

从海南哥纳香中分离的一种新化合物 ——海南哥纳香醇甲的抗肿瘤作用

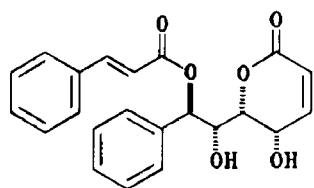
何剑华 叶玉梅 徐承熊

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 体外用细胞生长曲线测定法、MTT 试验、软琼脂集落形成分析法, 及体内对移植性肿瘤实验, 研究了海南哥纳香醇甲(GHM-10)的抗肿瘤作用, 结果表明: GHM-10 对肿瘤细胞有较强的抑制作用, IC_{50} 在 $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 左右; 对正常细胞影响较小, 骨髓祖细胞的敏感性则更低; 耐药的 KB/VCR200 细胞及其亲本 KB 细胞具有相似的敏感性。GHM-10 对 HL-60 细胞无分化诱导作用。GHM-10 对实体型肝癌 H22 小鼠、Lewis 肺癌小鼠及腹水型 S180 小鼠均有明显的治疗作用。

关键词 海南哥纳香醇甲; 海南哥纳香; 抗肿瘤作用

番荔枝科(Annonaceae)植物是一类生长在热带或亚热带的树木或灌木, 我所于德泉教授等于 1992 年开始了番荔枝科植物的研究, 对其中的 9 种植物进行了化学成分的分鉴定, 共获得化合物 100 多种, 其中新化合物 43 种。我们用体外 MTT 试验和小鼠肉瘤 180 腹水型生命延长率为指标, 从这 100 多种化合物中选出 58 个化合物进行抗肿瘤活性筛选, 12 个化合物显示了抗肿瘤活性, 其中 4 个化合物活性较好^[1]。海南哥纳香醇甲(GHM-10)是从海南哥纳香(*Goniothalamus howii*)中分离得到的一种苯乙烯吡喃酮类化合物, 其结构(见结构式)新颖, 国内外尚未见报道。本文对 GHM-10 的体内和体外抗肿瘤作用作进一步的研究。



The chemical structure of GHM-10.

材 料 与 方 法

细胞 小鼠淋巴白血病 L1210 细胞、人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞由美国 Mount Sinai 医学院 K. Scanlon 博士赠送。人肝癌 Bel 7402 细胞、人口腔癌 KB 细胞、人结肠癌 HCT-8 细胞、人卵巢癌 A2780 细胞及中国仓鼠肺 CHL 细胞均由本室传代保种。人口腔癌 KB 细胞耐长春新碱株(KB/VCR200)由我所籍秀娟教授赠送。

动物及动物瘤株 昆明种小鼠及 C57BL/6 小鼠, 18~22 g, ♀ ♂ 兼用, 由本院实验动物所动物房提供; 动物移植性肿瘤小鼠肉瘤 180, 肝癌 H22 及 Lewis 肺癌均由本室传代保种。

药品 GHM-10 由本所植化室提供, 分子量为 380, 溶于 DMSO, 4℃ 保存, 用前以培养基稀释至所需浓度。

L1210 细胞、HL-60 细胞生长曲线的测定^[2] 取对数生长期的 L1210 细胞和 HL-60 细胞分别配成细胞浓度为 2×10^4 个 $\cdot\text{ml}^{-1}$ 和 4×10^4 个 $\cdot\text{ml}^{-1}$ 的细胞悬液, 分装于培养瓶中, 每组平行 3 瓶, 于接种同时加药, 对照组加等体积溶剂, 给药后置 37℃, 5% CO_2 的培养箱中培养, 于不同时间取一定量的细胞悬液, 按台盼蓝拒染法, 光镜下计数活细胞数。以培养天数对

每毫升细胞数作图,画出细胞的生长曲线。

MTT(溴化噻唑蓝四唑)试验检测 GHM-10 对肿瘤细胞的抑制率^[3] 将对数生长期细胞按 10^4 个·ml⁻¹ 浓度接种于 96 孔板中,每孔 200 μ l,次日弃培养基换含不同药物浓度及相应溶剂对照的培养基,每组设 3~5 个平行孔,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养 3~5 d 后,弃上清液,每孔加新鲜配制的含 0.2 μ g·ml⁻¹ MTT 的无血清培养基 200 μ l,继续培养 4 h,小心弃上清液,并加入 DMSO 200 μ l 溶解 MTT 甲臈(formazan)沉淀,用微型超声振荡器混匀,在 MODEL 450 型酶标仪上 570 nm 测定吸收度。按下式计算细胞生长的抑制率并计算 IC₅₀:

