

# 癌得清注射液的抗癌作用

宋淑霞 吕占军 王秀芳 张小军 侯洁

**摘要** 本文用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、乙型溶血性链球菌(*Streptococcus hemolyticus*)、卡介苗(BCG)、伤寒杆菌(*Salmonella typhi*)等多种细菌抗原免疫SD大鼠,并从其脾脏、胸腺等淋巴组织通过透析的方法获得透析外液,再加上枸杞等中药透析的小分子(MW≤10KD)物质,制备成混合制剂(癌得清)。然后以DBA/2小鼠荷L5178Y、P815肿瘤为模型,分别在肿瘤细胞接种后及接种前后腹腔注射上述制剂,观察其抑瘤作用和荷瘤小鼠脾细胞NK、LAK活性及产生IL-2活性的影响。结果表明,该制剂可明显抑制L5178Y、P815肿瘤生长并能显著增强荷瘤小鼠脾脏NK、LAK活性,增强脾细胞产生IL-2的能力。

**关键词** 生物应答调节剂;癌得清注射液;肿瘤治疗

生物应答调节剂(BRM)是有效治疗肿瘤的办法,它通过修饰肿瘤和宿主之间的相互关系,改变宿主对瘤细胞的生物学效应,达到控制肿瘤发生和生长的目的。目前生物应答调节剂倍受重视。为减轻其副作用,许多学者都在寻找高效无毒的生物应答调节剂。本室通过大量筛选,发现用透析的方法,在多种细菌免疫的动物淋巴组织中得到小分子提取物,在抗肿瘤、提高荷瘤小鼠免疫功能等方面有一定作用。

## 1 材料与方法

**1.1 癌得清注射液的制备** 用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、乙型溶血性链球菌(*Streptococcus hemolyticus*)、卡介苗(BCG)、伤寒杆菌(*Salmonella typhi*)等多种细菌免疫SD大鼠,无菌取脾、胸腺等淋巴组织,研碎,冻融三次,用截流分子量1万道尔顿的透析袋,对着无菌蒸馏水(15g组织加30ml水)4℃透析一周,使透析袋内外液渗透压达到平衡,取透析外液(分子量小于1万道尔顿),经751分光光度计分析,在波长260nm处有一高吸收峰,此峰为核苷酸吸收峰,核苷酸含量为6mg/ml,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>=1.92。用同种方法透析的枸杞等中药透析外液在200nm(751分光光度计最小波长为200nm)处有一高吸收峰,为肽键吸收峰,经Folin-酚测定,中药透析外液中多肽含量为8mg/ml。把两种透析外液等量混合,红细胞脆性试验测定其渗透压相当于0.48%~0.50%

的NaCl溶液,补充NaCl使其相当于0.85%的NaCl溶液渗透压,精密试纸测定其pH为6.4。滤过除菌,封安瓿,待用。

**1.2 实验动物** DBA/2、C57bl/6雌性小鼠,8~10周龄,体重23±1.8g购自中国医学科学院药物鉴定所。

**1.3 肿瘤细胞株** L5178Y,购自中国医学科学院肿瘤研究所免疫室,P815本室传代保存。

**1.4 751-GW分光光度计**(波长范围200~1000nm)上海分析仪器厂。

**1.5 癌得清对荷瘤小鼠肿瘤生长抑制试验**

**1.5.1 癌得清对荷瘤小鼠肿瘤的治疗作用** 取DBA/2小鼠18只,分2组,对照组和实验组。取体外培养的对数生长期的L5178Y,用GKN平衡盐溶液洗一遍,计数,调整细胞浓度为 $1.5 \times 10^7$ /ml,每只DBA/2小鼠腋窝皮下接种0.2ml,于接种肿瘤细胞的当日,腹腔注射0.3ml癌得清,连续注射15天。对照组注射等量生理盐水。从接种肿瘤细胞第5天,开始测量肿瘤瘤块直径,连续测量10天。

**1.5.2 癌得清对肿瘤的防治作用** 为了观察癌得清防治肿瘤的作用,先腹腔注射一周癌得清,再皮下接种L5178Y肿瘤,并继续注射15天,这样共注射22天。然后测量肿瘤瘤块直径,连续测量10天。

**1.5.3 用P815重复1.5.1试验。**

**1.6 癌得清对荷L5178Y肿瘤的DBA/2小鼠免疫功能的影响**

**1.6.1 实验动物分组及给药** 取DBA/2小鼠18只,分为三组,其中一个为正常对照组,不接种肿瘤,其它

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学实验动物学部(宋淑霞、吕占军、王秀芳、侯洁);石家庄武警医院胸外科(张小军)

两组均皮下接种浓度为  $2.5 \times 10^7/\text{ml}$  的 L5178Y 0.2ml。实验组于接种肿瘤当日,腹腔注射癌得清 0.3ml/只,正常对照组和荷瘤对照组腹腔注射等量生理盐水。连续注射 15 天。于停药次日断椎处死小鼠,无菌取脾,检测 NK、LAK 活性、产生 IL-2 的能力及淋巴细胞转化率。

