

马尾藻多糖的抗肿瘤作用及其免疫功能的研究

梁世忠, 李兴芳, 陈 静, 韦莉莉, 王士长

(广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 530005)

摘要: 分别以马尾藻多糖(SP)、环磷酰胺对 H₂₂ 荷瘤 NIH 小鼠灌胃给药, 通过建立 H₂₂ 实体瘤小鼠模型和 H₂₂ 腹水瘤小鼠模型, 测定其抑瘤率、胸腺指数、脾指数、免疫球蛋白及 T 淋巴细胞数量等指标, 观察马尾藻多糖在 H₂₂ 腹水瘤小鼠体内的抗肿瘤作用及其机理、对 H₂₂ 腹水瘤小鼠生命延长的影响和体内 T 淋巴细胞数量的变化。结果表明, 马尾藻多糖对 H₂₂ 荷瘤小鼠有明显的抑瘤作用, 其质量比为 100 mg/kg 时的抑瘤效果最好, 抑瘤率达到 61.3%; H₂₂ 腹水瘤小鼠经 SP 灌胃后, 胸腺指数、脾指数、T 淋巴细胞数和白细胞数均有明显升高; SP 能显著提高 H₂₂ 腹水瘤小鼠的平均生存时间, SP 质量比为 100 mg/kg 时效果最好, H₂₂ 腹水瘤小鼠生命延长率为 69.87%。

关键词: 马尾藻(*Sargassum*); 多糖; 抗肿瘤; 免疫功能

中图分类号: R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)03-0049-04

癌症对人类健康和生命的威胁很大, 目前的治疗方法主要有外科手术、放射治疗和化学治疗, 以及这三种方法的综合应用。由于外科手术只能切除可见肿瘤, 对分散的、不可见的癌细胞无法消除, 不适宜于癌症晚期和年老体弱的患者; 放射疗法不能根除病因, 易产生局部复发和远处转移; 化疗药物具有严重的毒副作用, 选择性差, 在杀伤癌细胞的同时, 会杀死正常细胞。迄今为止癌症的治疗未达到令人满意的效果。因此本研究拟从中西医结合的角度出发, 在手术、放疗和化疗治疗肿瘤的基础上辅以一种生物反应调节剂, 用以增强机体免疫功能, 探讨治疗癌症的新思路。

马尾藻多糖是从马尾藻中提取出来的一种易溶于水、粘度较高的多糖复合物, 隶属于植物多糖。广泛存在于海藻生物体中, 是一种生物反应调节剂, 具有抗病毒、抗肿瘤、抗凝血等多种功效。关于其抗肿瘤作用, 国内外学者报道很多。卢睿春等^[1~5]利用从亨氏马尾藻(*Sargassum henslowianum*)中提取的硫酸多糖对小鼠艾氏腹水瘤、腹水型肉瘤进行了实验, 结果具有明显的抑瘤效果。

Ellouali 等^[6]观察到低分子质量的海藻多糖能抑制 CCL39 成纤维细胞瘤和 COL032ODM 的增生。Mishima 等^[7]研究发现绿藻多糖的 Ca 螯合物能抑制黑色素瘤 B 16-BL6 的侵袭与转移。由于海藻常年生活在特殊生态环境下, 能产生很多独具特色的次级代谢产物, 包括脂肪酸、芳香族、菇类、醇和含氮、含硫等各种类型的化合物, 其中许多具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗凝血等药理活性成分更兼有生长速度快、光合效率高、无性繁殖和适应能力强等特

点, 使其研究转向应用更具有优势。本课题选用马尾藻作为原料, 从中提取、分离和纯化得到的多糖复合物, 并对其抗肿瘤研究, 旨在为肿瘤药物的寻找和海洋资源的开发利用提供一定的实验研究资料, 期望研制出一种抗癌新药。我国海域辽阔, 海藻资源十分丰富, 采集和养殖工艺简单, 在生命科学领域中, 海藻多糖的重要性和药用潜力正展现出巨大的诱人前景。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

