

## 4-乙氧基-2-羟基-6-甲基苯甲酸体外抗肿瘤作用及与顺铂联合作用研究

王子睿<sup>1)</sup>, 贺小琼<sup>1)</sup>, 姚乾<sup>2)</sup>, 王静<sup>1)</sup>, 贺云发<sup>1)</sup>, 胡松杉<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学公共卫生学院, 云南昆明 650500; 2) 昆明医科大学第三附属医院, 云南省肿瘤医院, 云南昆明 650118)

**[摘要]** **目的** 研究4-乙氧基-2-羟基-6-甲基苯甲酸(以下简称D6B2)对多株人体肿瘤细胞体外抗肿瘤作用的剂量-效应和时间-效应关系,发现敏感的肿瘤细胞株,观察该化合物与临床抗癌药物是否具有体外联合抗肿瘤作用,以及作用形式和强度。**方法** 采用体外抗肿瘤实验,研究不同浓度的D6B2对人鼻咽癌细胞株CNE、人肝癌细胞株Hep G2、人子宫颈癌细胞株HeLa、人胆管癌细胞株QBC939和人白血病细胞株K562的体外抑制作用的剂量-效应关系,进一步观察该化合物对HeLa细胞体外抑制作用的时间-效应关系,以及其与顺铂是否具有联合抗肿瘤作用。**结果** D6B2在浓度为25 μM、50 μM、100 μM、150 μM、200 μM时对CNE细胞的抑制率分别为24.94%、42.11%、65.74%、70.22%、73.11%, IC<sub>50</sub>为66.9 μM;对Hep G2细胞的抑制率分别为23.15%、54.56%、62.95%、70.14%、75.18%, IC<sub>50</sub>为60.98 μM;对HeLa细胞的抑制率分别为31.34%、60.76%、78.43%、85.78%、90.75%, IC<sub>50</sub>为40.7 μM;对QBC939细胞的抑制率分别为5.97%、12.05%、28.44%、35.28%、51.31%, IC<sub>50</sub>为197.07 μM;对K562细胞的抑制率分别为18.20%、35.48%、46.76%、58.44%、57.32%, IC<sub>50</sub>为120.06 μM。D6B2对HeLa细胞的24 h抑制率分别为7.96%、9.56%、10.98%、14.00%、17.33%, 48 h抑制率分别为10.62%、25.96%、47.63%、48.24%、49.03%, 72 h抑制率分别为18.08%、53.68%、85.55%、87.86%、82.07%。D6B2在25 μM、50 μM、100 μM剂量下与10 μM的DDP联合用药,3组的CDI值分别为0.039、0.019和0.014。**结论** D6B2对CNE、Hep G2、HeLa、QBC939和K562细胞均有显著的体外抗肿瘤作用,存在明显的剂量-效应关系,人子宫颈癌细胞株HeLa对其最为敏感。D6B2对HeLa的体外抑制作用具有时间-效应关系。D6B2与临床抗癌药物顺铂具有显著的体外协同抗肿瘤作用。

**[关键词]** 4-乙氧基-2-羟基-6-甲基苯甲酸;抗肿瘤作用;联合抗肿瘤作用;顺铂;人鼻咽癌细胞;人肝癌细胞;人子宫颈癌细胞;人胆管癌细胞;人白血病细胞

**[中图分类号]** R329.2\*8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2014)09-0004-05

## In Vitro Anticancer Effects of 4-Ethoxy-2-hydroxy-6-methyl Benzoic Acid and Its Combinative Anticancer Effects with Cis-DDP

WANG Zi-rui<sup>1)</sup>, HE Xiao-qiong<sup>1)</sup>, YAO Qian<sup>2)</sup>, WANG Jing<sup>1)</sup>, HE Yun-fa<sup>1)</sup>, HU Song-shan<sup>1)</sup>

(1) *School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500;* 2) *The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Institute of Yunnan Tumor, Kunming Yunnan 650118, China*

