

铁筷子多糖抑制小鼠体内 S180 生长作用及其机制的实验研究*

刘昕 杨林西¹ 潘兴斌 王晶宇(兰州 730000 兰州医学院病理生理教研室;¹ 兰州医学院生化教研室)

摘要 目的:研究铁筷子多糖(HFPS)的体内抑瘤效应,探讨其作用机制。方法:在动物模型上对比观察 HFPS 对 S180 生长的抑制作用,同时对动物免疫器官指数、脾淋巴细胞转化率和 IL-2 的水平、腹腔巨噬细胞 I(PM ϕ)内酸性磷酸酶(ACP)和精氨酸酶(ARG)的活性及巨噬细胞的吞噬功能进行了检测。结果:用 HFPS 持续灌胃两周,可明显抑制 S180 的生长,动物免疫器官重量增加,细胞免疫功能增强,PM ϕ 内酶活性增加,吞噬能力增强。结论:HFPS 对体内生长的肿瘤 S180 具有良好的抑制作用,其机制与促进机体免疫功能有关。

关键词 铁筷子多糖;肿瘤;细胞免疫;腹腔巨噬细胞;酶

Experiment investigation of inhibitory mechanism on growth of S180 in mice by Tiekuaizi polysaccharide

Liu Xin(Liu X), Yang Linxi(Yang LX), Pan Xingbin(Pan XB), et al(Department of Pathophysiology, Lanzhou Medical Collage Lanzhou 730000)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** Study the inhibitory effect and the mechanism of helleborus thibetanus france .Polysaccharide(HFPS) on tumor growth. **METHOD:** The inhibitory function of HFPS to S180 was observed on animal model. The indexes of immunity organs, the rate of HFPS to S180 was observed on animal model. The indexes of immunity organs, the rate of splenic lymphocytes transformation, the level of IL-2, the ACP and arginase(ARG) vitality in PM ϕ and the swallowing fuction of M were all determined at same time. **RESULTS:** When HFPS was given for two weeks, the growth of S180 was restricted, while immunity organs weight, the cellular immunity function, the vitality of ACP and arginase in PM ϕ and the swallowing ability of M ϕ were heightened. **CONCLUSION:** HFPS could inhibit tumor S180 growth effectively in vivo, this mechanism was related to the affect that HFPS had promoted the immunity function.

KEY WORDS HFPS, tumor, cellular immunity, PM, ACP, ARG

中药铁筷子(Helleborus thibetanus Franch.)具有活血散瘀、消肿止痛、清热解毒的功效,临床用于治疗疮疖肿痛、泌尿道炎症等。国外曾报道在铁筷子根中存在抑制人上皮癌 KB 细胞体外生长的成分^[1],但对体内生长的肿瘤作用如何,以及它的抑瘤机制是什么,尚未见到有关报道。我们从铁筷子根中提取出了多糖成分,观察了该多糖对体内生长的实体型小鼠肉瘤 S180 的抑制效应,并对荷瘤鼠体内与肿瘤生长密切相关的细胞免疫功能、免疫器官指数、腹腔巨噬细胞中酸性磷酸酶和精氨酸酶活性及巨噬细胞的吞噬指数和吞噬百分率进行了检测。结果初步显示,铁筷子多糖对 S180 的生长有很好的抑制作用,并能影响机体细胞免疫功能和腹腔巨噬细胞的活性。

1 材料与与方法

1.1 药品

铁筷子选自我院药圃培植的优质药材,由本院药学系药用植物教研室提取的多糖为棕黄色结晶,临用前以生理盐水配制成 10%浓度的溶液。

1.2 动物

实验选用 LIBP 种小鼠,♂,体重 18~22g(兰州生物制品研究所动物室提供)。

1.3 瘤源

肿瘤细胞株 S180(本院血液病研究所)。接种前复苏瘤细胞,在动物腹腔内保种传代 3 次后使用。

1.4 方法

1.4.1 动物分组及肿瘤模型建立 将动物随机分为 4 组, I 组为正常对照组; II 组为肿瘤对照组; III 组为多糖对照组; IV 组为多糖+肿瘤组。其中 III、IV 组每日用 10% HFPS 溶液灌胃,剂量为 0.2 ml/d/10g 体重, I、II 组则灌以等量的生理盐水,均持续 12d。给药当天,取接种 7d 的腹水型 S180 肿瘤小鼠之腹水,用胎盼兰排除法计数,以生理盐水稀释至 1×10^6 /ml,置无菌容器内冰块中保存, II、IV 组动物右腋下常规

