

海桐皮提取物的抗肿瘤活性及其机制研究

张虹¹, 向俊锋¹, 谭莉¹, 戴玮¹, 白鸽², 刘岩¹, 曹学丽², 唐亚林^{1*}

(1. 中国科学院化学研究所分子动态与稳态结构国家重点实验室, 北京 100190;

2. 北京工商大学北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100037)

摘要: 本研究探讨了海桐皮提取物的抗肿瘤活性及其作用机制。首先应用 MTT 法对海桐皮提取物进行体外细胞毒效应实验。为明确体内抗肿瘤疗效, 建立了 Lewis 肺癌的小鼠模型, 通过对比各组小鼠的相对肿瘤增值率、肿瘤生长曲线、抑瘤率、瘤重等指标考察海桐皮提取物的抑瘤效果。并通过 G-四链体的稳定性实验, 探讨了海桐皮的抗肿瘤作用机制。结果显示, 海桐皮提取物在体外对肿瘤细胞增生具有抑制作用, 在体内的抗肿瘤药效实验中也表现出明显的抗肿瘤活性。从 G-四链体的稳定性实验结果可以看出, 随着海桐皮提取物加入量的增加, G-四链体的熔点 (T_m) 逐步提高, 其对 G-四链体结构具有很好的稳定作用。

关键词: 海桐皮; 抗肿瘤活性; G-四链体

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 12-1359-05

Anti-tumor activity of *Erythrina variegata* L. extract and its mechanism of action

ZHANG Hong¹, XIANG Jun-feng¹, TAN Li¹, DAI Wei¹, BAI Ge², LIU Yan¹, CAO Xue-li², TANG Ya-lin^{1*}

(1. State Key Laboratory for Structural Chemistry of Unstable and Stable Species, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 2. Beijing Key Lab of Plant Resource Research and Development, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037, China)

Abstract: The anti-tumor activities and mechanism of *Erythrina variegata* L. extract were investigated. Firstly, the MTT method was used to evaluate the inhibitory activity of the *Erythrina variegata* L. extract on proliferation of cancer cell lines. Moreover, in order to determine its anti-tumor effect *in vivo*, the Lewis lung cancer mice model was established. By comparing the relative tumor proliferation rates, growth curves, inhibition rates of different groups, the anti-tumor effect was evaluated. Furthermore, the anti-tumor mechanism of *Erythrina variegata* L. extract was studied by using G-quadruplex stability experiment. In the *in vitro* anti-liver cancer experiment, the *Erythrina variegata* L. extract has shown obvious anti-tumor effect on various tumor cells. And in the *in vivo* experiment, it exhibited significant anti-tumor effect. Besides, from the result of G-quadruplex stability experiment, we can see that the quadruplex structure show increasing T_m values with increasing amounts of *Erythrina variegata* L. extract.

Key words: *Erythrina variegata* L.; anti-tumor activity; G-quadruplex

海桐皮 (*Erythrina variegata* L.) 为我国传统中药, 具有祛风除湿、舒筋通络、杀虫止痒功效, 历代草本均有记载。目前在我国药材市场流通的海桐皮主要有 6 个品种, 分属豆科、芸香科、五加科及木棉科

等。在我国广东、广西、海南、江苏、浙江、贵州、四川、台湾等地均有栽培。人们开展对海桐皮活性成分的研究已有很长历史。Ghosal 等^[1]曾从 *Erythrina variegata* L. 中分离得到 8 个芳香刺桐生物碱和 3 个羧基-吲哚-3-烷基胺。García-Mateos 等^[2]从 *Erythrina coralloides* 和 *Erythrina americana* 两种植物种子的愈伤组织中分离得到了该类植物特征性的四环生

收稿日期: 2009-06-11.

