

[文章编号] 1007-385X(2005)04-0301-02

抗癌活性肽对荷瘤小鼠抑瘤作用及诱生 TNF 的研究

全晓红¹, 苏秀兰²(1. 赤峰学院医学院组织胚胎教研室, 内蒙古赤峰 024001; 2. 内蒙古医学院分子病理研究中心, 呼和浩特 010059)

肿瘤的生物治疗是近年蓬勃发展起来的一种新型肿瘤治疗手段,其特点为其靶向性强,对正常组织、器官损害性小,通过增强机体自身免疫功能,旨在启动调节机体的天然免疫防卫机制和抗癌能力来治疗肿瘤,变被动抗癌为主动抗癌,已被公认为“肿瘤的第四大治疗模式”,其巨大的开发潜能和前景已引起广泛的关注。本实验以内蒙古医学院分子生物学研究中心苏秀兰等研制的生物制剂抗癌活性肽(anti-cancer bioactivity peptide, ACBP)作为待测药物,建立荷 S180 肉瘤小鼠动物模型,体内抑瘤实验用腹腔注射和口服灌胃两种方式给药,采用流式细胞术、透射电子显微镜、DNA 凝胶电泳技术,旨在研究其对 TNF 的诱生及瘤细胞凋亡的影响,以期深入探讨抗癌活性肽对机体的免疫调节作用和抑瘤作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源

待测药物:ACBP 由内蒙古医学院分子生物实验中心分离提取,4℃ 保存。环磷酰胺:上海第十二制药厂提供;胸腺肽:山东新华制药股份有限公司提供。细胞株:鼠 S180 肉瘤细胞北大肿瘤医院引进。实验动物:健康雌性昆明小鼠 70 只购自内蒙古大学动物中心。

1.2.1 建立荷 S180 肉瘤小鼠动物模型

将称重后的雌性昆明种系小鼠随机分 6 组,抽取腹水传代的 S180 肉瘤细胞,用生理盐水 1:4 稀释,约 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 接种于小鼠右腋皮下 0.2 ml/只。接种细胞第 2 天开始以 2 种方式给药。腹腔注射组分为化疗组环磷酰胺 0.1 ml/10 g;实验组 ACBP 0.5 ml/只;对照组(生理盐水 0.5 ml/只)。口服灌胃组分为胸腺肽组,0.5 ml/只;实验组(ACBP 0.5 ml/只);对照组(生理盐水 0.5 ml/只)。连续给药 12 d 后称重,断颈取血,处死小鼠。

1.2.2 计算抑瘤率、脾指数胸腺指数 分别称瘤重、脾重、胸腺重,以下列公式计算抑瘤率,抑瘤率% = (对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重 $\times 100\%$ 。计算脾指数胸腺指数(脾、胸腺指数为每

10 g 小鼠体重中脾、胸腺的重量),并进行 *t* 检验。

1.2.3 电镜分析

剖取瘤块中央组织,按电镜常规制样方法置于 2.0% 戊二醛中固定,树脂包埋超微切片,柠檬酸染色后行透射电镜(EM10C/CR)分析,观察各组瘤体的超微结构的变化。

1.2.4 流式细胞仪检测

取 100 mg 瘤体研磨,1 \times PBS 清洗,过 200 目滤网后置于 50 \times 70 的 Falcon 管中加 0.25% 胰酶消化,离心 5 min,弃上清,每管加 70% 乙醇 1 ml 固定。BD 公司标准 Beads 校准流式细胞仪,获取细胞 10 000 个,取 TNF 单抗(鼠抗人)结合的细胞为阳性细胞,以生理盐水组为同型对照,分别测实验组与对照组肿瘤坏死因子的表达量。TNF 的定量分析,以均道值(Mode)表示他们的相对含量。

