

# 土木香中倍半萜内酯抗肿瘤活性及构效关系研究

李 勇<sup>1,2</sup>, 丛 斌<sup>1\*</sup>, 董 玫<sup>1</sup>, 张嫚丽<sup>3</sup>, 王思明<sup>3</sup>, 史清文<sup>3\*</sup>

(1 河北医科大学基础医学院 法医学系 河北省法医学重点实验室, 河北 石家庄 050017; 2 河北医科大学第四医院 胸外外科, 河北 石家庄 050011; 3 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017)

**摘要:**目的 通过检测土木香中 3 种倍半萜内酯化合物异土木香内酯 (isoalantolactone, 1), 2-羟基-11,13-二氢异土木香内酯 (2-hydroxy-11,13-dihydroisoalantolactone, 2) 和 11,13-二氢异土木香内酯 (11,13-dihydroisoalantolactone, 3) 抗肿瘤活性, 探讨化合物的构效关系。方法 利用 MTT 比色法检测 3 种倍半萜内酯化合物对人肺癌细胞增殖活性的影响; 以移植性小鼠肝癌 H<sub>22</sub> 为模型, 检测异土木香内酯对在体肿瘤生长以及机体免疫能力的影响; 以体外培养的仓鼠肺成纤维细胞 (CHL) 为对象, 评价异土木香内酯对正常细胞的毒性。结果 化合物 1 (异土木香内酯) 对人非小细胞肺癌细胞 (A549、RERF-LG-jk、QG-56) 的增殖抑制作用强于顺铂, 对人小细胞肺癌细胞 (PG-6 和 QG-90) 的增殖抑制作用与顺铂相同, 而化合物 2 和 3 对各种实验用肿瘤细胞的增殖增不显示抑制活性; 化合物 1 对肝癌 H<sub>22</sub> 生长具有较强的抑制活性, 但对小鼠胸腺指数和脾指数的影响与对照组相比均没有显著差异; 化合物 1 对体外培养的 CHL 细胞显示较弱的毒性。结论 化合物 1 显示较强的体内外抗肿瘤活性, 而化合物 2 和化合物 3 对体内外肿瘤的生长均不显示抑制活性, 说明体内外抗肿瘤活性可能与其具有的  $\alpha, \beta$ -不饱和和五元内酯环的结构有关, 不饱和的环外双键氢化饱和后形成的饱和和五元内酯环, 可能是体内外抗肿瘤活性消失或减弱的原因; 增强机体免疫力是其抗肿瘤作用的机制。

**关键词:** 土木香; 倍半萜内酯; 抗肿瘤; 构效关系

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1336-03

土木香 *Inula helenium* L. 系菊科旋覆花属植物, 为多年生草本, 性温, 味辛、苦, 在我国分布于新疆, 其他许多地区常有栽培; 其根供药用, 有些地区用土木香代替青木香。土木香具有健胃、利尿、祛痰和驱虫等功效<sup>[1]</sup>。目前已从土木香中分离得到土木香内酯、异土木香内酯和二氢土木香内酯等多种成分, 具有抗肿瘤、抗炎、驱虫、抗菌、降血糖和镇痛等多种活性<sup>[2,3]</sup>。为较系统地研究异土木香内酯的抗肿瘤活性, 本实验室采用体外培养的人小细胞肺癌细胞株和人非小细胞肺癌细胞株以及小鼠移植性肿瘤模型对从土木香根中纯化的 3 种倍半萜内酯化合物进行了体内外抗肿瘤活性研究, 并探讨了这 3 种化合物结构与活性之间的关系及可能的作用机制。

## 1 材料

1.1 药物: 3 种倍半萜类化合物, 异土木香内酯 (isoalantolactone, 1), 2-羟基-11,13-二氢异土木香内酯 (2-hydroxy-11,13-dihydroisoalantolactone, 2) 和 11,13-二氢异土木香内酯 (11,13-dihydroisoalantolactone, 3) 由河北医科大学药学院史清文教授从土木香的根中分离得到, 均为白色针晶, 经一

维和二维核磁共振光谱和质谱确定结构, 经 HPLC 和 <sup>1</sup>H-NMR 检查, 质量分数在 99% 以上。

1.2 试剂: MTT (Sigma); RPMI 1640 培养基 (Gibco); 顺铂 (Sigma, 批号 034k3693)。

1.3 细胞系和实验动物: 人非小细胞肺癌细胞株 (A549、RERF-LG-jk、QG-56) 以及人小细胞肺癌细胞株 (PG-6、QG-90) 由日本千叶大学医学部第二生物化学教研室提供; 仓鼠肺成纤维细胞 (CHL) 由河北医科大学基础医学院细胞生物学实验室提供。各细胞株接种于直径为 100 mm 的培养皿中, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 37 °C 和 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。实验用小鼠为昆明小鼠, 体质量 18~22 g, 合格证号冀动字 805213 号, 河北医科大学实验动物中心提供。

