

# 华蟾素注射液中酯蟾毒配基的分离及体内外抗肿瘤活性筛选

高波<sup>1</sup>, 魏晓露<sup>2</sup>, 韩玲玉<sup>2</sup>, 边宝林<sup>2\*</sup>

1. 安徽华润金蟾药业股份有限公司, 安徽 淮北 235000;
2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:通过观察华蟾素注射液中酯蟾毒配基体内外抗肿瘤的作用效果和对部分酯蟾毒配基类单体体外抗胰腺癌细胞的药效筛选,以明确酯蟾毒配基抗胰腺癌的物质基础。方法:运用现代色谱技术分离华蟾素注射液,得到酯蟾毒配基类成分,采用 HPLC-DAD-FT-ICR-MS 分析并鉴定酯蟾毒配基类化合物的主要单体。通过体外细胞筛选酯蟾毒配基抗肿瘤的活性,在体内建立胰腺癌荷瘤裸鼠模型以评价酯蟾毒配基药效,在体外将分离所得酯蟾毒配基的主要活性单体进行抗胰腺癌活性筛选。结果:华蟾素注射液中的酯蟾毒配基在体外对肝癌 BEL7402 细胞,胃癌 BGC823 细胞和胰腺癌 SW1990, MIA PaCa-2 细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)分别为(0.47 ± 0.03), (0.06 ± 0.01), (0.06 ± 0.02), (0.11 ± 0.03) g·L<sup>-1</sup>,酯蟾毒配基的半数致死量(LD<sub>50</sub>)为 20 mg·kg<sup>-1</sup>,体内对 SW1990 荷瘤裸鼠的治疗效果接近化疗药物吉西他滨,从酯蟾毒配基中分离并鉴定的 12 个活性物质体外抗胰腺癌的活性筛选出日蟾毒它灵、沙蟾毒精和噻根草苷元对 SW1990 和 BxPC-3 细胞具有明显抑制作用。结论:华蟾素注射液中酯蟾毒配基在体外对胰腺癌细胞的抑制率与胃癌几乎相同,在体内对胰腺癌荷瘤裸鼠有明显治疗效果,同时酯蟾毒配基中的单体成分日蟾毒它灵、沙蟾毒精和噻根草苷元在体外对胰腺癌细胞有明显的抑制作用。

**[关键词]** 酯蟾毒配基; 抗肿瘤; 抗胰腺癌; 体内实验; 体外筛选; 华蟾素注射液; 沙蟾毒精

**[中图分类号]** R285.5; R945; R284; R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)16-0078-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017160078

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170620.1557.002.html>

**[网络出版时间]** 2017-06-20 15:57

## Research on Isolation of Bufadienolides from Cinobufacin Injection and Its Activity Screening of Anti-cancer *in Vivo* and *in Vitro*

GAO Bo<sup>1</sup>, WEI Xiao-lu<sup>2</sup>, HAN Ling-yu<sup>2</sup>, BIAN Bao-lin<sup>2\*</sup>

1. Anhui China Resources Jinchan Pharmaceutical Co. Ltd., Huaibei 235000, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** According to observation of the anti-cancer effect of bufadienolides from cinobufacin injection *in vivo* and *in vitro* and the anti-pancreatic cancer cells of bufadienolide monomers *in vitro*, to indentify the foundation of bufadienolides on anti-pancreatic cancer. **Method:** Modern chromatographic separation technology was adopted to obtain bufadienolides from cinobufacin injection, HPLC-DAD-FT-ICR-MS was employed to analysis and identify the main monomers of bufadienolides. Anti-cancer activity of bufadienolides was screened by *in vitro* cells, then setting up the pancreatic cancer animal model in nude mice *in vivo* for evaluating the efficacy of bufadienolides, the anti-pancreatic cancer activity of the main bufadienolide monomers *in vitro* was screened. **Result:** IC<sub>50</sub> of bufadienolides from cinobufacin injection on hepatocellular carcinoma cells (BEL7402), gastric carcinoma cells (BGC823) and pancreatic cancer cells (SW1990 and MIA PaCa-2) *in vitro* were (0.47 ± 0.03),

**[收稿日期]** 20170518(003)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09102025);国家中药标准化项目(ZYBZH-C-AH-01)

**[第一作者]** 高波,高级工程师,从事中药学研究, Tel:0561-3152858, E-mail:gaobo2858@126.com

**[通讯作者]** \*边宝林,博士,研究员,从事中药化学及新药开发, Tel:010-64021008, E-mail:bian50101@sina.com

( $0.06 \pm 0.01$ ), ( $0.06 \pm 0.02$ ), ( $0.11 \pm 0.03$ )  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively.  $\text{LD}_{50}$  of bufadienolides was  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  and the treatment effect on SW1990 nude mice *in vivo* was close to gemcitabine. Gamabufotalin, arenobufagin and hellebrigenin had obvious inhibitory effect on SW1990 and BxPC-3 cells, which were isolated and identified from bufadienolides. **Conclusion:** Bufadienolides from cinobufacin injection shows almost the same inhibition rate on pancreatic cancer cells as gastric cancer *in vitro*, and it has apparently treatment effect on human pancreatic cancer bearing xenograft nude mice *in vivo*. Gamabufotalin, arenobufagin and hellebrigenin from bufadienolides show significantly inhibition on pancreatic cancer cells *in vitro*.

