

# 西施舌多糖对人食管鳞癌裸鼠移植瘤作用的研究

杨维群\*, 温扬敏, 林文东, 谢永华, 陈长明

泉州医学高等专科学校, 泉州 362000

**摘要:** 构建人食管鳞癌 EC-9706 细胞裸鼠移植瘤模型, 研究西施舌多糖对人食管鳞癌 EC-9706 细胞裸鼠移植瘤生长的影响。将移植瘤裸鼠随机分成 5 组, 每天分别腹腔注射生理盐水(NS)、环磷酰胺(CTX, 5 mg/kg)、西施舌多糖 3 个剂量(100、200、300 mg/kg), 2 周后, 每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤体积。实验持续 26 d, 实验结束后, 处死裸鼠, 称瘤重, 计算抑瘤率。结果表明, 不同浓度西施舌多糖对人食管鳞癌裸鼠移植瘤生长均有抑制作用, 且西施舌多糖各剂量组中抑瘤率呈现剂量-效应关系, 其中西施舌多糖 300 mg/kg 实验组效果最佳, 抑瘤率达 28.85%。

**关键词:** 多糖; 西施舌; 食管癌; 抗肿瘤

中图分类号: R931.6

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.08.016

## Effect of Polysaccharides from *Coelomactra antiquata* on Human Carcinoma of Esophagus Cells Transplanted in Nude Mice

YANG Wei-qun\*, WEN Yang-min, LIN Wen-dong, XIE Yong-hua, CHEN Chang-ming

Quanzhou Medical College, Quanzhou 362000, China

**Abstract:** In order to investigate antitumor effect of polysaccharides from *Coelomactra antiquata* (PCA) on esophageal cancer, the human esophagus carcinoma transplanted tumor model of Ec-9706 cells in nude mice was established. The nude mice were then divided randomly into 5 groups: Group 1, nude mice treated with normal saline (NS, Control); Group 2, nude mice treated with 5 mg/kg of cyclophosphamide (CTX); Group 3, nude mice treated with 100 mg/kg of PCA; Group 4, nude mice treated with 200 mg/kg of PCA; Group 5, nude mice treated with 300 mg/kg of PCA. The size of tumor was measured every 3 days after 2 weeks transplantation of Ec-9706 cells. All nude mice received ip administration every day for 26 days. All the mice were sacrificed after the last administration. The tumor weight was measured and the tumor inhibition rates were calculated. The results revealed that PCA can inhibit the growth of transplanted tumor in nude mice after administration for 26 d and the inhibitory rate was directly proportional to dose of PCA. When PCA was 300 mg/kg, the inhibitory rate was maximum (28.85%).

**Key words:** polysaccharides; *Coelomactra antiquata*; esophagus carcinoma; antitumor activity

多糖(polysaccharide)是由多个单糖分子缩合、失水而成,是一类分子结构复杂且庞大的糖类物质,具有免疫调节、抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗衰老等作用<sup>[1]</sup>。天然产物中存在广泛的生物活性多糖,从天然产物中分离活性多糖已受到普遍关注。我国具有丰富的海洋资源,海洋生物中的生理活性物质是研究和发展新化学成分,开发新药的天然宝库<sup>[2]</sup>。贝类多糖是存在于贝类体内的一种生物活性物质,结构新颖、功能独特,有望成为肿瘤治疗中新的药物资源。

西施舌多糖(Polysaccharides from *Coelomactra antiquate*, PCA)是从海洋经济贝类西施舌中提取的粗多糖。我们前期体外实验结果表明西施舌多糖能明显抑制人食管癌细胞株 EC-9706 的生长,在此基础上,本研究进一步观察其对人食管鳞癌细胞株 EC-9706 裸鼠移植瘤生长情况的影响,期望为西施舌药用价值开发利用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物与主要试剂

