

枸杞多糖对肝癌模型小鼠肿瘤抑制与免疫功能的影响^Δ

肖佩玉^{1*}, 万正兰², 黄际薇^{1#}(1.中山大学附属第三医院药剂科, 广州 510630; 2.中山大学附属第五医院药学部, 广东珠海 510630)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4046-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.05

摘要 目的:研究枸杞多糖对肝癌模型小鼠肿瘤抑制与免疫功能的影响。方法:于小鼠腋窝皮下接种H22瘤株以复制小鼠肝癌模型。20只KM小鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、环磷酰胺(20 mg/kg)组、枸杞多糖(5 mg/kg)组,灌胃给药,每天1次,连续10 d。测定小鼠体质量、抑瘤率、血清肿瘤标记物、炎症因子水平。结果:与正常对照组比较,模型组小鼠至给药第5天起体质量减少,给药10 d后瘤质量增加,小鼠血清甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、肿瘤坏死因子(TNF)- α 含量增加,自然杀伤(NK)细胞活性减弱,铁蛋白(SF)、白细胞介素(IL)-2、 γ 干扰素(INF- γ)含量减少;与模型组比较,枸杞多糖组小鼠至给药第5天起体质量增加,给药10 d后瘤质量减少,AFP、CEA、TNF- α 含量减少,NK细胞活性增强,SF、IL-2、INF- γ 含量增加。结论:枸杞多糖能有效抑制H22肝癌模型小鼠癌细胞的生长,并能改善机体免疫水平。

关键词 枸杞多糖;肝癌;免疫功能

Effects of *Lycium chinensis* Polysaccharides on Tumor Suppression and Immune Function of Liver Cancer Model Mice

XIAO Pei-yu¹, WAN Zheng-lan², HUANG Ji-wei¹ (1.Dept. of Pharmacy, The Third Affiliated Hospital of Sun Yet-san University, Guangzhou 510630, China; 2.Dept. of Pharmacy, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yet-san University, Guangdong Zhuhai 510630, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effect of *Lycium chinensis* polysaccharides on tumor suppression and immune function of liver cancer model mice. **METHODS:** Liver cancer model was induced by intraperitoneal injection of H22 tumor cell. 40 KM mice were randomly divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), cyclophosphamide group (i.p., 20 mg/kg), and *L. chinensis* polysaccharides group (5 mg/kg). They were given relevant medicine once a day for consecutive 10 days. The body weight, inhibition rate, serum tumor markers and inflammatory cytokines levels of each group were determined. **RESULTS:** Compared with normal control group, the body weight of mice was decreased in model group since fifth day of medication; tumor weight, the levels of AFP and CEA, TNF- α content were increased while the levels of SF, NK activity, IL-2 and INF- γ were decreased. Compared with model group, the body weight of mice was increased in *L. chinensis* polysaccharides group since fifth day of medication; tumor weight, the levels of AFP and CEA, TNF- α content were decreased while the levels of SF, NK activity, IL-2 and INF- γ were increased. **CONCLUSIONS:** *L. chinensis* polysaccharides can inhibit the growth of cancer cells in mice with H22 liver cancer, and can improve the body's immune level.

KEYWORDS *Lycium chinensis* polysaccharides; Liver cancer; Immune function

原发性肝癌炎症危害人类生命健康,我国是肝癌高发地区,每年死于肝癌的患者超过11万^[1]。由于该疾病早期临床症状不典型,患者发现时大多数已属晚期,失去了手术治疗最佳时机,因此患者病死率极高,预后效果较差^[2]。晚期肝癌患者临床常用的治疗方法为放疗,但放疗的毒副作用较大,导致部分患者不耐受而影响治疗效果。枸杞多糖是从枸杞子中提炼出来的蛋白多糖,近代药理学研究指出,枸杞多糖具有抗基因突变、抗肿瘤、调节机体免疫力、抵抗病毒及感染等多种生物活性功能^[3]。枸杞多糖不仅能直接杀死肿瘤细胞,同时可与中间宿主产生生物学效应,通过多途径作用于免疫细胞,增

