

文冠果种仁总皂苷的抗氧化及抗肝癌活性初探

张志宇,王珂,李涵,刘俊义,邓红*,齐娜

陕西师范大学食品工程与营养科学学院,西安 710119

摘要:本文研究了文冠果种仁总皂苷的体外抗氧化活性及其对人肝癌 HepG2 细胞的抑制增殖和诱导凋亡作用,为后续文冠果种仁皂苷单体活性研究提供依据。首先通过定性试验证明了所提取的种仁总皂苷为三萜皂苷类物质,浓度为 520 ± 19.1 mg/g。其次以 Vc 作阳性对照,研究文冠果种仁总皂苷的抗氧化活性,结果证明其还原能力强于 Vc,而其清除 DPPH 自由基的能力比 Vc 要弱。最后采用 MTT 试验评价皂苷的抗癌活性,结果发现皂苷处理时间为 24 h 的 IC_{50} 是 9.7 ± 0.39 mg/L;细胞形态学和荧光染色证明了其对 HepG2 细胞具有凋亡诱导作用,流式细胞仪试验表明癌细胞的晚期凋亡作用可能集中于细胞周期的 S 期。该试验结果为进一步探索文冠果种仁皂苷的生物活性机理提供理论和试验基础。

关键词:文冠果种仁;总皂苷;抗氧化活性;HepG2 细胞;细胞凋亡

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.7.005

Antioxidant and Anti-hepatoma Activities of Total Saponins from Kernel of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge

ZHANG Zhi-yu, WANG Ke, LI Han, LIU Jun-yi, DENG Hong*, QI Na

College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 71006, China

Abstract: In this study, the antioxidant activity *in vitro* of total saponins in kernel of *Xanthoceras sorbifolia* bunge and the inhibition of proliferation and apoptosis on HepG2 cells were studied. Firstly, the contents of extract was proved to contain triterpenoid saponin with the concentration of 520 ± 19.1 mg/g. Secondly, using vitamin C as a positive control, the antioxidant activity *in vitro* of total saponins was investigated. The results showed that the reducing power of total saponins in *X. sorbifolia* kernels was stronger than that of Vc, but the scavenging ability of DPPH free radical was weaker than that of Vc. Finally, the anti-cancer activity of saponins was evaluated with MTT assay. It was found that the optimal processing time was 24 h and IC_{50} of total saponins was 9.7 ± 0.39 mg/L in the inhibition of total saponins on HepG2 cells. The induced-apoptosis effect of total saponins on HepG2 cells was proved by cell morphology and fluorescence staining method. The flow cytometry experiments showed that HepG2 cells apoptosis was happened at later period of cell life and this apoptosis effect may be concentrated in S phase of the cell cycle.

Key words: *Xanthoceras sorbifolia* kernels; total saponins; antioxidant activity; HepG2 cells; cell apoptosis

文冠果 (*Xanthoceras sorbifolia* bunge) 是无患子科 (*Sapindaceae*) 文冠果属 (*Xanthoceras*) 植物,因其具有耐寒、耐旱,病虫害少等特点,在北方各省分布广泛,它是中国特有的具有极高经济价值的木本油料植物^[1,2],目前其全国栽培面积约有 200 万亩^[3]。随着研究的不断深入,人们发现文冠果是集食用、生态、药用、环保、观赏、木材、生物质能于一体的落叶乔木,具有很好的开发前途。据报道,文冠果的根、

茎、叶、果实等不同部位含有大量的生物活性成分,具有抗炎、改善记忆、抗肿瘤、抗病毒等多种功效^[4,6]。尤其是文冠果种仁中除含有高达 55% ~ 70% 的油脂之外,还有皂苷、甾醇、维生素等多种活性成分^[7]。

现在文冠果的开发利用主要集中在制取食用油脂或生物柴油^[8,9],但榨油后会产生大量的饼粕,而对饼粕的利用很少,对种仁榨油饼粕中皂苷的研究更是空白。现有的皂苷研究多集中于文冠果果壳^[10]、叶^[11]、根茎^[12]、花^[13]等,而对种仁中皂苷成分的研究很少。皂苷是一种糖衍生物,具有抗氧化、抗病毒、抗菌、降血糖等生物活性,由于其结构的复

收稿日期:2016-03-28 接受日期:2016-05-18

基金项目:陕西省自然科学基金(2013JM4036);农业部产业体系项目(CARS-28)

* 通讯作者 Tel:86-29-85310517; E-mail: hongden@snnu.edu.cn

杂性,不同来源和类型的皂苷其生物活性和作用机制不尽相同^[14,15]。鉴于文冠果种仁中皂苷组成、生物活性等相关研究较少,本试验以冷榨油后的饼粕为原料,提取纯化文冠果种仁总皂苷,分析其体外抗氧化活性和抗肿瘤活性,为进一步探讨种仁皂苷的抗癌分子机制及文冠果资源的综合利用提供理论和试验依据。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

文冠果籽(种子),购于陕西杨凌金山农业科技有限公司。人参皂苷 Re 标准品为色谱纯,购于 Sigma 公司。人肝癌细胞 HepG2 及人正常肝细胞 HL-7702 购自中科院上海生化细胞所。

