

番茄红素联合 CIK 治疗的抗肿瘤作用的实验研究 *

陈立武¹ 曾志刚² 林 东² 陈志钦² 桂 翔²

(1 福建省第二人民医院普外科 福建 福州 350003 2 福建省第二人民医院二化分院外科 福建 福州 350003)

摘要 目的 探讨番茄红素联合细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)治疗的抗肿瘤作用及相应机制。方法 建立荷 B16-F10 黑色素瘤小鼠模型 观察联合治疗对肿瘤体积、宿主生存时间、淋巴细胞增殖活力及淋巴细胞杀伤能力的影响。结果 :CIK 及番茄红素治疗均可以抑制肿瘤的生长,延长荷瘤鼠的生存时间。与 CIK 治疗组相比较,中高剂量的番茄红素联合 CIK 治疗可以显著增强抗肿瘤疗效,延长荷瘤鼠的生存时间,并且可以通过刺激荷瘤鼠淋巴细胞增殖、增强淋巴细胞对肿瘤的杀伤能力提高 CIK 治疗的抗肿瘤疗效。结论 :番茄红素能够通过提高宿主免疫水平而显著增强 CIK 治疗的抗肿瘤效果。

关键词 番茄红素 细胞因子诱导的杀伤细胞 荷瘤小鼠

中图分类号 R730.5 R285.5 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2012)14-2638-04

Experimental Studies on the Anti-Tumor Effects of Combined Treatment with Lycopene and Cytokine-Induced Killer*

CHEN Li-wu¹, ZENG Zhi-gang², LIN Dong², CHEN Zhi-qin², GUI Xiang²

(1 Department of General Surgery, The Second People's Hospital of Fujian Province, Fujian, Fuzhou 350003;

2 Department of Surgery, The Erhua Branch of the Second People's Hospital of Fujian Province, Fujian, Fuzhou 350003 China)

ABSTRACT Objective: The present study was aimed to assess the anti-tumor effects of combined treatment with lycopene and cytokine-induced killer (CIK) and to investigate the possible mechanism involved. **Methods:** B16-F10 melanoma tumor-bearing mice model was established and changes in tumor volume, survival of recipients, lymphocyte proliferation and cytotoxicity after combined treatment were analyzed. **Results:** Both CIK and lycopene treatment can inhibited tumor growth and prolonged the survival of recipients. Compared with CIK treatment, combined treatment with lycopene and CIK could significantly enhance the anti-tumor effects, prolong the survival of recipients, promote the proliferation of lymphocyte subsets and increase the cytotoxicity of lymphocyte. **Conclusion:** Lycopene treatment could increase the levels of host immunity and thus promote the anti-tumor effects of CIK.

Key words: Lycopene; Cytokine-induced killer; Tumor-bearing mice

Chinese Library Classification(CLC): R730.5, R285.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)14-2638-04

番茄红素是类胡萝卜素的一种,它主要来自于番茄及其相关产物^[1-3]。与其它类胡萝卜素比较,具有更为优越的性能,如其抗氧化性能在其他类胡萝卜素中最强^[4-6]。有研究表明,吃番茄可以减少癌症的发生^[7-9]。细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)是一种过继免疫治疗方法,将自体或者异体淋巴细胞经体外培养后,输注到患者体内抗肿瘤方法,已经广泛应用于临床并取得疗效^[10-14]。本研究通过应用番茄红素联合 CIK 的治疗方法,探讨番茄红素在 CIK 治疗肿瘤中的协同作用和可能的免疫机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选择雌性 6-8 周,体重 18-24g 的 C57BL/6(H-2^b)36 只,购自北京维通利华公司。

1.1.2 试剂 台盼蓝、MTT 由购于美国 sigma 公司,LDH 试剂盒购于瑞士罗氏公司。

1.2 CIK 细胞制备

取健康供血者的肝素抗凝血,经淋巴细胞分层液密度梯度离心分离 PBMC。CIK 细胞的诱导:PBMC 以 RPMI 1640 调至 1×10^6 个/ml,第 0d 加入 IFN- γ 100U/ml,放置 37℃ 5% CO₂ 孵箱中培养 24h,第 1d 加入 IL-1 100U/ml,CD3 单抗 15 μ l/ml,重组 IL-2 300U/ml,继续培养。每 4d 换新鲜培养液,调细胞数为 1×10^6 个/ml,补加 IL-2 100U/ml,另外每 8d 补加 CD3 单抗 15 μ l/ml,第 15d 收获细胞作细胞毒测定

