

鲨鱼软骨提取物抑瘤作用及其机制研究

梁中琴 姜开余 顾振纶 杨吉成¹ 盛伟华¹ (苏州 215007 苏州医学院药理教研室,¹ 苏州医学院基因室)

摘要 目的: 研究鲨鱼软骨提取物的抗肿瘤作用及其机制。方法: 采用 MTT 法及流式细胞仪技术测定鲨鱼软骨粉提取物对血管内皮细胞增殖及产生白细胞介素-6(IL-6)的影响, 常规方法测定其对荷 S-180_A 小鼠的抑瘤作用。结果: 鲨鱼软骨提取物浓度为 200~ 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时显著抑制内皮细胞的增殖 ($p < 0.05$), 细胞周期检测发现其主要抑制细胞进入 S 期; (2) 鲨鱼软骨提取物 (200~ 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 可显著抑制内皮细胞产生 IL-6; (3) 鲨鱼软骨粉水溶液灌胃 (250~ 1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 对荷 S-180_A 小鼠的抑瘤率达 31.9~ 34.2% ($p < 0.05$)。结论: 鲨鱼软骨制剂对小鼠 S-180_A 具有抑制作用, 其作用机制可能与抑制血管生长有关。

关键词 鲨鱼软骨; 抑瘤; 内皮细胞; IL-6; 小鼠肉瘤-180

Anti-tumor Effect and Mechanism of Shark Cartilage Extracts

Liang Zhongqin (Liang ZQ), Jiang Kaiyu (Jiang KY), Gu Zhenlun (Gu ZL), et al (Department of Pharmacology Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the anti-tumor action of shark cartilage (SC) and the mechanism of shark cartilage extracts (SCE) by cultured endothelial cells. **METHOD:** The proliferation effect and IL-6 stimulation effect of SCE were investigated with MTT method and FACS method by cultured endothelial cells. Anti-tumor function on implanted sarcoma-180 (S-180A) in Kunming mice was determined with regular methods. **RESULTS:** (1) SCE (200~ 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) could obviously inhibit the proliferation of endothelial cells ($P < 0.05$), and by cell cycle measure, it is found that the SCE mainly inhibited the cells from entering S phase. (2) SCE (200~ 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) could significantly reduce the production of IL-6 by endothelial cells ($P < 0.05$). (3) The results showed that shark cartilage preparation possesses a significant inhibitory effect on S-180_A, and the inhibition rate after oral administration of 500~ 1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of the SC was 31.9~ 34.2%. **CONCLUSION:** SC had the inhibitory effect on S-180_A and SCE can inhibit the proliferation by cultured endothelial cells, and its mechanism may be related to the inhibition of the growth of blood vessels.

KEY WORDS shark cartilage, endothelial cell, interleukin-6, sarcoma-180_A (S-180_A)

80年代以来, 鲨鱼软骨受到美国、日本等国科学家的重视, 因为他们发现鲨鱼软骨中含有新生血管抑制因子, 这种抑制因子能阻止肿瘤的生长和扩散, 有治疗和预防癌症的作用^[1,2], 我国科学家在这方面也做了大量的工作, 并取得了一定的成果^[3]。临床已有各种鲨鱼软骨制剂用于治疗癌症^[4], 为了确切了解该类物质的抗肿瘤疗效, 我们选用鲨鱼软骨胶囊进行荷瘤动物实验, 同时将鲨鱼软骨粉进一步分离纯化, 采用人脐带静脉内皮细胞增殖及产生 IL-6 作用的体外实验, 对其抗肿瘤效应及作用机制进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料和主要试剂

鲨鱼软骨胶囊由香港保健协会, 香港百草堂有限公司提供; 鲨鱼软骨提取物由苏州中药研究所提取并提供; 胶原酶 I 型 (Promega 产品), 使用浓度为 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 标准 IL-6 由法国 Klein B 博士惠赠, B₉ 细胞株 (IL-6 依赖细胞株) 为本院基因室保存细胞株。

小鼠肉瘤 180 腹水型 (S-180_A) 购自中科院上海药物研究所, 每 7 天传 1 代。

1.2 人脐带静脉内皮细胞分离、培养及鲨鱼软骨提取物处理:

