

## 刺果紫玉盘素 J 的体内外抗肿瘤作用

任先达, 杨政红, 周光雄, 蔡绍晖, 吕艳青

(暨南大学药学院, 广东 广州 510632)

**摘要:**目的 观察刺果紫玉盘素 J (calamistrin J, Cal-J) 的体内外抗肿瘤活性及其选择性。方法 MTT 法观察不同质量浓度的 Cal-J 对人非小细胞肺癌 NCI-H 460 细胞、人肝癌 HepG<sub>2</sub> 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞、人结肠癌 Lovo 细胞、肉瘤 S<sub>180</sub> 细胞 5 种肿瘤细胞系和正常人胚肺成纤维细胞 (HEL F) 增殖的影响, Hoechst 33258 染色后在荧光显微镜下观察 Lovo 细胞凋亡的形态变化。在 S<sub>180</sub> 荷瘤小鼠进行整体抑瘤实验, 计算 Cal-J 的抑瘤率。结果 Cal-J 对 NCI-H460、HepG<sub>2</sub>、HeLa、HEL F、S<sub>180</sub>、Lovo 等 6 种细胞的增殖均有不同程度的抑制作用, 其 IC<sub>50</sub> 依次为 > 100、(91±4)、(60.5±2.4)、(39.3±1.7)、(38±4)、(25±4) μg/mL。其中对 Lovo 细胞株抑制作用最强, 且呈剂量、时间双重依赖性。Cal-J 作用 48 h 后, 荧光显微镜下可见 Lovo 细胞核固缩, 染色质凝聚等典型凋亡形态学特征。Cal-J 对荷瘤小鼠 S<sub>180</sub> 移植瘤的生长有明显的抑制作用, Cal-J 高、中、低 (90、30、10 mg/kg) 剂量组的抑瘤率分别为 51%、30%、17%, 作用呈剂量依赖性。结论 Cal-J 对体外培养的多种人类肿瘤细胞和人胚肺成纤维细胞具有不同程度的细胞毒性作用, 其中对人结肠癌 Lovo 细胞作用最强, 并具有诱导细胞凋亡的作用。Cal-J 还可抑制荷瘤小鼠 S<sub>180</sub> 移植瘤的生长。

**关键词:** 刺果紫玉盘素 J (Cal-J); 抗肿瘤; 增殖; 凋亡

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)10-1527-04

Anti-tumor activity of calamistrin J *in vivo* and *in vitro*

REN Xian-da, YANG Zheng-hong, ZHOU Guang-xiong, CAI Shao-hui, Lü Yan-qing

(College of Pharmacy Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the anti-tumor activity of calamistrin J (Cal-J) *in vivo* and *in vitro* and their selectivity. **Methods** The inhibitory effect of Cal-J at various concentrations on growth of five kinds of tumor cell lines (NCI-H 460, HepG<sub>2</sub>, HeLa, Lovo, and S<sub>180</sub>) and normal human embryonic lung fibroblast (HEL F) was determined by MTT assay. The morphological changes of the Lovo apoptosis were observed by fluorescence microscope with Hoechst 33258 staining. The inhibitory effect of Cal-J on the growth of tumor was observed with the models of transplanted sarcoma 180 (S<sub>180</sub>) in Kunming mice and the inhibitory rate of Cal-J on tumor growth was calculated. **Results** Cal-J had different inhibitory intensities on the six kinds of cell lines. They were NCI-H460, HepG<sub>2</sub>, HeLa, HEL F, S<sub>180</sub>, and Lovo. Their IC<sub>50</sub> (μg/mL) were >100, (91±4), (60.5±2.4), (39.3±1.7), (38±4), and (25±4) μg/mL, respectively. Among them Cal-J had the strongest inhibitory effect on Lovo cells and it was observed in a dose- and time-dependent manner. Lovo cells treated by Cal-J could be observed typically morphological changes through fluorescence microscope, including cell shrinkage with a condensed cytoplasm, chromatin condensation, etc. Cal-J could obviously inhibit the growth of S<sub>180</sub> in mice and showed a dose-effect relationship. The inhibitory rate of Cal-J (90, 30, and 10 mg/kg) were 51%, 30%, and 17%, respectively. **Conclusion** Cal-J has different inhibitory intensities on several tumor cells and HEL F cells *in vivo*, among which the inhibitory effect on Lovo cells is the strongest and also significantly induce apoptosis of Lovo cells. Cal-J can also has a marked inhibitory effect on the growth of S<sub>180</sub> after administered to the tumor-bearing mice.

