

仙茅多糖对氟尿嘧啶增效减毒作用

姚佳^{1,2}, 肖雄¹, 唐健波¹, 胡江义³, 杨娟¹, 彭梅^{1*}

¹贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550002;

²黔南民族师范学院, 都匀 555800; ³贵阳医学院, 贵阳 550004

摘要: 本文探讨了仙茅多糖(COP)对氟尿嘧啶的增效减毒作用。实验中建立小鼠 S₁₈₀ 实体瘤模型, 连续给药 10 d, 测定小鼠瘤重, 体质量、白细胞、红细胞、胸腺指数、脾脏指数以及小鼠脾脏中的超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量。同时建立小鼠 S₁₈₀ 腹水瘤模型, 连续给药 30 d, 记录小鼠存活天数, 计算生命延长率。结果显示, 仙茅多糖能改善氟尿嘧啶引起的小鼠白细胞减少、胸腺萎缩、脾脏肿大($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 但联用高剂量组使小鼠脾脏中 SOD 活力($P < 0.01$)降低, 联用低、中剂量组使 MDA 含量增加($P < 0.05$)。COP 和 5-FU 均延长荷瘤小鼠的生存期, (5-FU + COP) 联合用药组生命延长率比 5-FU 单独用药组明显增高, 且与联用的 COP 剂量呈量效关系。从而表明仙茅多糖对氟尿嘧啶具有一定的增效减毒作用, 机制可能与其能调节机体免疫力有关, 而与过氧化反应无关。

关键词: 仙茅; 多糖; 氟尿嘧啶; 增效; 减毒

中图分类号: R151.1

文献标识码: A

Efficacy Enhancing and Toxicity Reducing Effect of *Curculigo orchioides* Polysaccharide on S₁₈₀ Tumor-bearing Mice Treated by Fluorouracil

YAO Jia^{1,2}, XIAO Xiong¹, TANG Jian-bo¹, HU Jiang-yi³, YANG Juan¹, PENG Mei^{1*}

¹The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China;

²Qiannan Normal College for Nationalities, Duyun 555800, China; ³Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

Abstract: This article observed the efficacy enhancing and toxicity reducing effect of *Curculigo orchioides* polysaccharide (COP) on S₁₈₀ tumor-bearing mice treated by fluorouracil (5-FU). A model of S₁₈₀ solid tumor was established. After successive administration of 10 d, the tumor weight, body mass, blood cells, thymus index and spleen index were measured. The activity of superoxide dismutase (SOD), content of malondialdehyde (MDA) in spleen were analyzed. At the same time, the model of S₁₈₀ ascites tumor was established. After successive administration of 30 d, the survival time and span prolonged were detected. The results showed that COP can improve decreasing of white cell count, thymic atrophy and spleen enlargement ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). However, high-dose COP combined with 5-FU decreased the activity of SOD ($P < 0.01$) and middle, low-dose COP increased the content of MDA ($P < 0.05$). The survival time of all COP combined with 5-FU groups was significantly longer than that of 5-FU group. The effect was COP dose dependent. In conclusion, COP can enhance anti-tumor effects and reduce toxicity of 5-FU. The mechanism may be related to the adjustment of body immunity and no correlation with the peroxidation process.

Key words: *Curculigo orchioides* Gaertn; polysaccharide; fluorouracil; efficacy enhancement; toxicity reduction

氟尿嘧啶(5-FU)为第一代氟化嘧啶抗代谢类药物, 抗癌谱广, 为 S 期特异性药物, 主要用于绒毛膜上皮癌、恶性葡萄胎、乳腺癌和胃肠道肿瘤等, 是肿瘤化学治疗的首选和基本用药^[1,2]。但该药在杀死癌细胞的同时严重损害正常细胞, 主要不良反应

是胃肠道反应和造血系统毒性^[3]。患者在接受放疗手术后, 如能给予药物辅助治疗将对改善患者生活质量和提高生存率具有重要意义。多糖类化合物因独特的作用机制显示了对机体无毒情况下肿瘤化疗的增效作用而备受关注。仙茅多糖(COP)为仙茅科仙茅属植物仙茅 *Curculigo orchioides* Gaertn 的水提醇沉部分, 具有调节免疫^[4]、抗氧化作用^[5]。本文通过 S₁₈₀ 小鼠模型, 探讨仙茅多糖对氟尿嘧啶