1.3 荷瘤鼠肿瘤的生长

将 5×10^4 个 B16-F10 黑色素瘤细胞接种于 C57BL/6 小鼠皮下,随机分为 6 组:A.对照组、B.CIK 组、C.番茄红素组、D.番茄红素低剂量(3mg/kg)+CIK 组、E.番茄红素中剂量(6mg/kg)+CIK 组、F.番茄红素高剂量(9mg/kg)+CIK 组。每组 6 只。番茄红素组予以中剂量番茄红素治疗。肿瘤生长至第 5 天时,按照分组尾静脉注射 CIK、灌胃不同剂量番茄红素,对照组注射及灌胃同体积的生理盐水。每 3 天观察小鼠肿瘤的生长情况,用游标卡尺测量小鼠肿瘤的长径和短径,并计算肿瘤体积。肿瘤体

* 基金项目:中美多中心合作课题《益气养阴中药增强消化道肿瘤患者术后免疫功能的研究》(2008DFA32200)

作者简介:陈立武(1968-)男,医学硕士,副教授,副主任医师,福建省第二人民医院普外科副主任

主要研究方向:癌症的基础和临床 E-mail: fjchenlw@126.com

(收稿日期:2011-11-06 接受日期:2011-12-02)

积 $V = \text{肿瘤长径} \times \text{肿瘤短径} \times \text{肿瘤短径} / 2$ 。同时观察小鼠的生存时间。

1.4 番茄红素对淋巴细胞增殖影响

给药后 10 天处死各组小鼠, 每组 6 只, 75%酒精浸泡 5 分钟, 在超净台内取小鼠脾脏。制成单细胞悬液, 加入红细胞裂解液溶解红细胞, 1000 rpm 离心 10 min, 去上清, 再 PBS 重悬细胞, 洗涤 3 遍。沉淀为脾淋巴细胞, 应用 MTT 颜色反应法测定淋巴细胞增殖功能^[15]。

1.5 番茄红素对淋巴细胞杀伤能力的影响

B16-F10 作为靶细胞备用。将效应细胞和靶细胞按照 E:T 比例(E:T=25:1, 50:1)混合, 按 100 μ l/孔, 加入培养板的相应孔内, 无靶细胞组加入 100 μ l 含有 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基。LDH 法检测各组小鼠淋巴细胞的杀伤能力。特异性杀伤率(%)= (实验组释放—实验组自发释放—靶细胞自发释放 / 靶细胞最大释放—靶细胞自发释放) $\times$ 100%。

1.6 统计学处理

正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间差异比较用单因素方差分析, 两两比较采用 Tukey 检验, 所有统计分析均采用 SPSS13.0 统计软件包进行, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量番茄红素对肿瘤生长的抑制

C57BL/6 小鼠右腋下皮下接种 5×10^4 个 hepa 1-6 细胞, 接种 5.6 天后, 肿瘤开始长出, 全部小鼠腋下均可触及肿瘤, 成

瘤率为 100%, 肿瘤生长速度尚均匀。四组小鼠之间, 对照组肿瘤生长速度最快。在接种 B16-F10 肿瘤细胞 17 天后, 对照组、低、中、高剂量番茄红素青组, 肿瘤平均体积分别为 1621.52、967.63、906.45、837.75、644.37、543.22 mm^3 , 与对照组比较, 各组均有显著的抗肿瘤作用, 其中番茄红素组、CIK 组 $P < 0.05$ 、低中高番茄红素 +CIK 组 $P < 0.01$ 。与 CIK 组比较, 中、高剂量番茄红素组 +CIK 组差异有统计学意义 $P < 0.05$ 肿瘤生长曲线见(见图 1)及小鼠的生存时间(见表 1), 与对照组相比, 各组荷瘤小鼠均获得更长的平均生存时间。

