

枸杞多糖对小鼠移植性肝癌抑制作用的实验研究

张鸣号, 王秀玉, 王秀梅, 刘青, 杨美玲*

宁夏医科大学, 宁夏 银川 750004

摘要: 目的 探讨枸杞多糖对小鼠移植性肝癌的抑制作用。方法 采用皮下接种法制备小鼠移植性肝癌 (H₂₂ 肝癌细胞株) 模型, 随机将 96 只小鼠分成对照组、模型组、枸杞多糖高、中、低剂量 (20、10、5 mg/kg) 组、环磷酰胺 (20 mg/kg) 组。观察枸杞多糖对荷瘤小鼠死亡率、肿瘤体积、肿瘤质量及肿瘤细胞密度、核分裂像、肿瘤坏死程度及间质淋巴细胞浸润、纤维组织增生情况的影响。结果 20、10、5 mg/kg 的枸杞多糖能明显降低移植性肝癌小鼠的死亡率 ($P < 0.05$), 减小肿瘤细胞的体积和质量 ($P < 0.05$), 抑瘤率分别为 42.23%、25.10% 和 9.16%; 同时 20、10 mg/kg 的枸杞多糖能不同程度地降低肿瘤细胞密度 ($P < 0.05$), 减少肿瘤细胞的核分裂像计数 ($P < 0.05$), 增加肿瘤细胞坏死程度、间质淋巴细胞浸润和纤维组织增生 ($P < 0.05$)。结论 枸杞多糖对小鼠移植性肝癌有一定的抑制作用。

关键词: 枸杞多糖; 移植性肝癌; 坏死; 淋巴细胞浸润; 纤维组织增生

中图分类号: R286.91 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)06-1142-05

Inhibition of *Lycium barbarum* polysaccharide on transplanted liver cancer in mice

ZHANG Ming-hao, WANG Xiu-yu, WANG Xiu-mei, LIU Qing, YANG Mei-ling

Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Abstract: Objective To explore the inhibition of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) on transplanted liver cancer in mice. **Methods** The transplanted liver cancer model was established with hypodermic inoculation. Ninety-six mice were randomly divided into six groups: control group, model group, LBP high-, middle-, and low-dose (20, 10, and 5 mg/kg) groups, and cyclophosphamide (20 mg/kg) group. The effects of LBP on mortality, gross tumor volume, inhibitory rate of tumor growth, tumorous cellular density, karyokinesis, degree of tumor necrosis, lymphocyte infiltration, and fibroplasia in interstitial substance in tumor-bearing mice were observed. **Results** LBP with high, middle, and low doses could obviously depress the death rate of tumor-bearing mice ($P < 0.05$) and diminish gross tumor volume and weight ($P < 0.05$). The inhibitory rates of tumor growth were 42.23%, 25.10%, and 9.16%. LBP with high and middle doses could degrade the tumorous cellular density ($P < 0.05$), decrease the karyokinesis ($P < 0.05$), and increase the degree of tumor necrosis, lymphocyte infiltration, and fibroplasia in interstitial substance in mice ($P < 0.05$). **Conclusion** LBP could produce the inhibition on transplanted liver cancer in mice.

Key words: *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP); transplanted liver cancer; tumor necrosis; lymphocyte infiltration; fibroplasia

原发性肝癌是消化系统常见的恶性肿瘤, 是导致癌性死亡的第三大原因, 肝癌的发生是由多种因素经多种途径引起的, 但其发病机制至今尚不清楚。目前对肿瘤的治疗一般多采用放化疗法, 但多数放化疗药物均会产生不良反应。因此, 寻找天然无毒的抗肿瘤药物成为研究热点。枸杞多糖是枸杞子的主要活性成分, 其药理作用广泛, 具有抗衰老、抗肿瘤、抗辐射及增强机体免疫力等作用^[1-4], 本研究

以小鼠移植性肝癌 (H₂₂ 肝癌细胞株) 模型为研究对象, 探讨枸杞多糖对肝癌的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与瘤株

昆明种小鼠, 清洁级, 6~8 周龄, 体质量 (20±2) g, 雌雄各半, 购自宁夏医科大学实验动物中心, 动物质量合格证号: SCXK (宁) 2010-001。肝癌 H₂₂ 腹水型细胞株购自南京凯基生物科技发展有限公司。

