

蟾酥抗肿瘤有效成分的作用研究 *

毕琳琳 缪 珊 王四旺[△]

(第四军医大学药学院天然药物学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 : 蟾酥 (Venenum Bufonis) 一词源自《本草衍义》, 为我国名贵的传统中药。其含有多种化学成分, 具有镇痛、强心、升压、局麻、抗炎和抗肿瘤等药理活性, 临床应用广泛。蟾酥中抗肿瘤的有效成分为蟾毒配基类化合物, 包括脂蟾毒配基、华蟾毒配基和蟾毒灵等。抗肿瘤活性主要包括诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞分化等。近年来, 有关蟾酥中活性成分在抗肿瘤方面的作用越来越成为国内外学者研究的热点。

关键词 蟾酥 ; 化学成分 ; 诱导凋亡 ; 抑制增殖 ; 诱导分化 ; 细胞周期阻滞

中图分类号 R285.5 R730.5 文献标识码 : A 文章编号 : 1673-6273(2012)16-3185-03

Progress of Research on the Chemical Components of Venenum
Bufonis and its Antitumor Effects*

BI Lin-lin, MIAO Shan, WANG Si-wang[△]

(Institute of Materia Medica, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Shaanxi Xi'an, 710032, China)

ABSTRACT : Venenum Bufonis, the name of which origin from the Canon of Chinese Materia Medica Ben Cao Yan Yi, is a rare and valuable traditional Chinese medicine. It is widely applied in clinic, for it contains many chemical components and has functions in analgesia, strong heart, boosting pressure, local anesthesia, anti-inflammatory and antitumor. The active antitumor component of venenum bufonis is bufogenin compound, including bufogenin, cinobufagin, bufalin and so on. The antitumor activity mainly includes inducing apoptosis of tumor cells, inhibiting the cell proliferation and inducing the cell differentiation. In recent years, the antitumor effects of venenum bufonis and its active components has become research focus at home and abroad.

Key words: Venenum Bufonis; Chemical component; Induce apoptosis; Inhibit proliferation; Induce differentiation; Cell cycle arrest

Chinese Library Classification(CLC): R285.5, R730.5 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)16-3185-03

蟾酥 (Venenum Bufonis) 一词源自《本草衍义》, 其云 : “蟾蜍眉间有自汁, 谓之蟾酥。以油单裹眉裂之, 酥出单上, 入药用”, 又名蟾蜍眉脂、蟾蜍眉酥、癞蛤蟆浆、蛤蟆酥等^[1]。蟾酥为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 (Bufo bufo gargarizans Cantor) 或黑眶蟾蜍 (Bufo melanostictus Schneider) 的耳后腺及皮肤腺分泌的白色浆液, 经加工干燥制成。蟾酥在中国被应用了数千年, 具有镇痛、强心、升压、局麻、抗炎和抗肿瘤等多种药理活性^[2]。因此, 古今来自蟾酥单方和复方的中药方剂众多, 临床应用广泛。人们对蟾酥化学成分的研究始于 1817 年, 直至 20 世纪 80 年代, 日本学者 Shimada^[3]等才开始研究中华大蟾蜍等的化学成分。蟾酥含有多种化学成分, 主要包括蟾毒配基类和吲哚烷胺类。近年来, 国内外学者对蟾酥中抗肿瘤有效成分进行了比较广泛的研究。

1 蟾酥的主要化学成分

蟾酥所含化学成分比较复杂, 目前已确定的化合物种类包括 : 脂溶性化合物蟾毒配基类如脂蟾毒配基 (resibufogenin, RBG)、华蟾素毒基 (cinobufagin, CBG)、蟾毒灵 (bufalin, BL)、华蟾毒灵 (CBL)、蟾毒它灵和 20, 21- 环氧蟾毒内酯类等 20 余

种 ; 水溶性化合物吲哚烷胺类如 5- 羟色胺、蟾蜍色胺、蟾蜍季胺等 10 余种 ; 另外, 在蟾酥中分离的化合物还有吗啡、肾上腺素、胆甾醇、β- 谷甾类、蝶啶类和多糖类等化合物^[4,5]。

2 抗肿瘤有效成分及其作用

蟾毒配基类化合物中的脂蟾毒配基、华蟾素毒基和蟾毒灵又称蟾蜍二烯羟酸内酯类化合物, 是一类在 C-17 位上带有 α- 吡喃环的强心甙体类化合物。与乌巴因和地高辛等强心甙体类药物一样, 是一种 Na⁺ / K⁺-ATP 酶抑制剂, 再此基础上表现出强心、局麻、升压、兴奋呼吸和抗肿瘤等生物学活性^[6,7]。已有研究表明, 它们是蟾酥中提取中抗肿瘤的主要活性成分。