DMSO, 胰蛋白酶液, RPMI1640 培养基, 小牛血清均购自赛默飞世尔科技公司(北京)。氟仿(AR, 天津市化学试剂一厂), 正丁醇(AR, 天津市登科化

学试剂有限公司),生理盐水(NS,广东新理想生物制药有限公司),环磷酰胺(CTX,江苏恒瑞医药股份有限公司)。

### 1.2 西施舌多糖提取

西施舌购自福建福州程普头市场。选择壳长7~9 cm新鲜西施舌成贝,去壳、洗净、称取其肌肉50 g,放入500 mL烧杯,再加入固液比(g/mL)为1:6的双蒸水。放置于超声波清洗机(40 kHz,100 W),于60 °C水浴超声波处理20 min。再用定性滤纸过滤,取滤液Sevag法除蛋白。加入乙醇使最终乙醇浓度为80%,4 °C过夜沉淀。6000 g离心15 min收集多糖,冷冻干燥得到西施舌多糖粉末<sup>[3]</sup>。采用苯酚-硫酸法测定总糖含量,吸取10 μg/mL的样品液1 mL测定吸光度,通过标准曲线法求得相应糖浓度值,计算总糖含量为82.17%。

### 1.3 细胞培养

人食管鳞癌细胞株EC-9706购自天呈科技生物公司。用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液,在5% CO<sub>2</sub>、37 °C饱和湿度条件下细胞培养箱中培养,2~3 d换液传代1次,实验用细胞为状态良好的对数生长期细胞。

### 1.4 动物实验

#### 1.4.1 裸鼠皮下移植瘤模型

4~5周龄SPF级BALB/c裸鼠[购自斯莱克实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(沪)2012-0002],体重15~18 g,SPF级层流柜饲养3 d后用于实验。对数生长期EC-9706细胞,胰蛋白酶液消化后,用PBS洗涤,制备1×10<sup>7</sup>/mL瘤细胞悬液接

种于裸鼠右前肢腋部皮下,建立EC-9706食管鳞癌的异种皮下移植瘤动物模型,7 d后观察成瘤率100%,选择肿瘤直径0.5 cm左右的裸鼠进行实验。

#### 1.4.2 分组与处理

将荷瘤裸鼠按随机数字表法分为NS(阴性对照组)、CTX(阳性对照组)、西施舌多糖小、中、大3个剂量实验组,每组10只,雌雄各半。分别腹腔注射等体积NS、CTX(5 mg/kg)、西施舌多糖(小100、中200、大300 mg/kg),每天给药一次,连续给药26次。各组裸鼠分别从给药后第2周起每3天测量瘤长(L)、瘤宽(S),根据公式(V): $V = 0.5 \times L \times S^2$ 计算肿瘤体积,绘制移植瘤生长曲线。观察26 d后,颈椎脱臼处死裸鼠,称量瘤、脾、肝湿重,计算抑瘤率和脏器指数<sup>[4]</sup>。另分别取各组裸鼠的部分新鲜肿瘤组织和肝脏经10%甲醛固定后,常规石蜡切片,HE染色,光镜下观察。

抑瘤率% = [(阴性对照组平均瘤重-治疗组平均瘤重)/阴性对照组平均瘤重] × 100%

脏器指数 = 脏器重(mg)/小鼠体重(g)

## 2 实验结果

### 2.1 西施舌多糖对裸鼠体重的影响

西施舌多糖对裸鼠体重影响(见表1),实验结束与实验开始时比较,NS组裸鼠的体重增加显著,而CTX组裸鼠体重无显著差异。治疗期间,西施舌多糖各剂量组的裸鼠一般状况良好,未见厌食,活跃程度下降等,治疗前后体重增加显著,表明西施舌多糖对裸鼠体重增加无明显的抑制作用。

