

# 旱生香茶菜素 G 对 S180 细胞抗肿瘤活性\*

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>2,4</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. 云南中医学院中药学院, 昆明 650500)

**摘要** **目的** 研究旱生香茶菜素 G 对 S180 细胞体内外抗肿瘤活性及其作用机制。**方法** 采用改良噻唑蓝 (MTT) 法测定旱生香茶菜素 G 对 S180 细胞株增殖的影响; 以荷 S180 肉瘤小鼠为模型, 检测旱生香茶菜素 G 对荷瘤小鼠肉瘤质量、体质量及其主要脏器的影响; 通过流式细胞术检测旱生香茶菜素 G 对 S180 细胞株和 S180 肉瘤组织细胞周期的影响; 采用脾脏淋巴细胞转化实验法测定旱生香茶菜素 G 对荷瘤小鼠脾脏淋巴细胞增殖活性; 采用酶联免疫吸附试验双抗夹心法检测旱生香茶菜素 G 对荷瘤小鼠血清中白细胞介素 (IL)-2 含量的影响。**结果** 旱生香茶菜素 G 对 S180 细胞株半数抑制浓度 ( $IC_{50}$  值) 为  $19.80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。小鼠经腹腔注射旱生香茶菜素 G 的  $LD_{50}$  为  $121.11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。在剂量为  $3, 6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 对荷 S180 肉瘤小鼠抑瘤率分别为 32.11%, 41.60%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 小鼠胸腺、肾脏和心脏指数均有一定程度的降低。旱生香茶菜素 G 使 S180 细胞株和 S180 肉瘤组织细胞  $G_0/G_1$  期所占比例增多, 对荷瘤小鼠脾脏 T、B 淋巴细胞具有一定的增殖促进作用 ( $P < 0.05$ )。小、中剂量组血清中 IL-2 含量分别较对照组减少约 90.9% 和 77.1% ( $P < 0.05$ )。**结论** 旱生香茶菜素 G 具有一定的抗肿瘤活性, 抑瘤作用可能是通过对肿瘤细胞  $G_0/G_1$  期阻滞, 及其促进荷瘤小鼠脾脏 T、B 淋巴细胞增殖, 增强机体免疫功能有关, 而与 IL-2 的表达关系不密切。

**关键词** 旱生香茶菜; 旱生香茶菜素 G; S180; 细胞周期; 免疫增强

**中图分类号** R285.5; R73

**文献标识码** A

**文章编号** 1004-0781(2017)04-0379-06

**DOI** 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.04.006

## Antitumor Activity of Xerophilusin G on S180 Cells

YANG Huanzhi<sup>1,2</sup>, ZHOU Yiping<sup>2</sup>, WENG Zhiying<sup>2</sup>, LUO Min<sup>2</sup>, SUN Handong<sup>3</sup>, LI Malin<sup>2,4</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. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

**ABSTRACT** **Objective** To study the antitumor activity of Xerophilusin G on S180 cells, and its mechanism. **Methods** Modified MTT assay was used to test the effect of Xerophilusin G on the proliferation of S180 tumor cell strain. The influences on tumor growth and immune organs of mice with transplanted sarcoma (S180) were observed. The cell cycle of S180 cell lines and mouse sarcoma (S180) was analyzed by flow cytometry. The lymphocyte proliferation activity of spleen stimulating was tested. The level of IL-2 in serum of mice with transplanted sarcoma (S180) was measured by ELISA. **Results** The  $IC_{50}$  of Xerophilusin G in S180 cell lines was  $19.80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the  $LD_{50}$  in mouse for Xerophilusin G was  $121.11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  through intraperitoneal injection. The tumor inhibition rate of Xerophilusin G was 32.11% and 41.60%, respectively at the doses of 3 and  $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ). Compared with the control, the thymus, kidney and cardiac index were decreased. The cell proportion at  $G_0/G_1$  phase of mouse sarcoma (S180) was increased. T and B cell proliferation activities in tumor-bearing mice were enhanced ( $P < 0.05$ ). As compared with control group, the serum level of IL-2 was decreased 90.9% and 77.1% in low- and medium-dose groups, respectively ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Xerophilusin G has remarkable effects in sarcoma (S180) bearing mice. The antitumor mechanism of Xerophilusin G might be related with  $G_0/G_1$  phase arrest of mouse sarcoma (S180) cells and enhancing the activity of T and B cell but not related with increasing the secreting of IL-2.

