

双四氢呋喃型番荔枝内酯体内抗肿瘤作用

陈勇, 李祥*, 陈建伟, 徐莎莎, 王玉, 邱海龙
南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 研究双四氢呋喃型番荔枝内酯的体内抗肿瘤作用。方法 以紫杉醇为阳性对照, 观察4个双四氢呋喃型番荔枝内酯单体番荔枝塔亭戊 (squamostatin-E, **1**)、番荔枝塔亭甲 (squamostatin-A, **2**)、去乙酰紫玉盘素 (desacetyluvaricin, **3**)、泡番荔枝辛 (bullatacin, **4**) 对移植性肝癌 Heps 和肉瘤 S₁₈₀ 荷瘤小鼠的抑瘤作用及对小鼠体质量与肝、胸腺和脾指数的影响。结果 与模型组比较, 化合物 **1** 高剂量 (60 μg/kg)、化合物 **3** 和 **4** 低剂量 (15 μg/kg) 对移植性肝癌 Heps 荷瘤小鼠肿瘤有极显著抑制作用 ($P < 0.01$), 抑制率分别为 51.6%、32.5%、63.4%; 化合物 **2** 和 **3** 高剂量 (60 μg/kg) 对移植性肝癌 Heps 荷瘤小鼠肿瘤有显著抑制作用 ($P < 0.05$), 抑制率分别为 31.2%、70.9%; 紫杉醇 40 μg/kg 的抑瘤率为 62.2%。化合物 **3** 高剂量对移植性肉瘤 S₁₈₀ 荷瘤小鼠肿瘤有极显著抑制作用 ($P < 0.01$), 抑制率为 63.9%; 紫杉醇 40 μg/kg 的抑瘤率为 48.9%。结论 化合物 **1**~**4** 对移植性肝癌 Heps 荷瘤小鼠、肉瘤 S₁₈₀ 荷瘤小鼠均有明显抗肿瘤作用, 部分化合物的抗肿瘤活性强于紫杉醇。

关键词: 双四氢呋喃型番荔枝内酯; 抗肿瘤; 肝癌 Heps; 肉瘤 S₁₈₀; 紫杉醇

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)01-0139-04

Antitumor effects of bistetrahydrofuran annonaceous acetogenins *in vivo*

CHEN Yong, LI Xiang, CHEN Jian-wei, XU Sha-sha, WANG Yu, QIU Hai-long
College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Key words: bistetrahydrofuran annonaceous acetogenins; anti-tumor; Heps; S₁₈₀; taxol

番荔枝内酯 (annonaceous acetogenins, 亦称番荔枝乙酰精宁) 是番荔枝科植物中特有的一类成分^[1]。Jolad 等^[2]从番荔枝科紫玉盘属植物尖紫玉盘 *Uvaria acuminata* Oliv. 根中分得第 1 个番荔枝内酯化合物 uvaricin, 其对小鼠白血病细胞有强杀伤作用, 由此掀起了发掘番荔枝科植物中番荔枝内酯类化合物的高潮。目前, 从番荔枝科植物中共分离得到 500 多个番荔枝内酯, 可分为单四氢呋喃型和双四氢呋喃型 (邻双和间双型) 两大类。以往关于番荔枝内酯的文献报道多为其体外抗肿瘤活性, 且双四氢呋喃型番荔枝内酯的抗肿瘤活性强于单四氢呋喃型番荔枝内酯^[3-9]。故本实验对前期分离得到的 4 个双四氢呋喃型番荔枝内酯化合物番荔枝塔亭戊 (squamostatin-E, **1**)、番荔枝塔亭甲 (squamostatin A, **2**)、去乙酰紫玉盘素 (desacetyluvaricin, **3**)、泡番

荔枝辛 (bullatacin, **4**) 进行体内抗肿瘤作用研究, 以期开发新型抗肿瘤药物。

1 材料

1.1 药品与仪器

化合物 **1**~**4** 由本实验室从番荔枝 *Annona squamosa* Linn. 种子氯仿提取部位分离得到, 经 HPLC-DAD 检测质量分数均 >98%; 紫杉醇, 规格 5 mL/支, 含紫杉醇 6 mg/mL, 四川康益生物技术制药有限公司, 批号 080403; 氯化钠注射液, 南京小营制药厂; AG285 电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司。

1.2 动物及瘤株

纯系清洁级昆明种小鼠 200 只, 雌雄各半, 体质量 18~22 g, 由南京中医药大学动物实验中心提供, 动物合格证号: 苏动质字第 200402 号。小鼠移

