

金樱根多糖的制备及其体内抗肿瘤作用初探

冯承恩,田素英*

(广东药学院中山校区实验中心,广东 中山 528458)

[摘要] 目的:从金樱根中分离提取金樱根多糖,并探索其抗肿瘤活性。方法:水提醇沉法提取,Sevag 法除蛋白,大孔树脂脱色后获得金樱根多糖粗品。建立小鼠 S180 肉瘤腹水瘤模型,并将小鼠随机分为 4 组:生理盐水组(阴性对照组)、金樱根多糖低、中、高剂量组(50,100,200 mg·kg⁻¹)。建立移植实体瘤模型,将小鼠随机分为 8 组:生理盐水组(阴性对照组)、阳性对照 5-Fu(5-氟脲嘧啶)组(20 mg·kg⁻¹)、金樱根多糖低、中、高剂量组(50,100,200 mg·kg⁻¹)、金樱根多糖各剂量组+5-Fu 组。腹腔注射给药结束后处死小鼠,计算各用药组抑瘤率、生命延长率和白细胞数、胸腺指数、脾指数,并用 EILSA 法测定荷瘤小鼠血清中 IL-2(白细胞介素-2)、TNF-α(肿瘤坏死因子-α)水平。结果:制备得到金樱根多糖粗品含糖量为 85.43%。金樱根多糖 50,100,200 mg·kg⁻¹剂量组荷瘤小鼠生命延长率分别为 3.07%±2.35%,10.11%±4.32%,34.3%±8.31%,与对照组相比,仅高剂量组有统计学意义(P<0.05)。但金樱根多糖低、中、高剂量组与 5-Fu 组(20 mg·kg⁻¹)合用抑瘤率分别为 62.74%±4.35%,67.92%±3.24%,78.79%±6.23%,明显优于单用 5-Fu(P<0.05),且与单用 5-Fu 组相比合用能升高白细胞数、胸腺指数、脾指数及 IL-2 水平(P<0.05),但对 TNF-α 水平无影响。结论:金樱根多糖单用不能有效抑制小鼠 S180 肉瘤生长,但与 5-Fu 合用有明显的增效减毒作用。

[关键词] 金樱根;多糖;抗肿瘤;S180 肉瘤

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0209-04

Separating and Purifying Polysaccharides from Root of Cherokee Rose and its *in vivo* Effect of Antitumor Activity

FENG Cheng-en, TIAN Su-ying*

(Zhongshan Branch,Guangdong College of Pharmacy, Zhongshan 528458, China)

[Abstract] Objective: To separate and purify polysaccharides from root of Cherokee Rose (Jinyinggen, JYG) in Chinese, and investigate its antitumor activity *in vivo*. Method: Water extracting and ethanol precipitating methods were applied to extract polysaccharide from root of Cherokee Rose. Sevage method was used to remove protein, and macro porous resin absorption was used for decolorization. Mice tumor model was established with transplantation of S180 solid tumor or ascites tumor. And the S180- ascites mice were divided into four groups: control(NS), JYG-Low, medium, high (50, 100, 200 mg·kg⁻¹). For the mice model with transplanted S180 solid tumor, the mice were divided into eight groups: control(NS), 5-Fu(20 mg·kg⁻¹), JYG-Low, medium, high (50,100,200 mg·kg⁻¹), JYG-Low, medium, high (50,100,200 mg·kg⁻¹) + 5-Fu(20 mg·kg⁻¹). Intraperitoneal injection was used to be the major route of administration. The effects of different groups on the inhibitory rate, the proliferation rate, WBC, thymus index (TI) and spleen index (SI) were observed after the mice were sacrificed. Result: The sugar content of JYG polysaccharides was 85.43%. The life-prolonging rates of JYG polysaccharides (low, medium, high) were 3.07%±2.35%, 10.11%±4.32%, 34.3%±8.31% respectively. There was only significant differences between high dose group and control group. The antitumor effect of JYG polysaccharides-low,

[收稿日期] 20100929(002)

[基金项目] 2009 年度中山市华南现代中药城(健康医药产业基地)专项发展资金项目(2009H020)

[第一作者] 冯承恩,硕士,Tel:13711295657,E-mail:cefeng2006@126.com

[通讯作者] * 田素英,硕士,副教授,研究方向:中药应用与开发,Tel:15362965291,E-mail:zsxqtsy@126.com

meddian, high doses combined with 5-Fu were superior to 5-Fu, the inhibitory rate were $62.74\% \pm 4.35\%$, $67.92\% \pm 3.24\%$, $78.79\% \pm 6.23\%$ respectively. Compared with 5-Fu alone, the drug combination could increase WBC count, TI, SI and the IL-2 level, but had no effect on TNF- α . **Conclusion:** The single use of JYG polysaccharides was not effect to inhibit the growth of S180 tumor, but the combination of JYG polysaccharide with 5-Fu had a coordinated effect with better efficacy and lower toxicity.

