

· 论 著 ·

苦参碱与氧化苦参碱影响荷瘤小鼠肿瘤生长及其免疫调节作用的研究

李 军, 司维柯[△], 赵 宸, 李招权, 潘 静

(第三军医大学医学临床血液学教研室, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨苦参碱(MA)与氧化苦参碱(OM)在体内的抑瘤作用及免疫调节机制。方法 分别以一定剂量 MA 与 OM 处理荷 HepG2 肝癌细胞的裸鼠和荷 H22 肝癌细胞的昆明小鼠, 检测肿瘤大小, 并观察 MA 与 OM 对小鼠引起的迟发型超敏反应(DTH)、淋巴细胞增殖、碳粒廓清率、溶血素试验、脾脏系数、WBC 计数等免疫学指标变化。结果 25、50 及 100 mg/kg 的 MA 与 OM 对裸鼠体内肿瘤无抑制作用, OM 对荷 H22 肝癌细胞昆明小鼠的抑瘤作用明显, 各免疫指标与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 OM 可以调动机体的免疫功能, 产生抑瘤效应, 在肿瘤化疗辅助用药方面具有应用前景。

关键词:氧化苦参碱; 苦参碱; 抑瘤作用; 免疫调节

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.27.007

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)27-2719-03

Study on the effect of MA and OM on tumor growth and their immunoregulatory function in tumor bearing mice

Li Jun, Si Weike[△], Zhao Chen, Li Zhaoquan, Pan Jing

(Department of Clinical Hematology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of matrine(MA) and oxymatrine(OM) on tumor growth and their immunoregulatory function in tumor bearing mice. **Methods** MA or OM injection of certain dosage were performed on the nude mice bearing HepG2 cells and Kunming mice bearing H22 cells, the tumors size in vivo and the changes of mouse immune parameters induced by MA and OM, delayed type hypersensitivity, lymphocyte proliferation, carbon granules clearance, hemolysin, spleen coefficient, WBC count were observed. **Results** The dosage of 25, 50 and 100 mg/kg of MA and OM had no effect on the growth of tumor in the nude mice, and OM had distinct inhibition effect on the growth of tumor of Kunming mice bearing H22 cells, and had statistically significant difference on the immune parameters compared with the control($P < 0.05$). **Conclusion** OM can activate the immune system to inhabit the tumor, and has a wide application on adjuvant drugs for tumor treatment.

Key words: ammothamine; matrine; anti-tumor effect; immunological regulation

苦参碱(matrine, MA)对肿瘤杀伤作用的研究已引起人们的高度重视, 近年来大量研究表明, MA 对于多种肿瘤细胞具有抑制增殖的作用^[1-2], 本研究的前期已证明, MA 在体外可抑制 HepG2、A549 细胞增殖^[3-4], MA 的抑瘤作用是氧化苦参碱(oxymatrine, OM)的 10 倍。现将苦参生物碱对肿瘤杀伤作用的机制报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 MA 纯品(西安鸿生生物技术公司)、OM 注射液(博尔泰力公司); 绵羊红细胞(sheep red blood cell, SRBC)悬液(第三军医大学实验动物中心)、豚鼠血清、二硝基氟苯(dinitrofluorobenzene, DNFB)、刀豆素 A(concanavalin A, ConA)、四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、印度墨汁(北京鼎国生物公司); 特级小牛血清(杭州四季青公司)。其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 动物 5~7 周龄、体质量 18~20 g 的健康 SPF 级裸鼠 20 只, 雌雄各半(第三军医大学附属大坪医院动物所); 体质量 18~22 g 的健康 SPF 级昆明小鼠(第三军医大学实验动物中心), 雌雄各半; H22 保种小鼠(重庆中药研究所动物中心)。

1.3 药物浓度的选择 将 120 只昆明小鼠随机分成 6 组, 按注射 MA、OM 的不同浓度分为 100、120、140、160、180 和 200 mg/mL 组, 每组 20 只(雌雄各 10 只), 常温饲养 12 h 后, 分别将浓度为 100、120、140、160、180 和 200 mg/mL 的 MA、

