汉防己甲素在肿瘤治疗中的研究进展

陈宝安 王 为 林国为

汉防己甲素(tetrandrine, Tet), 又称粉防己碱, 是从中草药粉防己的根块中提取的双苄基异喹啉类生物碱, 是粉防己的主要有效成分。早期研究表明 Tet 具有消炎、镇痛、降压、抗纤维化等广泛的药理作用。临床用于治疗高血压、矽肺、肝纤维化等疾病, 已取得了较好疗效。近年来的研究证实 Tet 是天然的非选择性的钙通道阻滞剂, 又是钙调蛋白的拮抗剂, 有着良好的应用前景。本文就近年来 Tet 在肿瘤治疗研究的主要进展作一回顾。

1 直接抗肿瘤作用

田晖等⁽¹⁾采用 MTT 法测得 Tet 对人乳腺癌耐阿霉素(ADM)细胞株 MCF-7/Adr 和人口腔上皮癌耐长春新碱(VCR)株 KBV₂₀₀ 及其敏感株均有程度不等的细胞毒作用, 对耐药株的 IC₅₀ 较对应的敏感株 IC₅₀ 分别高 2.4 和 1.9 倍。何琪扬等⁽²⁾采用台盼蓝计数法发现 Tet 对敏感急性白血病细胞株 HL-60 和抗三尖杉酯碱的 HL-60 细胞均有生长抑制作用, 对抗性细胞的抑制作用强于敏感 HL-60, 表明抗药性细胞对 Tet 没有交叉抗性。

王瑞珍等⁽³⁾用 7.5~10 μg/ml Tet 处理人食管癌细胞 ECa109 和 ECa109-C3 24~48h, 观察到肿瘤细胞分裂指数低于对照组约 50%, 但不能完全阻止细胞分裂, 在 10 μg/ml Tet 处理 5 天的生长曲线结果显示其存活率低于对照组 37%。³H-TdR 掺入实验表明 Tet 干扰肿瘤细胞 DNA 合成, 从而抑制肿瘤细胞分裂、增殖, 但对已完成 DNA 合成的 S 期、G₂ 期、M 期没有影响。徐和平等⁽⁴⁾发现 Tet 在 1~40 μg/ml 之间对视网膜母细胞瘤 HXO-Rb44 细胞有明显抑制作用, 清除药物后抑制作用逐渐消失, 肿瘤细胞重新恢复增殖能力, 推测 Tet 干扰 DNA 合成、抑制细胞分裂, 对已完成 DNA 合成的细胞无影响。采用³H-TdR、³H-尿苷和³H-亮氨酸掺入法观察到 40 mg/L Tet 可使白血病 L7712 和肉瘤 S180 细胞 DNA 和 RNA 合成抑制 80% 以上, 对蛋白质合成抑制较弱。去除 Tet 后, 肿瘤细胞 DNA 合成速率仍继续下降, 表明 DNA 复制模板受损⁽⁵⁾。

Dong Y 等⁽⁶⁾观察到 Tet 可抑制 HL-60 细胞和人

正常淋巴细胞生长, 认为 Tet 的细胞毒作用与细胞类型无关, 并且 HL-60 细胞经 24 μmol/L Tet 处理 12h 后可见细胞缩小、核碎裂、凋亡小体形成等典型的凋亡形态改变, DNA 凝胶电泳见梯形条带。此外, 人白血病 U937 细胞⁽⁷⁾、人恶性淋巴瘤 BM13674 细胞⁽⁸⁾、人神经胶质瘤细胞 U138MG⁽⁹⁾经 Tet 处理后也观察到典型的凋亡特征性改变。提示 Tet 可通过诱导肿瘤细胞凋亡而抑制肿瘤细胞生长。

2 放疗增敏作用

高令山⁽¹⁰⁾临床应用 Tet 合并小剂量放射治疗肺癌 97 例, 其中 60 例(61.9%)病灶有不同程度缩小, 缩小大于 1/2 者 31 例。疗效优于单纯小剂量放疗组和单纯中药治疗组, 提示 Tet 具有放疗增敏作用。