**KEY WORDS** Isodon xerophilus; Xerophilusin G; S180; Cell cycle; Immunity enhancement

旱生香茶菜是云南特有的香茶菜物种, 药用其枝叶, 其味苦, 性寒, 具有清热解毒、活血化瘀、抗菌消炎以及抗肿瘤等功效<sup>[1]</sup>。该植物中富含对映-贝壳杉烷型二萜化合物, 其中旱生香茶菜素 G (Xerophilusin G) 含量最多, 约占总二萜的 2.5%。本课题组前期研究旱生香茶菜总二萜 (the total diterpenoids of Isodon

Xerophilus, IXD) 对人肿瘤细胞株 K562、CA、CNE、BGC-823、MKN-28、A549、T-24 等体外细胞毒活性, 发现它能明显抑制肿瘤细胞增殖, 且抗癌谱较广<sup>[2]</sup>; IXD 对人肝癌细胞株 CA 体外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<sup>[3]</sup>。为从旱生香茶菜总二萜中发现新的抗肿瘤先导化合物, 笔者以荷

S180 肉瘤小鼠为模型拟通过对早生香茶菜素 G 抗肿瘤活性及其机制进行研究。

## 1 材料与方法

**1.1 瘤株与实验动物** 小鼠肉瘤细胞株 S180, 引自中国科学院上海药物研究所; 美国癌症研究所 (Institute of Cancer Research, ICR) 小鼠, 无特定病原体 (SPF) 级, 雌雄各半, 体质量 18 ~ 22 g, 由昆明医学院实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (滇) 2005-0008。

**1.2 样品** 二萜化合物早生香茶菜素 G 由中国科学院昆明植物研究所孙汉董研究员提供, 从早生香茶菜中提取并分离纯化得到, 为白色粉末, 室温下水溶性较差, 醇溶性较好。结构式见图 1。

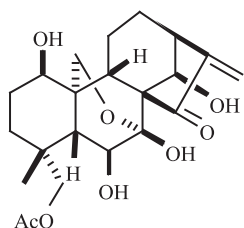


图 1 早生香茶菜素 G 结构式

Fig. 1 Molecular formula for *Xerophilusin G*

**1.3 药品与试剂** 顺铂 (云南个旧生物药业有限公司, 规格: 每支 10 mg, 批号: 051001); 环磷酰胺 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 规格: 每支 0.2 g, 批号: H32020857); 噻唑蓝 (MTT, AMRESCO 公司, 批号: 0174B32); 0.9% 氯化钠溶液 (昆明南疆制药有限公司, 批号: 200503156); 新生牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号: 051203); 二甲亚砜 (DMSO, Sigma 公司, 批号: DB19372DB); 1,2-丙二醇 (成都科龙化工试剂厂, 批号: 20060522); 小鼠白细胞介素-2 (IL-2)、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (美国 RD 公司, 编号: EIA05839)。

**1.4 仪器** METTLERAE240 型电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); 680 型酶标仪 (BIO-

RAD 公司); YJ-1450 型医用净化工作台 (苏州安泰空气技术有限公司)。

**1.5 早生香茶菜素 G 对 S180 细胞株增殖的影响** 将早生香茶菜素 G 用 DMSO 分别配成浓度为 1 000, 100, 10, 1, 0.1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  5 个浓度, 1% DMSO 为阴性对照。阳性对照为顺铂, 用 0.9% 氯化钠溶液分别配成 100, 10, 1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  3 个浓度。常规培养 S180 细胞, 取处于对数生长期 S180 细胞, 将细胞浓度调整为  $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ , 接种到 96 孔培养板, 每孔 90  $\mu\text{L}$ 。每孔分别加入 10  $\mu\text{L}$  不同浓度的样品。加样组及对照组均设 4 个复孔, 每块板均设有 4 个空白对照孔。细胞在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中分别孵育 48 h 后, 加入 MTT ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 每孔 10  $\mu\text{L}$ 。继续培养 4 h 后, 加入三联液, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 放置过夜后, 用酶标仪在 570, 630 nm 双波长下测定各孔的 A 值, 计算细胞增殖抑制率及半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。

