

### 黄花夹竹桃甙及其与氮芥合用的体内抗肿瘤活性

章雄文, 黄自强, 李常春 (福建医学院药理教研室, 福州350004, 中国)

R965.2

Antitumor activity of thevetoside alone and in combination with chlormethine *in vivo*

ZHANG Xiong-Wen, HUANG Zi-Qiang, LI Chang-Chun  
(Department of Pharmacology, Fujian Medical College, Fuzhou 350004, China)

**ABSTRACT** Thevetoside (TS) is one of the cardiac glycosides. A study of antitumor activity was carried out in 6 types of murine tumors *in vivo*, such as the ascitic tumors H22, EAC, P388, and solid tumors S180, U14, Lewis lung carcinoma, which were treated with ip TS 1.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> alone or in combination with chlormethine (Chl) 0.3, 0.5, or 1.0 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. TS only showed a remarkable inhibition on the growth of 3 types of solid tumors with inhibition rates of 48.7% - 56.7%. The effect of the combination therapy was much pronounced than that of independent administration. The life span under combined therapy was increased 82.4% to >122.1%. For solid tumors, the combined administration gave inhibition rates of 65.6% - 72.5%.

48.7% - 56.7%. TS 与轻度抑瘤作用剂量 (0.3, 0.5或1.0 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)的氮芥合用, 抑瘤活性高于单独给药组, 能使腹水瘤小鼠的生存期延长率达到82.4至>122.1%; 对实体瘤的抑瘤率为65.6% - 72.5%.

**关键词** 黄花夹竹桃甙; 糖苷类; 氮芥; 肿瘤移植; 植物性抗肿瘤药; 合并用药

**KEY WORDS** thevetoside; glycosides; mechlorethamine; neoplasm transplantation; phytogetic antineoplastic agents; drug combinations

肿瘤细胞具有高 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性, 且同其恶性度成正比<sup>[1]</sup>, 作者也发现两种白血病细胞较之其相应的正常细胞有较高的 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性<sup>[2]</sup>, 四种体外培养的肿瘤细胞, 生长速度最快者(SMMC-7721), 其 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性也最高<sup>[3]</sup>. 长期用洋地黄的患者较少发生癌肿<sup>[4]</sup>, 洋地黄具有体外抗肿瘤活性<sup>[5,6]</sup>, 对肿瘤细胞的抑制作用显著强于正常细胞<sup>[5]</sup>. 黄花夹竹桃甙(thevetoside, TS)属洋地黄类药, 其抗肿瘤方面的研究未见报道. 本文选用从福建产黄花夹竹桃果仁中提取的 TS 做为 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶的抑制剂, 并与氮芥(chlormethine, Chl)合用, 对数种小鼠移植性肿瘤进行治疗, 并观察其体内抗肿瘤活性.

#### MATERIALS AND METHODS

**A 摘要** 黄花夹竹桃甙(thevetoside, TS)属强心甙类药. 1.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ip 治疗小鼠腹水瘤 H22, EAC, P388 及实体瘤 S180, U14, Lewis 肺癌, 仅对实体瘤有效, 抑瘤率为

**动物、瘤株和药品** DBA/2小鼠引自广东省肿瘤研究所及上海医科大学实验动物部; C<sub>57</sub>小鼠引自厦门大学抗癌中心及中国预防医学科学院寄生虫病研究所; 昆明种小鼠由本校动物中心提供. 小鼠 P388 淋巴瘤白血病瘤株引自中科院上海药物研究所; 小鼠 Lewis 肺癌瘤株引自厦门大学抗癌中心; 宫颈癌 U14、肉瘤 S180、小鼠艾氏腹水瘤(EAC)和小鼠肝癌腹水型(H22)瘤株引自福州市红十字会医院肿瘤研究室. TS 为白色粉末(纯度>97%), 由李常春教授自福建产夹

Received 1992-06-24

Accepted 1993-09-07

竹桃科植物黄花夹竹桃的果仁中提取而得; 盐酸氟芥 (chlormethine hydrochloride, Chl) 安甬剂, 5 mg · ml<sup>-1</sup>, 上海第十三制药厂产品。