*通讯作者 Tel: 86-10-62522090, Fax: 86-10-82617302,

E-mail: tangyl@iccas.ac.cn

物碱,观察到含氧生物碱的不同构象。Wätjen 等^[3]从 *Erythrina addisoniae* Hutch. & Dalziel 中分离得到两种紫檀烷类黄酮。Cui 等^[4]针对 *Erythrina abyssinica* 中的黄酮类化合物进行了分离和植物化学研究。2009 年 Ozawa 等^[5,6]从 *Erythrina velutina* 中分离出 3 种刺桐生物碱^[7]。以上均表明该属植物含有丰富的活性成分,特别是具有潜在抗肿瘤活性和(或)增强活性的生物碱和黄酮类化合物,极有可能成为新型抗肿瘤药物来源。然而,迄今为止,对于海桐皮药材本身的抗肿瘤活性的研究却少有报道^[8]。因此,作者针对海桐皮的提取物开展了系统的体外及体内抗肿瘤活性研究。

除此之外,随着对肿瘤研究的不断深入,端粒及端粒酶与肿瘤永生化的关系近几年来受到国内外生物、化学及医药界的高度重视^[9]。研究结果表明:人类 85%~90% 肿瘤细胞的端粒酶活性呈阳性,而正常组织及良性病变组织中仅为约 5%^[10]。因而认为,端粒酶与肿瘤细胞的发生、发展有着极为重要的关系。人端粒的 3' 富含 G 碱基的突出端单链在生理离子(如 K^+ 和 Na^+) 浓度条件下通过 Hoogsteen 氢键与自身链或其他链上的 G 碱基形成 G-四集体。G-四集体可以堆积在一起形成不同结构的 G-四链体。研究表明,端粒 DNA G-四链体结构能够阻止端粒酶对端粒 3' 端进行延长,因而对端粒酶具有抑制作用。所以,高效特异地稳定或诱导形成的这种 G-四链体结构小分子可以作为端粒酶的有效抑制剂^[11, 12],因而也有可能成为潜在的抗肿瘤药物前体。本研究在体外及体内的抗肿瘤活性实验的基础上,探讨了海桐皮提取物对 G-四链体的稳定能力,进而初步阐明海桐皮的抗肿瘤作用机制。

材料与方法

海桐皮提取物的制备 海桐皮药材购自北京同仁堂股份有限公司(货号:01500900,生产批号:1601000255),采集地为浙江。经中国中医科学院中药研究所胡世林研究员鉴定属五加科海桐皮(*Erythrina variegata* L.)。

取海桐皮 200 g,将其以 1:3(海桐皮:95%乙醇)混合,80 °C 回流提取 3 h,抽滤,收集提取液。滤渣回流提取 3 次,合并提取液,真空减压浓缩、真空干燥至恒重,得到 0.9 g 海桐皮提取物(收率约为 0.45%)。经体内外抗肿瘤活性测定可知,海桐皮提取物可有效抑制肿瘤细胞的生长,具有抗肿瘤活性^[8]。

目前通过将海桐皮提取物利用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇分段萃取后所得各段进行各类物质的显色反应,初步鉴定为该提取物中含有鞣质、黄酮、皂苷及生物碱类物质。

肿瘤细胞株及实验动物 肿瘤细胞 HepG-2(人肝癌细胞)、BEL-7402(人肝癌细胞)、HCT-8(结肠癌细胞)、A-549(肺癌细胞),由中国科学院上海细胞生物学研究所提供。小鼠 Lewis 肺癌细胞株由北京肿瘤医院研究所病理研究室提供。SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠(动物来源:中国医学科学院实验动物研究所;测试单位:北京昭衍新药研究中心有限公司),动物周龄:4~6 周,动物体重:(19.89 ± 1.04) g。

试剂及仪器 高糖 DMEM 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司产品);噻唑蓝(MTT,北京索来宝科技有限公司);二甲基亚砜(北京北化精细化学品有限责任公司,分析纯);顺铂注射液(DDP,科鼎医疗有限公司);0.9%氯化钠注射液(山东华鲁制药有限公司);DNA(上海英俊生物技术有限公司);经 PAGE 纯化,其序列为:5'-TTAGGG-3';磷酸盐缓冲溶液(PBS- K^+):17.20 mmol·L⁻¹ K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7.04)。

