

DOI:10.16781/j.0258-879x.2018.07.0765

· 论 著 ·

月腺大戟素 A 抗乳腺癌活性

李盛建¹, 王莹², 王强利², 王慧¹, 曹青青³, 吕磊¹, 赵亮^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203

3. 上海市浦东新区人民医院药剂科, 上海 201299

[摘要] **目的** 从中药狼毒药材中分离、纯化化合物月腺大戟素 A, 探讨其抗乳腺癌活性。**方法** 采用回流提取、溶剂萃取和吸附色谱法从狼毒药材中分离、纯化月腺大戟素 A, 通过质谱和核磁共振谱解析其化学结构。以乳腺癌细胞 SUM149 (三阴性)、MCF-7 (luminal A 型)、ZR-75-1 (luminal B 型)、SK-BR-3 (HER2 阳性型) 为测试细胞株, 用 MTT 法测定月腺大戟素 A 的抗乳腺癌细胞增殖活性, 用流式细胞术检测月腺大戟素 A 对 SUM149 细胞周期的影响, 用裸鼠移植 SUM149 细胞建立肿瘤模型并评价月腺大戟素 A 对肿瘤的抑制效果。**结果** 月腺大戟素 A 结构为 3,3'-二乙酰基-2,4'-二甲氧基-2',4,6,6'-四羟基-5'-甲基二苯基甲烷; 对 SUM149、MCF-7、ZR-75-1 和 SK-BR-3 细胞的半数抑制浓度分别为 5.50、6.16、7.08、8.64 $\mu\text{mol/L}$ 。月腺大戟素 A 作用 SUM149 细胞 12、24 和 48 h 后, 随着月腺大戟素 A 浓度 (2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 的升高, G_0/G_1 期细胞比例下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), S 期细胞比例上升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。给予 35 mg/kg 腹腔注射月腺大戟素 A 后, 裸鼠肿瘤体积和质量的抑制率分别为 37.94% 和 41.38%。**结论** 月腺大戟素 A 对 4 种乳腺癌细胞增殖均有抑制作用, 并可抑制裸鼠 SUM149 细胞移植肿瘤生长, 其机制可能与抑制 SUM149 细胞周期从 S 期到 G_2/M 期的转换有关。

[关键词] 狼毒; 月腺大戟素 A; 乳腺肿瘤; 细胞凋亡; 细胞周期

[中图分类号] R 979.19; R 737.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)07-0765-05

Anti-breast cancer activity of ebracteolatin A

LI Cheng-jian¹, WANG Ying², WANG Qiang-li², WANG Hui¹, CAO Qing-qing³, LÜ Lei¹, ZHAO Liang^{1*}

1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China

2. College of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

3. Department of Pharmacy, People's Hospital of Shanghai Pudong New Area, Shanghai 201299, China

[Abstract] **Objective** To isolate and purify ebracteolatin A from the roots of *Euphorbia ebracteolata* Hayata, and to explore its anti-breast cancer activity. **Methods** Ebracteolatin A was isolated and purified from the roots of *Euphorbia ebracteolata* Hayata using reflux extraction, solvent extraction and absorption chromatography techniques. The chemical structure was identified by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry. The anti-breast cancer activity of ebracteolatin A was determined by MTT assay in the breast cancer cell lines including SUM149 (triple-negative), MCF-7 (luminal A), ZR-75-1 (luminal B) and SK-BR-3 (HER2-positive). The effect of ebracteolatin A on cell cycle was determined by flow cytometry. A tumor model was established in nude mice by transplanting SUM149 cells, and the inhibitory effect of ebracteolatin A on breast cancer was evaluated. **Results** The ebracteolatin A was 3, 3'-diacetyl-2, 4'-dimethoxy-2', 4, 6, 6'-tetrahydroxy-5'-methyl diphenylmethane. The half maximal inhibitory concentrations of ebracteolatin A on SUM149, MCF-7, ZR-75-1 and SK-BR-3 cells were 5.50, 6.16, 7.08 and 8.64 $\mu\text{mol/L}$, respectively. With the increase of drug concentration (2.5, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$), the percentage of the cells at G_0/G_1 phase was decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and the percentage of the cells at S phase was increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) after treatment with ebracteolatin A for 12, 24 and 48 h. After intraperitoneal injection of ebracteolatin A 35 mg/kg, the inhibition rates of the tumor volume and mass in nude mice were 37.94% and 41.38%, respectively. **Conclusion** Ebracteolatin A can inhibit

[收稿日期] 2018-03-26 **[接受日期]** 2018-05-11

[基金项目] 国家自然科学基金(81303300, 81703763). Supported by National Natural Science Foundation of China (81303300, 81703763).

