

银杏叶聚戊烯基磷酸酯体内外抗肿瘤的生物活性研究



WANG Cheng-zhang

王成章, 沈兆邦, 郑光耀, 张思访, 曹志庆, 高彩霞

(中国林业科学研究院 林产化学工业研究所; 国家林业局 林产化学
工程重点开放性实验室, 江苏 南京 210042)

摘要: 研究了聚戊烯基磷酸酯 (PPH) 体外对肿瘤细胞和体内抗移植性肿瘤的抑制作用。从银杏叶中分离制备聚戊烯醇混合物 ($C_{75} \sim C_{110}$), 选择 $POCl_3$ 为磷酸化剂和三乙胺为碱性水解剂, 经过磷酸化和水解二步反应, 合成聚戊烯基磷酸单酯。以氟脲嘧啶 (5-Fu) 为对照, 体外肿瘤细胞株选择 SGC-7901 人胃癌、LoVo 人结肠腺癌和 HeLa 人宫颈癌; 体内移植性肿瘤细胞株选择肝癌实体型 (Heps)、肉瘤 (S_{180})、艾氏癌实体 (EC), 用不同剂量的 PPH 进行抗肿瘤药效实验。结果表明, 银杏叶 PPH 在高浓度下 (0.4 g/L) 作用 72 h, 对 3 种体外细胞株抑瘤率达到 60% ~ 80%; 对 Heps、 S_{180} 和 EC 等移植性瘤株抑瘤率达到 50% ~ 65%。这说明银杏叶 PPH 具有明显的抑制肿瘤的生物活性。

关键词: 银杏叶; 聚戊烯醇; 聚戊烯基磷酸酯; 抗肿瘤

中图分类号: TQ91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2006)03-0013-04

Antitumor Biological Activity of Polyprenyl Phosphate from Leaves of *Ginkgo biloba* L. *in vivo* and *in vitro*

WANG Cheng-zhang, SHEN Zhao-bang, ZHENG Guang-yao, ZHANG Si-fang, CAO Zhi-qing, GAO Cai-xia

(Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; Key and Open Lab. on
Forest Chemical Engineering, SFA, Nanjing 210042, China)

Abstract: The researches of pharmacology of polyprenyl phosphate (PPH) from *Ginkgo biloba* L. on antitumor *in vitro* and *in vivo* were carried out. After extracting, separating and purifying the mixes of polyprenols ($C_{75} \sim C_{110}$) from leaves of *G. biloba* L., polyprenyl monophosphates were synthesized from polyprenols with $POCl_3$ and triethanlyamide. In contrast to 5-Fu, the antitumor activities were studied *in vitro* with SGC-7901, LoVo and HeLa, and *in vivo* with mice transplanted tumors of Heps, S_{180} and EC. The pharmacologic experiments were done by various doses of PPH. Results show that PPH have the inhibition of 60% ~ 80% against SGC-7901, LoVo and HeLa *in vitro* at high concentration of 0.400 g/L after 72 h, and have the inhibition of 50% ~ 65% against transplanted Heps, S_{180} and EC. This shows that PPH from leaves of *G. biloba* L. has distinct antitumor biological activity.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; polyprenols; polyprenyl phosphates; antitumor

聚戊烯基磷酸酯 (PPH) 为存在于动植物体内具有生物活性的天然类脂化合物, 在体内可代谢为多萜醇磷酸酯, 参与生物细胞膜糖蛋白的合成, 改善膜的流动性、稳定性和渗透性^[1]; 其药理作用主要用于抗病毒、免疫调节、诱导肿瘤细胞凋亡^[2-4]。而植物聚戊烯醇是合成多萜醇及其磷酸酯等衍生物的最佳中间体, 因为动物体内多萜醇含量仅为其脏器新鲜质量的万分之二、三, 难以大量制备生产。研究表明: 人体中多萜醇及其磷酸酯不足将会对细胞免疫功能及细胞分裂和再生产生影响, 引起脂质代谢、糖类代谢和蛋白代谢的混乱, 并导致细胞的病变。因此可以通过摄入外源性植物聚戊烯醇及其磷酸酯来补充体内多萜醇磷酸酯的不足。

