

蛤仔提取物抗啮齿动物肿瘤实验*

中国科学院海洋研究所药用组 青岛市医药科学研究所

北京生物制品研究所肿瘤免疫组

利用海产蛤类治疗肿瘤,我国古代早有记载。如《神农本草经》中写道:“文蛤主恶疮”^[2],宋时的《卫济宝书》则有“癌疾初发,……宜下大车螯散取之”^[1]等记述,明朝的《本草纲目》述及“车螯”之肉可“治痈疽”,还提到淡菜(贻贝的干制品)能“治症瘕”^[3]。可见我国以海洋双壳类软体动物治疗肿瘤和包括肿瘤的疾病,由来已久。至今我国沿海渔民仍有流传以“海蛤”治癌的土方。

当前,向大海要药已成为药物研究的新动向,我国和世界各国对于防治肿瘤的重视,在一定程度上促进了海洋抗癌药物的研究,并已取得了一些进展。就蛤类而言,自六十年代以来,李振翩(C. P. Li)等在指出贝类提取物具有抗病毒和抗菌作用之后,李、Schmeer和其他研究者先后报道了硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)提取物对啮齿动物肿瘤(包括白血病)的预防和抑制效应及其活性物质(Schmeer称之为“Mercenene”,意即“蛤素”)的化学和生物学特性^[6-8,11-14]。Hegyeli观察到这种蛤提取物的活性随环境水温的变化而消长^[5]。近年,Liu和Lippman等人相继探讨了硬壳蛤肝脏提取物的抑瘤活性^[9,10]。此外,蛤类其他种也有人进行了抑瘤试验。但是,迄今尚未见有其临床观察的报道。

“古为今用,洋为中用”。为了寻求发掘、利用我国海洋药源的途径,我们根据我国古代的记载与民间流传的经验,以及国外文献的线索和生物生态现象的启示,自1970年起进行了30多种海洋动、植物抗动物肿瘤的初步实验。本文报道的就是该项实验结果之一,文中叙述的蛤仔[*Venerupis (Amygdala) philippinarum* Adams et Reeve]是我国分布广、产量高的一种普通海产品。本实验旨在初步探明蛤仔提取物的抑瘤活性,并试图为从海洋双壳类中寻找抗癌药物摸索一条可行的路子。通过实验,证实蛤仔提取物对啮齿动物移植性肿瘤生长具有一定的抑制效应,并观察到其抑制值的季节变化似与蛤仔的性腺发育周期或肝脏季节变化有关。由于发现提取物中存在着过敏原,因而用于临床尚有待深入探讨。现就以下几方面作分别叙述。

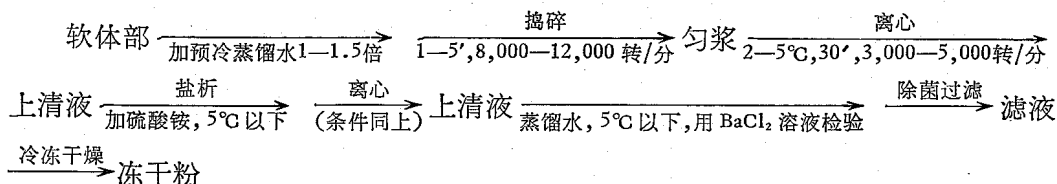
实验与结果

1. 蛤仔提取物的制备

(1) 材料 均为活蛤,采自胶州湾红岛公社附近海滩,供提取的部位为其软体部。采集时间包括春、夏、秋各季的一些月份。

* 中国科学院海洋研究所调查报告第377号;本实验承中国医学科学院药物研究所药理研究室和山东省医学科学院研究所肿瘤研究室协助进行部分动物实验,特此致谢。

(2) 制备 用海水洗净蛤仔壳上的污泥后,移入新鲜海水中放养过夜,使其充分吐出泥沙。次日,挑选健康个体,去壳,剥取其软体部(包括体液),然后按下列流程提取。



一般都在除菌过滤后,取滤液灌封,即为冷剂;只1973年4月份材料经冷冻干燥制成冻干粉(批号为 V73-4-A、B、C₁、C、D₁、D、E)。所加硫酸铵的饱和度通常为 33%,也曾分别不加(0%)或加至 10%、22%、33%、45% 和 60% 的饱和度,进行盐析、提取¹⁾,以观察提取物抑瘤效应的差别。