马尾藻多糖(SP): 本课题组从广西北部湾产马尾藻中采用超声波破碎、水浸提、乙醇沉淀提取马尾藻粗多糖, 经 Sevag 法脱蛋白, DE-52 柱层析除色素纯化得到多糖复合物^[8]。SP 呈灰白色粉末状, 溶于水, 不溶于乙醇、氯仿等有机溶剂, 具有抗病毒、抗肿瘤、抗凝血等特性, 且毒副作用小。

抗肿瘤药物——环磷酰胺(Cy): 江苏恒瑞医药股份有限公司生产, 批号: 05090921, 用蒸馏水配置成 20 mg/kg 混悬液。

收稿日期: 2008-05-20; 修回日期: 2008-10-26

基金项目: 广西壮族自治区科学技术厅资助项目(桂科攻 0428005-19A)

作者简介: 梁世忠(1969-), 男, 广西南宁人, 讲师, 硕士研究生, 主要从事生物技术在饲料中应用方面的研究, E-mail: dkylysz@163.com; 王士长, 通信作者, 教授, 电话: 0771-3239123, E-mail: wangshichang20012001@yahoo.com.cn

1.2 动物与瘤株

实验动物:NIH 小鼠,体质量 18~22 g,雌性,由广西中药研究所动物房提供;瘤株:小鼠肉瘤 H₂₂,由广西中药研究所提供。

1.3 瘤株接种

取腹水型 H₂₂瘤株小鼠,于无菌条件下脱颈处死后固定于手术腊板上,常规消毒取腹水,用无菌生理盐水按 1:3 配成细胞悬液,每只小鼠右腋下接种该细胞液 0.2 mL。

1.4 动物分组及给药方法

接种肿瘤立刻称质量,并将小鼠随机分为 5 组,每组 10 只,雌性,分别为:

1 组:空白对照组,蒸馏水 0.2 mL/(10 g·d)灌胃 ig

2 组:环磷酰胺(Cy)对照组,20 mg/kg 腹腔注射 ip

3 组:马尾藻多糖(SP)低剂量组,50 mg/kg 灌胃 ig

4 组:马尾藻多糖(SP)中剂量组,100 mg/kg 灌胃 ig

5 组:马尾藻多糖(SP)高剂量组,200 mg/kg 灌胃 ig

1.5 动物处理

小鼠接种分组后,立刻按各组剂量要求用马尾藻多糖进行连续 14 d 灌胃处理。停止灌胃后次日称动物体质量,拔眼球取血,分别用于白细胞计数和测定免疫球蛋白。脱颈处死动物,并固定于手术蜡版上,取瘤体、脾、胸腺、肝、心、肺、肾,并称质量。按以下公式求抑瘤率。

抑瘤率(%)=(对照组平均瘤质量-实验组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量×100%

脏器系数(mg/g)=10×脏器质量/小鼠体质量

1.6 T 淋巴细胞阳性率的测定

采用 T 淋巴细胞酯酶染色法^[9,10]将小鼠尾端剪掉后用玻片取血推片,血片自然干燥,置于 4℃ 固定液中固定 30 min,取出后用自来水流水冲水约 0.5 min 左右,空气干燥 30 min(室温),将干燥后血片浸入孵育液中,37℃ 条件下浸染 2 h,取出后用流水充分冲洗血片上的沉淀物,用甲基绿对比染色 30 min,流水冲洗,空气干燥后测定 T 淋巴细胞阳性率。

1.7 白细胞(WBC)总数计数

在最后一次用药后 3 h 经鼠尾取血 20 μL,加入 0.38 mL WBC 稀释液中混匀,取混匀稀释血液 1 滴,滴入计数盘中,静置 2~3 min,用低倍镜计数四角的

