

海胆肠提取物的抗肿瘤作用

张忠玲¹, 刘亚民², 韩金祥¹, 张 翠¹, 黄海南¹, 杜景云¹

【摘要】 目的: 观察海胆肠提取物的抗肿瘤活性。方法: 体外采用四唑盐(MTT)比色法测定药物对人胃癌 SGC-7901 细胞的生长抑制率。体内采用 S₁₈₀ 移植性实体瘤和腹腔积液瘤小鼠模型, 分别腹腔注射不同剂量的海胆肠提取物, 连续给药 10 天, 计算抑瘤率和生命延长率。结果: MTT 实验显示, 海胆肠提取物对体外培养的 SGC-7901 细胞增殖有明显的抑制作用, 且抑制程度与浓度呈正相关。200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 提取物腹腔注射给药, 对小鼠肉瘤 S₁₈₀ 实体瘤的生长抑制率为 33.58% (与对照组相比差异有显著性, $P < 0.01$); 对腹腔积液瘤小鼠的生命延长率为 76.94% (与对照组相比差异有显著性, $P < 0.01$)。结论: 海胆肠提取物在体内和体外都有明显的抗肿瘤作用。

关键词: 海胆; 抗肿瘤; S₁₈₀; 人胃癌

中图分类号: R979.1; R73-36 文献标识码: A 文章编号: 1006-9801(2002)05-0302-03

STUDY ON THE ANTITUMOR EFFECT OF THE EXTRACTIVE FROM SEA URCHIN INTESTINE

ZHANG Zhong-ling, LIU Ya-m in, HAN Jing-xiang, et al. Shandong Medical Biotechnology Centre (Jinan, 250062)

【Abstract】 **Objective:** To study the antitumor effects of the extractive isolated from sea urchin intestine. **Methods:** The inhibited rate of growth of human gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 in vitro was determined by the MTT colorimetric assay. S₁₈₀ model mice were treated with the extractive of sea urchin intestine of different dose respectively and administered via ip. for 10 days. The tumor inhibited rate and the life prolonged rate of the S₁₈₀ mice was calculated. **Results:** MTT assay method showed that the extractive of sea urchin intestine had significant antitumor activity against human gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 in vitro when compared with the blank control. The IR of the experimental groups was associated with dosage. The extractive can obviously inhibit S₁₈₀ tumor cell proliferation in mice. The inhibited rate was 33.58% and the life prolonged rate was 76.94% when the S₁₈₀ mice were treated with 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ of the extractive. **Conclusion:** The extractive of sea urchin intestine has relative potent antitumor effect both in vitro and vivo.

Key words: Sea urchin intestine; Antitumor effect; S₁₈₀; Human gastric adenocarcinoma

海胆属于无脊椎动物的棘皮动物门, 是海洋里的古老生物, 至今已有上亿年的历史。全球有 850 多种海胆, 我国有其中的 100 多种, 广泛分布于全国沿海。我们选用生长于我省胶东半岛的紫海胆, 同时采用了体内和体外两种方法对海胆肠的抗肿瘤作用进行了研究, 以探讨其抗肿瘤作用, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

收稿日期: 2002-05-15; 修回日期: 2002-08-20

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(批准号 Y2000C08)

作者单位: 1. 山东省医药生物技术研究中心, 山东 济南 250062;

1.1.1 海胆: 选择自然生长于山东胶东半岛的活紫海胆。由本中心提取制备海胆肠抗肿瘤活性成分。用时将提取物先溶于 4: 8: 3 的氯仿-甲醇-水(CMW)溶液中, 再加入到培养体系或加生理盐水中, CMW 在培养体系内或接种体系内的终浓度不超过 2%。

1.1.2 主要试剂: 二甲亚砜(DMSO), 法国进口, 上海化学试剂采购供应站试剂厂分装。MTT(3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue)为 Sigma 公司产品。RPM-1640 培养基为 GIBCO 产品。

1.1.3 仪器设备: 美国 BIO-TEK 公司 ELX800 型酶标仪; CREVCO CO₂ 培养箱; 美国 Falcon96 孔培

养板。

1.1.4 实验瘤株及其培养: SGC-7901 人胃腺癌细胞株和小鼠肉瘤 S₁₈₀ 细胞株分别引自山东省医学科学院基础所和药物所。

1.1.5 实验动物: 健康昆明种小白鼠购于山东大学实验动物中心, 雄性, 5~6 周龄, 体重 18 g~22 g。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养: SGC-7901 细胞株置于含体积分数 10 % 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 于 37℃、5 % CO₂ 条件下传代培养。细胞贴壁生长。每 2 天~3 天换培养液 1 次^[1]。细胞传代时用含体积分数 0.25 % 胰蛋白酶和体积分数 0.02 % EDTA 的消化液消化后传代。每日倒置显微镜下观察细胞的生长情况及形态改变。小鼠肉瘤 S₁₈₀ 细胞接种于昆明种小鼠腹腔内连续传代。