刘楠和郑秀龙⁽¹¹⁾采用羟基磷灰石离心法观察到 25、45、60 μmol/L Tet 不影响有氧或缺氧条件下射线照射后白血病 L7712 细胞 DNA 单链产量, 但可明显抑制其重接。各剂量点上 Tet 在照射前或后使用对肿瘤细胞 DNA 合成的影响差异无显著性。

徐和平等⁽¹²⁾测定视网膜母细胞瘤 HXO-Rb44 细胞的生长曲线发现放射与 Tet 合用对肿瘤细胞的抑制作用优于单纯放疗组和单纯 Tet 处理组, 放射前后给药, 二者无明显区别。0.1 μg/ml 低剂量时对肿瘤细胞无直接抑制作用, 但可明显增加放射线对肿瘤细胞的杀伤作用, 放射生存曲线变陡(平均致死剂量 D₀ 减少)随药物浓度增加 D₀ 逐渐降低, 但曲线肩部(准阈剂量 D_q)变化不明显, 说明 Tet 主要通过抑制放射线引起的潜在致死性损伤的修复而起放疗增敏作用。

Chang KH 等⁽⁹⁾观察到 5.0 μg/ml 和 7.5 μg/ml Tet 明显增加放疗对人神经胶质瘤 U138MG 细胞的生长抑制作用, 单用 Tet 或与放疗合用后细胞的 DNA 凝胶电泳均可见梯形条带。提示 Tet 诱导凋亡的作用在放疗增敏也有一定的影响。

3 减毒作用

李福全等⁽¹³⁾采用 ADM 损害大鼠心肌作模型, 每次给予 Tet 10 mg/kg, 每天 3 次, 血清肌酸激酶活性较单用阿霉素组明显降低, 与维生素 E 组近似, 心肌和全血 SOD 活性提高, 丙二醛含量降低(P<0.05)。提示 Tet 可减轻 ADM 引起的心肌损害。

金洪⁽¹⁴⁾以平阳霉素气管内一次性给药复制小白鼠肺间质纤维化模型, 观察到经 Tet 每次 50 mg/kg, 每

周 3 次,连用 4 周治疗的小鼠肺重/体重比值明显减小 ($P < 0.01$),肺表面结节少,质软,光镜下肺内细胞浸润度轻,胶原纤维明显减少,测定 SOD 活力增强,血管紧张素转换酶和羟脯氨酸含量下降,早期用药的效果优于晚期。在博来霉素给药的小鼠肺间质纤维化模型中也观察到 Tet 的上述作用⁽¹⁵⁾。

Chen YJ 等⁽¹⁶⁾发现低剂量 Te(2mg/ml)可以在体外预防单次高剂量照射(10Gy)对健康人单核细胞的损害且保护作用与 Tet 的剂量呈正相关,同时降低过氧化物释放和吞噬细胞的活性而抑制照射引起的炎症反应。动物试验证实经 Tet 治疗后的 Sprague-Dawley 鼠急性放射性皮炎的严重程度明显减轻,治疗效果优于凡士林,组织学检查提示 Tet 通过抗炎作用减轻急性放射反应,表明 Tet 通过抑制炎症反应而对放射损害起保护作用⁽¹⁷⁾。

4 逆转耐药性

多药耐药性(MDR)是肿瘤化疗的一大障碍,其机制较为复杂,目前认为主要与耐药细胞内多药耐药基因(mdr)扩增,过度表达 P-糖蛋白(P-gp)有关。P-gp 为能量依赖性药泵,能将多种抗肿瘤药泵出细胞外,使细胞内药物积累减少,不能有效杀伤肿瘤细胞,从而产生 MDR。抗肿瘤药物在细胞内的积聚和分布,不仅是耐药性的一个重要指标,也是评价逆转耐药性的快速和直观指标。耐三尖杉酯碱(Har)的 HL-60 细胞为多药耐药株,过度表达 mdr 基因和 P-gp,对 ADM、柔红霉素(DNR)、VCR 等药物有交叉耐药⁽¹⁸⁾。

