

文章编号: 1674-7054(2012)02-0130-05

番木瓜种子中异硫氰酸苄酯(BITC)的抑癌试验

周 骊¹, 李泽友², 沈文涛³, 靳云奎¹, 周 鹏³

(1. 海南省农垦中学 海南 海口 570226; 2. 海南医学院 海南 海口 571101;

3. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所 海南 海口 571101)

摘 要: 利用 MTT 法检测番木瓜种子中的异硫氰酸苄酯(BITC)在体外对肝癌细胞等6种常见癌细胞的生长抑制率。结果表明,番木瓜种子提取物中 BITC 的浓度达到 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (相当于 $0.745 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 时,对人肝癌 HepG2 细胞、人肺癌 A549 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞、人大肠癌 HCT-8 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞、人前列腺癌 DU-145 细胞的生长抑制率均达到 70% 以上,其中,人肝癌细胞 HepG2 最敏感, $\text{IC}_{50} = 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时抑制率可达 87%, 在 $\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,人大肠癌 HCT-8 细胞的生长抑制率几乎相同。因此,BITC 具有良好的抑癌效果。

关键词: 番木瓜; 种子提取物; 异硫氰酸苄酯; MTT 法; 肿瘤抑制

中图分类号: Q 949.21; R 965.1

文献标志码: A

番木瓜(*Carica papaya* L.) 属双子叶植物纲,五桠果亚纲,番木瓜科(Caricaceae),也被称为木瓜、万寿果,原产于墨西哥南部和中美洲地区,目前在世界热带、亚热带地区普遍栽培,在我国台湾、福建、广东、海南、广西、云南等南部和西南部地区均已引种栽培。番木瓜营养丰富,有研究证明^[1],其果实含有番木瓜碱、木瓜蛋白酶、凝乳酶、胡萝卜素等,同时还含 17 种以上氨基酸及多种营养元素,具有护肝、抗炎抑菌、降低血脂等功效。也有研究表明^[2-4],番木瓜种子中含有抗癌活性的异硫氰酸酯类化合物(ITCs),比其果肉中的活性成分更具有重要的保健以及医疗作用,因而倍受人们的关注。

流行病学研究^[5,6]发现大量食用十字花科植物如花椰菜、甘蓝和水芹菜等可以降低肿瘤发生的风险,并证实其所含的异硫氰酸酯化合物(ITCs)具有防癌、抑癌作用。迄今,人们已对 20 多种天然或合成的 ITCs 进行了研究,认为 ITCs 对多种肿瘤有明显的抑制作用,是共同的抗癌活性物质。已有文献表明,ITCs 对多种肿瘤包括肺癌、前列腺癌、膀胱癌、食管癌等实体肿瘤和血液肿瘤具有抗癌作用^[7-11]。此外也有报道用有机溶媒(如正己烷)来提取番木瓜种子中的异硫氰酸苄酯(BITC)^[2-3]。笔者利用本课题组发明的新工艺(已申请发明专利)来提取番木瓜非杂交一代番木瓜种子活性成份——异硫氰酸苄酯,并通过各种癌细胞体外培养实验,对提取的异硫氰酸苄酯进行生物活性测定分析,旨在为番木瓜种子生物活性成分的开发与应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验材料 取成熟的番木瓜两性果实种子清洗后备用。癌细胞株为人肝癌 HepG2 细胞、人肺癌 A549 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞、人大肠癌 HCT-8 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞、人前列腺癌 DU-145 细胞。

收稿日期: 2012-03-05

基金项目: 海南省自然科学基金(309042)

作者简介: 周骊(1994-),男,安徽绩溪人,农垦中学高中二年级学生,作为青少年创新大赛项目参加了此研究工作。

通信作者: 周鹏(1963-),教授,博士生导师,从事生物技术研究工作。联系电话: 0898-66895006, E-mail: zhp6301@126.com

这6种癌细胞株由中国医学科学院药用植物研究所复苏备用。

1.1.2 仪器 倒置荧光显微镜(Olympus 公司, 型号 CK40); 酶联免疫检测仪(Bio-Tek 公司, 型号 MQX200); CO₂ 培养箱(NAPCO 公司); 高压灭菌锅(日本 HIRAYAMA 公司, 型号 HEV-2510); 超净工作台(吴江市净化设备厂, 型号 YJ-875); 96 孔细胞培养板(Pore 公司); 离心机(德国 HERAEUS 公司, 型号 Labofuge 400 R); 电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司, 型号 AL104)。

