

文章编号:1673-1689(2007)03-0061-05

β -胡萝卜素氧化降解产物及其抑制癌细胞活性的研究

胡兴娟¹, 张连富¹, 王晓岚², 谷文英¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 医学院, 江苏 无锡 214063)

摘要: 研究了 β -胡萝卜素氧化降解产物的生理活性。对利用 OsO_4 为催化剂,将 β -胡萝卜素在 $\text{OsO}_4\text{-H}_2\text{O}_2\text{-Ether}$ 体系中进行控制型氧化降解,对氧化降解产物进行薄层分离后,采用体外细胞培养技术观察 β -胡萝卜素氧化降解产物对Hela细胞以及bel-7402细胞增殖的影响。结果发现, β -胡萝卜素氧化降解产物在高浓度时对Hela以及bel-7402的抑制作用强于 β -胡萝卜素的,且对bel-7402的作用强于对Hela的,显示 β -胡萝卜素氧化降解产物对癌细胞的增殖有抑制作用。

关键词: β -胡萝卜素; 氧化降解; 分离; 癌细胞; 抑制作用

中图分类号: R 151.43

文献标识码: A

β -Carotene Oxidation Products and Its Inhibition on Tumorous Cells

HU Xing-juan¹, ZHANG Lian-fu¹, WANG Xiao-lan², GU Wen-ying¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214063, China)

Abstract: The biological activity of β -carotene was investigated in this manuscript. Beta-carotene was oxidized in $\text{OsO}_4\text{-H}_2\text{O}_2\text{-Ether}$ system with OsO_4 as catalyzer, the oxidation products were separated through thin layer chromatography and then purified with HPLC. After that their biological activity were checked with Hela and bel-7402 tumorous cells. The results showed that β -carotene oxidation products could inhibit the proliferation of cancer cells(Hela and bel-7402).

Key words: β -carotene; oxidation products; separation; tumor cells; inhibition

类胡萝卜素在自然界中分布相当广泛,现已发现600多种。它们一般为由8个 C_5 -异戊二烯头尾相连(在中心部位是尾尾相连)组成具对称结构的类异戊二烯,其中包括环化的(如 β -胡萝卜素)或无环的(如番茄红素)胡萝卜素,以及含有氧原子的胡萝卜素醇等^[1]。 β -胡萝卜素分子式为 $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$,其化学

结构为两边反面对称,分子结构中包含有两个 β -紫罗兰酮和4个异戊二烯,中心断裂可产生两个VA分子(见图1)。

人和动物自身都不能合成类胡萝卜素,但都能吸收、利用来源于食物中的该类物质^[2]。不同种类的类胡萝卜素物质在人体各种组织、器官中的分布

收稿日期:2006-09-15.

作者简介:胡兴娟(1981-),女,浙江绍兴人,食品科学硕士研究生。

通讯作者:张连富(1967-),男,河北唐山人,副教授,工学博士,主要从事功能性食品配料研究。Email:zhanglianfu_jd@yahoo.com.cn

存在较大差异,β胡萝卜素是人体血液中最主要的类胡萝卜素之一^[3]。

由于类胡萝卜素物质分子中都含有较多的共轭双键,具有很强的抗氧化活性,故可以保护多不饱和脂肪酸、低密度脂蛋白(LDL)及DNA等免受单线态氧、超氧阴离子、过氧化自由基和羟自由基等活性氧碎片的破坏^[4]。但也正是由于它的多双键结构,它对光、热、氧等因素很敏感,容易氧化降解和异构化,一些金属离子也可以催化其氧化。

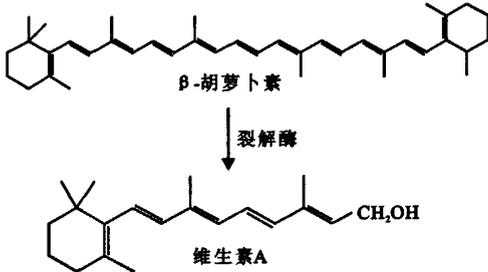


图1 β胡萝卜素的结构及其在加氧酶催化下生成两个维生素A分子

Fig. 1 Construction of β-carotene and decomposition to two molecular vitamin A by mono-oxygenase