* 本课题为 1997 年甘肃省自然科学基金资助项目,编号 ZR-97-069

消毒,皮下接种瘤细胞 0.2ml/鼠。实验结束时,分批处死动物,作如下指标的测定。

1.4.2 对肿瘤生长抑制效应的观察 对比观察各组动物一般情况,肿瘤生长速度,局部破溃情况等。第13天处死动物,剥离肿块,称取各组肿瘤重量和体重,计算抑瘤率。

1.4.3 免疫器官指数的测定 实验第13天处死动物,取胸腺和脾脏称重,同时称取体重,计算胸腺指数和脾指数。

1.4.4 脾淋巴细胞转化率的测定^[2,3] 实验第13天常规无菌取脾制成 5×10^5 / ml 单细胞悬液,Con A 刺激浓度为 10 μ g/孔,CO₂ 培养箱中 37℃ 培养 68h,加入 MTT 溶液 10 μ l/孔,继续培养 4h 后在酶标仪上测定各组 OD 值。

1.4.5 IL-2 的测定^[3] 取 5×10^5 / ml 浓度的脾单细胞悬液置入 16 孔培养板内,加入 ConA 10 μ g/ ml,CO₂ 箱中培养 24h,离心取上清液待用。另收集培养 48h 的脾细胞仍以 5×10^5 / ml 浓度重悬于 1640 完全培养液中制成 IL-2 反应细胞,将上述上清液和 IL-2 反应细胞各 100 μ l 加入 40 孔培养板中培养 48h,以 MTT 比色法在酶标仪上测定 OD 值。

1.4.6 腹腔巨噬细胞(PM ϕ)酸性磷酸酶和精氨酸酶活性测定^[4,5]

1.4.6.1 PM ϕ 悬液的制作 动物腹腔内注射无菌生理盐水 5ml,轻轻按揉腹部 3min,抽回腹腔液 4ml,1500/min 离心 15min,取沉淀细胞用 Hanks 液洗涤 3 次后用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液调节 M ϕ 浓度至 2×10^6 / ml,以 2ml/瓶分装并置 37℃ 培养箱内培养 2h。将贴壁的 M ϕ 用 Hanks 液轻轻洗涤一次,每瓶中加入双蒸水 2ml,经 -30℃、+30℃ 反复冻融制成破碎的 M ϕ 悬液。

1.4.6.2 酸性磷酸酶活性测定 取上述悬液 0.5ml,采用磷酸苯二钠法,以磷酸苯二钠为底物,4-氨基安替比林及铁氰化钾为显色剂作比色测定。

1.4.6.3 精氨酸酶活性测定 取上述悬液 0.5ml,采用茚三酮法,以精氨酸为底物,茚三酮冰醋酸溶液为显色剂作比色测定。

1.4.7 腹腔巨噬细胞吞噬指数和吞噬百分率的测定 参考文献^[6]进行检测。

2 结果

2.1 HFPS 对 S180 生长的影响

实验显示肿瘤对照组局部肿块生长迅速,与周围组织粘连不易剥离,大部分动物表皮破溃出血,精神萎靡,食欲差。与之相比 HFSP 组肿块生长速度慢,剥离出的瘤体相对完整,肿瘤周围无出血水肿现象,动物精神状态和食欲均好于肿瘤对照组,证明 HFPS 能调节荷瘤机体的整体状况,抑制肿瘤的生长。抑瘤率为 53.14%。

