

中药莪术醇构建胃癌细胞疫苗对胃癌的实验治疗效果

徐立春¹ 卜平¹ 许祥裕² 陈平³ 边可君¹ 周娟¹ 刘志敏¹ 孙振华¹

(1. 扬州大学中西医结合研究所, 江苏省扬州市淮海路 11 号, 225001;

2. 南京军区军事医学研究所; 3. 江苏省苏北人民医院)

[摘要] **目的** 研究莪术醇修饰构建的肿瘤细胞疫苗对人胃腺癌细胞(SGC-7901)等的抗癌作用。 **方法** 用莪术醇及新城鸡瘟病毒对SGC-7901细胞进行系列生物修饰,所构建的瘤苗分别对小鼠免疫接种3次后,接种SGC-7901胃肿瘤细胞,观察各组治疗及免疫效应。 **结果** 莪术醇构建的SGC-7901瘤苗能显著抑制皮下肿瘤结节形成,明显阻止胃癌细胞的肺转移,延长荷瘤鼠的生存时间。各组免疫效应淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK细胞)较同龄未免疫小鼠的LAK细胞对小鼠前胃癌细胞具有更强的抗癌作用。 **结论** 莪术醇修饰构建的SGC-7901新型疫苗可以增强胃肿瘤细胞的免疫原性,对胃癌有较好的实验治疗效果。 **[关键词]** 莪术醇;人胃腺癌细胞;新城鸡瘟病毒;生物疫苗构建;治疗效果

Experimental Therapeutic Effect of Tumor Cell Vaccine Constructed by Curcumol on Gastric Cancer

XU Li-chun¹, BU Ping¹, XU Xiang-yu², et al.

(1. Institute for Integrated Chinese and Western Medicine, Yangzhou University, Jiangsu 225001; 2. Nanjing Institute for Military Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study the therapeutic effect of tumor cell vaccine modified and constructed by curcumol on SGC-7901 cells. **Methods** SGC-7901 cells were modified by curcumol and Newcastle disease virus. The mice were vaccinated with tumor vaccine three times, then SGC-7901 cells. The therapeutic and immunological effect was observed. **Results** SGC-7901 cells constructed by curcumol could inhibit the formation of subcutaneous tumor nodule, interrupt pulmonary metastasis and extend the live time of mice bearing cancer. Immunizing lympholine-activated killer cells had better anticancer function than nonimmune ones. **Conclusion** SGC-7901 cells modified and constructed by curcumol can enhance immunogenicity of gastric tumor cells and experimentally cure gastric cancer.

Key Words Curcumol; SGC-7901 cells; Newcastle disease virus; Vaccine modification; Therapeutic effect

新近研究的肿瘤生物治疗方法因其特异性强、无毒副作用,具有较好的疗效,已逐渐得到临床认可^[1,2]。最近有研究报道中药三棱、莪术提取物联合治疗肿瘤有一定疗效^[3,4]。为此,我们在原有的研究基础上从中药莪术中提取有效单体成分莪术醇,对人胃腺癌细胞(SGC-7901)进行系列生物修饰构建,制成莪术醇-SGC-7901新型肿瘤疫苗,同时构建新城鸡瘟病毒(NDV)肿瘤疫苗,联合治疗胃癌,观察其在BALB/c纯系鼠内抗肿瘤肺转移、皮下结节形成、荷瘤鼠生存时间的变化以及淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK细胞)的杀伤效应,取得了较好的实验治疗结果。

1 材料

1.1 药物及试剂

莪术有效成分莪术醇由扬州大学中西医结合研究所提供,为姜黄属温莪术的挥发油中分离出的倍半萜类化合物,熔点为147℃~142℃,比旋度 $[\alpha]$ 为40.8℃,折光率 n_{25} 为1.482。莪术醇为具有半缩酮的氢化奥类化合物,由五元环和六元环并合而成,其中的七元环通过半缩酮的氧桥又形成了一个五元环和六元环,形成

具有刚性结构的较稳定的化合物。纯度为99%(气相色谱法)。NDV由扬州大学畜牧兽医学院提供。SGC-7901细胞株、小鼠前胃癌细胞(MFC)株由上海细胞生物研究所提供。

1.2 动物BALB/c纯系鼠

由扬州大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(苏)2002-0009,雌雄各半,5~7周龄,体重20~25g。