**1.6 早生香茶菜素 G 急性毒性实验** ICR 小鼠, 雌雄各半, 禁食 12 h 后随机分为 6 组, 每组 10 只, 设受试样品 5 个剂量组 (50, 77.3, 119.4, 184.4, 285.0  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 和阴性对照组。分别按每 10 g 体质量 0.2 mL, 一次性腹腔注射, 给药后连续观察 14 d, 记录动物的毒性反应情况、死亡情况及死亡时间。采用 Bliss 法测定半数致死量 (median lethal dose,  $\text{LD}_{50}$ )。

**1.7 早生香茶菜素 G 对荷 S180 肉瘤小鼠肿瘤生长的影响** 取 ICR 小鼠, 无菌条件下腹腔接种浓度为  $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$  的 S180 细胞悬液每只 0.3 mL。当接种的初代移植 S180 肉瘤腹水长出后再传代。取第 3 代浓度为  $1 \times 10^7$  个活细胞  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的 S180 肉瘤细胞每只 0.2 mL (腹水为乳白色无絮状沉淀物) 迅速皮下接种于 ICR 小鼠 (雌性) 右前肢腋部皮下。接种后 24 h 称质量随机分为 6 组, 早生香茶菜素 G 小、中、大剂量组分别为 3, 6, 12  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 环磷酰胺组剂量为 30  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 0.9% 氯化钠溶液组为空白对照组, 30% 丙二醇组为阴性对照组。按 0.01  $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$  剂量, 腹腔注射每天 1 次, 连续给药 7 d。停药后观察 24 h, 处死动物, 剥离肿瘤组织、胸腺、脾、肝脏等脏器, 并称质量。肿瘤抑制率 (%) = (阴性对照组质量 - 治疗组质量) / 阴性对照组质量  $\times 100\%$ , 脏器指数 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) = 脏器质量 / 动物质量。

**1.8 早生香茶菜素 G 对 S180 细胞株和肿瘤组织细胞周期的影响** 取对数生长期 S180 细胞, 调整密度为  $2.0 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ , 以每瓶 5 mL 接种于细胞培养瓶中。0, 5, 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  早生香茶菜素 G 分别作用细胞 48 h 后, 收集细胞, 预冷洗涤 2 次, 固定细胞。离心收集细胞, 弃固定液, 洗涤两次后加入 1 mL 的碘化丙啶溶液室温下避光染色 30 min, 流式细胞术检测。早生香茶

收稿日期 2016-03-02 修回日期 2016-05-06

基金项目 \* 云南省自然科学基金重点项目子课题 (2004C0008Z)

作者简介 杨焕芝 (1980-), 女, 河北沧州人, 主管药师, 硕士, 研究方向: 临床药学。电话: 0871-63188200, E-mail: yanghuanzhi1024@163.com。

通信作者 李玛琳 (1963-), 女, 云南宣威人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药理学研究。电话: 0871-67195110, E-mail: limalinb@vip.163.com。

菜素 G 小、中、大剂量和阴性对照组荷瘤小鼠(每组 4 只)停药后观察 24 h,取出瘤组织,切取约 0.5 g 新鲜肿瘤组织,制备密度为  $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  的单细胞悬液,70% 冰乙醇固定,4 ℃ 保存,流式细胞术检测。采集细胞的 DNA 数据,并以 Multigraph 软件分析结果。

**1.9 早生香茶菜素 G 对荷瘤小鼠 T、B 淋巴细胞增殖活性的影响** 处死荷 S180 肉瘤小鼠,无菌取出脾脏,在 RPMI1640 液中将脾脏制成单个细胞悬液,离心洗涤 2 次,用含 10% 小牛血清的培养液制成  $6 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  的脾细胞悬液,以每孔 90  $\mu\text{L}$  加入 96 孔培养板中。在脾细胞培养板中分别加入促进 T、B 淋巴细胞增殖的刺激因子 ConA( $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )和脂多糖( $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),每孔 10  $\mu\text{L}$ ,阴性对照为 RPMI640,每孔 10  $\mu\text{L}$ 。培养板于 37 ℃,5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 48 h 后,加入 MTT ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),每孔 10  $\mu\text{L}$ 。继续培养 4 h 后,加入三联液,放置过夜后,用酶标仪在 570,630 nm 双波长下测定各孔的 A 值。 $\text{T、B 淋巴细胞增殖率}(\%) = (\text{实验孔 A 值} - \text{对照孔 A 值}) / \text{对照孔 A 值} \times 100\%^{[4]}$ 。

