

茯苓多糖对 Lewis 肺癌小鼠自发肺转移的抑制作用及其机制研究

张密霞, 李怡文, 张德生, 庄朋伟, 张艳军*

天津中医药大学, 天津 300193

摘要: **目的** 研究茯苓多糖对 Lewis 肺癌小鼠自发肺转移的影响, 并探讨其作用机制。 **方法** C57BL/6 小鼠右腋皮下接种 Lewis 肺癌细胞, 分为茯苓多糖高 (0.50 mg/只)、低 (0.33 mg/只) 剂量组, 顺铂组 (顺铂 0.04 mg/只), 模型组 (生理盐水), 接种瘤细胞后第 2 天开始尾 iv 给药, 隔天一次。观察小鼠一般状态, 造模后第 7 天开始, 隔天测量肿瘤体积。造模后 21 d 取肺, 计数肺表面转移灶个数, HE 染色检测肺微小转移灶个数, 检测外周血白细胞数量及脾质量、脾指数。 **结果** 茯苓多糖高、低剂量对实体瘤无明显抑制, 茯苓多糖高剂量可减少肺表面转移灶个数, 增加白细胞 CD11b mRNA 表达, 不影响外周血白细胞数、脾质量及脾指数, 一般状况较好; 茯苓多糖低剂量对肺表面转移灶个数、外周血白细胞数、脾质量及脾指数无明显影响, 可增加白细胞 CD11b、CD18 mRNA 表达, 一般状况较好。 **结论** 茯苓多糖对 Lewis 肺癌小鼠实体瘤无明显抑制作用, 但能够抑制其自发肺转移, 对外周血白细胞数量、脾质量及脾指数无明显影响, 可增加外周血白细胞 CD11b、CD18 mRNA 表达, 活化外周血白细胞可能是茯苓多糖抑制肿瘤转移的机制之一。

关键词: 茯苓多糖; 肺转移; Lewis 肺癌

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)06-0842-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.06.007

Inhibition of pachymaran on spontaneous lung metastasis in Lewis lung cancer of mice and its mechanism

ZHANG Mi-xia, LI Yi-wen, ZHANG De-sheng, ZHUANG Peng-wei, ZHANG Yan-jun

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 300193 Tianjin, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects and mechanism of pachymaran on spontaneous lung metastasis in Lewis lung cancer mice model. **Methods** C57BL/6 mice were sc injected with Lewis lung cells in the right axilla, and the mice were divided into four groups with ten mice each, such as model (physiological saline), cisplatin (0.04 mg), and pachymaran high- and low-dose (0.50 and 0.33 mg) groups, and from the day 2 of model establishment, the drug was given through tail vein every 2 d. The tumor volume was measured from 7 d to 21 d every two days. The number of metastasis on the surface of the lung was calculated after 21 d. The number of micrometastases in lung was calculated by HE staining. The numbers of peripheral blood leukocytes, spleen weight, and spleen index were also detected. **Results** The low- and high-dose pachymaran had no effect on the growth of the tumor. The high-dose pachymaran could reduce the number of lung surface metastases and increase the expression of CD11b mRNA in peripheral white blood cells. It had no effect on the number of the peripheral blood leukocyte, spleen weight, and spleen index. The low-dose pachymaran had no effect on the number of lung surface metastases, the number of the peripheral blood leukocyte, spleen weight, and spleen index. But it could increase the expression of CD11b mRNA and CD18 mRNA in peripheral white blood cells. **Conclusion** Pachymaran has no obvious inhibitory effect on Lewis lung cancer solid tumor in mice, but could inhibit the spontaneous lung metastasis. It has no significant effect on peripheral blood white cell count, spleen weight, and spleen index, but it may increase the expression of CD11b and CD18 mRNA of peripheral white blood cells. It is suggested that the activation of peripheral white blood cells could be involved in the mechanism of pachyman inhibitory mechanism of tumor metastasis.

