

蟾毒它灵体内外抗肿瘤作用的研究

于垂亮, 侯惠民*

(上海医药工业研究院 药物制剂国家工程研究中心, 上海 201203)

摘要:目的 评价蟾毒它灵的体内外抗肿瘤作用。方法 采用SRB测试察蟾毒它灵对人非小细胞肺癌细胞A549、人肝癌细胞 BeT 7402、人胃癌细胞 SGG 7901 和人宫颈癌细胞 HeLa 的生长抑制活性。通过静脉恒速输注方式给药, 对 S₁₈₀ 及 H₂₂ 荷瘤小鼠进行蟾毒它灵体内药效评价, 包括高剂量短程给药和低剂量长程给药。结果 蟾毒它灵对 SGG-7901、A549、BeT 7402、HeLa 细胞作用 72 h 的 IC₅₀ 值分别为 0.018、0.017、0.052、0.013 μg/mL。蟾毒它灵采用恒速输注给药方式可以实现 50% 以上的抑瘤率。结论 蟾毒它灵在体内外均具有很好的抗肿瘤效果。

关键词: 蟾酥; 蟾毒它灵; 抗肿瘤; 恒速输注

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)10-1683-04

传统中药蟾酥具有很好的抗肿瘤效果, 蟾毒它灵为其中的一个主要成分^[1], 与同类其他化合物相比, 蟾毒它灵抗肿瘤活性较好, 毒性较低, 值得深入研究开发。研究表明, 蟾毒它灵体外对肿瘤细胞的生长具有抑制活性^[2-6], 但其在动物体内的抗肿瘤作用尚未见报道。蟾毒它灵在小鼠体内的生物半衰期 ($t_{1/2}$) 很短, 为 28 min。在药动学上称之为超速处置类药物, 此类药物在临床用药实践中, 为维持体内有效血药浓度必须多次给药。若按药物的 $t_{1/2}$ 给药, 则给药过于频繁; 若药物毒性不大, 可适当加大剂量, 给药周期可适当延长。但如果药物的治疗指数小, $t_{1/2}$ 又较短, 临床多采用静脉恒速滴注给药^[7]。蟾毒它灵正是治疗指数小, $t_{1/2}$ 又较短的一类化合物, 因此在评价其药效时, 合理的给药方式十分重要。本研究主要从体外细胞水平初步评价蟾毒它灵的抗肿瘤作用, 并进一步通过体内动物实验考察蟾毒它灵以恒速输注给药方式对荷瘤小鼠的肿瘤抑制作用, 为其临床合理应用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器: YP2001N 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); BS 110S 电子分析天平 (Sartorius); TS2-60 恒流泵 (保定兰格恒流泵有限公司); CSF-18 型超声波洗涤器 (上海超声波仪器厂); 酶标仪 (美国 Beckman 公司 DG3022 型); 全自动 CO₂ 孵箱 (杜邦公司 Napco-6100)。

1.2 药品与试剂: 蟾毒它灵 (自制, 质量分数为

97.5%); 5-FU (南通精华制药有限公司, 质量分数为 99%); RPMI 1640 培养液 (美国 Gibco 公司); 小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); 磺酰罗丹明 B (SRB) (美国 Sigma 公司); Cremophor EL (德国 BASF 公司), 水为灭菌注射用水; 其他试剂均为色谱纯或分析纯。

1.3 细胞株: 人非小细胞肺癌 A549 细胞、人肝癌 BeT-7402 细胞、人胃癌 SGG-7901 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞 (中国科学院上海细胞库)。

1.4 动物: 昆明种小鼠 (中国科学院上海实验动物中心提供), 雌雄各半, 体质量 18~22 g。

2 方法

2.1 体外抗肿瘤实验: 采用 SRB 法^[8,9]。取对数生长期 4 种癌细胞, 用新鲜的 RPMI 1640 培养基配制成一定浓度的细胞悬液, 按每孔 200 μL 接种于 96 孔板中, 每孔加入 2 μL 不同质量浓度的蟾毒它灵溶液 (DMSO 终体积分数 ≤ 0.5%), 37 °C 下培养 72 h, 离心弃去上清。每孔细胞中加入预冷的 80% 三氯醋酸 50 μL, 置 4 °C 固定 1 h, 用水冲洗 5 次, 空气干燥。每孔加入 0.4% SRB 的 1% 醋酸溶液 50 μL 并在室温静置 30 min。用 1% 醋酸水清洗 4 次, 除去未结合的游离 SRB 染料。每孔加入 150 μL Tris 非缓冲液 (10 mmol/L, pH 10.5) 溶解蛋白结合染料, 用酶标仪测定每孔在 520 nm 处的吸光度 (A) 值。在同一 96 孔板中的样品每个浓度设置 3 个复孔, 另设 3 孔作为对照。取 3 孔平均 A

