

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0260-05

天然活性物 SPA 对肺癌增殖的抑制作用及其机制研究

蒋捍东¹, 翟振国², 秦筱梅¹(1. 青岛大学医学院附属医院呼吸科, 山东 青岛 266003; 2. 北京首都医科大学, 北京 100020)

[摘要] 目的: 探讨 SPA 对肺癌增殖的抑制作用并探讨其机制。方法: 采用体外细胞培养以及小鼠动物模型, 观察 SPA 对培养肿瘤细胞的抑制, 及其对小鼠动物模型肿瘤增殖、免疫及白介素 1 和 2 产生的影响。结果: SPA 在 20, 40, 80 mg/kg 的剂量下连续灌胃给药 10d, 对小鼠体内 Lewis 肺癌生长具有明显抑制作用, 生长抑制率分别为 35. 27% ($P < 0. 01$), 48. 29% ($P < 0. 001$), 65. 41% ($P < 0. 001$), 但对体外培养的 A549 肺腺癌细胞株的生长无明显影响; 能够增加小鼠网状内皮系统的吞噬功能, 增加溶血素水平, 增强迟发超敏反应, 促进小鼠巨噬细胞与脾细胞分泌 IL-1, IL-2。结论: SPA 可通过调节免疫来抑制肺癌增殖。

[关键词] 硫酸多糖; 肺癌; IL-1; IL-2

[中国分类号] R734.2 [文献标识码] A

Inhibition on Proliferation of Lung Cancer by Natural Product SPA

JIANG Han-dong¹, ZHAI Zhen-guo², QIN Xiao-mei (1. Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003; 2. Beijing Capital Medical University)

[Abstract] Objective: To explore the inhibitory effect of algae sulfated polysaccharide(SPA) on the proliferation of lung cancer and its possible mechanism. Methods: Using *in vitro* cell culture and animal model to observe the effects of SPA given by oral administration on tumor proliferation, immune function and the ability of IL-1, IL-2 secretion. Results: SPA at dose of 20, 40, 80 mg/kg significantly inhibits tumor growth with inhibitory rates of 35. 27% ($P < 0. 01$), 48. 29% ($P < 0. 001$), 65. 41% respectively. Significant increase in phagocytic function, increase in serum hemolysin level, delayed allergic reaction and secretion of IL-1, IL-2 were observed after SPA administration. No direct inhibitory effect on proliferation of A459 adenocarcinoma cell was observed *in vitro*. Conclusion: SPA inhibits the growth of Lewis lung cancer possibly by modulating immune function.

[Key words] polysaccharide sulfate; lung cancer; IL-1; IL-2

* 海藻硫酸多糖(sulfated polysaccharide, SPA)是从天然海洋植物海藻中提取的一种具有多种生物学活性的多糖类物质, 现代药理学证实, 天然植物类多糖主要是通过调节机体的免疫功能而发挥其广泛的生物学效应。本研究观察了 SPA 对 Lewis 肺癌小鼠的增殖抑制作用, 同时检测了 SPA 对 Lewis 小鼠免疫功能的影响, 旨在探讨其抗肺癌作用及可能的免疫学机制。

1 材料与方

1.1 动物与瘤株

雄性小鼠 C₅₇BL/6, 6~8 周龄, 体重(20 ± 2) g, 由军事医学科学院实验动物中心提供; YAC-1 淋巴瘤细

胞引自中国医学科学院肿瘤研究所; CTLL, IL-2 依赖细胞株, 引自军事医学科学院基础医学研究所; Lewis 肺癌、A549 腺癌细胞株由中国医学科学院药物研究所引进, 青岛海洋大学海洋药物与食品研究所传代保种; Lewis 肺癌维持在 C₅₇BL/6 小鼠体内, 每 2 周传代一次。A549 细胞液氮冷冻保存。

1.2 主要试剂

SPA 由青岛海洋大学药物研究所提供, 呋喃氟脲嘧啶(FT-207)由山东济南制药厂提供。刀豆蛋白 A

[作者简介] 蒋捍东(1964-), 男, 山东省寿光县人, 副教授, 主要从事肺癌及间质性肺病方面的研究

(Con A)、细菌脂多糖(LPS),四噻唑氮蓝(MTT)购自美国Sigma公司。小牛血清(NCS)由军事医学科学院放射医学研究所提供。白细胞介素-2(IL-2)标准品购自日本盐野义制药公司。IL-1试剂盒购自中国人民解放军总医院东亚免疫研究技术所。

