

· 药理与临床 ·

苦参碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠的抑瘤作用及对免疫功能的影响

马凌娣, 文世宏, 张彦, 何於娟, 刘小珊, 康格非, 蒋纪恺*

(重庆医科大学 检验系, 重庆 400016)

摘要: 目的 研究苦参碱的体内抑瘤效应与荷瘤机体免疫功能的关系, 初步探讨苦参碱抑瘤作用的免疫学机制。方法 采用 MTT 法观察不同剂量苦参碱对荷瘤小鼠外周血淋巴细胞 (PBL) 增殖能力的影响; 采用小鼠 H₂₂ 肝癌细胞实体瘤模型进行苦参碱的体内抑瘤实验, 测定肿瘤生长抑制率 (IR), 观察荷瘤小鼠免疫器官质量和病理学形态的改变; ELISA 法检测小鼠血清中白细胞介素-2 (IL-2) 和白细胞介素-12 (IL-12) 水平。结果 高、低剂量苦参碱对小鼠 H₂₂ 实体瘤生长具有明显抑制作用, 抑瘤率分别为 60.7% 和 62.5% ($P < 0.01$); 体外增殖试验显示, 苦参碱单独作用时, 对荷瘤小鼠静止 PBL 体外增殖的抑制作用较明显, 但对刀豆蛋白 A (ConA) 活化的荷瘤小鼠 PBL 的体外增殖反应表现出一定的促进作用, 随苦参碱质量浓度的增高, 促进作用随之减弱; 苦参碱治疗后小鼠的脾脏和胸腺质量减轻, 其中以脾脏变化更为明显 ($P < 0.01$), 病理切片显示胸腺皮质变薄; 苦参碱不能提高荷瘤小鼠血清 IL-2 和 IL-12 水平 ($P > 0.05$)。结论 苦参碱在体内具有较强的抗肿瘤作用, 但在体内、体外都表现出一定的免疫抑制作用, 显示苦参碱的抗肿瘤活性不是通过提高机体的免疫功能来实现的。

关键词: 苦参碱; 肿瘤; 免疫

中图分类号: R 286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)12-1374-04

Antitumor efficacy of matrine and its effect on immune function in H₂₂ tumor-bearing mice

MA Ling-di, WEN Shi-hong, ZHANG Yan, HE Yu-juan,

LIU Xiao-shan, KANG Ge-fei, JIANG Ji-kai

(Department of Clinical Laboratory Medicine, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Object** To investigate the relationship between *in vivo* antitumor efficacy of matrine and its effect on immune function in H₂₂ tumor-bearing model mice and discuss the immune mechanism of matrine in inhibiting tumor growth. **Methods** MTT assay was used to observe the influence of matrine on proliferation of peripheral blood lymphocytes (PBL) stimulated by ConA *in vitro* from H₂₂ tumor-bearing mice. H₂₂ tumor-bearing model mice were applied to evaluate *in vivo* antitumor efficacy of matrine. The tumor growth inhibitory rate (IR) was calculated. Murine serum IL-2 and IL-12 were detected by means of ELISA assay. **Results** Matrine had remarkable inhibitory effect on tumor growth in H₂₂ tumor-bearing model mice. The IR were 60.7% and 62.5% ($P < 0.01$) in the groups treated with low- and high-dose of matrine, respectively. Matrine showed an increasingly inhibitory effect on *in vitro* proliferation of murine PBL with an elevation of matrine dosage and a lessen SI scores compared with that of control panel when it was prescribed in single, while a combined effect on proliferation of murine PBL activated by ConA observed in MTT assay, and a decreasing inhibitory effect was also found along with the elevation of matrine dosage. The weights of both spleen and thymus of H₂₂ tumor-bearing model mice treated with matrine became less than that of control panel, and spleen decreased more than thymus gland ($P < 0.01$). Paraffin slice H and E staining revealed thymus cortex became thinner. The increasing of serum IL-2 and IL-12 had not appeared in H₂₂ tumor-bearing model mice treated with matrine ($P > 0.05$). **Conclusion** Matrine has marked *in vivo* antitumor effect, but it can not improve the immune function of H₂₂ tumor-bearing mice both *in vivo* and *in vitro*. This inferred that improving immune function may not be the main mechanism for matrine to exert its antitumor effect.