1.1.3 试剂 RPMI1640, DMEM 培养基干粉购自 Gibco 公司; 四甲基偶氮唑蓝(MTT) 为 Promega 公司产品; 异硫氰酸苄酯对照品购于 Sigma 公司; 胎牛血清(FBS)、二甲基亚砷(DMSO)、胰酶购于 Amresco 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 番木瓜种子生物活性成分的提取 分别采用大豆油及正己烷作溶剂进行番木瓜种子生物活性物质的提取, 具体提取方法为“一种番木瓜种子提取物的开发工艺”(本课题组科研人员的国家发明专利, 申请号: 201010271962.2)。该专利尚在公示审核期(公开号: CN101935295A), 因此, 为不涉及该专利的核心内容, 仅对番木瓜种子活性成分的提取方法作简要介绍: (1) 取成熟番木瓜种子, 加少量水研磨成糊状后, 再加水适量使之被淹没, 然后加入 5 倍量体积的大豆油(或正己烷), 混匀; (2) 室温下放置 15 min 后, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min; (3) 分离上层油层, 用适宜的溶剂溶解和稀释, 用于测定含量和活性试验。本提取技术是通过将番木瓜种子进行酶水解, 将其前体物质转变成具有良好生物活性的物质, 再经过食用油(或正己烷) 提取、分离得到含活性成分的物质。

1.2.2 活性成分含量的测定 对番木瓜种子提取物(以异硫氰酸苄酯为对照), 按中国药典 2010 年版二部附录 VE 气相色谱法测定, 实验条件: GC-17C 气相色谱仪, 色谱柱: 30 m×0.32 mm×0.25 μm 的 SPB1701 熔融石英毛细管柱; FID 检测器, 载气为氮气; 梯度升温: 起始温度 100 ℃, 保持 5 min, 然后以 10 ℃·min⁻¹ 的速率升到 180 ℃, 保持 5 min, 再以 20 ℃·min⁻¹ 的速率升到 250 ℃, 保持 2 min。检测器温度 280 ℃, 气化室温度 250 ℃。进样量: 1 μL。

采用异硫氰酸苄酯对照品作出对照图谱, 并作出标准曲线图和线性方程用于计算番木瓜种子活性成分含量。

1.2.3 种子活性提取物的抑癌试验测定 利用 MTT 法^[12] 检测种子提取物对体外的人肝癌 HepG2 细胞、人大肠癌 HCT-8 细胞、人肺癌 A549 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞、人前列腺癌 DU-145 细胞生长的抑制率。按文献[12-13]方法测定不同浓度的异硫氰酸苄酯对 6 种癌细胞增殖的抑制效应。具体步骤为: (1) 供试样品的制备。将适量提取物用微量乙醇溶解(乙醇终浓度在 φ=0.5% 以内, 不会对细胞生长产生明显抑制), 再以 φ=50% 的 DMSO 为溶剂, 精确配制成 100 μmol·L⁻¹ 供试样品储备液。使用供试样品储备液时, 用磷酸盐缓冲液稀释, 使药液在 96 孔板中的浓度分别在 0.156~10 μmol·L⁻¹ 之间。(2) 按文献[14]方法进行抑癌试验。收集生长良好的癌细胞, 用含 φ=10% 的胎牛血清的 RPMI-1640 或 DMEM 培养基配成 6×10⁴/mL 细胞悬液, 接种于 96 孔板内, 每孔 180 μL, 37 ℃ φ=5% 的 CO₂ 孵箱培养 24 h 后, 加入提取物不同浓度的稀释液(见表 1), 每浓度设 3 个平行孔, 同时设空白组(仅加入不含细胞的培养液) 和对照组(以培养液代替药物)。继续培养 48 h 后弃上清, 每孔加入 MTT 液 10 μL(5 g·L⁻¹, 用 RPMI-1640 培养基配制) 后继续培养 4 h, 每孔加入 100 μL 酸化异丙醇细胞裂解液, 过夜培养, 然后检测波长 540 nm 和参考波长 450 nm 下的吸光度(A) 值。依据 A 值计算细胞生长抑制率(IR)。IR>70% 为高度敏感, 70%≥IR≥50% 为中度敏感, IR<50% 为不敏感。其计算公式如下:

$$IR = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%。$$

2 结果与分析

2.1 番木瓜种子活性成分提取含量测定结果 取同一批新鲜的番木瓜种子, 用大豆油(或正己烷) 按“一种番木瓜种子提取物的开发工艺”的方法分别进行异硫氰酸苄酯的提取, 重复提取 3 次。按 1.2.2 所述色谱条件测定对照品并绘制标准曲线(见图 1 和图 2), 其中线性方程为: $y = 226.125x - 2749.1$, 相关系数 $R = 0.9992$ 。

