论著

文章编号:1000-5404(2011)10-0988-03

# 桑葚花色苷的提取及对人乳腺癌细胞株MDA-MB-453生长的抑制

王 湛[1],付钰洁[1,2],常 徽[1],赵长君[1],糜漫天[1] (400038 重庆,第三军医大学营养与食品安全研究中心,重庆市营养与食品安全重点实验室[1];400050 重庆,重庆理工大学药学与生物工程学院[2])

【摘要】 **目的** 以超声辅助乙醇浸提法提取桑葚花色苷,观察其对人乳腺癌细胞株MDA-MB-453体内外生长的抑制作用。**方法** 将桑葚冷冻干燥,冷冻干粉于常温下用70%乙醇以1∶15的料液比超声提取1 h,提取液采用Amberlite™ XAD7HP型大孔吸附树脂以1 ml/min的吸附流速和1 ml/min的洗脱流速在pH 3.0酸性环境下纯化,得到桑葚花色苷提取物。利用CCK-8法检测不同浓度桑葚花色苷提取物(50、100、150、200 mg/ml)对人乳腺癌细胞MDA-MB-453增殖活力的影响;以24只雌性BALB/c裸鼠建立MDA-MB-453细胞移植瘤模型,随机分为对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,分别以0、50、100、200 mg/(kg·d)的桑葚花色苷提取物膳食干预,检测其对肿瘤生长的影响。**结果** 获得花色苷含量为(41.8±4.8)%的桑葚花色苷提取物;CCK-8法检测发现桑葚花色苷提取物可显著降低乳腺癌细胞活力,并显示剂量-效应关系[50、100、150、200 mg/ml桑葚花色苷提取物处理组抑制率分别为(14.8±1.8)%、(29.8±2.2)%、(33.0±2.7)%、(44.3±3.8)%];体内实验发现,高剂量组和中剂量组移植瘤体积和质量均显著低于对照组[体积抑制率分别为(55.5±4.8)%、(39.3±3.2)%;质量抑制率分别为(51.6±4.2)%、(38.9±3.1)%],表明桑葚花色苷提取物膳食干预可有效抑制移植瘤的生长。**结论** 桑葚花色苷提取物能够显著抑制人乳腺癌细胞株MDA-MB-453的生长。

【关键词】 桑葚花色苷;乳腺癌;移植瘤;MDA-MB-453
【中图法分类号】 R151.3;R737.9;R730.59 【文献标志码】 A

# Inhibitory effect of anthocyanin extract of mulberry fruit on growth of breast cancer MDA-MB-453 cells

Wang Zhan[1], Fu Yujie[1,2], Chang Hui[1], Zhao Changjun[1], Mi Mantian[1] ([1]Department of Nutrition and Food Hygiene, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing, 400050, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the extraction of anthocyanins from mulberry fruits and to observe their inhibitory effect on the growth of human breast cancer MDA-MB-453 cells *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Freeze-dried mulberry fruit powder was subjected to ultrasonic extraction with 70% ethanol at a material-to-liquid ratio of 1∶15 for 1 h. The extract solution was purified by Amberlite™ XAD7HP resin in pH 3.0 acidic environment, at an adsorption flow rate 1 ml/min and an elution flow rate 1 ml/min, to obtain an anthocyanin-containing extract. The inhibition of the anthocyanin-containing extract on MDA-MB-453 cell viability was detected by CCK-8 assay. Twenty-four female BALB/c nude mice were injected with MDA-MB-453 cells to establish a transplanted tumor model. The mice were then randomized into 4 groups: a control group, a low dose group, a middle dose group and a high dose group and the treated with the anthocyanin-containing extract at 0, 50, 100, and 200 mg/(kg·d), respectively. Tumor volume was measured every four days, and tumor weight was measured on the 28th day. **Results** The average content of anthocyanins in the mulberry fruit extract was 41.8%. CCK-8 assay indicated that the anthocyanin-containing mulberry fruit extract reduced breast cell viability markedly, exhibiting a dose-effect relationship [(14.8±1.8)%, (29.8±2.2)%, (33.0±2.7)%, (44.3±3.8)%, respectively]. Tumors in the high dose and middle dose groups were significantly smaller [(55.5±4.8)% and (39.3±3.2)%] and lighter [(51.6±4.2)% and (38.9±3.1)%] than those in the control group, indicating growth inhibition of the transplanted tumors. **Conclusion** The anthocyanin-containing mulberry fruit extract can significantly inhibit the growth of human breast cancer MDA-MB-453 cells.