**Key words:** calamistrin J (Cal-J); anti-tumor; proliferation; apoptosis

番荔枝科植物属双子叶植物木兰亚纲, 我国有 24 属 120 种, 大部产于华南及云南南部。自 1982 年从番荔枝科紫玉盘属植物尖紫玉盘 *Uvaria*

*acuminata* Oliv. 中分离出一种抗癌活性很强的内酯 Uvaricin 后<sup>[1]</sup>, 引发了研究番荔枝科植物的热潮。由于番荔枝内酯结构独特、抗肿瘤机制不同于现

收稿日期: 2007-03-06

作者简介: 任先达 (1946—), 男, 湖南汨罗人, 暨南大学药学院药理学教授, 硕士生导师, 1988 年赴加拿大阿伯达大学研修, 主要从事天然药物药理学和肿瘤药理学研究。Tel: (020) 38896810 E-mail: renxd520@126.com

有的抗癌药物、无致突变性,引起人们的极大兴趣<sup>[2]</sup>。从国产番荔枝科紫玉盘属植物刺果紫玉盘 *Uvaria calamistrata* Hance 根中提取一种新的番荔枝内酯化合物刺果紫玉盘素 J (calamistrin J, Cal-J), 为白色无定形粉末, 溶解于无水乙醇、丙酮、二甲基亚砜等, 分子式  $C_{37}H_{66}O_7$ , 相对分子质量 622。Calamistrins A 和 B 均为从同一植物中分离鉴定的单四氢咪喃环番荔枝内酯<sup>[3]</sup>, 而 Cal-J 为邻双四氢咪喃环番荔枝内酯。国内外对邻双四氢咪喃环番荔枝内酯的研究主要集中在分离、结构鉴定和合成方面, 在抗肿瘤活性方面也只是测定对一些瘤株的细胞毒活性 ( $IC_{50}$ ), 极少见进行荷瘤小鼠的抑瘤活性及抗肿瘤细胞凋亡作用研究<sup>[4,5]</sup>。本实验观察 Cal-J 对不同肿瘤细胞系的体内外抗肿瘤作用, 并以正常的人胚肺成纤维细胞作为对照, 为将 Cal-J 开发成新药提供重要的实验依据。

## 1 材料与方法

1.1 材料: 昆明种小鼠购自广东省医学实验动物中心 (合格证号 2005A012);  $S_{180}$  肉瘤腹水型小鼠、人肝癌 HepG<sub>2</sub> 细胞、人非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞、人结肠癌 Lovo 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞、小鼠肉瘤  $S_{180}$  细胞均由本校中药与天然药物研究所实验室提供; 人胚肺成纤维细胞 (HEL F) 购自中山大学实验动物中心。RPMI-1640 培养基为美国 Gibco 公司产品。Hoechst 33258 和顺铂 (DDP) 为美国 Sigma 公司产品, 注射用环磷酰胺 (CTX, 批号 06011521) 为江苏恒瑞医药股份有限公司产品。Cal-J 为本实验室制备, 经 HPLC 测定, 各批产物的质量分数均在 95% 以上; 以体积分数 10% 二甲基亚砜 (DMSO) 溶解配制所需浓度溶液备用。

