

白桦脂醇的体内抗肿瘤作用及机制

宋添添¹ 牟 瑛¹ 张桂英²

(1 解放军 302 医院营养科, 北京, 100039; 2 吉林大学公共卫生学院营养与食品卫生教研室, 长春, 130021)

摘要 目的: 研究白桦脂醇的体内抗肿瘤作用及机制。方法: 采用小鼠肝癌细胞(H22)建立荷瘤小鼠动物模型, 白桦脂醇灌胃 10 d 后, 计算抑瘤率、胸腺指数、脾指数; MTT 法测定小鼠 T 淋巴细胞转化功能及 NK 细胞杀伤活性。结果: 白桦脂醇三个剂量组、阳性对照组瘤重均减轻, 与阴性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 中剂量组抑瘤率最高; 三个剂量组脾指数与阳性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 中、高剂量组与阴性对照组比较差异亦有统计学意义($P < 0.05$); 中剂量组胸腺指数与阴性、阳性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 中剂量组 T 淋巴细胞转化率与阴性对照组和阳性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 低剂量组在效靶比为 25:1 时, NK 细胞杀伤活性高于阳性对照组($P < 0.05$), 在效靶比为 100:1, 杀伤活性高于阴性对照组($P < 0.05$); 中剂量组在效靶比为 25:1、50:1、100:1 时, NK 细胞杀伤活性均同时高于阴性对照组和阳性对照组($P < 0.05$); 高剂量组在效靶比为 25:1 时, NK 细胞杀伤活性高于阴性对照组和阳性对照组($P < 0.05$)。结论: 白桦脂醇通过刺激激活免疫器官, 提高 T 淋巴细胞转化功能、提高 NK 细胞杀伤活性来抑制肿瘤细胞增殖。

关键词 白桦脂醇; 抑瘤效应; MTT; 小鼠; 免疫细胞

Anti-tumor Effects of Betulin and Its Mechanism in Vivo

Song Tiantian¹, Mu Ying¹, Zhang Guiying²

(1 Department of Nutrition, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China; 2 Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract Objective: To investigate the anti-tumor activity of betulin in vivo and its mechanism. **Methods:** The study built tumor bearing mice model by injecting H22 tumor cells on the mice's left inguinal region. The mice were given intragastric administration of betulin for ten days. Inhibition ratio, thymus index and spleen index were calculated after that. Then betulin's effects on T lymphocyte transformation, NK activity were detected using MTT method. **Results:** Tumor weight of three betulin groups and positive control group decreased compared with that of negative control group ($P < 0.05$), especially that of the middle dose group. Spleen index in betulin group had significant difference compared with positive control group ($P < 0.05$). Middle dose and high dose group had significant difference from negative control group ($P < 0.05$). Thymous index in middle dose group had significant difference compared with negative control and positive control group ($P < 0.05$). T lymphocyte transformation rate of middle dose group had significant difference compared with negative control and positive control group ($P < 0.05$). When effect cell/target cell was 25, NK activity in low dose group was higher than positive control group ($P < 0.05$), and when effect cell/target cell was 100, it was higher than negative control group ($P < 0.05$); NK activity in middle dose group was higher than negative control and positive control group, when effect cell/target cell was 25 or 50 or 100 ($P < 0.05$); NK activity in high dose group was higher than negative control and positive control group when effect cell/target cell was 25. **Conclusion:** Betulin can inhibit the proliferation of tumor cell by promoting T lymphocyte transformation and enhancing NK activity.

Key Words Betulin; Anti-tumor; MTT; Mice; Immune cells

中图分类号: R285.6 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.07.025

用于治疗肿瘤的天然药物存在选择性低、毒性大及耐药等问题。从天然植物中寻找新的抗肿瘤药物已成为医学界关注的热点。白桦脂醇是从桦树皮中提取的三萜类化合物, 具有杀菌、抗病毒、防紫外线、消炎、快速治愈伤口、抗过敏等作用, 还可改善受损头发光泽, 促进头发生长, 在食品、医药、日用化工等领域有广

泛应用^[1-5], 是非常有价值的天然物质, 可以从丰富的植物资源中获得。本研究通过荷瘤小鼠探讨白桦脂醇的抗肿瘤的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞株 雄性昆明种小鼠 50 只, 体重(18~20 g), 由吉林大学基础医学院动物中心提供;

基金项目: 吉林省科技厅资助项目(编号: 201105020)