收稿日期: 2013-09-25 接受日期: 2014-03-05

基金项目: 贵州省社会发展科技攻关计划项目(2011-3022); 973 计划前期研究专项项目(2012CB722601)

* 通讯作者 Tel: 86-851-3804370; E-mail: pengmei520@163.com

(5-FU)治疗小鼠 S_{180} 肿瘤的增效减毒作用。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

仙茅 (*Curculigo orchoides* Gaertn) 于 2012 年 9 月购自贵阳市万东桥药材市场,经贵阳中医学院孙庆文副研究员鉴定。昆明种 (KM) 小鼠,体重 (20 ± 2) g,雌雄各半,重庆医科大学实验动物中心提供 [许可证号:SCXK(渝)2007-001]。

氟尿嘧啶 (5-FU) (天津金耀氨基酸有限责任公司);超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成生物科技有限公司); S_{180} 瘤株,由贵州大学杨再昌教授惠赠。

1.2 主要仪器

FA114 精密电子天平 (上海海康电子仪器厂); MD Spectra Max-190 连续波长酶标仪 (美国 MD 公司);PH100 生物显微镜 (凤凰光学集团有限公司);Eppendorf 5418R 离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2 试验方法

2.1 仙茅多糖的制备

干燥仙茅根茎粉碎,经 80% 乙醇回流提取后的残渣挥去乙醇后,加入 10 倍蒸馏水沸水浴提取 3 次 (每次 2 h),合并提取液后浓缩。浓缩液加入 95% 乙醇至含醇量达 80%,冰箱静置过夜。过滤,残渣先后用 95% 乙醇,无水乙醇,丙酮依次洗涤后,60 °C 真空干燥得仙茅多糖 COP。

2.2 仙茅多糖含量测定^[6]

标准曲线的制作:准确称取葡萄糖标准品 20 mg,溶于 500 mL 容量瓶中,分别移取该溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 及 1.8 mL,各以蒸馏水补至 2 mL,加入 1 mL 6% 的苯酚和 5 mL 浓硫酸混匀,静置 10 min 后,在 490 nm 波长处测定吸光值,以 2.0 mL 蒸馏水同上操作作为空白。测定结果以横坐标为多糖微克数,纵坐标为多糖的吸光值作图,即得多糖标准曲线和回归方程。

样品含量测定:称取仙茅多糖 10 mg 溶于 50 mL 容量瓶中配制得 0.2 mg/mL 的样品,分别取 0.8、1.0、1.2 mL 按上述步骤操作,测得吸光值,以标准回归方程求得多糖中糖的含量,对每个不同浓度样品液所测得的多糖含量求平均数,即为仙茅多糖中糖的含量。

2.3 COP 对 5-FU 治疗小鼠荷 S_{180} 肿瘤的增效作用

2.3.1 S_{180} 实体瘤肿瘤模型的建立

将保存在液氮中的 S_{180} 瘤株复苏,小鼠常规消

毒,接种于小鼠腹腔,每鼠 0.2 mL,接种小鼠自由饮水和进食。7 d 后,无菌抽取肿瘤液,按前述方法再传一代,待传至两代的肿瘤液活性稳定后,用台盼蓝染色法计数,活细胞数大于 95%,方可用于实验。无菌抽取生长良好的 S_{180} 腹水瘤,调节细胞浓度为 (1×10^7) 个/L,每只小鼠右腋接种 0.2 mL。

2.3.2 分组及抑瘤率

KM 小鼠 72 只,雌雄各半。自由进食和饮水,适应性饲养 3 d。小鼠接种 24 h 后,随机分为模型组 (ig 生理盐水)、5-FU 组 (30 mg/kg)、COP 组 (100 mg/kg)、5-FU + COP 低、中、高剂量组 (50、100、200 mg/kg)。5-FU ip 给药 0.1 mL/10 g,隔日 1 次;多糖组均 ig 给药,每日一次,连续给药 10 d。末次给药 24 h 后,称重,计算小鼠体质量增加值;然后将小鼠处死,完整剥离肿瘤,计算抑瘤率。

$$\sum \text{抑瘤率} = (\bar{T}_{\text{对照组}} - \bar{T}_{\text{实验组}}) / \bar{T}_{\text{对照组}} \times 100\%, T \text{ 为瘤重}$$

