

## 七叶皂苷钠对小鼠急性淋巴白血病 L1210 细胞的体内外作用研究

牛泱平, 邱燕燕, 竺佳, 姚炳兴  
(浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310032)

**摘要:**目的 探讨七叶皂苷钠对小鼠急性淋巴白血病 L1210 细胞的体外增殖抑制作用和体内抗白血病作用。方法 采用 MTT 法观察七叶皂苷钠对小鼠急性淋巴白血病细胞 L1210 的体外增殖抑制作用; 建立 L1210 小鼠白血病移植模型, 观察七叶皂苷钠对荷瘤小鼠生命的延长率, 以及对化疗药阿霉素的增敏作用, 并绘制生存曲线。结果 七叶皂苷钠 (20~60  $\mu\text{g/mL}$ ) 对 L1210 细胞具有一定的增殖抑制作用, 作用呈时间和剂量依赖性, 体外作用 72 h 的  $\text{IC}_{50}$  为 (24.86 $\pm$ 2.23)  $\mu\text{g/mL}$ ; 体内实验结果显示, 七叶皂苷钠中、高剂量组能明显延长荷瘤小鼠的生命期, 生命延长率分别为 32.3% 和 25.8% ( $P<0.01$ ), 低剂量组对常规化疗药阿霉素具有增敏作用。结论 七叶皂苷钠能有效抑制 L1210 细胞体外增殖, 对体内 L1210 白血病小鼠移植模型也具有一定的治疗效果。

**关键词:**七叶皂苷钠; 小鼠急性淋巴白血病细胞 L1210; 增殖; 白血病

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)11-1770-04

*In vivo and in vitro study of aescin in L1210 murine acute lymphoid leukemia cells*

NIU Yang-ping, QIU Yan-yan, ZHU Jia, YAO Bing-xing

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

**Abstract:** **Objective** To explore aescin's inhibition of *in vitro* proliferatim in L1210 murine acute lymphoid leukemia cells and its *in vivo* antileukemic effects. **Methods** MTT assay was used to determine the anti-proliferative effect *in vitro*; Leukemia transplant models were used to test the antileukemic effect. Mice inoculated with L1210 cells were treated with ten daily doses of aescin or/and each other day of DOX, and were observed for survival. Antileukemic effects were assessed by calculating the extension of lifespan. **Results** Aescin (20~60  $\mu\text{g/mL}$ ) was found to be able to inhibit the proliferation of L1210 cells. The effects were in a dose- and time- dependent manner. The  $\text{IC}_{50}$  value of aescin in L1210 cells after 72 h was (24.86 $\pm$ 2.23)  $\mu\text{g/mL}$ . *In vivo* study showed that after treating the L1210 cells bearing mice with higher, middle, and low dosage (4.5, 3.5, and 2.5 mg/kg) of aescin for ten consecutive days, The extension of lifespan were 25.8% ( $P<0.01$ ), 32.3% ( $P<0.01$ ), and 12.9%, respectively. Moreover, the extension of lifespan was 45.2% when mice were treated with a low dose of aescin in combination with DOX (2 mg/kg), which was significantly increased compared with 29.0% when treated with single DOX ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The data presented here indicate that aescin is a poent natural inhibitor of proliferation in L1210 lymphoid leukemia cells and aescin has the potential to be a promising candidate for cancer treatment.

**Key words:** aescin (sodium aescinate); L1210 murine acute lymphoid leukemic cell line; cell proliferation; leukemic transplant model

七叶皂苷钠 (sodium aescinate) 是从七叶树科中国天师栗 *Aesculus wilsonii* Rehd.、欧洲七叶树 *Aesculus hippocastanum* L.、日本七叶树 *Aesculus turbinata* Blume 和浙江七叶树 *Aesculus chinensis* Bunge var. *chejiangensis* (Hu et Fang) Fang 干燥成熟果实娑罗子中提取的天然三萜糖苷类化合物的钠盐, 具有抗炎症渗出、增加静脉张力、改善微循环