Key words: pachymaran; lung metastasis; Lewis lung cancer

收稿日期: 2013-03-25

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目 (10JCZDJC21300)

作者简介: 张密霞 (1975—), 女, 硕士, 研究方向为中药药理。Tel: 13132113407 E-mail: mimimixia@sina.com

*通信作者 张艳军 E-mail: zyjsunye@163.com

恶性肿瘤是一类严重危害人类身体健康的疾病。肿瘤本质上都表现为细胞失去控制的异常增殖,这种异常生长的能力除了表现为肿瘤本身的持续生长之外,在恶性肿瘤中还表现为对邻近正常组织的侵犯以及经血管、淋巴管和体腔转移到身体其他部位,而这往往是肿瘤致死的原因^[1]。肿瘤常见的转移途径有淋巴道转移、血道转移和种植转移。Cui 等^[2-4]报道的肿瘤自然消退/完全消退 (spontaneous regression/complete resistance, SR/CR) 小鼠的粒细胞能够在肿瘤细胞周围形成玫瑰花环样结构,抵抗多种类型的癌细胞,如果在肿瘤转移过程中,中性粒细胞能在肿瘤细胞周围形成玫瑰花环样结构,并杀死瘤细胞,则可能抑制肿瘤转移。而当机体发生细菌感染时,细菌细胞壁主要成分脂多糖 (LPS) 是激活白细胞的主要物质。茯苓系多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核,其主要成分茯苓多糖有对肿瘤细胞的直接抑制和杀灭作用,它既可增强细胞免疫,又可增强体液免疫,是很好的免疫增强剂^[5-6]。与 LPS 同为多糖,茯苓多糖可能通过提高粒细胞杀伤肿瘤细胞的能力从而发挥防治肿瘤的作用。本实验拟通过考察茯苓多糖对 Lewis 肺癌自发肺转移模型的抗肿瘤作用,并检测外周血白细胞数量及外周血白细胞活化程度,以期从激活白细胞抗肿瘤能力角度检测茯苓多糖是否具有抗肿瘤生长和转移的作用,并从活化白细胞角度探讨其作用机制。

1 实验材料

茯苓多糖粉末由天津中医药大学中药学院赵骏教授提供,重均相对分子质量为 16 580,质量分数为 81%;顺铂注射液 (2 mL:10 mg,云南生物谷药业股份有限公司,批号 20110901);TRNzol、RNase-free H₂O (北京天根生化科技有限公司);Bio imaging system (Syngene 公司);三圈牌游标卡尺 (125 mm×0.02 mm,上海精美量具厂)。

C57BL/6 小鼠 40 只,体质量 (20±1) g,4 周龄,雌雄各半,由北京力科爱达生物技术咨询服务中心提供。由于小鼠体质量基本相同,以下给药按照每只为单位进行给药。

2 实验方法

2.1 分组及给药

将接种 Lewis 肺癌细胞的 C57BL/6 小鼠随机分成 4 组,每组 10 只,即茯苓多糖高、低剂量组,顺铂注射液组,模型组。右腋皮下接种 Lewis 肺癌细

胞 2×10⁶ 个/只。接种后第 2 天给药,高剂量组茯苓多糖 0.50 mg/只,低剂量组茯苓多糖 0.33 mg/只,顺铂组给予顺铂 0.04 mg/只,模型组给予生理盐水。所有药物均于给药当天用生理盐水新鲜配制,0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌,0.2 mL/只,尾静脉注射,隔天给药 1 次。

2.2 一般情况观察

定期观察动物精神状态、进食和排便情况。每次给药前用电子天平称量小鼠体质量。

2.3 肿瘤体积测量

接种肿瘤后第 7 天开始,隔天用游标卡尺测量实体瘤结节的最长径 (*a*) 和最短径 (*b*),计算肿瘤体积 (肿瘤体积=1/2*ab*²)。

2.4 外周血白细胞数量的计数

接种肿瘤后第 21 天,眼内眦取血,白细胞稀释液稀释后显微镜下计数白细胞数量,剩余血样加入 TRNzol 充分吹打后放入-80℃冰箱保存,以备提取外周血白细胞 RNA。

2.5 抑瘤率的计算

接种肿瘤后第 21 天,取血后处死小鼠,取出小鼠的实体瘤组织,称定质量,计算抑瘤率。

抑瘤率=(1-药物组平均瘤质量/模型组平均瘤质量)

2.6 肺转移灶个数及肺转移抑制率的计算

接种肿瘤后第 21 天,取血后处死小鼠,取出肺脏,计数小鼠肺部表面转移灶个数。转移灶为类圆形小突起呈结节状,呈圆形半透明点状,部分转移灶可融合在一起。

据肺结节直径将其分为 4 级:I 级<0.5 mm,0.5 mm≤II 级≤1 mm,1 mm≤III 级≤2 mm,IV 级≥2 mm^[7]。肺表面转移结节总数=I 级转移灶个数×1+II 级转移灶个数×2+III 级转移灶个数×3+IV 级转移灶个数×4。计数完毕后将肺组织放入 4%多聚甲醛固定,用于肺病理组织学检测。