2.1 诱导肿瘤细胞凋亡

近年来研究表明, 蟾酥及其有效成分可诱导肿瘤细胞凋亡。细胞凋亡需要通过多种信号途径如线粒体途径和死亡受体途径、凋亡相关蛋白如 bcl-2 蛋白家族和 caspase 家族蛋白及细胞周期循环阻滞等进行调节。其在蟾酥有效成分诱导肿瘤细胞凋亡中起到重要的作用。

脂蟾毒配基作为蟾酥抗肿瘤的活性成分之一, 药性温和, 具有很好的抗肿瘤作用。黄应申等^[8]利用流式术和 Western Blot

* 基金项目 陕西省自然科学基金 脂蟾毒配基和人参皂苷 Rg3 联合抗肿瘤作用机制研究 (2010JQ4019)

作者简介 毕琳琳 (1979-) 女, 博士, 主管药师, 主要研究方向 : 中药药理学, 电话 : 029-84772227 E-mail: bilinlin-05@fmmu.edu.cn

[△]通讯作者 王四旺, E-mail: wangsiw@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-11-28 接受日期 2011-12-23)

等实验方法观察脂蟾毒配基(RBG)对 Bel-7402 细胞凋亡的作用。结果显示 RBG 作用 Bel-7402 细胞 24、48、72 h 的 IC_{50} 分别为 3.8、1.8、1.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。药物作用后,肿瘤细胞出现凋亡的形态变化,凋亡率明显高于对照组细胞,可显著抑制 Bel-7402 细胞增殖;另外,还可引起线粒体跨膜电位下降,细胞色素 c (Cyt-c)释放增多,活化 Caspase-3,同时抑制 Bcl-2 蛋白表达,诱导细胞凋亡。

蟾毒灵是抗肿瘤的有效活性成分。大量研究证实,蟾毒灵可诱导多种肿瘤细胞发生凋亡。文献报道^[9],蟾毒灵分别以浓度 0.7、0.5、0.6、1.0 和 0.6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作用 Ishikawa 子宫内膜癌细胞、HHUA 子宫内膜癌细胞、HEC-1B 子宫内膜癌细胞、SK-OV-3 卵巢癌细胞和 OMC-3 卵巢癌细胞时,细胞表现极为敏感,细胞抑制率达 50% 以上;而正常的人子宫内膜细胞对 0.1~10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的蟾毒灵敏感度较低。经过蟾毒灵 1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 刺激 48 h 后,流式细胞仪测定的细胞凋亡率分别为 16±14%、37±8%、22±8%、27±11% 和 23±9%。Western Blot 实验结果显示,蟾毒灵作用于 Ishikawa 子宫内膜癌细胞后,可降低 Bcl-2 和 Bcl-xL 的蛋白表达水平, Caspase-9 蛋白活化,诱导细胞凋亡。顾伟等^[10]观察到蟾毒灵对人肝癌 BEL-7402 细胞生长抑制作用呈浓度-时间依赖性,24、48 和 72 h 的半数抑制浓度分别为 6.67、0.348 和 0.228 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过透射电镜观察到典型的细胞凋亡特征。近年来的研究表明,蟾毒灵可以通过抑制 PI3K/Akt 信号通路诱导人胃癌 MGC803 细胞发生凋亡;可通过 p53 介导的细胞凋亡途径诱导前列腺癌细胞凋亡;还可以在裸鼠原位移植瘤模型中通过调节凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达达到显著地抗癌作用^[11-13]。

华蟾素毒基也具有抗癌作用。Yeh 等^[14]用 0.1、1 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量 CBG 干预前列腺癌细胞 DU145 和 LNCaP 48~96 h 后,细胞毒性作用表现为剂量依赖性。DU145 和 PC3 细胞在药物干预 24 h 后,细胞内 Ca^{2+} 水平升高,同时 Caspase-3 活化,在 LNCaP 细胞中表现为 Caspase-9 被活化,均引起细胞凋亡。而后, Yu 等^[12]又用 0.1、1 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量 CBG 干预前列腺癌细胞时发现, CBG 可延长肿瘤细胞增殖的时间,通过线粒体通路、活化 Caspase 蛋白和上调 p53 的表达而诱导肿瘤细胞发生凋亡。

