

• 研究论文 •

红芪总多糖对荷 S180 瘤小鼠的抑瘤作用及其机制的研究

姚宝泰^{1,2}, 赵健雄^{2*}, 薛凤英¹, 王学习², 雷丰丰²

1. 中山市三角医院, 广东 中山 528445

2. 兰州大学 基础医学院 中西医结合研究所, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 研究红芪总多糖 (THPS) 单用及与环磷酰胺 (CTX) 合用对荷瘤小鼠的抑瘤作用, 并探讨其机制。 **方法** 昆明种小鼠 90 只, 随机分 10 只为正常对照组, 其余 80 只小鼠接种 S180 瘤株后随机分为荷瘤对照组、CTX 组、THPS 高、中、低剂量 [400、200、100 mg/(kg·d)] 组及各与 CTX 合用组共 8 组。正常对照组和荷瘤对照组给予生理盐水, 其余各组给予相应剂量 THPS 及 CTX 治疗, 观察肿瘤的体积变化。14 d 后处死小鼠, 观察瘤质量、抑瘤率; 血球计数仪检测外周血白细胞、血小板、红细胞及血红蛋白; 流式细胞仪检测 CD3⁺T 细胞和 NK 细胞。 **结果** 与荷瘤对照组相比, 中剂量 THPS 明显抑制小鼠 S180 瘤质量增长 ($P<0.01$) 及体积增加 ($P<0.05$), 提高 NK 细胞水平 ($P<0.05$)。与 CTX 组相比, THPS 与 CTX 合用后, 各剂量组均能明显抑制 CTX 所致的白细胞数量下降 ($P<0.01$); 而只有中剂量的 THPS 与 CTX 合用能够降低肿瘤的质量 ($P<0.05$), 并能明显抑制 CTX 所致的 CD3⁺T 细胞 ($P<0.01$) 和 NK 细胞 ($P<0.05$) 数量下降。 **结论** 中剂量的 THPS 能抑制 S180 瘤生长, 具有降低 CTX 免疫抑制和骨髓抑制的作用, 其机制与提高 T 细胞和 NK 细胞介导的免疫应答有关。

关键词: 红芪总多糖; 荷瘤小鼠; CD3⁺T 细胞; NK 细胞

中图分类号: R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)02-0090-04

Antitumor effect of total hedysarum polybotrys saccharide on mice with S180 and its mechanism

YAO Bao-tai^{1,2}, ZHAO Jian-xiong², XUE Feng-ying¹, WANG Xue-xi², LEI Feng-feng²

1. Sanjiao Hospital of Zhongshan, Zhongshan 528445, China

2. Institute of Chinese Traditional and Western Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To investigate the antitumor effects of total hedysarum polybotrys saccharide (THPS) alone and THPS combined with cytoxan (CTX) on tumor-bearing mice and its mechanisms. **Methods** Ninety Kunming mice were divided into nine groups randomly. Except for normal group, other eight groups inoculated with S180 tumor cells consisted of control, CTX, THPS of high, moderate, and low doses, and THPS of high, moderate, and low doses combined with cytoxan groups. Normal and control groups were treated with normal saline while others were treated with CTX, THPS, and THPS combination with CTX. Tumor sizes were measured every other day. All mice were killed after treatment for 14 d. Tumor weight and inhibition rate were observed. CD3⁺T lymphocyte and NK cells were counted through the flow cytometer. Blood routine was tested by blood cell count instrument. **Results** Compared with the control group, the moderate dose of THPS showed significantly antitumor effect on S180 tumor weight ($P<0.01$) and size ($P<0.05$) and markedly increased NK cell amount ($P<0.05$). Compared with the CTX group, all dose groups of THPS combined with CTX obviously inhibited the decrease of white blood cell amount ($P<0.01$). Only the moderate dose of THPS combined with CTX significantly reduced S180 tumor weight ($P<0.05$) and inhibited the decreases of CD3⁺T lymphocyte ($P<0.01$) and NK cell ($P<0.05$) amounts caused by CTX. **Conclusion** The moderate dose of THPS showed significant antitumor effect in S180-bearing mice and reduced immunosuppression and myelosuppression caused by CTX through improving immune response mediated by T cells and NK cells.