[**Key words**] root of cherokee rose; polysaccharides; antitumor; S180 sarcoma

金樱根为蔷薇科植物金樱子 *Rosa laevigata* Michx 的根, 又名脱骨丹, 始见于《日华子本草》, 性平, 味酸涩, 有固精涩肠作用。目前已发现金樱根多糖能明显提高机体的免疫力及有较强的抗氧化、抗炎等多种作用^[1-3], 然而这仅停留在粗提物的研究水平, 尚未见有金樱根多糖的抗肿瘤活性研究相关的报道。本实验对金樱根多糖进行分离纯化, 所得的金樱根多糖进一步研究其对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用及与化疗药物氟尿嘧啶(5-Fu)联用的增效减毒作用。

1 材料

金樱根药材采于广东中山市五桂山逍遥谷, 经广东药学院中山校区实验中心田素英副教授鉴定为蔷薇科植物金樱子 *R. Laevigata* 的根; 超级无支原体新生牛血清(批号 080508, 杭州四季青生物材料有限公司); RPMI-1640(批号 1020708, 美国 Gibco 公司); 胰酶(批号 P7545, 美国 Gibco 公司); ELISA 试剂盒(IL-2 批号 402-ML-020, TNF- α 批号 410-MF-050 R&D 公司)。S180 肉瘤细胞由本实验传代保存。KM 小鼠由广东省中医药大学实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK(粤)2008-0102。

RE-52 型旋转蒸发仪(上海博通公司); TGL 台式离心机(上海安亭离心机厂); SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); BC-J80/160S 型 3111 二氧化碳培养箱(上海博讯实业有限公司); DNM-9602G 型酶标仪(北京普朗公司)。

2 方法

2.1 金樱根粗多糖的提取 将所采金樱根干燥、粉碎, 并称取 200 g, 充分浸渍, 沸水煮提 4 次, 每次 1 h, 边提取边搅拌。合并滤液并浓缩, 浓缩前后体积比为 5:1。并按溶液体积的 1/4 ~ 1/3 加入 Sevage 试剂混合, 充分振摇后静置, 离心($1\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min), 除去蛋白层, 取上清重复操作, 反复多次, 至无游离蛋白为止(280 nm 处测定蛋白含量)。脱蛋白多糖液用大孔树脂脱色后, 加入 4 ~ 5 倍体积的 95% 乙醇, 使溶液中含乙醇量体积分数达到 60%。放入 4℃ 冰箱内静置 24 h, 对醇沉的多糖沉淀进行离心

($1\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min), 沉淀用乙醚、丙酮、无水乙醇多次洗涤, 得金樱根多糖的粗品。硫酸-苯酚法测定多糖含量。

2.2 金樱根多糖对 S180 腹水瘤小鼠的治疗 取腹腔接种 S180 细胞株 9 d 生长良好的腹水瘤源小鼠, 抽取腹水, 生理盐水悬浮, 计数并调节细胞密度为 1.0×10^7 个/mL, 每鼠 0.2 mL 细胞悬液, 接种于小鼠腹腔。于接种后 24 h 将小鼠随机分 4 组, 每组 8 只, 分成生理盐水组(阴性对照组)、金樱根多糖低、中、高剂量组($50, 100, 200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)。每天腹腔给药至小鼠死亡, 观察并记录各组小鼠给药后 10 d 内每天腹围变化情况 & 小鼠的生存时间(t), 计算其生命延长率(the proliferating rate)。

$$\text{生命延长率} = (t_{\text{实验组}} - t_{\text{对照组}}) / t_{\text{对照组}} \times 100\%$$

