

# 浙山蛭抗癌作用的实验研究

熊耀康 王平<sup>1</sup> 黄绳武 严云良 金貽郎(杭州 310009 浙江中医学院;<sup>1</sup> 浙江中医学院 93 级硕士研究生)

**摘要** 对浙山蛭的抗癌作用进行了研究,结果显示:浙山蛭高剂量对 S<sub>180</sub> 实验小鼠具抑瘤作用,抑瘤率为 33.63%,它还可以增强 S<sub>180</sub> 肉瘤小鼠 NK 活性、明显提高 T 淋巴细胞的转化率并提高艾氏腹水瘤小鼠存活天数。

**关键词** 浙山蛭;抗癌;T 淋巴细胞转化率

## Experimental study on antineoplastic effects of *Spirobolus walkeri* pocock

Xiong Yaokang (Xiong YK), Wang Ping (Wang P), Huang Shengwu (Huang SW), et al (Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310009)

**ABSTRACT** The animal experiments have shown that the high dose of *Spirobolus walkeri* pocock may inhibit tumor with the inhibiting rate in 33.63%, enhance the activity of natural killer cell and significantly increase T lymphocyte transformation rate in mice carried Sarcoma - 180, prolong the vital stage of the EAC transplanted mice.

**KEY WORDS** *spirobolus walkeri* pocock, anti - tumor, T lymphocyte transformation rate

浙山蛭 (*Spirobolus walkeri* Pocock.) 为多足纲、山蛭虫科动物,它与燕山蛭 (*Spirobolus bungii* Brandt.) 同属,有关燕山蛭的抗癌作用已被证实,而作为与之同属不同种的浙山蛭,在浙江等地区资源非常丰富,在民间也有将其作为抗癌药使用,为了在动物药中寻找有效的抗癌药物,证实浙山蛭抗癌作用,本文就浙山蛭抗癌作用方面进行了实验研究,现将结果报道如下。

### 1 材料

**1.1 动物:** NIH 系小鼠,6 周龄左右,体重 18 ~ 22g (浙江中医学院实验动物中心)。

**1.2 药材及制剂:** 浙山蛭采自浙江省临安县西天目山,经作者鉴定为山蛭虫科、山蛭虫属浙山蛭 (*Spirobolus walkeri* Pocock.) 的动物全体。将浙山蛭于 50 ~ 60℃ 烘干后用万能粉碎机粉碎,过 100 目筛,取粉末用蒸馏水分别配成 0.1、0.2 和 0.3g/ml 的悬浮溶液,备用。

1.3 瘤株: S<sub>180</sub>肉瘤及艾氏腹水瘤(浙江省中医药研究院)。

1.4 细胞株: YAC-1 细胞株(浙江省中医药研究院基础所)。

1.5 药物: 环磷酰胺(CTX, 上海第十二制药厂); 人参(杭州长春药店)。

1.6 试剂: 刀豆球蛋白(Con-A, Sigma 公司); <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H-TdR, 中国科学院上海原子核研究所); RPMI-1640 培养液: 每 1000ml 含 Hepes 25mmol, 谷氨酰胺 2mmol, 2-ME 50μmol, 小牛血清 10%, 青霉素、链霉素各 100u/ml。

1.7 仪器: 超净工作台(苏州净化设备厂); 平板离心机(北京医用离心机厂); TG-328B 型电光分析天平(上海天平仪器厂); 万能粉碎机(河北省黄骅市家务科研器械厂); 微量取样器(上海求精玻璃仪器厂)。