BIO-RAD550 型酶标仪(美国 Bio-Rad 伯乐公司产品);3111 型二氧化碳培养箱(美国 ThermoForma 公司产品);超净工作台(北京昌平长城空气净化工程公司产品);细胞培养瓶及 96 孔细胞培养板(美国 Corning/Costar 产品);十万分之一天平(德国赛多利斯产品);pH 计(上海康仪仪器有限公司,型号:PHS-3C);高速台式冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司,型号:TGL-16);圆二色谱(CD)(日本分光株式会社,型号:Jasco-815)。

体外抗肿瘤实验 将对数生长期的肿瘤细胞 HepG-2、BEL-7402、HCT-8 和 A-549 用 0.25% 胰蛋白酶消化,然后用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液制成细胞悬液,分别将肿瘤细胞稀释至 5.0×10^4 /mL,再将其接种至 96 孔培养板中,每孔 200 μ L,于 37 °C、5% CO_2 的培养箱内培养 24 h。待细胞完全贴壁后,HepG-2 实验组每孔加入含不同浓度(5、25、50、75 和 100 μ g·mL⁻¹)海桐皮提取物的 DMEM 培养液 200 μ L。BEL-7402、HCT-8、A-549 肿瘤细胞组进行单浓度 50 μ g·mL⁻¹ 测定。阴性对照组加入含等体积药物溶剂的 DMEM 培养液 200 μ L;另单设不含细胞的 DMEM 培养液 200 μ L 为空白对照组。每一个浓度设 3 个平行孔,培养 72 h 后各孔分别加入 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 20 μ L,再培养 4 h 后,倾去各

孔培养液,分别加入 DMSO 200 μL , 15 min 后用酶标仪在 490 nm 测定各孔吸收度 (A) 值。计算药物各个浓度对肿瘤细胞的抑制率。抑制率 (%) = $[1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$

体内抗肿瘤实验 将冻存的 Lewis 肺癌瘤块接种于小鼠,制备 F1 代荷瘤种鼠,待肿瘤生长至 1 g 左右,接种小鼠,制备 F2 代荷瘤小鼠。选择肿瘤生长旺盛且无溃破、健康状况良好的荷瘤小鼠,无菌条件下取瘤,制备成 3 mm^3 ,接种于各动物右侧腋窝下。Lewis 肺癌生长迅速,当肿瘤体积长至约 50~80 mm^3 时,将动物随机分组后给予不同药物。海桐皮提取物组 (1 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和阴性对照组 (等体积生理盐水) 灌胃给药,每天 1 次。阳性对照组 (0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 顺铂溶液 10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) 腹腔注射给药,每周 1 次。

肿瘤体积 (V) = $1/2 \times a \times b^2$, 其中, a 、 b 分别表示长、宽。根据测定的结果计算出相对肿瘤体积 (RTV), 计算公式: $\text{RTV} = V_t / V_0$ 。其中 V_0 为给药前肿瘤体积, V_t 为给药后每 1 次测量的肿瘤体积。以平均 RTV 值绘制肿瘤生长曲线。为了定量评价各组的疗效,引入评价指标相对肿瘤增值率 T/C (%), 计算公式为: $T/C = T_{\text{RTV}} / C_{\text{RTV}}$, 其中 T_{RTV} 为治疗组的 RTV; C_{RTV} 为阴性对照组的 RTV。以第 9 天和第 16 天的 RTV 值计算相对肿瘤增值率,并作疗效评价。治疗、观察后,将小鼠实施安乐死,剥离肿瘤并称重,抑瘤率 = $(1 - W_{\text{drug}}/W_{\text{NC}}) \times 100\%$ (W_{drug} 为给药组的肿瘤重量, W_{NC} 为阴性对照组的肿瘤重量)。

G-四链体的稳定性实验 G-四链体的制备方法参照相关文献^[13, 14]。具体过程: 固体 DNA 样品经高速离心后 (12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min), 加入 PBS-K⁺ 缓冲溶液,充分振荡使得 DNA 完全溶解。上述样品静置 24 h 后,进行实验操作。