细胞生长抑制率 % =

$$\frac{\text{对照组吸收度} - \text{实验组吸收度}}{\text{对照组吸收度}} \times 100$$

软琼脂集落形成率的测定^[4] 采用双层软琼脂培养法,在 33 mm 平皿中加入不同浓度的药物及相应的溶剂后,底层加含有 0.5% 琼脂及 15% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基;上层加含 0.3% 琼脂,15% 小牛血清及 1000 个活细胞的 RPMI 1640 培养基,置 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养,7 d 后,在 16 \times 解剖镜下计数 50 个细胞以上的集落,每组平行 3 皿。小鼠骨髓粒单系造血祖细胞 GM-CFC 的集落形成率的测定按文献^[5]。

NBT(硝基蓝四氮唑)还原能力测定^[6] 收集药物作用 5 d 的 HL-60 细胞和对照 HL-60 细胞,在 4 $^{\circ}$ C 条件下 1000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清液,每管加入含 1% NBT,200 μ g·ml⁻¹ TPA 的生理盐水 0.5 ml,置 37 $^{\circ}$ C 水浴中保温 1 h,1000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清液,取细胞沉淀涂片,Wright-Geimsa 染色,油镜下每玻片观察 200 个细胞,计数阳性细胞百分数。

对小鼠肝癌 H22、Lewis 肺癌实体型的治疗作用 取生长良好的荷瘤小鼠,按常规方法无菌分离瘤组织,用生理盐水配成悬液,接种于 18~22 g 的昆明种小鼠(H22)或 C57BL/6 小鼠(Lewis)腋部皮下,于接种 24 h 后随机分组,

ig 给药,每日 1 次,共 10 次,11 d 后处死动物,称体重、瘤重,计算药物的抑瘤率。

对小鼠肉瘤 180 腹水型的治疗作用 取生长良好的荷瘤小鼠,无菌抽取腹水,用生理盐水 1:3 稀释,接种于 18~22 g 昆明种小鼠腹腔内,每鼠 0.2 ml,于接种 24 h 后,随机分组,ip 给药,每日 1 次,共 7 次,观察小鼠的存活天数,30 d 尚未死亡的小鼠以活存 30 d 计算,比较给药组和对照组的平均生存天数计算生命延长率。

结 果

1 GHM-10 对 HL-60 细胞和 L1210 细胞生长的影响

用不同浓度 GHM-10 处理 HL-60 细胞和 L1210 细胞,可见 HL-60 细胞和 L1210 细胞的生长均受到抑制,且呈浓度和时间依赖性,由图 1 可看出,2 μ g·ml⁻¹ 的 GHM-10 可抑制 L1210 细胞的生长,抑制率为 66.7%。2 μ g·ml⁻¹ 的 GHM-10 则完全抑制了 HL-60 细胞的生长(图 2)。

2 GHM-10 对体外培养的肿瘤细胞和正常细胞的影响

用 MTT 法观察了 GHM-10 (1~5 μ g·ml⁻¹) 对体外培养的人卵巢癌细胞 A2780、人肝癌细胞 Bel 7402、人口腔癌细胞 KB 和人结肠癌细胞 HCT-8 等肿瘤细胞,以及体外培养的正常细胞株中国仓鼠肺细胞 CHL 的影响。如图 3 所示,GHM-10 对肿瘤细胞具有较强的细胞毒作用,而对正常细胞 CHL 的细胞毒作用较弱。

3 GHM-10 对耐药细胞的影响

用 MTT 法研究发现:GHM-10 对耐药的 KB/VCR200 细胞与其亲本 KB 细胞具有相似的细胞毒作用,说明 GHM-10 与已知的抗癌药如长春新碱可能无交叉耐药,而长春新碱的抗药性属于多药抗药性,KB/VCR200 为多药抗药性瘤株(图 4)。

