

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.19.007

佛甲草对 S180 荷瘤小鼠氧化应激和肿瘤免疫的影响*

吴丽珍,曹性玲,李欢,麻海娟,黄志华,周青[△]

(赣南医学院基础医学院,江西赣州 341000)

[摘要] **目的** 探讨佛甲草(SLT)提取物对 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤生长、外周血白细胞分类、血清超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性及丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)水平的影响。**方法** 采用小鼠右前肢腋部皮下接种 S180 细胞建立移植瘤模型,观察 SLT 提取物 4、8 g/kg 体质量连续给药 14 d。观察小鼠体质量变化,计算肿瘤、胸腺及脾脏指数,检测小鼠外周血中白细胞分类,测定小鼠血清 SOD、GSH-Px 的活性及 MDA、NO 的水平。**结果** 经 SLT 治疗后,S180 荷瘤小鼠体质量明显高于环磷酰胺(CTX)组,肿瘤指数明显低于模型组和 CTX 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且能有效的调节荷瘤小鼠的胸腺指数及脾脏指数;外周血中性粒细胞数/白细胞总数(GR%)和单核细胞/白细胞总数(MO%)明显低于模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而淋巴细胞/白细胞总数(LY%)明显高于模型组($P < 0.05$),血清 SOD、GSH-Px 活性明显高于模型组($P < 0.05$),血清 MDA 水平明显低于模型组和 CTX 组($P < 0.05$),血清中 NO 水平明显高于模型组和 CTX 组($P < 0.05$)。**结论** SLT 对 S180 荷瘤小鼠有抗肿瘤作用,其抗肿瘤机制与抑制氧化应激和调节肿瘤免疫有关。

[关键词] 佛甲草;氧化性应激;肿瘤免疫;抗肿瘤作用**[中图分类号]** R285**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)19-2613-03**Antitumor activity of sedum lineare thunb by suppressing oxidative stress and modulating tumor immune***Wu Lizhen, Cao Xingling, Li Huan, Ma Haijuan, Huang Zhihua, Zhou Qing[△]

(Basic Medicine College, Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the antitumor activity of sedum lineare thunb(SLT) and its affection on antioxidation and tumor immunology in S180-bearing mice. **Methods** S180-bearing mice model were established by subcutaneously inoculating S180 ascitic tumor into the right armpit. From the second day, the mice were treated with normal saline, cyclophosphamide (50 g/kg) or two doses of SLT (4, 8 g/kg) through intragastric administration, and the process extent 14 d. After the last administration, the mice body weight and the index of tumor, spleen and thymus were calculated, classification of white blood cells in peripheral blood was tested, and the activity of SOD and GSH-Px as well as the content of MDA and NO in serum were measured. **Results** The body weight of mice treated with SLT was dramatically higher than those of the CTX ($P < 0.05$). Compare with the model group, SLT groups showed decreases in tumors index ($P < 0.05$), spleen index ($P < 0.05$), percentage of peripheral blood neutrophil ($P < 0.05$) and monocyte ($P < 0.05$), and increases in thymus index ($P < 0.05$) and percentage of lymphocyte ($P < 0.05$). The activity of SOD and GSH-Px and NO level in the SLT groups mice's serum were significantly higher than those of the model group ($P < 0.05$), while the content of MDA in the SLT groups mice's serum was markedly lower than those of the model and CTX groups ($P < 0.05$). **Conclusion** SLT has antitumor activity in S180-bearing mice by suppressing oxidative stress and modulating tumor immune.

[Key words] sedum lineare; oxidative stress; tumor immune; antitumor activity

佛甲草(sedum lineare thunb, SLT)又名鼠牙半支莲、禾雀颯等,为景天科佛甲草属多年生草本植物,SLT 全草药用,性味甘寒,具有清热、解毒、消肿等功效,民间用于治疗黄疸、迁延性肝炎、咽喉肿痛、痢疾等症。现代药理研究证实,许多清热解毒中药具有抗肿瘤的作用^[1],结合 SLT 具有抗脂质过氧化^[2]及抗急、慢性炎症反应并具有免疫调节功能^[3]的前期研究结果,SLT 很可能具有抗肿瘤作用。本实验以小鼠 S180 移植性肿瘤为模型,从肿瘤免疫和氧化应激的角度分析 SLT 提取物的抗肿瘤作用机制,为 SLT 治疗恶性肿瘤提供实验依据,现报道如下。