2.3.3 对荷 S_{180} 腹水瘤小鼠存活情况的影响

KM 小鼠 72 只,雌雄各半。自由进食和饮水,适应性饲养 3 d。小鼠腹部接种 S_{180} 24 h 后,随机分为模型组:ig 生理盐水,5-FU 组:ip 5-FU 30 mg/kg,0.1 mL/10g,隔日 1 次;COP 组:每日 ig COP 200 mg/kg;5-FU + COP 低、中、高剂量组 (100、200、400 mg/kg)。多糖组均 ig 给药,每日一次,连续给药 30 d 后,计算小鼠生命延长率。

$$S = \frac{L_{\text{给药}} - L_{\text{CT}}}{L_{\text{CT}}} \times 100\%$$

式中,S 表示生命延长率, L_{CT} 表示模型组平均生存天数, $L_{\text{给药}}$ 表示给药组平均生存天数。

2.4 COP 对 5-FU 治疗小鼠荷 S_{180} 肿瘤的减毒作用

2.4.1 外周血象检测

白细胞计数:末次给药后,小鼠禁食 12 h,眼眶取血,进行外周血白细胞计数。取 EP 管一支,加入白细胞稀释液 (冰醋酸 2 mL、蒸馏水 98 mL、10 g/mL 亚甲蓝溶液 5 滴) 0.38 mL。用移液枪移取 20 μ L 血液,将枪头插入稀释液的底部轻轻将血放出,并吸取上清液清洗两次,手动摇动试管混匀。充池,静置 2 min,待白细胞下沉,用低倍镜计数 4 个大格内的白细胞数。

$$\text{白细胞数/L} = 4 \text{ 个大格内的白细胞总数} / 4 \times 10 \times 20 \times 10^6$$

红细胞计数:取 10 μ L 血液,加入盛有红细胞稀释液 2 mL 的 EP 管中,计数方法同白细胞,计数 5 个中格红细胞数。

$$\text{红细胞数/L} = 5 \text{ 个中格的红细胞总数} \times 200 / 0.02$$

2.4.2 胸腺指数和脾脏指数检测

末次给药 24 h 后,小鼠称重,然后处死小鼠,分

别取出小鼠的胸腺、脾脏,称重,并按下列公式计算胸腺及脾脏指数。

胸腺指数 = 胸腺重量(mg)/小鼠体重(g)

脾脏指数 = 脾脏重量(mg)/小鼠体重(g)

2.4.3 脾脏 SOD、MDA 的检测

脾脏用冷生理盐水(NS)漂洗干净,按 1:9(脾脏重量:NS)的比例加入冷 NS,在冰浴条件下匀浆,3500 rpm 离心,制成 10% 的组织匀浆。SOD 活性的测定使用邻苯三酚自氧化法测定,MDA 的含量使用硫代巴比妥酸(TBA)比色反应测定,具体检测方法参见试剂盒说明书。

2.5 数据统计分析

应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析 t 检验,显著水平设在 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果与分析

3.1 仙茅多糖的制备

2.66 kg 干燥仙茅根粉末经沸水浴提取,乙醇沉淀后,得到 0.38 kg 多糖,提取率为 14.1%。硫酸-

表 1 COP 联合 5-FU 对荷 S₁₈₀ 实体瘤小鼠体质量及肿瘤的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of COP and 5-FU on body weight and tumor of S₁₈₀ tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Groups	剂量 Dose (mg/kg)	始/末体重 Start/end weight (g)	瘤重 Tumor weight (g)	抑瘤率 Inhibition rate (%)
模型组 CT group	0	22.43/ +5.79	1.83 ± 0.45	
5-FU 组 5-FU group	30	22.23/ +2.50 **	0.86 ± 0.14 **	50.08
COP 组 COP group	100	22.24/ +5.19 ^{##}	1.15 ± 0.55 * ^{##}	31.60
5-FU + COP 组	30 + 50	22.47/ +4.48 ^{##}	0.85 ± 0.09 **	45.55
5-FU + COP group	30 + 100	22.50/ +5.23 ^{##}	0.79 ± 0.10 **	57.40
	30 + 200	22.20/ +5.92 ^{##}	0.61 ± 0.12 * ^{##}	62.60