2.3 金樱根多糖对 S180 实体瘤小鼠的治疗

2.3.1 金樱根多糖对荷瘤小鼠的抑瘤作用 S180 肉瘤细胞于小鼠腹腔内培养 7 d 后, 无菌条件下抽取腹腔内瘤细胞, 无菌生理盐水洗涤 3 次, $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 3 min, 细胞沉淀用生理盐水调整瘤细胞密度为 1×10^7 个/mL, 接种于小鼠右腋皮下, 每只小鼠接种 0.2 mL。于接种后 24 h 将小鼠随机分 8 组, 每组 8 只, 分成生理盐水组(阴性对照组)、阳性对照 5-Fu 组($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、金樱根多糖低、中、高剂量组($50, 100, 200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、金樱根多糖各剂量组 + 5-Fu 组。各组均按体重每天腹腔给药 0.1 L· kg^{-1} , 连续 10 d, 末次给药后 24 h, 将小鼠称重, 眼眶取血并处死小鼠, 计数白细胞、解剖摘取胸腺、脾脏及瘤块, 用滤纸吸干后称重(m), 计算胸腺指数(thymus index, TI)、脾指数(spleen index, SI)和抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (m_{\text{对照组}} - m_{\text{实验组}}) / m_{\text{对照组}} \times 100\%$$

2.3.2 ELISA 法测定金樱根多糖对荷瘤小鼠细胞因子 IL-2, TNF- α 的影响 取小鼠血清, 采用酶标仪以 ELISA 方法分别检测 IL-2, TNF- α 水平。分别向 IL-2, TNF- α 单抗包被的 96 孔酶标板每孔加入标准品稀释液或待检样本 10 μL , 并设空白对照和标准曲线孔。各试剂稀释浓度和步骤按试剂盒操作说明

进行。终止反应后即用酶标仪均于 490 nm 处测定相应的吸光度(A)。绘制标准曲线,根据标准曲线方程求得样品中相关细胞因子浓度。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 11.0 统计软件包中多个样本率比较的方法进行统计学分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 代表差异有显著性。

3 结果

3.1 金樱根多糖的分离提纯 本实验经醇沉、脱蛋白、脱色、重结晶后所得金樱根多糖粗品,为淡黄色粉末,水溶性好。计算多糖的提取率为 6.31%,总糖含量为 85.43%。

3.2 金樱根多糖对 S180 肉瘤腹水瘤小鼠的腹围的变化及生命延长率的影响 给予金樱根多糖 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组与生理盐水组相比,在瘤株接种的 10 d 内,腹围增长明显放缓且差异有显著性($P < 0.05$),腹围总增长长度为 (2.92 ± 0.35) cm 与对照组的总增长长度 (4.03 ± 0.40) cm 相比亦有明显缩短。但 50,100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组,腹围总增长长度分别为 (4.00 ± 0.52) , (3.64 ± 0.55) cm,与生理盐水组比较无显著性差异(图 1)。

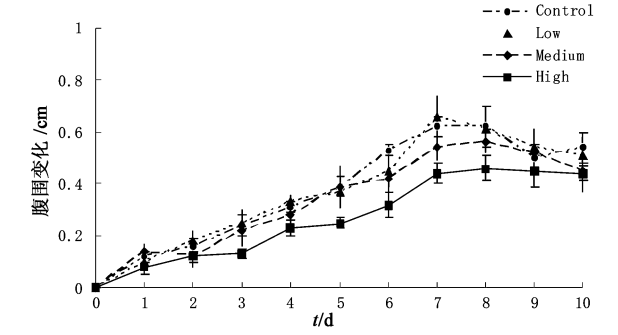


图 1 金樱根多糖对小鼠 S180 肉瘤腹水 0 瘤腹围变化的影响
对照组荷瘤小鼠平均生存时间为 (15.4 ± 4.1) d,而金樱根多糖 50,100,200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组的平均生存时间分别为 (15.8 ± 3.8) , (17.1 ± 5.3) , (20.7 ± 3.6) d,仅高剂量组的荷瘤小鼠平均生存时间明显高于对照组($P < 0.05$)。经计算 3 个剂量组的生命延长率分别为 $3.07\% \pm 2.35\%$, $10.11\% \pm 4.32\%$, $34.3\% \pm 8.31\%$,仅高剂量组与对照组间差异有显著性($P < 0.05$)。

3.3 金樱根多糖对 S180 小鼠实体瘤抑瘤率的影响
金樱根多糖各剂量组单独使用与模型组相比,均不能能有效抑制肿瘤生长,使肿瘤的生长受到抑制,抑瘤率不超过 10%。但与各剂量组与 5-Fu 合用后的抑瘤效果要明显优于单用 5-Fu ($P < 0.05$),高、

