

新疆软紫草多糖体内抗肿瘤作用研究

陈韩英^{1,2}, 陈韩飞³, 李德芳¹, 张波^{1,2}, 王振华^{1,2}, 郑秋生^{1,2*} (1.石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002; 2.新疆特种植物药资源省部重点实验室, 新疆 石河子 832002; 3.新疆水产科学研究所, 乌鲁木齐 830000)

摘要: 目的 研究新疆软紫草多糖对小鼠宫颈癌 U14 生长的抑制作用。方法 建立小鼠宫颈癌 U14 实体瘤与腹水瘤两种模型, 观察软紫草多糖对实体瘤抑瘤率、胸腺和脾脏免疫器官重量和腹水瘤生命延长率的影响。结果 软紫草多糖 3 个剂量组对 U14 实体瘤小鼠均具有明显的抑制作用($P<0.05$), 对 U14 腹水瘤小鼠具有明显的延长存活期作用($P<0.05$), 中剂量组能明显增加 U14 实体瘤小鼠的脾指数, 高、中剂量组能明显降低胸腺指数。结论 软紫草多糖对小鼠宫颈癌 U14 的生长有一定的抑制作用。

关键词: 软紫草多糖; U14; 体内抑瘤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)11-1061-04

Effect of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst Polysaccharide on Mice Bearing in U14 Cervical Cancer *in Vivo*

CHEN Hanying^{1,2}, CHEN Hanfei³, LI Defang¹, ZHANG Bo^{1,2}, WANG Zhenhua^{1,2}, ZHENG Qiusheng^{1,2*} (1.College of Pharmaceutical, Shihezi University, Shihezi 832002, China; 2.Key Laboratory of Phytomedicine Resources & Modernization of TCM, Shihezi 832002, China; 3.Institute of Fisheries Science of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of crude polysaccharides from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst(ARPS) anti-tumor of mice bearing uterine cervical carcinoma (U14) *in vivo*. **METHODS** The effect of ARPS on the inhibition rate of solid tumor, thymus index, spleen index and the life span of ascites tumor were conducted with the experiment model *in vivo* of animal tumor. **RESULTS** ARPS had obvious anti-tumor effects to U14-mice ($P<0.05$), could prolong U14-mice life, and medium dose group increased effect on spleen index ($P<0.05$), high and medium dose groups decreased effects on thymus index ($P<0.05$). **CONCLUSION** The result indicated that ARPS could inhibited the development of U14 cervical cancer in mice.

KEY WORDS: *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst polysaccharide; U14; tumor inhibition *in vivo*

紫草为紫草科植物新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst.或内蒙紫草 *Arnebia guttata* Bunge 的干燥根^[1]。新疆紫草又称软紫草, 主要分布于新疆, 为维吾尔医常用药材, 具有凉血活血、解毒透疹等功效, 也是中医临床常用的清热解毒、凉血止血药物。近几年研究结果表明, 紫草不仅具有杀菌抗炎^[2]、护肝^[3]、抗生育作用^[4], 还具有抗肿瘤^[5]和延缓衰老、增强机体抵抗力^[6]的作用, 同时, 对紫草化学成分的研究也在逐步深入, 但目前对软紫草中水溶性成分——多糖的研究较少。已有研究表明软紫草多糖 [*Arnebia euchroma* (Royle) Johnst polysaccharide, ARPS]具有免疫增强功能, 有明显抑制单纯性疱疹病毒、非特异性抗炎作用^[7], 但至今 ARPS 的体内抗肿瘤作用, 尚未见明确报道。目前国内外已经有多种活性多糖在临床上用作抗肿瘤药物及抗肿瘤辅助药, 用于

抗肿瘤的辅助治疗和减轻化疗的不良反应, 因此, 研究 ARPS 的抗肿瘤活性, 具有重要的现实意义。为更好地开发利用新疆的紫草资源, 同时也为 ARPS 的研究及其临床应用提供基础, 本研究通过建立荷瘤小鼠模型, 观察 ARPS 对小鼠宫颈癌 U14 生长的抑制作用, 为进一步的研究提供实验依据。

1 材料

1.1 实验药物

软紫草采自新疆阿克苏地区(采集时间: 10 月下旬), 经石河子大学药学院李鹏副教授鉴定为紫草科植物新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst 的干燥根。取软紫草粗粉(紫草粉研后过二号筛), 用 600 mL 石油醚(30~60 °C)脱脂 3 次, 晾干, 然后加入 1 000 mL 蒸馏水加热提取数小时, 趁热过滤, 重复 3 次。合并水提液并浓缩至原体积的 1/4, 加入 3 倍量无水乙醇, 静置过夜后抽滤。

