

槐定的抗癌作用

李雪梅、吴运琬¹、陈绍励、潘达鑫²、伍嘉宁³、余月华

(江西中医学院病理教研室, 南昌 330006)

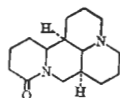
提要 槐定(sophoridine)对 Lewis 肺癌(LLC)等小鼠移植瘤有 30-60% 的抑癌率, 对癌细胞具直接杀伤作用, 毒性低。电镜显示 S 180 瘤细胞表面微绒毛脱落, 线粒体肿大、变性。S 180 肿瘤组织内核酸含量轻度下降, 对荷瘤小鼠免疫功能无明显影响。对 S 180 瘤细胞 cAMP 含量无影响。并观察了槐定在大鼠体内的吸收、分布与排泄。

关键词 槐定; 植物的抗肿瘤药; 毒性; 细胞免疫; 药物代谢; 组织分布; 实验肿瘤; 电镜

从豆科植物苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)中提出的槐果碱(sophocarpine)有抗癌作用⁽¹⁾。近年来, 我们又对从苦豆子中分离出来的另一单体生物碱槐定(sophoridine)进行了抗肿瘤疗效的研究。

材 料

药物 槐定曾名西豆根丙碱, 系我院药厂提供, mp 106-8°C, 分子式 C₁₅H₂₄ON₂, 结构式如下



实验动物 杂种小鼠、纯系小鼠 C 57 BL/6, DBA, 615。小鼠的体重 20.0 ± SD 1.8 g, 大鼠, 体重 80 ± 12 g; 中国医学科学院动物中心提供。犬、猫、兔等均系我院动物室饲养繁殖。

动物瘤株 小鼠 LLC, U 14, S 180, EC, 白血病 L 1210, P 388, L 615, 中国科学院上海药物研究所引入或中国医学科学院药物研究所提供。

方法与结果

槐定抗癌作用 实验按照“全国抗癌药物筛选规程”(1978)进行。接种瘤细胞后 24 h 随机分为对照组及治疗组。实体瘤以 ip 或 ig, 10-20 mg/kg 给药 9-11 d, 腹水瘤及白血病则 ig 给药 5-8 d, 对照组给生理盐水。末次给药后处死小鼠(或大鼠), 称瘤重, 计算抑癌率, 或不处死, 观察每组小鼠(或大鼠)平均生存时间, 计算生命延长率, 进行统计学处理。

实验结果见表 1, 2。

毒性实验

1. 小鼠急性 LD 50 小鼠 100 只, 体重

Tab 1. Effects of sophoridine on solid tumors. No animal died during the experiment. n = 10. $\bar{x} \pm SD$. *p > 0.05, **p < 0.05, ***p < 0.01

Tumor	Dose (mg/kg × d)	Route	Tumor wt (g)	Inhibition (%)
S 180 (mice)	Control		2.0 ± 0.4	
	10 × 11	ip	1.4 ± 0.2	30**
	20 × 11	ig	1.2 ± 0.4	41***
	Control		1.7 ± 0.3	
	20 × 10	ig	0.7 ± 0.1	60***
U 14 (mice)	Control		1.70 ± 0.05	
	10 × 10	ip	1.03 ± 0.05	40***
	20 × 10	ip	0.85 ± 0.20	53***
	Control		1.9 ± 0.3	
	20 × 9	ip	0.89 ± 0.07	55***
	10 × 9	ip	0.98 ± 0.06	49***
LLC (mice)	Control		2.5 ± 1.1	
	20 × 10	ig	1.8 ± 0.2	30**
	10 × 10	ip	1.5 ± 0.3	40**
W 256 (Rats)	Control		7.8 ± 2.9	
	20 × 10	ip	6.6 ± 2.0	15*

1985年9月30日收稿 1986年8月4日修回
1985年10月在第四届中国病理生理学术会议(成都)宣读

¹ 有机化学教研室, ² 微生物教研室, ³ 生化教研室

Tab 2. Effects of sophoridine on ascitic tumor and Leukemia $n = 10 \bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$

Tumor	Dose (mg/kg × d)	Route	Survival time (d)	Prolongation (%)
EC (mice)	Control		16 ± 4	
	10 × 5	ip	24 ± 2	50**
	10 × 8	ig	20 ± 4	25*
	20 × 8	ig	21 ± 4	31**
	Control		15 ± 4	
	20 × 8	ig	19 ± 6	26*
S 180 (mice)	Control		16 ± 4	
	10 × 8	ip	17 ± 4	6*
	20 × 8	ip	22 ± 10	38**
W 256 (Rats)	Control		11.7 ± 1.4	
	10 × 10	ip	12.4 ± 3.1	6*
	20 × 10	ig	12 ± 5	2.5*
L 1210 (mice)	Control†		7.4 ± 1.2	
	20 × 10	ig	8.7 ± 1.4	18*