1 材料与方**1.1 材料** 选取 SPF 级昆明小鼠 60 只,雄性,6~8 周龄,体

质量 18~22 g,由湖南省斯莱克景达实验动物有限公司提供[许可证号:SCXK(湘)2011-0003;合格证号:4304702309]。S180 瘤株,由中国医学科学院医药研究所购进,赣南医学院科研中心传代培养。SLT 提取物由赣南医学院机能实验中心制备,临用前用双蒸水配制成实验所需浓度。环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)白色粉状针剂,0.2 g/支,江苏恒瑞医药股份有限公司生产,批号:12041125;小鼠超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)、一氧化氮(nitric oxide, NO)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 方法* 基金项目:江西省卫生厅科技项目(20141117)。 作者简介:吴丽珍(1981—),实验师,本科,主要从事中药药理研究。 [△] 通讯作者,

表 1 SLT 对 S180 荷瘤小鼠体质量及肿瘤指数、脾指数、胸腺指数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量(g/kg)	体质量(g)	肿瘤指数(mg/g)	胸腺指数(mg/g)	脾脏指数(mg/g)
健康对照组	—	33.71±2.21*	—	1.88±0.50 [#]	5.65±1.58
模型组	—	28.50±2.47	1.50±0.50	0.63±0.08	23.20±1.64
CTX 组	0.05	25.42±1.92	1.11±0.30*	0.69±0.26	12.42±2.70 [#]
SLT 组	4.00	31.62±3.22 [△]	0.33±0.13 ^{#▲}	1.24±0.34 [#]	17.27±2.49 [#]
	8.00	30.63±3.32 [△]	0.45±0.21 ^{#▲}	0.98±0.33	18.94±5.34

*: $P<0.05$, #: $P<0.05$, 与模型组比较; Δ : $P<0.01$, \blacktriangle : $P<0.01$ 与 CTX 组比较; —: 表示此项无数据。

1.2.1 造模与给药方法 SPF 级雄性昆明种小鼠 60 只, 分成 5 组, 分别为健康对照组、S180 荷瘤模型组、环磷酰胺组, 4 g/kg SLT 治疗组、8 g/kg SLT 治疗组。参照文献[4]方法, 无菌条件下抽取第 3 代后接种 7 d 的 S180 瘤源小鼠的腹腔积液, 离心, 弃上清液, 无菌生理盐水调至细胞浓度为 1×10^7 个/mL, 每只小鼠右腋部皮下接种 0.2 mL, 建立小鼠实体瘤模型。健康对照组小鼠每只接种 0.2 mL 生理盐水。健康对照组和模型组小鼠分别灌胃生理盐水 10 mL/kg; 环磷酰胺组小鼠腹腔注射环磷酰胺 50 mg/kg; SLT 治疗组分别给予 40 g/mL 或 80 g/mL 的 SLT, 按 10 mL/kg 灌胃, 每天 1 次, 连续 14 d。

1.2.2 小鼠体质量和肿瘤指数、胸腺指数及脾脏指数测定 末次给药 24 h 后, 颈椎脱臼处死小鼠, 称体质量, 取出肿瘤, 用电子天平称质量, 计算指数 = 肿瘤/脾脏/胸腺质量(mg) ÷ 体质量(g)。

1.2.3 流式细胞术检测 白细胞分类末次给药 24 h 后, 小鼠摘眼球采血。取肝素抗凝血 20 μ L, 加入 180 μ L 红细胞裂解液, 混匀后, 静置 10 min, 加入 2 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS), 600 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 100 μ L PBS 重悬白细胞, 上机检测。采用前向角和侧向角将白细胞分成淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞 3 群, 分别计算 3 种细胞占白细胞总数的百分比。

1.2.4 血清 SOD、GSH-Px 活性及 MDA、NO 含量检测 末次给药 24 h 后, 小鼠摘眼球采血, 4 $^{\circ}$ C, 800 r/min, 离心 10 min, 分离血清, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存。严格按试剂盒说明书操作, 检测各组小鼠血清 SOD、GSH-Px 活性及 MDA、NO 水平的变化。

1.3 统计学处理 采用 Prism5.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 各组间测定指标的总体比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SLT 对小鼠体质量、肿瘤指数、脾指数、胸腺指数比较 与健康对照组比较, 模型组小鼠体质量及胸腺指数下降, 脾指数升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与模型组比较, SLT 治疗组小鼠肿瘤指数及脾脏指数降低, 胸腺指数升高, 差

异均有统计学意义 ($P<0.05$), CTX 组小鼠肿瘤指数降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 CTX 组比较, SLT 治疗组小鼠体质量升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 但与模型组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。