**1.10 早生香茶菜素 G 对荷 S180 肉瘤小鼠血清 IL-2 含量的影响** 荷瘤小鼠(每组 4 只)停药后观察 24 h,处死动物,摘除荷 S180 肉瘤小鼠的单侧眼球取静脉血 2 mL,用清洁的试管收集血液,室温凝固 2 h,离心收集血清。立即分装后 -20 ℃ 冷冻保存。严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行实验操作,运用 CurveExpert1.3 绘图软件绘制 IL-2 标准曲线,计算出血清中 IL-2 含量。

**1.11 统计学方法** 采用 SPSS11.5 版统计软件对数据进行处理,计量资料用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组变量采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有

统计学意义。

**2 结果**

**2.1 早生香茶菜素 G 对 S180 细胞增殖的影响** 早生香茶菜素 G 在浓度为 0.01,0.1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,对 S180 细胞株的增殖没有抑制作用,当浓度增至 1.0,10,100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,抑制率分别为 7.9%,31.5%,86.4%,且呈浓度依赖性,抑制率随浓度增加而增加, $\text{IC}_{50}$  为  $19.80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , $r = 0.92$ 。顺铂对 S180 细胞株的  $\text{IC}_{50}$  值为  $0.16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , $r = 0.93$ 。

**2.2 早生香茶菜素 G 急性毒性实验** 早生香茶菜素 G 的 5 个剂量组(浓度 285,184.4,119.4,77.3,50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )小鼠死亡率依次分别为 100%,90%,60%,0%,0%。小鼠最早死亡时间出现在给药后 30 min,最晚出现死亡时间为第 3 天,死亡高峰出现在给药后 1.5 h。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,小鼠的五官、粪便未见异常,动物行为未见异常。动物在死亡前出现后肢拉伸、行动不稳、有的小鼠有仰翻抽搐现象、气息微弱等症状,并持续至死亡。阴性对照组中的每只小鼠在观察期都没有任何异常状况,生长良好。经用 Bliss 法计算早生香茶菜素 G 的  $\text{LD}_{50}$  为  $121.11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

**2.3 早生香茶菜素 G 体内抗肿瘤活性** 与阴性对照组比较,早生香茶菜素 G 小、中剂量组抑瘤率分别为 32.11%,41.60% ( $P < 0.05$ ),而早生香茶菜素 G 大剂量组抑瘤作用不显著 ( $P > 0.05$ ),早生香茶菜素 G 的 3 个剂量组的抑瘤作用均低于环磷酰胺组 ( $P < 0.05$ ),对小鼠体重均无明显的抑制作用 ( $P > 0.05$ )。环磷酰胺组与空白对照组比较,抑瘤率为 68.54% ( $P < 0.05$ ),体质量明显减轻 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 6 组荷 S180 肉瘤小鼠肿瘤抑制作用比较

Tab.1 Comparison of tumor inhibition among six groups of mice bearing S180 tumor

$\bar{x} \pm s, n = 10$

组别	剂量/ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	初体质量	末体质量	肿瘤质量	抑瘤率/ %
		g			
空白对照组	—	18.69 $\pm$ 1.28	21.19 $\pm$ 1.63	1.24 $\pm$ 0.38	—
阴性对照组	—	18.77 $\pm$ 0.86	20.87 $\pm$ 1.32	1.37 $\pm$ 0.25	—
环磷酰胺组	30	18.95 $\pm$ 1.59	18.29 $\pm$ 2.10 <sup>*1</sup>	0.39 $\pm$ 0.17 <sup>*1</sup>	68.54
早生香茶菜素 G					
小剂量	3	19.50 $\pm$ 1.46	22.27 $\pm$ 1.47	0.93 $\pm$ 0.44 <sup>*2*3</sup>	32.11
中剂量	6	18.60 $\pm$ 1.20	20.11 $\pm$ 2.30	0.80 $\pm$ 0.29 <sup>*2*3</sup>	41.60
大剂量	12	17.56 $\pm$ 2.52	20.58 $\pm$ 1.57	1.17 $\pm$ 0.33 <sup>*3</sup>	14.59
F		2.232	7.897	10.474	
P		>0.05	<0.01	<0.01	