1.6.2 淋巴细胞转化试验 无菌制备小鼠脾细胞悬液, GKN 平衡盐溶液洗二遍, 用含 10%NCS 的 DMEM 培养基调整细胞浓度为  $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。取 96 孔细胞培养板, 每孔 0.1ml, 每个样品设三个复孔, 每孔中加入  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  的 ConA  $10\mu\text{l}$ , 同时做三个不加 ConA 的对照孔, 每孔补加 0.1ml 培养基, 放  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱培养 68h。用 MTT 法测定淋巴细胞转化率<sup>[1]</sup>。用刺激指数(SI)表示。

1.6.3 NK、LAK 活性测定 用培养基调整细胞浓度为  $1 \times 10^7/\text{ml}$  的脾细胞作为 NK 细胞活性测定的效应细胞; 将终浓度为 1000u 的 IL-2 加到  $1 \times 10^7/\text{ml}$  的脾细胞中, 5% $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$  培养 4 天, 诱导成 LAK 细胞, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^7/\text{ml}$ , 作为 LAK 活性测定的效应细胞。取体外培养的对数生长期的 YAC-1 作为测定 NK 活性的靶细胞, P815 作为测定 LAK 活性的靶细胞。取 96 孔 U 型细胞培养板, 调整效靶细胞比例为 40:1, 放  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养 24h, 用本室稍加改良的 MTT 法测定杀伤活性<sup>[2]</sup>。

1.6.4 IL-2 诱导及活性测定: 取荷瘤小鼠的脾细胞悬液 ( $2 \times 10^7/\text{ml}$ ) 1ml, 加入 24 孔板中, 再加入浓度为  $20\mu\text{g}/\text{ml}$  的 ConA/ml。  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养 48h, 离心取上清,  $-20^\circ\text{C}$  冻存待测。IL-2 活性测定方法采用 ConA 诱导 T 细胞微量测定法<sup>[3]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 癌得清注射液对荷瘤小鼠肿瘤生长抑制作用

给小鼠腋窝皮下移植 L5178Y、P815 肿瘤细胞后, 一般 5 天可触摸到肿块。本实验结果表明, 癌得清注射液对 L5178、P815 肿瘤均有一定的抑制作用, 经  $t$  检验分析发现, 从荷瘤第 8 天(测量第 4 天)癌得清注射组与荷瘤对照组比两组肿瘤块直径有显著差异 ( $P < 0.01$ ), 结果见图 1、图 2。如果在移植肿瘤细胞之前, 先注射 7 天癌得清, 则癌得清的抑瘤作用更明显, 从荷瘤第 6 天(测量第 2 天)实验组小鼠肿瘤块明显小于对照组 ( $P < 0.01$ ), 见图 3 和图 4。

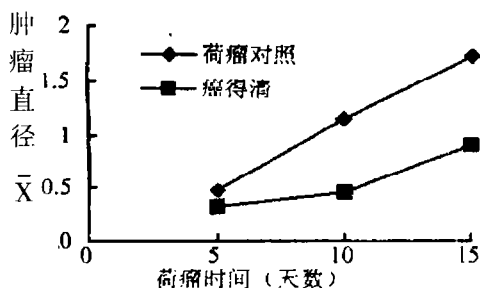


图 1 癌得清对 L5178Y 体内抑制作用

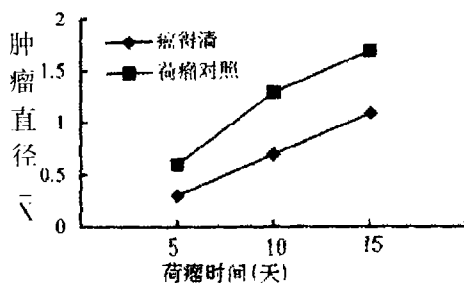


图 2 癌得清对注射液对 P815 体内抑制作用

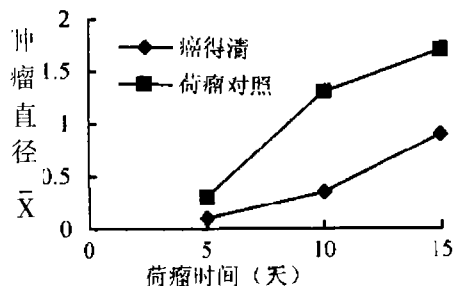


图 3 癌得清对 L5178Y 防治作用

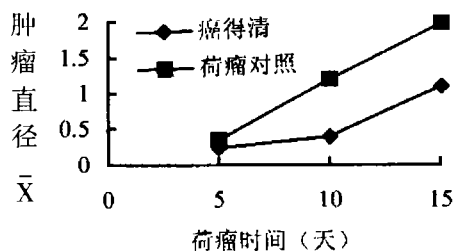


图 4 癌得清对 P815 防治作用

2.2 癌得清注射液对荷瘤小鼠脾淋巴细胞转化率的影响:试验结果表明,注射癌得清后脾淋巴细胞对 ConA 的敏感性增强,其转化率明显高于对照组( $P<0.01$ , $t$  检验)。见表 1。