1.3 实验方法

1.3.1 SPA 体内对 Lewis 肺癌增殖的影响

取传代后 14 d 的 Lewis 肺癌瘤源小鼠,处死后取腋部皮下剥取肿瘤组织,制成瘤细胞悬液。细胞活力大于 95%,调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。取 C₅₇BL/6 小鼠,随机分为对照组,SPA 20,40,80 mg/kg 组及 FT-207 150 mg/kg 组,每组 10 只。除正常组外,均于右腋部皮下注射上述瘤细胞悬液 0.2 ml。从接种肿瘤次日开始灌胃给药,连续 10 d。末次药后 24 h 处死小鼠,剥取瘤块,称重,计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率}(\%) = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{治疗组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

1.3.2 SPA 体外对肺癌细胞增殖的影响

取对数生长期的人肺腺癌细胞株 A549 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$,分装于 96 孔培养板,0.1 ml/孔。设 FT-207 阳性对照组、不同浓度的 SPA 组。各组设 5 个平行孔,37℃,5% CO₂湿度饱和条件下培养 72 h,实验终止前 4 h 加入 0.5% MTT 液 20 μl/孔,继续培养 4 h 后去上清液,加入 DMSO 100 μl/孔,振荡混匀,酶标仪 570 nm 波长处测 OD 值。

1.3.3 SPA 对小鼠免疫功能的影响

1.3.3.1 对小鼠非特异性免疫功能的影响

随机将荷瘤小鼠分为正常对照组及 SPA 20,40,80 mg/kg 组,灌胃给药,共 10 d。末次药后 24 h,尾静脉注射 1:10 稀释印度墨水 0.4 ml,分别于注射后 2 min 和 10 min 眶静脉取血通过分光光度计 670 nm 比色。计算碳粒廓清率。

$$\text{碳廓清率}(\%) = \frac{\log OD_2 - \log OD_{10}}{t_{10} - t_2} \times 100\%$$

式中 OD₂ 和 OD₁₀ 分别为 2,10 min 时所取制得测试液的吸光值。

1.3.3.2 SPA 对小鼠血清溶血素的影响

取实验第 6 天腹腔注射 3:5(v:v)绵羊红细胞(SRBC)0.2 ml/只免疫小鼠,4 d 后摘眼球取血,血清 20 μl,加入 5 ml 生理盐水中,混匀,56℃水浴 30 min 灭活补体。取此血清样品 1 ml,加入 10% SRBC 0.5 ml 和生理盐水稀释的 1:10 补体 1 ml,混匀,37℃水浴 10 min,再移入冰浴中终止反应。离心,取上清液,加入 3

ml 都氏试剂,分光光度计 A₅₄₀ nm 处测定吸光度值,计算半数溶血值(HC₅₀)。

1.3.3.3 SPA 对小鼠迟发型超敏反应的影响

于试验后第 3 天免疫小鼠左后足,每鼠 2×10^7 个 SRBC,第 9 天以 SRBC 攻击右后足,每鼠 2×10^8 个绵羊红细胞(SRBC),第 10 天通过测其左右足厚度差确定其迟发性超敏反应的强度。

1.3.3.4 SPA 对小鼠胸腺器官重量及 IL-2,IL-1 及 NK 细胞活性的影响

于试验后 10 d,处死小鼠,取胸腺及脾脏称重,并进行如下指标检测。

1.3.3.4.1 IL-2 诱生与检测

常规制备脾细胞悬液,取其悬液 $2 \times 10^7/\text{ml}$,与终浓度为 5 μg/ml 的 Con A 共同培养 24 h,收集上清液,即为 IL-2 粗品。将以 Con A (5 μg/ml)诱导的各给药组小鼠脾细胞悬液培养上清作为待测样品,以 1:2 稀释待用,生长良好的细胞 CTLL 细胞以染料排斥法确定活细胞数目(大于 95%),调整浓度 $4 \times 10^5/\text{ml}$,取 0.1 ml,加入稀释的样品 0.1 ml,共同培养 48 h,同时设 IL-2 标准品(10 U/ml)对照组,实验结束前 4 h 去上清 100 μl,加入 MTT 液,继续培养 4 h,去上清,加入 DM-SO 溶解,酶标仪测 570 nm 处吸光度值(A_{570nm})。

1.3.3.4.2 IL-1 诱生与检测

常规收集小鼠腹腔巨噬细胞,用培养液配成 $2 \times 10^5/\text{ml}$,96 孔培养板每孔 0.1 ml 与 10 μg/ml 细菌脂多糖(LPS)0.1 ml 共同培养 3 d,诱导腹腔巨噬细胞产生 IL-1,以 1:2.5 稀释上清液。常规制备 C₅₇BL/6 小鼠胸腺细胞悬液 $1.5 \times 10^7/\text{ml}$,96 孔培养板 0.1 ml/孔与 IL-1 检品 0.1 ml 共同培养 3 d,实验结束前 6 h 每孔加入 ³H-TdR 1.0 μCi,实验结束时,将细胞收集于 69 型纤维滤纸上,温干,以液闪仪测其放射性强度 cpm 值。

