

## 旱生香茶菜总二萜包合物对小鼠移植性肿瘤的抗肿瘤活性及其毒性研究

### Antitumor activities and toxicities of the total diterpenoids of *Isodon Xerophilus* inclusion complex on mouse transplanted tumor

杨焕芝<sup>1,2</sup>, 周轶平<sup>2</sup>, 翁稚颖<sup>2</sup>,  
罗敏<sup>2</sup>, 孙汉董<sup>3</sup>, 李玛琳<sup>4,2</sup>

(1. 昆明市第一人民医院 药学部, 昆明 650011; 2. 昆明医科大学 药学院 暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500; 3. 中国科学院 昆明植物研究所, 昆明 650204; 4. 云南中医学院, 昆明 650500)

YANG Huan-zhi<sup>1,2</sup>, ZHOU Yi-ping<sup>2</sup>,  
WENG Zhi-ying<sup>2</sup>, LUO Min<sup>2</sup>,  
SUN Han-dong<sup>3</sup>, LI Ma-lin<sup>4,2</sup>

(1. Department of Pharmacy, Kunming Municipal First People's Hospital, Kunming 650011, China; 2. Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, College of Pharmacy, Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 3. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; 4. Yunan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

收稿日期: 2016-05-09

修回日期: 2016-07-14

作者简介: 杨焕芝(1980-), 女, 硕士研究生, 主管药师, 主要从事临床药学研究

通信作者: 李玛琳 教授 博士生导师

MP: 15877992260

E-mail: limalinb@vip.163.com

**摘要:** 目的 研究旱生香茶菜总二萜包合物(IXD)对小鼠移植性肿瘤的抗肿瘤活性及其毒性。方法 急性毒性实验: ①ICR小鼠20只,雌雄各半,按体重随机分为5组(每组4只):正常对照组(蒸馏水),4个剂量(150,100,70,40 mg·kg<sup>-1</sup>) IXD包合物组,一次性腹腔注射,测定IXD包合物LD<sub>50</sub>。②ICR小鼠20只,雌雄各半,一次性灌胃IXD包合物500 mg·kg<sup>-1</sup>,测定IXD包合物最大耐受剂量(MTD)。③ICR小鼠18只,雌雄各半,按体重随机分为6组(每组3只):正常对照组(蒸馏水),5个剂量(普朗尼克,2.95,4.53,6.97,10.73,16.5 g·kg<sup>-1</sup>)辅料组,一次性经灌胃给药。这3种情况均连续给药7 d,观察小鼠的呼吸、胃肠、心血管、生殖、皮肤、毛发及行为等,记录小鼠的毒性反应和死亡情况。抗肿瘤活性实验:以ICR小鼠制备成S180肉瘤小鼠模型,按照体重随机分为7组(每组10只):低、中、高3个剂量(30,60,120 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) IXD包合物组、辅料对照组(普朗尼克3960 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、溶剂对照组(蒸馏水)、阳性对照组(环磷酰胺30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)和阴性对照组(生理盐水)经灌胃连续给药7 d后,测定肉瘤重量、体重及对主要脏器的影响。结果 小鼠经腹腔注射IXD的半数致死量(LD<sub>50</sub>)为113.14 mg·kg<sup>-1</sup>,经灌胃 MTD > 500 mg·kg<sup>-1</sup>。与溶剂对照组相比,3个剂量 MTD 组对荷 S180 肉瘤小鼠抑瘤率分别为 18.16%, 34.69%, 54.45%, 中、高 2 个剂量差异有统计学意义(均 P < 0.05); 中、高 2 个剂量 MTD 和辅料对照组小鼠肾指数分别减少 9.14%, 9.99%, 10.21%, 差异有统计学意义(均 P < 0.05); 但是对荷瘤小鼠体重、肝、脾、胸腺及心脏无明显影响。结论 MTD 毒性低,对 S180 肉瘤的生长有明显的抑制作用。

