

真菌抗癌药物槐耳颗粒的研制

庄毅 (南京中医药大学药用菌与中药生物技术研究所, 南京 210029)

槐耳系生长在老龄中国槐 *Sophora japonica* 上的高等真菌子实体, 民间用以治疗癌症、炎症等。现代生物学将真菌门 *Eumycota* 归属菌物界 *Mycosystema*, 共约 40 万种, 其中已开发的药用真菌仅占 0.01% ~ 0.1%, 故可开发潜力巨大, 在现有的 30 种左右常见药用真菌中约 50% 与抗癌有关, 但仅少数品种功效突出。对产自民间的所谓“槐耳”进行鉴别, 发现正品与混淆品种多达七种, 大多是多孔菌科 *Polyporaceae* 的种类, 不仅形态有差异, 而且寄主也多不同, 经反复调研识别, 正品槐耳是生长在中国槐上的槐栓菌 *Trametes robiniophila* Murr。

1 槐耳菌种及生产工艺

由于槐耳的寄主, 老龄中国槐日益稀少, 且有寄主也不一定生长槐耳, 故采集分离菌种适用的子实体及进行人工培育供存用的子实体都极为困难, 故药用槐耳只能用生物转化技术走发酵工程的途径。

据有关研究结果设计了槐耳菌的液体种子与固体发酵的生产工艺。

许多药用菌种常因长期无性繁殖几代培养而导致菌种退化, 而槐耳菌的生命力强, 用正确培养方法传代 10 代以上, 经形态、细胞学观察及其发酵产品的药效试验等均未发现有退化现象, 且其子实体复栽也已成功, 菌种可因有性繁殖而复壮, 因此槐耳菌已根本上克服了菌种退化问题。

1986 年国家“新药审批办法”颁布前分别用液体和固体两种工艺生产约有十来种真菌药物, 但两者间缺乏详细的质量比较, 而槐耳菌是先用以上两种发酵工程分别生产出菌丝体(菌球)和菌质, 再用同一工艺提取成份, 进行对荷瘤动物抑瘤比较, 结果表明固体发酵所产菌质其药效明显优于菌球, 因此决定采用固体发酵工程。

固体发酵工程虽已有千余年历史, 但因还存在着各种缺陷使它已濒临淘汰, 经详细研究后从理论

of Surgical Oncology》发表了其研究成果。本品手术后与 5-Fu 联合化疗, 直肠癌患者 5 年生存率可达 76.6%, 结肠癌可达 53.8%, 若与丝裂霉素联合化疗 10 年生存率直肠癌可达 71.1%, 结肠癌可达 79.3%。HCFU 与其它嘧啶类药物无交叉耐药性。因非肝脏代谢, 在肝功能衰退情况下仍可使用。由于在脑积液中分布较低, 长期服用对中枢神经系统影响轻微。

羟基脲(Hydroxycarbamide): 本品为核苷酸还原酶抑制剂, 能显著抑制核糖核酸还原为脱氧核糖核酸, 选择性地阻止 DNA 合成, 杀伤 S 期细胞。临床应用中对慢性粒细胞型白血病有非常确切的疗效, 也可用于转移性恶性黑色素瘤的治疗, 本品可使癌细胞集中在 G₁ 期达到同步化, G₁ 期细胞对放射线高度敏感, 与放疗合并用于脑瘤、坏死型鼻咽癌、肺癌、宫颈癌的治疗有增效作用。另外, 1994 年在日

本横滨召开的第十届国际艾滋病会议上, 羟基脲被认为是治疗艾滋病的有效药物。美国的 Gallo 博士发表论文解释了羟基脲抗艾滋病的原理。

卡铂(Carboplatin): 本品为第二代铂类国家二类抗肿瘤药物。能与 DNA 结合成交叉键, 干扰其复制和转录。高浓度时也抑制 RNA 及蛋白质的合成, 为周期非特异性药物, 毒副作用明显低于顺铂。由于其作用机制与常用烷化剂和抗代谢药物不同, 特别是对乏氧细胞也有作用, 因而受到广泛重视, 在很多常见肿瘤的联合化疗中占有重要地位。据济南制药厂 II 期临床统计卡铂单药治疗小细胞肺癌有效率为 50%, 卵巢癌为 63.6%, 头颈部癌为 53.8%, 对小细胞肺癌用本品与 VP-16 联合化疗有效率达 78%。临床主要适应证为小细胞肺癌、卵巢癌、睾丸肿瘤、头颈部癌, 也可用于非小细胞肺癌、膀胱癌、子宫颈癌、黑色素瘤及子宫内膜癌的治疗。(收稿: 1999-07-20)