收稿日期: 2011-06-21

基金项目: 国家教育部博士点专项基金资助项目 (20113237110009); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目 (ysxk-2010); 江苏省中医药局科技项目 (LZ09001); 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室开放研究课题 (P09018); 2011 年江苏省普通高校研究生科研创新计划项目 (790)

作者简介: 陈勇 (1987—), 男, 博士, 研究方向为中药化学与分析。E-mail: achenyong@gmail.com

***通讯作者** 李祥 Tel: (025)85811512 E-mail: lixiang_8182@163.com

植性肿瘤 Heps 和 S₁₈₀ 瘤株由江苏省肿瘤医院药理实验中心提供。

2 方法

2.1 对肝癌 Heps 与 S₁₈₀ 荷瘤小鼠的抑瘤作用

将传代 7~8 d、生长旺盛且无溃破的肝癌 Heps 荷瘤小鼠，颈椎脱臼处死，置超净工作台，从腹腔抽出瘤液（乳白或乳黄色为佳）用氯化钠注射液按 1:4 配制成 1×10^8 /mL 的肿瘤细胞悬液。取昆明种小鼠 100 只，每只小鼠右前肢腋下接种 0.2 mL 肝癌 Heps 细胞悬液，次日将小鼠随机分成模型组、紫杉醇 (40 μ g/kg, 用豆油稀释) 阳性对照组、化合物 1~4 高剂量和低剂量 (60、15 μ g/kg, 均用豆油稀释) 组，每组 10 只。同法制备移植性肉瘤 S₁₈₀ 荷瘤小鼠模型。各给药组小鼠 ip 紫杉醇或化合物 1~4，每天 1 次，连续 7 d，模型组给予等量生理盐水。每天记录小鼠生存状态，停药后 24 h 处死小鼠，称体质量。剥取肿瘤、肝、脾和胸腺称质量，计算抑瘤率及肝、脾和胸腺指数。

抑瘤率 = $1 - \frac{\text{给药组平均瘤质量}}{\text{模型组平均瘤质量}}$

脏器指数 = $10 \times \frac{\text{器官质量}}{\text{体质量}}$

2.2 数据处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，并经 Excel 处理，用双侧 *t* 检验进行组间分析。

3 结果

3.1 对肝癌 Heps 荷瘤小鼠的影响

4 种双四氢呋喃型番荔枝内酯对移植性肝癌

Heps 荷瘤小鼠均显示了不同程度的肿瘤抑制作用，除化合物 4 高剂量组的小鼠死亡率高、化合物 1 和 2 低剂量对肝癌 Heps 抑制率较低外，其他给药组瘤质量与模型组比较具有统计学意义。化合物 3 高剂量的抑瘤率为 70.9%，化合物 4 低剂量的抑制率为 63.4%，表明其体内抗移植性肝癌 Heps 的作用优于紫杉醇（抑制率 62.2%）。化合物 1 高剂量的抑制率为 51.6%，也显示了较好的抗肿瘤作用。结果见表 1。与模型组比较，部分双四氢呋喃型番荔枝内酯对荷瘤小鼠脾、胸腺免疫器官具有保护作用；各化合物对荷瘤小鼠肝脏无明显保护作用或不良影响；而紫杉醇对荷瘤小鼠的脾、胸腺和肝脏均有不同程度的不良影响。结果见表 2。

3.2 对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠的影响

除化合物 4 高剂量组的小鼠死亡率外，4 种双四氢呋喃型番荔枝内酯对移植性肉瘤 S₁₈₀ 荷瘤小鼠显示了较强的抑瘤作用，其中化合物 1 高剂量组的抑瘤率为 51.1%，化合物 2 高、低剂量组的抑瘤率分别为 54.2%、52.7%，化合物 3 高剂量组的抑瘤率为 63.9%，化合物 4 低剂量组的抑瘤率为 65.8%，均显示了比紫杉醇（抑瘤率 48.9%）更强的体内抗移植性肉瘤 S₁₈₀ 的作用。结果见表 1。与模型组比较，部分双四氢呋喃型番荔枝内酯化合物对荷瘤小鼠的胸腺具有一定的保护作用，而所有化合物对荷瘤小鼠肝脏和脾脏均无明显的保护作用。结果见表 3。

