

冬凌草甲素对 C6 大鼠脑胶质瘤裸鼠异种移植模型的抗肿瘤疗效研究

尹波, 李志伟, 张弩, 盛汉松, 林坚

(温州医科大学附属第二医院, 浙江 温州 325000)

摘要: [目的] 利用 C6 大鼠脑胶质瘤裸鼠异种移植模型研究冬凌草甲素对大鼠 C6 脑胶质瘤增殖的抑制效果。[方法] 应用 C6 大鼠脑胶质瘤细胞株建立了该肿瘤的 BALB/C 裸鼠异种移植模型, 腹腔注射低、中、高 3 个剂量的冬凌草甲素和固定剂量的对照化疗药物卡氮芥, 比较给药前后的相对肿瘤增殖率、肿瘤抑制率和肿瘤体积变化, 单因素方差分析比较各组间差异。[结果] 在给药后的 22d, 冬凌草甲素低、中、高 3 个剂量组所对应动物模型的相对肿瘤增殖率均小于 100%, 且随着冬凌草甲素给药剂量的增加而降低; 肿瘤抑制率均为正值, 且随着给药剂量的增加而升高, 但 3 个剂量组之间差异无统计学意义 ($F=7.59, P>0.05$); 在给药后的 22d 内, 未给药组和所有给药组动物模型体内的肿瘤体积均呈逐日增大的趋势, 但在 12d 后, 高剂量冬凌草甲素给药组动物模型的肿瘤体积增量要显著小于未给药组 ($F=41.15, P<0.05$), 在给药组中, 随着给药剂量的增加, 在同一天动物模型所对应的肿瘤体积增量呈现递减趋势。[结论] 冬凌草甲素对大鼠 C6 脑胶质瘤的增殖具有一定的抑制效果。

主题词: 冬凌草甲素; 卡氮芥; 胶质瘤; 异种移植

中图分类号: R739.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)01-0034-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.01.B008

Anti-tumor Efficacy of Oridonin to Rat C6 Glioma in Nude Mouse Xenograft Model

YIN Bo, LI Zhi-wei, ZHANG Nu, et al.

(the 2nd Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract: [Purpose] To study the inhibitory effect of oridonin on proliferation of rat C6 glioma in nude mouse xenograft model with rat C6 glioma. [Methods] BALB/C nude mouse xenograft models with rat C6 glioma were built by rat C6 glioma cell line. Low, medium and high dosages of oridonin, and fixed-dosages carmustine as control were consecutively administrated for nine days intraperitoneally. Tumor proliferation, inhibition rate and volume change among different groups were compared after administration. Experimental data were statistically analyzed by One-Way ANOVA. [Results] Tumor proliferation rates in the 3 different oridonin dosages groups were all less than 100% and as the oridonin dosages increasing the tumor proliferation rate decreasing. Tumor inhibitory rates were all increase as administration dosage increase, but there was no significant difference ($F=7.59, P>0.05$). After 22 days' administration, tumor volumes of the administrated and non-administrated animal models all showed increase day by day. After 12 days' administration, the tumor volume increment in models with oridonin was significantly less than that without oridonin ($F=41.15, P<0.05$). The tumor volume increment showed decline trend on the same day as administration dosage increased. [Conclusion] Oridonin has inhibitory effect on proliferation of rat C6 glioma.

Subject words: oridonin; carmustine; glioma; xenograft

冬凌草为唇形科香茶菜属植物碎米亚 [*Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara] 的干燥全草。冬凌草甲素

(oridonin) 是从冬凌草中提取出来的一种以贝壳杉烯为骨架的四环二萜类化合物, 占冬凌草有效成分的 90% 以上^[1-3]。研究表明, 冬凌草甲素在体外对多种组织来源的人肿瘤细胞株的生长具有明显的抑制作用^[4,5], 此外另有研究证实, 冬凌草甲素在体内对多种移植性肿瘤的生长也具有明显的抑制作用, 可

