

## 墓头回环烯醚萜酯提取部位抗肿瘤作用及机制研究

杨波, 王一奇, 程汝滨, 陈佳丽, 张如松\*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

**摘要:** **目的** 研究墓头回醋酸乙酯提取物环烯醚萜酯部位 (PHEBB) 的体内外抗肿瘤作用及其机制。 **方法** 硅胶柱色谱法精制 PHEBB; 反相高效液相色谱法分析 PHEBB 化学成分。MTT 法检测 PHEBB 对人肿瘤细胞 KB、COLO-205、SGC-7901 的抑制活性。采用小鼠移植性瘤模型研究 PHEBB 对小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤、H<sub>22</sub> 肝癌的体内抗肿瘤作用; 免疫组化法研究 PHEBB 对肿瘤组织中相关基因表达的影响。 **结果** PHEBB 主要成分均为环烯醚萜酯类, 主要有 desacetylisovaltratum、isovaltrate acetoxhydroin。体外实验结果显示, PHEBB 对 KB、COLO-205、SGC-7901 等癌细胞均具有显著抑制作用, IC<sub>50</sub> 在 2.27~5.49 μg/mL。体内实验显示, PHEBB 以 60 mg/kg ip 给予荷瘤小鼠, 对 S<sub>180</sub> 肉瘤的抑制率为 45.5%, 对 H<sub>22</sub> 肝癌的抑制率为 54.2%; 免疫组化检测结果显示, PHEBB 能上调小鼠 H<sub>22</sub> 肿瘤组织中 Bax 表达, 下调 Bcl-2 表达, 且能降低肿瘤组织中微血管密度。 **结论** PHEBB 抗肿瘤药效物质为环烯醚萜酯; 其体内外均具有一定抗肿瘤作用, 且其抗肿瘤机制可能与诱导肿瘤细胞凋亡及抑制肿瘤微血管有关。

**关键词:** 墓头回; 环烯醚萜酯部位; 抗肿瘤; 细胞凋亡; 肿瘤微血管

中图分类号: R282.710.5; R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)20-2884-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.20.017

## Antitumor effect of iridoid ester fraction from *Patriniae Radix* and its mechanism

YANG Bo, WANG Yi-qi, CHENG Ru-bin, CHEN Jia-li, ZHANG Ru-song

College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

**Abstract: Objective** To purify the iridoid ester fraction of ethyl acetate extract from *Patriniae Radix* (PHEBB), and to study the antitumor effect and mechanism *in vivo* and *in vitro*. **Methods** The silica gel column chromatography was used to purify the effective fraction. The chemical constituents of PHEBB were elucidated by RP-HPLC; MTT assay was used to study the inhibition of PHEBB on human oral epithelial cancer cells KB, human colon cancer cells COLO-255, and human gastric cancer cells SGC-7901; Mice transplanted S<sub>180</sub> and H<sub>22</sub> experiments were used to study the antitumor effect *in vivo*; The immunohistochemical method was used to study the effect of PHEBB on the expression of related genes in tumor tissue. **Results** The main effective components in PHEBB were desacetylisovaltratum and isovaltrate acetoxhydroin, and they are both iridoid esters. The results of MTT showed that PHEBB had the significant inhibition on KB, COLO-205, and SGC-7901 cells, and the IC<sub>50</sub> values were within 2.27—5.49 μg/mL; The experiment of mice transplanted tumor showed that after ip injection with PHEBB at a dose of 60 mg/kg, there was an inhibitory rate of 45.5% on S<sub>180</sub> and 54.2% on H<sub>22</sub>; The immunohistochemistry results showed that PHEBB could upregulate Bax expression in H<sub>22</sub> cells, decrease Bcl-2 expression, and reduce the microvascular density in tumor tissue. **Conclusion** The main components in PHEBB are iridoid esters, and have certain antitumor effect *in vitro* and *in vivo*; the antitumor mechanism of PHEBB might be associated with the induction of apoptosis and the inhibition of tumor microvessel.