为了比较,曾用加热提取法。取软体部加两倍水搅碎成匀浆后,高压加热(110°C),过滤,滤液加明矾,再过滤,取滤液灌封,即为热剂。

2. 急性毒性试验

(1) 冷剂D的急性毒性试验 选取体重 18—22 克的小鼠,随机分为四组,每组四只。按剂量组分别地一次腹腔注入冷剂D原液 0.8、0.6、0.4 和 0.2 毫升/只,观察 3—7 天。一般除 0.8 毫升/只组给药后明显出现竖毛、不活泼等反应外,余未见中毒及死亡现象,二、三天后全部恢复正常。由此确定一次腹腔给药量为原液 0.5 毫升/只。

(2) 冻干粉D的急性毒性试验 用生理盐水将冻干粉稀释成预定的各种浓度混悬液后,供下列试验用。

预试:将小鼠(18—22 克)随机分为六组,每组四只,各组分别按 12.5、2.5、0.5、0.1、0.02 和 0.004 克/公斤的剂量腹腔注入冻干粉混悬液,观察七天。结果 12.5 克/公斤组全部死亡,其他各组正常或渐趋正常。

半数致死量(LD₅₀)的初步测定:根据预试测定的剂量范围,将小鼠随机分为五个剂量组(见表 1),每组四只,按预定剂量一次腹腔注入冻干粉混悬液,观察七天。大剂量组动物于给药五小时后开始死亡,至第三天止,存活者逐渐恢复正常。依 Lärber 氏法计算 LD₅₀ 约为 4.38 克/公斤,取此量的约 1/7 即 600 毫克/公斤为一次给药量。

(3) 冻干粉A与冻干粉C的毒性比较 为了比较冻干粉A与C的毒性,各设五组,

表 1 冻干粉 A、C、D 的急性毒性试验结果

剂 量 (克/公斤)	冻 干 粉 A	冻 干 粉 C	冻 干 粉 D	
	死 亡 率	死 亡 率	剂量(克/公斤)	死 亡 率
12.5	1.0	1.0	12.5	1.0
6.25	0.0	1.0	10.0	1.0
3.12	0.0	0.0	7.5	0.75
1.56	0.0	0.0	5.0	0.0
0.78	0.0	0.0	2.5	0.0

1) 所有的提取物及其批号均依此顺序分别以 A、B、C、D、E、F 表之,以示区别。如:“提取物 A”指提取时未加硫酸铵,“V73-4-D”指 1973 年 4 月份采集的材料,用 33% 饱和度硫酸铵盐析,余类推。

每组四只小鼠,按所需剂量分别腹腔注入这两种冻干粉混悬液,观察七天。结果给以冻干粉C的动物于给药次日两个大剂量组全部死亡,给以冻干粉A的,给药第三天最大剂量组死尽。结合冻干粉D的毒性看,冻干粉C、D的毒性都比冻干粉A的大(见表1)。

3. 疗效实验

(1) 肿瘤模型 实验所用的动物肿瘤模型有小鼠肉瘤 180 (S_{180})、小鼠艾氏腹水癌(EAC)、小鼠肝癌实体型、小鼠肝癌腹水型(HepA)、艾氏实体癌和 L_{615} 小鼠白血病(L_{615}),其中以 S_{180} 和 EAC 为主。

(2) 接种和分组 动物体重一般为 18—20 克,按常规接种后,随机分组,通常每组雌雄各半或互成四六之比。实体瘤和腹水瘤用小白鼠 10 只为一组, L_{615} 用 L_{615} 纯种小鼠 5 只为一组。

(3) 给药方法 冷剂和热剂用原液或 1:1, 1:1.5 的稀释液,冻干粉用 25 倍生理盐水稀释的混悬液,参照小鼠急性毒性试验结果确定每日剂量,由腹腔注射给药。实体瘤和腹水瘤给药十天, L_{615} 给药六天。对照组给予等量的生理盐水。

(4) 疗效的判断 停药次日,将实体瘤动物处死,称其体重和瘤重,比较给药组和对照组的平均瘤重,计算抑制率。腹水型者继续观察至满 50 天,处死,比较给药组与对照组平均生存天数,计算生命延长率。 L_{615} 则称重后观察至全部死亡,同样计算其生命延长率。凡疗效达到要求指标者,用统计学方法比较其差异的显著性,以 $P < 0.05$ 者为有效。