等作用, 已广泛应用于临床<sup>[1]</sup>。国内目前主要用于治疗脑水肿、脑梗死、颅脑外伤及肢体肿胀等疾病<sup>[2]</sup>。近年来, 有关七叶皂苷钠抗肿瘤活性已有研究报道<sup>[3~5]</sup>。但有关七叶皂苷钠体内治疗 L1210 白血病的作用研究尚未见报道。本实验首次探讨七叶皂苷钠对小鼠急性淋巴白血病 L1210 细胞的体外增殖抑制作用和体内抗白血病作用, 为其临床应

收稿日期: 2009-03-04

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y205636); 浙江省科技厅项目 (2008C23064)

作者简介: 牛泱平 (1968—), 女, 浙江省余姚市人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事药理学相关教学及科研工作, 已发表论文 30 余篇, 曾获省部、厅局级科技进步奖 6 项, 国家发明专利授权 2 项。Tel: (0571) 88320218 E-mail: nyp@zjut.edu.cn

用于淋巴白血病的治理提供实验依据。

## 1 材料

1.1 药物与试剂:七叶皂苷钠(商品名麦通钠,英文名 Aescin):山东烟台绿叶制药有限公司生产,批号 200606182;阿霉素(商品名注射用盐酸多柔比星):浙江海正药业股份有限公司生产,批号 060501;二甲基亚砜(DMSO):上海泽衡生物技术有限公司生产;RPMI 1640 培养液(含青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 U/mL):洁诺生物医药技术有限公司产品;胎牛血清(FBS):杭州四季青生物工程材料有限公司产品,56℃水浴灭活 30 min 后混匀分装,-20℃保存;MTT:上海泽衡生物技术有限公司产品。

1.2 细胞株:小鼠急性淋巴白血病细胞株 L1210,购自中国科学院上海生化细胞研究所细胞库。

1.3 动物:实验采用 DBA/2 雌性小鼠,体质量 18~22 g,购自浙江中医药大学动物中心,由中国科学院上海实验动物中心提供。

## 2 方法

2.1 细胞培养:L1210 细胞悬浮培养于含 10% 马血清高糖的 RPMI 1640 培养液中,于 37℃、5% CO<sub>2</sub>和饱和湿度的条件下培养,2~3 d 更换培养液 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

2.2 MTT 法检测细胞增殖:取对数生长期的 L1210 细胞,调整细胞浓度为  $4.0 \times 10^4$  /mL,接种于 96 孔板,每孔 180  $\mu$ L 细胞液。实验组加入七叶皂苷钠 20  $\mu$ L,使终质量浓度分别为 10、20、30、40、50、60  $\mu$ g/mL,对照组加入相应体积的 RPMI 1640 培养液,每组设 3 个平行孔,于 37℃、5% CO<sub>2</sub>和饱和湿度的条件下分别培养 24、48、72 h 后,加入 20  $\mu$ L MTT (5 mg/mL) 继续培养 4 h,倾去培养液,每孔加入 150  $\mu$ L DMSO,轻轻震荡 10 min,待结晶物完全溶解后,于酶标免疫检测仪上以测定波长为 570 nm、参考波长为 490 nm 测定吸光度(A)值,取 3 个孔的平均值,计算存活率,绘制量效-时效曲线,并进一步计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

### 2.3 体内抗肿瘤实验

2.3.1 L1210 小鼠移植模型的建立:取接种 L1210 淋巴白血病细胞 7~9 d 的荷瘤种鼠,颈椎脱臼致死,消毒后剪开并剥去皮肤,用一次性无菌注射器穿过腹壁肌层抽取腹水,放入无菌容器,加入无菌生理盐水稀释腹水,得到腹水稀释液。计数并调整细胞浓度至  $5 \times 10^5$  /mL。按无菌操作要求,给实验小鼠腹腔接种该稀释液 0.2 mL/只。