[ **Key words** ] bufadienolides; anti-cancer; anti-pancreatic cancer; *in vivo* experiment; *in vitro* screening; cinobufacin injection; arenobufagin

胰腺癌是全球范围内恶性程度极高的消化道肿瘤,发病率在全球范围内呈逐渐上升的趋势。我国胰腺癌近 20 年来发病率增长约 6 倍,死亡率位居恶性肿瘤第 5 位<sup>[1]</sup>。临床表现为腹胀、消化不良、食欲减退、体重减轻,并伴有腹痛或背痛、黄疸、乏力、个别发热等。从天然植物或中药中提取抗胰腺癌药物是目前基础和临床研究的一个重点突破方向。华蟾素是蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* 等的全皮经加工提取的水溶性制剂,为我国自行研制的二类新药,具有清热解毒、利水消肿、化痰溃坚等作用,对于热毒内蕴所致的中、晚期肿瘤,慢性乙型肝炎<sup>[2-3]</sup>及顽固性呃逆的治疗<sup>[4-5]</sup>等均有良好疗效。本课题组前期化学分析研究发现,华蟾素注射液中主要含有酯蟾毒配基<sup>[6]</sup>,蟾蜍色胺(生物碱)<sup>[7]</sup>,核苷<sup>[8]</sup>和多肽<sup>[9]</sup>四大类活性成分。其中含量仅占百万分之一<sup>[10]</sup>的酯蟾毒配基类成分已被越来越多的研究证实是该药发挥抗肿瘤作用的有效物质,包括酯蟾毒配基、华蟾酥毒基、蟾毒灵等蟾蜍甾烯类化合物。

本实验运用现代色谱技术对华蟾素注射液进行系统分离,得到酯蟾毒配基类组分,称其酯蟾毒配基,并采用高效液相色谱串联高分辨傅立叶变换离子回旋共振质谱(HPLC-DAD-FT-ICR-MS)进行鉴定,在体外将酯蟾毒配基作用于包括胰腺癌在内的多种癌症细胞,进行抗肿瘤活性筛选及体内抗胰腺癌的药效评价,将分离所得酯蟾毒配基的主要单体进行体外抗胰腺癌活性筛选,以明确酯蟾毒配基类组分抗胰腺癌的有效物质基础。

## 1 材料

MCO-5AC 型  $\text{CO}_2$  细胞培养箱(日本 Sanyo 公司),MS3 型数显型振荡器(德国 IKA 公司),ML104 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),

LXJ-II 型水平离心机(上海医用分析仪器厂),Varioskan Flash 型酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司),UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(美国戴安公司),LTQ-Orbitrap Velos Pro 双压线性离子阱串联静电场轨道阱质谱(美国 Thermo 公司),Milli-Q 型超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

人胃癌 BGC823 细胞,人肝癌 BEL7402 细胞,人胰腺癌 MIA PaCa-2, SW1990, BxPC-3, PANC-1 和 AsPC-1 细胞均购自北京协和细胞资源中心;华蟾素注射液(安徽金蟾生化股份有限公司,国药准字 Z34020274,批号 131101-1,含量用吡啶生物碱标定),华蟾素酯蟾毒配基类有效组分(自制,将蟾皮经过水提醇沉后的提取物,通过 HW40-C 凝胶色谱柱进行分离和富集<sup>[11]</sup>,于使用前用培养液稀释至所需浓度),吉西他滨(江苏豪森药业股份有限公司,国药准字 H20030104,批号 20140312),二甲基亚砜(DMSO)和台盼蓝染料(美国 Sigma 公司,批号分别为 20150105, 20141120); RPMI1640 培养基,高糖 DMEM/F12 培养基,青霉素-链霉素溶液, Hank's 液,磷酸盐缓冲液(PBS)(Hyclone 公司,批号分别为 20141010, 20140410, 20140510, 20140910, 20141010); 0.25% 乙二胺四乙酸(EDTA)-胰蛋白酶和胎牛血清(Gibco 公司,批号分别为 20140410, 20140110), HW-40C 凝胶(日本 Toyo 公司), 5-氟尿嘧啶(5-Fu, Sigma 公司,批号 20131210,水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯)。

SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体重( $20 \pm 2$ ) g; SPF 级 ICR 小鼠,雌雄各半,体重( $20 \pm 2$ ) g; SPF 级 BALB/c 裸鼠,5 周龄,雌雄各半;均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号均为 SCXK(京)2012-0001,实验动物的管理、饲养及实验过程中的动物护理、照顾和使用均遵循实验动物护理原则,由中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会批准,编号 20141019。