【**Key words**】 mulberry fruit anthocyanin extract; breast cancer; transplanted tumor; MDA-MB-453

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30901194). Corresponding author: Mi Mantian, 86-23-68752292, E-mail: mimt2007@126.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30901194)
【通信作者】 糜漫天,电话:(023)68752292,E-mail:mimt2007@126.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,极大的威胁着女性的生命健康,探讨通过膳食途径防治乳腺癌是一项有意义的课题。花色苷是一类广泛存在于蔬菜、水果等食物中的天然色素,属植物黄酮化合物。流行病学调查和实验研究证实膳食花色苷化合物具有抗氧化、抗炎症、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化等广泛、优良的生物学效应,特别是其抗肿瘤活性,以其天然、低毒、高效而备受关注[1-3]。桑葚花色苷(mulberry anthocyanins)是天然存在于桑葚中的一类花色苷类物质。研究表明,成熟桑葚含有丰富的花色苷化合物[4],但其提取和纯化方法尚缺乏研究。本实验探讨桑葚花色苷的提取和纯化方法,并通过体内外实验观察桑葚花色苷提取物对人乳腺癌细胞株MDA-MB-453生长的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

桑葚来自重庆产8632果桑品种。6~8周龄健康雌性BALB/c裸鼠24只,体质量15~20 g,由第三军医大学实验动物中心提供[scxk(军)2007015],并饲养于其SPF动物实验室。裸鼠依照完全随机设计原则均分为对照组,桑葚花色苷低、中、高剂量处理组4个组,每组6只动物。改良型RPMI1640培养基购自美国Hyclone公司,标准胎牛血清购自天津TBD公司,CCK-8购于日本株式会社同仁化学研究所。人乳腺癌细胞株MDA-MB-453购自中科院上海细胞所,在37 ℃、5% $CO_2$条件下正常培养于含10%标准胎牛血清的RPMI1640培养基中。

### 1.2 方法

1.2.1 提取与纯化 将桑葚干粉溶于70%酸化乙醇中,超声提取1 h后5 000 r/min×10 min离心,取上清液(果渣存留于下一次超声提取,可反复提取3次),真空抽滤后用旋转蒸发器旋蒸去乙醇,再用石油醚萃取3次去脂类,最后再真空抽滤保证提取液无颗粒杂质。最终得到桑葚花色苷粗提物。将经过酸化的花色苷提取物导入Amberlite™ XAD7HP型大孔吸附树脂柱中,流速1 ml/min,树脂完全吸附后用上样液50倍体积的酸化水冲洗,流速2 ml/min,再用80%酸化乙醇洗脱,流速1 ml/min,当柱中流出液体不透光时用烧杯接入,直至液体开始透光后停止。将此溶液旋转蒸发后装入培养皿中,冷藏于-80 ℃冰箱冷冻2 h后放入冷冻干燥机冻成干粉。

1.2.2 pH示差法检测花色苷总含量 称取0.1 g桑葚花色苷提取物,分别用pH 1.0和pH 4.5的缓冲液配制成0.01 g/ml溶液,-4 ℃冷冻离心,取上清液。设置空白对照组(蒸馏水),pH 1.0溶液组,pH 4.5溶液组,检测各组520、700 nm波长下的光密度值,根据Wrolstad等[5]推导的公式计算:花色苷含量(%,质量比)=(A/εL)×MW×DF×V/Wt×100。式中A为光密度值,$A=(A_{520}-A_{700})_{pH\ 1.0}-(A_{520}-A_{700})_{pH\ 4.5}$;ε为消光系数,DF为稀释因子,MW为矢车菊花素-3-葡萄糖苷的分子量(449.2),V为最终体积(1.0 ml),Wt为产品质量(0.01 g),L为光程(1.0 cm)。

1.2.3 CCK-8法检测桑葚花色苷对乳腺癌细胞活力的影响 将对数生长期的MDA-MB-453肿瘤细胞以$2.5\times10^5$/ml接种于96孔培养板,每孔200 μl,共6组,每组6个平行孔,培养过夜,分别加入不同剂量花色苷提取物,使其终浓度分别为200、150、100、50 mg/ml,对照组加等量蒸馏水,培养24 h,每孔加入10 μl CCK-8培养4 h收获细胞,酶标仪检测450 nm处光密度值[$D$(450)],以蒸馏水空白调零。抑制率=[对照$D$(450)-实验组$D$(450)]/对照$D$(450)×100%

1.2.4 裸鼠移植瘤模型的制造及处理 收集处于对数生长期的MDA-MB-453细胞,PBS漂洗2遍,以不含血清的RPMI1640培养基重悬细胞,调整细胞数至$1\times10^7$/ml,每只裸鼠右肩胛皮下注射0.1 ml,同时开始给予处理因素。桑葚花色苷高、中、低剂量组分别以200、100、50 mg/(kg·d)桑葚花色苷提取物灌胃,对照组以等量的无菌蒸馏水灌胃处理,共处理28 d。每4天测量1次裸鼠体质量和肿瘤体积。使用游标卡尺测量肿瘤的最长径(a)和最短径(b),按公式求出肿瘤体积:$V=ab^2/2$。