**小鼠移植性肿瘤接种与传代** 根据1989年第三届全国肿瘤药理及化疗学术会议(南宁)之抗癌药物体内药效试验规程进行操作。P388接种于DBA/2小鼠, EAC和H22接种于昆明种小鼠腹腔中生长传代; Lewis肺癌接种于C<sub>57</sub>小鼠, U14和S180接种于昆明种小鼠腋窝皮下生长传代。

**药物对动物移植性肿瘤的抑制试验** 实验用同一性别小鼠。接种肿瘤细胞或瘤块24 h后分组ip给药, 给药前12 h禁食。对各种小鼠移植性肿瘤的治疗给药均分为3组, 即: TS组(1.5 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>), Chl组(6种小鼠移植性肿瘤对Chl的敏感性不同, Chl的剂量为对各种肿瘤仅有轻度抑制作用的单一剂量0.3, 0.5或1.0 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>)和二药联合治疗组(TS和Chl的剂量为TS组与Chl组的给药剂量, 将TS和Chl配制成混合药液后一次性给药), 各组给药体积均为每10 g体重0.1 ml, 每天给药1次。记录给药天数, 给药前后的小鼠体重、实验始末的动物数。观察小鼠进食和一般情况。记录腹水瘤小鼠60 d内的存活天数, 按下式计算生存期延长率(increase in life span, ILS): (给药组动物平均存活天数/对照组动物平均存活天数-1) × 100 %。接种后10-14 d处死全部实体瘤小鼠, 剥离瘤块, 称重, 计算抑瘤率(tumor weight inhibition, TWI): (1-给药组动物平均瘤重/对照组动物平均瘤重) × 100 %。

**数据分析** 所有实验数据先经Bartlett法检验方差齐性后, 再进行随机方差分析(ANOVA, F检验)或近似方差分析(F'检验), 差别有意义者采用q检验法(Student-Newman-Keuls法)分析组间差别的统计学意义。为评价TS与Chl合用对小鼠移植性肿瘤的抑瘤疗效(相加、增强或拮抗), 本文试用Bürgi修正公式<sup>[7]</sup>作疗效判别, 即:

$$q = \text{实测值} / \text{期望值} = E_{(A+B)} / (E_A + E_B - E_A \times E_B)$$

上式E<sub>(A+B)</sub>为合用疗效发生率, E<sub>A</sub>和E<sub>B</sub>分别为A药和B药的疗效发生率。若q值为0.85~1.15为单纯相加; >1.15为增强; <0.85为拮抗。

**RESULTS**

给药过程中, 给药组动物的一般状况和进

食量与对照组动物无明显区别, 也无其它特殊毒副反应出现。给药方式、剂量、天数、治疗前后小鼠体重、实验始末小鼠数量、平均生存天数、平均瘤重、ILS、TWI和P值等数据见Tab 1和2。

Tab 1. Antitumor activity of ip TS alone and in combination with ip Chl against ascitic tumor in mice.  $\bar{x} \pm s$ . \*P > 0.05, †P < 0.05, ‡P < 0.01 vs control; §P < 0.05, ¶P < 0.01 vs TS; ††P < 0.05, †††P < 0.01 vs Chl. One way ANOVA and then q test.

Tumor	TS mg · kg <sup>-1</sup> · d <sup>-1</sup> × d	Chl mg · kg <sup>-1</sup> · d <sup>-1</sup> × d	Mice Begin:End	Mean	Increase
				Survival time/d	in life span/%
P388	0	0	9:0	10.2 ± 0.7	
	1.5 × 7	0	8:0	10.5 ± 0.9	2.9 <sup>*</sup>
	0	1.0 × 1	7:0	16.1 ± 2.1	57.8 <sup>§</sup>
H22	1.5 × 7	1.0 × 1	7:0	18.6 ± 3.4	82.4 <sup>††</sup>
	0	0	10:0	12.5 ± 2.2	
	1.5 × 9	0	8:0	15.6 ± 4.2	24.8 <sup>*</sup>
EAC	0	1.0 × 1	8:1	18.9 ± 1.7	51.5 <sup>§</sup>
	1.5 × 9	1.0 × 1	8:1	26.4 ± 13.9	>111.0 <sup>†††</sup>
	0	0	10:0	14.5 ± 3.6	
Lewis	1.5 × 10	0	8:0	14.1 ± 2.7	-2.8 <sup>*</sup>
	0	0.3 × 1	8:0	17.1 ± 2.1	22.4 <sup>†</sup>
	1.5 × 10	0.3 × 1	8:2	32.2 ± 19.7	>122.1 <sup>††</sup>

