

瑞香狼毒提取物尼地吗啉的抗肿瘤研究概况

王园园, 王鑫, 王义善(解放军第107医院国家中西医结合肿瘤治疗重点专科, 山东烟台264002)

[摘要] 本文就瑞香狼毒中抗肿瘤活性成分尼地吗啉的抗肿瘤机制、研究现状及其临床应用存在的问题进行了较完整的总结和介绍, 进一步分析了尼地吗啉作为一种抗癌药物的可行性及临床应用减毒增效方案, 籍此为尽可能的发挥祖国传统肿瘤中中医药巨大潜能, 深入研究抗肿瘤有效单体成分提供参考。

[关键词] 瑞香狼毒; 尼地吗啉; 中药单体; 抗肿瘤

[中图分类号] R287 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2011)05-0328-04

Progress on diterpenoids gnidimacrin in *Stellera chamaejasma* L.

WANG Yuan-yuan, WANG Xin, WANG Yi-shan(The Center for Tumor Treatment, 107th Hospital of PLA, Yantai 264002, China)

[Abstract] A relatively complete summary on the anti-tumor component gnidimacrin was introduced, which was extracted from *Stellera chamaejasma* L. The research status of gnidimacrin's antitumor mechanism and its clinical application were reviewed. A further analysis on the feasibility and attenuated efficiency programs of the Gnidimacrin as an antitumor drug was made. The review could provide reference to exert the enormous potential of Chinese traditional medicine as much as possible and to deeply excavate the effective monomers.

[Key words] *Stellera chamaejasma* L.; gnidimacrin; chinese medicine; antitumor

瑞香狼毒(*Stellera chamaejasma* L., 简称SC)治疗肿瘤在我国古代医学典籍中早有记载,《本经》中就有:“狼毒破积聚,治恶疮,消蛊毒”的论述,又有逐水、祛痰、破积、杀虫之功效。近年来国内外文献报道瑞香狼毒在抗肿瘤研究的药理实验较多,是一种很有前途的抗肿瘤药物,动物实验表明对小鼠移植性肿瘤有一定的抑制作用^[1]。动物体内实验、体外肿瘤细胞系实验及动物血清药理学实验均证明,瑞香狼毒有明显的抗肿瘤作用。

为进一步探究瑞香狼毒抗肿瘤的活性成分,寻找新的抗肿瘤靶点,在对中药瑞香狼毒抗肿瘤有效成分筛选中,国内外学者对瑞香狼毒进行了多种分离萃取。在瑞香狼毒甲醇提取物中,得到多种二萜活性成分,其中,尼地吗啉(gnidimacrin)显示出了较强的抗肿瘤活性^[2]。

1 对尼地吗啉抗肿瘤活性的研究

河北医科大学的冯威健与日本的Ikegawa等发现瑞香狼毒中二萜类化合物有抗癌活性并重点研究了尼地吗啉,发现其具有较宽的抗癌谱及较强的抗癌活性,是瑞香狼毒中的主要抗肿瘤活性

成分^[3]。

1.1 尼地吗啉单体成分的获得 尼地吗啉,从西藏产瑞香狼毒的干燥根茎经甲醇提取、石油醚复提、硅胶层析,最后经反相型高压液相分离获得^[4]。尼地吗啉为白色粉末,属瑞香烷型二萜类化合物,脂溶性,但在血清中仍然具有很好的物理稳定性以及抗肿瘤活性,从*Gnidia subcordata*首次分离,并于1976年由Kupchan^[5]首次报道。

1.2 尼地吗啉具有较强的抗癌活性 冯威健和日本学者应用MTT法和克隆形成法,观察了尼地吗啉对体外培养的人白血病K562和胃癌Kato-III、MKN-28、MKN-45及小鼠L-1210的细胞生长和克隆形成抑制作用,其IC₅₀在0.007~0.00012 μg/ml,范围以0.02~0.03 mg/kg腹腔注射,可使小鼠白血病P-388和L-1210腹水型生命延长70%和80%。以0.01~0.02 mg/kg腹腔注射,可使小鼠实体瘤Lewis肺癌、黑色素瘤B-16和结肠癌26的生命延长40%、49%和41%。SC的甲醇提取物以10 mg/kg剂量ip时的生命延长率是79%,进一步用石油醚复提后,以1 mg/kg ip时的生命延长率为57%。