Key words: total hedysarum polybotrys saccharide (THPS); tumor-bearing mice; CD3⁺T lymphocyte; NK cell

收稿日期: 2011-11-24

基金项目: 甘肃省科技攻关项目 (No.2GS064-A43-020-32); 兰州大学医学科研基金 (No.LZUYX200601)

作者简介: 姚宝泰 (1970—), 硕士研究生, 研究方向为中西医结合抗肿瘤。Tel: (0760)85404001 E-mail: yao.bt@163.com

*通讯作者 赵健雄, 教授, 博士生导师。研究方向为中医药抗肿瘤。

红芪具有补气升阳、固表止汗、托毒生肌和利水消肿等作用,能增强和调节免疫功能及抗肿瘤^[1-3]。红芪总多糖(total hedysarum polybotrys saccharide, THPS)是从红芪中分离得到的总多糖。以前文献虽有少量红芪多糖抗肿瘤研究^[4-5],但多用粗多糖,结构不清,本课题组提取的THPS质量分数高,相对分子质量及所含单糖明确,对其单用及与环磷酰胺(CTX)合用通过整体动物模型荷S180瘤小鼠进行体内抑瘤实验,并初步探讨其抗肿瘤作用机制。

1 材料

1.1 实验动物与瘤株

清洁级7~8周昆明种小鼠90只,雌雄各半,体质量18~22g,由兰州大学实验动物中心提供,合格证号14-005,S180瘤株由中国医学科学院药物研究所提供。

1.2 药物

甘肃武都产红芪,由兰州大学药学院封士兰教授鉴定,经水提、醇析、酶解及Sevag法除蛋白,紫外分光光度计280nm检测无蛋白吸收峰为止。由中国科学院上海药物研究所丁侃教授测定,相对分子质量为19000,成分为阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖及葡萄糖,其物质的量比为0.42:0.53:0.34:1.00。临用时加生理盐水溶解至所需浓度,无菌过滤器滤过除菌。CTX注射剂(200mg/瓶,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号06101021)。

1.3 试剂与仪器

FITC-CD3⁺单抗(BioLegend),PE-抗NK细胞(Caltag公司);KX-21血球计数仪(日本Sysmex公司),Coulter EPICS-XL流式细胞仪(美国Coulter公司),BP211D电子分析天平(德国Storis公司)。

2 方法

2.1 动物分组与造模

健康昆明种小鼠90只,雌雄各半,置于清洁级动物室中,自由摄食饮水,适应两天后,按质量随机分10只为正常对照组,剩余80只造模。从S180瘤株传代小鼠腹腔抽取乳白色的腹水液,用生理盐水稀释至瘤细胞计数为 2.5×10^7 个/mL,在小鼠右前腋皮下接种瘤液0.16mL,造S180实体瘤模型,然后称质量,按质量随机分8组,即荷瘤对照组、CTX组、THPS低、中、高剂量组以及THPS低、中、高剂量合CTX组。

2.2 给药方法

ip给药,剂量为7.5 μ L/(kg·d),THPS和CTX

均按下述剂量溶于生理盐水中。正常对照组和荷瘤对照组每天注射生理盐水,CTX组隔天注射CTX 20mg/kg,未注射CTX日注射生理盐水。THPS低、中、高剂量组每天注射THPS,剂量分别为100、200、400mg/(kg·d),其与CTX的合用组除每天注射该剂量的THPS外,隔天注射CTX 20mg/kg。每3天称体质量,调整液体与药量,用药14d。

2.3 标本采集与测试方法

于接种瘤液后每两天用游标卡尺测量荷瘤小鼠肿瘤的最长径(*a*)和垂直径(*b*),按 $V=0.5 \times ab^2$ 计算肿瘤体积。注射给药第15天称体质量,摘除眼球采血,EDTA-Na₂抗凝,测CD3⁺T细胞、NK细胞和血常规。严格按照流式细胞仪Coulter EPICS-XL、血球计数仪KX-21操作规程和试剂说明书进行。剥离瘤体称质量,计算抑瘤率。