收稿日期: 2011-09-19

基金项目: 宁夏自然科学基金项目 (NZ1092); 宁夏医科大学科研项目 (XM2011002)

作者简介: 张鸣号 (1977—), 男, 河北人, 讲师, 硕士研究生, 从事心血管病理生理学。Tel: 13995178770 E-mail: zhangmh270@163.com

*通讯作者 杨美玲 Tel: (0951)4075218 E-mail: yml590@163.com

网络出版时间: 2012-05-08 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120508.1131.001.html>

1.2 药物与试剂

枸杞多糖(质量分数40%)购自宁夏宏德生物技术有限公司,批号20110121。环磷酰胺购自江苏恒瑞医药股份有限公司,规格0.2g,批号11032421。

1.3 仪器

Olympus CHC—212 光学显微镜(日本); Motic Images Advanced 3.2 图像分析系统(Motic China Group Co., Ltd.); Airtech 超净工作台(苏州富泰洁净系统有限公司); TP—100 微量天平(北京赛得利斯仪器系统有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 小鼠移植性肝癌模型复制 将96只小鼠随机分成6组,每组16只,即对照组、模型组、枸杞多糖高、中、低剂量(20、10、5 mg/kg)组^[5]、环磷酰胺(20 mg/kg)组。75%乙醇常规消毒小鼠右侧腋下皮肤,抽取已受H₂₂瘤株感染9d小鼠的新鲜腹水,于动物(对照组接种等剂量的生理盐水)的右侧腋窝下接种0.2 mL(约含H₂₂瘤细胞 2×10^6 个),制备荷瘤小鼠模型。接种24 h后,对照组和模型组ip等量生理盐水;环磷酰胺组ip给予20 mg/kg的环磷酰胺;枸杞多糖高、中、低剂量组分别ip连续给药14 d,第15天颈椎脱臼处死小鼠,取瘤组织,称质量,计算抑瘤率^[6]。取肿瘤组织置于4%多聚甲醛溶液中固定,进行病理学检查。

抑瘤率 = (模型组瘤质量 - 给药组瘤质量) / 模型组瘤质量

1.4.2 小鼠一般情况观察 每日观察小鼠的体重、毛发、进食、肿瘤生长及有无死亡等,计算死亡率。肿瘤包块出现后,每2天用游标卡尺测定肿瘤块的长径A(mm)及短径B(mm),计算肿瘤体积,并绘制肿瘤生长体积曲线^[7]。

$$\text{体积} = 1/2 \times A \times B^2$$

1.4.3 肿瘤组织病理学改变观察 各组切取部分肿瘤组织4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,HE染色,观察肝癌细胞病理学改变。

1.4.4 肿瘤组织病理定量分析 采用Motic Images Advanced 3.2 图像分析系统观察各组肝癌细胞密度、核分裂像计数、肿瘤坏死程度及间质淋巴细胞浸润、纤维组织增生等情况。

(1) 肿瘤细胞密度: 每张切片选择3个无坏死细胞的高倍镜视野,分为(+): 肿瘤细胞聚集成巢,可见细胞间隙; (++) : 肿瘤细胞紧密排列成巢、部分区域见到细胞间隙; (+++) : 肿瘤细胞密集成堆,

少见细胞间隙等3个密度等级。

(2) 肿瘤组织核分裂像计数: 每张切片选择核分裂像最多的区域,连续计数5个高倍镜视野,对核分裂像进行计数,取平均值为每张切片的核分裂像计数^[8]。

(3) 坏死程度: 根据每张切片坏死情况评定为灶性坏死(+)、网状多灶性坏死(++)、大片坏死(+++)。

(4) 肿瘤间质反应情况,包括纤维结缔组织增生情况: 根据肿瘤间质及周边纤维组织增生情况分为轻(+)、中(++)、重(+++) 3个等级; 淋巴细胞浸润情况: 根据肿瘤实质及间质中淋巴细胞浸润情况,分为少量(+)、中量(++)、多量(+++) 3个等级。

1.4.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5 统计软件对多样本均数间比较采用One-way ANOVA分析,组间比较采用Student-Newman-Keuls检验,病理学半定量资料属有序分类等级资料,应用Ridit分析方法。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况比较