由于 G-四链体具有特征的 CD 信号,可以采用检测特征 CD 信号的方法来检测海桐皮提取物对 G-四链体的稳定能力^[15, 16]。通过检测 262 nm 处的 CD 信号,观测 G-四链体的熔点随海桐皮提取物加入的变化 (ΔT_m), 评价其对 G-四链体的稳定能力。CD 光谱的实验条件为: 样品池为光程长 1 cm 的石英池,扫描范围为 200~400 nm; 变温实验参数: 升温范围 35~70 $^{\circ}\text{C}$, 升温速度: 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; DNA 的浓度为 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 海桐皮提取物的质量浓度为 25、50 及 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用生物统计学软件 SPSS 13.0 的独立样本 t 检验进行组间差异比较。

结果

1 海桐皮提取物对肿瘤细胞增殖的抑制作用

MTT 检测结果发现,海桐皮提取物的质量浓度为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对肿瘤细胞株 HepG-2、BEL-7402、HCT-8、A-549 均有一定程度的抑制作用,抑制率分别为 46%、43.15%、29.14% 和 43.28%。

为明确其量效关系,开展了系列浓度的海桐皮提取物对人肝癌细胞 HepG-2 的增殖抑制实验 (表 1)。结果表明,海桐皮提取物对人肝癌细胞 HepG-2 的生长具有抑制作用, IC_{50} 值为 56.13 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

Table 1 Inhibition rates of the *Erythrina variegata* L. extract on HepG-2 cells ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Dose/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	A	Inhibition/%
<i>Erythrina variegata</i>	5	0.203 \pm 0.014	4.2
L. extract	25	0.178 \pm 0.014	20.5
	50	0.140 \pm 0.015	46.0
	75	0.124 \pm 0.019	56.6
	100	0.094 \pm 0.011	76.6
Control	-	0.210 \pm 0.010	-
Blank	-	0.058 \pm 0.011	-

2 海桐皮提取物的体内抗肿瘤作用

在整个实验过程中,阴性对照组 (control) 的肿瘤呈现连续增长的趋势;海桐皮提取物组 (1 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和阳性对照组 (DDP 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的肿瘤生长被抑制,肿瘤生长缓慢,且随着给药时间的延长,与同期阴性对照组比较差异越显著 (图 1)。

结果显示,阳性对照组及海桐皮提取物组的瘤重均显著低于阴性对照组。海桐皮提取物组的肿瘤生长抑制率为 51.22%,阳性对照组的肿瘤生长抑制率为 49.19%,表明海桐皮提取物对肿瘤具有抑制作用 (表 2)。

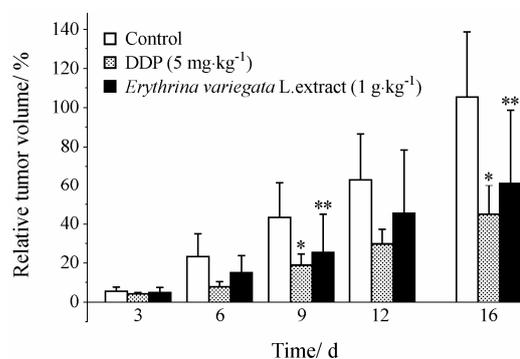


Figure 1 Growth of the tumors of mice with Lewis lung cancer by relative tumor volume. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

Table 2 Therapeutic effect of *Erythrina variegata* L. extract on Lewis tumor

Group	Mass of tumor /g	Inhibition rate/%	T/C (%)	
			9th day	16th day
Control	6.60 ± 1.71	—	—	—
DDP (5 mg·kg ⁻¹)	3.35 ± 1.27**	49.19	44.11*	42.76*
<i>Erythrina variegata</i> L. extract (1 g·kg ⁻¹)	3.32 ± 1.54**	51.22	58.62**	56.22**