[作者简介] 李盛建, 药师. E-mail: punk8@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875579, E-mail: zhaoliangphar@163.com

the proliferation of the four types of breast cancer cells and the growth of transplanted-SUM149 cell tumor on nude mice, which may be related to suppressing the transition of cell cycle from S phase to G₂/M phase.

[Key words] *Euphorbia ebracteolata*; ebracteolata A; breast neoplasms; apoptosis; cell cycle

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(7): 765-769]

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 发病率高居女性恶性肿瘤之首, 严重威胁女性的身心健康^[1]。根据基因谱和分子生物学特征, 可将乳腺癌分为4个主要亚型: luminal A、luminal B、人表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 阳性及三阴性。目前, 乳腺癌的治疗主要是外科手术结合放射治疗、化学治疗、内分泌治疗和靶向药物治疗^[2]。乳腺癌的化疗药物包括蒽环类、紫杉醇类、顺铂、烷化剂等, 这类药物杀伤肿瘤细胞的选择性较差, 对机体的毒副作用大, 因此其临床应用受到很大程度的限制^[3]; 内分泌治疗药物主要包括雌激素受体拮抗剂 (三苯氧胺) 和芳香化酶抑制剂 (来曲唑、阿那曲唑、依西美坦等), 服药后患者体内的雌激素水平下降, 出现的一系列不良反应严重影响患者的生活质量^[4]; 分子靶向药物如曲妥珠单抗的选择性较强, 仅对 HER2 阳性的乳腺癌细胞效果明显, 但价格昂贵, 且肿瘤细胞易对其产生耐药性^[5]。化疗是目前常用的治疗手段, 但迄今仍无公认的最佳化疗方案。由此可见, 目前对乳腺癌患者的治疗仍缺乏理想的药物, 亟待开发药理作用明确、毒副作用小的新药。

中药狼毒为大戟科大戟属植物月腺大戟 (*Euphorbia ebracteolata* Hayata) 的根, 植物资源丰富, 分布广泛。近年研究表明, 中药狼毒含有多种活性成分, 这些成分不仅拥有特殊结构, 而且具有明显的抗结核杆菌、抗肿瘤等作用^[6]。本课题组前期从狼毒药材中分离出一种乙酰间苯三酚类化合物月腺大戟素 A, 本研究拟通过乳腺癌模型评价其抗乳腺癌的生物活性。

1 材料和方法

1.1 仪器 100 级超洁净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); XDS-200 型倒置显微镜 (上海蔡康光学仪器有限公司); Micro 17 型微量高速离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公

司); Mettler AE240 型十万分之一电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); Heal Force SMART-N 型超纯水机 (香港力康生物医疗科技控股有限公司); Multiskan MK3 型全自动酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Bruker AVANCE III 600 型高分辨核磁共振波谱仪系统 (德国 Bruker 公司); Agilent 1260 型高效液相色谱仪、Agilent 6220 型飞行时间质谱仪 (美国 Agilent Technologies 公司)。

1.2 试剂与药品 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液, Ham's F12、DMEM、RPMI 1640 培养基, 胎牛血清、青霉素、链霉素均购于美国 Corning 公司; 二甲亚砜 (DMSO) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司; 其他试剂为市售分析纯。紫杉醇购于德国 Fine Science 公司 (批号: Y18Y03Y26)。中药狼毒饮片购于安徽 (产地: 山东, 批号: 20140811), 经海军军医大学 (第二军医大学) 药学院生药学教研室的韩婷副教授鉴定为大戟科大戟属植物月腺大戟的干燥根。

