

内折香茶菜乙素抗肿瘤作用的研究<sup>△</sup>

河南医科大学医学实验中心(郑州 450052) 李继成\* 杨丽嘉 刘兰琦  
河南省医学科学研究所 叶启霞

**摘要** 内折香茶菜乙素是从内折香茶菜 *Rabdosia inflexus* (Thumb) Kundo 叶中分离得出的一种新的二萜化合物,实验证明,在体外对艾氏腹水癌细胞有很强的细胞毒作用,对 Lewis 肺癌,小鼠肉瘤 S<sub>180</sub> 实体型及腹水型、小鼠肝癌 HCA 实体型及腹水型等均有明显的抗肿瘤作用,对以小鼠溶血素形成为指标的体液免疫有轻度抑制作用,而对由 DNCB 诱导的小鼠迟发性超敏反应为指标的体内细胞免疫无明显影响。

**关键词** 内折香茶菜 内折香茶菜乙素 二萜化合物 抗肿瘤作用

内折香茶菜乙素是从河南省嵩县产内折香茶菜 *Rabdosia inflexus* (Thumb) Kundo 叶中分离得到的一种化合物,经结构鉴定为螺断贝壳杉烯二萜<sup>[1]</sup>,本文就其抗肿瘤作用进行研究

### 1 材料

1.1 内折香茶菜乙素,由河南医科大学医学实验中心新药研究室提供,含量 0.25% (原生药计算),为无色棱形结晶,溶于水,实验时用生理盐水稀释到所需浓度备用

1.2 动物:由河南医科大学实验动物中心提供的昆明种小白鼠,体重 (20±2) g,雌雄兼用,室温为 22℃~25℃,常规饲料喂养,饮水量不限

1.3 瘤株, ECA 艾氏腹水癌, S<sub>180</sub> 肉瘤实体型及腹水型, HCA 肝癌实体型及腹水型, Lewis 肺癌实体型,各瘤株均由河南省医科所药理室保种,按常规方法传代接种

### 2 实验方法

2.1 对体外培养的 ECA 瘤细胞生长的影响:无菌条件下,抽取荷 ECA 肿瘤小鼠腹水,混悬于 RPMI 1640 培养液中,按  $5 \times 10^5$  /mL 细胞接种于培养瓶中,每瓶接种细胞悬液 1.9 mL,按拟定剂量加入药液 0.1 mL,总体积 2 mL,置 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 培养箱中培养 24 h 后取出,采用台盼蓝拒染法测定细胞杀伤率<sup>[2]</sup>。

2.2 体内抗肿瘤作用:抗 S<sub>180</sub> 肉瘤和抗 HCA 肝癌实验组动物均为昆明种小鼠,抗 Lewis 肺癌实验动物为 C<sub>57</sub> 纯种小鼠,各实验组均分为 4 组,即阴性对照组,生理盐水 0.1 mL/10 g;阳性对照组, 5-Fu 20 mg/kg,内折香茶菜乙素低、高剂量组, 12.5, 25

mg/kg 实验按常规方法接种,接种后次日按拟定剂量 ip 给药,每日 1 次,连续 10 d,腹水型肿瘤以存活期延长率为疗效指标,实体型肿瘤以瘤重抑制率作为疗效指标,实验结果经统计学处理,按 *t* 检验进行显著性测定

2.3 对机体免疫功能的影响<sup>[3]</sup>:采用小鼠溶血素实验和对二硝基氯苯 (DNCB) 诱导的小鼠迟发性超敏反应的影响,测定本品对小鼠体液免疫和细胞免疫状态的影响,实验分组同 2.2,昆明种小鼠以 20% 的压积绵羊红细胞致敏,每鼠 0.5 mL,于致敏后第 2 天给药,连用 5 d,于致敏后的第 5 天进行免疫试验,取灭活的小鼠眼眶血清 2 mL,以 2 倍稀释法加入每一试验管,每试管加入 1:30 绵羊红细胞 (SREC) 0.2 mL 及 1:5 豚鼠血清 0.2 mL,充分摇匀,于 37℃ 培养 30 min,观察其最大溶血稀释度。

