

旱生香茶菜总二萜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

田庆镔^{1*}, 李玛琳², 孙汉董³(1. 湖南湘潭市中心医院临床药理学室, 湘潭市 411100; 2. 云南省天然药物药理重点实验室, 昆明市 650031; 3. 中国科学院昆明植物研究所, 昆明市 650204)

中图分类号 R285.5; R979.1

文献标识码 A

文章编号 1001-0408(2006)15-1134-03

摘要 目的:研究旱生香茶菜总二萜(IXD)对人肝癌细胞株(CA)增殖、荷 CA 裸鼠皮下移植瘤生长的影响。方法:体外试验采用磺酰罗丹明 B(SRB)法测试 IXD 对 CA 的 IC₅₀ 值,体内试验测定 IXD 不同剂量对荷 CA 裸鼠移植瘤增殖的抑制率。结果:IXD 对 CA 的 IC₅₀ 值为 6.17 μ g/ml,其在剂量为 100、200(mg·kg)/d 应用 12d 时抑制率分别为 33.52%、38.19%,与生理盐水阴性对照组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。结论:IXD 对 CA 有较强的细胞毒活性,对荷 CA 裸鼠移植瘤生长具有一定的抑制作用。

关键词 旱生香茶菜总二萜;人肝癌细胞;磺酰罗丹明 B 法;细胞增殖;裸鼠

Effects of Diterpenoids of Isodon Xerophilus on Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line and Growth of Human Hepatocellular Carcinoma Subcutaneous Transplantation Tumor in Nude Mice
TIAN Qing'e (Dept. of Clinical Pharmacy, Hu'nian Xiangtan Municipal Central Hospital, Xiangtan, 411100, China)

LI Malin (Yunnan Provincial Key Pharmacological Laboratory of Natural Medicine, Kunming 650031, China)

SUN Handong (Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Diterpenoids of Isodon Xerophilus(IXD) on cell proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line (CA) and growth of human hepatocellular carcinoma subcutaneous transplantation tumor in nude mice. METHODS: IC₅₀ of IXD in CA was determined by sulfonyl rhodamine B (SRB) assay in vitro, the inhibition ratios of different dosage of IXD on the proliferation of human xenograft hepatocellular carcinoma in nude mice were detected in vivo. RESULTS: The IC₅₀ of IXD in CA was 6.17 μ g/ml, administered at the dosage of 100 and 200(mg·kg)/d for 12 days, the inhibition ratios were 33.52% and 38.19%, respectively, significant differences were noted as compared with the negative control group($P < 0.05$). CONCLUSIONS: IXD has strong cytotoxicity in CA and some inhibitory action on the growth of xenograft hepatocellular carcinoma in nude mice.

KEY WORDS Diterpenoids of Isodon Xerophilus; Human hepatoma carcinoma cell; Sulfonyl rhodamine-B assay; Cell proliferation; Nude mouse

共同损伤机制。据此,笔者采用原代培养大鼠肝细胞的方法,建立了 CCl₄ 诱导肝细胞损伤模型。

CCl₄ 可经肝细胞的细胞色素 P₄₅₀Fe²⁺ 作用产生 O₂·⁻, 并通过自由基反应扩展程序产生 CCl₃· 和 CCl₃OO· 等自由基。O·⁻ 可经超氧化物歧化酶(SOD)转化为 H₂O₂, 后者又经 Fe³⁺ 促发 Fenton 反应生成羟自由基(OH·); OH· 等自由基可致 DNA 键断裂,并与细胞的重要成分发生反应,亦可攻击膜磷脂中的多不饱和脂肪酸,引发膜脂质过氧化链式反应。双链脂肪酸过氧化(聚合)可导致 MDA 形成增多,肝细胞膜通透性增加,使 ALT 与 AST 释放增加;同时 CCl₄ 可促进 GSH 等抗氧化物消耗增多而水平下降,清除自由基功能也下降,损伤进一步加重,并导致肝细胞死亡。据此,本研究选择培养上清液中 ALT 与 AST,肝细胞 MDA、GSH 含量和细胞活性作为评价肝细胞损伤的指标。