国内外对于外源性 PPH 的药效研究不多, 尤其是对体内外肿瘤细胞的抑制作用未见任何报道。俄

收稿日期: 2005-10-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (C02060103); 国家林业局 948 项目资助 (2003436)

作者简介: 王成章 (1966-), 男, 湖北汉川人, 研究员, 硕士生导师, 从事天然产物活性成分提取、分离及药物开发;

E-mail: wangczhs@sina.com。

罗斯医科院流行病学与微生物研究所对 PPH 体内外抗病毒作用进行了研究^[2-4],实验表明,PPH 是一种广谱抗病毒制剂,对犬肠炎、犬传染性肝炎、鼠痘、鼠肝炎、猫传染性胃肠炎、猫传染性肠炎和腹膜炎、牛混合病毒感染、牛白血病、狂犬病、痘热病毒等有抑制和治疗作用,其有效率 60%~90%,而未用 PPH 处理的小鼠 100% 死亡。因此,开展 PPH 抗肿瘤药效药理研究,将进一步阐明 PPH 在体内代谢为多萜醇磷酸酯的生理活性,为药用开发提供基础。

国内已有文献报道银杏叶化学成分及其应用^[5-9],但银杏叶聚戊烯醇是银杏叶中新的有效部位,国内研究不多。作者曾对其化学结构、分析方法和含量变化规律以及抗肿瘤的药效学进行了大量的研究报道^[10-16],本研究在此基础上,提取分离高纯度银杏叶聚戊烯醇,选择 POCl_3 为磷酸化剂,经过磷酸化和水解反应,生成聚戊烯醇单磷酸酯,在国内外首先报道 PPH 抗肿瘤生物活性。

1 实验部分

1.1 材料

银杏叶聚戊烯醇($\text{C}_{75} \sim \text{C}_{110}$)样品是由 PP-15 至 PP-22 组成的混合物,其总聚戊烯醇含量为 87.2%,通过合成成为 PPH,由中国林科院林产化学工业研究所制备。

1.2 试剂

氟脲嘧啶(5-Fu),天津金耀氨基酸有限公司(批号 031171);RPMI 1640 粉末,GIBCO 公司;新生小牛血清,杭州四季青生物工程有限公司;二甲基亚砷(DMSO),上海凌峰化学试剂有限公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)和胰酶,Amresco 公司分装。

1.3 供试样品

PPH 溶于少量卵磷脂,用适量的助溶剂溶解药物,再用不含血清的 RPMI 1640 培养液稀释至 2 g/L 的母液,由母液分别稀释至 50、100、200、300、400 和 800 mg/L 5 个质量浓度,同时配制不含药物但含相同剂量助溶剂的对照母液,并按相同方法稀释成 5 个质量浓度,作为体外细胞试验的供试样品。

PPH 加入适量 Tween 80 和水,在超声波下超声 20 min,配制成乳白色油状混悬液,质量浓度为 2 g/L 的母液,由母液分别稀释至 10.0、20.0 和 40.0 $\mu\text{g/g}$,作为体内抗移植性肿瘤试验的供试样品。

1.4 动物及瘤谱

KM 小鼠,雌雄各半,质量约 18~22 g,由青龙山动物饲养中心提供。动物生产许可证:SCXK(苏)2002-0018。小鼠移植性肿瘤模型:肝癌实体型 Heps,肉瘤 S_{180} 、艾氏实体癌 EC 以及体外肿瘤细胞株 SGC-7901 人胃癌、LoVo 人结肠腺癌和 Hela 人宫颈癌肝癌均由中科院上海药物研究所提供。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度饱和、 CO_2 5% (体积分数)孵箱中常规培养,3~4 d 传代 1 次。

1.5 仪器设备

医用净化台 YJ875S,苏州净化设备公司;BS110S 电子天秤,德国 Sartorius;LDJ5-2 台式离心机,北京医用离心机厂;生物显微镜,日本 OLYMPUS; CO_2 孵箱和可调移液器,Thermo 公司;DG5031 型酶联免疫检测仪,国营华东电子管厂;80-2 离心沉淀器,上海手术器械厂;血球计数板,玉环县求精医用仪器厂;96 孔板,Corning 公司。

