

长柱重楼总皂苷的抗肿瘤活性及急性毒性作用研究

陈雪梅¹, 杨焕芝², 施敏¹, 杨蓉蓉¹, 陈英杰³, 王跃虎^{4*}, 周轶平^{1*}

1. 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500

2. 昆明市第一人民医院药学部, 云南 昆明 650011

3. 昆明医科大学基础医学院, 云南 昆明 650500

4. 中国科学院昆明植物研究所资源植物与生物技术重点实验室, 云南 昆明 650201

摘要: **目的** 研究长柱重楼总皂苷(PCT3)的体内外抗肿瘤活性及 ig 一次性给药的急性毒性。**方法** 采用改良 MTT 法检测 PCT3 对人结肠癌(HCT-116)细胞和人胃癌(SGC-7901)细胞增殖的影响, 计算半数抑制浓度(IC₅₀)。ig 一次性给予小鼠 1.646、2.352、3.360、4.800 g/kg PCT3 进行急性毒性测试。建立小鼠皮下肝癌(H22)模型, 分别 ip 顺铂 2 mg/kg (阳性对照)、生理盐水(阴性对照); ig 给予 0.5% CMC-Na (溶剂对照)、30、90、270 mg/kg PCT3, 连续给药 9 d, 检测小鼠肿瘤、体质量抑制率, 肝、脾、肾、胸腺系数。**结果** 与阴性对照组比较, PCT3 对 HCT-116 和 SGC-7901 细胞增殖有明显的抑制作用($P < 0.05$ 、 0.01), IC₅₀ 分别为 7.6、5.9 $\mu\text{g/mL}$ 。大剂量 PCT3 可致动物腹泻及活动抑制, 半数致死量(LD₅₀)为 1.985 5 mg/kg。与溶剂对照组比较, PCT3 对小鼠体质量无显著影响; 270 mg/kg PCT3 对 H22 肿瘤发挥显著抑制作用($P < 0.05$), 抑制率为 26.8%; 对各脏器系数均无显著影响; 与阴性对照组比较, 顺铂显著抑制肿瘤和体质量的增长($P < 0.01$), 抑制率分别达 81.4%和 37.4%; 对肝脏、脾脏、胸腺系数均发挥显著抑制作用($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 顺铂抑瘤率明显高于 PCT3, 但其显著抑制小鼠的体质量和肝脏、脾脏、胸腺系数, PCT3 在体内外具有一定的抗肿瘤活性, 且毒性较低, 其活性及作用机制有待进一步研究。

关键词: 长柱重楼; 总皂苷; 抗肿瘤; 小鼠肝癌; 急性毒性; 脏器系数

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2017)07-0904-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.07.004

Antitumor activity and acute toxicity of total saponins from *Paris forrestii*

CHEN Xue-mei¹, YANG Huan-zhi², SHI Min¹, YANG Rong-rong¹, CHEN Ying-jie³, WANG Yue-hu⁴, ZHOU Yi-ping¹

1. School of Pharmaceutical Sciences & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

2. Department of Pharmacy, Kunming Municipal First People's Hospital, Kunming 65011, China

3. Basic Medical School of Kunming Medical University, Kunming 650500, China

4. Key Laboratory of Economic Plants and Biotechnology, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

Abstract: Objective To detect the antitumor activity of total saponins from *Paris forrestii* (PCT3) *in vitro* and *in vivo* and its acute toxicity by disposable ig administration. **Methods** The inhibitory effect of PCT3 on proliferation of human colorectal cancer cells (HCT-116) and human gastric cancer cells (SGC-7901) was detected by modified MTT assay, and the half inhibition concentration (IC₅₀) was calculated. Acute toxicity test of PCT3 at doses of 1 646, 2 352, 3 360 and 4 800 mg/kg was performed by ig administration in mice. Mouse model of hepatocellular carcinoma (H22) was established with sc injection, and the mice were respectively ip given cisplatin 2 mg/kg (positive control), normal saline (negative control), ig given 0.5% CMC-Na (solvent control),

收稿日期: 2017-01-23

基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项项目(2014FB011); 云南省教育厅科学研究基金重点项目(2014Z060)

作者简介: 陈雪梅(1992-), 女, 在读硕士, 研究方向为肿瘤药理学。Tel: 15288441059 E-mail: chenxuemei-sy@com

*通信作者 周轶平, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为肿瘤药理学。Tel: 13529325922 E-mail: zhouyypym@foxmail.com