由于β胡萝卜素在裂解时的反应非常复杂,许多中间产物在生成的同时又会迅速与其它物质发生反应,这些中间产物的分离鉴定非常困难,从而要推断β胡萝卜素的真正裂解机理比较困难。Garry J Handelman、Werner G Siems等研究了β胡萝卜素在不同条件下的降解反应,并发现其降解产物中的某些成分会抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活性并表现出毒性^[5]。但他们所采用的氧化条件过于强烈,其产物为碳链很短的无色物质,类似反应在人体内不太可能发生。同时,对番茄红素的不完全氧化产物的研究表明,其次级代谢产物具有比番茄红素更理想的生理作用效果。Akihiko Nagao的研究小组在番茄红素的自然氧化产物中发现了可以诱导HL60细胞(人白血病细胞)凋亡的成分,而分子状态的番茄红素不具有这种作用^[6]; Stahl W等用 $\text{OsO}_4 - \text{H}_2\text{O}_2$ 氧化体系对番茄红素进行不完全氧化降解,发现从产物中分离得到的十四碳二醛具有细胞间连接通信(GJC)促进作用的成分^[7]。 OsO_4 是一种对烯烃进行顺式氧化的良好试剂,它作为烯烃氧化剂的最大优点是选择性高、使用方便,但由于毒性大且价格昂贵,因此通常是在仅使用催化剂量 OsO_4 的条件下,加入过氧化氢等另一氧化剂^[8]。该氧化反应体系的最大优点来自于 OsO_4 ,因为如果没有 OsO_4 的参与,即使与过氧化氢接触更长的时间,也可以在产物中发现未发生任何变化的β胡

萝卜素。鉴于此,作者采用 $\text{OsO}_4 - \text{H}_2\text{O}_2$ 氧化体系对β胡萝卜素进行控制型氧化降解^[9]。

1 实验器材

1.1 试验原料及试剂

β胡萝卜素样品,Fluka公司提供;无水乙醇、无水乙醚、 H_2O_2 、二氯甲烷、甲醇,以上均为分析纯;乙腈,甲醇为色谱纯;四氧化钨(OsO_4 ,纯度>99%),Lancaster Synthesis公司产品;MTT,Amerisco公司产品;超级新生小牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司提供。

1.2 仪器设备

AB104型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司制造;Agilent1100型高效液相色谱仪,美国安捷仑公司制造;XK96型微型振荡器,江苏省姜堰市新康仪器厂制造;UV-2102 PCS型紫外可见分光光度计,尤尼克上海仪器有限公司制造;Hettich EBA20型离心机,德国Hettich公司制造;OLYMPUS CKX41型倒置显微镜,日本奥林巴斯公司制造;THERMO Labsystems Multiskan MK3型酶联免疫检测仪,芬兰Thermo Labsystems公司制造。

2 实验方法

2.1 2 g/dL 四氧化钨溶液的配制

将0.5或1.0 g装四氧化钨安瓿瓶充分洗净,放入棕色试剂瓶中,在排毒柜内把安瓿瓶敲破,即刻加入双蒸馏水,配制2 g/dL的 OsO_4 水溶液,盖上盖子,溶解1 d。

2.2 β胡萝卜素的氧化

准确称取5 mg β胡萝卜素,溶于25 mL无水乙醚中,倒入三口烧瓶,并加入8 g无水 Na_2SO_4 ,采用磁力搅拌器持续搅拌并缓慢加入2 g/dL OsO_4 溶液后,缓慢加入 H_2O_2 ,反应25 min后加入冷的质量分数5%的 NaHCO_3 溶液,2 min后停止搅拌。待溶液稳定后,将醚相倒入分液漏斗, Na_2SO_4 用无水乙醚洗。将上述乙醚合并,用冷的质量分数5%的KOH进行多次洗涤,再用蒸馏水洗涤至中性。转移醚相到三角烧瓶,加3 g无水 Na_2SO_4 ,去除水分。再将醚相转移到圆底烧瓶,挥发乙醚。将得到的氧化产物用乙醇溶液密封、避光冷藏^[8-9]。