基金项目: 温州市科技局科研基金资助项目 (Y20090282)

通讯作者: 尹波, 主治医师, 硕士; 温州医科大学附属第二医院神经外科, 浙江省温州市学院西路 109 号 (325000); E-mail: 76yinbo@163.com

收稿日期: 2013-05-28; **修回日期:** 2013-08-31

延长荷瘤动物的寿命,其对实体瘤的治疗作用目前已被广泛地应用于临床,并且取得了明显的疗效^[6,7]。然而,关于冬凌草甲素治疗胶质瘤的实验研究,迄今为止却鲜有文献报道。本研究将国际上通用的胶质瘤细胞系 C6 大鼠脑胶质瘤细胞株接种于 BALB/C 裸小鼠,构建 C6 大鼠脑胶质瘤的裸鼠异种移植模型,利用该模型来研究冬凌草甲素对该肿瘤的疗效,为将冬凌草甲素进一步应用于胶质瘤的临床治疗提供了有力的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级的 BALB/C 裸小鼠共 40 只,购自上海斯莱克实验动物责任有限公司,动物合格证号为 SCXK(沪)2007-0005。所有实验小鼠均为 6 周龄雄性鼠,体重均为 18~20g。

1.1.2 药品

冬凌草甲素购于上海诗丹德生物技术有限公司,应用生理盐水对其进行稀释。根据本研究的需要,将冬凌草甲素稀释为 3 个浓度梯度,分别为:7.5 mg/ml、3.75 mg/ml 和 1.875 mg/ml。卡氮芥购于 Sigma 公司,应用生理盐水将其稀释为 0.3 mg/ml 的溶液。

1.2 方法

1.2.1 C6 大鼠脑胶质瘤裸鼠异种移植模型的构建

C6 大鼠脑胶质瘤细胞株购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。从液氮中取出该细胞株,将细胞复苏后置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。待细胞贴壁并在培养瓶壁上长至超过 80%时,即可进行传代。传代过程中,取对数生长期的细胞,并用生理盐水配制出 10⁷ 细胞/ml 浓度的细胞悬液。取 10 只实验小鼠,向其腋部皮下接种该细胞悬液,每只接种 0.2ml。待实验小鼠皮下形成肿瘤后,在无菌条件下取出肿瘤组织,将其切割成 1~2mm³ 的组织碎块,并用套管针对 30 只实验小鼠于腋部皮下接种该肿瘤组织碎块,每只小鼠接种一块。待接种的肿瘤组织块长至 100mm³ 左右后,可认为 C6 大鼠脑胶质瘤的裸鼠异种移植模型已构建完成。将构建成功的动物模型置于层流架中饲养,所应用的垫料、笼具及动物接触的器械等均经高压消毒后使用。

1.2.2 动物模型的给药方案

将 30 只荷瘤小鼠随机分成 5 组,每组 6 只。第 1 组为阴性对照组,其中每只小鼠均腹腔注射 0.2ml 生理盐水,连续注射 9d;第 2 组为对照化疗药物卡氮芥给药组,给药剂量为 3mg/kg 体重,每只小鼠均腹腔注射事先用生理盐水稀释好的 0.3mg/ml 的卡氮芥溶液 0.2ml,连续给药 9d;第 3~5 组分别为冬凌草甲素低、中、高剂量组,给药剂量分别为 18.75、37.5 和 75mg/kg,因此每组的荷瘤小鼠分别腹腔注射事先用生理盐水稀释好的 1.875、3.75 和 7.5mg/ml 的冬凌草甲素溶液 0.2ml,连续给药 9d。给药后每日观察荷瘤小鼠的生活状态,如精神、饮食、睡眠及二便情况等。