内皮细胞分离参照盛民立方法^[5], 正常胎儿脐带离体后立即置 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (PH 7.2) 中, 半小时内使用。经用 PBS 清洗血管内残余有血液后灌入预温至 37℃ 的胶原酶消化液, 在 37℃ 温育 15 分钟, 用 RPMI 1640 培养液冲洗消化液于离心管中, 1000 rpm, 10 min 离心二次洗细胞, 以含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 重悬细胞配成 2×10^6 个细胞 mL^{-1} , 在 96 孔板中, 加入内皮细胞 2×10^5 个/孔培养 24 h 后以 PBS 洗去各孔旧培养液及非粘附细胞, 实验组加入不同剂量鲨鱼软骨提取物 (50、100、200、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 用含 5% 小牛血清的 RPMI 1640 溶解), 对照组加含 5% 小牛血清的 RPMI 1640 继续培养 48 h, 收集上清待测 IL-6。

1.3 细胞增殖测定^[6]

用 MTT 比色法。内皮细胞处理同上, 在细胞培养结束前 4 小时加入 MTT (噻唑蓝, Sigma 产品, 使用浓度为 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 4 小时后用酸化 SDS 终止反应, 以 MR710 型酶标仪检测 OD 值。

流式细胞仪(FACS)检测细胞周期:以不同浓度的 SEC (200~ 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)与内皮细胞共同培养 72 h 后收获细胞,以冷的 PBS 洗涤 2 次,细胞沉淀用 70% 乙醇混匀备用,上机前用 PBS 洗涤后再用 PBS 调细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,加入 RNA 酶 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,37°C 水浴作用 30 min 后置冰浴终止反应,每毫升细胞悬液加 PI 染液 100 μL (1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),暗室中放置 30 min 后,用流式细胞仪检测细胞周期。

1.4 IL-6 活性测定及计算

IL-6 活性测定采用改良的 MTT 法^[7],单位计算采用概率单位法^[8]。

1.5 抑瘤实验

按文献^[9]方法。接种 24 h 后称重随机分为阴性、阳性对照组及鲨鱼软骨组。鲨鱼软骨粉水溶液组(250~ 1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃给药,对照组用生理盐水灌胃,每天 1 次共 9 天。环磷酰胺阳性对照组采用 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射,9 天中共给药 2 次,各组均在停药 1 天后处死动物,取瘤称重,拍照及切片观察。按下列公式计算抑瘤率。

肿瘤抑制率(%) = (对照组平均瘤重 - 给药组平均瘤重)/对照组平均瘤重 $\times 100$

2 结果

2.1 鲨鱼软骨提取物对培养的人脐带静脉内皮细胞增殖的影响

MTT 比色法显示鲨鱼软骨提取物在 200~ 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时显著抑制内皮细胞增殖($p < 0.05$),其抑制作用似呈剂量依赖性。见表 1。

表 1 鲨鱼软骨提取物对内皮细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Groups	Dosage $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	OD Value
Control		0.54 \pm 0.068
SEC	50	0.49 \pm 0.031
	100	0.47 \pm 0.046
	200	0.38 \pm 0.085*
	400	0.39 \pm 0.041*

* $p < 0.05$ Compared with control

流式细胞仪检测结果提示,鲨鱼软骨提取物浓度为 200~ 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时明显抑制内皮细胞进入 S 期和 G₂ 期,400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时作用显著($p < 0.05$),见表 2。说明鲨鱼软骨提取物可抑制血管内皮细胞 DNA 的合成。

表 2 鲨鱼软骨提取物对内皮细胞细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

group	cell cycle (%)		
	G ₁	S	G ₂
Control	75.56 \pm 5.65	13.39 \pm 3.45	12.34 \pm 3.89
SEC(200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	79.16 \pm 3.56	10.67 \pm 3.08	11.15 \pm 2.33
SEC(400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	82.68 \pm 4.37	8.38 \pm 2.16*	9.12 \pm 3.15

* $p < 0.05$ Compared with control

2.2 鲨鱼软骨提取物对培养的人脐带静脉内皮细胞产生

IL-6 影响

鲨鱼软骨提取物为 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时即开始显著抑制内皮细胞产生 IL-6,表现为剂量依赖性。见表 3。

表 3 鲨鱼软骨提取物对培养的内皮细胞产生 IL-6 的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

group	dose($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-6 level(IU $\cdot \text{mL}^{-1}$)
Control		5226.66 \pm 387.34
SEC	50	5300.90 \pm 505.54
	100	5086.05 \pm 733.85
	200	3982.21 \pm 464.14*
	400	3774.75 \pm 491.32*

