

余甘子对肿瘤细胞抑制作用及免疫调节的研究

罗春丽*

(贵州大学农学院 中药材研究所, 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 运用中药血清药理学研究方法, 研究余甘子对 S180 荷瘤小鼠肿瘤存活率、主要免疫器官及红细胞免疫调节能力的影响。方法: 余甘子采用鲜果榨汁经冷冻干燥保存。建立小鼠肿瘤模型, 模型小鼠随机分组, 小鼠末次给药后摘眼球取血, 分离红细胞、淋巴细胞, 进行肿瘤红细胞淋巴细胞混合花环实验; 观察不同剂量给药组对小鼠肿瘤抑制率及脾、胸腺指数的影响。结果: 与模型对照组比较, 余甘子大剂量组红细胞促淋巴细胞黏附肿瘤细胞能力及抑制肿瘤存活率具极显著差异性; 与阳性对照组比较, 各剂量组对免疫器官的影响均具显著差异性。结论: 余甘子在抑制肿瘤生长的同时, 对免疫器官有良好的保护作用。

[关键词] 余甘子; S180 荷瘤小鼠; 免疫调节

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0155-04

Immunoregulative Action and Inhibitive Effect of *Phyllanthus emblica* on Tumor Cells

LUO Chun-li*

(Institute of Chinese Herbal Medicines, College of Agronomy, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of *Phyllanthus emblica* on survival rate and immunoregulation capability in main immune organs and erythrocyte of S180 tumour-burdened mice with serum pharmacology method for evaluation of Chinese herbs. **Method:** *P. emblica* fresh fruits were juiced and then stored after freeze-drying. Mice tumor model of S180 burdened was established. Mice were randomly grouped into model group and treatment groups with different doses of *P. emblica*. Erythrocytes and lymphocytes were separated from blood samples after the last administration of the herb. The mixed rosette test was carried out with tumor erythrocytes and lymphocytes. The effect of different dose of *P. emblica* was evaluated by inhibition rate of the tumor, spleen index and thymus index. **Result:** Compared with model group *P. emblica* of high dose group had significant elevated adherence of lymphocytes to tumor cells promoted by erythrocytes, inhibition for survival rate of tumor cells. The three dosage groups all showed significant regulative effect for immune organs, compared with positive control group. **Conclusion:** *P. emblica* inhibits proliferation of tumor and improves immunity function of the hosts.

[Key words] *Phyllanthus emblica*; S180 tumour-burdened mice; immunoregulation

余甘子为大戟科植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的成熟果实, 是贵州蕴藏极为丰富的植物民族药资源, 因其含有维生素、微量元素、超氧化歧化酶和余甘子多糖, 已证实具有提高机体免疫力、延缓机体

衰老的作用^[1]。实验采用中药血清药理学研究方法, 研究经冷冻干燥的余甘子鲜果汁对 S180 荷瘤小鼠肿瘤存活率、主要免疫器官及红细胞免疫调节能力的影响。旨在探讨余甘子在抗肿瘤, 调节机体免疫力方面的作用效果。

1 材料

1.1 余甘子果汁冻干粉 余甘子鲜果 10 kg(2007 年 12 月采自贵州省望谟县); 鲜果洗净, 用 100 沸水热烫 2 ~ 3 min, 剥离果肉, 榨汁 5 800 mL,

[收稿日期] 20100316(005)

[通讯作者] * 罗春丽, 讲师, 硕士学位, 主要从事“苗药的开发与利用”的研究, Tel: 13984095679, E-mail: lilyluo310@126.com

