

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2005 )02-0129-05

## 三肽化合物酪丝亮肽抗肿瘤作用及对单核巨噬细胞激活作用机制

邱爽<sup>1</sup>, 陆融<sup>2</sup>, 赵岚<sup>1</sup>, 王松<sup>1</sup>, 周春雷<sup>1</sup>, 赵茜<sup>1</sup>, 李国力<sup>1</sup>, 高文远<sup>3</sup>, 姚智<sup>1,3</sup>( 1. 天津医科大学免疫教研室, 天津 300070; 2. 深圳康哲药业有限公司, 深圳 518029; 3. 天津大学药学系, 天津 300072 )

[ 摘要 ] **目的:** 观察三肽化合物酪丝亮肽的抗肿瘤作用, 探讨其对单核巨噬细胞的激活作用。**方法:** 观察 YSL 对人肝癌 BEL-7402 裸鼠移植瘤的抑制作用; 观察 YSL 对体外培养 BEL-7402 细胞体系的抑制作用; 观察 YSL 对 PEM $\phi$  杀伤肿瘤细胞 BEL-7402 及 B16-F10 的影响; 观察 YSL 对 PEM $\phi$  分泌合成 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  和 NO 等细胞毒效应分子的影响。**结果:** YSL 能显著抑制 BEL-7402 移植瘤裸鼠的肿瘤生长, 给药剂量为 160  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  时疗效最显著, 抑制率为 44.03%; YSL 体外对 BEL-7402 细胞生长有一定的抑制作用, 与阴性对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); YSL 能增强裸鼠 PEM $\phi$  对 BEL-7402, B16-F10 杀伤作用, 与生理盐水对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); YSL 能增强 Balb/c 小鼠 PEM $\phi$  对 BEL-7402, B16-F10 杀伤作用, 与生理盐水对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); YSL 能促进小鼠 PEM $\phi$  分泌合成细胞毒效应分子 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  和 NO, 与生理盐水对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。**结论:** YSL 能够抑制 BEL-7402 的增殖, 增强单核巨噬细胞的细胞毒功能, 促进细胞毒效应分子 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  和 NO 的分泌合成。

[ 关键词 ] 酪丝亮肽; 人肝癌 BEL-7402; 巨噬细胞; 细胞毒效应分子

[ 中图分类号 ] R392.12 [ 文献标识码 ] A

## Anti-Tumor Effects of Tripeptide Tyroserleutide and Its Mechanisms by Activating Monocyte-Macrophages

QIU Shuang<sup>1</sup>, LU Rong<sup>2</sup>, ZHAO Lan<sup>1</sup>, WANG Song<sup>1</sup>, ZHOU Chun-lei<sup>1</sup>, ZHAO Qian<sup>1</sup>, LI Guo-li<sup>1</sup>, GAO Wen-yuan<sup>3</sup>, YAO Zhi<sup>1,3</sup>( 1. Department of Immunology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Shenzhen Kangzhe Pharmaceutical CO. LTD, Shenzhen 518029, China; 3. Pharmaceutical College, Tianjin University, Tianjin 300072, China )

[ Abstract ] **Objective:** To investigate the anti-tumor effects of the tripeptide tyroserleutide ( YSL ) and to discuss its mechanisms by activating monocyte-macrophages. **Methods:** To apply human hepatocarcinoma BEL-7402 tumor transplanted in nude mice to examine the anti-tumor effects of YSL. To apply human hepatocarcinoma cell BEL-7402 to investigated the cytotoxicity of YSL against human hepatocarcinoma BEL-7402 cell line *in vitro*. To explore the activating effects of YSL on the peritoneal macrophage ( PEM $\phi$  ) functions of cytotoxicity against tumor cell lines ( BEL-7402, B16-F10 ) *in vitro* and to detected the effects of YSL on the content of cytotoxicity effectors IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and NO produced by PEM $\phi$ . **Results:** YSL could inhibit the growth of transplanted tumor BEL-7402 in nude mice, the inhibition rate of 160  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  was 44.03%. The tumoricidal activity of YSL against BEL-7402 cell line *in vitro* was observed when compared with the control group ( $P < 0.05$ ). YSL could activated PEM $\phi$  of nude mice and markedly enhance cytotoxicity against tumor cell lines ( BEL-7402, B16-F10 ) when compared with the control group ( $P < 0.05$ ). YSL could activated PEM $\phi$  of Balb/c mice and marked enhance cytotoxicity against tumor cell lines ( BEL-7402, B16-F10 ) when compared with producing group ( $P < 0.05$ ). YSL could stimulate the contents of the cytotoxicity effectors of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and NO produced by PEM $\phi$  ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** YSL had inhibition functions against human hepatocarcinoma BEL-7402. YSL could increase the cytotoxicity of monocyte-macrophages and stimulate producing of the contents of the cytotoxicity effector of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and NO.