* $p < 0.05$ Compared with control

2.3 鲨鱼软骨水溶液对荷 S-180_A 小鼠的抑瘤效应

结果见表 4。鲨鱼软骨水溶液对荷 S-180_A 小鼠具有抑瘤作用,并有明显的剂量依赖关系,小剂量时抑瘤作用较弱,当剂量加大时,抑瘤作用加大,抑瘤率达 31.9~ 34.2%,说明一定剂量的鲨鱼软骨制剂能明显抑制肿瘤的生长。

表 4 鲨鱼软骨水溶液对荷 S-180_A 小鼠的抑瘤效应($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	Tumor weight (g)	Inhibition rate of tumor (%)	P
NS	2.07 \pm 0.61		
SC(250 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	1.94 \pm 0.57	12.5	
SC(500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	1.42 \pm 0.46	31.9	< 0.05
SC(1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	1.39 \pm 0.58	34.2	< 0.05
CY(30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ^{ip} $\times 2$	0.15 \pm 0.02	92.2	< 0.001

3 讨论

Folkman 在 70 年代早期就提出,肿瘤的生长依赖于血管生成,建立丰富的血液循环,以适应肿瘤组织异常旺盛的生化代谢以及瘤细胞的繁殖与转移。而抗血管生存策略可成为治疗实体瘤的一种新的疗法^[10],这一假说已被近 30 年来在各方面积累的证据所支持^[2,3],研究表明抑制肿瘤的血管生成,可切断肿瘤血供及其转移途径,对肿瘤的治疗和防止肿瘤转移有重要的意义。因此寻找或合成血管生成抑制药已引起人们极大的兴趣^[11]。本实验研究表明,鲨鱼软骨提取物在体外对短期培养的人脐带静脉内皮细胞增殖具有明显的抑制作用,其抑制作用主要发生在细胞周期的 S 期,进一步说明其可抑制内皮细胞 DNA 的合成,具有抑制血管生成的作用。同时鲨鱼软骨提取物对内皮细胞产生 IL-6 有抑制作用,此抑制作用与剂量呈依赖趋势,我们认为这一作用的产生可能与内皮细胞被抑制有关,因为 IL-6 可由血管内皮细胞产生,但形成这种现象的真正原因和其代表的功能机制尚有待于进一步的研究。

鲨鱼软骨制剂可有效抑制荷-180_A 小鼠的肿瘤生长,口服剂量 500~ 1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,抑瘤率达 31.9~ 34.2%,对其瘤块的病理切片中发现,用药组间质小血管数减少,血管壁增厚,并有血栓形成增多现象,这种结果与血管内皮细胞

的抑制效应关系将有待研究证实。

参考文献

- 1 Lee A, Langer R. Shark cartilage contains inhibitors of tumors angiogenesis. *Science*, 1983, 221: 1185.
- 2 Oikawa H, Ashino-Fuse H, Shimamura M, et al. A novel angiogenic inhibitor derived from Japanese shark cartilage (1) extraction and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis. *Cancer Letters*, 1990, 51: 181.
- 3 贾福星, 沈先荣, 于志浩等. 软骨抗肿瘤制剂的制备及肿瘤实验治疗. *中国生化药物杂志*, 1996, 17(4): 150.
- 4 唐永范. 鲨鱼软骨的应用研究. *抗癌*, 1996, 420(2): 32.
- 5 唐民立主编. 血管内皮与疾病(血管内皮细胞培养), 上海: 上海医科大学出版社, 1993, 170.
- 6 梁中琴, 盛伟华, 王晓霞, 等. 云芝糖肽对人外周血淋巴细胞增殖和 T 细胞亚群变化的调节作用. *中草药*, 1999, 30(1): 37.
- 7 Tade H, shiho O, kuroshima K, et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods*, 1986, 93(2): 157.
- 8 曹雪涛主编. 白细胞介素 2 的基础与临床. 北京: 科学出版社, 1990.
- 9 徐淑云主编. 药理实验方法学, 北京: 人民卫生出版社, 1991.
- 10 Fan TP. 血管生成、抗血管生成及靶向血管的基因治疗. *国外医学药学分册*, 1995, 22(5): 285.
- 11 沈先荣, 贾福星, 王玲, 等. 鲨鱼软骨制剂抑制血管生成的研究. *生物化学与生物物理进展*, 1997, 24(2): 155.

收稿日期: 2000- 04- 07