Key words: matrine; tumor; immunity

收稿日期: 2004-04-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171150)

作者简介: 马凌娣(1973—), 女, 山东人, 助教, 在读博士, 主要从事中药抗肿瘤的分子学机制和肿瘤免疫学方面的基础研究。

Tel: (023) 68485216 E-mail: lingdina@hotmail.com

近年来,苦参及其有效成分苦参碱的抗肿瘤作用正逐渐受到人们的关注。研究表明,苦参碱能有效抑制体外培养的人肝癌细胞株 HepG2 的增殖,且抑制作用有时间和剂量依赖性^[1];诱导人白血病 K562 细胞向正常形态分化,明显抑制肿瘤细胞端粒酶活性的表达^[2,3]。此外,苦参碱可诱导肿瘤细胞发生凋亡,明显抑制肿瘤细胞与内皮细胞间的黏附,阻止肿瘤的转移。笔者采用动物试验对苦参碱的抗癌作用进行了研究,发现苦参碱可以明显抑制小鼠 H₂₂ 移植瘤生长,抑瘤率达 60% 以上,并进一步观察苦参碱对荷瘤小鼠免疫功能的影响,以期从免疫学角度探讨苦参碱的抗肿瘤作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物:苦参碱,纯度为 99%,由日本大正制药公司提供,以无菌生理盐水溶解,配成 10 mg/mL 储备液,0.22 μ m 抽滤除菌后 4 $^{\circ}$ C 保存。环磷酰胺,上海华联制药有限公司生产,每支 200 mg,批号 000211,以无菌生理盐水配成 10 mg/mL。

1.2 实验动物与细胞株:清洁级 BALB/C 小鼠,体重 18~22 g,雌雄兼用,重庆医科大学实验动物中心提供。BALB/C 小鼠 H₂₂ 腹水瘤细胞由重庆医科大学基础医学院病理生理教研室惠赠。

1.3 试剂与仪器:RPM I 1640 培养基(Gibco 产品),胎牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品。小鼠淋巴细胞分离液:天津灏阳生物制品科技有限公司出品。刀豆蛋白 A (ConA),美国 Sigma 公司产品,以无菌 PBS 配成 10 mg/mL。MTT [3-(4,5)-双甲基-2-噻唑-(2,5)-二甲基溴化四氢唑盐]为美国 Sigma 公司产品,以 pH 7.2 的无菌 PBS 配成 5 mg/mL,0.22 μ m 抽滤除菌,避光 4 $^{\circ}$ C 保存。小鼠 IL-2 和 IL-12 ELISA 试剂盒购自广州晶美生物工程有限公司。Hitachi—600 透射电子显微镜;Olympus 光学显微镜;MODEL 550 型酶联免疫吸附检测仪,美国 BD-RAD。

1.4 体内试验

1.4.1 荷瘤小鼠模型的建立:无菌条件下抽取肝癌小鼠腹水中的 H₂₂ 细胞,用无菌 PBS 将收集到的肿瘤细胞浓度调整为 1×10^6 /mL,于 BALB/C 小鼠左下腹部行无菌皮下接种,每只小鼠接种 0.2 mL 细胞悬液,细胞总数为 2×10^5 。

1.4.2 实验动物分组及处理:小鼠接种后 24 h 称重分组,随机分为苦参碱高、低剂量 (100、50 mg/kg) 组,环磷酰胺 (CTX, 20 mg/kg) 组为阳性对照组,另设阴性对照组,给以等量生理盐水 (NS)。各

组均 ip 给药,每只 0.2 mL,每日 1 次,连续 15 d。

1.4.3 苦参碱对荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用:停药后次日处死小鼠,剥瘤称质量,计算肿瘤生长抑制率(抑瘤率)。

抑瘤率 = (对照组平均瘤质量 - 治疗组平均瘤质量) / 对照组平均瘤质量 $\times 100\%$

1.4.4 苦参碱对荷瘤小鼠免疫器官的影响:各组小鼠停药后次日处死,完整取出胸腺和脾脏后称质量,计算胸腺指数和脾脏指数。胸腺、脾脏病理学切片行 HE 染色观察。

1.4.5 苦参碱对荷瘤小鼠血清 IL-2 和 IL-12 水平的影响:各组小鼠停药后次日摘眼球放血,静置后 (3 000 r/min 离心 10 min),得到血清。用 ELISA 法检测荷瘤小鼠血清中 IL-2 和 IL-12 水平。测定方法详见试剂盒说明书。