**Key words:** *Patriniae Radix*; iridoid ester fraction; antitumor; cell apoptosis; tumor microvessel

墓头回 *Patriniae Radix* 系败酱科植物异叶败酱 *Patrinia heterophylla* Bunge 及糙叶败酱 *P. scabra* Bunge 的根及根茎, 民间常用于治疗恶性肿瘤, 疗效显著。水溶性三萜皂苷多是墓头回抗肿瘤作用的

药效物质<sup>[1]</sup>。也有研究表明异叶败酱近缘植物脂溶性提取物亦具有显著抗肿瘤作用<sup>[2]</sup>。

本课题组从墓头回醋酸乙酯提取物 (PHE) 中分离、精制得到有效部位 PHEB (主要含环烯醚萜

收稿日期: 2013-03-18

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LY13C020003); 浙江省医药卫生科技计划 (2012KYB137)

作者简介: 杨波 (1978—), 男, 讲师, 主要研究方向为中药及天然药物抗肿瘤活性成分的研究与开发。E-mail: skyby@126.com

\*通信作者: 张如松 Tel: (0571)86613798 E-mail: zrs789@hotmail.com

酯和木质素), PHEB 在体内外均具有显著的抗肿瘤作用,还具有诱导人前列腺癌细胞 PC3 凋亡的作用<sup>[3]</sup>, 继而从 PHEB 中分离、鉴定了 8 个环烯醚萜酯、3 个木脂素。但前期实验显示, PHEB 有一定毒性, 每次 ip 给药 60 mg/kg 10 d 后有小鼠死亡。本试验将 PHEB 进一步精制, 以期增效减毒, 研究精制后的有效部位中药效物质以及体内外抗肿瘤作用及其机制。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

PHEB 由浙江中医药大学中药资源工程学实验室从 PHE 中分离、精制得到; desacetylisoaltratum、isoaltrate acetoxhydrin 为本课题组从 PHEB 中分离并鉴定, 质量分数 >98%; DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基, 美国 Invitrogen Life Technologies 公司; 胎牛血清 (FBS), 杭州四季青生物制品有限公司; MTT, 美国 Biosharp 公司; 胰蛋白酶, 美国 Amresco 公司; 环磷酰胺, 德国 Baxter Oncology GmbH 公司; VWF 抗体, 丹麦 DAKO 公司; Bax (P-19) SC-526、Bcl-2 (N-19) SC-492, 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; 化学纯石油醚、醋酸乙酯; 色谱纯乙腈; 水为双蒸水。

### 1.2 仪器

高效液相色谱仪, 美国 Waters Corporation 公司; Kromasil C<sub>18</sub> 分析柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 瑞典 Akzo Nobel 公司; CO<sub>2</sub> 培养箱、Sorvall ST16 离心机, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Model 680 酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; Forma-86C 超低温冰箱, 美国 Thermo electron 公司; CKX41 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司。

### 1.3 细胞与动物

人口腔上皮癌 KB 细胞、人结肠癌 COLO-205 细胞、人胃癌 SGC-7901 细胞、小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤、H<sub>22</sub> 肝癌瘤株, 均由浙江省医学科学院提供。

雄性 ICR 小鼠, 体质量 (20±2) g, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 许可证号 SYXK (浙) 2008-0115。

## 2 方法

### 2.1 PHEBB 的制备

对 PHEB 进行色谱分离, 得到 3 个粗提取部位, 依次为 PHEBA、PHEBB、PHEBC。经 RP-HPLC 分析, PHEBB 主要成分为 desacetylisoaltratum、isoaltrate acetoxhydrin, 均为环烯醚萜酯类成分,

质量分数分别为 65%、25%。

### 2.2 细胞培养

SGC-7901 细胞在 RPMI 1640 培养液中培养, KB 及 COLO-205 细胞在 DMEM 培养液中培养。培养基用 NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 值至近中性, 配成含 10%FBS 的全培养液, 加 2% 双抗。细胞均在 37 °C、95% 相对湿度、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每周传代 1~2 次。

### 2.3 MTT 法检测肿瘤细胞的生长<sup>[4]</sup>

取“2.2”项下对数生长期肿瘤细胞, 消化计数, 按  $2.5 \times 10^3 \sim 3 \times 10^3$  /孔接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL, 培养 24 h, 加不同质量浓度的 PHEBB (至终质量浓度 0.5~20 μg/mL), 每组 4 个平行孔。培养 72 h, 加 MTT (5 mg/mL) 20 μL, 37 °C 培养 4 h, 终止培养, 用酶标仪测定 570 nm 处吸光度 (A) 值, 计算肿瘤细胞生长抑制率。根据抑制率, 用 82798-IC<sub>50</sub> 软件计算半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。实验重复 3 次。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{对照}}$$