1.6 实验方法

1.6.1 体外对肿瘤细胞抑制的方法 取对数生长期的肿瘤细胞,倾去上层培养液,加一管消化液,轻轻荡洗,倾去,再加一管消化液消化,并在显微镜下观察,至大部分细胞成片状飘起,加一管含血清的培养液终止消化。用弯头滴管轻轻吹打,至培养瓶壁上几乎无细胞为止,移至离心管,1 000 r/min,离心 5 min。倒去上清液,加入新鲜的培养液,轻轻吹打成悬液。用血球计数板计数后稀释至 4×10^4 个/mL。接种 96 孔板,每孔加 100 μL 细胞悬液,放置培养箱孵育 4 h 后加入药物,每孔 100 μL ,使其最终质量浓度分别为 10、50、100、250、500 mg/L。阴性对照加入等体积的 RPMI1640 培养液,阳性对照加入 100 μL 的五氟脲嘧啶,使其终质量浓度为 25 mg/L。每个质量浓度各设 4 个复孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 体积分数为 5% 孵箱中培养 24、48、72 h。培养结束前 4 h,每个质量浓度各设 4 个复孔,每孔加入 20 μL MTT 液

(5 g/L),放至上述恒温培养箱培养。4 h 后取出,倾去上清,加入二甲基亚砜,每孔 150 μ L,震荡 10 min 至甲贲完全溶解且颜色均一,用酶联免疫检测仪在 570 nm 处测定每孔的吸光度(用 OD 值表示),计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{相应质量浓度对照孔 OD 值} - \text{相应质量浓度药物孔 OD 值}}{\text{相应质量浓度对照孔 OD 值}} \times 100\%$$

1.6.2 体内抗移植性肿瘤实验方法 取健康、接种 8 d 肿瘤生长旺盛的荷瘤小鼠,颈椎脱臼处死,无菌条件下取出瘤块,研磨制备成单细胞悬液,生理盐水调节细胞为 1×10^8 个/mL,接种于健康小鼠右前肢皮下,每只 0.2 mL。接种后 24 h 随机分组,分对照组(给予相应溶媒)、给药组(给予不同剂量的药物)和阳性药对照组(5-Fu),并开始分别灌胃给药(ig),每日给药一次,连续 8 d。停药 24 h 后颈椎脱臼处死小鼠,称体质量,解剖剥离瘤块,称瘤质量。对照组平均瘤质量 1 g 以上可进行结果分析。按公式计算抑瘤率,t 检验统计处理。抑瘤率 $\geq 30\%$ 以上判断为有一定的抗癌作用。

$$\text{抑瘤率} = (\text{对照组平均瘤质量} - \text{给药组平均瘤质量}) / \text{对照组平均瘤质量} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 聚戊烯基磷酸酯(PPH)对体外肿瘤细胞的抑制作用

PPH 质量浓度分别为 10、50、100、250、500 mg/L 时对 SGC-7901 人胃癌、LoVo 人结肠腺癌和 HeLa 人宫颈癌的抑制结果如表 1。

表 1 PPH 体外对肿瘤细胞的抑制作用

Table 1 Inhibition effects of PPH on tumors *in vitro*

药物 drugs	药物质量浓度 /(mg·L ⁻¹) drugs concn.	不同时间的抑瘤率 inhibition rate of tumor at different time /%								
		LoVo			SGC-7901			Hela		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
PPH	25	14.13	4.01	0.34	2.40	8.22	17.99	-1.02	7.72	8.02
PPH	50	14.92	6.95	1.82	5.98	11.76	14.11	5.88	6.19	12.25
PPH	100	16.09	8.26	4.42	8.13	11.97	21.59	11.39	18.04	17.96
PPH	200	13.40	9.07	4.59	5.17	15.18	27.06	30.34	57.82	64.46
PPH	400	59.30	60.26	62.82	53.77	71.14	83.82	56.94	70.60	84.37
5-Fu	25	34.62	52.02	70.08	11.74	22.76	57.97	18.14	34.83	60.23