4 000 r·min⁻¹离心 15 min, 过滤; 滤液冷冻干燥, 得淡黄色粉末 238.6 g, 干燥保存。

1.2 药品与试剂 肝素钠(上海生物化学制药厂生产, 批号 060310); 淋巴细胞分离液(比重 1.077 ± 0.001 的聚蔗糖-泛影葡胺 TBD 生物技术发展中心, 批号 200802); RPMI1640 培养基(日本株式会社); 新生小牛血清(美国 Sigma 公司); MTT(美国 Sigma 公司); ConA-型(美国 Sigma 公司); 复方泛影葡胺注射液(上海旭东海普药业有限公司, 批号 081101); 环磷酰胺(江苏恒瑞医药有限公司, 批号 03070221)。其余均为分析纯试剂。MTT(四甲基偶氮唑盐)溶液: 用 pH7.2, 0.01 mmol·L⁻¹含 0.5% 葡萄糖的磷酸缓冲液配成 5 g·L⁻¹ 的浓度, 现配现用。RPMI1640 完全培养液: RPMI1640 培养液; 含 10% 灭活小牛血清; 100 U·mL⁻¹青霉素; 100 μg·mL⁻¹链霉素; 2 mmol·L⁻¹的谷氨酰胺; 1 mmol·L⁻¹的丙酮酸钠; 3.4 μmol·L⁻¹的 2-巯基乙醇; 混匀, 用 NaCO₃ 溶液调整 pH 7.1, 过滤除菌, -20℃ 以下保存备用。DMSO(二甲基亚砷)溶液: 用 pH 7.2, 0.01 mmol·L⁻¹含 0.5% 葡萄糖的磷酸缓冲液配制成 10% 的 DMSO 溶液备用。

1.3 动物 昆明种小鼠, 清洁级动物, SCXK(苏)2008-0011。雌雄各半, 体重(20 ± 2) g。S180 荷瘤小鼠, 江苏省药用植物生物技术重点实验室传代维持。

1.4 仪器 离心机; 超净工作台; 奥林巴斯生物显微镜; 电热恒温水浴箱; SHELATC2323 型 CO₂ 孵育箱; BIO-RED550 型酶标仪; 血球记数板(上海医用光学仪器厂 XB-K-25)。

2 方法

2.1 S180 腹水肿瘤细胞存活率的测定

2.1.1 小鼠肿瘤模型的建立及分组 无菌条件下取 S180 腹水癌细胞, 放入无菌容器内, 置冰块中保存, 另取少量腹水, 置于加肝素的试管内, 用台盼蓝染色, 观察细胞形态以及进行细胞记数, 死细胞蓝染并胀大, 活细胞不被染色并保持原有形态。癌细胞数为 97% 以上方可使用。腹水用无菌生理盐水作 1:2 稀释, 使肿瘤细胞密度为 2 × 10⁷ /mL。在小鼠右腋下接种肿瘤细胞悬液 0.2 mL/只。

将荷瘤小鼠随机分 5 组, 分别为生理盐水模型组、环磷酰胺对照组(30 mg·kg⁻¹)、余甘子低剂量组(100 mg·kg⁻¹)、余甘子中剂量组(300 mg·kg⁻¹)、余甘子高剂量组(600 mg·kg⁻¹); ig 给药, 每日 1 次, 每

次 0.02 mL·g⁻¹, 连续给药 14 d。

2.1.2 血清制备 各组于末次给药 120 min 后, 摘眼球无菌取血, 37℃ 促凝, 3 000 r·min⁻¹离心 10 min 分离血清, 血清呈透明、清亮、淡黄色、无沉淀、未溶血。56℃, 30 min 灭活(除去血清中的补体)^[2-4]。4℃ 保存备用(3 d 内有效)。

2.1.3 S180 腹水肿瘤细胞悬液的制备 无菌条件下取 S-180 腹水癌细胞, 用基本 1640 液洗涤离心 3 次后, 用完全 1640 液配成 3 × 10⁵ 个/mL 备用。

2.1.4 S180 腹水肿瘤细胞存活率的测定 于 96 孔培养板中每孔加入 100 μL S180 腹水癌细胞悬液, 再加入 100 μL, 2.5 mg·L⁻¹ ConA 溶液及 20 μL 的试验血清, 4 复孔; 20 μL 空白血清, 4 复孔。37℃, 5% CO₂ 培养 48 ~ 72 h。培养结束前 4 ~ 6 h 每孔加入 MTT 溶液 10 μL, 培养结束弃去上清, 每孔加入 DMSO 溶液 200 μL, 充分震荡后静置 20 min, 酶标仪测定 A_{490 nm} 值。