2.2 抑制肿瘤细胞增殖

细胞增殖在癌症发生中起到非常重要的作用,控制细胞增殖是预防癌症的关键因素^[15]。Takai N 等^[9]运用 MTT 测定法,在不同剂量下蟾毒灵干预子宫内膜癌和卵巢癌细胞后,显示出明显的细胞增殖抑制作用。Tian X 等^[16]用 MTT 法检测蟾毒灵对 HL-60 细胞的活性,结果显示蟾毒灵可抑制 HL-60 细胞的增殖,在 24、48、72 h 的细胞 IC_{50} 值分别为 25.8±2.1、8.0±1.2、2.3±0.3 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。杨敏^[17]利用 MTT 检测方法观察到,蟾毒灵可抑制 HL-60 细胞增殖,并且随着浓度的增加抑制程度增强, IC_{50} 约为 0.03 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,显示蟾毒灵具有抑制 HL-60 细胞增殖的作用。王骊等^[18]研究发现华蟾毒精对人肝癌细胞(Bel-7402)、宫颈癌细胞(HeLa)、乳腺癌细胞(MCF-7)、胃癌细胞(BGC-823)和白血病淋巴细胞(HL-60)等几种人体肿瘤细胞的增殖都有明显的抑制作用。其 Bel-7402、HeLa、MCF-7、BGC-823 和 HL60 细胞的 IC_{50} 值分别为 0.011、0.019、0.116、0.149、1.369 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,其中以人宫颈癌细胞(HeLa)和人肝癌细胞(Bel-7402)最为敏

感。孟书聪等^[19]对不同浓度的脂蟾毒配基对体外培养的人胃癌 BGC-823 细胞系的细胞增殖和细胞抑制进行实验研究,结果显示经 0.1、1、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脂蟾毒配基分别作用 24、48、72 h 后,细胞生长显著抑制,脂蟾毒配基对癌细胞的生长抑制百分率与剂量、时间呈正相关。其 IC_{50} 分别为 3.9、2.0、1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 诱导肿瘤细胞分化

细胞分化是一种少量成熟细胞变成完全分化型细胞的过程^[20]。许多肿瘤细胞极少分化和成熟,这是导致其加速增殖的重要原因。因此,诱导肿瘤细胞分化是抑制其增殖的很好的方式。蟾酥及其有效成分对肿瘤细胞除具有诱导凋亡、抑制生长作用外,还可以诱导肿瘤细胞分化。

Zhang 等^[21,22]研究发现,低剂量的蟾毒灵就可诱导人髓细胞性白血病细胞分化,并且随着药物浓度的升高细胞活力不断降低。研究结果显示,蟾毒灵在 5-10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内,使 U937、ML1 和 HL60 的细胞活力降低了 90% 以上。同时,10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蟾毒灵可抑制白血病 K562 细胞的生长,同时诱导其向粒细胞分化。徐瑞成等^[23]以早幼粒白血病 HL-60 细胞为靶细胞,应用电镜技术观察蟾毒灵诱导的细胞分化,免疫组化方法检测增殖细胞核抗原(PCNA)和细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制因子 p21^{WAF1} 的表达。结果显示,0.001 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蟾毒灵作用 HL-60 细胞,细胞向粒细胞方向分化, p21^{WAF1} 表达显著升高,而 PCNA 表达显著下降,说明蟾毒灵诱导 HL-60 细胞分化与其上调 p21^{WAF1} 的表达、下调 PCNA 表达有关。华蟾素毒基是一种高效的细胞分化诱导剂。Kim 等^[24]也发现, 1×10^{-8} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的华蟾素毒基作用于 SMMC-7721 细胞时能使细胞向分化型转变,表明华蟾素毒基能特异的诱导肿瘤细胞分化。