(5) 结果 实验共进行了 50 组(给药组),其中 S_{180} 18 组, EAC 19 组,肝癌实体

表 2 4—6 月份蛤仔提取物对动物肿瘤抑制率的分布

动物模型		出现次数 硫酸铵饱和度	抑制率 %	30 — 40 — 50 — 60			
S_{180}	0%					1*	1
	22%				1		1*
	33%			4	1		
肝癌实体型	22%				1		
	33%				1	1	
动物模型		出现次数 硫酸铵饱和度	延长率 %	50 — 100 — 150 — 200			
EAC	0%				1		
	22%			1		1	
	33%			1		1	3
HepA	0%				1		
	22%			1			
	33%			1	1	1	

* 实验期间动物死亡20%

型 4 组,肝癌腹水型 5 组,艾氏实体癌 1 组, L_{615} 3 组。

实验结果表明,蛤仔提取物对动物移植性肿瘤生长有一定的抑制作用,但各模型株的反应不同(见表 2)。以 4—6 月份采集蛤仔的提取物为例, EAC 最为敏感,实验的八组生命延长率全部达到 50% 以上,最高的三组超过 200%;其中以 33% 硫酸铵盐析提取的 4 月份样品所作的五组重复实验,均出现了较高的生命延长率:第一次一组为 96.1%,第二次两组 246 和 201%,第三次一组 158% 和第四次一组 201%。HepA 的五组实验,除 33% 硫酸铵盐析的提取物组中的一组外,延长率皆达到 50% 和 100% 以上。 S_{180} (除 33% 硫酸铵盐析的提取物组中的四组外)和肝癌实体型皆出现较好的结果,前者抑制率高的可达 60% 以上,后者有二组在 40% 以上。惟 L_{615} 做了三组动物试验,全无疗效,可能与该模型对蛤仔提取物不敏感有关。

用不同饱和度的硫酸铵盐析,其提取物的疗效也不同(表 3)。对于实体瘤,不加硫酸铵和加 10%、22% 饱和度硫酸铵盐析的提取物,疗效较高,超过此饱和度疗效便下降,饱和度增至 60%,疗效略增。 V_{73-4-A} 、B、C、D、E 和 V_{72-4-F} 对 S_{180} 的六组试验结果,可以反映这种趋势,抑制率在 A、B、C 组较高(55—65%),D 组降至 24.6%,E 组为负值,

表 3 不同饱和度硫酸铵盐析的蛤仔提取物的疗效比较

动物 模型	抑 制 率 批 号	(NH ₄) ₂ SO ₄ 饱和度					
		0% -A	10% -B	22% -C	33% -D	45% -E	60% -F ¹⁾
S_{180}	V73-4	55.3	63.2	65.4	24.6	(-)	10.0
	V73-6	69.0	—	42.4	(-)	—	—
EAC	V73-4	148	—	58.0	201	—	—
HepA	V73-6	102	—	63.9	89.9	—	—

1) 系 V_{72-4-F}

F 组 10%。 V_{73-6-A} 、C、D 对 S_{180} 的抑制率是: A 组 69%, 最高, C 组 42.4%, 次之, D 组负值。对腹水瘤的疗效,就 V_{73-4-A} 、C、D 对 EAC 和 V_{73-6-A} 、C、D 对 HepA 的六组试验结果看,都以 33% (D 组) 和 0% (A 组) 饱和度的较高,而 22% (C 组) 饱和度的较低。对于 L_{615} , 则无论用 22% 或 33% 饱和度硫酸铵盐析的提取物均无效。

从材料采集的季节看,蛤仔提取物大致都是 4、6 月份的疗效比此后各月的高(表 4)。举提取物 D 为例,两年都以 4 月份采集的蛤仔提取物对 EAC 的疗效最高,延长率达到 200% 以上,对肝癌实体型和肝癌腹水型也有一定疗效。1973 年 6 月份材料对 HepA 仍保持 90% 的延长率。但 8 月和 10 月的疗效均明显下降。提取物 A、C 也有类似的趋势。

与低温盐析制备的冷剂相比,加热提取的热剂的抑瘤作用显然是很小的,一次试验结果是:对 S_{180} 为 19% 抑制率,艾氏实体癌和艾氏腹水癌都无效。

为了了解与蛤仔亲缘较近种类提取物的抗癌活性,曾以 9 月份采集的、同属于帘蛤科(Veneridae)的文蛤(*Meretrix meretrix*)为材料,分别制备其软体部提取物(用 33% 饱和度的硫酸铵盐析)和肝提取物(用水-乙醇提取)。它们对 S_{180} 的抑制率是:前者 34.3%,后者 55%,显示了文蛤特别是它的肝脏提取物的抑瘤活性,值得加以注意。