## 2 方法

2.1 体外抗肿瘤细胞或 CHL 增殖活性: 参照文献方法<sup>[4]</sup>。细胞接种于 96 孔板, 每孔含  $1 \times 10^4$  个细胞, 分别加入溶剂 (终体积分数 0.1% DMSO)、阳性对照药物顺铂、紫杉醇和化合物 1~3, 终浓度分别为 100、10、1  $\mu\text{mol/L}$ , 每组设 3 个复孔, 置于饱和

\* 收稿日期: 2009-12-30

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (08B032); 河北省留学回国人员科技活动项目 (2006-02); 河北省卫生厅医学科学研究重点课题计划 (20090151)

作者简介: 李 勇 (1976-), 男, 河北邯郸人, 博士, 研究方向为肺癌的基础与临床。Tel: 13831120879 E-mail: liyongdoctor@126.com

\* 通讯作者 丛 斌 Tel: (0311) 86266406 E-mail: heydcongbin@126.com

史清文 Tel: (0311) 86265634 E-mail: shiqingw@163.com

湿度、37 ℃ 和 5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养 48 h。于培养结束前 4 h, 各培养孔加入 5 mg/mL MTT, 测定各孔吸光度 (A) 值, 测定波长 570 nm, 参考波长 630 nm, 计算细胞增殖抑制率及半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 值。

增殖抑制率 = (1 - 给药组 A 值 / 对照组 A 值) × 100%

2.2 体内抗肿瘤活性: 参考文献方法<sup>[5]</sup>, 制备移植性肝癌 H<sub>22</sub> 小鼠模型, 取小鼠腹腔传代的处于对数生长期的肝癌 H<sub>22</sub> 细胞, 计数后用无菌生理盐水调细胞浓度为 5 × 10<sup>7</sup>/mL, 接种于小鼠右前肢腋窝皮下, 每只 0.2 mL, 即 1 × 10<sup>7</sup> 个细胞, 接种 1 d 后, 随机分组, 每组 10 只。模型组 ig 给予水 (0.2 mL/10 g); 环磷酰胺组 ip 环磷酰胺 (30 mg/kg); 给药组分为 1、10、100 mg/kg 3 个剂量组, ig 给予相应药物 (0.2 mL/10 g), 每日给药 1 次, 连续 10 d。第 10 天处死小鼠, 迅速剥取瘤块、胸腺和脾脏, 称取瘤质量、胸腺和脾脏质量, 计算抑瘤率、胸腺指数和脾指数。

抑瘤率 = (1 - 给药组瘤质量 / 模型组瘤质量) × 100%

胸腺(脾)指数 = 1000 × 胸腺(脾)质量 / 体质量

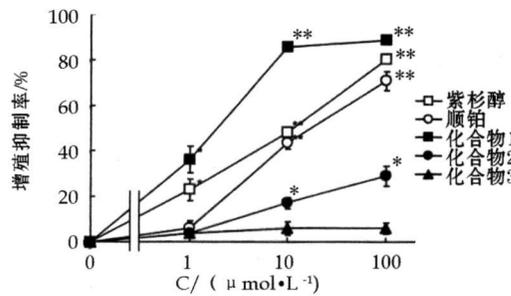
2.3 统计学处理: 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示; 两组间数据用 *t* 检验; 多组间数据用单因素方差分析。应用 SA S612 统计软件计算。

### 3 结果

3.1 化合物 1~3 对体外培养的人非小细胞肺癌细胞 A549 增殖的抑制作用: 结果见图 1, 阳性对照药物顺铂和紫杉醇对 A549 细胞增殖显示较强的抑制活性, 对 A549 细胞增殖的 IC<sub>50</sub> 分别为 8.48、14.54 μmol/L; 100 μmol/L 化合物 1 (异土木香内酯) 对 A549 肿瘤细胞的抑制率为 88.93%, IC<sub>50</sub> 仅为 1.51 μmol/L, 低于阳性对照顺铂和紫杉醇, 并且与溶剂对照组相比较差异极显著, 提示异土木香内酯具有较强的抑制人肺肿瘤细胞增殖的作用。但是 100 μmol/L 与异土木香内酯结构相似的化合物 2