**关键词:** 旱生香茶菜总二萜包合物; 急性毒性; 小鼠移植性肿瘤; 抗肿瘤活性

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2016.19.015

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2016)19-1785-04

**Abstract: Objective** To study the antitumor activity and acute toxicity of the total diterpenoids of *Isodon Xerophilus*(IXD) inclusion complex on mouse transplanted tumor. **Methods** Acute toxicity experiment: ① Twenty ICR mice were half male and female respectively, according to the weight were randomly divided into 5 groups (4 mice in each group): normal control group (distilled water), four doses (150, 100, 70, 40 mg·kg<sup>-1</sup>) IXD inclusion complex group, IXD inclusion complex were intraperitoneal injection one-time to determine the LD<sub>50</sub>. ② Twenty ICR mice were half male and female respectively, 500 mg·kg<sup>-1</sup> IXD inclusion complex was intragastrically one-time administered to measure the maximum tolerated dose (MTD) in mouse. ③ Eighteen ICR mice were

half male and female respectively, according to the weight were randomly divided into 6 groups (3 mice in each group): normal control group (distilled water), five doses (2.95, 4.53, 6.97, 10.73, 16.5  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  Pluronic F68) ingredient control group was ig administered one-time to measure the toxicity of Pluronic F68 in mouse. The three conditions were all observed the respiratory, gastrointestinal, cardiovascular, reproductive, skin, hair and behavior and recorded the toxicity reaction of mice and death for continuous 7 days. Antitumor activity experiment: Take 70 ICR mice to prepare S180 tumor models and divided these into 7 groups (10 mice in each group): the low, medium and high dose groups of IXD inclusion complex (30, 60, 120  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), ingredient control group (3960  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  Pluronic F68), solvent control (distilled water group), positive control group (30  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  cyclophosphamide), negative control (saline group). IXD inclusion complex were ig administered to mice with transplanted sarcoma (S180) for consecutive 7 days and to observe their influence on tumor's weight, mouse's weight and main organs.

**Results** Through ip administration,  $\text{LD}_{50}$  in mouse for the complex was 113.14  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , the MTD > 500  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Compared with the solvent control group, the inhibitory rate of tumor for complex were 18.16%, 34.69%, 54.45% respectively at the low, median and high dose via ig administration, the difference was significantly in median and high dose IXD inclusion complex groups (all  $P < 0.05$ ). The kidney index in the complex group at the median and high dose and also in ingredient control group were decreased of 9.14%, 9.99%, 10.21% respectively, the difference was significantly (all  $P < 0.05$ ). And has no toxicity on mice's weight, liver, spleen, thymus, cardiac in tumor-bearing mice. **Conclusion** The complex is safe and can inhibit the growth of mouse transplanted sarcoma.

**Key words:** the total diterpenoids of *Isodon Xerophilus* inclusion complex; acute toxicity; mouse transplanted tumor; antitumor activity

旱生香茶菜是云南特有香茶菜属植物,植物中主要含有对映-贝壳杉烷型二萜化合物。旱生香茶菜总二萜(the total diterpenoids of *Isodon Xerophilus*, IXD)是总二萜混合物,对多种肿瘤细胞体内均有显著的抗肿瘤活性<sup>[1-2]</sup>。与同属植物冬凌草的有效成分冬凌草甲素抗肿瘤活性相当<sup>[3]</sup>。IXD成分复杂,室温下水溶性较差,不宜制成注射剂。本研究采用包合技术冷冻干燥法,以普朗尼克(Pluronic F68)作为助溶剂,将IXD制备成IXD包合物,提高其水溶性及生物利用度。Pluronic F68是一种大分子、非离子型表面活性剂,在水或乙醇中易溶,Pluronic F68水溶液在空气中较稳定,对酸碱水溶液和金属离子稳定,无毒性,对人体十分安全<sup>[4]</sup>。为此,本实验以荷S180肉瘤小鼠为模型,研究IXD包合物的抗肿瘤活性。

## 材料与方法

### 1 材料

**瘤株** 小鼠肉瘤细胞株 S180 (Sarcoma),由中国科学院上海药物研究所提供。

**动物** ICR小鼠,SPF级,雌雄各半,18~22 g,由昆明医学院实验动物中心提供。动物许可证号:SCXK(滇)2005-0008。

**药品与试剂** IXD,由中国科学院昆明植物所孙

汉董研究员提供;环磷酰胺(CTX),规格:每支0.2 g,批号:050603,江苏恒瑞医药股份有限公司生产。新生牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司生产;普朗尼克(Pluronic F68),德国BASF公司生产。