王跃虎, 博士, 副研究员, 研究方向为民族植物学与药物化学。Tel: (0871) 65223318 E-mail: wangyuehu@mail.kib.ac.cn

30, 90 and 270 mg/kg PCT3 continuously for 9 d, and the inhibitory rate of tumor, body weight, liver, spleen, kidney and thymus coefficients were detected. **Results** PCT3 had significant inhibitory effect on the proliferation of HCT-116 and SGC-7901 cells, with IC_{50} values of 7.6 and 5.9 $\mu\text{g/mL}$, respectively. PCT3 induced animal diarrhea and activity inhibition in mice, the half lethal dose (LD_{50}) was 1985.5 mg/kg. Compared with solvent control group, PCT3 had no significant effect on body weight of mice; 270 mg/kg PCT3 had a significant inhibitory effect on H22 tumor mass ($P < 0.05$), the inhibitory rate was 26.8%; There was no significant effect on the organ coefficient; compared with negative control group, cisplatin significantly inhibited the tumor growth and body weight ($P < 0.01$), the inhibitory rates were 81.4% and 37.4% respectively; The liver, spleen and thymus coefficients were also significantly inhibited ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** The tumor inhibitory rate of cisplatin is significantly higher than that of PCT3, but it also significantly inhibits mice body weight and liver, spleen, thymus coefficients. PCT3 shows obvious antitumor activity *in vitro* and *in vivo*, and the toxicity is not remarkable. It could be a potential antitumor agent in the future.

Key words: *Paris forrestii* (Takht) H. Li; total saponins; antitumor activity; mouse transferred hepatocellular carcinoma; acute toxicity; organ coefficient

重楼在我国有着悠久的药用历史,《中华人民共和国药典》^[1] (2015年版) 收载重楼为百合科重楼属多年生草本植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.或七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎,其性微寒,味苦,有小毒,归肝经。重楼具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊的功效,主要用于疮痍肿毒、毒蛇咬伤、跌扑伤痛、惊风抽搐等症^[2],是云南白药、宫血宁胶囊等中成药的主要成分,对治疗跌打损伤有独特疗效^[3]。现代药理学研究结果表明重楼具有抗肿瘤、消炎、抑菌、镇静、止血、免疫调节及镇痛等活性^[4-7],其主要活性成分为甾体皂苷^[8-10]。

重楼属植物全世界共有 26 种,分布于欧亚大陆的热带及温带地区,我国种类最多,拥有 19 种,其中西南各省区种类和资源极为丰富,主要分布于我国的云南、四川、贵州等地^[11-13],其中独龙重楼 *Paris dulongensis*、皱叶重楼 *Paris rugosa* 和长柱重楼 *Paris forrestii* (Takht) H. Li 为云南特有^[14-15]。

长柱重楼根茎入药,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊的功效,用于治疗痈疽疮疡、无名肿毒、毒蛇咬伤、咽喉肿痛、腮腺炎、扁桃体炎和大头瘟^[16-17],目前在云南省怒江傈僳族自治州已有大量的人工栽培^[18]。中国科学院昆明植物研究所王跃虎研究团队发现,长柱重楼总皂苷(PCT3)提取率为 6.6%,作用于乳腺癌 MCF-7 细胞和肺癌 A-549 细胞的 IC_{50} 值分别为 0.50 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.45 $\mu\text{g/mL}$ ^[19]。在前期研究的基础上,本研究将探讨 PCT3 对 HCT-116 细胞和 SGC-7901 细胞增殖的抑制作用及经口一次性 ig 给药的急性毒性作用;构建小鼠肝癌 H22 模型,检测 PCT3 对小鼠肝癌 H22 移植瘤的抑制作用,为

长柱重楼作为抗肿瘤新药的研发奠定基础。

1 材料

1.1 细胞株及动物

HCT-116 细胞:人结直肠癌细胞;SGC-7901 细胞:人胃癌细胞;H22 细胞:小鼠肝癌细胞,均由昆明医科大学药学院暨天然药物药理重点实验室提供。

SPF 级 5~6 周龄的昆明种小鼠,体质量 18~22 g,雌雄各半(急性毒性实验)、雌性(体内抗肿瘤实验),由昆明楚商科技有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2013-0004。

1.2 受试样品及试剂

长柱重楼根茎于 2014 年 9 月采集自云南省怒江傈僳族自治州,经中国科学院昆明植物研究所李恒研究员鉴定为长柱重楼 *Paris forrestii* (Takht) H. Li,并提取 PCT3,提取方法及提取物信息见文献^[19]。