[ Key Words ] tyroserleutide; human hepatocarcinoma BEL-7402; macrophage; cytotoxicity effectors

酪丝亮肽 ( tyroserleutide, YSL ) 是一种由酪氨酸、丝氨酸和亮氨酸组成的三肽化合物, 具有中国独立的知识产权。本研究拟应用 YSL 于人肝癌 BEL-7402 荷瘤裸鼠、人肝癌 BEL-7402 细胞, 以观察其抗肿瘤活性;

[ 基金项目 ] 国家“863” 高新技术研究发展计划资助项目 ( 2004AA2z3170 ); 教育部重点项目 ( 03007 )

[ 作者简介 ] 邱爽 ( 1978- ), 贵州省贵阳市人, 女, 硕士生, 主要从事医学免疫学研究

[ 通讯作者 ] 姚智, E-mail: yaozhi@tmu.cn

从单核巨噬细胞系统初步探讨其可能的抗肿瘤机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物与细胞株

Balb/c( nu/nu )裸鼠, SPF 级( 无特定病原体动物 ), 雌性, 4 ~ 5 周龄, 体重 18 ~ 22g, 购自中国医学科学院肿瘤研究所动物中心。Balb/c 小鼠, CLA( 清洁级动物 )级, 6 ~ 8 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 雌性, 购自军事医学科学院实验动物中心; 人肝癌细胞系 BEL-7402 购自中国医学科学院肿瘤药物研究所; 小鼠黑色素瘤细胞系高转移株 B16-F10 购自中国医学科学院肿瘤药物研究所。

### 1.2 试剂

YSL 由深圳康哲药业有限公司提供, MTT( 四甲基偶氮唑蓝 )浓度为 0.5 mg/ml, 胰酶浓度为 0.5 mg/ml, LPS( 脂多糖 )浓度为 0.1 mg/ml, 购自 Sigma 公司, 胎牛血清购自 Hyclone 公司, EDTA 购自 Boehringer Mannheim GmbH, RPMI-1640 购自 Gibco 公司, mL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒购自 R&D 公司, mTNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒购自 BMS 公司, NO( 酶法 )试剂盒购自北京晶美生物工程有限公司。

### 1.3 YSL 对人肝癌 BEL-7402 裸鼠移植瘤生长的影响

选取肿瘤直径大于 1 cm, 生长状态良好的荷人肝癌 BEL-7402 裸鼠, 无菌条件下将新鲜的瘤组织切成 2 ~ 4 mm<sup>3</sup> 的小块, 在裸鼠腹部外侧皮下剪一小口, 用无钩眼科镊子将瘤块移植于皮下。将已接种肿瘤组织的 Balb/c( nu/nu )裸鼠, 随机分为生理盐水组( 0.2 ml/只/d )、YSL 80  $\mu$ g/( kg · d )组、YSL 160  $\mu$ g/( kg · d )组、YSL 320  $\mu$ g/( kg · d )组, 各组药物均溶于 0.2 ml 生理盐水中, 于肿瘤接种后次日经腹腔注射, 每日 1 次, 连续给药 60 d。于给药结束后次日, 逐只剖取肿瘤, 称量、记录瘤重。用游标卡尺测量肿瘤的 3 个互相垂直的直径, 代入下式计算:  $V = (1/6)\pi ABC$ 。V 为肿瘤体积, A、B、C 为瘤体的 3 个直径。计算肿瘤抑制率。