1.2 主要仪器与试剂

紫外可见分光光度计(722 型):上海光谱仪器有限公司;Rotavapor R-215 旋转蒸发仪(G4B21972A 3704B 型):瑞士步琪 BUCHI 公司;全波长酶标仪(SpectraMax 190):美国热电公司;CO₂ 恒温培养箱:新加坡艺思高科技有限公司;ESCO 生物安全柜:新加坡艺思高科技有限公司;Leica 倒置荧光显微镜(DMI3000B/DFC450C):德国徕卡公司;BD FACS-Calibur 流式细胞仪:美国贝克顿-迪金森公司。

抗坏血酸(Vc)、铁氰化钾、三氯乙酸(TCA)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、四氮唑蓝(NBT)等为分析纯,购于 sigma 公司。XAD-16 树脂购于西安蓝晓科技新材料股份有限公司。改良 1640 不完全培养基, Penicillin-Streptomycin Solution (50 × 双抗)购于 HyClone 公司, 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT), 4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI), 5-氟尿嘧啶(5-Fu)等购自 sigma 公司。吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。细胞周期与凋亡检测试剂盒, Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒购自上海七海复泰生物科技有限公司。其余试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 文冠果种仁总皂苷的提取与纯化

根据相关文献^[16,17]和预实验结果,本课题组自行摸索确定的提取和纯化工艺步骤如下:

将文冠果籽人工破壳取种仁,冷榨取油后粉碎饼粕制粉,石油醚脱脂,真空抽滤,脱脂后物料进行

干燥,即获得文冠果种仁脱脂粉;以一定浓度乙醇作为提取溶剂,与脱脂粉混匀后进行超声辅助提取;提取液抽滤后旋转蒸发除去乙醇,剩余物用一定量的去离子水复溶后作为总皂苷提取液。

将总皂苷提取液用预处理过得 XAD-16 大孔树脂在一定条件下进行吸附,用一定比例乙醇洗脱,洗脱液经旋转蒸发除去乙醇后,冷冻干燥获得文冠果种仁总皂苷提取物。

2.2 文冠果种仁总皂苷的定性与定量

2.2.1 皂苷的定性分析

2.2.1.1 取待测样品用水溶解,震荡数分钟,观察有无泡沫产生及持续时间,将同质量的人参皂苷 Re 溶解作阳性对照,蒸馏水作阴性对照。

2.2.1.2 Liebermann-Burchard 反应,用乙酸酐溶解少量样品,适量滴加浓硫酸,观察颜色变化。

2.2.1.3 沉淀反应,三萜皂苷类物质的水溶液加入硫酸铵等中性盐类反应可生成沉淀。用水溶解少量样品,加入适量硫酸铵溶液,观察是否有沉淀产生。

2.2.2 皂苷的定量分析

以人参皂苷 Re 为标准品制作标准曲线,采用分光光度法^[18,19]测定所提取的样品中总皂苷的含量。即吸取不同浓度人参皂苷 Re 标品溶液各 0.1 mL,加入试管中,60 °C 水浴使溶剂挥发完全,加入 0.2 mL 5% 香草醛冰醋酸溶液和 0.8 mL 高氯酸溶液,于 70 °C 水浴 15 min 后,加 5 mL 冰醋酸,摇匀,静置 15 min,用分光光度计在 546 nm 吸收波长处测量。按相同方法处理纯化后的总皂苷提取液 1 mL,测量吸光度,按标准曲线方程计算总皂苷的含量。

2.3 文冠果种仁总皂苷抗氧化活性的研究

2.3.1 还原能力测定

参考文献^[20]进行还原能力的测定。分别取 1.0 mL 不同浓度的文冠果种仁皂苷溶液,加入 2.5 mL pH 6.6 的磷酸缓冲液和 2.5 mL 1% 的 K₃[Fe(CN)₆]溶液,混匀,50 °C 水浴 20 min,加 2.5 mL 10% TCA 溶液,涡旋混匀,3000 rpm 离心 10 min。取 2.0 mL 上清液于另一试管,加 2.0 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% FeCl₃ 溶液,涡旋混匀,室温静置 10 min,然后于 700 nm 处测其吸光值,吸光值越大表示还原能力越强。

2.3.2 DPPH·自由基抑制率的测定

参考文献^[20]进行 DPPH·自由基抑制率的测定。分别取 1.0 mL 不同浓度的文冠果种仁皂苷溶液,加入 3.0 mL 1 mM DPPH·溶液,避光室温静置

30 min, 于 517 nm 处测定吸光值。用 Vc 作为阳性对照, 文冠果种仁皂苷溶液对 DPPH 的抑制率可用下式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = (A_0 - A_{\text{样}}) / A_0 \times 100\%$$