有对瑞香狼毒甲醇提取物的研究结果显示,培养24 h后洗去或不洗去瑞香狼毒甲醇提取物对K562细胞的增殖抑制作用无明显不同,说明甲醇提取物的这种作用在24 h时即已发挥,且一旦发挥

[基金项目] 全军科技攻关项目(06G034)。

[作者简介] 王园园(1987-),女,硕士研究生。Tel:15053532453, E-mail:wangyuan0922@126.com。

[通讯作者] 王义善。Tel:(0535)2933559, E-mail:wys@107zlx.com。

即可自行维持至少9 d。推测,尼地吗啉抗肿瘤效应发挥可能也在进入体内后24 h内,且可以长时间维持药效^[6]。

1.3 尼地吗啉抗癌细胞毒作用以抑制癌细胞增殖形成克隆为主 尼地吗啉对体外培养的小鼠白血病L-1210具有很强的抑制作用,结果显示,对用MTT法测定的培养4 d的癌细胞的增殖抑制在0.1~0.0001 μg/ml浓度范围;对用克隆形成试验测定的培养7 d癌细胞的克隆形成抑制在0.01~0.00001 μg/ml浓度范围内,呈现为直线性浓度依赖性抑制作用,并且对克隆形成的抑制作用较对细胞增殖的抑制作用更为明显。实验表明,尼地吗啉是通过抑制癌细胞的生长,抑制癌细胞增殖形成克隆而发挥抗癌作用的,即细胞毒作用,并且以抑制癌细胞增殖形成克隆为主^[4]。

1.4 尼地吗啉体外抗癌活性高于长春新碱和阿霉素 尼地吗啉对体外培养的小鼠白血病L-1210的50%抑制浓度在MTT法和克隆形成试验中分别是0.001 μg/ml和0.0002 μg/ml,而长春新碱的50%抑制浓度分别是0.005 μg/ml和0.001 μg/ml。在两种试验方法中,尼地吗啉的50%抑制浓度均较长春新碱低。

尼地吗啉对体外培养的人白血病K562的IC₅₀在MTT法和克隆形成试验分别是0.00045 μg/ml和0.0006 μg/ml,对人胃癌Kato-3的IC₅₀在MTT法和克隆形成试验分别是0.00075 μg/ml和0.002 μg/ml。阿霉素对人白血病K562的IC₅₀在MTT法和克隆形成试验分别是0.047 μg/ml和0.055 μg/ml,对人胃癌Kato-3的IC₅₀在MTT法和克隆形成试验分别是0.044 μg/ml和0.05 μg/ml。尼地吗啉对人癌培养细胞株K562和Kato-3的IC₅₀,无论是MTT法还是克隆形成法均低于阿霉素。

1.5 尼地吗啉抗癌活性与肿瘤细胞的物种有关 冯威健等^[4]的研究资料表明,瑞香狼毒甲醇提取物对小鼠L-1210和P388等血液系统来源的肿瘤细胞系的抗癌效果好;王润田^[6]也发现人来源的白血病肿瘤细胞系K562对醇提物的敏感性远高于小鼠来源的肿瘤细胞系S180和YAC-1。以上资料提示,尼地吗啉的抗肿瘤作用可能与肿瘤细胞的物种来源有关,有可能人源性肿瘤细胞和血液来源的肿瘤细胞对瑞香狼毒甲醇提取物或尼地吗啉更为敏感。