**[Abstract]** **Objective** To investigate the in vitro anticancer effects of 4-ethoxy-2-hydroxy-6-methyl benzoic acid (D6B2) and its combinative anticancer effects with clinical anticancer drug cis-DDP. **Methods** Human cancer cell lines CNE, Hep G2, HeLa, QBC939 and K562 were used for the in vitro anticancer studies. The anticancer effects were detected by cell counting or MTT assay. **Results** The inhibitory ratios of D6B2 (25 μM,

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(30960437);云南省自然科学基金资助项目(2009FXL001)

**[作者简介]** 王子睿(1988~),男,湖南衡阳市人,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@gmail.com

50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ) were 24.94%, 42.11%, 65.74%, 70.22%, 73.11% on CNE; 23.15%, 54.56%, 62.95%, 70.14%, 75.18% on Hep G2; 31.34%, 60.76%, 78.43%, 85.78%, 90.75% on HeLa; 5.97%, 12.05%, 28.44%, 35.28%, 51.31% on QBC939; 18.20%, 35.48%, 46.76%, 58.44%, 57.32% on K562. The  $\text{IC}_{50}$  value against CNE, Hep G2, HeLa, QBC939 and K562 were 66.9  $\mu\text{M}$ , 60.98  $\mu\text{M}$ , 40.7  $\mu\text{M}$ , 197.07  $\mu\text{M}$  and 120.06  $\mu\text{M}$ , respectively. The inhibitory ratios of D6B2 (25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ) on HeLa were 7.96%, 9.56%, 10.98%, 14.00%, 17.33% at 24 h; 10.62%, 25.96%, 47.63%, 48.24%, 49.03% at 48 h; 18.08%, 53.68%, 85.55%, 87.86%, 82.07% at 72 h. The CDI value of D6B2 at 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  was 0.039, 0.019 and 0.014, respectively, when used with 10  $\mu\text{M}$  DDP.

**Conclusion** D6B2 showed significant in vitro anticancer effects on human cancer cells. Its in vitro anticancer activity was dose-dependent and time-dependent. D6B2 and DDP had synergistic in vitro anticancer effects.

**[Key words]** 4-Ethoxy-2-hydroxy-6-methyl benzoic acid; Anticancer; Synergistic effect; DDP; CNE; Hep G2; HeLa; QBC939; K562

2014年《世界癌症报告》显示,截至2012年,全球新增癌症病例达到1400多万例,预计在未来20a将达到2200万/a,同期癌症死亡人数也将从820万/a飙升至1300万/a<sup>[1]</sup>.2012年中国新增癌症病例约占全球的20%,癌症死亡病例约占全球的25%,癌症已经成为严重危害我国人民生命健康的“头号杀手”<sup>[2]</sup>.自上世纪60年代,植物抗癌新药长春花碱与长春新碱被发现以来,植物来源抗癌药物受到了科学家们的普遍重视,紫杉醇的发现更是掀起了一阵研究天然产物的热潮.寻找高效、低毒的新抗癌药物已成为当今癌症治疗领域的研究热点.

真菌植物提取物AMH(Antimutagen-He)是一种云南特有真菌植物的提取物,前期大量的研究表明,AMH具有很强的抗突变、预防致癌物诱发动植物肿瘤、抑制动物移植性肿瘤生长和体外杀灭人类癌细胞作用<sup>[3]</sup>.AMH在癌症的化学治疗方面具有良好的开发应用前景<sup>[4-9]</sup>.

4-乙氧基-2-羟基-6-甲基苯甲酸(D6B2)是从AMH中分离得到的一种具有抗肿瘤活性的化合物.本研究采用体外抗肿瘤实验,研究D6B2对人类不同癌细胞株的体外抑制作用,观察其剂量-效应和时间-效应关系,并观察其与临床抗癌药物顺铂是否具有体外联合抗肿瘤作用、作用形式与强度.本研究能为该化合物的后续深入研究及抗肿瘤新药物的开发提供科学依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂 DMEM/F12培养基,胎牛血清,青链

双抗,磷酸缓冲液,胰蛋白酶等均由HyClone公司生产.