## 2 方法与结果

2.1 对 S<sub>180</sub>肉瘤小鼠的影响: 按无菌操作程序, 从接种后 9d, 肿瘤生长及动物健康程度较好的瘤源动物中取出瘤块, 剔除骨骼及坏死部分, 并剪成碎块, 置于无菌匀浆器中以 1:3 无菌生理盐水(NS)稀释后匀浆制成瘤细胞悬液, 经 2% 台盼兰染色计算活细胞数大于 95%, 调整瘤细胞悬液浓度为 1 × 10<sup>7</sup> 个瘤细胞/ml。选健康 NIH ♂ 小鼠(6 周龄) 50 只, 体重 18 ~ 22g, 每只小鼠右侧腋窝皮下接种瘤细胞悬液 0.2ml, 24h 后随机分成 NS、浙山蚤低剂量(2g/kg)、浙山蚤中剂量(4g/kg)、浙山蚤高剂量(6g/kg)、CTX(0.02g/kg) 5 组, 每组各 10 只, 除 CTX 组外, 每只每天以 0.2ml/10g 灌胃给药, 连续 10d, CTX 组于第 1 及第 3 天各腹腔注射一次 CTX, 每次剂量为 20mg/kg, 用药 10d 后, 未发现动物死亡, 在末次给药 2h 后, 将小鼠处死, 并立即取瘤称重, 然后以抑瘤率 % =  $\frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$  公式计算, 抑瘤率结果见表 1。

表 1 浙山蚤不同剂量对 S<sub>180</sub>肉瘤的抑制作用( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量(g/kg)	瘤重(g)	抑瘤率(%)	P 值	
				与 NS 比较	与 CTX 比较
NS	等容积	2.2162 ± 0.2136		<0.001	
低剂量	2	2.0508 ± 0.2275	7.46	>0.05	<0.001
中剂量	4	1.7632 ± 0.3121	20.44	<0.01	<0.001
高剂量	6	1.4710 ± 0.1792	33.63	<0.001	<0.001
CTX	0.02	0.9564 ± 0.1502	56.85	<0.001	<0.001

2.2 对 S<sub>180</sub>肉瘤小鼠自然杀伤细胞活性(NK 活性)的影响: 取 NIH 小鼠 60 只, 其中 50 只接种 S<sub>180</sub>肉瘤, 并随

机将其分成 NS、浙山蚤低剂量(2g/kg)、浙山蚤中剂量(4g/kg)、浙山蚤高剂量(6g/kg)、人参(2g/kg) 5 组, 每组各 10 只, 每天每只以 0.2ml/10g 灌胃给药, 连续喂药 10d。余下的 10 只为正常对照组。第 11 天把小鼠断颈处死, 在无菌条件下取出脾脏, 剪刀剪碎, 100 目尼龙网过滤, Tris-NH<sub>4</sub>Cl 液洗 2 次, 加入 5ml Hanks 液中, 于 1500r/min × 10min 离心, 弃上清液, 加 2 ~ 3ml 工作培养液[含 10% FCS(S)], 1500r/min × 5min 离心, 配成 2 × 10<sup>7</sup> 个/ml 的脾细胞悬液, 取 100μl 脾细胞悬液以及 50μl 预先用 <sup>3</sup>H-TdR 标记的 YAC-1 靶细胞悬液(2 × 10<sup>5</sup> 个/ml), 分别加入 96 孔圆底板中, 效应细胞/靶细胞比为 200/1, 每鼠设复孔, 同时设 YAC-1 对照孔, 将 96 孔板置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 16h, 培养终止按常规法收集细胞并测定每分钟脉冲数(cpm), 按细胞毒指数(CI%) =  $\frac{\text{对照孔}_{\text{cpm}} - \text{实验孔}_{\text{cpm}}}{\text{对照孔}_{\text{cpm}}} \times 100\%$  公式计算, 并用细胞毒指数来表示 NK 活性, 实验结果见表 2。

表 2 浙山蚤不同剂量对 S<sub>180</sub>小鼠 NK 活性的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量(g/kg)	NK 活性(CI%)	P 值	
			与 NS 比较	与人参比较
NS	等容积	19.8 ± 4.7	<0.001	
低剂量	2	20.3 ± 6.4	>0.05	<0.01
中剂量	4	20.6 ± 5.9	>0.05	<0.01
高剂量	6	28.5 ± 9.6	<0.05	>0.05
人参组	2	29.5 ± 5.7	<0.001	
对照组		57.4 ± 11.7	<0.001	<0.001