OM 按 0.02 mL/g 进行腹腔注射 1 次, 然后观察 7 d 内动物反应及死亡情况, 分别计算两种药物的半数致死剂量^[5]。

1.4 模型的建立

1.4.1 荷 Hep Gz 肝癌裸鼠模型的建立 取培养至对数生长期的 HepG2 细胞 15 瓶, 制成细胞悬液, 以无血清 1640 培养液洗涤 1 次后, 用正常血清(normal sera, NS)稀释细胞, 镜下计数细胞数约为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个。混匀细胞后用一次性注射器在裸鼠背部右后外侧皮下注射 0.2 mL 细胞悬液, 接种后常温下正常饲养, 观察 5 d 后再补种 1 次肿瘤细胞。10 d 后有 18 只裸鼠长出瘤体。实验分组: 将 18 只荷瘤裸鼠随机分为 MA 组、OM 组和对照组, 每组 6 只。MA 组于瘤体出现后 1 d 开始, 每天皮下注射 MA 100 mg/kg; OM 组于瘤体出现后 1 d 开始, 每天皮下注射 OM 100 mg/kg。对照组每天注射 NS 每只 0.2 mL。3 组的饲养条件相同。每天以游标卡尺测量瘤体大小。20 d 后处死小鼠, 取出肿瘤称瘤体质量。

1.4.2 荷 H22 肝癌小鼠模型的建立 断颈处死腹腔保种 H22 细胞的小鼠, 于 75% 乙醇中浸泡约 2 min, 无菌条件下剪开小鼠腹部皮肤暴露腹膜, 以镊子挑起腹膜并剪开一小口, 用吸管吸取含 H22 肿瘤细胞的腹腔积液于无菌烧杯中。稀释细胞, 镜下计数细胞数约为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个。混匀细胞后, 在昆明小鼠背部右后外侧皮下注射 0.2 mL 细胞悬液, 接种后常温下同条件下饲养, 任其自然生长, 分别给予 MA(25、50 和

[△] 通讯作者, Tel: (023) 68752312; E-mail: weikesi@yahoo.com.cn.

100 mg/kg)、OM(25、50 和 100 mg/kg)共 10 d。停药后处死小鼠,取出肿瘤称瘤体质量。

1.5 检测 MA 及 OM 对荷瘤小鼠免疫调节的影响

1.5.1 小鼠迟发型超敏反应(delayed type hypersensitivity, DTH)检测^[6] 将 50 mL 1% DNFB 丙酮麻油溶液涂于去毛的荷瘤小鼠腹部,4 d 后于每鼠右耳涂以 10 μ L 同样浓度的 DNFB,24 h 后,颈椎脱臼致死,剪下左右耳郭,各取直径为 8 mm 的耳片称其质量,以左右耳片质量之差表示肿胀程度。

1.5.2 淋巴细胞增殖实验^[7] 无菌条下摘取小鼠眼球取血,用完全培养基按 3:1(V:V),稀释血液,经淋巴细胞分离液处理离心得到单核细胞层(按试剂说明书操作)。小心提取该层细胞以 2 倍体积完全培养液洗涤后制备成 1.5×10^6 个/mL 单细胞悬液。细胞溶胶培养用 96 孔培养板,每孔加 100 μ L 细胞溶胶,100 μ L ConA 液(5 μ g/mL),设立 3 个平行孔,置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h。于培养结束前 4 h,加入 MTT 20 μ L(5 mg/mL)继续培养,最后离心弃上清液加 100 μ L 含 0.04 mol/L HCl 的 10% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),吹打均匀,酶联仪检测波长 570 nm 与 630 nm 的吸光度(optical density, OD)值,OD₅₇₀ 减去 OD₆₃₀ 值即为实验结果。

1.5.3 碳粒廓清实验^[8] 分组及用药同前。在第 10 天最后 1 次用药后 1 h,尾静脉注射 NS 稀释 10 倍的印度墨汁 0.2 mL,分别在 3 min、13 min 各从眼眶静脉丛取血 20 μ L,溶于含 2 mL 0.1% 的 Na₂CO₃ 溶液的试管中,混匀,静置 24 h,以分光光度计测定 650 nm 处的 OD 值,计算碳廓清除率 $k = (\lg A_1 - \lg A_2) / (T_2 - T_1)$ 。