肿瘤抑制率( % ) =

$$\frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

1.4 YSL 对体外培养人肝癌 BEL-7402 细胞生长的影响 将对数生长期的人肝癌 BEL-7402 细胞株, 调整细胞浓度至  $6.5 \times 10^4$ /ml, 每孔 100  $\mu$ l 接种于 96 孔细胞培养板中, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 24 h 后分别加入不同浓度的 YSL, 使药物终浓度分别为 100, 10, 1, 0.1  $\mu$ g/ml, 分别设置 8 个平行对照孔; 另设 8 个不加药的细胞培养基孔作为阴性对照, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中分别培养 24 h, 48 h, 72 h, 96 h 后, 用 MTT 法检测肿瘤细胞增殖情况。

### 1.5 YSL 对裸鼠腹腔巨噬细胞( PEM $\phi$ )杀伤肿瘤细胞作用的影响<sup>[1,2]</sup>

将健康裸鼠随机分为生理盐水组、YSL 160  $\mu$ g/( kg · d )组及 YSL320  $\mu$ g/( kg · d )组, 每组 10 只, 各组药物均溶于 0.2 ml 生理盐水, 腹腔注射, 每日 1 次, 连续 7 d, 给药结束后次日, 颈椎脱臼处死各组裸鼠, 冷 D-Hanks 液冲洗腹腔, 按摩腹部 2 ~ 3 min, 收集冲洗液, 1 200 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 用 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$ /ml( 台盼兰染色细胞存活率 98% 以上 ), 100  $\mu$ l/孔加至 96 孔细胞培养板中, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养 4 h, 弃去上清及非贴壁细胞, 加入细胞培养基 100  $\mu$ l/孔, 每组分别设置 8 个平行对照孔, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 24 h, 作为效应细胞。将处于对数生长期的 BEL-7402、B16-F10 肿瘤细胞, 调整细胞浓度为  $4 \times 10^4$ /ml, 作为靶细胞, 按 E: T = 25: 1 的效靶比关系每孔加入肿瘤细胞悬液, 100  $\mu$ l/孔( 效应细胞组除外 ), 效应细胞组加入细胞培养基 100  $\mu$ l/孔。将加完样品的 96 孔细胞培养板置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱继续孵育 72 h。用 MTT 法<sup>[3]</sup>在 ELISA-reader 上检测吸光度( OD 值 ), 测定波长为 570 nm, 参考波长为 630 nm, 结果以每个样品的 8 个平行孔平均 OD 值表示, 按以下公式计算 PEM $\phi$  的杀伤活性:

杀伤率( % ) =

$$\left( 1 - \frac{\text{实验孔 OD 值} - \text{效应细胞对照孔 OD 值}}{\text{靶细胞孔 OD 值}} \right) \times 100\%$$

### 1.6 YSL 对 Balb/c 小鼠 PEM $\phi$ 杀伤肿瘤细胞作用的影响

将健康 Balb/c 小鼠随机分为生理盐水组、YSL 80  $\mu$ g/( kg · d )组、YSL 160  $\mu$ g/( kg · d )组及 YSL 320  $\mu$ g/( kg · d )组, 每组 10 只, 给药方法、PEM $\phi$  对 BEL-7402、B16-F10 肿瘤细胞杀伤作用的检测方法同( 1.5 )。

### 1.7 YSL 对 PEM $\phi$ 分泌 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及 NO 的影响

将健康 Balb/c 小鼠随机分为生理盐水组、YSL 80  $\mu$ g/( kg · d )组、YSL 160  $\mu$ g/( kg · d )组及 YSL 320  $\mu$ g/( kg · d )组, 每组 10 只, 各组药物均溶于 0.2 ml 生理盐水, 腹腔注射, 每日 1 次, 连续 7 d, 于给药结束后次日取出各组小鼠 PEM $\phi$ , 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$ /ml( 台盼兰染色细胞存活率 98% 以上 ), 1 ml/孔加入 24 孔细胞培养板中, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养 4 h, 弃去上清及非贴壁细胞, 加入含 LPS( 10  $\mu$ g/ml )的细胞培养基 1 ml, 每组分别设置 10 个平行对照孔, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱培养 24 h 后, 提取各孔细胞培养上清液, 分装后 - 20 $^{\circ}$ C 保存。用 ELISA 法, 检测 PEM $\phi$  上清液中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  及 NO 的含量<sup>[4,5]</sup>。

