

海藻多糖对肿瘤细胞膜流动性的影响

季宇彬,高世勇,孔琦*

(哈尔滨商业大学 药物研究所博士后科研工作站,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 研究海藻多糖的抗肿瘤作用机制。方法 采用荧光探针 DPH法,观察海藻多糖对 S_{180} 和 H_2 小鼠细胞膜流动性的影响。结果 海藻多糖可升高 S_{180} 荷瘤小鼠肿瘤细胞的膜流动性,降低 H_2 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜流动性。结论 海藻多糖可恢复肿瘤细胞膜流动性至正常细胞膜流动性而达到抗肿瘤的作用。

关键词:海藻多糖;荷瘤小鼠;细胞膜流动性;抗肿瘤作用机制

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)05-0435-03

Effect of sea-algae polysaccharide to tumor cell membrane fluidity

Ji Yu-bin, GAO Shi-yong, KONG Qi

(Institute of Materia Medica, Harbin Commercial University, Harbin Heilongjiang 150076, China)

Abstract Object To study the antitumor mechanism of sea-algae polysaccharide (SP). **Methods** The membrane fluidity of the S_{180} and H_2 mice was observed by DPH fluorescent probe method. **Results** SP could increase the membrane fluidity of the S_{180} and decrease that of the H_2 . **Conclusion** SP showed the antitumor effect through returning the tumor cell membrane fluidity to the normal one.

Key words sea-algae polysaccharide (SP); tumor mice; tumor cell membrane fluidity; antitumor mechanism

海藻多糖 (SP) 是从石花菜 *Eucheuma gelatinae* (Esp.) J Ag., 昆布 *Ecklonia kurome* Okam 海藻子 *Sargassum pallidum* (Turn.) Ag. 等海藻中提取出来一种酸性多糖 (硫酸类多糖)。我国传统中医常用马尾藻等治疗乳腺癌和子宫癌^[1]。国外也开展了使用海藻多糖进行肿瘤防治的研究^[2,3]。也有报道海藻多糖可提高巨噬细胞的吞噬能力,提高肿瘤细胞 CAT 和 SOD 酶的活性,抑制肿瘤细胞中 MDA (丙二醛)的合成而达到抗肿瘤的作用^[4]。本研究通过海藻多糖对肿瘤细胞膜流动性影响的观察,阐明海藻多糖的抗肿瘤作用机制。

1 材料

1.1 药品:海藻多糖 (哈尔滨商业大学药物研究所提供,批号: 990517); 5-氟嘧啶 (5-Fu,上海制药十二厂,批号 990517); DPH (1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene, Fluke AG 产品)

1.2 实验动物及瘤株:昆明种小鼠由哈尔滨医科大学实验动物部提供,雌雄各半,体重 (20±2) g S_{180} 及 H_2 荷瘤小鼠购自哈尔滨市肿瘤医院肿瘤研究所

1.3 主要实验仪器: RF-540 荧光分光光度计 (日本岛津); 恒温水浴箱 (厦门医疗电子仪器厂); 超净工作台 (苏州净化设备厂); 水平高速离心机 (北京医用离心机厂)。

2 实验方法

2.1 小鼠肿瘤模型的建立

2.1.1 抽取腹水: 将接种 7 d 的小鼠,颈椎脱臼处死,固定于蜡板上,腹部皮肤消毒后,剪开并剥去腹部皮肤,用高温消毒过的注射器抽取腹水,放入无菌容器内,置冰块中保存。另取小量腹水,置于加有肝素的试管中,作为观察细胞形态及细胞记数用。将注射器中剩余的腹水,滴一滴于载玻片上,推片,瑞氏染色,并进行细胞分类记数,其中癌细胞数为 97% 以上方可使用。

2.1.2 接种: 腹水用无菌生理盐水按 1:4 稀释,对 S_{180} 作腋下部位注射接种,每鼠注射接种 0.2 mL,对 H_2 作 ip 接种,每鼠注射 0.2 mL。

