

护生宝口服液对 H22肝癌小鼠抑癌作用的实验研究

陈建业, 张 翥, 陈俊杰, 李瑞祥, 曾益新*

(四川大学 华西医学中心, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 研究护生宝 (HSB) 口服液对荷 H22肝癌小鼠实体瘤的抑瘤作用以及对荷瘤小鼠机体免疫功能的影响, 为 HSB的临床应用提供实验依据。方法 3种剂量的 HSB和生理盐水 ig H22肝癌小鼠动物模型, 观察各处理组小鼠实体瘤重、脾重、胸腺重以及淋巴细胞增殖的变化情况。结果 HSB实验组小鼠实体瘤重显著低于生理盐水对照组, 平均抑瘤率达 53.28%。同时, HSB药物组小鼠的胸腺指数和淋巴细胞转化率明显高于对照组 ($P < 0.01$)。结论 HSB口服液对荷 H22肝癌小鼠的实体瘤具有较强的抑瘤作用, 并能显著提高机体的免疫功能, 促进淋巴细胞增殖和免疫应答。

关键词: 护生宝; 肿瘤抑制; 免疫调节

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)10-0929-03

Inhibitory effect of HUSHENGBAO ORAL LIQUOR* on H 22 hepatic cancer mice

CHEN Jian-ye, ZHANG Xian, CHEN Jun-jie, LI Rui-xiang, ZENG Yi-xin

(West China Medical Science Center, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Key words HUSHENGBAO ORAL LIQUOR; tumor inhibition; immunoregulation

* HUSHENGBAO ORAL LIQUOR is a Chinese herbal prescription with the function of anti-Tumor.

中草药中存在着广泛的生物活性物质, 如多糖类、多酚类、黄酮类、皂苷类。它们所具有的抗氧化、抗辐射、抗肿瘤、增强免疫功能的生物学活性^[1]近年来引起了医学界的普遍关注。中药复方护生宝 (HSB) 口服液是由黄芪、灵芝、绿茶等多味中药根据传统中医理论配伍, 经科学方法提炼精制而成的中药制剂。研究证明 HSB具有明显的抗辐射作用, 是一种有效的辐射防护剂^[2]。为了进一步弄清 HSB的其他药理功能, 我们研究了护生宝的抑瘤作用及其对机体免疫功能的影响, 为临床应用提供可靠的依据。

1 材料

1.1 药物: HSB由黄芪、灵芝、绿茶等多味中药配伍而成, 各组成药均由中山医科大学肿瘤防治中心中药房提供。

1.2 动物与瘤株: 昆明种小鼠, 由广东省卫生厅实验动物中心提供, 体重 18~22 g, 鼠龄 6~8周, 雌雄兼用。H22小鼠肝癌, 由中山医科大学肿瘤研究所惠赠。

1.3 试剂: RPMI 1640 (美国 Gibco 公司) 按说明配制, 新生牛血清 (NBS) (杭州四季青生物工程材

料研究所), 淋巴细胞分离液 (上海试剂二厂), ³H-TdR (上海原子能研究所), ConA (Sigma 公司)。

2 实验方法

2.1 HSB口服液的制备: 按处方将各组分混合, 水浴提取, 浓缩, 无菌双蒸水稀释, 制成生药含量分别为 2.5, 1.75和 1.26 g/mL, 4℃保存备用。动物毒理实验证明本品对动物安全无毒副作用。

2.2 肿瘤接种: 无菌条件下取生长 7~9 d 传代接种的 H22肝癌小鼠腹水, 用生理盐水按 1:1 稀释成细胞悬液 (细胞量约为 6×10^6 /mL), 每只小鼠右腋皮下接种 0.2 mL。

2.3 动物分组: 动物接种后, 随机分成生理盐水对照组和药物组。对照组 ig 生理盐水 30 mL/kg⁰·d。HSB高、中、低剂量组分别 ig HSB 75, 52.5, 37.8 g/kg⁰·d。动物接种 24 h后 ig 给药, 每天 1次, 连续给药 10 d。