式中: $A_{\text{样}}$ 代表皂苷溶液的吸光值; A_0 代表阴性对照的吸光值。

2.3.3 羟自由基清除能力的测定

参考文献^[20,21]进行羟自由基清除能力的测定。在 10 mL 离心管中按顺序加入 1 mL 文冠果种仁皂苷溶液, 1 mL 6 mM FeSO₄ 溶液, 1 mL 6 mM 水杨酸-乙醇溶液及 1 mL 0.03% H₂O₂ 溶液, 于 37 °C 水浴 1 h 后, 在 510 nm 处测定吸光值。用蒸馏水代替文冠果种仁皂苷溶液做阴性对照, 用蒸馏水代替过氧化氢溶液做本底对照。

$$\text{清除率} = (1 - A_j / A_i) \times 100\%$$

式中: A_j 代表皂苷溶液的吸光值; A_i 代表阴性对照的吸光值。

2.3.4 超氧阴离子清除作用的测定

参考文献^[20,21]进行清除羟超氧阴离子作用的测定。在试管中按顺序加入 1 mL NBT 溶液, 1 mL NADH 溶液, 1 mL 文冠果种仁皂苷溶液, 0.4 mL PMS 溶液, 混匀静置 5 min, 在 560 nm 处测其吸光值。用蒸馏水做阴性对照, 用 Vc 做阳性对照。

$$\text{清除率}(\%) = (A_0 - A_{\text{样}}) / A_0 \times 100\%$$

式中: $A_{\text{样}}$ 代表皂苷溶液的吸光值; A_0 代表阴性对照的吸光值。

2.4 文冠果种仁总皂苷对肝癌细胞体外抑制活性测定

2.4.1 细胞株及其培养

人肝癌细胞 HepG2 及人正常肝细胞 HL-7702 购自中科院上海生化细胞所。在 5% CO₂、37 °C 下用含 10% 胎牛血清的改良 1640 培养基培养并传代。取对数生长期细胞用于实验。

2.4.2 细胞活力检测

MTT 法测定细胞活力^[22-24]。将 HepG2 细胞和 HL-7702 细胞分别接种于 96 孔板, 在 5% CO₂、37 °C 下培养 24 h 后, 吸弃培养液, 每孔按顺序加入含不同浓度文冠果种仁皂苷的培养基, 以浓度为 350 mg/L 的 5-氟尿嘧啶(5-Fu) 为阳性对照, 以不含皂苷的培养基为阴性对照, 分别培养 24 h 后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL, 在 5% CO₂、37 °C 下孵育 4 h, 吸弃培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 震荡 15 min 后在酶标仪 490 nm 波长下测量吸光度。

2.4.3 细胞形态的观察

按 2.4.2 方法用不同浓度文冠果种仁皂苷处理 HepG2 细胞 24 h 后, 吸弃培养基, 每孔加入 100 μL PBS, 用倒置荧光显微镜观察细胞形态并拍照^[25,26]。

2.4.4 DAPI 和 AO/EB 染色

DAPI 和 AO/EB 染色观察细胞凋亡^[26-28]。按 2.4.2 方法用不同浓度文冠果种仁皂苷处理细胞 24 h 后, 用 PBS 清洗, 加入适量 AO/EB 染液(终浓度均为 50 mg/L) 或 DAPI 染液(5 mg/L), 避光染色 15 min, 用倒置荧光显微镜观察细胞形态并拍照。

2.4.5 Annexin V-FITC 双标法分析细胞凋亡

将 HepG2 细胞接种于 6 孔板, 按 2.4.2 方法用不同浓度文冠果种仁皂苷处理细胞 24 h。将培养液吸出至离心管, 用 PBS 清洗细胞, 胰酶消化 2 min, 加入吸出的培养液轻轻吹打均匀, 500 g 离心 5 min。用 1 mL PBS 重悬计数后, 离心收集细胞。加入 400 μL 1 × Binding Buffer 轻轻重悬细胞, 之后加入 5 μL Annexin V-FITC, 避光孵育 15 min, 最后加入 10 μL PI 染液, 冰浴避光 5 min。30 min 内用流式细胞仪进行检测^[26-28]。

2.4.6 PI 染色法分析细胞周期

将 HepG2 细胞接种于 6 孔板, 按 2.4.2 方法用不同浓度文冠果种仁皂苷处理细胞 24 h。吸弃培养液, 胰酶消化, 1000 g 离心 5 min, 用 1 mL 预冷 PBS 重悬, 1000 g 离心 5 min。沉淀用 1 mL 预冷的 70% 乙醇混匀, 4 °C 固定过夜, 用预冷 PBS 清洗。再次离心收集细胞, 加入 0.5 mL 碘化丙啶染色液, 重悬后室温避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测^[26-28]。

2.5 数据统计与分析

所有试验至少重复 3 次, 计算平均值, 采用 SPSS 20.0 进行试验设计和数据分析。P < 0.05 表示差异显著, P < 0.01 表示差异极显著。

3 结果与讨论

3.1 文冠果种仁总皂苷的定性分析与定量分析结果

通过定性分析来确定本试验所提取纯化的文冠果种仁总皂苷提取物是否为皂苷类物质, 其结果如下所示。

3.1.1 起泡试验结果, 试验结果如表 1 所示。提取物用水溶解后, 经震荡能够产生蜂窝状的泡沫, 并且有较强的起泡力, 泡沫持久, 同时水质硬度对泡沫无影响, 表明提取物与对照组人参皂苷 Re 有相似性质。

表1 文冠果皂苷定性泡沫试验结果

Table 1 Foaming capacity of *X. sorbifolia* saponin

评价指标 Evaluation index	人参 Re 对照组 Ginsenoside Re	蒸馏水对照组 Distilled water	样液 Sample
泡沫量 Foam quantity	++++	+	++++
持续时间 Duration (min)	>20	<5	>20

注:“+”代表产生泡沫量的多少。

Note:“+” means the amount of bubble generated.