肺转移抑制率=(模型组平均肺表面转移结节数-治疗组平均肺表面转移结节数)/模型组平均肺转移结节数

2.7 脾质量及脾指数的计算

接种肿瘤后第 21 天,取血后处死小鼠,取出脾脏,称取脾质量,并计算脾指数。

脾指数=脾质量/(体质量-瘤质量)

2.8 病理组织学检测

将小鼠肺组织放入 4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,每个样本随机选取 5 个视野,10×物镜下计数微小转移灶个数。

2.9 对 Lewis 肺癌荷瘤外周血白细胞活化的影响

提取小鼠外周血总 RNA, RT-PCR 法检测白细胞活化、黏附相关基因 CD11b、CD18 mRNA 的表达情况。

引物序列根据 Primer3 软件设计, 经 NCBI 数据库引物序列检测, 由上海生工生物技术有限公司合成。引物序列为 β -actin: 上游 AGCCATGTACGTA GCCATCC, 下游 TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG (227 bp); CD11b: 上游 CATCACCGTGAGTTCCACAC, 下游 GAGAACTGGTTCTGGCTTGC (174 bp); CD18: 上游 AGTCCCAGTGGAAACAACGAC, 下游 GCACTGGGGCTAGCTGTAAG (161 bp)。反应条件为: 94 °C, 2 min, 1cycle; 94 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 30 s (其中 β -actin 扩增 28cycles, 其余 38cycles)。琼脂糖凝胶电泳在凝胶成像分析仪上, 应用 Bio Imaging System 照像, 进行灰度扫描, 以目的基因 β -actin 灰度比值进行半定量比较分析, 目的基因灰度比值=目的基因灰度值/ β -actin 灰度值。

2.10 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行组间比较。

3 实验结果

3.1 一般情况观察

模型组小鼠随着肿瘤体积逐渐增加, 活动减少, 精神倦怠。与模型组比较, 顺铂组小鼠体质量明显减轻, 活动迟缓, 精神倦怠, 毛发晦暗无色; 茯苓多糖高、低剂量组小鼠精神状态良好, 毛发黑亮。

3.2 对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠瘤质量、肿瘤体积的影响

各组小鼠肿瘤体积逐渐增加, 自给药后第 7 天起至实验结束, 顺铂组各时间点肿瘤体积明显均低于模型组, 茯苓多糖高、低剂量对肿瘤体积无明显

影响, 见图 1。

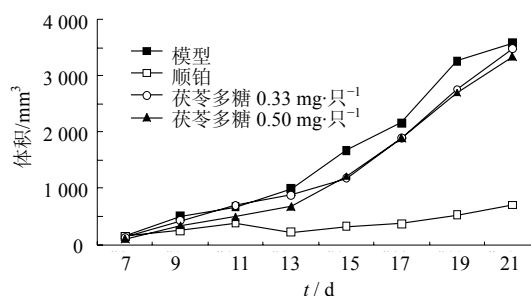


图 1 Lewis 肺癌荷瘤小鼠实体瘤体积变化曲线

Fig. 1 Solid tumor volume change curve of Lewis lung tumor-bearing mice

给药后 21 d, 顺铂组瘤质量明显低于模型组, 茯苓多糖对瘤质量无明显影响, 顺铂、茯苓多糖高剂量、低剂量抑瘤率分别为 70.30%、5.27%、4.24%, 见表 1。

表 1 茯苓多糖对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠实体瘤质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of pachymaran on tumor weight of Lewis lung cancer solid tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·只 ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	—	7.78 ± 1.99	
顺铂	0.04	2.31 ± 1.35*	70.30
茯苓多糖	0.33	7.37 ± 1.55	5.27
	0.50	7.45 ± 0.38	4.24

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

3.3 对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠自发肺转移的影响

顺铂和茯苓多糖高剂量可明显减少 Lewis 肺癌的肺表面转移灶个数。转移抑制率分别为 79.76%、51.40%。茯苓多糖低剂量组与模型组比较肺表面转移灶个数差异无显著性。见表 2。

表 2 茯苓多糖对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠自发肺转移的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of pachymaran on spontaneous lung metastasis in Lewis lung cancer solid tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·只 ⁻¹)	肺表面转移灶数/个	转移抑制率/%	微小转移灶数/个
模型	—	14.00 ± 7.56	—	1.19 ± 0.66
顺铂	0.04	2.83 ± 2.64*	79.76	0.67 ± 0.77
茯苓多糖	0.33	13.20 ± 5.25	5.71	1.13 ± 0.83
	0.50	6.80 ± 2.39*	51.40	0.94 ± 0.57

