

· 药理实验与临床观察 ·

鲍鱼多糖对荷人鼻咽癌裸鼠抗癌作用的研究[△]

深圳海王生物工程股份有限公司研究发展部 (518054)

王 兵^{*}

中山大学

蒋建敏 许东晖 许实波 邵志宇 林永成

摘 要 采用人癌裸鼠移植模型以及电镜观察,对从杂色鲍 *Haliotis diversicolor* Reeve 中提取得到的鲍鱼多糖 (abalone polysaccharide, AP) 进行抗肿瘤药理作用研究。结果表明: AP 对裸鼠移植人鼻咽癌具有明显的抑制作用,能明显抑制人鼻咽癌的生长,诱导肿瘤细胞凋亡和坏死,对荷癌裸鼠体重增长无明显抑制作用。

关键词 鲍鱼多糖 裸鼠 人鼻咽癌 抗癌作用

Antitumor Effect of Abalone Polysaccharide on Human Nasopharyngeal Cancer Inoculated on Nude Mice

Development Department, Shenzhen Neptunus Biotechnology Stock Co. Ltd. (Shenzhen 518054) Wang Bing

Sun Yat-sen University Jiang Jianmin, Xu Donghui, Xu Shibo, Shao Zhiyu and Lin Yongcheng

Abstract Antitumor effect of abalone polysaccharide (AP) isolated from *Haliotis diversicolor* Reeve was studied on nude mice implanted with human nasopharyngeal cancer cells and investigated under electron microscope. The results showed that AP could significantly inhibit the growth of implanted cancer cells by inducing cell apoptosis and necrosis.

Key words abalone polysaccharide (AP) nude mice human nasopharyngeal cancer antitumor effects

天然产物中存在着广泛的生物活性多糖。多糖类具有增强免疫功能、抗辐射、抑制肿瘤生长、抗炎、降血糖等广泛的生物学活性^[1],近年来越来越受到人们的普遍关注。我国海域辽阔,海洋生物资源十分丰富,海洋生物中的生理活性物质是研究和发展新化学成分,开发新药的天然宝库。鲍鱼多糖 (abalone polysaccharide, AP) 是从海洋软体动物杂色鲍 *Haliotis diversicolor* Reeve 中提取得到的水溶性多糖,我们对其进行了抗肿瘤药理作用研究,并对其机制进行了初步探讨。

1 实验材料

1.1 药品与试剂: AP 为白色粉末,由林永成教授等提取、分离提供,临用时以生理盐水配成一定浓度的溶液备用。阳性对照药猪苓多糖注射液 (zhuling polysaccharide, ZP),连云港正大天晴制药有限公司产品,批号: 980507。环磷酰胺 (cyclophosphamide, Cy),上海华联制药有限公司产品,批号: 970701。

1.2 动物与瘤株: BALB/c 系裸小鼠 (nude mice,

NM),由中山医科大学裸鼠实验室提供,6~8 周龄,雌雄兼用,放置在空气净化室内繁殖、饲养,室内保持 (25±2)℃。全部实验过程达到 SPF (Specific Pathogen-free) 条件。人鼻咽癌瘤源 (CNE-1) 由中山医科大学实验动物中心提供。

2 实验方法

2.1 鼻咽癌接种: 将瘤源裸鼠脱颈椎处死,取出鼻咽癌肿瘤组织,切成 2 mm×2 mm×2 mm 的小瘤块,用套管针将瘤块接种于每只裸鼠的背部皮下,形成人鼻咽癌裸鼠模型。

2.2 动物分组及实验方法: 裸小鼠 48 只,接种后次日随机分为 6 组,即空白对照组, Cy 组, ZP 组, AP 10, 20, 40 mg/kg 3 个剂量组。实验组于接种 24 h 后 ip 样品每只 0.20 mL,对照组在同样条件下 ip 生理盐水每只 0.20 mL,每天 1 次,连续 30 d。各组裸小鼠分别从给样品后 15 d 起每 3 天作一次活体肿瘤大小测量,以最大长径 (L) 和横径 (S) 按下式计算肿瘤体积 (V),绘制不同治疗组肿瘤生长曲线, $V(\text{mm}^3) = 0.5 \times L \times S^2$ 。

* Address Wang Bing, Shenzhen Neptunus Biotechnology Stock Co. Ltd., Shenzhen

王 兵,男,中山大学药学院硕士毕业,现在深圳海王生物工程股份有限公司从事新药研究开发工作。

△国家海洋八六三计划 (819)“海洋生物技术”课题资助项目

停药次日处死动物,按下式计算抑瘤率:

抑瘤率(%)=(1-给药组平均瘤重/对照组平均瘤重)×100%。

电镜观察:处死动物后,立即取出 0.5~ 1 mm³ 大小的癌组织,迅速浸入预冷的前固定液(2.5% 戊二醛加 2% 多聚甲醛)固定 4 h,再用 1% 锇酸作用后固定 2 h,酒精、丙酮梯度脱水,Epon 812 渗透包埋,LKBIV 型超薄切片机切片,铀铅双重染色,在透射电镜下进行观察