### 1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析,两组间差异比较采用$t$检验。

## 2 结果

### 2.1 桑葚花色苷提取物获得的花色苷含量

经过超声波辅助乙醇浸提法得到桑葚花色苷粗提物,再经过树脂吸附、洗脱,旋转蒸发和冷冻干燥,得到纯化的桑葚花色苷提取物。利用pH示差法测定桑葚花色苷提取物中花色苷的总含量为(41.8±4.8)%。

### 2.2 桑葚花色苷提取物对乳腺癌细胞活力的影响

相对于对照组,桑葚花色苷提取物作用各组光密度值下降,且随作用剂量增加下降程度增加,100 mg/ml及以上剂量作用组与对照组相比出现显著性差异(表1)。表明桑葚花色苷提取物可显著降低乳腺癌MDA-MB-453细胞增殖活力,并呈现剂量-效应关系。

**表1 CCK-8法检测桑葚花色苷对乳腺癌细胞活力的影响($n=6$,$\bar{x}\pm s$)**

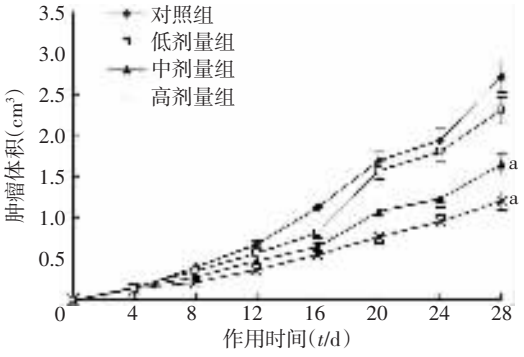
| 组别 | | $D$(450) | 抑制率(%) |
|---|---|---|---|
| 对照组 | | 0.584±0.121 | - |
| 桑葚花色苷提取物组(mg/ml) | 50 | 0.497±0.044 | 14.8±1.8 |
| | 100 | 0.410±0.034[a] | 29.8±2.2 |
| | 150 | 0.391±0.034[a] | 33.0±2.7 |
| | 200 | 0.325±0.037[b] | 44.3±3.8 |

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

### 2.3 桑葚花色苷提取物对裸鼠移植瘤生长的影响

BALB/c裸鼠接种乳腺癌MDA-MB-453细胞4 d后形成皮下包块,成瘤率100%,各组间成瘤时间及成瘤率均无显著差异。饲养期间动物生长状态良好,未见明显的毒副作用。至观察终点时,各组动物体质量无显著性差异。桑葚花色苷提取物膳食干预3组移植瘤生长速度均低于对照组,表现为移植瘤体积均低于对照组(图1);处理28 d后,对照组及低、中、高剂量组移植瘤质量分别为(3.06±0.27)、(2.59±0.26)、(1.87±0.17)、(1.48±0.16) g,高、中剂量组移植瘤质量和体积均显著低于对照组($P<0.05$),其中高、中剂量组移植瘤体积抑制率分别为(55.5±4.8)%、(39.3±3.2)%,质量抑制率分别为(51.6±4.2)%、(38.9±3.1)%。表明桑葚花色苷提取物膳食

干预可显著抑制乳腺癌移植瘤的生长。




a：$P<0.05$，与对照组比较

**图1 桑葚花色苷提取物膳食干预对裸鼠移植瘤生长的抑制作用**

## 3 讨论

花色苷化合物是人类日常膳食中一类较为重要的食物成分，是植物黄酮类化合物中的一种。在西方膳食结构中，美国成年人膳食中花色苷类化合物每人每日平均摄入量约为100 mg[6-7]，我国传统膳食结构以植物性食物为主，近些年虽然膳食结构向增加动物性食物发展，但相比西方膳食仍是植物性食物比例较高，因此对于我国现阶段的膳食结构，花色苷化合物的摄入量应高于美国膳食。

膳食、营养与肿瘤的关系近年来备受关注[8-9]。从食物中提取天然化合物进而寻找有效的抗肿瘤活性物质，一直是国内外研究的一个热点。现代医学研究表明[10-11]，桑葚具有增强免疫功能，促进造血细胞的生长，预防动脉粥样硬化，促进新陈代谢等作用，具有一定的药理学价值。成熟桑葚含有丰富的花色苷物质，花色苷类化合物对肿瘤具有较强的防治作用，其机制涉及抗氧化、抑制瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡以及抗血管生成等诸多方面。桑葚花色苷的提取尚缺乏研究。本研究采用超声波辅助乙醇萃取法提取桑葚花色苷，并通过树脂纯化，获得了花色苷提取物，经检测花色苷平均含量为41.8%。