† $n = 12$

20 ± 2 g, ♀♂各半, 随机均分为二组。一次给药后观察 1 wk, 按照 Finney 氏法计算。结果 iv LD 50 为 50.4 mg/kg (95% 置信限 45.1-56.4), ip LD 50 为 64.3 mg/kg (95% 置信限 59.7-69.3)。

2. 对猫血压、呼吸及 EKG 的影响 猫 4 只, 体重 3.5 ± 0.5 kg, 给药前, 呼吸 12 次/min, 血压 11 ± 5 kPa (90 ± 4 mm Hg)。iv, 10-20 mg/kg 给药后, 血压平均上升 1.3 ± 0.6 kPa (10 ± 4 mm Hg), 并伴有呼吸深快; iv, 40 mg/kg 后, 血压下降到 5.3 ± 0.5 kPa (40 ± 4 mm Hg), 呼吸浅慢, EKG 示心肌轻度损伤; 以 iv 80 mg/kg 后呈周期性呼吸、血压进行性下降, 显示心率慢、房室传导轻度阻滞等, 上述剂量改为静脉缓慢滴注时无反应。

3. 犬亚急性毒性 分高低剂量二组, 每组 2 只犬。观察指标为一般行为、体重、血、肝、肾功能等。iv 5 mg/kg qd × 35 d 后上述指标均在正常范围。iv 10 mg/kg qd × 35 d 后, 每天给药后出现流涎、呕吐, 2 h 后渐恢复, 给药后 15 d 血小板从 245 × 10⁶/ml 降至 155 × 10⁶/ml, 但停药后 2 wk 恢复正常, 病理检查, 消化道

淤血, 肝、肾细胞轻度浊肿及脂肪变性。

4. 对兔后肢股四头肌及眼结膜的影响

取兔 10 只, 随机分为连续 5 d 注射及一次注射两组。在两侧股四头肌分别 im 等容量生理盐水及槐定 10 mg/kg (0.5 ml) × 5 d, d 6 杀死或 20 及 40 mg/kg (0.5 ml) × 1 d, 次日杀死作病理检查, 均无异常发现; 40 mg/kg 给兔滴眼 bid × 5 d, 未见结膜流泪, 充血等刺激反应。

大鼠体内的吸收, 分布与排泄 参照文献(2,3)。在 72 型分光光度计上取 510 nm 波长测光密度, 槐定在 30 μg 内药物浓度与吸收光密度呈线性关系, 直线通过零点, 光密度 0.1 相当槐定 5.7 μg, 回收率为 90%。用薄层层析法鉴定其特异性。

1. 大鼠 iv 槐定后血浆中药物水平的动态变化 大鼠 24 只, 体重 142 ± 30 g, 均分为 8 组, iv 40 mg/kg 后 1, 5, 15, 30 min 及 1, 2, 4, 24 h 断头取血, 肝素抗凝, 离心分离出血浆后, 提取并测定槐定浓度。槐定从血中迅速下降, 4 h 后尚能测出, 据残数法求得血药-时曲线的动力关系是 $C = 37.6791 e^{-5.8459 t} + 7.1581 e^{-0.2331 t}$, 血浆半衰期是 $t_{1/2\alpha}$ (快相, 分布相) = 7.1 min, $t_{1/2\beta}$ (慢相, 消失相) = 2.97 h (图 1)。

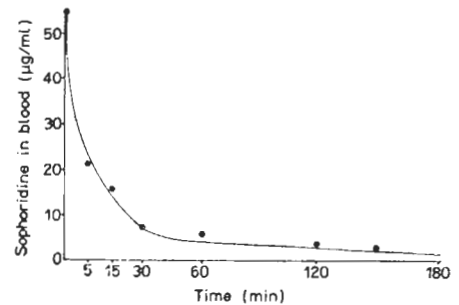


Fig 1. Blood concentration of sophoridine in 3 rats after iv 40 mg/kg.