与空白对照组比较, <sup>\*1</sup> $P < 0.05$ ; 与阴性对照组比较, <sup>\*2</sup> $P < 0.05$ ; 与环磷酰胺组比较, <sup>\*3</sup> $P < 0.05$

Compared with blank control group, <sup>\*1</sup> $P < 0.05$ ; compared with negative control group, <sup>\*2</sup> $P < 0.05$ ; compared with cyclophosphamide group, <sup>\*3</sup> $P < 0.05$

2.4 早生香茶菜素 G 对荷瘤小鼠脏器指数的影响

与空白对照组比较,环磷酰胺组小鼠胸腺指数显著降低,肾脏、心脏指数显著增加 ( $P < 0.05$ ),脾脏指数、肝脏指数差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与阴性对照组比较,早生香茶菜素 G 3 个剂量组小鼠胸腺指数显著降低,小剂量组肾脏、心脏指数均降低 ( $P < 0.05$ ),3 个剂量组脾脏、肝脏指数差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

2.5 早生香茶菜素 G 对 S180 细胞株及其肿瘤组织细胞周期的影响 流式结果显示,5,10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  早生香茶菜素 G 处理 S180 细胞 48 h,处于  $G_0/G_1$  分别为 50.7%,42.0% (空白对照组 19.0%),处于  $G_2/M$  期细胞分别为 32.8%,36.5% (空白对照组 33.3%);处于 S 期细胞分别为 16.4%,21.5% (空白对照组 47.7%)。与空白对照组比较,药物组  $G_0/G_1$  期细胞所占比例呈相对增多趋势,S 期细胞呈相对减少趋势,表明早生香茶菜素 G 可使 S180 细胞阻滞于  $G_0/G_1$  期(图 2)。

与阴性对照组比较,早生香茶菜素 G 3 个剂量组 S180 小鼠肿瘤组织细胞处于  $G_0/G_1$ ,S 期细胞比例数值相对增加,但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );早生香茶菜素 G 小、中剂量组肿瘤组织细胞处于  $G_2/M$  期细胞明显减少,分别减少 33% 和 26% ( $P < 0.05$ ),见表 3。

2.6 早生香茶菜素 G 对荷 S180 肉瘤小鼠脾细胞增殖和小鼠血清中 IL-2 的影响 与阴性对照组比较,早生香茶菜素 G 的 3 个剂量组均可促进荷瘤小鼠脾脏 T,B 淋巴细胞增殖 ( $P < 0.05$ ),对 T 淋巴细胞增殖作用以早生香茶菜素 G 中剂量组最明显,早生香茶菜素 G 大剂量组对 B 淋巴细胞增殖率是早生香茶菜素 G 小剂量组的 3.68 倍,是早生香茶菜素 G 中剂量组的 2.57 倍。与空白对照组比较,环磷酰胺组血清中 IL-2 含量明显减少 ( $P < 0.05$ )。与阴性对照组比较,早生香茶菜素 G 小、中剂量组血清中 IL-2 含量分别减少约 90.9% 和 77.1% ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 2 6 组荷 S180 肉瘤小鼠脏器指数的比较						
Tab.2 Comparison of organ index among six groups of mice bearing S180 tumor						
$\bar{x} \pm s, n = 10$						
组别	剂量/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	胸腺指数	脾脏指数	肝脏指数 ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	肾脏指数	心脏指数
空白对照组	—	$2.26 \pm 0.45$	$5.50 \pm 1.15$	$54.63 \pm 4.32$	$10.86 \pm 0.83$	$3.66 \pm 0.33$
阴性对照组	—	$2.58 \pm 0.58$	$5.87 \pm 0.84$	$54.17 \pm 4.51$	$11.80 \pm 0.97$	$4.64 \pm 0.69$
环磷酰胺组	30	$1.57 \pm 0.41^{*1}$	$4.58 \pm 1.88$	$54.94 \pm 4.82$	$12.84 \pm 1.15^{*1}$	$4.56 \pm 0.52^{*1}$
早生香茶菜素 G						
小剂量	3	$2.49 \pm 0.37^{*2*3}$	$5.82 \pm 1.23$	$52.34 \pm 4.08$	$10.63 \pm 0.85^{*2*3}$	$4.22 \pm 0.54^{*2}$
中剂量	6	$2.04 \pm 0.62^{*4}$	$5.64 \pm 1.80$	$51.16 \pm 5.53$	$11.29 \pm 1.06^{*3}$	$4.34 \pm 0.44$
大剂量	12	$2.37 \pm 0.38^{*3*4}$	$6.76 \pm 0.79$	$53.86 \pm 5.54$	$11.04 \pm 1.53^{*3}$	$4.23 \pm 0.47$
F		6.461	2.554	0.527	7.414	5.915
P		<0.01	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01

