

壳寡糖抗肿瘤和免疫调节作用的实验研究

曹秀明^{1,2}, 徐海娇¹, 尚明¹, 刘万顺²

(1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心药物所, 黑龙江 哈尔滨 150076
2. 中国海洋大学 生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 研究壳寡糖抗肿瘤的作用和免疫调节作用. 应用 SRB 法对壳寡糖进行体外抗肿瘤作用研究, 对 S_{180} 荷瘤小鼠的瘤重和胸腺及脾指数进行了的观察, 同时观察了壳寡糖体外对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力的影响. 壳寡糖体外对肿瘤生长的抑制作用不明显, 体内实验表明壳寡糖能抑制 S_{180} 小鼠的瘤重. 壳寡糖能显著提高荷瘤小鼠的胸腺指数和脾指数. 壳寡糖体外实验能提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力. 提示壳寡糖有可能是通过调节荷瘤小鼠免疫力实现抗肿瘤作用的.

关键词: 壳寡糖; 抗肿瘤作用; SRB 法; 巨噬细胞

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 1672-0946(2006)04-0008-03

Experimental study on antitumor activities and immunity regulation of chitooligosaccharide

CAO Xiuming², XU Haijiao¹, SHANG Ming¹, LU Wan-shun²

(1. Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences Harbin University of Commerce Harbin 150076 China; 2. School of Life Sciences Ocean University of China Qingdao 266003 China)

Abstract: To study the antitumor activities of chitooligosaccharide and its action on mouse peritoneal macrophages. The *in vitro* antitumor action was observed by SRB. *In vivo* its effects were studied by observing tumor weight of mouse S_{180} , thymus, spleen, exponential tuelyene red pinocytic test of mouse peritoneal macrophages. The effects of chitooligosaccharide inhibits the growth of S_{180} tumor cell is not in evidence *in vitro*, but it can carry out *in vivo*. Chitooligosaccharide promoted the pinocytic ability of mouse peritoneal macrophages *in vitro*. The results showed that antitumor activities of chitooligosaccharide may be achieved by immunity regulation.

Key words: chitooligosaccharide; antitumor activity; SRB; peritoneal macrophages

壳寡糖是海洋多糖甲壳质(N-乙酰-2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖以 β -1,4糖苷键连接起来的多糖,广泛存在于虾、蟹壳和真菌细胞壁及一些绿藻中)C2位脱乙酰基后衍生成的壳聚糖再降解后的产物.壳寡糖有很多生物活性,如提高机体免疫力^[1,2],改善肠道微生物区系分布,刺激有益菌生长^[3].本实验对壳寡糖体外、体内的抗肿瘤

作用进行了研究.同时观察了壳寡糖对荷瘤小鼠的胸腺指数、脾指数及体外对小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬中性红能力的影响.

1 实验材料

1.1 药品、试剂、仪器设备

5-氟尿嘧啶(大丰华曙药业有限公司),壳寡

收稿日期: 2006-04-16

基金项目: 黑龙江省青年基金(N0QQ04C36).

作者简介: 曹秀明(1964-),女,副研究员,博士,研究方向: 中药抗肿瘤药物.

糖由中国海洋大学生命学院刘万顺教授惠赠. 小牛血清、RPMI-1640 培养液均为 Gibco 产品, SRB 为 Sigma 产品, CO₂ 培养箱 LNA(日本), 酶标仪 (美国 Biorad).

1.2 动物、细胞株、瘤株

人肝癌细胞 HepG-2, 肠癌 LS-174, 胃癌 BGC-7901, S₈₀, H₂₂ 小鼠由哈尔滨医科大学肿瘤防治所提供. 昆明种小鼠体重 (20±2.0) g 雄性, 黑龙江省肿瘤防治研究所提供, 合格证号: 黑动字 (R0101014).

2 实验方法

2.1 壳寡糖体外抗肿瘤作用

SRB 实验: 参照 Skehan 的方法^[4], 将细胞浓度调整到 1×10^7 个 /mL 96 孔板接种, 100 μ L 孔, 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后, 加药 100 μ L 每孔总液量为 200 μ L 每个药物设计 6 个复孔, 并设对照孔 (加 RPMI-1640 培养液), 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱培养 72 h 每孔加入 50% 的三氯乙酸 50 μ L 固定细胞. 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 1 h 培养板各孔用去离子水洗涤 5 遍, 空气干燥后, 每孔加入 0.4% SRB 100 μ L 室温下放置 15 min 弃去各孔液体后用 1% 乙酸洗去未结合染料, 空气干燥后用 10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷溶解, 在平板振荡器上振荡 5 min 在酶联免疫检测仪上测定 OD 值, 波长为 490 nm.

