

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2003 )02-0101-04

## 无细胞短棒状杆菌纳米级制剂抗肿瘤作用及机理研究

高尚先<sup>1</sup>, 宋 静<sup>2</sup>, 刘星霞<sup>2</sup>, 康国华<sup>1</sup>, 王 群<sup>2</sup>, 张 萍<sup>2</sup>, 李 伟<sup>2</sup>, 张利宁<sup>2</sup>, 李守悌<sup>1</sup>( 1. 中国药品生物制品检定所培养基室, 北京 100050; 2. 山东大学免疫学研究所, 济南 250012 )

[ 摘 要 ] **目的:** 研究无细胞短棒状杆菌纳米级制剂( NCPP )体内抗肿瘤作用及机理。**方法:** 小鼠腹腔注射 NCPP 与短棒状杆菌制剂( CPP )14 d 后测定脾指数。小鼠腹腔注射艾氏腹水癌细胞, 于注射癌细胞前 1 d 及注射后次日日起, 连续( 间隔 1 d )腹腔注射 NCPP 与 CPP 5 次, 计算小鼠存活率。小鼠腹腔注射 NCPP 和 CPP 10 d 后测定腹腔巨噬细胞( M $\phi$  )吞噬率、吞噬指数、过氧化氢( H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> )和一氧化氮( NO )水平、脾脏自然杀伤( NK )细胞杀伤率及 T 细胞增殖指数。**结果:** NCPP 组和 CPP 组与对照组相比: 均有明显的抑瘤作用; 脾指数均大于 2.0; 腹腔 M $\phi$  吞噬率、吞噬指数、产生过氧化氢( H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> )和一氧化氮( NO )水平均有显著性提高(  $P < 0.01$  ); 脾脏 NK 细胞杀伤率均有明显提高(  $P < 0.05$  ); 脾脏 T 细胞增殖指数均无明显差异。上述所有实验中, NCPP 和 CPP 2 组间均无明显差异。**结论:** NCPP 具有与 CPP 相同的脾激活及抑瘤作用, 其机理主要是通过激活 M $\phi$  及 NK 细胞吞噬、杀伤功能所致。

[ 关键词 ] 短棒状杆菌; 免疫调节剂; 巨噬细胞; 纳米技术

[ 中图分类号 ] R730.5 [ 文献标识码 ] A

## Anti-Tumor Effects and Mechanism of the Product from *Corynebacterium Parvum* at Nano Scale ( NCPP )

GAO Shang-xian<sup>1</sup>, SONG Jing<sup>2</sup>, LIU Xing-xia<sup>2</sup>, KANG Guo-hua<sup>1</sup>, WANG Qun<sup>2</sup>, ZHANG Ping<sup>2</sup>, LI Wei<sup>2</sup>, ZHANG Li-ning<sup>2</sup>, LI Shou-ti<sup>1</sup>( 1. Department of Medium, National Institute for the Control of Pharmaceutical & Biological Products, Beijing 100050, China; 2. Institute of Immunology, Shandong University, Jinan 250012, China )

[ **Abstract** ] **Objective:** To investigate the *in vivo* anti-tumor effect and its mechanism of NCPP. **Methods:** Ehrlich's ascites carcinoma cells were injected into the peritoneal cavity of mice. On the day before the injection and then, every other day, NCPP and *Corynebacterium Parvum*( CPP ) were given in the same way, total 5 times. The survival rates of the tumor-carrying mice were analyzed. 10 days after the injection of NCPP and CPP, data were collected, including the phagocytic index and its rate of the macrophages, the level of the hydrogen peroxide and nitric oxide produced by the macrophages, splenic natural killing ( NK ) cell's activity, and the proliferation of T cells. And splenic index was evaluated on the 14th day after the injection of NCPP and CPP. **Results:** Compared with the control group, the survival rates of tumor-bearing mice were significantly increased in both NCPP and CPP groups; NCPP and CPP groups induced higher levels of splenic index (  $>2$  in average ); higher levels of macrophage activity (  $P < 0.01$  ), and splenic NK cell activity (  $P < 0.05$  ), However, there was no difference in all the parameters mentioned as above between NCPP group and CPP group. **Conclusions:** This study shows that NCPP plays the same role as CPP in the tumor inhibition and splenic stimulation, mainly through the activating macrophage and NK cells.