和 3 处理 A549 细胞, 对其增殖均显示较弱的抑制性, 其 IC<sub>50</sub> 均大于 100 μmol/L。

3.2 化合物 1 对其他 4 种人肺肿瘤细胞增殖活性的影响: 结果见图 2, 阳性对照顺铂和紫杉醇对人非小细胞肺癌细胞 (RERF-LG-jk 和 QG-56) 的增殖显示较弱的抑制活性, 对人小细胞肺癌细胞 (PG-6 和 QG-90) 的增殖显示较强的抑制活性, IC<sub>50</sub> 仅为 24.62、8.95、4.53、0.32 μmol/L; 化合物 1 除对 PG-6 的增殖显示中等的抑制活性, 对 RERF-LG-jk、QG-56 和 QG-90 细胞的增殖均有较强的抑制活性, 其 IC<sub>50</sub> 分别为 7.23、4.29、3.70 μmol/L。用 100 μmol/L 化合物 2 和 3 处理其他 4 种实验用人肺肿瘤细胞, 对其增殖均显示较弱的抑制活性, IC<sub>50</sub> 均大于 100 μmol/L。



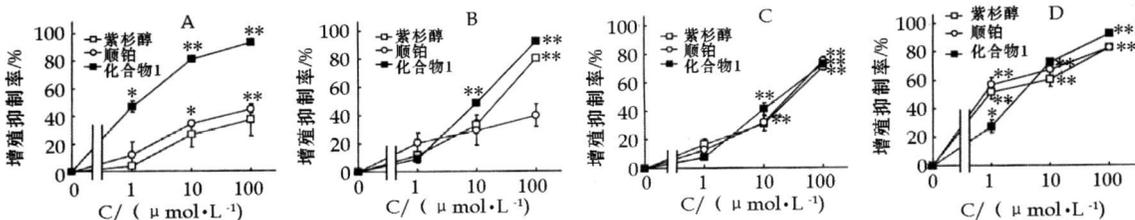
与溶剂对照组比较: \* *P* < 0.05 \*\* *P* < 0.01

\* *P* < 0.05 \*\* *P* < 0.01 vs solution control group

图 1 3 种倍半萜内酯化合物对人肺肿瘤细胞 A549 增殖的影响

Fig. 1 Effect of three sesquiterpene lactones on proliferation of human A549 tumor cell line

3.3 化合物 1 对小鼠移植性肿瘤 H<sub>22</sub> 生长活性的影响: 结果见图 3, 环磷酰胺显著抑制小鼠肝癌 H<sub>22</sub>, 抑瘤率为 67.56%, 化合物 1 100、10 mg/kg 剂量组可显著抑制小鼠肝癌 H<sub>22</sub> 的生长, 抑瘤率分别为 65.50%、42.97%、100 mg/kg 剂量组与模型组



A-RERF-LG-jk B-QG-56 C-PG-6 D-QG-90

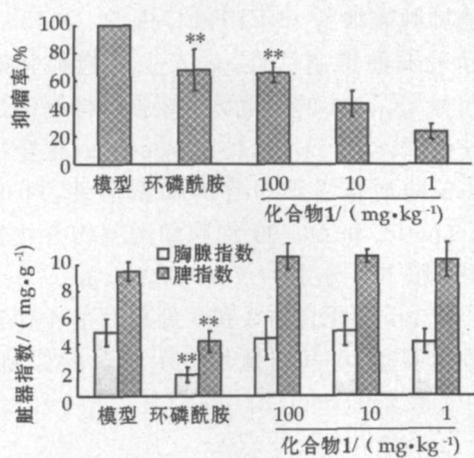
与溶剂对照组比较: \* *P* < 0.05 \*\* *P* < 0.01

\* *P* < 0.05 \*\* *P* < 0.01 vs solution control group

图 2 化合物 1 对其他 4 种人肺肿瘤细胞增殖活性的影响

Fig. 2 Effect of compound 1 on proliferation of other four human lung tumor cell lines

相比差异显著 ( $P < 0.01$ ), 并呈现较好的剂量依赖关系。与模型组相比, 环磷酰胺组的胸腺指数和脾指数非常显著降低 ( $P < 0.01$ ), 但化合物 1 各剂量组的胸腺指数以及脾指数与模型组相比无显著差异。