表 1 癌得清注射液对荷瘤小鼠淋巴细胞转化率的影响

	例数	淋巴细胞转化率(SI)	P(与荷瘤组比)
正常对照	6	2.51	$>0.05$
荷瘤对照	6	1.69	—
癌得清	6	3.09	$<0.01$

2.3 癌得清注射液对荷瘤小鼠 NK、LAK 活性及对脾细胞产生 IL-2 活性的影响:用 YAC-1、P815 为靶细胞分别测定了荷瘤小鼠 NK、LAK 细胞活性,结果表明,癌得清注射能显著提高荷瘤小鼠 NK、LAK 活性;同时还能提高脾细胞产生 IL-2 的能力,结果经  $t$  检验均有显著差异( $P<0.01$ ),见表 2。

表 2 癌得清注射液对荷瘤小鼠 NK、LAK 及 IL-2 的影响

	例数	NK 活性 (%)	LAK 活性 (%)	IL-2 (OD, $\pm s$ )	P 与荷瘤组比
正常对照	6	$9.6 \pm 2.03$	$13.76 \pm 3.86$	$0.367 \pm 0.03$	$>0.05$
荷瘤对照	6	$8.0 \pm 1.36$	$11.6 \pm 2.16$	$0.305 \pm 0.04$	$>0.01$
癌得清	6	$14.2 \pm 2.42$	$11.0 \pm 1.67$	$0.858 \pm 0.06$	$<0.05$

3 讨论

3.1 癌得清注射液是我室经大量实验,筛选出来的生物应答调节剂。本实验初步表明具有免疫增强作用并可显著抑制肿瘤生长,若在给小鼠移植肿瘤细胞之前,先腹腔注射癌得清 1 周,肿瘤细胞移植之后再注射 2 周,注射癌得清组与对照组比瘤块直径差异更大。表明癌得清注射液具有防治肿瘤生长的作用。

3.2 癌得清注射液能增强荷瘤鼠脾细胞产生 IL-2 活性,也能增强 NK、LAK 活性,这也许是其抑瘤的主要

机制之一。

3.3 癌得清成份之一是从免疫过的 SD 大鼠脾及胸腺提取出来的一种混合物(分子量 $\leq 10$ KD),通过初步鉴定,很可能含有转移因子,可直接作用于 T 细胞,使之活化,合成并释放多种可溶性的淋巴因子,进而促进 TC、NK、LAK 细胞杀伤功能<sup>[4]</sup>。癌得清另一种成份是中药提取物,我们以前的工作表明,枸杞等中药含有两类有效成份,一是对热稳定和蛋白结合的多糖类,一是对热不稳定的小分子物质<sup>[5]</sup>。有实验<sup>[6]</sup>证明枸杞小分子提取物( $0.01\mu\text{g/ml}$ )能促进淋巴细胞增殖,说明其具有促进有丝分裂原的作用,可直接激活 T 细胞,刺激淋巴细胞增殖、分化,产生较多的 IL-2。关于中药治疗肿瘤的报道很多,但多采用传统的加热等剧烈提取方法,使一些对热不稳定的小分子成份失活,本实验提取方法温和,得到小分子的多肽和核苷酸,不会引起过敏反应,适于临床开发。

本实验结果表明:癌得清注射液确实有增强机体免疫力及抑制肿瘤生长的作用,且没有发现任何副作用,值得进一步研究与开发。

参 考 文 献

1 吴明生. MTT 比色分析法在豚鼠淋巴细胞转化试验中的应用. 中国实验临床免疫学杂志, 1992, 4(4):10  
2 张志强,等. MTT 法检测 NK 和 LAK 活性的方法学探讨. 中国实验临床免疫学杂志, 1994, 6(3):12  
3 杨贵贞主编. 免疫生物工程纲要与技术. 吉林:吉林科学技术出版社. 1991:48  
4 余贺等主编. 肿瘤与免疫. 上海:上海科学技术出版社. 1982:150  
5 王秀芳,等. 枸杞小分子物质对小鼠肿瘤杀伤细胞活性的影响. 河北医学, 1996, 2(6):7  
6 钱玉昆,等. 中药(苦参及枸杞子)对免疫细胞和细胞因子的实验调节. 中华微生物学和免疫学杂志, 1989, 8:312

Antitumoral Effect of Ederqini Ingection

Song Shuxia, et al

Department of Laboratory animal, Hebei medical university, Shi Jiazhuang 050017

Many kinds of antigen (Staph aureus, S hemolyticus, BCG, et al) immunized SD rats. Dialysate was obtained from spleen and thymus of SD rats by dialysing, and adding low molecular weight( $MW\leq 10$ KD) dialysate from Lycium chineses etc Chinese Medicine. This preparation is named Ederpinil. Then, L5178Y P815 tumors bearing DBA mice were used as modeals Respectively, after of inoculation of tumors, before and after of inoculation of tumors, Ederqini were administrated i. p. Then the action of anti-tumor and protect—treat tumor, the NK, LAK, IL—2 activity iv the l5178Ytumor baering mice were assaied. The results suggested Ederqini ingection can inhibted the growth of L5178Y, P815 and can enhance the IL—2 activity and NK, LAK activity distinctly.

Key words: Biological response modifier; Ederqini ingection; Tumor treatment