

异紫堇碱衍生物抗菌及抑肿瘤作用的研究

杨世英¹, 柳军奎², 张鑫³, 宋雷^{*1}

(1. 西北民族大学医学院, 甘肃 兰州 730030; 2. 中科院西北特色植物资源化学重点实验室/甘肃省天然药物重点实验室/中科院兰州化学物理研究所, 甘肃 兰州 730000; 3. 兰州军区兰州总医院, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 研究异紫堇碱(isocorydine, ICD)半合成衍生物 8-氨基-异紫堇碱(8-NH₂-ICD)的抗菌及抑制肿瘤生长作用。用琼脂扩散法和最低抑菌浓度测定法测定 8-NH₂-ICD 的抑菌作用, 用 MTT 法测定该化合物对细胞增殖的抑制作用。不同浓度的 8-NH₂-ICD 对 7 种常见致病菌具有明显抑制作用, 其中对伤寒沙门氏菌和大肠埃希菌的抑制作用显著高于其它菌, 8-NH₂-ICD 对产气杆菌的抑制作用相对较弱。8-NH₂-ICD 对 9 种肿瘤细胞系生长抑制程度不同, 对胃腺癌细胞 MGC803 和胶质瘤细胞 M059K 的增殖具有较强的抑制作用, 对人正常细胞生长抑制作用较弱。8-NH₂-ICD 具有较强的抑制病原菌和抑制肿瘤细胞生长的作用。

关键词: 生物碱; 8-氨基-异紫堇碱; 抑菌作用; 抗肿瘤作用

中图分类号: R 285.5; R 915 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)01—0079—05

Study on Bacteriostasis and Anti-Tumor Effect of Isocorydine Base Derivate

YANG Shiyong¹, LIU Junxi², ZHANG Xin³, SONG Lei^{*1}

(1. Medical College, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China; 2. Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources/Key Laboratory for Natural Medicine of Gansu Province/Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; 3. Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China)

Abstract: To investigate the bacteriostasis activity and tumour inhibitory effect of semi-synthetic derivate of isocorydine 8-amino-isocorydine (8-NH₂-ICD). The bacteriostasis activities of alkaloid in vitro were tested with agar diffusion method and minimal inhibitory concentrations (MIC). Inhibitory activity on proliferation of tumour cells with treated by 8-NH₂-ICD were measured by MTT assay. The results show there is a dramatic bacteriostasis activity on *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*, and relatively mild effect on *Enterobacter aerogenes*. MGC803 cell and M059K cell proliferation effect were dramatically inhibited by 8-NH₂-ICD in vitro. The anti-tumour activity was gradually enhanced with the alkaloid variety of dose. However, 8-NH₂-ICD have been

收稿日期: 2014-05-15

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (31920130036); 西北民族大学科研启动费项目 (xbmuyjrc201120); 西北民族大学 2014 年本科生科研创新项目 (URIP14287); 2014 年国家级大学生创新创业训练项目 (201410742058); 西北民族大学医学院校级科研团队项目 (xbmuyjrc201120)。

*** 通信作者:** 宋 雷 (1975—), 男, 甘肃兰州人, 理学博士, 副教授, 主要从事药理学研究。E-mail: leisong12@163.com

demonstrated with low toxicity to normal fibroblasts MRC-5 till concentration up to 200 mol/L. To our knowledge, this is the first time that 8-NH₂-ICD has anticancer and antibacterial activity is reported.

