极大螺旋藻胞内多糖 IPS A 逆转化疗模型小鼠免疫功能的研究

朱劲华¹, 张威¹, 王敏², 李朝军², 张成武²

(1. 江苏职工医科大学, 江苏 南京 210029; 2. 南京师范大学 生命科学学院, 江苏 南京 210097)

摘要: 研究了极大螺旋藻(*Spirulina maxima*)胞内多糖 IPS A 对化疗模型小鼠免疫功能的影响。通过注射环磷酰胺构建化疗小鼠模型, 再分别注射不同剂量(0.5、1、2 μg/g)的 IPS A, 14 d 后进行外周血白细胞计数、免疫器官称质量并且应用炭粒廓清法和溶血素测定法测定单核细胞吞噬功能和 B 淋巴细胞的体液免疫功能。结果发现 IPS A 能显著改善环磷酰胺所致白细胞减少、胸脾指数降低, 还能使单核细胞吞噬功能、B 淋巴细胞的体液免疫功能得以恢复和提高, 并且存在剂量累积效应。可见 IPS A 能显著逆转化疗模型小鼠的免疫功能, 具有成为癌症化疗辅助药物的潜能。

关键词: 极大螺旋藻(*Spirulina maxima*); 胞内多糖; 化疗; 免疫激活; 小鼠模型

中图分类号: R93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2005)11-0018-04

国内外研究表明^[1-3], 钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)多糖在防癌抗癌、增强免疫功能等诸多方面有独特功效, 但有关极大螺旋藻(*Spirulina maxima*)多糖的药用研究国内外报道较少, 作者曾对极大螺旋藻胞外多糖(Exocellular polysaccharide, EPS)的免疫学功能作了研究^[4], 发现 EPS 能显著增强免疫低下小鼠的免疫功能。而化疗后如何提高机体的免疫功能是肿瘤治疗研究的热点, 为了进一步了解极大螺旋藻多糖能否激活化疗后机体的免疫功能, 作者以极大螺旋藻胞内多糖(Intracellular polysaccharide, IPS) IPS II A 为材料, 研究其对化疗模型小鼠非特异性免疫功能以及体液免疫功能的影响, 以期找到一种化疗药物的辅助用药, 为开发天然药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 藻种及胞内多糖 IPS A 的制备

极大螺旋藻(*Spirulina maxima*)藻种来源于美国 Texas 大学藻种保藏中心(原产于非洲乍得湖); 藻种

鉴定人: 南京大学生物系曾昭琪教授; IPS II A 制备: 热水提取胞内粗多糖, 丙酮、乙醚脱水脱色, 再经改良的 Sevag 等方法脱蛋白, 获得胞内多糖半精品(IPS I), 经 DE-52、Sephadex G-100 层析柱纯化, 得到 2 种单一组分的多糖精品(IPS II): IPS II A 和 IPS II B。利用 HPLC、IR 等方法测定 IPS II A 的初步结构, 结果显示: IPS II A 的平均分子质量为 238 000 u, 主要单糖组成为 L-岩藻糖、L-鼠李糖、D-木糖、D-半乳糖(摩尔比为 6.09: 3.38: 0.66: 0.072), 糖苷键构型以 α 型为主, 硫酸根含量为 26.3 mg/g ± 3.7 mg/g。

1.2 试剂及实验动物

环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX): 批号: 20031107, 上海第二制药厂产品; 绵羊红细胞: 购自南京江宁区防疫站; 豚鼠: 购自南京医科大学实验动

收稿日期: 2003-09-21; 修回日期: 2003-12-23

作者简介: 朱劲华(1973-), 女, 江苏南京人, 硕士, 讲师, 研究方向: 藻类多糖的药用价值, E-mail: zhjh1973.student@sina.com

物中心;昆明种小鼠:雄性,18~22g,购自南京医科大学实验动物中心。

1.3 化疗模型建立

小鼠在实验第2、4、6、8、10、12、14天经腹腔注射CTX(60 μg/g),共7次。

1.4 主要仪器

血常规检测仪 Hema-screen 18(意大利);721 分光光度计。

1.5 动物分组

实验动物共分5组,每组10只。(1)正常对照组:每只小鼠每天腹腔注射生理盐水0.2 mL,连续14 d。(2)模型对照组:建模同时,每只小鼠每天腹腔注射生理盐水0.2 mL,连续14 d。(3)低剂量治疗组,(4)中剂量治疗组和(5)高剂量治疗组:建模同时,每只小鼠每天分别腹腔注射IPS II A 0.5, 1和2 μg/g,连续14 d。