上提出了正确概念,将它与固体培养进行科学区别,统一了名词术语,确定了产品专用名称“菌质”,在技术上改变了以往发酵基质几乎一律用甘蔗渣的情况,筛选出适宜的新营养基质及其合理配比,据它在发酵 90 天内成份变化的情况又对原料新鲜程度、颗粒大小、紧密程度等制订了一套生产操作规程,对最关键的问题,即发酵终点判断与发酵产品质量控制标准的研究,是应用发酵基质与经过 10 至 100 天内不同发酵时间的菌质,每隔 10 至 15 天抽取菌质样本一份,干燥后提取成份测定多糖及蛋白质等含量并进行动物体内抑瘤试验,结果显示发酵基质的多糖含量最高,蛋白质含量最低,发酵后基质转化为菌质随着发酵时间的延长,产品中多糖含量迅速下降而蛋白质含量逐步上升,两者间存在一定消长关系,当发酵周期达 45 天左右,多糖与蛋白质含量渐趋稳定,这时期的菌质所提取成份的抑瘤率最高,这也是菌质中槐耳菌丝体由营养生长转向生殖生长的阶段。在药理试验中,又证实多糖蛋白(PS-T)是槐耳菌质的重要有效成份,因此据多糖与蛋白质的含量可作为发酵质量的监控指标,并判定菌质的发酵终点,它也是药品的主要质量标准。

菌质后处理及成份提取是固体发酵工程下游的重要环节,以往菌质的干燥工艺主要采用阳光晒干,因受季节天气变化影响致质量不稳定,经研究如南京地区用晒干法只宜在夏、秋高温季节,及铺料不太厚的情况下使用,以能在短期内晒干为佳,而电热烘干其效果最好,药厂生产采用旋转式茶叶烘干机效果更好。菌质成份的提取工艺则参照有关本草“槐耳”服用方法,用热水、乙醇提取清膏,浓缩到相对密度 1.33 以上,加入适量糊精、糖粉等辅料,混合均匀后制成颗粒,烘干后的棕黄色颗粒,气腥、味甘、微香,每袋 20g 即槐耳颗粒剂。

槐耳菌质是一种菌物类新药材,它是以生物转化技术用已趋完善的固体发酵工程生产的新真菌药物,因为有严格的质控标准又有良好与稳定的生产条件,因此产品质量良好、稳定。日趋完善的固体发酵理论与生产工艺对于其它新药用菌的研究与开发,也具有重要应用价值。

2 槐耳新药的基础研究

2.1 化学研究

菌质以热水提取两次,合并滤液浓缩,用 Sevag 法反复清除游离蛋白,溶液透析 72 小时除去小分子成份,透析液中加 4 倍量乙醇,沉淀离心,沉淀物脱

水干燥得精制槐耳多糖(得率为 1.5%~1.8%)简称 PS-T。PS-T 经高效液相定性分析、聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯度证实为高纯度均质多糖蛋白,又经小鼠肉瘤 S₁₈₀ 抑瘤试验,抑瘤率 40%~47%,充分证实 PS-T 具有抗癌活性,为槐耳菌质与清膏的有效部位,多糖蛋白是真菌药物常见的有效部位,如著名的云芝多糖 PS-K 也是有效部位。PS-T 为棕褐色粉末,没有明显熔点,280℃ 时变黑,易溶于热水,稍溶于低浓度乙醇,水溶液 pH5~6,无旋光性。经纸层析、气相层析、高效液相、聚丙烯酰胺凝胶电泳,紫外与红外光谱、核磁共振等分析证明它由 6 种单糖组成的杂多糖,结合 18 种氨基酸组成的蛋白质。

槐耳多糖蛋白(PS-T)多糖总量 41.53%、氨基酸总量 12.93%、水 8.72%,相对分子量(MW)为 30000,多糖分子糖苷键构型主要是 β 甙键。

由于槐耳子实体极珍稀,难以将它与菌质进行详细比较,两者所含糖蛋白从红外吸收光谱、氨基酸组成、熔点、pH、旋光性及矿质元素等理化性质进行比较,证实两者多有一致性,仅在某些量上有所差异,如菌质及其多糖蛋白的氨基酸含量普遍高于子实体与子实体多糖蛋白,提示可能质量较好。