**仪器** AE240电子分析天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司。

### 2 实验方法

#### 2.1 药品制备<sup>[5]</sup>

IXD包合物,由上海交通大学药学院制备。IXD包合物由IXD-辅料普朗尼克按10:330(mg)构成。本研究中IXD包合物均用蒸馏水溶解。

#### 2.2 IXD包合物和辅料普朗尼克的急性毒性实验<sup>[6]</sup>

**IXD包合物经腹腔注射的急性毒性实验** ICR小鼠20只,雌雄各半,禁食12 h后,按体重随机分为5组:正常对照组(蒸馏水)4个剂量(150, 100, 70, 40  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) IXD包合物组,每组4只,一次性腹腔注射。连续7 d,观察小鼠的呼吸、胃肠、心血管、生殖、皮肤、毛发及行为等,记录小鼠的毒性反应情况和死亡情况;测定IXD包合物 $\text{LD}_{50}$ 。

**IXD包合物经灌胃的急性毒性实验** ICR小鼠20只,雌雄各半,禁食12 h后,称重。测定IXD包合物一次性灌胃500  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后小鼠的急性毒性。连续7 d,观察小鼠的呼吸、胃肠、心血管、生殖、皮肤、毛发及行为等,记录小鼠的毒性反应情况和死亡情况;测定IXD

包合物最大耐受剂量(maximum tolerated dose, MTD)。

辅料普朗尼克经灌胃的急性毒性实验 ICR 小鼠 18 只,雌雄各半,禁食 12 h 后,按体重随机分为 6 组:正常对照组(蒸馏水) 5 个剂量(普朗尼克 2.95, 4.53, 6.97, 10.73, 16.5 g · kg<sup>-1</sup>) 辅料组,每组 3 只,一次性经灌胃给药。连续 7 d,观察小鼠的呼吸、胃肠、心血管、生殖、皮肤、毛发及行为等,记录小鼠的毒性反应情况和死亡情况。

**2.3 IXD 包合物在 ICR 小鼠体内抗肿瘤活性的测定模型制备<sup>[7]</sup>** 参照文献方法进行。取 ICR 小鼠,无菌条件下腹腔接种浓度为 1 × 10<sup>7</sup>/mL 的 S180 细胞悬液,每只 0.3 mL。取第 3 代浓度为 1 × 10<sup>7</sup> 个活细胞/毫升的 S180 肉瘤细胞,每只 0.2 mL,迅速皮下接种于 ICR 小鼠(雌性)右前肢腋部皮下。

分组与给药 接种后 24 h,按体重随机分为 7 组:3 个剂量(30, 60, 120 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>) IXD 包合物组、辅料对照组(Pluronic F68, 3.96 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>)、溶剂对照组(蒸馏水组)、阳性对照组(环磷酰胺 30 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>) 和阴性对照组(生理盐水)。按 10 μL · g<sup>-1</sup> 体重灌胃给药,1 次/天,连续给药 7 d。

观察指标<sup>[8]</sup> 停药后观察 24 h,处死动物,剥离肿瘤组织、胸腺、脾、肝等脏器,并称量。肿瘤抑制率 = (阴性对照组重量 - 治疗组重量) / 阴性对照组重量 × 100%, 脏器指数 = 脏器重量(mg) / 平均体重(g)。

### 3 统计学处理

所有数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS11.5 统计软件处理,多组数据比较采用方差分析,显著性检验水准为 0.05。半数致死量(LD<sub>50</sub>)用改进的 Bliss 法进行计算。

## 结 果

### 1 IXD 包合物及其辅料 Pluronic F68 的急性毒性

#### 1.1 经腹腔注射 IXD 包合物小鼠的急性毒性

4 个剂量(150, 100, 70, 40 mg · kg<sup>-1</sup>) IXD 包合物组小鼠死亡率分别为 75%, 50%, 0, 0。经腹腔注射后,小鼠最早出现死亡时间为给药后 40 min,最晚出现死亡时间为给药后第 2 天。对死亡小鼠进行解剖,其皮肤黏膜、心、肺、肝、脾均未见肉眼可见病变,并无胃肠胀气。对照组生长状况良好。IXD 包合物经腹腔注射的 LD<sub>50</sub> 为 113.14 mg · kg<sup>-1</sup>。

#### 1.2 经灌胃给与 IXD 包合物小鼠的急性毒性

给药前 3 天,小鼠腹泻较重;第 4 天,小鼠腹泻症状开始减轻,五官未观察到异常分泌物,动物行为未见异常;第 7 天,未发现死亡。对照组小鼠生长状况良好。小鼠经灌胃给 IXD 包合物的 MTD > 500 mg · kg<sup>-1</sup>。