何琪扬等⁽¹⁹⁾观察到无细胞毒作用的 Tet 0.5mg/L 明显增强 ADM 对抗 Har 的 HL-60 细胞的生长抑制作用,并使克隆形成率从单用 ADM 的 60%降至 0.2%;存活率从 87%降至 5%,但不增加 ADM 对敏感的 HL-60 细胞的毒性。荧光法进一步发现 Tet 增加耐药细胞内 ADM 的积聚。此外还发现耐 Har 的 HL-60 细胞改变 DNR 在胞内分布、降低细胞内积聚,2μmol/L Tet 处理细胞后使 DNR 在耐药细胞内积聚明显增加。所积聚的量接近敏感 HL-60 细胞,作用比 2μmol/L VER 明显⁽²⁰⁾。Tet(10⁻⁶mol/L)还明显提高 DNR 及高三尖杉酯碱(HHT)对耐药细胞(人白血病细胞株 K562/A02, K562/HHT)的毒性,而对 K562/S 敏感细胞无明显影响⁽²¹⁾。Tet(10⁻⁶mol/L)与 VCR、足叶乙甙、ADM 和 KBv₂₀₀ 对 DNR 共同处理耐药细胞株 K562/VCR,可使细胞集落均明显减少⁽²²⁾。

田晖等⁽¹⁾观察到 Tet 明显增加 MCF/Adr 细胞对 ADM 和 KBv₂₀₀ 对 VCR 的敏感性。且呈剂量依赖性,而不增加敏感株对 ADM 和 VCR 的敏感性。10μmol/

L Tet 使 MCF-7/Adr 细胞内 ADM 积聚增加 5.1 倍 ($P < 0.01$)对敏感细胞影响不明显。联合用药时 Tet 有效逆转耐药的浓度范围为 0.1 ~ 1.0μmol/L。1.0μmol/L Tet 可逆转 100%肿瘤细胞的耐药性,在此范围内单用 Tet 对体外培养的 MCF-7 和 KB 细胞生长基本无任何抑制作用⁽²³⁾。在保留了 MCF-7/Adr 细胞的耐药特性的裸鼠 MCF-7/Adr 实体瘤模型上,体内单用 Tet 对该实体瘤有一定的抑制作用(25.8%),单用 ADM 无抑制作用(4.4%),二者联用则明显抑制肿瘤生长(54.9%, $P < 0.05$)。值得一提的是 Tet 对小鼠的 LD₅₀ 为 280mg/kg,而 Tet 产生体内逆转效应的单次剂量(20mg/kg)仅为该药 LD₅₀ 的 1/14,显示出该药是一种有较好的临床应用前景的耐药逆转剂⁽¹⁾。

许文林等⁽²⁴⁾选取终浓度为 10⁻⁸、10⁻⁶、10⁻⁴ mol/L Tet 对 30 例急性白血病患者进行体外药敏试验,结果显示随着浓度升高, Tet 逐渐增加 DNR 或 VCR 对白血病细胞的杀伤作用,且对急性淋巴细胞白血病、急性非淋巴细胞白血病、急性未分化白血病均有效。10⁻⁶mol/L Tet 对敏感组和耐药组的促杀伤率分别为(7.85 ± 4.86)%和(29.96 ± 10.20)% ($P < 0.001$), Tet 对正常骨髓细胞的促杀伤作用明显低于异搏定(VER),表明 Tet 可以替代 VER 成为安全的逆转剂。对正规化疗两个疗程以上无效的急性非淋巴细胞性白血病(2例)和多发性骨髓瘤(2例)在原方案基础上每天加服 Tet 240mg,共 6~7 天,2 例获得完全缓解,1 例临床症状及体证明显减轻,血象及生化指标明显改善,患者均未出现心、肝、肾毒性反应。其中 3 例采用 APAAP 法检测肿瘤细胞 P-gp 的表达阳性率分别 38.0%、26.5%、11.0%,以 Tet 处理 3h 后阳性率下降至 4.0%、2.0%、4.0%,且着色程度明显减低,表明 Tet 逆转白血病细胞的机制可能是作用于 P-gp,使其外排泵功能失活从而提高细胞内药物浓度⁽²⁵⁾。

