白英甾体总生物碱对人肺癌细胞 A549 裸鼠异种移植瘤的药效研究

王建农，臧雅丽，顾士萍，卜 璟(中国中医科学院西苑医院实验研究中心，北京 100091)

摘要：目的 探讨白英抗肿瘤有效部位对人肺癌细胞 A549 裸鼠异种移植肿瘤生长抑制作用及作用强度。**方法** 在裸鼠腹腔内接种人肺癌细胞 A549 细胞株复制肿瘤模型，给予阳性对照药紫杉醇和白英甾体总生物碱干预后，测量肿瘤体积和肿瘤质量，计算肿瘤生长抑制率，比较组间抗肿瘤药效强度。**结果** 白英低、中、高剂量组(12，24，48 mg·kg^{-1})的相对肿瘤增殖率（T/C）分别为 85.52 %、60.64 %、45.24 %，抑瘤率分别为 2.35 %、49.79 %、48.93 %，而相同条件下，紫杉醇组(8 mg·kg^{-1})的 T/C 和抑瘤率分别为 14.68 %、82.59 %。紫杉醇有明显的抗肿瘤作用，白英甾体总生物碱均有一定的抗肿瘤作用，其中中、高剂量组抗肿瘤作用更明显。**结论** 白英甾体总生物碱对人肺癌细胞 A549 裸鼠异种移植肿瘤的生长具有抑制作用。

关键词： 白英；抗肿瘤；甾体总生物碱；A549 肺癌细胞株
中图分类号： R285.5 **文献标志码：** A **文章编号：** 1003-9783(2013)05-0469-04
doi： 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.05.010

In-vivo Inhibiting Activity of Total Steroidal Alkaloids from *Solanum lyrantum* Thunb. on A549 Lung Cancer Malignant Cell Lines in Nude Mice

WANG Jiannong，ZANG Yali，GU Shiping，BU Jing(Experimental Center，Xiyuan Hospital，China Academy of Chinese Medical Sciences，Beijing 100091，China)

Abstract：Objective To study the inhibitory effect of active fractions of *Solanum lyrantum* Thunb. on A549 lung cancer malignant cell lines in nude mice. **Methods** Three different dosages of *Solanum lyrantum* total steroidal alkaloids solution and positive drug of paclitaxel solution were given to the nude mice which were inoculated with A549 lung cancer cells intraperitoneally. At the end of drug intervention，tumor mass size and tumor mass weight were measured，tumor-inhibitory rate was evaluated，and the anti-tumor effect of different groups was compared by SPSS software. **Results** The relative tumor proliferation rate(T/C) was 85.52 %，60.64 %，and 45.24 % in 12，24，48 mg·kg^{-1} total steroidal alkaloids groups respectively，and tumor-inhibitory rate was 2.35 %，49.79 %，and 48.93 % accordingly. Under the same condition，T/C was 14.68 % and tumor-inhibitory rate was 82.59 % in paclitaxel (8 mg·kg^{-1}) positive control group. **Conclusion** Total steroidal alkaloids from *Solanum lyrantum* Thunb. shows certain tumor-inhibitory effect on A549 lung cancer cells in nude mice.

Keywords： *Solanum lyratum* Thunb.；Anti-tumor；Total steroidal alkaloids；A549 lung cancer cell line

白英别名白毛藤，为茄科植物白英 *Solanum lyratum* Thunb.的全草，味苦、辛，性微寒，归肝、胆经，具有清热解毒、祛风化痰、利湿退黄以及抗癌的功效，主产于江苏、浙江、江西[1-4]。白英为临床常用抗癌中药，特别是在上海地区，白英常用于治疗肺癌、甲状腺癌、膀胱癌等[4-5]。以往研究认为，甾体皂苷是白英主要抗肿瘤有效部位，但是这些部位的抗肿瘤药效不强，而且主要采用石油醚、乙酸乙酯、氯仿、正丁醇萃取方法，难以做到针对某类特征成分专属性富集，因此制备的样品不能代表白英抗肿瘤的有效部位[4,6]。本文采用离子交换型大孔吸附树脂，专属性富集得到白英甾体总生物碱，其含量达到 56 %