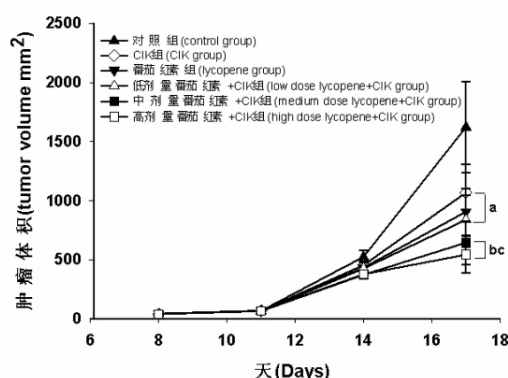


图 1 肿瘤体积

Fig.1 Tumor volume

注 a 与对照组比较 $P < 0.05$ b 与对照组比较 $P < 0.01$ c 与 CIK 组比较 $P < 0.05$ 。

Note: a Compared with control group, $P < 0.05$; b Compared with control group, $P < 0.05$.

表 1 平均生存时间

Table 1 The mean survival of recipients

分组 Groups	平均生存时间(day) The mean survival
A 对照组 A control group	28.5 $\pm$ 4.23
B CIK 组 B CIK group	36.6 $\pm$ 3.85 ^a
C 番茄红素 C lycopene treatment group	37.4 $\pm$ 5.32 ^a
D 低剂量番茄红素 +CIK 组 D low dose lycopene+CIK group	37.2 $\pm$ 4.97 ^a
E 中剂量番茄红素 +CIK 组 E medium dose lycopene+CIK group	40.6 $\pm$ 5.75 ^b
F 高剂量番茄红素 +CIK 组 F high dose lycopene+CIK group	42.8 $\pm$ 5.38 ^b

注 a 与对照组比较 $P < 0.05$ b 与对照组比较 $P < 0.01$

Note: a Compared with control group, $P < 0.05$; b Compared with control group, $P < 0.01$

2.2 番茄红素对小鼠淋巴细胞增殖的影响

在淋巴细胞增殖活力的检测中(表 2), 与对照组比较, CIK 组差异无统计学意义, 番茄红素组、中剂量番茄红素 +CIK 组、高剂量番茄红素 +CIK 组可以显著增强淋巴细胞的增殖活力 ($P < 0.01$)。与 CIK 组比较, 中剂量番茄红素 +CIK 组、高剂量番茄红素 +CIK 组可以显著增强淋巴细胞的增殖活力 ($P < 0.01$)。

2.3 番茄红素对淋巴细胞杀伤能力的影响

C57BL/6 来源的淋巴细胞分别和肿瘤细胞混合培养 (MLTC) LDH 法检测给药后第 10 天, 各组小鼠淋巴细胞对 B16-F10 黑色素瘤细胞的杀伤活性, 发现输注番茄素后, 可以提高淋巴细胞对 B16-F10 黑色素瘤细胞的杀伤活性, 且这种现象呈剂量依赖趋势。

表 2 淋巴细胞增殖活力
Table 2 The proliferation of lymphocyte

分组 Groups	增殖活力 The proliferation of lymphocyte
A 对照组 A control group	0.253± 0.059
B CIK 组 B CIK group	0.284± 0.064
C 番茄红素组 C lycopene treatment group	0.363± 0.069 ^b
D 低剂量番茄红素 +CIK 组 D low dose lycopene+CIK group	0.314± 0.077
E 中剂量番茄红素 +CIK 组 E medium dose lycopene+CIK group	0.385± 0.075 ^{b,c}
F 高剂量番茄红素 +CIK 组 F high dose lycopene+CIK group	0.403± 0.058 ^{b,c}

注 b 与对照组比较 P<0.01 c 与 CIK 组比较 P<0.01

Note: b Compared with control group, P<0.01; c Compared with CIK group, P<0.01

表 3 淋巴细胞杀伤能力
Table 3 The cytotoxicity of lymphocyte

分组 Groups	杀伤活性(%) The cytotoxicity of lymphocyte (%)	
	25 :1	50 :1
A 对照组 A control group	1.43± 0.08	3.64± 1.24
B CIK 组 B CIK group	2.93± 0.12	8.73± 2.23
C 番茄红素组 C lycopene treatment group	4.67± 0.13 ^{b,c}	15.28± 3.85 ^{b,c}
D 低剂量番茄红素 +CIK 组 D low dose lycopene+CIK group	3.96± 2.14 ^{b,c}	12.74± 2.81 ^b
E 中剂量番茄红素 +CIK 组 E medium dose lycopene+CIK group	6.24± 1.85 ^{b,c}	19.52± 4.36 ^{b,c}
F 高剂量番茄红素 +CIK 组 F high dose lycopene+CIK group	8.93± 3.36 ^{b,c}	23.73± 3.96 ^{b,c}