2.2 HFPS 对免疫器官的影响

肿瘤对照组胸腺较正常对照组者体积小,重量轻,有一定程度的萎缩,胸腺指数小于正常对照组 ($P < 0.01$),而使用 HFPS 的两个组胸腺显著增生肥大,指数增加,其中尤以 III 组更为明显,表明 HFPS 对胸腺组织有保护作用,但对脾脏未发现有明显影响。见表 1。

表 1 HFPS 对免疫器官指数的影响/ $n = 10$

组别	胸腺指数 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	P 值	脾脏指数 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	P 值
正常对照组	2.27 \pm 0.78		30.23 \pm 5.47	
肿瘤对照组	1.44 \pm 0.55	< 0.01	28.33 \pm 5.14	> 0.05
多糖对照组	3.06 \pm 0.89	< 0.001	29.89 \pm 7.47	> 0.05
多糖 + 肿瘤组	2.79 \pm 0.93	< 0.001	32.15 \pm 4.96	> 0.05

注:表中 P 值均为与正常对照组相比,下表同

2.3 HFPS 对脾淋巴细胞转化率和 IL-2 水平的影响

表 2 显示,与 I、II 组相比,III、IV 组脾细胞对 ConA 反应性增强,淋巴细胞分化增殖,并诱导较多 IL-2,即使用 HFSP 的动物,无论是否荷瘤,其脾淋巴细胞转化率和 IL-2 水平均明显高于不用 HFPS 者,证明 HFPS 对细胞免疫功能有促进作用。见表 2。

表 2 HFPS 对脾淋巴细胞转化率和 IL-2 水平的影响/ $n = 10$

组别	脾淋巴细胞 转化率/ %	P 值	IL-2 水 平/ O.D	P 值
正常对照组	1.24 \pm 0.08		0.432 \pm 0.098	
肿瘤对照组	1.17 \pm 0.04	< 0.05	0.174 \pm 0.039	< 0.01
多糖对照组	2.00 \pm 0.11	< 0.01	0.661 \pm 0.093	< 0.01
多糖 + 肿瘤组	1.88 \pm 0.07	< 0.01	0.549 \pm 0.113	< 0.05

2.4 HFPS 对 PM ϕ 内酶活性的影响

各组动物 PM ϕ 内酸性磷酸酶和精氨酸酶活性如表 3 所示,经统计学处理,III、IV 组与正常对照组的 I 组相比,均有极显著的差异,说明 HFPS 可提高正常与荷瘤动物 PM ϕ 内酸性磷酸酶产精氨酸酶的活性。见表 3。

表 3 HFPS 对 PM ϕ 中酸性磷酸酶和精氨酸酶的影响/ $n = 10$

组别	酸性磷酸酶 / $\mu \cdot \text{L}^{-1}$	P 值	精氨酸 / $\mu \cdot \text{L}^{-1}$	P 值
正常对照组	4.2 \pm 2.0		2.9 \pm 1.4	
肿瘤对照组	5.3 \pm 2.7	> 0.05	3.7 \pm 1.5	> 0.05
多糖对照组	55.5 \pm 10.0	< 0.01	62.5 \pm 14.5	< 0.01
多糖 + 肿瘤组	60.1 \pm 15.2	< 0.01	57.4 \pm 18.2	< 0.01

2.5 HFPS 对 PM ϕ 功能的影响

从表 4 可知 HFPS 有增强 PM ϕ 功能的作用,三个实验组 PM ϕ 吞噬百分率和吞噬指数都有不同程度提高,但 II 组与对照组相比无统计学意义。见表 4。

3 讨论

从实验中可以看出,铁筷子多糖具有理想的抑制实体型 S180 在小鼠体内生长的作用,我们从免疫药理学的角度对其作用机理进行初步探讨。机体内细胞免疫功能的强弱直接影响着肿瘤的发生发展,而在肿瘤生长期间往往因为细胞免疫功能受到抑制,使肿瘤得以快速生长。本实验表明,铁筷子多糖能促进胸腺组织增生。实验显示,荷瘤的机体细胞免疫功能是低下的,而铁子多糖不仅可提高正常机体的细胞免