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

HE 染色结果显示, 茯苓多糖高、低剂量组和顺铂组均有减少 Lewis 肺癌自发转移的趋势, 但与

模型组比较减少 Lewis 肺癌自发转移趋势的差异均无显著性。见图 2。

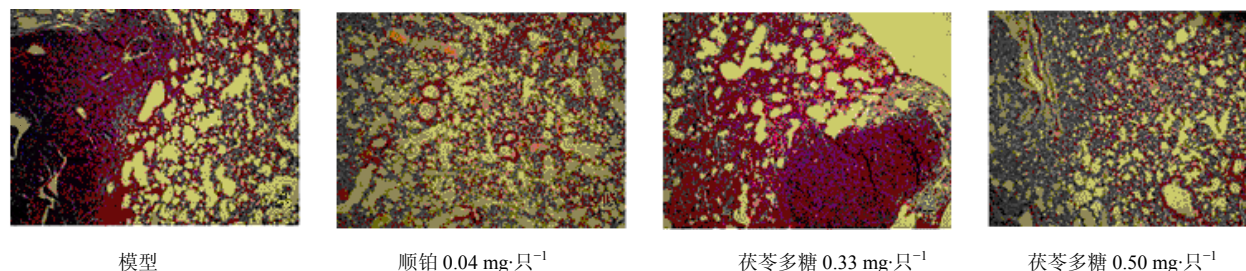


图 2 茯苓多糖对 Lewis 肺癌自发肺转移的 HE 染色图

Fig. 2 Effect of pachymaran on spontaneous lung metastasis in Lewis lung cancer solid tumor-bearing mice by HE staining

3.4 对 Lewis 肺癌荷瘤外周血白细胞数量及活化的影响

顺铂可明显降低小鼠外周血白细胞数量 ($P<0.05$), 但茯苓多糖高、低剂量对外周血白细胞数量无明显影响。顺铂和茯苓多糖高、低剂量均可增加 Lewis 荷瘤小鼠外周血白细胞 CD11b mRNA 表达

($P<0.05$), 且茯苓多糖高、低剂量组的外周血白细胞 CD11b mRNA 表达均高于顺铂组。茯苓多糖低剂量可增加 Lewis 荷瘤小鼠外周血白细胞 CD18 mRNA 表达 ($P<0.05$), 但顺铂、茯苓多糖高剂量对外周血白细胞 CD18 mRNA 表达无明显影响。见表 3。

表 3 茯苓多糖对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠外周血白细胞数量及 CD11b、CD18 mRNA 表达的影响

Table 3 Effect of pachymaran on numbers and expression of CD11b and CD18 mRNA in peripheral blood leukocytes of Lewis lung tumor-bearing mice

组 别	剂量/(mg·只 ⁻¹)	外周血白细胞数($\times 10^6$ 个/mL)	CD11b	CD18
模型	—	8.72 $\pm$ 3.40	0.74 $\pm$ 0.08	1.58 $\pm$ 0.09
顺铂	0.04	2.20 $\pm$ 1.05*	0.87 $\pm$ 0.09*	1.53 $\pm$ 0.08
茯苓多糖	0.33	10.09 $\pm$ 3.26	1.00 $\pm$ 0.03*	1.73 $\pm$ 0.09*
	0.50	8.86 $\pm$ 3.58	0.99 $\pm$ 0.04*	1.66 $\pm$ 0.09

与模型组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs model group

3.5 对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠脾质量及脾指数的影响

顺铂可明显降低荷瘤小鼠脾质量及脾指数, 茯苓高、低剂量对脾质量及脾指数无明显影响。见表 4。

表 4 茯苓多糖对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠脾脏的影响

Table 4 Effect of pachymaran on spleen of Lewis lung tumor-bearing mice

组 别	剂量/(mg·只 ⁻¹)	脾质量/g	脾指数/%
模型	—	0.16 $\pm$ 0.05	1.15 $\pm$ 0.28
顺铂	0.04	0.05 $\pm$ 0.02*	0.42 $\pm$ 0.18*
茯苓多糖	0.33	0.16 $\pm$ 0.07	1.10 $\pm$ 0.39
	0.50	0.21 $\pm$ 0.06	1.41 $\pm$ 0.31

与模型组比较: * $P<0.0$

* $P<0.05$ vs model group

4 讨论

肿瘤的侵袭及转移是一个复杂、多步骤的过程, 防治肿瘤的侵袭、转移是降低肿瘤患者死亡率的重要途径之一。Lewis 肺癌是 1951 年发现的自发于 C57BL/6 的小鼠肺癌, 是局部接种肿瘤最易发生转移的小鼠实体瘤, 动物常因肺转移而死亡。小鼠处死或自然死亡后, 用肉眼或镜检肺部转移灶可用来评价肿瘤转移。