加抗体分泌,提高机体免疫功能,从而起到杀灭及抑制肿瘤细胞的作用^[3]。为此,本研究通过复制H22肝癌小鼠模型,以探讨枸杞多糖抑制肿瘤与提高机体免疫力的作用。

1 材料

1.1 仪器

BLXK-JA3003B型电子天平(上海鑫仓电子科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

枸杞多糖(西安森冉生物工程有限公司,批号:20081201,含量:>30%);环磷酰胺(山西普德药业有限公司,批号:20090103);甲胎蛋白(AFP)测试盒(北京倍爱康生物技术股份有限公司);铁蛋白(SF)、癌胚抗原(CEA)测试盒(天津中新科炬生物制药有限公司);白细胞介素(IL)-2、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、 γ 干扰素(INF- γ)酶联免疫(ELISA)测试盒均购于上

^Δ 基金项目:广州市科技计划项目(No.2012J4300071)

* 主管药师。研究方向:医院药学。研究方向:E-mail:xiaopeiy@163.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:医院药学。电话:025-85088970

海森雄科技实业有限公司。

1.3 动物与瘤株

KM小鼠20只,6~8周,♀♂兼用,体质量15~20g,由广州中医药大学动物研究中心提供[实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2013-0085]。H22瘤细胞株由北京康为世纪生物科技有限公司提供。

2 方法

2.1 模型的复制

将经三代细胞传代培养的H22瘤株经腹腔接种到KM小鼠体内,并于接种后7d选择腹水饱满、精神状态良好的小鼠采用颈椎脱臼处死,消毒腹腔部位后抽取小鼠腹部乳白色腹水作为肿瘤源,并用无菌生理盐水将肿瘤细胞悬液稀释为原来的3倍,经常规消毒后将0.2ml悬液皮下接种于小鼠右前肢腋窝,以复制小鼠肝癌模型。

2.2 分组与给药

20只KM小鼠随机均分为4组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、环磷酰胺(20mg/kg)组、枸杞多糖(5mg/kg)组。ig给药,每天1次,连续10d。

2.3 指标的检测

2.3.1 体质量的称定 每天上午8:00~10:00称取小鼠去除瘤体后的纯体质量。

2.3.2 抑瘤率的计算 称定肿瘤质量,并根据公式计算抑瘤率:抑瘤率(%)=[1-(用药组平均瘤质量/模型组平均瘤质量)]×100%。

2.3.3 血清肿瘤标记物的测定 空腹静脉抽取小鼠血液3ml,常规离心得血清,采用ELISA法测定血清肿瘤标记物。

2.3.4 炎症因子的测定 空腹静脉抽取小鼠血液3ml,常规离心得血清,采用ELISA法测定小鼠血清IL-2、TNF-α、INF-γ含量。

2.3.5 自然杀伤(NK)细胞活性的测定 采用MTT法测定NK细胞活性。NK细胞活性(%)=[靶细胞吸光度-(用药组吸光度-效应细胞吸光度)]/靶细胞吸光度×100%。其中,效应细胞为脱颈椎处死小鼠去脾脏研磨制成单细胞悬液,经200目筛网滤过,Hanks液洗3次,用RPMI1640培养液制成细胞悬液,用台酚蓝染色计数活细胞数在95%以上,并调整细胞密度为5×10⁶ ml⁻¹;靶细胞为将连续传代培养的胞株为靶细胞,活细胞数在95%以上、细胞密度调为2.5×10⁵ ml⁻¹。

2.4 统计学方法

采用SPSS18.0软件处理分析实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 枸杞多糖对模型小鼠体质量的影响

给药第5、10天,与正常对照组比较,模型组小鼠体质量减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,枸杞多糖组小鼠体质量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。枸杞多糖对

模型小鼠体质量的影响见表1。

表1 枸杞多糖对模型小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of *L. chinensis* polysaccharides on body weight in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	第1天	第5天	第10天
正常对照组	5	19.63±1.21	22.32±1.58	25.32±2.59
模型组	5	19.21±1.45	16.89±1.65*	14.26±3.12*
枸杞多糖组	5	19.25±1.08	22.36±1.75*	24.39±2.78*
环磷酰胺组	5	18.98±1.32	20.69±1.89*	18.98±3.12*

与正常对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: * $P < 0.05$

vs.normal control group: * $P < 0.05$;vs.model group: * $P < 0.05$

3.2 枸杞多糖对模型小鼠抑瘤率的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠瘤质量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,枸杞多糖组小鼠瘤质量减少(抑瘤率为62.98%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。枸杞多糖对模型小鼠抑瘤率的影响见表2。