四大格中的 WBC 总数。

WBC/L=4 大格白细胞总数/20×10⁹

1.8 数据分析与处理

采用 Excel 处理数据,SAS8.0 单因素分析其差异显著性。实验数据的结果以均数加减标准误差($\bar{x} \pm S$)表示。

2 结果与讨论

2.1 肉瘤小鼠的一般情况

小鼠接种后前 3 d 与正常组在外观上无明显差异,第 4 d 于右腋皮下可触到扁平包块,一组摸之较明显,多糖组和环磷酰胺组摸不到包块,且多糖组精神较好。一周后一组和二组饮食明显减少,形体消瘦,被毛无光泽,竖毛现象明显,运动迟缓,反应迟钝。多糖组被毛有光泽,无竖毛现象,精神佳,仍喜活动,只是随着瘤体增大,运动较迟缓,食量稍减。

2.2 马尾藻多糖对 H₂₂ 肉瘤小鼠生长的影响

小鼠给药 14 d 后,给药组小鼠与对照组小鼠相比肿瘤体积减少,肿瘤质量明显减轻。从表 1 可以看出,与 1 组相比,2 组、4 组的平均瘤质量较小,且差异显著,3 组、5 组的平均瘤质量也相应的减少,但差异不显著。各种浓度的多糖对小鼠 H₂₂ 肉瘤均有不同程度的抑制作用,2 组使小鼠 H₂₂ 肉瘤的生长受到明显抑制,抑瘤率达 61.3%。而试验组中剂量为 100 mg/kg 的 4 组对小鼠 H₂₂ 肉瘤抑制效果最好,已经达到 2 组的抑制水平,抑瘤率达 61.3%。本次实验结果表明,不同浓度的马尾藻多糖均具有良好的抗肿瘤作用,均高于《现代肿瘤治疗药物学》关于抗肿瘤中草药有效性的标准(抑瘤率 >30%)以上的指标。

表 1 马尾藻多糖对 H₂₂ 肉瘤小鼠生长的影响

Tab. 1 Anti-tumor effect of SP on mice with H₂₂ tumor

组别	小鼠数量 (只)	剂量 (mg/kg)	平均瘤质量 (g)	抑瘤率 (%)
1	10	0	1.446±0.232 ^a	0
2	10	20	0.559±0.115 ^b	61.3%
3	10	50	0.998±0.277 ^{ab}	31.0%
4	10	100	0.559±0.069 ^b	61.3%
5	10	200	0.982±0.291 ^{ab}	32.1%

注:同列不同字母表示差异显著(P<0.05),相同字母表示差异不显著(P>0.05),下同

2.3 马尾藻多糖对 H₂₂ 肉瘤小鼠脏器指数的影响

从表 2 可以看出,各多糖组的胸腺指数均高于

1组,但差异不显著。与2组相比,各多糖组的胸腺指数也有所升高,差异不显著。与1组相比,2组的脾指数明显下降,但差异不显著,除5组稍微下降外,其它组都升高,但差异不显著。与2组相比,各多糖组的脾指数都有所增高,其中4组差异显著。从而说明环磷酰胺明显导致荷瘤小鼠免疫器官胸腺、脾脏萎缩,多糖对荷瘤小鼠免疫器官胸腺、脾脏有明显的保护作用。

表2 马尾藻多糖对H₂₂肉瘤小鼠脏器指数的影响

Tab. 2 Effect of SP on organ index of mice with H₂₂ tumor

组别	剂量(mg/kg)	胸腺指数	脾指数
1	0	0.030±0.002 ^b	0.072±0.003 ^{ab}
2	20	0.025±0.003 ^b	0.058±0.004 ^b
3	50	0.034±0.002 ^{ab}	0.074±0.005 ^{ab}
4	100	0.031±0.003 ^b	0.085±0.007 ^a
5	200	0.031±0.006 ^b	0.069±0.005 ^b

脾是机体最大的免疫器官,主要功能是参与免疫反应,含有大量的淋巴细胞和巨嗜细胞,是机体细胞免疫和体液免疫的中心,通过多种机制发挥抗肿瘤作用。胸腺(thymus)为机体的重要淋巴器官,其功能与免疫紧密相关,产生T淋巴细胞,而整个淋巴器官的发育和机体免疫力都必需有T淋巴细胞,故胸腺为周围淋巴器官正常发育和机体免疫所必需。灌喂马尾藻多糖能升高脾指数和胸腺指数,充分说明了它能提高小鼠免疫功能。