2 方法

2.1 肿瘤细胞疫苗的系列生物修饰构建

SGC-7901单瘤苗、莪术醇-SGC-7901新型瘤苗的生物修饰构建,按扬州大学中西医结合研究所创建的方法实施,主要步骤是增殖培养、生物修饰构建、灭活固定、质量检查(包括无支原体、热原质、活细胞等质控);NDV-SGC-7901瘤苗及SC-NDV-SGC-7901瘤苗的构建方法同前,生物构建的NDV的浓度为每毫升含2个病毒活性单位^[5]。

2.2 LAK细胞活性测定

分别取瘤苗免疫后存活的小鼠及同龄正常未免疫小鼠的脾细胞制备LAK细胞。取各组LAK细胞与MFC肿瘤细胞按50:1的比例混合,观察各组杀伤抑制效应。靶细胞为MFC肿瘤细胞,用¹²⁵I-udR法测定

LAK 细胞活性^[6]。

肿瘤细胞的杀伤抑制率(%)=[1-(各实验组 OD 值/对照组 OD 值)]×100%。

2.3 抑制SGC-7901 胃肿瘤细胞肺转移的实验流程

按前述方法将莪术醇、NDV 与培养的 SGC-7901 细胞进行系列生物构建,制成单瘤苗组(SGC-7901)、莪术醇-SGC-7901 瘤苗组、莪术醇-SGC-7901-NDV 瘤苗组、NDV-SGC-7901 瘤苗组(NDV 瘤苗组),另设对照组,分别对 BALB/c 纯系鼠进行免疫接种 3 次(每组 10 个样本,每周 1 次,分前左、右肢,后左、右肢,每肢按三点法接种,用量为每肢 0.4 ml),最后 1 次接种 1 周后,每组分别从尾静脉注射 SGC-7901 细胞悬液 0.2 ml,观察生长情况,若中途死亡则立即解剖记录肺表面的肿瘤转移结节数,在接种瘤细胞的第 30 天,杀死 BALB/c 小鼠取肺,记录肺表面的肿瘤结节数^[7]。

肿瘤肺转移抑制率(%)=[1-(各实验组结节数/对照组结节数)]×100%。

2.4 抑制SGC-7901 胃肿瘤细胞皮下结节的实验流程

按前述方法分组,分别接种各种瘤苗 3 次,从第 4 周开始将培养的 SGC-7901 细胞悬液 0.2 ml 分别注入各组 BALB/c 纯系鼠右臀部皮下,按规定时间测量皮下肿瘤结节的大小。并按设定的时间记录各组 BALB/c 鼠的生存时间(观察时间以 60 天为准)。

肿瘤皮下结节抑制率(%)=[1-(各实验组结节数/对照组结节数)]×100%^[8]。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 8.0 软件对数据进行 *t* 检验。

3 结果

3.1 各组对SGC-7901 皮下肿瘤结节形成的抑制作用比较

表 1 示,莪术醇-SGC-7901-NDV 瘤苗组、莪术醇-SGC-7901 瘤苗组抑制 SGC-7901 胃肿瘤细胞皮下结节形成作用优于其他组($P<0.01$),莪术醇-SGC-7901-NDV 瘤苗组与莪术醇-SGC-7901 瘤苗组比较差异无显著性意义($P>0.05$)。提示中药莪术醇-SGC-7901-NDV 瘤苗组有较好抑制 SGC-7901 胃肿瘤细胞皮下结节形成的作用。

3.2 各组免疫后小鼠及对照组 LAK 细胞对 MFC 杀伤效应比较

表 2 示,经莪术醇-SGC-7901 瘤苗免疫后的 LAK 细胞对 MFC 的杀伤效应优于其他组($P<0.01$),但与莪术醇-SGC-7901-NDV 瘤苗组比较差异无显著性意义($P>0.05$)。提示经中药莪术醇-SGC-7901 瘤苗免疫后的 LAK 细胞能明显增强对 MFC 的杀伤效应。

表 1 各组对SGC-7901 皮下肿瘤结节形成的抑制作用比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	皮下 结节数(个)	皮下结节 抑制率(%)
对照组	10	17.50±2.95	—
单瘤苗组	10	11.90±2.33*	32.00
NDV 瘤苗组	10	7.80±1.93*△	55.43
莪术醇-SGC-7901-NDV 瘤苗组	10	3.20±1.39*△▲	81.71
莪术醇-SGC-7901 瘤苗组	10	3.70±1.70*△▲	78.86