表1 西施舌多糖对裸鼠体重增加的影响

Table 1 Effect of PCA on weight gain of nude mice

组别 Group	剂量 Dose(mg/kg)	体重 Weight(g)		体重增加 Gain weight(g)
		开始 Original	结束 End	
NS组(NS group)	-	15.84 ± 0.37	18.97 ± 0.64**	3.13
CTX组(CTX group)	5	16.03 ± 0.41	16.95 ± 1.75	0.92
多糖小剂量组(Small dose of PCA)	100	16.10 ± 0.38	17.55 ± 0.58*	1.45
多糖中剂量组(Middle dose of PCA)	200	15.88 ± 0.45	17.98 ± 0.83**	2.11
多糖大剂量组(Large dose of PCA)	300	16.13 ± 0.42	18.46 ± 0.68**	2.33

注:与本组实验前比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01。

Note:compared with original weight,\*P<0.05,\*\*P<0.01.

### 2.2 西施舌多糖对裸鼠人食管鳞癌移植瘤体积的影响

给药17 d后,除西施舌大剂量组肿瘤体积与

NS组之间存在显著差异外,其它实验组与NS组比较无显著差异。给药20 d后,西施舌小剂量组与NS组比较,肿瘤体积无显著差异。实验结束后,不同

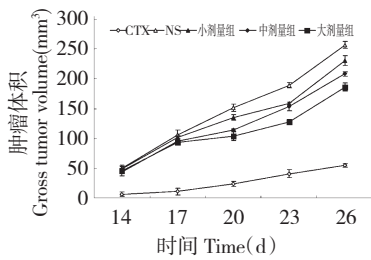


图1 西施舌多糖对裸鼠肿瘤体积的影响

Fig. 1 Effect of PCA on tumor size in nude mice

剂量西施舌多糖实验组与 NS 对照组之间肿瘤体积

均存在显著差异,各实验组肿瘤体积均小于阴性对照组。

### 2.3 西施舌多糖对人食管癌裸鼠移植瘤抑瘤率的影响

西施舌多糖小剂量组小鼠的瘤重与 NS 组比较显著降低( $P < 0.05$ ),抑瘤率为 13.46%。而中剂量组和大剂量组肿瘤重量与 NS 组比较均存在极显著差异( $P < 0.01$ ),抑瘤率分别为 22.44% 和 28.85%,且西施舌多糖各剂量组中裸鼠的瘤重呈现出剂量-效应关系,提示西施舌多糖对裸鼠 EC-9706 细胞移植瘤的生长具有明显的抑制作用。

表2 西施舌多糖对裸鼠食管癌抑瘤率的影响

Table 2 Effect of PCA on tumor inhibition rate of esophagus carcinoma in nude mice

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	瘤重 Tumor weight (g)	抑瘤率 Inhibition rate (%)
NS 组(NS group)	-	0.234 ± 0.054	
CTX 组(CTX group)	5	0.056 ± 0.011 **	75.96
多糖小剂量组(Small dose of PCA)	100	0.203 ± 0.036 *	13.46
多糖中剂量组(Middle dose of PCA)	200	0.182 ± 0.029 **	22.44
多糖大剂量组(Large dose of PCA)	300	0.167 ± 0.031 **	28.85

注:与阴性对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note:compared with NS group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ .

### 2.4 西施舌多糖对裸鼠脾脏、肝脏的影响

西施舌多糖大剂量组脾脏指数与 NS 组比较存在显著差异,而小剂量组和中剂量组与 NS 组比较,脾指数不存在显著差异。各实验组裸鼠肝脏重量与

NS 组比较,除 CTX 组存在极显著差异外,西施舌多糖各剂量组均无显著差异(见表 3);裸鼠肝脏镜下观察,阳性对照组见肝细胞出现大片坏死,而西施舌多糖各剂量组肝细胞均未见明显形态改变(见图 2)。

表3 西施舌多糖对食管癌裸鼠脾、肝的影响

Table 3 Effect of PCA on important organs of tumor-bearing nude mice

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	脾脏指数 Spleen index (mg/g)	肝脏指数 Liver index (mg/g)
NS 组 NS group	-	11.80 ± 1.98	1.32 ± 0.98
CTX 组 CTX group	5	8.88 ± 1.08 **	0.91 ± 0.78 **
多糖小剂量组 PCA low dose group	100	12.81 ± 2.12	1.44 ± 0.76
多糖中剂量组 PCA medium dose group	200	13.83 ± 1.63	1.40 ± 0.63
多糖大剂量组 PCA high dose group	300	14.63 ± 2.32 *	1.37 ± 0.66

注:与阴性对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note:compared with NS group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ .

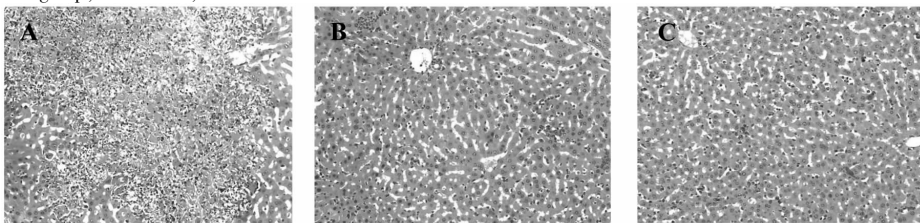


图2 CTX 组(A)、西施舌大剂量组(B)及西施舌中剂量组(C)裸鼠肝脏镜下观察(HE×200)

Fig. 2 Histopathological observation of liver of nude mice of positive control group (A),PCA high dose group (B) and PCA medium dose group (C) (HE×200)

## 2.5 移植瘤病理组织学观察

光镜下观察,可见 NS 组的肿瘤组织中瘤细胞排列密集成群,呈不规则巢状分布,瘤细胞多为多边形,核大深染。而西施舌中、大剂量组及阳性对照组

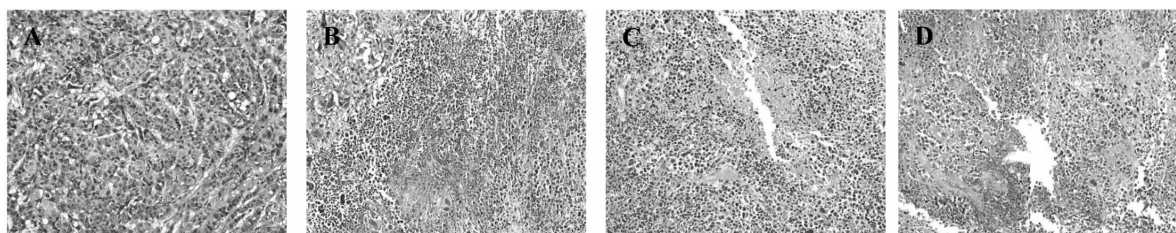


图3 NS组(A)、西施舌中剂量组(B)、西施舌大剂量组(C)及CTX组(D)的移植瘤病理组织学观察(HE×200)

Fig. 3 Histopathological observation of tumor of NS group (A), PCA medium dose group (B), PCA high dose group (C) and CTX group (D)

## 3 讨论

食管癌是人类常见的恶性肿瘤之一,我国食管癌发病率和病死率均居世界之首<sup>[4]</sup>。近十几年,肿瘤的手术及放化疗取得了长足的进步,使患者生存时间明显延长,但对大部分恶性肿瘤的治疗尚未能达到令人满意的效果。临床所用的抗癌药物大多有明显的毒副作用,而从天然产物提取活性多糖不仅具有显著抗肿瘤作用,且没有或很少有常用抗肿瘤化疗药物损伤骨髓、抑制造血的副作用<sup>[5]</sup>。从天然产物中开发无毒副作用的抗肿瘤活性成分是人类战胜肿瘤的可能途径之一。