基金项目: 石河子大学高层次人才科研启动资金专项(RCZX200758); 石河子大学自然科学与技术创新重点项目(ZRKX2009ZD01-2)

作者简介: 陈韩英, 女, 博士, 副教授, 硕士 Tel: (0993)2057005 E-mail: hanyingchen@sina.com *通信作者: 郑秋生, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (0993)2057003 E-mail: zqsyt@sohu.com

将沉淀用无水乙醇、丙酮和乙醚依次洗涤，真空干燥，即得粗 ARPS，苯酚-硫酸法紫外分光光度计测定多糖含量为 25.36%，用生理盐水溶解为浓度 100, 200, 300 mg·mL⁻¹ 溶液，过滤除菌，分装后置 4℃ 保存备用。

环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX, 江苏恒瑞医药股份有限公司，批号：09020521，规格：200 mg·支⁻¹)，用生理盐水配制成 40 mg·kg⁻¹ 溶液，现配现用。

1.2 肿瘤细胞株

U14 细胞株：小鼠宫颈癌细胞株，新疆特种植物药资源省重点实验室保存。

1.3 实验动物

昆明种小鼠，♀♂ 各半，体重(20±2)g，由新疆自治区实验动物研究中心提供，合格证号：SCXK(新)2003-0002。分笼饲养，自由饮水和进食。

2 方法

2.1 ARPS 对 U14 实体瘤的抑制作用

无菌条件下取接种第 7 天生长良好的 U14 荷瘤腹水小鼠，抽吸乳白色腹水立即置无菌管中，以注射用生理盐水按 1:4 比例稀释成瘤细胞悬液，并计数调整活瘤细胞浓度为 2×10⁷ 个·mL⁻¹。取 60 只小鼠，♀♂ 各半，在小鼠右前肢腋下皮下注射接种 0.2 mL 肿瘤细胞悬液，制成实体瘤实验动物模型。接种次日称量，小鼠随机分为 5 组，即空白对照组(灌胃给药与 ARPS 组等体积的生理盐水)、阳性对照组(腹腔注射 CTX 40 mg·kg⁻¹，隔日给药)^[8]、ARPS 高、中、低剂量组(灌胃给药，ARPS 剂量分别为 100, 200, 300 mg·kg⁻¹)，连续给药 10 d，1 次·d⁻¹。末次给药 24 h 后称重，乙醚麻醉后脱臼处死小鼠，剪开肿瘤部位，剥离瘤块，用滤纸吸净其上液体，称瘤块重量，计算抑瘤率。并且分离胸腺和脾脏，滤纸吸去表面残血，精密称重，计算胸腺和脾脏指数。

肿瘤生长抑制率/%=

$$\frac{\text{空白对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}}{\text{空白对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

$$\text{脾脏指数} = \frac{\text{脾脏重量} / \text{mg}}{\text{体重} / \text{g}}$$

$$\text{胸腺指数} = \frac{\text{胸腺重量} / \text{mg}}{\text{体重} / \text{g}}$$

2.2 ARPS 对腹水瘤宫颈癌 U14 小鼠生命延长时间率试验

无菌条件下取接种第 7 天生长良好的 U14 荷瘤腹水小鼠，抽吸乳白色腹水立即置无菌管中，以注射用生理盐水按 1:4 比例稀释成瘤细胞悬液，并计数调整活瘤细胞浓度为 2×10⁷ 个·mL⁻¹。每只小鼠腹腔注射 0.2 mL，次日称重、分成 5 组，开始给药，按“2.1”项下给药剂量和方式，连续给药 10 d，停药后观察小鼠存活天数，计算生命延长率。

生命延长率/%=

$$\frac{\text{给药组平均生存时间} - \text{对照组平均生存时间}}{\text{对照组平均生存时间}} \times 100\%$$

2.3 数据处理

结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 11.5 进行统计学处理，各组均数之间比较进行 one-way ANOVA 检验和组间多重比较，判断有无显著性。

3 结果与分析

3.1 ARPS 的抑瘤作用

ARPS 对 U14 移植性实体瘤的抑制与空白对照组瘤重相比，实验组的高、中、低剂量组均有显著抑制 U14 宫颈癌实体瘤生长的作用($P < 0.05$)，结果见表 1。