本研究显示,CCl₄ 导致肝细胞培养上清液中的 AST、ALT 活性和肝细胞内的 MDA 含量均明显升高,同时明显降低肝细胞内的 GSH 水平,并抑制肝细胞活性;在 CCl₄ 损伤的肝细胞中加入 LYS 后,细胞培养上清液中的 AST、ALT 活性和肝细

胞内的 MDA 含量明显降低,肝细胞内的 GSH 含量和细胞活性则明显的恢复和提高,且这种作用呈剂量依赖性。提示 LYS 对 CCl₄ 诱导的化学性肝细胞损伤具有明显的保护作用,其机制可能是通过清除氧自由基、抑制脂质过氧化、减少脂质过氧化产物生成,从而保护肝细胞膜和线粒体膜的完整性,使肝细胞免受 CCl₄ 产生的自由基引起的肝细胞损害。

尽管 LYS 对 CCl₄ 诱导的化学性肝细胞损伤具有明显的保护作用,但由于大多数肝炎为免疫介导的肝细胞损伤,而 LYS 是否对免疫介导的肝细胞损伤具有保护作用尚不清楚,因此 LYS 能否用于治疗肝炎还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 蒋伟哲,孔晓龙,段小群,等. 龙眼参对机体氧自由基清除作用的研究[J]. 中国药房,2001,12(8):453.
- [2] 蒋伟哲,孔晓龙,黄仁彬,等. 龙眼参对小鼠化学性肝损伤的保护作用及机制的研究[J]. 中国药房,2004,15(7):398.
- [3] 姜金兰,吕文富,胡春光,等. 大鼠肝细胞的分离及原代长期培养[J]. 白求恩医科大学学报,2000,26(6):562.
- [4] 杨雁,陈敏珠. 体外大鼠肝细胞坏死性损伤模型的建立[J]. 安徽医科大学学报,1999,34(6):467.

(收稿日期:2005-11-08 修回日期:2006-01-23)

* 硕士,主管药师。研究方向:临床合理用药和抗肿瘤药理。电话:0732-8214813。E-mail: tianqingne@163.com

二萜类化合物生物活性多样,具有较强的抗微生物、抗肿瘤、抗氧化和清除自由基等作用,在众多天然产物中,二萜类化合物被认为是最有希望找到抗癌新药的5大类化合物(二萜、木脂体、苦木素、柄型化合物和生物碱)之一,其中对映-贝壳杉烷型二萜类化合物又是二萜类化合物中常见物质,而旱生香茶菜总二萜(IXD)主要含有对映-贝壳杉烷型二萜类化合物^[1]。为证实其是否具有抗肿瘤作用,笔者按照抗肿瘤药物评价的指导原则要求,对 IXD 进行体内、外抗肿瘤活性研究。

1 材料

1.1 细胞株与动物

人肝癌细胞株(CA);Balb/c、nu/nu 裸鼠,SPF 级,鼠龄 6wk~8wk,体重 18g~20g,♂,合格证号:沪动合证字 157 号,均购自中国科学院上海药物所。

1.2 试剂及仪器

IXD (中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室孙汉董院士提供);顺铂注射液(云南个旧生物药业有限公司,批号:030601);二甲基亚砜(DMSO,美国 Merck 公司,批号:971025);磺酰罗丹明 B (SRB,美国 Sigma 公司,批号:101K3645);氟尿嘧啶片(上海九福药业,批号:020911);RPMI1640(美国 Gibco 公司,批号:31800-014);特级无支原体新生牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所,批号:20020114)。

CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司);CK-2 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);BL340 型酶标板自动读数仪(美国 Biotek 公司)。

