

## 真菌植物提取物体内抗小鼠 S180 作用及与环磷酰胺联合作用

原茵, 贺小琼, 王子睿, 姚乾  
(昆明医科大学公共卫生学院, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 研究真菌植物提取物 AMH-D 的体内抗肿瘤作用, 与环磷酰胺是否具有联合作用以及联合作用的形式和强度, 为抗癌药物的开发提供科研基础. **方法** 昆明种小鼠右腋下接种 S-180 肿瘤细胞, 随机分组后, 第 2 天开始腹腔注射给药, 隔天给药 1 次, 第 11 天处死小鼠, 剥离并称量肿瘤, 以肿瘤重量作为分析评价指标. **结果** 提取物 AMH-D 能显著抑制 S-180 的生长, 在剂量为 150 mg/kg 时抑瘤率达 50.45%, 其肿瘤抑制作用呈现剂量-效应关系. AMH-D 对小鼠体重增长没有明显的影响. AMH-D 与环磷酰胺具有体内协同抗肿瘤作用. **结论** 真菌植物提取物 AMH-D 具有体内抑制 S-180 肿瘤作用, 并与临床抗癌药物环磷酰胺具有体内联合抗癌作用.

**[关键词]** 真菌植物; 体内抗癌; S-180; 联合作用; 环磷酰胺

**[中图分类号]** R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2013) 09-0016-04

## The Anti-cancer Effects in Vivo of Fungus Plant Extract on Transplanted Tumor S-180 in Mice and the Synergistic Effects with Cyclophosphamide

YUAN Yin, HE Xiao-qiong, WANG Zi-rui, YAO Qian  
(School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** Study the anti-tumor effects in vivo of AMH-D on S-180 cell lines, the synergistic effects of AMH-D and cyclophosphamide, and investigate the way and its strength of the effect. Provide the basis for the development of anti-cancer drug. **Methods** Kunming mice were transplanted with S-180 tumor cells subcutaneously in the right armpit. Intraperitoneal injection was done after randomization on the next day. Mice were killed on the eleventh day, and tumors were stripped and weighed. The tumor weight was used as indicator for analysis and evaluation. **Results** The results showed that AMH-D could effectively inhibit the growth of S180 cells transplanted tumor. The tumor inhibition rate was 50.45% at the dose of 150 mg/kg, with a dose-effect relationship. There were no obvious impacts on the growth of the weight of mice. The results showed that AMH-D had a synergistic effect combined with cyclophosphamide within a certain dose. **Conclusion** Fungus extract AMH-D has a great effect on anti-tumor in vivo of S180 cells transplanted tumor, and has a synergistic effect combined with cyclophosphamide within a certain dose.

**[Key words]** Fungus plant; Anti-tumor; S-180; Synergistic effect; Cyclophosphamide

AMH (Antimutagen-He) 是云南一种特殊真菌的提取物. 该真菌植物的提取物 AMH 具有很强的抗突变、预防致癌物诱发动物肿瘤、抑制动物移植性肿瘤生长和体外杀灭人类癌细胞作用<sup>[1-8]</sup>; 由

AMH 分离的活性组分 AMH-K 在 20~25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度下, 能完全抑制并杀灭所有已检测的人类乳腺癌细胞株和前列腺癌细胞株, 且对人正常乳腺细胞株基本无毒作用; 经毒理学安全性评价检验, 未发

**[基金项目]** 云南省科技计划项目 (2009FXL001)

**[作者简介]** 原茵 (1986~), 女, 黑龙江密山市人, 在读硕士研究生, 主要从事卫生毒理学研究工作.

**[通讯作者]** 贺小琼. E-mail: [hexqcn@yahoo.com.cn](mailto:hexqcn@yahoo.com.cn)

现 AMH 具有明显的毒性作用. 笔者在前期的体外抗癌研究中发现, AMH-D 能够显著地抑制人肺癌 A-549 细胞的增殖, 呈现明显的剂量-效应和时-效关系, 在剂量为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 抑瘤率可达 86.38%, 72 h 的  $\text{IC}_{50}$  为 21.28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . AMH-D 与 DDP、5-FU 联合实验, 分别表现出具有相加作用和协同作用.