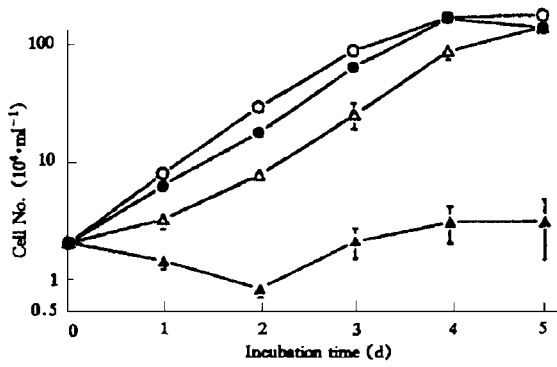


Fig 1 Inhibition of L1210 cell growth by different concentrations of GHM-10 ($n = 3, \bar{x} \pm s$). ○—○ Control; ●—● GHM-10 $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; △—△ GHM-10 $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; ▲—▲ GHM-10 $4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

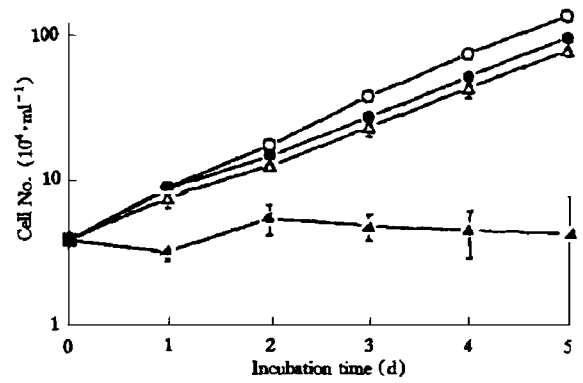


Fig 2 Inhibition of HL-60 cell growth by different concentrations of GHM-10 ($n = 3, \bar{x} \pm s$). ○—○ Control; ●—● GHM-10 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; △—△ GHM-10 $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; ▲—▲ GHM-10 $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

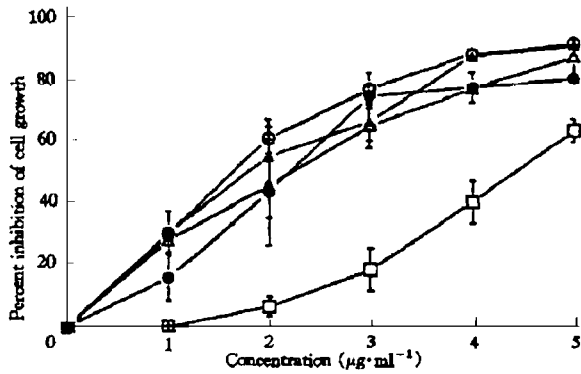


Fig 3 Cytotoxic effect of GHM-10 on cancer cell lines and a normal cell line ($n = 3, \bar{x} \pm s$). ○—○ A2780; ●—● HCT-8; △—△ KB; ▲—▲ Bel 7402; □—□ CHL.

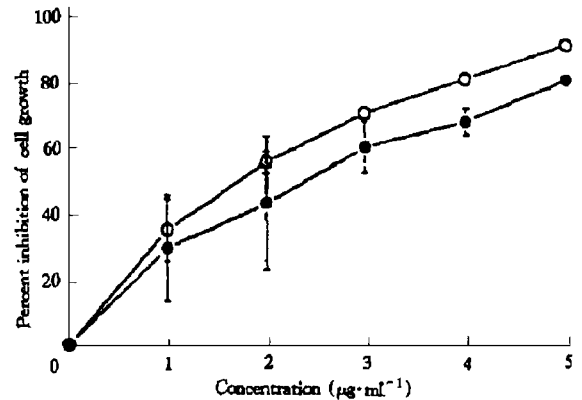


Fig 4 Cytotoxic effect of GHM-10 on the multidrug resistant cell line and its parent line ($n = 3, \bar{x} \pm s$). ○—○ KB; ●—● KB/VCR200.