2. 槐定在正常大鼠体内的分布 大鼠 9 只, 每组 3 只, 体重 167 ± 42 g, iv 槐定 40 mg/kg 后 30 min, 2, 4, 24 h 断头处死, 取心、肺、肝、脾、胃、肾、肌肉等, 称湿重, 以磷酸缓冲

液制成 25% 组织匀浆后提取并测定槐定含量。结果见图 2。

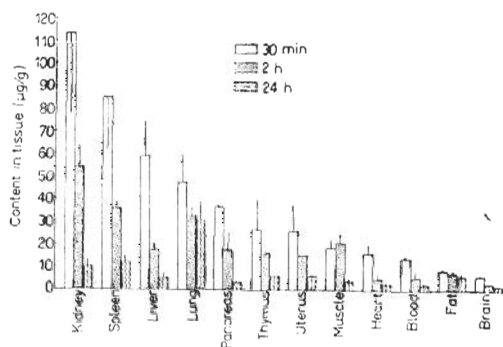


Fig 2. Distribution of sophoridine in rats at 30 min, 2 h and 24 h after iv 40 mg/kg.

槐定在 Lewis 肺癌小鼠体内的药物分布见图 3。

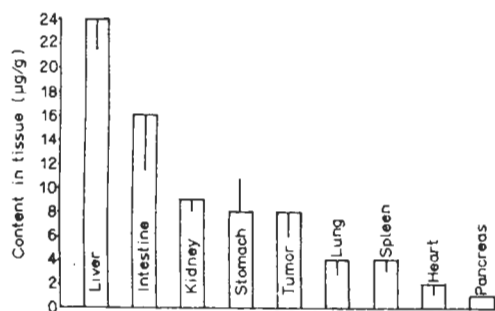


Fig 3. Distribution of sophoridine in mice bearing Lewis lung carcinoma at 30 min after iv 40 mg/kg.

3. 槐定的排泄 大鼠 12 只, 匀分为 iv 组与 ig 组, 给药前先 ig 生理盐水 5 ml 后, 分别分段收集尿、粪、胆汁等。结果: iv 后 1 h 已有槐定从尿排出, 24 h 的累计尿排泄量为给药的 26% (占总排出量的 75%), 3-6 h 为高峰, 96 h 已测不出。ig 组尿排泄与 iv 类似; 不论 iv, ig, 槐定主要从尿排出; 胆汁、粪内的含量极微(图 4)。

槐定抗癌细胞作用

1. 槐定对 EC 癌细胞浓度、总数、倍增时间的影响 小鼠 240 只, ♀♂ 各半, ip EC 1 ×

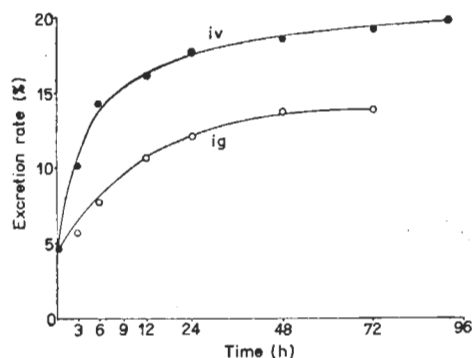


Fig 4. Excretion of sophoridine in urine after iv 30 mg/kg.

$10^7/ml$ 后 24 h 随机分组给药(对照组, ip 槐定组, $10\text{ mg/kg} \times 8\text{ d}$; ip 槐果碱组 $60\text{ mg/kg} \times 8\text{ d}$; ip 环磷酰胺组 $50\text{ mg/kg} \times 8\text{ d}$)。接种后 d3 开始每天每组取 3 鼠, 脱椎处死、抽腹水, 计数活细胞, 涂片并测定癌细胞核有丝分裂指数及形态变化。

结果证明, 接种癌细胞后 0-3 d 癌细胞数量呈指数样增长, 3 d 后生长曲线渐偏离对数值; 4-7 d 倍增时间为: 槐定 53 h, 槐果碱 59 h, 环磷酰胺 70 h, 而对照组是 36 h, 抽取 d3 癌细胞液计算癌细胞浓度, 总数明显降低, 癌细胞核有丝分裂下降。

2. 槐定对 S 180 小鼠癌细胞超微结构的影响 C 57 BL/6 小鼠 ip 接种瘤细胞 $1 \times 10^7/ml$, d4, 槐定按有效量 ip $10-20\text{ mg/kg}$, 4 h 后抽取腹水离心, 电镜观察结果见图 5 (见图版 3)。