2.4 阻滞细胞周期

Takai N 等^[9]通过流式细胞术检测得到,1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蟾毒灵刺激子宫内膜癌和卵巢癌细胞 48h 后,可使细胞周期的 G0/G1 期蓄积,同时降低 S 期的细胞比率。蟾毒灵作用于 Ishikawa 子宫内膜癌细胞的 Western Blot 实验结果显示,蟾毒灵可显著上调 p21^{WAF1} 的表达,降低 cyclinA 和 cyclinD3 的水平。顾伟等^[10]观察到蟾毒灵可将人肝癌 BEL-7402 细胞的细胞周期阻滞于 G₂/M 期,诱导肝癌细胞周期 G₂/M 期阻滞可能是蟾毒灵抑制肝癌细胞增殖的机制之一。杨敏^[17]利用流式细胞术观察到, HL-60 细胞经 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蟾毒灵处理 6h 后, G1 期细胞比率下降, S 期细胞增高,作用 24h 后, G0/G1 期细胞显著增加, S 期细胞持续下降,蟾毒灵使细胞周期阻滞在 S 期。王骊等^[18]研究发现华蟾素毒基可使 HeLa 细胞周期阻滞在 G₂/M 期。孟书聪等^[19]应用 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脂蟾毒配基作用 24-48 h 后癌细胞阻滞 S 期, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脂蟾毒配基作用 72 h 时,细胞阻滞在 G₂/M 期。苏永华^[25]等研究发现,华蟾素对人肝癌细胞 SMMC-7721 和 BEL-7402 在 1×10^6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,使细胞周期阻滞于 G₂/M 期,加速肿瘤细胞的死亡。Qi 等^[26]通过 FCM 检测证实,华蟾素毒基使 HepG2 细胞的细胞周期阻滞在 G₂/M 期。

3 小结

研究结果表明,蟾酥中的抗癌有效单体对肝癌、宫颈癌、乳腺癌细胞、胃癌细胞和白血病淋巴细胞等肿瘤细胞具有有效的抗癌活性。微量的药物即可抑制肿瘤细胞的生长,达到抗癌的目的。由于其抗癌作用显著,因此具有很高的临床应用价值。但

是 蟾酥及其抗癌单体的毒性作用 ,使其限制了应用。因此 ,要加强临床前的实验研究 ,进行药物的毒性作用实验 ,找到临床有效的用药剂量 ,提高临床用药的安全性和有效性 ,为临床用药提供科学的理论依据。随着对其化学成分及抗肿瘤作用机制的深入研究 ,蟾酥作为传统中药 ,将有更广阔的开发利用前景。

参考文献(References)

