

螺旋藻多糖对移植性癌细胞的抑制作用及其机理的研究

刘力生^① 郭宝江^① 阮继红^① 覃广泉^① 吴伯堂^②

(中国科学院海洋研究所实验生物学开放研究实验室, 青岛 266071)

(^① 仲恺农业技术学院生物技术研究室, 广州 510225)

(^② 中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301)

收稿日期 1990年5月20日

关键词 螺旋藻多糖, 腹水型肝癌细胞, 肉瘤 180, ³H-脱氧胸腺嘧啶核苷, ³H-尿嘧啶核苷, ³H-亮氨酸

提要 螺旋藻多糖 200mg/kg 可显著抑制小鼠体内腹水型肝癌细胞的增殖。它对 S180 和腹水型肝癌细胞 DNA, RNA 和蛋白质的抑制作用, 在 3~24h 内均随作用时间延长而提高。它对癌细胞 DNA 合成的抑制作用, 属 DNA 代谢干扰型。螺旋藻多糖虽不能直接杀伤癌细胞, 但通过增强机体的免疫力而抑制癌细胞的增殖。

螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 多糖, 经我们多年研究, 发现它是一种无毒的天然产物。它的分子量为 12 590, 其组分含 D-甘露糖 30.938, D-葡萄糖 29.779, D-半乳糖 22.755, 葡萄糖醛酸 16.526%^[1]。它具有抗辐射和显著减轻小鼠骨髓细胞及蚕豆根尖细胞的辐射损伤, 大大降低电离辐射引起的突变频率的作用^[2,10]; 具有增强小鼠骨髓细胞增殖能力的活性^[10]。此外它还可提高核酸内切酶的活性和促进 DNA 修复合成的作用^[3]。为了进一步研究螺旋藻多糖的生物活性与作用机理而设计了本试验。

I. 实验材料

I.1. 螺旋藻多糖

按文献[1]的方法提取与纯化, 用 80℃ 的无菌蒸馏水配制成所需浓度, 置冰箱备用。

* 实验海洋生物学开放研究实验室研究报告第 41 号。

I.2. 实验动物

取 $19 \pm 1\text{g}$ 健康昆明种小白鼠,兰州生物制品研究所提供。

I.3. 癌细胞

无菌取接种后第5天的腹水型肝癌 (Ascitic hepatoma) 或肉瘤 (Sarcoma 180) 或白血病 (Leukemia 7712) 癌细胞^[4]用无菌生理盐水洗涤1次,计数配成所需浓度。

I.4. 培养液

199 或 1640 培养液 (Sigma 产品)内含 20% 小牛血清、青霉素 100U/mL 和链霉素 100 μg /mL。

I.5. 标记物

^3H -脱氧胸腺嘧啶核苷 (^3H -TdR, 比强度 999GB q/m mol), ^3H -尿嘧啶核苷 (^3H -UR, 740 GB q/m mol), ^3H -亮氨酸 (^3H -Leu, 2.96TB q/m mol),均为上海原子核研究所产品。

I.6. 消化剂

过氯酸与过氧化氢容量比 1:1。

I.7. 闪烁液

0.4% PPO 和 0.01% POPOP 的二甲苯溶液与乙二醇甲醚,6:4(V:V)。

II. 实验方法

II.1. 对体内癌细胞的抑制作用

选健康雌性 $19 \pm 1\text{g}$ 的昆明种小鼠 36 只,每鼠接种腹水型肝癌细胞 5×10^6 个,随机分成 2 组,对照组:在接种后第2天开始每天腹腔注射无菌生理盐水 0.2mL,连续 6d。治疗组:在接种后第2天开始每天注射剂量为 200mg/kg 的螺旋藻多糖,亦连续 6d。防治组:在接种癌细胞前 5 天,每天腹腔注射 200mg/kg 的螺旋藻多糖,接种后再按治疗组的方法处理。停药后隔两天取出腹水,并用生理盐水 2mL 洗 3 次腹腔,腹水与洗涤液合并定量后在显微镜下进行细胞计数。比较对照组与各实验组每只小鼠带癌细胞的平均数,得出抑制率(%)。

