软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠免疫功能的初步研究

刘安军，刘爽，曹东旭，袁博，王维君，阎妍
（天津科技大学食品工程与生物技术学院，天津 300457）

摘要：目的：研究软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠的免疫功能及灭活 S180 细胞对小鼠免疫功能的影响，分析其免疫机制。**方法：**用 MTT 法测定软骨多糖治愈的 S180 腹水瘤小鼠的血清、脾细胞及胸腺细胞对 S180 细胞和 MCF-7 乳腺癌细胞的生长影响，并以灭活的 S180 细胞对健康小鼠免疫，观察其对小鼠免疫功能的影响。**结果：**软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠的血清、脾细胞及胸腺细胞对肿瘤生长均有一定抑制效果。其中在不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养下，治愈小鼠 10%的血清对 S180 细胞和 MCF-7 乳腺癌细胞的抑制率分别为 64.09%、73.48%，而其 20%血清对两种肿瘤细胞的抑制率则分别为 88.70%、96.80%。结论：软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠对肿瘤有一定的免疫能力。

关键词：软骨多糖；S180 荷瘤小鼠；MCF-7 乳腺癌细胞；肿瘤免疫；MTT 法
中图分类号：R965；**文献标识码：**A；**文章篇号:**1673-9078(2007)12-0001-04

Study on Immune Function of the S180 Tumor-bearing Mice Cured by Cartilage Polysaccharide

LIU An-jun, LIU Shuang, CAO Dong-xu, YUAN Bo, WANG Wei-jun, YAN Yan
(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Objective: To study the immune function of the S180 tumor-bearing mice cured by cartilage polysaccharide, the effects of virucidal S180 tumor on immune function of the mice and the mechanisms. **Methods:** The influences of the blood serum, spleen cells and thymucytes of the S180 ascites tumor-bearing mice cured by cartilage polysaccharide on the S180 tumor and MCF-7 breast carcinoma cells were measured using the MTT method. Virucidal S180 tumor cells were injected into healthy mice and their effect on immune functions of the mice were investigated. **Results:** The blood serum, spleen cells and thymucytes of the S180 tumor-bearing mice cured by cartilage polysaccharide had definite inhibitory effects on tumor growth. When cultured in the RPMI 1640 culture-medium, the inhibition rates of 10% blood serum of the S180 tumor-bearing mice cured by cartilage polysaccharide reached 64.09 %, 73.48 %, respectively, while those of 20% blood serum of the mice were 88.70 % and 96.80 %, respectively. **Conclusion:** The S180 tumor-bearing mice cured by cartilage polysaccharide had definite immune functions on tumors.

Key words: cartilage polysaccharide; S180 tumor-bearing mice; MCF-7 breast carcinoma cells; tumor immunity; MTT method

肿瘤免疫治疗始于 100 年前，肿瘤患者的免疫功能状态虽不能直接反映机体的抗肿瘤效应，但与肿瘤的发展及预后有一定关系[1]。人们发现鲨鱼软骨中的软骨多糖具有抑制肿瘤的血管形成和生长、增强机体免疫功能等作用[2]。免疫血清主要用于治疗，也可作预防使用。脾脏是人体最大的淋巴器官，具有重要的免疫功能，是各种免疫细胞居住、增殖并进行免疫应答及产生免疫效应物质（如抗体等）的重要基地[3]。胸腺是造血器官，能产生 T 淋巴细胞，并运送到淋巴结和脾脏等处，对机体的细胞免疫具有重要作用。因此，本研究以软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠为模型，将其血清、脾脏及胸腺作为主要研究对象。

肿瘤的主动特异性免疫疗法（ASI）是近年研究的热点，目前应用于临床实验的多表位肿瘤抗原主要来源于肿瘤细胞的溶泡物质，但真正实用的肿瘤相关抗原十分有限[4]。本课题组前期的研究表明，经软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠再次注射 S180 细胞后部分不再长腹水瘤。本论文将在此基础上初步分析治愈小鼠体内的免疫成分，初步探讨肿瘤免疫应答的机制，为肿瘤的免疫治疗提供一定的依据。

1 材料

收稿日期：2007-07-19
基金项目：国家自然科学基金项目（20576101）
作者简介：刘安军（1963-），男，教授，博士，博导，主要从事畜产（副产）品高附加值的开发利用及功能性食品研究等