作者简介: 宋添添(1985—), 硕士, 医师, 本文为作者在读硕士期间所做部分研究

通信作者: 张桂英(1957—), 女, 本科, 高级实验师, 研究方向: 营养与疾病控制, E-mail: 943769970@qq.com

小鼠肝癌细胞(H22),由吉林大学公卫学院营养与食品卫生教研室提供,人髓样白血病细胞(K562),由302医院艾滋病研究室。

1.2 药物及主要试剂 白桦脂醇纯品从上海升佳公司购得,呈白色粉末状,含量99%,用橄榄油配成浓度为 $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $4\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,4℃保存。用于体内阳性对照的环磷酰胺用生理盐水配成浓度为 $2.5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,4℃保存。DMSO(北京益利精细化学品有限公司),MTT(AMRESCO公司),小牛血清(FCS,大连生物试剂厂),RPMI-1640、IMDM培养液(GIBCO公司),刀豆凝集素(ConA,美国Sigma公司),IL-2(吉林大学第一医院)。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组及处理 50只雄性昆明种小鼠适应性饲养2d,取0.2mL浓度为 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的H22细胞接种至小鼠左下肢腹股沟皮下,4d后可触及小米粒大小实体瘤。将小鼠随机分为5组:阴性对照组(NC)、阳性对照组(PC)、低剂量组(LD)、中剂量组(MD)、高剂量组(HD),每组10只。阴性对照组按 $0.1\text{ mL} \cdot 10\text{ g}^{-1}$ 体重灌胃橄榄油;阳性对照组按 $25\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃环磷酰胺;低剂量组、中剂量组、高剂量组分别按 $10\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $20\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $40\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃相应浓度的白桦脂醇橄榄油溶液。连续灌胃10d,第11d拉颈处死。

1.3.2 白桦脂醇对荷瘤小鼠抑瘤率的影响 小鼠处死后取肿瘤称重,计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{对照组小鼠瘤重} - \text{实验组小鼠瘤重}}{\text{对照组小鼠瘤重}} \times 100\%$$

1.3.3 白桦脂醇对荷瘤小鼠脏器指数的影响 小鼠处死后无菌条件下取脾、胸腺称重,计算脏器指数。脏器指数($\text{g}/100\text{ g}$) = (脏器重/体重) $\times 100$ 。

1.3.4 白桦脂醇对荷瘤小鼠T淋巴细胞转化功能的影响 无菌条件下取小鼠脾脏,制备脾细胞悬液,调细胞浓度至 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$,加FCS使血清浓度达10%,取96孔培养板,每只小鼠设:1)对照孔,每孔加入100 μL IMDM培养液;2)ConA刺激孔,每孔加入 $10\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ConA液100 μL ,各3复孔,然后每孔加入100 μL 小鼠脾细胞悬液。将培养板移入CO₂ 孵箱孵育44h,各孔加入MTT溶液10 μL ,继续孵育4h后终止培养,吸弃孔内上清,每孔加入DMSO 100 μL ,震荡10min。酶标仪570nm波长处测定各孔OD值。

$$\text{刺激指数} = \frac{\text{ConA刺激孔OD值}}{\text{空白对照组OD值}}$$

1.3.5 白桦脂醇对荷瘤小鼠NK细胞杀伤活性的影

响 靶细胞制备需用1640培养液调K562细胞浓度至 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,加入FCS使血清浓度达10%;效应细胞制备需取淋转所用浓度为 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的脾细胞悬液,用10%FCS-IMDM调至 $5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $2.5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$;取靶细胞悬液50 μL 和效应细胞悬液100 μL 加入96孔培养板,效靶比分别为100:1、50:1、25:1,空白对照组加靶细胞悬液50 μL 和完全培养液100 μL ,效应细胞对照组加相应浓度的脾细胞悬液200 μL ;每个样品3复孔。将培养板移入CO₂ 孵箱孵育20h,每孔吸出上清液100 μL ,补充无血清1640培养液100 μL ,MTT 20 μL ,继续培养4h终止培养,每孔吸出上清120 μL ,加入DMSO 150 μL ,震荡,酶标仪570nm波长处测定各孔OD值。

$$\text{杀伤活性} = \frac{C - (A - B)}{C} \times 100\%$$

A:靶细胞加效应细胞混合培养孔OD值;B:效应细胞对照孔OD值;C:空白对照孔OD值

1.4 统计方法 实验结果用($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS 17.0统计软件单因素方差分析法比较组间差异, $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 用LSD法进行两两比较。