抑制率 =

$$(1 - \text{用药孔 OD 值} / \text{空白对照孔 OD 值}) \times 100\%$$

2.2 壳寡糖体内抗肿瘤作用及对胸腺指数和脾指数的影响

壳寡糖对 S₈₀ 荷瘤小鼠瘤重的影响: 取接种 9 d 并生长良好的 S₈₀ 小鼠, 无菌条件下取腹水, 用灭菌生理盐水按体积比 4:1 稀释, 按常规方法^[3], 在

无菌条件下接种于小鼠右侧腋窝皮下 (每只 0.2 mL). 24 h 后称重, 随机分为壳寡糖高、中、低剂量组, 阴性对照组及环磷酰胺阳性对照组. 灌胃给药, 每日 1 次, 每只小鼠 0.2 mL 给药 10 d 后, 小鼠称重后, 剥离脾、胸腺、肿瘤组织并称量. 计算肿瘤率、脾指数和胸腺指数.

2.3 壳寡糖体外对小鼠巨噬细胞吞噬中性红作用的影响

实验前 3 d 小鼠腹腔注射小牛血清 0.5 mL/只, 实验当天颈椎脱臼法处死小鼠, 75% 酒精浸泡 10 min 腹腔注射不含血清的 RPMI-1640 培养液 10 mL^[5], 轻轻按揉小鼠腹部 5 min 收集腹腔液 1 000 r/min 离心, 不含血清的 RPMI-1640 培养液洗涤 2 次, 台盼蓝染色计数活细胞 > 95%, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度至 1×10^6 个 /mL 以每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板, 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h 后, 洗去未贴壁细胞, 按所需剂量加入药物进行培养, 48 h 后每孔加入生理盐水配置的 0.1% 中性红溶液, 继续培养 20 min 后弃去上清液, PBS 洗 3 次, 每孔加入细胞溶解液 ($V_{\text{冰醋酸}} : V_{\text{乙醇}} = 1 : 1$) 100 μ L 室温下放置 2 h 待细胞溶解后在酶标仪上测定 550 nm 处吸光度.

2.4 统计学处理

计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示, 统计分析采用 SPSS1.5 软件, 方差分析.

3 实验结果

3.1 壳寡糖体外抗肿瘤作用

结果见表 1. 实验结果表明壳寡糖体外对人肿瘤细胞 HepG-2, LS-174, BGC-7901 的细胞毒作用并不明显.

表 1 壳寡糖对人肿瘤细胞的细胞毒作用 (SRB 法, $\bar{x} \pm S$ n = 6)

药物	药物质量浓度 / (mg · L ⁻¹)	HepG-2		BGC-7901		LS-174	
		OD 值	抑制率	OD 值	抑制率	OD 值	抑制率
壳寡糖	1 000	0.139 ± 0.013	18.9	0.148 ± 0.004	23.7	0.332 ± 0.052	4.8
	400	0.163 ± 0.019	5.2	0.158 ± 0.006	18.2	0.359 ± 0.0157	1.5
	200	0.141 ± 0.019	18.1	0.166 ± 0.002	14.2	0.376 ± 0.012	2.2
	40	0.147 ± 0.007	14.4	0.169 ± 0.012	12.8	0.382 ± 0.032	15
5- μ	400	0.095 ± 0.004	44.2*	0.089 ± 0.031	54.3**	0.128 ± 0.032	70.9**
	80	0.106 ± 0.004	38.4*	0.107 ± 0.009	45.1*	0.284 ± 0.013	35.2*
	16	0.123 ± 0.008	28.4*	0.110 ± 0.006	43.2*	0.346 ± 0.016	21.3
	3.2	0.138 ± 0.008	19.7	0.134 ± 0.009	30.9*	0.408 ± 0.008	7
空白		0.172 ± 0.004		0.194 ± 0.056		0.439 ± 0.022	

注: * 表示与空白孔比较 $P < 0.05$, ** 与空白组比较 $P < 0.01$

3.2 壳寡糖体内抗肿瘤作用

3.2.1 壳寡糖对 S₁₈₀小鼠瘤重的影响

结果见表 2 实验结果表明中剂量壳寡糖对

S₁₈₀小鼠瘤体的生长有明显的抑制作用. 抑瘤率达到 39.5%, 而高剂量组抑瘤率反而低于中剂量组为 22.6%.

