

托盘根乙醇提取物的抗肿瘤抗转移作用研究

杜钢军 林海红 杨义明¹ 张水兰¹ (开封 475001 河南大学药学院药理室;¹ 开封 475001 河南大学东京医院肿瘤科)

摘要 目的:观察托盘根乙醇提取物(ERC)对肿瘤生长的影响。方法:用 MTT 法观察 ERC 体外对人肿瘤 SPC-A1 细胞的影响,体内抑瘤实验观察 ERC 对 Lewis 肺癌的作用。结果:ERC 体外明显抑制 SPC-A1 细胞的生长,体内明显抑制 Lewis 癌块增大,减少 Lewis 肺转移结节数,增强小鼠对 Lewis 肺癌的相伴免疫反应。结论:ERC 对肺癌细胞系有明显抗肿瘤作用。

关键词 抗肿瘤;抗转移;相伴免疫

Study on antitumor and anti metastasis effect of alcohol extract from roots of rubus crategifolius bge(ERC)

Du Gangjun, Lin Haihong, Yang Yiming¹, Zhang Shui Lan¹ (Department of Pharmacology, Pharmaceutical college of HeNan University, KaiFeng, 475001;¹ Department of oncology, DongJing Hospital of HeNan University, Kai Feng 475001)

ABSTRACT **OBJECTIVE:**To observe the effect of ERC on tumor. **METHOD:**influence of ERC on SPC-A1 cells was observed in vitro by MTT method and on Lewis lung cancer was studied in vivo in tumor bearing mice. **RESULTS:**ERC could inhibit growth of SPC-A1 cells in vitro, prevent Lewis lung cancer from growing and decline node numbers of tumor in lung. **CONCLUSION:**ERC had antitumor effect on lung cancer.

KEY WORDS antitumor, antimetastasis, immunity-associated.

牛迭肚为蔷薇科悬钩子属植物,生长于东北、内蒙古等地,辽宁山区广有分布,沈阳药科大学生药教研室将其鉴定命名为托盘(Rubus Crategifolius bge),根药用治疗关节炎、痛风等,辽宁铁岭地区民间用其治疗肺癌。近年来沈药人员对托盘根乙醇提取物(Alcohol Extract from Roots of Rubus Crategifolius bge, ERC)进行了研究,认为主含鞣花酸及结构未明的萜类,有较强的抗氧化及增强免疫作用^[1,2],为开发托盘根的药用价值,河南大学药物研究所联合沈阳药科大学就托盘根乙醇提取物(ERC)抗肿瘤作用作了以下研究。

1 实验材料

1.1 动物

昆明小鼠 18-22g ♂ 沈阳药科大学动物室提供

C57BL/6 小鼠 18-22g ♂ 北京中国医学科学院药物研究所肿瘤室提供。

1.2 瘤株

SPC-A1 人肺癌 吉林省肿瘤研究所保存

Lewis lung cancer,由北京中国医学科学院药物研究所肿瘤室提供

1.3 样品与试剂

托盘根,采于辽宁省开源县,由沈阳药科大学生药教研室鉴定。

托盘根乙醇提取物,黄褐色粉末,性质稳定,每 1g 相当于 10g 原药材,于 70~80℃ 的生理盐水中溶解度可达 0.2%,沈阳药科大学药理室提供,灌胃给药时以生理盐水制成所需混悬液,加入细胞培养液中时以 70~80℃ 的生理盐水溶

解,过滤后稀释至所需浓度使用。

MTT,比利时 JANSSEN CHIMICA 公司产品 批号:67672

RPMI 640 USA CATALOG NO.200-2075

小牛血清杭州四季青生物工程材料研究所产品 批号:991011

1.4 仪器

CO₂ 培养箱 XPX-1A 型 日本

SPECTRA 1 型酶标仪 奥地利 SLT 公司

2 实验方法

2.1 对体外培养肿瘤细胞的影响^[3]

将指数增长期的 SPC-A1 人肺癌细胞用含 20% 小牛血清的 RPMI 640 培养液(内含青霉素、链霉素各 100μg/ml)配制成 1×10⁵ 个细胞/ml 悬液。于 96 孔培养板上每孔加细胞悬液 200μl,每组三个孔。试验孔含 ERC(生理盐水溶解,过滤,灭菌后用。)分别为 400,200,100,50,25μg/ml(所加不同浓度药物容积均为 10μl),对照孔加 10μl 生理盐水,于 5% CO₂ 培养箱内 37℃ 培养 72h。培养结束前 4h,每孔加 5μg/ml 的 MTT 20μl。培养结束时,快速翻板法除去培养液,每孔加 DMSO(二甲基亚砷)200μl,振荡 10min,于 SPECTRA 1 型酶标仪上 578nm 处测各组吸收度 A,计算细胞生长抑制率,求 IC₅₀。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 A} - \text{给药组 A}}{\text{对照组 A}} \times 100\%$$