2.3.2 实验分组与给药:接种 24 h 后将小鼠随机分组,每组 10 只。设立生理盐水对照组(模型组),七叶皂苷钠低、中、高剂量组,阿霉素阳性对照组,以及七叶皂苷钠低剂量与化疗药阿霉素联合用药组(观察增敏作用)。阳性对照组,阿霉素给药剂量为 2 mg/kg (选择抑制率在 30% 左右的剂量,由预实验获得),隔天 ip 给药。七叶皂苷钠组剂量按照临床应用剂量换算成小鼠用药剂量,并以 1:0.7 为浓度梯度,因此选用高、中、低剂量分别为 4.5、3.5、2.5 mg/kg。七叶皂苷钠治疗组每天 ip 给药 1 次,共给药 10 d,观察 30 d。

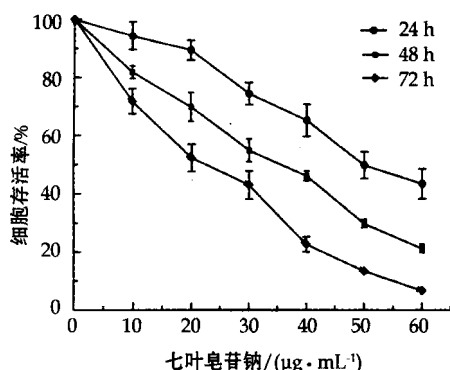
2.3.3 观察指标:每日观察各组小鼠,直至小鼠全部死亡。其间分别记录各组小鼠的生存时间,按文献方法<sup>[6]</sup>计算生命延长率(ILS): $ILS = (MST_T / MST_U - 1) \times 100\%$  [MST<sub>T</sub>和 MST<sub>U</sub>分别代表治疗组和对照组小鼠的存活天数中值(MST), $MST = 1/2(x+y)$ , $x$ =半数动物死亡天数, $y$ =(半数+1只)动物死亡天数];观察小鼠腹水情况,于第 14 天测量小鼠腹部横直径;按小鼠生存率随时间的变化情况,绘制小鼠生存曲线图。

2.4 统计学处理:采用 GraphPad Prism 软件作图及进行数据统计和分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。单变量两组资料之间的比较采用  $t$  检验,多组资料之间的比较采用单因素方差分析,IC<sub>50</sub>应用 Graph-Pad Prism 软件非线性回归获得。

## 3 结果

3.1 七叶皂苷钠对 L1210 细胞的体外增殖抑制作用:采用 MTT 法检测了不同质量浓度七叶皂苷钠对小鼠急性淋巴白血病 L1210 细胞体外增殖的影响。实验结果显示,七叶皂苷钠在 20~60  $\mu$ g/mL 对 L1210 细胞的生长均有一定程度的抑制作用,作用呈明显的时间和剂量依赖性。七叶皂苷钠作用于 L1210 细胞 24、48、72 h 的 IC<sub>50</sub>值分别为 (48.56  $\pm$  4.56)、(36.25  $\pm$  3.42)、(24.86  $\pm$  2.23)  $\mu$ g/mL。IC<sub>50</sub>随药物作用时间延长而降低。见图 1。

3.2 七叶皂苷钠对 L1210 小鼠淋巴白血病移植模型的治疗作用:七叶皂苷钠 4.5、3.5 mg/kg 剂量组对 DBA/2 近交小鼠移植性 L1210 白血病的生命延长率分别为 25.8% 和 32.3%,与模型组相比具有显著性差异 ( $P < 0.01$ );七叶皂苷钠低剂量 (2.5 mg/kg) 组无显著作用,见表 1 和图 2。但七叶皂苷钠低剂量 (2.5 mg/kg) 联合阿霉素 (2 mg/kg) 后,荷瘤小鼠生命延长率可达 45.2%,与单用阿霉素治疗组的生命延长率 29.0% 相比,具有显著性差异