2 尼地吗啉抗癌机制研究

2.1 细胞毒作用 对尼地吗啉抗癌的相关研究从形态观察发现,经尼地吗啉作用后的细胞膜有

明显的突起样改变,有丝分裂明显减少,细胞呈现多核化、巨核化改变,以及胞体变大、染色质减少等改变,说明细胞毒作用可能是尼地吗啉抗肿瘤的主要机制^[7,8]。2003年,王润田对瑞香狼毒甲醇提取物抗癌机制进行了深入研究。研究表明,醇提物作用24 h的K562分裂期细胞减少,p53、bcl-2和c-myc的表达都有所增加,但凋亡基因p53表达增加显著,因此凋亡细胞增加。醇提物继续作用至48 h,分裂期细胞进一步减少,而G0/G1细胞明显增加,p53表达达最高值,bcl-2表达明显减低,因此细胞凋亡率增加,电镜可见凋亡形态学改变。醇提物作用72 h,分裂期细胞更少,G0/G1期细胞继续增加;p53表达虽有下降,但仍高于对照,而bcl-2和c-myc表达均明显降低,发生凋亡的细胞更多,电镜观察易见典型的凋亡形态改变。以上研究结果提示,醇提物抗癌机制可能与其能阻滞肿瘤细胞周期,抑制肿瘤细胞分裂增殖和促进肿瘤细胞凋亡有关。由此,可以预测尼地吗啉抗癌机制可能也与其能阻滞肿瘤细胞周期,抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡有关。

对尼地吗啉抗肿瘤机制的进一步研究发现,该物质是一个比较强的蛋白激酶C的一个激活剂^[9,10]。应用敏感的人类白血病K562细胞和难以控制的鼠肝细胞癌细胞系HLE细胞进行实验,发现尼地吗啉对前者的作用是后者的3倍。斑点免疫法分析证明,K562细胞出现蛋白激酶Cβ₂表达增加,而HLE细胞蛋白激酶Cα表达增加。在尼地吗啉以0.0005 mg/ml与K562细胞作用24 h后,出现G1期阻滞和CDK2活性受抑制;浓度为0.005 mg/ml时,G1期阻滞最大,且CDK2活性受完全抑制;浓度为0.05 mg/ml时,其生物效应降低。在24 h之后,K562细胞的蛋白激酶C的量和生物学效应均没有改变,但出现低于对照组1/10的下调控,生物学效应的降低可能是蛋白激酶C结果。

2.2 免疫调节作用 王润田^[6]研究了瑞香狼毒甲醇提取物对正常脾细胞生长、对CoA刺激正常脾细胞转化及对正常脾细胞NK活性的影响。结果显示,醇提物与正常脾细胞共育24 h时,0.001、0.01 μg/ml醇提物组的生长指数与对照无差异,而0.1~10 μg/ml醇提物可刺激脾细胞增殖($P < 0.05$),并呈剂量依赖式;共育至48、72 h,0.001~10 μg/ml醇提物对脾细胞生长与对照无差异($P > 0.05$)。0.001、0.01 μg/ml醇提物对ConA刺激的正常脾细胞转化无影响;0.1~10 μg/ml醇提物与最适量和亚适量ConA同刺激作用。0.1 μg/ml和1 μg/ml

醇提取物作用的脾细胞 NK 活性分别为 $(35.16 \pm 1.73)\%$ 、 $(36.53 \pm 2.14)\%$, 与对照组 $(18.53 \pm 1.98)\%$ 差异有显著性 ($P < 0.05$); 而同时间内醇提取物本身对 YAC-1 活性无明显影响。王润田提出瑞香狼毒醇提取物抗癌机制可能与其可刺激脾细胞增殖, 协同 ConA 刺激脾细胞转化和提高脾细胞 NK 杀伤活性有关。

2.3 协同诱导作用 贾正平等^[11]研究了瑞香狼毒小鼠药物血清增敏化疗药物对 K562/VCR 耐药细胞的抗癌活性, 结果表明, 瑞香狼毒小鼠药物血清可明显增强长春新碱、阿霉素和足叶乙苷体外抗肝癌细胞活性, 并可协同诱导肝癌细胞凋亡, 降低 BCL-2 蛋白阳性表达, 减少 DNA 合成, 抑制肿瘤细胞生长于 G2/M 期, 从而起到抗肿瘤作用。