1.5 苦参碱对荷瘤小鼠外周血淋巴细胞 (PBL) 体外增殖活性的影响

1.5.1 荷瘤小鼠 PBL 的分离:将荷瘤小鼠颈椎脱臼处死,无菌取脾,在盛有无菌 Hanks 液的平皿中用玻璃小瓶轻轻捻碎脾组织,以 250 目不锈钢筛网滤过,收集得到脾细胞悬液。用小鼠淋巴细胞分离液按常规方法操作,分离得到小鼠 PBL 悬液。台盼蓝排除计数法计数活细胞数在 95% 以上,以含 10% 胎牛血清的 RPM I 1640 培养液配成 1×10^6 /mL 细胞悬液。

1.5.2 淋巴细胞转化试验 (MTT 法):试验组为含和不含 5 μ g/mL ConA 的小鼠 PBL 悬液,加入苦参碱溶液,使其终质量浓度分别为 100、200、500 μ g/mL,阳性对照组仅含 5 μ g/mL ConA,空白对照组为加入等体积 PBS 溶液的 PBL 悬液。将上述细胞悬液分别加入到 96 孔细胞培养板中,每孔 200 μ L,各组均设 6 个复孔。96 孔培养板置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养 68 h 后,离心弃上清液 150 μ L,再加入 RPM I 1640 液 150 μ L 和 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μ L,继续培养 4 h。培养结束后每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷,振荡 2 min 溶解沉淀,混匀后以酶标仪于 570 nm 波长处读取各管吸光度 (A_{570}) 值。计算刺激指数 (SI)。

SI = (实验孔 A_{570} 均值 / ConA 孔 A_{570} 均值) $\times 100\%$

1.6 统计学处理:数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS10.0 统计学软件进行单向方差分析 (one-way ANOVA),并进行组间比较。

2 结果

2.1 苦参碱对荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用:不同剂量

苦参碱对 BALB/C 小鼠 H₂₂ 实体瘤均有明显抑制作用。100、50 mg/kg 苦参碱组及 CTX 组抑制率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$) 分别为 60.7%、62.5% 和 78.6%, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$), 苦参碱高、低剂量组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 苦参碱对荷瘤小鼠免疫器官的影响: 结果见表 1。与对照组相比, 低剂量苦参碱组小鼠的胸腺指数无明显改变 ($P > 0.05$), 脾指数明显降低 ($P < 0.01$); 高剂量苦参碱组小鼠的胸腺指数与脾指数均低于对照组 ($P < 0.05$), 以脾指数的降低更为明显 ($P < 0.01$), 显示苦参碱对小鼠的胸腺、脾脏有一定的抑制作用, 受抑程度以脾脏更明显。病理形态学观察: 苦参碱处理组小鼠脾脏体积缩小, 质量减轻, HE 染色见白髓结构轻度破坏, 有少量坏死淋巴细胞, 红髓淋巴细胞减少, 脾窦扩张充血, 巨核细胞散在分布; 胸腺小叶结构清楚, 皮髓质界限清楚, 网状上皮细胞及纤维细胞增生, 血窦扩张。CTX 组小鼠脾脏和胸腺明显萎缩, 脾窦扩张充血, 大量淋巴细胞坏死, 纤维组织增生; 胸腺皮质变薄, 有的分叶不清, 呈灰白色, 皮髓质界限欠清。

表 1 苦参碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠免疫器官的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Table 1 Effect of matrine on immune organs of H₂₂ tumor-bearing model mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组别	剂量 /(mg · kg ⁻¹)	胸腺指数 /(mg · kg ⁻¹)	脾指数 /(mg · kg ⁻¹)
苦参碱	50	1.17 ± 0.07*	6.75 ± 1.75**
	100	0.97 ± 0.33*	6.90 ± 1.93**
CTX	20	0.73 ± 0.50**	6.37 ± 2.19**
对照	-	1.11 ± 0.62	10.15 ± 2.93