表 1 化合物 1~4 对移植性肝癌 Heps 和 S₁₈₀ 荷瘤小鼠的抑瘤率 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Antitumor effects of compounds 1~4 against transplanted Heps tumor- and S₁₈₀ bearing mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (μ g·kg ⁻¹)	Heps			S ₁₈₀		
		动物 / 只	平均瘤质量 / g	抑瘤率 / %	动物 / 只	平均瘤质量 / g	抑瘤率 / %
模型	—	10	1.133 ± 0.46	—	10	0.752 ± 0.16	—
化合物 1	15	10	0.745 ± 0.16	34.2	10	0.547 ± 0.10	27.2
	60	10	0.547 ± 0.18**	51.6	10	0.368 ± 0.08	51.1
化合物 2	15	10	0.964 ± 0.19	14.9	10	0.355 ± 0.09	52.7
	60	10	0.789 ± 0.12*	31.2	10	0.344 ± 0.10	54.2
化合物 3	15	10	0.765 ± 0.18**	32.5	10	0.433 ± 0.12	42.3
	60	10	0.330 ± 0.22*	70.9	10	0.271 ± 0.08**	63.9
化合物 4	15	8	0.381 ± 0.18**	63.4	9	0.263 ± 0.06	65.8
	60	4	—	—	3	—	—
紫杉醇	40	10	0.428 ± 0.15**	62.2	10	0.384 ± 0.12**	48.9

与模型组比较：**P*<0.05 ***P*<0.01；下表同

P*<0.05 *P*<0.01 vs model group; same as below

表 2 化合物 1~4 对移植性肝癌 Heps 荷瘤小鼠肝脏、脾脏和胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of compounds 1—4 against liver, spleen, and thymus indexes of Heps-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	平均体质量 /g	脾质量 /g	脾指数	肝质量 /g	肝指数	胸腺质量 /g	胸腺指数
模型	—	24.7±3.02	1.17±0.06	0.069±0.018	1.31±0.03	0.534±0.096	0.044±0.004	0.017±0.007
化合物 1	15	22.1±3.95	0.13±0.06	0.018±0.009**	1.38±0.08	0.390±0.073*	0.075±0.008	0.006±0.010**
	60	21.5±3.28	0.11±0.08	0.057±0.015	1.22±0.01	0.624±0.103	0.032±0.006	0.033±0.004*
化合物 2	15	22.7±2.61	0.18±0.09	0.049±0.020	1.36±0.05	0.566±0.056	0.074±0.009	0.015±0.012
	60	25.3±3.95	0.18±0.04	0.078±0.012	1.48±0.07	0.598±0.073	0.039±0.003	0.033±0.008*
化合物 3	15	25.7±3.83	0.20±0.10	0.072±0.023	1.44±0.10	0.582±0.108	0.055±0.008	0.016±0.011
	60	23.2±3.28	0.24±0.12	0.077±0.013	1.38±0.12	0.560±0.076	0.026±0.006	0.021±0.010
化合物 4	15	23.1±2.18	0.10±0.08	0.051±0.021	1.30±0.15	0.594±0.039	0.030±0.008	0.011±0.003
紫杉醇	40	16.1±2.61	0.03±0.05	0.042±0.006	0.63±0.05	0.566±0.082	0.009±0.002	0.013±0.008

表 3 化合物 1~4 对肉瘤 S₁₈₀ 荷瘤小鼠肝脏、脾脏和胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of compounds 1—4 against liver, spleen, and thymus indexes of S₁₈₀-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	平均体质量 /g	脾质量 /g	脾指数	肝质量 /g	肝指数	胸腺质量 /g	胸腺指数
模型	—	23.1±2.25	0.199±0.08	0.086±0.009	1.48±0.06	0.641±0.086	0.050±0.007	0.022±0.008
化合物 1	15	23.7±2.09	0.210±0.06	0.115±0.005	1.63±0.05	0.662±0.040	0.056±0.009	0.018±0.009
	60	21.8±2.59	0.170±0.08	0.088±0.008	1.37±0.011	0.688±0.047	0.048±0.005	0.024±0.016
化合物 2	15	23.3±3.62	0.180±0.06	0.077±0.014	1.54±0.08	0.628±0.086	0.054±0.007	0.022±0.004
	60	17.9±3.58	0.080±0.09	0.077±0.008	0.92±0.09	0.661±0.043	0.027±0.005	0.023±0.008
化合物 3	15	22.1±2.93	0.190±0.10	0.044±0.100	1.38±0.08	0.514±0.033	0.054±0.004	0.015±0.012
	60	19.4±2.17	0.130±0.11	0.085±0.003	1.12±0.10	0.624±0.038	0.052±0.005	0.024±0.036
化合物 4	15	21.5±3.07	0.110±0.04	0.067±0.009	1.11±0.08	0.577±0.046	0.034±0.007	0.026±0.066
紫杉醇	40	22.5±2.55	0.206±0.09	0.051±0.030	1.49±0.04	0.516±0.024	0.041±0.002	0.016±0.021