2 方法

2.1 体外试验

采用 SRB 法^[2]。IXD 及顺铂试剂的配制、CA 的培养、SRB 法试验步骤、CA 存活率和 IXD 对 CA 增殖抑制率结果处理均参照文献^[2]进行。

2.2 体内实验

2.2.1 荷 CA 裸鼠皮下移植瘤模型的建立。CA 细胞培养方法见文献^[2],细胞密度调整为 2×10^7 个/ml。将 CA 细胞悬液 0.2ml 接种于 1 只裸鼠右侧腋窝皮下,于肿瘤组织长出后 7d 无菌条件下取出瘤块,置于 RPMI1640 培养基中,剪成面积约为 1mm³ 大小的组织块,组织匀浆器磨碎,过 200 目尼龙网,制成密度为 2×10^7 个/ml 细胞悬液,用 1ml 注射器将细胞悬液行初代移植于 2 只裸鼠右腋窝皮下,每只 0.2ml。初代移植瘤长出后 7d,按初代移植的方法行第 2 代移植,传代于 3 只裸鼠。第 2 代移植瘤长出后 14d 时,按初代移植方法行第 3 代移植,接种 30 只裸鼠。

2.2.2 剂量设计及给药方案。裸鼠对药物毒性的敏感性与普通小鼠相似^[3],本实验的剂量设计经灌胃给予 IXD 的小鼠急性毒性实验得到的 LD₅₀ 1.98g/kg 予以确定。设立 IXD 低(50mg/kg,约 1/40 LD₅₀)、中(100mg/kg,约 1/20 LD₅₀)、高(200mg/kg,约 1/10 LD₅₀)3 个剂量组,5-氟尿嘧啶(5-Fu, 50mg/kg)为阳性对照,0.5%羧甲基纤维素钠为溶剂对照,0.9%生理盐水(NS)为阴性对照。接种后 16d,待其肿瘤面积长至 100mm³~300mm³ 时,称量各裸鼠体重,按瘤体大小随机

分为 6 组,每组 5 只。每天上午 10:00 时,均按 0.2ml/10g 剂量连续灌胃给药 12d。停药后,观察 2d,脱颈处死动物。

2.2.3 检测指标与方法。(1)对移植 CA 后细胞生长的影响^[4]:给药期间每次给药后,用游标卡尺测量瘤体最大长径(a)、横径(b),计算各组平均肿瘤体积、绘制生长曲线。停药 2d 后,处死动物,剥离肿瘤称湿重,计算各组裸鼠平均瘤重(W)及抑瘤率(IR)。

$$\text{肿瘤体积}(V) = (1/2) a^2 b$$

$$\text{IR}(\%) = [(\text{阴性对照组平均瘤重} - \text{治疗组平均瘤重}) / \text{阴性对照组平均瘤重}] \times 100\%$$

(2)瘤组织形态学观察:将瘤组织标本置于 pH 为 7.0 的 10% 中性缓冲福尔马林液中固定 24h~48h,流水冲洗过夜,冰冻切片,HE 染色,光学显微镜下观察。

2.3 统计学方法

体外试验数据采用 GWBASIC 软件计算 IXD 对 CA 细胞增殖的 IC₅₀ 和相关系数(r)。体内实验数据用 SPSS10.0 统计软件包进行方差分析和 q 检验比较各组结果,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

3 结果

3.1 体外试验

SRB 法检测 IXD 浓度在 10~1 000μg/ml 时对 CA 增殖的抑制率均大于 50%,IC₅₀ 值为 6.17μg/ml, $r = 0.88$ 。

3.2 体内实验

3.2.1 荷 CA 裸鼠皮下移植瘤模型建立。第 3 代移植 7d 后,6 组裸鼠均于接种部位出现微小隆起,缓慢生长,体积逐渐增大并在皮下形成瘤结。于接种后 16d (即开始给药前)测量瘤体的面积,范围为 122.5mm³~300mm³,IXD 低剂量组(195.5±41.70)mm³,IXD 中剂量组(185.2±43.89)mm³,IXD 高剂量组(186.63±76.67)mm³,阳性对照组(190.75±24.77)mm³,溶剂对照组(198.60±17.33)mm³,阴性对照组(203.35±69.86)mm³,成瘤率 100%。