收稿日期： 2013-06-17
作者简介： 王建农，男，研究员，研究方向：中药化学。Email：wangjiannong2008@sina.com。
基金项目： 国家重大新药创制(2009ZX09103-402)；北京市自然科学基金(7102137)。

以上，并对该部位进行整体动物药效学实验，以期为阐明白英抗肿瘤有效部位提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂　白英甾体总生物碱，由中国中医科学院西苑医院实验研究中心中药化学室制备，含量为58.6 %；称取甾体总生物碱溶于双蒸水中，配成浓度分别为1.2，2.4，4.8 mg·mL^{-1}的溶液。紫杉醇，太极集团四川太极制药有限公司，批号：10090029，每次给药前用生理盐水稀释至浓度为0.8 mg·mL^{-1}的溶液。

1.2 动物　BALB/c裸小鼠，由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，4~5周龄，体质量12~15 g，雌性，每组8只，共40只。动物使用许可证号：SYXK(军)2007-030。

1.3 仪器　AVANCE 400 MHz、600 MHz核磁共振波谱仪，瑞士布鲁克公司；Micromass Zabspec高分辨磁质谱仪，英国Waters公司。D151型离子交换大孔树脂，安徽天康集团医药树脂有限公司。

1.4 方法

1.4.1 白英甾体总生物碱的制备　综合单因素考察和正交实验优化结果，最终确定白英甾体总生物碱的提取工艺参数为8倍生药量60 %乙醇、100 ℃回流提取3次、每次提取3 h。白英甾体总生物碱的精制工艺采用D151型离子交换大孔树脂工艺：减压回收白英药材提取液，浓缩至无醇味，静置，取上清液过D151型离子交换大孔吸附树脂，载药树脂用3倍柱体积的水和95 %乙醇依次洗脱，弃去水和95 %乙醇洗脱液，继续用95 %酸性乙醇洗脱载药树脂，收集酸性乙醇洗脱液，氨水中和后减压浓缩该酸性乙醇洗脱液，用AB-8型大孔树脂脱盐，浓缩至干即为白英甾体总生物碱。

1.4.2 白英甾体总生物碱的含量测定　精密吸取样品溶液适量置60 mL分液漏斗中，精密加入pH为4.0的磷酸氢二钠-枸橼酸缓冲液5.0 mL及溴酚蓝溶液1.0 mL，振摇均匀，分别精密加入三氯甲烷10.0 mL，剧烈振摇2 min，静置30 min，分取三氯甲烷层，同法制成空白对照溶液，在408 nm处测定吸收度，以澳洲茄碱为标准品，计算白英甾体总生物碱的含量。

1.4.3 模型复制　将液氮中冻存的人肺癌细胞A549在37 ℃水浴中快速解冻。在超净工作台内，PBS清洗复苏的细胞2次，0.2 mL PBS重新混匀细胞，接种于裸鼠腹腔内。8 d后，小鼠腹部肿大，断颈处死小鼠，乙醇浸泡后于超净工作台内抽取腹水。离心抽取的腹水，用PBS清洗细胞2次，PBS重悬细胞，计数，调整细胞悬液浓度为1×10^7个·mL^{-1}；每只裸鼠右侧腋窝皮下接种0.1 mL(1×10^6个细胞)。

1.4.4 分组及给药　裸鼠移植瘤用游标卡尺测量移植瘤直径，接种14 d后，肿瘤直径生长至50~75 mm时将动物随机分为5组，每组8只，同时，开始给药紫杉醇组，尾静脉注射阳性对照药紫杉醇(Paclitaxel) 8 mg·kg^{-1}，隔天1次，共持续23 d；白英甾体总生物碱低、中、高剂量组；灌胃给予白英甾体总生物碱12，24，48 mg·kg^{-1}，每天1次，持续23 d；模型组，灌胃给予等量溶媒，每天1次，持续23 d。使用测量瘤径的方法，动态观察白英甾体总生物碱的抗肿瘤效应，给药23 d后处死裸鼠，手术剥取瘤块称质量。

1.4.5 观测指标　(1)肿瘤体积(tumor volume，TV)计算公式为：$TV=1/2\times a\times b^2$（其中a、b分别表示长和宽)。根据测量的结果计算出相对肿瘤体积(relative tumor volume，RTV)，计算公式为：$RTV=V_t/V_0$。其中V_0为分笼给药时(即d_0)测量所得肿瘤体积，V_t为每一次测量时的肿瘤体积。