顺铂(批号 20150711),南京制药厂有限公司;RPMI-1640 培养基(批号 0044515),BI 公司;新生牛血清(批号 1128143)、胰蛋白酶消化液(批号 1665845),gibco 公司;生理盐水(批号 C150308),昆明南疆制药有限公司;PBS 片(批号 2810305),MP 公司;MTT (M-2128),Sigma 公司;羧甲基纤维素钠(CMC-Na,批号 108D025),Solarbio 公司。

1.3 主要仪器

CPA224S 型电子天平(德国 Sartorius 公司);EVL-53 型超净工作台(珠海再鑫公司);2406 型 CO2 细胞培养箱(美国 SHELLAB 公司);Plus384 型全波长酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);CKX31 型倒置生物显微镜(日本 Olympus 公司);TDL-4A 型普通低速离心机(上海菲恰尔公司);YCD-EL259 型医用冰箱(合肥美菱公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

2.1.1 HCT-116 和 SGC-7901 细胞的培养 用含 10%新生牛血清的 RPMI-1640 培养基中,在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。细胞 4~5 d 传代 1 次,使用 0.25%胰蛋白酶消化,取对数生长期的细胞进行实验。

2.1.2 H22 细胞的培养 复苏保存在液氮中的 H22 细胞,用生理盐水将细胞密度调整为 $1 \times 10^8/\text{mL}$,然后将 H22 细胞悬液接种于小鼠腹腔,每只 0.2 mL,细胞接种 5~7 d 小鼠腹腔隆起,从中抽取 H22 细胞,利用小鼠腹腔繁殖瘤细胞,将小鼠腹腔内传 2 代以上的 H22 细胞用于实验。

2.2 改良 MTT 法检测 PCT3 对 HCT-116 和 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用

取对数生长期细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化后配制成 $8.9 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 90 μL ,37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁后,加入不同浓度的 PCT3,10 $\mu\text{L}/\text{孔}$,使其终浓度分别为 1、3、10、30、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每组设 5 个平行孔。于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 48 h 后,每孔加入 10 μL MTT 溶液 (5 mg/mL),继续培养 4 h 后,每孔加入 100 μL 三联液 (10%SDS-5%异丁醇-0.012 mol/L HCl) 溶解甲臢颗粒,于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 12 h;将培养板置于酶标仪中,于 570、630 nm 双波长下用全波长酶标仪测定各孔的吸光度 (A),实验重复 3 次,取平均值。同时设置调零孔 (培养液、MTT、三联液),阴性对照孔 (细胞、培养液、生理盐水、MTT、三联液),顺铂作为阳性对照,终浓度为 0.3、1.0、3.0、10.0、30.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由 A 值计算抑制率,细胞增殖抑制率 = $1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{调零}})$,实验重复 3 次,取抑制率平均值,用各浓度抑制率均值计算 IC₅₀ 值。

2.3 PCT3 急性毒性实验

按照《中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则》开展急性毒性研究^[20]。60 只昆明小鼠禁食 12 h 称质量,随机分为 6 组,雌雄各半,每组 10 只。PCT3 各剂量组用 0.5% CMC-Na 配制,分别 ig 给予小鼠 0.5% CMC-Na (对照组)、1.646、2.352、3.360、4.800 g/kg (依据预实验中动物全部死亡的最低剂量和全部存活的最大剂量,以 0.7 的组距设置剂量) PCT3。0.4 mL/10 g,1 次性给药,给药后

观察并详细记录动物的毒性反应。

在 24 h 内多次观察,以后每天观察 3 次,连续观察 14 d。观察小鼠体质量变化、饮食、外观、行为、排泄物、死亡情况及中毒情况 (中毒反应的症状、严重程度、起始时间、持续时间、是否可逆) 等。若有小鼠死亡,则将死亡小鼠解剖,肉眼观察心、肝、脾、肺、肾等脏器的变化,14 d 观察期结束后,将存活的小鼠处死进行解剖,按照上述同样方法对主要脏器大体病理变化进行肉眼观察。记录动物的毒性反应情况和死亡情况,采用 Bliss 法测定半数致死剂量 (LD₅₀)^[21-22]。