Keywords: alkaloids, 8-amino-isocorydine, bacteriostasis, anti tumour

秃疮花 (*Dicranostigma leptopodum* (Maxim.) Fedde) 为罂粟科秃疮花属植物, 该植物全草民间供药用, 具清热解毒、消肿止痛、杀虫等功效, 可用其治疗扁桃体炎、淋巴结核、胃溃疡等^[1]。文献表明秃疮花提取物具有显著的抗肿瘤活性^[2], 其主要活性成分异紫堇碱(isocorydine)为阿普菲类生物碱, 为国家药监局批准处方药物(H53021713)。最新研究表明该化合物具有较好的抗肿瘤活性, 可以诱导肝癌细胞凋亡和选择性杀伤肝癌干细胞作用^[3-4], 但其发挥抗肿瘤作用的有效剂量相对较高, 其溶解性较差。张小平^[5]等的研究表明通过化学修饰改善天然药物活性组分麦冬多糖的水溶性, 可以明显提高其抗肿瘤活性, 提示可对异紫堇碱结构进行化学衍生改造, 以提高其药理活性和改善其溶解特性。

8-氨基-异紫堇碱(8-NH₂-ICD)为前期筛选的异紫堇碱化学衍生物, 易溶于水, 化学性质较稳定, 因此对其生物活性尤其抑瘤抑菌生物活性进行深入研究。作者对常见肠道病原菌和肿瘤细胞系, 对其体外抗菌和抑瘤活性进行了系统的实验研究, 为异紫堇碱类化合物的药物开发提供依据, 同时为西北特色植物资源秃疮花的综合开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

8-NH₂-ICD: 由中科院兰州化学物理研究所西北特色植物资源化学重点实验室合成, 通过 UV、IR、NMR、HR-ESIMS 等波谱技术鉴定为目标化合物, HPLC 面积归一化法测定纯度不低于 99%, 4℃避光保存备用。二甲基亚砜(DMSO): 上海西格玛奥德里奇贸易有限公司产品; 胰蛋白酶: Amresco 公司产品; RPMI-1640 培养基(Gibco), DMEM-F12 培养基(Gibco), 胎牛血清: Hyclone 公司产品; Penicillin/Streptomycin: Hyclone 公司产品; 四氮甲唑蓝(MTT): Spectrum 公司产品; MH 琼脂, MH 肉汤, 平板菌落计数琼脂: 杭州微生物试剂厂产品。

1.2 菌种及细胞株

细菌标准菌株: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、伤寒杆菌(*Salmonella typhi*)、痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 和产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) 7 种肠道菌, 均由西北民族大学医学中心实验室提供。人肾癌细胞(786-O)、小鼠肾癌细胞(Renca)、人乳腺癌细胞(MCF-7)、人胃腺癌细胞(BGC823, MGC803)、人子宫颈癌细胞(HeLa)、人肺腺癌细胞(A549)、人肝癌细胞(HepG2, SMMC7721)、人脑胶质瘤细胞(M059K): 中国科学院上海细胞库提供。

1.3 仪器

SW-CJ-2FD 超净工作台: 苏州净化设备有限公司产品; XD20 倒置生物显微镜: 宁波舜宇仪器有限公司产品; HH.CP7W 细胞培养箱: 上海博讯实业有限公司产品; 冷冻离心机: 上海安亭科学仪器厂产品; DNM-9602 酶标仪: 北京普朗新技术有限公司产品; 电子天平: 德国 Sartorius 公司产品; ZHWY-103D 恒温培养振荡器: 上海智诚分析仪器制造有限公司产品; Hfsafe-1200 生物安全柜: Heal Force Development Ltd 产品; HPX-9272 mbe 电显电热培养箱: 上海博讯实业有限公司医疗设备厂产品。

1.4 体外抑菌实验

称取 8-NH₂-ICD 纯品溶于去离子水中, 使其终浓度分别为 46.0 mmol/L, 34.5 mmol/L 和 23.0 mmol/L 并滤过除菌。采用琼脂扩散法^[6], 用活菌平板计数法将受试菌液浓度调为 10⁸~10⁹ cfu (Colony forming unit)/L 的细菌稀释液, 取 200 μL 用涂布棒均匀涂于 MH 平板上, 利用 6 mm 打孔器打孔后用洗耳球洗出孔中的琼脂, 分别滴加上述 3 个浓度的 8-NH₂-ICD 药液, 至液面与 MH 平板表面平行即可。每种菌做 2 个平行, 实验重复 3 次, 以无菌生理盐水处理做为阴性对照, 将平板 37℃培养 16 h~18 h 后, 通过测量抑菌圈直径来比较抑菌效果, 数据以