对照组: 小鼠身形匀称,反应灵活、动作敏捷,被毛乳白色、光滑浓密、有光泽,紧贴身体,无蓬松零乱现象。模型组: 小鼠于肿瘤接种后第3天左右能触及皮下肿瘤,接种成功率100%。随着肿瘤体积的增大,小鼠逐渐出现运动迟缓,反应差,被毛失去光泽,部分小鼠被毛稀疏蓬乱。其中4只小鼠显示出恶病质状态,表现出消瘦、疲乏无力,少运动,被毛稀疏蓬乱等。枸杞多糖高剂量组: 小鼠状态好,反应灵活,被毛有光泽; 接种后第5~6天能触及皮下肿瘤,接种成功率100%,随着肿瘤体积的增大,个别小鼠逐渐出现活动迟缓,被毛稀疏蓬乱; 第10天后大多数小鼠状态优于模型组,且食欲良好。枸杞多糖中、低剂量组: 接种后第5~6天能触及皮下肿瘤,接种成功率100%; 随着肿瘤体积的增大,部分小鼠出现活动迟缓,个别小鼠出现消瘦、疲乏无力,被毛零乱无光泽等表现; 第10天后大多数小鼠一般情况优于模型组,食欲明显优于模型组。环磷酰胺组: 小鼠状态好,反应灵活; 接种后第6~7天能触及皮下肿瘤,接种成功率100%,随着肿瘤体积的增大,个别小鼠逐渐出现活动迟缓,被毛稀疏蓬乱; 第10天后大多数小鼠状态优于模型组,且食欲良好。

2.2 各组小鼠死亡率比较

随着肿瘤的生长, 除对照组外其余各组均有小鼠死亡。模型组与对照组比较死亡率明显升高 ($P < 0.01$); 给予不同剂量枸杞多糖 (20、10、5 mg/kg) 干预后, 与模型组比较, 小鼠死亡率明显降低 ($P < 0.05$); 环磷酰胺组与模型组比较小鼠死亡率明显降低 ($P < 0.05$); 环磷酰胺组与枸杞多糖高剂量组比较小鼠死亡率无明显差别, 见表 1。

表 1 枸杞多糖对移植性肝癌小鼠死亡率的影响

Table 1 Effect of LBP on mortality in mice with transplanted liver cancer

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物数 / 只	死亡数 / 只	死亡率 / %
对照	-	16	0	0
模型	-	16	8	50.00**
枸杞多糖	20	16	2	12.50 ^Δ
	10	16	3	18.75 ^Δ
	5	16	5	31.25 ^Δ
环磷酰胺	20	16	2	12.50 ^Δ

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^Δ $P < 0.05$, 下表同
** $P < 0.01$ vs control group; ^Δ $P < 0.05$ vs model group, same as below

2.3 接种后不同时间各组肿瘤体积及肿瘤生长体积曲线比较

模型组与对照组比较肿瘤体积明显增大 ($P < 0.01$); 给予不同剂量 (20、10、5 mg/kg) 枸杞多糖干预后, 与模型组比较, 小鼠肿瘤体积明显减小 ($P < 0.05$); 环磷酰胺组与模型组比较小鼠肿瘤体积明显减少 ($P < 0.05$); 环磷酰胺组与枸杞多糖高剂量组比较小鼠肿瘤体积相近, 见表 2。

2.4 枸杞多糖对肿瘤质量及抑瘤率的影响

模型组的平均肿瘤质量为 (2.51±0.23) g, 经不同剂量枸杞多糖干预后, 平均肿瘤质量均有所减轻, 高、中、低剂量组分别降为 (1.45±0.17)、(1.88±0.29)、(2.28±0.46) g, 其中枸杞多糖高、中剂量组与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$); 环磷酰胺组与模型组比较小鼠肿瘤质量明显减轻 ($P < 0.05$); 环磷酰胺组与枸杞多糖高剂量组比较小鼠肿瘤质量无明显差别。枸杞多糖高、中、低剂量抑瘤率分别为 42.23%、25.10%和 9.16%, 环磷酰胺组的抑瘤率为 45.42%。