笔者前期的大量研究均证实, 真菌植物提取物 AMH 在癌症的治疗方面具有很好的开发应用前景. 本研究中, 笔者采用植物化学分离手段, 将该提取物进行进一步分离, 得到活性组分 AMH-D. 笔者采用体内抗癌试验, 研究了 AMH-D 对小鼠肉瘤 S-180 的体内抗肿瘤作用, 以及与抗肿瘤药物环磷酰胺 (cyclophosphamide, CP) 的联合作用, 为 AMH 的后续研究提供科学依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 昆明种小鼠, 18~23 g. 由昆明医科大学动物实验中心提供, 实验室生产许可证编号: scxk (滇) 2011-0004.

**1.1.2 试剂** 二甲基亚砷 (DMSO): 分析纯, 西陇化工股份有限公司生产, 批号: 1107031.

**1.2.2 AMH-D 体内联合 CP 抗癌作用** 96 只昆明种小鼠按上述方法接种 S-180 肿瘤细胞, 制成皮下移植瘤模型.

接种后将小鼠称重并随机分成 8 组, 分别为 DMSO 溶剂对照组、CP 阳性对照组、3 个 AMH-D 剂量组和 3 个 AMH-D 与 CP 联合用药组. AMH-D 组剂量分别为 25 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg. 阴

性对照组给予 DMSO, 环磷酰胺剂量为 20 mg/kg. 于接种后的第 1 天开始每隔 1 d 腹腔注射给药, 每只小鼠每次给药 0.05 mL, 一共给药 5 次.

**1.1.3 瘤株** 小鼠肉瘤 S-180 细胞株, 由昆明医科大学重点实验室提供.

**1.1.4 样品** 样品 AMH-D 是由真菌植物提取物 AMH 通过乙醇回流提取法、有机溶剂萃取法和硅胶柱层析等分离手段得到的活性组分, 用 DMSO 配制.

### 1.2 实验方法

**1.2.1 AMH-D 体内抗癌作用** 按移植性肿瘤研究法<sup>[9]</sup>, S-180 肿瘤细胞经小鼠腹水传代 2 次后, 无菌条件下抽取生长良好呈米汤样的小鼠腹水, 用灭菌生理盐水稀释. 取昆明种小鼠 48 只, 对小鼠左腋下进行皮下注射, 每只 0.1 mL (约  $5 \sim 6 \times 10^6$  个瘤细胞), 制成皮下移植瘤模型.

接种后将小鼠称重并随机分成 4 组, 每组 12 只, 雌雄各半. 分别为 DMSO 溶剂对照组和 3 个 AMH-D 剂量组, 剂量分别为 50 mg/kg、100 mg/kg 和 150 mg/kg. 阴性对照组给予 DMSO, 其他各组给予相应的待测物. 于接种后的第 2 天开始腹腔注射给药, 隔天给药 1 次, 每只小鼠每次给药 0.05 mL, 一共给药 5 次. 于最后 1 次给药后的第 2 天脱颈处死小鼠, 称重, 完整剥取实体瘤并称重. 按以下公式计算抑瘤率, 进行统计分析.

$$\text{抑瘤率}(\%) = \frac{\text{溶剂对照组瘤重均数} - \text{实验组瘤重均数}}{\text{溶剂对照组瘤重均数}} \times 100\%$$

性对照组给予 DMSO, 环磷酰胺剂量为 20 mg/kg. 于接种后的第 1 天开始每隔 1 d 腹腔注射给药, 每只小鼠每次给药 0.05 mL, 一共给药 5 次.

实验结束时, 处死小鼠, 完整剥取实体瘤并称重. 按以下公式计算抑瘤率和 Q 值并判断 2 药的联合效应, 进行统计分析.

$$\text{抑瘤率}(\%) = \frac{\text{溶剂对照组瘤重均数} - \text{实验组瘤重均数}}{\text{溶剂对照组瘤重均数}} \times 100\%$$

$$\text{金氏公式}^{[10]}: Q = \frac{E(A+B)}{EA + (1-EA) \times EB}$$

其中  $E(A+B)$  为 2 药合用的抑制率, EA 和 EB 分别为两药单用的抑制率. Q 为 0.85~1.15 表示 2 药作用相加,  $Q > 1.15$  表示 2 药作用协同,  $Q < 0.85$  表示 2 药作用拮抗.