## 2 方法

**2.1 酯蟾毒配基类组分的成分指认** 采用电喷雾离子源(ESI),负离子模式扫描,鞘气气压 241 kPa,喷雾电压 -5 kV,毛细管温度 380 °C,电压 -35 V;采用傅立叶变换(FT)对各组分进行全扫描(分辨率 3 万,  $m/z$  150 ~ 1 000),采用数据依赖性扫描(data dependent scan, DDS)进行二级质谱分析。色谱条件为流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 5% ~ 25% A; 10 ~ 45 min, 25% ~ 46% A; 45 ~ 60 min, 46% ~ 60% A; 60 ~ 65 min, 60% ~ 100% A; 65 ~ 75 min, 100% A),流速为 0.5 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,进样量 5 μL, DAD 在线扫描紫外波长 190 ~ 400 nm。

**2.2 酯蟾毒配基类组分体外抗多种癌细胞的活性筛选** 将人肝癌 BEL7402 细胞和人胃癌 BGC823 细胞用含 10% 胎牛血清, 200 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素, 质量浓度 200 g·L<sup>-1</sup> 链霉素的高糖 DMEM/F12 培养液进行传代培养, 置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。将人胰腺癌 MIA PaCa-2 和 SW1990 细胞用含 10% 胎牛血清, 200 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素, 200 g·L<sup>-1</sup> 链霉素的 PRIM-1640 培养液进行传代培养, 置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。分别取对数生长期的 BEL7402 细胞, BGC823 细胞, MIA PaCa-2 细胞和 SW1990 细胞, 用胰酶消化后制成细胞悬液, 计数调整细胞浓度至 1 × 10<sup>4</sup> 个/mL, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL, 待细胞贴壁生长 18 ~ 24 h 后弃培养基, 加入不同质量浓度(50, 10, 2, 8, 0.4, 0.08, 0.016 g·L<sup>-1</sup>)的酯蟾毒配基类样品和阳性药 5-Fu 50 μL, 另设细胞对照组(只加细胞不加药)和空白组(只加培养基)。每组设 3 个平行孔, 每孔总体积 200 μL。置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h。孵育结束后, 小心吸弃细胞上清, 加入终质量浓度 0.5 g·L<sup>-1</sup> 噻唑蓝(MTT)溶液, 继续培养 4 h 后吸弃上清, 每孔加入 DMSO 150 μL, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 用酶标仪(570 nm)测定吸光度 A, 计算细胞生长抑制率, Bliss 法计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。实验重复 3 次。

细胞生长抑制率 =  $[1 - A_{\text{样品组}}/A_{\text{细胞对照组}}] \times 100\%$

**2.3 急性毒性测定** 预设(0.006 25, 0.025, 0.5, 1 g·kg<sup>-1</sup>) 4 个酯蟾毒配基类有效组分剂量组, 按给药体积 0.01 ~ 0.02 mL·g<sup>-1</sup> 对昆明种小鼠进行腹腔注射, 分别于 2, 4, 24, 48, 72 h 连续观察并记录小鼠死亡情况, 找出引起 0 ~ 100% 小鼠死亡的酯蟾毒配基类有效组分剂量, 估计致死浓度。取昆明种小鼠

60 只随机分为 6 组, 每组 10 只。根据获得的酯蟾毒配基类有效组分剂量范围, 按等比级数增减且相邻两剂量比值 1:(0.6 ~ 0.9) 的要求, 设置(10, 14, 16, 20, 24, 28 mg·kg<sup>-1</sup>) 6 个剂量组和 1 个空白组, 腹腔注射相关浓度药物, 空白组给予生理盐水。给药后连续观察 7 d, 记录不同剂量组小鼠死亡情况, 通过改良寇氏法公式计算获得酯蟾毒配基类有效组分的半数致死量(LD<sub>50</sub>)。LD<sub>50</sub> =  $\lg^{-1} [X_m - i(\sum p - 0.5)]$ , X<sub>m</sub> 为最大剂量组剂量对数值, i 为相邻两组剂量高剂量与低剂量之比的对数(相邻两组对数剂量的差值), p 为各组动物死亡率,  $\sum p$  为各组动物死亡率之总和。

**2.4 人胰腺癌 SW1990 细胞荷瘤裸鼠移植模型的建立** 将 SW1990 胰腺癌细胞体外常规培养, 待细胞生长至对数生长期后, 稳定传代 2 ~ 3 次, 收集细胞, 台盼蓝染色计数细胞成活率 > 95% 时, 调整细胞密度至 5 × 10<sup>6</sup> 个/mL, 皮下接种于裸鼠右侧腋下, 接种体积 0.2 mL/只。连续观察肿瘤生长情况, 待体内成瘤后进行体内瘤块传代 2 ~ 3 次后取肿瘤生长良好的荷瘤裸鼠, 常规消毒后, 处死剥离肿瘤, 选取透亮肉色部分切成约 2 mm × 2 mm × 2 mm 小块, 接种于裸鼠右侧腋皮下, 待肿瘤长至 > 100 mm<sup>3</sup> 时, 将符合要求的荷瘤裸鼠留下备用。