均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 Microsoft Excel 软件进行数据统计处理,方差分析采用 F 检验。

采用肉汤稀释法^[7]测定最低抑菌浓度(MIC),将 8-NH₂-ICD 稀释成 5 个浓度,设生理盐水为对照组,具体操作如下:取已灭菌的培养基冷却到 70 ℃ 左右,取 9 mL 加入到培养皿中,迅速加入 1 mL 的供试液,混匀,冷却,加 200 μ L 菌悬液于培养基上涂布均匀,置 37 ℃ 培养,24 h 后观察结果,菌落被完全抑制的最低抑菌液浓度即为最低抑菌浓度 MIC。各浓度药液对每种实验菌均做 3 次重复。

1.5 体外抑瘤实验

用细胞培养基将 8-NH₂-ICD 配成 20 mmol/L 储备液,-20 ℃ 冰箱保存,实验时用细胞培养液稀释至工作浓度。生长于 RPMI-1640 完全细胞培养液(含体积分数 10% 灭活小牛血清、L-谷氨酰胺 2 mmol/L、青霉素和链霉素各 100 U/L)中的指数生长期肿瘤细胞,以 $5\times 10^3\sim 1.0\times 10^4$ cells/mL 的浓度接种于 96 孔培养板,每孔 100 μ L,设阴性对照组(不加药物)、药物组(分别加不同浓度的 8-NH₂-ICD,每组 6 个复孔),置 37 ℃,体积分数 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,48 h 后每孔加入 MTT 液 20 μ L,孵育 4 h 后弃去培养液,加入 DMSO 150 μ L,振荡摇匀,用酶标仪于 570 nm 波长处测定各孔的 OD 值。实验重复 3 次。同法检测对用 MEM 培养基培养的人正常胚肺成纤维细胞 MRC-5 的细胞毒作用。按下式求出抑制率:抑制率(%)=(对照组 OD 均值-实验组 OD 均值)/对照组 OD 均值 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 8-NH₂-ICD 的化学性质

8-NH₂-ICD 的化学结构见图 1,其相对分子质量 M 为 356.4。其干燥的合成产物为棕色粉末状固体,无臭,味苦,易溶于水和有机溶剂,其水溶液呈棕黄色,在空气中久置易被氧化变为棕黑色,故药液需在临用前配制,固体药需低温密闭保存。

2.2 8-NH₂-ICD 体外抗菌活性测定

对 7 种常见肠道菌的抑菌圈直径测定结果见表 1,8-NH₂-ICD 对常见肠道菌均有明显的抑制作用,随用药物浓度的增加该作用增强。大肠杆菌和伤寒杆菌对 8-NH₂-ICD 的敏感性最强,产气杆菌和变形杆菌对该药敏感性相对较弱。

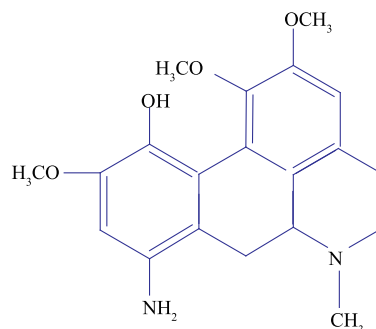


图 1 8-氨基-异紫堇碱的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of 8-amino-isocorydine

表 1 8-NH₂-ICD 对常见肠道菌的抑菌活性结果 ($\bar{x}\pm s$, mm)

Table 1 Inhibitory activities of 8-NH₂-ICD to common intestinal pathogenic bacteria (mm, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