表 2 枸杞多糖对移植性肝癌小鼠肿瘤体积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

Table 2 Effect of LBP on tumor volume in mice with transplanted liver cancer ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	肿瘤体积 / mm ³									
		第 6 天	第 7 天	第 8 天	第 9 天	第 10 天	第 11 天	第 12 天	第 13 天	第 14 天	第 15 天
对照	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
模型	-	122.5±10.3**	190.4±13.1**	280.7±22.5**	412.3±9.5**	545.4±48.7**	638.8±53.1**	680.4±69.9**	990.7±72.5**	1 258.7±98.6**	1 369.7±93.1**
枸杞多糖	20	97.6±8.1 ^Δ	175.9±12.6 ^Δ	230.6±18.4 ^Δ	325.6±26.3 ^Δ	410.8±29.1 ^Δ	430.8±31.0 ^Δ	456.9±32.3 ^Δ	620.9±45.2 ^Δ	719.3±55.3 ^Δ	890.3±61.0 ^Δ
	10	94.1±6.2 ^Δ	185.4±10.3 ^Δ	250.3±19.2 ^Δ	356.8±23.1 ^Δ	450.4±31.2 ^Δ	495.1±36.8 ^Δ	560.7±39.1 ^Δ	735.3±48.1 ^Δ	848.5±61.3 ^Δ	1 037.6±99.4 ^Δ
	5	118.3±9.1 ^Δ	201.3±10.9 ^Δ	270.6±15.6 ^Δ	366.9±21.1 ^Δ	478.4±39.6 ^Δ	496.3±48.2 ^Δ	501.3±33.0 ^Δ	858.9±41.3 ^Δ	986.3±46.3 ^Δ	1 175.3±84.6 ^Δ
环磷酰胺	20	94.3±6.3 ^Δ	180.4±9.7 ^Δ	225.7±16.2 ^Δ	320.5±26.3 ^Δ	340.6±23.6 ^Δ	378.7±34.0 ^Δ	400.2±29.1 ^Δ	510.6±36.8 ^Δ	638.8±49.2 ^Δ	791.6±61.9 ^Δ

2.5 肿瘤组织的病理学变化

模型组可见肿瘤细胞排列密集, 细胞异型性明显, 表现为细胞形态大小不一, 细胞核大深染, 形状不规则, 核分裂像多, 且多为病理性核分裂; 肿瘤组织间质中少见淋巴细胞浸润, 肿瘤组织内可见不同程度的坏死, 与正常组织交界处纤维组织增生不明显。枸杞多糖高剂量组与模型组比较可见肿瘤细胞密度有所减低, 细胞异型性有所减轻, 表现为肿瘤细胞大小、形状较规则, 核大深染, 病理性核分裂像明显减少; 肿瘤组织内可见大片坏死; 肿瘤组织及其周围可见纤维结缔组织增生明显, 且有较多炎细胞浸润。枸杞多糖中、低剂量组与模型组比

较可见细胞密度较模型组有所减低, 肿瘤细胞仍具有明显异型性, 表现为细胞大小不一, 形状不规则, 核大深染, 可见病理性核分裂像; 部分肿瘤组织内可见大片状坏死, 肿瘤组织及其周围纤维结缔组织增生较模型组明显, 可见少量的炎细胞浸润。环磷酰胺组与模型组比较可见肿瘤细胞密度明显减低, 细胞异型性小, 病理性核分裂像明显减少; 肿瘤组织内可见大片坏死; 肿瘤组织及肿瘤周围纤维结缔组织增生较明显, 可见较多炎细胞浸润, 见图 1。