$$\text{存活率计算: 存活率} = (K_1 - K_2) / K_2 \times 100\% \quad (1)$$

其中: K₁ = 试验组平均吸光值, K₂ = 正常组平均吸光值

2.2 余甘子对小鼠 S180 腹水肿瘤抑制率及对脾脏和胸腺的影响

2.2.1 小鼠肿瘤模型的建立与分组 同 2.1.1。

2.2.2 肿瘤抑制率及对脾脏和胸腺的影响 小鼠于末次给药 24 h 后脱颈椎处死, 称体质量, 剥离肿瘤, 称其质量, 以生理盐水组为参照, 计算抑瘤率; 摘除胸腺及脾脏称质量, 以胸腺或脾脏质量(mg)与体质量(g)之比计算胸腺或脾脏指数。

$$\text{肿瘤抑制率} = (\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}) / \text{对照组平均瘤重} \times 100\% \quad (2)$$

2.3 余甘子对 S180 荷瘤小鼠红细胞促淋巴细胞黏附肿瘤细胞能力的影响

2.3.1 小鼠肿瘤模型的建立与分组 分组增设正常对照组, 其余同 2.1.1。

2.3.2 红细胞、淋巴细胞的分离 小鼠摘眼球放血, 加入 0.1% 的肝素钠抗凝, 用 pH 7.2 ~ 7.6 的 Hanks 液将抗凝血作 1:1 ~ 1:2 稀释。取配好的淋巴分离液(在淋巴分离液中加入 34% 的复方泛影葡胺注射液, 调其比重为 1.085 g·mL⁻¹) 置入灭菌离心管中(一般淋巴分离液与稀释血液的体积比为 1:2), 吸取稀释血液, 在离淋巴分离液上 1 cm 处, 沿管壁徐徐加入, 使稀释血液重叠于分离液上; 用水平离心机离心, 2 000 r·min⁻¹, 20 min, 离心后绝大多数 PMNC(外周血液中单个核细胞)悬浮于血浆与分离

液的界面上,呈白膜状。在 PMNC 中,淋巴细胞占 80% ~90%,而单核细胞占 10 ~20%。将 PMNC 层,红细胞层小心吸出分别保存。

2.3.3 淋巴细胞的纯化 将已制备的单个核细胞悬液倾于玻璃或塑料平皿或扁平小瓶中,移至 37 温箱静置 1 h 左右,单核细胞和粒细胞均贴于平皿壁上,而未贴壁的非粘附细胞几乎为纯淋巴细胞,继用橡皮棒刮下贴壁的细胞即为纯单核细胞群,因 B 细胞也有贴壁现象,用本法分离的淋巴细胞群中 B 细胞有所损失。

2.3.4 细胞悬液的制备 红细胞悬液的制备:红细胞用无菌生理盐水洗涤离心(2 000 r·min⁻¹, 5 min) 3 次,再用生理盐水配成 1 ×10⁸/mL 备用。

淋巴细胞悬液的制备:用 5 倍量以上无 Ca²⁺, Mg²⁺ 的 Hanks 液离心(1 500 r·min⁻¹, 5 ~10 min) 3 次,用 Hanks 液配成 1 ×10⁷/mL 备用。血清致敏癌细胞悬液的制备:S180 腹水癌细胞经生理盐水洗涤离心 1 次后,配成 1 ×10⁶/mL,加等体积的人新鲜血清,混匀,37 水浴 30 min,取出用生理盐水洗涤,水平离心 1 次,倒尽上清液,用生理盐水配成 1 ×10⁶/mL 备用。