3.1.2 Liebermann-Burchard 反应试验结果,用乙酸酐将少量样品溶解,滴数滴浓硫酸后摇匀,溶液变为紫红色,表明待测样品可能包含三萜皂苷类化合物。

3.1.3 沉淀反应试验结果,利用三萜皂苷类物质的水溶液与硫酸铵等中性盐类反应生成沉淀的原理检测三萜皂苷类物质的存在。取少量待测样品用水溶解,滴入硫酸铵溶液,发现有絮状沉淀产生,证明本试验提取纯化的文冠果种仁提取物为三萜皂苷类化合物。

另外,以人参皂苷 Re 为标准品制作标准曲线,

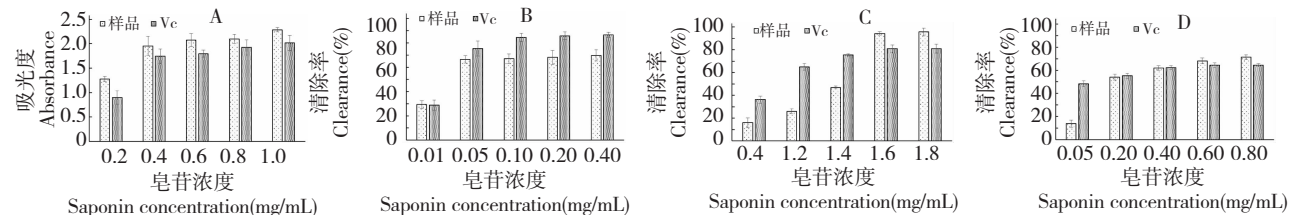


图1 文冠果种仁总皂苷及 Vc 的还原力 (A) 以及对 DPPH 自由基 (B)、羟自由基 (C)、 $O_2^{\cdot -}$ 自由基 (D) 的清除能力

Fig. 1 Reducing power (A) and scavenging effects against DPPH free radical (B), hydroxy radical (C), superoxides (D) of total saponins from kernel of *X. sorbifolia* seed and Vc

由图 1A 可知,文冠果种仁总皂苷的还原能力随浓度增大而增加,与 Vc 的趋势相同,且同浓度下皂苷的还原能力高于 Vc,说明文冠果种仁总皂苷具有比较强的还原能力。

由图 1B 可知,文冠果种仁总皂苷对 DPPH 自由基的清除能力也随浓度增大而增大,但在本次试验条件下,当总皂苷浓度大于 0.1 mg/mL 后,清除率基本不变。总皂苷与 Vc 的清除率变化趋势相同,但总皂苷的清除 DPPH 自由基的能力小于 Vc。

由图 1C 可得,文冠果种仁总皂苷对羟自由基的清除作用呈剂量依赖,随浓度增大而增大。不同的是,当皂苷浓度在 0.3 ~ 1.4 mg/mL 时,其对羟自由基的清除作用低于同浓度的 Vc,当皂苷浓度大于 1.4 mg/mL 时,其对羟自由基的清除作用高于同浓度的 Vc。

由图 1D 可得,随文冠果种仁总皂苷浓度的增大,对 $O_2^{\cdot -}$ 自由基的清除作用增大。文冠果皂苷的

采用分光光度法测定所提取的样品中总皂苷的含量,进行定量分析。测得标准曲线方程为 $A = 2.41X - 0.0237$ ($R^2 = 0.992$),计算所得提取物中总皂苷浓度为 520 ± 19.1 mg/g。

3.2 文冠果种仁总皂苷抗氧化活性试验结果

按照 2.3 项下的方法进行试验,文冠果种仁总皂苷的还原能力、清除 DPPH 自由基的能力、对羟自由基的清除作用及对 $O_2^{\cdot -}$ 自由基的清除作用结果如图 1A ~ D 所示。

半清除率质量浓度 IC_{50} 小于 Vc,在低浓度下的清除作用较好,但当加药浓度高于 0.4 mg/mL 后,文冠果种仁总皂苷对 $O_2^{\cdot -}$ 自由基的清除作用小于 Vc。