2.2 药理、免疫研究

2.2.1 药理 药效研究由全军肿瘤研究中心、中科院上海药物研究所及肿瘤研究所等分别进行,结果显示槐耳清膏灌胃药效最佳剂量应在 1500mg/kg,对肉瘤 S₁₈₀ 抑瘤率达 46%,对腹水型 S₁₈₀,1000mg/kg 生命延长率 38%, $P < 0.05$,粗多糖腹腔给药 200mg/kg 对小鼠肉瘤 S₁₈₀ 抑瘤率达 48%,1000mg/kg 生命延长率 50%,PS-T 灌胃给药 500mg/kg,抑瘤率 47%,腹腔给药 200mg/kg,抑瘤率 40%,说明清膏、粗多糖及精制糖蛋白对小鼠肉瘤 S₁₈₀、腹水型 S₁₈₀ 都有明显抑瘤与延长生命的作用。槐耳清膏与多糖对体外培养 P399 细胞生长抑制无显著作用。试验中注意到清膏与多糖对小鼠均无明显毒性,多糖各剂量组的动物体重均有所增加。

2.2.2 免疫 免疫试验对特异性与非特异性免疫包括体液与细胞免疫都有良好反应,槐耳对巨噬细胞吞噬功能的促进作用非常明显,使溶菌酶活性显著增强,对脐血 EaRFC 及 GVHR 有增进影响,对 α、γ 干扰素诱生、α 干扰素促进 NK 活性有协同作用,可提高特异性抗体产生,促进小鼠脾细胞 DNA 合成。

2.3 一般药理试验

多糖静脉注射给药,20mg/kg~250mg/kg 各剂量组对犬血压、心电图、心率无明显影响,对麻醉后

呼吸频率也无明显影响,对家兔呼吸系统及大鼠神经系统的实验也均未发现异常。

2.4 毒理研究

2.4.1 急性毒性试验 槐耳清膏小鼠灌胃剂量 > 20000mg/kg,相当于人临床常用量(干清膏 7.92g/d)的 126.6 倍,大鼠灌胃剂量 > 15000mg/kg,相当于人临床剂量的 95 倍,均未能测出 LD₅₀,其最大耐受量小鼠为 20000mg/kg,大鼠为 15000mg/kg,小鼠及大鼠多糖腹腔给药及静脉给药在观察期内均未引起动物死亡。

2.4.2 长期毒性试验 大鼠各试验组清膏灌胃,按人临床用药量的 5.5 倍、50.6 倍及 95 倍,另各设清水对照组,连续给药 90 天,各给药组实验动物活动与体重增长正常,各项生化、血象指标间无显著差异,各脏器形态、组织学检查结果均属正常。

家犬清膏小剂量组为 0.21g/kg 为临床等效剂量,大剂量组 5.2g/kg 连续给药 180 天,按犬体重增加每月调整剂量,观察一般体征,外观和行为、进食、粪便均无异常,给药期间体重变化与对照组相仿,测定肝、肾功能,血象及心电图等均未见异常,各主要脏器目检和病理切片的组织、形态学也未见异常,也未发现由药物引起的病理性改变。

2.4.3 特殊毒理 槐耳清膏进行诱变试验,微核与染色体畸变等试验均为阴性反应。

槐耳菌质及槐耳颗粒按“新药审批办法”的规定完成药品质量标准及稳定性试验后,经江苏省药检所、卫生部新药审评中心审查合格,已有部颁标准。

3 临床试验

3.1 I 期临床试验

槐耳颗粒剂的临床剂量成人每天服用 3 包,每包 20g 含干清膏 2.64g。正常人服药 1 个月,服药前后进行肝肾功能、血常规和心电图等检测均无影响,亦未见对骨髓功能有抑制作用。

3.2 II 期临床试验

用槐耳颗粒剂治疗中晚期原发性肝癌 128 例,按 1978 年全国肿瘤药物会议制订的疗效评定标准,其中完全缓解 5 例,部分缓解 10 例,稳定 69 例,进展 46 例,有效率 11.9%,稳定率 64.06%,治疗后生存期 1~6 个月 78 例,6 个月~1 年 32 例,其中 1 年者 11 例,1 年以上至 2 年者 12 例,2 年以上者 7 例,1 年生存率 30% (30/100),随访结束后最长生存期已逾 11 年。试验表明槐耳冲剂具抗癌作用并有缓解