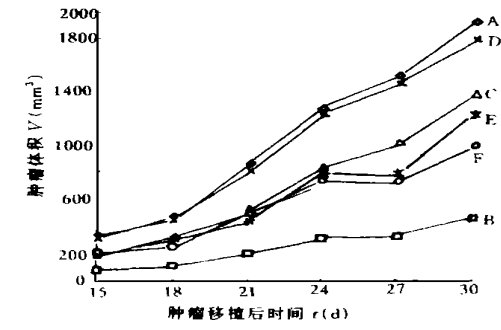
表 1 AP 对荷人鼻咽癌裸鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂 量 (mg /kg)	动物数(只)		体 重(g)		体重增加 (g)
		始	末	始	末	
空白对照	—	8	8	19.55± 1.35	23.96± 2.32 [*]	+ 4.41
Cy	10	8	8	22.05± 2.96	24.02± 4.23	+ 1.97
ZP	20	8	8	20.52± 2.56	23.16± 2.36	+ 2.64
AP	10	8	8	19.59± 2.03	22.36± 2.59	+ 2.77
	20	8	8	22.55± 1.97	25.39± 2.13 [†]	+ 2.84
	40	8	8	21.19± 1.36	24.58± 1.71 [*]	+ 3.39

与本组治疗前比较^{*} P<0.05 ^{**} P<0.001

长无明显抑制作用。

3.2 对人鼻咽癌生长的影响:结果如图 1 所示 A 10 mg/kg 组对肿瘤体积增长无明显的抑制作用,对肿瘤的抑制率为 3.09%~ 6.83%;AP 20 和 40 mg/kg 组对肿瘤的生长均有明显的抑制作用,对肿瘤的抑制率分别为 35.75%~ 49.20% 和 36.58%~ 52.40%。ZP 对肿瘤生长的抑制率为 27.84%~ 42.56%。Cy 的对肿瘤生长的抑制率为 74.80%~ 77.92%。



A 空白对照组 B-Cy 组 C-ZP 组 D-AP 10 mg/kg
E-AP 20 mg/kg F-AP 40 mg/kg

图 1 不同治疗组肿瘤生长曲线

3.3 对人鼻咽癌的治疗作用:结果如表 2 所示 AP 10, 20, 40 mg/kg 连续给药 30 d 的荷人鼻咽癌裸鼠,其瘤重抑制率分别为 9.33%, 36.64%, 46.72%, 呈明显的量效关系,其中 20 和 40 mg/kg 剂量组有明显的抗肿瘤作用 (P<0.01)。

3.4 对人鼻咽癌肿瘤细胞结构的影响:结果如图 2~ 5 所示。空白对照组(图 2)癌细胞均匀分布,胞膜

3 实验结果

3.1 对裸鼠体重增长的影响:结果如表 3 所示 空白对照组裸小鼠的体重与 30 d 前比较,体重增加显著 (P<0.001);Cy 对裸小鼠体重的增长有较明显的抑制作用,给药 30 d 体重与治疗前比较 P>0.05,在用药期间,AP 各剂量组的裸小鼠的体重明显增长,健康状况良好,用药 30 d 后与用药前的体重比较, P<0.05~ 0.001,表明 AP 对裸鼠体重增

表 2 AP 对裸鼠移植人鼻咽癌的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 (mg /kg)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
空白对照	—	1.190± 0.307	—
Cy	10	0.290± 0.087 ^{**}	75.63
ZP	20	0.814± 0.269 [*]	31.60
AP	10	1.079± 0.223	9.33
	20	0.754± 0.197 [*]	36.64
	40	0.634± 0.251 [*]	46.72

与空白对照组比较:^{*} P<0.05 ^{**} P<0.01 ^{***} P<0.001

完整,胞内染色质分布较均匀,可见基本正常的细胞器;除极少数坏死瘤细胞外,未见凋亡瘤细胞 AP 10 mg/kg 剂量组(图 3)与空白对照组比较,癌细胞形态结构无明显变化 AP 20 mg/kg 剂量组(图 4)有较多的癌细胞出现凋亡的特征,表现为细胞皱缩,胞浆密度增高,染色质在核膜下浓聚、边集,细胞间出现大量的凋亡小体,有少数变性坏死的癌细胞。

AP 40 mg/kg 剂量组(图 5)癌组织内可见凋亡现象,但量少,同时可见多数变性坏死的癌细胞。结果提示在体内 AP 可诱导鼻咽癌细胞死亡,包括凋亡和坏死 其中癌细胞以哪种死亡的方式为主,依用药的剂量不同而异。