1.1 受试药物：实验室自行从猪软骨中分离、提取、纯化的软骨多糖。

提取工艺：猪的软骨经 1% Na_2CO_3，pH 10~11 处理后，70 ℃加热 30 min，用木瓜蛋白酶水解，DEAE-Sephadex 离子交换树脂吸附，NaCl 洗脱，得到大分子量的软骨多糖。用-OH 自由基降解，得到小分子的软骨多糖，用乙醇沉淀，冷冻真空干燥后 4 ℃储存备用。

1.2 试剂

四甲基偶氮唑蓝（MTT）为 Amresco 公司产品，类标准胎牛血清为中美合资兰州民海生物工程有限公司产品，HyQ®改良型 RPMI 1640 培养基为海克隆生物化学制品（北京）有限公司产品。

1.3 肿瘤细胞株

小鼠肉瘤 S180 腹水型瘤株、乳腺癌 MCF-7 细胞株，天津医科大学提供。

1.4 实验动物

昆明种雌性小鼠 50 只，清洁级动物，6~8 周，质量 20~22 g，由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供，合格证号：SCXK-（军）2002-001。

2 实验方法

2.1 实验动物模型的建立

2.1.1 模型Ⅰ

无菌条件下抽取接种 7 d 荷瘤 S180 小鼠的腹水，用生理盐水将细胞浓度稀释成 1×10^7 个/mL 的细胞悬液，分别腹腔接种 18 只小鼠，每只注射 0.2 mL。24 h 后开始腹腔给药（多糖）30 mg/d，在 40 d 的观察期内均未出现腹水形成并死亡的情况，且小鼠生存状况良好[5]。

无菌条件下抽取接种 7 d 荷瘤 S180 小鼠的腹水，用生理盐水将细胞浓度稀释成 1×10^7 个/mL，再次分别腹腔接种该 18 只小鼠，每只注射 0.2 mL。7 d 后选未长腹水瘤的小鼠，即软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠作为本实验的动物模型。

2.1.2 模型Ⅱ

将 15 只小鼠随机分成 5 组，分为药物处理 A 组、药物处理 B 组、药物处理 C 组、正常细胞组和对照组。

无菌条件下抽取接种 7 d 荷瘤 S180 小鼠的腹水，用完全培养基洗涤后加入软骨多糖，药物终浓度为 400 μg/mL，5% CO_2，37 ℃培养 0 h、12 h、24 h、48 h 后，反复冻融将细胞胀破，分别腹腔注射入正常细胞组、药物处理 A、B、C 组小鼠体内，每只定量注射 9.6×10^6 个细胞。对照组即无菌条件下抽取接种 7 d 荷瘤 S180 小鼠的腹水，用生理盐水洗涤后直接腹腔注射入小鼠体内，每只定量注射 1×10^5 个细胞。5 组小鼠均在注射细胞 8 d 后再次腹腔注射 S180 细胞，观察其生存情况。

2.1.3 模型Ⅲ

造模方法同上，灭活细胞定量为 6.4×10^6 个/只。

2.2 血清、脾细胞悬液及胸腺细胞悬液的制备

将模型Ⅰ小鼠及健康小鼠断颈取血，14000 r/min 离心 10 min，血清待用。无菌条件下取出脾脏及胸腺，剪成 5~10 mm^2 大小的组织块，将组织块研磨，通过 200 目的不锈钢网桶，再用 RPMI 1640 培养基离心洗涤 2 次，制得单细胞悬液。

2.3 软骨多糖治愈 S180 荷瘤小鼠的血清、脾细胞悬液及胸腺细胞悬液对 S180、MCF-7 细胞活力的影响

分别将制好的 S180 细胞和 MCF-7 细胞分别加入到 96 孔培养板中，每孔 100 μL，分别加入 10%、20%的模型Ⅰ小鼠的血清，25 μL、50 μL 的脾细胞悬液，25 μL、50 μL 的胸腺细胞悬液，每组均设 6 个复孔，对照孔加完全培养基 100 μL。另取 96 孔培养板，以上相同操作以健康小鼠样本作对照。5% CO_2，37 ℃培养 48 h 后 1500 r/min 离心 15 min，弃上清。每孔加 MTT 溶液 100 μL，继续培养 4 h，1500 r/min 离心 15 min，弃上清。每孔加 DMSO 150 μL，溶解 Fomazan 颗粒，酶标仪中速震荡 10 s 后测定其 $OD_{570\,nm}$。