迟发性超敏反应实验各用药组动物按拟定剂量连续用药 10 d,于实验的第 5 天将小鼠腹部用新鲜配制的 1% DNCB 丙酮-麻油 50 mL 致敏,第 11 天再以新鲜配制的 1% 的 DNCB 丙酮-麻油 10 mL 涂于小鼠右耳进行攻击,24 h 处死动物,剪下小鼠左右两耳壳,用打孔器打下直径为 8 mm 的耳片精确称重,以左右两耳重量之差为肿胀度,同时取其胸腺,脾脏精确称重,计算其脾指数和胸腺指数,实验结果经统计学处理,经 *t* 检验进行组间比较。

### 3 结果

3.1 对体外培养的 ECA 瘤细胞生长的影响:见表 1  
由表 1 可以看出,内折香茶菜乙素剂量为 2 μg/mL 时,细胞杀伤率为 100%,当减小到 0.125 μg/mL 时则为 48%,作用明显减弱,表明该化合物

\* Address: Li Jicheng, Laboratory Centre of Medical Research, Henan University of Medical Sciences, Zhengzhou

李继成 男,47岁,北京医科大学药学院毕业,现任河南医科大学新药研究室主任,副研究员。1997~1998年应日本摄南大学药学部的邀请作为客员研究员赴日本留学。承担国家、省重点科研项目 12项,从药物中分离活性单体近 40个,发表论文 30余篇,其中有 20余篇被《美国化学文摘》、《中国药学文献》等刊物录用。国际刊物发表论文 8篇,出席国际会议 5次,著书 2本,获科技成果奖 6项,获省市优秀论文奖 3项。

<sup>△</sup>国家人事部留学回国人员资助项目,人发[1999]122号;河南省科技攻关资助项目,课题号:991180121

表 1 内折香茶菜乙素对体外培养的 ECA 瘤细胞生长的影响

组别	剂量 (μg/mL)	蓝染率 (%)
内折香茶菜乙素	2	100
	1	100
	0.5	87
	0.25	64
	0.125	48

在体外对 ECA 肿瘤细胞有较强的细胞毒作用,且随剂量增大而作用增强,显示出剂量依赖性。

3.2 体内抗肿瘤作用:由表 2~6 可以看出,内折香茶菜乙素在剂量为 12.5 mg/(kg·d) 时,对实体型及腹水型肿瘤表现有一定抑制作用,而剂量为 25 mg/(kg·d) 时,疗效提高,表现出明显抗肿瘤作

用,与对照组相比,  $P < 0.01$

3.3 对小鼠溶血素的影响:由表 7 可以看出,对照组的最大溶血稀释度为 1:512,内折香茶菜乙素两剂量组的最大稀释度分别为 1:512,1:256,表明本品在 25 mg/(kg·d) 时,对以溶血素反应为指标的体液免疫可能有轻度抑制作用。

3.4 对 DNCB 诱导的小鼠迟发性超敏反应的影响:见表 8

表由 8 可以看出,内折香茶菜乙素与正常组相比,两剂量组的耳肿胀度、脾指数和胸腺指数均无差异 ( $P > 0.05$ ),表明该样品对小鼠体内细胞免疫无明显作用。

4 讨论

表 2 对 C57 小鼠实体瘤 Lewis 肺癌的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (mg/kg·d)	动物数		体重 (g)		瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
		始	末	始	末		
对照	—	8	8	18.88±0.83	23.50±1.28	3.07±0.34	
5-Fu	20(第 1,4,7天给药)	8	8	19.00±0.93	19.69±0.75	1.18±0.78**	62.79
内折香茶菜乙素	12.5	8	8	18.88±0.89	20.88±0.69	1.69±0.58*	44.95
	25	8	8	18.80±0.89	21.13±1.03	1.48±0.68**	51.5