3. 槐定对小鼠 U 14 及 S 180 肿瘤组织及正常小鼠脾组织核酸含量影响 小鼠 40 只接种瘤细胞 24 h 后给药, 按文献(4)提取核酸, 按二苯胺法测 RNA, 苔黑酚法测 DNA。结果证明, 正常小鼠 ig 槐定后脾组织核酸含量: RNA 下降 36%, DNA 下降 19%; S 180 及 U 14 经槐定治疗后肿瘤组织核酸抑制率: U 14, DNA 28.4%, RNA 14.1%; S 180 DNA 50.8%, RNA 55.6%, ($p > 0.05$), 仅从含量看, 槐定对核酸代谢影响不明显。

4. 槐定对 S 180 瘤组织中 cAMP 含量影响 小鼠 42 只, 接种 S 180 瘤细胞后 24 h 给药, 治疗组按 ig 20 mg/kg × 10 d; 对照组 ig 等量生理盐水。末次给药后处死小鼠, 取瘤组织 100 mg 用过氯酸(冰)制成匀浆, 离心取上清液, 用 KOH 中和后再离心, 取上清液在恒温水浴中蒸干。用上海第二医学院同位素室生产的 cAMP 放射免疫分析试剂盒并参照文献(5,6)测定 cAMP, 两组 cAMP 水平以 pmol/mg 组织湿重表示。结果: 对照组(n=22)cAMP 的含量为 1.3 ± 0.7, 槐定治疗组(n=20) cAMP 的含量为 1.13 ± 0.7(p>0.05), 两组差异不显著。

槐定对机体免疫功能的影响

1. 槐定对荷瘤小鼠 U 14 外周血液 T 淋巴细胞酸性 α-萘乙酸酯酶 Anae 反应的影响 小鼠 20 只, 右腋窝下接种 U 14 瘤细胞后 24 h 随机分组, 治疗组按 ig 20 mg/kg × 10 d 给药, 对照组给生理盐水, 治疗前 1 d、治疗后 d 5, 10, 分别从尾尖取血、涂片, 参考文献(7)进行酸性 α-萘乙酸酯酶 Anae 反应, 油镜下计数 Anae 反应阳性与阴性淋巴细胞, 计算阳性淋巴细胞%。于最后一次给药并测定 Anae 活性后处死小鼠, 同时计算抑癌率进行显著性测定。结果见表 3。

2. 槐定对小鼠肿瘤相伴免疫性能的影响 纯系 C 57 BL/6 小鼠 40 只, 体重 21.0 ± 1.4 g, ♀♂各半, 选 S 180 相伴免疫(concomitant tumor immunity, CTI)⁽⁸⁾为指标, 观察小鼠 T 淋巴细胞免疫功能, 以了解槐定对机体免疫功能的影响, 结果见表 4。

Tab 4. Effect of sophoridine on the concomitant tumor immunity in mice S 180-bearing. A = S 180 tumor cell challenge. B = S 180 tumor cell immune + challenge. C, D = immune + challenge + sophoridine. n = 10. $\bar{x} \pm SD$, *p>0.05, **p<0.05 compared to B.

Group	Dose (mg/kg × d)	Tumor wt (g)	Multiple of Tumor growth	Thymus coefficient	Spleen coefficient
A	—	3.8 ± 0.9	—	0.0018	0.0116
B	—	2.1 ± 0.4	—	0.0017	0.0133
C	40 × 1	2.1 ± 0.6	0.11	0.0015*	0.0110*
D	20 × 6	2.6 ± 0.7	0.4	0.0011**	0.077*

Tab 3. Effect of sophoridine 20 mg/kg × 10 d on the Anae reaction of T-lymphocyte in bearing U 14 mice. $\bar{x} \pm SD$. *p>0.05.

Group	Anae's reaction of T-lymphocyte		
	Before(n = 10)	After treatment(n = 9)	
	-1 d	5 d	10 d
Control	52.7 ± 2.7	52.6 ± 2.6	56.2 ± 3.7
Treatment	53.0 ± 2.9	57.0 ± 2.0*	56.2 ± 2.0*

讨 论

槐定与槐果碱的化学结构近似, 都是苦参碱(matrine)的异构体。苦参碱和氧化苦参碱(oxyamatrine)对 S 180 和 EC 有抑癌作用。我们继槐果碱⁽¹⁾之后, 本文又证实槐定有抗癌作用, 从而表明苦参碱类生物碱具有值得重视的抗癌活性。