2.3 对 S<sub>180</sub>肉瘤小鼠 T 淋巴细胞转化功能的影响: 动物分组、喂药及效应细胞的制备同前, 取 2 × 10<sup>7</sup> 个/ml 脾细胞悬液 100μl, 加入 96 孔平底板内, 每鼠 2 孔, 另外每孔加入含 Con-A 的完全 1640 培养液 100μl(Con-A 终浓度为 10μg/ml), 同时设不加 Con-A 的对照孔, 将 96 孔板置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 72h, 培养终止前 16h 向每孔加入 <sup>3</sup>H-TdR/uci(luci/50μl), 在终止培养后用变头细胞样品收集器将各孔之细胞分别吸于 4P 型玻璃纤维滤膜上, 用双蒸水洗涤 10 次后, 置 80℃ 烘箱中干燥 30min, 用打孔器将每个样品的滤片取下, 放入含有 7ml 闪烁液的闪烁瓶中, 避光过夜, 次日, 用液体闪烁计数器测样品的每分钟脉冲数(cpm), 以 cpm 来反映细胞内 <sup>3</sup>H-TdR 掺入 DNA 的量, 用以表示细胞增殖的速度, 结果见表 3。

2.4 对艾氏腹水瘤小鼠生存期的影响: 选择接种后 8d, 健康较好瘤株鼠, 脱颈处死, 固定, 用 75% 的医用酒精消毒腹部皮肤, 并用手术剪剪开, 使腹部皮肤与腹部

表3 浙山蚤不同剂量对 S<sub>180</sub>小鼠 T 淋巴细胞转化功能的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 (g/kg)	转化 cpm 值	P 值	
			与 NS 比较	与人参比较
NS	等容积	8871 ± 2278		> 0.05
低剂量	2	9600 ± 6685	> 0.05	> 0.05
中剂量	4	13180 ± 4534	< 0.05	> 0.05
高剂量	6	13774 ± 6393	< 0.05	> 0.05
人参组	2	18580 ± 14838	> 0.05	
对照组		21856 ± 13626	< 0.01	> 0.05

粘膜分离,用无菌针筒抽取腹水,用生理盐水稀释成瘤细胞浓度为  $1 \times 10^7$  个/ml 的悬液,经台盼兰染色,活细胞计数大于 95%。再选健康情况良好,体重 18 ~ 22g 的♂ NIH 小鼠 40 只,按无菌操作程度每只腹腔内注入瘤细胞悬液 0.2ml,24h 后随机分成生理盐水(NS)、浙山蚤低剂量(2g/kg)、浙山蚤中剂量(4g/kg)、浙山蚤高剂量(6g/kg)组,每组各 10 只,每天以 0.2ml/10g 剂量灌胃,连续 10d,观察艾氏腹水瘤小鼠存活天数,结果见表 4。

### 3 小结与讨论

3.1 从浙山蚤对 S<sub>180</sub>肉瘤小鼠影响的结果分析来看,浙山蚤有一定的抑瘤作用,而且不同剂量对抑瘤效果有所不同,低剂量效果不明显,高剂量显示出了抑瘤苗

表4 浙山蚤对艾氏腹瘤小鼠生存期的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 (g/kg)	生存天数	生命生长率 (%)	P 值*
低剂量	2	20.2 ± 6.4944	22.42	> 0.05
中剂量	4	24.2 ± 5.7697	46.67	< 0.01
高剂量	6	25.7 ± 5.9264	55.76	< 0.01

注: \* 与 NS 比较

头,并且抑瘤率与低、中、高各剂量之间基本呈现剂量相关关系。

3.2 机体免疫状态与肿瘤发生发展有着密切的关系,肿瘤免疫以细胞免疫为主,细胞免疫的效应细胞主要有 T 细胞和非 T 细胞(以 NK 为代表)。通过浙山蚤对 S<sub>180</sub>小鼠 NK 活性的影响及 T 淋巴细胞转化功能实验表明,浙山蚤可以增强 S<sub>180</sub>肉瘤小鼠的 NK 活性和提高 T 淋巴细胞转化率。

3.3 在对艾氏腹水瘤小鼠生存期实验中,证明生命延长率与浙山蚤剂量存在一定的相关关系,其中高剂量组为 55.76%( $P < 0.01$ )。

综合以上结果,显示浙山蚤是一在抗癌方面值得开发并有价值的药用动物。