与对照组比较: \*  $P > 0.05$  \*\*  $P < 0.05$  \*\*\*  $P < 0.01$  (下表同)

表 3 对小鼠实体瘤 S<sub>80</sub>肉瘤的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (mg/kg·d)	动物数		体重 (g)		瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
		始	末	始	末		
对照	—	8	8	20.00±0.93	23.06±1.29	2.55±0.65	
5-Fu	20(第 1,4,7天给药)	8	8	20.00±0.46	22.88±1.25	1.21±0.19**	52.7
内折香茶菜乙素	12.5	8	8	19.63±0.74	22.00±2.28	2.08±0.72*	18.4
	25	8	8	19.37±1.06	23.13±1.38	1.48±0.73**	45.1

表 4 对小鼠实体瘤 HCA (肝癌)的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (mg/kg·d)	动物数		体重 (g)		瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
		始	末	始	末		
对照	—	8	8	19.13±0.64	24.88±1.46	3.36±0.41	
5-Fu	20(第 1,4,7天给药)	8	8	19.63±1.41	22.13±0.83	1.89±1.01**	43.75
内折香茶菜乙素	12.5	8	8	19.83±1.06	25.50±1.77	2.13±0.53*	36.60
	25	8	8	19.13±0.35	22.50±1.19	1.82±0.87**	45.83

表 5 对小鼠腹水瘤 S<sub>180</sub>的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (mg/kg·d)	动物数		体重 (g)		存活天数 (d)	生命延长率 (%)
		始	末	始	末		
对照	—	8	0	20.13±1.13	27.13±9.36	12.37±0.74	
5-Fu	20(第 1,4,7天给药)	8	1	19.75±0.46	23.38±2.13	40.00±11.30***	223.36
内折香茶菜乙素	12.5	8	0	19.63±0.74	29.25±1.58	27.63±5.88**	123.36
	25	8	0	19.63±0.74	24.38±2.01	36.50±6.48**	195.07

表 6 对小鼠腹水瘤 HCA 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (mg/kg·d)	动物数		体重 (g)		存活天数 (d)	生命延长率 (%)
		始	末	始	末		
对照	—	8	0	18.5±1.13	27.88±2.69	13.25±1.29	
5-Fu	20(第 1,4,7天给药)	8	2	9.13±0.78	22.63±3.42	35.13±7.67**	165.13
内折香茶菜乙素	12.5	8	0	18.75±0.71	27.3±2.89	23.50±9.61**	73.50
	25	8	2	19.13±0.83	26.63±3.94	33.00±19.22**	149.06

表 7 溶血素试验

组别	剂量 (mg/kg·d)	最大稀释度
对照组	—	1: 512
5-Fu	15	1: 32 **
内折香茶菜乙素	12.5	1: 512
	25	1: 256 *

表 8 对 DNCB 诱导的小鼠迟发性超敏反应的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (mg/kg·d)	动物数	耳肿胀度 (mg)	脾指数 (mg/10g)	胸腺指数 (mg/10g)
对照	—	8	1.53 ± 0.21	84.52 ± 8.24	45.04 ± 4.39
CPA	15	8	2.02 ± 0.33 *	43.82 ± 9.02 *	19.21 ± 3.07 *
内折香茶菜乙素	12.5	8	1.67 ± 2.04 <sup>f</sup>	76.45 ± 9.6 <sup>f</sup>	39.66 ± 5.37
	25	8	1.65 ± 2.87 <sup>f</sup>	79.65 ± 7.45 <sup>g</sup>	43.35 ± 2.14 <sup>g</sup>

小鼠肝癌 HCA 肉瘤 S<sub>180</sub>, Lewis 肺癌, 均为抗肿瘤药物筛选实验中常用的动物移植性肿瘤模型, 本文采用这些瘤株进行了内折香茶菜乙素的抗肿瘤作用实验。并通过小鼠溶血素实验和 DNCB 诱导的小鼠迟发性超敏反应实验对小鼠的机体免疫状态影响进行了实验研究。结果表明, 内折香茶菜乙素具有