槐定与槐果碱的抗癌活性相似, 但槐定的抗癌有效剂量仅槐果碱的 1/6(槐定 10 mg/kg, 槐果碱 60 mg/kg)。

槐定对狗骨髓和重要器官功能无明显影响, 药物在体内无蓄积现象。用药过程中不影响 T 淋巴细胞免疫功能, 也不影响荷瘤小鼠的相伴免疫功能。说明槐定的毒性低, 副作用小。

槐定对 LLC 有明显疗效。在带 Lewis 肺癌小鼠肺内及正常大鼠肺内有一定含量, 在正常大鼠肺内含量持续较久(图 2); 江西省妇幼保健院等进行临床试用恶性葡萄胎和绒癌 20 例, 18 例有效, 用药后患者肺部及阴道的转移灶消失、血、尿 HG 下降至正常(待发表资料), 患

者肺转移灶的消失可能与槐定在肺内停留时间较长有关系。

EC 小鼠 ip 槐定使癌细胞浓度、总数下降,核分裂减少,癌细胞倍增时间延长,而致抑癌说明其抗癌效应存在直接杀伤作用。此外,槐定对于小鼠肿瘤及脾组织核酸含量轻度下降,癌细胞表面微绒毛脱落、胞浆内线粒体肿大变性,然而 cAMP 含量改变不明显,以上说明槐定的抗癌作用机理复杂。

致谢 韩锐教授指导药物代谢动力学、彭泽华参加部分技术工作,中国医学科学院药物研究所提供动物瘤株及实验动物。

参 考 文 献

1 李雪梅、李兰珍、陈绍勋,等。槐果碱对动物移植瘤的抑制作用。中国药理学报 1984; 5: 123

- 2 Brodie BB, Udenfriend S, Dill W. The estimate of basic organic compounds in biological material. *J Biol Chem* 1947; 168: 355
- 3 谢明智、周文正、张英。氧化苦参碱的代谢。药理学报 1981; 16: 481
- 4 Schneider W. Determination of nucleic acid in tissue by pentose analysis. *Methods Enzymol* 1957; 3: 680
- 5 Miyamoto E, Kuo JF, Greengard P. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 1969; 244: 6395
- 6 Gilman AG. A protein binding assay for adenosine 3': 5-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 67: 305
- 7 Muller J, Brun Del Re G, Buerki H, Keller HU, Hess MW, Cottier H. Nonspecific acid esterase activity: A criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur J Immunol* 1975; 5: 270
- 8 杨金龙、韩家娴、胥彬。喜树碱对小鼠肿瘤相伴免疫性研究。药理学报 1979; 14: 12

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Mar, 8 (2): 153-158

Antitumor action of sophoridine

LI Xue-Mei, WU Yun-Guang¹, CHEN Shao-Li, PAN Da-Xin², WU Jia-Nin³, YU Yue-Hua

(Dept Pathology, Jiangxi Traditional Chinese Medical College, Nanchang 330006)

ABSTRACT Sophoridine, an alkaloid isolated from *Sophora alopecuroides* L., is a new anticancer compound. The transplanted tumors of Lewis Lung carcinoma, S 180, U 14 and EC were inhibited 30-60% ($p < 0.05$) by sophoridine with smaller therapeutic dose (10 mg/kg ig) than that of sophocarpine (60 mg/kg ig).

The acute ip and iv LD 50 in mice were 60 ± 0.1 and 50.4 ± 0.4 mg/kg respectively. In dog iv 5 mg/kg \times 35 d produced no apparent toxicity except mild reversible leukopenia and thrombopenia in large dose (10 mg/kg \times 35 d)

When normal mice or mice bearing S 180, U 14 solid tumors were given ig sophoridine 20 mg/kg qd \times 10 d, the con-

tents of RNA and DNA in tumor and spleen decreased slightly. Sophoridine showed no marked influence on the content of cAMP in S 180 solid tumor. The mitochondria of S 180 sarcoma cells swelled and dissolved, vacuolations were formed inside the cytoplasm of the tumor cells. The microvilli of the cell membrane diminished.

After iv a single dose (40 mg/kg) of sophoridine, the plasma concentration showed an initial rapid drop and subsequent declination and were rapidly taken up by various organs, highest in kidney, moderate in spleen and lung, and lowest in plasma and brain; 29% of the injected sophoridine was excreted within 24 h in urine.

Sophoridine showed no influence on

immunity during the studies on T-lymphocyte Anae reaction of blood smear and concomitant tumor immunity in mice.

Our experiments showed that the matrinoid alkaloids, sophoridine and sophocarpine possess noticeable antitumor activity.