症状、延长生命等功效,且安全无毒副作用。同时又与 5-Fu 对照组分别治疗 II 期原发性肝癌各 32 例,均治疗 1 个月以上,结果两组临床效果相仿,但治疗后 1 年生存率槐耳组为 25%,对照组仅 4%,有显著差异。

3.3 III 期临床试验

由 6 所医院共完成 405 例,其中 50 例设甲基斑蝥胺对照组。病情已达 III 期的患者 1 个月为一个疗程观察 3 个月以上,II 期患者 3 个月为一个疗程观察 1 年以上,疗程间无明显界限可连续服用,原发性肝癌诊断和疗效标准据 1993 年卫生部《关于中药新药临床研究指导原则》所订标准。病例按中医、西医分期分型。西医分型以硬化型 381 例(94.1%)为主,II 期 244 例(52.84%),III 期 174 例(42.96%)。中医分型共 210 例,脾虚湿困型 50 例(23.3%),肝肾阴虚型 60 例(28.6%),气滞血淤型 87 例(41.4%),肝胆湿热型 13 例(6.2%)。试验结果证明槐耳冲剂能显著减轻肝区疼痛,消除腹胀与乏力,改善黄疸,消退腹水,增加体重,卡氏评分增加,(见附表)使 AFP

附表 患者用槐耳冲剂前后症状、体征记分改变(405 例)

症状	用药前后记分改变(前-后)						平均下降分			
	-2	-1	0	1	2	3	计	d	sd	t
肝痛	2	6	67	184	10		269	0.72	0.60	19.52 [△]
腹胀	1	10	34	123	7	1	176	0.73	0.67	14.32 [△]
乏力	1	10	42	94	16		163	0.70	0.75	11.84 [△]
黄疸	1	6	16	9	4		36	0.25	0.96	1.55
浮肿	1	1	4	6			12	0.33	0.89	1.42
恶心		43	5	15	4		67	-0.30	1.01	2.42*
呕吐		9	148	1			158	-0.05	0.24	2.52*
腹水		1	53	28	1		83	0.35	0.52	6.10 [△]
发热			5	8	2		15	0.80	0.67	4.58 [△]

注:“*” $P < 0.05$;“ Δ ”, $P < 0.01$;其余 $P > 0.05$ 。

阳性患者的 AFP 含量下降,症状好转,持续中位时间 4 个月。405 例中,部分缓解 11 例,稳定 267 例,稳定率 68.64%。寿命表法疗后生存期半年生存率 67.9%,一年生存率 44.7%。未见明显毒副作用,疗效与疗程有正相关的关系。按以上中医四种分型结果显示中医各型的稳定率分别为 64.00%、71.66%、80.46%、23.08%,提示以气滞血淤型及肝肾阴虚型疗效较好,脾虚湿困型次之,肝胆湿热型较差。与甲基斑蝥胺对照组各治疗 50 例,比较各项指标,槐耳冲剂均明显优于对照组 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。

3.4 其它适应证

在实践中发现槐耳除对原发性中、晚期肝癌疗效良好外,还对其它如消化道肿瘤、肺癌、乳腺癌、宫颈癌、白血病、恶性淋巴瘤等单独使用或与手术、化

疗、放疗等联合使用都有良好疗效,另对慢性乙型肝炎已试验证实清膏对小鼠血清干扰素的诱生作用非常明显,对鸭肝炎病毒 DHBV 在用药后使鸭血清 HBV-DNA 水平显著下降。临床试用于 HBeAg 阳性患者,转阴率达 33%,对照组用一般护肝药维生素 C 等治疗 40 例,转阴率 5%,槐耳对慢性乙肝有较好疗效,提示它有可能阻断乙肝患者的癌变,因此值得深入扩大探索槐耳颗粒的其它临床适应证。

卫生部于 1992 年批准槐耳菌质与槐耳冲剂(颗粒剂)为中药一类新药,由盖天力制药有限公司独家进行试生产,1996 年转正式生产,称金克®槐耳颗粒剂。同年获国家中医药管理局科技进步二等奖,1998 年获国家科技进步三等奖,又多次获国际奖。