1.5.4 溶血素实验^[9] 治疗分组及剂量同前。于给药后第 2 天每只小鼠经尾静脉注射 10% SRBC 1.0 mL 使其致敏,治疗 10 d 结束后,摘取小鼠眼球取血 20 μ L 加入到 5 mL NS 中混匀,1 000 r/min 离心 10 min,取上清液与 1 mL 5% SRBC 和 1 mL 1:20 稀释的豚鼠血清混合后 37 $^{\circ}$ C 水浴 20 min,1 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1 mL,加入 3 mL 都氏液,用紫外分光光度计于 540 nm 处测其 OD 值。

1.5.5 脾脏系数的测定 断颈法处死各组小鼠,称小鼠体质量,无菌条件下小心分离脾脏,置高压灭菌后的称量瓶中称量脾脏质量。脾脏系数(mg/g)=脾脏质量/小鼠体质量。

1.5.6 血 WBC 计数 在最后一次用药后 3 h,经鼠尾取血

20 μ L,加入 0.38 mL WBC 稀释液中混匀,取混匀稀释血液 1 滴,滴入计数板中,静置 2~3 min,用低倍镜计数 WBC 总数, $WBC/L = 4 \text{ 大格白细胞总数} / 20 \times 10^9$ 。

1.6 统计学处理 根据回归方程为: $Y = -17.3698 + 10.3513X$ ($r = 0.9235$), $a = 0.01$ 时,查表得的 r 为 0.9170 (其中 Y 为概率单位加 5 后的值, X 为剂量的对数 $\log X$)。求得半数致死量(lethal dose 50%, LD₅₀) $MA = 144.90 \text{ mg/kg}$ (置信系数 $a = 0.05$ 时的置信区间为: $120.5279 \leq LD_{50} \leq 174.2004$, 0.0800)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验用药剂量 不同 MA 剂量引起小鼠死亡情况见表 1。OM 各组均未见动物死亡。根据 LD₅₀, 确定 MA、OM 用药剂量为 25、50 及 100 mg/kg。

2.2 MA 及 OM 对荷瘤裸鼠的抑瘤作用 对照组的瘤体质量为 $(2.4187 \pm 0.2366) \text{ g}$ 、MA 组为 $(2.2717 \pm 0.2498) \text{ g}$ 、OM 组为 $(2.2539 \pm 0.2998) \text{ g}$, 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 MA 及 OM 对昆明小鼠的抑瘤作用 OM 组与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

2.4 MA 及 OM 对荷瘤小鼠免疫调节的影响

2.4.1 DTH 结果 MA 致小鼠耳肿胀度降低,与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$); OM 组与对照组相比无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.4.2 淋巴细胞增殖实验 MA 作用后,细胞后 OD₅₇₀ ~ OD₆₃₀ 远小于 OM 作用于细胞后的 OD₅₇₀ ~ OD₆₃₀, 结果见表 3。

表 1 不同 MA 剂量引起小鼠死亡情况

组别	<i>n</i>	死亡数 (<i>n</i>)	死亡率 (%)	剂量 对数	概率单位 (<i>P</i> +5)
200 mg/mL 组	20	16	80.0	2.301	5.840
180 mg/mL 组	20	19	95.0	2.255	6.640
160 mg/mL 组	20	13	65.0	2.204	5.390
140 mg/mL 组	20	12	60.0	2.146	5.250
120 mg/mL 组	20	2	10.0	2.079	3.720
100 mg/mL 组	20	1	5.0	2.000	3.360