n = 10, $\bar{x} \pm s$. *P < 0.05, **P < 0.01 vs control group

3 海桐皮提取物对 G-四链体的稳定作用

DNA [TTAGGG]₄在 PBS-K⁺中的 CD 光谱上在约 262 nm 处有 1 个正信号峰, 在约 245 nm 处存在 1 个较弱的负信号峰, 该信号说明在该实验条件下 DNA 形成了平行结构的 G-四链体结构^[17](图 2)。小分子结合到 G-四链体后, 依靠小分子与 G-四链体之间的作用力来稳定 G-四链体的结构, 从而抑制端粒酶的活性。因此, 作者研究了海桐皮提取物稳定 G-四链体的能力(图 3)。在没有加入海桐皮提取物时, 随着温度的升高, [TTAGGG]₄在 262 nm 处的 CD 光谱信号逐渐降低, 单独 G-四链体的 T_m值为 50 °C。在加入海桐皮提取物后, 262 nm 处的 CD 光谱信号随温度的变

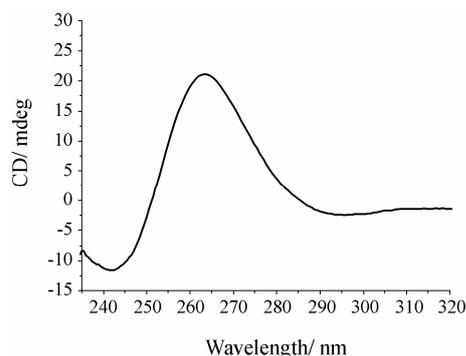


Figure 2 CD spectra of [TTAGGG]₄ in PBS-K⁺ buffer solution

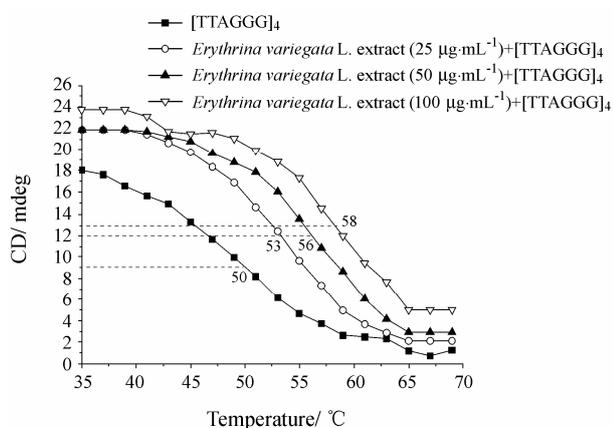


Figure 3 Effect of *Erythrina variegata* L. on the CD melting curves of G-quadruplexes monitored at 262 nm

化减缓, 海桐皮提取物 (25、50 和 100 µg·mL⁻¹) 可使 G-四链体的熔点分别提高 3 °C、6 °C 和 8 °C。此结果表明, 海桐皮提取物具有稳定 G-四链体结构的作用。

讨论

从自然界中寻找和发现具有生物活性的先导化合物是创新药物研究的重要方向之一。天然产物是抗癌药物的重要来源。目前已报道的具有抗肿瘤活性的植物成分超过 400 种, 从 20 世纪 40 年代起到 2006 年 6 月, 全球应用的 175 种抗癌药物中, 有 57% 直接或间接来源于天然产物。本文对海桐皮提取物进行了体外及体内的抗肿瘤活性研究并对其机制进行了探讨。

依据国家药物筛选中心的筛选原则, 在多种肿瘤细胞模型上针对 50 µg·mL⁻¹ 海桐皮提取物进行了 MTT 检测。由于海桐皮提取物对人肝癌细胞 HepG-2 的抑制率较高, 作者针对 HepG-2 细胞进行了浓度梯度测试, 并计算了 IC₅₀; 从 MTT 检测结果可以看出, 海桐皮提取物对多种人肿瘤细胞株均有抑制增生的效果。在质量浓度为 50 µg·mL⁻¹ 时, 对人肝癌和肺癌细胞株的抑制率均大于 30%。且海桐皮提取物对人肝癌细胞 HepG-2 的生长抑制作用随着药物浓度的升高而增强, 具有量效关系。在体内抗肿瘤药效评价中, 以相对肿瘤增值率评价抗肿瘤药物是否有效的标准: T/C > 40% 为无效; T/C ≤ 40%, 经统计学分析 P < 0.05, 为有效。而以抑瘤率为指标的评价标准为抑瘤率 < 40% 为无效; 抑瘤率 ≥ 40% 为有效。从抑瘤率、瘤重、肿瘤生长变化曲线的综合评价来看, 海桐皮提取物具有良好的抗肿瘤效果。为下一步扩大抗癌谱进行更深层次的研究奠定了基础。