抗肿瘤活性的评价指标：相对肿瘤增殖率T/C(%)，计算公式如下：

$$T/C(\%)=\frac{T_{RTV}}{C_{RTV}}\times100$$

（其中T_{RTV}：治疗组RTV；C_{RTV}：阴性对照组RTV）

(2) 抗肿瘤活性的评价指标：肿瘤生长抑制率(%)，计算公式如下：

$$肿瘤生长抑制率=\frac{给药组平均瘤质量-模型组平均瘤质量}{模型组平均瘤质量}\times100\ \%$$

1.5 统计学处理方法　实验数据采用SPSS17.0统计软件处理，实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较采用方差分析进行比较。$P<0.05$被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白英甾体总生物碱对人肺癌细胞A549裸鼠异种移植肿瘤生长的抑制作用　见表1。白英甾体总生物碱低、中、高剂量组的T/C分别为85.52 %、60.64 %、45.24 %，抑瘤率分别为2.35 %、49.79 %、48.93 %，而相同条件下紫杉醇组的T/C和抑瘤率分别为14.68 %、82.59 %。结果表明，紫杉醇有明显的抗肿瘤作用，白英甾体总生物碱均有一定的抗肿

表 1 白英甾体总生物碱对人肺癌细胞 A549 裸鼠异种移植肿瘤生长的抑制作用($\bar{x}\pm s$，n=8)

Table 1 Inhibitory effect of total alkaloids on the tumor growth of A549 human lung cancer cell in nude mice

组别	剂量 / mg·kg^{-1}	动物体质量 / g	起始肿瘤体积 /cm^3	处死动物体质量 /g	处死肿瘤体积 /cm^3	T/C/%	肿瘤质量 / g	抑瘤率 / %
模型组	–	18.09 ± 0.58	0.062 ± 0.019	23.05 ± 0.68	1.380 ± 0.621		1.23 ± 0.58	–
紫杉醇组	8	18.09 ± 0.66	0.062 ± 0.023	17.83 ± 1.52**	0.205 ± 0.100**	14.68	0.20 ± 0.10**	82.59
白英低剂量组	12	18.25 ± 0.35	0.065 ± 0.173	20.88 ± 0.74**	1.225 ± 0.652	85.52	1.14 ± 0.66	2.35
白英中剂量组	24	17.74 ± 0.76	0.063 ± 0.016	20.46 ± 1.11**	0.742 ± 0.356*	60.64	0.59 ± 0.40*	49.79
白英高剂量组	48	17.96 ± 0.79	0.064 ± 0.020	19.19 ± 1.74**	0.698 ± 0.442*	45.24	0.60 ± 0.36*	48.93

注：与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

瘤作用，其中中、高剂量组抗肿瘤作用更明显。

2.2 白英甾体总生物碱对人肺癌细胞 A549 裸鼠异种移植瘤裸鼠体质量的影响 见图 1。模型组小鼠平均体质量增长略快，而紫杉醇组小鼠质量呈下降趋势，白英甾体总生物碱中、高剂量组小鼠体质量增长速度在模型组和紫杉醇组之间。

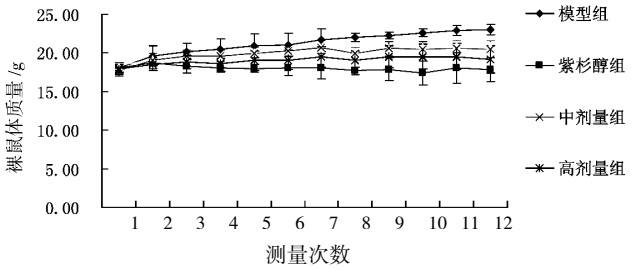


图 1 白英甾体总生物碱对人肺癌细胞 A549 裸鼠异种移植瘤裸鼠体质量的影响

Figure 1 Influence of total alkaloids on the body weight of nude mice with A549 human lung cancer cell