1.3 实验动物与细胞 BALB/c 裸鼠 36 只, 雌性、4 周龄、体质量约 20 g, 由海军军医大学 (第二军医大学) 实验动物中心提供, 动物许可证号为 SCXK (沪) 2013-0016; 人乳腺癌细胞系 SUM149 (三阴性)、MCF-7 (luminal A 型)、ZR-75-1 (luminal B 型)、SK-BR-3 (HER2 阳性型) 均购于美国模式菌种收集中心 (ATCC)。

1.4 月腺大戟素 A 的制备 取 30 kg 干燥狼毒药材, 用 100 L 80% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 趁热过滤, 合并提取液, 浓缩至无乙醇残留 (浓缩体积至 8 L)。取 2 L 浓缩液加 1 L 水稀释, 乙酸乙酯每次萃取体积均为 3 L, 减压回收溶剂, 乙酸乙酯部分 160 g。乙酸乙酯部分过正相硅胶柱, 以石油醚: 乙酸乙酯 (20:1) 洗脱, 得洗脱物。过正相柱, 石油醚: 乙酸乙酯: 甲酸 (15:1:0.1) 洗脱, 得单一化合物, 通过质谱 (MS) 和核磁共振 (NMR) 谱测定其结构。

1.5 细胞培养 SUM149 细胞培养基: Ham's F12

培养基, 含 0.4% 庆大霉素、0.2% 氢化可的松、0.5% 胰岛素和 5% 胎牛血清。MCF-7 细胞培养基: DMEM 培养基, 含 10% 胎牛血清。ZR-75-1 细胞培养基: RPMI 1640 培养基, 含 0.4% 庆大霉素和 10% 胎牛血清。SK-BR-3 细胞培养基: RPMI 1640 培养基, 含 10% 胎牛血清。以上 4 种培养基均含有 100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素。细胞均于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中常规传代培养。

1.6 MTT 法检测月腺大戟素 A 对乳腺癌细胞增殖的影响 取对数生长期细胞, 以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔培养板, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养 24 h 后, 分别加入含月腺大戟素 A 浓度为 0、1、2、5、7.5、10、12.5、15、20 $\mu\text{mol/L}$ (含 0.1% DMSO) 的培养基, 每个剂量设 6 个平行孔。72 h 后每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μL , 继续培养 4 h, 吸去上清液, 每孔加入 100 μL DMSO, 避光, 低速震荡 15 min, 使结晶充分溶解。用酶标仪 (波长 492 nm) 测定光密度 (D) 值, 计算不同浓度的月腺大戟素 A 对乳腺癌细胞的生长抑制率。抑制率 (%) = $[1 - (\text{加药组 } D \text{ 值} - \text{调零孔 } D \text{ 值}) / (\text{对照组 } D \text{ 值} - \text{调零孔 } D \text{ 值})] \times 100\%$ 。用 PASW Statistics 18.0 软件计算半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

1.7 流式细胞术检测月腺大戟素 A 对乳腺癌细胞周期的影响 取对数生长期的 SUM149 细胞, 以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养 24 h 后, 分别加入浓度为 2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的月腺大戟素 A, 实验对照组为含等量药物溶媒的培养液。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中继续培养细胞 12、24 和 48 h 后, 先用胰酶消化分散均匀, 之后移入离心管中。800 $\times g$ 离心 5 min, 然后用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 洗涤 2 次, 调整细胞密度为 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5/\text{mL}$ 。用流式细胞仪对细胞样品进行分析, 计算细胞周期。

1.8 裸鼠肿瘤模型的建立 收集 1×10^6 个 SUM149 细胞, 混悬于 50 μL PBS 中, 加入 50 μL 基质胶后混匀, 置冰上, 将细胞悬液注射于雌性 BALB/c 裸鼠左腋皮下乳腺脂肪垫。注射 SUM149 细胞 1 周后, 在裸鼠皮下可见实体瘤形成, 每天称量 1 次裸鼠体质量, 测量 1 次肿瘤大小。待肿瘤长