顺铂是临床上常用的化疗药物之一, 有较强的广谱抗癌作用, 其疗效确切, 但副作用大。Cui 等^[2-4]报道, SR/CR 小鼠的粒细胞能够在肿瘤细胞周围形成玫瑰花环样结构, 并进一步杀死癌细胞。Mac-1 是位于白细胞表面参与于机体防御作用及免疫反应的重要黏附分子, 由 A(CD11b)和 B(CD18)两个亚基

以非共价键的方式缔合成异二聚体^[8], 可能参与粒细胞与肿瘤细胞的黏附。茯苓多糖是茯苓的主要成分, 硫酸化茯苓多糖可以通过增强 NK 细胞杀伤活力、促进淋巴细胞增殖、增强机体特异性免疫功能而发挥抗肿瘤作用, 还可以拮抗免疫抑制药所致的免疫抑制^[9]。在前期实验中发现, 茯苓多糖能够增加体外培养的大鼠中性粒细胞在肝癌细胞周围形成玫瑰花环样结构, 并与增加白细胞 CD11b、CD18mRNA 表达相关。

本实验采用 C57BL/6 小鼠右腋皮下接种 Lewis 肺癌细胞复制小鼠自发肺转移模型, 以顺铂作为对照, 检测茯苓多糖对荷瘤小鼠肿瘤生长、肺转移及外周血白细胞数量及脾质量、脾指数的影响。结果发现顺铂虽可明显抑制 Lewis 荷瘤小鼠肿瘤生长, 减少肺表面转移灶个数, 增加外周血白细胞 CD11bmRNA 表达, 但同时明显降低外周血白细胞数量、脾质量及脾指数, 减轻小鼠体质量, 且顺铂组小鼠一般状况较差; 茯苓多糖对肿瘤体积和质量无明显影响, 茯苓多糖高剂量可减少 Lewis 肺癌的肺表面转移灶个数, 对外周血白细胞数量无明显影响, 可增加外周血白细胞 CD11bmRNA 表达, 对脾质量及脾指数无明显影响, 一般状况较好; 茯苓多糖低剂量对肺表面转移灶个数、外周血白细胞数量、脾质量及脾指数均无明显影响, 可增加外周血白细胞 CD11bmRNA 表达, 一般状况较好。与顺铂组相比, 茯苓高剂量组肺表面转移灶个数无明显差异, 茯苓高低剂量组外周血白细胞数、白细胞 CD11bmRNA 表达及脾质量均明显高于顺铂组, 并能提高小鼠一般状态。

综上所述, 茯苓多糖对 Lewis 肺癌小鼠实体瘤

无明显抑制作用, 但能够抑制其自发肺转移, 对外周血白细胞数量、脾质量及脾指数无明显影响, 但可增加外周血白细胞 CD11b、CD18mRNA 表达。活化外周血白细胞可能是茯苓多糖抑制肿瘤转移的机制之一。

参考文献

- [1] 曾益新. 肿瘤学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 15-20.
- [2] Cui Z, Willingham M C, Hicks A M, *et al.* Spontaneous regression of advanced cancer: identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(11): 6682-6687.
- [3] Hicks A M, Willingham M C, Du W, *et al.* Effector mechanisms of the anti-cancer immune responses of macrophages in SR/CR mice [J]. *Cancer Immun*, 2006, 6: 11.
- [4] Hicks A M, Riedlinger G, Willingham M C, *et al.* Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(20): 7753-7758.
- [5] 邵祥龙, 苏日娜, 李伟立, 等. 茯苓多糖抗肿瘤作用研究进展 [J]. 北京中医药, 2009, 28(4): 315-317.
- [6] 黄 灿, 王玉明, 赵 骏. 抗肿瘤活性茯苓多糖的提取、纯化与结构分析 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2146-2149.
- [7] 游 捷, 施志明. 肺癌国际生存质量量表与体能状态评定指标及中医症状量表的关系 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(7): 595-599.
- [8] 刁 飞, 朱晓燕, 刘宇健. Mac-1 的结构与功能及其在肿瘤免疫治疗中的作用 [J]. 中国癌症杂志, 2006, 16(3): 232-234.
- [9] 王爱云, 陈 群, 李成付, 等. 茯苓多糖修饰物抗肿瘤作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 268-271.