1.2.2 体外细胞毒实验: 用 MTT 比色法, 取对数生长期的 SGC-7901 人胃腺癌细胞, 用体积分数 0.25 % 胰蛋白酶消化后, 用含体积分数 10 % 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液制成单个细胞悬液, 以 1×10^5 个/mL 的浓度接种于 96 孔细胞培养板, 每孔加入 100 μ L 的量^[2]。于 37℃、5 % CO₂ 及饱和湿度条件下, 培养 24 h。然后将不同浓度的海胆肠提取物加入实验组的相应孔中, 浓度分别为 0.8 μ g/mL、4 μ g/mL、20 μ g/mL、100 μ g/mL、500 μ g/mL。阴性对照组为含同样 4: 8: 3 的 CMW 溶液的等量培养液。每个浓度设 3 个平行孔。设不加细胞只加培养液的空白对照组^[3]。同条件继续培养 48 h。实验终止前 4 h, 小心吸去各孔中的上清, 再向每孔分别加入新鲜培养基 80 μ L 和 MTT 磷酸缓冲液 20 μ L (用 Hanks 液配制, 浓度 5 mg/mL), 于 37℃ 继续孵育 4 h 后离心 (1 000 r/min $\times$ 10 min)。直接吸去每孔的上清液。每孔加入 100 μ L 二甲基亚砷后, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解^[4]。最后用酶标仪于 490 nm 波长测定各孔的吸光值, 以空白对照孔调零^[5]。

各用药组的生长抑制率 IR (%) = (1 - 用药组平均 A_{490 nm} / 对照组平均 A_{490 nm}) $\times$ 100 %

以不加药孔细胞的存活率为 100 %, 计算各条件下细胞的生长抑制率。

1.2.3 小鼠肉瘤 S₁₈₀ 移植瘤模型的制备: 选择腹腔接种肉瘤 S₁₈₀ 后 8 日健康较好的小鼠, 无菌抽取腹腔积液, 抽出之腹腔积液为乳白色的黏稠液体。细胞分类计数, 其中瘤细胞大于 95 %。根据活细胞计数值, 用生理盐水稀释 10 倍~20 倍, 将细胞数调整至

窝皮下, 每鼠接种 0.2 mL^[6]。

1.2.4 体内抑瘤实验: 按常规抑瘤试验进行。于接种次日, 分别将实体瘤和腹腔积液瘤小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 每组小白鼠平均体重相差不超过 1 g。治疗组分三个剂量组, 剂量分别为: 实验 1 组 100 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹、实验 2 组 200 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹、实验 3 组 400 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹。阳性对照组注射环磷酰胺 20 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹, 阴性对照组注射含同样 4: 8: 3 CMW 的生理盐水。各组皆腹腔注射治疗, 每日 1 次, 每次每鼠 0.4 mL, 疗程为连续 10 天^[7]。实体瘤组于停药次日处死小鼠, 先称体重, 后解剖剥离皮下瘤块, 称中重, 计算抑瘤率。腹腔积液瘤组于疗程结束后次日称体重, 逐日记录, 继续饲养, 自接瘤之日起, 记录死亡时间。

疗效评价: 实体瘤的疗效以瘤重抑制百分率表示。瘤重抑制率 (%) = (1 - T/C) $\times$ 100 %, T 是治疗组平均瘤重, C 是对照组平均瘤重。腹腔积液型肿瘤疗效以生命延长率表示。生命延长率 = (T/C - 1) $\times$ 100 %, T 是治疗组平均生存天数, C 是对照组平均生存天数。

2 结果

2.1 体外细胞毒试验结果

高倍镜下观察, 用海胆肠提取物治疗的 SGC-7901 人胃腺癌细胞大多呈病理性萎缩和不可逆性破坏, 而空白对照组没有显著的病理学改变。

MTT 结果见表 1, 提取物对体外培养的 SGC-7901 人胃腺癌细胞的增殖有明显的抑制作用, 且抑制程度与浓度呈正相关。

表 1 海胆肠提取物对 SGC-7901 细胞生长的抑制效果

组别	提取物用量 μ g/mL	A _{490 nm}	抑制率 %
阴性对照组		0.79 $\pm$ 0.04	
实验 1 组	0.8	0.61 $\pm$ 0.05	22.78
实验 2 组	4.0	0.52 $\pm$ 0.04	34.18
实验 3 组	20.0	0.41 $\pm$ 0.05	48.10 ¹⁾
实验 4 组	100.0	0.35 $\pm$ 0.04	55.70 ¹⁾
实验 5 组	500.0	0.31 $\pm$ 0.03	60.76 ¹⁾

1) 与阴性对照组相比 $P < 0.01$ 。

2.2 抑瘤试验结果

实验发现, 小鼠给药后, 食欲、精神、毛色等均正常, 未见有由于药物引起的病变和中毒现象, 说明海胆肠提取物毒性很小。海胆肠提取物在对小鼠生存数和体重均无明显影响的情况下, 对小鼠肉瘤 S₁₈₀ 实体瘤的生长具有明显的抑制作用, 结果见第