至 100 mm^3 (肿瘤体积 = $1/2 \times \text{长度} \times \text{宽度} \times \text{宽度}$) 时, 将裸鼠随机分成月腺大戟素 A (35 mg/kg) 组、紫杉醇 (15 mg/kg) 组和模型对照组, 每组 12 只, 3 组裸鼠的肿瘤相对体积无明显差异。模型对照组、月腺大戟素 A 组每天腹腔注射给药 1 次, 紫杉醇组每 5 d 腹腔注射给药 1 次 (其余时间每天给予等剂量溶媒), 每天测量 1 次各组裸鼠的肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线。10 d 后处死裸鼠, 剥离肿瘤组织, 称量瘤质量。计算月腺大戟素 A 对肿瘤的生长抑制率, 抑制率 (%) = $[1 - \text{给药组瘤体积 (质量)} / \text{模型对照组瘤体积 (质量)}] \times 100\%$ 。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间差异比较采用单因素方差分析, 两组间差异比较采用 LSD 法。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 月腺大戟素 A 的制备与鉴别 从 30 kg 药材中提取得到 17 mg 黄色针晶。ESI-MS m/z : 391[M+H]⁺, ESI-MS m/z : 389[M-H]⁻, 结合 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据分析, 化合物为 3,3'-二乙酰基-2,4'-二甲氧基-2',4,6,6'-四羟基-5'-甲基二苯基甲烷, 化学结构式如图 1 所示。¹H NMR (600 MHz, CDCl_3): 16.16 (1H, s, 2'-OH), 13.2 (1H, s, 4-OH), 9.15 (1H, s, 6-OH), 8.82 (1H, s, 6'-OH), 6.02 (1H, s, 5-CH), 3.96 (3H, s, 2-OCH₃), 3.84 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.74 (2H, s, CH₂), 2.69 (3H, s, 3-COCH₃), 2.62 (3H, s, 3'-COCH₃), 2.05 (3H, s, 5'-CH₃)。 ¹³C NMR (150 MHz, CDCl_3): 205.2 (3-CO), 203.7 (3'-CO), 164.1 (4-C), 164.1 (4'-C), 164.1 (6'-C), 163.9 (2'-C), 157.1 (2-C), 112.1 (5'-C), 109.0 (1'-C), 106.6 (1-C), 106.6 (3-C), 106.6 (3'-C), 66.1 (4'-OCH₃), 57.1 (2-OCH₃), 33.9 (3-COCH₃), 31.9 (3'-COCH₃), 17.6 (1-CCH₂), 9.3 (5'-CH₃)。

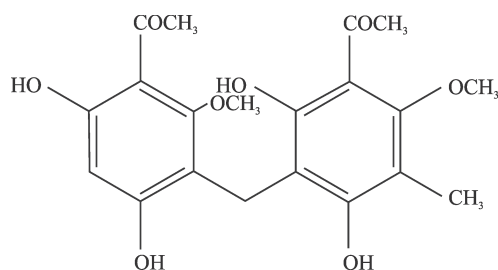


图 1 月腺大戟素 A 化学结构式

Fig 1 Chemical structure of ebracteolatin A

2.2 月腺大戟素 A 对乳腺癌细胞增殖的影响 不同浓度的月腺大戟素 A 作用于乳腺癌细胞 72 h 后, SUM149、MCF-7、ZR-75-1 和 SK-BR-3 细胞的生长均受到不同程度影响, IC₅₀ 分别为 5.50、6.16、7.08、8.64 μmol/L。结果表明月腺大戟素 A 对 4 种亚型乳腺癌细胞均有明显的增殖抑制作用, 各细胞系对其敏感程度排序为 SUM149>MCF-7>ZR-75-1>SK-BR-3。

2.3 月腺大戟素 A 对乳腺癌细胞周期的影响 月腺大戟素 A 处理 SUM149 细胞后, 采用流式细胞术分析细胞周期的变化, 结果 (图 2) 表明, 随月腺大戟素 A 浓度的增加, G₀/G₁ 期细胞比例下降 ($P<0.05$, $P<0.01$), S 期细胞比例上升 ($P<0.05$, $P<0.01$), 提示月腺大戟素 A 抑制 SUM149 细胞周期从 S 期到 G₂/M 期的转换。