2.2 对 Lewis 实体型肿瘤生长的影响

作者简介:杜钢军,男,1971 年 12 月生,讲师,硕士,从事肿瘤及免疫药理学研究

将接种 10d 生长良好的荷 Lewis 肺癌 C57 小鼠处死,剥离瘤块,加无菌生理盐水于组织研磨器内研磨成细胞匀浆,调细胞数为 5×10^7 个细胞/ml,于小鼠(均为雄性)前肢右腋下接种 0.2 ml/只。接种后将小鼠随机分为 5 组,每组 12 只,其中 3 组分别为 ERC 高、中、低剂量组(所给容积均为 0.2 ml/10g,剂量分别为 800、400、200 mg/kg),对照组给生理盐水 0.2 ml/10g,阳性对照组给 5-Fu 20 mg/kg(容积为 0.2 ml/10g)。接种后次日各组均 ig 给相应药物,每天 1 次,连续 9d。停药后次日处死小鼠,剥离瘤块,称重,计算抑瘤率。(本实验重复 3 次,所用小鼠均为雄性 C57 小鼠)

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

2.3 对 Lewis 肺癌转移的影响^[4]

瘤细胞悬液制法同前,调细胞数为 1×10^6 个细胞/ml,于小鼠(均为雄性)尾部 iv 接种 0.2 ml/只。接种后将小鼠随机分为 4 组,每组 12 只,其中三组分别按高、中、低剂量给 ERC(所给药物容积、剂量均同前),对照组给生理盐水 0.2 ml/10g。另设一组未接种小鼠为正常肺组,与接种小鼠平行饲养。接种后次日各组 ig 给相应药物,隔日 1 次,共给 9 次。末次给药后次日处死小鼠,切离肺脏,称重,以实验组小鼠肺重与正常小鼠平均肺重的差值作为瘤重,计算抑瘤率。将称重后的肺按其原始 5 叶切开,以 Bouin's 液(苦味酸饱和水溶液 75 ml,福尔马林 25 ml,冰醋酸 5 ml)固定 24h,再用 95%乙醇冲洗,计数肉眼可见各组肺癌转移结节总数。(本实验重复 2 次,所用小鼠均为雄性昆明小鼠)

2.4 对 Lewis 肺癌相伴免疫反应的影响

小鼠 60 只,雄性,随机分为 5 组,每组 12 只。一组为正常对照组(不预先用肿瘤细胞免疫),二组灌服生理盐水 0.2 ml/10g,其余三组分别按高、中、低剂量灌服 ERC(所给药物容积、剂量均同前),每天 1 次,连续给药 10d。第 1 次给药当天,除正常对照组外,各组小鼠均于距尾根约 3cm 处 SC 接种 5×10^7 个/ml 的 Lewis 瘤细胞悬液 0.05 ml/只进行免疫。停药次日,5 组小鼠均按上述 2.2 实验方法于右前肢腋部 SC 接种 5×10^7 个/ml 的 Lewis 瘤细胞悬液 0.2 ml/只,剪去各组免疫小鼠尾部有癌结节的鼠尾,继续正常饲养 10d 后处死,剥离各组小鼠腋部瘤块,称重,计算抑瘤率。

3 实验结果

3.1 对肿瘤生长的影响

ERC 对体外培养的人肺癌 SPC-A-1 细胞有明显杀伤作用,IC₅₀ 为 257.7 μg/ml(见表 1);对小鼠体内移植 Lewis 肺癌的生长有明显抑制作用,实验重复 3 次,结果相似,高、中、低三个剂量的平均抑瘤率分别为 38.9%、40.1%、28.4%($P < 0.01$,见表 2)

3.2 对 Lewis 肺癌转移的影响

ERC 对 Lewis 肺癌转移有抑制作用,高、中剂量均能明显减少肺癌转移结节数,且对转移后的肿瘤生长有明显抑制作用,实验重复 2 次,结果相似,高、中两个剂量的平均抑瘤率分别为 34.7%、30.6%、28.4%($P < 0.01$,见表 3)

表 1 ERC 对 SPC-A-1 细胞生长的影响

组别	浓度 (μg/ml)	吸收度 (A)	抑制率 (%)
生理盐水	-	1.887	-
ERC	400	0.592	68.6
	200	1.211	35.8
	100	1.419	24.8
	50	1.484	21.4