测定不同溶剂提取物中活性成分异硫氰酸苄酯(见图 3 和图 4), 并分别计算提取物的活性成分含量。

大豆油溶媒的提取物含量为 $4.09 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (相当于 $0.61 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) ,与正己烷溶媒的提取物含量 $4.02 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ($0.60 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 相近 这说明用适宜的食用油也能有效地从番木瓜种子中提取出活性成分异硫氰酸苄酯。

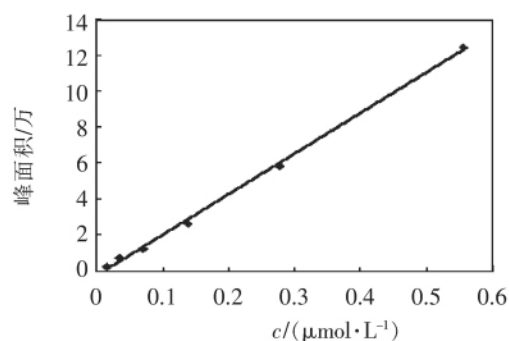


图1 标准曲线图

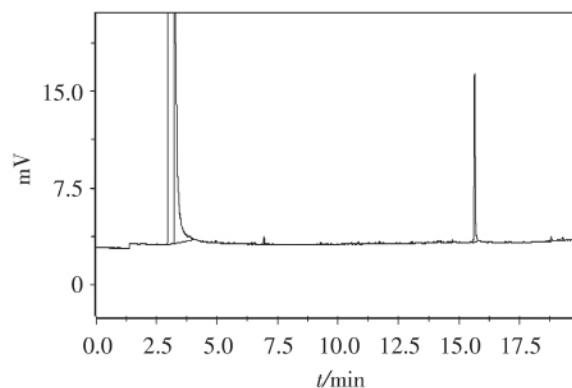


图2 异硫氰酸苄酯对照图谱

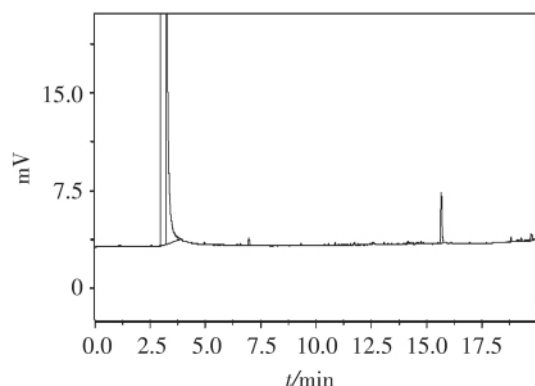


图3 正己烷提取物色谱图

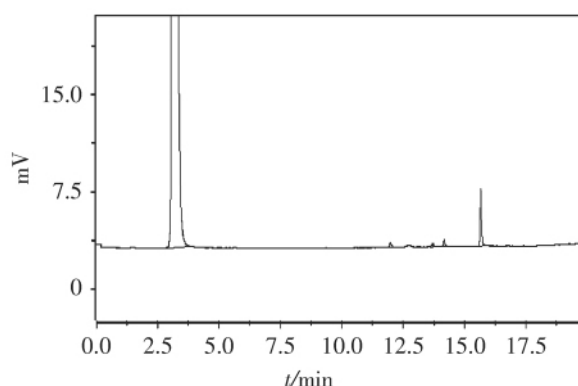


图4 大豆油提取物色谱图

2.2 番木瓜种子提取物体外抗癌实验结果 从表1可见,番木瓜种子提取物(含 BITC) 的浓度达到 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (相当于 $0.745 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 时,对人肝癌 HepG2 细胞、人肺癌 A549 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞、人大肠癌 HCT-8 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞、人前列腺癌 DU-145 细胞的生长抑制率均达到 70% 以上,其中,人肝癌细胞 HepG2 对 BITC 最敏感 $c_{\text{BITC}} = 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑制率可达到 87%; $c_{\text{BITC}} = 10, 5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,人大肠癌 HCT-8 细胞的生长抑制率几乎相同。总体来说,番木瓜种子提取物 BITC 的浓度范围在 $0.313 \sim 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,随着 BITC 浓度的增加,BITC 对癌细胞的生长抑制率也随之增加,这表明 BITC 具有良好的抑制癌细胞生长的活性。