为了探讨抗肿瘤作用的机制, 利用变温 CD 研究了海桐皮提取物对 G-四链体的稳定能力。结果显示, G-四链体的 T_m 值随海桐皮提取物的加入量增加而逐渐升高。该实验结果表明, 海桐皮提取物具有稳定 G-四链体结构的能力。由前述可知, G-四链体结构能够防止端粒酶对端粒 3' 端进行延长, 对端粒酶具有抑制作用。由此可以推测, 海桐皮提取物的抗肿瘤活性与其 G-四链体稳定能力具有一定的相关性, 可通过稳定 G-四链体结构, 进而抑制端粒酶的活性, 破坏肿瘤细胞的永生性, 最终导致肿瘤细胞凋亡。

References

- [1] Ghosal S, Dutta SK, Bhattacharya SK. Erythrina-chemical and pharmacological evaluation 11: alkaloids of *Erythrina variegata* L. [J]. J Pharm Sci, 1972, 61: 1274–1277.
- [2] García-Mateos R, Soto-hernandez M, Martínez-vazquez M, et al. Isolation of alkaloids of erythrina from tissue culture [J]. Phytochem Anal, 1999, 10: 12–16.
- [3] Wätjen W, Kulawik A, Suckow-schnitker AK, et al. Pterocarpan phaseollin and neorautenol isolated from *Erythrina addisoniae* induce apoptotic cell death accompanied by inhibition of ERK phosphorylation [J]. Toxicology, 2007, 242: 71–79.
- [4] Cui L, Thuong PT, Lee HS, et al. Flavanones from the stem bark of *Erythrina abyssinica* [J]. Bioorg Med Chem, 2008, 16: 10356–10362.
- [5] Wang S, El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors [J]. Oncogene, 2003, 22: 8628–8633.
- [6] Ozawa M, Etoh T, Hayashi M, et al. TRAIL-enhancing activity of Erythrinan alkaloids from *Erythrina velutina* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19: 234–236.
- [7] Pietroa AD, Conseila G, Pérez-Victoria JM, et al. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters [J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59: 307–322.
- [8] Tang YL, Tan L, Dai W, et al. The new anti-tumor application of *Erythrina variegata* L. extract: China, 200810115667.0 [P]. 2008-10-11.
- [9] Jenkins TC. Targeting multi-stranded DNA structures [J]. Curr Med Chem, 2000, 7: 99–115.
- [10] Saretzki G. Telomerase inhibition as cancer therapy [J]. Cancer Lett, 2003, 194: 209–219.
- [11] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. Science, 1994, 266: 2011–2015.
- [12] Evonne MR, David JB, Hurley LH. Telomeres and telomerases as drug targets [J]. Curr Opin Pharmacol, 2002: 415–423.
- [13] Mita H, Ohyama T, Tanaka Y, et al. Formation of a complex of 5, 10, 15, 20-tetrakis (*N*-methylpyridinium-4-yl)-21*H*, 23*H*-porphyrin with G-quadruplex DNA [J]. Biochemistry, 2006, 45: 6765–6772.
- [14] Fedoroff OY, Salazar M, Han HY, et al. NMR-based model of a telomerase-inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA [J]. Biochemistry, 1998, 37: 12367–12374.
- [15] Rachwal PA, Fox KR. Quadruplex melting [J]. Methods, 2007, 43: 291–301.
- [16] Fu B, Huang J, Ren L, et al. Cationic corrole derivatives: a new family of G-quadruplex inducing and stabilizing ligands [J]. Chem Commun, 2007, 31: 3264–3266.
- [17] Balagurumoothy P, Brahmachari SK, Mohanty D, et al. Hairpin and parallel quartet structures for telomeric sequences [J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20: 4061–4067.