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

2.3 苦参碱对荷瘤小鼠 L-2 和 L-12 水平的影响: 结果见表 2。苦参碱治疗后, 小鼠血清 L-2 和 L-12 的水平无明显改变 ($P > 0.05$), 苦参碱低剂量组小鼠的 L-2 水平虽稍有升高, 但与对照组相比差异无显著性 ($P > 0.05$), 提示苦参碱不能提高荷瘤小鼠血清 L-2 和 L-12 水平。

2.4 苦参碱对荷瘤小鼠 PBL 体外增殖活性的影响: 结果见表 3。苦参碱单独作用时, 可明显抑制荷瘤小鼠静止 PBL 的体外增殖, 苦参碱各组 SI 均小于空白对照组 ($P < 0.01$), 但对 ConA 活化了的小鼠 PBL 增殖表现出一定的协同刺激作用, 除苦参碱 500 μg/mL 组外, 两者共同作用的 SI 较单用 ConA 或单用苦参碱者都高, 但刺激作用随苦参碱质量浓

表 2 苦参碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠 L-2 和 L-12 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Table 2 Effect of matrine on serum L-2 and L-12 levels in H₂₂ tumor-bearing model mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组别	剂量 /(mg · kg ⁻¹)	L-2 /(pg · mL ⁻¹)	L-12 /(pg · mL ⁻¹)
苦参碱	50	188.4 ± 42.2	87.8 ± 30.4
	100	180.9 ± 39.4	85.4 ± 35.2
CTX	20	183.7 ± 35.5	88.5 ± 22.2
对照	-	181.2 ± 39.1	90.0 ± 26.4

表 3 苦参碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠 PBL 体外增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Effect of matrine on PBL proliferation in vitro of H₂₂ tumor-bearing model mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	质量浓度 /(μg · mL ⁻¹)	A ₅₇₀	SI/%
苦参碱	100	0.40 ± 0.08	56**
	200	0.36 ± 0.07	50**
	500	0.25 ± 0.05	35**
空白对照	-	0.45 ± 0.12	64
苦参碱 + ConA	100	1.72 ± 0.20	242**
	200	1.44 ± 0.12	200**
	500	0.65 ± 0.10	91**
ConA	-	0.71 ± 0.30	100**

与空白对照组比较: ** $P < 0.01$

与 ConA 组比较: $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; $P < 0.01$ vs ConA group

度的增加而降低。

3 讨论

小鼠 H₂₂ 肝癌是抗肿瘤药物研究中常用的动物移植性肿瘤模型。本实验利用此模型观察了苦参碱的体内抑瘤作用。研究发现苦参碱对小鼠 H₂₂ 实体瘤的生长有明显的抑制作用, 抑瘤率达 60% 以上, 显示出苦参碱作为一种抗肿瘤药物潜在的临床应用价值。

大量的研究资料表明, 肿瘤的发生、发展和转移都与机体的免疫功能密切相关。免疫功能受损, 导致机体易患肿瘤, 而当宿主免疫功能恢复和提高时, 就能有效的排斥肿瘤, 控制肿瘤的生长和转移。研究发现, 肿瘤患者都有不同程度的免疫功能低下状态, 如 NK 细胞活性、CD₄/CD₈ 比值、L-2 含量下降等, 这也是导致肿瘤无限制增长和免疫逃避的一个重要因素。因此, 正确评价荷瘤机体的免疫功能是研究抗肿瘤药物作用机制的重要前提。T 淋巴细胞转化实验是检测淋巴细胞增殖活性的一种有效的方法, 常用于评价药物对细胞免疫功能的影响。本实验选用 ConA 为刺激物, 刺激 T 细胞发生转化, 结果显示, 苦参碱单独应用时对小鼠 PBL 的体外生长有较明显的抑制作用, 对 ConA 所致的 T 淋巴细胞活化增