1.2.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析

常规酚、氯仿法提 DNA,行琼脂糖凝胶电泳,在紫外分析仪下观察分析 DNA 条带并拍照。

1.2.6 统计学方法

数据经 SPSS10.0 软件处理,实验组与对照组行配对 *t* 检验。

2 结果与讨论

ACBP 以两种给药方式均可抑制肿瘤生长,但腹腔给药组效果强(表 1)。口服灌胃抑瘤率为 39.57%,与目前已用于临床的胸腺肽比较无显著性差异。多肽类药物口服因经过胃肠道蛋白酶的消化降解及肝脏的代谢,其疗效往往不如注射给药。

表 1 腹腔注射给药对昆明鼠 S180 肉瘤的生长抑制作用

组别	动物数	瘤重 (g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率 (%)
化疗对照组	10/8	0.044 \pm 0.037	85.20
实验组	10/10	0.3115 \pm 0.143 * Δ	75.23
生理盐水组	10/10	1.2561 \pm 1.047	

* 与化疗组比较 $P < 0.05$; Δ 与生理盐水组比较 $P < 0.01$

改善肿瘤患者免疫功能低下,激发和增强宿主体内的免疫活性细胞是免疫调节剂抗肿瘤免疫的重要作用途径。腹腔实验组脾指数(12.09 ± 1.90,与NS组对比 $P < 0.05$)、胸腺指数(3.37 ± 0.60,与NS水组对比 $P < 0.05$)增高,荷瘤小鼠生存质量提高,全身状况良好,体重增加4.13 g,表明ACBP可以促进S180荷瘤小鼠免疫器官增生,增强小鼠的自身免疫器官功能,在抗肿瘤的同时,不损坏免疫器官,弥补了化疗药物的缺陷,显示出抗癌活性肽作为一种新型生物制剂抗肿瘤的优势。

电镜观察腹腔实验组瘤体超微结构,结果显示瘤细胞核染色质浓缩,易见凋亡现象,胞浆可见多数空泡,细胞器结构不清;DNA琼脂糖凝胶电泳分析可见有DNA梯状条带出现;流式细胞术测量结果显示肿瘤坏死因子表达量增高(表2)。结合瘤细胞的生化和超微结构的变化可以得出结论:抗癌活性肽在促进肿瘤细胞坏死和诱导肿瘤细胞凋亡两方面同时发挥了抑瘤作用,参照流式细胞仪检测TNF的结果,可以推论抗癌活性肽诱导TNF发挥了对肿瘤细胞的直接细胞毒作用^[1,2],而对肿瘤细胞的凋亡的诱导可能是通过Fas/TNF介导的信号传导途径而启动^[3,4]。

表2 流式细胞仪检测TNF的表达量

组别	例数	标记率(%)	表达量 (Mode, $\bar{x} \pm s$)
化疗对照组	8	48.03	6.01 ± 0.13
实验组	10	30.44* [△]	5.48 ± 0.46
生理盐水组	10	21.23	3.70 ± 0.31

*与生理盐水组比较 $P < 0.01$; [△]与化疗对照组比较 $P < 0.05$

目前,外源性细胞因子疗法因其存在的诸多药理学和毒理学问题而使其应用受限,抗癌活性肽对内源性TNF诱导作用值得深入研究。进一步对TNF的mRNA进行分析,检测相关的酶及凋亡因子,将为阐明其机制提供有价值研究结果。

[关键词] 抗癌活性肽; 抑瘤作用; TNF

[中图分类号] R73;R3 [文献标识码] A

[参考文献]

[1] Mondal TK, Bhatta D, Biswas S, et al. Superantigen - induced apoptotic death of tumor cells is mediated by cytotoxic lymphocytes, cytokines, and nitric oxide[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(4): 1336-1339.

[2] Kianmanesh A, Hackett NR, Lee JM, et al. Intratumoral administration of low doses of an adenovirus encoding tumor necrosis factor alpha together with naive dendritic cells elicits significant suppression of tumor growth without toxicity[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12(17): 2035-2041.

[3] 梁卫江, 张万岱. 肿瘤坏死因子诱导凋亡的信号传导机制[J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8: 329-331.

[4] 龚非力.《医学免疫学》[M]. 第2版, 科学出版社, 2000.

[收稿日期] 2005-05-08

[修回日期] 2005-07-10

[本文编辑] 王莹