IC₅₀ = 257.7 μg/ml

表 2 ERC 对 Lewis 肺癌生长的影响

组别	剂量 (mg/kg)	瘤重 ($\bar{x} \pm s$)	抑瘤率 (%)
生理盐水	-	1.62 ± 0.23	-
5-Fu	20	0.90 ± 0.21**	44.4
ERC	800	0.99 ± 0.21**	38.9
	400	0.97 ± 0.19**	40.1
	200	1.16 ± 0.20**	28.4

与生理盐水组比较 ** $P < 0.01$

表 3 ERC 对 Lewis 肺癌转移的影响

组别	剂量 (mg/kg)	肺结节数 ($\bar{x} \pm s$)	瘤重 ($\bar{x} \pm s$)	抑瘤率 (%)
生理盐水	-	21.6 ± 5.3	0.52 ± 0.24	-
ERC	800	9.7 ± 2.4**	0.27 ± 0.13**	34.7
	400	9.4 ± 2.4**	0.30 ± 0.11**	30.6
	200	22.4 ± 4.5*	0.49 ± 0.19*	4.2

与生理盐水组比较 * $P > 0.05$ ** $P < 0.01$

3.3 对 Lewis 肺癌相伴免疫反应的影响

ERC 能明显促进小鼠对 Lewis 肺癌的相伴免疫反应,高中剂量通过提高肿瘤相伴免疫反应的抑瘤率分别为 62.4% 和 63.5% ($P < 0.01$,见表 4)。

表 4 ERC 对 Lewis 肺癌相伴免疫反应的影响

组别	剂量 (mg/kg)	生瘤率 (生瘤鼠数/实验鼠数)	瘤重 ($\bar{x} \pm s$)	抑瘤率 (%)
正常组	-	12/12	1940 ± 380	-
生理盐水	-	11/12	280.9 ± 49.2	-
ERC	800	8/12	105.7 ± 22.5**	62.4
	400	8/12	102.4 ± 19.7**	63.5
	200	10/12	258.2 ± 51.9*	7.9

与生理盐水组比较 * $P > 0.05$ ** $P < 0.01$

4 结论与讨论

化疗药物一般均有毒性大、对肿瘤细胞选择性差的弊端;免疫调节剂可通过机体自身的防御作用抑制肿瘤生长,不损伤自身细胞,但一般无直接细胞毒作用,单独应用疗效较差,如能有药物既能直接杀伤肿瘤细胞,又能增强机体自身免疫,对治疗肿瘤无疑非常有利。文献证明 ERC 有促进淋巴细胞转化及诱生 IL-2 作用^[2];本文结果显示,ERC 对体外培养的人肺癌 SPC-A-1 细胞及小鼠体内移植 Lewis 肺癌的生长均有明显抑制作用,且有抑制 Lewis 肺癌转移、增强小鼠对 Lewis 肺癌的相伴免疫反应作用,提示 ERC 的抗癌机制兼有细胞直接杀伤及免疫增强两条途径。另有文献报道托盘根能促进骨折愈合^[5],有增强损伤修复作用,可能也是

ERC 抗癌作用机制的一部分。因托盘根目前仅在民间用于治疗肺癌,原因不明,我们首先选择了肺癌细胞株做抗癌活性筛选,在此基础上也对 ERC 的抗癌谱及作用选择性进行了深入研究^[1],均证明 ERC 在抗癌方面不同于常规化疗药物及免疫调节剂,对肿瘤细胞选择性较高,进一步研究有望开发为一种新型抗癌药物。

参考文献

- 1 王五坤,王爱民,曹颖林.托盘根抗组织脂质过氧化作用[J].沈阳药科大学学报,1994 11(4):299.
- 2 徐颖,杜钢军,牟孝硕.托盘根乙醇提取物对淋巴细胞转化及 IL-2 产生的影响[J].沈阳药科大学学报,2000,17(6):438.
- 3 李登华,田志钢,张捷.MTT 法用于快速测试药物对悬浮肿瘤细胞毒性研究[J].癌症,1991,10(3):226.
- 4 喻伦根,田鸿生,舒清波.超氧化物歧化酶抑制剂 DDC 对 Lewis 肺癌转移的抑制作用[J].癌症,1993,12(4):337.
- 5 赵明宏,牟孝硕,赵厚得.盘根接骨粉的促进骨折愈合作用[J].沈阳药科大学学报,2001,18(2):134.
- 6 杜钢军,林海红,许启泰.托盘根提取物对不同细胞的影响[J].中国药科大学学报,2001,32(6):468.

收稿日期:2001-06-26