**2.5 酯蟾毒配基类组分的体内药效评价** 按随机区组法将荷瘤裸鼠分为空白组、吉西他滨(给药剂量 37.1 mg·kg<sup>-1</sup>)组, 酯蟾毒配基类有效组分低、高剂量(1, 2 mg·kg<sup>-1</sup>)组, 每组 6 只。随后腹腔注射给药, 1 周 3 次, 连续给药 4 周。给药期间用 0.02 mm 精度游标卡尺测量肿瘤的长径和短径, 同时称量体重, 每周 2 次, 按肿瘤体积 =  $a \times b^2 \times 0.5$  (a 为肿瘤长径, b 为肿瘤短径) 计算肿瘤体积, 按相对肿瘤体积(RTV) =  $V_i/V_0$  (V<sub>0</sub> 为给药前肿瘤体积, V<sub>i</sub> 为每次测量时的肿瘤体积) 计算相对肿瘤体积。于末次给药 24 h 后处死动物, 称量体重, 测量肿瘤的长径和短径, 解剖并取出肿瘤组织, 称量肿瘤质量。计算相对肿瘤增殖率 =  $T_{\text{RTV}}/C_{\text{RTV}} \times 100\%$  (T<sub>RTV</sub> 为治疗组 RTV, C<sub>RTV</sub> 为空白组 RTV), 肿瘤生长抑制率 =  $(1 - T/C) \times 100\%$  (T 为给药组平均瘤重, C 为空白组平均瘤重)。以相对肿瘤体积、相对肿瘤增殖率及肿瘤质量、肿瘤生长抑制率综合评价药物的体内抗癌效果。

**2.6 酯蟾毒配基类活性成分体外抗胰腺癌的活性筛选** 按与 2.2 项下方法将人胰腺癌 SW1990, PANC-1, BxPC-3, AsPC-1 细胞完全培养基培养, 并

取对数生长期的细胞,消化、计数和接种于 96 孔培养板中,随后加入从酯蟾毒配基类成分中分离并结构鉴定出的活性成分(先用 DMSO 助溶并配制为  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  作为起始质量浓度)和 5-Fu  $50\ \mu\text{L}$ ,另设细胞对照组(只加细胞不加药)和空白组(只加培养基)。每组设 3 个平行孔,培养 48 h 后,弃细胞上清,加入 MTT 溶液,培养 4 h 后弃上清,加入 DMSO  $150\ \mu\text{L}$ ,置摇床上低速振荡,于 570 nm 处测定 A,计算细胞生长抑制率和  $\text{IC}_{50}$ 。实验重复 3 次。

**2.7 统计分析** 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 16.0 统计软件进行检验分析。采用单因素方差分析评价整体性差异,方差齐性用最小显著差数法  $t$  检验分析方法进行组间比较,方差不齐用 Dunnett's T3 分析方法进行组间比较, $P < 0.05$  表示有显著性差异。

### 3 结果

**3.1 华蟾素注射液酯蟾毒配基类组分的分离与鉴定** 通过 HPLC 和 LC-MS 分析,确认了华蟾素注射液中的酯蟾毒配基类成分,见图 1。与对照品比结合质谱裂解规律分析指认了 29 个酯蟾毒配基类单体成分,见图 2 及表 1。

表 1 华蟾素注射液中酯蟾毒配基单体的鉴定

Table 1 Identification of bufadienolides monomers in cinobufacin injection

编号	名称	$t_R$ /min	相对分子质量	分子式
1	去乙酰华蟾毒精醇	15.02	416	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$
2	3-表-假蟾毒精	21.94	416	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$
3	假蟾毒精	22.23	416	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$
4	16-去乙酰基-19-氧代华蟾毒它灵	24.12	430	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_7$
5	日蟾毒它灵	26.05	402	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$
6	3-表-日蟾毒它灵	35.88	402	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$
7	噁根草醇	38.51	418	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_6$
8	3-表-远华蟾毒精	42.33	402	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$
9	沙蟾毒精	43.86	416	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$
10	3-表-沙蟾毒精	44.99	416	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$
11	噁根草苷元	50.01	416	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$
U1	噁根草苷元同分异构体	54.22	416	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$
U2	19-羟基蟾毒灵	55.30	402	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$
12	华蟾毒精醇	60.75	458	$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_7$
13	蟾蜍它里宁	63.97	414	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_6$
14	3-氧代沙蟾毒精	64.05	414	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_6$
15	去乙酰蟾毒它灵	65.52	402	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$
16	19-氧代华蟾毒它灵	67.93	472	$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_8$
17	阿根廷蟾毒精	69.22	414	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_6$
18	7 $\beta$ -羟基脂酯蟾毒配基	71.04	400	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$
U3	蟾蜍它里宁同分异构体	72.86	414	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_6$
19	远华蟾毒精	76.05	402	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$
U4	脱氢去乙酰华蟾毒精	77.82	396	$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_5$
20	去乙酰华蟾毒精	79.06	400	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$
21	蟾毒它灵	79.25	444	$\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_6$
22	华蟾素它灵	84.72	458	$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_7$
U5	蟾毒它灵同分异构体	87.92	444	$\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_6$
23	华蟾毒精同分异构体	91.46	442	$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_6$
24	3-酮基-去乙酰华蟾毒精	94.12	398	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_5$

