

化合物 LJZ 对小鼠移植瘤生长和荷瘤小鼠免疫功能的影响

张雁丽¹⁾, 李彩霞²⁾, 金俞希¹⁾, 卿 晨¹⁾

(1) 昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650031; 2) 昆明医学院第一附属医院临床实验中心, 云南 昆明 650032)

[摘要] **目的** 研究化合物 LJZ 的体内抗肿瘤活性和对荷瘤小鼠免疫功能的影响. **方法** 以小鼠移植性肉瘤 S180 和小鼠移植性肝癌 H22 为模型, 研究化合物 LJZ 对肿瘤生长的影响; 采用 DNFb 诱导荷瘤鼠迟发型超敏反应 (DTH) 反应, 检测化合物 LJZ 对荷瘤小鼠特异性免疫功能的影响; 采用荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红试验, 检测化合物 LJZ 对荷瘤小鼠非特异性免疫功能的影响. **结果** 化合物 LJZ 对小鼠移植性肉瘤 S180 和肝癌 H22 的生长均有一定的抑制作用, 呈现明显的量效关系. 化合物 LJZ 能明显增强荷瘤小鼠巨噬细胞的吞噬功能, 但对 DTH 无明显影响. **结论** 化合物 LJZ 具有一定的抗肿瘤作用, 并与其增强荷瘤小鼠非特异性免疫功能有关.

[关键词] LJZ; 抗肿瘤; 免疫功能; 小鼠

[中图分类号] R965.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2007) 06-0029-04

Effects of Compound LJZ on Antitumor Activity and Immune Function in Tumor Bearing Mice

ZHANG Yan-Li, LI Chai-xia, JIN Yu-xi, QING Chen

(1) The Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products in Yunnan Province, Kunming 650031, China; 2) Clinical medicine Reseovrch, The 1st Affiliated Hospital University, Kunming, 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate effects of compound LJZ on antitumor activity and immune function in mice bearing implanted tumor in vivo. **Methods** The antitumor effects on the sarcoma 180 (S180) and hepatoma 22 (H22) bearing in mice were evaluated by weight of tumor. The effects of compound LJZ on specific immunity function were observed by delayed-type hypersensitivity (DTH) response induced by 2, 4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB) and the effects of compound LJZ on non-specific immunity function were studied by macrophage phagocytosing neutral red. **Results** Compound LJZ inhibited significantly the growth of S180 and H22 bearing in mice, and showed dose-dependent relationship. Compound LJZ could enhance the phagocytic capacity of macrophage in bearing S180 mice. But it had no effect on DTH. **Conclusion** Compound LJZ has significant antitumor effects in vivo, and the effects on phagocytic capacity of macrophage maybe one of its antitumor mechanisms.

[Key words] LJZ; Antitumor activity; Immune function; Mice

癌症是当今危害人类健康的重要疾病之一. 目前临床所用抗癌药普遍存在选择性低、毒副作用大及对发病率高的实体瘤疗效不理想的情况, 继续寻找新的抗癌药特别是具有抗肿瘤活性的天然

[作者简介] 张雁丽 (1979~), 女, 云南保山市人, 医学硕士, 助教, 主要从事肿瘤药理学研究.

[通讯作者] 卿晨. Email: qingchenhh@yeah.net

产物是抗肿瘤新药研究的重要任务。

化合物 LJZ 是从云南的一种野生植物中分离得到的一个已知结构化合物,但其抗肿瘤作用尚未见报道。我们前期的体外抗人肿瘤细胞增殖活性筛选结果显示化合物 LJZ 具有体外抗肿瘤活性。我们采用两种小鼠移植性肿瘤模型,在整体水平上评价其体内抗肿瘤活性和研究其对荷瘤小鼠免疫功能的影响,为此进一步证实其抗肿瘤作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品及配制 受试样品化合物 LJZ 为白色粉末状,食用油溶解。

1.1.2 小鼠移植瘤和实验动物 小鼠移植性肝癌(H22)、小鼠移植性肉瘤(S180),引自中国科学院上海药物研究所。ICR 小鼠,SPF 级,雌性,18~22 g,由昆明医学院实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(滇)2005-0008。

