

五种小麦麸皮烷基酚类化合物 体外抗肿瘤作用及初步的机制研究

汤卫国¹,管福琴²,赵友谊²,孙浩²,王鸣²,冯煦²,单宇^{1,2,*}

(1.金陵药业股份有限公司,江苏南京 210009;

2.江苏省中国科学院植物研究所/南京中山植物园,江苏南京 210014)

摘要:目的:观察小麦麸皮中5种烷基酚类成分对体外肿瘤细胞的抑制作用,并初步探讨其作用机制。方法:MTT法测定5种化合物对人结肠癌细胞株LoVo、人肝癌细胞株HepG2和人乳腺癌细胞株MDA-MB-231增殖的影响及半数抑制浓度 IC_{50} 。流式细胞仪检测5-十七烷基间苯二酚(5-heptadecylresorcinol)不同浓度对人结肠癌细胞株LoVo细胞周期的影响。结果:5-十七烷基间苯二酚对3种肿瘤细胞的增殖均有较强的抑制作用,5-十九烷基间苯二酚(5-nonadecylresorcinol)活性次之,其他化合物对肿瘤细胞的抑制作用较弱。5-十七烷基间苯二酚可将肿瘤细胞阻断于 G_2/M 期,进而抑制肿瘤细胞增殖。结论:小麦麸皮中5种烷基酚具有一定的抗肿瘤活性,其活性可能与侧链长短相关。5-十七烷基间苯二酚具有较好的体外抑瘤作用,是一种有潜力的抗癌先导化合物,值得进一步深入研究。

关键词:小麦麸皮,烷基酚,抗肿瘤,细胞周期

Experimental study on antitumor effects of five Alkylphenol from wheat bran and its preliminary mechanism

TANG Wei-guo¹, GUAN Fu-qin², ZHAO You-yi², SUN Hao², WANG Ming², FENG Xu², SHAN Yu^{1,2,*}

(1.Jinling Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210009, China; 2.Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences(Nanjing Botanical Garden, Mem.Sun Yat-Sen), Nanjing 210014, China)

Abstract: Objective: The aim of this study was to observe the inhibitory effect of five alkylphenols from wheat bran *in vitro*, and explore its mechanism. Method: The proliferation and IC_{50} of five compounds on LoVo, HepG2, MDA-MB-231 cancer cell lines were assayed by MTT method *in vitro*. Flow cytometry was applied to analyze the effect of cell cycle with different concentrations of 5-heptadecylresorcinol in LoVo cancer cell lines. Result: The inhibition effects of 5-heptadecylresorcinol on all three tumor cell lines were significant, and 5-nonadecylresorcinol took second place. The other compounds had less toxicity to all three tumor cell lines than 5-nonadecylresorcinol. 5-Heptadecylresorcinol could inhibit the proliferation of LoVo cells during G_2/M period. Conclusion: The antitumor activity of five alkylphenols may be related to its length of side chains. Our results showed that 5-heptadecylresorcinol possess good effects of inhibiting tumor cell proliferation *in vitro*. It may be a potential anti-cancer leading compound and need study further.

Key words: wheat bran; alkylphenol; antitumor activity; cell cycle

中图分类号: TS210.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)15-0352-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2014.15.069

植物中所含烷基酚类成分主要有抑菌、抗肿瘤、抗虫害等活性。植物烷基酚主要对酵母菌、链球菌、金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性的细菌生长有抑制作用^[1]。它对乳腺癌、结肠癌、肝癌、白血病等均有体外抑制作用^[2-4]。此外,烷基酚还可以代替农药防止蚜虫、菜青虫、红蜘蛛等昆虫,可减少化学农药的污染^[5]。另外,烷基酚还是某些重要酶的抑制剂,如酪

氨酸酶、15-脂肪氧合酶、磷脂酶、丙三醇-3-磷酸盐脱氢酶等^[6-7]。有研究表明,部分人工合成的烷基酚类化合物会对造成人体内分泌紊乱,干扰人体免疫系统以及产生肥胖^[8-9],但未见植物源烷基酚相关严重毒性报导。基于上述研究,学者们认为烷基酚可开发成新的功能性产品。