抑瘤率=(荷瘤对照组平均瘤质量-治疗组平均瘤质量)/荷瘤对照组平均瘤质量

2.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均采用SPSS 13.0软件行单因素方差分析,组间比较用Tukey法。

3 结果

3.1 THPS对荷瘤小鼠肿瘤的抑瘤作用

THPS中剂量组对小鼠S180瘤生长有明显抑制作用,平均抑瘤率达27.81%,与荷瘤对照组相比差异显著($P<0.01$),同时与CTX合用有明显的协同作用,与CTX组比较差异显著($P<0.05$),见表1。

3.2 THPS对荷瘤小鼠肿瘤体积的影响

接种瘤液后第6天可测量肿瘤大小,其后随着时间推移各组的肿瘤体积增大有所不同。第6天,各实验组瘤体积都比荷瘤对照组减小,只有THPS中剂量合CTX组的瘤体积与荷瘤对照组相比差异显著($P<0.05$)。第8天,THPS中剂量组对肿瘤体积增大的抑制效果显著,与荷瘤对照组相比 $P<0.01$,且与CTX合用后有协同作用,与CTX组相比显著减小肿瘤体积($P<0.05$)。第10、12、14天,与荷瘤对照组相比,THPS中剂量组均显著减小肿瘤体积($P<0.01$ 或 0.05),与CTX合用后瘤体积缩小,但与CTX组比较无显著差异,结果见表2。

3.3 THPS对荷瘤小鼠外周血CD3⁺T细胞的影响

与正常对照组比较,荷瘤对照组CD3⁺T细胞无明显变化。与荷瘤对照组比较,CTX能显著降低荷瘤小鼠CD3⁺T细胞数($P<0.01$),而THPS

各剂量组及与 CTX 合用后 CD3⁺T 细胞无明显变化。与 CTX 组比较, THPS 中剂量与 CTX 合用后, 能显著增加 CD3⁺细胞数 ($P < 0.01$), 说明 THPS 中剂量能减轻 CTX 所致的 CD3⁺T 细胞减少, 结果见表 1。

3.4 THPS 对荷瘤小鼠外周血 NK 细胞的影响

与正常对照组比较, 荷瘤对照组 NK 细胞数明显降低 ($P < 0.05$)。与荷瘤对照组比较, CTX 组能明显降低荷瘤小鼠 NK 细胞数 ($P < 0.05$), 而 THPS 中剂量组能明显增加 NK 细胞数 ($P < 0.05$)。THPS 中剂量与 CTX 合用后, 与 CTX 组比较, 能明显增加 NK 细胞数 ($P < 0.05$), 结果见表 1。

表 1 THPS 对 S180 体内生长的抑瘤作用及对外周血 CD3⁺和 NK 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Antitumor effect of THPS on S180 *in vivo* and CD3⁺ and NK cells in peripheral blood ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肿瘤质量/g	抑瘤率/%	CD3 ⁺ /%	NK/%
正常对照组	—	—	—	62.90 ± 6.16	23.87 ± 3.18
荷瘤对照组	—	2.717 7 ± 0.246 6	—	65.71 ± 7.11	17.60 ± 3.16*
CTX 组	20	1.102 4 ± 0.393 0 ^{△△}	59.14	55.84 ± 3.15 ^{△△}	11.93 ± 3.91 ^{**△}
THPS 组	100	2.274 5 ± 0.274 1	16.31	64.93 ± 4.15 ^{###}	19.84 ± 4.43 ^{###}
	200	1.961 8 ± 0.293 4 ^{△△}	27.81	72.73 ± 5.45 ^{**###}	23.40 ± 2.86 ^{###△}
	400	2.300 5 ± 0.277 7	15.35	64.83 ± 5.52 ^{###}	21.47 ± 3.52 ^{###}
THPS+CTX 组	100+20	1.098 4 ± 0.488 5 ^{△△}	59.58	62.26 ± 6.03	17.16 ± 3.89 ^{**}
	200+20	0.593 2 ± 0.249 3 ^{△△#}	79.28	70.22 ± 2.94 ^{###}	18.23 ± 4.11 [#]
	400+20	1.088 9 ± 0.412 1 ^{△△}	59.93	61.29 ± 5.60	16.37 ± 5.16 ^{**}