2.6 肿瘤组织病理定量分析结果

2.6.1 肿瘤细胞密度分析 模型组可见肿瘤细胞密度大, 排列紧密, 细胞异型性明显。枸杞多糖干预

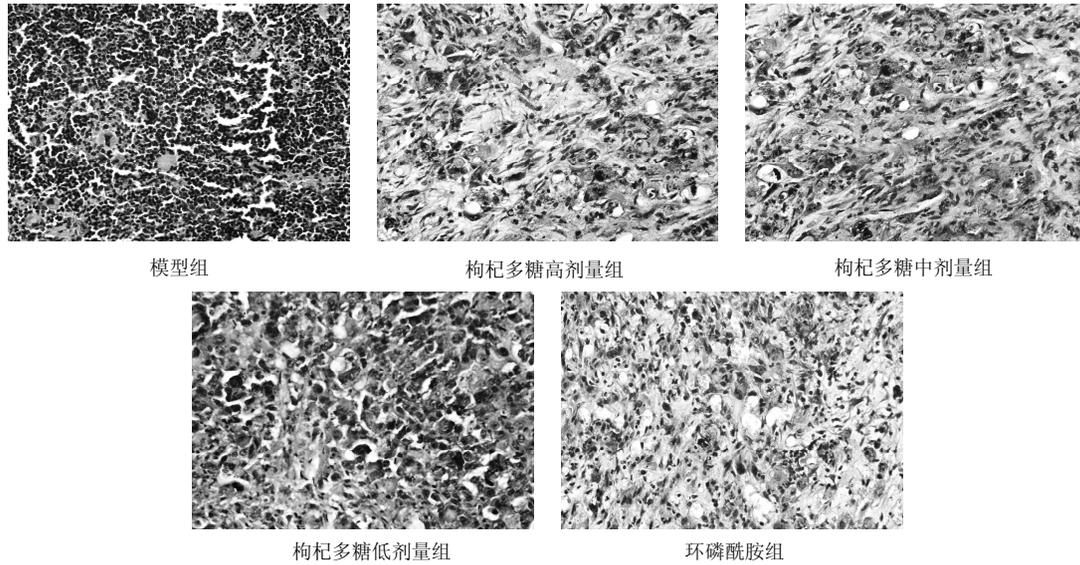


图 1 肿瘤组织的病理学变化

Fig. 1 Pathological changes of tumor tissue

后与模型组比较，枸杞多糖高剂量组和环磷酰胺组肿瘤细胞增殖密度明显减小 ($P < 0.05$)；枸杞多糖中、低剂量组肿瘤细胞增殖密度虽有不同程度的减小，但统计学分析无明显差异 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.6.2 肿瘤组织核分裂像计数比较 模型组切片可见较多核分裂像，平均 5.9 个，且多为病理性核分裂。与模型组比较，枸杞多糖高、中、低剂量组肿瘤细胞核分裂像计数均有较明显的下降 ($P < 0.05$)。环磷酰胺组与模型组比较，肿瘤细胞核分裂像计数较明显下降 ($P < 0.05$)，与枸杞多糖高剂量组比较细胞核分裂像计数无明显差异 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.6.3 肿瘤组织坏死情况比较 各组均有不同程度的肿瘤坏死，在枸杞多糖高剂量组和环磷酰胺组坏死区表现更加明显，但各组之间比较并无明显差异

($P > 0.05$)。见表 3。

2.6.4 肿瘤组织间质反应情况比较 模型组肿瘤间质中可见少量淋巴细胞浸润，肿瘤与正常组织交界处纤维组织增生不明显。与模型组比较，枸杞多糖高、中剂量组肿瘤间质及其与正常组织交界处可见不同程度的淋巴细胞浸润 ($P < 0.05$)，小血管、淋巴管轻度扩张，纤维组织增生明显，形成明显的假包膜 ($P < 0.05$)；枸杞多糖低剂量组与模型组比较肿瘤间质及其与正常组织交界处可见有不同程度的淋巴细胞浸润但纤维组织增生不明显，未见明显的假包膜形成 ($P > 0.05$)。环磷酰胺组与模型组比较，肿瘤组织间质可见明显的淋巴细胞浸润和纤维组织增生，可见到明显假包膜形成 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠肿瘤组织病理定量分析结果的比较 ($n = 16$)

Table 3 Comparison of pathological quantitative analysis in tumor-bearing mice of each group ($n = 16$)

组别	剂量 / ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	肿瘤密度评分			核分裂像计数 均值/个	肿瘤坏死程度			间质淋巴细胞 浸润情况			间质纤维组 织增生情况		
		+	++	+++		+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
模型	-	9	21	18	5.90 ± 0.51	0	8	8	10	3	3	12	3	1
枸杞多糖	20	23	12	13*	$4.20 \pm 0.20^*$	1	5	10	4	4	8*	3	7	6*
	10	20	12	16	$4.70 \pm 0.45^*$	1	5	10	5	5	6*	4	7	5*
	5	18	12	18	$5.10 \pm 0.36^*$	1	6	9	6	5	4	7	6	3
环磷酰胺	20	25	10	13*	$4.00 \pm 0.18^*$	1	6	9	4	4	8*	2	7	7*