小麦中烷基酚类化合物主要是以5-烷基间苯二酚(5-alkylresorcinol)、5-烯基间苯二酚(5-alkenylresorcinol)、5-(2-氧代烷基)间苯二酚(5-(2-oxoalkyl)resorcinol)和5-(2-氧代烯基)间苯二酚(5-(2-oxoalkenyl)resorcinol)为类型的一系列同系物,同类同系物相互间仅相差若干个 CH_2 ^[10-12]。其

收稿日期:2013-12-16 *通讯联系人

作者简介:汤卫国(1963-),男,博士,高级工程师,研究方向:中药学。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31100251);江苏省自然科学基金(BK20131338)。

中 5-烷基间苯二酚(5-alkylresorcinol)同系物(C17:1、C19:1、C21:1、C23:1、C25:1)是小麦麸皮总烷基酚类物质的主要成分^[13]。研究表明小麦麸皮中烷基酚类化合物约占小麦麸皮总重量的 0.31%, 是一类比较丰富资源, 然而目前国内外尚没有对小麦麸皮烷基酚类成分药理活性进行研究, 因而难以对其进行科学合理的利用。

本研究应用细胞培养及 MTT 法体外检测五种主要小麦麸皮烷基酚类成分对人结肠癌细胞株 LoVo、人肝癌细胞株 HepG2 和人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的体外增殖抑制作用, 为小麦麸皮的综合利用提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

5-十七烷基间苯二酚(5-heptadecylresorcinol)、5-十九烷基间苯二酚(5-nonadecylresorcinol)、5-二十一烷基间苯二酚(5-heneicosylresorcinol)、5-二十三烷基间苯二酚(5-tricosylresorcinol)、5-二十五烷基间苯二酚(5-pentacosylresorcinol) 由本实验室研究制备。

RPMI 1640 培养基 GIBICO; 胎牛血清 Hyclone; DMSO Amresco; MTT Amresco; 乙醇 分析纯, 上海久亿化学有限公司; 硅胶 浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂; 氟尿嘧啶 上海徐东海普药业有限公司。

人结肠癌细胞株 LoVo、人肝癌细胞株 HepG2 和人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 均购自上海药物所, 由江苏省中科院植物研究所药理室接种保存。

Infinite M200 酶标仪 TECAN 公司; 5804R 冷冻离心机 Eppendorf 公司; LIBROR AEL-200 电子天平 Shimadzu 公司; R-210 旋转蒸发器 Buchi 公司; IX51 倒置显微镜 Olympus 公司; Napco 6500 二氧化碳培养箱 Thermo 公司; Napflow 1200 生物安全柜 Thermo 公司; 流式细胞仪 Accuri C6 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 细胞接种后, 加含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 置于 5% CO₂, 37℃ 恒温培养箱中培养, 每 72h 换培养液 1 次。当细胞生长至培养瓶 80%~90% 密度时, 细胞传代。

1.2.2 MTT 法 取处于指数生长期状态良好的肿瘤细胞 1 瓶, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化液, 使贴壁细胞消化脱落, 计数 5×10^4 个/mL, 制成细胞悬液。取细胞悬液接种于 96 孔板上, 100 μ L/孔, 置恒温 CO₂ 培养箱中培养 24h。换液, 加入受试药物或阳性对照(氟尿嘧啶), 培养 72h。将 5mg/mL MTT 加入 96 孔板中, 10 μ L/孔, 培养箱中反应 4h。吸去上清液, 加入 DMSO, 100 μ L/孔, 振荡 5min, 用酶标仪在波长为 570nm 处测定每孔吸光值并计算细胞抑制率。

抑制率(%) = $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{用药组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{调零孔}}) \times 100$

1.2.3 细胞周期的检测 取处于对数生长期的 LoVo 结肠癌细胞, 常规消化, 制成单细胞悬液, 计数, 以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中, 血清饥饿 24h 后, 分别加入不同浓度的受试药(终浓度分别为 10、20、