2.3 β胡萝卜素氧化产物分离

对β胡萝卜素氧化降解产物进行薄层层析。分离得到5个条带,将分离以后的各条色带分别刮下,用无水乙醇溶解并对其降解产物进行波长扫

描。

2.4 β-胡萝卜素氧化产物高效液相色谱检测

色谱条件:二极管阵列检测器(DAD); HEWLETY ZORB×SB C₁₈ 色谱柱;非梯度洗脱流动相:V(乙腈):V(二氯甲烷):V(甲醇)=85:10:5^[10];梯度洗脱:A液:乙腈;B液:V(乙腈):V(二氯甲烷):V(甲醇)=85:10:5;T₀=0 min,A=100%,B=0%;T₁=10 min,A=0%,B=100%;T₂=15 min,A=0%,B=100%。体积流量 1 mL/min;检测波长 450 nm;柱温 30 ℃。

2.5 β-胡萝卜素氧化产物生理活性检测

2.5.1 细胞株培养 将含 10%(体积分数)小牛血清的 RPMI 1640 培养液(含青霉素和链霉素,浓度为 100 IU/mL)抽滤灭菌后,调 pH 至 7.2,将细胞接种于培养瓶中,在 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养。取对数生长期细胞接种于 96 孔培养板并进行检测^[11]。

2.5.2 细胞生长抑制实验(MTT法) 用质量分数 0.25%的胰蛋白酶消化培养细胞,用体积分数 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液配成单个细胞悬液,以每孔 10⁵ 细胞接种于 96 孔培养板中,每孔体积 100 μL。第一列孔以生理盐水对照,其余列加不同浓度的样品培养液,将培养板移入 CO₂ 培养箱中,在 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养。培养结束后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μL,37℃继续孵育 4 h。然后终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150 μL DMSO 使样品溶解,然后在酶联免疫检测仪上测定各孔 570 nm 吸光度值^[11]。按下式计算抑制率:

$$RI = (1 - (\bar{A}_{\text{实验}} / \bar{A}_{\text{对照}})) \times 100\%$$

3 实验结果

3.1 β-胡萝卜素与氧化后产物的对比

根据在不同 H₂O₂、OsO₄ 添加量下反应不同时间后体系中 β-胡萝卜素的残留量来选择具体的氧化条件,结果见表 1。

表 1 β-胡萝卜素氧化降解条件

试验编号	2 g/dL OsO ₄ 添加量/mL	反应时间/min	H ₂ O ₂ 添加量/mL	反应时间/min	β-胡萝卜素残留量/%
1	90	15	150	25	65.63
2	135	15	225	25	59.96
3	135	25	225	35	53.2
4	180	25	300	35	0.51

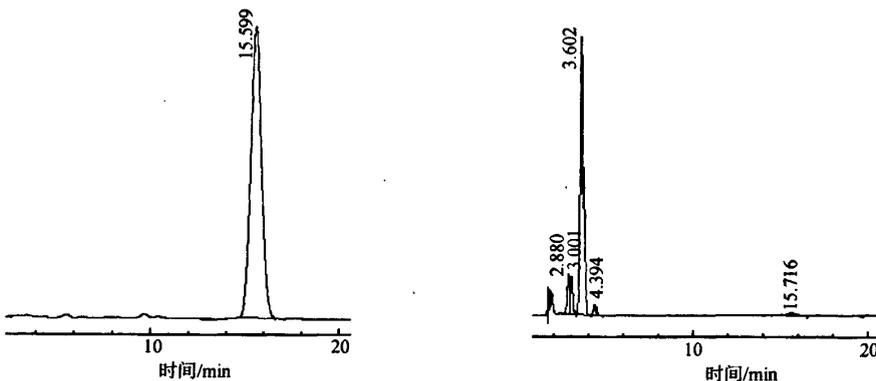
对 β-胡萝卜素进行控制型氧化后,对 β-胡萝卜素和 β-胡萝卜素氧化降解产物进行高效液相检测(见图 2),以同浓度的 β-胡萝卜素作为外标,检测发现试验 4 的氧化降解产物中 β-胡萝卜素质量分数 0.51%,可认为是完全控制型氧化。