胰腺癌细胞的体外抑瘤效果高于肝癌,与胃癌效果相当。

**3.3 酯蟾毒配基对小鼠的急性毒性试验** 按表 2 的分组和给药后,连续 7 d 观察小鼠状况,发现给药后短时间内小鼠呼吸加快,呼吸幅度加大,后肢僵直,角弓反张,浑身抖动,剧烈挣扎,身体反应消失,10~15 min 后死亡,并且雌鼠对药物的耐受性略强于雄鼠,当给药剂量  $< 10\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  时,小鼠才无任何明显的不良反应。根据 SPSS 16.0 软件计算  $\text{LD}_{50}$  为  $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

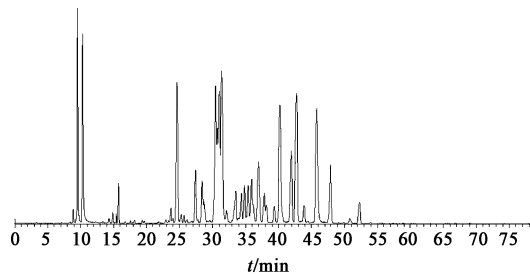


图 1 华蟾素注射液中酯蟾毒配基的总离子流  
Fig. 1 Total ion current of bufadienolides in cinobufacin injection

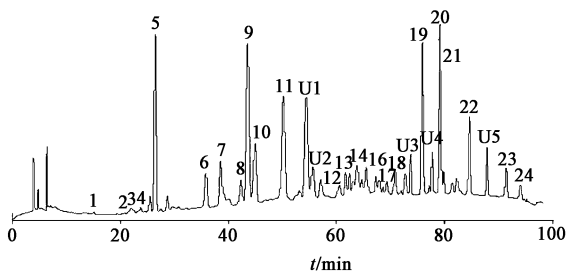


图 2 华蟾素注射液中酯蟾毒配基的 HPLC  
Fig. 2 HPLC chromatogram of bufadienolides in cinobufacin injection

### 3.2 酯蟾毒配基体外抗多种癌细胞的药效评价

华蟾素注射剂中酯蟾毒配基对 BEL7402 肝癌细胞, BGC823 胃癌细胞, SW1990 和 MIA PaCa-2 胰腺癌细胞的  $\text{IC}_{50}$  的分别为  $(0.47 \pm 0.03)$ ,  $(0.06 \pm 0.01)$ ,  $(0.06 \pm 0.02)$ ,  $(0.11 \pm 0.03)\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 与 5-Fu 对肿瘤的作用效果相当,而且酯蟾毒配基对 2 株

表 2 华蟾素注射液中酯蟾毒配基对 KM 小鼠的急性毒性试验 (n=10)

Table 2 Acute toxicity test of bufadienolides on KM mice (n=10)

组别	剂量/ mg·kg <sup>-1</sup>	存活数/只	
		雄	雌
酯蟾毒配基	10	5	5
	14	4	5
	16	4	4
	20	2	3
	24	1	2
	28	0	0
空白	-	5	5

3.4 酯蟾毒配基对人胰腺癌 SW1990 荷瘤裸鼠移植模型的治疗效果 见表 3~6。吉西他滨和酯蟾毒配基对 SW1990 肿瘤体积有明显抑制作用, 给药 12 d 后已显示对肿瘤生长速度有延缓作用, 至 24 d

给药结束时发现酯蟾毒配基和吉西他滨对肿瘤的抑制具有显著性差异 (P<0.05)。观察到酯蟾毒配基 1 mg·kg<sup>-1</sup> 组几乎对裸鼠体重无影响, 而吉西他滨组的裸鼠体重降低较明显; 酯蟾毒配基 2.0 mg·kg<sup>-1</sup> 组对相对肿瘤体积和相对肿瘤增殖率的作用低于吉西他滨组, 但也能起到一定的抑制作用。试验结束时取肿瘤和脾脏称定质量, 见表 7。结果给药组的肿瘤质量均低于空白组, 酯蟾毒配基 1 mg·kg<sup>-1</sup> 组效果接近阳性药吉西他滨, 脾重和脾系数接近空白组。而酯蟾毒配基 2 mg·kg<sup>-1</sup> 组的肿瘤质量高于酯蟾毒配基 1 mg·kg<sup>-1</sup> 组和吉西他滨组, 生长抑制率低于这 2 个组, 但脾重和脾系数与吉西他滨组接近。说明酯蟾毒配基对 SW1990 荷瘤裸鼠具有类似与化疗药物吉西他滨接近的治疗效果, 但是药物低浓度时对动物体重的影响较小, 可有效提高患瘤动物的生存质量。