2.4 抑瘤率、胸腺指数和脾指数: 动物停药 48 h后眼球放血 (肝素抗凝供免疫学检测) 处死动物, 称体重、瘤重、胸腺和脾重, 计算抑瘤率 (IR)、胸腺指数 (TI) 和脾指数 (SI)。

2.5 淋巴细胞转化率: 将肝素抗凝的眼球血约 0.5

收稿日期: 2001-10-17

作者简介: 陈建业 (1961-), 男, 四川武胜县人, 川北医学院生化副教授, 四川大学华西医学中心分子生物学研究所在读博士, 主要从事神经分子生物学及中草药治病机制的研究。四川大学华西医学中心分子生物学研究所重组 DNA室 Tel: (028) 85501265

* 中山医科大学肿瘤防治中心 (广州 510060)

mL用淋巴细胞分离液分离外周淋巴细胞,洗涤 2 次,用 10% NBS RPMI 1640培养液调整细胞浓度为 3×10^6 /mL,在 96孔细胞培养板上加入细胞 ConA 及培养液,每个样本做 2个重复孔,37℃、5% CO₂条件下培养 48 h 后每孔加入 ³H-TdR 18.5 kBq,再培养 18 h,用多头细胞收集器收集细胞,液闪仪测定 cpm 值,以对照组与药物组的 cpm 值进行显著性比较。

2.6 统计分析:所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异显著性判断用 *t* 检验

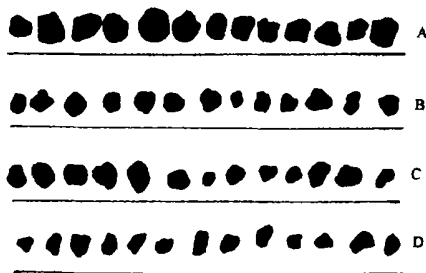
3 实验结果

3.1 HSB对荷瘤小鼠体重增长的影响:结果如表 1 所示 生理盐水对照组和各药物组小鼠体重与实验前比较均有显著增加,但生理盐水对照组与药物组之间以及不同剂量药物组之间小鼠体重的差异无显著性 (*P* < 0.05) 表明 HSB对荷瘤鼠体重无明显的增强或抑制作用。

表 1 HSB对荷瘤小鼠体重的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物 (只)		体 重 (g)		体重变化 (g)
		始	末	始	末	
对照	-	13	13	20.65± 2.13	28.55± 3.65	+ 7.9
HSB	37.8	13	13	21.04± 3.13	27.74± 3.13	+ 6.7
	52.5	13	13	20.47± 1.98	28.07± 2.99	+ 7.6
	75.0	13	13	21.39± 2.75	29.69± 3.71	+ 8.3

3.2 HSB对荷瘤鼠肿瘤生长的影响:结果如图 1 和表 2所示。不同剂量的 HSB连续 ig 给药 10 d,能显著抑制小鼠肿瘤的生长 (*P* < 0.01),平均抑瘤率高达 53.28%。随着 HSB给药剂量的增加,对肿瘤的抑制作用有所增强,但在本实验剂量范围内未见明显量效关系 (*P* > 0.05) 说明 HSB在上述给药剂量下对肿瘤均有显著抑制作用。



A-对照组 B- D-HSB低、中、高剂量组

图 1 HSB对小鼠肝癌细胞瘤的影响

3.3 HSB对荷瘤小鼠胸腺和脾脏的影响:结果如表 3所示 与生理盐水对照组比较,HSB能显著增加荷瘤小鼠胸腺重量,提高胸腺指数 (*P* < 0.001),但不同 HSB给药剂量间无显著差异 (*P* > 0.05) HSB能增加脾脏重量,升高脾指数,但无显著性

(*P* > 0.05)。提示 HSB可能具有增强胸腺活动,提高免疫功能的作用。

表 2 HSB对小鼠肝癌细胞的抑制作用 ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物 (只)		平均瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
		始	末		
对照	-	13	13	1.73± 0.49	
HSB	37.8	13	13	0.65± 0.23	51.09
	52.5	13	13	0.65± 0.23	52.55
	75.0	13	13	0.60± 0.20	56.20