2.4 PCT3 抗小鼠肝癌 H22 移植瘤的作用

2.4.1 瘤细胞接种 取在体内传 2 代生长良好的 H22 细胞,用生理盐水调整密度为 $1 \times 10^8/\text{mL}$ 的细胞悬液,按 0.2 mL/只接种于小鼠右侧腋部皮下^[23-25]。动物接种瘤细胞的第 2 天,禁食 4 h 后将动物随机分为 6 组,每组 15 只。按 0.2 mL/10 g 体质量,分别 ip 顺铂 2 mg/kg (阳性对照)、生理盐水 (阴性对照);ig 给予 0.5% CMC-Na (溶剂对照)、30、90、270 mg/kg PCT3 (根据急性毒性实验的 LD₅₀ 设置剂量,分别约为 1/66、1/22、1/7 LD₅₀),连续给药 9 d。

2.4.2 指标检测 给药前及处死前分别称量小鼠体质量。于停药 24 h 后处死,解剖取其肿瘤、肝、脾、肾及胸腺,大体观察各个脏器是否异常,并称瘤质量及各脏器质量。分别按下列公式计算抑瘤率、体质量抑制率和脏器抑制率:

肿瘤抑制率 = $(\text{溶剂对照组平均瘤质量} - \text{给药组平均瘤重}) / \text{溶剂对照组平均瘤质量}$

体质量抑制率 = $(\text{溶剂对照组停药后平均体质量} / \text{给药前平均体质量} - \text{给药组停药后平均体质量} / \text{给药前平均体质量}) / (\text{溶剂对照组停药后平均体质量} / \text{给药前平均体质量})$ ^[26]

脏器系数 (mg/g) = 脏器质量 (mg) / 体质量 (g)^[27-28]

脏器抑制率 = $(\text{溶剂对照组平均脏器系数} - \text{给药组平均脏器系数}) / \text{溶剂对照组平均脏器系数}$ ^[26]

2.5 数据处理

运用 GWBASIC 软件计算 IC₅₀ 值及 95%可信区间;采用 Bliss 法计算 LD₅₀;采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,多组间比较进行单因素方差分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对 2 株人癌细胞增殖的影响

从表 1 可以看出,经不同浓度的 PCT3 和顺铂作用后,HCT-116、SGC-7901 细胞的生长受到不同

程度的抑制,并呈浓度相关性。与阴性对照组比较,PCT3在1、3、10、30、100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内,对HCT-116细胞的抑制率分别为7.9%、15.8% ($P<0.05$)、42.7% ($P<0.01$)、87.3% ($P<0.01$)、98.9% ($P<0.01$);顺铂在0.3、1.0、3.0、10.0、30.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内,对HCT-116细胞的抑制率分别为3.9%、8.7%、19.9% ($P<0.05$)、53.2% ($P<0.01$)、79.1% ($P<0.01$);PCT3和顺铂作用于HCT-116细胞48 h后 IC_{50} 分别为7.6 $\mu\text{g/mL}$ 和9.2 $\mu\text{g/mL}$,95%可信区间分别为5.2~11.1 $\mu\text{g/mL}$ 、7.1~11.8 $\mu\text{g/mL}$ 。

与阴性对照组比较,PCT3在1、3、10、30、100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内,对SGC-7901细胞的抑制率分别4.4%、29.9% ($P<0.05$)、63.9% ($P<0.01$)、84.2% ($P<0.01$)、99.9% ($P<0.01$);顺铂在0.3、1.0、3.0、10.0、30.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内,对SGC-7901细胞的抑制率分别为7.6%、11.3%、52.5% ($P<0.01$)、86.6% ($P<0.01$)、89.8% ($P<0.01$);PCT3和顺铂作用于SGC-7901细胞48 h后 IC_{50} 分别为5.9和3.3 $\mu\text{g/mL}$ 。95%可信区间分别为3.4~10.1 $\mu\text{g/mL}$ 、2.1~5.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

表1 PCT3对HCT-116、SGC-7901细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of PCT3 on proliferation of HCT-116 and SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	HCT-116 细胞 抑制率/%	SGC-7901 细胞 抑制率/%
阴性对照	—	—	—
PCT3	1	7.9 $\pm$ 2.0	4.4 $\pm$ 3.8
	3	15.8 $\pm$ 9.4*	29.9 $\pm$ 8.2*
	10	42.7 $\pm$ 8.8**	63.9 $\pm$ 13.9**
	30	87.3 $\pm$ 3.6**	84.2 $\pm$ 4.8**
	100	98.9 $\pm$ 0.8**	99.9 $\pm$ 0.5**
顺铂	0.3	3.9 $\pm$ 1.7	7.6 $\pm$ 7.3
	1.0	8.7 $\pm$ 3.5	11.3 $\pm$ 5.4
	3.0	19.9 $\pm$ 6.0*	52.5 $\pm$ 28.6**
	10.0	53.2 $\pm$ 18.0**	86.6 $\pm$ 8.6**
	30.0	79.1 $\pm$ 8.9**	89.7 $\pm$ 11.2**