### 1.3 数据统计分析

利用 SPSS 统计软件进行数据的统计分析, 采用方差分析, 实验数据用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,  $P < 0.05$

为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 AMH-D 体内抗癌作用

AMH-D 的体内抗癌结果见表 1. AMH-D 对 S-180 的抑瘤率均大于 30%, 分别为 36.04%、

43.14%、50.45% (如图 1)。与对照组相比, 实验组的平均瘤重均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 表明 AMH-D 在 50 ~ 150 mg/kg 的剂量范围内能显著抑制 S-180 肿瘤的生长。相邻剂量组之间平均瘤重均具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 且呈现递减趋势, 表明 AMH-D 的抑瘤作用呈现剂量-效应关系。各剂量组给药后的小鼠体重与对照组相比较, 150 mg/kg 组小鼠平均体重低于对照组, 尽管结果比较未发现有统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 说明高剂量的

AMH-D 可能有一定的毒性。

### 3.2 AMH-D 与环磷酰胺的体内联合抗癌作用结果

联合作用结果见表 2、图 2。结果表明, AMH-D 与 CP 合用用药对小鼠肉瘤 S-180 的生长有抑制作用, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。当联合组的 AMH-D 为 50 mg/kg 时, Q 值为 1.27, 且与 CP 组相比, 有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 表明在此浓度时, AMH-D 与 CP 联合

表 1 AMH-D 与 CP 的体内联合抑制 S-180 细胞移植瘤作用 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab. 1 The result of AMH-D in inhibiting the growth of S180 cells ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量(mg/kg)	n	小鼠体重 (g)		平均瘤重(g)	抑瘤率 (%)
			给药前	给药后		
DMSO 组	-	12	20.11 ± 1.93	28.60 ± 2.96	2.64 ± 0.69	-
AMH-D 组	50	12	20.03 ± 1.73	30.40 ± 4.13	1.69 ± 0.44**	36.04
	100	12	20.05 ± 1.73	30.25 ± 2.93	1.50 ± 0.55**	43.14
	150	12	20.02 ± 1.67	25.71 ± 3.19	1.31 ± 0.44**	50.45

与 DMSO 组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

表 2 AMH-D 与环磷酰胺的体内联合治疗后的瘤重和抑瘤率 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 The tumor weight and anti-tumor rate after treatment with AMH-D combined with cyclophosphamide ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (雄 / 雌)	剂量 (mg/kg)		瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
		CP	AMH-D		
DMSO 组	6/6	0	0	2.24 ± 0.56	-
CP 组	6/5	20	0	1.45 ± 0.74**	35.43
AMH-D1	6/5	0	25	2.10 ± 0.70	6.52
AMH-D2	6/6	0	50	1.77 ± 0.84	21.17
AMH-D3	3/6	0	100	1.51 ± 0.57**	32.64
D1+CP	6/6	20	25	1.13 ± 0.38**	49.70
D2+CP	5/6	20	50	0.84 ± 0.41** $\Delta$	62.37
D3+CP	5/6	20	100	1.01 ± 0.43**	55.16

与 DMSO 组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 CP 组比较,  $\Delta P < 0.05$ 。

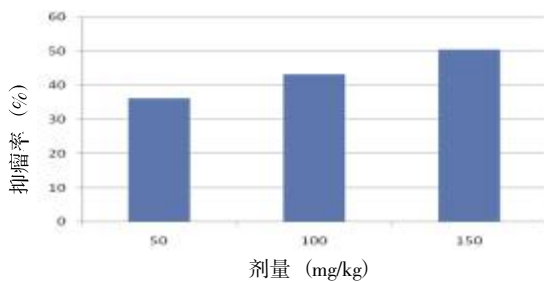


图 1 AMH-D 对小鼠 S180 抑瘤作用

Fig. 1 The anti-tumor activity of AMH-D against S180 cells

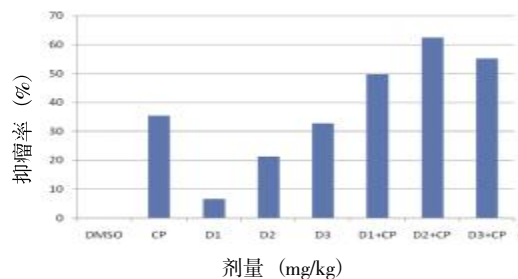


图 2 AMH-D 与 CP 联合抑制 S-180 细胞移植瘤作用

Fig. 2 The anti-cancer activity of AMH-D combined with cyclophosphamide

注: 对照组: DMSO; AMH-D 组: D1、D2、D3; CP 组: CP; 联合组: CP+D1、CP+D2、CP+D3。

应用有协同效果. 当联合组的 AMH-D 剂量为 100 mg/kg 时, Q 值为 0.98, 表明具有相加作用.