2.2 实验分组与给药: 将小鼠随机分为 5 组: 阴性对照组,阳性对照组,海藻多糖高、中、低剂量组,每组 10 只。小鼠接瘤 24 h 后 ip 药物,每天 1 次,连续

* 收稿日期: 2001-11-26

基金项目: 教育部重点项目 (01035); 黑龙江省自然科学基金资助 (D-0018); 黑龙江省杰出青年基金资助 (J9906); 黑龙江省教育厅骨干教师项目资助 (2001015); 哈尔滨市科委后备基金资助 (0181218007)

作者简介: 季宇彬,男,45岁,教授,博士,博士生导师。

给药 7 d 阴性对照组给生理盐水,阳性对照组给 5-Fu,治疗组给海藻多糖 停药次日处死动物,测相关指标

2.3 膜流动性的测定

2.3.1 肿瘤细胞的预处理^[5]: 从已接种腹水癌细胞 1 星期后的小鼠腹腔中,取腹水 1 mL,用生理盐水 10 mL 洗涤 1 次,1 000 r/min 离心 10 min,用 10 mL PBS 溶液洗涤 1 次。若腹水中有红细胞,应多洗两次,将红细胞除去。将腹水癌细胞悬浮在含有 10% 小牛血清的 Eagle 液中,细胞浓度 1×10^7 / mL 用台盼蓝检查,95% 以上细胞是活细胞。对 S₁₈₀ 肉瘤则首先将其剥离出后放入冰冷 0.9% NaCl 中洗去血液,滤纸吸干,称重后按 25:1 加入匀浆液中,在冰浴中用玻璃匀浆器制成组织匀浆,三层纱布过滤,滤液处理同腹水癌细胞

2.3.2 肿瘤细胞荧光标记: 取已准备好的细胞 2 mL,离心,用 PBS 洗涤 1 次,离心,加 2 mL 2×10^{-6} mol/L DPH,25℃ 温育 30 min,再用 PBS 洗涤 1 次,最后悬浮在 4 mL PBS 溶液中。

2.3.3 荧光偏振度 (P) 的测定: 用荧光分光光度计,采用氙灯光源,荧光激发波长为 362 nm,发射波长为 432 nm,分别测定与激发偏振光振动方向平行、垂直时的荧光偏振光强度 $I_{\parallel}$ 、 $I_{\perp}$,计算 P 值 $P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$,微粘度 $\eta = 2P / (0.46 - P)$

3 实验结果

3.1 海藻多糖对 S₁₈₀小鼠肿瘤细胞膜流动性的影响: 见表 1

表 1 海藻多糖对 S ₁₈₀ 小鼠肿瘤细胞膜流动性的影响				
组 别	剂量 (mg/kg)	动物 (n)	P	η
生理盐水	-	10	0.198 ± 0.020 8	1.540 ± 0.278 9
5-Fu	25	10	0.180 ± 0.018 8 [*]	1.307 ± 0.222 6 [*]
海藻多糖	100	10	0.141 ± 0.024 5 ^{**}	0.935 ± 0.196 8 ^{**}
	50	10	0.177 ± 0.017 7 [*]	1.267 ± 0.205 4 [*]
	25	10	0.187 ± 0.016 5	1.392 ± 0.205 6

与生理盐水组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01

结果表明: 海藻多糖可显著降低 S₁₈₀肉瘤小鼠肿瘤细胞膜微粘度,即可显著升高肿瘤细胞膜流动性。其中海藻多糖高剂量组经统计学处理,差异非常显著 (P < 0.01),而中剂量组差异比较显著 (P < 0.05) 5-Fu 组也具有同样的作用,但作用强度不及海藻多糖