表 1 ARPS 对小鼠体内移植性实体瘤 U14 的抑制作用

Tab 1 Effects of ARPS on the growth of U14

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	体重/g		瘤重/g	抑瘤 率/%
		初	末		
空白对照组	—	21.21±0.73	26.00±2.42	2.94±0.40 ²⁾	—
阳性对照组	40	20.06±1.33	25.30±3.05	1.32±0.39 ¹⁾	55.10
ARPS 低剂量组	100	20.64±1.02	26.04±2.07	1.49±0.32 ¹⁾	49.32
ARPS 中剂量组	200	21.11±0.86	26.88±2.68	1.41±0.28 ¹⁾	52.04
ARPS 高剂量组	300	20.35±1.09	26.12±2.46	1.66±0.37 ¹⁾	43.54

注：与空白组比较，¹⁾ $P < 0.05$ ；与阳性对照组比较，²⁾ $P < 0.05$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with positive control group, ²⁾ $P < 0.05$

3.2 ARPS 对荷瘤小鼠脾脏和胸腺指数的影响

结果表明，与空白对照组比较，CTX 能明显降低荷瘤小鼠脾指数($P < 0.05$)，使胸腺指数降低。服用 ARPS 后，3 个剂量组荷瘤小鼠脾脏指数均高于空白对照组，胸腺指数与空白对照组比较，中、低剂量组有显著性差异($P < 0.05$)，结果见表 2。

3.3 ARPS 对荷瘤小鼠生存时间的影响

结果表明，与空白对照组比较，ARPS 3 个剂量组对 U14 宫颈癌腹水瘤小鼠生命均具有明显的延长作用($P < 0.05$)，且以 ARPS 高、中剂量组生命延长率较为显著，结果见表 3。

表 2 ARPS 对 U14 小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响

Tab 2 Effects of ARPS on weight of immune organs

组 别	剂量/ mg·kg ⁻¹	脾脏指数/ mg·g ⁻¹	胸腺指数/ mg·g ⁻¹
空白对照组	—	10.51±1.67 ²⁾	2.13±0.33
阳性对照组	40	8.25±1.21 ¹⁾	1.81±0.33
ARPS 低剂量组	100	12.24±1.77 ²⁾	1.73±0.30 ¹⁾
ARPS 中剂量组	200	13.02±2.78 ¹⁾²⁾	1.64±0.25 ¹⁾
ARPS 高剂量组	300	12.16±1.31 ²⁾	1.97±0.38

注：与空白组比较，¹⁾P<0.05；与阳性对照组比较，²⁾P<0.05

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.05; compared with positive control group, ²⁾P<0.05

表 3 ARPS 对 U14 腹水瘤小鼠生存时间的影响

Tab 3 Effects of ARPS on the life span of of U14

组 别	剂量/ mg·kg ⁻¹	数量/只		平均生存 时间/d	生命延 长率/%
		前	后		
空白对照组	—	12	11	12.71±0.48 ²⁾	82.06
阳性对照组	40	12	12	23.14±0.69 ¹⁾	82.06
ARPS 低剂量组	100	12	11	17.14±0.70 ¹⁾²⁾	34.85
ARPS 中剂量组	200	12	11	19.28±1.11 ¹⁾²⁾	51.69
ARPS 高剂量组	300	12	10	19.00±1.15 ¹⁾²⁾	49.49

注：与空白组比较，¹⁾P<0.05；与阳性对照组比较，²⁾P<0.05

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.05; compared with positive control group, ²⁾P<0.05

4 讨论

本实验结果显示，服用 CTX 的阳性对照组虽然有明显的抑瘤率，但小鼠在服药过程中体重增加减少，皮毛不好；脾脏指数及胸腺指数明显低于空白对照组，提示其在抑制肿瘤生长的同时，对机体免疫器官和免疫功能有一定的抑制作用；而服用 ARPS 后，在抑瘤率与阳性对照组差异不明显的同时，没有 CTX 所致的脾脏萎缩等不良反应，且显著提高荷瘤小鼠的脾脏指数，提示 ARPS 可促进小鼠的免疫作用。ARPS 对胸腺指数则有降低趋势，其原因可能是 ARPS 能加速胸腺细胞向脾脏和外周血释放，促使胸腺内成熟和较成熟的 T 细胞减少^[9]。故可认为其胸腺缩小的趋势，不是免疫抑制的结果，而是其增强机体细胞免疫功能的机制之一。

目前对肿瘤的治疗多采用放化疗方法，但由于化疗药物在治疗疾病的同时，对机体正常组织细胞也产生强烈的杀伤作用，如造成白细胞减少、免疫器官萎缩、巨噬细胞吞噬功能降低等不良反应，从而使肿瘤患者的自身免疫力进一步降低，不但影响了化疗的效果，而且使治疗难以持续长久的进行。近些年来，中药多糖日益受到关注，