注:与模型组比较,** $P < 0.01$;与 5-FU 组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

Note:Compared with model group, ** $P < 0.01$;Compare with 5-FU group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

表 2 仙茅多糖对荷 S₁₈₀ 腹水瘤小鼠生存天数和生命延长率的影响($n = 12, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of COP on survival days and increase in life span of S₁₈₀ ascites tumor mice($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	剂量 Dose (mg/kg)	平均生存天数 Average survival days(d)	生命延长率 Increase in life span(%)
模型组 CT group	0	14.9 ± 2.23	
5-FU 组 5-FU group	15	18.5 ± 4.21 **	24.16
COP 组 COP group	200	18.7 ± 3.34 ^{##}	25.50
5-FU + COP 组	15 + 100	21.2 ± 4.01 * ^{##}	42.28
5-FU + COP group	15 + 200	23.3 ± 5.65 * ^{##}	56.37
	15 + 400	24.4 ± 4.97 * ^{##}	63.76

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 5-FU 组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

Note:Compared with model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;Compared with 5-FU group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

苯酚法计算多糖含量,以葡萄糖含量为横坐标,吸光度值为纵坐标,得回归方程为 $Y = 8.2871X - 0.0339, R = 0.9984$ 。代入仙茅多糖吸光度,计算得仙茅多糖含量为 50%。

3.2 COP 对 5-FU 治疗小鼠荷 S₁₈₀ 肿瘤的增效作用

表 1 结果表明,模型组小鼠的平均瘤重达 1.83g,说明造模成功。与模型组比较,所有给药组小鼠的平均瘤重均降低,且有极显著差异($P < 0.01$)与 5-FU 组比较,5-FU + COP 低、中剂量组小鼠的平均瘤重明显降低,其抑瘤率无明显差异($P > 0.05$);但 5-FU + COP 高剂量组小鼠的平均瘤重明显降低,其抑瘤率明显提高,具有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,5-FU 组体质量增加值显著减少($P < 0.01$);与 5-FU 组比较,5-FU + COP 各剂量联用组体质量增加显著($P < 0.01$)。

从表 2 中可以看出,与 CT 组比,5-FU 能延长小鼠生存时间($P < 0.01$);COP 各剂量组联合 5-FU 也能明显延长荷 S₁₈₀ 小鼠的生存时间,与 5-FU 组比较有显著性差异($P < 0.05$)。

3.3 COP 对 5-FU 治疗荷 S₁₈₀ 肿瘤的减毒作用

3.3.1 COP 联合 5-FU 对荷 S₁₈₀ 小鼠外周血象及其脏器的影响

表 3 结果显示,接种肿瘤后,连续给药 10 d,小鼠外周血细胞呈下降趋势。与模型组比较,5-FU 组小鼠白细胞(WBC)、红细胞(RBC)数量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与 5-FU 组比较,与多糖联用的 5-FU + COP 三个剂量组小鼠的 WBC、RBC 显著增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,5-FU 组小鼠胸腺指数、脾脏指数显著降低($P < 0.01$)。与 5-FU 组比较,5-FU + COP 中、高剂量组小鼠胸腺指数增高;5-FU + COP 三个剂量组小鼠的脾脏指数也显著增高,且有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。说明仙茅多糖能够改善肿瘤小鼠因化

疗药物 5-FU 所致的外周血象降低,增强肿瘤小鼠的免疫功能。

表 3 COP 联用 5-FU 对外周血象及脏器指数的影响 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of COP on peripheral blood cell and organ index on S_{180} tumor in mice ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	剂量 Dose (mg/kg)	白细胞 WBC ($\times 10^9/L$)	红细胞 RBC ($\times 10^{12}/L$)	胸腺指数 Thymus index	脾脏指数 Spleen index
模型组 CT group	0	7.44 \pm 0.52	8.98 \pm 0.40	3.69 \pm 0.52	9.85 \pm 2.89
5-FU 组 5-FU group	30	3.32 \pm 1.48 **	6.42 \pm 0.44 **	2.01 \pm 0.64 *	5.70 \pm 1.22 **
COP 组 COP group	100	3.92 \pm 1.64 **	8.18 \pm 1.21 ##	3.93 \pm 0.79 *##	8.57 \pm 1.91 ##
	30 + 50	5.64 \pm 0.97 **#	8.04 \pm 1.35 #	2.95 \pm 0.42 *	7.38 \pm 1.83 **#
5-FU + COP 组 5-FU + COP group	30 + 100	5.40 \pm 1.26 **#	8.35 \pm 0.96 #	3.12 \pm 0.50 #	7.51 \pm 1.27 **#
	30 + 200	6.08 \pm 1.35 ***#	8.39 \pm 1.62 #	3.50 \pm 0.38 #	9.32 \pm 1.96 ##