1.2.3 肿瘤体积、肿瘤体积增量、相对肿瘤体积、相对肿瘤增殖率和肿瘤抑制率的计算

在连续给药 9d 后,每 2d 用卡尺测量各组荷瘤小鼠肿瘤的短径(a)和长径(b),并按 $V_n=(a^2 \times b)/2$ 的公式计算出肿瘤体积,其中 n 代表给药后的天数。给药后第 n d 的肿瘤体积增量= V_n-V_0 。荷瘤小鼠给药后第 n d 的相对肿瘤体积(RTV)计算公式: $RTV=V_n/V_0$ 。相对肿瘤增殖率=(给药组 RTV/阴性对照组 RTV)×100%,其中给药组和阴性对照组 RTV 均为一组中 6 只荷瘤小鼠 RTV 的平均值,在给药后的 22d,将 5 组荷瘤小鼠全部处死,取出体内肿瘤并称重,分别计算得到的每组 6 只小鼠肿瘤重量的平均值。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学分析。小鼠体重、相对肿瘤体积和增殖率等指标用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 给药后荷瘤小鼠的生活状态

在连续给药 9 d 后,每日观察荷瘤小鼠的生活状态,发现在给药后的 22d 内 5 组小鼠均呈现出良好的精神状态,外观、毛色、饮食、睡眠及二便情况等均属正常。荷瘤小鼠的活动较正常 BALB/C 裸小鼠相比稍少且稍缓,无死亡现象。

2.2 给药后 22d 内荷瘤小鼠的体重变化

在连续给药 9d 后,对全部荷瘤小鼠 2d 测量一

次体重,测量截至给药后的第 22d。5 组荷瘤小鼠的体重在给药后的 22d 内均呈现出递增趋势。在给药后的第 0~12d,5 组荷瘤小鼠的体重均大致相当。从给药后的第 14d 起,阴性对照组小鼠的体重高于卡氮芥和冬凌草甲素给药组的小鼠,但差异无统计学意义($F=0.085,P>0.05$)(Figure 1)。

2.3 给药后 22d 内荷瘤小鼠的肿瘤体积增量

在连续给药 9d 后,每 2d 用卡尺测量各组荷瘤小鼠的肿瘤体积,并计算出肿瘤体积增量,该过程截

至给药后的第 22d。从给药后的第 6d 起,阴性对照组荷瘤小鼠的肿瘤体积增量均显著大于卡氮芥和冬凌草甲素给药组的小鼠。自给药后第 12d,每个时间点所对应的卡氮芥给药组荷瘤小鼠的肿瘤体积增量均显著小于冬凌草甲素给药组小鼠 ($F=42.78,P<0.05$)(Figure 2)。