#### 1.3 经灌胃给与辅料 Pluronic F68 小鼠的急性毒性

辅料 Pluronic F68 经灌胃一次性给药后发现,第 1 天,小鼠轻微腹泻;第 2 天,腹泻减轻;第 3 天,腹泻进一步缓解;持续观察至第 7 天,小鼠未发现死亡。解剖小鼠发现,其皮肤、黏膜、心、肺、肝、脾未见肉眼可见病变,胃肠胀气稍严重。对照组生长状况良好。

### 2 IXD 包合物在小鼠体内的抗肿瘤活性

结果见表 1。与溶剂对照组比较,中、高 2 个剂量(60, 120 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>) IXD 包合物组抑瘤率分别为 34.69%, 54.45%, 组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );低剂量组的抑瘤率为 18.16%, 组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与阴性对照组相比,阳性对照组的瘤重明显减轻,抑瘤率达

表 1 旱生香茶菜总二萜(IXD)包合物经灌胃给药对荷 S180 肉瘤小鼠肿瘤生长的影响( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 1** Effects of the total diterpenoids of *Isodon Xerophilus*(IXD) inclusion complex on the tumor inhibitory rates in mice bearing S180 tumor( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Dosage (mg · kg <sup>-1</sup> )	Initial body weight(g)	Final weight (g)	Tumor weight (g)	Antitumor rate(%)
Negative control		21.04 ± 1.51	21.97 ± 1.38	1.05 ± 0.41	
Positive control	30	21.03 ± 1.10	20.33 ± 1.52 <sup>▲</sup>	0.34 ± 0.12 <sup>*</sup>	67.62
Solvent control		20.64 ± 1.12	21.72 ± 2.01	1.12 ± 0.57	
Ingredient control	3960	21.36 ± 1.54	21.92 ± 1.38	1.20 ± 0.50	-9.22
IXD inclusion complex					
Low	30	20.94 ± 1.04	20.06 ± 2.80	0.92 ± 0.23 <sup>▲</sup>	18.16
Median	60	21.15 ± 1.26	22.21 ± 2.09	0.73 ± 0.15 <sup>*▲&amp;</sup>	34.69
High	120	21.25 ± 1.23	22.64 ± 1.62	0.51 ± 0.16 <sup>**&amp;</sup>	54.45

Each group had ten mouse; Ingredient control: Pluronic F68; Negative control: Saline group; Positive control: Cyclophosphamide group; Solvent control: Distilled water group; Compared with solvent control group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; Positive group compared with negative control group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the positive control group, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the ingredient group, <sup>&</sup> $P < 0.05$

表2 IXD包合物对荷S180肉瘤小鼠脏器指数的影响( $\bar{x} \pm s$ )Table 2 Effect of IXD inclusion complex on the organ index in mice bearing S180 tumor( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Dosage (mg · kg <sup>-1</sup> )	Thymus index (mg · g <sup>-1</sup> )	Spleen index (mg · g <sup>-1</sup> )	Liver index (mg · g <sup>-1</sup> )	Cardiac index (mg · g <sup>-1</sup> )	Kidney Index (mg · g <sup>-1</sup> )
Negative control		2.03 ± 0.83	7.11 ± 2.85	58.87 ± 6.83	4.52 ± 0.4	12.01 ± 1.28
Positive control	30	1.31 ± 0.50*	3.56 ± 1.18*	46.14 ± 6.49*	4.42 ± 0.55	11.88 ± 1.13
Solvent control		2.51 ± 1.09	5.58 ± 1.50	56.82 ± 6.15	4.45 ± 0.75	12.13 ± 0.79
Ingredient control	3960	2.49 ± 1.00	6.23 ± 1.81	57.97 ± 5.43	4.32 ± 0.88	10.89 ± 0.58* <sup>▲</sup>
IXD inclusion complex						
Low dosage	30	1.92 ± 0.54	5.21 ± 1.49	52.22 ± 4.44	5.11 ± 1.60	11.21 ± 0.99
Median dosage	60	2.86 ± 0.81	6.72 ± 1.21	57.39 ± 4.70	3.97 ± 1.15	11.02 ± 1.55* <sup>▲</sup>
High dose	120	2.12 ± 0.54	7.09 ± 1.72	47.74 ± 5.32	4.60 ± 1.05	10.92 ± 0.94* <sup>▲</sup>

Each group had ten mouse; Compared with solvent control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; Positive control group compared with negative control group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with the positive control group, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the ingredient control group, <sup>△</sup> $P < 0.05$