II.2. 对移植性腹水型肝癌小鼠存活率的观察

选健康小白鼠(雌雄各半)120 只,随机分成 4 组,每组 30 只(♀♂分笼饲养),正常对照组不做任何处理,在相同条件下饲养。另 90 只平均每鼠接种腹水型肝癌细胞 5×10^6 个,阳性对照组、治疗组和防治组的处理与上述癌细胞抑制试验相同。然后逐日观察实验小鼠在 30d 内的存活率。

II.3. 对体外癌细胞的抑制作用

用体外细胞培养 ^3H -TdR 参入法^[5,9]进行研究。无菌取在昆明种小鼠接种后第5天的腹水型肝癌 (AH) 或肉瘤 (S 180) 或在 615 小鼠接种后第5天的白血病 (L7712) 癌细胞,经生理盐水洗 1 次,用 199 培养液制成 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 悬液,每瓶分装 5mL,在 37℃ 温育 14h 后随机分组,每组 3 瓶,实验组各瓶按 250, 200, 150, 100 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量加入螺旋藻多糖,对照组则加入相应的无菌生理盐水。同时各瓶加入 50 μL 的 ^3H -TdR,使培养液的放射性比强度为 37KB q/mL,37℃ 继续温育 24h,离心、洗涤、消化,用 10mL 闪烁液分 3 次将消化物全部移入测量瓶。置 FJ-2100 型全自动液体闪烁计数器测放射性,比较各试验组与对照组的平均 cpm 值,得抑制率(%)。

II.4. 对癌细胞 DNA, RNA 和蛋白质合成抑制的动力学

方法与“II.3.”法相同,唯标记物分别同时使用 ^3H -TDR, ^3H -UR 和 ^3H -Leu,培养液的放射性比度均为 37KB q/mL,螺旋藻多糖的剂量均为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。37℃ 培育 3, 6, 12 和 24h 后,如上

法测其放射性, 分别比较各时相对照组与各实验组的平均 cpm 值。分别得到该多糖对 S180 和 AH 癌细胞 DNA, RNA 和蛋白质代谢抑制的动力学曲线。

II.5. 用 Painter^[11] 的 DNA 合成速率抑制法来判断 DNA 合成的抑制机理

用 RPMI 1640 培养液分别将 S180 和 AH 细胞配成 2×10^5 个/mL 的细胞悬液, 每瓶 5mL, 37°C 预培养 10h 后随机分组。实验组各瓶加入螺旋藻多糖溶液 0.1mL (终浓度 $150 \mu\text{g/mL}$), 对照组加入相应的无菌生理盐水, 继续 37°C 温育 10h 后, 用无菌生理盐水洗 3 次, 除去螺旋藻多糖, 再加入新鲜 1640 培养液 5mL, 分别温育 1, 3, 5 和 7h, 然后加入 0.10mL ^3H -TdR (终比度为 37KB q/mL), 均再在 37°C 培养标记 2h, 离心收集细胞, 洗涤、消化, 如上法测放射性, 分别比较各时相对照组与实验组的平均 CPM 值, 得相对于对照组的参入百分率(%)的动态曲线。

III. 结果

III.1. 螺旋藻多糖对体内腹水型肝癌细胞的抑制

表 1 说明, 该多糖对体内移植性癌细胞的增殖有显著的抑制作用。同时, 防治组比治疗组的抑制率更高。

表 1 螺旋藻多糖对体内腹水型肝癌细胞的抑制作用

Tab. 1 Inhibition of polysaccharide of *Spirulina platensis* 200 mg/kg on proliferation of ascitic hepatoma cells in vivo