与阴性对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs negative control group

3.2 急性毒性试验

一次性ig给予PCT3后,多数小鼠表现为活动减少、腹泻,持续时间约3~9 h;4.800 g/kg剂量组小鼠在给药后4 h内全部死亡,3.360 g/kg剂量组

在给药后8~10 h仅1只存活,其它剂量组少部分动物在给药后第2天死亡。存活小鼠多于24 h后上述症状减轻,48~72 h逐渐恢复正常。死亡小鼠经解剖,可见大部分动物胃肠胀气,表面黏膜颜色苍白,少数小肠发黑,内见棕褐色液体,其余重要脏器未见明显异常。PCT3 ig一次性给药后,剂量与死亡率关系如图1所示。在1.646~2.352 g/kg,PCT3对小鼠的致死率由30.0%迅速升高到70.0%;在2.352~4.800 g/kg,致死率由70.0%升至100.0%。用Bliss法计算PCT3的 LD_{50} 为1.985 5 mg/kg,95%的可信限为1.412 8~2.394 8 mg/kg。

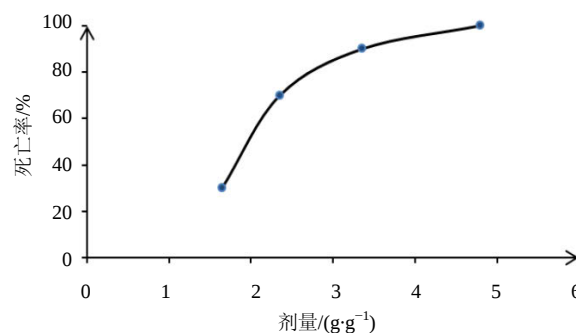


图1 不同剂量PCT3一次性ig给药后小鼠的死亡率

Fig. 1 Mortality rate of PCT3 in mice by disposable ig administration

3.3 对小鼠肝癌H22细胞生长的抑制作用

给药9 d,停药1 d后处死荷瘤小鼠,迅速剥离肿瘤组织,称量各组小鼠肿瘤干质量,计算抑瘤率(实验过程中有个别动物死亡,具体动物数见表2)。从表2可以看出,与溶剂对照组比较,30、90、270 mg/kg PCT3对小鼠肿瘤生长和体质量抑制率分别为2.0%、15.6%、26.8%和-5.4%、4.1%、3.4%,与对照组比较,高剂量组肿瘤质量显著下降($P<0.05$),表现出一定抗肿瘤作用;与阴性对照组比较,2 mg/kg顺铂显著抑制了肿瘤的生长和体质量($P<0.01$),抑制率分别达81.4%和37.4%,对肿瘤和体质量的抑制作用显著强于PCT3各剂量组($P<0.01$)。

3.4 对荷瘤小鼠肝、脾、肾、胸腺系数的影响

如表3所示,与溶剂对照组比较,30、90、270 mg/kg PCT3对小鼠肝脏和肾脏系数抑制率分别为-3.7%、5.5%、-1.8%和8.0%、-1.6%、4.0%;与阴性对照组比较,2 mg/kg顺铂对小鼠肝脏和肾脏抑制率分别为21.0%和-4.7%,其中肝脏抑制率差异显著($P<0.01$);且强于PCT3各剂量组($P<0.01$)。

表2 PCT3对荷瘤小鼠肿瘤生长和体质量的影响($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effect of PCT3 on tumor growth and body weight in H22 tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	肿瘤质量/g	抑瘤率/%	停药后体质量/给药前体质量	抑制率/%
溶剂对照	—	13	2.05±0.68	—	1.48±0.17	—
PCT3	30	15	2.01±0.58 ^{##}	2.0	1.56±0.22 ^{##}	-5.4
	90	14	1.73±0.39 ^{##}	15.6	1.42±0.19 ^{##}	4.1
	270	15	1.50±0.27 ^{*##}	26.8	1.43±0.14 ^{##}	3.4
阴性对照	—	16	2.10±0.70	—	1.63±0.21	—
顺铂	2	16	0.39±0.17 ^{△△}	81.4	1.02±0.16 ^{△△}	37.4