### 1.8 统计学处理

用方差分析的方法统计各组数据。

YSL 给药剂量为 160  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  时疗效最显著, 肿瘤抑制率大于 40%, 与生理盐水比较具有显著性差异(  $P < 0.05$  ) ( 表 1 )。

## 2 结 果

### 2.1 YSL 对人肝癌 BEL-7402 裸鼠移植瘤生长的影响

表 1 YSL 对裸鼠人肝癌 BEL-7402 移植瘤抑制作用的实验结果

Tab. 1 The inhibition effect of YSL on human hepatocellular BEL-7402 transplanted tumor in nude mice

Groups	Dosage	n	Weight of mice ( g )		Volume of tumor ( $\text{cm}^3$ )	Weight of tumor ( g )	Inhibition( % )
			Begin	End			
YSL	320 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$	10	18.70 $\pm$ 2.24	21.86 $\pm$ 3.32	1.12 $\pm$ 0.46	0.87 $\pm$ 0.35 $^{\Delta}$	35.07
YSL	160 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$	10	18.53 $\pm$ 1.10	20.80 $\pm$ 2.57	0.81 $\pm$ 0.35 $^{\Delta}$	0.75 $\pm$ 0.37 $^{\Delta}$	44.03
YSL	160 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$	10	18.06 $\pm$ 1.64	21.34 $\pm$ 2.52	1.16 $\pm$ 0.57	0.97 $\pm$ 0.40	27.61
Control group	-	10	19.78 $\pm$ 1.45	22.88 $\pm$ 2.37	1.61 $\pm$ 0.51	1.34 $\pm$ 0.47	-

$\Delta P < 0.05$  compared with control group

### 2.2 YSL 体外对人肝癌 BEL-7402 细胞生长的影响

不同浓度 YSL 在不同时段对人肝癌细胞系 BEL-7402 细胞有一定的抑制作用, 与对照组相比较有显著性差异(  $P < 0.05$  ) ( 表 2 ); YSL 作用 72 h 时各浓度对肿瘤细胞的抑制作用最明显( 图 1 )。

### 2.3 YSL 对裸鼠 PEM $\phi$ 杀伤肿瘤细胞作用的影响

腹腔注射 YSL 后裸鼠 PEM $\phi$  对肿瘤细胞 BEL-7402 的杀伤功能增强, 160  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ , 320  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  两组的 OD 值与生理盐水对照组比较有显著性差异(  $P < 0.05$  )。腹腔注射 YSL 后裸鼠 PEM $\phi$  对肿瘤细胞 B16-F10 的杀伤功能增强, 160  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ , 320  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  两组的 OD 值与生理盐水对照组比较有显著性差异(  $P < 0.05$  ) ( 表 3 )。

图 1 YSL 对体外培养人肝癌细胞系 BEL-7402 细胞在不同时段的抑制作用

Fig. 1 The inhibition effect of YSL against human hepatocellular cell line BEL-7402 *in vitro* during several period time

表 2 YSL 对体外培养人肝癌细胞系 BEL-7402 细胞的抑制作用

Tab. 2 The inhibition effect of YSL *in vitro* against human hepatocellular cell line BEL-7402