抑制率（Inhibitory rate，IR）%=[(对照组平均 OD 值-加药组平均 OD 值)/对照组平均 OD 值]×100%。

3 结果

3.1 软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠的血清对肿瘤细胞生长的影响

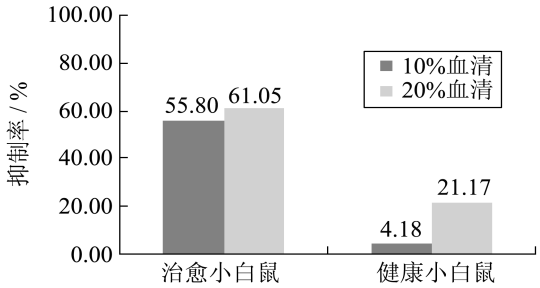

图 1 不同浓度血清对 S180 腹水瘤细胞生长的影响

（含 10%胎牛血清）

如图 1 所示，在含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中，分别用软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠 10%、20%两种浓度的血清培养 S180 腹水瘤细胞，并用健康小鼠的血清作对照。结果表明，治愈小鼠的血清对 S180 腹水瘤细胞的生长具有明显的抑制作用。10%血

清的抑制率可达 55%以上，而相同浓度的健康小鼠血清无明显抑制作用。20%血清的抑制率可达 60%以上，明显高于健康小鼠的抑制率。

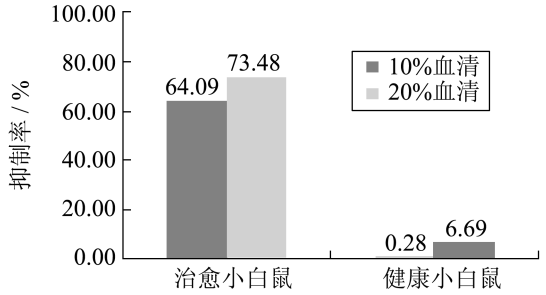

图 2 不同浓度血清对 S180 腹水瘤细胞生长的影响

（不含 10%胎牛血清）

如图 2 所示，在不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中，分别用软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠 10%、20%两种浓度的血清培养 S180 腹水瘤细胞，并用健康小鼠的血清作对照。结果表明，治愈小鼠的血清对 S180 腹水瘤细胞的抑制率明显高于健康小鼠，对照组几乎无抑制效果，且随着血清浓度增大，抑制率有所提高。

综合以上两组结果，可以看出软骨多糖治愈组小鼠的血清内可能含有能够抑制 S180 细胞生长的物质。

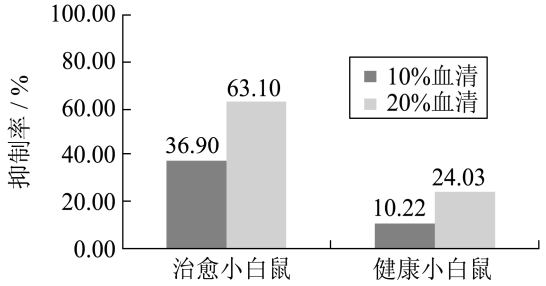

图 3 不同浓度血清对 MCF-7 细胞生长的影响

（含 10%胎牛血清）

如图 3 所示，在含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中，分别用软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠 10%、20%两种浓度的血清培养 MCF-7 乳腺癌细胞，并用健康小鼠的血清作对照。结果治愈小鼠的血清对 MCF-7 乳腺癌细胞的抑制率明显高于健康小鼠，且随着血清浓度增大，抑制率有所提高。

如图 4 所示，在不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中，分别用软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠 10%、20%两种浓度的血清培养 MCF-7 乳腺癌细胞，并用健康小鼠的血清作对照。结果治愈小鼠的血清对 MCF-7 乳腺癌细胞的抑制率明显高于健康小鼠，且随着血清浓度增大，抑制率有所提高。