桑葚花色苷是否具有抗肿瘤活性尚少见报道。本实验在提取获得桑葚花色苷的基础上，进一步观察了其对乳腺癌细胞的体内外作用。体内、体外实验表明，桑葚花色苷提取物可显著抑制乳腺癌细胞MDA-MB-453的增殖生长，发挥抗乳腺癌作用。为进一步研究桑葚的药理学活性提供了一定参考。桑葚花色苷提取物中其化合物的类型、分子结构等尚不清楚，这将是本课题组下一步研究的重点。

本研究显示，桑葚花色苷提取物可显著抑制HER-2/neu高表达MDA-MB-453乳腺癌细胞的生长，其机制可能涉及对细胞增殖信号的抑制作用。HER-2/neu是自身具有酪氨酸蛋白激酶活性的生长因子受体，其所属的EGFR家族成员（EGFR、erbB-3和erbB-4）均为跨膜糖蛋白，在细胞信号转导中发挥重要作用，是细胞生长、分化及存活的重要调节者。HER-2/neu信号的活化可通过Ras/Raf/MEK信号通路，激活ERK-1/-2或MAPK，ERK-1/-2活化后转运至细胞核，激活一系列目标蛋白（如NF-kB），并最终促进DNA合成和细胞增殖。研究表明，花色苷物质可抑制肿瘤细胞EGFR/Ras/MAPK（ERK-1/-2）信号通路，从而抑制肿瘤细胞增殖信号的转导，如抑制促血管生成相关因子（包括VEGF、MMP-2/-9和uPA）的表达等[12-14]。桑葚花色苷提取物是否通过此机制发挥抗乳腺癌作用需要进一步验证。

## 参考文献：

[1] Faria A, Pestana D, Teixeira D, *et al*. Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: anticancer properties in breast cancer cell lines [J]. Phytother Res, 2010, 24(12): 1862-1869.

[2] 常徽，糜漫天，顾艳艳，等. 3，6-二羟基黄酮对多种肿瘤细胞的增殖抑制及调亡诱导作用. 第三军医大学学报，2009，31(16)：1566-1568.

[3] Lee Y K, Lee W S, Kim G S, *et al*. Anthocyanins are novel AMPKα1 stimulators that suppress tumor growth by inhibiting mTOR phosphorylation[J]. Oncol Rep, 2010, 24(6): 1471-1477.

[4] 霍琳琳，苏平，吕英华. 分光光度法测定桑葚总花色苷含量的研究[J]. 酿酒，2005，32(4)：88-89.

[5] Wrolstad R E, Durst R W, Lee J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products[J]. Trend Food Sci Technol, 2005, 16(9): 423-428.

[6] Chun O K, Chung S J, Song W O. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U. S. adults[J]. J Nutr, 2007, 137(5): 1244-1252.

[7] Song W O, Chun O K, Chung S. Tea Consumption is a determinant of flavonoid intake among US adults[J]. J Am Diet Assoc, 2006, 106(8): A80-A83.

[8] Chrubasik C, Li G, Chrubasik S. The clinical effectiveness of chokeberry: a systematic review[J]. Phytother Res, 2010, 24(8): 1107-1114.

[9] 于斌，余小平，易龙，等. 黑米花青素对HER-2/neu高表达人乳腺癌细胞株MDA-MB-453移植瘤血管生成的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(22)：2206-2208.

[10] 李冬香，陈清西. 桑葚功能成份及其开发利用研究进展[J]. 中国农学通报，2009，25(24)：293-297.

[11] 王晓杨，张媛，张志琴，等. 桑葚提取物对实验性高脂血症预防作用的研究[J]. 心血管康复医学杂志，2009，18(5)：494-497.

[12] 易龙，陈春烨，金鑫，等. 花色苷类植物化学物抑制血管内皮细胞氧化应激损伤作用的结构-效应关系研究[J]. 第三军医大学学报，2009，31(21)：2046-2049.

[13] Chang H, Mi M, Ling W, *et al*. Structurally related cytotoxic effects of flavonoids on human cancer cells *in vitro*[J]. Arch Pharm Res, 2008, 31(9): 1137-1144.

[14] Liu J, Zhang W, Jing H, *et al*. Bog bilberry (Vaccinium uliginosum L.) extract reduces cultured Hep-G2, Caco-2, and 3T3-L1 cell viability, affects cell cycle progression, and has variable effects on membrane permeability[J]. J Food Sci, 2010, 75(3): H103-H107.

（收稿 2010-12-03 修回 2011-03-09）

（编辑 汪勤俭）