表 4 蛤仔提取物 D 的各月疗效比较

S ₁₈₀ (△)、肝癌实体型(○)							EAC (▲)、肝癌腹水型 (●)									
疗效 抑制率(%)	年 月	1972		1973				疗效 延长率(%)	年 月	1972			1973			
		4	10	4	6	8	10			4	9	10	4	6	8	10
40		○						200		▲			▲			
30				△	○			150					▲			
20		△		△				100					●			
10						△	△	50		▲				●		
0			○		△			0		●	▲	▲			▲	▲

此外,我们还观察了蛤仔提取物对 HeLa 细胞的抑制作用。方法是取 10 及 100 倍稀释的冻干粉 D 混悬液及煮沸 30 分钟的冻干粉 D 混悬液,分别进行两组试验:一组待细胞生长成片后再注入这种混悬液,另一组是把细胞与混悬液混合后进行培养。每个样品接种四瓶,观察五天。结果对照组细胞透明、均匀成片、形态完整;10 倍稀释的混悬液组只见少数细胞贴瓶,细胞呈圆缩散集状;100 倍稀释的混悬液组大部分细胞贴瓶,呈稀松状,有圆缩现象;而经煮沸处理的混悬液组,细胞生长成片,形态无明显变化,与对照组细胞相似。

又曾用抗噬菌体法观察蛤仔提取物的抑瘤效应。方法为双层琼脂平板-纸片法,五批试验结果除一批无效外,均显示了抗噬作用。以上初步试验表明,蛤仔提取物在体外亦有抗癌作用。

4. 过敏性试验

取体重 250—350 克的健康豚鼠六只,间日腹腔注入内含冻干粉 20 毫克的混悬液 0.5 毫升,连续三次,然后分为两组,使动物致敏。然后,分别在第一次注射后的第 14 天及第 21 天,耳静脉攻击注射上述混悬液 1 毫升,注意观察反应。

第一批试验(用 V73-4-D₁):致敏后第 14 天进行攻击注射的组,三只豚鼠中有一只死于过敏性反应,其余两只有抓鼻、咳嗽及打喷嚏等过敏反应,但未死亡;致敏后第 21 天进行攻击注射的组,三只豚鼠全部死于过敏性反应。

第二批试验(用 V73-4-C、D):致敏后第 14 天进行攻击的组,结果不论 V73-4-C 或 V73-4-D 试验的豚鼠均全部发生过敏性反应而死亡。

以上实验结果表明,蛤仔提取物含有过敏原。

讨 论

在本实验中,蛤仔提取物对艾氏腹水癌、肝癌腹水型、肝癌实体型和肉瘤 180 皆重复出现较高的抑制率,在 HeLa 细胞试验中也表明有抑制作用。它初步显示的生物学和化学的某些特性与硬壳蛤素相似^[9,10-14],但疗效还不及后者。这可能与目前还处于粗提阶段有关,估计通过提纯,疗效可望提高。如能对蛤仔的肝脏、性腺和外套膜等生理功能、化

学成分各殊的器官分别提取,也许还可以找到疗效更高的部位。

蛤仔提取物的生物学特性表现最突出的是它疗效的季节变化。两年实验结果都是4、6月的抑制率较高,此后各月降低(我们称前者是“高效季节”,后者为“低效季节”)。Hegyceli认为,硬壳蛤提取物在冬季抑瘤活性低于夏季,如提高环境水温仍可恢复其较高的夏季抑瘤值^[5],而我们实验的蛤仔提取物的抑制率随着胶州湾夏季水温的上升反而降低,两者高效季节要求的水温似乎是不同的。两年抑制率最高的4月份,都是蛤仔最肥满,基本上处于性腺发育的生长期^[4],一般认为此时肝脏最发达;抑制率最低的9—10月份,蛤仔出肉率最低,多数个体达到性腺发育的生殖期,此时肝脏相对变小(图1)。这些现象是否暗