①收稿日期: 2010-04-22

基金项目: 国家重大科技专项 (2009ZX09103-385)

作者简介: 于垂亮 (1978-), 男, 山东青岛人, 助理研究员, 博士研究生, 从事天然药物及药剂研究。

Tel: (021) 51320211 E-mail: yuel@nperc.com.cn

* 通讯作者 侯惠民, 中国工程院院士 Tel: (021) 51320211 E-mail: houhm@nperc.com.cn

值, 计算细胞增殖抑制率^[9,11]。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

2.2 对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用

2.2.1 S₁₈₀ 荷瘤小鼠模型制备: 移植 S₁₈₀ 肿瘤, 本实验室传代维持。无菌条件下抽取 S₁₈₀ 荷瘤小鼠腹水, 用生理盐水稀释成 1×10^6 / mL 的肿瘤细胞悬液。每只健康小鼠右前肢腋下注射 0.2 mL 肿瘤细胞悬液。接种后小鼠自由进食进水。

2.2.2 分组与给药: 将荷瘤小鼠称体质量, 随机分成 4 组, 为模型组、5-FU 组、蟾毒它灵单次尾 iv 给药组、蟾毒它灵恒速静脉输注给药组, 每组 10 只。将蟾毒它灵溶于适量表面活性剂 cremophor EL 及乙醇, 以生理盐水配成 1 mg/mL 溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 控制 cremophor EL 及乙醇在最终溶液中的量不超过 10 mg/mL。

接种第 2 天开始给药, 连续 7 d。蟾毒它灵单次尾 iv 给药组以 5 mg/kg 剂量每天单次给药; 蟾毒它灵恒速静脉输注给药组以首个半衰期 5 mg/(kg × 28 min) 给药, 第 2 个半衰期以 2.5 mg/(kg × 28 min) 给药, 其后以 2 mg/(kg × 28 min) 给药, 持续给药 8 h; 模型组尾 iv 给予等体积生理盐水。5-FU 阳性对照组, 以 25 mg/kg ip 给药, 给药 7 次。

2.2.3 抑瘤率评价方法: 接种肿瘤后第 10 天, 即末次给药后次日, 小鼠称体质量, 脱颈椎处死, 剥取皮下实体瘤体组织, 冲洗干净, 滤纸吸干, 称质量, 计算各组平均瘤质量, 计算抑瘤率 (模型组的平均瘤质量应在 1 g 以上, 且肿瘤小于 400 mg 的小鼠比例低于 20%)。

抑瘤率 = (模型组瘤质量 - 给药组瘤质量) / 模型组瘤质量 × 100%

2.2.4 统计学分析及疗效评价标准: 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学分析采用 *t* 检验。抑瘤率大于 40%, 且经 *t* 检验, 有显著差异时, 连续 3 次疗效稳定, 则评定此药有一定疗效。

2.3 对 H₂₂ 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用

2.3.1 H₂₂ 荷瘤小鼠模型制备: 小鼠肝癌 H₂₂ 移植性肿瘤, 由本实验室传代维持。无菌条件下抽取肝癌 H₂₂ 荷瘤小鼠腹水, 用生理盐水稀释成 1×10^7 / mL 的肿瘤细胞悬液。每只健康小鼠右前肢腋下注射 0.2 mL 肿瘤细胞悬液。接种后小鼠自由进食、进水。