40 μ g/mL), 常规培养 24h; 收获细胞于 15mL 离心管中, 制成单细胞悬液, 1000r/min 离心 5min, 弃上清; 以预冷 PBS 漂洗 2 次, 沿管壁缓慢加入 70% 的预冷乙醇固定, 4℃ 过夜; 离心, PBS 漂洗去乙醇, 加入 20mg/L RNA 酶 1mL, 37℃ 孵育 30min, 加入 50mg/L 碘化丙啶 1mL 标记, 4℃ 避光静置 1h, 上流式细胞仪进行检测分析, 采用 BD Accuri C6 Software 软件获取数据并分析数据。

1.2.4 统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA); 组间比较采用 t 检验; $p < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 MTT 法测定 5 种化合物体外抑瘤作用

不同浓度 5 种化合物分别作用于人结肠癌细胞株 LoVo、人肝癌细胞株 HepG2 和人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞 72h。在实验所设浓度范围内, 5 种化合物对本实验用肿瘤细胞有不同程度的抑制作用, 以 5-十七烷基间苯二酚(5-heptadecylresorcinol) 作用最显著, 且呈明显的量效关系。5-十七烷基间苯二酚 LoVo、HepG2、MDA-MB-231 的半数抑制浓度 IC₅₀ 分别为 43.09、53.65、45.82 μ g/mL。其次是 5-十九烷基间苯二酚(5-nonadecylresorcinol), 其对 LoVo 细胞的毒性较大, IC₅₀ 达到 59.57 μ g/mL, 对 HepG2、MDA-MB-231 细胞抑制作用较弱, IC₅₀ 分别为 70.03、70.33 μ g/mL。5-二十五烷基间苯二酚(5-heneicosylresorcinol) 高浓度对三种肿瘤细胞株有一定的抑制活性, 但 IC₅₀ 均超过 100 μ g/mL; 5-二十三烷基间苯二酚(5-tricosylresorcinol)、5-二十一烷基间苯二酚(5-pentacosylresorcinol) 对 3 种细胞的抑制效果均不明显。见表 1~表 3。

比较五种小麦麸皮烷基酚类化合物间对三种癌细胞体外生长的抑制活性差异时, 发现在同等浓度下, 五种样品活性按烷基键长短呈现先降后升的趋势, 见图 1。

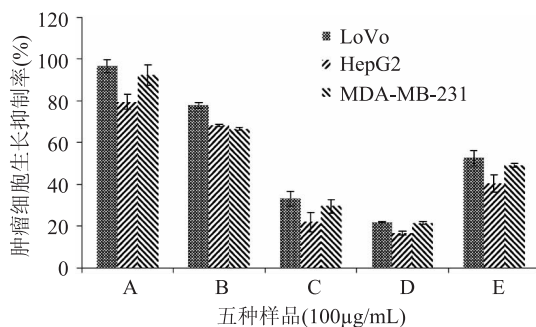


图1 五种样品对三种肿瘤细胞生长的抑制率

Fig.1 Inhibitory ratio of five alkylphenol from wheat bran on the proliferation of three cancer cells

注: A: 5-十七烷基间苯二酚, B: 5-十九烷基间苯二酚, C: 5-二十一烷基间苯二酚, D: 5-二十三烷基间苯二酚, E: 5-二十五烷基间苯二酚。

2.2 5-十七烷基间苯二酚对 LoVo 细胞周期的影响

鉴于五种化合物中 5-十七烷基间苯二酚抑制肿瘤活性最高, 通过流式细胞术分析了其对 LoVo 细胞

表1 5种小麦麸皮烷基酚类化合物对 LoVo 的体外生长抑制作用($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 Inhibitory effects of five alkylphenol from wheat bran on the proliferation of LoVo cells($\bar{x} \pm s, \%$)