从表 1 看, PPH 体外对 LoVo、SGC-7901 和 HeLa 肿瘤细胞株有较好的抑制作用,特别是高质量浓度(400 g/L), PPH 的药效在 24 h 分别对 LoVo、SGC-7901 和 HeLa 肿瘤细胞株的抑制率为 59.30%、53.77% 和 56.94%,作用时间延长至 72 h,其抑制率最高,分别为 62.82%、83.82% 和 84.37%,具有很好的时效关系,优于质量浓度为 25 g/L 的五氟尿嘧啶阳性对照药,但其具体的作用机制还有待于进一步研究。

2.2 PPH 对小鼠体内移植性 Heps、肉瘤 S₁₈₀、艾氏癌 EC 肿瘤细胞的抑制作用

PPH 以 10.0、20.0 和 40.0 μ g/g 灌胃给药 8 d,以 5-Fu 为阳性对照,观察 PPH 不同的剂量在体内对 Heps、S₁₈₀、EC 肿瘤细胞的抑制效果,结果见表 2。

PPH 以 10.0、20.0 和 40.0 μ g/g 灌胃给药,对移植性肝癌 Heps 的抑瘤率在 18.36% ~ 52.79% 之间,说明 PPH 对 Heps 有明显的抑制作用,而且有很好的量效关系。

10.0、20.0 和 40.0 μ g/g 3 个实验剂量组的 PPH 对移植性肉瘤 S₁₈₀ 都有较强的抑制,分别为 52.56%、55.77% 和 63.78%。PPH 给药量与抑瘤率明显地呈现量效关系,其结果都优于 5-Fu。

PPH 以 10.0、20.0 和 40.0 μ g/g 灌胃给药,对移植性艾氏实体癌 EC 的抑瘤率在 43.38% ~ 54.55% 之间,说明 PPH 对 EC 有明显的抑制作用,但没有很好的量效关系,有待于进一步研究。

3 结论

聚戊烯基磷酸酯(PPH)在体外对肿瘤细胞株 SGC-7901 人胃癌、LoVo 人结肠腺癌和 HeLa 人宫颈

癌细胞株抑瘤率达到 60% ~ 80% ; 在体内对移植性肿瘤细胞 Heps、S₁₈₀ 和 EC 的抑瘤率达到 50% ~ 65% , 结果表明, 银杏叶 PPH 具有明显的抑制肿瘤的生物活性。根据植物聚戊烯醇及其磷酸酯在体内代谢机理, 在体内最终代谢为多萜醇磷酸酯, 参与生物细胞膜糖蛋白的合成, 因此在理论上讲, 外源性的 PPH 和外源性的聚戊烯醇直接作用肿瘤的效果应该相似, 这与作者以前的研究结论是一致的^[12-16]。但由于国内外没有报道 PPH 抗肿瘤的机理, 是否外源性的 PPH 较外源性的聚戊烯醇直接作用肿瘤的效果更快, 时间更短, 剂量更少等有待研究。