DMSO(二甲基亚砜)为分析纯,西陇化工股份有限公司生产.

1.1.2 样品 D6B2:通过植物化学分离手段从真菌植物提取物AMH中分离得到,纯度大于99.8%,以分析纯DMSO进行配制.试验浓度分别为200  $\mu\text{M}/\text{mL}$ (D1)、150  $\mu\text{M}/\text{mL}$ (D2)、100  $\mu\text{M}/\text{mL}$ (D3)、50  $\mu\text{M}/\text{mL}$ (D4)、25  $\mu\text{M}/\text{mL}$ (D5).

顺铂:齐鲁制药有限公司生产.以分析纯DMSO进行配制,试验浓度为10  $\mu\text{M}/\text{mL}$ .

1.1.3 细胞株 人鼻咽癌细胞株CNE、人肝癌细胞株Hep G2、人子宫颈癌细胞株HeLa、人胆管癌细胞株QBC939和人白血病细胞株K562由云南省肿瘤医院提供.

### 1.2 实验方法

1.2.1 体外抗肿瘤实验 实验设阴性对照组(DMSO)、阳性对照组(10  $\mu\text{M}$  DDP或20  $\mu\text{M}$  5-FU)和D6B2组(25  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、150  $\mu\text{M}$ 和200  $\mu\text{M}$ ).

细胞计数法:肿瘤细胞接种于6孔板,贴壁培养24h后,弃去培养液,每孔加入含有相应浓度样品的培养液2mL.培养72h后,收集贴壁细胞在显微镜下(10 $\times$ 25)进行细胞计数,计算抑制率和 $\text{IC}_{50}$ .

MTT法:肿瘤细胞接种于96孔板,贴壁培养24h后,弃去培养液,每孔加入含有相应浓度样品的培养液200  $\mu\text{L}$ .培养72h后,弃去原培养液,每孔加入含有20  $\mu\text{L}$  MTT(5 mg/mL)的完全培养液200  $\mu\text{L}$ ,放入培养箱中继续培养4h后,弃去含MTT的培养基,每孔加入150  $\mu\text{L}$  DMSO,避光震

荡 10 min, 在 490 nm 波长下测定每孔的吸光值 (OD), 计算抑制率和  $IC_{50}$ .

**1.2.2 体外抗癌作用的时间-效应关系研究** 采用 MTT 法进行时间-效应关系研究. 实验方法同前, 分别在加药后 0 h、24 h、48 h 和 72 h 测定结果. 计算不同时间和浓度下的抑制率, 并绘制出时

间-效应关系曲线.

**1.2.3 体外联合抗癌作用研究** 实验设阴性对照组 (DMSO)、DDP 组 (10  $\mu$ M DDP)、D6B2 组 (D3、D4、D5)、联合用药组 (D3+DDP、D4+DDP、D5+DDP). 采用前述细胞计数法进行试验. 计算各组的抑制率及联合用药组的  $q$  值.

$$\textcircled{1} \text{ 抑制率 } (\%) = \left( 1 - \frac{\text{实验组细胞数} - \text{对照组细胞数}}{\text{对照组细胞数}} \right) \times 100\%$$

$$\textcircled{2} \text{ 抑制率 } (\%) = \left( 1 - \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}}{\text{验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}} \right) \times 100\%$$

$$\textcircled{3} q = \frac{E_{(A+B)}}{E_A + E_B - E_A \cdot E_B}$$

注:  $E_{(A+B)}$  为联合用药组的抑制率,  $E_A$ 、 $E_B$  分别为两药单独用药时的抑制率. 如  $q$  值小于 0.05, 则两药为显著的拮抗作用;  $q$  值在 0.05 ~ 0.85 之间, 则两药为拮抗作用;  $q$  值在 0.85 ~ 1.15 之间, 则两药为相加作用;  $q$  值在 1.15 ~ 20 之间, 则两药为协同作用;  $q$  值大于 20, 则两药为显著的协同作用<sup>[10]</sup>.