较强的抗肿瘤作用, 且抗瘤谱较广, 能抑制 Lewis 肺癌, 肉瘤 S<sub>180</sub> 实体型, 以及肝癌 HCA 实体型等实体瘤的增长, 也能明显延长荷肉瘤 S<sub>180</sub> 腹水型和荷肝癌 HCA 腹水型小鼠的生命延长率, 其抗肿瘤作用的强弱呈现剂量依赖性

的临床应用价值, 可做为一种有前途的抗肿瘤药物, 值得进一步深入研究与开发

参考文献

- 1 李继成, 袁宝梅, 苏金玲, 等. 中草药, 1996, 27(6): 323
- 2 王庆端, 王绵英, 刘海君, 等. 河南医科大学学报, 1987, 22(4): 372
- 3 徐叔云. 药理实验方法学. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 11

(1999-11-02收稿)

## 鲨鱼软骨制剂诱导人肝癌细胞凋亡及 p21<sup>WAF1</sup>和 PCNA 表达调控的研究<sup>△</sup>

武警医学院细胞与分子生物学实验室 (300162) 陈莉\* 陈小义 徐瑞成

**摘要** 目的: 探讨鲨鱼软骨制剂 (SCP) 能否诱导 SMM C7721 细胞凋亡及其机制。方法: 以不同浓度 SCP 加入体外培养的 SMM C7721 细胞中, 用 MTT 比色法, 荧光显微镜, 琼脂糖凝胶电泳和免疫细胞化学方法, 观察 SMM C7721 细胞形态学, 生化和基因表达的变化。结果: SCP 明显抑制 SMM C7721 细胞生长, IC<sub>50</sub> 值为 1 mg/mL, 荧光显微镜下可见典型的凋亡细胞的形态学改变; 琼脂糖凝胶电泳呈现梯状条带 (DNA ladder); 免疫细胞化学检测显示 p21<sup>WAF1</sup> 表达增强, PCNA 表达减弱。结论: SCP 诱导 SMM C7721 细胞凋亡, 使 p21<sup>WAF1</sup> 表达上调, PCNA 表达下降, 提示 SCP 是一种有前途的抗肿瘤药物。

**关键词** SMM C7721 细胞 鲨鱼软骨 细胞凋亡 p21<sup>WAF1</sup> PCNA

近年来研究表明, 鲨鱼软骨的有效成分具有血管生成和抗炎作用<sup>[1]</sup>, 并可通过抑制血管生成而抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[2]</sup>, 也有报道, 鲨鱼软骨对肺癌、结肠癌和淋巴瘤具有潜在的治疗效果<sup>[3]</sup>。沈先荣等人以鲨鱼软骨为原料, 经盐酸胍抽提等步骤得到鲨鱼软骨制剂 (Shark Cartilage Preparation, SCP) 能抑制血管生成和 HeLa 细胞的生长, 同时提高机

体免疫功能<sup>[4]</sup>, 但关于 SCP 诱导人肝癌细胞凋亡的研究未见报道。本研究以人肝癌细胞 (SMM C7721) 为靶细胞, 进一步研究 SCP 抑制肿瘤细胞生长的机制, 为 SCP 防治肿瘤的应用提供实验依据

### 1 材料

鲨鱼软骨粉由天士力药业公司赠与, 人肝癌细胞株 (SMM C7721) 由天津市肿瘤研究所生化室引

\* Address: Chen Li, Tianjin Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin

陈莉女, 1981年毕业于内蒙古医学院研究生班, 现任武警医学院生物教研室副教授。主要从事抗癌药物作用机制的研究, 发表科研论文 10篇, 1997年以第一作者获武警部队科技进步二等奖。

△武警部队资助科研项目, 批准号: W K H98027