贝类多糖是存在于贝类体内的一种生物活性物质,结构新颖、功能独特,有望成为肿瘤治疗中新的药物资源<sup>[1]</sup>。Liao等<sup>[6]</sup>研究表明,从淡水贝类河蚬中提取活性多糖对人胃癌和卵巢癌具有显著抑制作用。陈倩超<sup>[7]</sup>研究证实鲍鱼多糖具有抑制肿瘤生长,延长S<sub>180</sub>腹水型小鼠、艾氏腹水型小鼠和肝癌腹水型小鼠寿命,同时认为多糖的抗癌活性与其化学结构,给药途径、剂量选择有密切关系。许东晖<sup>[8]</sup>等研究也表明,鲍鱼多糖能明显抑制裸鼠移植人鼻咽癌的生长,诱导肿瘤细胞凋亡和坏死,对荷瘤裸鼠体重增长无明显抑制作用,并且未出现毒副作用。文蛤多糖能显著地降低小鼠的S<sub>180</sub>实体瘤的重量,可显著延长艾氏腹水瘤和肝癌腹水瘤荷瘤小鼠的存活时间<sup>[9]</sup>。另外,从鲍鱼、牡蛎、珠母贝、褶纹冠蚌、三角帆蚌等贝类中提取出具抗肿瘤效果的活性多糖<sup>[1]</sup>。本研究结果显示,西施舌多糖不仅能有效抑制裸鼠体内食管癌的生长,导致肿瘤细胞凋亡和坏

的肿瘤组织中,瘤细胞数较少,分布稀疏,细胞体积变小,核深染,有的细胞固缩,有的仅存胞核,并可见不规则坏死(图3)。

死。同时其抑瘤率随浓度增大和时间的延长而增加,而且对裸鼠的肝脏重量及其形态没有影响,说明无明显的毒副作用。与以上的研究结论相似。

贝类多糖抗肿瘤作用的主要机制与其免疫调节和抗氧化作用有关。免疫调节是目前公认的多糖抗肿瘤作用的主要机制之一<sup>[1]</sup>。多数多糖具有体内抗肿瘤作用,不仅能激活T、B淋巴细胞,巨噬细胞,自然杀伤细胞等免疫细胞,还能活化补体,促进细胞因子生成,对免疫系统发挥多方面的调节作用<sup>[10,11]</sup>。多糖是一种免疫增强剂,许东晖等<sup>[8]</sup>研究表明鲍鱼多糖能明显增强荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能和迟发型超敏反应。鲍鱼多糖通过激活巨噬细胞及T细胞,直接或间接地促进细胞毒因子的释放、杀伤肿瘤细胞,从而抑制肿瘤细胞的生长,发挥其抗肿瘤作用。文蛤多糖对环磷酰胺(CTX)造成的小鼠免疫功能损伤有对抗作用,能使外周血液白细胞数量增加,吞噬能力增强,血清溶血素抗体水平增高,免疫器官胸腺、脾脏增重<sup>[9]</sup>。肿瘤患者常伴随免疫功能的低下,故提高患者的免疫功能,将有利于机体抗肿瘤。但绝大多数抗肿瘤药在杀伤肿瘤细胞的同时,对免疫功能也有很大的影响,常引起胸腺指数、脾指数等免疫指标的异常。而西施舌提取物不仅能提高正常小鼠的T-OAC、SOD和POD活性,降低MDA含量,提高小鼠的抗氧化能力<sup>[12]</sup>。而且本实验结果显示,西施舌多糖能显著抑制裸鼠移植性食管癌的生长,提高裸鼠的免疫器官脾脏的重量。表明西施舌多糖在抑制肿瘤生长的同时具有一定的促进荷瘤动物机体恢复、改善荷瘤动物免疫功能的作用,至于西施舌多糖抗肿瘤作用可能与增强机体