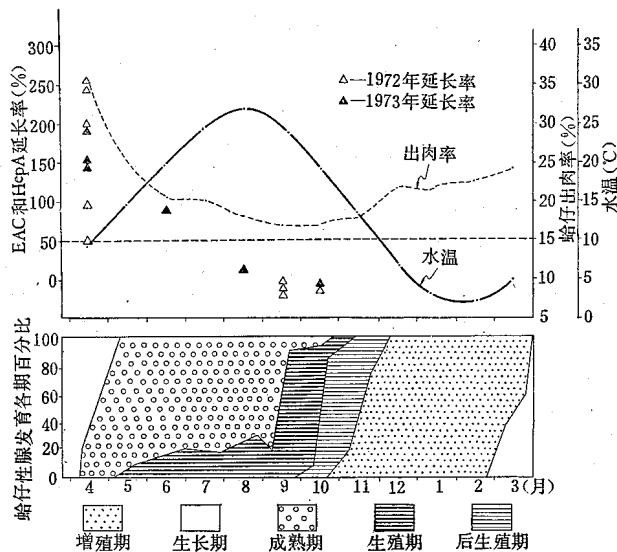


图1 蛤仔提取物D对动物腹水癌疗效的季节变化与蛤仔各月出肉率*、蛤仔性腺发育周期**和胶州湾水温年变化的比较

* 据中国科学院海洋研究所贝类组 1967—68 年胶州湾蛤仔生长情况测定表(未刊资料)

** 见李嘉泳等,1962,图 VII. 半叉蛤与蛤仔的性腺发育周期^[4]。据中国科学院海洋研究所原形态组鉴定,半叉蛤与蛤仔均为蛤仔的同物异名。

示着: 蛤仔提取物抑瘤效应的季节变化与蛤仔体内生理状况的变化(如性腺发育或肝脏物质转移……等)有关,尚有待证实。它们之间如确有内在联系,也许有助于我们找到提高疗效的途径。

Schmeer (1972)根据硬壳蛤的工作指出,硫酸铵饱和度达 20—25% 时,上清液中提取物所含的活性物质最多,>25% 则减少,若增至 50% 以上,活性又提高^[12,13]。V73-4-A、B、C、D、E 和 V72-4-F 对 S₁₈₀ 的各组试验结果,大致亦有类似的趋势(见表 3)。但在其他各组试验中,还不完全一致;对腹水癌,饱和度 33% 的反而比 22% 的具有较长的活存时间。所以,用硫酸铵以何种饱和度最适宜,何者为最大有效饱和度尚不能确定,只能大体上说 22% 或 33% 饱和度盐析的疗效较高,超过此值为过量。看来,饱和度达 45% 时,有效成分的大部分不再存在于上清液中。又,不加硫酸铵的提取物,其疗效不亚于硫酸铵盐析的提取物,在“高效季节”各批试验中,皆出现较高或最高的抑制率。因而我们认为,如不是对蛤仔提取物的最适饱和度作进一步探讨和进行提纯或分析、鉴定,在粗提中是否需

用硫酸铵盐析是值得商榷的。

目前存在的问题之一是, 蛤仔提取物中含有过敏原。这是临床试用前亟待解决的问题, 估计也是其他海洋动物制剂可能遇到的难题。一般也认为, 用蛋白质成分作为药物的缺陷之一是有抗原性^[10]。因此, 进一步的工作, 最好从化学提纯着手, 确定有效物质的化学成分, 再探索减除过敏原的途径。

急性毒性试验表明: 蛤仔提取物与硬壳蛤素一样含有一定的毒性^[10, 12-14]。但毒性似乎不大, 只要剂量选择适当, 可望获得预期的效果。以 V73-4-D 为例, 按半数致死量的 1/4 量对 EAC 给药, 动物出现中毒反应; 后来减为 1/7 量, 看来是比较合适的, 获得了较高的疗效。诚如 Schmeer 等人所说, 硬壳蛤素有毒物质由存在于上清液中的钾和其他金属盐类组成^[12], 那么透析完全与否就成为免除毒性的重要一环。

综合以上和以前试验初步证明有抑瘤效应的蛤仔、文蛤、马氏珍珠贝 [*Pteria (Pinctada) martensii*]¹⁾, 和我国古代、民间流传可治肿瘤的海产蛤类, 加上近年国外报道有抗癌活性的硬壳蛤、康佩切硬壳蛤 (*Mercenaria campechiensis*)、大仙女蛤 (*Macrocallista nimbosa*)、细牡蛎 (*Ostrea spreta*)、美国牡蛎 (*O. virginica*)……等至少分属于二个目四个科的海洋双壳类软体动物, 它们之间, 无论亲缘远近, 分布毗邻或隔离, 生态相似与否, 其提取物都显示抗肿瘤活性。推想这类动物可能是广泛含有抗肿瘤成分的一个潜在药源; 且其种类繁多, 资源丰富, 在筛选海洋抗癌药物中, 将是不可忽视的一个类群。