2 结果

2.1 白桦脂醇对荷瘤小鼠抑瘤率的影响 白桦脂醇三个剂量组小鼠瘤重均减轻,与阴性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),其中中剂量组抑瘤率最高。见表1。

表1 白桦脂醇对荷瘤小鼠抑瘤率的影响($\bar{g}, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	瘤重	抑制率(%)
NC	10	1.14 ± 0.28	—
LD	10	$0.69 \pm 0.21^*$	39.60
MD	10	$0.56 \pm 0.15^*$	51.31
HD	10	$0.73 \pm 0.20^*$	36.04
PC	10	$0.55 \pm 0.17^*$	52.03

注:与NC组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 白桦脂醇对荷瘤小鼠脾指数、胸腺指数的影响 白桦脂醇各剂量组与阴性、阳性对照组比较,脾指数均升高,与阳性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),中、高剂量组与阴性对照组比较差异亦有统计学意义($P < 0.05$);中剂量组与阴性、阳性对照组比较,胸腺指数升高且差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

2.3 白桦脂醇对荷瘤小鼠T淋巴细胞转化功能的影响 白桦脂醇低、中剂量组与阴性对照组比较,T淋巴细胞转化率有所上升,阳性对照组与阴性对照组比较,T淋巴细胞转化率有所下降,中剂量组与阴性对照组和阳性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见

表 3。

表 2 白桦脂醇对荷瘤小鼠脾指数、胸腺指数的影响
(g/100 g, $\bar{x} \pm s$)

Group	例数	脾指数	胸腺指数
NC	10	0.66 ± 0.15	0.13 ± 0.02
LD	10	0.75 ± 0.20 [△]	0.15 ± 0.02
MD	10	0.85 ± 0.17 * [△]	0.18 ± 0.05 * [△]
HD	10	0.94 ± 0.20 * [△]	0.16 ± 0.09
PC	10	0.54 ± 0.13	0.13 ± 0.04

注:与 NC 组比较, * $P < 0.05$; 与 PC 组比较, [△] $P < 0.05$ 。

表 3 白桦脂醇对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞转化
功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	SI
NC	10	1.15 ± 0.19
LD	10	1.25 ± 0.10
MD	10	1.52 ± 0.21 * [△]
HD	10	1.14 ± 0.08
PC	10	1.04 ± 0.09

注:与 NC 组比较, * $P < 0.05$; 与 PC 组比较, [△] $P < 0.05$ 。

2.4 白桦脂醇对荷瘤小鼠 NK 细胞杀伤活性的影响

当效靶比为 25:1 时,白桦脂醇三个剂量组小鼠 NK 细胞杀伤活性均高于阴性对照组和阳性对照组,低剂量组与阳性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),中、高剂量组与阴性对照组和阳性对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);效靶比为 50:1 时,中剂量组 NK 细胞杀伤活性最高,为 32.4%,与阴性对照组和阳性对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);效靶比为 100:1 时,低、中剂量组 NK 细胞杀伤活性与阴性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),中剂量组与阳性对照组比较差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 白桦脂醇对荷瘤小鼠 NK 细胞杀伤活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NK 细胞杀伤活性(%)		
		25:1	50:1	100:1
NC	10	19.0 ± 1.9	17.8 ± 1.6	17.9 ± 1.3
LD	10	22.1 ± 2.6 [△]	21.7 ± 2.5	23.2 ± 2.7 *
MD	10	29.9 ± 1.4 * [△]	32.4 ± 3.0 * [△]	26.3 ± 2.5 * [△]
HD	10	24.9 ± 2.4 * [△]	17.0 ± 2.3	18.7 ± 3.1
PC	10	17.3 ± 1.7	17.7 ± 2.7	19.2 ± 1.4

注:与 NC 组比较, * $P < 0.05$; 与 PC 组比较, [△] $P < 0.05$ 。

3 讨论

三萜类化合物中的白桦脂酸有抗炎、抗肿瘤,抗人类免疫缺陷病毒(HIV)等作用^[6-13],可由白桦脂醇经两步反应得到^[14-16]。蔡唯佳等^[17]研究发现白桦脂醇对体外培养的食管癌细胞有抑制作用。本研究结果表明,白桦脂醇各剂量组与阴性对照组比较,瘤重均减轻($P < 0.05$),特别是中剂量组,抑瘤率达 51.31%,接近