1.6 实验方法^[5]

1.6.1 测定白细胞数、胸腺指数、脾指数

末次给药后24 h,从小鼠眼眶后静脉丛取血,用Hema-screen 18测定每组样品的血常规,然后将小鼠颈椎脱臼处死,分别称取胸腺、脾质量,计算胸腺指数和脾指数。

1.6.2 单核细胞实验

末次给药后24 h,于鼠尾静脉注入稀释印度墨汁0.01 mL/g,于注入印度墨汁后1 min(T_1)及11 min(T_2)从小鼠眼眶后静脉丛取血0.025 mL,立刻吹入2 mL 0.001 g/L 碳酸钠溶液中,用721型分光光度计测675 nm处A值。最后将小鼠颈椎脱臼处死,按下式计算吞噬指数K:

$$K=(\lg A_1 - \lg A_2)/(T_2 - T_1)$$

1.6.3 溶血素抗体实验

于实验第8天用绵羊红细胞免疫小鼠,免疫6 d后,眼眶取血,分离血清,与绵羊红细胞及补体(豚鼠血清)一起体外温育,用分光光度计(波长540 nm)进行比色,记录各样品的吸收度(A)值。按下式计算每个样品的半数溶血值(HC₅₀):

HC₅₀=(样品吸收度值/绵羊红细胞半数溶血时吸收度值)×稀释倍数

2 结果

2.1 IPS A对化疗模型小鼠白细胞、胸腺指数及脾指数的影响

由表1结果可以看出,模型对照组与3个剂量(0.5、1、2 μg/g)的治疗组之间在胸腺指数上有非常显著($P < 0.01$)的差异,而低剂量治疗组(0.5 μg/g)与模型对照组间在白细胞数及脾指数上无明显差异($P > 0.05$),中、高剂量组在白细胞数上存在极显著差异($P < 0.01$),而在脾指数上只有高剂量组(2 μg/g)与对照组存在显著差异($P < 0.05$)。与中剂量组(1 μg/g)比较,高剂量组的白细胞数、胸腺指数都明显增加,其中胸腺指数差异极显著($P < 0.01$)。该结果显示CTX引起小鼠白细胞、胸腺指数及脾指数急剧下降,IPS II A能使小鼠以上3个指标都显著回升,且存在剂量累积效应。

表1 IPS A对化疗模型小鼠白细胞、胸腺指数及脾指数的影响

Tab.1 Effects of IPS A on the white cells, thymus index, spleen index of mice treated with CTX

组别	白细胞数 (10^9 个/L)	胸腺指数 (mg/g)	脾指数 (mg/g)
正常对照组	7.2±2.36	4.12±0.31	6.91±0.78
模型对照组	1.83±1.05	0.44±0.077	2.10±1.19
低剂量治疗组	2.23±1.84	1.62±0.28**	3.07±1.26
中剂量治疗组	3.56±1.97**	1.75±0.43**	3.28±1.32
高剂量治疗组	4.64± 2.28** ^{oo}	2.96± 0.72** ^{oo}	3.69± 1.60*

注: t-检验 $\bar{x} \pm S(n=10)$; 与模型对照组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与中剂量组比较, ^{oo} $P < 0.01$

2.2 IPS A对化疗模型小鼠单核细胞功能及溶血素抗体生成的影响

表2结果显示:模型对照组与3个剂量(0.5、1、2 μg/g)的治疗组之间在吞噬指数K及半数溶血值HC₅₀上都存在非常显著($P < 0.01$)的差异,高剂量治疗组与中剂量治疗组之间亦存在非常明显差异($P < 0.01$),而低剂量治疗组与中剂量治疗组之间只有HC₅₀存在明显差异($P < 0.05$),可见有剂量效应。

3 讨论

本实验在建立模型时, 参照 CTX 临床用量, 隔天给药, 同时, 每天都给一定量的 IPS II A, 从非特异性免疫及体液免疫两方面观察 IPS II A 对 CTX 引起的免疫低下小鼠的免疫功能的影响。结果表明, IPS II A 能有效($P < 0.01$)改善 CTX 所致小鼠免疫功能的低下: IPS II A 能逆转 CTX 引起的白细胞减少、胸脾指数下降、单核细胞吞噬功能降低等非特异性免疫抑制以及致敏小鼠溶血素抗体生成量减少等体液免疫抑制。其中, 对血细胞的影响与国外有关钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 多糖的报道^[6]基本一致, 即提高血液中白细胞数量而对红细胞和血红蛋白没有影响(本文未显示该数据)。同时, 实验结果还显示 IPS II A 对小鼠免疫功能的影响存在一定的剂量累积效应, 一定浓度范围内 (0.5、1、2 $\mu\text{g/g}$) 浓度愈高效果愈明显。