[ **Key words** ] *corynebacterium parvum*; biological response modifier; macrophage; nano scale technology

\* 短棒状杆菌( *corynebacterium parvum*, CP )制剂( CPP )是一种非特异性免疫增强剂, 它是用从健康人骨髓中分离的一种厌氧革兰氏阳性杆菌经甲醛灭活制成的死菌苗<sup>[1]</sup>。CPP 促进机体免疫反应和抗肿瘤疗效已被许多实验及临床研究所证实, 尤其在消退癌性胸

[ 作者简介 ] 高尚先( 1957- ), 男, 山东青岛人, 副研究员, 硕士, 主要从事抗肿瘤、抗微生物免疫制剂方面的研究。  
E-mail: gaoshangxian@yahoo.com.cn

水方面具有独特疗效<sup>[2,5]</sup>。CPP 抗肿瘤作用主要是通过单核巨噬细胞系统强大而持久的刺激,引起 M $\phi$  增生、活化、吞噬功能增强及诱导分泌肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、干扰素(IFN- $\gamma$ )、白细胞介素(IL-2)、活性氧(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO)等癌细胞杀伤因子及增强 NK 细胞杀伤活性,达到抑制和杀伤肿瘤细胞的目的<sup>[6,8]</sup>。分子免疫学的进展加深了人们对免疫系统抗肿瘤功能及免疫治疗作用重要性的认识。目前, CPP 可以说是激活 M $\phi$  活性最好的制剂之一,但副作用较大限制了其临床应用<sup>[5,9-12]</sup>。若能利用现代高科技手段制备出疗效好、副作用低的新制剂,将有着重要的应用价值。为此,我们在对 CP 进行深入研究的基础上,利用先进的纳米技术,制备出了无细胞短棒状杆菌纳米级制剂(NCPP),并对其抗肿瘤作用及机理的研究,报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、细胞株及主要试剂

615 和 BALB/c 小鼠分别由中国药品生物制品检定所实验动物中心及山东大学实验动物中心提供;艾氏腹水癌细胞株由中国药品生物制品检定所药理学室提供;YAC-1 细胞系(小鼠淋巴瘤)为山东大学免疫学研究所保存菌株。RPMI-1640 培养基购自 GIBCO 公司;硫乙醇酸盐培养基(不含琼脂)由北京三药科技开发公司提供;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 检测试剂盒及 NO 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;MTT(四甲基偶氮唑盐);DMSO(二甲基亚砷)购自济南爱博生物工程公司, CPP 购自卫生部长春生物制品研究所;NCPP 由中国药品生物制品检定所培养基室研制。

### 1.2 NCPP 的制备

主要步骤为:启开 CP 菌种,接种硫乙醇酸盐培养基(不含琼脂),连续 2~4 次传代,接种于大瓶,于 36℃~37℃ 厌氧培养 5~7 d。收集菌体加热灭活,用超高压射流对撞机破碎 CP,高速离心收集沉淀,分装即得纳米级 NCPP(见图 1,2)。

### 1.3 脾激活及抑瘤试验

纯种 615 小鼠,18~20 g,雌雄各半,随机分为 3 组(NCPP 组、CPP 组及对照组),每组 10 只,以 NCPP 1 mg/ml 等同于 CPP 含菌 6.0 × 10<sup>9</sup>/ml 计,进行脾指数测定及抑瘤试验,试验组:脾指数应不低于 2.0,小鼠存活率应不低于 70%。具体方法见文献[1]。

### 1.4 小鼠腹腔 M $\phi$ 免疫活性、NK 细胞杀伤活性及 T 细胞增殖活性测定

将 BALB/c 小鼠,18~20g,雌雄各半,随机分为 3 组(NCPP 组、CPP 组及对照组),每组 12 只,以 NCPP 1 mg/ml 等同于 CPP 含菌 6.0 × 10<sup>9</sup>/ml 计。于试验第 1