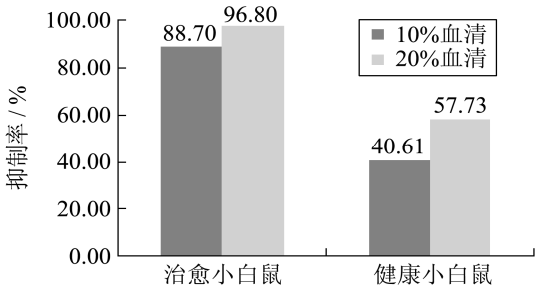

图 4 不同浓度血清对 MCF-7 细胞生长的影响

（不含 10%胎牛血清）

综合以上两组结果，可以看出软骨多糖治愈组小鼠的血清内可能含有能够抑制 MCF-7 细胞生长的物质。

3.2 软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠的脾细胞悬液对肿瘤细胞生长的影响

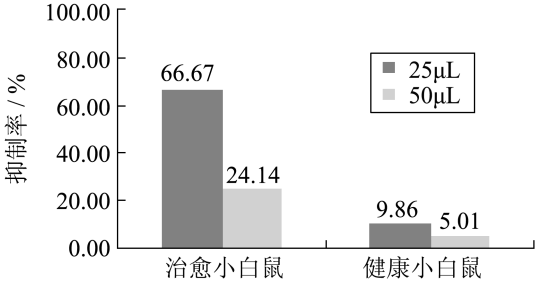

图 5 不同剂量脾细胞对 S180 腹水瘤细胞生长的影响

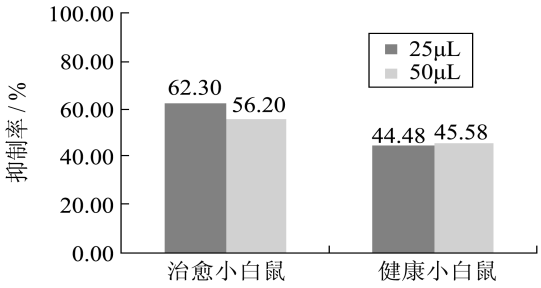

图 6 不同剂量脾细胞对 MCF-7 乳癌细胞生长的影响

如图 5、图 6 所示，分别用软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠 25 μL、50 μL 两种剂量的脾细胞悬液培养 S180 腹水瘤细胞和 MCF-7 乳腺癌细胞，并用健康小鼠的脾细胞悬液作对照。结果治愈小鼠的脾细胞悬液对 S180 腹水瘤细胞的抑制率明显高于健康小鼠，且随着剂量增大，抑制率有所降低；对 MCF-7 乳腺癌细胞的抑制率也明显高于健康小鼠，但随着脾细胞剂量增大，模型组抑制率有所降低，而对照组无明显变化。

综合以上两组结果，可以看出软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠的脾细胞中可能含有能够抑制 S180 细胞和 MCF-7 细胞生长的物质。

3.3 软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠的胸腺细胞悬液对肿瘤细胞生长的影响

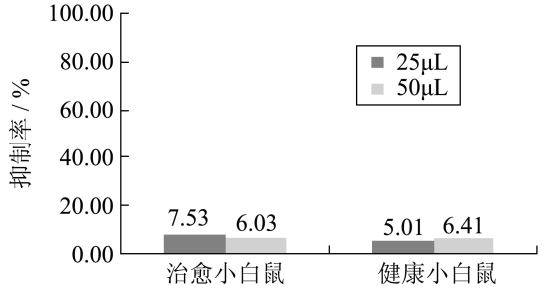

图 7 不同剂量胸腺细胞对 S180 腹水瘤细胞生长的影响

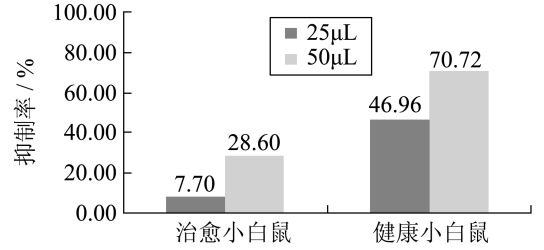

图 8 不同剂量胸腺细胞对 MCF-7 乳癌细胞生长的影响

如图 7、图 8 所示，分别用软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠 25 μL、50 μL 两种剂量的胸腺细胞悬液培养 S180 腹水瘤细胞和 MCF-7 乳腺癌细胞，并用健康小鼠的胸腺细胞悬液作对照。结果表明模型组与对照组对 S180 腹水瘤细胞的抑制率均较低，且不同剂量之间无明显变化；对 MCF-7 乳腺癌细胞的抑制率明显低于健康小鼠，且随着胸腺细胞剂量增大，抑制率有所提高。