4 GHM-10 对不同细胞集落形成的影响

采用双层软琼脂培养法,观察了 GHM-10 持续作用对细胞集落形成率的影响。以对照组集落形成抑制率为 0,计算出在各种浓度药物作用下细胞集落形成抑制百分率。从图 5 可知,HL-60 细胞对 GHM-10 最敏感,L1210 细胞次之,而正常骨髓粒单系造血祖细胞 GM-CFC 对药物的敏感性则低于前两种肿瘤细胞。这 3 种细胞对 GHM-10 反应的半数抑制浓度(IC_{50})依次为 1.24, 1.57 和 $5.34 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

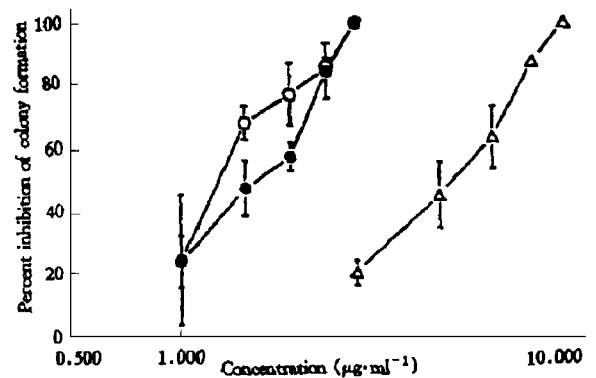


Fig 5 Effect of GHM-10 on clonogenicity of cancer cells and murine bone marrow cells (GM-CFC) in soft agar ($n = 3, \bar{x} \pm s$). ○—○ HL-60; ●—● L1210; △—△ GM-CFC.

5 GHM-10 对 HL-60 细胞 NBT 还原能力的影响

人早幼粒白血病细胞缺乏 NBT 还原能力, 但一旦被诱导向成熟细胞分化, 即可获得此种能力, 不同浓度 GHM-10 ($0.5 \sim 2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 作用 HL-60 细胞 5 d 后, 涂片染色, 发现 NBT 阳性细胞率均未超过 5%, 说明 GHM-10 不能使

HL-60 细胞获得 NBT 还原能力, 即 GHM-10 无分化诱导作用。

6 GHM-10 对小鼠肝癌 H22、小鼠 Lewis 肺癌的治疗作用

表 1 的结果表明, po 或 ip 给药均可明显抑制 H22 肝癌和 Lewis 肺癌的生长。

Tab 1 Inhibition of GHM-10 on transplantable hepatoma H22 and Lewis lung cancer in mice

Tumor	Group	Dose ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$)	Animal No. (initial/final)	Body wt (g) (initial/final)	Tumor wt (g, $\bar{x} \pm s$)	Inhibition (%)
H22	Control		10/10	$20.4 \pm 1.0/30.4 \pm 3.5$	3.60 ± 0.4	
	GHM-10	20×10 po	10/10	$21.4 \pm 1.3/28.1 \pm 5.9$	$2.10 \pm 0.8^{**}$	41.6
		60×10 po	10/8	$21.4 \pm 2.1/29.9 \pm 5.9$	$1.65 \pm 0.8^{**}$	54.2
		10×10 ip	10/10	$21.2 \pm 1.7/28.2 \pm 4.4$	$1.45 \pm 0.9^{**}$	59.7
		40×10 ip	10/10	$21.4 \pm 1.5/24.8 \pm 2.6$	$1.28 \pm 0.5^{**}$	64.4
Lewis	Control		10/9	$21.7 \pm 1.2/18.7 \pm 2.6$	2.36 ± 0.4	
	GHM-10	20×10 po	10/10	$20.4 \pm 1.0/20.2 \pm 1.2$	$0.96 \pm 0.4^{**}$	59.4
		60×10 po	10/10	$20.8 \pm 0.9/19.5 \pm 1.2$	$0.49 \pm 0.2^{**}$	79.2

** $P < 0.01$ vs control.

7 对腹水型肉瘤 180 小鼠的治疗作用

从表 2 可知, 给昆明种小鼠于腹腔接种 S180 后, ip GHM-10 可使荷瘤小鼠的生命延长。

Tab 2 Effect of GHM-10 on the survival time of mice with S180 ascitic tumor

Group	Dose ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$)	Animal No. (Initial/ Final 30 d)	Survival time (d)	IST* (%)
Control		12/0	18.1 ± 1.2	
GHM-10	10×7 ip	10/3	26.7 ± 5.3	47.5^{**}
	20×7 ip	10/9	29.2 ± 3.2	61.3^{**}
	40×7 ip	10/10	30.0 ± 0.0	65.7^{**}

* Increased survival time, mice which live longer than 30 d are calculated as 30 d. ** $P < 0.01$ vs control.