样品名称	样品浓度($\mu\text{g/mL}$)				
	100	50	25	12.5	6.25
5-十七烷基间苯二酚	96.46 $\pm$ 3.07 **	52.88 $\pm$ 0.16 **	20.95 $\pm$ 0.21 *	15.12 $\pm$ 4.97 *	7.91 $\pm$ 0.96
5-十九烷基间苯二酚	77.74 $\pm$ 1.30 **	33.19 $\pm$ 1.05 *	22.10 $\pm$ 4.20 *	9.77 $\pm$ 2.76	6.93 $\pm$ 4.77
5-二十一烷基间苯二酚	33.06 $\pm$ 3.53 *	17.55 $\pm$ 0.77 *	15.41 $\pm$ 3.42	9.41 $\pm$ 1.73	3.15 $\pm$ 1.18
5-二十三烷基间苯二酚	21.79 $\pm$ 0.39 *	16.26 $\pm$ 0.38	13.88 $\pm$ 3.44	2.52 $\pm$ 1.03	1.28 $\pm$ 0.44
5-二十五烷基间苯二酚	52.62 $\pm$ 3.63 **	37.30 $\pm$ 3.15 **	16.19 $\pm$ 0.38 *	6.78 $\pm$ 1.96	4.80 $\pm$ 2.64

注:与对照组比 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,表2~表4同。

表2 5种小麦麸皮烷基酚类化合物对 HepG2 的体外生长抑制作用($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 2 Inhibitory effects of five alkylphenol from wheat bran on the proliferation of HepG2 cells($\bar{x} \pm s, \%$)

样品名称	样品浓度($\mu\text{g/mL}$)				
	100	50	25	12.5	6.25
5-十七烷基间苯二酚	79.43 $\pm$ 3.62 **	43.54 $\pm$ 3.63 **	17.43 $\pm$ 3.05 *	13.34 $\pm$ 4.69 *	7.20 $\pm$ 1.44
5-十九烷基间苯二酚	68.25 $\pm$ 0.54 **	29.90 $\pm$ 2.87 *	18.41 $\pm$ 1.37 *	9.20 $\pm$ 4.56	7.20 $\pm$ 0.89
5-二十一烷基间苯二酚	21.85 $\pm$ 4.84 *	10.24 $\pm$ 4.86	4.36 $\pm$ 0.39	2.90 $\pm$ 3.05	0.71 $\pm$ 4.77
5-二十三烷基间苯二酚	16.71 $\pm$ 0.95 *	12.39 $\pm$ 3.79	8.34 $\pm$ 3.41	6.86 $\pm$ 4.10	3.26 $\pm$ 3.80
5-二十五烷基间苯二酚	40.40 $\pm$ 4.18 **	13.11 $\pm$ 4.01 *	5.91 $\pm$ 1.52	2.77 $\pm$ 2.03	1.79 $\pm$ 0.66

表3 5种小麦麸皮烷基酚类化合物对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的体外生长抑制作用($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 3 Inhibitory effects of five alkylphenol from wheat bran on the proliferation of MDA-MB-231 cells($\bar{x} \pm s, \%$)

样品名称	样品浓度($\mu\text{g/mL}$)				
	100	50	25	12.5	6.25
5-十七烷基间苯二酚	92.39 $\pm$ 4.85 **	54.72 $\pm$ 4.63 **	15.74 $\pm$ 2.51 *	5.15 $\pm$ 4.18	3.95 $\pm$ 0.79
5-十九烷基间苯二酚	66.44 $\pm$ 0.64 **	32.14 $\pm$ 2.11 *	17.9 $\pm$ 0.79 *	7.01 $\pm$ 4.57	2.16 $\pm$ 0.23
5-二十一烷基间苯二酚	29.53 $\pm$ 3.22 *	16.78 $\pm$ 0.27 *	11.99 $\pm$ 0.32	7.68 $\pm$ 4.08	1.97 $\pm$ 1.57
5-二十三烷基间苯二酚	21.4 $\pm$ 0.67 *	15.88 $\pm$ 0.61 *	10.44 $\pm$ 2.68	1.49 $\pm$ 3.14	0.84 $\pm$ 4.38
5-二十五烷基间苯二酚	48.99 $\pm$ 0.83 **	34.15 $\pm$ 1.90 **	15.81 $\pm$ 3.97 *	4.82 $\pm$ 2.04	2.16 $\pm$ 0.54