菌名	8-NH ₂ -ICD/(mmol/L)			生理盐水/%
	23.0	34.5	46.0	
金黄色葡萄球菌	18.12 $\pm$ 0.21 ^a	20.31 $\pm$ 0.21 ^b	25.34 $\pm$ 0.61 ^b	—
大肠杆菌	18.32 $\pm$ 0.14 ^a	23.21 $\pm$ 0.14 ^a	30.41 $\pm$ 0.52 ^a	—
枯草芽孢杆菌	16.24 $\pm$ 0.24 ^c	18.36 $\pm$ 0.43 ^c	21.36 $\pm$ 0.25 ^c	—
痢疾杆菌	17.25 $\pm$ 0.51 ^b	22.36 $\pm$ 0.25 ^{ab}	29.16 $\pm$ 0.41 ^a	—
伤寒杆菌	19.32 $\pm$ 0.61 ^a	24.31 $\pm$ 0.43 ^a	32.45 $\pm$ 0.36 ^a	—
产气杆菌	12.31 $\pm$ 0.13 ^d	14.25 $\pm$ 0.32 ^d	16.54 $\pm$ 0.28 ^d	—
变形杆菌	17.56 $\pm$ 0.43 ^b	17.62 $\pm$ 0.21 ^c	20.42 $\pm$ 0.31 ^c	—
F 检验	$p<0.01$	$p<0.05$	$p<0.01$	

注:抑菌圈直径在 20 mm 以上为极敏,15~20 mm 为高敏,10~14 mm 为中敏,10 mm 以下为低敏。“—”表示无抑菌圈, F 检验比较不同细菌敏感性的差异。同一列不同字母表示差异显著, $p<0.05$ 。

对细菌的 MIC 值见表 2。以阿米卡星(amikacin)为阳性对照药物,比较了 8-NH₂-ICD 对不同肠道致病菌的抑制活性,结果表明对金葡菌、大肠杆菌和伤寒杆菌的最低抑菌浓度达到了 9.2 mmol/L,而枯草芽孢菌达到 13.8 mmol/L,产气杆菌的 MIC 为 18.4 mmol/L,表明金葡菌、大肠杆菌和伤寒杆菌对 8-NH₂-ICD 的敏感性更高。

2.3 8-NH₂-ICD 对肿瘤细胞系的抑制作用和 IC₅₀ 值

结果见图 2,图 3 与表 3。结果表明 8-NH₂-ICD 对 9 种肿瘤细胞系生长的抑制作用大体分为 3 种类型,抑制作用明显(MGC803 和 M059K),比较明显(BGC823、MMC7721、Renca、786-O 和 MCF-7),较不明显(A549 和 HepG2)。以正常人胚肺成纤维细胞 MRC-5 为对照处理,发现即使增加 8-NH₂-

ICD 药物浓度至 200 $\mu\text{mol/L}$, 其对正常细胞毒性仍比 肿瘤细胞小, IC_{50} 值的统计分析进一步证明了上述结论。

表 2 8-NH₂-ICD 的抑菌作用

Table 2 Minimum inhibitory concentration(MIC) of active extracts of 8-NH₂-ICD

菌名	8-NH ₂ -ICD/(mmol/l)					阿米卡星/($\mu\text{mol/l}$)					生理盐水
	23.0	18.4	13.8	9.2	4.6	101.6	50.8	25.4	12.7	6.4	
金葡萄菌	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
大肠杆菌	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
枯草芽孢杆菌	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
伤寒杆菌	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
产气杆菌	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+