1.1.3 主要试剂 顺铂(DDP)(购于云南省个旧市生物药业有限公司);二硝基氟苯(DNFB)(上海化学试剂公司);RPMI-1640 培养基(GIBCO 公司);新生牛血清(杭州四季青生物工程有限公司);中性红(天津市天新精细化工开发中心)。

1.1.4 主要仪器 医用净化工作台(苏州净化设备公司);酶标板自动读数仪(BIO-RAD 680 型);电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);CO₂ 培养箱(德国 Hereaus 公司)

1.2 实验方法

1.2.1 化合物 LJZ 对小鼠移植瘤生长的影响 参考文献^[1,2]方法。取处于对数生长期的腹水型小鼠肝癌 H22 和小鼠肉瘤 S180 细胞,计数后生理盐水调整细胞浓度,接种于小鼠右侧腋部皮下。24 h 后随机分为阴性对照(NS)、阳性对照(DDP)、溶媒对照(食用油)和化合物 LJZ 低、中、高剂量组,接种当天为第 0 天,接种后第 1 天开始给药,每天 1 次,连续 10 d,于第 12 天处死小鼠,称体重、瘤重、胸腺和脾脏重,按下列公式计算抑瘤率:抑瘤率(%) = (对照组平均瘤重 - 受试组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 × 100 %

1.2.2 化合物 LJZ 对二硝基氟苯(DNFB)诱导

荷瘤小鼠 DTH 反应的影响 按 1.2.1 方法给小鼠接种移植性肉瘤 S180 细胞,分为致敏对照组和致敏组,其中致敏组又分为阴性组(NS)、阳性对照(DDP)、溶媒对照(食用油)和化合物 LJZ 低、中、高剂量组。接种后第 6 天除致敏对照组外,致敏组每只小鼠腹部去毛,约 3 cm × 3 cm。将新鲜配制的 1% DNFB 丙酮麻油混合液 50 μL 均匀涂抹于小鼠腹部。接种后第 11 天将 1% DNFB 溶液 10 μL 涂于小鼠右耳两面进行攻击性致敏,致敏对照组同样操作。攻击后 24 h 处死小鼠,剪下左右耳廓,取直径 8 mm 耳片,称重。以左右耳片重量之差为肿胀度^[3]。

1.2.3 化合物 LJZ 对荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 小鼠 S180 细胞接种、分组及给药与 1.2.1 相同。实验结束时处死小鼠,消毒腹部,剪开腹部皮肤,腹腔注射 NS 5 mL/只,轻揉腹部,吸出腹腔液,同组小鼠腹腔液混匀离心 1000 r/min,10 min,两次,用含 10% 血清 1640 培养基调整细胞数为 2 × 10⁶ 个/mL。吸取 100 μL 细胞悬液加入 96 孔培养板中,置 37℃、5% CO₂ 孵箱孵育 2 h,去除培养液,加入 0.072% 中性红溶液,100 μL/孔,60 min 后弃去中性红,用预温 37℃ 生理盐水充分洗涤 2 次,加入细胞溶解液(乙酸:乙醇=1:1),静置过夜,次日酶标仪检测波长 570 nm 处吸光值^[4]。

1.2.4 统计学处理 数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,测定结果用 Microsoft Excel 计算,用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 化合物 LJZ 对小鼠移植性肿瘤生长的影响

2.1.1 化合物 LJZ 对小鼠移植性肝癌 H22 生长的影响 结果显示,阳性对照药 DDP 对小鼠移植性肝癌 H22 的肿瘤生长的抑制率为 59.34%,与阴性组相比,统计学处理瘤重具有显著性差异。化合物 LJZ 随着给药剂量的增加对小鼠肝癌 H22 生长的抑制率增加,呈现一定的量效关系,中、高剂量组的瘤重与溶媒组比较有显著性差异,见表 1。