3.2.2 IXD 对荷 CA 裸鼠移植瘤生长的影响。对荷 CA 裸鼠处死前与给药前瘤体体积差值进行统计处理,结果详见表 1。

表 1 各组瘤体体积差值比较

Tab 1 Comparison on the tumor volume among groups

组别	动物数(n)		处死前与给药前瘤体体积差值(mm ³)
	开始	结束	
阴性对照组	5	5	145.12±86.10
溶剂对照组	5	5	142.21±37.24
IXD低剂量组	5	5	104.62±19.08*
IXD中剂量组	5	5	95.34±29.76*
IXD高剂量组	5	5	72.58±29.66*
阳性对照组	5	5	37.73±18.09*

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

vs. negative control group: * $P < 0.05$

由表 1 可知,IXD 低、中、高剂量组裸鼠处死前与给药前瘤体体积差值呈剂量依赖性,体积差值随剂量的增加而减小。统计显示,与阴性对照组比较,IXD 各剂量组瘤体体积差值具有显著性差异($P < 0.05$)。

3.2.3 移植瘤生长曲线。每天于给药前测量瘤体大小,取瘤体体积对数值绘制肿瘤生长曲线,结果详见图 1。

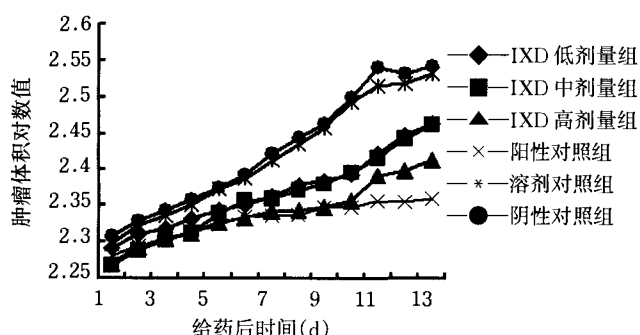


图1 各组荷移植瘤生长曲线比较

Fig 1 Comparison on growth curve of human hepatocellular carcinoma among groups

由图1可看出,与阴性对照组比较,IXD各组及阳性对照组裸鼠移植瘤体积增长较为平缓。

3.2.4 抑瘤率。脱颈处死裸鼠后,剥离肿瘤组织,计算抑瘤率,结果详见表2。

表2 各组抑瘤率比较

Tab 2 Comparison on tumor - inhibition ratios among groups

组别	动物数(n)		实验前、后 体重差(g)	瘤重 (mg)	抑瘤率 (%)
	开始	结束			
阴性对照组	5	5	3.04 ± 0.33	660 ± 220	
溶剂对照组	5	5	2.01 ± 0.45	640 ± 140	1.68
IXD低剂量组	5	5	-2.69 ± 1.19	530 ± 110	18.97
IXD中剂量组	5	5	-4.93 ± 1.47	440 ± 60*	33.52*
IXD高剂量组	5	5	-5.89 ± 1.79	410 ± 70*	38.19*
阳性对照组	5	5	0.99 ± 0.61	370 ± 50*	42.99*

与阴性、溶剂对照组比较: * $P < 0.05$

vs. negative control and solvent control group: * $P < 0.05$

由表2可知,IXD中、高剂量组及阳性对照组抑瘤率与溶剂对照组比较,具有显著性差异($P < 0.05$)。

3.2.5 肿瘤形态学观察。各组无明显差异。

3.2.6 主要脏器病理学检查。对裸鼠的肝脏、心脏、脾脏、肾脏、肺脏、脑、肾上腺等组织进行病理检查(HE × 200),均未见明显异常。

4 讨论

IXD体外抗肿瘤活性测定:植物提取物体外抗肿瘤活性标准为对肿瘤细胞增殖的 $IC_{50} < 30.00 \mu g/ml$ [5],笔者在本试验中得到IXD对CA细胞增殖的 IC_{50} 值为 $6.17 (< 30.00 \mu g/ml)$, $r = 0.88$,说明IXD对CA细胞有很强的细胞毒活性,并且其浓度与抑制率密切相关。