天腹腔注射:NCPP 组每只每次注射 0.5 mg, CPP 组每只每次注射 3 × 10<sup>9</sup> mg,对照组生理盐水(NS)每只每次注射 0.1 ml。第 7 天重复注射,第 10 天进行腹腔 M $\phi$  免疫活性测定、NK 细胞杀伤活性测定及 T 细胞增殖活性的测定。

图 1 CPP 的电镜照片(×8000 为 CP 完整菌体)

Fig. 1 Observation of CPP under electron microscope (×8000)

图 2 NCPP 的电镜照片(×30K 为纳米级颗粒物)

Fig. 2 Observation of NCPP under electron microscope (×30K)

1.4.1 腹腔 M $\phi$  吞噬功能测定

采用体内法,方法见文献[ 13 ]。

1.4.2 腹腔 M $\phi$  的培养 按文献[ 13 ]方法培养小鼠腹腔 M $\phi$ ,用于 M $\phi$  产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 NO 含量测定。

1.4.3 腹腔 M $\phi$  产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量测定

按 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 试剂盒说明书进行。

1.4.4 腹腔 M $\phi$  产生 NO 含量测定

按 NO 检测试剂盒(化学法)说明书进行。

1.4.5 NK 细胞杀伤活性测定

取经上述处理第 10 天的小鼠脾脏制备效应细胞进行试验,方法见文献[ 13 ]。

1.4.6 T 细胞增殖活性的测定

取经上述处理第 10 天的小鼠脾脏制备细胞悬液进行试验,方法见文献[ 13 ]。

1.5 统计学处理

差异显著性检验采用 *t* 检验、单因素方差分析和 Kruskal-Wallis 秩和检验。

2 结果

2.1 NCPP 与 CPP 对小鼠对脾脏的激活作用

NCPP 和 CPP 对小鼠脾脏均有明显的激活作用,2 组脾指数均大于 2.0(见表 1)。

2.2 NCPP 与 CPP 对小鼠艾氏腹水瘤的抑瘤作用

NCPP 与 CPP 对小鼠艾氏腹水瘤均有明显的抑瘤作用,2 组小鼠存活率均大于 70%(见表 1)。

表 1 NCPP 与 CPP 脾激活及抑瘤作用

Tab.1 Splenic activation and tumor suppression induced by NCPP and CPP

Groups( <i>n</i> )	Splenic index	Survival rate( % )
Control( 10 )	1.0	0
NCPP( 10 )	2.4	80
CPP( 10 )	2.3	80

2.3 NCPP 与 CPP 对小鼠腹腔 M $\phi$  吞噬功能的影响

NCPP 和 CPP 可明显增强小鼠腹腔 M $\phi$  的吞噬功能,两组与对照组相比,吞噬率(单因素方差分析)和吞噬指数( Kruskal-Wallis 秩和检验)均有显著性差异( *P* < 0.01 ),2 组之间无明显差异(见表 2)。

2.4 NCPP 与 CPP 对小鼠腹腔 M $\phi$  产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 NO 的影响

NCPP 和 CPP 可明显增强小鼠腹腔 M $\phi$  产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 NO 的水平,两组与对照组相比,均有显著性差异( *P* < 0.01 ),两组之间无明显差异(见表 3)。

表 2 NCPP 与 CPP 对小鼠腹腔 M $\phi$  吞噬功能的影响

Tab.2 Effects of NCPP and CPP on the phagocytosis of macrophages

Groups( <i>n</i> )	Phagocytic rate( % ) $\bar{x} \pm s$	Phagocytic index ( $\bar{x} \pm s$ )
Control( 12 )	36.00 $\pm$ 10.55	1.83 $\pm$ 0.14
NCPP( 12 )	67.30 $\pm$ 7.60*	2.72 $\pm$ 0.63*
CPP( 12 )	66.63 $\pm$ 10.57*	2.41 $\pm$ 0.41*