1.2 细胞培养: 分别取 NCI-H460、HeLa、HepG<sub>2</sub>、Lovo、 $S_{180}$ 、HEL F 细胞, 按  $3 \times 10^5$ /mL 接种, 细胞置于 RPMI-1640 培养液 (含体积分数 10% 已灭活的小牛血清、青霉素  $1 \times 10^5$  U/L、链霉素 100 mg/L) 中,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度培养箱中培养。间日换液, 3~4 d 传代, 取指数生长期细胞用于实验。

1.3 细胞增殖抑制实验 (MTT) 法: 取对数生长期的肿瘤细胞, 接种于 96 孔培养板 (细胞数为  $5 \times 10^3$ /孔), 待细胞完全贴壁后 (4 h 以上), 再加入不同质量浓度已配制好的 Cal-J 溶液, 使其终质量浓度分别为 6.25、12.5、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (DMSO 终体积分数为 0.1%), 对照组为含 0.1% DMSO 的培养液, 阳性对照组加入 DDP 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养 48 h 后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶

液 20  $\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h 后, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去孔内培养液, 每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温摇 10 min, 使其充分溶解, 在酶标仪 570 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 每组设 6 个复孔, 取其均值计算增殖抑制率, 并求其  $IC_{50}$  值, 重复 3 次实验。

Cal-J 作用不同时间对人结肠癌 Lovo 细胞生长的影响检测方法同上, 分别检测不同质量浓度药物处理 24、48、72 h 后的 A 值, 每组设 6 个复孔, 取其均值计算增殖抑制率, 并求其  $IC_{50}$  值, 重复 3 次实验。

$$\text{增殖抑制率} = (1 - A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

1.4 Hoechst 33258 荧光染色: 用 24 孔板培养 Lovo 细胞, 预先将小盖玻片置于每个孔板底部, 制作细胞爬片。分别以空白溶媒 (质量分数 0.1% DMSO) 和 Cal-J 12.5、25、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理 48 h 后, 以冷 PBS 洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 去除固定液, 清洗 2 次, 晾干。加 Hoechst 33258 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 0.5 mL 染色 10 min, 蒸馏水冲洗, 晾干。以紫外光 (340 nm) 激发, 用荧光显微镜观察并拍照。结果判断: 正常细胞的细胞核呈现弥散均匀荧光, 出现细胞凋亡时, 细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光, 甚至可见 DNA 荧光碎片。

1.5 体内抗肿瘤作用: 取生长旺盛期的  $S_{180}$  腹水瘤小鼠, 无菌抽取腹水, 用生理盐水 (1:3) 稀释, 制备肿瘤细胞悬液, 取 0.1 mL 于玻片上, 加 0.02% 台盼蓝一滴, 在光镜下计数, 活细胞数应大于 95%。取雄性昆明种小鼠 (18~22 g) 55 只, 将上述肿瘤细胞悬液, 无菌条件下接种于昆明种小鼠右腋下, 每只 0.2 mL, 饲养于标准环境下, 自由饮水和进食。次日将小鼠随机分为 5 组, 每组 11 只, 分别为 Cal-J 高、中、低剂量 (90、30、10 mg/kg), 模型对照组 (以等容积空白溶媒代替), CTX (20 mg/kg) 组。CTX 组 ip 给药, 其余各组 ig 给药, 连续给药 9 d, 末次给药后 24 h 处死动物, 解剖取肿瘤组织, 称质量, 计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = \frac{1 - \text{实验组平均瘤质量}}{\text{模型组平均瘤质量}} \times 100\%$$

1.6 数据处理: 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 均采用 SPSS 11.0 软件进行处理。多组样本数据用单因素方差分析, 两组样本均数之间比较用组间  $t$  检验。

## 2 结果

2.1 Cal-J 对几种肿瘤细胞株体外增殖的影响: MTT 实验结果显示, 与对照组相比, Cal-J 对 NCI-H460、HepG<sub>2</sub>、HeLa、 $S_{180}$ 、Lovo 细胞增殖均有不同程度的抑制作用 (表 1), 其  $IC_{50}$  值分别为  $>100$ 、