表 2 壳寡糖对 S₁₈₀小鼠瘤重的影响 ($\bar{x} \pm S$ n=10)

药物	剂量 / (g·kg ⁻¹)	给药途径	动物数 (n)	平均瘤重/g	抑瘤率/%
壳寡糖	0.270	ig	10	1.48±0.201	22.6
	0.135	ig	10	1.18±0.125*	39.5
	0.063	ig	10	1.47±0.211*	24.3
环磷酸胺	0.025	ig	10	0.54±0.170*	71.6*
生理盐水		ig	10	1.92±0.206	

注: *表示与生理盐水比较 P<0.01

3.2.2 壳寡糖对 S₁₈₀小鼠胸腺指数、脾指数的影响

高、中剂量壳寡糖组荷瘤 S₁₈₀小鼠的胸腺指数和脾指数明显高于环磷酸胺组和生理盐水组 P<0.01, 低剂量组显著高于生理盐水 P<0.05 低剂量组与环磷酸胺组比较也有极显著差异 P<0.01. 结果见表 3.

表 3 壳寡糖对 S₁₈₀小鼠胸腺指数、脾指数的影响 ($\bar{x} \pm S$ n=10)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	胸腺指数 / (mg·g ⁻¹)	脾指数 / (mg·g ⁻¹)
壳寡糖	0.270	4.23±0.80**△△	6.55±1.26**△△
	0.135	3.83±0.72**△△	6.61±1.43**△△
	0.063	2.96±0.52*△△	5.97±1.36*△△
环磷酸胺	0.025	1.75±0.62**	3.23±1.04**
生理盐水		2.31±0.52△	4.04±0.43△

注: 与生理盐水组比 * P<0.05 ** P<0.01 与环磷酸胺组比 △ P<0.05 △△ P<0.01

3.3 壳寡糖体外对小鼠巨噬细胞吞噬中性红作用的影响

质量浓度为 100~20 mg/L 的壳寡糖能显著提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力. 结果见表 4.

表 4 壳寡糖体外对小鼠巨噬细胞吞噬中性红作用的影响 ($\bar{x} \pm S$ n=6)

组别	寡糖质量浓度 / (mg·L ⁻¹)	A _{550nm}
对照组	0	0.0459±0.0069
寡糖组	200	0.0495±0.0035
	100	0.0527±0.0021△
	20	0.0603±0.0063△

注: 与对照组相比 △ P<0.01

4 讨 论

本实验表明壳寡糖在体外对 HEPG-2、BGC-

7901、LS-174 这几株肿瘤细胞的生长没有明显的抑制作用, 说明壳寡糖没有细胞毒作用. 同时体内实验结果却证明了壳寡糖对小鼠 S₁₈₀实体瘤有显著的抑制作用. 抑瘤率最高可达 39.5%. 壳寡糖能够提高荷瘤小鼠的胸腺指数和脾指数, 说明壳寡糖对胸腺、脾脏有较强的保护作用. 体外实验中壳寡糖还能提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力. 由此我们可以推断壳寡糖具有抗肿瘤细胞生长的作用. 其机理可能是壳寡糖对机体免疫力有保护和调节作用, 而不是直接对肿瘤细胞产生细胞毒作用. 众所周知, 肿瘤患者常伴有机体免疫力下降, 而化疗药物的应用更严重地损害了机体的免疫. 壳寡糖能够通过调节机体免疫系统的机能控制肿瘤细胞的生长. 因此壳寡糖应该在抗肿瘤的治疗过程中发挥一定的作用.

参考文献:

- [1] MEGAHREN W J. Chitosan by fermentation [J]. Process in Chem 1984 19: 88.
- [2] 张 虎, 杜昱光, 虞星炬. 几丁聚糖与壳寡糖的制备和功能 [J]. 中国生化药物杂志, 1999 20(2): 99.
- [3] 杜昱光, 白雪芳, 虞星炬, 等. 寡聚糖类物质生理活性的研究 [J]. 中国生化药物杂志, 1997 18(5): 268-271.
- [4] SKEHAN P, STORENG R, SCUDIERO D et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. J of Nat Cancer Inst, 1990 82 (13): 1107-1112.
- [5] 王晓京, 丁桂凤, 范少光. 几种阿片肽及 ACIH 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的作用 [J]. 中国免疫杂志, 1987 3(4): 211.