图1 七叶皂苷钠对 L1210 细胞体外生长的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )Fig. 1 Effect of aescin on growth of L1210 cells *in vitro* ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

( $P < 0.01$ ), 说明七叶皂苷钠对阿霉素具有增敏作用, 见表2和图3。另外还观察了治疗14 d后, 各组小鼠的腹水变化情况, 图4表明七叶皂苷钠中剂量组、阿霉素单独治疗组及联合用药组小鼠腹水均明显少于模型组 ( $P < 0.05$ ), 其他实验组情况未显示 (略)。

#### 4 讨论

三萜类化合物作为一类重要的天然产物, 在植物界中已经形成了一个庞大而多样化的有机化合物族群, 它具有很高的药用价值, 多种三萜皂苷具有抑制肿瘤细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用<sup>[7]</sup>。在前期的实验研究中也发现人参皂苷和七叶皂苷钠具有诱

表1 七叶皂苷钠对 L1210 荷瘤小鼠存活时间的影响 ( $n=10$ )

| 组别    | 剂量/<br>( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) | 平均存活<br>时间/d          | 中位存活<br>时间/d | 生命延长率/<br>% |
|-------|---------------------------------------------|-----------------------|--------------|-------------|
| 模型    | —                                           | $15.50 \pm 0.50$      | 15.5         | —           |
| 七叶皂苷钠 | 2.5                                         | $17.67 \pm 1.10$      | 17.5         | 12.9        |
|       | 3.5                                         | $19.67 \pm 2.05^{**}$ | 20.5         | 32.3        |
|       | 4.5                                         | $19.50 \pm 0.96^{**}$ | 19.5         | 25.8        |

与模型组比较:  $^{**} P < 0.01$

$^{**} P < 0.01$  vs model group

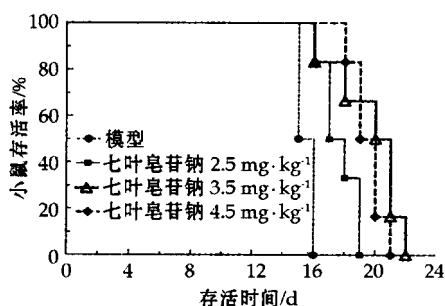


图2 七叶皂苷钠对荷瘤小鼠生存曲线的影响

Fig. 2 Effect of aescin on survival curves of L1210 bearing mice

表2 七叶皂苷钠联合阿霉素对 L1210 荷瘤小鼠存活时间的影响 ( $n=10$ )Table 2 Influence of aescin combined with DOX on survival time of L1210 bearing mice ( $n=10$ )

| 组别    | 剂量/<br>( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) | 平均存活<br>时间/d                    | 中位存活<br>时间/d | 生命延长率/<br>% |
|-------|---------------------------------------------|---------------------------------|--------------|-------------|
| 模型    | —                                           | $15.50 \pm 0.50$                | 15.5         | —           |
| 阿霉素   | 2                                           | $20.17 \pm 1.07^{**}$           | 20.0         | 29.0        |
| 七叶皂苷钠 | 2.5                                         | $17.67 \pm 1.10$                | 17.5         | 12.9        |
| 联合用药  | 2.5+2                                       | $22.33 \pm 1.11^{\Delta\Delta}$ | 22.5         | 45.2        |