2.2 SLT 对小鼠血液中白细胞分类的影响 与健康对照组比较, 模型组小鼠外周血中性粒细胞和单核细胞比例升高 ($P<0.01, P<0.05$), 淋巴细胞比例降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 两种剂量 SLT 治疗组中性粒细胞比例降低 ($P<0.01$), 淋巴细胞比例升高 ($P<0.01$), 8 g/kg SLT 治疗组单核细胞比例降低 ($P<0.05$)。与 CTX 组比较, SLT 治疗组中性粒细胞比例降低 ($P<0.01$), 淋巴细胞比例升高 ($P<0.01$), 见表 2。

表 2 SLT 对 S180 荷瘤小鼠外周血白细胞分类的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量(g/kg)	中性粒细胞比例(%)	淋巴细胞比例(%)	单核细胞比例(%)
健康对照组	—	34.61±3.57 [#]	61.00±2.61 [#]	4.38±1.10*
模型组	—	69.36±2.31	20.96±1.18	9.67±1.99
CTX 组	0.05	74.07±4.36	19.70±4.07	6.23±0.45
SLT 组	4.00	46.23±4.52 ^{#△}	46.69±6.78 ^{#△}	7.07±2.27
	8.00	43.73±8.46 ^{#△}	51.17±7.71 ^{#△}	5.10±1.48*

*: $P<0.05$, #: $P<0.01$, 与模型组比较; Δ : $P<0.01$, 与 CTX 组比较; —: 表示此项无数据。

2.3 SLT 对小鼠血清抗氧化指标的影响 与健康对照组比较, 模型组小鼠血清 SOD 和 GSH-Px 活性降低, MDA 及 NO 水平增加, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。与模型组比较, CTX 组小鼠血清 SOD 和 GSH-Px 活性升高 ($P<0.01$), MDA 和 NO 水平变化不明显; SLT 治疗组血清 SOD 和 GSH-Px 活性及 NO 水平升高, MDA 水平降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。与 CTX 组比较, SLT 治疗组 GSH-Px 活性及 MDA 水平降低, NO 水平升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$), 见表 3。

表 3 SLT 对 S180 荷瘤小鼠血清 SOD 和 GSH-Px 活性及 MDA 和 NO 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量(g/kg)	SOD(U/mL)	GSH-Px(U/mL)	MDA(mmol/mL)	NO(μ mol/mL)
健康对照组	—	95.02±22.31 [△]	1452.09±1.19 [△]	2.83±0.59 [#]	34.39±22.90 [#]
模型组	—	47.68±14.66	462.22±94.92	4.30±0.67	132.96±22.77
CTX 组	0.05	85.54±17.23 [#]	1337.45±470.96 [△]	4.18±0.33	111.11±34.45

续表 3 SLT 对 S180 荷瘤小鼠血清 SOD 和 GSH-Px 活性及 MDA 和 NO 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量(g/kg)	SOD(U/mL)	GSH-Px(U/mL)	MDA(mmol/mL)	NO(μ mol/mL)
SLT 组	4.00	82.59 \pm 16.75 [#]	906.72 \pm 130.77 ^{*●}	3.29 \pm 0.52 ^{*▲}	201.23 \pm 62.80 ^{*▲}
	8.00	85.83 \pm 14.66 [#]	646.27 \pm 285.2 ^{△○}	2.95 \pm 0.64 ^{#●}	195.37 \pm 53.19 ^{*●}

*: $P<0.05$, #: $P<0.01$, Δ : $P<0.01$, 与模型组比较; ▲: $P<0.05$, ●: $P<0.01$, ○: $P<0.01$, 与 CTX 组比较; -: 表示此项无数据。

3 讨 论

恶性肿瘤是目前严重危害人类健康的重大疾病之一。《中国卫生统计年鉴》2011 年的统计资料显示,我国城市居民的恶性肿瘤病死率约为 172.33/10 万,占城市居民疾病死因的 27.79%;在农村地区,恶性肿瘤病死率约为 150.83/10 万,占农村居民疾病死因的 23.62%,均居第 1 位。如何有效的预防和治疗恶性肿瘤,成为医学界关注的重要课题之一。目前,临床治疗肿瘤药物几乎都存在细胞毒作用,因此寻找低毒高效的天然抗肿瘤药物一直是近年研究的热点。陈雨洁^[5]研究发现 SLT 不同提取部位及总黄酮提取物具有体外抗肿瘤活性。本实验结果显示,SLT 可降低肿瘤指数,体质量较阳性药物 CTX 组高,提示其具有抗肿瘤作用的同时不良反应较化疗药 CTX 小。