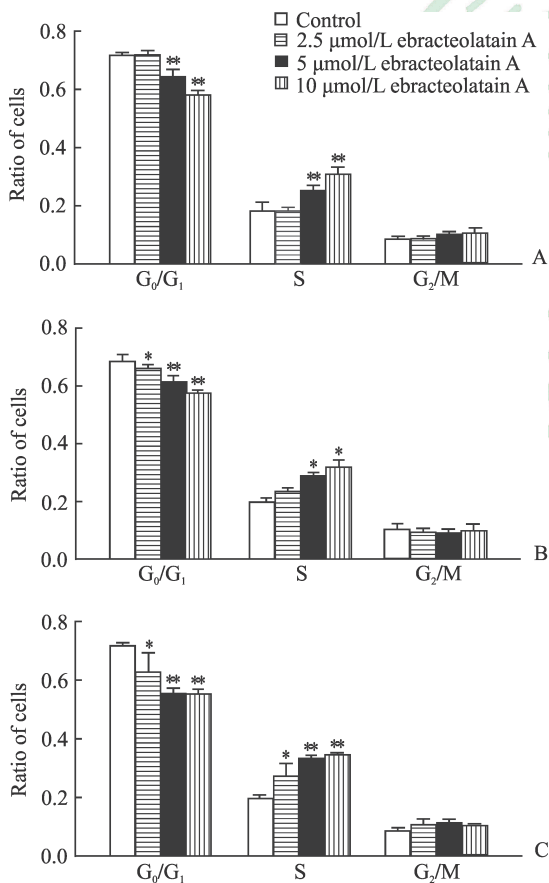


图 2 月腺大戟素 A 对乳腺癌细胞 SUM149 细胞周期的影响

Fig 2 Effect of ebracteolatin A on cell cycle of breast cancer cell line SUM149

A: 12 h; B: 24 h; C: 48 h. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.4 肿瘤的生长曲线及抑制率 模型对照组裸鼠肿瘤生长速度较快, 而月腺大戟素 A 组和紫杉醇组肿瘤生长缓慢 (图 3); 给药第 10 天后剥离各组裸鼠皮下肿瘤, 称质量并比较。与模型对照组相比, 月腺大戟素 A 组和紫杉醇组裸鼠肿瘤体积与质量均减小 ($P<0.01$), 月腺大戟素 A 组肿瘤体积和质量的抑制率分别为 37.94% 和 41.38%, 紫杉醇组肿瘤体积和质量的抑制率分别为 45.77% 和 48.28%, 见表 1。结果表明月腺大戟素 A 能够抑制裸鼠 SUM149 细胞移植肿瘤的生长。

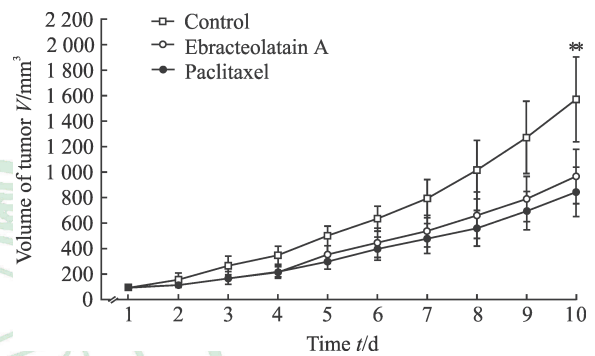


图 3 各组裸鼠 SUM149 细胞移植肿瘤生长曲线
Fig 3 Growth curves of transplanted-SUM149 cell tumor in nude mice in each group

** $P<0.01$ vs ebracteolatin A group or paclitaxel group. $n=12$, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

研究表明中药狼毒提取物有较好的抗肿瘤效果, 其对 Lewis 肺癌、艾氏腹水癌、肝癌、腹水瘤 S180 细胞株、人组织细胞淋巴瘤细胞株 U937、人宫颈癌细胞株 HeLa、肝癌细胞株 QRH-7701 均有不同程度的抑制作用^[7-9], 但是目前关于狼毒中化学成分抗乳腺癌作用的研究鲜有报道。本研究从狼毒药材中分离得到一种乙酰间苯三酚类天然产物月腺大戟素 A, 通过 MS 结合 ¹HNMR 和 ¹³CNMR 数据分析得其结构为 3,3'-二乙酰基-2,4'-二甲氧基-2',4,6,6'-四羟基-5'-甲基二苯基甲烷, 通过 MTT 法检测月腺大戟素 A 对乳腺癌细胞增殖的影响, 证明其对 4 种乳腺癌细胞株 SUM149、MCF-7、ZR-75-1、SK-BR-3 均具有增殖抑制作用。