2.1.2 化合物 LJZ 对小鼠移植性肉瘤 S180 生长的影响 结果显示,阳性组 DDP 对小鼠移植性肉瘤 S180 肿瘤生长的抑制率为 45.34%,与阴性组

表 1 化合物 LJZ 对小鼠移植性肝癌 H22 生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 Effect of compound LJZ on the growth of hepatoma 22 (H22) bearing in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	n	体重 (g)		瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
			给药前	给药后		
NS 组	等体积	8	20.53 ± 1.50	23.25 ± 1.56	0.94 ± 0.10	--
DDP 组	1	8	19.79 ± 0.96	21.20 ± 0.96	0.38 ± 0.14 ^{**}	59.34
溶媒组	等体积	8	20.33 ± 1.19	23.25 ± 1.51	0.88 ± 0.09	--
LJZ 组						
低剂量	150	8	20.29 ± 1.44	23.46 ± 2.19	0.61 ± 0.19	30.15
中剂量	300	8	20.22 ± 1.12	23.33 ± 1.34	0.57 ± 0.27 [△]	35.37
高剂量	600	8	19.95 ± 1.24	23.00 ± 2.04	0.49 ± 0.23 ^{△△}	43.48

与 NS 对照组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与溶媒对照组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$.

表 2 化合物 LJZ 对小鼠移植性肉瘤 S180 生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 2 Effect of compound LJZ on the growth of sarcoma 180 (S180) bearing in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	n	体重 (g)		瘤重 (g)	抑瘤率(%)
			给药前	给药后		
NS 组	等体积	12	19.61 ± 1.90	23.27 ± 1.49	0.81 ± 0.35	--
DDP 组	1	12	19.50 ± 1.40	22.65 ± 0.96	0.44 ± 0.13 ^{**}	45.34
溶媒组	等体积	12	20.02 ± 1.51	23.09 ± 2.52	0.78 ± 0.33	--
LJZ 组						
低剂量	100	12	19.77 ± 1.36	21.66 ± 1.66	0.61 ± 0.25	21.37
中剂量	200	12	19.16 ± 0.72	22.85 ± 2.07	0.56 ± 0.22 [△]	28.24
高剂量	300	12	19.39 ± 1.50	23.32 ± 2.09	0.50 ± 0.18 ^{△△}	35.83

与 NS 对照组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与溶媒对照组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$.

相比, 统计学处理差异具有显著性. 化合物 LJZ 随着给药剂量的增加对小鼠肉瘤 S180 生长的抑制率增加, 呈现一定的量效关系, 其中中、高剂量组的瘤重与溶媒组比较有显著性差异, 见表 2.

2.2 化合物 LJZ 对二硝基氟苯 (DNFB) 诱导荷 S180 小鼠 DTH 反应的影响

结果显示, 阴性组小鼠耳廓肿胀度明显比致敏对照组大, 统计学处理差异有显著性, 小鼠致敏成功. DDP 组小鼠耳廓肿胀度较阴性组小, 但统计学处理没有差异性. 化合物 LJZ 各剂量组与溶媒组比较变化不大, 无统计学意义, 见表 3.

2.3 化合物 LJZ 对荷 S180 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

结果显示, DDP 组平均吸光度为 0.227, 明显低于阴性组, 统计学处理差异具有显著性. 化

合物 LJZ 各组随着剂量的增加平均吸光度增加, 有量效关系. 与溶媒组比较, 低、高剂量组统计学处理差异具有显著性, 见表 4.

3 讨论

化合物 LJZ 是从云南的一种野生植物中提取分离到的一个已知结构化合物, 此前未报道过其抗肿瘤活性. 前期的体外试验显示它具有抑制多种肿瘤细胞株增殖的作用, 且表现出较好的重现性. 本研究在前期工作的基础上研究了化合物 LJZ 的体内抗肿瘤作用, 结果显示, 化合物 LJZ 对小鼠移植性肝癌 H22 和小鼠移植性肉瘤 S180 的生长均显示出明显的抑制作用, 且呈现出一定的量效关系.