\* *P* < 0.01, compared with control

表 3 NCPP 和 CPP 对小鼠腹腔 M $\phi$  产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 NO 的影响

Tab.3 Influence of NCPP and CPP on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO produced by macrophages

Groups( <i>n</i> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\mu$ mol/L ) ( $\bar{x} \pm s$ )	NO( $\mu$ mol/L ) ( $\bar{x} \pm s$ )
Control( 12 )	11.71 $\pm$ 1.28	16.65 $\pm$ 5.95
NCPP( 12 )	20.92 $\pm$ 2.04*	78.12 $\pm$ 17.64*
CPP( 12 )	19.35 $\pm$ 1.85*	55.57 $\pm$ 10.63*

\* *P* < 0.01, compared with control

2.5 NCPP 与 CPP 对小鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性的影响

NCPP 和 CPP 可明显增强小鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性,2 组与对照组相比,均有显著性差异( *P* < 0.05 ),2 组之间无明显差异(见表 4)。

表 4 NCPP 与 CPP 对小鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性的影响

Tab.4 Influence of NCPP and CPP on the killing activity of splenic NK cells

Groups( <i>n</i> )	Killing rate( % ) ( $\bar{x} \pm s$ )
Control( 12 )	42.8 $\pm$ 3.0
NCPP( 12 )	55.9 $\pm$ 3.5*
CPP( 12 )	55.8 $\pm$ 3.5*

\* *P* < 0.05, compared with control

2.6 NCPP 与 CPP 对小鼠脾脏 T 细胞增殖活性的影响

NCPP 与 CPP 对小鼠脾脏 T 细胞增殖活性没有明显影响,两组与对照组相比,均无明显差异(单因素方差分析,见表 5)。

3 讨论

通过对 NCPP 和 CPP 的实验研究,表明 NCPP 对

小鼠具有明显的脾激活和抑瘤作用,其抗肿瘤作用机理是通过强力激活单核巨噬细胞及 NK 细胞吞噬、杀伤活性,且使  $M\phi$  产生  $H_2O_2$ , NO 的水平明显提高,达到抗肿瘤免疫治疗作用。然而,CP 对 T 淋巴细胞的作用报道不一,有待进一步研究<sup>[5,7]</sup>。

表5 NCPP 与 CPP 对小鼠脾脏 T 细胞增殖活性的影响  
Tab.5 Influence of NCPP and CPP on the proliferation index of splenic T cells

Groups( n )	Proliferation index ( $\bar{x} \pm s$ )
Control( 12 )	5.80 ± 0.56
NCPP( 12 )	8.40 ± 1.73
CPP( 12 )	7.08 ± 0.77

随着对肿瘤发病机理的深入认识和分子免疫学理论的发展,非特异性免疫在抗肿瘤中的作用,越来越被人们所重视<sup>[14]</sup>。 $M\phi$  不但在机体非特异性免疫中起重要作用,而且在特异性免疫中也起着非常重要的作用。单核吞噬细胞系统除具有吞噬功能,还可发挥抗原呈递(antigen presentation)作用,也属于抗原呈递细胞(antigen-presentation cell, APC),可辅助 T 淋巴细胞活化,并与淋巴细胞相互刺激其功能,从而放大特异性免疫效应。然而只有活化的  $M\phi$  才能发挥抗肿瘤效应,且活化的  $M\phi$  的抗肿瘤作用具有选择性,即只杀伤肿瘤细胞而不杀伤正常细胞,其杀伤效应与肿瘤的抗原结构及瘤细胞增生周期无关,且可杀伤对化疗、放疗呈抗性的肿瘤细胞<sup>[15]</sup>。因此,一种优良的  $M\phi$  免疫刺激剂无疑有着重要的应用价值。另外,近年来的研究还表明 CP 通过激活单核巨噬细胞系统,除了具有明显的抗肿瘤作用外,在抗微生物方面亦有明显效果<sup>[6,16-18]</sup>。