### 1.3 统计学处理

所有数据均以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 以 SPSS 软件进行分析, 采用  $t$  检验、方差分析及 SNK- $q$  检验.  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 D6B2 对多种肿瘤细胞的体外增殖抑制作用

D6B2 在浓度为 25  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ M、150  $\mu$ M、200  $\mu$ M 时对人鼻咽癌细胞 CNE、人肝癌细胞 Hep G2、人宫颈癌细胞 HeLa、人胆管癌细胞 QBC939 和人白血病细胞 K562 的抑制作用, 结果见表 1.

除 Hep G2 与 QBC939 在 25  $\mu$ M D6B2 作用下的抑制率与对照组没有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 其余结果与对照组相比均存在统计学差异 ( $P < 0.05$ ). D6B2 对 CNE、Hep G2、HeLa、QBC939 和 K562 细胞的  $IC_{50}$  分别为 66.9  $\mu$ M、60.98  $\mu$ M、40.7  $\mu$ M、197.07  $\mu$ M 和 120.06  $\mu$ M. 5 种细胞株对 D6B2 的敏感程度由强到弱排列, 分别为: HeLa > Hep G2 > CNE > K562 > QBC939.

D6B2 对以上 5 种肿瘤细胞株均具有显著的体外增殖抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 且随着剂量的增加, 抑制效果成上升趋势, 存在明显的剂量-效应关系, 见图 1.

### 2.2 D6B2 对人宫颈癌细胞 HeLa 体外抑制作用的时-效关系

D6B2 体外抑制人宫颈癌细胞 HeLa 的时-效关系的实验结果, 见表 2.

与对照组相比, 各组的 OD 值均存在显著的统计学差异 ( $P < 0.05$ ). 各剂量组的 24 h、48 h 和 72 h 数据, 两两之间均具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ).

72 h 各组的抑制率均高于 48 h, 48 h 各组的抑制率均高于 24 h, 抑制效果具有明显的时间依赖性, 存在明显的时间-效应关系, 见图 2.

### 2.3 D6B2 与临床抗肿瘤药物 DDP 的联合作用

D6B2 在不同剂量下联合临床抗肿瘤药物 DDP 体外抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖作用的实验结果见表 3.

DDP 单独用药时 72 h 的细胞增殖抑制率为 85.21%, D6B2 单独用药时各剂量组 72 h 的细胞增殖抑制率分别为 27.31%、58.53% 和 84.01%, D6B2 与 DDP 联合用药各剂量组 72 h 的细胞增殖抑制率分别为 91.38%、94.62% 和 96.84%. 与对照组相比, DDP 单独用药、D6B2 单独用药以及 D6B2 联合 DDP 用药的各剂量组的细胞数目均显著减少 ( $P < 0.05$ ).

联合用药 3 个剂量组的抑制率均高于 D6B2 或 DDP 单独用药, 见图 3. D6B2 与 DDP 联合用药 3 个剂量组的  $q$  值分别为 0.02、1.01 和 0.99, 均在

表 1 D6B2 对不同癌细胞的体外抑制率 (%)

Tab. 1 In vitro inhibitory ratios of D6B2 on various cancer cells (%)

组别	Dose (μM)	IR				
		CNE	Hep G2	HeLa	QBC939	K562
对照组	-	0	0	0	0	0
5-FU 组	20	80.08	54.26	43.58	-	-
DDP 组	10	-	-	-	78.79	76.29
D6B2 组	25	24.94*	23.15	31.34**	5.97	18.20*
	50	42.11**	54.56**	60.76**	12.05**	35.48**
	100	65.74**	62.95**	78.43**	28.44**	46.76**
	150	70.22**	70.14**	85.78**	35.28**	58.44**
	200	73.11**	75.18**	90.75**	51.31**	57.32**