2.4 给药后第 22d 各组荷瘤小鼠的肿瘤实像

在给药后的第 22d,将 5 组共 30 只荷瘤小鼠全部处死,并取出体内肿瘤(Figure 3)。卡氮芥和冬凌草

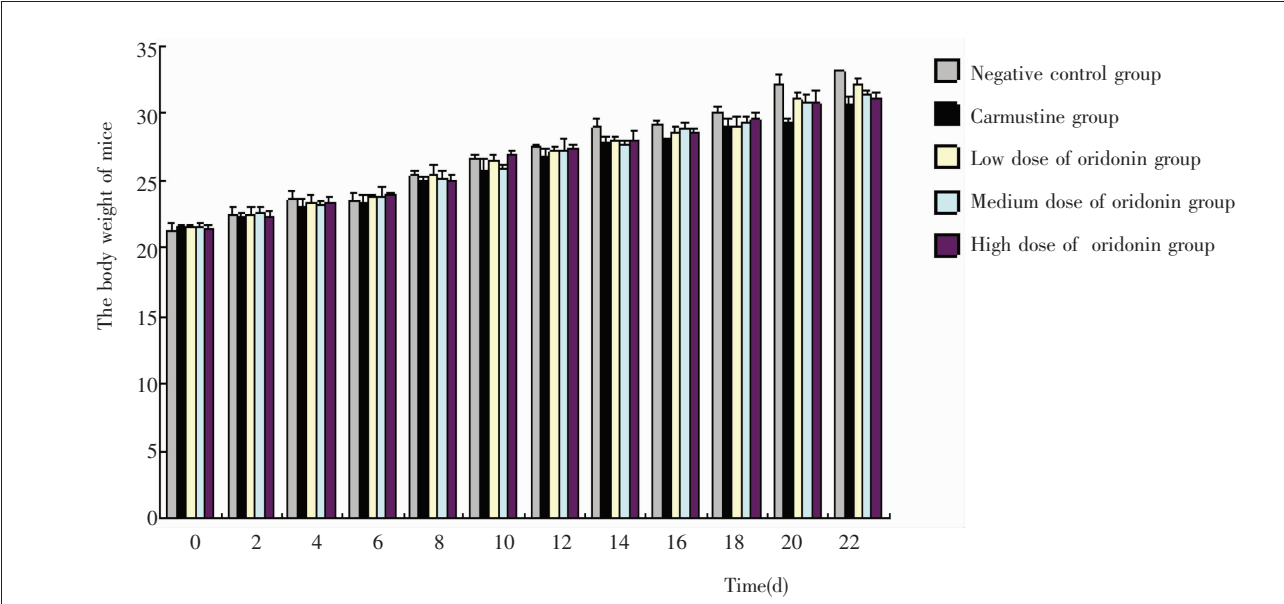
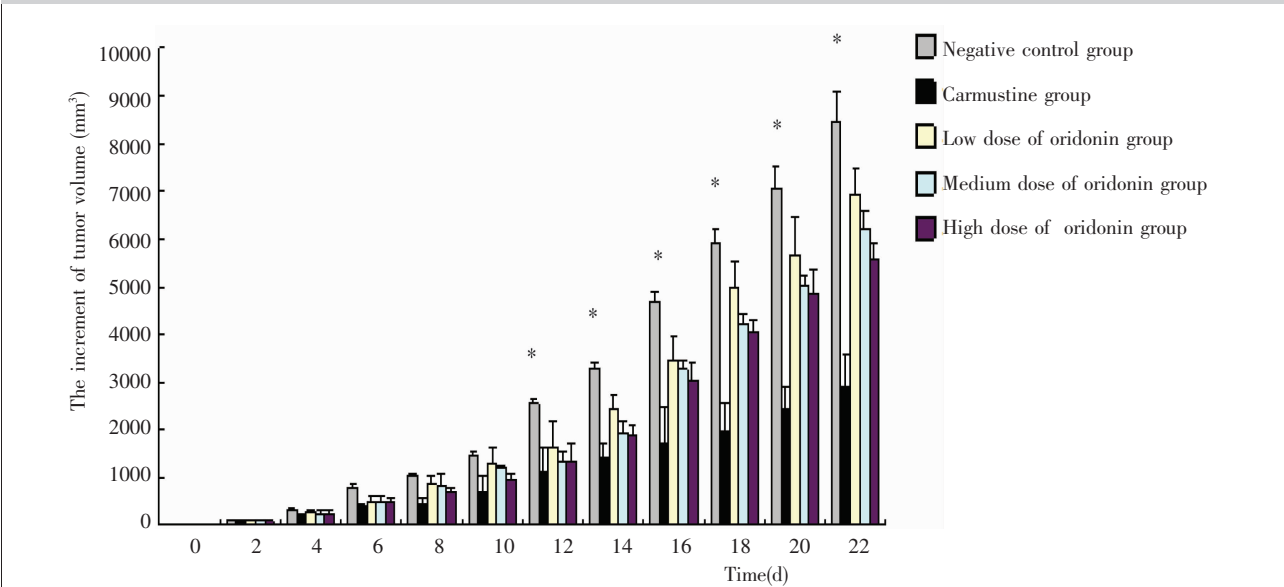


Figure 1 The body weight of mice after administration in different groups



* $P<0.05$

Figure 2 The tumor volume of tumor-bearing mice treated for 22 days in different groups