2.3.5 肿瘤红细胞淋巴细胞混合花环实验 实验时分实验管和对照管,前管加入 0.025 mL 红细胞悬液和 0.05 mL 血清致敏癌细胞悬液,后管加入 0.025 mL 生理盐水和 0.05 mL 血清致敏癌细胞悬液。两管都混匀放入 37 水浴 30 min,然后两管分别加入淋巴细胞悬液 0.05 mL,混匀,37 水浴 1 h,最后放 4 过夜,第 2 天取出,混匀,加 0.8% 的戊二醛 0.025 mL,混匀,取干净的载玻片在 Hanks 液中浸滚珠后背面擦干,立即用较粗口径的滴管吸取上述细胞悬液滴一大滴于载玻片上,令其自然扩散干燥。滴加瑞氏染液染 1 min,使标本被其中的甲醛所固定;加等量的 pH 6.4

的磷酸缓冲液(或等量的超纯水)轻轻晃动玻片,均匀静置 5 min;水洗、吸干、镜检。高倍镜下各记数 100 个癌细胞,一个癌细胞接上 3 个或 3 个以上红细胞为一朵肿瘤红细胞花环,接上 2 个或 2 个以上淋巴细胞为一朵肿瘤淋巴细胞花环,同时接上 2 个或 2 个以上淋巴细胞和红细胞为一朵肿瘤红细胞淋巴细胞混合花环^[5]。计算公式:

$$\text{促进率} = (N_1 - N_2) / N_2 \times 100\% \quad (3)$$

N_1 = 实验组淋巴细胞花环率, N_2 = 对照组淋巴细胞花环率

公式中淋巴细胞花环率 = 肿瘤淋巴细胞花环率 + 肿瘤红细胞淋巴细胞混合花环率

3 结果

3.1 余甘子含药血清对小鼠 S180 腹水肿瘤细胞存活率的影响 与模型对照组比较,余甘子各剂量组对小鼠 S180 腹水肿瘤细胞存活率均具有显著抑制作用($P < 0.001$)。结果见表 1。

表 1 余甘子对小鼠肿瘤细胞存活率的影响(珞±s)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	A	存活率/%
正常对照	-	0.120 8 ±0.006 1	-
余甘子	600	0.136 8 ±0.013 2	13.25 ²⁾
	300	0.142 2 ±0.017 8	17.72 ²⁾
	100	0.144 6 ±0.009 5	19.70 ²⁾
环磷酰胺	30	0.132 2 ±0.004 0	9.44 ¹⁾
模型对照	-	0.203 6 ±0.142 1	68.54

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.001$

3.2 余甘子对小鼠 S-180 腹水肿瘤抑制率及对脾脏和胸腺的影响 与模型对照组比较,余甘子各剂量组对肿瘤有较好抑制作用,与模型对照组比较,余甘子各剂量组、阳性对照组对荷瘤小鼠肿瘤抑制具显著差异($P < 0.01$);与阳性对照组比较,余甘子各剂量组对荷瘤小鼠胸腺的保护作用具极显著差异($P < 0.001$);对脾脏的保护作用具显著差异($P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 余甘子对荷瘤小鼠肿瘤抑制率及对脾脏和胸腺的影响(珞±s)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	瘤重/mg	瘤指数/mg·g ⁻¹	脾指数/mg·g ⁻¹	胸腺指数/mg·g ⁻¹	肿瘤抑制率/%
环磷酰胺	30	370.3 ±100.1	1.451 75 ⁴⁾	0.570 73	0.135 26	69.02
余甘子	600	405.7 ±76.4	1.844 11 ⁴⁾	0.723 37 ¹⁾	0.335 91 ²⁾	66.05
	300	682.8 ±104.0	2.783 90 ³⁾	0.766 35 ¹⁾	0.375 84 ²⁾	42.88
	100	475.5 ±77.8	2.083 14 ³⁾	0.705 32 ¹⁾	0.307 90 ²⁾	60.22
模型对照	-	1 195.3 ±259.9	4.800 05	0.910 29 ¹⁾	0.253 94 ¹⁾	-

注:与阳性对照组相比¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$;与模型对照组相比³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.001$ 。