3.4 灭活的 S180 腹水瘤细胞对健康小鼠的免疫效果实验

模型Ⅱ中小鼠长出腹水时间：药物处理 A 组 8 d 左右，药物处理 B 组 12 d 左右、其中 1 只未长腹水，药物处理 C 组 10 d 左右，正常细胞组 20 d 左右。对照组 7 d 左右。

模型Ⅲ中小鼠长出腹水时间：药物处理 A 组 9 d 左右，药物处理 B 组 1 只 9 d、2 只 10 d，药物处理 C 组 12 d 左右，正常细胞组 17 d 左右。对照组 7 d 左右。

4 讨论

实验发现，无论用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基还是不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养，软骨多糖治愈的 S180 荷瘤小鼠的血清对 S180 腹水瘤细胞和 MCF-7 乳腺癌细胞的抑制率均明显高于健康小鼠，说明软骨多糖对患腹水瘤小鼠的免疫功能有较好的调节作用，在不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养抑制效果更好，说明治愈后的小鼠血清中有较强的抗体存在。并且随着血清浓度增大，抑制率均有所提高，说明抗体量也相应增多。同时，对 S180 腹水瘤的抑制效果较 MCF-7 乳腺癌细胞好，原因可能是 S180 腹水瘤细胞为鼠系肿瘤，而 MCF-7 乳腺癌细胞为人系肿瘤，作用效果相对较差。

治愈小鼠脾细胞对两种细胞的抑制率随着脾细胞剂量的增加有降低的趋势，可能是由于脾细胞悬液中存在有助于细胞生长的物质，有待于进一步研究。

治愈小鼠和健康小鼠的胸腺细胞对 S180 腹水瘤细胞几乎均无抑制作用，说明对 S180 腹水瘤的抗体不存在于胸腺。治愈小鼠的胸腺细胞对 MCF-7 乳腺癌细胞也无明显抑制作用，而健康小鼠的胸腺细胞对 MCF-7 乳腺癌细胞的抑制率相对较高，可能是由于药物软骨多糖在治疗腹水瘤的过程中对胸腺产生一定影响造成的。对 S180 腹水瘤细胞无抑制作用而对 MCF-7 乳腺癌细胞有抑制作用的原因还需进一步实验研究。

在考察灭活 S180 腹水瘤细胞对健康小鼠免疫效果的实验中，药物处理组和正常细胞组均比对照组长出腹水的时间晚，说明一次免疫有一定的延长腹水长出时间的效果。高剂量 9.6×10^6 个/只比低剂量 6.4×10^6 个/只小鼠长出腹水的时间较晚，说明抗体的数量较多能够延长腹水长出的时间。而注射软骨多糖处理过的灭活 S180 细胞的小鼠相对注射未经处理的灭活 S180 细胞的小鼠较早长出腹水，可能是由于软骨多糖将 S180 腹水瘤细胞表面的一些抗体物质处理掉了，导致免疫效果不理想。动物的个体差异也是影响因素。但是药物处理的高剂量模型中有 1 只小鼠未长腹水，证明免疫作用确实存在。

参考文献

[1] 陆继业,袁昌锦,侯建军.肿瘤疫苗的现代研究进展[J].中华现代医学与临床,2006(4)7:132-136

[2] Oikawa T, Ashino-Fuse H, Shinamura M, et a1. A novel angiogenic inhibitor derived from Japanese shark cartilage extraction and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis [J].Cancer Letters, 1990, 51(3):181-186

[3] 宋春华,金明,陈京,等.保元汤醇提取物不同途径给药对小鼠体重及免疫器官的影响[J].中国实验临床免疫学杂志,1998,10(3):39-41

[4] 黄海燕,王占峰综述,鞠砚审校. 肿瘤免疫治疗实验研究的新热点-Exosome[J].中国实验诊断学,2007,11(3):419-421

[5] 刘安军,尤玲玲,张国蓉,等.软骨多糖对小鼠肉瘤细胞 S_{180} 抑制作用的实验研究[J].中国肿瘤,2006,15(11):772-774