表 1 Cal-J 对不同细胞株增殖的抑制率 ( $\bar{x} \pm s, n=18$ )

Table 1 Inhibitory rate of Cal-J on proliferation of various cell lines ( $\bar{x} \pm s, n=18$ )

药物	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	增殖抑制率/%					
		NCI-H460	HepG <sub>2</sub>	HeLa	S <sub>180</sub>	Lovo	HELFL
DDP	5	78.0±6.0**	65.5±2.7**	75.1±1.7**	83.0±5.0**	73.6±1.7**	68.8±1.8**
Cal-J	6.25	0.8±0.9	3.2±2.7	4.5±2.7	12.2±1.7**	14.0±4.0**	16.1±1.5
	12.5	4.7±1.7	8.0±1.8	19.6±1.0**	22.5±1.6**	30.0±5.0**	26.5±1.9**
	25	9.0±1.7	17.1±2.0*	27.6±2.0**	31.0±2.4**	56.0±4.0**	35.8±2.9**
	50	18.0±3.0**	20.9±1.3**	44.1±1.6**	59.3±2.6**	68.6±1.9**	50.5±1.4**
	100	31.7±1.0**	60.0±7.0**	60.5±2.4**	77.0±6.0**	84.9±1.6**	75.0±0.9**

与对照组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ ; 表 2 同

\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs control group; Table 2 is same

(91±4)、(60.5±2.4)、(38±4)、(25±4)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 其中对人结肠癌 Lovo 细胞的作用最强, 对人非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞则几乎无增殖作用。对正常人胚肺成纤维细胞 HELFL 同样有较强的抑制增殖作用(见表 1), 其  $\text{IC}_{50}$  为 (39.3±1.7)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 Cal-J 作用不同时间对人结肠癌 Lovo 细胞的体外增殖抑制作用: 不同质量浓度 Cal-J 处理人结肠癌 Lovo 细胞 24、48、72 h 后, 用 MTT 法测定, 结果发现其呈剂量和时间双重依赖性抑制 Lovo 细胞增殖(表 2), Cal-J 作用 24、48、72 h 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 (28±3)、(25±4)、(16.4±2.3)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

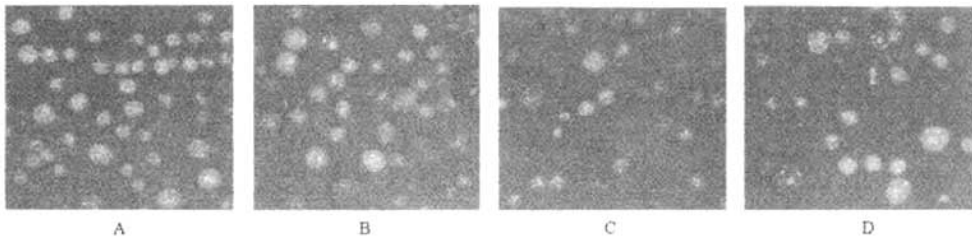
2.3 Cal-J 对 Lovo 细胞形态学的影响: 染色质凝聚是凋亡细胞典型的细胞形态学变化之一, Cal-J 作

表 2 Cal-J 作用不同时间对 Lovo 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=18$ )

Table 2 Effect of Cal-J on proliferation of Lovo cells treated for different times ( $\bar{x} \pm s, n=18$ )

Cal-J $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	增殖抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
6.25	11.3±2.0*	14.0±4.0**	26.0±5.0**
12.5	28.3±1.6**	30.0±5.0**	41.0±3.0**
25	53.0±5.0**	56.0±4.0**	63.0±4.0**
50	65.5±2.5**	68.6±1.9**	75.0±4.0**
100	81.0±4.0**	84.9±1.6**	90.0±1.8**