+:细菌生长;-:细菌不生长;未见细菌生长的最低浓度即为 MIC

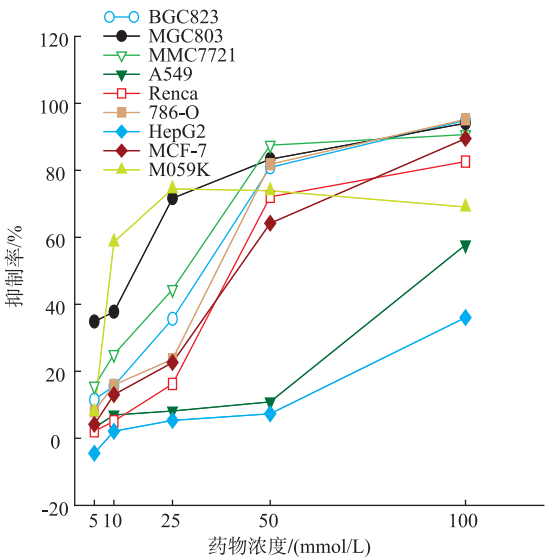


图 2 8-NH₂-ICD 对肿瘤细胞系的抑制率

Fig. 2 Inhibit rate of 8-NH₂-ICD against cancer cell lines

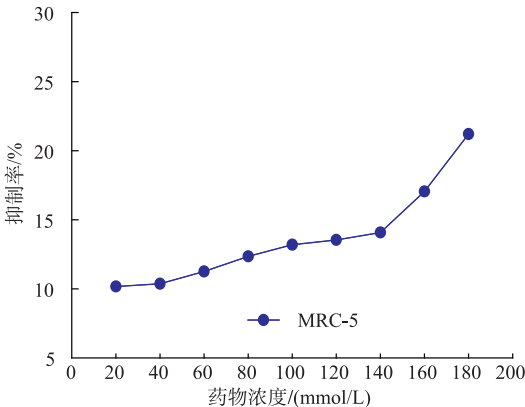


图 3 8-NH₂-ICD 对人正常胚胎肺细胞 MRC-5 生长的抑制率

Fig. 3 Inhibit rate of 8-NH₂-ICD against human fetal lung fibroblasts(MRC-5 cells)

表 3 8-氨基异紫堇碱细胞生长抑制的 IC₅₀ 值

Table 3 IC₅₀ value of inhibitory rate by 8-NICD

细 胞	IC ₅₀ /($\mu\text{mol/L}$)
MCF-7	48.3 $\pm$ 1.6 ^d
HepG2	142.8 $\pm$ 4.4 ^b
Renca	47.7 $\pm$ 4.2 ^d
786-O	45.2 $\pm$ 2.5 ^d
A549	97.5 $\pm$ 4.6 ^c
SMMC7721	25.3 $\pm$ 1.3 ^f
MGC803	11.8 $\pm$ 1.3 ^e
M059K	8.0 $\pm$ 1.1 ^e
BGC823	36.9 $\pm$ 2.5 ^c
MRC-5	420.4 $\pm$ 13.1 ^a

同一列不同字母表示差异显著, $p < 0.05$ 。

3 结 语

8-NH₂-ICD 具有明显抑制细菌和肿瘤细胞生长的作用,在中等浓度(34.5 mmol/L)以上 8-NH₂-ICD 对大肠杆菌、伤寒杆菌和痢疾杆菌及金黄色葡萄球菌为高度敏感,其中对伤寒沙门氏菌的抑制作用最强。8-NH₂-ICD 对需氧菌的抑制作用强于兼性需氧菌,这一点被 IC_{50} 值所进一步证明。作者选取的常见致病菌,其中金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌为常见的食源性细菌,是国内食品污染以及腐败的常见细菌,故在工业生产和家庭卫生环境中需要严格控制^[8]。MTT 法通过测定细胞线粒体能量代谢水平间接反应细胞的增殖情况,结果表明在 2.5~100 $\mu\text{mol/mL}$ 浓度范围内神经胶质瘤细胞 M059K 和胃腺癌细胞 MGC-803 最为敏感,而 MCF-7、Renca、786-0、MMC7721 和 BGC823 5 种肿