**TS的抑瘤作用** 单独用TS对P388, H22和EAC腹水瘤无明显的对抗作用, ILS分别是2.9%、24.8%和-2.8%, 但对U14, S180和Lewis实体瘤的生长有明显抑制作用, TWI分别是48.7%、53.8%和56.7%。

**Chl的抑瘤作用** 单独用小剂量Chl对腹水瘤和实体瘤均无明显疗效。对腹水瘤的ILS分别是P388: 57.8%, H22: 51.5%和EAC: 22.4%; 对实体瘤的TWI分别是U14: 33.5%, S180: 30.9%和Lewis肺癌: 22.4%。

**TS与Chl联合给药的抑瘤作用** 二药联合用药对腹水瘤和实体瘤均有相当明显的疗效。对腹水瘤的ILS分别是P388: 82.4%, H22: >111.0%和EAC: >122.1%, 个别H22和EAC荷瘤鼠的存活期可超过60 d, 达到

Tab 2. Antitumor activity of ip TS alone and in combination with ip Chl against solid tumor in mice.  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control; † $P > 0.05$ , ‡ $P < 0.05$  vs TS; § $P < 0.05$ , ¶ $P < 0.01$  vs Chl. One way ANOVA and then  $q$  test.

Tumor	TS $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times \text{d}$	Chl	Mice Begin:End	Body wt/g Begin:End	Tumor wt/ g	Inhibition/ %
S180	0	0	10:10	20.8:24.4	$1.62 \pm 0.66$	
	$1.5 \times 12$	0	8:7	21.9:22.1	$0.75 \pm 0.34$	53.8 <sup>c</sup>
	0	$0.5 \times 6$	8:8	20.8:23.9	$1.12 \pm 0.36$	30.9 <sup>b</sup>
	$1.5 \times 12$	$0.5 \times 6$	8:7	20.9:21.9	$0.45 \pm 0.22$	72.2 <sup>cdh</sup>
U14	0	0	10:10	25.8:30.8	$2.06 \pm 0.57$	
	$1.5 \times 10$	0	9:9	26.3:29.3	$1.06 \pm 0.17$	48.7 <sup>c</sup>
	0	$0.5 \times 5$	8:8	26.8:30.4	$1.37 \pm 0.25$	33.5 <sup>c</sup>
	$1.5 \times 10$	$0.5 \times 5$	9:9	26.9:27.5	$0.71 \pm 0.12$	65.6 <sup>cd</sup>
Lewis lung cancer	0	0	9:9	17.8:18.0	$1.34 \pm 0.52$	
	$1.5 \times 8$	0	7:7	17.2:16.4	$0.58 \pm 0.33$	56.7 <sup>c</sup>
	0	$0.5 \times 3$	7:7	17.4:17.2	$0.91 \pm 0.37$	32.2 <sup>b</sup>
	$1.5 \times 8$	$0.5 \times 3$	7:6	17.0:14.8	$0.37 \pm 0.23$	72.5 <sup>cdh</sup>

治愈标准;对实体瘤的 TWI 分别是 U14: 65.6%, S180: 72.2% 和 Lewis 肺癌: 72.5%。经统计学分析,联合给药与单独用药治疗腹水瘤的疗效差别有显著意义,治疗实体瘤的疗效差别也大都有显著意义。

依据 Tab 1 和 2 的数据,求出的  $q$  值分别是 P388: 1.40, H22: 1.75, EAC: 5.45, U14: 1.00, S180: 1.06 和 Lewis 肺癌: 1.03, 表明 TS 与 Chl 合用对 P388, H22, EAC 和 S180 具有增强抑瘤作用,对 U14 和 Lewis 肺癌则具有相加抑瘤作用。