4 槐耳抗癌的机理探讨

有关本草记述槐耳味苦辛、性平无毒,功能治风、益力、破血,主治五痔、心痛等,祖国医学在古代并无癌症、肿瘤等病名,而属“症瘕积聚”范畴,乃正气亏虚,邪气乘袭,气血逆乱而致气血瘀滞脏腑经脉的疾病,使临床表现多见脏腑气血瘀阻或衰弱症状。槐耳的功能与此有关。

益力:如益力即益气扶正,扶固五脏六腑之真气,促进虚弱脏腑功能渐复原、气血旺盛而脏腑功能运转正常,从而使邪(病)外出。这概念与现代医学的提高机体免疫功能相一致。

破血:气为血帅,血为气舍,气行则血行,气滞则血瘀,气不生血则血亏,血不化气则气虚,气血失调,逆乱脏腑。槐耳益力、破血、化瘀、补气行血,补气不留瘀,破血不伤气,从而扶正固本,破血消瘤,标本兼治,因此槐耳既扶正固本又驱邪抗癌。

现代医学认为机体对肿瘤的免疫应答包括细胞免疫和体液免疫,在两者的协同下杀伤肿瘤细胞,现代治疗肿瘤的重要模式之一,肿瘤的生物学治疗,其目的就是激发、调动机体的免疫系统,增强微环境抗肿瘤的能力,从而控制、杀伤肿瘤细胞,其中如细胞因子疗法是利用细胞因子如白细胞介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(IFN)等注入人体以调节、增强与发挥各种免疫细胞的抗肿瘤功能。实验证明槐耳对小鼠肉瘤 S180、腹水型 S180 的抑瘤作用及生命延长作用等都很显著,对原发性的肝癌临床疗效良好,这与它对机体免疫功能的调节、促进有关。

促进吞噬功能:能激活巨噬细胞,使活化的巨噬



细胞能直接杀伤肿瘤细胞,处理、递呈肿瘤抗原从而激活 T 细胞产生特异性抗肿瘤效应,尚可通过 ADCC 作用(抗体依赖的细胞毒作用)杀伤肿瘤细胞,巨噬细胞可释放 TNF- α 、IL-1、IFN- α 等细胞因子可调节抗肿瘤反应,测定血清中溶菌酶活性的增加也反映了巨噬细胞的活性。

诱生细胞因子:单核巨噬细胞产生的 IFN- α 、IL-1、CSF(集落刺激因子)等均可活化增强吞噬细胞杀伤效应抑制肿瘤生长。IFN- α 还能增强 NK 细胞(自然杀伤细胞)及 CTL(细胞毒性 T 细胞)的活性。T 细胞可产生 IFN- γ 、IL-2 等。IL-2 可刺激 T、B 淋巴细胞生长,增殖使活化的 T 细胞分泌 IFN- γ 、CSFS,而这些细胞因子又可增强 CTL、NK 细胞、巨噬细胞的细胞毒活性及诱导 LAK(淋巴因子激活的杀伤细胞)、TIL(肿瘤浸润淋巴细胞)的抗肿瘤活性。在这些细胞因子的协同作用下才能增强 T 细胞、巨噬细胞、NK 细胞等对肿瘤细胞的杀伤能力。

促进细胞免疫作用:槐耳对脐血 EaRF(活性花环)及 GVHR(移植物抗宿主反应)有增强作用,这说明 T 细胞活性增强,同时在干扰素尤其是 IFN- γ 的协同作用下使 NK 细胞增殖活性增强,而提高 CTL 对肿瘤的杀伤作用。

提高特异性抗体产生:在抗体作用下,增加吞噬细胞的调理吞噬作用及发挥 ADCC 作用,使肿瘤细胞被杀伤、吞噬或溶解。

以上充分说明槐耳具有调节与促进机体免疫功能,从而杀伤、抑制肿瘤细胞的作用,此外它还能促进小鼠脾细胞 DNA 的合成,提高血清中血红蛋白的含量等,提示对造血细胞有一定促进作用。与细胞因子疗法不同的是服用槐耳诱生的 IFN(α 、 γ)、IL-2 等细胞因子属内源性,它们间具有小剂量、多刺激与联合作用的特性,常用会有更明显的效果。

槐耳抗癌的机理研究还很不足,有待继续深入探索。

(收稿:1999-07-19)