瘤细胞中等敏感,A549 和 HepG2 比较不敏感。该化合物对人体正常细胞的细胞毒性远远小于肿瘤细胞,这对于进一步研究其抗肿瘤活性具有重要意义。动物实验表明:异紫堇碱具有广泛迅速的体内分布,且可以通过血脑屏障^[9],这对于特殊部位的感染或肿瘤例如脑部感染或肿瘤具有重要意义。目前研究表明^[10]秃疮花生物碱主要组分为:异紫堇碱、原

阿片碱、紫堇碱、异紫堇啡碱、木兰碱。具有抗菌、抑菌、抗溶血和改善微循环、对中枢和平滑肌有抑制、提高机体免疫力等作用,对心肌细胞和小鼠肝损伤^[11]有保护作用等多种药理学作用,作者在对异紫堇碱结构改造后,发现其产物 8-NH₂-ICD 具有显著的体外抗菌和抗肿瘤活性,揭示其细胞毒活性的机理和体内抗菌抗肿瘤活性的研究还有待进一步开展。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编委会.中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [2] Zhang W H,Lv M H,Hai J,et al. *Dicranostigma leptopodum* (maxim) fedde induced apoptosis in SMMC-7721 human hepatoma cells and inhibited tumor growth in mice[J]. **Natural Science**,2010,2(5):457-463.
- [3] Lu P,Sun H,Zhang L,et al. Isocorydine targets the drug-resistant cellular side population through PDCD4-related apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. **Molecular Medicine**,2012,18(1):1136-1146.
- [4] Sun H,Hou H,Lu P,et al. Isocorydine inhibits cell proliferation in hepatocellular carcinoma cell lines by inducing G2/M cell cycle arrest and apoptosis[J]. **PLoS One**,2012,7(5):e36808.
- [5] 张小平,孙润广,王小梅,等. 化学修饰水提麦冬多糖 WPOJ 的抗肿瘤活性研究[J]. 食品与生物技术学报,2014,33(4):368-373.
ZHANG Xiaoping,SUN Runguang,WANG Xiaomei,et al. Study on anti-tumor activities of WPOJ of chemical modification[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(4):368-373.(in Chinese)
- [6] Lai H Y,Lim Y Y,Kim K H. *Blechnum orientale* Linn—a fern with potential as antioxidant,anticancer and antibacterial agent[J]. **BMC Complementary and Alternative Medicine**,2010,10:15-22.
- [7] 周邦靖. 常用中药的抑菌作用及其测定方法[M]. 重庆:科学技术出版社重庆分社,1987.
- [8] 周文渊,张宏梅,姜燕,等. 三种食品添加剂抑制菌体生物被膜形成[J]. 食品与生物技术学报,2014,33(2):171-176.
ZHOU Wenyuan,ZHANG Hongmei,JIANG Yan,et al. Inhibiting effect of three nature products on biofilm formation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(2):171-176.(in Chinese)
- [9] Guo C,Yu C,Li L,et al. Rapid determination of isocorydine in rat plasma and tissues using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its applications to pharmacokinetics and tissue distribution[J]. **Xenobiotica**,2012,42(5):466-476.
- [10] 赵强,王廷璞,孙国禄,等. 秃疮花生物碱成分分析及药理作用研究进展[J]. 陇东学院学报,2010,21(2):53-57.
ZHAO Qiang,WANG Tingpu,SUN Guolu,et al. The research progress of the component analysis and pharmacological effects about *dicranostigma leptopodum*(maxim) fedde's alkaloid[J]. **Journal of Longdong University**,2010,21(2):53-57.(in Chinese)
- [11] 毛爱红,张昱,赵祁,等. 秃疮花提取物对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2004,20(8):940-943.
MAO Aihong,ZHANG Yu,ZHAO Qi,et al. Protective effect of *dicranostigma leptodu*(Maxim.) Fedde on immunological live injury in mice[J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**,2004,20(8):940-943.(in Chinese)