3.3 余甘子对 S180 荷瘤小鼠红细胞促淋巴细胞黏附肿瘤细胞能力的影响 与模型对照组、阳性对照组比较,余甘子大剂量组红细胞促淋巴细胞黏附肿

瘤细胞能力均具极显著差异性;实验结果见表 3 及图 1。

表 3 余甘子对 S-180 荷瘤小鼠红细胞促淋巴细胞黏附
肿瘤细胞能力的影响 (n=12)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	促进率 /%
正常对照	-	20.82 ^{2,4)}
模型对照	-	8.54 ¹⁾
余甘子	600	23.33 ^{2,4)}
	300	15.8 ^{1,3)}
	100	10.92 ¹⁾
环磷酰胺	30	4.865

注:与环磷酰胺组比较:¹⁾ P<0.01, ²⁾ P<0.001;与模型对照组比较³⁾ P<0.05, ⁴⁾ P<0.01。

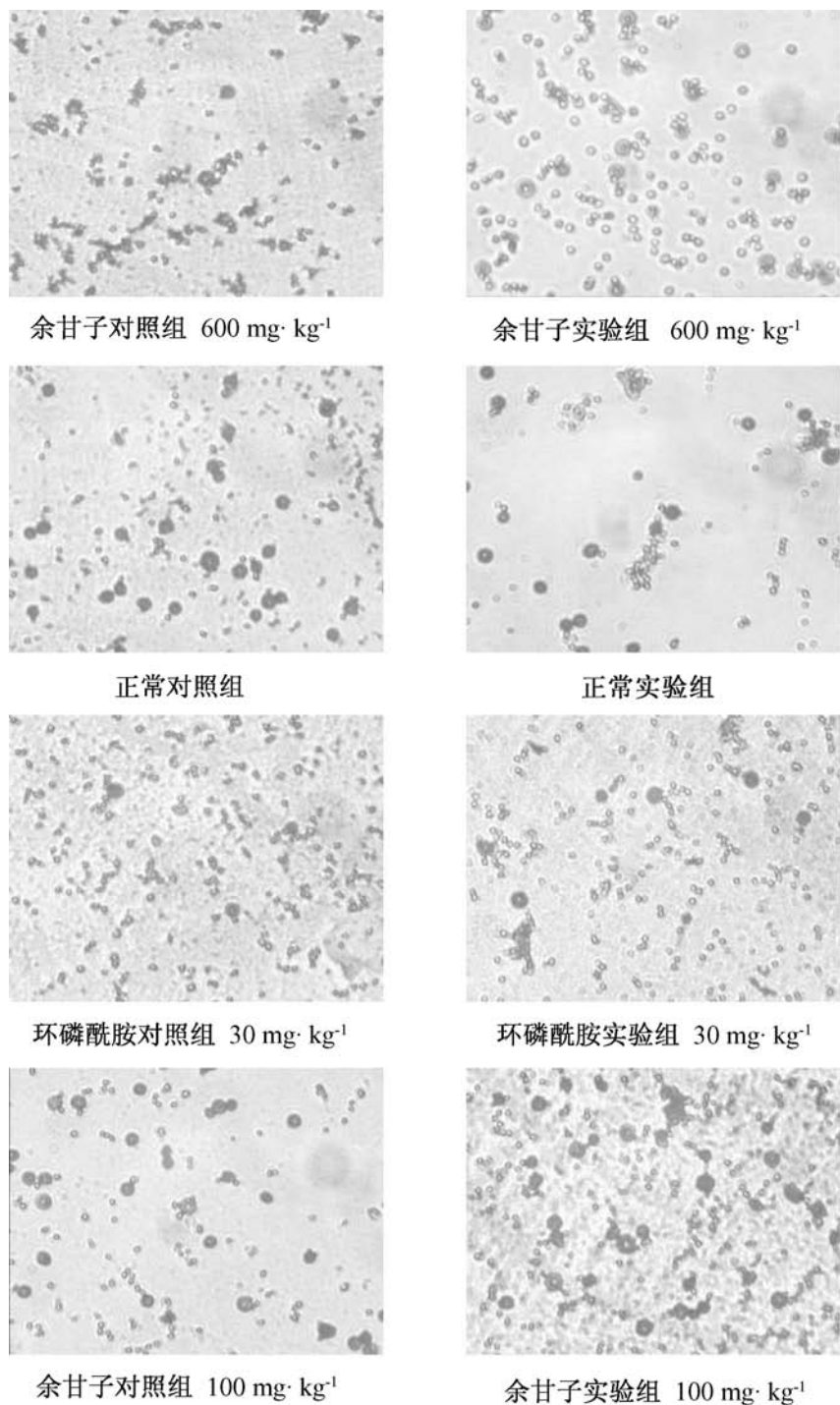


图 1 各组红细胞促淋巴细胞黏附肿瘤细胞能力的比较 (×400)

实验结果表明,余甘子大剂量组的肿瘤抑制率(66.05%)略低于阳性对照环磷酰胺组(69.02%);中剂量组胸腺指数(3.758 mg·10 g⁻¹)、脾指数(7.664 mg·10 g⁻¹)均是最高,胸腺指数甚至高于正常对照组。从实验结果很难看出余甘子的量效关系,但综合其抑瘤率和免疫器官指数,可以得出余甘子在拮抗肿瘤细胞的同时均能不同程度的提高机体免疫力的结论。另一方面,采用余甘子对 S180 荷瘤小鼠红细胞促淋巴细胞黏附肿瘤细胞能力的实验来

观察余甘子对 S180 荷瘤小鼠红细胞免疫功能的影响;实验所得数据显示:相对于模型组,余甘子各剂量组对红细胞的免疫调节均有不同程度的促进作用,大剂量组的更是略高于正常空白组,显示余甘子大剂量组对红细胞促淋巴细胞黏附肿瘤细胞的作用明显:试验结果中环磷酰胺组的促进率(4.855%)不但明显低于余甘子剂量组,甚至仅为模型组的 50%左右,再一次印证了环磷酰胺的副作用——免疫功能低下是难以克服的。

4 讨论