阳性对照组的抑瘤率,说明白桦脂醇可较好地抑制肿瘤生长。

有研究认为,白桦脂酸能够提高 T 细胞增殖力,增强 NK 细胞活性,提高 INF 水平,抑瘤机制可能与直接或间接增强机体抗肿瘤免疫有关^[18-19]。脾指数、胸腺指数的增大反映了脾、胸腺重量的增加,因此用脾指数和胸腺指数评价白桦脂醇对荷瘤小鼠免疫器官的影响。本研究结果表明,中剂量组白桦脂醇的脾指数、胸腺指数同时高于阳性对照组和阴性对照组($P < 0.05$),低剂量组脾指数高于阳性对照组($P < 0.05$);高剂量组脾指数高于阴性对照组和阳性对照组($P < 0.05$),阳性对照组脾指数较阴性对照组低。说明白桦脂醇对小鼠免疫器官有一定的刺激激活作用,其中中剂量组作用最强。T 淋巴细胞是重要的免疫活性细胞,主要发挥细胞免疫作用,并协助 B 淋巴细胞产生抗体,释放淋巴因子参与免疫调节,在抗感染、抗肿瘤、免疫监视方面发挥重要作用。在特异性或非特异性抗原如 ConA、PHA 等的诱导下,T 淋巴细胞可发生转化、增殖,故 T 淋巴细胞转化功能反映了机体的免疫状况^[20-21]。本研究结果表明:低、中剂量组与阴性对照组比较,T 淋巴细胞转化率有所上升,阳性对照组与阴性对照组比较,T 淋巴细胞转化率下降,中剂量组与阴性对照组和阳性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),说明中剂量白桦脂醇可以促进 T 淋巴细胞转化,增强机体的免疫功能。NK 细胞主要发挥免疫监视和抗肿瘤作用^[20-21],能够调节 B 淋巴细胞、胸腺细胞、骨髓干细胞的分化并分泌 IL-1、IL-2、INF- α 和 INF- γ 等。NK 细胞杀伤活性可反应机体的免疫功能。本研究结果表明,低剂量组在效靶比为 25:1 时,NK 细胞杀伤活性高于阳性对照组($P < 0.05$),在效靶比为 100:1,杀伤活性高于阴性对照组($P < 0.05$);中剂量组在效靶比为 25:1、50:1、100:1 时,NK 细胞杀伤活性同时高于阴性对照组和阳性对照组($P < 0.05$);高剂量组在效靶比为 25:1 时,NK 细胞杀伤活性高于阴性对照组和阳性对照组($P < 0.05$)。说明白桦脂醇可以提高 NK 细胞杀伤活性,增强机体非特异性免疫功能,中剂量组作用最强,在效靶比为 25:1 时,杀伤活性最高。而白桦脂醇提高机体非特异性免疫功能是如何在分子水平上发挥作用的,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 韩世岩. 四氢呋喃-苯混合溶剂法分离纯化桦木醇[J]. 林产化学与工业, 2005, 25: 129-132.
- [2] 韩淑英, 李岩, 宗瑞义, 等. 桦树皮抗肿瘤作用及对免疫功能的影响[J]. 中药材, 2000, 23(6): 343-345.

(下接第 922 页)

- [4] 张静, 张亚男, 张纾难. 张纾难教授治疗过敏性鼻炎经验[J]. 世界中医药, 2014, 9(3): 345-346.
- [5] 李萌, 徐珊, 汪受传. 汪受传教授从伏风论治小儿鼻鼽经验[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(11): 3278-3280.
- [6] 李萌, 戴启刚, 汪受传. 汪受传教授治疗小儿鼻鼽药对经验[J]. 中医儿科杂志, 2013, 9(2): 1-2.
- [7] 李萌, 汪受传, 魏肖云. 变应性鼻炎豚鼠血清 IgE 和 IL-6、IL-17 的变化及消风宣窍汤的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(6): 167-170.
- [8] 赵秀杰, 董震, 杨占泉, 等. 鼻超敏反应实验模型的建立[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1993, 28(1): 17.
- [9] Agrawal DK, Shao Z. Pathogenesis of allergic airway inflammation[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2010, 10(1): 39-48.
- [10] Seavuzzo MC, Recchi V, Fattori B, et al. Cytokine secretion in nasal mucus of normal subjects and patients with allergic rhinitis[J]. Biomed Pharmacother, 2003, 57(8): 366-371.
- [11] CHUNG F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma[J]. Mediators Inflamm, 2001, 10(6): 51-59.
- [12] TILL SJ, DURHAM SR, RAJAKULASINGAM K, et al. Allergen-induced proliferation and interleukin-5 production by bronchoalveolar lavage and blood T cells after segmental allergen challenge[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158(6): 404-411.
- [13] ZHAO LL, LIDEN A, SJUSTRANG, et al. IL-12 regulates bone marrow eosinophilia and airway eosin levels induced by airway allergen exposure[J]. Allergy, 2000, 55(5): 749-756.
- [14] 彭华陈, 勇挺, 汪建, 等. 白介素 4 与白介素 12 在变应性鼻炎、哮喘和特应性皮炎中的表达及意义[J]. 广东医学, 2010, 31(6): 727-728.
- [15] 利彦华, 张新日, 亚生江, 等. 欧博鼻炎冲剂对变应性鼻炎大鼠总 IgE、Th2 细胞因子活性的影响[J]. 陕西中医, 2012, 33(3): 369-370.