表 3 华蟾素注射液中酯蟾毒配基对荷 SW1990 肿瘤裸鼠肿瘤体积的影响 (x̄±s, n=6)

Table 3 Influence of bufadienolides on tumor volume of SW1990 tumor model (x̄±s, n=6)

组别	剂量/ mg·kg <sup>-1</sup>	肿瘤体积/mm <sup>3</sup>									
		0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	24 d	
空白	-	163.2±50.0	248.4±79.3	311.4±105.4	501.1±98.7	373.2±196.0	562.2±246.1	644.8±65.9	670.5±137.2	731.0±283.7	
吉西他滨	37.1	537.5±117.4	635.5±105.0	667.2±226.3	690.7±226.8	583.4±199.6	676.9±274.0	735.4±336.5	675.8±116.4	699.1±138.2	
酯蟾毒配基	2.0	237.9±98.5	310.8±65.9	431.2±139.3	442.9±206.2	448.3±89.5	506.8±193.2	574.8±188.6	602.5±206.3	723.7±306.4	
	1.0	143.9±59.1	202.7±113.0	362.6±216.5	382.7±174.2	416.1±98.6	474.9±115.7	581.6±267.1	478.1±213.5	486.9±290.5 <sup>1,2)</sup>	

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05; 与吉西他滨组比较<sup>2)</sup>P<0.05(表 4~7 同)。

表 4 酯蟾毒配基对荷 SW1990 肿瘤裸鼠体重的影响 (x̄±s, n=6)

Table 4 Influence of bufadienolides on nude mice weight of SW1990 tumor model (x̄±s, n=6)

组别	剂量/ mg·kg <sup>-1</sup>	体重/g									
		0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	24 d	
空白	-	19.8±1.2	18.7±1.4	19.0±0.8	18.9±1.9	18.5±1.6	19.0±1.5	18.4±2.1	18.1±1.7	18.0±2.0	
吉西他滨	37.1	17.9±1.5	14.7±0.8	16.1±1.3	14.6±1.8	15.4±2.1	17.5±1.9	15.6±2.0	15.2±1.6	15.4±1.8	
酯蟾毒配基	2.0	18.9±1.3	17.4±1.6	16.9±1.5	17.4±2.0	17.3±1.7	17.9±2.1	17.3±1.6	17.1±2.2	16.9±1.9	
	1.0	20.4±1.5	19.6±1.1	19.3±1.8	20.0±1.5	20.1±2.2	20.3±1.9	19.8±1.8	20.3±0.9	20.2±1.7 <sup>1,2)</sup>	

表 5 酯蟾毒配基对荷 SW1990 肿瘤裸鼠相对肿瘤体积的影响 (x̄±s, n=6)

Table 5 Influence of bufadienolides on relative tumor volume of SW1990 tumor model (x̄±s, n=6)

组别	剂量/ mg·kg <sup>-1</sup>	相对肿瘤体积									
		0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	24 d	
空白	-	1.0±0	1.58±0.9	1.87±0.5	3.00±0.8	4.85±0.8	2.83±1.3	5.78±1.2	6.83±2.8	6.74±3.5	
吉西他滨	37.1	1.0±0	1.27±0.3	1.21±0.4	1.55±0.2	1.17±0.5	1.48±0.8	1.79±0.6	1.62±1.7	1.69±1.2	
酯蟾毒配基	2.0	1.0±0	1.48±0.8	2.12±1.1	2.16±0.9	2.19±1.9	3.08±3.1	3.68±0.9	3.54±4.2	4.53±5.5 <sup>1,2)</sup>	
	1.0	1.0±0	1.48±1.2	2.66±1.7	2.76±1.7	4.69±1.8	4.04±2.8	5.44±1.2	3.34±2.4	3.83±4.3 <sup>1,2)</sup>	

表 6 酯蟾毒配基对荷 SW1990 肿瘤裸鼠相对肿瘤增值率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 6 Influence of bufadienolides on relative tumor growth rate of SW1990 tumor model ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	相对肿瘤增殖率/%							
		3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	24 d
空白	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
吉西他滨	37.1	80.26	65.00	51.80	43.39	30.57	30.92	28.89	21.18
酯蟾毒配基	2.0	93.91	113.00	72.10	81.63	63.58	63.68	51.89	67.18
	1.0	94.15	143.00	92.10	174.60	83.41	94.21	48.87	56.74 <sup>1)</sup>