3.2 海藻多糖对 H₂₂小鼠肿瘤细胞膜流动性的影响: 见表 2 结果表明: 海藻多糖可显著降低 H₂₂小鼠肿瘤细胞膜流动性,其中高、中剂量组与生理盐水组

比较微粘度显著升高,经统计学处理差异显著 (P < 0.01, P < 0.05)。5-Fu 也有同样作用,但疗效较海藻多糖组弱

表 2 海藻多糖对 H ₂₂ 小鼠肿瘤细胞膜流动性的影响				
组 别	剂量 (mg/kg)	动物 (n)	P	η
生理盐水	-	10	0.154 ± 0.009 4	1.016 ± 0.094 8
5-Fu	25	10	0.165 ± 0.006 7 [*]	1.123 ± 0.071 0
海藻多糖	100	10	0.178 ± 0.006 5 [*]	1.268 ± 0.076 5 [*]
	50	10	0.172 ± 0.011 2 [*]	1.201 ± 0.124 6
	25	10	0.162 ± 0.008 4	1.089 ± 0.087 1

与生理盐水组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01

4 讨论

细胞膜流动性的大小是生物体的一个参数,正常组织器官细胞膜必须要维持一定的膜流动性。伴随着肿瘤的恶变,调节机制发生障碍,膜流动性也随之改变。细胞膜流动性是反映细胞功能状态的综合指标,在已有的关于恶性肿瘤细胞及正常细胞的对比分析中,人们发现细胞膜流动性的变化趋势依瘤细胞来源的不同而异。当某些组织细胞发生癌变时,膜中胆固醇含量减少,胆固醇与磷脂克分子数的比值减小,因而导致某些肿瘤细胞膜的流动性高于起源组织的正常细胞,如各种白血病细胞、肺癌细胞等。与之相反,有些组织细胞发生癌症时,胆固醇与磷脂的克分子数的比值增加,膜流动性降低。本研究表明: 海藻多糖高、中剂量组均可使 S₁₈₀肉瘤小鼠肿瘤细胞膜流动性明显升高 (P < 0.05, P < 0.01),而使 H₂₂小鼠肿瘤细胞膜流动性明显降低,且均具有剂量相关性。同时可以观察到 S₁₈₀小鼠生理盐水组与 H₂₂小鼠生理盐水组细胞膜流动性相差甚大,经海藻多糖治疗后,二者膜流动性趋于相同。也就是说, S₁₈₀肉瘤小鼠肿瘤细胞膜流动性较正常细胞膜流动性低,而 H₂₂荷瘤小鼠肿瘤细胞膜流动性较正常细胞膜流动性高,在经海藻多糖治疗后, S₁₈₀小鼠细胞膜流动性升高,而 H₂₂小鼠肿瘤细胞膜流动性降低,并且在数值上趋于相近,即膜流动性均趋于正常细胞膜流动性。这与文献报道实体瘤细胞膜流动性较相应正常细胞膜流动性低,而腹水癌等的细胞膜流动性较相应正常细胞膜流动性高相符合。

细胞膜流动性受多种化学和物理因素的调节,其维持主要依赖膜中胆固醇水平和脂肪不饱和程度。当某些组织细胞癌变时,膜中胆固醇含量减少,胆固醇与磷脂克分子数的比值减小,因而导致某些肿瘤细胞膜流动性高于起源组织的正常细胞,如各种白血病细胞、肺癌细胞等。与之相反,有些组织细

胞发生癌变时,胆固醇与磷脂的克分子数比值增加,膜流动性降低,如肝癌细胞。同时,也有人认为晚期和老年肿瘤患者机体的免疫反应性降低,可能与细胞膜中胆固醇含量的改变有关。Roozemon等也发现,效应细胞或靶细胞膜流动性的改变,都会抑制NK细胞介导的细胞毒作用。因此细胞膜中胆固醇含量的改变而引起细胞膜流动性的改变,进而改变正常细胞的功能及机体免疫力,从而促发细胞癌变。本实验表明海藻多糖可以使肿瘤细胞膜流动性恢复正常,进而恢复其正常细胞功能和机体免疫力而达到抗肿瘤作用。海藻多糖恢复细胞膜流动性的作用很可能与海藻多糖中的有效成分对胆固醇的改变有