与对照组比较,* $P<0.01$;与单瘤苗组比较,△ $P<0.01$;与 NDV 瘤苗组比较,▲ $P<0.01$

表 2 各组瘤苗免疫后及对照组 LAK 细胞对 MFC 杀伤效应比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	杀伤效应
对照组	10	25.63±4.44
单瘤苗组	10	37.63±10.74*
NDV 瘤苗组	10	53.38±6.00*△
莪术醇-SGC-7901-NDV 瘤苗组	10	88.13±4.58*△▲
莪术醇-SGC-7901 瘤苗组	10	86.38±4.31*△▲

与对照组比较,* $P<0.01$;与单瘤苗组比较,△ $P<0.01$;与 NDV 瘤苗组比较,▲ $P<0.01$

3.3 各组SGC-7901 荷瘤鼠生存时间比较

表 3 示,莪术醇-SGC-7901 瘤苗组与莪术醇-SGC-7901-NDV 瘤苗组对 SGC-7901 荷瘤鼠生存时间的延长作用明显优于 NDV 瘤苗组、单瘤苗组、对照组(均 $P<0.01$)。提示中药莪术醇-SGC-7901 瘤苗组能明显延长 SGC-7901 荷瘤鼠的生存时间。

表 3 各组SGC-7901 荷瘤鼠生存时间比较

组别	样本数	存活天数(天)	存活率(%)
对照组	10	13.50±4.62	22.50
单瘤苗组	10	20.70±5.41*	34.50
NDV 瘤苗组	10	29.10±6.03*△	48.50
莪术醇-SGC-7901-NDV 瘤苗组	10	46.40±11.1*△▲	77.33
莪术醇-SGC-7901 瘤苗组	10	44.20±12.43*△▲	73.67

与对照组比较,* $P<0.01$;与单瘤苗组比较,△ $P<0.01$;与 NDV 瘤苗组比较,▲ $P<0.01$

表 4 各组对SGC-7901 胃肿瘤细胞的肺转移抑制作用比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	肺转移 结节数(个)	肺转移 抑制率(%)
对照组	10	35.70±4.55	—
单瘤苗组	10	24.50±3.69*	31.37
NDV 瘤苗组	10	15.30±2.75*△	57.14
莪术醇-SGC-7901-NDV 瘤苗组	10	5.90±1.97*△▲	83.47
莪术醇-SGC-7901 瘤苗组	10	6.70±1.56*△▲	81.23

与对照组比较,* $P<0.01$;与单瘤苗组比较,△ $P<0.01$;与 NDV 瘤苗组比较,▲ $P<0.01$

3.4 各组对SGC-7901 胃肿瘤细胞的肺转移抑制作用比较

表 4 示,莪术醇-SGC-7901-NDV 瘤苗组、莪术醇-

SGC-7901 瘤苗组对 SGC-7901 胃肿瘤细胞的肺转移抑制效应优于其他组 ($P < 0.01$), 莪术醇-SGC-7901 瘤苗组与莪术醇-SGC-7901 瘤苗组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。提示中药莪术醇-SGC-7901 瘤苗组能明显抑制 SGC-7901 胃肿瘤细胞的肺转移效应。

4 讨论

肿瘤的主动特异性免疫治疗已经历了近 1 个世纪的研究, 它就是利用肿瘤细胞 (肿瘤抗原) 或修饰过的肿瘤细胞物质诱导机体的特异性抗瘤活性, 以阻止肿瘤的生长扩散或复发。传统的肿瘤疫苗主要是利用各种理化方法, 对肿瘤细胞进行处理或修饰, 以增强其抗瘤作用, 总的来说效果尚不理想。近年来, 肿瘤研究学者们开始尝试用中药提取单体或某种非致病病毒对肿瘤细胞进行修饰构建, 提高其免疫原性及杀瘤效应, 为肿瘤特异性主动免疫疗法注入了新的生机^[9]。

本研究利用中药莪术提取的有效成分莪术醇作为天然药物单体对 SGC-7901 细胞进行修饰构建成新型瘤苗, 提高其免疫原性及杀瘤效应, 其特点首先主要表现在杀瘤的特异性, 采用单一特异治疗比非特异性免疫治疗更有针对性; 其二为多效价, 比单一成分瘤苗更易获得有效抗肿瘤效应; 其三呈现抗瘤的持久性, 能启动机体免疫系统、恢复受损的细胞和体液免疫、激活的 TB 淋巴细胞均具有免疫记忆功能; 最后是安全性, 无再种植风险, 无毒副作用, 在帮助肿瘤个体重建受损的 T 淋巴细胞调节网络的同时, 提高机体免疫功能, 从而有效阻止肿瘤的复发和转移^[2]。