1.3.4.3 自然杀伤细胞(NK)活性检测

常规制备小鼠脾细胞悬液,以不同浓度脾细胞作效应细胞(E),标记的 YAC-1 细胞作靶细胞(T),使 E:T 分别为 100:1,50:1,共同培养 16 h,测上清液 cpm 值。

2 结果

2.1 SPA 对小鼠体内 Lewis 肺癌增殖的影响

SPA 在 20,40,80 mg/kg 的剂量下连续灌胃给药 10 d,对小鼠体内 Lewis 肺癌生长具有明显抑制作用,生长抑制率分别为 35.27%($P < 0.01$),48.29%($P < 0.001$),65.41%($P < 0.001$)。阳性对照药 FT-207 在 150 mg/kg 的剂量下对小鼠体内 Lewis 肺癌生长抑制率为 51.27%($P < 0.01$,表 1)。

2.2 SPA 体外对肺癌细胞增殖的影响

观察 SPA 对培养的肺癌细胞株生长抑制作用。从表 2 可以看出,SPA 在 25,50,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下对体外

培养的 A549 肺腺癌细胞株的生长无明显影响。阳性对照药 FT-207 在 120 $\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{kg})$ 的浓度下对 A549 细胞株生长有明显抑制作用($P < 0.01$, 表 2)。

表 1 SPA 体内对小鼠体内 Lewis 肺癌生长的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 *in vivo* inhibition on the growth of Lewis lung cancer in mouse by SPA

Groups	Dose(mg/kg)	Tumor weight(g)	Tumor inhibitory rate(%)
Model	-	2.92 \pm 0.57	-
SPA	20	1.89 \pm 0.81 *	35.27
	40	1.51 \pm 0.63 **	48.29
	80	1.01 \pm 0.96 **	65.41
FT-207	150	1.41 \pm 0.69 *	51.27

* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ SPA vs control

表 2 SPA 体外对 A549 细胞株生长的影响

($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Tab. 2 Effect of SPA on proliferation of A549 cell line

($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Groups	Concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ODvalue
Control	-	0.758 \pm 0.116
SPA	25	0.757 \pm 0.154
	50	0.724 \pm 0.076
	100	0.660 \pm 0.119
FT-207	120	0.342 \pm 0.126 *

* $P < 0.01$, SPA vs control

2.3 SPA 对小鼠免疫功能的影响

2.3.1 SPA 对小鼠非特异性免疫功能的影响

小鼠连续口服 SPA 10 d 后,其碳粒廓清率明显提高,其中 40, 80 mg/kg 组与正常组相比均有显著性差异($P < 0.01$, 表 3)。

表 3 SPA 对小鼠网状内皮系统吞噬功能的影响

($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 3 Effect of SPA on phagocytosis of reticular-endothelial system ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Groups	Dose(mg/kg)	K($\times 10^{-3}$)
NS	-	35.00 \pm 4.08
SPA	20	41.08 \pm 5.12
	40	69.40 \pm 4.45 *
	80	67.20 \pm 4.76 *
FT-207	150	37.20 \pm 4.24 *

* $P < 0.01$, SPA vs NS

2.3.2 SPA 对小鼠血清溶血素水平的影响

SPA 20, 40, 80 mg/kg 连续口服给药 10 d,可使小鼠血清溶血素水平显著升高,与对照组相比有显著性差异($P < 0.01$, 表 4)。

表 4 SPA 对小鼠血清溶血素水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 4 Effect of SPA on serum hemolysin($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Groups	dose(mg/kg)	HC ₅₀
NS	-	267.50 \pm 44.94
SPA	20	483.63 \pm 47.11 *
	40	442.38 \pm 40.36 *
	80	421.63 \pm 26.56 *
FT-207	150	224.31 \pm 36.47 *

* $P < 0.01$ SPA vs NS

2.3.3 SPA 对小鼠迟发型超敏反应的影响

结果发现 SPA 40, 80 mg/kg 对小鼠 DTH 反应性的有明显促进作用($P < 0.05$, 表 5)。

表 5 SPA 对小鼠的 DTH 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 5 Effect of SPA on DTH ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Groups	Dose(mg/kg)	Foot thickness (mm)
Control	-	0.34 \pm 0.12
SPA	20	0.41 \pm 0.13
	40	0.58 \pm 0.10 *
	80	0.49 \pm 0.13 *
FT-207	150	0.38 \pm 0.11 *