关。这有待于进一步的工作来证实。

参考文献:

- [1] 丁源,江涛. 海洋药物在祖国医学中的地位和作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1981, 6: 32.
- [2] Yamonoto M, Hawkins W. Drugs from the sea[J]. Marine Natural Products, 1984, 8(5): 402-421.
- [3] Manyamall H. A brief account of the chemical and pharmacological studies of marine alarine alage[J]. 海洋药物, 1983, 3(2): 68-71.
- [4] 季宇彬,张秀娟,窦淑珍,等. 5-Fu 海藻多糖、黄芪多糖复方抗癌制剂抗肿瘤药理作用的研究[J]. 黑龙江商学院学报, 1999, (2): 1-2.
- [5] 林克椿,聂松青,薄惠卿. 用荧光探针 DPH 研究腹水癌细胞膜脂流动性[J]. 生物化学与生物物理进展, 1981, 6: 32.

当归醇沉物及其中性组份体外对巨噬细胞分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-1 的影响

奚瑾磊,彭仁琇,王智勇*

(武汉大学医学院 药理教研室,湖北 武汉 430071)

摘要: 目的 观察当归醇沉物 (ESA) 及其中性组分 (ESA-1) 体外对小鼠腹腔巨噬细胞分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-1 的影响。方法 L929细胞株细胞毒法测 $\text{TNF-}\alpha$; L929细胞增殖法测 IL-1 。结果 ESA、ESA-1 与小鼠腹腔巨噬细胞 (MP) 共同培养可显著增强其 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-1 的分泌。在 $5\sim 20\mu\text{g/mL}$ 浓度范围, ESA 的这种作用呈剂量依赖性; ESA-1 虽有明显的作用,但未表现出剂量依赖。结论 当归醇沉物及其中性组分体外可增强小鼠腹腔巨噬细胞分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-1 。

关键词: 当归醇沉物;巨噬细胞; $\text{TNF-}\alpha$; IL-1

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)05-0437-03

Effects of ethanol sediments from tuber of *Angelica sinensis* and its litmusless component on secreting $\text{TNF-}\alpha$ and IL-1 of macrophages *in vitro*

XI Jin-lei, PENG Ren-xiu, WANG Zhi-yong

(Department of Pharmacology, Medical College of Wuhan University, Wuhan Hubei 430071, China)

Abstract **Object** To investigate the effects of ethanol sediments obtained from the tuber of *Angelica sinensis* (Oliv). Diels (ESA) and its litmusless component (ESA-1) on the secretion of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-1 by mice peritoneal macrophages *in vitro*. **Methods** L929 cell line cytotoxicity was used for the assay of $\text{TNF-}\alpha$. The proliferation of L929 cell line was used for the assay of IL-1 . **Results** The secretion of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-1 by mice peritoneal macrophages which were co-cultured with ESA or ESA-1 *in vitro* can be significantly promoted. At the concentrations in range of $5\sim 20\mu\text{g/mL}$, there is a dose-dependence in the action of ESA, while there is not the similar effect of ESA-1, even though it showed the marked effect. **Conclusion** ESA and ESA-1 can enhance the secreting $\text{TNF-}\alpha$ and IL-1 of mice peritoneal macrophages *in vitro*.

Key words ethanol sediments from the tuber of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (ESA); macrophages; $\text{TNF-}\alpha$; IL-1

* 收稿日期: 2001-09-04

作者简介: 奚瑾磊 (1975-), 男, 湖北浠水县人, 助教, 生化药理专业硕士, 现工作于武汉科技大学医学院药理教研室, 研究方向为生化药理、中药药理。Tel (027) 86875504 E-mail frank922@yeah.net