Groups	Dosage	n	$\bar{x} \pm s$ ( OD value )			
			24 h	48 h	72 h	96 h
YSL	0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8	0.1619 $\pm$ 0.0050	0.2887 $\pm$ 0.0050	0.4108 $\pm$ 0.0161 $^{\Delta}$	0.3357 $\pm$ 0.0050 $^{\Delta}$
YSL	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8	0.1622 $\pm$ 0.0050	0.2858 $\pm$ 0.0010	0.3968 $\pm$ 0.0194 $^{\Delta}$	0.3390 $\pm$ 0.0248 $^{\Delta}$
YSL	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8	0.1615 $\pm$ 0.0060	0.2650 $\pm$ 0.0176 $^{\Delta}$	0.3930 $\pm$ 0.0133 $^{\Delta}$	0.3375 $\pm$ 0.0334 $^{\Delta}$
YSL	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8	0.158 $\pm$ 0.0050 $^{\Delta}$	0.2572 $\pm$ 0.0060 $^{\Delta}$	0.3793 $\pm$ 0.0133 $^{\Delta}$	0.3253 $\pm$ 0.0408 $^{\Delta}$
BEL-7402	-	8	0.1620 $\pm$ 0.0070	0.2985 $\pm$ 0.0060	0.4723 $\pm$ 0.0282	0.3800 $\pm$ 0.0189

$\Delta P < 0.05$  compared with BEL-7402 group

### 2.4 YSL 对 Balb/c 小鼠 PEM $\phi$ 杀伤肿瘤细胞作用的影响

腹腔注射 YSL 后 Balb/c 小鼠 PEM $\phi$  对肿瘤细胞

BEL-7402 的杀伤功能增强, 80  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ , 320  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  2 组的 OD 值与生理盐水对照组比较有显著性差异(  $P < 0.05$  )。腹腔注射 YSL 后小鼠的 PEM $\phi$  对

肿瘤细胞 B16-F10 的杀伤功能增强, 80  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ , 320  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  两组的 OD 值与生理盐水对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (见表 4)。

2.5 YSL 对 PEM $\phi$  分泌 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 NO 的影响

小鼠经腹腔注射 YSL 后, PEM $\phi$  分泌 IL-1 $\beta$  增加, YSL 80  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ , YSL 320  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  剂量时 IL-

1 $\beta$  含量与生理盐水组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); YSL 作用后能促进小鼠 PEM $\phi$  分泌 TNF- $\alpha$ , YSL 各剂量组都能促进 PEM $\phi$  分泌 TNF- $\alpha$ , 与生理盐水组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。YSL 各剂量组作用后 PEM $\phi$  能合成更多量的 NO, 与对照相比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (表 5)。

表 3 YSL 裸鼠腹腔作用 7 d 后 PEM $\phi$  对 BEL-7402 和 B16-F10 的杀伤作用

Tab. 3 The cytotoxicity effect of nude mice PEM $\phi$  activated by YSL *in vivo* against tumor cell BEL-7402 and B16-F10

Groups	Dosage	n	BEL-7402		B16-F10	
			$\bar{x} \pm s$ (OD value)	Cytotoxicity (%)	$\bar{x} \pm s$ (OD value)	Cytotoxicity (%)
Control group	-	10	0.375 $\pm$ 0.018 $\Delta$	17.49	0.1780 $\pm$ 0.0130 $\Delta$	38.64
YSL	160 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$	10	0.339 $\pm$ 0.012 $\Delta\blacktriangle$	25.57	0.1090 $\pm$ 0.0140 $\Delta\blacktriangle$	62.46
YSL	320 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$	10	0.307 $\pm$ 0.012 $\Delta\blacktriangle$	32.86	0.0782 $\pm$ 0.0370 $\Delta\blacktriangle$	73.07
BEL-7402 or B16-F10	-	10	0.455 $\pm$ 0.025	-	0.2900 $\pm$ 0.0150	-

$\Delta P < 0.05$  compared with BEL-7402 or B16-F10 group;  $\blacktriangle P < 0.05$  compared with control group

表 4 YSL 小鼠腹腔作用 7 d 后 PEM $\phi$  对 BEL-7402 和 B16-F10 的杀伤作用

Tab. 4 The cytotoxicity effect of mouse PEM $\phi$  activated by YSL *in vivo* against tumor cell BEL-7402 and B16-F10