KEY WORDS sophoridine; phytogenic antineoplastic agents; toxicology; cellular immunity; drug metabolism; tissue distribution; experimental neoplasms; electron microscopy

¹*Dept Organic Chemistry*; ²*Dept Microbiology*;

³*Dept Biochemistry*.

* * * * *

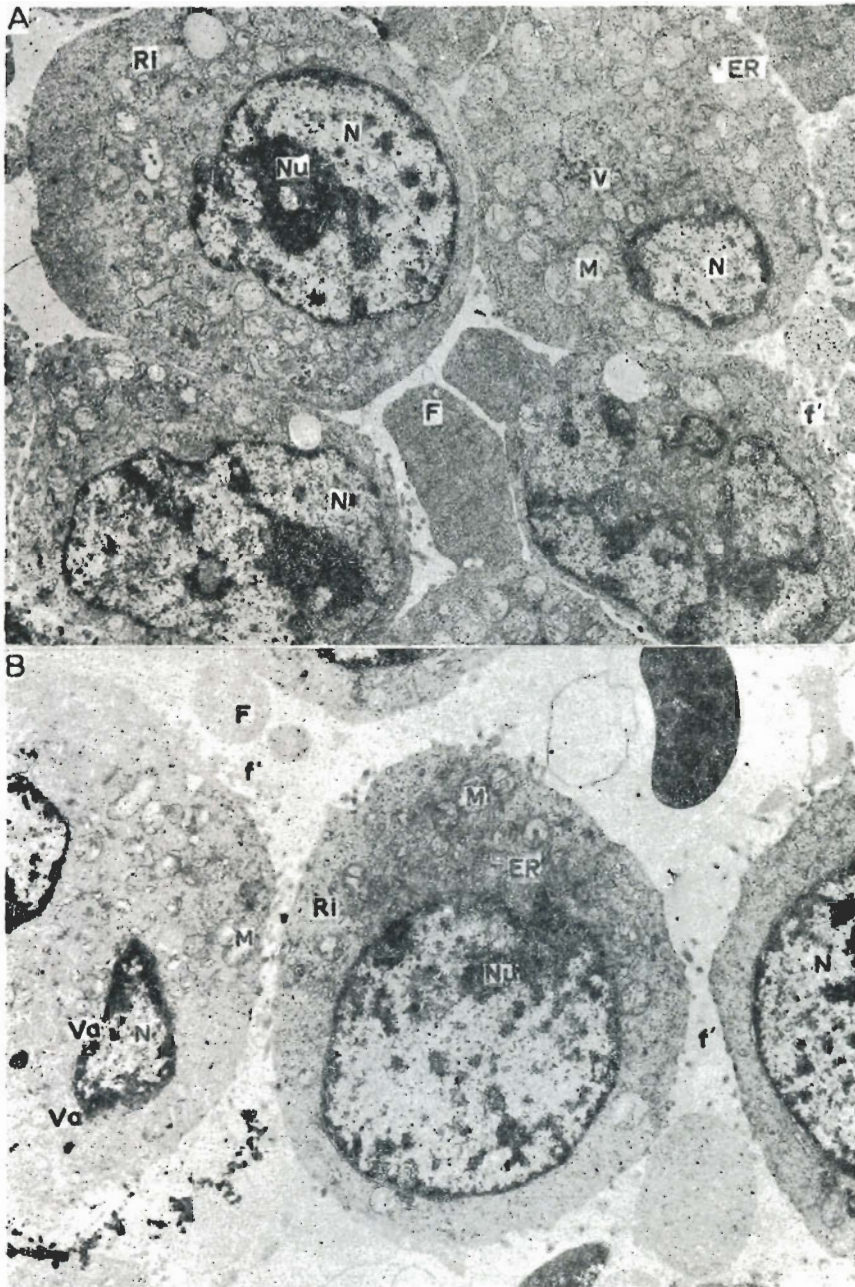


Fig 5. A. Sarcoma 180 cell, $\times 7150$. Er=Endoplasmic reticulum; F=microvilli of cell membrane; f' = microvilli of plasmalemma; M=mitochondria; N=nucleus; Nu = nucleolus; V = virus; Ri = ribosome. B. After ip sophoridine 20 mg/kg. $\times 8370$. The microvilli of cell membrane or plasmalemma were destroyed and scattered among the tumor cells. Swelling, dissolution of mitochoria and even disappearance of inner cristae. Vacuoles (Va) increased, Ri decreased.

(See p 155)