用 48 h 后的 Lovo 细胞, 经 Hoechst 33258 染色后, 荧光显微镜下可见, 细胞核固缩, 染色质凝聚, 染色加深, 细胞核或细胞质内出现浓染致密的块状或颗粒状荧光(图 1)



A-对照组 B~D-Cal-J 12.5、25、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$

A-control group B-D-Cal-J 12.5, 25, and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$

图 1 不同质量浓度 Cal-J 作用 48 h 引起 Lovo 细胞核形态学改变

Fig. 1 Nucler morphological changes of Lovo cells treated with different concentrations of Cal-J for 48 h

2.4 Cal-J 的体内抗肿瘤作用: Cal-J 低剂量 (10 mg/kg) 组瘤质量与模型对照组比较有显著性差异 ( $P<0.05$ ), 但抑瘤率仅为 17.19%, 在专业角度无实际意义。Cal-J 高、中 (90、30 mg/kg) 剂量组的抑瘤率分别为 51% 和 30%, 抑瘤作用均有明显意义 ( $P<0.01$ )。CTX 在所有实验组中, 抑瘤作用最强, 抑瘤率为 70%。见表 3。本实验结束时, Cal-J 高剂量组动物死亡两只, 且动物体重增加量与模型对照组相比有明显减少, 可能为药物毒性反应。

### 3 讨论

表 3 Cal-J 对荷瘤小鼠 S<sub>180</sub> 移植瘤的生长抑制作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Inhibition of Cal-J on growth of implanted S<sub>180</sub> in mice ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	动物/只		体质量/ 加量/g	瘤质量/ g	抑瘤率/ %
		实验前	实验后			
模型	—	11	11	8.3±1.7	1.16±0.16	—
CTX	20	11	11	7.8±2.3	0.35±0.16**	70
Cal-J	10	11	11	7.8±2.5	0.96±0.21*	17
	30	11	11	7.6±2.0	0.81±0.16**	30
	90	11	9	3.7±1.0*	0.57±0.19**	51

与模型组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$

\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs model group

恶性肿瘤是严重危害人类健康及生命的常见病,在传统的手术、放化疗等治疗方法不能取得令人满意疗效的情况下,番荔枝内酯化合物被认为是继紫杉醇后的又一类有前途的、天然来源的抗肿瘤化合物。本实验对本院从植物中分离的番荔枝内酯新化合物 Cal-J 的体内、外抗肿瘤作用作出了初步评价。

从番荔枝科植物中提取有效成分抗肿瘤,是当前世界范围内的研究热点之一,目前发现的近 400 种番荔枝内酯类化合物大多有不同程度的抗肿瘤、抗微生物、抗寄生虫、抗疟、免疫抑制以及逆转肿瘤多药耐药性等多种生物活性<sup>[6,7]</sup>,其中最受关注的是其抗肿瘤活性。

McLaughlin 的研究小组比较了番荔枝内酯对不同肿瘤细胞株的毒性选择性,发现番荔枝内酯并不是“广泛细胞毒剂”,不同番荔枝内酯分别对不同肿瘤细胞具有特异选择性<sup>[8,9]</sup>。本实验通过 MTT 法观察到 Cal-J 对几种肿瘤细胞具有不同强度的抑制作用,作用强度依次是: Lovo 细胞 > S<sub>180</sub> 细胞 > HeLa 细胞 > HepG<sub>2</sub> 细胞 > NCI-H460 细胞。其中对人结肠癌 Lovo 细胞株抑制作用最强,对人非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞则几乎无抑制作用,说明 Cal-J 对不同肿瘤细胞的抑制作用也有一定的选择性,如果用于临床,必须确定其适当的应用范围。对于番荔枝为什么对不同肿瘤细胞的抑制作用能表现出如此大的差异,目前还不清楚,这可能与细胞种类的不同以及番荔枝内酯在细胞内的转运、代谢、灭活及受体的几何分布等多方面因素有关。