表4 5-十七烷基间苯二酚对结肠癌细胞 LoVo 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effecton of 5-heptadecylresorcinol on the LoVo cell cycle($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量($\mu\text{g/mL}$)	细胞周期比率($\%$)		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
5-十七烷基间苯二酚	40	52.11 $\pm$ 3.53 *	20.35 $\pm$ 2.64 **	26.64 $\pm$ 2.31 **
	20	55.39 $\pm$ 7.87 *	17.31 $\pm$ 3.20 *	26.30 $\pm$ 3.67 **
	10	61.95 $\pm$ 6.33	13.72 $\pm$ 6.07	23.53 $\pm$ 2.72 *
对照	-	69.81 $\pm$ 3.06	11.19 $\pm$ 4.02	18.00 $\pm$ 2.17

周期的影响,初步探讨其抗肿瘤的作用机制。与对照组相比,5-十七烷基间苯二酚 40 $\mu\text{g/mL}$ 可使 G₀/G₁期细胞数目显著减少,S 期、G₂/M 期细胞数显著增加,出现 G₂/M 期阻滞($p < 0.01$)(图2,表4)。

3 结论与讨论

MTT 法实验结果表明,五种小麦麸皮烷基酚类化合物均对人结肠癌细胞株 LoVo、人肝癌细胞株 HepG2 和人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞增殖有抑制作用,抑制率随样品浓度的增加而增大,小麦麸皮烷基酚类成分具有一定程度的抗肿瘤作用,但要确切了解其抗肿瘤效果,尚须进一步做体内外抑瘤实验。

整体比较五种小麦麸皮烷基酚类化合物对三种癌细胞体外生长的抑制活性,发现五种样品活性按

烷基键长短基本呈现先降后升的规律。Kubo^[14]也曾发现槲鞣酸侧链长度与抑菌效果有关,槲鞣酸水杨酸衍生物对痤疮丙酸杆菌的抑菌活性随侧链长度的增加而增强,当侧链长度达到 12 个碳时,其抑菌活性达到最大;经过此峰后,抑菌活性又随侧链长度的增加而降低。因此我们认为烷基酚活性作用的机制可能和该类分子的亲水和亲脂的比例有关,这种推测需要进一步的实验证实。这种规律也给我们另一个启示,是否拥有更短或更长侧链的 5-烷基间苯二酚化合物具有更强的抑制癌症生长的活性,这需要后续实验去验证。

IC₅₀ 数据显示,5-十七烷基间苯二酚(5-heptadecylresorcinol)在五种小麦麸皮烷基酚类化合物中活性最为显著,对 LoVo、HepG2、MDA-MB-