2.3 白英甾体总生物碱对人肺癌细胞 A549 裸鼠异种移植肿瘤生长体积变化的影响 见图 2。模型组肿瘤体积增长速度最快，紫杉醇组肿瘤体积增长最慢，白英甾体总生物碱中、高剂量组肿瘤体积增长速度介于两者之间。

2.4 白英甾体总生物碱对人肺癌细胞 A549 裸鼠异种移植肿瘤生长的抑制作用 见图 3。紫杉醇组显著抑制人肺癌细胞 A549 裸鼠异种移植瘤生长，与模型组比较，差异有统计学意义($P < 0.01$)，白英甾体总生物碱中、高剂量组能显著抑制人肺癌细胞 A549 裸鼠异种移植瘤生长，与模型组比较，差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 实验小鼠肿瘤图片 见图 3。

3 讨论

以往文献报道[7-11]的白英抗肿瘤有效部位研究，

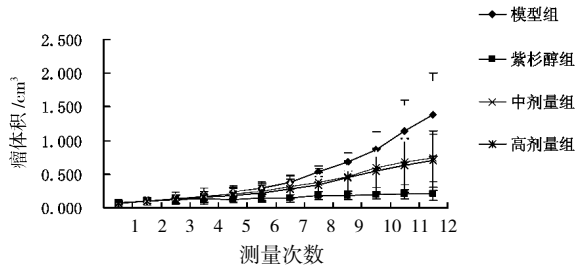
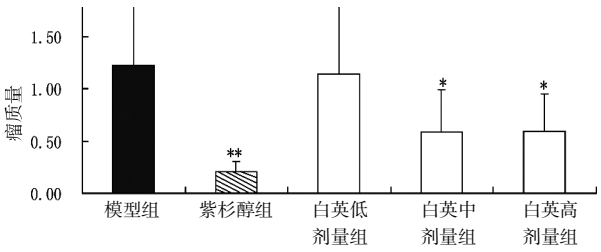


图 2 白英甾体总生物碱对人肺癌细胞 A549 裸鼠异种移植瘤裸鼠生长体积的影响

Figure 2 Influence of total alkaloids on the cancer mass size in nude mice with A549 human lung cancer cell



注：与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

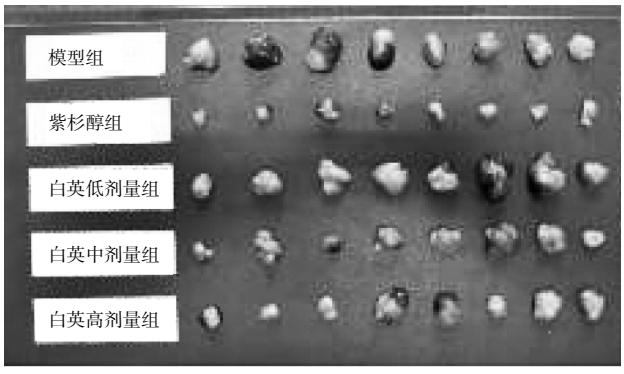


图 3 小鼠分组及瘤体剥离图片

Figure 3 Gragh for groups of the nude mice and the isolated tumor mass

使用的样品多数为水粗提取物或正丁醇萃取部位，认为这些部位中主要抗肿瘤组分是甾体总皂苷，但是鉴于这些样品制备方法不具备专属性富集的特征，含量

较低，因此抑瘤率较低，特别是难以阐明发挥抗肿瘤作用的有效组分。本文使用的样品，采用专属性富集甾体生物碱的制备工艺，因此具有良好的抑瘤率，远远高于现有文献报道方法制备样品的肿瘤抑制效果，并且可以充分说明白英的抗肿瘤有效组分为白英甾体总生物碱。