与模型组比较:  $^{**} P < 0.01$ ; 与阿霉素组比较:  $^{\Delta\Delta} P < 0.01$

$^{**} P < 0.01$  vs model group;  $^{\Delta\Delta} P < 0.01$  vs DOX group

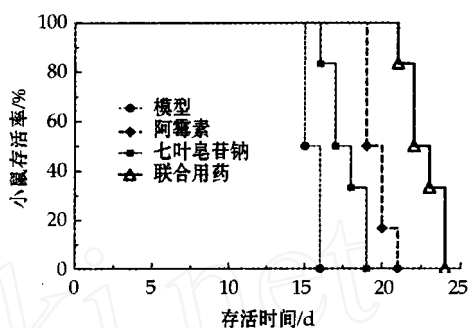
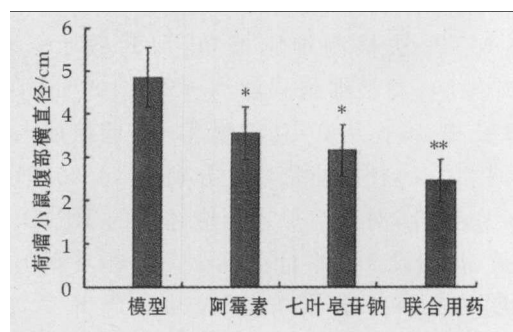


图3 七叶皂苷钠联合阿霉素对 L1210 荷瘤小鼠生存曲线的影响

Fig. 3 Effect of aescin combined with DOX on survival curves of L1210 bearing mice



与模型组比较:  $^{*} P < 0.05$   $^{**} P < 0.01$

$^{*} P < 0.05$   $^{**} P < 0.01$  vs model group

图4 药物治疗14 d 荷瘤小鼠腹水变化 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )Fig. 4 Changes of ascites of L1210 bearing mice after treatment with aescin (middle), DOX, or aescin + DOX for 14 d ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

导人急性髓性白血病 HL-60 细胞凋亡的作用<sup>[8,9]</sup>。本实验进一步研究了七叶皂苷钠对小鼠急性淋巴白血动物模型的体内治疗作用和体外细胞抑制增殖作用。

体内实验所采用剂量由目前临床抗炎、抗肿胀的七叶皂苷钠剂量 (20~30 mg/d) 换算而来, 并按照 1:0.7 的比率设置成低 (2.5 mg/kg)、中 (3.5 mg/kg) 和高 (4.5 mg/kg) 3 个剂量, 以避免剂量

过高而引起毒性反应。从图1可以看出七叶皂苷钠体外对L1210细胞的抑制作用虽然非常明显,但量-效曲线陡峭,有效浓度范围窄,这些均意味着该药物的安全指数较低。在体外诱导HL-60细胞凋亡的实验中,七叶皂苷钠在小于10  $\mu\text{g/mL}$ 时无明显的增殖抑制作用,而在70  $\mu\text{g/mL}$ 时显示明显的细胞毒活性<sup>[9]</sup>。因此在本实验中设计与阿霉素联合用药研究时,采用了低剂量的七叶皂苷钠,以观察七叶皂苷钠对阿霉素的增敏作用,目的是从另一个角度来考察该药物的作用,以发挥中药的本来特色。结果表明低剂量的七叶皂苷钠虽然没有直接的治疗作用,但可以明显提高常规化疗药阿霉素的疗效,起到增效减毒的作用,具有更深远的意义。

另外,结果表明七叶皂苷钠中剂量组体内抑瘤作用明显,其作用与化疗药阿霉素(2 mg/kg)基本接近。近年来,有关七叶皂苷钠抗肿瘤活性已有所报道,研究发现七叶皂苷钠具有抑制人鼻咽癌KB细胞、小鼠肝癌H<sub>22</sub>细胞、小鼠肉瘤S<sub>180</sub>细胞及大肠癌HCT-8细胞生长的作用<sup>[3,4]</sup>。Patlolla等<sup>[5]</sup>报道七叶皂苷钠能够抑制小鼠ACF(结肠癌前病变)的形成,以及诱导HT-29人克隆结肠癌细胞凋亡,但有关作用机制报道甚少。研究表明七叶皂苷钠的代谢产物可以有效抑制小鼠肉瘤、肺癌和肝癌细胞的生长,说明七叶皂苷钠进入小鼠体内在发挥直接抑制肿瘤细胞生长的同时,其代谢后的活化产物也具有抑制肿瘤生长的作用<sup>[10]</sup>。另外七叶皂苷钠抗炎机制研究表明:七叶皂苷钠具有通过促进K<sup>+</sup>离子进入通道,提高静脉张力,促进前列腺素F<sub>2a</sub>的释放,拮抗组胺和5-羟色胺的释放,以及降低组织中透明质酸酶活性等作用。其中的一些特性与七叶皂苷钠潜在的体内抗肿瘤作用有关,如前列腺素F<sub>2a</sub>。