组 别	鼠数	平均细胞数($\times 10^5$ /只)	抑制率(%)
对照	12	18.82 ± 1.14	
治疗	12	8.65 ± 0.43	54.0
防治	12	1.62 ± 0.11	91.4

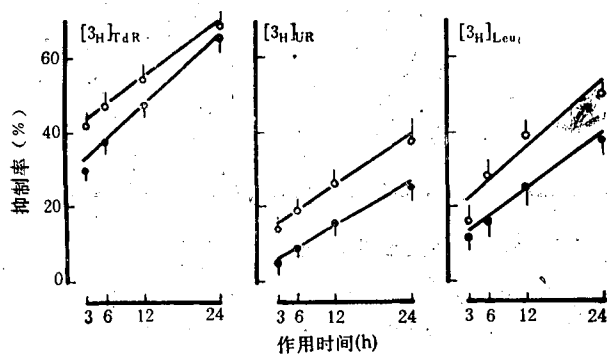


图 1 螺旋藻多糖对肉瘤 180(○)和腹水型肝癌(●)细胞 DNA, RNA 和蛋白质代谢的影响

Fig. 1 Inhibition of polysaccharide of *Spirulina platensis* 150 $\mu\text{g/mL}$ on ^3H TdR, ^3H UR and ^3H Leu incorporations into sarcoma 180 (○) and ascitic hepatoma (●) cells in vitro $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SD}$

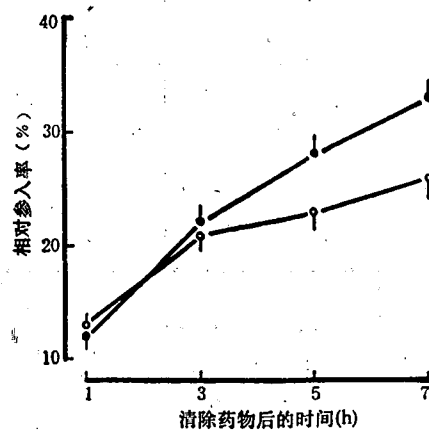


图 2 螺旋藻多糖对肉瘤 S180(○)和腹水型肝癌(●)细胞 DNA 合成的后作用

Fig. 2 Rate of DNA synthesis in sarcoma 180(○) and ascitic hepatoma (●) cells at various time after treatment with polysaccharide of *Spirulina platensis* 150 $\mu\text{g/mL}$ $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SD}$

III.2. 螺旋藻多糖对移植性腹水型肝癌小鼠存活率的影响

表 2 表明,该多糖虽能提高带瘤小鼠的存活率及其存活天数,但不明显。

表 2 螺旋藻多糖对移植性腹水癌小鼠存活率的影响

Tab. 2 Effect of polysaccharide of *Spirulina platensis* 200 mg/kg on survival percentage of transplanted ascitic hepatoma in mice

组别	鼠 数	死鼠平均存活天数	存活鼠数	存活率(%)
正常对照	30	0	30	100
对照	30	20	6	20
治疗	30	21.5	7	23
防治	30	23	9	30

表 3 螺旋藻多糖对腹水型肝癌、肉瘤 180 和白血病 7712 癌细胞 DNA 合成的抑制作用

Tab. 3 Inhibition of polysaccharide of *Spirulina platensis* (PSP) on incorporation of [^3H] thymidine into DNA of ascitic hepatoma, sarcoma 180 and leukemia 7712 cells in mice $\bar{x} \pm \text{SD}$

癌细胞	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	^3H -TdR 在 DNA 的脉冲数	抑制率(%)
腹水型肝癌	对照	71.1 ± 3.4	
	250	12.4 ± 0.6	82.5
	200	17.0 ± 0.6	76.0
	150	24.0 ± 1.1	66.2
	100	32.2 ± 1.4	54.7
	50	47.3 ± 2.6	33.5
肉瘤 180	对照	31.3 ± 1.7	
	250	2.7 ± 0.2	91.2
	200	4.3 ± 0.2	86.2
	150	7.6 ± 0.4	75.6
	100	12.7 ± 0.6	59.3
	50	21.4 ± 1.1	31.6
白血病 7712	对照	524.6 ± 26.3	
	250	401.3 ± 21.0	23.5
	200	432.7 ± 21.7	17.5
	150	462.6 ± 23.3	11.8
	100	477.6 ± 24.4	8.9
	50	498.8 ± 24.8	4.9