NCPP 是通过采用先进的纳米技术破碎 CP,经离心去除无效的上清部分,收集沉淀部分制备的新制剂。该制剂具有低热原、无甲醛残留,颗粒具有纳米级,粒度均一,可明显提高吸收率和扩散度,减少 CPP 发烧、胸痛,注射局部红肿、硬结和肝损伤等副作用(另见报道)。新制剂不但具有良好的抗肿瘤活性,且副作用明显低于 CPP,为进一步研发成功奠定了基础(已申报国家发明专利,申请号:02123571.6)。

#### [ 参 考 文 献 ]

[1] 脾指数测定,中国生物制品规程 2000 年版[M]. 北京:化学工业出版社,2002. 240-244.

- [2] 李守梯,董关木,李修兰,等. 厌氧棒状菌(77-1 菌株)的细胞免疫学效应[J]. 上海免疫学杂志,1985,5(3): 140-141.
- [3] 梁滴声,柯玲,丁丽珍,等. 厌氧棒状菌苗胸膜腔内注射治疗癌性胸水取得显效[J]. 生物制品通讯,1979,8(5): 213-214.
- [4] 郑素歌,王思勤,李炜. 短小棒状杆菌菌苗治疗恶性胸腔积液[J]. 河南诊断与治疗杂志,1995,9(2): 127-127.
- [5] 卢锦汉,章以浩,赵铠,主编. 医学生物制品学[M]. 北京:人民卫生出版社,1995. 472-475.
- [6] Koukalova D, Kod'ousek R, Hajek V, et al. Experimental non-specific immunostimulation by the propionibacterium acnes vaccine [J]. Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med, 1992, 133: 19-23.
- [7] 董菁,李康生. 化学发光法检测小棒状杆菌对巨噬细胞和淋巴细胞的激活作用[J]. 汕头大学医学院学报,1999,3: 4-5.
- [8] Rossol S, Voth R, Brunner S, et al. Corynebacterium parvum (propionibacterium acnes): An inducer of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human peripheral blood mononuclear cells and monocytes *in vitro* [J]. Eur J Immunol, 1990, 20: 1761-1765.
- [9] Hart DA. Increased sensitivity of corynebacterium parvum treated in mice to toxic effects of indomethacin and lipopolysaccharide [J]. Infect Immun, 1985, 47(5): 408-414.
- [10] Nagai H, Yakuo I, Yamada H, et al. Liver injury model in mice for immunopharmacological study [J]. Japan J Pharmacol, 1988, 46: 247-254.
- [11] Uchida K, Sakaida I, Hironaka K, et al. Preventive effect of FK 506 (tacrolimus hydrate) on experimentally induced acute liver injury in rats [J]. Dig Dis Sci, 2000, 45(10): 1996-2001.
- [12] 许建明,徐叔云,梅俏,等. 短棒状杆菌和脂多糖诱发的免疫性肝损害模型[J]. 中国药理学通报,1997,13(2): 186-188.
- [13] 吴雄文,梁志辉,主编. 实用免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2002. 141-165.
- [14] Wigzell H. How to use the immune system to selectively destroy self tissues [C]. International cancer vaccine symposium, 2003. 24-25.
- [15] 巴德年主编. 当代免疫学技术与应用[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,23-29.
- [16] Megid J, Kaneno R. Natural killer activity in mice infected with rabies virus and submitted to P. acnes (Propionibacterium acnes) as immunomodulator [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2000, 23(2): 91-97.
- [17] Papaevangelou G, Sparros L, Vissoulis C, et al. The effect of intradermal administration of Corynebacterium parvum on the immune response to hepatitis Bs antigen [J]. J Med Virol, 1977, 1(1): 15-19.
- [18] Megid J, Cremonini DN, Leomil H. Distribution of rabies virus in infected mice, vaccinated and submitted to Pacnes as immunomodulator [J]. Comp Immunol Infect Dis, 2002, 25(4): 237-248.

[ 收稿日期 ] 2003 - 03 - 07

[ 修回日期 ] 2003 - 05 - 06