结果见表 3, 提取物 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔注射给药对小鼠 S_{180} 肉瘤的抑制率抑瘤率为 33.58%, 对

表 2 海胆肠提取物对小鼠 S_{180} 实体瘤的抑制作用

组别	药物	剂量 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	动物数 只		动物体重 g		瘤重 g	抑瘤率 %
			始	终	始	终		
阴性对照组	生理盐水		10	10	18.2 ± 0.41	26.9 ± 0.47	2.65 ± 0.42	
阳性对照组	环磷酰胺	20	10	10	18.4 ± 0.45	21.8 ± 0.61	1.02 ± 0.06	61.51 ¹⁾
实验 1 组	提取物	100	10	10	18.1 ± 0.48	26.2 ± 0.58	2.08 ± 0.24	21.51
实验 2 组	提取物	200	10	9	18.5 ± 0.62	25.9 ± 0.68	1.76 ± 0.26	33.58 ¹⁾
实验 3 组	提取物	400	10	10	18.3 ± 0.56	25.4 ± 0.42	1.45 ± 0.32	45.28 ¹⁾

1) 与阴性对照组相比 $P < 0.01$ 。

表 3 海胆肠提取物对 S_{180} 腹腔积液瘤的抑制效果

组别	药物	剂量 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	动物数 只		动物体重 g		存活期 天	生命延长率 %
			始	终	始	终		
阴性对照组	生理盐水		10	10	18.3 ± 0.38	27.7 ± 0.47	16.52 ± 3.22	
阳性对照组	环磷酰胺	20	10	9	18.2 ± 0.42	23.8 ± 0.61	30.03 ± 3.01	81.78 ¹⁾
实验 1 组	提取物	100	10	10	18.5 ± 0.31	27.1 ± 0.58	19.58 ± 2.78	18.52
实验 2 组	提取物	200	10	9	18.4 ± 0.61	25.9 ± 0.62	29.23 ± 2.42	76.94 ¹⁾
实验 3 组	提取物	400	10	10	18.5 ± 0.54	25.4 ± 0.43	30.82 ± 3.07	86.56 ¹⁾

1) 与生理盐水组比 $P < 0.01$ 。

3 讨论

肿瘤是危害人类健康的严重疾病。肿瘤的防治工作一直是医药研究领域的重点。化疗、放疗是目前治疗肿瘤的主要手段。但化疗、放疗在抑制了癌细胞发育的同时也抑制了正常细胞的发育,降低机体的免疫能力,导致新的并发症。近年来,研究无创性、无副作用的天然抗肿瘤药物成为国际医药领域的重点方向。

我们抽提海胆肠内的糖脂成分,同时对其体内、体外的抗肿瘤作用进行了实验研究。我们除了设不治疗的阴性对照组外,同时采用阳性对照。这样,实验组既可与不治疗的对照组比较,又可与阳性对照组比较,增加了实验的可靠性。

体内实验结果表明,海胆肠提取物在腹腔给药 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的情况下,具有抑制小鼠体内 S_{180} 移植性实体瘤的生长作用,抑瘤率为 33.58%,与阴性对照组相比差异有显著性 ($P < 0.01$),且呈量效关系。腹腔注射 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 提取物,对荷 S_{180} 腹腔积液瘤的小鼠的生命延长率为 76.93%,大于 75%,并经统计学处理有显著差。

MTT 实验表明,海胆肠提取物低浓度时抑制作用较弱,随浓度增加抑制作用增强,且与作用时间呈线性相关。可初步认为海胆肠提取物具有一定的

本实验首次在国内对海胆肠提取物的抗肿瘤作用进行了初步检测与评价。实验研究表明,用药期间海胆肠提取物在产生抑瘤作用的同时,对小鼠的体重增长和存活数无明显影响,说明海胆肠提取物不影响实验动物的生长、发育,无毒副作用。本实验用的是海胆肠糖脂粗提物,其抗肿瘤作用的有效成分和机制有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].上海:世界图书出版公司,1992.
- [2] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening[J]. Natl Cancer Inst, 1990, 82: 1107.
- [3] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1994.779.
- [4] 鱼达. MTT 显色法抗癌药物敏感性试验的实用性研究[J]. 浙江医学, 1991, 13(5): 7.
- [5] 焦顺昌.肿瘤细胞计数法-单波长嘧啶蓝比色分析法[J]. 肿瘤, 1993, 13(5): 230.
- [6] 徐淑云.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,1982. 112.
- [7] 韩锐.抗癌药物研究与实验技术[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学出版社,1997.271-321.

作者简介:张忠玲(1964—),女,山东人,1987年毕业于青岛医学院。现任山东省医学科学院,山东省医药生物技术研究中心副