Choi SU 等⁽²⁶⁾发现 3.0mmol/L Tet 和 10mmol/L VER 使泰素(TAX)对 HCT15 细胞(P-gp 阳性)的 IC₅₀ 降低 3100 倍和 410 倍,使 ADM 对其的 IC₅₀ 降低 36 和 18.2 倍。同时发现 Tet 和 VER 不影响 TAX 和 ADM 对 SK-OV-3 细胞(P-gp 阴性)的细胞毒作用。另一方面, Tet 和 VER 均增加已知的 P-gp 底物罗丹明 123 在 HCT15 细胞的积聚率,经新鲜介质排出 2h 后,仍使罗丹明 123 的残余率较对照组增加 5 倍和 2.6 倍,而对 SK-OV-3 细胞的罗丹明 123 积聚率和残余率均无影响。因此认为, Tet 通过调节 P-gp 增加多药耐药相关药物的细胞毒作用。

符立梧等⁽²⁷⁾采用流式细胞仪观察到 ADM 培养

24h 可诱导 74.6% 敏感细胞株 MCF-7 凋亡, 而只引起 14.3% 的 MCF-7/Adr 细胞凋亡, 合用 ADM 和 Tet 能显著使 MCF-7/Adr 细胞的凋亡增至 47.0%, 较单用 ADM 明显提高 ($P < 0.01$); 对 MCF-7 的凋亡作用较单用 ADM 无明显差异 ($P > 0.05$)。加入 Tet 对耐药和敏感细胞株的 bcl-2 蛋白表达水平均未见明显影响。提示 Tet 能逆转耐药细胞对 ADM 的凋亡抗性, 其机制可能与 bcl-2 蛋白表达无关。

综上所述, Tet 不仅能直接抑制肿瘤生长, 并且具有放疗增敏、逆转耐药、减轻放疗毒副作用的作用, 表明 Tet 在抗肿瘤治疗中有着良好的临床应用前景。当然, Tet 抗肿瘤治疗的相关机制及临床具体用法仍有待进一步探索。