2.3.2 分组与给药: 高剂量短程给药方案具体如下, 荷瘤小鼠称体质量, 随机分成 4 组, 分别为模型

组、蟾毒它灵每日两次尾 iv 给药组、蟾毒它灵短程 (12 h) 恒速静脉输注给药组、5-FU 组, 每组 10 只。接种第 2 天开始给药, 连续 7 d。蟾毒它灵尾 iv 给药组以 5 mg/kg 剂量给药, 每日早晚各 1 次; 蟾毒它灵恒速静脉输注给药组以首个半衰期 5 mg/kg × 28 min 给药, 第 2 个半衰期以 3 mg/(kg × 28 min) 给药, 其后以 2.5 mg/(kg × 28 min) 给药, 持续给药 12 h; 模型组尾 iv 给予等体积生理盐水。5-FU 阳性对照组, 以 25 mg/kg ip 给药, 给药 7 次。低剂量长程给药方案具体如下, 荷瘤小鼠称体质量, 随机分成 3 组, 分别为模型组、5-FU 阳性对照组, 恒速静脉输注 (24 h) 给药组, 每组 10 只。接种第 2 天开始给药, 蟾毒它灵恒速静脉输注给药组给药 5 d, 隔日给药 1 次, 以首个半衰期 2 mg/(kg × 28 min) 给药, 第 2 个半衰期以 1 mg/(kg × 28 min) 给药, 其后以 1 mg/(kg × 28 min) 给药, 持续给药 24 h; 模型组尾 iv 给予等体积生理盐水。5-FU 阳性对照组, 以 25 mg/kg ip 给药, 给药 7 次。

2.3.3 抑瘤率评价方法、统计学分析及疗效评价标准同 2.2.3 与 2.2.4 项内容。

3 结果

3.1 体外抗肿瘤实验结果: 表 1 结果表明, 蟾毒它灵对于不同的实体瘤细胞系均具有较好的细胞生长抑制活性, 蟾毒它灵对 SGC-7901、A549、BeT 7402、HeLa 细胞作用 72 h 的 IC₅₀ 值分别为 0.018、0.017、0.052、0.013 μg/mL, 显示了广谱抗肿瘤活性。

表 1 蟾毒它灵对不同肿瘤细胞增殖的抑制作用

Table 1 Inhibition of bufotalin on proliferation of different tumour cell lines

蟾毒它灵/ (μg · mL ⁻¹)	细胞增殖抑制率/%			
	SGC-7901	A549	BeT 7402	HeLa
0.1	97.4	80.4	69.1	97.1
0.05	86.3	75.3	50.7	96.0
0.025	54.4	62.7	21.2	78.3
0.0125	33.9	49.3	13.5	58.6
0.0063	16.0	21.8	0	13.8

3.2 对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用: 肉眼可观察到荷瘤小鼠右腋窝有明显包块, 右前肢行动困难。解剖后取出瘤体, 瘤体形状不规则, 颜色粉白。质地软硬不均。蟾毒它灵对小鼠移植性肿瘤 S₁₈₀ 的抑制作用结果见表 2。模型组肿瘤生长良好, 平均瘤质量在 1 g 以上。各给药组与模型组比较, 其瘤质量均降低, 以蟾毒它灵恒速输注组抑瘤效果好, 与模型组比较差异显著 (*P* < 0.001)。

表 2 蟾毒它灵对 S_{180} 荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用

Table 2 Inhibition of bufotalin on tumor in S_{180} tumor bearing mice

组别	动物/只		瘤质量/g	抑瘤率/%
	开始	结束		
模型	9	9	1.99 ± 0.54	-
5-FU	9	9	0.81 ± 0.23***	59.3
蟾毒它灵 单次 iv 给药	10	10	1.20 ± 0.39**	39.7
蟾毒它灵 恒速输注给药	10	10	0.85 ± 0.19***	57.3

与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

3.3 对 H_{22} 荷瘤小鼠抗肿瘤作用

3.3.1 高剂量短时程给药方案下实验结果: 蟾毒它灵高剂量短时程给药对小鼠移植性肝肿瘤 H_{22} 的抑制作用结果见表 3。模型组肿瘤生长良好, 平均瘤质量在 1 g 以上。各给药组与模型组比较, 其瘤质量均降低, 以恒速输注 (12 h) 组抑瘤效果更好, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.001$); 每日两次尾 iv 给药组也有一定的抑瘤效果 ($P < 0.001$)。

3.3.2 低剂量长时程给药方案下实验结果: 蟾毒它灵低剂量长时程给药对小鼠移植性肝肿瘤 H_{22} 的抑制作用结果见表 4。

表 3 蟾毒它灵高剂量短时程给药对 H_{22} 荷瘤小鼠的肿瘤的抑制作用

Table 3 Inhibition of short term at high dose of bufotalin on tumor in H_{22} tumor bearing mice

组别	动物/只		瘤质量/g	抑瘤率/%
	开始	结束		
模型	9	9	2.73 ± 0.61	-
5-FU	9	9	1.31 ± 0.43***	52.0
蟾毒它灵 iv 给药	9	9	1.64 ± 0.45**	39.9
蟾毒它灵 恒速输注 (12 h) 给药	10	10	1.35 ± 0.34***	50.5