3.2 β-胡萝卜素的分离

利用薄层层析对 β-胡萝卜素氧化降解产物进行分离后,通过高效液相检测可以确定分离得到的物质(见图 3)。

3.3 β-胡萝卜素生理活性检测

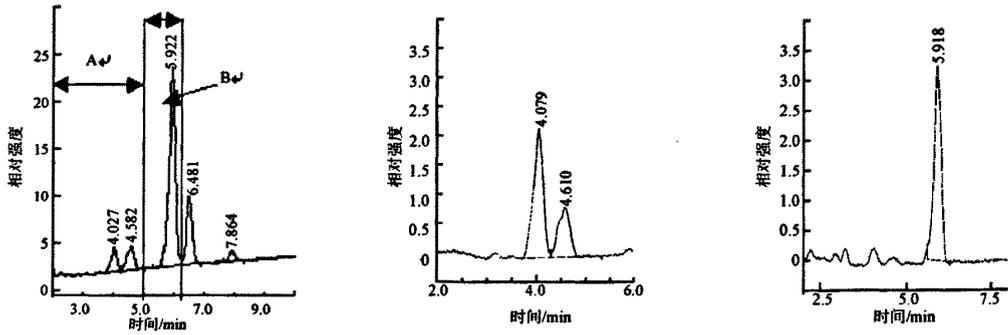
β-胡萝卜素及其氧化降解产物对 HeLa(宫颈癌)细胞以及 bel-7402(肝癌)细胞的作用效果如表 2 所示。



色谱条件:Agilent1100 色谱仪,二极管阵列检测器(DAD); HEWLETY ZORB×SB C₁₈ 色谱柱;流动相,V(乙腈):V(二氯甲烷):V(甲醇)=85:10:5^[10];体积流量 1 mL/min;检测波长 450 nm;柱温 30 ℃。

图 2 β-胡萝卜素氧化前(左)后(右)的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC analysis of β-carotene(left) and its degradation and oxidation product(right)



色谱条件:二级管阵列检测器(DAD);HEWLETTY ZORB×SB C18 色谱柱;梯度洗脱: A液:乙腈;B液:V(乙腈):V(二氯甲烷):V(甲醇)=85:10:5;T₀=0 min,A=100%,B=0%;T₁=10 min,A=0%,B=100%;T₂=15 min,A=0%,B=100%。体积流量 1 mL/min;检测波长 450 nm;柱温 30 ℃。

图3 β-胡萝卜素氧化降解产物(左)及其分离后的组分A(中)、B(右)的高效液相色谱图
Fig.3 HPLC analysis of β-COP and fraction A,B

表2 β-胡萝卜素及其氧化降解产物对Hela细胞与bel-7402细胞的抑制作用

Tab.2 Inhibition effect of β-carotene and its oxidation products on Hela and bel-7402

组别	质量浓度/ (g/L)	Hela		bel-7402	
		A ₅₇₀ ($\bar{x} \pm s$)	RI/%	A ₅₇₀ ($\bar{x} \pm s$)	RI/%
空白	—	0.528 ± 0.029	—	1.434 ± 0.049	—
β-胡萝卜素氧化降解产物	0.025 0	0.447 ± 0.055	15.34	0.974 ± 0.059 *	32.10
	0.050 0	0.350 ± 0.043 **	33.77	0.614 ± 0.023 *	57.16
	0.100 0	0.327 ± 0.021 **	38.07	0.238 ± 0.067 *	83.40
	0.200 0	0.265 ± 0.030 **	49.81	2.121 ± 0.102 *	—
β-胡萝卜素	0.012 5	0.659 ± 0.089 *	—	—	—
	0.025 0	0.233 ± 0.027 **	55.87	0.743 ± 0.023 *	48.21
	0.100 0	0.275 ± 0.046 **	48.01	0.647 ± 0.025 *	54.88
	0.200 0	0.199 ± 0.017 **	62.31	0.763 ± 0.074	46.81
A	0.012 5	0.476 ± 0.038	9.91	1.247 ± 0.020 *	13.06
	0.025 0	0.368 ± 0.042 **	30.30	0.596 ± 0.032 *	58.46
	0.050 0	0.180 ± 0.014 **	65.97	0.247 ± 0.043 *	82.75
	0.100 0	0.520 ± 0.086	—	0.242 ± 0.023 *	83.12
	0.200 0	0.161 ± 0.037 **	69.60	1.149 ± 0.070 *	19.87
B	0.012 5	0.293 ± 0.011	44.51	—	—
	0.025 0	0.263 ± 0.023 **	49.38	0.800 ± 0.049 *	44.25
	0.050 0	0.288 ± 0.008 **	45.51	0.243 ± 0.016 *	83.05
	0.100 0	0.267 ± 0.053 **	49.49	0.241 ± 0.038 *	83.17
	0.200 0	0.234 ± 0.010 **	55.74	1.378 ± 0.063 *	3.91