(2013-12-23 收稿 责任编辑: 曹柏)

(上接第 918 页)

- [3] EOM S Y, JUNG U S, KIM J H, et al. Cosmetic composition for decreasing wrinkles comprising betulin: KR, 2003067545[P]. 2003-08-14.
- [4] Pavlova N I, Savinova O V, Nikolaeva S N. Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses[J]. Fitoterapia, 2003, 74: 489-491.
- [5] 李丹, 周金培, 吴晓明. 白桦酸及其衍生物的研究进展[J]. 药物化学, 2004, 28(3): 120-125.
- [6] Alakurti S, Kakela T, Koskimies S, et al. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006, 29: 1-13.
- [7] Mullauer FB, van Bloois L, Daalhuisen JB, et al. Betulinic acid delivered in liposomes reduces growth of human lung and colon cancers in mice without causing systemic toxicity[J]. Anticancer Drugs, 2011, 22(3): 223-233.
- [8] Cichewicz RH, Kouzi SA. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulonic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection[J]. Med Res Rev, 2004, 24(1): 90-114.
- [9] Wing-Keung L, Joyce C K H, Florence W K C, et al. Apoptotic activity of betulonic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 498: 71-78.
- [10] 叶银英, 何道伟, 叶文才. 23-羟基白桦酸体外和体内抗黑色素瘤作用的研究[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2000, 7(1): 5-7.
- [11] Valentia Z, Rosanna S, Sabina C. Selective cytotoxicity of betulonic acid on tumor cell lines, but not on normal cells[J]. Cancer Lett, 2002, 175(1): 17-25.
- [12] Sonia L. Holz-Smith, I-Chen Sun, et al. Role of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope in the anti-HIV activity of the betulonic acid derivative IC 9564[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(1): 60-66.
- [13] 倪明宇. 桦木酸的抗肿瘤作用及其诱导 KB 细胞凋亡的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 1(23): 38-42.
- [14] Kim DSHL, Chen Z, Nguyen V T, et al. A concise semi-synthetic approach to betulonic acid from betulin[J]. Synth Commun, 1997, 27: 1607-1612.
- [15] 张泽. 高效液相色谱法测定白桦树皮中的白桦脂醇含量[J]. 林产化学与工业, 2004, 1(24): 61-63.
- [16] 祁逸梅. 长白山白桦树皮中白桦脂醇的提取、衍生化及生物活性研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2005.
- [17] 蔡唯佳, 马云青, 祁逸梅, 等. 白桦脂醇对食管癌细胞 109 的抑制作用[J]. 癌变畸变突变, 2006, 18(1): 16-18.
- [18] 韩淑英, 吴子忠, 熊建新. 桦树皮提取物对荷瘤小鼠免疫抑癌效应的研究[J]. 中成药, 2002, 24(3): 199-201.
- [19] YI JE, Dbminska-Mrukowicz B, Yuan LY, et al. Immunomodulatory effects of betulonic acid from the bark of white birch on mice[J]. J Vet Sci, 2010, 11(4): 305-313.
- [20] 杨贵贞. 免疫学纲要[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2002: 55-56.
- [21] Janeway CA. Immunobiology[M]. 4th, chapter 8. Current Biology Publications, 1999: 263-305.

(2013-12-11 收稿 责任编辑: 曹柏)