

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0129-02

芦荟对 S180 荷瘤小鼠的抑瘤作用

许国战¹, 刘莉杰², 王典瑞¹, 梁兆祥¹(1. 第四军医大学吉林军医学院病原教研室, 吉林 132013; 2. 北华大学吉林医学院, 吉林 132023)

芦荟含有多种抗癌成分,同时,芦荟对免疫系统有刺激活性^[1]。本研究应用芦荟浸出液,观察了其对 S180 荷瘤小鼠的免疫增强作用及抑瘤效应。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

昆明种小鼠、雄性、体重 22 ± 2.0 g(白求恩医科大学实验动物中心提供);S180 肉瘤株,YAC-1 瘤株(由白求恩医科大学免疫教研室提供);MTT(华美生物工程公司产品);ConA、EMDM(美国 Sigma 公司产品);环磷酸胺(上海华联制药有限公司产品)。

1.2 芦荟浸出液的制备

取中国芦荟鲜叶,经挤压抽提新鲜叶汁而成。

1.3 荷瘤小鼠的治疗

随机将 30 只小鼠平均分为 3 组,即芦荟组、环磷酸胺组、生理盐水组。在小鼠左前肢腋窝皮下注射 S180 肉瘤细胞悬液 0.2 ml(2×10^7 细胞/ml),制备 S180 荷瘤小鼠模型。3 d 后开始灌胃给药,芦荟组灌服芦荟液 20 mg/kg,环磷酸胺组灌服环磷酸胺 80 mg/kg,生理盐水组灌服生理盐水 20 mg/kg。每日 1 次,连续 7 d。8 d 后处死小鼠,称量体重,取瘤称重,取脾脏进行免疫功能检测。

1.4 T 淋巴细胞增殖试验

无菌取小鼠脾脏制备细胞悬液(5×10^6 细胞/ml),加入 96 孔培养板中,每孔 $100 \mu\text{l}$,实验孔加 ConA $100 \mu\text{l}$ (终浓度 $5 \mu\text{g/ml}$)。对照孔中加入培养液 $100 \mu\text{l}$,均设 3 复孔置 5% CO_2 孵箱, 37°C 培养 $18 \sim 22$ h,每孔加入 MTT 溶液 $20 \mu\text{l}$ (5 mg/ml),继续培养 $24 \sim 26$ h,每孔加入酸化异丙醇 $100 \mu\text{l}$ (0.04 mol/L, NH_4 -异丙醇)充分震荡后静置 20 min,检测波长 570 nm,参考波长 630 nm,比色分析,用 OD $570 \sim 630$ nm 代表淋巴细胞增殖反应程度。

1.5 NK 细胞毒活性检测^[2-3]

无菌取小鼠脾脏制备细胞悬液,调整细胞浓度至 2×10^7 细胞/ml,为效应细胞。离心,洗涤,培养瓶中的 YAC-1 细胞调整细胞浓度至 2×10^5 细胞/ml,为靶细胞。取效应细胞 $100 \mu\text{l}$ 加入 96 孔培养板 6 个复孔。3

个复孔各加入靶细胞 $100 \mu\text{l}$,3 个复孔未加入靶细胞为效应细胞对照孔。另取 $100 \mu\text{l}$ 靶细胞悬液加入 96 孔培养板中 3 复孔为靶细胞对照孔。将培养板置于 5% CO_2 孵箱内,培养 20 h 后,每孔加入 MTT 溶液 $20 \mu\text{l}$ 继续培养 4 h,再加入酸化异丙醇 $100 \mu\text{l}$,充分震荡 20 min,用酶标仪 540 nm 波长测定吸光度(A 值)。计算 NK 细胞毒活性,以 A 值的 $\bar{x} \pm s$ 表示。细胞毒活性 = $[1 - (\text{实验孔 A 值} - \text{效应细胞对照孔 A 值}) / \text{靶细胞对照孔 A 值}] \times 100\%$ 。

2 结果与讨论

在正常情况下,肿瘤与机体防御之间处于平衡状态,肿瘤的发生、增殖与转移,是多种机制造成的,其中这种动态平衡状态失调也很重要。如果将失衡状态人为地调整至正常水平,则可抑制肿瘤生长,甚至使其消退。肿瘤患者免疫功能已失去平衡,肿瘤晚期机体的免疫反应几乎都被抑制,应用化学药物治疗,在杀伤肿瘤细胞的同时亦抑制或损害了机体的免疫功能。本实验用芦荟作为生物应答调节剂(BRM),治疗了 S180 荷瘤小鼠,从表 1 可见,芦荟浸出液对肿瘤的生长具有明显抑制作用,与生理盐水组相比具有非常显著差异($P < 0.01$)。对经治疗小鼠 T 细胞增殖反应及 NK 毒活性的检测显示,两者均有不同程度的增强(见表 2),表明芦荟浸出液对荷瘤小鼠的免疫功能有一定增强作用。环磷酸胺虽具有较强的抑瘤作用,但有使小鼠免疫功能降低或抑制作用。实验结果表明芦荟具有提高机体免疫功能及抑制恶性肿瘤的作用,为进一步研究应用芦荟抗癌提供了参考。

表 1 各组小鼠 S180 瘤重测定结果

组别	小鼠体重(g) 开始/结束(\bar{x})	瘤重(g) ($\bar{x} \pm s$)
芦荟组	21.8/25.25	$1.43 \pm 0.6^*$
环磷酸胺	21.62/25.12	$1.14 \pm 0.71^*$
生理盐水	22.50/26.00	3.43 ± 0.76