表 2 不同浓度的 MA、OM 对荷瘤小鼠的抑瘤作用及对免疫调节的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	瘤体质量(g)	耳肿胀度(mg)	碳粒廓清 K 值	OD ₅₄₀	WBC 数($\times 10^9/L$)
对照组	2.9069 \pm 0.3214	11.62 \pm 1.04	0.0256 \pm 0.0044	0.589 \pm 0.010	3.25 \pm 0.11
MA(25 mg/kg)组	2.7151 \pm 0.3244	7.73 \pm 0.45	0.0217 \pm 0.0035	0.379 \pm 0.005	2.92 \pm 0.20
MA(50 mg/kg)组	2.8790 \pm 0.5059	7.44 \pm 0.45	0.0195 \pm 0.0019	0.309 \pm 0.010	2.42 \pm 0.21
MA(100 mg/kg)组	2.9617 \pm 0.4314	7.40 \pm 0.35	0.0180 \pm 0.0036	0.291 \pm 0.015	2.33 \pm 0.17
OM(25 mg/kg)组	2.1772 \pm 0.2050	11.94 \pm 1.17	0.0280 \pm 0.0034	0.632 \pm 0.009	3.24 \pm 0.07
OM(50 mg/kg)组	2.0024 \pm 0.1836	12.14 \pm 1.41	0.0293 \pm 0.0024	0.690 \pm 0.004	3.56 \pm 0.34
OM(100 mg/kg)组	2.0751 \pm 0.3579	12.21 \pm 1.05	0.0314 \pm 0.0066	0.738 \pm 0.008	3.75 \pm 0.48

2.4.3 碳粒廓清实验结果 MA、OM 组与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。MA 组 K 值较对照组下降,而 OM 组 K 值上升。即 MA 可抑制小鼠内皮吞噬系统功能,而 OM 可

提高小鼠内皮吞噬系统功能。见表 2。

2.4.4 溶血素试验结果 MA 可抑制溶血素的产生,而 OM 可刺激溶血素的生成,即 MA 可抑制小鼠体液免疫功能,OM

则促进小鼠的体液免疫。MA、OM 组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

2.4.5 脾脏系数测定结果 MA 组的脾脏系数变小;OM 可使小鼠脾脏系数增大。见表 4。

表 3 各组小鼠淋巴细胞对 ConA 的反应

组别	OD ₅₇₀	OD ₆₃₀	OD ₅₇₀ - OD ₆₃₀
对照组	42.39 ± 0.97	31.64 ± 0.26	10.24 ± 0.29
MA(25 mg/kg)组	42.48 ± 1.20	32.11 ± 0.716	10.12 ± 0.67
MA(50 mg/kg)组	40.23 ± 0.94	31.69 ± 0.21	8.67 ± 0.35
MA(100 mg/kg)组	35.87 ± 1.35	31.43 ± 0.85	4.57 ± 0.37
OM(25 mg/kg)组	52.43 ± 1.00	31.39 ± 0.381	21.08 ± 0.22
OM(50 mg/kg)组	54.01 ± 1.18	31.53 ± 0.287	22.28 ± 0.49
OM(100 mg/kg)组	56.81 ± 2.89	32.30 ± 0.43	24.46 ± 0.24

表 4 MA 对荷瘤鼠脾脏系数的影响

组别	脾脏系数(mg/g)
对照组	0.0111
MA(25 mg/kg)组	0.0077
MA(50 mg/kg)组	0.0091
MA(100 mg/kg)组	0.0070
OM(25 mg/kg)组	0.0113
OM(50 mg/kg)组	0.0161
OM(100 mg/kg)组	0.0141

2.4.6 WBC 计数结果 MA 治疗后,小鼠血液 WBC 下降,各浓度与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);中浓度与高浓度 OM 可使小鼠 WBC 数升高,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);低浓度 OM 对 WBC 数量的变化无明显作用($P > 0.01$)。见表 2。

3 讨论

本实验结果显示,MA 与 OM 对荷 HepG2 肝癌裸鼠无明显抑瘤作用,与本研究前期 MA 在体外实验中良好的抑制肿瘤细胞增殖的作用有差异。究其原因,考虑为 MA 在体外实验时的有效药物浓度较大,而在体内实验中发现,其对小鼠的 LD₅₀ 为 144 mg/kg,而本研究体内用药的最高剂量仅用到 100 mg/kg,可能在该浓度下 MA 不能发挥其良好的抑瘤作用。改用荷 H22 肝癌细胞的昆明小鼠进行研究发现,虽然 MA 的作用仍不明显,但 OM 却显示了一定的抑瘤效应,这似乎与体外作用时 MA 的抗癌效果比 OM 强及 MA 与 OM 在裸鼠体内无明显抑瘤作用的结果相矛盾。本研究认为,裸鼠作为免疫缺陷小鼠,抗肿瘤药物主要通过药物本身对肿瘤细胞产生杀伤作用,由于 MA 体内试验时的剂量不足导致其杀伤肿瘤细胞的作用得不到良好的体现。对于昆明小鼠而言,其机体的免疫系统比较完善,药物可以通过调动机体的免疫力对肿瘤产生抑制作用。从体外试验中了解到 MA 对细胞可以诱导肿瘤细胞凋亡,也有致使其坏死的作用,而 OM 在一定程度上体现了对细胞的保护作用,由此推测,OM 可能具有增强机体免疫力的作用。为了验证这一假设,对经两种药物治疗的荷瘤小鼠的免疫功能进行了研究。