与对照组比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

表 2 D6B2 在 24 h、48 h 和 72 h 时对人宫颈癌 HeLa 细胞的体外增殖抑制作用 (x̄ ± s)

Tab. 2 In vitro inhibitory effects of D6B2 on HeLa at 24 h, 48 h and 72 h (x̄ ± s)

组别	Dose(μM)	24 h		48 h		72 h	
		OD	IR (%)	OD	IR (%)	OD	IR (%)
对照组	-	0.354 ± 0.007	-	0.503 ± 0.023	-	0.725 ± 0.036	-
	25	0.326 ± 0.012*	7.96*	0.450 ± 0.021*	10.62*	0.594 ± 0.032**	18.08**
	50	0.320 ± 0.007**	9.56**	0.373 ± 0.013**	25.96**	0.336 ± 0.008**	53.68**
D6B2 组	100	0.315 ± 0.017**	10.98**	0.264 ± 0.009**	47.63**	0.105 ± 0.006**	85.55**
	150	0.304 ± 0.003**	14.00**	0.261 ± 0.007**	48.24**	0.088 ± 0.005**	87.86**
	200	0.293 ± 0.005**	17.33**	0.257 ± 0.016**	49.03**	0.130 ± 0.011**	82.07**

与对照组比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

表 3 D6B2 联合 DDP 对 HeLa 细胞的体外增殖抑制作用 (x̄ ± s)

Tab. 3 Combinative effect of D6B2 and DDP on HeLa (x̄ ± s)

组别	剂量 (μM)	细胞数 (× 10 <sup>4</sup> )	IR (%)
对照组	-	158.1 ± 10.0	-
DDP 组	10	23.4 ± 4.4**	85.21
D5 组	25	114.9 ± 9.0	27.31
D4 组	50	65.5 ± 12.2**	58.53
D3 组	100	25.3 ± 5.6**	84.01
D5+DDP 组	25+10	13.6 ± 1.2**	91.38
D4+DDP 组	50+10	8.5 ± 1.0**	94.62
D3+DDP 组	100+10	5.0 ± 0.9**	96.84

与对照组比较, \*\*P<0.01.

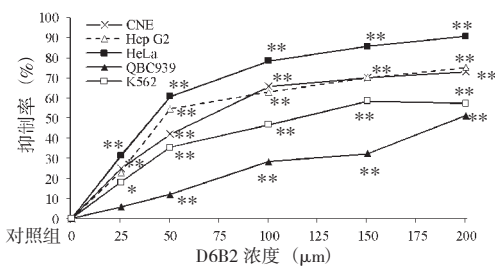


图 1 D6B2 的体外增殖抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effects of D6B2 in vitro

与对照组比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

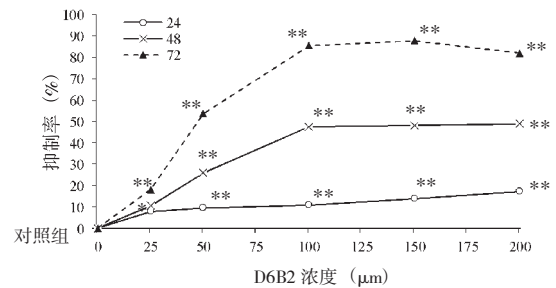


图 2 D6B2 对 HeLa 细胞体外增殖抑制作用的时-效关系

Fig. 2 Time-effect relationship of inhibition of D6B2 on HeLa

与对照组比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

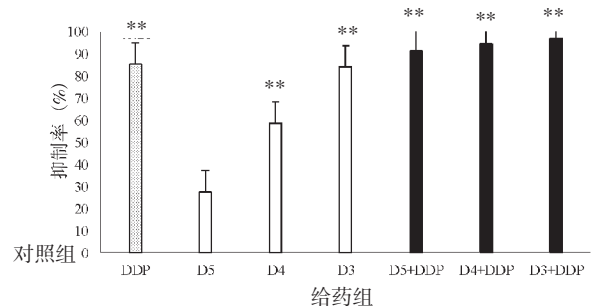


图 3 D6B2 联合 DDP 对 HeLa 细胞的体外增殖抑制率

Fig. 3 Combinative anticancer effect of D6B2 and DDP on HeLa

与对照组比较 \*\*P<0.01.