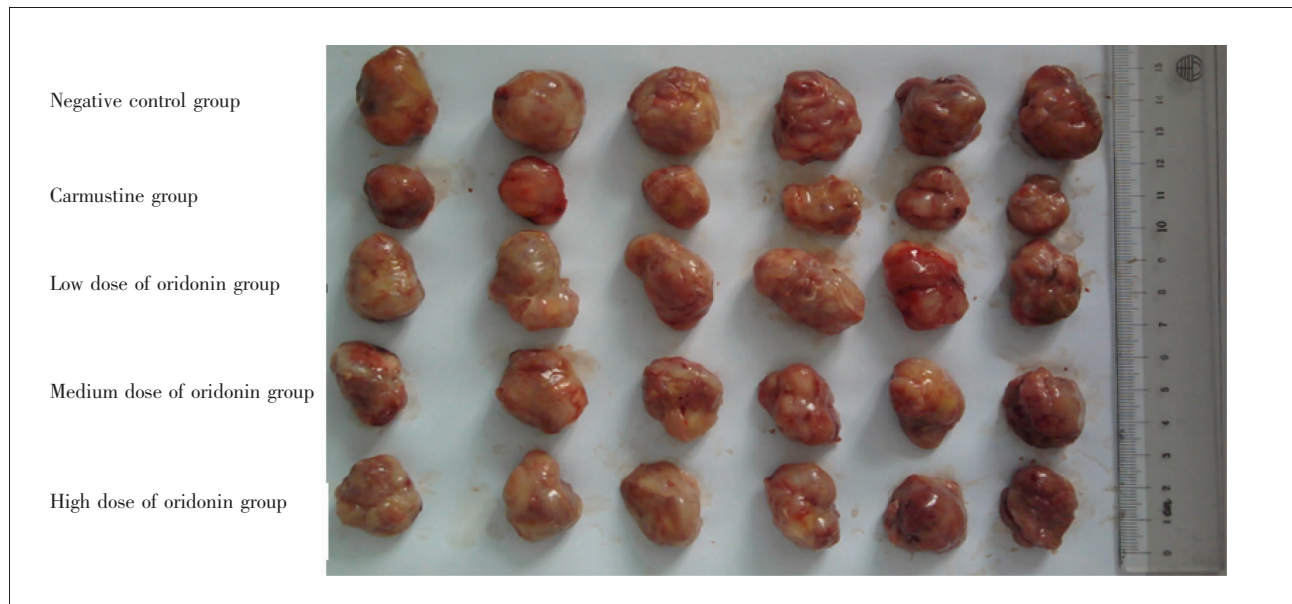


Figure 3 The tumor image of tumor-bearing mice in treated groups 22d after administration

甲素给药组小鼠的肿瘤体积都要小于阴性对照组小鼠。其中,卡氮芥给药组小鼠的肿瘤体积小于阴性对照组小鼠,而冬凌草甲素低剂量组小鼠的肿瘤体积仅略小于阴性对照组小鼠,随着冬凌草甲素给药剂量的增加,小鼠肿瘤的体积呈减小趋势,但冬凌草甲素高剂量组小鼠的肿瘤体积也要大于卡氮芥给药组小鼠。

2.5 给药后第 22d 各组荷瘤小鼠的相对肿瘤增殖率

给药后第 22d 的相对肿瘤增殖率反映的是截至给药后第 22d,小鼠体内肿瘤的增殖情况。卡氮芥给药组小鼠的相对肿瘤增殖率最低,为(36.3%±4.8%)。随着冬凌草甲素给药剂量的增加,小鼠的相对肿瘤增殖率从(83.3%±16.7%)降低至(67.9%±9.1%),但差异不显著($F=57.448$, $P>0.05$)(Table 1)。

2.6 给药后第 22d 各组荷瘤小鼠的肿瘤抑制率

卡氮芥给药组小鼠的肿瘤抑制率最高,为(59.2%±4.4%),而冬凌草甲素低、中、高剂量组小鼠的肿瘤抑制率分别为(7.0%±2.1%)、(11.3%±6.2%)和(31.0%±7.3%),均低于卡氮芥给药组小鼠(Table 2)。