3.3 文冠果种仁总皂苷对肝癌细胞抑制作用试验结果

3.3.1 对细胞增殖的抑制作用

用文冠果种仁总皂苷处理 HepG2 细胞和 HL-7702 细胞后,用 MTT 法测得细胞活性,结果如图 2 所示。

试验结果表明:两种细胞的活性均随药物浓度的增大而减小,具有显著的量效关系,但相对于人肝正常细胞 HL-7702,人肝癌细胞 HepG2 对于文冠果种仁总皂苷更为敏感。经计算文冠果种仁总皂苷对 HepG2 细胞 24 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 9.7 ± 0.39 mg/L,而对 HL-7702 细胞的 IC_{50} 值为 11.9 ± 0.95 mg/L。因此,为尽量减小对正常细胞的抑制作用,试验选择的文冠果种仁总皂苷浓度应低于 12 mg/L。

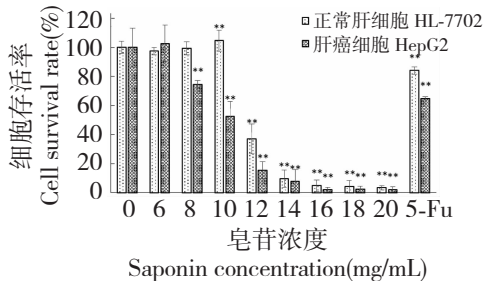


图2 文冠果种仁总皂苷对细胞活力的影响

Fig. 2 Effect of total saponins from kernel of *X. sorbifolia* seed on cell viability

注:与阴性对照组相比,差异极显著, ** $P < 0.01$

Note: compared with negative control group, ** $P < 0.01$ indicated extremely significant difference

3.3.2 对细胞形态的影响试验结果

用文冠果种仁总皂苷处理 HepG2 细胞,于倒置显微镜下观察细胞形态变化,结果如图3所示。

试验结果表明,阴性对照组(0 mg/L)细胞轮廓清楚,贴壁完全,细胞为多边形或者菱形,细胞排列紧密;用文冠果种仁总皂苷处理 HepG2 细胞后,细胞形态逐渐发生改变,皂苷浓度为 6 ~ 8 mg/L 时,观察到细胞开始变圆,链接聚集开始减少,细胞间隙增大;皂苷浓度为 10 ~ 16 mg/L 时,细胞明显皱缩变圆变小,基本失去原有形态,出现轮廓模糊的皱缩的凋亡细胞,随着皂苷浓度的加大,皱缩凋亡的细胞明显增多;当细胞浓度增加到 20 mg/L 时,细胞基本完全凋亡;阳性对照组(5-Fu)的细胞形态的变化特征与皂苷处理组类似。

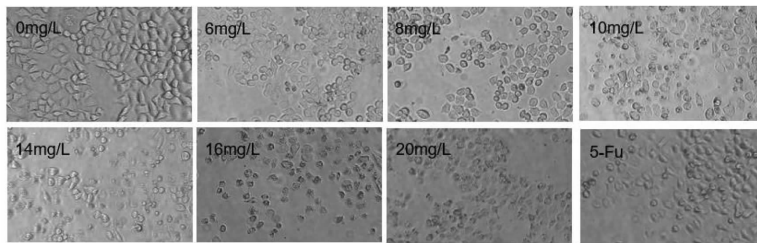


图3 文冠果种仁总皂苷对细胞形态的影响(×200)

Fig. 3 Effect of total saponins from kernel of *X. sorbifolia* seed on cell morphology(×200)

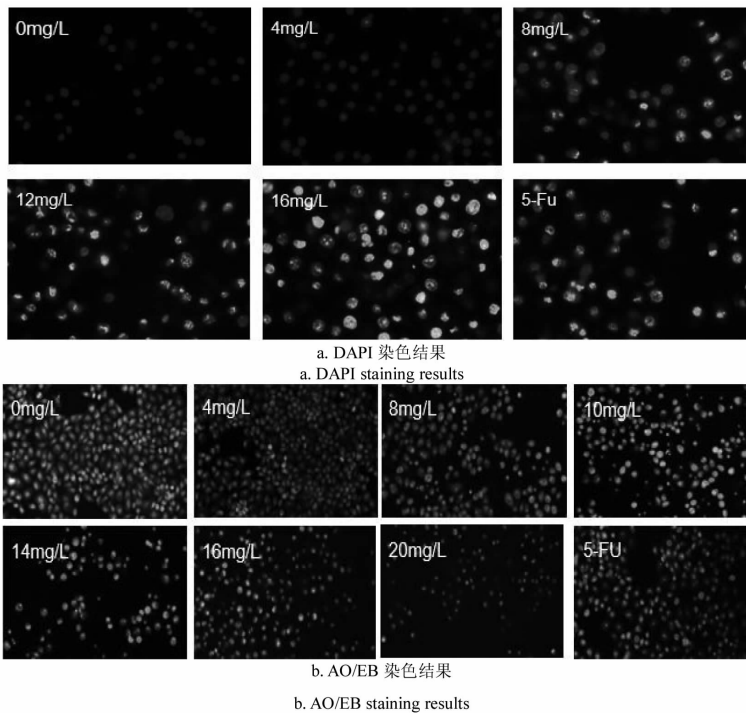


图4 荧光染色结果(×200)

Fig. 4 Fluorescence staining results(×200)