* 与生理盐水组比较 $t = 2.29 \sim 2.37$, $P < 0.01$

表2 各组小鼠免疫功能测定结果

组别	T淋巴细胞增殖反应(A)	NK细胞毒活性(%)
芦荟组	0.85 ± 0.04*	71.15 ± 5.50*
环磷酰胺组	0.58 ± 0.06	44.87 ± 5.29*
生理盐水组	0.72 ± 0.05	50.03 ± 6.12

* 与生理盐水组比较 $t = 7.65 \sim 14.81$ $P < 0.01$

[关键词] 芦荟; S180肉瘤; 环磷酰胺; 免疫功能; 抑瘤作用

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0130-01

mdr1 基因转染小鼠骨髓细胞在化疗中药物耐受量的研究

康 权, 金先庆, 李英存, 王珊, 许嘉陵 (重庆医科大学儿童医院普外科, 重庆 400014)

肿瘤细胞对抗癌药物多药耐药性的产生及化疗中出现的骨髓抑制是目前临床治疗恶性肿瘤面临的主要问题。多药耐药基因(mdr1)编码产生的相对分子量为170 kD的跨膜蛋白(P-gp), 可将多种化疗药物排出细胞外, 从而避免药物对细胞的损害。正常骨髓造血干细胞mdr1基因表达水平极低, 故化疗中易产生骨髓抑制。本研究旨在探讨将已转染mdr1基因的小鼠骨髓细胞回输入同种小鼠体内后, 受体鼠对化疗药物骨髓毒性的耐受性有无增强, 从基因水平寻找一种解决化疗中骨髓抑制的措施。

我们采用含人全长mdr1基因cDNA的质粒pHamdr1/A, 通过逆转录病毒介导, 采用浓缩病毒上清转染法成功地将mdr1基因导入BALB/c小鼠骨髓细胞中, 通过PCR、免疫组化及柔红霉素排泄实验等方法从基因水平、蛋白质水平及细胞水平证实了转染mdr1基因的骨髓细胞在体外具有持续、稳定、有效的P-gp表达。转染率达到35%。

实验小鼠共25只, 随机分组法分为2组, 其中对照组10只, 实验组15只。经亚致死剂量⁶⁰Co-γ射线照射后(剂量为0.3 Gy/min, 照射剂量为1.5 Gy), 按程序性骨髓移植方法建立转基因鼠骨髓移植模型。(骨髓移植细胞数 1×10^6 /次)

实验组小鼠共15只, 腹腔注入紫杉醇(taxol), 剂量由22 mg/kg开始(正常小鼠肿瘤治疗剂量为6~8 mg/kg), 每周化疗1次, 每次增加8 mg/kg, 如有明显耐受, 则改为环磷酰胺(CTX), 由200 mg/kg开始(正常小鼠肿瘤治疗剂量为100~200 mg/kg), 每周化疗1次, 每次增加200 mg/kg。每次化疗时设5只正常的只接受相同剂量化疗的对照鼠。15只实验

[中图分类号] R979.1 [文献标识码] A

[参考文献]

[1] 许国战, 王典瑞, 姚敏捷, 等. 芦荟对小鼠免疫功能的影响的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2002, 27(6): 383.
 [2] 孙淑芬, 曾艳, 赵维诚. 独角莲抑制恶性肿瘤的实验研究[J]. 中医研究, 1998, 12(11): 8.
 [3] 杨金明, 郭红梅, 陈霞, 等. 黄芪对S180荷瘤小鼠的免疫增强及抑瘤作用[J]. 中国实验免疫学杂志, 1995, 7(1): 42.
 [收稿日期] 2002-01-20 [修回日期] 2002-04-02

组小鼠经taxol化疗4次, 剂量达46 mg/kg时仅死亡4只, 而对照组小鼠在22 mg/kg时即死亡4只, 30 mg/kg时全部死亡。换用CTX后, 对照组小鼠在600 mg/kg时即全部死亡, 统计分析显示, 实验组与对照组小鼠存活率之间比较, 实验组小鼠明显高于对照组, Fisher精确概率分析显示 $P = 1.05E-04$, $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$, 证明2组小鼠存活率比较具有显著性差异。

部分实验组存活小鼠常规方法取骨髓细胞后, PCR证实植入受体鼠内的细胞可检测到mdr1基因整合及表达, 免疫组化测得骨髓中定植的mdr1基因阳性表达的细胞为8%, 而对照mdr1基因阴性的回输定植细胞P-gp阳性率为零。柔红霉素排泄试验证实体内mdr1阳性表达细胞的DNR阳性率为79.75%, 而对照组小鼠骨髓细胞中DNR阳性率为98.50%。统计学显示 $P < 0.05$, 2组小鼠体内DNR表达的差异具有显著性。我们的研究表明, 体内含有mdr1阳性表达基因骨髓细胞的小鼠对化疗药物的耐受性远远高于对照组mdr1基因阴性表达的小鼠, 且通过PCR、免疫组化及柔红霉素排泄实验等方法从基因水平、蛋白质水平及细胞水平证实了转染mdr1基因的骨髓细胞在体内外具有持续、稳定、有效的P-gp表达。从而在动物水平证实了通过mdr1基因转染在体内保护骨髓细胞的可行性。

[关键词] 多药耐药基因; 骨髓移植; 转染; 小鼠骨髓单个核细胞

[中图分类号] R730.53 [文献标识码] D

[收稿日期] 2001-10-08 [修回日期] 2002-02-05