可以强烈抑制由二甲胍诱导大鼠结肠腺癌细胞的增殖<sup>[11]</sup>;具有抗透明酸活性的化合物往往同时具有抗肿瘤活性,抗透明酸活性越强其抗肿瘤活性也越强<sup>[12]</sup>。从这些现象也许可以解释七叶皂苷钠的体内显著抗肿瘤作用,具体机制有待进一步研究证实。

#### 参考文献:

- [1] Sirtori C R. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile [J]. *Pharmacol Res*, 2001, 44(3): 183-193.
- [2] 侯广平, 池广明. 七叶皂苷的药理作用及其主要临床应用 [J]. *中国药师*, 2004, 7(3): 206-208.
- [3] 郭维, 徐波, 杨秀伟.  $\beta$ -七叶皂苷钠的抗肿瘤作用研究 [J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(3): 351-352.
- [4] 邹明, 韩英, 纪欣. 七叶皂苷抑制大肠癌HCT-8细胞生长及提高癌细胞对5-FU敏感性的研究 [J]. *中华消化杂志*, 2001, 21(4): 248-249.
- [5] Patlolla J M, Raju J, Swamy M V, et al. Beta-Escin inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats and regulates the cell cycle growth by inducing p21 (waf1/cip1) in colon cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(6): 1459-1466.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [7] Lacaille-Dubois M A, Wagner H. *In Studies in Natural Products Chemistry* [M]. Elsevier, Amsterdam, 2000.
- [8] 牛浹平, 高瑞兰, Helen T. 人参皂苷诱导HL-60细胞凋亡的研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2002, 22(6): 449-453.
- [9] 牛浹平, 宋必卫, 王文喜.  $\beta$ -七叶皂苷钠对髓性白血病细胞HL-60的抑制增殖及诱导凋亡作用研究 [J]. *中华实用中西医结合杂志*, 2005, 19(2): 1097-1099.
- [10] 杨秀伟, 赵静, 崔景荣, 等. 七叶树皂苷-1a的人肠内细菌生物转化产物及其抗肿瘤活性研究 [J]. *北京大学学报: 医学版*, 2004, 36(1): 31-35.
- [11] Tutton P J, Barkla D H. Influence of prostaglandin analogues on epithelial cell proliferation and xenograft growth [J]. *Br J Cancer*, 1980, 41(1): 47-51.
- [12] Stone O J. Cancer resistance, carcinogenesis and ground substance viscosity [J]. *Med Hypotheses*, 1986, 20(1): 117-124.

## 自主活动实时测试分析处理系统的建立与开心散安神镇静作用验证

王琼<sup>1,5</sup>, 买文丽<sup>5</sup>, 李翊华<sup>2</sup>, 陈善广<sup>3\*</sup>, 王立为<sup>1</sup>, 冯志强<sup>5</sup>, 朱轶范<sup>4</sup>, 刘新民<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100093; 2. 中国科学院大恒集团, 北京 100083;

3. 中国航天员科研训练中心, 北京 100094; 4. 北京三维拓盟数字影像技术有限公司, 北京 100007;

5. 泸州医学院, 四川 泸州 646000)

**摘要:**目的 建立自主活动实时测试分析处理系统,并用此系统检测安神中药复方开心散对小鼠自主活动的影

收稿日期: 2009-01-20

基金项目: 国家人事部中医药回国人员重点基金资助项目(2003LHR01); 国家科技部国际科技合作重点资助项目(2006DFA21740)

\* 通讯作者 刘新民 E-mail: liuxinmin@hotmail.com 陈善广 E-mail: tjgercsg@163.com