与空白对照组比较,  $^{*1}P < 0.05$ ; 与阴性对照组比较,  $^{*2}P < 0.05$ ,  $^{*4}P < 0.01$ ; 与环磷酰胺组比较,  $^{*3}P < 0.05$   
Compared with blank control group,  $^{*1}P < 0.05$ ; compared with negative control group,  $^{*2}P < 0.05$ ,  $^{*4}P < 0.05$ ; compared with cyclophosphamide group,  $^{*3}P < 0.05$

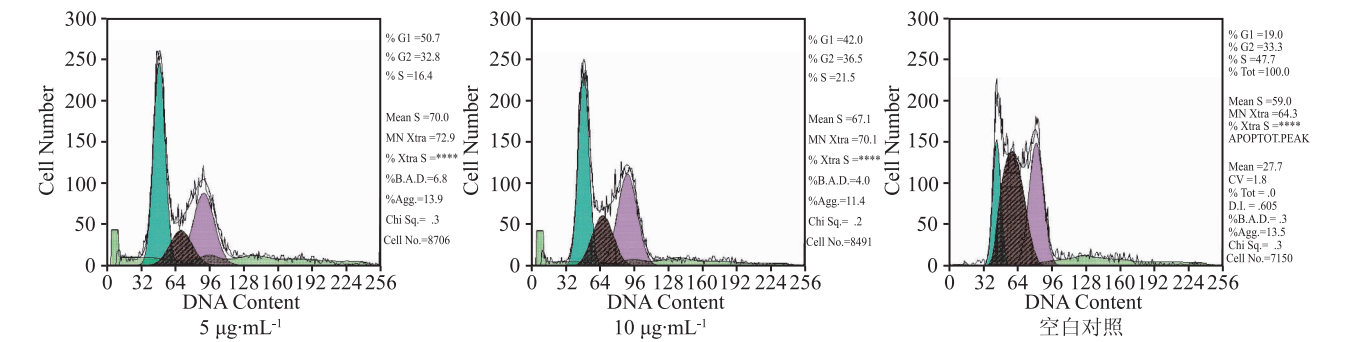


图 2 早生香茶菜素 G 处理 S180 细胞 48 h 细胞周期流式图  
Fig.2 Flow cytometry analysis on cell cycle of S180 cells treated with Xerophilusin G

表 3 6 组荷 S180 小鼠肿瘤组织细胞周期的比较

Tab.3 Comparison of cell cycle of tumor tissue cells among six groups of mice bearing S180 tumor

% , $\bar{x} \pm s, n = 4$				
组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> /M 期
空白对照组	—	49.25 ± 4.13	22.90 ± 6.82	27.70 ± 8.24
阴性对照组	—	47.98 ± 9.92	13.48 ± 12.73	38.58 ± 6.42
环磷酰胺组	30	40.85 ± 19.11	26.00 ± 10.32	33.15 ± 14.36
早生香茶菜素 G				
小剂量	3	76.82 ± 25.57	17.63 ± 9.63	5.55 ± 3.10 <sup>*1</sup>
中剂量	6	62.30 ± 21.84	25.20 ± 7.34	12.52 ± 8.51 <sup>*1</sup>
大剂量	12	60.92 ± 26.49	17.80 ± 11.32	21.28 ± 7.23
<i>F</i>		1.720	0.676	3.872
<i>P</i>		>0.05	>0.05	<0.05

与阴性对照组比较, <sup>\*1</sup>*P* < 0.05

Compared with negative control group, <sup>\*1</sup>*P* < 0.05

表 4 6 组荷 S180 肉瘤小鼠脾细胞增殖及血清中 IL-2 含量的比较

Tab.4 Comparison of splenocyte proliferation and the serum level of IL-2 among six groups of mice bearing S180 tumor