注:与空白对照组比较,* P<0.05,** P<0.01

从表2可以看出,对于Hela细胞,在较低质量浓度时, β 胡萝卜素氧化降解产物有抑制作用, β 胡萝卜素在较高质量浓度时对其抑制作用比较强,0.2 g/L时抑制率达到62.31%,但是不及主分A的抑制率(69.60%)。 β 胡萝卜素氧化降解产物对bel-7402与Hela有较明显的抑制效果,对bel-7402的抑制效果更强,0.1 g/L的抑制效果达到83.4%,而 β 胡萝卜素氧化降解产物对bel-7402细胞的抑制作用均强与对Hela细胞的作用。

4 结 语

近年来,无论在发达国家还是发展中国家,恶性肿瘤的发病率和死亡率都呈不断上升的趋势^[12]。宫颈癌、肝癌是最常见的恶性肿瘤。全世界每年大约有一百万人患肝癌。因此恶性肿瘤的预防、控制

以及治疗成为当今社会关注的一个焦点。

以 β 胡萝卜素次级代谢产物为研究目标,用特定肿瘤细胞/淋巴细胞的抑制/增殖试验(MTT试验)为检测指标,对 β 胡萝卜素在相对温和条件下的不完全氧化方法进行筛选。 β 胡萝卜素在180 μ L 2 g/dL的OsO₄中反应25 min后加入300 μ L H₂O₂反应35 min,在此条件下进行氧化降解。对其不完全氧化降解产物进行分离、纯化,用分离所得到的产物进行体外细胞培养,发现 β 胡萝卜素氧化降解产物对Hela以及bel-7402也有明显抑制增殖的作用。

该研究对于避免 β 胡萝卜素在高自由基浓度下对人的潜在危害、解释类胡萝卜素物质可能的代谢途径等具有重要指导作用,并有可能发现新的生物活性成分,对 β 胡萝卜素等类胡萝卜素成分的应用具有重要指导意义。

参考文献(References):

- [1] Nelis H J, De Leenheer A P. Microbial production of carotenoids used in foods and feeds[J]. *J Appl Bacteriol*, 1991, 70: 181-191.
- [2] James Allen Olson. Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans[J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1994, 66(5): 1011-1016.
- [3] Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants[J]. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62(6): 1315-1321.
- [4] Vainio Harri. Chemoprevention of cancer: lessons to be learned from beta-carotene trials[J]. *Toxicology Letters*, 2000, 112-113: 513-517.
- [5] Siems W G, Sommerburg O, Hurst J S, et al. Carotenoid oxidative degradation products inhibit Na⁺-K⁺-ATPase[J]. *Free Radic Res*, 2000, 33(4): 427-435.
- [6] Zhang H, Kotake-Nara E, Ono H, et al. A novel cleavage product formed by autoxidation of lycopene induces apoptosis in HL-60 cells [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2003, 35(12): 1653-1663.
- [7] Aust O, Ale-Agha N, Zhang L, et al. Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2003, 41(10): 1399-1407.
- [8] 万新军,周峰岩,陈子康. 在OsO₄催化作用下烯烃的立体选择性氧化反应[J]. *化学试剂*, 1994, 16(2): 96-98.
WAN Xin-jun, ZHOU Feng-yan, CHEN Zi-kang. Stereo-selectivity oxidation of alkene catalyzed by OsO₄[J]. *Chemical Reagents*, 1994, 16(2): 96-98. (in Chinese)
- [9] Wendler N L, Rosenblum C, Tishler M. The oxidation of β -carotene[J]. *J Am Chem Soc*, 1950, 72: 234-239.
- [10] 王强,韩雅珊,广田才之. 食品中多种类胡萝卜素的测定(HPLC法)[J]. *营养学报*, 1997, 19(2): 212-215.
WANG Qiang, HAN Ya-shan, Guangtian Caizhi. Determination of carotenoids in food (by HPLC)[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 1997, 19(2): 212-215. (in Chinese)
- [11] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版社,1996.

(责任编辑:秦和平,朱明)