3.3.3 诱导肝癌细胞凋亡

荧光染色(DAPI染色和AO/EB染色)试验结果如图4(a、b)所示。

DAPI核染料可以通过细胞膜与DNA结合,紫外下激发蓝色荧光^[27,28]。如图4(a)所示,阴性对照组(0 mg/L)核形态完整,呈均匀的蓝色荧光;当皂苷浓度增大到8 mg/L时,细胞凋亡典型特征出现,即细胞收缩,染色质固缩,出现明显亮斑;随着皂苷浓度的增大,细胞凋亡的特征更加明显,凋亡细胞的数量也显著增加,说明皂苷诱导细胞凋亡呈剂量依赖性;阳性对照组(5-Fu)的细胞也出现亮斑,变化特征与皂苷处理组类似。

为进一步探究细胞的凋亡现象,本研究又采用了AO/EB染色观察细胞的凋亡现象。吖啶橙(AO)能穿透活细胞,与DNA结合,激发产生绿光;溴化乙锭(EB)只能穿过受损的细胞膜,染色后发橘红色荧光^[27,28]。因此AO/EB双染可以判断细胞凋

亡过程。结果如图4(b)所示,阴性对照组(0 mg/L)均发出绿色荧光,呈现深浅不一的结构特征;皂苷浓度为4 mg/L时,细胞形态无明显变化;当皂苷浓度达到8 mg/L时,绿色荧光强度减弱(图中较大较明亮且呈圆形的细胞),红色荧光变强(图中较小且灰暗的细胞),说明细胞膜通透性增加,可观察到细胞核呈固缩状的早期凋亡细胞,而晚期凋亡细胞,细胞核固缩且呈橘红色;随着皂苷浓度上升,细胞形态变化明显,细胞变圆,橘红色细胞(图中较小且灰暗的细胞)增多,说明凋亡细胞明显增加;当皂苷浓度达到20 mg/L时,细胞基本呈橘红色,说明细胞全部凋亡;阳性对照组(5-Fu)的细胞也出现橘红色的凋亡细胞,变化特征与皂苷处理组类似。

3.3.4 对细胞凋亡的影响试验结果

采用流式细胞仪用Annexin V-FITC双标法检测细胞的凋亡率,试验结果如图5所示。

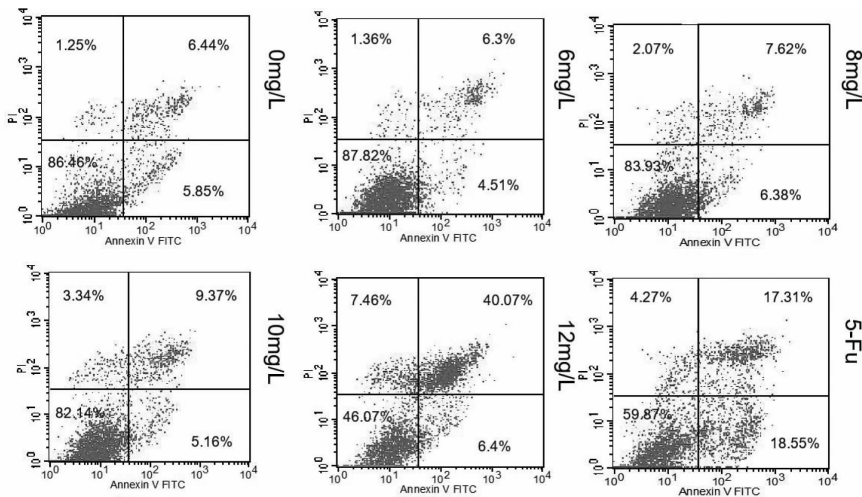


图5 流式细胞仪(Annexin V-FITC双标法)检测总皂苷诱导细胞凋亡

Fig. 5 Total saponins induced apoptosis quantified by cytometric analysis with Annexin V-FITC/PI double staining

在双参数散点图上,左下表示活细胞,右上表示晚期凋亡细胞及坏死细胞,右下表示早期凋亡细胞^[26-28]。从图5中可以看出,与阴性照组相比,皂苷浓度为6 mg/L时细胞凋亡率无明显变化,与MTT的实验结果相符;当皂苷浓度逐渐提高时,晚期凋亡细胞和坏死细胞的数量明显增加,除6 mg/L外,其他实验组与阴性对照组相比差异均极显著,具有统计学意义;当皂苷浓度达到12 mg/L时,细胞凋亡的数量急剧增加,与观察细胞形态时发现该浓度下细胞大量凋亡的结果相吻合。同时,观察到早期凋亡细胞的数量也有一定程度的变化,但增加不明显,说

明皂苷对早期凋亡时期的作用不显著。与皂苷处理组相比,阳性对照组的晚期凋亡现象相似,但同时也观察到显著地早期凋亡,表明皂苷和5-Fu虽然都能引起HepG2细胞凋亡,但凋亡机理可能不尽相同。

3.3.5 对细胞周期的影响

采用流式细胞仪用PI染色法^[26-28]检测文冠果种仁皂苷对细胞周期的影响,结果如图6所示。

处理4 h后,与4 h的阴性对照组(0 mg/L)相比,皂苷处理组的周期变化不明显。但处理24 h后,与24 h的阴性对照组相比,皂苷处理组出现明显的凋亡峰,且凋亡峰随皂苷浓度的增大而增大。