2.4 马尾藻多糖对H₂₂肉瘤小鼠T淋巴细胞和白细胞的影响

从表3的结果可以看出,与1组相比,2组的T淋巴细胞阳性率明显下降,且差异显著,各浓度的马尾藻多糖组的T淋巴细胞阳性率明显上升,且差异显著。与2组相比,各浓度的马尾藻多糖组的T淋巴细胞阳性率上升极显著。淋巴细胞是具有特异性免疫功能的一种白细胞,包括T细胞和B细胞。T淋巴细胞随血液或淋巴液流动到达抗原所在地,通过与抗原的直接接触,才分泌出免疫活性物质,发挥其免疫作用,如排斥移植来的异体组织、破坏肿瘤细胞、抑制病毒与细胞繁殖等,故称之为细胞免疫。T淋巴细胞阳性率明显上升,说明给小鼠灌胃马尾藻多糖可调节T、B淋巴细胞的比率,刺激T淋巴细胞数量增长,增强机体的免疫力。

表3 马尾藻多糖对H₂₂肉瘤小鼠T淋巴细胞和白细胞的影响
Tab. 3 Effect of SP on T lymphocytes rate and WBC of mice with H₂₂ tumor

组别	剂量(mg/kg)	T淋巴细胞阳性率(%)	白细胞密度(×10 ⁹ 个/L)
1	0	40.1±0.87 ^b	8.60±0.11 ^d
2	20	33.2±0.83 ^c	3.51±0.11 ^e
3	50	54.1±0.95 ^a	10.12±0.14 ^b
4	100	55.8±1.02 ^a	10.38±0.13 ^b
5	200	54.6±0.85 ^a	11.38±0.16 ^a

经环磷酰胺作用后,小鼠血液白细胞密度下降,与1组相比有显著差异。各浓度的多糖组可使小鼠的白细胞密度升高,与对照组相比有显著差异。多糖对环磷酰胺所致小鼠白细胞减少有改善作用,说明其对免疫功能有促进作用。

2.5 马尾藻多糖对H₂₂腹水瘤小鼠生存时间及生命延长的影响

从表4的结果可以看出,与1组相比,2组和各多糖给药组的平均生存时间都有所延长,其中2组和4组平均生存时间最长,且差异显著,高于《现代肿瘤治疗药物学》关于抗肿瘤中草药有效性的标准(腹腔给药时,生命延长率>50%)以上的指标。4组在多糖组中的生命延长率最高,与2组接近,差异不显著。结果提示,马尾藻多糖对H₂₂腹水瘤小鼠存活时间有明显的影。

表4 马尾藻多糖对小鼠H₂₂腹水瘤生存时间及生命延长

Tab. 4 Effect of SP on average survival time and prolonging life rate of mice with H₂₂ tumor

组别	剂量(mg/kg)	小鼠数量(只)	平均生存时间(d)	生命延长率(%)
1	0	11	14.77±1.21 ^c	0
2	20	11	28.68±6.05 ^a	94.18
3	50	11	20.23±0.97 ^{bc}	36.97
4	100	11	25.09±1.52 ^{ab}	69.87
5	200	11	16.77±0.69 ^{bc}	13.54

天然多糖具有抑制肿瘤细胞生长和提高机体免疫功能的作用,这已被国内外大量研究证实。而本研究用的马尾藻多糖是从广西北部湾产马尾藻中提取的多糖复合物,对H₂₂肉瘤小鼠有明显的抑瘤作用,同时对Cy所致的白细胞下降有显著的保护作用,增强机体免疫系统功能的作用,其抗肿瘤作用途径可能是通过增强肉瘤小鼠机体对肿瘤细胞的防御能力和增强宿主免疫系统的功能来间接实现的,机制有待进一步研究。广西北海涠洲岛马尾藻资源丰富,马尾藻多糖毒副作用小,作为抗肿瘤药物的增敏剂有着良好的开发应用前景。