与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与顺铂组比较: $^{##}P < 0.01$ ^{*} $P < 0.05$ vs solvent control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs negative control group; $^{##}P < 0.01$ vs Cisplatin group表3 PCT3对荷瘤小鼠肝脏和肾脏系数的影响($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of PCT3 on liver and kidney coefficients in H22 tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	肝脏系数/(mg·g ⁻¹)	肝脏抑制率/%	肾脏系数/(mg·g ⁻¹)	肾脏抑制率/%
溶剂对照	—	13	68.31±7.70	—	12.13±1.06	—
PCT3	30	15	70.84±3.86 ^{##}	-3.7	11.16±1.14	8.0
	90	14	64.57±5.38 ^{##}	5.5	12.33±1.44	-1.6
	270	15	69.54±5.32 ^{##}	-1.8	11.65±1.04	4.0
阴性对照	—	16	67.14±6.74	—	11.44±1.03	—
顺铂	2	16	53.06±5.80 ^{△△}	21.0	11.98±2.12	-4.7

与阴性对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与顺铂组比较: $^{##}P < 0.01$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs negative control group; $^{##}P < 0.01$ vs Cisplatin group

如表4所示,与溶剂对照组比较,30、90、270 mg/kg PCT3对小鼠的脾脏和胸腺的抑制率分别为-13.8%、0.1%、2.9%和-1.3%、-3.2%、6.0%;与阴性对照组比较,2 mg/kg 顺铂对小鼠的脾脏和胸腺均有显著抑制

作用($P < 0.05$ 、0.01),抑制率分别为61.5%和28.7%;与顺铂组比较,30、90、270 mg/kg PCT3对小鼠脾脏抑制作用明显较弱($P < 0.01$),30、90 mg/kg PCT3对小鼠脾脏抑制作用明显较弱($P < 0.05$)。

表4 PCT3对荷瘤小鼠脾脏系数和胸腺系数的影响($\bar{x} \pm s$)Table 4 Effect of PCT3 on spleen and thymus coefficients in H22 tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	脾脏系数/(mg·g ⁻¹)	脾脏抑制率/%	胸腺系数/(mg·g ⁻¹)	胸腺抑制率/%
溶剂对照	—	13	6.85±1.66	—	3.17±1.07	—
PCT3	30	15	7.75±2.37 ^{##}	-13.8	3.21±1.24 [#]	-1.3
	90	14	6.84±1.01 ^{##}	0.1	3.27±1.14 [#]	-3.2
	270	15	7.05±1.85 ^{##}	-2.9	2.98±1.18	6.0
阴性对照	—	16	7.50±0.92	—	3.17±0.69	—
顺铂	2	16	2.89±0.70 ^{△△}	61.5	2.26±1.22 [△]	28.7

与阴性对照组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$; 与顺铂组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs negative control group; $^{\#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ vs Cisplatin group

4 讨论

重楼属植物具有较强的生理活性和独特的药用价值,近年来随着研究的深入该属植物的药用价值越来越受重视。长柱重楼以分布广、皂苷种类多以及总皂苷含量高为特点,具有较好的开发潜力。

本实验研究PCT3对HCT-116和SGC-7901细胞增殖抑制作用,结果显示,PCT3对HCT-116和SGC-7901细胞具有显著抑制作用,呈现明显的量效关系,IC₅₀值分别为7.6和5.9 μg/mL,表明PCT3具有良好的体外抗肿瘤活性。孙治国等^[29]研究表

明,滇重楼总皂苷提取率为4.2%,对乳腺癌MCF-7细胞和肺癌A549细胞的 IC_{50} 值分别为71.2 $\mu\text{g/mL}$ ^[30]和大于120 $\mu\text{g/mL}$ ^[31]。由此可知,长柱重楼总皂苷活性优于滇重楼总皂苷,是值得关注的新的抗肿瘤药用资源。

体内实验结果显示,30、90、270 mg/kg的PCT3能抑制小鼠移植瘤H22的生长,抑瘤率分别为2.0%、15.6%、26.8%,显示出一定的体内抗肿瘤活性。李涛^[32]对接种移植性肉瘤S180的昆明小鼠ig给予用生理盐水配制的,剂量为75、150、300 mg/kg的滇重楼总皂苷,结果显示,滇重楼总皂苷在体内具有明显的抗肿瘤活性,抑瘤率分别为38%、41%和42%。以上结果表明,PCT3的体内抗肿瘤活性略低于滇重楼总皂苷,而PCT3的体外活性强于滇重楼总皂苷,推测PCT3 ig给药后经肝脏代谢,部分失活,使其抑瘤率较低。