0.85 ~ 1.15 之间, 表明 D6B2 联合 DDP 具有体外相加抗肿瘤作用。

### 3 讨论

癌症的治疗过程中的多药耐药问题越来越突出, 寻找更安全和更高选择性的抗癌新药物成为癌症研究的一项迫切任务<sup>[1]</sup>。生物资源是新的抗癌药物发现的重要来源, 大多数临床抗癌药物直接或间接地来源于天然产物<sup>[2]</sup>。

目前, 国内外临床上广泛使用的抗肿瘤药物有 100 多种<sup>[3]</sup>。据我国抗肿瘤药物市场调查显示, 进口药占据市场的半壁江山, 研发具有我国自主知识产权的抗肿瘤药物变得尤为迫切。AMH 为云南的一种特殊真菌的提取物, 前期大量研究显示 AMH 的抗肿瘤作用具有选择性。本研究结果表明从 AMH 中分离得到的化合物 4-乙氧基-2-羟基-6-甲基苯甲酸, 能够显著抑制 CNE、Hep G2、HeLa、QBC939 和 K562 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ ), 其体外抗肿瘤作用具有剂量-效应和时间-效应关系, 不同癌细胞对化合物 D6B2 的敏感性具有较大差异, HeLa 细胞对 D6B2 非常敏感。4-乙氧基-2-羟基-6-甲基苯甲酸与 DDP 具有显著的体外协同抗肿瘤作用, 表明其能增强临床抗肿瘤药物的抗癌效果, 可作为联合抗肿瘤药物使用。

本研究表明, 4-乙氧基-2-羟基-6-甲基苯甲酸具有显著性体外抗肿瘤作用, 并与临床抗癌药物 DDP 具有协同抗肿瘤作用。4-乙氧基-2-羟基-6-甲基苯甲酸具有开发成为抗癌药物的应用前景, 但其抗癌作用机制还不清楚, 其体内抗癌药效有待进一步研究。

#### [参考文献]

[1] SIEGEL, REBECCA, et al. Cancer statistics [J]. CA: A-

Cancer Journal for Clinicians, 2014, 64(1): 9 - 29.

- [2] 杨雄雄. 癌症增长: 中国和世界的异同[J]. 百科知识, 2013, (24): 4 - 7.
- [3] 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.
- [4] 贺小琼, 段生朝, 邓艳. 真菌植物提取物 AMH 对环磷酸酰胺致突变作用的抑制作用 [J]. 中医药学报, 2004, 32(4): 55 - 56.
- [5] 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.
- [6] XIAOQIONG H E. The antimutagenicity and anticancer effects of a kind of wild mushroom extract [J]. Proceedings of the American Association for Cancer Research, 2007, 48(1): 1310 - 1316.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 金正均. 合并用药中的相加 [J]. 中国药理学报, 1980, 1(2): 70 - 71.
- [11] GUTIERREZ M E, KUMMAR S, GIACCONE G. Next generation oncology drug development: opportunities and challenges [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2009, 6(5): 259 - 265.
- [12] NASTRUCCI, CANDIDA, ALFREDO GESARIO, et al. Anticancer drug discovery from the marine environment [J]. Recent Patents on Anti-cancer Drug Discovery, 2012, 7(2): 218 - 232.
- [13] 张万年, 缪震元. 抗肿瘤创新药物研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2011, 19(24): 2277 - 2284.

(2014 - 05 - 21 收稿)