同皂苷处理剂量间相比,可以发现 G0-G1 期细胞比例出现下降,S 期细胞的比例显著增加($P < 0.01$),G2-M 期的细胞比例也显著降低($P < 0.01$),尤其是当皂苷处理浓度 12 mg/L 时,处理 24 h 后 G2-M 期

的细胞比例接近于零。据此推测文冠果种仁皂苷对肝癌细胞 HepG2 细胞的作用主要集中于 S 期,通过将细胞阻断在 S 期来抑制细胞的增殖作用以及诱导细胞凋亡。

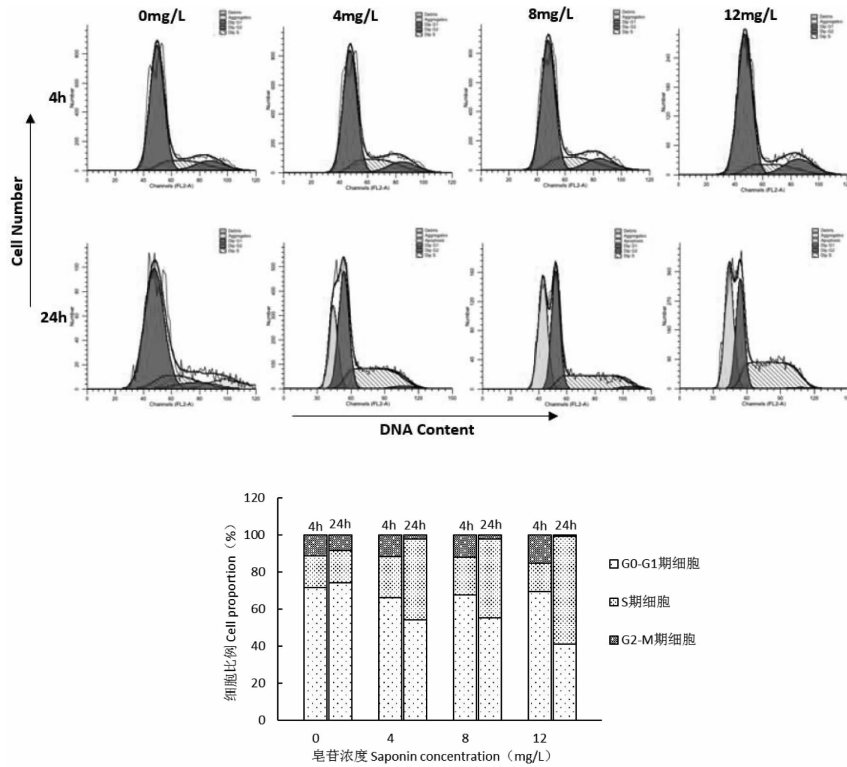


图 6 流式细胞仪 (PI 染色法) 检测总皂苷对细胞周期影响

Fig. 6 Total saponins effected on cell cycle quantified by cytometric analysis with PI staining

4 讨论与结论

研究显示文冠果果壳及枝干中发现的三萜类皂苷^[4-6],其母核多为齐墩果酸型五环三萜皂苷,而文冠果种仁的皂苷类化合物却鲜有报道。本试验对纯化的文冠果种仁总皂苷的抗氧化活性和对人体肝癌肿瘤细胞 HepG2 的体外抑制活性进行了初步的研究,发现文冠果种仁总皂苷具有较强的抗氧化作用,且在低浓度下具有较强的清除羟基自由基的能力,从而为食品中抗氧化功能性成分提供了一个新的选择。

在抗肿瘤研究中,文冠果种仁总皂苷可以抑制 HepG2 细胞的增值并诱导细胞凋亡;且发现种仁总皂苷在浓度较低的情况下对正常肝细胞的损伤较小;同时呈剂量依赖性,加入皂苷处理后,细胞主要为晚期凋亡,同时细胞周期多被阻断在 S 期。试验结果显示文冠果种仁总皂苷在治疗肝癌方面具有良

好的应用前景。

参考文献

- De YJ, Zhang QL, An HJ, *et al.* The analysis of industrial *Xanthoceras sorbifolia* forest-oil integration 's prospects. *Proced Environ Sci*, 2012, 12: 52-56.
- Mou HX (牟洪香). Investigation and research in woody energy plant *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. Beijing: Chinese Academy of Forestry (中国林业科学研究院), PhD. 2006.
- Zeng YY, Jian HQ, Li MY. Biodiesel production from *Xanthoceras sorbifolia* in China: Opportunities and challenges. *Renew Sust Energy Rev*, 2013, 24(10): 57-65.
- Ling JH, Liu LL, Wang YX, *et al.* Characterization and quantification of the triterpenoids in different parts of *Xanthoceras sorbifolia* by HPLC-ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55: 259-264.
- Zhao XX (赵茜茜), Liu JY (刘俊义), Wang K (王珂), *et al.* Extraction and identification of total sterol from seed kernel oil of *Xanthoceras sorbifolia* bunge. *Nat Prod Res Dev* (天