IXD体内抗肿瘤活性研究:(1)荷CA裸鼠皮下移植瘤模型的成功建立。在实验中,裸鼠体内CA3次传代移植成功率均为100%,阴性对照组移植瘤无自行消退现象,说明皮下移植瘤裸鼠模型的建立是成功的。根据指导原则的要求[5],如果体

内肿瘤模型阴性对照组20%肿瘤重量小于400mg,表明肿瘤生长不良,实验失败。本次实验阴性对照组平均瘤重为660mg,且每个瘤重均大于400mg,阳性对照组平均瘤重为370mg,抑瘤率达到42.99%,对肿瘤的生长具有较明显的抑制作用,进一步证实本实验模型可靠。(2)IXD对移植瘤生长的影响:对荷CA裸鼠经灌胃给予IXD,测量瘤体,统计显示,与阴性对照组相比,IXD低、中、高剂量组具有统计学差异($P < 0.05$)。从裸鼠瘤体体积角度看,IXD各剂量组均能明显抑制肿瘤的生长,其效果与阳性对照相当。比较肿瘤生长曲线,结果与阴性对照组比较,IXD各组裸鼠移植瘤体积增长较为平缓。抗肿瘤药物研究要求[5]受试药物的抑瘤率 $> 30\%$,药物方被视为有效。本研究中,IXD在剂量为 $50.00 mg/kg$ 时的抑瘤率为18.97%,与阴性对照组比较无显著性差异($P > 0.05$);IXD在剂量为100.00、200.00 mg/kg 时,抑瘤率分别为33.52%、38.19%,与阴性对照组比较,具有显著性差异($P < 0.05$),且抑制作用呈剂量依赖性。可见,IXD中、高剂量组对裸鼠CA移植瘤的生长具有较强的抑制作用。裸鼠瘤体体积统计显示,IXD低、中、高剂量均能明显抑制肿瘤的生长,而称取瘤重湿,对抑瘤率的统计表明,只有中、高剂量才有抑制肿瘤生长作用。2种结果在低剂量组表现不一致,应以称取瘤重计算抑瘤率更客观、准确。因瘤体体积的测量既有仪器导致的误差又有人为因素的影响,而用电子天平称取瘤重,抑瘤率主要只受前者的影响。

可见,在本试验中,IXD在体外对CA细胞增殖具有很强的抑制作用;在剂量 $100 \sim 200 (mg \cdot kg)/d \times 12d$ 范围内,经灌胃给药对荷CA裸鼠皮下移植瘤生长也具有明显的抑制作用。

(本研究在云南省天然药物药理重点实验室肿瘤药理室完成)

参考文献

- [1] 孙汉董,许云龙,姜北. 香茶菜属植物二萜化合物[M]. 北京:科学出版社,2001:93~105.
- [2] 田庆镔,李玛琳,孙汉董. 早生香茶菜总二萜体外对10株人源性肿瘤细胞增殖的影响[C]. 湖南省药学会医院药专业委员会2005年学术年会论文集,2005,9:127.
- [3] 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,2002:1784~1789.
- [4] Wu YZ, Ren QL, Li SL. The effect of liposome-c-erbB-2 anti-sense oligodeoxynucleotides on the human ovarian carcinoma transplanted subcutaneously in nude mice[J]. The Practical Journal of Cancer, 2003, 18:6.
- [5] 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:137~139.

(收稿日期:2005-10-20 修回日期:2006-02-05)

《中国药房》杂志——全国中文核心期刊,欢迎投稿、订阅