目前已发现许多天然多糖有明显的抗肿瘤、免疫调节、抗病毒等方面的活性，而且对正常细胞无伤害^[10-11]。本次试验表明，CTX 对小鼠 U14 宫颈癌有明显的抑制作用，能明显延长 U14 腹水瘤小鼠存活时间，但是对于小鼠体重的正常增长有一定的影响，使胸腺指数和脾脏指数明显下降；采用不同剂量的 ARPS 进行干预后，结果显示其高、中、低 3 个剂量组的小鼠在实验结束时瘤重均低于空白对照组(P<0.05)，且抑瘤率均高于中药疗效评价中规定的指标(抑瘤率 30%以上)^[12]。其中 ARPS 高、中剂量组对 U14 宫颈癌腹水瘤小鼠生存时间作用较为显著，表现出较强的抗腹水瘤作用，这可能与 ARPS 增强脾脏中 T 细胞的数量和 T 淋巴细胞的功能，促进 T 淋巴细胞的免疫应答作用^[13]，增强免疫功能有关；同时，ARPS 可以提高荷瘤小鼠红细胞膜流动性和带 3 蛋白含量，使红细胞更好地发挥体内天然的免疫功能^[14]，在机体抗肿瘤中起到重要的作用。

综上所述，ARPS 在 U14 宫颈癌小鼠体内具有明显的抗肿瘤作用，这对癌症的治疗具有重要的意义，但本试验仅对 ARPS 的抗肿瘤作用进行了浅层研究，ARPS 是否具有增效减毒的双重作用，具体是通过哪条途径发生了抗肿瘤作用尚未明确，因此，需要对 ARPS 的抗肿瘤作用机制进行深层次的研究。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版。一部)[S]. 2010: 320.
- [2] LI H L, QIN J, HE H J, et al. Pharmacodynamics study of the extract of *Onosma paniculata* Bur. et Fr., *Arnebia Euchroma* (Royle) Johnst. and *Lithospermum Erythrorhizon* Sieb. et Zucc [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族医药杂志), 2002, 3(56):174-176.
- [3] ZHAO T, WU T, LU D P. Prophylaxis of sinusoidal obstruction syndrome by *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst alcoholic extract in rats model [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2005, 40(21): 1626-1629.
- [4] ZHANG Y, WANG Y L, QI H, et al. Experimental study on the hepatoma carcinoma by Xinjing Shikonin [J]. J Pract Oncol(实用肿瘤杂志), 2006, 20(4): 294-295.
- [5] ZHANG H Z, LIAO M C, XUAN L J, et al. A contraceptive constituent from *Arnebia euchroma*(Royle) Johnst [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2002, 14(1): 1-4.
- [6] XU J B, MAIERDAN M, YU Y L. The effects of *Arnebia euchroma*(Royle) Johnst on extracts on life-span in drosophila melanogaster [J]. J Xinjiang Med Univ(新疆医科大学学报), 2007, 30(3): 228-229.
- [7] JING Y X, SHAN L J, LIAN J, et al. Effects of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst on immune functions of mice [J].

- Xinjiang J Tradit Chin Med(新疆中医药), 2007, 25(4):10-12
- [8] JU X Y. Preparation of triptolide-liposome and its *in vivo* antitumor activity [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2007, 24(4): 271-274.
- [9] SU X R, LOU Y J, CHANG Y Q, et al. Study on the nutritional components and the antineoplastic activity of polysaccharides of Sea Cucumber [J]. Acta Nutr Sin(营养学报), 2003, 25(2): 181-182.
- [10] ZHANG L, TIZARD I R. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from Aloe vera gel [J]. Immunopharmacology, 1996, 35(2): 119-128.
- [11] JIANG J F, WANG S P, HE X J. Progress in Studies of traditional Chinese drug polysaccharides on anti-tumor [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2008, 25(7): 616-618.
- [12] HAN R. Study anti-cancer drugs and experiment technique(抗癌药物研究与实验技术)[M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College unite publishing company, 1997: 271-272.
- [13] ZHOU N N, DONG J Y. The regulative effect of Arnebia root polysaccharide on mouse immunological function [J]. Chin J Exp Clin Immunol(中国实验临床免疫学), 1995, 7(5): 42-44.
- [14] ZHANG X J, MU K, YANG S S, et al. Influence of polysaccharides of lithospermum erythrorhizon on fluidity and band-3 protein level of red cells membrane of S180 mice [J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2007, 3(9): 30-33.
- 收稿日期: 2010-01-25