Table 1 The relative tumor volume and proliferation rate of the 22nd day after administration of tumor-bearing mice

Groups	N	Relative tumor volume	Relative proliferation rate(%)
Negative control group	6	83.1±4.2	—
Carmustine group	6	30.1±2.4*	36.3±4.8
Low dose of oridonin group	6	69.2±4.9	83.3±16.7
Medium dose of oridonin group	6	63.6±3.7	76.5±9.6
High dose of oridonin group	6	56.4±3.0	67.9±9.1
<i>F</i>		57.448	94.96
<i>P</i>		0.000	0.000

Note: *:Compared with the negative control group, $P<0.05$.

Table 2 The tumor inhibition rate of the 22nd days after administration of each group of mice

Groups	N	Weight of tumor(g)	Inhibition rate of tumor(%)
Negative control group	6	7.1±0.6	—
Carmustine group	6	2.9±0.1*	59.2±4.4
Low dose of oridonin group	6	6.6±0.4	7.0±2.1
Medium dose of oridonin group	6	6.3±0.3	11.3±6.2
High dose of oridonin group	6	4.9±0.3*	31.0±7.3
<i>F</i>		122.261	170.47
<i>P</i>		0.000	0.000

Note: *:Compared with the negative control group, $P<0.05$.

3 讨论

脑胶质瘤起源于脑部神经胶质细胞,是最常见的颅内肿瘤,约占所有颅内肿瘤的 40%~50%。脑胶

质瘤为浸润性生长,它和正常脑组织没有明显界限,难以完全切除,对放疗、化疗不甚敏感且非常容易复发,因此脑胶质瘤至今仍是全身肿瘤中预后最差的肿瘤之一。研究表明,我国脑胶质瘤的年发病率约为6/10万,年死亡人数则超过3万人,而单纯手术治疗的5年生存率尚不足25%^[8,9],因此寻找更为有效的脑胶质瘤的治疗方法是当前值得研究的一项热门课题。

天然药物抗肿瘤是近年来肿瘤治疗研究的热点之一。冬凌草甲素是从纯天然药物冬凌草中提取出来的一种化学成分,研究表明,冬凌草甲素对常见的15种人癌细胞株的生长有抑制作用,在体内也可抑制多种动物移植瘤的生长,且低毒并对骨髓、肝、肾等器官均无明显损伤^[4-7],因此,冬凌草甲素的抗肿瘤活性具有良好的临床应用和开发价值。目前,关于冬凌草甲素治疗脑胶质瘤的研究尚鲜有报道。为了开辟脑胶质瘤治疗的新途径,本研究应用C6大鼠脑胶质瘤细胞株构建了C6大鼠脑胶质瘤的BALB/C裸小鼠异种移植模型,并利用该动物模型初步探索了冬凌草甲素对C6大鼠脑胶质瘤的抗肿瘤疗效。

本实验建立动物模型时发现荷瘤小鼠的活动较正常BALB/C裸小鼠相比稍少且稍缓,无死亡现象,说明本实验的给药剂量所引起的不良反应较小,具有相对较好的安全性。

在观察荷瘤小鼠体重变化时发现,阴性对照组和给药组小鼠体内的肿瘤均是不断增殖的。在给药后的第0~12d,5组荷瘤小鼠的体重均大致相当,说明截至给药后的第12d,各组荷瘤小鼠体内的肿瘤重量相差无几,这暗示卡氮芥和冬凌草甲素尚未对小鼠体内肿瘤的增殖发挥明显的抑制作用。然而从给药后的第14d起,阴性对照组小鼠的体重高于卡氮芥和冬凌草甲素给药组的小鼠,说明从给药后第14d起,阴性对照组小鼠体内的肿瘤重量已高于卡氮芥和冬凌草甲素给药组小鼠,这暗示卡氮芥和冬凌草甲素抑制了荷瘤小鼠体内肿瘤的增殖,且根据图中数据分析可知,冬凌草甲素对该肿瘤增殖的抑制效果要弱于卡氮芥。