表2 枸杞多糖对模型小鼠抑瘤率的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of *L. chinensis* polysaccharides on tumor inhibition rate in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	平均瘤质量,g	抑瘤率,%
正常对照组	5	0	
模型组	5	3.648±0.185*	
枸杞多糖组	5	0.896±0.245*	62.98
环磷酰胺组	5	0.842±0.312*	52.98

与正常对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: * $P < 0.05$

vs.normal control group: * $P < 0.05$;vs.model group: * $P < 0.05$

3.3 枸杞多糖对模型小鼠血清肿瘤标记物水平的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠血清AFP、CEA含量增加,SF含量减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,枸杞多糖组小鼠血清AFP、CEA含量减少,SF含量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。枸杞多糖对模型小鼠血清肿瘤标记物水平的影响见表3。

表3 枸杞多糖对模型小鼠血清肿瘤标记物水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of *L. chinensis* polysaccharides on serum tumor markers in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AFP, μg/L	SF, μg/L	CEA, μg/L
正常对照组	5	42.36±22.21	86.32±31.21	4.62±2.78
模型组	5	786.32±215.60*	68.52±42.53*	12.82±3.12*
枸杞多糖组	5	75.22±145.28*	95.62±21.32*	4.46±1.62*
环磷酰胺组	5	289.6±18.96*	225.62±38.96*	7.15±2.12*

与正常对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: * $P < 0.05$

vs.normal control group: * $P < 0.05$;vs.model group: * $P < 0.05$

3.4 枸杞多糖对模型小鼠血清细胞因子水平的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠血清IL-2、IFN-γ含量减少,TNF-α含量增加,NK细胞活性减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,枸杞多糖组小鼠血清IL-2、IFN-γ含量增加,TNF-α含量减少,NK细胞活性增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。枸杞多糖对模型小鼠血清细胞因子水平的影响

见表4。

表4 枸杞多糖对模型小鼠血清细胞因子水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Effects of *L. chinensis* polysaccharides on inflammatory cytokines levels in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-2, mmol/L	IFN- γ , mmol/L	NK细胞活性, %	TNF- α , mmol/L
正常对照组	5	112.3 \pm 5.02	50.96 \pm 10.45	51.69 \pm 5.12	205.6 \pm 61.2
模型组	5	38.21 \pm 8.63*	20.52 \pm 8.63*	18.89 \pm 7.45*	458.5 \pm 58.5*
枸杞多糖组	5	109.60 \pm 3.92	50.32 \pm 10.22 [#]	41.52 \pm 7.85 [#]	263.3 \pm 31.5 [#]
环磷酸胺组	5	50.32 \pm 4.02 [#]	24.12 \pm 9.63 [#]	23.65 \pm 5.26 [#]	396.3 \pm 28.7 [#]

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

vs. normal control group: * $P < 0.05$; vs. model group: [#] $P < 0.05$

4 讨论

肿瘤的发生及发展是非常复杂的过程,目前关于肿瘤的作用机制还有待进一步研究,但已有研究指出,肿瘤的发生、进展、预后与机体免疫状况有密切关系,肿瘤患者普遍存在免疫功能低下的情况^[4]。机体免疫状况对对抗肿瘤侵袭、抑制肿瘤生长具有重要意义。

枸杞多糖是从植物枸杞子中提炼的活性成分,相关研究表明,其具有抗病毒、调节机体免疫、抗肿瘤、降血糖血脂、清除机体自由基与延缓衰老等功能^[5]。枸杞多糖对机体免疫功能的调节,能通过中间宿主产生生物学效应而起到间接抑制或杀伤肿瘤的目的^[6]。枸杞多糖可通过多层面及多途径调节机体免疫系统,从而激活巨噬细胞、T淋巴细胞、树突状细胞等免疫细胞而起到免疫调节功能。此外,枸杞多糖能通过刺激NK细胞大量分泌IFN- γ ,增加巨噬细胞免疫杀伤功能,调节机体免疫系统,增强机体抗肿瘤作用^[7-8]。