* $P < 0.05$, vs control

2.3.4 SPA 对小鼠免疫器官重量的影响

小鼠连续灌胃给药 10 d 后,处死小鼠,取胸腺及脾脏称重,结果显示 SPA 20, 40 mg/kg 组可以明显增加胸腺的重量,统计学有显著意义($P < 0.05$, 见表 6)。

表 6 SPA 灌胃给药对小鼠免疫器官重量的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 6 Effect of SPA on weight of immune organs
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Groups	Dose (mg/kg)	Weight(mg/10 g)	
		Spleen	Thymus
NS	-	55.23 ± 17.18	30.12 ± 7.41
SPA	20	53.95 ± 11.08	44.80 ± 6.64*
	40	54.18 ± 17.25	42.76 ± 11.08*
	80	47.96 ± 16.66	33.80 ± 12.12
FT-207	150	39.88 ± 15.46	29.88 ± 13.22*

* $P < 0.05$ SPA vs NS

2.3.5 SPA 对小鼠 IL-2, IL-1 及 NK 细胞活性的影响

2.3.5.1 SPA 对小鼠脾细胞 IL-2 产生的影响

结果发现各用组小鼠脾细胞产生 IL-2 的量均高于对照组,其中 80 mg/kg 组效果最明显(见图 1)。

图 1 SPA 对小鼠脾细胞 IL-2 产生的影响

Fig.1 Effect of SPA on IL-2 production by mouse
abdominal phagocytes

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; SPA vs control

2.3.5.2 SPA 对小鼠腹腔巨噬细胞 IL-1 产生的影响

实验结束时,将细胞收集于 69 型纤维滤纸上,温干,以液闪仪测其放射性强度 cpm 值,计算 RPI。结果表明 SPA 体内给药可明显促进小鼠腹腔巨噬细胞产生 IL-1,其中 80 mg/kg 作用最强(见图 2)。

2.3.5.3 SPA 对小鼠淋巴细胞自然杀伤活性的影响

结果发现在效靶比为 100:1,50:1 时,SPA 20 mg/

kg 对 NK 细胞活性未见明显影响,而 40,80 mg/kg 对 NK 细胞活性则表现出明显的增强作用,呈现剂量依赖性。FT-207 组 NK 活性与空白对照组相似(见表 7)。

图 2 SPA 对小鼠脾细胞 IL-1 产生的影响

Fig.2 Effect of SPA on IL-1 production by mouse
abdominal phagocytes

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; SPA vs control

表 7 SPA 对小鼠脾 NK 细胞活性的影响

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab.7 Effect of SPA on spleen NK cellular activity
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Groups	Dose (mg/kg)	E: T	[³ H]Radiation dose (10 ³ cpm)
Control	0	100:1	12.4 ± 0.9
		50:1	6.9 ± 0.4
SPA	20	100:1	15.4 ± 1.3
		50:1	7.5 ± 0.9
	40	100:1	9.5 ± 0.3**
		50:1	5.7 ± 0.5*
	80	100:1	6.9 ± 0.7***
		50:1	5.2 ± 0.1**
FT-207	150	100:1	10.8 ± 0.6
		100:1	6.8 ± 0.5*

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$;

SPA and FT-207 vs control

2.4 统计学处理

根据资料性质,采用 Microsoft Excel 进行 t 检验。

3 讨论

为了深入探讨 SPA 在肺癌治疗中的作用机制,我们给移植瘤小鼠灌服 SPA,发现 20,40,80 mg/kg 均有

显著抑制肿瘤生长的作用,抑制率分别达到 35.27% , 48.29% ,65.41%。表现有显著抑制肺癌细胞增殖的作用。基于以上实验结果,我们把 SPA(25 ~ 100 μg/ml)直接加入培养的细胞株,结果发现对 A549 肺癌细胞株无显著抑制作用,提示 SPA 可能是通过细胞毒直接作用以外的其他机制发挥其抗肿瘤作用。

海藻多糖(SFPS)在抗肿瘤作用已有文献报道^[1,2]。大量的实验研究证实,天然植物多糖药物在抑瘤、抗转移和提高免疫功能方面具有确切的疗效,可诱发机体产生生物反应调节剂(BRM)或具有同样的作用^[3,4],发挥抗肿瘤的效果。