表1 番木瓜种子提取物(BITC)体外抗癌试验结果

$c_{\text{BITC}} /$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	生长抑制率/%					
	人肝癌 HepG2 细胞	人肺癌 A549 细胞	人乳腺癌 MCF-7 细胞	人宫颈癌 HeLa 细胞	人前列腺癌 DU-145 细胞	人大肠癌 HCT-8 细胞
10	—	—	—	—	—	83.80
5.0	—	78.39	69.38	86.79	70.70	83.55
2.5	87.02	69.78	59.32	81.35	57.50	78.74
1.25	84.42	31.82	47.77	59.69	52.16	76.26
0.625	67.39	33.49	40.54	32.93	52.85	67.96
0.313	35.17	23.60	31.74	16.57	45.19	—
0.156	21.19	—	—	—	—	—

注: 中“—”表示预实验时显示此浓度过高或过低,正式实验未做此浓度的试验。

3 讨 论

研究结果^[3]表明, 番木瓜种子的苄基硫代葡萄糖苷含量较高, 这种葡萄糖苷可在其自身的芥子酶作用下水解生成异硫氰酸苄酯(BITC), 该成分具有防癌抗癌作用, 但在番木瓜果肉中的含量很低, 几乎检测不到。在实际生产中, 番木瓜非杂交一代种子易产生后代分离, 品质和产量双下降等问题, 通常不能作为繁育体, 而是作为废物丢弃, 造成极大的资源浪费^[15-16]。本研究结果表明, 选用适宜的食用油提取番木瓜种子活性成分, 不仅可以避免采用有机溶剂提取造成的溶剂残留的危害, 且提取的效率也不低于有机溶剂的; 而且提取出来的活性成分可直接制备成供人们食用的制剂, 还可简化生产工艺。因此, 开发应用番木瓜种子的活性成分及其相关产品成为提高番木瓜附加值的重要途径, 同时也会激发和推动整个番木瓜产业的发展。

番木瓜种子提取物有良好的抑癌活性, 这将预示番木瓜非 F_1 代种子变“废”为“宝”成为可能。本研究通过体外实验证实, 番木瓜种子提取物(含 BITC) 在体外对人肝癌细胞 HepG2 等 6 种常见的癌细胞株的生长增殖具有较好的抑制作用, 在较高剂量试验组, 细胞增殖抑制率可以达到 80% 以上, 显示出对癌细胞生长的活性有较好的抑制效果。与文献[17-18]报道的 BITC 对癌细胞生长活性有抑制作用的结果相一致。异硫氰酸苄酯(BITC) 是 ITCs 的一种, BITC 可以引起多种癌细胞凋亡, 使癌细胞周期阻滞于 G2/M 期, 有多种信号传导途径参与其中, 如 JNK, p53 等^[19-20]。ITCs 作用强度与官能基团种类、碳链的长短等有关, 其药理作用可能是抑制代谢酶细胞色素氧化酶 P450 的活性^[17]; 一些体内及离体实验结果^[6]还表明, ITCs 的抗癌活性与诱导癌细胞周期阻滞及细胞凋亡密切相关, 但其诱导癌细胞凋亡的机理还不清楚, 特别是促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白在 BITC 诱导癌细胞凋亡中的具体作用还有待深入研究。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] NAKAMURA Y, YOSHIMOTO M, MURATA Y et al. Papaya seed represents a rich source of biologically active isothiocyanate [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(11): 4407-4413.
- [3] 李泽友, 沈文涛, 言普, 等. 番木瓜中异硫氰酸苄酯及其前体物质苄基硫代葡萄糖苷的含量分析[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(4): 678-681.
- [4] 刘思, 沈文涛, 黎小瑛, 等. 番木瓜的营养保健价值与产品开发[J]. 广东农业科学, 2007(2): 68-69.
- [5] 李雷, 邹翔, 季宇彬. 十字花科植物中异硫氰酸盐的性质及活性研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2007, 23(4): 385-389.
- [6] 蒋少红, 马旭东. 异硫氰酸酯化合物的抗癌作用及其机制研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2008(9): 80-83.
- [7] 汪俏梅. 异硫代氰酸酯的抗癌机理及其相关研究[J]. 细胞生物学杂志, 2002, 24(3): 171-175.
- [8] 季宇彬, 池文杰, 邹翔, 等. 西兰花中萝卜硫素提取、分离与抗癌活性研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2005, 21(3): 270-273.
- [9] 曹波, 王晓芹, 李泽桂, 等. 异硫氰酸苄酯诱导人急性白血病细胞凋亡的分子机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(3): 209-212.
- [10] BASU A, HALDAR S. Dietary isothiocyanate mediated apoptosis of human cancer cells is associated with Bcl-xL phosphorylation [J]. Int J Oncol, 2008, 33(4): 657-663.
- [11] GAMEL-PAYRASTRE L, LI P et al. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells [J]. Cancer Res, 2000, 60(5): 1426-1433.
- [12] 袁媛, 王琳, 田丽美, 等. MTT 法筛选青梅对 SPCA-1 体外增殖抑制作用有效部位的研究[J]. 海南师范大学学报: 自然科学版, 2009, 22(3): 291-293.
- [13] 边兴艳, 尹学念. MTT 比色法及其应用[J]. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 1998, 19(2): 83.
- [14] 崔福德. 药剂学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [15] 周鹏. 番木瓜种植管理与开发应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [16] 周鹏, 沈文涛. 番木瓜生物技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [17] XIAO D, POWOLNY A A, SINGH S V. Benzyl isothiocyanate targets mitochondrial respiratory chain to trigger reactive oxygen species-dependent apoptosis in human breast cancer cells [J]. J Biol Chem, 2008, 283(44): 30151-30163.
- [18] MI L, GAN N, CHEEMA A et al. Cancer preventive isothiocyanates induce selective degradation of cellular {alpha}- and {beta}-