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 5-FU 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with 5-FU group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

3.3.2 COP 联合 5-FU 对荷 S_{180} 小鼠脾脏 SOD、MDA 的影响

表 4 结果显示,与模型组比较,5-FU 组小鼠的 SOD 有所增加,但增加不显著;与 5-FU 组比较,联用多糖各组 SOD 活性均有所降低,但无统计学意义。与模型组比较,5-FU 脾脏中的 MDA 含量有所降低,但无统计学差异;5-FU + COP 中、高剂量组 MDA 明显升高,有统计学差异 ($P < 0.05$),5-FU + COP 高剂量组小鼠 MDA 与 5-FU 组比较无统计学差异。

表 4 COP 联用 5-FU 对小鼠脾脏 SOD 及 MDA 的影响 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of COP on SOD activities and MDA content in mice spleen after CTX induced toxicity ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	剂量 Dose (mg/kg)	超氧化物歧化酶 SOD (U/mgprot)	丙二醛 MDA (nmol/mgprot)
模型组 CT group	0	59.9 \pm 8.61	5.86 \pm 2.45
5-FU 组 5-FU group	30	66.9 \pm 5.72	5.32 \pm 1.18
COP 组 COP group	100	51.6 \pm 2.93	4.46 \pm 0.95
	30 + 50	56.22 \pm 5.37	8.92 \pm 1.89 **
5-FU + COP 组 5-FU + COP group	30 + 100	59.56 \pm 6.53	8.86 \pm 1.76 **
	30 + 200	44.40 \pm 1.64 * ##	5.63 \pm 0.69

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 5-FU 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with 5-FU group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

4 讨论

本实验结果显示,接受化疗药物 5-FU 的荷瘤小鼠发生了骨髓抑制作用,WBC 和 RBC 数量明显降低,并且对小鼠免疫器官也造成了损伤,脾脏指数、胸腺指数均减小;而合用 COP 后,使小鼠的 WBC 和 RBC 数量增加,脏器指数明显增加,说明 COP 通过

改善荷瘤小鼠的造血功能并且在一定程度上降低因化疗药引起的免疫器官的损伤,从而增强免疫力。

自由基理论认为,肿瘤病人在接受化疗后,体内的抗氧化能力会大大地降低,低到某个程度时,自由基就会损害细胞、器官。而超氧化物歧化酶(SOD)是一种能清除超氧阴离子自由基(O_2^-)的酶,可以保护细胞免受损伤,因而 SOD 活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力。丙二醛(MDA)是自由基作用于脂质发生过氧化反应的终产物,引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,产生细胞毒性,因而 MDA 含量的的高低则间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度^[7]。从实验结果可以看出 COP 与 5-FU 合用后,出现了一定的负影响,说明 COP 对 5-FU 的增效减毒作用可能不是通过提高机体抗氧化能力来实现的。

参考文献

- Zhao XD(赵晓东), Zhang Y(张毅). Routine chemotherapeutic drug treatment effectiveness predictive molecules and chemotherapeutic drug selection. *Chin J Cancer* (癌症), 2006, 25: 1577-1580.
- Fan JH(范剑虹), Wu X(吴霞), He CY(何陈云). Short-term efficacy concurrent chemoradiotherapy in the patient with advanced cervical cancer. *Clin Med J Chin* (中国临床医学), 2005, 13: 983-984.
- Liu YH(刘永辉), Li GC(李公春), Cui JJ(崔娇娇), et al. Development of anticancer drugs of 5-fluorouracil. *Hebei Chem Eng Ind* (河北化工), 2008, 31: 9-11.
- Yu XH(余晓红). Effect of Curculigo polysaccharide on immune function mice. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2011, 23: 33-35.