马健等^[12]以人肝癌耐药 Bel₅-FU2000 细胞为靶细胞, 采用小鼠血清药理学方法, 细胞周期流式细胞仪检测及 MTT 比色法研究瑞香狼毒提取物诱导耐药肝癌细胞凋亡的作用。结果表明, 瑞香狼毒具有协同抗肿瘤药物诱导耐药肝癌细胞凋亡的作用, 其逆转多药耐药的作用与其协同抗肿瘤药物诱导肝癌细胞凋亡的作用有关。

樊俊杰等^[13-16]总结瑞香狼毒抗肿瘤可能的主要机制包括协同诱导作用。瑞香狼毒小鼠药物血清可明显增强 DOX 和 VP-16 体外抗肝癌细胞活性, 并可协同诱导肝癌细胞凋亡, 降低 BCL-2 蛋白阳性表达, 抑制肿瘤细胞生长于 G2/M 期。

综上所述, 尼地吗啉抗肿瘤作用可能是药物直接作用于肿瘤细胞的细胞毒作用、对免疫功能的增强作用以及对细胞凋亡的诱导作用的综合效应。

3 尼地吗啉临床应用中存在的问题

3.1 活性剂量接近于毒性剂量 瑞香狼毒有很强的刺激性, 可引起皮肤和黏膜炎症、充血、水肿、起泡等; 过量服用可致中毒, 而出现口干麻木、头昏、肢体软弱无力、疲倦欲睡、恶心、呕吐、腹部不适, 甚至腹痛、腹泻(出血性便)而休克。瑞香狼毒中的主要有效成分尼地吗啉亦有较大毒性, ip 剂量超过 0.105 mg/kg 时即出现毒性反应^[17,18]。在动物体内实验时发现, 小鼠腹腔注射的活性剂量(0.102 mg/kg)与毒性剂量(0.105 mg/kg)较接近。孙丽君认为尼地吗啉抗肿瘤的有效剂量范围较窄, 大剂量则无治疗作用且毒性很大^[19]。

而邬俊等^[20]对瑞香狼毒急性毒性进行了研究, 发现瑞香狼毒一次灌服 12 g/kg, 相当药材 48 g/kg, LD₅₀ 无法测出。用最大耐受量方法测定 1 日 2 次给药, 计算出最大耐受量相当临床 240 倍(按 50 kg 体

重计算), 最大服药量为 24 g/kg, 相当药材 96 g/kg。邬俊认为瑞香狼毒毒性作用可能来自药材地上部位, 狼毒地下根茎为药材, 瑞香狼毒无明显急性毒性, 临床使用比较安全, 应修正蒙医传统医学对瑞香狼毒大毒的观察, 以促进瑞香狼毒在医药学领域中的更多应用。

3.2 生物活性部位改造难度大 潘国凤等^[21]验证从尼地吗啉化学结构分析其生物活性部位改造的难度相当大, 故权衡其药效与毒性作用, 即对受试系统的收益与风险等因素考虑, 认为其进一步研究的必要性作为先导化合物开发空间是不大的。

由此推测, 瑞香狼毒所含抗肿瘤生物活性的成分与毒性成分以及两者之间关系复杂。潘国凤等以中药有效组分与整体受试系统相互作用作为先导研究范例, 阐述了在病症结合、方证对应的中医理论指导下, 运用现代技术实现中医药现代化的理念与实施方案, 认为可以考虑将中药药效组分作为作用整体, 以中医系统生物学观点去开发瑞香狼毒的药用价值, 可能是一条捷径^[22]。

临床和实验研究均证实了瑞香狼毒及其成分的抗肿瘤疗效, 特别是尼地吗啉, 因其抗癌谱广、作用强而引起众多学者的关注。但是, 将瑞香狼毒中抗癌有效成分尼地吗啉开发为一种抗肿瘤药物, 还需在其抗肿瘤作用机制、毒性实验研究以及优化分离提取以最大程度减轻其毒性等方面进一步深入研究。