上述实验结果表明余甘子具有一定的抗肿瘤作用,能够抑制肿瘤细胞存活率;对其调节机体免疫力的作用进行实验研究,从对荷瘤小鼠免疫器官及免疫细胞的影响结果判断,余甘子具有较好的免疫调节和免疫保护作用。余甘子抗肿瘤作用相对于化学药物在抗癌过程中严重破坏机体免疫系统功能来说,体现了中药性质温和,能够标本兼治,扶正祛邪的优势。余甘子用于癌症的辅助治疗,相对于斑蝥、蟾酥、冬虫夏草、灵芝等有毒及名贵中药,有着非常明显的优势:来源广、资源丰富,价廉、易得,无毒、副作用,适于患者长期服用。

目前认为植物多糖具有免疫调节功能以及延缓衰老、抗肿瘤、降血脂、抗血栓等功能。在实验过程中,也曾提取余甘子多糖进行对比实验,实验结果显示对荷瘤小鼠白细胞的活化作用与模型组比较,余甘子大剂量组具明显促进作用;而多糖给药组所得结果为负值。单凭实验结果分析,表明余甘子的免疫调节作用应为多种成分的协同作用。这对我们今后的研究工作提出新的思路——余甘子免疫调节作用的物质基础有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 周涛,邱德文,廖波. 民族药余甘子的现代研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2002, 24(2): 50.
- [2] 周明眉,杨奎,姜远平,等. 中药血清药理学的方法研究——采血时间的确定及时效关系研究[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(1): 43.
- [3] 周明眉,杨奎,姜远平,等. 中药血清药理学的方法学研究——含药血清低温保存和血清灭活的影响[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(2): 46.
- [4] 孟季. 含药血清的制备方法研究[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(5): 290.
- [5] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版,北京:人民卫生出版社, 2006.

[责任编辑 聂淑琴]