3.1 天然植物多糖对免疫器官大体形态和组织形态的影响

季宇彬等^[3]研究了复方海藻多糖合剂对小鼠艾氏腹水癌(EAC)、小鼠肉瘤(S180)、小鼠网状组织细胞白血病(L615)的抑制作用。发现复方海藻多糖合剂可显著延长荷瘤小鼠的生存时间,抑制肿瘤细胞的增殖;同时也对抗因接种肿瘤细胞后引起荷瘤小鼠的胸腺萎缩和肾上腺萎缩。本研究发现荷瘤小鼠灌服 SPA,胸腺重量增加,脾脏未出现明显萎缩,与文献报道一致。

3.2 天然药物对特异性免疫功能和非特异性免疫功能的影响

傅勤等^[6]应用扶正天然药物黄芪和女贞子水煎剂对小鼠巨噬细胞毒的研究发现,它使缺陷型小鼠 AD-CC 活性明显升高,提示可能是通过提高机体免疫功能来达到抗癌目的。许东晖等^[7]发现鲍鱼多糖能明显增强荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能和迟发型超敏反应。本文为荷瘤小鼠灌服 SPA,胸腺重量增加,并能明显提高血清溶血素水平,能明显增强荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能和迟发型超敏反应,与文献报道一致。提示 SPA 可能通过激活巨噬细胞及 T 细胞,直接或间接地促进细胞毒因子的释放、杀伤肿瘤细胞,从而抑制肿瘤细胞的生长,发挥其抗肿瘤作用。

3.3 天然植物多糖诱导细胞因子产生、影响自然杀伤细胞(NK 细胞)活性

现在提出细胞因子网络(cytokine network)学说^[8-10],即不同的细胞因子具有相互诱生和协同作用。比如在 NK 细胞-IFN-IL-2 调节网络中,NK 细胞起到核心作用。研究发现灵芝多糖、茯苓多糖、猪苓多糖等均可诱导 IL-2 的产生,对某些肿瘤细胞具有细胞毒性和细胞生长抑制作用。本研究发现 SPA 体内给药后小鼠

血清溶血素水平升高,小鼠 DTH 反应性增加,促进单核-巨噬细胞的碳粒廓清率,同时观察分析了 SPA 对 NK 细胞、IL-2 活性影响,发现可以明显促进 IL-2 的产生,提高 NK 细胞的杀伤活性,提示 SPA 通过对多个细胞因子的影响,提高整体免疫功能,介导肿瘤细胞发生 APO,发挥其抗肿瘤的作用,与文献报道一致。

本研究应用整体动物实验方法探讨了 SPA 治疗肺癌的可能机制,认为药物在体内的抗肿瘤功效可能与免疫调节有关。来源于天然植物药的天然活性产物以其所特有的低毒性、确切疗效、无耐药性并具整体调节和双向调节效应等方面的优势,在肿瘤治疗中具有非常重要的作用。

[参 考 文 献]

[1] Tomasoni C, Sinquin C, Durand P, *et al.* Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line[J]. *Anticancer Res*, 1996, 16(3A): 1213-1217.

[2] Iwawa H. Effects of Shsiakot, a Japanese and Chinese traditional herbal mixture on the mitogenic activating of lipopolysaccharide: A new pharmacological testing method[J]. *J Ethnopharmacol*, 1987, 21: 45-48.

[3] 施志云. 海洋药物研究进展[J]. *药学情报通讯*, 1994, 12(2): 18-20.

[4] 吴学勇. 补益类中药在肿瘤治疗中的作用[J]. *中医研究*, 1999, 12(2): 53-55.

[5] 季宇彬,李文举,谷春山. 复方海藻多糖合剂抗癌作用的实验研究[J]. *中国海洋药物*, 1994, 13(3): 20-24.

[6] 傅勤,王丽娟,景年才,等. 扶正中药黄芪、女贞子水煎剂对小鼠巨噬细胞细胞毒功能的作用[J]. *中国实验临床免疫学杂志*, 1998, 10(1): 44-49.

[7] 许东晖,王兵,许实波,等. 鲍鱼多糖对荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞活性及迟发型超敏反应的作用[J]. *中药材*, 1999, 22(2): 88-90.

[8] Roveli F, Lissonip, Barmi S, *et al.* Increased level of soluble IL-2 receptor in advanced solid tumors: A preliminary study[J]. *Tumoris*, 1988, 47: 633-638.

[9] Smith C, Farrah T, Goodwin R. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death [J]. *Cell*, 1994, 76: 959-963.

[10] Roveli F, Lissonip, Barmi S, *et al.* Increased level of soluble IL-2 receptor in advanced solid tumors: A preliminary study[J]. *Tumoris*, 1988, 47: 633-638

[收稿日期] 2003 - 04 - 04 [修回日期] 2003 - 05 - 25