Groups	Dosage	n	BEL-7402		B16-F10	
			$\bar{x} \pm s$ (OD value)	Cytotoxicity (%)	$\bar{x} \pm s$ (OD value)	Cytotoxicity (%)
Control group	-	10	0.416 $\pm$ 0.019 $\Delta$	8.92	0.161 $\pm$ 0.022 $\Delta$	31.47
YSL	80 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10	0.364 $\pm$ 0.030 $\Delta\blacktriangle$	20.23	0.131 $\pm$ 0.030 $\Delta\blacktriangle$	44.31
YSL	160 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10	0.403 $\pm$ 0.036 $\Delta$	11.68	0.158 $\pm$ 0.015 $\Delta$	32.84
YSL	320 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10	0.359 $\pm$ 0.037 $\Delta\blacktriangle$	21.39	0.123 $\pm$ 0.013 $\Delta\blacktriangle$	47.63
BEL-7402 or B16-F10	-	10	0.456 $\pm$ 0.017	-	0.234 $\pm$ 0.004	-

$\Delta P < 0.05$  compared with BEL-7402 or B16-F10 group;  $\blacktriangle P < 0.05$  compared with control group

表 5 YSL 小鼠腹腔作用 7 d 后 PEM $\phi$  分泌 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  含量及合成 NO 检测

Tab. 5 The content of cytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and NO produced by PEM $\phi$  by applying YSL *in vivo* after 7 days

Groups	Dosage	n	IL-1 $\beta$ (pg/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	NO ( $\mu\text{mol}/\text{l}$ )
YSL	80 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10	314.775 $\pm$ 45.004 $\Delta$	20.968 $\pm$ 4.770 $\Delta$	111.0004 $\pm$ 9.112 $\Delta$
YSL	160 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10	244.688 $\pm$ 49.302	20.492 $\pm$ 4.371 $\Delta$	123.0005 $\pm$ 7.746 $\Delta$
YSL	320 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10	370.625 $\pm$ 15.723 $\Delta$	18.746 $\pm$ 6.308 $\Delta$	156.0006 $\pm$ 12.040 $\Delta$
Control group	-	10	229.167 $\pm$ 14.427	12.000 $\pm$ 3.994	97.5004 $\pm$ 4.200

$\Delta P < 0.05$  compared with control group

3 讨论

三肽化合物 YSL 化学结构为 L-酪氨酰-L-丝氨酰-L-亮氨酸, 分子结构式为 C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (图 2), 分子量为

381.42, 中国国家药典委员会批准通用名称为 YSL。目前已在中国和美国申请了专利保护。因其显著的抗肝癌作用, 2003 年 9 月获得中国国家食品和药品监督管理局颁发的临床批文 (批件号: 2003L03492), 作为 I

类化学药物进入临床研究,并于2004年9月获得美国FDA批准,进入抗肝癌治疗孤儿药研究状态。

本研究应用的人体肝癌细胞系 BEL-7402 由中国陈瑞铭等<sup>[6]</sup>建立于1975年,是从1例肝癌患者外科手术切除标本中获得,在离体培养条件下,应用旋转管法过度到细胞单层静置培养而建成的。BEL-7402 细胞的各种特征与临床人肝癌相似,是保留了恶性特征的一系肝癌细胞。YSL 在体外对 BEL-7402 直接抑制率仅为20%,而对人肝癌 BEL-7402 裸鼠移植瘤的生长,肿瘤抑制率接近50%。裸鼠是一种先天无胸腺或仅有胸腺残迹或异常上皮的免疫缺陷动物。T 细胞不能正常分化,缺乏成熟 T 细胞的辅助、抑制系杀伤功能,细胞免疫力低下,其体内非依赖 T 细胞免疫机制如 NK 及巨噬细胞具有较高活性。因此,为了探讨 YSL 的抗肿瘤机制,本研究重点观察该化合物对单核巨噬细胞系统抗肿瘤作用影响。