本研究中对H22肝癌小鼠ig枸杞多糖,通过研究发现,枸杞多糖具有明显抑制肿瘤的作用。枸杞多糖组小鼠平均瘤质量低于模型组,而抑瘤率则高于环磷酸胺组,环磷酸胺作为广谱抗癌药物具有较强的抑制肿瘤作用,但其在杀伤癌细胞的同时也会对机体正常细胞产生较大的损害作用,增加患者不良反应率。蒋艳等^[9]研究指出,通过检查肿瘤血清标记物可以有效评价药物抑瘤作用。CEA是由肠黏膜释放的,进入循环后其将会被肝脏吸收并分解,当肝脏受损时,CEA的分解能力将受到影响,从而导致血液中CEA的水平上升^[10]。SF是血清中的铁蛋白质,其生成及合成是由肝脏细胞生成的,当肝脏细胞受损时,会导致铁蛋白的合成受阻,使得血液中SF含量升高。AFP是肝组织出现大规模坏死时释放到血清中的物质,因此通过对三种标记物进行测定能有效预测肝癌的进展程度。本研究枸杞多糖组小鼠血清AFP、CEA低于模型组,而SF高于模型组,从而说明枸杞多糖能有效抑制肿瘤生长。邓自辉等^[11]研究认为,肿瘤的发生与机体免疫力失衡有关,通过增强机体免疫力可有效抵抗肿瘤。本研究枸杞多糖组NK细胞

活性、IL-2、INF- γ 含量高于环磷酸胺组,而TNF- α 含量低于环磷酸胺组,差异有统计学意义($P < 0.05$),其结果与杨书良等^[12]报导一致。原因可能与枸杞多糖如下作用机制有关:(1)增加T淋巴细胞及淋巴细菌亚群,增强淋巴细胞转化率。(2)通过调节小鼠巨噬细胞,释放可溶性因素及抗原从而起到抑制肿瘤的作用。(3)枸杞多糖刺激NK细胞释放,增加NK细胞杀伤肿瘤活性,溶解肿瘤细胞,增加白细胞,降低IL,诱导干扰素生成,促进肿瘤细胞与巨噬细胞结合,从而产生特异性免疫杀伤肿瘤细胞,起到抑制肿瘤的作用。

参考文献

- [1] 张鸣号,王秀玉,王秀梅,等.枸杞多糖对小鼠移植性肝癌抑制作用的实验研究[J].中草药,2012,(6):1142.
- [2] 周爱国,李小兰.枸杞多糖对大鼠小肠缺血再灌注氧化应激的抑制作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(22):221.
- [3] 郝习,赵明耀,杨红艳,等.枸杞多糖对荷H22肝腹水瘤小鼠免疫功能的影响[J].郑州大学学报:医学版,2011,46(2):242.
- [4] 余燕玲,何彦丽,杜标炎,等.枸杞多糖联合趋化因子对肝癌小鼠T辅助淋巴细胞分化的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(7):208.
- [5] 刘静.枸杞多糖对小鼠移植性肝癌抑制作用的实验研究[J].陕西中医,2013,34(8):1079.
- [6] 成日华,李焕德.枸杞多糖抗肿瘤机制研究进展[J].中南药学,2011,9(12):921.
- [7] 郝习,赵明耀,董子明,等.灵芝多糖和枸杞多糖联合应用对荷瘤小鼠抗肿瘤活性和免疫功能的影响[J].中医研究,2011,24(5):33.
- [8] 张鸣号,王秀玉,王秀梅,等.枸杞多糖对小鼠移植性肝癌端粒酶活性及hTERT蛋白表达的影响[J].时珍国医国药,2012,23(10):2438.
- [9] 蒋艳,姜孝新.枸杞多糖对肝癌Hca-F荷瘤小鼠的抗肿瘤作用及其机制[J].肿瘤药学,2011,01(4):391-394.
- [10] 章培军,邢雁霞,刘斌钰,等.枸杞多糖对实验性肝损伤保护作用的研究[J].中国药物与临床,2011,11(11):1286.
- [11] 邓自辉,牛阳,王荣,等.枸杞多糖药理作用的研究现状[J].临床合理用药杂志,2011,04(35):164.
- [12] 杨书良,郝玉栓,单铁英,等.口服枸杞多糖对实验性食管癌大鼠免疫功能影响的研究[J].中国实验诊断学,2012,16(6):986.

(收稿日期:2014-04-14 修回日期:2014-07-29)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