4 总结与展望

在肿瘤的治疗上, 现代医学多采用放疗化疗等联合疗法, 随着祖国传统医学的发展, 中西医结合治疗疾病已经逐渐被人接受并广泛应用于临床。现代分子生物学技术的迅猛发展使尼地吗啉抗肿瘤作用机制在分子生物学水平更进一步阐明成为可能。

今后的研究方向应该主要围绕以下几个方面: ①利用现代分子生物技术如基因芯片等进一步确定尼地吗啉抗肿瘤的主要作用机制, 尤其对其影响肿瘤细胞周期与信号传导通路关键环节及诱导肿瘤细胞凋亡的作用机理应从分子水平上进一步探讨; ②从新的抗肿瘤作用机制找到突破口, 如尼地吗啉是否影响肿瘤细胞的转移, 对肿瘤血管的生成有无影响; ③改进分离提取技术或通过生物技术改造尼地吗啉化学结构, 在确保药效的同时, 寻找科学有效的减毒脱毒方法是对其进一步开发关键。相信, 随着我们对瑞香狼毒抗癌有效成分尼地吗啉的深入细致的分析研究, 西医治疗方法结合使用中药制剂尼地吗啉将会为肿瘤的治愈提供新的希望。

(下转第 335 页)

- [35] Kim JY, Shin JS, Ryu JH, *et al.* Anti-inflammatory effect of anemarsaponin B isolated from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* in LPS-induced RAW 264.7 macrophages is mediated by negative regulation of the nuclear factor- κ B and p38 pathways[J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(7):1610.
- [36] 李泽松,李德良,黄坚,等. 心血管相关基因芯片的制备及其在知母皂苷作用机理研究中的应用[J]. *药学报*, 2003, 38(7):496.
- [37] 赵树进,韩丽萍. 知母皂苷及其苷元对动物模型 β 肾上腺素受体的调整作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2000, 20(2):70.
- [38] Wang GJ, Lin LC, Chen CF, *et al.* Effect of timosaponin A-III, from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge (Liliaceae), on calcium mobilization in vascular endothelial and smooth muscle cells and on vascular tension[J]. *Life Sci*, 2002, 71(9):1081.
- [39] Xiao S, Xu M, Ge Y, *et al.* Inhibitory Effects of Saponins From *Anemarrhena asphodeloides* Bunge on the Growth of Vascular Smooth Muscle Cells[J]. *Biomed Environ Sci*, 2006, 19(3):185.
- [40] Nakashima N, Kimura I, Kimura M, *et al.* Isolation of pseudoprotimosaponin AIII from rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* and its hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *J Nat Prod*, 1993, 56(3):345.
- [41] 李春梅,高永林,李敏,等. 知母皂苷对小鼠血糖的影响[J]. *中药药理与临床*, 2005, 21(4):22.
- [42] 韩兵,李春梅,李敏,等. 知母皂苷的降脂及抗动脉粥样硬化作用[J]. *上海中医药杂志*, 2006, 40(11):68.
- [43] 付宝才,林娟,杨林海. 知母皂苷对高脂血症大鼠肝脏低密度脂蛋白受体活性的影响[J]. *医学综述*, 2009, 15(14):2226.
- [44] Ren LX, Luo YF, Li X, *et al.* Antidepressant-Like Effects of Sarsasapogenin from *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE (Liliaceae)[J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(11):2304.
- [45] Takeda O, Tanaka S, Yamasaki K, *et al.* Screening for molluscicidal activity in crude drugs[J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(4):1090.
- [46] Lee B, Trinh HT, Jung K, *et al.* Inhibitory effects of steroidal timosaponins isolated from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* against passive cutaneous anaphylaxis reaction and pruritus[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2010, 32(3):1.