III.3. 螺旋藻多糖对 S 180, AH 和 L7712 癌细胞 DNA 合成的抑制

从表 3 可见,该多糖在大剂量时对 S180 和腹水型肝癌细胞 DNA 合成的抑制率较高,经计算其 ID₅₀ 依次为 88 和 99 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而对 L7712 细胞 DNA 合成的抑制则较低。

III.4. 螺旋藻多糖对 S180 和 AH 癌细胞 DNA, RNA 和蛋白质合成抑制的动力学

图 1 的抑制动态曲线表明,该多糖对 S180 和 AH 癌细胞 3 种生命大分子的抑制均随作用时间延长而增高,其中对 DNA 的抑制始终比 RNA 和蛋白质高。

III.5. 螺旋藻多糖对 S180 和 AH 癌细胞 DNA 合成速率的影响

由图 2 可见,当螺旋藻多糖从培养液中除去之后,两种癌细胞 DNA 合成的速率都是逐步恢复的。

IV. 讨论

螺旋藻多糖 200mg/kg 可以显著抑制小鼠体内移植性腹水型肝癌细胞的增殖, 而且防治组比治疗组的抑制率更高(表 1)。但对移植性腹水型肝癌小鼠存活率的提高不显著(表 2)。这是什么原因? 通过体外培养 ^3H -TdR 参入法试验, 表 3 的结果表示, 螺旋藻多糖 50~250 $\mu\text{g/mL}$ 对 S180, AH 和 L7712 癌细胞 DNA 合成的抑制作用均随剂量增多而提高; 对 S180 的半抑制量 (ID_{50}) 为 88 $\mu\text{g/mL}$, 对 AH 的 ID_{50} 为 99 $\mu\text{g/mL}$, 而对 L7712 的抑制作用甚差。说明不同癌细胞对该多糖的敏感性不一样。一般认为, ID_{50} 在 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 的药物是对癌细胞有细胞毒作用的^[12], 从而可知, 螺旋藻多糖对上述 3 种癌细胞的细胞毒作用是很低的。螺旋藻多糖 150 $\mu\text{g/mL}$ 对 S180 和 AH 癌细胞 DNA, RNA 和蛋白质合成抑制动态曲线(图 1)表明: 它对 3 种生命大分子的抑制率均随作用时间延长而升高, 对 DNA 的抑制始终比 RNA 和蛋白质高。这说明该多糖对癌细胞增殖的抑制主要是通过抑制 DNA 合成起作用的。那么它抑制 DNA 合成的作用机理如何? 根据 Painter^[11] 的判断标准: 当药物从培养液中清除后, DNA 合成速率迅速恢复者, 此化合物只代谢性地抑制了 DNA 的合成; 而使 DNA 合成速率继续下降者, 则此化合物损伤了 DNA 的复制模板, 因此, 从图 2 看, 螺旋藻多糖的抑制机理主要属于代谢性的抑制。

上述事实说明, 螺旋藻多糖不能损伤癌细胞 DNA 的复制模板, 不能直接杀伤癌细胞。因此停药之后, 带癌小鼠逐渐死亡是可以理解的。那么, 防治组对体内的癌细胞增殖的抑制率高达 91%, 又是如何实现的呢? 经免疫学研究表明: 螺旋藻多糖能够显著提高机体非特异性的细胞免疫功能 and 特异性的体液免疫功能。所以它是通过增强机体免疫力的介导作用^[6,7,8], 而间接地抑制癌细胞的。螺旋藻多糖对机体免疫功能的提高作用及其机理研究将另文报道。