表 1 各组裸鼠 SUM149 细胞移植肿瘤生长的抑制率

Tab 1 Inhibition rates of transplanted-SUM149 cell tumor in nude mice in each group

n=12

Group	Dose (mg · kg ⁻¹)	Inhibition of volume		Inhibition of mass	
		Volume of tumor V/mm ³ , $\bar{x} \pm s$	Inhibition rate (%)	Mass of tumor m/g, $\bar{x} \pm s$	Inhibition rate (%)
Control		1 583.80 ± 332.27		1.21 ± 0.27	
Ebracteolatin A	35	982.89 ± 210.99**	37.94	0.71 ± 0.11**	41.38
Paclitaxel	15	858.97 ± 193.01**	45.77	0.63 ± 0.15**	48.28

**P<0.01 vs control group

三阴性乳腺癌具有侵袭早、转移快、病死率高的特点,是乳腺癌中预后最差的亚型^[10],本研究发现三阴性乳腺癌细胞 SUM149 对月腺大戟素 A 最敏感。因此选用 SUM149 作为研究对象,通过裸鼠移植肿瘤实验发现月腺大戟素 A 具有抑制肿瘤生长的作用,流式细胞术检测结果提示月腺大戟素 A 能阻滞 SUM149 细胞周期于 S 期,阻滞 DNA 合成。本研究关于月腺大戟素 A 抗乳腺癌活性的结果尚属首次报道,其抑制肿瘤生长的机制可能与抑制细胞周期从 S 期到 G₂/M 期的转换有关,这为进一步探讨月腺大戟素 A 的药理作用机制和抗乳腺癌新药开发奠定了基础。

[参考文献]

- [1] RIVERA-FRANCO M M, LEON-RODRIGUEZ E. Delays in breast cancer detection and treatment in developing countries[J/OL]. *Breast Cancer (Auckl)*, 2018, 12: 1178223417752677. doi: 10.1177/1178223417752677.
- [2] NOUNOU M I, ELAMRAWY F, AHMED N, ABDELRAOUF K, GODA S, SYED-SHA-QHATTAL H. Breast cancer: conventional diagnosis and treatment modalities and recent patents and technologies[J]. *Breast Cancer (Auckl)*, 2015, 9(Suppl 2): 17-34.
- [3] 宣雯霞,郭泰,王伏生. 乳腺癌的治疗进展[J]. *中国药物与临床*, 2015, 15: 203-205.
- [4] MAKUBATE B, DONNAN P T, DEWAR J A, THOMPSON A M, MCCOWAN C. Cohort study of adherence to adjuvant endocrine therapy, breast cancer recurrence and mortality[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108: 1515-1524.
- [5] 李伟,潘燕,李学军. HER2 阳性乳腺癌治疗药物曲妥珠单抗耐药机制及新一代靶向药物研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2014, 30: 48-51.
- [6] 夏青,徐柯心,张文婷,王雨彤,黄碗贞,罗隽,等. 中药狼毒化学成分与药理作用概述[J]. *环球中医药*, 2017, 10: 927-932.
- [7] 姜红. 狼毒大戟对小鼠 Lewis 肺癌增殖及转移的影响[J]. *实用医药杂志*, 2013, 30: 808-810.
- [8] LIU Z G, LI Z L, BAI J, MENG D L, LI N, PEI Y H, et al. Anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebracteolata*[J]. *J Nat Prod*, 2014, 77: 792-799.
- [9] 沈佳钰. 瑞香狼毒药理活性研究进展[J]. *内蒙古中医药*, 2017, 36: 151-152.
- [10] 李甜,周钱梅,张卫红. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在三阴性乳腺癌治疗中的研究进展[J]. *中国肿瘤*, 2018, 27: 40-45.

[本文编辑] 尹 茶