[收稿日期] 2011-04-12

[修回日期] 2011-07-13

(上接第330页)

【参考文献】

- [1] 李树学,韩玉生,刘志敏,等. 复方瑞香狼毒瘤体注射液对移植肿瘤抑制作用的实验研究[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2005, 26(12):1395.
- [2] 冯威健,池川哲郎,吉田光二. 瑞香狼毒提取物尼地吗啉的抗癌活性[J]. *中华肿瘤杂志*, 1995, 17(1):24.
- [3] Ikegawa T, Ikegawa A. Extraction of antitumor diterpenes from *Stellera chamaejasma* L. [P]. 日本专利, 08310993, 1996-04-26.
- [4] 冯威健,吉田光二,池川哲郎. 瑞香狼毒提取物尼地吗啉与长春新碱和阿霉素体外抗癌活性的比较[J]. *癌症*, 1994, 13(6):503.
- [5] Kupchan SM, Shizuri Y, Murae T, *et al.* Letter: Gnidimacrin and Gnidimacrin 20-Palmitate, Novel Macrocyclic Antileukemic Diterpenoid Esters from *Gnidia subcordata* 1, 2[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1976, 98(18):5719.
- [6] 王润田,张坤娟,佟慧,等. 瑞香狼毒甲醇提取物抗癌机理研究[J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 2003, 23(9):734.
- [7] Feng WJ. Studies on antitumor active compounds of *Stellera chamaejasma* L. and their mechanism of action[J]. *Toho Igokkai Zashi*, 1992, 38(6):896.
- [8] Tatematsu H, Kurokawa M, Niwa M, *et al.* Piscidal constituents of *Stellera chamaejasma* L. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32(4):1612.
- [9] Yoshida M, Yokokura H, Hidaka H, *et al.* Mechanism of antitumor action of PKC activator, gnidimacrin[J]. *Int J Cancer*, 1998, 77(2):243.
- [10] 梅爱敏,宋立刚. 中药瑞香狼毒有效成分及抗肿瘤作用的研究进展[J]. *承德医学院学报*, 2006, 23(2):173.
- [11] 贾正平,樊俊杰,谢景文,等. 瑞香狼毒小鼠药物血清增敏化疗药物对 K562/VCR 耐药细胞的抗癌活性[J]. *西北国防医学杂志*, 2001, 22(4):307.
- [12] 马健,李永华,罗京滨,等. 瑞香狼毒协同化疗药物诱导耐药肝癌细胞凋亡作用研究[J]. *中医学报*, 2007, 35(6):15.
- [13] 樊俊杰,贾正平,谢景文,等. 瑞香狼毒和狼毒素对外培养小鼠白血病 P388 细胞生长的影响[J]. *中药材*, 1996, 19(11):567.
- [14] 樊俊杰,贾正平,谢景文,等. 瑞香狼毒对小鼠移植肿瘤生长的影响[J]. *兰州医学院学报*, 1994, 20(4):228.
- [15] 樊俊杰. 瑞香狼毒抗肿瘤作用及机制研究概况[J]. *医学临床研究*, 2007, 24(11):2001.
- [16] 樊俊杰. 瑞香狼毒抗肿瘤作用及机制研究进展[J]. *实用预防医学*, 2007, 14(5):1635.
- [17] 卓兆莲,高英,李卫民. 蒙药瑞香狼毒的生物活性及毒副作用研究[J]. *中国现代中药*, 2007, 9(12):32.
- [18] 杨仓良. 毒药本草[M]. 北京:中国中医药出版社, 1993:369.
- [19] 孙丽君,周燕,王伟. 瑞香狼毒化学成分及生物活性的研究概述[J]. *中成药*, 2009, 31(5):776.
- [20] 郭俊,常亮,琳静. 蒙药瑞香狼毒急性毒性试验研究[J]. *中国民族医药杂志*, 2010, 1(1):41.
- [21] 潘国风,杨庆,刘安,等. 瑞香狼毒药效组分抑制小鼠皮下移植瘤 H22 的实验研究[J]. *中华中医药杂志*, 2009, 24(4):438.
- [22] 潘国风,朱晓新,张晓东. 系统生物学与中药有效组分的研究[J]. *世界科学技术-中医药现代*, 2008, 110(2):5.

[收稿日期] 2010-11-05

[修回日期] 2011-04-29