表 2 PPH 对小鼠移植性 Heps、S₁₈₀、EC 的抑制作用

Table 2 Inhibition effects of PPH on mice transplanted Heps, S₁₈₀ and EC tumors

组别 groups	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \times \text{d}$) dosage	动物数/只 (前/后) animals/number (before/after)	体质量/g (前/后) animals weight (before/after)	瘤质量 ¹⁾ /g $\bar{X} \pm S$ tumor weight	抑瘤率/% inhibition rate of tumor	
Heps	H ₂ O	10/10	21.0/30.7	3.05 ± 0.65 ^a		
	PPH	10 × 8	10/10	2.49 ± 0.49 ^c	18.36	
	PPH	20 × 8	10/10	21.0/28.9	1.54 ± 0.21 ^c	48.85
	PPH	40 × 8	10/10	21.0/28.0	1.44 ± 0.55 ^c	52.79
	5-Fu	25 × 8	10/10	21.2/27.5	1.39 ± 0.42 ^c	54.42
S ₁₈₀	H ₂ O	10/9	20.4/29.9	3.12 ± 0.69 ^a		
	PPH	10 × 8	10/10	20.3/29.7	1.48 ± 0.54 ^c	52.56
	PPH	20 × 8	10/10	20.1/27.9	1.38 ± 0.30 ^c	55.77
	PPH	40 × 8	10/10	20.0/27.3	1.13 ± 0.26 ^c	63.78
	5-Fu	25 × 8	10/10	20.1/27.0	1.45 ± 0.51 ^c	53.52
EC	H ₂ O	10/10	20.5/32.3	3.85 ± 1.03 ^a		
	PPH	10 × 8	10/10	20.3/29.0	1.98 ± 0.60 ^c	52.56
	PPH	20 × 8	10/10	20.6/31.3	2.18 ± 0.64 ^b	55.77
	PPH	40 × 8	10/10	20.4/28.8	1.75 ± 0.53 ^c	63.78
	5-Fu	25 × 8	10/10	20.5/28.9	1.70 ± 0.44 ^c	53.52

1) a. $p < 0.01$; b. $p < 0.005$; c. $p < 0.001$

参考文献:

- [1] KRYSZYNA W, TADEUSE J. The effect of phosphate ester derivates of polyprenol on model membrane stability[J]. Cell Biol Mol Lett, 2001, 6(2):426.
- [2] OKAMOTO Y, TAHARA Y, MISHIMA Y. Polyprenol and polyprenyl phosphates for inhibition of tumor metastasis; Eur, EP0350801A2 [P]. 1989-07-07.
- [3] OZHERELKOV S V, TIMOFEEV A V, NOVIKOVA G P. Protective effect of phosprenyl, a new antiviral drug, in experimental tick-borne encephalitis[J]. Problems of Virology, 2000(1):33.
- [4] DANILOV L L, CHOJNACHI T. Antiviral Drug: USSR, RU2005475C1 [P]. 1994-09-20.
- [5] 李定梅. 我国银杏产业现状及对策[J]. 林产化学与工业, 1995, 15(4):77.
- [6] 宋永芳. 银杏的化学成分和用途[J]. 林产化学与工业, 1986, 6(3):42.
- [7] 程绍玲, 杨迎花. 银杏叶活性成分提取研究进展[J]. 林产化工通讯, 2005, 39(1):34.
- [8] 王成章, 陈祥, 谭卫红, 等. 银杏叶黄酮类化合物及其分析方法[J]. 林产化学与工业, 1998, 18(1):83-88.
- [9] 王成章, 谭卫红, 陈祥, 等. 银杏叶申萜内酯的化学成分及分析方法[J]. 林产化工通讯, 1997, 33(5):11-19.
- [10] 王成章, 沈兆邦, 陈祥. 银杏叶聚戊烯醇化学研究[J]. 林产化学与工业, 1992, 12(4):279-286.
- [11] 王成章, 沈兆邦, 谭卫红, 等. 银杏叶聚戊烯醇含量分析研究[J]. 林产化工通讯, 2001, 35(5):12-15.
- [12] 王成章, 沈兆邦, 刘好婵, 等. 银杏叶聚戊烯醇对小鼠免疫功能和诱导肿瘤细胞凋亡的研究[J]. 林产化学与工业, 2005, 25(3):9-12.
- [13] 王成章, 沈兆邦, 高凌. 银杏叶聚戊烯醇联合化疗肿瘤的药效研究[J]. 林产化学与工业, 2003, 23(3):15-18.
- [14] 王成章, 沈兆邦, 高凌. 银杏叶聚戊烯醇抗肿瘤的生物学活性研究[J]. 天然产物研究和开发, 2002, 14(5):18.
- [15] 王成章, 沈兆邦, 高凌. 银杏叶聚戊烯醇联合化疗药对 Heps 和 EC 荷瘤鼠的抗癌作用[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(3):9.
- [16] 王成章, 沈兆邦, 高凌. 银杏叶聚戊烯醇联合⁶⁰C₀ 放疗 Heps 荷瘤鼠的药效研究[J]. 药物生物技术, 2004, 11(4):329-331.