- ta}-tubulins by proteasomes [J]. J Biol Chem 2009 284(25):17039–17051.
- [19] CHEN Y R, WANG W, KONG A N, et al. Molecular mechanisms of c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis induced by anticarcinogenic isothiocyanates [J]. J Biol Chem 1998 273:1769–1775.
- [20] KIM S H, SINGH S V. p53-Independent apoptosis by benzyl isothiocyanate in human breast cancer cells is mediated by suppression of XIAP expression [J]. Cancer Prev Res, 2010, 3(6):718–26.

Test of Tumor-inhibition of Benzyl Isothiocyanate (BITC) in Papaya Seed

ZHOU Li¹, LI Ze-you², SHEN Wen-tao³, JIN Yun-kui¹, ZHOU Peng³

(1. Hainan Nongken Middle School, Haikou 570226, China; 2. Hainan Medical University, Haikou 571101, China; 3. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Benzyl isothiocyanate (BITC) was extracted from papaya seeds (*Carica papaya* L.) and used to determine its inhibitory effect on the cell growth of 6 common cancers *in vitro* including liver cancer by using the MTT method. The results showed the papaya seed extract with BITC at the concentration of up to $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (equivalent to $0.745 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) inhibited more than 70% of the cell growth of a human liver cancer cell line HepG2, a lung cancer cell line A549, a breast cancer cell line MCF-7, a colon cancer cell line HCT-8, a cervical cancer cell line Hela and a prostate cancer cell line DU-145. Of them the HepG2 liver cancer cells were the most sensitive to BITC which gave an 87% inhibition over the cells at the concentration $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. HCT-8 colon cancer cells had a similar inhibition rate when treated with BITC at both 5.0 and $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. This showed that higher concentration of BITC in the extract of papaya seeds was similar to the lower concentration ($5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in inhibition of the growth of the cancer cells.

Key words: *Carica papaya* L.; seed extract; benzyl isothiocyanate; MTT method; tumor-inhibition

(上接第 129 页)

- [10] HIROSHI Miyoshi, NORIKO Suehiro, KOJI Tomoo, et al. Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and plant translational initiation factors [J]. Biochimie 2006 88:329–340.
- [11] 卢航, 赵小明, 白雪芳, 等. 翻译起始因子 4E 在植物病毒侵染中的作用 [J]. 中国农业科技导报 2007 9(6):35–40.
- [12] JAMIE A Ashby, CLARE E M Stevenson, GAVIN E Jarvis, et al. Structure-based mutational analysis of *eIF4E* in relation to *sbm1* resistance to pea seed-borne mosaic virus in pea [J]. PLoS One 2011 6(1): e15873.

The Construction of Mutant *eIF4E* in Papaya

ZHANG Dong-dong^{1,2}, YAN Pu², SHEN Wen-tao², LI Xiao-ying², ZHOU Peng^{1,2}

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology/Analysis & Testing Center, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Mutations in or loss of the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) can affect infections of viruses to plants, which leads to resistance of the plants against the viruses. The interaction between PRSV-VPg and *Cp-eIF4E* (eIF4E in Papaya) has been verified. In this study, six point mutations were determined by protein sequence alignment and analysis of homology modeling, and the point mutations were produced in *Cp-eIF4E* by overlap extension PCR. Then, the mutant *Cp-eIF4E* genes were connected into two sets of expressive vectors, yeast two-hybrid system and bimolecular fluorescence complementation, which lays a foundation for the follow-up verification of interaction and resistance in the plants.

Key words: *eIF4E*; point mutation; VPg; interaction