### 3 讨论

临床目前使用的肿瘤化疗药物大多毒性大, 肿瘤易产生耐药性, 因此寻找天然植物药物越来越受到重视. AMH 为云南的一种特殊真菌的提取物, 大量实验研究证明 AMH 具有很好的体外肿瘤抑制作用. 国内外尚未发现其他的相关报道.

目前我国抗癌植物药的开发生主要集中在各种具有显著抑瘤作用的抗癌(细胞毒性中草药品种上, 如干扰癌细胞 DNA、RNA 和蛋白质的合成从而使癌细胞停止生长到最终凋亡. 已成功开发的中草药抗癌症新药中包括: 温莪术提取物<sup>[11]</sup>(榄香烯注射液)、乌头提取物<sup>[12]</sup>(乌头注射液)、冬凌草提取物<sup>[13]</sup>(冬凌草丙素, 丁素等等)、粗榧提取物、苦豆子提取物<sup>[14]</sup>(氧化苦参素)等. 这类细胞毒性的中草药提取物, 在抗癌的过程中, 往往也会影响机体正常细胞的生长, 主要表现在动物实验中抑制小鼠体重的增长.

本次实验研究了 AMH-D 的体内抗肿瘤作用. 研究表明, AMH-D 能够显著抑制小鼠 S-180 的生长, 并且随着剂量的增加, 抑瘤率呈现上升趋势, 具有很好的剂量-效应关系. AMH-D 对小鼠体重的增长没有明显的影响. AMH-D 与环磷酰胺体内联合抗癌作用结果显示, 25 mg/kg 和 50 mg/kg 的 AMH-D 与 CP 联合使用, 具有协同抗肿瘤作用, 表明该植物提取物具有促进临床抗肿瘤药物抗癌作用效果, 可作为联合抗肿瘤药物使用.

笔者的体内体外抗癌试验结果表明, AMH-D 具有显著的抗肿瘤活性, 具有较好的抗肿瘤开发和应用前景.

#### [参考文献]

[1] XIAOQIONG H E. The antimutagenicity and anticancer ef-

fects of a kind of wild mushroom extract[J]. Proceedings of the American Association for Cancer Research, 2007, 48 (1):1 310 - 1 316.

- [2] XIAOQIONG H E. The inhibitory effects of natural plant extract AMH on the mutagenicity of several carcinogens in vitro. U.S[J]. Chinese Journal of Lymphology and Oncology, 2004, 3(2):105 - 107.
- [3] 贺小琼, 段生朝, 邓艳. 真菌植物提取物 AMH 对环磷酰胺致突变作用的抑制作用[J]. 中医药学报, 2004, 32 (4):55 - 56.
- [4] 贺小琼, 邓艳, 段生朝. 真菌植物提取物 AMH 体外对苯并(a)芘致突变作用的抑制作用[J]. 中成药, 2004, 26(8):652 - 654.
- [5] 贺小琼, 邓艳, 段生朝. 真菌植物提取物 AMH 对 2-氨基芴致突变作用的抑制作用[J]. 云南中医中药杂志, 2004, 25(3):33 - 34.
- [6] 贺小琼, 陈彦红, 熊祥玲. 真菌植物提取物 AMH 体外对卷烟焦油致突变作用的抑制作用[J]. 癌变·畸变·突变, 2004, 16(1):46 - 49.
- [7] 贺小琼, 段生朝, 邓艳, 等. 真菌植物提取物 AMH 体外对染发剂致突变作用的抑制作用[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(6):710 - 711.
- [8] 贺小琼. 天然植物制剂 AMH 体外抑制多种致癌物致突变作用[J]. 肿瘤, 2003, 23(6):494 - 496.
- [9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社, 2002:1 758.
- [10] 金正均. 合并用药中的相加[J]. 中国药理学通报, 1980, 1(17):70 - 75.
- [11] 冯刚, 黄涛, 卢宏达, 等. 莪术油注射液对小鼠移植性 S180 肉瘤血管行程的抑制作用[J]. 肿瘤研究与临床, 2005, 4(17):233 - 235.
- [12] 黄永融. 乌头抗癌研究概述[J]. 福建中医药, 1991, 1 (22):54 - 56.
- [13] 辛庆锋, 陈俊辉. 冬凌草甲素抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 医学综述, 2008, 3(11):455 - 457.
- [14] 焦河玲, 邓虹珠, 王晓娟, 等. 苦豆子总碱对 S180 荷瘤小鼠的抑瘤作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 2 (17):163 - 165.

(2013-06-25 收稿)