表 2 IPS II A 对化疗模型小鼠单核细胞功能、小鼠溶血素抗体生成的影响

Tab.2 Effects of IPS II A on the functions of monocyte swallowing and the produce of hemolysin antibody of mice treated with CTX

组别	吞噬指数 $K (\times 10^{-4})$	HC ₅₀
正常对照组	9 674 ± 1 236	6 582 ± 1 528
模型对照组	2 764 ± 1 323	512 ± 126
低剂量治疗组	4 216 ± 1 297**	1 128 ± 652**
中剂量治疗组	5 321 ± 1 463**	2 967 ± 1 073** ^{0 0}
高剂量治疗组	7 254 ± 1 022** ^{0 0}	4 351 ± 1 194** ^{0 0}

注: t -检验 $\bar{x} \pm S(n=10)$; 与模型对照组比较, ** $P < 0.01$; 与中剂量组比较, ⁰⁰ $P < 0.01$

关于 IPS II A 增强小鼠免疫功能的机理, 目前还不清楚。但通过本实验已清楚地看出 IPS II A 能明显地改善化疗模型小鼠的各项免疫指标, 而且作者在实验过程中也发现治疗组小鼠无论在体质量、毛色还是在饮食上明显地优于模型对照组(本文未显示

该数据), 可见 IPS II A 还能明显改善模型小鼠的健康状况。

目前, 化疗是治疗肿瘤的有效方法之一, 但化疗药物对机体免疫系统的毒副作用却严重影响了化疗效果, 而作者从极大螺旋藻中提取的 IPS II A 不仅本身无毒, 而且能有效逆转化疗模型小鼠的免疫功能, 改善 CTX 对小鼠单核细胞功能活性带来的负面影响, 对网状内皮系统吞噬功能具有极为明显的激活、增强作用, 另外, 作者还发现 IPS II A 能抑制体外肿瘤细胞的增殖, 也能抑制体内肿瘤的生长(结果将另文发表)。由此可见, IPS II A 作为一种肿瘤化疗的辅助用药, 应该有很好的应用前景。

参考文献:

- [1] Gitte S, Donald I, Christian D. Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator [J]. *JANA*, 2001,3(4): 24 - 30.
- [2] Misako M, Kaoru H, Yoshiko S, *et al.* Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*[J]. *International Immunopharmacology*, 2002,10(2):423 - 434.
- [3] Mishima T, Murata J, Toyoshima M, *et al.* Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan(Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis* [J]. *Clin Exp Metastasis*, 1998, 16(6):541 - 550.
- [4] 吴洁, 张成武. 极大螺旋藻胞外多糖 EP II 的分离、纯化及免疫学研究[J]. *药物生物技术*, 1999, 6(2):99 - 102.
- [5] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社 1994.251-258.
- [6] Zhang H Q, Lin AP, Sun Y, *et al.* Chemo- and radio-protective effects of polysaccharide of *Spirulina platensis* on hemopoietic system of mice and dogs[J]. *Acta Pharmacol Sini*, 2001, 22(12):1 121 - 1 124.

Chemo-protective effects of intracellular polysaccharide of *Spirulina maxima* on immune system of mice

ZHU Jing-hua¹, ZHANG Wei¹, WANG Min², LI Chao-jun², ZHANG Cheng-wu²,

(1. Jiangsu Staff Medical College, Nanjing 210029, China; 2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Received: Sep.,21,2003

Key words: *Spirulina maxima*; intracellular polysaccharides; chemotherapy; immuno-enhancer; mice model

Abstract: The effect of intracellular polysaccharide of *Spirulina maxima*(IPS II A) on immune system of mice treated by injection of cyclophosphamide(CTX) was observed. CTX was used to induce immune system low, and the experimental animals were injected with different doses of IPS for 14 d administration, the white cells were measured, the immune organs were weighed, and the functions of monocyte swallowing and the functions of B lymphocyte were inspected. IPS II A obviously improves the functions of immune system of mice treated with CTX, and the results showed dose-dependent patterns. IPS II A possesses chemo-protective capability ,and may be a potential adjunct to cancer therapy .