67.62% 组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。辅料对照组与溶剂对照组相比,瘤重比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与辅料对照组相比,中、高2个剂量IXD包合物组抑瘤作用,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。低、中2个剂量IXD包合物组抑瘤作用均低于CTX组,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与阴性对照组相比,阳性对照组小鼠体重略减轻,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与溶剂对照组相比,3个剂量IXD包合物组小鼠体重差异,组间比较无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3 IXD包合物对荷瘤小鼠各脏器的影响

与阴性对照组比较,阳性对照组小鼠的胸腺、脾、肝指数均降低,抑制率分别为35.47%,49.93%,21.63%,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与溶剂对照组相比,3个剂量IXD包合物组、辅料对照组的小鼠胸腺、脾、肝、心脏指数均无明显的改变,组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与溶剂对照组、阳性对照组相比,中、高2个剂量IXD包合物组和辅料对照组小鼠肾指数均有一定程度改变,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表2。

## 讨 论

前文<sup>[2]</sup>研究显示,IXD经灌胃给药的LD<sub>50</sub>为1.98 g · kg<sup>-1</sup>。3个剂量(50,100,200 mg · kg<sup>-1</sup>)IXD经灌胃给药,对小鼠移植性肝癌的抑制率分别为18.97%,33.52%,38.19%。根据我国抗肿瘤药物体内筛选标准操作规程,体内试验抑瘤率大于40%且有统计学差异,说明药物有抗肿瘤作用。与溶剂对照组相比,高剂量IXD包合物组抑瘤率为54.45%,说明IXD包合物具有较强的抗肿瘤活性,高剂量IXD包合物组与CTX组抗肿瘤活性相当。

在本研究中,3个剂量(30,60,120 mg · kg<sup>-1</sup>)

IXD包合物经灌胃给药,对小鼠移植性肉瘤S180的抑制率分别为18.16%,34.69%,54.45%。可见IXD在同等剂量下,对小鼠移植性肉瘤S180的抑瘤作用略大于小鼠移植性肝癌,反映出用Pluronic F68作为助溶剂制备的IXD包合物,因溶解度的增加并未引起其抗肿瘤活性下降。IXD包合物组、辅料对照组对小鼠胸腺、脾、肝、心脏均未显示毒性,说明IXD包合物是一种较安全的剂型。

本研究显示,IXD包合物抑瘤作用的有效剂量大于60 mg · kg<sup>-1</sup>。根据人与动物的用药剂量换算方法<sup>[6]</sup>,可计算出成人用IXD剂量大于460 mg。按照Pluronic F68与IXD形成的包合物比例为33:1,Pluronic F68的剂量应达到15 g左右,不适合临床口服给药。因此有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] LI L M, PU J X, XIAO W L, et al. Ent - Abietane diterpenoids from isodon xerophilus [J]. *Arch Pharm Res* 2011 34(6): 875 - 879.
- [2] 田庆锴,李玛琳,孙汉董. 旱生香茶菜总二萜体对人肝癌细胞株增殖、荷人肝癌细胞株裸鼠皮下移植瘤生长的影响[J]. *中国药房*, 2006, 17(15): 1134 - 1136.
- [3] LIU H, QIAN C, SHEN Z. Anti - tumor activity of oridonin on SNU - 5 subcutaneous xenograft model via regulation of c - Met pathway [J]. *Tumour Biol* 2014 35(9): 9139 - 9146.
- [4] BUENO C Z, DIAS A M, SOUSA H J, et al. Control of the properties of porous chitosan - alginate membranes through the addition of different proportions of Pluronic F68 [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 44(11): 117 - 125.
- [5] 黄莹玺,李瓶娉,银杉杉. 枸橼酸他莫昔芬 - 羟丙基 - β - 环糊精包合物的制备与表征[J]. *华西药理学杂志* 2014 29(5): 503 - 506.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社 2002: 202 - 228.
- [7] 林瑶,李津,覃永长,等. 薏苡叶的体内抗肿瘤S180实验研究[J]. *中国医院药学杂志* 2015 35(15): 1357 - 1359.
- [8] 李远辉,郭圣奇,黄挺章,等. 薏苡叶提取物对H22荷瘤小鼠的体内抗肿瘤作用[J]. *中国临床药理学杂志* 2015 31(18): 1863 - 1864.

( 本文编辑 权菊香)