与正常对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与荷瘤对照组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与 CTX 组比较: [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$; 下表同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group; [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ vs CTX group; same as below

表 2 THPS 对荷瘤小鼠肿瘤体积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of THPS on tumor size in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	肿瘤体积/mm ³				
		第 6 天	第 8 天	第 10 天	第 12 天	第 14 天
荷瘤对照组	—	70.1 ± 6.54	423.6 ± 57.3	653.9 ± 127.5	1 175.0 ± 337.4	1 783.0 ± 656.1
CTX 组	20	50.9 ± 15.6	306.5 ± 38.6 ^{△△}	447.1 ± 73.5 ^{△△}	686.9 ± 404.4 ^{△△}	816.4 ± 469.1 ^{△△}
THPS 组	100	65.9 ± 22.9	347.4 ± 69.6	539.5 ± 149.5	868.8 ± 383.1	1 587.0 ± 576.1
	200	63.2 ± 16.9	326.6 ± 63.5 ^{△△}	476.5 ± 126.8 ^{△△}	758.1 ± 259.4 [△]	1 165.4 ± 271.3 [△]
	400	66.9 ± 14.8	351.3 ± 75.9	545.8 ± 50.4	873.7 ± 275.0	1 253.2 ± 571.1
THPS+CTX 组	100+20	52.3 ± 14.9	278.6 ± 49.1 ^{△△}	369.9 ± 68.3 ^{△△}	589.8 ± 194.3 ^{△△}	631.3 ± 279.2 ^{△△}
	200+20	46.9 ± 20.2 [△]	219.6 ± 47.6 ^{△△#}	345.4 ± 85.2 ^{△△}	454.3 ± 130.4 ^{△△}	465.1 ± 103.9 ^{△△}
	400+20	49.5 ± 14.6	241.7 ± 55.2 ^{△△}	378.8 ± 130.8 ^{△△}	544.9 ± 197.8 ^{△△}	592.5 ± 222.9 ^{△△}

3.5 THPS 对荷瘤小鼠外周血红细胞、血红蛋白、血小板和白细胞的影响

与正常对照组比较, 荷瘤对照组小鼠红细胞、血红蛋白、血小板和白细胞无明显差别。与荷瘤对照组比较, THPS 各剂量组对红细胞、血红蛋白、血小板和白细胞均无明显影响; CTX 对荷瘤小鼠红细胞、血红蛋白和血小板无明显影响, 而能明显降低白细胞数 ($P < 0.01$)。但 THPS 各剂量合用 CTX 后, 与 CTX 组相比, 各剂量组白细胞均明显升高, 结果见表 3。

4 讨论

在抗肿瘤细胞免疫中, T 细胞介导的特异性免

疫反应和 NK 细胞介导的非特异性免疫反应起着重要作用。CD3 抗原是一种多链的糖蛋白, 存在于所有成熟的 T 细胞上, 是检测外周血中成熟 T 细胞总数的标志。NK 细胞是一群广谱的杀伤细胞, 作为免疫监视第一道防线, 能直接杀伤肿瘤细胞, 对阻止肿瘤转移和生长起重要作用。CTX 是公认的治疗肿瘤的有效药物之一, 具有细胞毒作用。在杀灭肿瘤细胞的同时, 抑制机体免疫功能和骨髓造血功能, 导致细胞免疫功能紊乱、贫血、血小板和白细胞数减少。细胞免疫功能紊乱在肿瘤的发生发展中起重要作用, 也是导致目前肿瘤患者“难以治愈”现状