- [1] 王玲华, 宋克忠. 蟾酥临床应用近况 [J]. 中国现代应用医学, 2006, 23(7):618-619
Wang Ling-hua, Song Ke-zhong. The clinical application developments of Venenum Bufonis [J]. The Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2006, 23(7):618-619
- [2] 中国国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化工出版社, 2010:265-266
Committee of pharmacopeia of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Bei Jing: The publishing company of chemical industry, 2010:265-266
- [3] Shimada K, Jai Seup R, Kazuo O, et al. Isolation and characterization of cinobufagin 3-glutaroyl-L-arginine ester from Bufo bufogargarizans Cantor [J]. Chem Pharm Bull, 1985, 33(7):2767-2771
- [4] Kamano Y, Nogawa T, Yamashita A, et al. Isolation and structure of a 20, 21-epoxybufenolide series from "Chan Su" [J]. J Nat Prod, 2002, 65(7):1001-1005
- [5] 夏俊, 江敏, 姜彦峰. 蟾酥及其有效成分体外抗肿瘤作用研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(8):1441-1444
Xia Jun, Jiang Min, Jiang Yan-feng [J]. Journal of Modern Oncology, 2008, 16(8):1441-1444
- [6] Zhang Y, Tang X, Liu F, et al. Simultaneous determination of three bufadienolides in rat plasma after intravenous administration of bufadienolides extract by ultra performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2008, 610: 224-231
- [7] Fanghua Qi, Anyuan Li, Yoshinori Inagaki, et al. Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad Bufo gargarizans Cantor [J]. International Immunopharmacology, 2011, (11): 342-349
- [8] 黄应申, 肖军军, 孟书聪等. 脂蟾毒配基通过线粒体途径诱导人肝癌 Bel-7402 细胞凋亡的研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(20): 1141-1145
Huang Ying-shen, XiaoJun-jun, Meng Shu-cong, et al. The Study of Resibufogenin on induction of the apoptosis of human hepatocarcinoma Bel-7402 cells by the mitochondrial-dependent pathway [J]. Chinese Tumor Clin, 2006, 33(20):1141-1145
- [9] Takai N, Ueda T, Nishida M, et al. Bufalin induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells[J]. Int J Mol Med, 2008, 21(5):637-643
- [10] 顾伟, 韩克起, 苏永华等. 蟾毒灵对人肝癌 BEL-7402 细胞增殖的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2006, 16(1):16-20
Gu Wei, Han Ke-qi, Su Yong-hua, et al. Effect of Bufalin on proliferation of BEL-7402 human hepatocarcinoma cell line[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases, 2006, 16(1):16-20
- [11] Li D, Qu X, Hou K, et al. PI3K/Akt is involved in bufalin induced apoptosis in gastric cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 2009, 20:59-64
- [12] Yu CH, Kan SF, Pu HF, et al. Apoptotic signaling in bufalin- and cinobufagin-treated androgen-dependent and -independent human prostate cancer cells[J]. Cancer Sci, 2008, 99:2467-2476
- [13] Han KQ, Huang G, Gu W, et al. Anti-tumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic transplantation tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13:3374-3379
- [14] Yeh J Y, Huang W J, Kan S F, et al. Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells [J]. Prostate, 2003, 54(2):112-124
- [15] Mori H, Sugie S, Yoshimi N, et al. Control of cell proliferation in cancer prevention[J]. Mutat Res, 1999, 428:291-298
- [16] Tian X, Wang P P, Liu Y P, et al. Effect of bufalin-inducing apoptosis on Bcl-2 and PKC in HL-60 cells [J]. Zhong Guo Shi Yan Yi Xue Za Zhi, 2007, 15(1):67-71
- [17] 杨敏. γ -IFN、蟾蜍灵单用与联用抑制 HL-60 细胞的作用[J]. 广东医学院学报, 2004, 22(3):208-210
Yang Min. Proliferation of HL-60 cells inhibited by interferon- γ , bufalin, or both[J]. Journal of Guangdong Medical College, 2004, 22 (3):208-210
- [18] 王骊, 吴军, 李敏, 等. 华蟾毒精抑制 HeLa 细胞增殖抑制作用机制的探讨[J]. 中华肿瘤杂志, 2005, 27(12):717-720
Wang Li, Wu Jun, Li Min, et al. Pilot study on the mechanisms of growth inhibitory effect of cinobufagin on HeLa cells [J]. Chinese Journal of Oncology, 2005, 7(12):717-720
- [19] 孟书聪, 董晓敏, 肖军军, 等. 脂蟾毒配基对人胃癌 BGC-803 细胞系细胞生长干预效应[J]. 中国临床康复, 2006, 10(43):138-141
Meng Shu-cong, Dong Xiao-min, Xiao Jun-jun, et al. Interventional effect of resibufogenin on the cell growth of human gastric cancer BGC-823 cell line[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006, 10(43):138-141
- [20] Sell S. Cellular origin of cancer: dedifferentiation or stem cell maturation arrest[J]? Environ Health Perspect, 1993, 101(Suppl 5):15-26
- [21] Zhang L, Nakaya K, Yoshida T, et al. Induction by bufalin of differentiation of human leukemia cells HL60, U937, and ML1 toward macrophage/monocyte-like cells and its potent synergistic effect on the differentiation of human leukemia cells in combination with other inducers[J]. Cancer Res, 1992, 52:4634-4641
- [22] Zhang LS, Nakaya K, Yoshida T, et al. Bufalin as a potent inducer of differentiation of human myeloid leukemia cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 178(2):686-693
- [23] 徐瑞成, 陈小义, 陈莉. 蟾毒灵诱导白血病 HL-60 细胞分化及相关基因表达[J]. 中草药, 2002, 33(2):151-153
Xu Rui-cheng, Chen Xiao-yi, Chen Li. Effect of differentiation and related gene expression of Human Leukocythemia Cell induced by Bufalin [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 33 (2): 151-153
- [24] Kim K W, Yamane H, Zondlo J, et al. Expression, purification, and characterization of human acetyl-CoA carboxylase [J]. Protein Expr Purif, 2007, 53(1):16-23
- [25] 苏永华, 尹西才, 谢觉民, 等. 三种蟾毒单体对 SMMC-7721 和 BEL-7402 人肝癌细胞生长的抑制作用 [J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(4):393-395
Su Yong-hua, Yin Xi-cai, Xie Jue-min, et al. Inhibition effects of three kinds of bufotoxins on human SMMC-7721 and BEL-7402 hepatoma cells lines [J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2003, 24(4):393-395
- [26] Qi FH, Li AY, Zhao L, et al. Apoptosis-inducing effect of cinobufacini on human hepatoma cell line HepG2 and its mechanism of action[J]. Yao Xue Xue Bao, 2010, 45(3):218-323