殖有一定的刺激作用,但随着苦参碱质量浓度的增高,这种协同刺激作用又随之下降。此结果提示苦参碱不能促进静止的小鼠 PBL 的增殖反应,对 ConA 活化了的小鼠脾细胞增殖,高质量浓度的苦参碱也有一定的抑制作用,显示了其具有免疫抑制剂的特征。苦参碱对静止和活化的小鼠 PBL 体外增殖活性的不同影响,也可能与机体的免疫状态有关,本实验中所制备的 PBL 来自荷瘤小鼠,受肿瘤影响,小鼠 PBL 对刺激原的反应性与正常情况可能有所不同。苦参碱对荷瘤机体免疫效应细胞活性的影响和具体的作用机制还有待于深入研究。

本研究中,苦参碱作用后小鼠的胸腺外观与对照组几乎无差异,胸腺指数无明显改变,而脾指数明显低于对照组,以高剂量苦参碱作用更甚,表明苦参碱在一定程度上抑制了荷瘤小鼠的免疫功能,其中对脾脏的抑制作用强于胸腺。病理形态学观察也证明了这一点。

在机体的抗肿瘤免疫反应中,IL-2 和 IL-12 是发生细胞免疫应答所必需的两种细胞因子,通过多

种途径发挥免疫调节作用。本研究中,苦参碱治疗后小鼠血清 IL-2 和 IL-12 水平没有增高,提示苦参碱不能增强荷瘤小鼠的抗肿瘤细胞免疫应答反应。但也不能排除肿瘤发生时,机体所产生的免疫抑制因子的作用。

本研究发现,苦参碱对肿瘤所致的小鼠免疫功能低下状态没有明显改善作用,同时体内、体外实验都显示其有一定的免疫抑制效应,表明苦参碱的抑瘤活性不是通过提高机体自身的免疫机能来实现的,还存在其他的作用机制,其确切的抗肿瘤作用尚待深入研究。

References

- [1] SiW K, Shang T Y, Kang G F. Effects of matrine on cell morphology and related factors of hepatocellular carcinoma cell HepG2 *in vitro* [J]. *Acta Acad Med Mil Tert* (第三军医大学学报), 2000, 22(6): 553-556.
- [2] Zhang L P, Jiang J K. Effects of matrine on proliferation and differentiation in K562 cells [J]. *Leuk Res*, 2001, 25(9): 793-800.
- [3] Zhang L P, Jiang J K. Effects of matrine on telomerase activity and cell cycle in K562 cell [J]. *Chin J Oncol* (中华肿瘤杂志), 1998, 20(5): 328-329.

Weight-reduction and fat-decrease effects in rats of extracts from five kinds of Chinese herbs

ZHANG Chong-ben, ZHANG Xiao-lan, SHANG Ke-gang, DENG Hong-kui, DENG Ming-xiao^{*}
(Department of Cell Biology and Genetics, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract **Object** To evaluate the effects of the extracts from five kinds of Chinese herbs (5ECH) on weight-reduction and fat-decrease in rats, as well as their mechanisms. **Methods** Rats were fed by high-calorie food and administered with two different doses of 5ECH as experimental groups, with Qumei and Xuezhikang as positive control groups, and with carboxymethyl cellulose sodium as negative control group by intragastric administration with relevant drugs in each group. Concentrations of triglycerides (TG) and total cholesterol (TC) in the blood were determined by a HITACHI-7170A auto-biochemical analyzer. The activities of fatty acid synthase (FAS) and acyl-coenzyme A synthetase (ACS) were determined by spectrophotometry and isotopic-labeling, respectively. The items of body weight increase (BW I), body fat (BF), and food intake (FI) were determined by regular weighing. **Results** 5ECH reduces BW I, BF, TG, TC, and FI in a dose-dependent manner, inhibits FAS activity, and enhances ACS activity in a dose-dependent manner. The BW I is highly correlated to the FI; the TG and TC levels in the blood are highly correlated to the activities of FAS and ACS, and the BF is highly correlated to both the FI and the two enzymes' activities. **Conclusion** The 5ECH in this research has significant weight-reduction and fat-decrease effects on rats. The effects are associated with appetite suppression, FAS inhibition, and ACS

^{*} 收稿日期: 2004-04-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目资助课题(2003AA2Z3432)

作者简介: 张崇本(1963—),男,辽宁省人,讲师,理学博士,研究方向为细胞遗传学。

Tel: (010)62751858 62757430 E-mail: zhangcb@pku.edu.cn