4 讨论

番荔枝内酯的作用靶点为肿瘤细胞的线粒体,它通过降低线粒体内 cAMP 和 cGMP 的水平而诱导肿瘤细胞凋亡^[10]。有研究表明,番荔枝内酯可能作用于线粒体复合酶 I 的 ND1 及 ND2 亚单元^[11-12],而番荔枝内酯类化合物 desacetylurvaricin 可增加肝癌细胞 TLR4 和 p53 的表达,从而改进免疫识别和诱导肝癌细胞凋亡,这可能是其临床抑制肝癌细胞的作用机制之一^[13]。本实验结果表明,双四氢呋喃型番荔枝内酯对两种实体瘤显示了较强的抑制作用,其中对肝癌 Heps 的作用更强,并且各化合物高剂量的作用强于低剂量,存在较明显的量效关系。通过比较对两种实体瘤的抑瘤率发现,邻双四氢呋喃环番荔枝内酯化合物 3 和 4 的抗癌活性强于间位双四氢呋喃环番荔枝内酯化合物 1 和 2,虽然化合物 4 高剂量组的小鼠死亡率较高,但其在低剂量时

就已显示出很高的肿瘤抑制率,表明该化合物的抗癌活性非常强,具体作用、剂量有待进一步研究确定。部分双四氢呋喃型番荔枝内酯对荷瘤小鼠的脾和胸腺免疫器官具有保护作用,而紫杉醇对小鼠的脾、胸腺和肝脏均有不同程度的不良影响。体内实验结果与前期体外细胞实验结果一致^[14],但各化合物的最佳剂量、具体作用机制等有待深入研究。本研究结果提示双四氢呋喃型番荔枝内酯类化合物极有可能开发成为新型抗肿瘤药物。

参考文献

- [1] 顾关云, 蒋 昱. 番荔枝科植物细胞毒成分的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(4): 252-261.
- [2] Jolad S D, Hoffmann J J, Schram K H, et al. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae) [J]. *J Org Chem*, 1982, 47(16): 3135-3153.
- [3] Miyoshi H, Ohshima M, Shimada H, et al. Essential

- structural factors of annonaceous as potent inhibitors of mitochondrial complex I [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1998, 1365(3): 443-452.
- [4] He K, Zeng L, Ye Q, *et al.* Comparative SAR evaluation of annonaceous acetogenins for pesticidal activity [J]. *Pest Sci*, 1997, 49(4): 372-378.
- [5] Oberlies N H, Chang C, McLaughlin J L. Structure-activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells [J]. *J Med Chem*, 1997, 40(13): 2102-2106.
- [6] Alali F Q, Kaakeh W, Bennett G W, *et al.* Annonaceous are acetogenins as natural pesticides: Potent toxicity against insecticide susceptible and resistance German cockroach [J]. *J Econ Entomol*, 1998, 91(3): 641-649.
- [7] Landolt J L, Ahammadsahib K I, Hollingworth R M, *et al.* Determination of structure-activity relationships of Annonaceous acetogenins by inhibition of oxygen uptake in rat liver mitochondria [J]. *Chem Biol Interact*, 1995, 98(1): 1-13.
- [8] Degli E M, Ghelli A, Ratta M, *et al.* Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I) [J]. *Biochem J*, 1994, 301(1): 161-167.
- [9] Alfonso D, Johnson H A, Colman-Saizarbitoria T, *et al.* SARs of annonaceous acetogenins in rat liver mitochondria [J]. *Nat Toxins*, 1996, 4(1): 181-188.
- [10] Chiu H F, Chih T T, Hsian Y M, *et al.* Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65(5): 319-327.
- [11] Murai M, Ishihara A, Nishioka T, *et al.* The ND1 subunit constructs the inhibitor binding domain in bovine heart mitochondrial complex I [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(21): 6409-6416.
- [12] Nakamaru-Ogiso E, Han H, Matsuno-Yagi A, *et al.* The ND2 subunit is labeled by a photoaffinity analogue of asimicin, a potent complex I inhibitor [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(5): 883-888.
- [13] He H B, Wu X L, Yu B, *et al.* The effect of desacetyluvaricin on the expression of TLR4 and P53 protein in Hepg 2.2.15 [J]. *Hepat Mon*, 2011, 11(5): 364-367.
- [14] Yang H, Zhang N, Li X, *et al.* Structure-activity relationships of diverse annonaceous acetogenins against human tumor cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(8): 2199-2202.