与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

表 4 蟾毒它灵低剂量长时程给药对 H_{22} 荷瘤小鼠的肿瘤抑制作用

Table 4 Inhibition of long term at low dose of bufotalin on tumor in H_{22} tumor bearing mice

组别	动物/只		瘤质量/g	抑瘤率/%
	开始	结束		
模型	10	10	3.32 ± 0.71	-
5-FU	10	10	1.58 ± 0.68***	52.4
蟾毒它灵恒速输注 (24 h) 给药	10	10	1.35 ± 0.55***	59.3

与模型组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs model group

4 讨论

本研究首次考察了蟾毒它灵在荷瘤小鼠体内的抗肿瘤作用, 结果表明蟾毒它灵在体内具有较好的

抗肿瘤效果。

蟾毒它灵的生物半衰期很短, $t_{1/2} < 1$ h, 在药理学上称之为超速处置类药物, 在临床用药实践中, 为维持体内有效血药浓度必须多次给药, 给药次数要比一般药物更频繁。当给药周期 $\tau = t_{1/2}$ 时, 按一定的剂量, 一定间隔多次给药后, 体内的药物浓度逐渐达到稳定水平, 约需 6 个 $t_{1/2}$, 给药速率等于药物在体内的消除速率, 不会出现蓄积中毒, 若 $\tau < t_{1/2}$ 时, 则易引起中毒。蟾毒它灵是治疗指数小, $t_{1/2}$ 又较短的一类化合物, 因此在评价其药效时, 合理的给药方式十分重要。寻找选择性高的抗癌药物, 应提高新药筛选质量, 增加筛选工作的可靠性和预见性, 减少筛选结果的假阴性和假阳性, 研制出有代表性的各类肿瘤的筛选模型和筛选方法^[8]。本研究工作正是考虑到蟾毒它灵的一些特点, 充分考察蟾毒它灵抗肿瘤作用的潜力, 降低假阴性的可能性。给药方式不合理, 生物达不到体内有效药物浓度, 或有效药物浓度的维持时间不够长, 都会影响药物疗效。

本研究过程中建立了一套小鼠清醒状态下实现长时间给药的装置^[12], 小鼠可以自由饮食、饮水及排泄, 可模拟临床静脉滴注的给药方式, 并且可实现多次反复给药, 能够客观评价药物的潜在临床应用价值。就蟾毒它灵这种 $t_{1/2}$ 比较短的药物而言, 单次注射给药不能很好体现药效, 会造成给药方式不当引起的假阴性结果。本研究通过不同给药方式进行药效评价, 基本肯定了蟾毒它灵对荷瘤小鼠的抗肿瘤药效, 其抗肿瘤作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 赵强, 孟凡静, 刘安西. 蟾酥的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(10): 附 4 附 7
- [2] Qiao L, Huang Y F, Cao J Q, et al. One new bufadienolide from Chinese drug "Ch'an Su" [J]. J Asian Nat Prod Res, 2008, 10(3): 224-227
- [3] Kamano Y, Yamashita A, Nogawa T, et al. QSAR evaluation of the Ch'an Su and related bufadienolides against the colchicine resistant primary liver carcinoma cell line PLC/PRF/5(1) [J]. J Med Chem, 2002, 45(25): 5440-5447
- [4] Nogawa T, Kamano Y, Yamashita A, et al. Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Ch'an Su [J]. J Nat Prod, 2001, 64(9): 1148-1152
- [5] Su C L, Lin T Y, Lin C N, et al. Involvement of caspases and apoptosis inducing factor in bufotalin induced apoptosis of Hep 3B cells [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(1): 55-61
- [6] 吴兴新, 洋孙, 周晓斌, 等. 蟾毒它灵对胃癌 BEG-823 细胞的促凋亡作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(2): 117-119
- [7] 邓树海, 刘兆平. 药动力学-理论与实践 [M]. 北京: 人民

- 卫生出版社, 1998
- [8] 王兴旺, 胥 杉. 抗癌药物筛选模型与筛选方法的研究 [J]. 中国医药工业杂志, 1997(1): 39-43
- [9] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(13): 1107-1112
- [10] 黄银久, 宋宝安, 金林红, 等. SRB 法和 MTT 法抗肿瘤药物筛选结果相关性研究 [J]. 生物学杂志, 2009(4): 13-16
- [11] 王 斌, 姜登钊, 李国强, 等. 怪柳抗肿瘤蒽类成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 697-701
- [12] 于垂亮, 罗春林, 张惠平, 等. 固定小鼠的装置 [P]. 中国: 2010201453364 2010-03-30