图2 YSL 分子结构式

Fig.2 YSL molecule construction

1892年, Metchnikoff<sup>[7]</sup>首次提出了巨噬细胞的吞噬作用在机体防御机制中的重要意义。本实验结果表明 YSL 能够活化小鼠 PEM $\phi$ , 增强其对肿瘤细胞的杀伤作用。由于巨噬细胞对鼠源性肿瘤细胞比人源性肿瘤细胞具有更强的杀伤作用<sup>[8]</sup>。本研究选用了小鼠黑色素瘤细胞系高转移株 B16-F10, 进一步观察 YSL 对单核巨噬细胞抗肿瘤作用影响。研究表明 YSL 在体内能够激活小鼠单核巨噬细胞系统, 增强了单核巨噬细胞系统的抗肿瘤作用。巨噬细胞可分泌多种细胞毒效应分子抑瘤或杀瘤, 巨噬细胞产生的细胞因子可以使肿瘤细胞分解并引起功能障碍<sup>[9-10]</sup>。IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  和 NO 巨噬细胞分泌的重要的抗肿瘤细胞效应分子, 有很强的抗肿瘤作用, 能抑制多种肿瘤的生长并且有很强的增殖抑制作用<sup>[11-13]</sup>。YSL 能够促进 IL-1 $\beta$  的合成, 提示 IL-1 $\beta$  是 YSL 活化的巨噬细胞杀伤肿瘤的细胞毒效应分子机制之一。YSL 也能促进巨噬细胞 TNF- $\alpha$  的分泌, 表明 TNF- $\alpha$  是激活的巨噬细胞杀伤肿瘤细胞的主要效应分子之一。YSL 对巨噬细胞合成

NO 的促进作用, 提示 NO 是 YSL 活化的巨噬细胞杀伤肿瘤的细胞毒效应分子机制之一。以上结果提示 YSL 能促进巨噬细胞分泌合成多种细胞毒效应分子, 可以通过反应性氮代谢机制(促进巨噬细胞合成 NO)和氧、氮非依赖机制(促进巨噬细胞分泌细胞因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ )发挥抗肿瘤作用。

综上所述, YSL 能够抑制人肝癌 BEL-7402 的增殖, 增强单核巨噬细胞杀伤肿瘤细胞的作用, 促进细胞毒效应分子 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  和 NO 的分泌合成。

## [参考文献]

- [1] Adelman DC, Erickson KL, Gershwin ME. Macrophage-mediated inhibition of melanoma cell growth in nude mice [J]. *Exp Cell Biol*, 1983; 51(3): 165-171.
- [2] 王立生, 潘令嘉, 施理, 等. 完整肽聚糖对裸鼠腹腔巨噬细胞分泌和杀瘤功能的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2000, 7(1): 25-27.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 1785-1786.
- [4] 孙卫民. 细胞因子研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 383-384.
- [5] 傅其宏, 于海, 王青青, 等. 三羧氨基喹啉对人口腔癌裸鼠移植瘤的抗血管生成作用与其调节巨噬细胞分泌细胞因子的关系 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2002, 31(4): 273-280.
- [6] 陈瑞铭, 朱德厚, 叶秀珍, 等. 人体肝癌体外细胞株 (BEL-7402) 的建立及特征 [J]. *科学通报*, 1975, 20(9): 434-436.
- [7] Whitworth PW, Pak CC, Esgro J, et al. Macrophages and cancer [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1990, 8(4): 319-351.
- [8] Saiki I, Shinji S, Chiharu F, et al. Induction of tumoricidal macrophages and production of cytokines by synthetic muramyl dipeptide analogues [J]. *Vaccine*, 1988, 6(3): 238-244.
- [9] 向连滨. 巨噬细胞的分子生态学 [J]. *免疫学杂志*, 1994, 10(1): 1-10.
- [10] 赵阳, 饶春明, 张翊, 等. 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子活性测定标准品的研制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, (3): 205-207.
- [11] 余传霖, 叶天星, 陆德源, 等. 现代医学免疫学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1998. 146-150.
- [12] Mullins DW, Walker TM, Burger CJ, et al. Taxol-mediated changes in fibrosarcoma-induced immune cell function: Modulation of antitumor activities [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1997, 45(1): 20-28.
- [13] Hill JR, Corbett JA, Kwon G, et al. Nitric oxide regulates interleukin 1 bioactivity released from murine macrophages [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(37): 22672-22678.

[收稿日期] 2004-11-29

[修回日期] 2005-04-21

[本文编辑] 王莹