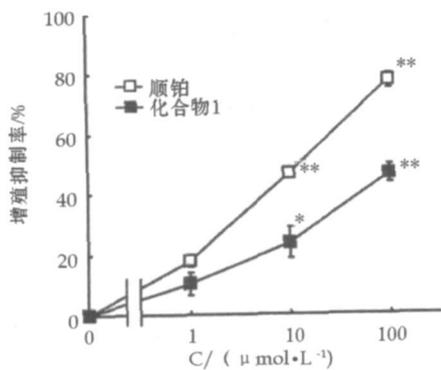


与溶剂对照组比较: \*\*  $P < 0.01$   
\*\*  $P < 0.01$  vs solution control group

图 3 化合物 1 对小鼠肿瘤 H<sub>22</sub> 生长的影响

Fig. 3 Effect of compound 1 on H<sub>22</sub> growth in mice

3.4 化合物 1 对体外培养的 CHL 细胞增殖活性的影响: 以 CHL 细胞为对象, 考察化合物 1 对正常细胞的毒性, 结果见图 4, 阳性对照顺铂对 CHL 细胞增殖呈现较强的抑制活性, IC<sub>50</sub> 为 18.34 μmol/L, 而用 100 μmol/L 化合物 1 处理 CHL 细胞, 其增殖抑制率为 46.33%, 化合物 1 对 CHL 的 IC<sub>50</sub> 大于 100 μmol/L, 显示较弱毒性。



与溶剂对照组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$   
\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs solution control group

图 4 化合物 1 对 CHL 细胞增殖的影响

Fig. 4 Effect of compound 1 on CHL cell proliferation

#### 4 讨论

近年来肺癌的发生率和死亡率逐渐升高, 并且发病年龄逐渐年轻化。化学治疗在肺癌尤其是小细

胞肺癌和晚期肺癌患者中占据重要地位, 而目前临床上肺癌化疗仍以铂类、紫杉烷类和长春新碱类为主, 但是因其不良反应较大, 限制了其广泛应用, 所以寻找高效低毒的新的抗癌药物对于肿瘤治疗具有重大意义。

本实验室前期研究发现, 土木香中提取的多种倍半萜类化合物对恶性肿瘤细胞的增殖显示了较强的抑制活性。本实验以土木香中提取的 3 种倍半萜内酯化合物为研究对象, 对 5 种人肺癌细胞增殖的抑制活性进行的系统研究。研究结果显示, 化合物 1 (异土木香内酯) 对人肺癌细胞的增殖均有明显的抑制作用, 尤其对人非小细胞肺癌细胞 (A549 和 RERF-CL-jk) 的增殖抑制活性强于顺铂和紫杉醇, 并且呈现较好的剂量依赖关系; 进一步的整体实验表明, 化合物 1 对小鼠移植性肿瘤 H<sub>22</sub> 生长具有抑制作用, 并且不降低荷瘤小鼠的胸腺指数和脾指数, 推测化合物 1 有可能通过提高机体的免疫能力来实验其抗肿瘤活性, 有关作用机制的实验正在进一步研究中。同样从土木香根中提取得到的化合物 2 (2-羟基-11, 13-二氢异土木香内酯) 和化合物 3 (2-羟基-11, 13-二氢异土木香内酯), 即使用 100 μmol/L 处理 5 种人肺癌细胞, 对其增殖均显示较弱的抑制活性。从结构上分析异土木香内酯属于桉叶烷型 (eudesmane) 倍半萜内酯, 其活性与其具有的 α, β-不饱和五元内酯环的结构有关, 不饱和的环外双键氢化饱和后形成饱和五元内酯环, 可能是抗肿瘤活性消失或减弱的原因。

通过对土木香中提取的多种倍半萜内酯化合物对肿瘤细胞的增殖抑制作用的研究, 明确其对肿瘤细胞的增殖抑制作用, 并在下一步对土木香提取的 3 种倍半萜类化合物的抗癌机制进行深入研究, 探讨化合物构效关系, 这对发现新的肺癌治疗药物, 并在指导药物的开发设计方面具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] Cantrell C L, Abate L, Fronczek F R, et al. Antimycobacterial eudesmanolides from *Inula helenium* and *Rudbeckia subtomentosa* [J]. *Planta Med*, 1999, 65(2): 351-355
- [3] Konishi T, Shimada Y, Nagao T, et al. Antiproliferative sesquiterpene lactones from the roots of *Inula helenium* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25: 1370-1372
- [4] 司徒镇强. 细胞培养 [M]. 北京: 世界图书出版社, 1996
- [5] Newan D J, Cragg, G M, Snader K M. The influence of natural products on drug discovery [J]. *Nat Prod Rep*, 2001, 17: 215-234