4 讨论

实验结果可见,给予 AP 的荷人鼻咽癌裸鼠,其肿瘤生长明显减缓,表明 AP 可明显抑制人鼻咽癌的生长;另外还可见到,AP 和 Cy 组有着不同的肿瘤生长曲线,提示 AP 的抗癌作用不同于 Cy 对癌细胞的直接杀伤。具体作用机制有待进一步研究。

人体肿瘤裸鼠移植瘤模型在抗肿瘤药物研究中

的应用日趋广泛,尤其在新抗肿瘤药物的筛选、对特定类型肿瘤的药效学评价、及肿瘤导向治疗研究中具有重要的作用^[2]。

药物对异种移植的人体肿瘤的作用与药物的临床疗效有良好的相关性^[3]。可见,人癌裸鼠移植模型的建立,开辟了直接针对人癌进行抗肿瘤药物研究的新途径。研究结果表明,AP对荷人鼻咽癌裸鼠具有明显的抗癌作用。

近年来研究表明,细胞凋亡在肿瘤的发生、发展和治疗中有重要意义。目前认为肿瘤的发生和发展既与细胞的异常增殖有关,同时也与细胞凋亡异常有关^[4]。放疗、热疗、抗体、淋巴因子等均可促进肿瘤细胞凋亡。对细胞凋亡的研究,为肿瘤治疗寻找新靶点、制定新策略带来了新希望。

电镜观察是鉴定细胞凋亡的最佳选择之一^[5]。本实验结果可见 AP 20 mg/kg 剂量组的癌细胞主要出现凋亡现象,AP 40 mg/kg 剂量组的癌细胞的死亡方式则主要为变性坏死。而 AP 20和 40 mg/kg

剂量对裸鼠移植人鼻咽癌均有明显的抑制作用,抑瘤率为 36.64%~46.72%。由此可见,AP抑瘤作用机制之一是 AP能诱导癌细胞死亡,包括凋亡和坏死。其中癌细胞以哪种死亡的方式为主依用药剂量不同而异,与有关报道相似^[6]。

本研究表明,AP对荷人鼻咽癌裸鼠具有明显的抗癌作用,给予 AP的裸小鼠在实验中一般状况良好,在本实验条件下,尚未见 AP出现毒副作用。提示 AP在海洋抗癌药物中具有开发价值和应用前景。

参考文献

- 1 李忠.药学报,1988,23(8):455
- 2 曾知真.上海第二医科大学学报,1992,12(2):162
- 3 Fujita M, Hayata S, Taguchi T. J Surg Oncol, 1980, 15(3): 211
- 4 Kerr J F R, Winterford C M, Harmon B V. Cancer, 1994, 73: 2013
- 5 Claire M P, Harris B, Harinder G. Ultrastruct Pathol, 1995, 19: 221
- 6 Matsuzaki, Kurokawa N, Terai S. Jpn J Cancer Res, 1996, 87(2): 170

(2000-02-29收稿)

白首乌甾体总苷的体外抗肿瘤作用[△]

浙江省医学科学院(杭州 310013) 张如松* 叶益萍 刘雪莉

摘要 体外用细胞生长曲线法、MTT试验、蛋白质含量测定法及形态学观察研究了白首乌甾体总苷(CG)的抗肿瘤作用。结果表明:CG对 Hce-8693 PC₃、Hela PAA 4种实体瘤细胞均有较强的体外细胞毒作用,且呈浓度依赖性。CG作用于 Hela细胞 4 d,形态观察表现为细胞膜皱缩、细胞核固缩、浓聚。

关键词 白首乌 白首乌甾体总苷 细胞毒活性

Studies on *in vitro* Antitumor Activity of Total Steroidal Glycoside from the Root of *Cynanchum auriculatum*

Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences (Hangzhou 310013) Zhang Rusong, Ye Yiping and Liu Xueli

Abstract *In vitro* cytotoxicity of total steroidal glycoside (CG) from the root of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight was studied on Hce-8693, PC₃, Hela and PAA solid tumor cells by determining cell growth curve, MTT test, protein content assay and morphological observation. The results showed that CG exhibited potent cytotoxic effect on all four solid tumor cells lines in a concentration-dependent manner. After 4 d of treatment with CG, Hela cells proliferation distinctly declined with dramatic morphologic alteration, including some cell membrane shrinkage and nuclei pyknosis.

Key words the root of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight total steroidal glucoside from the root of *Cynanchum auriculatum* (CG) cytotoxic activity

Address: Zhang Rusong, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou

张如松,副研究员,硕士生导师,浙江省跨世纪学术和技术带头人培养人员。1977年毕业于浙江医科大学药学院,1992年获日本大阪大学药理学博士。主要从事天然药物活性成分的研究,特别对萝藦科植物含有 C₂₁甾体类成分有较深入的研究,已分离确定了 9种新的 C₂₁甾体类成分。近 3年来,主持浙江自然科学基金项目 2项及其它基金项目多项。在国内外杂志发表论文 20余篇。

[△]浙江省自然科学基金资助 No. 396484