在研究给药后22d内荷瘤小鼠的肿瘤体积增量发现,从给药后的第6d起,阴性对照组荷瘤小鼠的肿瘤体积增量均要显著大于卡氮芥和冬凌草甲素给

药组的小鼠,说明卡氮芥和冬凌草甲素对该肿瘤的增殖具有一定的抑制效果。自给药后第12d起,每个时间点所对应的卡氮芥给药组荷瘤小鼠的肿瘤体积增量均显著小于冬凌草甲素给药组小鼠,说明冬凌草甲素对该肿瘤的抑制效果弱于卡氮芥。此外,从给药后第8d起,每个时间点所对应的冬凌草甲素给药组荷瘤小鼠的肿瘤体积增量均随着冬凌草甲素给药剂量的增加而减小,这说明冬凌草甲素对该肿瘤的抑制效果随着其给药剂量的增加而增强,冬凌草甲素对该肿瘤的抑制作用是剂量依赖性。此外,本研究还发现卡氮芥和冬凌草甲素给药组小鼠的肿瘤体积都要小于阴性对照组小鼠,且冬凌草甲素对该肿瘤的抑制效果弱于卡氮芥,但随着其给药剂量的增大,抑制效果逐渐增强。经腹腔注射低、中、高剂量冬凌草甲素溶液的荷瘤小鼠,在给药后的第22d,其C6大鼠脑胶质瘤的相对肿瘤增殖率分别为 $(83.3\% \pm 16.7\%)$ 、 $(76.5\% \pm 9.6\%)$ 和 $(67.9\% \pm 9.1\%)$,对该肿瘤的抑制率分别为 $(7.0\% \pm 2.1\%)$ 、 $(11.3\% \pm 6.2\%)$ 和 $(31.0\% \pm 7.3\%)$ 。可见冬凌草甲素在BALB/C裸小鼠体内对C6大鼠脑胶质瘤的生长具有明显的抑制作用,并且随着给药剂量的增加,其对该肿瘤的抑制率呈现出上升趋势。这样的结果无疑为寻求胶质瘤的治疗方法提供了新的思路,同时也为我们应用冬凌草甲素进行胶质瘤治疗研究的进一步深入带来了极大的信心。根据近年来的报道可知,冬凌草甲素能够通过诱导肿瘤细胞凋亡、阻滞肿瘤细胞增殖周期、抑制肿瘤细胞核酸和蛋白质的合成、降低肿瘤细胞的钠泵转运活性以及抑制端粒酶活性等途径来发挥其抗肿瘤作用^[10,11]。因此,我们将有必要深入探索冬凌草甲素对C6大鼠脑胶质瘤生长抑制作用的具体机制,从而实现冬凌草甲素对胶质瘤治疗效果的最佳化。此外另有研究表明,冬凌草甲素能够增强其他抗肿瘤药物的疗效,它与某些化疗药物联合应用时具有协同作用,既能增强化疗药物对肿瘤细胞的杀伤力,又能减少对正常细胞的损伤^[12]。这样一来,将冬凌草甲素与化疗药物联合应用于动物模型是否能够进一步提升对C6大鼠脑胶质瘤的抑制率也将成为未来的研究方向之一。

另一方面不可否认相对于体外对C6细胞的抑制效果^[13],冬凌草甲素对脑胶质瘤的体内抑率偏低,这一点可能与冬凌草甲素在体内的稳定性有关,有

研究表明冬凌草甲素在小鼠体内的消除半衰期为42.6384min^[14],属于超短效药物。此外,目前没有针对冬凌草甲素是否能通过血脑屏障的研究,考虑到冬凌草甲素在脑胶质瘤的治疗前景,我们后续将针对此方面进行研究。