讨 论

从植物中寻找新结构的抗肿瘤药物, 在国内外均为抗肿瘤药物研究的重要组成部分。GHM-10 为短链的苯乙烯吡喃酮类化合物。文献报道^[7]的已知的苯乙烯吡喃酮类化合物的抗肿瘤活性一般都较弱, 而 GHM-10 不同于多

数的苯乙烯吡喃酮类化合物, 它无论是在体内还是体外都具有较好的抗肿瘤活性。本文实验结果表明; GHM-10 在 $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 能完全抑制 HL-60 细胞和 L1210 细胞的生长。MTT 试验发现: GHM-10 对 A2780, HCT-8, KB 和 Bel 7402 细胞等多种肿瘤细胞具有较强的抑制作用, 对正常细胞影响较小, 对耐药细胞 KB/VCR200 具有相似的抑制作用, 说明 GHM-10 与传统的抗肿瘤药长春新碱可能无交叉耐药。软琼脂集落形成试验结果表明: GHM-10 在对肿瘤细胞集落形成具有较强抑制作用的同时对骨髓细胞的抑制作用较小。体内动物移植性肿瘤实验进一步证明了 GHM-10 的抗肿瘤作用, 它对小鼠肝癌 H22、小鼠 Lewis 肺癌及小鼠肉瘤 180 等具有明显的抑制作用, 其中以小鼠 Lewis 肺癌最敏感, 口服 GHM-10 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \times 10$ 次, 抑制率可达 79.2%。说明 GHM-10 无论在体内还是体外都具有较强的抗肿瘤作用。由于 GHM-10 新颖的结构, 其作用机制可能也有独到之处, 值得对它进行深入的研究。

参 考 文 献

- 1 于德泉, 陈若芸, 徐承熊, 等. 番荔枝科植物抗癌有效成分研究. 见: 中国医学科学院中国协和医科大学科学年会学术论文集. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1996:206
- 2 鄂征. 组织培养技术. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1986:153
- 3 Hussain RF, Nouri AME, Oliver RTD, *et al.* A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J Immunol Methods*, 1993, **160**: 89
- 4 徐承熊, 韩锐, 郭哲人, 等. 三尖杉酯碱及高三尖杉酯碱对体外培养的肿瘤细胞集落形成率的影响. 中国医学科学院学报, 1987, **9**:18
- 5 Testa NG, Hendry JH, Lajtha LG. The response of mouse hemopoietic colony-forming units to repeated whole body X-irradiation. *Biomedicine*, 1974, **21**: 431
- 6 Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, *et al.* Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J Exp Med*, 1979, **149**:669
- 7 Fang XP, Anderson JE, Chang CJ, *et al.* Three new bioactive styryllactones from *Goniothalamus giganteus* (Annonaceae). *Tetrahedron*, 1991, **47**:9751

STUDIES ON THE ANTICANCER EFFECT OF HOWIINOL A, A NEW COMPOUND ISOLATED FROM *GONIOTHALAMUS HOWII*

He Jianhua(He JH), Ye Yumei(Ye YM) and Xu Chengxiong(Xu CX)

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and
Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

ABSTRACT The effect of howiinol A (GHM-10) on the growth of several cancer and normal cells were studied, using the methods of cell growth curve determination, MTT test and soft-agar colony formation assay. The results showed that GHM-10 exhibited potent inhibitory effect on cancer cells with an IC_{50} of $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ approximately. Normal cells, especially bone marrow progenitor cells, were shown to be less sensitive to GHM-10. A drug-resistant cell line, KB/VCR200, was found to be as sensitive as its parental KB cells. GHM-10 did not induce HL-60 cell differentiation. In murine transplantable tumors, GHM-10 was found to have significant therapeutic effect on mice bearing solid tumor hepatoma H22, Lewis lung carcinoma and S180 ascites.

KEY WORDS Howiinol A; *Goniothalamus howii*; Anticancer effect