参考文献

- [1] 庞启深、郭宝江、阮继红, 1989. 螺旋藻抗辐射多糖的提纯和分析. 生物化学与生物物理学报 2(5): 445~449.
- [2] 阮继红、庞启深、郭宝江, 1988. 螺旋藻抗辐射的研究. 遗传 10(2): 27~30.
- [3] 庞启深、郭宝江、阮继红, 1988. 螺旋藻多糖对核酸内切酶活性和 DNA 修复合成的增强作用. 遗传学报 15(5): 374~381.
- [4] 刘力生、郑荣梁等, 1986. 合成的异三尖杉酯碱对小鼠移植瘤细胞 DNA, RNA, ATP, 蛋白质和核蛋白代谢的影响. 中国药理学报 7(3): 279~282.
- [5] 刘力生、郑荣梁等, 1985. 多被银莲花素 A 对癌细胞 DNA, RNA、蛋白质和血浆 CAMP 含量的影响. 中国药理学报 6(3): 192~194.
- [6] 夏尔宁, 1985. 多糖的生物活性及其作用机理. 南京药学院学报 16(4): 1~7.
- [7] 郑双武、李文简, 1988. 巨噬细胞对肿瘤细胞结合与杀伤功能的研究. 中国免疫学杂志 4(3): 141~143.
- [8] 马晓英、蔡访勤, 1989. 小鼠腹腔巨噬细胞体外产生的细胞毒性因子. 中国免疫学杂志 5(3): 148~150.
- [10] Pang Qishen, Guo Baojiang and Ada kolman, 1989. Radioprotective effect of extract from *Spirulina platensis* in mouse bone marrow cells studied by using the micronucleus test. *Toxicology Letters* 48:165-169.
- [9] Lea Ma, Morris HP, Weber G., 1966. Comparative Biochemistry of Hepatomas VI. Thymidine incorporation into DNA as a measure of Hepatoma Growth Rate. *Cancer Research* 26: 465.
- [11] Painter RB., 1977. Rapid test to detect agents that damage human DNA. *Nature* 265 (17): 650-651.
- [12] Smith CG, Lummis WL, Grady JE., 1959. An Improved tissue culture assay I. methodology and cytotoxicity of anti-tumor agents. *Cancer Research* 19: 843.

INHIBITIVE EFFECT AND MECHANISM OF POLYSACCHARIDE OF *SPIRULINA PLATENSIS* ON TRANSPLANTED TUMOR CELLS IN MICE*

¹⁾ Liu Lisheng, ¹⁾ Guo Baojiang, ¹⁾ Ruan Jihong, ¹⁾ Qin Guangquan ²⁾ and Wu Botang²⁾

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao, 266071)

(¹⁾ Biotech, Dept., Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou, 510225)

(²⁾ South China Sea Institute of Oceanology, Academia Sinica, Guangzhou, 510301)

Received: May, 20, 1990

Key Words: Polysaccharide of *Spirulina platensis*, Ascitic hepatoma sarcoma 180, ³H-thymidine, ³H-uridine, ³H-leucine

Abstract

Polysaccharide of *Spirulina platensis* can inhibit the proliferation of ascitic hepatoma cells of mice in the concentration of 200 mg/kg. It can inhibit the incorporation of ³H-thymidine, ³H-uridine and ³H-leucine into DNA, RNA and protein synthesis of sarcoma 180 and ascitic hepatoma cells during the period of 24 h after exposure in vitro. The degree of inhibition increases with the extending of incubation time. Polysaccharide of *Spirulina platensis* can inhibit DNA synthesis of sarcoma 180 and ascitic hepatoma cells. The mechanism of inhibition belongs to DNA metabolism disturbance.

* Contribution No. 41 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica the Experimental Marine Biological Lab.