表 4 HFPS 对 PMO 功能的影响 / n = 10

组 别	吞噬百分率 / %	P 值	吞噬指数	P 值
正常对照组	41.0 ± 8.1		0.49 ± 0.07	
肿瘤对照组	42.4 ± 6.9	> 0.05	0.45 ± 0.09	> 0.05
多糖对照组	60.6 ± 10.3	< 0.01	0.64 ± 0.16	< 0.01
多糖 + 肿瘤组	54.2 ± 10.8	< 0.01	0.59 ± 0.11	< 0.01

疫功能,并且可逆转荷瘤机体因肿瘤生长而功能低下的细胞免疫状态,表现为使用多糖的两个组动物脾淋巴细胞转化率和 IL-2 水平均较高。MØ 的众多功能已为人们所认识,活化的 MØ 作为抗肿瘤的效应细胞具有较强的杀伤肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞繁殖的能力^[7];除了参加机体的非特异性免疫反应外,在特异性免疫反应中巨噬细胞也起了重要作用,它们可将抗原信息传递给 T、B 细胞,另外,巨噬细胞功能增强后产生的 IL-1 可与 T 淋巴细胞结合,促使后者产生较多的 IL-2 并与 T 细胞膜上 IL-2 结合部位相互作用,促使 T 淋巴细胞分裂繁殖^[8]。我们的实验结果符合这一理论,即铁筷子多糖在使巨噬细胞吞噬功能增强的同时,IL-2 的产生有所增加,由此促进了脾淋巴细胞的分裂繁殖。巨噬细胞功能的强弱与其自身酶的活性息息相关,酸性磷酸酶被认为是巨噬细胞内溶酶体酶的标志酶,可受免疫激活剂和免疫抑制剂的调节^[9,10];精氨酸酶则可分解体内肿瘤组织微环境中的精氨酸,从而干扰肿瘤细胞内多肽和蛋白质的生物合成,因此与巨噬细胞的抗肿瘤效应有关。用铁筷子多糖灌胃 2 周后,动物腹腔巨噬细胞内这两种酶的活性被大大提高,这在肿瘤细

胞自身遗传信息的传递和表达受影响的同时,增进了巨噬细胞的吞噬消化能力,限制了肿瘤组织的生长。

总之,通过实验,我们认为铁筷子多糖抑制实体型 S180 体内生长的机制,可能是作为免疫增强剂促进了巨噬细胞内酶的活性,从而提高了其抗肿瘤和调节细胞免疫功能的作用,达到了抑制肿瘤生长的目的。

参考文献

- 郭晓庄主编.有毒中草药体系大词典.天津:科技翻译出版公司,1992: 435.
- Mosman T, et al. J Immunol Methods, 1983, (65): 55.
- 周道洪,洪元珊,赵曼瑞.测定淋巴细胞转化和鼠白细胞介素-2 活性新方法——MTT 比色法.中国免疫学杂志,1986,2(1):39.
- 吕建新,金丽琴,陈国荣等.免疫调节剂对大鼠巨噬细胞脂质过氧化和酸性磷酸酶的影响.中国病理生理杂志,1999,15(2): 131.
- 王坤,秦明芬.精氨酸酶的测定.江苏医药,1979,4: 4.
- 袁文学.人参总皂甙对环磷酸胺所致免疫功能低下的影响.中国药理学通报,1986,2(1): 21.
- 吕建新,陈国荣,金丽琴等.蜂花粉对小鼠腹腔巨噬细胞酶活性的影响.免疫学杂志,1993,9(2): 94.
- 余贺主编.医学微生物学.第 2 版.北京:人民卫生出版社,Pl 45.
- 李万德.卡介苗活化的肺巨噬细胞对二氧化碳的反应.中华结核和呼吸系疾病杂志,1981,4(5): 257.
- 陆天才,徐英含.环磷酸胺对肺泡巨噬细胞在矽肺发生中的作用.中华病理学杂志,1986,15(2): 114.