中、低各剂量组与 5-Fu 合用的抑瘤率分别是 $62.74\% \pm 4.35\%$, $67.92\% \pm 3.24\%$, $78.79\% \pm 6.23\%$,而 5-Fu ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 单独使用的抑瘤率是 $55.32\% \pm 6.17\%$,结果见表 1。

表 1 金樱根多糖对 S180 肉瘤实体瘤的抑制作用

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	瘤重 /g	抑瘤率 /%
对照		1.540 ± 0.41	
5-Fu	20	0.688 ± 0.32	55.32 ± 6.17
JYG	50	1.460 ± 0.14	3.07 ± 2.35
	100	1.430 ± 0.26	10.11 ± 4.32
	200	1.410 ± 0.31	34.3 ± 8.31
5-Fu + JYG	20 + 50	0.574 ± 0.24	$62.74 \pm 4.35^{1)}$
	20 + 100	0.494 ± 0.22	$67.92 \pm 3.24^{1)}$
	20 + 200	0.327 ± 0.35	$78.79 \pm 6.23^{1)}$

注:JYG + 5-Fu 剂量组与单用 5-Fu 组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 金樱根多糖对 S180 荷瘤小鼠白细胞数、胸腺指数和脾指数的影响 与模型对照组相比,单用 5-Fu 组小鼠白细胞数、胸腺指数及脾指数均显著降低($P < 0.05$),与 5-Fu 组相比,不同剂量金樱根多糖 + 5-Fu 组白细胞数显著回升($P < 0.05$),胸腺指数和脾指数亦有不同程度回升($P < 0.05$),且有随多糖浓度的增大而增大的趋势,但除高剂量组外,其余组间差异不明显。与阴性对照组相比,金樱根多糖单独应用对白细胞数、胸腺指数及脾指数的改变无影响。

3.5 金樱根多糖对 S180 荷瘤小鼠血清中细胞因子 IL-2, TNF- α 的影响 与模型对照组比较,金樱根多糖高、中、低剂量组能增加 IL-2 分泌,有显著性差异($P < 0.05$),5-Fu 组的 IL-2 水平明显低于模型组($P < 0.05$),但与金樱根多糖合用后,其 IL-2 水平呈有明显的升高($P < 0.05$)。5-Fu 组与模型对照组相比,能显著升高 TNF- α 的水平($P < 0.05$),但与高剂量组的金樱根多糖合用,其 TNF- α 水平增加不明显。而单用金樱根多糖则 TNF- α 水平无显著性变化,结果见图 2。

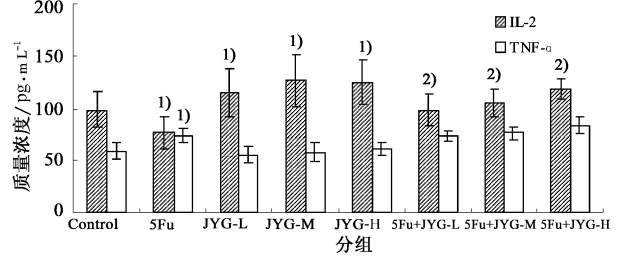


图 2 金樱根多糖对小鼠 S180 血清 IL-2 及 TNF- α 的影响
与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 5-Fu 组比较²⁾ $P < 0.05$

表 2 金樱根多糖对 S180 小鼠白细胞数,胸腺指数、脾指数的影响

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	WBC/×10 ⁹ 个/L	TI/mg·kg ⁻¹	SI /mg·kg ⁻¹
对照	—	7. 29 ±0. 72	3. 21 ±0. 092	6. 87 ±0. 22
5-Fu	20	5. 37 ±0. 61 ¹⁾	2. 06 ±0. 12	4. 33 ±0. 44
	50	7. 31 ±0. 67 ²⁾	3. 33 ±0. 18 ²⁾	6. 91 ±0. 42 ²⁾
	100	7. 21 ±0. 52 ²⁾	3. 47 ±0. 19 ²⁾	6. 76 ±0. 47 ²⁾
	200	7. 03 ±0. 76 ²⁾	3. 26 ±0. 12 ²⁾	6. 66 ±0. 56 ²⁾
5-Fu + JYG	20 + 50	6. 42 ±0. 45 ^{1,2)}	2. 33 ±0. 15 ^{1,2)}	5. 48 ±0. 41 ^{1,2)}
	20 + 100	6. 81 ±0. 77 ²⁾	2. 77 ±0. 19 ^{1,2)}	6. 26 ±0. 37 ^{1,2)}
	20 + 200	7. 35 ±0. 26 ²⁾	3. 26 ±0. 082 ²⁾	6. 86 ±0. 45 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾ P <0. 05;与 5-Fu 组比较²⁾ P <0. 05。