## DISCUSSION

在对动物没有产生毒性作用的剂量下,单用 TS 对腹水瘤无明显抑制作用,与文献结果<sup>(6)</sup>相符,但能明显抑制实体瘤生长,远高于规程的疗效标准(腹水瘤 ip 给药 ILS 应  $> 50\%$ , 实体瘤 TWI 应  $> 30\%$ ); TS 与对上述各种小鼠移植性肿瘤均无明显疗效的 Chl 合用,抗肿瘤活性明显高于单独给药组,对 P388, H22, EAC 和 S180 具有增强抑瘤作用,对 U14 和 Lewis 肺癌则具有相加抑瘤作用。上述事实至少意味着有可能以低剂量的 Chl 与

无毒剂量的 TS 合用获得与高剂量 Chl 单独应用同样的效果,从而减轻 Chl 的毒副作用。有关最佳用药及最佳联合化疗方案值得深入研究。

TS 与 Chl 合用的协同作用机制尚不清楚,强心甙类药物对肿瘤细胞的生物大分子合成影响很小<sup>(6)</sup>,我们的研究发现,TS 对四种体外培养肿瘤细胞的  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活性有很强的抑制作用,但不影响肿瘤细胞的生物大分子合成(待发表资料)。Chl 通过与细胞 DNA 形成交叉联结而阻碍 DNA 的复制,但其对肿瘤细胞  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶的抑制作用亦是一个重要的因素<sup>(8)</sup>。TS 与 Chl 合用能明显提高疗效,可能同下面两个因素有关。首先,两药抗肿瘤的作用原理不同,它们分别作用于肿瘤细胞生长繁殖所必须的不同环节上,产生协同效果;其次,可能与提高药物进入细胞内的量有关,TS 直接作用于肿瘤细胞膜上的  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶,引起水盐代谢紊乱,膜的通透性增加,是否增加 Chl 进入肿瘤细胞的量,增强了抗肿瘤活性,这些尚有待进一步研究。

## REFERENCES

- 1 Emmelot P, Bos CJ. Studies on plasma membranes.

- IX. A survey of enzyme activities displayed by plasma membranes isolated from normal and preneoplastic livers and primary and transplanted hepatomas of the rat. *Int J Cancer* 1969; 4: 705-22.
- 2 Zhang XW, Huang ZQ, Li CC. Experimental study on transporting activities of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase of leukemia cells. *J Fujian Med Coll* 1991; 25: 106-8.
- 3 Zhang XW, Huang ZQ, Li CC.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity of tumor cells cultured *in vitro*. *J Fujian Med Coll* 1992; 26: 189-92.
- 4 Goldin AG, Safa AR. Digitalis and cancer. *Lancet* 1984; 1(8366): 1134.
- 5 Lu SL, Ma JY, Liu YX, Zhu SN. The effect of ouabain inhibition on the growth of cultured human tumor cells and its relation to sodium-pump. *Tumor* 1985; 5: 1-3.
- 6 Shiratori O. Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells; *in vitro* and *in vivo* studies. *Gann* 1967; 58: 521-8.
- 7 Chen HZ, Sun C, Yu AY, Jin ZJ. Combined antitumor effect of lysine-germanium and cyclophosphamide on S-180 sarcoma in mice. *Chin Pharmacol Bull* 1991; 7: 32-5.
- 8 Baxter MA, Chahwala SB, Hickman JA, Spurgin GE. The effects of nitrogen mustard ( $\text{HN}_2$ ) on activities of the plasma membrane of PC6A mouse plasmacytoma cells. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 1773-8.
- ~~~~~

### “中国药理学报”基金会于1994年4月18日正式成立

中国药理学报基金会筹备组在中国药理学会理事长张均田教授及秘书长林志彬教授的同意下,在基金会(筹)理事长胥彬教授的领导下历经半年的筹备工作,得到中科院上海药物研究所(93)药所办字107号文及中科院上海分院中科沪院(93)发计字第219号文批准,经上海市徐汇区公安局备案,申请到独立的银行帐号,工作已正式运转。1993年12月基金会收到由苏定冯教授所主持的上海大众医药科技服务公司的赞助20000元,1994年2月收到李伯刚董事长领导的中国科学院成都生物所地奥制药公司赞助20000元。为支持办好中国药理学报,为我国新药研究与开发事业做贡献,敬请各界同仁继续给予支持、赞助和捐赠。特此恭告!

中国药理学报基金会