表 7 酯蟾毒配基对 SW1990 肿瘤裸鼠肿瘤和脾脏的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 7 Effect of bufadienolides on SW1990 tumors and spleen ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	肿瘤质量/g	生长抑制率/%	脾重/g	脾系数
空白	-	1.673 ± 0.341	-	0.112 ± 0.032	6.1 ± 1.6
吉西他滨	37.1	0.889 ± 0.215	46.86	0.065 ± 0.018	4.1 ± 0.9
酯蟾毒配基	2.0	1.115 ± 0.336	33.36	0.077 ± 0.026 <sup>1)</sup>	4.4 ± 1.2 <sup>1)</sup>
	1.0	0.989 ± 0.280 <sup>1)</sup>	40.88	0.141 ± 0.022	6.7 ± 1.5 <sup>2)</sup>

**3.5 酯蟾毒配基活性化合物体外抗胰腺癌细胞的筛选** 将分离并鉴定了结构的 12 个酯蟾毒配基类活性物质、酯蟾毒配基及在体外进行抗胰腺癌细胞筛选,药物对 4 株胰腺癌的生长抑制率见表 8。结

果发现日蟾毒它灵、沙蟾毒精和嚏根草苷元对胰腺癌细胞均具有很强的抑制作用,其中对 SW1990 和 BxPC-3 的抑制作用尤其明显。这些提示均可通过表 8 中数据得以体现。

表 8 酯蟾毒配基及其活性化合物体外抗人胰腺癌细胞的 IC<sub>50</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 8 IC<sub>50</sub> of bufadienolides and its monomers for anti-pancreatic cancer *in vivo* ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

g·L<sup>-1</sup>

样品名	SW1990	BxPC-3	PANC-1	AsPC-1
酯蟾毒配基	0.104 ± 0.021	0.079 ± 0.016	0.026 ± 0.003 <sup>1)</sup>	0.124 ± 0.029
日蟾毒他灵	0.043 ± 0.008 <sup>1)</sup>	0.025 ± 0.006 <sup>2)</sup>	0.087 ± 0.024	0.121 ± 0.037
沙蟾毒精	0.035 ± 0.005 <sup>2)</sup>	0.015 ± 0.006 <sup>2)</sup>	0.070 ± 0.019	0.115 ± 0.032
蟾毒灵	0.134 ± 0.037	0.057 ± 0.019 <sup>1)</sup>	0.124 ± 0.045	0.179 ± 0.048
蟾毒它灵	0.177 ± 0.054	0.050 ± 0.018 <sup>1)</sup>	0.050 ± 0.016	0.147 ± 0.041
华蟾毒它灵	0.565 ± 0.112	0.386 ± 0.083	0.063 ± 0.021	0.856 ± 0.073
远华蟾毒精	1.121 ± 0.433	0.320 ± 0.096	0.108 ± 0.033	0.765 ± 0.065
去乙酰华蟾酥毒基	2.298 ± 0.598	1.199 ± 0.284	0.139 ± 0.052	3.314 ± 0.711
去乙酰华蟾毒它灵	23.920 ± 4.860	781.290 ± 50.45	3 265.650 ± 158.140	1 512.000 ± 79.650
酯蟾毒配基	2.114 ± 0.714	2.263 ± 0.642	0.690 ± 0.082	2.217 ± 0.688
华蟾蜍毒基	1.142 ± 0.331	0.833 ± 0.094	0.439 ± 0.067	0.961 ± 0.016
嚏根草醇	0.342 ± 0.088	0.256 ± 0.082	0.054 ± 0.011	0.128 ± 0.034
嚏根草苷元	0.076 ± 0.009 <sup>1)</sup>	0.022 ± 0.007 <sup>2)</sup>	0.085 ± 0.016	0.103 ± 0.022
5-Fu	0.209 ± 0.092	0.211 ± 0.084	0.211 ± 0.082	0.219 ± 0.079

注:与 5-Fu 组比较<sup>1)</sup> P < 0.05,<sup>2)</sup> P < 0.01。

#### 4 讨论

由于胰腺癌具有起病隐匿、早期无特殊临床表现、容易侵袭转移及多药耐药等特点,使得手术治疗前景不容乐观,辅助化疗的临床治疗也有诸多瓶颈问题亟需解决。中医药治疗肿瘤历史悠久,并通过

中医的辨证论治形成了一套独特的理论体系。中医对胰腺癌的辨证多从脾胃入手,涉及肝胆,病理因素主要是痰、湿、瘀<sup>[12]</sup>。结合中医基础理论指导和中药特性,对中药抗胰腺癌的研究主要集中在单味药及其有效提取物成分、复方制剂的研究 2 个方面。

其中单味药物及其有效成分研究,即是对治疗胰腺癌有效单方的有效成分加以提炼进行抗肿瘤研究,具有目的明确、结果对应较清晰、实验操作相对简便等优势,是目前研究的主要方向,包括植物提取物和动物毒素<sup>[13]</sup>。