与对照组比较: * *P* < 0.01

表 3 HSB对荷瘤小鼠免疫器官的影响

组别	剂量 (g/kg)	脾脏重 (mg)		胸腺重 (mg)		脾 指数	胸腺 指数
对照	-	141.5± 45.3	56.9± 14.8	4.9	1.9		
HSB	37.8	147.2± 23.4	80.8± 12.1	4.9	1.7		
	52.5	170.1± 51.1	82.1± 21.1	5.6	2.7		
	75.0	183.0± 72.1	87.0± 15.0	6.0	2.8		

与对照组比较: * *P* < 0.001

3.4 HSB对荷瘤小鼠淋巴细胞增殖的影响: HSB连续给药 10 d后能促进荷瘤小鼠淋巴细胞的增殖反应,与生理盐水对照组比较差异极其显著 (*P* < 0.001) 结果见表 4 说明 HSB能显著促进荷瘤小鼠淋巴细胞增殖。结合 3.3结果,提示 HSB可能以提高胸腺 T 淋巴细胞的增殖活动为主,进而增强 T 淋巴细胞对肿瘤细胞的免疫作用。

表 4 HSB对荷瘤小鼠淋巴细胞增殖的影响

组 别	剂 量 (g/kg)	动 物 (只)	cpm 值
对照	-	13	1 231± 131
HSB	37.8	13	2 395± 176
	52.5	13	2 441± 199
	75.0	13	2 581± 187

与对照组比较: * *P* < 0.01

4 讨论

结果表明 HSB能显著抑制小鼠 H22肝癌实体瘤的生长,增加免疫器官重量,提高胸腺指数和淋巴细胞转化率,增强机体的免疫调节功能 提示 HSB不仅是有效的肿瘤抑制剂,而且具有明显的免疫增强作用。

HSB选用益气固表消肿排脓的黄芪,补肝益肾、扶正固本的灵芝以及生津止渴并治虚癆的绿茶等多味中药组成复方,提取黄芪总黄酮 (TFA)、黄芪多糖 (APS)、灵芝多糖 (GLP)、绿茶多酚 (GTP) 等作为主要的有效成分。研究表明 APS能促进胸腺和脾脏生长,促进 ConA 刺激的淋巴细胞转化,改善淋巴细胞的超微结构,加速胸腺和脾脏损伤的修复,增强机体免疫功能^[3,4]。GLP能增强小鼠巨噬细胞的吞噬功能,诱导 DNA 多聚酶的生成和白细胞

介素 2 的分泌,促进免疫细胞中 DNA 的合成及细胞增殖,加速免疫应答过程^[5]。GTP 能有效抑制肿瘤细胞生长,阻滞细胞周期的各个进程,提高胸腺指数和脾指数,增强 T 淋巴细胞的粘附和增殖活性^[6,7]。

肿瘤是由多种因素引起的恶性疾病,而机体的免疫监视功能低下或抑制是导致肿瘤的重要诱因。实验显示:荷瘤能引起小鼠胸腺严重萎缩,脾指数异常^[8],T 细胞数量减少,功能抑制,抗癌作用明显降低^[9]。临床上肿瘤患者常伴有免疫系统机能低下,尤其是胸腺在免疫机能低下时严重萎缩。本研究选用既具有抑瘤作用又具有免疫增强功能的中药成分,来抑制肿瘤的生长与繁殖,提升机体的免疫调节功能,使 HSB 具有高效的抑瘤作用和免疫增强效果,为 HSB 的临床应用提供了有意义的实验资料。

参考文献:

- [1] 周 静. 近年来国内植物多糖生物活性研究 [J]. 中草药, 1994, 25(1): 40-44.
- [2] 陈建业,曾益新,陈小君,等. 护生宝口服液对辐射的防护作用研究 [J]. 中华放射与防护杂志, 2000, 20(4): 273-275.
- [3] 邵启祥,徐芬红,夏 圣,等. 黄芪对小鼠免疫功能的调节作用 [J]. 镇江医学院学报, 1994, 4(4): 261-264.
- [4] 郭琼林,张世明,戎诚兴,等. 黄芪多糖对小鼠脾脏急性放射损伤修复作用的实验研究 [J]. 中华放射与防护杂志, 1989, 9(3): 171-174.
- [5] 雷林生. 灵芝多糖对老年小鼠脾细胞 DNA 合成及 DNA 多聚酶 α 活性的影响 [J]. 北京医科大学学报, 1992, 12(3): 193-195.
- [6] 郭建霞,黄少珍,张丽生,等. 茶多酚对体外人肝癌细胞的生物效应 [J]. 癌症, 1995, 14(6): 245-247.
- [7] 曹明富,林植华,虞研原,等. 茶多酚对细胞免疫功能的影响及抑瘤作用 [J]. 现代应用药学, 1994, 11(4): 3-6.
- [8] 张金红,毛启龙,许乃寒,等. 小檗胺衍生物 (EBB) 体内抗肿瘤作用初探 [J]. 中草药, 1998, 29(4): 243-246.
- [9] Robins R A, Baldwin R W. T-cell subsets in tumour rejection responses [J]. Immunol Today, 1985, 6(2): 55-58.

百草降糖片对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究

茅彩萍,顾振纶,徐乃玉*

(苏州大学医学院 药理研究室,苏州中药研究所,江苏 苏州 215007)

α -葡萄糖苷酶 (EC3.2.1.20 α -glucosidase) 通过水解 α -1,4 糖苷键从淀粉和有关多糖的非还原端切下葡萄糖^[1],人体对淀粉、糊精、蔗糖等碳水化合物的利用吸收依赖于小肠刷状缘上该酶的活性^[2]。目前已知,该酶抑制剂不仅可防治糖尿病、肥胖症,还具有抗肿瘤和抗艾滋病 (AIDS) 病毒的作用^[3,4]。因此对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究,具有重要的临床意义。

运用中医药治疗糖尿病,祖国医学已有两千多年的临床经验,但其作用机制的研究尚在起步阶段。百草降糖片是我所自行研制的降血糖药物,由黄芪、黄连、魔芋、丹参等组成,具有益气养阴、补肾活血、温经通脉之功效。本文通过建立酶抑制剂模型,从酶学的角度研究百草降糖片对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,为探讨百草降糖片降血糖机制提供实验依据。

1 材料

α -葡萄糖苷酶, Sigma 公司; PNPG (4-硝基酚-

α -D-吡喃葡萄糖苷), E. merck 公司;还原型谷胱甘肽,中国科学院上海生物化学研究所;中药购自药材公司;其余试剂均为国产分析纯试剂。

2 方法

2.1 中药水提物的制备:按配伍取组成百草降糖片的中药材 200 g,另取五味子、鬼箭羽、地黄、黄芪各 200 g,分别浸于 800 mL 蒸馏水中,捣碎,60℃ 水提 10 h,5 000 r/min 离心 5 min,上清液活性炭脱色,分别浓缩至 400 mL 即得 0.5 g/mL 水提物百草降糖片 (I)、五味子 (II)、鬼箭羽 (III)、地黄 (IV)、黄芪 (V)。

2.2 α -葡萄糖苷酶活力测定^[1]:以 PNPG 为底物,反应系统为:67 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH6.8) 1.7 mL,1 mg/mL 谷胱甘肽 50 μ L,20 mg/mL α -葡萄糖苷酶 5 μ L,37℃ 保温 10 min 后,加入 0.116 mol/L PNPG 50 μ L,于 37℃ 反应 10 min 后,加入 0.1 mol/L Na_2CO_3 终止液 10 mL,在 400 nm 处测定在酶的作用下释放出硝基酚的量。

* 收稿日期:2002-04-09

基金项目:江苏省中医药管理局资助项目 (No. 9948)

作者简介:茅彩萍 (1968-),女,江苏苏州人,现苏州大学攻读心血管内科学博士学位,副教授,研究方向为中药药理学,主持省级课题 2 项,发表科研论文 12 篇。Tel: 0512-5125270 E-mail: szzyzs@public1.sz.js.cn