### 2.4 PHEBB 体内抗肿瘤实验

无菌抽取 S<sub>180</sub> 肉瘤及 H<sub>22</sub> 肝癌荷瘤小鼠腹水, 以无菌生理盐水稀释, 调细胞密度为  $1 \times 10^7$  /mL, 于每只小鼠右前肢皮下接种 0.2 mL。接种 24 h 后将小鼠随机分为 5 组: PHEBB 低、中、高剂量 (30、45、60 mg/kg) 组, 模型组 (0.9% 生理盐水), 环磷酰胺 (25 mg/kg) 阳性对照组, 每组 10 只。各给药组每日 ip 给药 1 次, 连续给药 10 d。停药次日称小鼠的体质量, 解剖剥离肿瘤组织, 称质量, 计算抑瘤率。同时取瘤块, 浸泡在 5% 甲醛溶液中, 以备免疫组化测定。

$$\text{抑瘤率} = 1 - \text{实验组平均瘤质量} / \text{模型组平均瘤质量}$$

### 2.5 免疫组化染色法检测相关蛋白表达<sup>[5-6]</sup>

取“2.4”项下各组小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌细胞移植瘤, 结节外固定, 观察大体形态后放入包埋框内, 在中性缓冲福尔马林液固定 4 h, 自来水、80%~100% 乙醇梯度洗涤, 二甲苯透明 2 次, 切片在石蜡液中浸蜡 3 h, 包埋组织, 连续切片, 烤箱烤片 6 h。二甲苯脱蜡, 100%~70% 乙醇梯度洗涤, 蒸馏水水化, 高温、高压下进行抗原修复, PBS 洗涤 3 次, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 10 min, PBS 洗 3 次。滴加适当比例稀释的一抗, Bax (P-19) SC-526 (1:200), Bcl-2 (N-19) SC-492 (1:150), VWF (1:200), PBS 代替一抗作为空白对照。滴加一抗后, 37 °C 孵育 60 min,

PBS 冲洗 3 次, 滴加山羊抗兔二抗, 37 °C 孵育 40 min, PBS 冲洗 3 次, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色 1 min, 终止反应后, Harris 苏木素液复染细胞核 1 min, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

Bax 和 Bcl-2 阳性表达为细胞核核膜、胞浆着色均为黄色, 阴性表达为细胞核膜及胞浆呈蓝色。微血管密度微血管密度 (MVD) 阳性表达为血管内皮细胞呈棕色或棕黄色。

### 2.6 数据处理

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计分析, 两组间比较采用 Dunnett's *t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 对肿瘤细胞增殖的影响

PHEBB 对 KB 细胞、COLO-205 细胞、SGC-7901 细胞的增殖均具有显著抑制作用, IC<sub>50</sub> 值分别为 (3.80 ± 1.69)、(5.49 ± 0.97)、(2.27 ± 0.25) μg/mL。

### 3.2 对小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤和 H<sub>22</sub> 肝癌移植瘤的影响

PHEBB 对小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤及 H<sub>22</sub> 肝癌移植瘤均具有一定的抑制作用, 剂量分别为 30、45、60 mg/kg 时, 对小鼠移植性 S<sub>180</sub> 肉瘤的抑瘤率分别为 31.7%、35.4%、45.5%, 对小鼠移植性 H<sub>22</sub> 肝癌的抑瘤率分别为 22.0%、27.4%、54.2%, 且呈剂量相关性。结果见表 1、2。PHEBB 对小鼠体质量无显著影响。

表 1 PHEBB 对 S<sub>180</sub> 荷瘤小鼠肿瘤质量和体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of PHEBB on tumor and body weights of S<sub>180</sub>-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / (mg·kg <sup>-1</sup> )	体质量 / g		肿瘤质量 / g	抑瘤率 / %
		给药前	给药后		
模型组	—	23.46 ± 1.54	25.56 ± 1.10	0.90 ± 0.15	—
PHEBB	30	23.16 ± 1.16	23.42 ± 1.88	0.61 ± 0.05	31.7
	45	22.39 ± 1.33	22.19 ± 2.65	0.58 ± 0.08**	35.4
	60	22.43 ± 1.32	21.77 ± 1.77	0.49 ± 0.13**	45.5
环磷酸胺	25	22.71 ± 1.12	22.89 ± 3.06	0.48 ± 0.20**	46.6