免疫活性有关,具体的机制还有待后续进一步深入研究。

#### 参考文献

- Fan QY (范巧云), Li CP (李朝品), Wang KX (王克霞). New advance in the study of the biological activity of polysaccharides from marine animals. *J Pathogen Biol* (中国病原生物学杂志), 2012, 7: 876-877.
- Jia YH (贾玉海). Chinese ocean and limnology pharmacology (中国海洋湖沼药理学). Beijing: Academic Press, 1995. 1-5.
- Ye H, Wang KQ, Zhou CH, et al. Purification, antitumor and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chem*, 2008, 111: 428-432.
- Lu P, Liang QD, Li R, et al. Effect of traditional Chinese medicine on survival and quality of life in patients with esophageal carcinoma after esophagec. *Chin J Integr Med*, 2006, 12: 175-179.
- Wu XZ (吴晓忠), Luo SQ (罗素琴), Liu LL (刘乐乐), et al. The research progress of anti-tumor effects of polysaccharide of Chinese medicine. *Acta Acad Med Neimongol* (内蒙古医学院学报), 2009, 31: 81-83.
- Liao N, Chen S, Ye X, Antioxidant and anti-tumor activity of a polysaccharide from freshwater clam, *Corbicula fluminea*. *Food Funct*, 2013, 4: 539-548.
- Chen QC (陈倩超). Extraction of *Haliotis discushannl* Ino. polysaccharide and experimental study on its anti-tumor action. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 1998, 15: 8.
- Xu DH (许东晖), Wang B (王兵), Xu SB (许实波), et al. Effects of polysaccharide on the activity of the peritoneal macrophages and delayed-type hypersensitivity in mice bearing S<sub>180</sub>. *Chin Tradit Herb Drug* (中药材), 1999, 22(2): 88-89.
- Dou CG (窦昌贵), Huang F (黄芳), Huang LS (黄罗生), et al. An experimental study on the effects of Meretrix polysaccharide on antineoplastic and immunoregulation. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 1999, 18(2): 15-19.
- Xie HG (谢好贵), Chen MZ (陈美珍), Zhang YQ (张玉强). Research progress on structure-antitumor activity relationship of polysaccharide and its mechanism. *Food Sci* (食品科学), 2011, 32: 329-333.
- Ouyang TZ (欧阳天贽), Li XD (李小定), Rong JH (荣建华). Recent studies on bioactivities of fungal polysaccharides. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18: 524-528.
- Wen YM (温扬敏), Luo CL (罗彩林), Chen SZ (陈淑增), et al. Influence of extract from *Coelomactra antiquata* on antioxidant ability of normal mice. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2011, 241: 371-372.
- Cao W (曹炜), Suo ZR (索志荣). Determination of total phenolic acid in honey by folin-ciocailleu colorimetry. *Food Fermn Ind* (食品与发酵工业), 2003, 29: 80-82.
- Siddhuraju P, Becker K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 2144-2155.
- Larraur JA, Sanchezmoreno C, Sauracalixto F. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 2694-2697.
- Li YM, Zhong H. Simultaneous determination of five flavonoids in *Saussurea involucrata* by capillary electrophoresis. *J Chem Soc Pak*, 2013, 35: 1288-1292.
- Fatima A, Elizabeth H, Roger S, et al. Physical features, phenolic compounds, betalains and total antioxidant capacity of coloured quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) from Peruvian altiplano. *Food Chem*, 2015, 183: 83-90.
- Lurdes M, Tereza F, Marta S, et al. Interactions of flavonoids with iron and copper ions; a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Res*, 2002, 36: 1199-1208.
- Qiu J, Xue XF, Chen FD, et al. Quality evaluation of snow lotus (*Saussurea*): quantitative chemical analysis and antioxidant activity assessment. *Plant Cell Rep*, 2010, 29: 1325-1377.
- Lu J (陆健), Fan W (樊伟), Kong WB (孔维宝), et al. Study on the extraction of total polyphenol in barley (*Hordeum vulgare* L.) and its ability on scavenging DPPH free radical. *J Food Sci Biotechnol* (食品与生物技术学报), 2008, 27: 57-61.

(上接第 1435 页)