表 3 化合物 LJZ 对二硝基氟苯 (DNFB) 诱导荷 S180 小鼠 DTH 反应的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 3 Effect of compound LJZ on the response of DNFB-induced DTH in S180-bearing mice ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量(mg/kg)	n	耳朵重量 (mg)		左右耳差 (mg)
			左耳	右耳	
NS 组	等体积	6	13.25 ± 1.80	24.73 ± 3.84	11.48 ± 5.28
DDP 组	1	6	12.48 ± 1.05	22.15 ± 3.48	9.67 ± 3.31
溶媒组	等体积	6	12.78 ± 1.60	25.88 ± 7.08	13.10 ± 6.46
LJZ 组					
低剂量	100	6	12.40 ± 0.63	22.88 ± 3.86	10.48 ± 3.66
中剂量	200	6	12.73 ± 1.50	25.18 ± 4.75	12.45 ± 5.34
高剂量	300	6	12.73 ± 0.93	27.85 ± 5.52	15.12 ± 5.95
致敏对照	--	3	14.23 ± 2.57	17.80 ± 2.44	3.57 ± 2.65**

与 NS 对照组比较, ** $P < 0.01$; 与溶媒对照相比较, $\Delta P < 0.05$.

表 4 化合物 LJZ 对荷瘤 S180 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能影响比较

Tab. 4 Effect of compound LJZ on the phagocytic capacity of macrophage in S180-bearing mice

组 别	剂量(mg/kg)	n	OD 值
NS 组	等体积	6	0.459 ± 0.039
DDP 组	1	6	0.227 ± 0.021**
溶媒组	等体积	6	0.408 ± 0.057
LJZ 组			
低剂量	100	6	0.302 ± 0.037 $\Delta\Delta$
中剂量	200	6	0.389 ± 0.040
高剂量	300	6	0.667 ± 0.191 $\Delta\Delta$

与 NS 对照组比较, ** $P < 0.01$; 与溶媒对照组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$.

机体的免疫功能与肿瘤的发生有密切关系, 当宿主免疫功能低下或受到抑制时, 肿瘤发生率增高. 肿瘤发生后, 机体首先通过免疫效应机制发挥抗肿瘤作用. 机体抗肿瘤免疫的效应机制包括细胞免疫和体液免疫两方面. 细胞免疫是抗肿瘤免疫的主要方式, 体液免疫起协同作用. 目前认为在抗肿瘤细胞免疫机制中起主要作用的效应细胞包括 T 淋巴细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞等^[1]. 实验结果显示, 化合物 LJZ 各剂量组荷瘤小鼠耳廓肿胀度与溶媒组相比变化不大, 说明化合物 LJZ 可能对 T 淋巴细胞无影响. 对荷瘤鼠腹腔巨

噬细胞功能的检测实验显示, 化合物 LJZ 在 100 mg/kg 和 200 mg/kg 剂量组下巨噬细胞的吞噬功能降低, 但 300 mg/kg 剂量组的巨噬细胞吞噬功能明显增强, 与溶媒组比较有统计学意义. 这可能是因为化合物 LJZ 在低中剂量时未激活巨噬细胞, 而在高剂量下激活了巨噬细胞而产生的结果.

本研究结果表明, 化合物 LJZ 具有较为显著的体内抗肿瘤活性, 同时对荷瘤鼠的免疫系统有一定影响, 能明显增强巨噬细胞的吞噬功能, 但对迟发型超敏性 T 细胞没有影响. 化合物 LJZ 的抗肿瘤作用可能与其增强荷瘤小鼠的非特异性免疫功能有关.

[参考文献]

- [1] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1757-1779
- [2] 卿晨, 纪舒昱, 王蕾. 青山抗癌注射液抑制小鼠肿瘤生长的实验研究 [J]. 昆明医学院学报, 2003, 24 (2): 8-19
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1433
- [4] 梁再赋, 李铁皮, 赵慕丽, 等. 肺疾患肺泡巨噬细胞功能的变化 [J]. 中国医科大学学报, 1995, 24 (1): 12
- [5] 曾益新. 肿瘤学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 5

(2007-10-17 收稿)