与模型组比较: \*\**P* < 0.01, 下表同

\*\**P* < 0.01 vs model group, same as below Table

表 2 PHEBB 对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠肿瘤质量和体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of PHEBB on tumor and body weights of H<sub>22</sub>-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / (mg·kg <sup>-1</sup> )	体质量 / g		肿瘤质量 / g	抑瘤率 / %
		给药前	给药后		
模型组	—	21.31 ± 0.91	27.94 ± 2.35	1.33 ± 0.29	—
PHEBB	30	22.27 ± 0.69	26.88 ± 2.11	1.04 ± 0.19	22.0
	45	21.97 ± 1.21	23.98 ± 1.44	0.97 ± 0.20**	27.4
	60	23.13 ± 1.69	22.88 ± 2.57	0.61 ± 0.09**	54.2
环磷酸胺	25	22.34 ± 1.18	25.37 ± 2.07	0.85 ± 0.11**	36.4

### 3.3 对相关蛋白表达的影响

模型组小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌移植瘤组织 Bax 呈蓝色; PHEBB 各剂量组及环磷酸胺组小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌移植瘤组织 Bax 棕黄色染色加深。模型组小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌移植瘤组织 Bcl-2 呈棕黄色; PHEBB 各剂量组及环磷酸胺组小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌移植瘤组织棕黄色染色减弱, 蓝色染色增强。模型组小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌移植瘤组织 MVD 棕黄色染色较弱; PHEBB 各剂量组及环磷酸胺组小鼠 H<sub>22</sub> 肝癌移植瘤组织棕黄色染色程度

增强。上述结果表明, PHEBB 能上调 Bax 表达, 下调 Bcl-2 表达, 降低 MVD, 且具有一定的剂量相关性。结果见图 1。

## 4 讨论

研究表明, 异叶败酱总苷片具有抑制人大肠癌 HT-29 裸鼠异种移植瘤细胞增殖、诱导瘤细胞凋亡的作用<sup>[7]</sup>。异叶败酱总苷为水溶性三萜皂苷类成分, 而本研究表明, 主要含环烯醚萜酯类成分的异叶败酱脂溶性提取物 PHEBB 亦具有抗肿瘤作用。

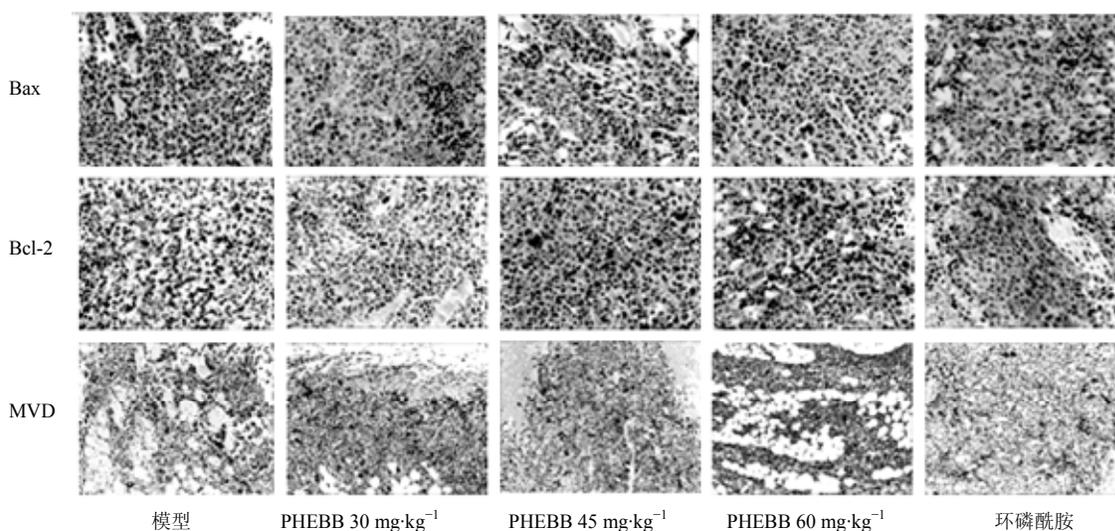


图1 免疫组化法测定 PHEBB 对 H<sub>22</sub> 肝癌组织 Bax、Bcl-2、MVD 表达的影响

Fig. 1 Effects of PHEBB on expression of Bax, Bcl-2, and MVD in mice H<sub>22</sub> hepatoma tumor tissue by immunohistochemical method