3 结论

(1) 马尾藻多糖对 H₂₂ 腹水瘤小鼠有明显的抑瘤作用,当质量比为 100 mg/kg 时抑瘤效果最好,抑瘤率达到 61.3%。

(2) 灌喂马尾藻多糖对荷瘤小鼠免疫器官胸腺、脾脏有明显的保护作用,提高脾指数和胸腺指数,充分说明了它能提高小鼠免疫功能。

(3) 马尾藻多糖对 H₂₂ 肉瘤小鼠 T 淋巴细胞和白细胞阳性率明显提高,调节 T、B 淋巴细胞的比率,刺激 T 淋巴细胞数量增长,增强机体的免疫力。

(4) 马尾藻多糖对 H₂₂ 腹水瘤小鼠存活时间有明显的影 响,当质量比为 100 mg/kg 时,小鼠的生命延长率最高,为 69.87%。

参考文献:

[1] 卢睿春,候振建,刘婉乔,等. 亨氏马尾藻硫酸多糖抗肿瘤活性的研究[J]. 海洋科学, 1998, 3: 63-65.
 [2] 邓志峰,纪明候. 龙须菜和扁江篱多糖的组成及其抗肿瘤效果[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(6): 575-577.
 [3] 高向东,吴梧桐. 螺旋藻多糖抗肿瘤作用的研究[J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(6): 458-460.

[4] 刘秋英,孟庆勇,刘志辉. 海藻多糖抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国海洋药物, 2003, 4: 45-48.
 [5] 刘秋英,孟庆勇. 半叶马尾藻多糖体内抗肿瘤作用及其机制探讨[J]. 第一军医大学学报, 2004, 4: 21-23.
 [6] Ellouali M, Boisson V C, Durand P, et al. Antitumor activity of low molecular weight fucans extracted from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* [J]. **Anticancer Res**, 1993, 13(6A): 2 011-2 016.
 [7] Mishima T, Murata J, Toyoshima M, et al. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis* [J]. **CLirn Exp Metastasis**, 1998, 16(6): 541-541.
 [8] 史军花,梁忠岩,耿惠,等. 猴头发酵菌丝多糖的分离、提取、纯化及其初步研究[J]. 长春师范学院学报, 2002, 1: 7-9.
 [9] 宫伟,吕化仙,彭凤生,等. T 淋巴细胞酯酶染色法在连续观察小鼠末稍血的应用[J]. 上海免疫学杂志, 1981, 4: 31-33.
 [10] 朱辛为,李质馨,窦肇华,等. T 淋巴细胞标记染色——ANAE 法的改进[J]. 解剖学杂志, 2003, 3: 300-301.

Antitumor activity and immune activity of polysaccharides sargassum

LIANG Shi-zhong, LI Xing-fang, CHEN Jing, WANG Shi-chang

(College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, Chnia)

Received: May, 20, 2008

Key words: *Sargassum*; polysaccharides; antineoplastic; immune function

Abstract: This paper deals with the systemic effects of polysaccharides Sargassum (SP) on NIH mice with H₂₂ tumor. The antitumor effort and immune function of SP were evaluated. H₂₂ tumor bearing mice entity model was established, was treated by gavage with different does of SP and the inhibition rates, thymus and spleen index T lymphocytes and WBC were measured, the vivo deffects on the antitumor were studied. H₂₂ tumor bearing ascites mice model was established and the average survival time was measured.

The SP have an evidence in vivo antitumor effect. The inhibition rates are 61.3% on H₂₂ in the concentration of 100 mg/kg. Treatment by gavage with SP can increase the thymus and spleen index, strengthen T lymphocytes and WBC and increase the IgA, IgM, IgG. The SP can improve the average survival time on the ascites mice, the highest inhibition rate is 69.87% in the concentration of 100 mg/kg.

The SP has a definite antineoplastic effect and promotes the immune function of tumor bearing mice.

(本文编辑:康亦兼)