从白英中提取的甾体生物碱并非浓度越高抗癌性越好，其抗癌性最佳剂量为中剂量，相当于生药量 8 g·kg^{-1}，这一剂量折算成临床人体等效剂量，与白英临床常用剂量完全一致，进一步支持该方法富集的白英提取物能代表白英的抗肿瘤效果。由于大剂量和小剂量的抗肿瘤药效均较低，说明白英甾体生物碱对 Lewis 肺癌抑制作用量效关系为倒 U 型关系。这是典型的靶向型量效关系，说明白英提取物可能具有靶向型抗肿瘤作用特点。有报道，用白英每天 60 g 或加少许红枣煎服治疗毛细血管瘤 3 例，均在 1 个月左右痊愈。白英对毛细血管瘤具有一定的疗效，预示白英可能通过抑制肿瘤血管新生机制实现抗肿瘤作用。大量证据表明，肿瘤血管新生在肿瘤从良性向恶性转变、癌细胞进入血液以及转移灶形成和发展中均起关键作用。目前大多数抗肿瘤药物由于基因(如 p53)的变异等因素导致多药耐药(multiple drug resistance，MDR)现象，但是因为和正常机体细胞比较，肿瘤细胞的发育更依赖于血管新生，这使抗血管新生的抗肿瘤药物不存在多药耐药性。因此抗血管新生机制为从肿瘤发生、发展过程中的多个环节创制抗肿瘤新药提供了崭新思路，成为肿瘤细胞毒类治疗药物研究的前沿领域之一，具有广阔的发展前景。

根据白英对小鼠移植性肿瘤 Lewis 肺癌的实验研究结果，证明白英甾体生物碱部位为白英抗小鼠移植性肿瘤主要药效部位。对该部位进行深入的化学成分及其作用机理研究，对阐明白英抗肿瘤机制，创制新药、建立高水平的质量标准均具有重要意义。

参考文献：

[1] 吴婉莹，高志刚，李云谷. 白英和欧白英的化学成分与药理活性[J]. 国外医药植物药分册，2001，16(6)：245-247.

[2] 孙立新，毕开顺，王敏伟. 中药白英的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报，2006，23(4)：251-255.

[3] 徐顺，王林江，刘宏民. 白英化学成分和药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药，2006，17(4)：253-254.

[4] 尹海龙，李建，董俊兴. 白英的化学成分研究（Ⅱ)[J]. 军事医学，2013，37(4)：27-30.

[5] 涂硕，万福生，韦星，等. 白英生物碱通过激活 FAS 途径诱导人肺癌 549 细胞凋亡的研究[J]. 时珍国医国药，2013，24（1)：277-274.

[6] 孙立新，任靖，王敏伟，等. 白英抗肿瘤活性部位筛选[J]. 沈阳药科大学学报，2005，22(3)：210-212.

[7] 韦星，李朝敢，农嵩，等. 白英提取液对 Hela 细胞凋亡及 Fas/FasL 基因表达的影响[J]. 中药材，2006，29(11)：1203-1207.

[8] 韦星，李朝敢，农嵩. 白英提取物诱导乳腺癌 MCF27 细胞凋亡及其对凋亡相关基因表达的影响[J]. 右江医学，2007，35(4)：357-359.

[9] 孙立新，任靖，王敏伟，等. 白英水提物抗肿瘤作用的初步研究[J]. 中草药，2006，37(1)：98-100.

[10] 任靖，冯国楠，王敏伟，等. 白英乙醇提取物抗肿瘤作用初步研究[J]. 中国中药杂志，2006，31(6)：497-500.

[11] 施文荣，刘艳. 白英对人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞生长的影响[J]. 福建中医学院学报，2002，12(1)：36-39.

（编辑：邓响潮）

·简讯·

《中药新药与临床药理》杂志为中药新药研发、中药临床药理学科重要的学术交流平台，学科影响指标、影响因子以及学科排序在全国同类期刊中位居前列，并全面进入国内重要的核心期刊评价系统，是中国中文核心期刊、中国科技核心期刊、RCCSE 中国核心学术期刊，2013 年经过中国科学引文数据库（简称 CSCD）的定量遴选、学科专家评审和中国科学引文数据库来源期刊遴选委员会的评议，本刊再次入选为 2013~2014 年度中国科学引文数据库来源期刊。在 2012 年出版的《中国学术期刊影响因子年报（自然科学与工程技术)》中本刊影响因子数据：复合影响因子 JIF 为 1.271，他引 JIF 为 1.140；期刊综合影响因子 JIF 为 0.841，他引 JIF 为 0.797；基金论文比为 0.81，在中医学与中药学类 119 种期刊中列第 5 位，成为中医药行业具有较高学术地位和重要影响力的期刊之一。

（《中药新药与临床药理》编辑部辑）