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

3 讨论

本实验采用皮下接种法制备小鼠移植性肝癌模型,通过观察枸杞多糖对小鼠死亡率、肿瘤体积及质量的影响,发现给予不同剂量(20、10、5 mg/kg)的枸杞多糖能明显降低肝癌小鼠的死亡率,减小肿瘤的体积,抑制肝癌细胞的生长。这一作用可能与枸杞多糖能够提高机体的免疫应答能力及较强的细胞保护作用^[5]有关。

肿瘤细胞密度大小与其增殖活跃程度密切相关,因此通过肿瘤细胞密度可以了解肿瘤的生长增殖状况。本实验结果显示 20 mg/kg 的枸杞多糖可使肿瘤细胞增殖密度明显减小 ($P < 0.05$),提示该剂量的枸杞多糖可使肝癌细胞的增殖活跃程度降低。核分裂像是细胞以有丝分裂形式进行增殖的形态学标志,其多少可反映细胞的增殖活性,也代表肿瘤细胞的增殖活跃程度。本实验结果显示:模型组细胞异型性大,核分裂像较多,且多为病理性核分裂。在给予不同剂量的枸杞多糖干预后,核分裂像计数明显降低 ($P < 0.05$)。以往研究发现抗肿瘤化疗药物作用机制大多都是诱导肿瘤细胞凋亡^[9],但本实验发现,各实验组均有不同程度的肿瘤细胞坏死表现,在枸杞多糖高剂量组和环磷酰胺组坏死区表现更加明显,但各组之间并无明显差异 ($P > 0.05$)。因此,枸杞多糖是否可以促使肿瘤组织发生较大面积的坏死,还需要进一步研究。间质反应情况包括纤维组织增生和间质淋巴细胞浸润等,可以间接反应机体对肿瘤生长的抑制能力。本实验结果显示,模型组纤维组织增生不明显,肿瘤间质中少见淋巴细胞浸润。而枸杞多糖高、中、低剂量组均有不同

程度的纤维组织增生,且有的形成明显的假包膜,分隔肿瘤组织与正常组织。同时可见到有较多淋巴细胞浸润现象。以上研究结果提示枸杞多糖对肝癌细胞的生长具有明显的抑制作用,其机制除了枸杞多糖能够增强宿主的免疫功能,提高机体免疫杀伤效应外,尚需要进一步研究探讨。

参考文献

- [1] 朱彩萍. 枸杞多糖的结构分析及生物活性评价 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [2] 姜怡邓, 董晓薇, 董泉洲, 等. 枸杞籽油对小鼠耐缺氧抗疲劳作用的实验研究 [J]. 宁夏医学院学报, 2004, 26(1): 19-21.
- [3] 何彦丽, 应逸, 王斌, 等. 枸杞多糖对荷瘤小鼠免疫抑制因子 VEGF、TG-FpI 水平的影响 [J]. 中药药理与临床, 2005, 21(5): 28-29.
- [4] 黄霞, 肖丙秀, 赵军伟, 等. 枸杞多糖对人肝癌细胞 HepG2 生长的影响及其分子机制 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1501-1503.
- [5] 齐春会, 张永祥, 赵修南, 等. 枸杞多糖的免疫活性 [J]. 中国药理与毒理学杂志, 2001, 15(3): 180.
- [6] 翟羽, 吕占军. 反应停对小鼠肝癌细胞 H₂₂ 移植瘤生长的影响 [J]. 癌症, 2003, 22(12): 1301.
- [7] Huber B E, Austin E A, Good S S. *In vivo* antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine demainase [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(19): 4619.
- [8] 张天泽, 徐光炜. 肿瘤学 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1996.
- [9] Chandra J, Kaunflann S H. *Singal Transduction and Human Disease* [M]. New Jersey: Wiley-Intesreience, 2003.