卷柏提取物对去卵巢大鼠骨代谢的影响

郑晓珂^{1,2}, 陈克宇², 侯庆伟², 王小兰², 张 鑫², 李冬梅^{2*}

(1 河南中医学院, 河南 郑州 450008; 2 河南省中药开发工程技术研究中心, 河南 郑州 450008)

摘要:目的 研究卷柏提取部位 (A、B、C、D) 对去卵巢大鼠血清雌二醇水平及骨代谢生化指标的影响, 并初步探讨其作用机制。方法 采用 6 月龄雌性 Wistar 大鼠 70 只, 按体质量随机分为假手术组、模型组、阳性对照组和 4 个卷柏不同提取部位用药组, 每组 10 只。除假手术组外, 其余各组切除双侧卵巢建立模型。手术 1 周后开始给药, 连续给药 26 周后处死大鼠。用放射免疫法检测雌二醇 (E₂)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、血清骨钙素 (BGP)、降钙素 (CT) 水平, 用常规生化法检测血清碱性磷酸酶 (ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 活性。结果 大鼠去除卵巢以后, E₂、CT 水平明显降低, ALP、TRAP、BGP、TNF-α 水平明显升高。给药 26 周后, 用药组 ALP、TRAP、BGP、TNF-α 水平比模型组明显降低 ($P < 0.01$); E₂、CT 水平明显升高 ($P < 0.01$)。结论 卷柏提取物对去卵巢大鼠骨代谢有一定的调节作用, 能够提高血清雌激素水平, 提示卷柏提取物对骨质疏松症有一定预防和治疗作用。

关键词: 卷柏; 去卵巢; 雌二醇; 骨代谢; 骨质疏松症

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)10-1686-04

卷柏为蕨类卷柏科 (Selaginellaceae) 植物卷柏 *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring 的全草, 为多年生草本植物, 又名长生不死草、九死还魂草、石莲花、万年青^[1]。卷柏为传统中药, 早在《本经》中已有记载, 将其列为上品, 述其“主治五脏邪气, 女子阴中寒热痛, 癥瘕血闭绝子。”卷柏和垫状卷柏 *S. pulvinata* (Hook. et Grev.) Maxim. 一直被《中国药典》(一部) 收录, 作为卷柏的药材使用。

本实验室前期对卷柏化学成分进行了全面系统的研究, 从中分离得到大量的黄酮类、木脂素类、核苷类和其他多酚类化合物成分^[2-8], 并对其药理活性进行了初步的研究。在前期实验中发现, 卷柏提取物能增加性未成熟小鼠子宫系数, 可使小鼠子宫质量增加, 具有雌激素样作用^[9-10]。去卵巢大鼠所引起的生物学上的变化与妇女绝经后生理上改变相似, 主要是由于体内雌激素水平下降而引起骨质疏松^[11]。本实验选用去卵巢大鼠模型, 探讨卷柏提取物长期作用对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响, 为卷柏抗骨质疏松有效成分的活性筛选及其机制的研究

提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 雌性 Wistar 大鼠 70 只, 6 月龄, 平均体质量 200~220 g (郑州大学河南省动物实验中心, 合格证号: 豫 2008-0013), 实验期间在二级动物房饲养, 环境温度为 (25±1) °C。

1.2 药物制备: 卷柏购自本草国药堂责任有限公司 (批号 20080321), 经河南中医学院陈随清教授、董诚明教授鉴定为卷柏属植物卷柏 *S. tamariscina* (Beauv.) Spring。卷柏干燥全草 8.98 kg, 80% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并滤液, 减压干燥, 得到 A (350.1 g, 总部位), 然后上聚酰胺柱, 用水和不同体积分数乙醇梯度洗脱, 得到 B (100.8 g, 水部位)、C (66.34 g, 50% 乙醇部位)、D (86.06 g, 80% 乙醇部位) 4 个部位。

1.3 主要试剂和仪器: 尼尔雌醇片 (Tabellae Nilestrioli), 1 mg/片 (上海华联, 批号 071103); 碱性磷酸酶 (ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所生产); 雌二醇

①收稿日期: 2010-01-16

基金项目: “重大新药创制”国家科技重大专项 (2009ZX09103-440); 重大公益性科研招标项目 (08110091800)

作者简介: 郑晓珂 (1962-), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药活性成分及其作用机制研究。

Tel: (0371) 65575963 E-mail: zhengxk.2006@yahoo.com.cn