本研究初步确定了冬凌草甲素在 BALB/C 裸小鼠体内能够抑制 C6 大鼠脑胶质瘤的增殖,为将来尝试应用冬凌草甲素进行胶质瘤的治疗奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] Li CY,Wang EQ,Cheng Y,et al.Oridonin:an active diterpenoid targeting cell cycle arrest,apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics[J]. Int J Biochem Cell Biol,2011,43(5):701-704.
- [2] Liu Z,Ouyang L,Peng H,et al. Oridonin:targeting programmed cell death pathways as an anti-tumour agent[J]. Cell Prolif,2012,45(6):499-507.
- [3] Tian W,Chen SY. Recent advances in the molecular basis of anti-neoplastic mechanisms of oridonin[J]. Chin J Integr Med,2013,19(4):315-320.
- [4] Sophie C,Jian GH,Dorota H,et al. The cytostatic and cytotoxic effects of oridonin(Rubescenin),a diterpenoid from *Rabdosia rubescens*,on tumor cells of different lineage[J]. Int J Oncol,2005,26(3):579.
- [5] Han QB,Li ML,Li SH,et al. Ent-kaurane diterpenoids from *Isodon rubescens* var. *lushanensis* [J].Chem Pharm Bull,2003,51(7):790-793.
- [6] Duan GS. Progress in the study of brain glioma[J].Chinese Journal of Neurosurgery,2004,20(2):85-87. [段国升.脑胶质瘤临床治疗的进展[J],中华神经外科杂志,2004,20(2):85-87.]
- [7] Gu K,Zhang JN. Research progress in chemotherapy for glioma[J].The Practical Journal of Cancer,2005,20(6):37-38.[顾科,张军宁.脑胶质瘤放疗研究进展[J].实用癌症杂志,2005,20(6):37-38.]
- [8] Chen HS,Qian SX.Research progress on anti tumor molecular pharmacological mechanisms of oridonin [J], Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology,2009,16(5):422-423. [陈红淑,钱松祥.冬凌草甲素抗肿瘤分子药理机制研究进展[J].中国中医药科技,2009,16(5):422-423.]
- [9] Hu YJ,Zhang JC.Progress of modern pharmacological research on oridonin [J]. Guangming Journal of Chinese Medicine,2011,26(3):618-620. [胡颖军,张进朝.冬凌草甲素现代药理研究进展[J].光明中医,2011,26(3):618-620.]
- [10] Zhang S,Wang LX,Fan QX,et al.Cell growth inhibition on human esophageal carcinoma Eca-109 by *Acanthopanax senticosus* and oridonin [J]. Journal of Basic and Clinical Oncology,2007,20(3):226-229. [张松,王留兴,樊青霞,等.刺五加叶皂苷联合冬凌草甲素对人食管癌 Eca-109 细胞的生长抑制作用 [J]. 肿瘤基础与临床,2007,20(3):226-229.]
- [11] Kang N,Zhang JH,Qiu F,et al. Inhibition of EGFR signaling augments oridonin-induced apoptosis in human laryngeal cancer cells via enhancing oxidative stress coincident with activation of both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways[J]. Cancer Lett,2010,294(2):147-158.
- [12] Wu J,Yuan SJ,Yang DX,et al. Oridonin inhibited the growth of BGC823 cells and the expression of MMP-2 and MMP-9 [J]. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army,2007,23(5):344-347. [吴婕,袁守军.杨德宣等,冬凌草甲素抑制 BGC823 细胞的生长及 MMP-2、MMP-9 的表达[J]. 解放军药学报,2007,23(5):344-347.]
- [13] Yin B,Sheng H,Lin J,et al. The cell death of C6 astrocytoma cells induced by oridonin and its mechanism[J]. Int J Clin Exp Pathol,2012,5(6):562-568.
- [14] Zheng HN,Li JX,Yao HZ. Study on pharmacokinetics of oridonin in mice [J].China Journal of Chinese Materia Medica,2011,36(24):3515-3518.[郑海娜,李吉学,姚会枝.冬凌草甲素在小鼠体内的药代动力学研究[J].中国中药杂志.2011,36(24):3515-3518.]