体内实验的结果显示,模型对照组平均瘤质量大于 1 g,阳性对照组则显示了显著的抑制作用,表明本药效评价模型可靠。在本实验条件下,Cal-J 对小鼠肿瘤 S<sub>180</sub> 的生长有明显的抑制作用,低、中、高剂量组的抑瘤率依次增大,高剂量组 (90 mg/kg) 对小鼠肿瘤的抑制率达到 51.30%,显示了一定的剂量效应关系。体外实验结果也发现 Cal-J 对 Lovo 细胞的生长抑制作用有剂量、时间双重依赖性的特点,随着 Cal-J 质量浓度的增加,作用时间的延长,其杀伤肿瘤细胞的能力也随之增强。细胞形态学的改变提示该作用与诱导肿瘤细胞凋亡有关。

为了观察 Cal-J 对肿瘤细胞和正常细胞作用的

选择性,本实验中选用了正常人肺成纤维细胞 HELF,结果显示,Cal-J 对 HELF 细胞同样有较显著的抑制作用,说明 Cal-J 在增殖旺盛的正常细胞和肿瘤细胞间并无明显的作用选择性,在临床应用中必须注意其可能出现的毒性反应。在体内实验结束时,高剂量组小鼠死亡 2 只,且小鼠体重增加值明显低于其他各组,提示可能为药物的毒性反应,在临床应用时需要事先确定其安全范围。

李艳芳等<sup>[10]</sup>发现番荔枝内酯大花紫玉盘素 (uvarigrin) 可显著抑制多药耐药性 KBv200 细胞及其亲本 KB 细胞的增殖,对两种细胞的 IC<sub>50</sub> 值接近;并可剂量依赖性诱导这两种细胞凋亡。如果从其近亲植物刺果紫玉盘中提取的 Cal-J 也具有逆转肿瘤细胞多药耐药性活性,将确立其临床应用价值,本课题组将对此进行进一步考察。

#### References:

- [1] Jolard S D, Hoffman J J, Schram K H, et al. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae) [J]. *J Org Chem*, 1982, 47(16): 3151-3153.
- [2] Zeng L, Ye Q, Oberlies N H, et al. Recent advances in annonaceous acetogenins [J]. *Nat Prod Rep*, 2000, 13(4): 275-306.
- [3] Zhou G X, Zhou L E, Chen R Y, et al. Calamistrins A and B, two new cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Uvaria calamistrata* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(2): 261-264.
- [4] Zhou G X, Chen R Y, Zhang Y J, et al. New annonaceous acetogenins from the roots of *Uvaria calamistrata* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(9): 1201-1204.
- [5] Rupprecht J K, Hui Y H, McLaughlin J L. Annonaceous acetogenins; a review [J]. *J Nat Prod*, 1990, 53(2): 237-278.
- [6] Li Y F, Fu L W. Antitumoral effects of annonaceous acetogenins [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2004, 20(3): 245-247.
- [7] Alali F Q, Rogers L, Zhang Y, et al. Goniotriocin and (2,4-cis-and-trans)-xyloomaticinones, bioactive annonaceous acetogenins from *Goniothalamus giganteus* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(1): 31-34.
- [8] Hopp D C, Alali F Q, Gu Z M, et al. Three new bioactive bis-adjacent THF ring acetogenins from the bark of *Annona squamosa* [J]. *Bioorg Med Chem*, 1998, 6(5): 569-575.
- [9] Liu X X, Alali F Q, Pilarinou E, et al. Two bioactive monotetrahydrofuran acetogenins, annoglacins A and B, from *Annona glabra* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 50(5): 815-821.
- [10] Li Y F, Liang Y J, Shi Z, et al. Induction of apoptosis of tumor multidrug resistance cell by uvarigrin and its mechanism [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2006, 41(3): 252-256.