为评价PCT3安全性,通过PCT3对小鼠的急性毒性实验研究发现:经口一次性给药的 LD_{50} 值为1.985 5 g/kg,95%的可信限为1.412 8~2.394 8 g/kg,毒性主要表现为活动抑制及对消化系统的影响,表明PCT3具有一定的毒性,这将为长柱重楼后续药理作用研究和开发提供实验依据。

本实验在对PCT3药效学的试验设计中,引入了一些基本的毒理学评价指标,如观察样品对荷瘤小鼠瘤重影响的同时,还逐步了解样品对小鼠体质量及主要脏器的影响,以期利用少量的动物获得更多指标,对样品的有效性及安全性进行客观及完整的评价^[33-34]。脏器系数是衡量药物对动物脏器影响程度的常用指标,在一定程度上也反映了药物的毒副作用。在肿瘤治疗中,与肿瘤的发生、生长和免疫有着非常重要的关系^[35]。

胸腺组织是机体重要的免疫器官,同时也是T细胞成熟、进一步增生和分化的场所。有研究表明,在肿瘤发生的过程中,胸腺组织会出现严重的萎缩和破坏,同时胸腺中含量最多的淋巴细胞亚群 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 未成熟细胞也严重消耗^[36-37]。脾脏作为机体重要的淋巴器官,在机体的各种免疫活动中均起到重要作用,其中包括细胞免疫反应和体液免疫反应。细胞免疫反应主要表现为动脉淋巴鞘增大以及大量的免疫活性细胞输出增加,而体液免疫反应主要表现为骨髓淋巴小结、脾索中浆细胞的增多以及输出血液中抗体浓度的增加。本研究结果显示:30、90、270 mg/kg PCT3对小鼠脾脏和胸腺的抑制率分别

为-13.8%、0.1%、-2.9%和-1.3%、-3.2%、6.0%,顺铂对小鼠脾脏和胸腺的抑制率分别为61.5%和28.7%,表明PCT3各剂量组对小鼠免疫系统的损害明显弱于顺铂。

肝脏在药物的代谢和处置中起着十分重要的作用,大多数药物和毒物在肝内经生物转化作用而排出体外,而肾脏在排泄代谢废物、调节体液、分泌内分泌激素、维持体内内环境稳定和新陈代谢正常进行等方面也起到重要作用。因此,肝肾是反映药物有无毒性最直接的脏器。30、90、270 mg/kg PCT3对小鼠肝脏抑制率分别为-3.7%、5.5%、-1.8%,顺铂对小鼠肝脏抑制率为21.0%,说明PCT3各剂量组对小鼠肝脏的抑制作用明显弱于顺铂。30、90、270 mg/kg PCT3对小鼠肾脏抑制率分别为8.0%、-1.6%、4.0%,顺铂小鼠肾脏抑制率为-4.7%,二者对小鼠肾脏均无明显抑制作用。

虽然阳性对照药顺铂抑瘤率明显高于PCT3,但其显著性地抑制了小鼠的体质量和肝脏、脾脏、胸腺等脏器系数。PCT3与顺铂比较,在抑制肿瘤细胞生长的同时,显示出较低的毒性,有待于对PCT3的活性及作用机制进行进一步的研究。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015.
- [2] 叶方,杨光义,李志荣,等.重楼皂苷的提取工艺及质量控制研究概述[J].中国药师,2011,14(8):1207-1209.
- [3] 杨永红,陆峻波,王明辉,等.从文献分析看我国重楼研究进展[J].中药材,2008,31(1):165-167.
- [4] Wang G X, Han J, Zhao L W, et al. Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Paris polyphylla* [J]. Phytomedicine, 2010, 17(14): 102-105.
- [5] Wang Y, Hao J, Gao W, et al. Study on hemostatic activities of the rhizome of *Paris bashanensis* [J]. Pharm Biol, 2013, 51(10): 1321-1325.
- [6] Zhao J, Mou Y, Shan T, et al. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. Molecules, 2010, 15(11): 7961-7970.
- [7] GuangLie C, WeiShi G, GaiLing H, JianPing C. Effect of Paris saponin on antitumor and immune function in U14 tumor-bearing mice [J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2013, 10(3): 503-507.
- [8] Xiao X, Zou J, Bui-Nguyen T M, et al. Paris saponin II of *Rhizomn paridis*-a novel inducer of apoptosis in human ovarian cancer cells [J]. Biosci Trends, 2012, 6(4):