$\bar{x} \pm s, n = 4$				
组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	T 淋巴细胞增殖率	B 淋巴细胞增殖率	IL-2/
		%		(pg·mL <sup>-1</sup> )
空白对照组	—	8.81 ± 4.17	7.76 ± 1.64	11.78 ± 0.12
阴性对照组	—	-17.75 ± 3.85	4.25 ± 2.87	10.31 ± 0.76
环磷酰胺组	30	2.19 ± 1.04	-8.66 ± 3.80	3.07 ± 0.10 <sup>*1</sup>
早生香茶菜素 G				
小剂量	3	24.51 ± 8.94 <sup>*2</sup>	35.43 ± 9.42 <sup>*2</sup>	0.94 ± 0.10 <sup>*2</sup>
中剂量	6	34.27 ± 10.25 <sup>*2</sup>	50.66 ± 15.31 <sup>*2</sup>	2.36 ± 0.14 <sup>*2</sup>
大剂量	12	32.56 ± 14.73 <sup>*2</sup>	130.36 ± 16.27 <sup>*2</sup>	8.12 ± 0.16
<i>F</i>		1.870	2.350	4.263
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

与空白对照组比较, <sup>\*1</sup>*P* < 0.05; 与阴性对照组比较, <sup>\*2</sup>*P* < 0.05

Compared with blank control group, <sup>\*1</sup>*P* < 0.05; compared with negative control group, <sup>\*2</sup>*P* < 0.05

3 讨论

前期研究显示,早生香茶菜素 G 对 K562、HCT 和 MKN-28 细胞株体外无细胞毒活性,对 HL-60 细胞株 IC<sub>50</sub> 为 3.93 μg·mL<sup>-1</sup>[5]。本研究中对 S180 细胞株的 IC<sub>50</sub> 为 19.80 μg·mL<sup>-1</sup>,显示对 S180 细胞细胞毒活性不显著。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 > 40%,且差异有统计学意义,说明药物有抗肿瘤作用。本研究中早生香茶菜素 G 小、中剂量组对荷 S180 肉瘤小鼠的抑瘤率分别为 32.11%、41.6%,说明早生香茶菜素 G 在体内有抗肿瘤作用。但早生香茶菜素 G 给药剂量与抑瘤作用之间量效关系只在一定范围显现,而超过一定剂量时量效关系不再存在。实验中观察到,各剂量组胸腺指数显著降低,但与环磷酰胺组比较,对小鼠胸腺的毒性

小,小剂量组对肾脏、心脏有一定的毒性,对脾脏、肝脏的毒性不明显。

细胞周期调控是当前肿瘤研究的热点,几乎所有癌基因、抑癌基因的生物学效应,最终都归结到细胞周期的机制,在细胞周期调控中,G<sub>2</sub>/M 期是细胞增殖的主要调控点[6]。香茶菜属植物所含化学成分以二萜类化合物为主,该类化合物普遍具有诱导肿瘤细胞凋亡的生物学活性。冬凌草甲素通过将胶质瘤细胞周期阻滞于 S 期诱导细胞凋亡[7],作用于 SGC-7901 细胞通过下调 Cdk1 和 cyclinB1 蛋白的表达使细胞周期阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期抑制细胞增殖[8]。毛萆乙素通过激活 p53 信号通路诱导激活 caspase-3 和将细胞周期阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期诱导人胰腺癌细胞细胞凋亡[9]。本研究发现不同浓度早生香茶菜素 G 处理 S180 细胞 48 h 后,

$G_0/G_1$ 期细胞所占比例呈上升趋势,S期细胞呈减少趋势。各剂量组对荷 S180 小鼠肿瘤组织细胞处于  $G_0/G_1$ 期细胞比例呈增多趋势;小、中剂量组肿瘤组织细胞处于  $G_2/M$ 期的细胞比例均下降。表明早生香茶菜素 G 可能通过阻滞细胞周期于  $G_0/G_1$ 期而达到抑制细胞增殖作用。IXD 中细胞毒活性最强的化合物早生香茶菜素 B,可通过诱导 K562 细胞凋亡发挥其抗肿瘤作用,并可影响凋亡通路中的多个环节;对 K562 细胞中致病融合蛋白 BCR-ABL 的表达具有直接的抑制作用<sup>[10]</sup>。研究证明早生香茶菜素 G、冬凌草甲素和毛萼乙素对于一些肿瘤细胞具有细胞周期阻滞作用,但早生香茶菜素 G 是否具有诱导细胞凋亡作用有待进一步研究。