华蟾素注射液是中华大蟾蜍干皮经提取,精制而成,是目前我国临床上应用广泛的一种中药抗肿瘤制剂,对于各种中、晚期恶性肿瘤尤其是原发性肝癌、肺癌和胃癌的治疗均有良效<sup>[14]</sup>。华蟾素有效治疗恶性肿瘤的关键在于整体调节,往往能通过多部位、多环节、多靶点发挥作用,在稳定或部分缩小病灶,减少并发症,提高患者生活质量等方面发挥着独特的优势。华蟾素注射液中主要含有蟾毒配基,蟾蜍色胺(生物碱),核苷和多肽等活性成分。含量在华蟾素中达 1/10 以上的蟾蜍色胺(生物碱)类,主要包括 5-羟色胺、蟾蜍噻啉、蟾蜍色胺、脱氢蟾蜍噻啉等含氮类化合物,曾一度被认为是华蟾素中抗肿瘤的主要起效物质,但后来发现这类水溶性吲哚类生物碱成分(包括 5-羟色胺、蟾毒色胺、蟾蜍噻啉等)是在临床引起华蟾素注射液疼痛及刺激性不良反应的主要物质。而在华蟾素注射液中含量极低的蟾毒配基类成分则是抗肿瘤作用的有效物质,在体内外均显示出对肝癌和胃癌有着很强的杀伤作用<sup>[15]</sup>。

本实验研究发现酯蟾毒配基对 SW1990 和 MIA PaCa-2 胰腺癌细胞的抑瘤效果均高于肝癌,与胃癌效果相当。酯蟾毒配基对 SW1990 荷瘤裸鼠具有类似与化疗药物吉西他滨接近的治疗效果,而且药物低浓度时对动物体重的影响较小,可以有效提高患瘤动物的生存质量。结合课题组前期的蟾毒配基体内能引起 AsPC-1 胰腺癌荷瘤裸鼠模型中多种免疫相关细胞因子的分泌,增强机体的免疫功能<sup>[16]</sup>,可以充分说明华蟾素注射液酯蟾毒配基对胰腺癌肿瘤细胞有明显的杀伤作用,同时可增强患瘤机体的免疫功能。发现日蟾毒它灵、沙蟾毒精和噶根草苷元对 4 株胰腺癌细胞均具有很强的抑制作用,其中对 SW199 和 BxPC-3 尤其有效,提示日蟾毒它灵、沙蟾毒精和噶根草苷元是酯蟾毒配基类组分抗胰腺癌细胞可能的物质基础。在后续研究中,本课题组将把上述 3 种单体成分进行体内评价以及抗胰腺癌细胞的机制研究,以期能寻找出药效明显和作用机制明确的抗胰腺癌中药单体成分。

[参考文献]

[1] LI H Y, CUI Z M, CHEN J, et al. Pancreatic cancer:

diagnosis and treatments[J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(3): 1375-1384.

- [2] 仲丽丽,白云,费洪新,等. 蝙蝠葛酚性碱与胰腺癌研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(6): 85-88.
- [3] GUO X Z, CUI Z M, LIU X. Current developments, problems and solutions in the non-surgical treatment of pancreatic cancer [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2013, 5(2): 20-28.
- [4] 杨尹默. 胰腺癌外科治疗的现状、存在问题与展望[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(9): 1231-1235.
- [5] Blaauw R. Pancreas cancer with Whipple's operation [J]. *SAJCN*, 2015, 28(2): 92-96.
- [6] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA-Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69.
- [7] 邵永孚,赵东兵. 胰腺癌诊断治疗中的几个热点问题浅谈[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2012, 18(6): 401-403.
- [8] Heinemann V, Haas M, Boeck S. Systemic treatment of advanced pancreatic cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2012, 38(7): 843-853.
- [9] Olive K P, Jacobetz M A, Davidson C J, et al. Inhibition of hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer [J]. *Science*, 2009, 324(5933): 1457-1461.
- [10] Mimeault M, Batra S K. New advances on critical implications of tumor- and metastasis-initiating cells in cancer progression, treatment resistance and disease recurrence [J]. *Histol Histopathol*, 2010, 25(8): 1057-1073.
- [11] 杨立新,赵海誉,袁圣芬,等. 华蟾素注射液中总蟾毒配基类成分的含量测定[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(6): 87-89.
- [12] 郭敬新,李广永,张栋亭,等. 中医治疗胰腺癌疗效评价[J]. *内蒙古中医药*, 2015(2): 12-13.
- [13] 王丽娟,路军章. 中医药治疗胰腺癌的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 35(3): 961-964.
- [14] MENG Z, YANG P, SHEN Y, et al. Pilot study of huachansu in patients with hepatocellular carcinoma, nonsmall-cell lung cancer, or pancreatic cancer [J]. *Cancer*, 2011, 115(22): 5309-5318.
- [15] WEI X L, SI N, ZHANG Y, et al. Evaluation of bufadienolides as the main antitumor components in cinobufacin injection for liver and gastric cancer therapy [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1).
- [16] 魏晓露,杨健,司南,等. 华蟾素蟾毒配基类有效组体内免疫效果分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(21): 87-92.

[责任编辑 刘德文]