研究表明, 用各组免疫接种后长期存活的脾细胞制备的 LAK 细胞, 较同龄未免疫小鼠的脾细胞制备的 LAK 细胞具有更强的抗瘤效应, 各实验组与对照组比较差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。经莪术醇修饰构建的新型瘤苗能明显阻止 SGC-7901 移植瘤的肺转移, 其抑制率为 81.23%, 与对照组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。在抑制皮下肿瘤结节形成方面莪术醇修饰的新型瘤苗亦有其独特的作用, 抑制率为 78.86%, 与对照组比较差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。经莪术醇修饰的 SGC-7901 疫苗能明显延长荷瘤鼠的生存时间, 生存率为 73.67%, 明显优于对照组 ($P < 0.01$)。本研究显示, 由 NDV 构建的疫苗在抑制移植瘤肺转移及皮下结节方面优于对照组而低于莪术醇-SGC-7901 瘤苗组、莪术醇-SGC-7901-NDV 瘤苗组 ($P < 0.01$)。另外, 莪术醇与 NDV 联合修饰的瘤苗其抗瘤效应未呈生物学放大及相加效应, 其原因有待进一步探讨。

参考文献

[1] Zheng S, Yang H, Zhang S, et al. Initial study on naturally

occurring products from traditional Chinese herbs and vegetables for chemoprevention. J Cell Biochem Suppl, 1997, 27: 106~112.

[2] Navarro Dde F, de Souza MM, Neto RA, et al. Phytochemical analysis and analgesic properties of Curcuma zedoaria grown in Brazil. Phytomedicine, 2002, 9(5): 427~432.

[3] 徐立春, 卜平, 陈平, 等. SC 提取物修饰肿瘤细胞疫苗对 MFC、S180 的抗瘤作用. 中华现代全科医学杂志, 2002, 2(6): 1~3.

[4] 吴万垠, 邓嵘, 区勇全, 等. 经肝动脉灌注莪术油微球对大鼠移植性肝癌的治疗作用. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(1): 24~26.

[5] 徐立春, 孙振华, 陈志琳, 等. 三棱、莪术提取物修饰的肿瘤疫苗非特异性抗瘤实验研究. 癌症, 2001, 20(12): 1380~1382.

[6] 曹广文, 杜平. 现代癌症生物治疗学. 北京: 人民军医出版社, 1995: 98~122.

[7] 巴德年主编. 当代免疫学技术与应用. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 388~396.

[8] 季宇彬. 抗癌中药药理与应用. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1999: 995~999.

[9] Morikawa T, Matsuda H, Ninomiya K, et al. Medicinal foodstuffs. XXIX. Potent protective effects of sesquiterpenes and curcumin from Zedoariae Rhizoma on liver injury induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide or tumor necrosis factor- α . Biol Pharm Bull, 2002, 25(5): 627~631.

(收稿日期: 2006-02-28; 修回日期: 2006-05-08)

《读经典做临床》栏目征稿通知

本栏目是为了配合国家中医药管理局 2003 年启动的“优秀中医临床人才研修项目”而设立, 将于 2007 年 1 月第 1 期正式推出。近年来由国家组织的“优秀中医临床人才研修项目”中通过严格考核选拔出来的 200 余名中医临床专家, 既有良好的经典理论基础, 又有丰富的临床实践经验, 理应将最能体现他们学术水平的经验予以集中报道, 并和中医药学术界进行广泛的交流。本刊曾报道了许多名老中医的宝贵临床经验, 受到广泛欢迎, 推动了中医临床学术的发展。为此, 我们设立本专栏, 专载首批“优秀中医临床人才研修项目”学员丰富的临床经验。征稿要求如下:

征稿对象: 国家中医药管理局 2003 年启动的“优秀中医临床人才研修项目”的 213 名学员和主要组织者。征稿内容: 能代表作者读经典作临床最高学术水平的内容, 要紧密结合临床实践。文字要求: 以 2000~4000 字为宜, 文字力求精炼、概括。文稿格式: 参考《中医杂志》。文末另附 200 字以内的个人小传, 注明作者详细通讯地址、联系方式、电子信箱。并随稿寄 2 寸照片 1 张。

来稿寄至: 北京东直门内南小街 16 号 (100700) 中医杂志社 1 号编辑, 并注明“读经典作临床”栏目论文。联系人: 刘国正 (电话: 010-84032289, 64014411 转 3034; 13601284793; 电邮: liugz@mail.cintcm.ac.cn) 梁峻 (特邀编审, 电话: 13501246476; 电邮: lj3812@163.com)