早生香茶菜素 G 在体外的细胞毒活性不明显,体内抗肿瘤活性及毒性显示其大剂量组低于小剂量组,提示体内抗肿瘤活性可能与其细胞毒活性不密切。各剂量组与阴性对照组比较,均可促进荷瘤小鼠脾脏 T、B 淋巴细胞增殖,对 T 淋巴细胞增殖作用以中剂量组最明显,大剂量组对 B 淋巴细胞增殖率最高。小、中剂量组对肿瘤的抑制作用与 T、B 淋巴细胞增殖率呈线性相关,推测早生香茶菜素 G 的抗肿瘤作用可能与其促进小鼠脾脏 T、B 淋巴细胞增殖,增强机体免疫功能有关。T 细胞主要有两类, $CD_4^+$ T 辅助细胞和  $CD_8^+$ 细胞毒性 T 细胞。 $CD_4^+$ T 细胞可以发生克隆性增殖,释放出多种细胞因子,主要为 IL-2、干扰素、肿瘤坏死因子<sup>[11]</sup>。本研究结果发现早生香茶菜素 G 小、中剂量组荷瘤小鼠血清 IL-2 含量较阴性对照组,明显减少,显示早生香茶菜素 G 对荷 S180 小鼠肿瘤的抑制作用不是通过促进 IL-2 分泌而实现的。本课题组前期研究发现:0.01,0.1,1,10,100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 早生香茶菜素 G 在体外对 T 淋巴细胞增殖抑制率依次是 21.6%,9.4%, -48.9%,52.9%,69.0%,显示早生香茶菜素 G 在一定剂量范围内对 T 淋巴细胞增殖具有双向调节作用<sup>[10]</sup>。本研究中体内实验各剂量组胸腺指数显著降低,但体外实验可促进荷瘤小鼠脾脏 T、B 淋巴细胞增殖,推测早生香茶菜素 G 对免疫系统可能具有双向调节作用,有待进一步研究。

综上所述,早生香茶菜素 G 在体外能抑制 S180

细胞增殖,体内对荷 S180 肉瘤小鼠肿瘤生长具有抑制作用,而其抗肿瘤活性的发挥可能与阻滞肿瘤细胞周期有关。今后,将扩大细胞株和瘤株的选择范围,对其抗肿瘤活性进一步研究。

#### 参考文献

- [1] SUN H D, HUANG S X, HAN Q B. Diterpenoids from *Isodon* species and their biological activities[J]. *Nat Prod Rep*,2006,23(5):673-698.
- [2] 田庆镗,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[J]. *中医药学刊*,2006,24(6):1097-1099.
- [3] 田庆镗,李玛琳,孙汉董. 早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.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:1755-1770.
- [5] HOU A J, ZHAO Q S, LI M L, et al. Cytotoxic 7,20-epoxy ent-kauranoids from *isodon xerophilus*[J]. *Phytochemistry*, 2001,58(1):179-183.
- [6] DIAZ M S, TARRADO C M, MIRANDA A, et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy [J]. *Pharmacol Ther*,2013,138(2):255-271.
- [7] ZHANG X H, LIU Y X, JIA M, et al. Oridonin inhibits tumor growth in glioma by inducing cell cycle arrest and apoptosis[J]. *Cell Mol Biol*,2014,60(6):29-36.
- [8] GAO S Y, LI J, QU X Y, et al. Downregulation of Cdk1 and cyclinB1 expression contributes to oridonin-induced cell cycle arrest at  $G_2/M$  phase and growth inhibition in SGC-7901 gastric cancer cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014,15(15):6437-6441.
- [9] LI L, YUE G G, LAU C B, et al. Eriocalyxin B induces apoptosis and cell cycle arrest in pancreatic adenocarcinoma cells through caspase and p53 dependent pathways [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2012,262(1):80-90.
- [10] 翁稚颖. 早生香茶菜的化学成分和抗肿瘤活性研究[D]. 昆明:中国科学院昆明植物研究所,2007:26-54.
- [11] MONJA A M, TIETZE J K, GROSS S K, et al. Bystander activation and anti-tumor effects of  $CD_8^+$  T cells following Interleukin-2 based immunotherapy is independent of  $CD_4^+$  T cell help[J]. *PLoS One*,2014,9(8):e102709.