参 考 文 献

- 田 晖, 潘启超. 双苄基异喹啉类生物碱粉防己碱与小檗胺逆转多药抗药性的比较研究. 药学学报 1997; 32(4): 245—250.
- 何琪扬, 张鸿卿, 庞大本, 等. 抗三尖杉酯碱的 HL-60 细胞抗粉防己碱诱导的细胞凋亡. 中国药理学报 1996; 17(6): 545—549.
- 王瑞珍, 潘琼婧. 汉防己甲素对体外培养人食管癌上皮细胞增殖的影响. 中华肿瘤杂志 1981; 3(2): 86—88.
- 徐和平, 王成业, 祝和成. 汉防己甲素和长春新碱对人视网膜母细胞瘤细胞系 HXO-Rb44 生长的抑制作用. 中国中医眼科杂志 1995; 5(2): 67—69.
- 刘力生. 汉防己甲素、乙素对 L7712 和 S180 细胞 DNA、RNA 和蛋白质合成的抑制作用. 中国药理学通报 1990; (1): 53—55.
- Dong Y, Yang MM, Kwan CY. In vitro inhibition of proliferation of HL-60 cells by tetrandrine and coriolus versicolor peptide derived from Chinese medicinal herbs. Life Sci 1997; 60(8): PL135—140.
- Lai YL, Chen YJ, Wu TY. Induction of apoptosis in human leukemic U937 cells by tetrandrine. Anticancer Drugs 1998; 9(1): 77—81.
- Song Q, Baxter GD, Kovacs EM. Inhibition of apoptosis in human BM13674 tumor cells by okadaic acid. J Cell Physiol 1992; 153: 550—556.
- Chang KH, Chen ML, Chen HC. Enhancement of radiosensitivity in human glioblastoma U138MG cells by tetrandrine. Neoplasma 1999; 46(3): 196—200.
- 高令山. 汉防己甲素合并小剂量放射治疗肺癌 97 例的临床研究. 中医杂志 1980; (8): 37—39.
- 刘 楠, 郑秀龙. 米索硝唑和粉防己碱对白血病 L7712 细胞 DNA 辐射损伤与修复的影响. 中国药理学报 1985; 6(3): 209—211.
- 徐和平, 王成业, 祝和成, 等. 汉防己甲素对视网膜母细胞瘤细胞系 HXO-Rb44 放射敏感性的影响. 中国实用眼科杂志 1995; 13(11): 668—670.
- 李福全, 马春力, 张明远, 等. 粉防己碱对阿霉素心脏损害大鼠的保护作用. 佳木斯医学院学报 1994; 17(6): 12—14.
- 金 洪. 汉防己甲素阻断平阳霉素所致肺间质纤维化的实验研究. 中华结核和呼吸杂志 1991; 67: 359—361.
- Ma JY, Barger MW, Hubbs AF. Use of tetrandrine to differentiate between mechanisms involved in silica-vesus bleomycin-induced fibrosis. J Toxicol Environ Health 1999; 57(4): 247—266.
- Chen YJ, Tu ML, Kvo HC. Protective effect of tetrandrine on normal human mononuclear cells against ionizing irradiation. Biol Pharm Bull 1997; 20(11): 1160—1164.
- Chen YJ, Dai YS, Chec BF. The effect of tetrandrine and extracts of centella asiatica on acute radiation dermatitis in rats. Biol Pharm Bull 1999; 22(7): 703—706.
- 何琪扬, 周卫东, 纪 林. 抗三尖杉酯碱的人白血病 HL-60 细胞的特性. 中国药理学报 1996; 17(5): 463—467.
- 何琪扬, 孟凡宏, 张冯卿. 粉防己碱和蝙蝠葛碱减低抗三尖杉酯碱的人白血病 HL-60 细胞对阿霉素的抗性. 中国药理学报 1996; 17(2): 179—181.
- 何琪扬, 李玉梅, 李 岩, 等. 柔红霉素在人敏感和抗三尖杉酯碱的 HL-60 细胞中分布和积聚变化. 中国组织化学与细胞化学杂志 1996; 5(1): 6—10.
- 夏 薇, 敖忠芳, 朱广荣. 一种有效的肿瘤耐药逆转剂: 汉防己甲素逆转白血病耐药的实验研究. 南京医科大学学报 1995; 15(3): 543—546.
- 贾正平, 谢景文, 徐丽萍, 等. 粉防己碱逆转耐细胞株 K562/VCR 多药耐药的研究. 兰州医学院学报 1995; 21(4): 203—204.
- 叶祖先, 孙爱续, 李兰芳, 等. 汉防己甲素对阿霉素或长春新碱耐药株人癌细胞的逆转抗药性作用. 中国中药杂志 1996; 21(6): 369—371.
- 许文林, 敖忠芳, 陈玉心, 等. 汉防己甲素对柔红霉素和长春新碱增效作用的实验研究. 中华血液学杂志 1994; 15(5): 256—257.
- 许文林, 钱 军, 费 霞, 等. 汉防己甲素逆转血液系统肿瘤细胞多药耐药的临床观察. 中华血液学杂志 1999; 20(7): 383—384.
- Choi SU, Park SH, Kim KH, et al. The bisbenzylisoquinoline alkaloids, tetrandrine and fangchinoline, enhance the cytotoxicity of multidrug resistance related drugs via modulation of P-glycoprotein. Anticancer Drugs 1998; 9(3): 255—261.
- 符立梧, 潘启超, 黄红兵, 等. 粉防己碱逆转肿瘤多药抗药性细胞的凋亡抗性作用. 中国药理学报 1998; 19(4): 309—311.