参 考 文 献

- [1] 东轩居士, 1171. 卫济宝书. 人民卫生出版社, 1956 年影印本。
- [2] 吴普等述, 魏. 神农本草经. 商务印书馆, 1955 年影印本。原书约著成于东汉以前。
- [3] 李时珍, 1578. 本草纲目, 介部. 商务印书馆, 1954 年重印本。
- [4] 李嘉泳、邹仁林、王秋、杨德渐, 1962. 胶州湾两种习见蛤 (*Venerupis semidecussata* 和 *V. philippinarum*) 的生殖周期. 山东海洋学院学报(海洋生物专号): 43。
- [5] Hegyeli, A., 1964. Temperature dependence of the activity of the antitumor factor in the common clam. *Science*, **146**: 77.
- [6] Judge, J. W., 1966. Inhibition of effects of leukaemogenic viruses in mice by extracts of *Mercenaria mercenaria*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **123**: 299.
- [7] Li, C. P., Martino, E. C., and Liu, O. C., 1968. Antineoplastic activity of clam liver extract. *Nature*, **219**: 1163.
- [8] Li, C. P., Tauraso, N. M., Prescott, B., Eddy, B. E., Hoyer, R. C., Martino, E. C., Caldes, G., and Gorschboth, C., 1972. Intratumor therapy in Rodents with aqueous clam extracts. *Cancer Res.*, **32**: 1201.
- [9] Lippman, M., Mathews, M., and Cifonelli, A., 1971. Complete and reversible inhibition of cell division by Macton, A non-mamalian heparin. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **12**: 38.
- [10] Liu, O. C., Li, C. P. and R. J. Cipolia, 1968. The antiviral and antileukemic activity of shellfish extracts. In *Drugs from the Sea*, ed. by H. D. Freudenthal, MTS, pp. 141—150.
- [11] Prescott, B., and Caldes, G., 1967. Chemical studies of an antitumor substance from clams. *Fed. Proc.*, **26**: 314.
- [12] Schmeer, M. R., 1964. Growth-inhibiting agents from *Mercenaria* extract: Chemical and biological characteristics. *Science*, **144**: 413.
- [13] ———, 1972. Clam extracts effective against Sarcoma-180 and Krebs-2 carcinoma in mice. *U. S. Pat.*, **3**: 655, 875.

1) 其贝壳珍珠层粉对小鼠 S₁₈₀ 灌胃显示 30% 以上的抑制率。

- [14] Schmeer, M. R., Horton, D., and Tanimura, A., 1966. Mercenene, a tumor inhibitor from *Mercenaria*: Purification and characterization studies. *Life. Sciences*, 5:1160.

INHIBITORY EFFECT OF THE EXTRACT OF THE COMMON CLAM *VENERUPIS (AMYGDALA) PHILIPPINARUM* (ADAMS ET REEVE) ON THE EXPERIMENTAL TUMOR IN RODENTS*

Marine Drugs Group, Institute of Oceanology, Academia Sinica

Qingdao Institute of Materia Medica and Medicina

Division of Cancer Research, National Vaccine and Serum Institute, Peking

ABSTRACT

Marine bivalves had been recorded in China for its use as antitumor drugs in ancient times. Folklore use of such a drug can be found even today in the fishing villages along the Chinese coast. The present study was conducted, employing modern scientific methods, to search for antitumor drugs from marine organisms in our seas.

Pharmacological tests showed that the extract of the common edible clam *Venerupis (Amygdala) philippinarum*, often abundant in Jiaozhou Bay, Qingdao, exhibited a certain inhibitory action against some experimental tumors in rodents. Its inhibitory value varies with the seasonal changes. Extract from specimens collected in April—June, 1972—1973, showed a higher inhibitory value than that collected in August—October of the same years. Of the eight groups of the Ehrlich ascites carcinoma tested, all prolonged the survival time by more than 50%, of which four groups by more than 100%, two groups over 200%. Of the five groups of hepatic carcinoma ascitic form tested, four groups showed a prolongation of over 50—100% in survival time. Higher inhibitory rates were also recorded for the two groups of both sarcoma 180 and hepatic cincinoma solid form tested, namely, >60% and >40% respectively. The inhibitory value of the extract from materials collected in August—October was, however, considerably low.

It is suggested that the seasonal change of inhibitory value is dependent on the physiological states of the clams, such as the periodical development of sexual gland and the seasonal change in liver.

This extract was also found to have an inhibitory action in HeLa cell test.

It should be emphasized, that there exists some allergen in the present extract. Further investigations are necessary before the extract can be put into clinical trials.

* Contribution No. 377 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.