测定小鼠皮肤 DTH,了解药物作用后,小鼠对肿瘤的非特异性皮肤反应,体现了小鼠非特异性免疫功能的强弱。本研究

证实,MA 作用后导致小鼠皮肤 DTH 减弱,而 OM 对其无明显影响,说明 MA 对小鼠的非特异性免疫具有抑制作用,而 OM 不会抑制小鼠的非特异性免疫功能。淋巴细胞体外增殖反应的结果表明,MA 可以抑制淋巴细胞的体外增殖反应,而 OM 则可以促进淋巴细胞在体外的增殖,表明 MA 可以抑制 T 淋巴细胞的免疫功能,而 OM 则可促进 T 淋巴细胞免疫。碳粒廓清实验结果表明,MA 抑制吞噬作用而 OM 可增强吞噬作用,提示 OM 可以增强小鼠网状内皮系统的功能。溶血素试验实验结果证实,OM 可增强荷瘤小鼠的体液免疫,MA 则起抑制作用。脾脏系数的测定也证实,OM 可使小鼠脾脏增大,而 MA 使小鼠脾脏减小。WBC 计数发现中、高浓度 OM 处理后的荷瘤小鼠血 WBC 数量上升,也说明其对免疫功能有促进作用。

综上所述,虽然 MA 在体外试验有很强的抗肿瘤作用^[10-11],但本研究提示,在体内 OM 的抑瘤作用强于 MA,其可能机制是 OM 调动机体的免疫功能发挥抑瘤作用,而 MA 却起到免疫抑制的作用。本研究表明,抗肿瘤药物在体外与体内实验可得出不同的结果,体内抗肿瘤的研究显得尤为重要,研究结果为苦参生物碱的临床应用提供了新思路。

参考文献:

- [1] 何松,左国庆,张燕,等.苦参碱对肝癌细胞 HepG2 端粒酶活性调控的体外研究[J].重庆医学,2008,38(3):291-293.
- [2] 朱晓伟,宝金荣,布仁.苦参碱和氧化苦参碱抗肿瘤作用机制研究进展[J].化学试剂,2010,32(1):32-36.
- [3] 王源,司维柯,李鹏,等.苦参碱及氧化苦参碱抑制 A549 细胞增殖及诱导细胞凋亡的比较研究[J].第三军医大学学报,2004,26(9):778-780.
- [4] 李鹏,司维柯,王源,等.苦参碱与氧化苦参碱抑制 HepG2 细胞增殖的对比研究[J].中国生化药物杂志,2004,25(5):261-264.
- [5] 王晓燕,梁磊,常建兰,等.苦参碱对小鼠的毒性研究[J].南方医科大学学报,2010,30(9):2154-2155.
- [6] 李应全.临床免疫药理学[M].北京:中国协和医科大学出版社,2003:286-287.
- [7] 赵洁,王曦鸣,李继祥.MTT 法检测淋巴细胞增殖能力的影响因素[J].畜禽业,2008,19(2):28-30.
- [8] 才玉婷,李孟全,梁忆红,等.咳尔康口服液对小白鼠碳粒廓清功能的影响[J].牡丹江医学院学报,2009,30(5):16-17.
- [9] 李彦博,王倩,张炳桢.牡丹皮对小白鼠免疫功能的影响[J].中华中医药学刊,2007,25(3):575-576.
- [10] 朱慕云,姜正华,吕元文,等.苦参碱联合化疗药物对人肺癌细胞的生长抑制作用[J].中西医结合学报,2008,2(2):163-165.
- [11] 申志华,揭伟,陈锦,等.苦参碱对人卵巢癌细胞株 HO-8910PM 增殖及侵袭运动能力的影响[J].中草药,2008,39(3):386-390.