- 然产物研究与开发),2015,27:1737-1742.
- 6 Rong YM(荣语媚). Investigation of anticancer effect of Xanthoceraside *in vitro* and the mechanism of Xanthoceraside-induced human breast cancer MCF-7 cell death. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical university (沈阳药科大学), PhD. 2008.
- 7 Kong WB(孔维宝), Liang JY(梁俊玉), Ma XZ(马正学), *et al.* Research advance of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge oil. *China Oils Fats*(中国油脂), 2011, 36(11):67-72.
- 8 Li J, Zu YG, Luo M, *et al.* Aqueous enzymatic process assisted by microwave extraction of oil from yellowhorn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) seed kernels and its quality evaluation. *Food Chem*, 2013, 138:2152-2158.
- 9 Li J, Fu YJ, Qu XJ, *et al.* Biodiesel production from yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge) seed oil using ion exchange resin as heterogeneous catalyst. *Bioresour Technol*, 2012, 108:112-118.
- 10 Liu XX(刘新霞), Ji XF(纪雪飞), Lu LL(陆玲玲), *et al.* Effects of extracts from the pericarp of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge on learning and memory obstacle. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharm*(中药新药与临床药理), 2007, 38:1859-1863.
- 11 Xiao W, Wang Y, Zhang P, *et al.* Bioactive barrigenol type triterpenoids from the leaves of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. *Eur J Med Chem*, 2013, 60:263-270.
- 12 Ma CM, Nakamura N, Hattori M, *et al.* Inhibitory effects on HIV-1 protease of constituents from the wood of *Xanthoceras sorbifolia*. *J Nat Prod*, 2000, 63:238-242.
- 13 Zhao DD(赵丹丹), Li DY(李丹毅), Hua HM(华会明), *et al.* A new monoterpene isolated from flowers of *Xanthoceras sorbifolia*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2013, 44:11-15.
- 14 Li J(李佳), Wang CZ(王成章), Yan XB(严学兵), *et al.* Advances on biological activities of plant saponin. *Prat Sci*(草业科学), 2012, 29:488-494.
- 15 Cheok CY, Salman HAK, Sulaiman R. Extraction and quantification of saponins; A review. *Food Res Int*, 2014, 59(5):16-40.
- 16 Cui FS(崔福顺), Li GH(李官浩). Extraction of total triterpenoids from fruit, stems and leaves of *Schisandra Chinensis* with ultrasonic wave. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2013, 34(7):53-56.
- 17 Yu LL, Tang XL, Chen LX, *et al.* Oleanane-type triterpenoid saponins from *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. *Fitoterapia*, 2012, 83:1636-1642.
- 18 Li GX(李光勋), Wang LH(王利华). Determination on content of total saponins in the husks of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge based on spectrophotometry. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 2008, 36:3071-3072.
- 19 Liu WR(刘伟锐), Zhang X(张霞), Jiang R(姜蕊), *et al.* Determination of total triterpenes from the roots of *Sonchus arvensis* L. by spectrophotometry. *Northwest Pharm J*(西北药学杂志), 2014, 29:554-557.
- 20 Ryu CS, Kim CH, Lee SY, *et al.* Evaluation of the total oxidant scavenging capacity of saponins isolated from *Platycodon grandiflorum*. *Food Chem*, 2012, 132:333-337.
- 21 Chan KW, Iqbal S, Khong NMH, *et al.* Antioxidant activity of phenolics-saponins rich fraction prepared from defatted kenaf seed meal. *LWT-Food Sci Technol*, 2014, 56:181-186.
- 22 Yu L, Wang XB, Wei XC, *et al.* Triterpenoid saponins from *Xanthoceras sorbifolia* Bunge and their inhibitory activity on human cancer cell lines. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22:5232-5238.
- 23 Long FY, Chen YS, Zhang L, *et al.* Pennogenyl saponins induce cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162:112-120.
- 24 Yuan L(袁莉). Effects and mechanism of isoorientin on apoptosis and autophagy in human hepatoblastoma cancer cells. Yangling: Northwest Agricultural & Forestry University(西北农林科技大学), PhD. 2014.
- 25 Zhao CY(赵晨阳), Hui LP(惠林萍), He L(何琳), *et al.* Study on inhibitory effect of triterpenoid saponin from *Ardisia japonica* TSP02 on proliferation and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells and its mechanism. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 2013, 38:861-865.
- 26 Yu SR, Ye XW, Chen L, *et al.* Cytotoxic and anti-colorectal tumor effects of sulfated saponins from sea cucumber *Holothuria moebii*. *Phytomedicine*, 2015, 22:1112-1119.
- 27 Wang J(王静). The pro-apoptotic effect and migration and invasion inhibitory effect of Momordin Ic on HepG2 cells and the functional mechanisms. Yangling: Northwest Agricultural & Forestry University(西北农林科技大学), PhD. 2014.
- 28 Xie JH, Dong CJ, Nie SP, *et al.* Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja leaves. *Food Chem*, 2015, 186:97-105.