胸腺和脾脏是机体重要的免疫器官,其脏器指数是衡量机体免疫功能的基本指标。肿瘤的发生、发展与机体细胞免疫反应密切相关,淋巴细胞在机体抵抗、防御肿瘤的免疫功能中起着重要作用。这是因为在肿瘤抗原诱发下机体中产生的效应淋巴细胞(M 淋巴细胞)对该肿瘤细胞有着特异的溶细胞作用。另一方面,肿瘤细胞与其相应抗体结合后,可被非效应淋巴细胞(未经肿瘤抗原致敏的正常淋巴细胞)所杀伤。肿瘤微环境中存在肿瘤相关中性粒细胞,可通过分泌弹性蛋白酶和基质金属蛋白酶-9 促进肿瘤增殖和转移^[6-9];通过合成和分泌多种细胞因子和趋化因子而改变肿瘤局部微环境中细胞的组成^[10-11]等多种机制促进肿瘤的生长和转移。本实验结果发现,SLT 治疗明显改善了荷瘤小鼠脾指数的异常升高及胸腺指数的下降,外周血中性粒细胞显著降低而淋巴细胞明显升高,提示 SLT 提取物可能通过调节肿瘤免疫发挥抗肿瘤作用。

氧化应激参与了致癌基因的突变、原癌基因活化、肿瘤抑制基因失活,具有致癌潜力。机体微环境处于氧化应激状态时,基因转录、细胞信号转导、酶和生物大分子活性及细胞的增殖、分化、凋亡、坏死等生理过程异常,导致肿瘤的发生、发展。SOD 是一种过氧化物分解酶,它是体内重要的抗氧化防御物质,体内 SOD 活性愈高,自由基清除速度愈快。GSH-Px 是体内广泛存在的一种重要的催化氧化酶,它的主要功能是还原过氧化物,阻断脂质过氧化的链式反应。当机体发生氧化应激时,部分脂肪酸会氧化分解为一系列复杂的化合物,其中就包括 MDA,此时可通过检测 MDA 水平来反应脂质过氧化水平。NO 是杀伤肿瘤细胞的效应分子,研究发现高水平 NO 可通过与细胞内的超氧阴离子结合生成氮/氧自由基,损伤 DNA,从而产生细胞毒性的途径来抗肿瘤作用^[12]。在本研究中,SLT 治疗后,荷瘤小鼠血清 SOD、GSH-Px 和 NO 水平增高,MDA 含量降低,说明 SLT 能提高机体的抗氧化酶活性,抑制自由基的产生及其引起的脂质过氧化反应,并清除氧自由基,使 S180 荷瘤小鼠体内氧化应激受到抑制,从而抑制肿瘤生长。提示 SLT 提取物可通过抑制氧化应激发挥其抗肿瘤作用。

综上所述,SLT 提取物具有较强的体内抗肿瘤活性,其抗肿瘤机理与抑制氧化应激和调节肿瘤免疫有关。

参考文献

- [1] 刘磊磊,陈娟,师彦平. 清热解毒中药抗肿瘤作用研究进展[J]. 中草药,2012,43(6):1203.
- [2] 周青,许庆林,周俐,等. 佛甲草对四氯化碳中毒小鼠的脂质过氧化作用研究[J]. 赣南医学院学报,2003,23(2):128-130.
- [3] 廖跃华,吴丽珍,程赣中,等. 佛甲草抗炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):142-144.
- [4] 徐淑云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:1757.
- [5] 陈雨洁. 景天属三种植物药不同提取部位及总黄酮抗肿瘤作用研究[J]. 中央民族大学学报,2011,20(2):88-92.
- [6] Gasparini C, Menegazzi R, Patriarca P, et al. Evidence that elastase is the TNF-R75 shedding enzyme in resting human polymer-phonouclear leukocytes[J]. FEBS Lett, 2003, 553(3):360-364.
- [7] Wada Y, Yoshida K, Tsutani Y, et al. Neutrophilelastase induces cell proliferation and migration by the release of TGF- α , PDGF and VEGF in esophageal cell lines[J]. Oncol Rep, 2007, 17(1):161-167.
- [8] Benson DD, Meng X, Fullerton DA, et al. Activation state of stromal inflammatory cells in murine metastatic pancreatic adeno-carcinoma [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012, 302(9):1067-1075.
- [9] Kuang DM, Zhao Q, Wu Y, et al. Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angio-genesis in hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2011, 54(5):948-955.
- [10] Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL, et al. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells [J]. J Immunol, 2010, 185(4):2273-2284.
- [11] Shang K, Bai YP, Wang C, et al. Crucial involvement of tumor-associated neutrophils in the regulation of chronic colitis-associated carcinogenesis in mice [J]. PLoS One, 2012, 7(12):e51848.
- [12] Chaudhary SC, Singh T, Kapur P, et al. Nitric oxide-releasing sulindac is a novel skin cancer chemopreventive agent for UVB-induced photocarcinogenesis [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 268(3):249-255.