4 讨论

金樱子作为常用中药,已有悠久的历史,且有确切疗效,而其中的多糖物质是主要的活性成分之一。而金樱子的根部富含植物多糖,因此从金樱根中获取多糖成分是开发金樱的一个重要方向。由于在提取多糖过程中蛋白质是主要的杂质和干扰物,去除蛋白质是提高多糖得率和纯度的关键。本实验采用乙醇沉淀,Sevage 试剂与透析法相结合去除蛋白,并利用大孔树脂脱色,提高了所获的多糖的纯度和得率。

目前的研究已发现多种高等植物的多糖具有抗肿瘤活性,其抗肿瘤作用机制大致可分为两类,即以细胞毒为主的直接抑瘤机制和免疫作用为主的间接抑瘤机制。有报道指出,菌类多糖、云芝多糖、香菇多糖、树舌多糖等,它们对实体瘤有直接的抑制作用,而枸杞、黄芪、牛膝等多糖能透过 T 淋巴细胞功能或 B 淋巴细胞功能增强机体的免疫力从而延缓肿瘤的生长,改善病人的生存质量^[4-5]。我们的实验发现,金樱根多糖单独使用,高剂量的情况下略能延长荷腹水瘤小鼠的生存期,但中、低剂量对延长生存期无明显的改善,且 3 个剂量组的金樱根多糖单用对于实体瘤的增长几无抑制作用,这说明金樱根多糖若直接作为抗癌药物使用,无明显的治疗效果。与 5-Fu 联用时其抑制实体瘤的生长的作用明显优于单用 5-Fu,说明金樱根多糖可能是一种潜在的抗肿瘤辅助药物。尽管我们采用腹腔注射给药,希望多糖提取物能对腹水瘤的癌细胞产生直接抑制作用提高疗效,但对比研究资料发现与传统灌胃给药的香菇多糖、灵芝多糖等无明显疗效上的直接提高,这也从另一侧面说明该多糖对直接杀伤肿瘤细胞效果不明显。

此外,我们还通过实验发现,金樱根多糖与 5-Fu

合用后,能明显改善单独使用 5-Fu 的严重免疫抑制,如白细胞数减少,胸腺指数和脾指数降低等不良反应。此外,我们还发现了金樱根多糖能明显上调 IL-2 的水平,IL-2 是 T 细胞在体外长期生长所必需的因子,也是 TC 细胞成熟因子,它可促进已活化的 T 细胞增殖并分化成熟为效应的 TD 细胞和 TC 细胞,诱导 T 细胞表面 IL-2R 的表达增加,还可刺激其他细胞因子(TNF,IFN)等的分泌^[6-7],这提示了金樱根多糖可通过刺激 IL-2 的分泌,提高机体的免疫能力。通过一系列的前期实验,我们发现金樱根多糖与传统化疗药物 5-Fu 可提高肿瘤治疗的疗效,减轻免疫抑制的不良反应,其机制可能与提高免疫水平有关。

[参考文献]

[1] 黄贤华,谭晓彬,曾靖,等. 金樱根醇提取液耐缺氧作用的研究[J]. 赣南医学院学报,2003,23 (5) :488.

[2] 邹节明,潘佐静,陆浩. 三金片临床研究综述[J]. 中医杂志,2003,44 (4) :311.

[3] 王艳,杨静,田素英,等. 金樱根、茎抗炎作用的对比研究[J]. 中国现代中药,2010,12(3) :34.

[4] 李建恒,张杏红. 抗肿瘤中药多糖的研究[J]. 中医药学报,1998,4(4) :46.

[5] 吴梧桐,高美凤,吴文俊,等. 多糖的抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国天然药物,2003,1(3) :15.

[6] Sone S R, Ogura T. Local inter-leukin-2 therapy for cancer and its effector induction mechanism [J]. Oncology,1994,51(4) :170.

[7] Aliee K P, Jorge A T. Thera-peutic use of interleukin-2 in HIV-infected patients[J]. Curr Opin Pharmacol,2002,2 (4) :433.

[责任编辑 邹晓翠]