表3 THPS对荷瘤小鼠外周血红细胞、血红蛋白、血小板和白细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of THPS on red blood cell, hemoglobin, platelet, and leukocyte in peripheral blood ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	红细胞/(×10 ¹² L ⁻¹)	血红蛋白/(g·L ⁻¹)	血小板/(×10 ⁹ L ⁻¹)	白细胞/(×10 ⁹ L ⁻¹)
正常对照组	—	8.15±1.33	147.5±13.7	684.3±118.6	7.52±2.34
荷瘤对照组	—	7.28±0.92	127.5±11.5	666.9±75.5	8.73±2.08
CTX组	20	8.01±0.75	143.1±14.2	576.3±106.1	3.62±1.07 ^{*△△}
THPS组	100	7.84±0.76	131.2±13.4	681.7±117.9	9.18±2.35 ^{##}
	200	7.78±1.12	133.4±17.6	693.2±110.9	9.67±2.20 ^{##}
	400	8.56±0.94	147.9±11.3	632.7±113.8	9.84±2.79 ^{##}
THPS+CTX组	100+20	8.26±0.99	146.1±20.8	596.9±111.9	7.87±2.38 ^{##}
	200+20	7.50±1.20	130.8±19.7	600.9±94.2	8.37±2.95 ^{##}
	400+20	7.38±0.73	127.2±11.5	621.3±141.3	8.73±2.89 ^{##}

的主要原因之一^[6]。如何提高机体的免疫应答能力,减轻化疗药物所致的免疫抑制和骨髓抑制,是肿瘤治疗研究的重要课题。

多糖类化合物能提高机体的免疫功能,增强机体抗肿瘤作用,如活化杀伤性T细胞和巨噬细胞、促进细胞因子分泌^[7]、活化补体等,并提高由化疗所致的免疫功能低下及骨髓抑制状态,对多糖的研究已成为当今抗癌新药及抗癌辅助药研究的热点之一。本实验显示荷瘤小鼠红细胞、血红蛋白、白细胞和血小板无明显改变,隔日ip给予20mg CTX 14d,未能造成小鼠贫血和血小板减少的模型,这可能与CTX剂量及时间有关。THPS是否对贫血和血小板减少的机体产生影响,由于造模不成功而未能观察到,有待以后进一步研究。但该剂量的CTX能造成白细胞明显下降,而THPS各剂量组对CTX所造成的白细胞的下降均有拮抗作用。这说明THPS能够改善CTX所导致的白细胞下降,提高机体由于粒细胞的缺乏而导致的抗感染能力下降。中剂量的THPS对荷瘤小鼠S180抑瘤作用最强,大剂量和小剂量的THPS效果不及中剂量,说明有最适剂量。李晓玉等^[8]认为糖类免疫调节作用的一个显著特点是具有最适量效,这可能与多糖的生物活性主要通过相应受体识别才能发挥作用有关。中剂量THPS明显增加荷瘤小鼠NK细胞数;与CTX合用,能明显抑制CTX所致的CD3⁺T细胞和NK细胞的

数量下降。结合本课题组先前报道^[9],THPS抑瘤机制可能与提高T细胞及NK细胞介导的特异性与非特异性免疫应答,减轻细胞毒药物CTX所致的免疫抑制和骨髓抑制,增强机体的抗肿瘤能力有关。

参考文献

- [1] 马骏,任远,崔祝梅,等. 红芪多糖对氢化可的松所致免疫抑制模型小鼠T淋巴细胞亚群的影响 [J]. 甘肃中医学院学报, 2003, 20(3): 18-19.
- [2] 黄正良,崔祝梅. 红芪多糖抗衰老作用的实验研究 [J]. 中草药, 1992, 23(9): 469-473.
- [3] 陶文若,郭解宁. 红芪多糖对动物心脏功能的影响 [J]. 中草药, 1993, 24(6)
- [4] 李成义,张雅聪. 红芪研究进展 [J]. 中草药, 1991, 22(12): 559-560.
- [5] 李云志,黄静,郭弘川,等. 红芪化学成分和抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药,2009, 40(8): 1195-1198.
- [6] 陈尉峰. 医学免疫学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [7] Tang W, Heman I, Bertram B. Recent development of anti-tumor agents from Chinese herbal medicines, Part II. High molecular compounds [J]. *Planta Med*, 2003, 69(2): 193-201.
- [8] 李晓玉,李俊. 免疫药理学新论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [9] 姚宝泰,赵健雄,王学习,等. 红芪总多糖体内抗肿瘤的实验研究 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(7): 627-629.