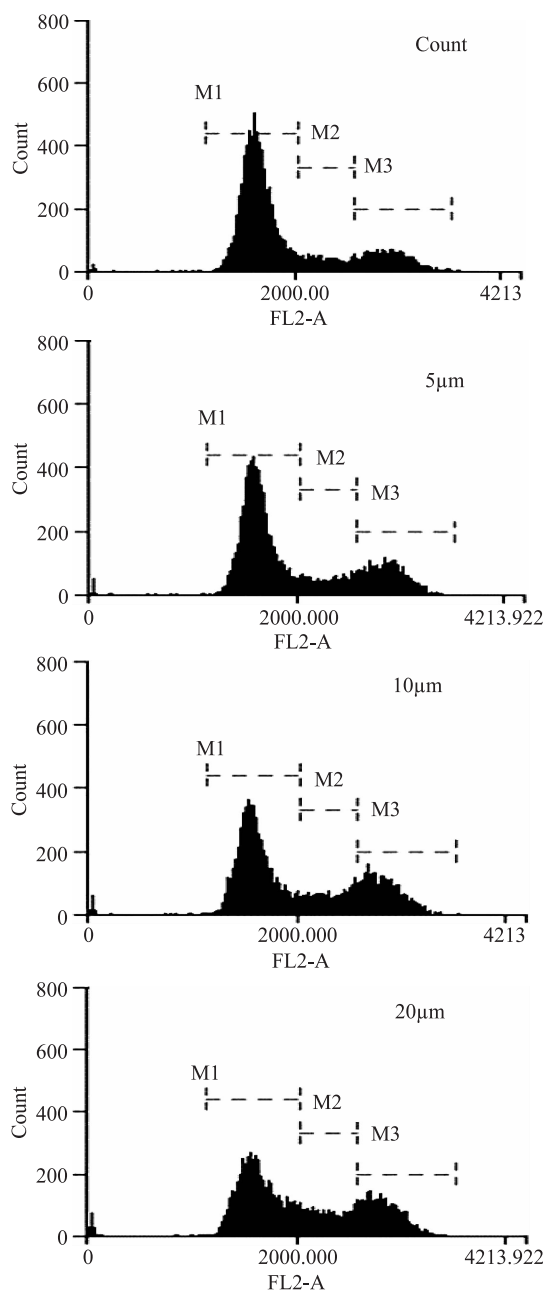


图2 5-十七烷基间苯二酚
对结肠癌细胞 LoVo 细胞周期的影响
Fig.2 Effect of 5-heptadecylresorcinol
on the LoVo cell cycle
注:M1:G₀/G₁期;M2:S期;M3:G₂/M期。

231 的半数抑制浓度 IC₅₀ 分别为 43.09、53.65、45.82 μg/mL,具有一定的应用前景。流式细胞术研究表明,5-heptadecylresorcinol 可有效影响肿瘤细胞的细胞周期,可将 LoVo 细胞阻断于 G₂/M,其抗肿瘤

作用机制值得重点关注和深入研究。

参考文献

- [1] Jaggy H, Koch E. Chemistry and biology of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L[J]. Pharmazie, 1997, 52(10): 735-738.
- [2] Zhu GY, Wong BC, Lu A, et al. Alkylphenols from the roots of *Ardisia brevicaulis* induce G1 arrest and apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway in human non-small-cell lung cancer cells[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2012, 60(8): 1029-36.
- [3] Tanaka A, Arai Y, Kim SN, et al. Synthesis and biological evaluation of bilobol and adipostatin A[J]. J Asian Nat Prod Res, 2011, 13(4): 290-296.
- [4] Kubo I, Ochi M, Vieira C P. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice [J]. J Agric Food Chem, 1993, 41(8): 1012-1015.
- [5] Grazzini R, Hesk D, Heininger E. Inhibition of lipoxygenase and postaglandin endoperoxide synthase by anacardicacids [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 176(2): 775-780.
- [6] Kubo I, Kinst-Hori I, Yokokawa Y. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits [J]. J Nat Prod, 1994, 57(4): 545-551.
- [7] 杨小明, 陈钧, 钱之玉. 烷基酚酸的生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(5): 附4-5.
- [8] Hung CH, Yang SN, Wang YF, et al. Environmental alkylphenols modulate cytokine expression in plasmacytoid dendritic cells [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73534.
- [9] Pereira-Fernandes A, Demagdt H, Vandermeiren K, et al. Evaluation of a screening system for obesogenic compounds; screening of endocrine disrupting compounds and evaluation of the PPAR dependency of the effect [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77481.
- [10] Wenkert E, Loeser EM, Mahapatra S. Wheat bran phenols [J]. J Org Chem, 1964, 29: 435-440.
- [11] Gohil S, Pettersson D, Salomonsson AC. Analysis of alkenylresorcinols in triticale, wheat and rye [J]. J Sci Food Agric, 1988, 45: 43-52.
- [12] Seitz LM. Identification of 5-(2-oxoalkyl) resorcinols and 5-(2-oxoalkenyl) resorcinols in wheat and rye grains [J]. J Agric Food Chem, 1992, 40(8): 1541-1546.
- [13] 冯煦, 姜东, 单宇, 等. 小麦麸皮的化学成分 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 27-29.
- [14] Kubo I, Muroi H, Himejima M. Structure - antibacterial activity relationship of anacardic acids [J]. J Agric Food Chem, 1993, 41(7): 1016-1019.