- 201-211.
- [9] Wu S, Gao W, Qi U F, et al. Simultaneous quantification of *Polyphyllin D* and *Paris H*, two potential antitumor active components in *Paris polyphylla* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and the application to pharmacokinetics in rats [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, 9(5): 54-60.
- [10] Yue G, Wei J, Qian X, et al. Synergistic anticancer effects of *polyphyllin I* and *evodiamine* on freshly-removed human gastric tumors [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65164.
- [11] 李恒. 重楼属系统发育探讨 [J]. 云南植物研究, 1984, 6(4): 351.
- [12] 李恒. 重楼属分类研究 [J]. 植物研究, 1986, 6(1): 109.
- [13] 李恒, 顾志建, 纳海燕. 重楼属植物的细胞地理学研究 [J]. 植物分类学报, 1988, 26(1): 1.
- [14] 李恒. 重楼属的系统发育 • 重楼属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 8.
- [15] 赵志勇, 高文远, 黄贤校, 等. 重楼属植物分类学研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 244-246.
- [16] 刀志灵, 龙春林, 刘怡涛. 云南省高黎贡山怒族对植物传统利用的初步研究 [J]. 生物多样性, 2003, 11(3): 231-139.
- [17] 朱兆云. 云南省天然药物图鉴 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2010, 6: 127.
- [18] 王跃虎, 牛红梅, 张兆云, 等. 重楼属植物的药用价值及其化学物质基础 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(5): 833-839.
- [19] 王跃虎, 张兆云, 牛红梅, 等. 一种治疗癌症的植物药及其制备方法与应用 [P]. 中国专利: CN104706896A, 2015-06-17.
- [20] 国家食品药品监督管理局药品评审中心. 中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则 (GPT2-1) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2005: 3.
- [21] 黎七雄, 汪辉, 肖清秋, 等. 半数致死量 (LD_{50}) Bliss 法的评价及计算 [J]. 数理医药学杂志, 1995, 8(4): 318-320.
- [22] 姜晓东, 阎政礼, 周桂凤. R 程序在 Bliss 法计算半数致死量中的运用 [J]. 实用预防医学, 2011, 18(3): 431-432.
- [23] Cui B K, Liu S, Li S H, et al. Effect of *Tea Polyphenol* on oxidative injury in S180 cells induced hepatocarcinoma mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 5571-5583.
- [24] 冯浩丽, 高建平. 党参多糖体内抗肿瘤活性研究及急性毒性实验 [J]. 山西中医, 2012, 28(8): 49-50.
- [25] 朱坤杰, 宋娟, 沈云虹, 等. 库拉索芦荟多糖和木立芦荟多糖体内抗肿瘤作用 [J]. 中成药, 2010, 11(32): 1978-1980.
- [26] 施敏, 周云, 杜馨娥, 等. 金属铁与氟尿嘧啶配合物的体内抗肿瘤活性及其毒性 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(12): 1779-1786.
- [27] Zhang Y, Xiao Y, Wang P, et al. Compositions and anti-tumor activity of *Pyropolyporus fomentarius* petroleum ether fraction *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109599.
- [28] 覃华, 张琰, 韩艳, 等. 穿心莲内酯对 S180 小鼠体内抗肿瘤作用的研究 [J]. 科学技术与工程, 2010, 10(28): 6971-6874.
- [29] 孙治国, 张琳, 李凌军, 等. 重楼总皂苷提取工艺研究 [J]. 中药材, 2007, 30(6): 726-729.
- [30] 李春江. 重楼皂苷抗乳腺癌及免疫调节作用研究 [D]. 东北师范大学, 2011.
- [31] 陈志红, 龚先玲, 刘义. 重楼总皂苷对人肺癌细胞 A549 的增殖抑制及对细胞周期的影响 [J]. 实用医学杂志, 2010, 26(15): 2685-2687.
- [32] 李涛. 重楼总皂苷抗肿瘤机制研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2013.
- [33] 沈建忠. 动物毒理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [34] 李寿祺. 动物毒理学原理与方法 [M]. 成都: 四川大学出版社, 2003.
- [35] Yuan H M, Song J M, Li X G, et al. Enhanced immune stimulatory and antitumor activity of different derivatives of *k-carrageenan oligosaccharides* from *Kappaphycus striatum* [J]. *Appl Phycol*, 2011, 23: 59-65.
- [36] Prins R M, Graf M R, Merchant R E, et al. Thymus Function and output of recent thymus emigrant T Cells during intracranial glioma progression [J]. *J Neurooncol*, 2003, (64): 45-54.
- [37] Shanker A, Singh S M. Immunopotential in mice bearing a spontaneous transplantable T-cell lymphoma: role of thymic extract [J]. *Neoplasma*, 2003, 50(4): 272-279.