从败酱属植物脂溶性提取物中发现了多个环烯醚萜酯，该类成分具有镇静、催眠作用，并已用于临床<sup>[8-10]</sup>。其环烯醚萜酯成分亦具有显著的抑制人源肿瘤细胞株增殖的活性，是核转运蛋白 Rev 抑制剂，具有抗 HIV、抗流感、逆转肿瘤多药耐药等生物活性<sup>[11-15]</sup>。因此，环烯醚萜酯是一类在生物医药领域具有良好应用前景的有机小分子。

本实验结果显示，PHEBB 体外对 3 种人源肿瘤细胞具有一定抑制作用，体内对小鼠移植性肿瘤亦具有抑制作用。抗肿瘤作用机制研究结果显示，PHEBB 能上调促细胞凋亡蛋白 Bax 表达，下调抑制细胞凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。因此，破坏促细胞凋亡因子与抑细胞凋亡因子的动态平衡，诱导瘤细胞凋亡，可能是 PHEBB 抑制小鼠移植性肿瘤的作用机制之一。免疫组化检测结果显示，PHEBB 能降低 H<sub>22</sub> 小鼠瘤组织微血管密度。因此，抑制小鼠瘤组织中微血管增殖，亦是 PHEBB 抗肿瘤作用机制之一。笔者拟扩大瘤谱，进一步研究 PHEBB 对人源肿瘤细胞抑制作用的选择性，对人源肿瘤裸鼠异种移植瘤的作用。PHEBB 抗肿瘤作用机制及其作用的靶点、干预的细胞信号传导通路也将进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Zhang T, Li Q, Li K, *et al.* Antitumor effects of saponin extract from *Patrinia villosa* (Thunb.) Juss on mice bearing U14 cervical cancer [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(5): 640-645.
- [2] Chiu L C, Ho T S, Wong E Y, *et al.* Ethyl acetate extract of *Patrinia scabiosaefolia* downregulates anti-apoptotic Bcl-2/Bcl-X (L) expression, and induces apoptosis in human breast carcinoma MCF-7 cells independent of caspase-9 activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 105(1/2): 263-268.
- [3] Yang B, Li N, Wang Y Q, *et al.* Preliminary evaluation of antitumor effect and induction apoptosis in PC-3 cells of extract from *Patrinia heterophylla* Bunge [J]. *Braz J Pharmacogn*, 2011, 21(3): 471-476.
- [4] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1/2): 55-63.
- [5] Weidner N, Semple J P, Welch W R, *et al.* Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma [J]. *New Engl J Med*, 1991, 324(1): 1-8.
- [6] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. *中国癌症杂志*, 1996, 6(4): 229-231.
- [7] 陈金秀, 王迪, 王军, 等. 异叶败酱总苷片对人大肠癌 HT-29 细胞凋亡的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2007, 27(2): 159-161.
- [8] Qiu D F, Yang X P, Xu Y J, *et al.* A new iridoid compound from *Patrinia rupestris* (Pall.) Juss [J]. *Nat Prod Res*, 2011, 25(17): 1662-1665.
- [9] Lin S, Chen T, Liu X H, *et al.* Iridoids and lignans from *Valeriana jatamansi* [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(4): 632-638.
- [10] Eun J C, Qing H L, Q J, *et al.* New Iridoid Esters from the Roots of *Patrinia scabiosaefolia* [J]. *Bull Korean Chem*

- Soc*, 2009, 30(6): 1407-1409.
- [11] Lin S, Shen Y H, Zhang Z X, *et al.* Revision of the Structures of 1, 5-Dihydroxy-3, 8-epoxyvalechlorine, Volvaltrate B, and Valeriotetrate C from *Valeriana jatamansi* and *V. officinalis* [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(10): 1723-1726.
- [12] Lin S, Shen Y H, Li H L, *et al.* Acylated Iridoids with Cytotoxicity from *Valeriana jatamansi* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(4): 650-655.
- [13] Tamura S, Shimizu N, Fujiwara K, *et al.* Bioisostere of valtrate, anti-HIV principle by inhibition for nuclear export of Rev [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(7): 2159-2162.
- [14] Watanabe K, Takatsuki H, Sonoda M, *et al.* Anti-influenza viral effects of novel nuclear export inhibitors from *Valerianae Radix* and *Alpinia galangal* [J]. *Drug Discov Ther*, 2011, 5(1): 26-31.
- [15] Turner J G, Dawson J, Sullivan D M. Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(8): 1021-1032.