注 b 与对照组比较 P<0.01 c 与 CIK 组比较 P<0.01

Note b Compared with control group, P<0.01; c Compared with CIK group, P<0.01

3 讨论

番茄红素广泛分布于各种植物中,其中番茄、胡萝卜、西瓜、红色葡萄柚等的果实中含量较高^[1-3]。在人体的各种器官和组织中,如血液、肾上腺、肝脏、睾丸等也含有较多的番茄红素^[16]。研究者们对番茄红素的抗肿瘤作用进行了多项研究,发现其具有抗氧化、清除自由基、防止脂蛋白和 DNA 被氧化破坏、抑制癌细胞转移增殖因子的遗传表达等作用^[17-19],预防癌症并抑制肿瘤生长。本实验中,我们将番茄红素和 CIK 细胞联合应用,观察其抗肿瘤的疗效及可能的抗肿瘤机制。

本研究建立荷黑色素瘤小鼠模型,探讨不同剂量番茄红素联合 CIK 治疗的抗肿瘤作用,发现番茄红素、CIK、低中高剂量番茄红素均,均能抑制小鼠肿瘤细胞生长,延长小鼠生存时间,

而中、高剂量番茄红素可以协同 CIK 治疗,增强抗肿瘤疗效,并且观察到剂量依赖的趋势。

CIK 主要通过以下机制发挥抗肿瘤作用:①可被淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)有关识别结构激活,释放毒性颗粒②通过表面 CD3 受体结合激活 CIK 细胞,释放毒性颗粒③产生大量炎性细胞因子,杀伤或抑制肿瘤④诱导肿瘤细胞凋亡等^[10-14]。而番茄红素可以激活小鼠免疫来发挥抗肿瘤作用和协同 CIK 治疗。先前研究者们发现,荷瘤小鼠在生长过程中,荷瘤鼠淋巴细胞数量会进行性下降^[20],免疫活性减弱,而番茄红素可以逆转的这种趋势,增强荷瘤鼠免疫^[17-19]。我们的研究也证实了这一点,较单用 CIK 治疗相比,增加番茄红素治疗可以剂量依赖性地促进荷瘤小鼠淋巴细胞的增殖,增强淋巴细胞对肿瘤的杀伤能力,从而获得更佳的抗肿瘤疗效。同时,所有小鼠均未观察到

任何不良反应。这表明番茄红素联合 CIK 可进一步激活荷瘤鼠免疫并对肿瘤细胞进行杀伤。

综上所述,番茄红素能够通过提高宿主免疫水平而显著增强 CIK 治疗的抗肿瘤效果。番茄红素素作为新型的抗肿瘤药物进一步临床应用的潜在价值值得进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] Campoio TR, Oliveira FA, Otton R, et al. Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables [J]. *Molecules*, 2011,16(2): 1710-1738
- [2] Nitsche C, Simon P, Weiss FU, et al. Environmental risk factors for chronic pancreatitis and pancreatic cancer [J]. *Dig Dis*, 2011,29(2): 235-242
- [3] Gupta SC, Kim JH, Kannappan R, et al. Role of nuclear factor κ B-mediated inflammatory pathways in cancer-related symptoms and their regulation by nutritional agents[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011,236(6):658-671
- [4] Khoo HE, Prasad KN, Kong KW, et al. Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables [J]. *Molecules*, 2011,16(2): 1710-1738
- [5] Nagao A. Absorption and metabolism of dietary carotenoids[J]. *Biofactors*, 2011,37(2):83-87
- [6] Capanoglu E, Beekwilder J, Boyacioglu D, et al. The effect of industrial food processing on potentially health-beneficial tomato antioxidants [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2010,50(10):919-930
- [7] Reynolds JV, Donohoe CL, Doyle SL. Diet. Obesity and cancer[J]. *Ir J Med Sci*, 2011,180(2):521-527
- [8] Lu R, Dan H, Wu R, et al. Lycopene: features and potential significance in the oral cancer and precancerous lesions [J]. *J Oral Pathol Med*, 2011,40(5):361-368
- [9] Chang CC, Chen WC, Ho TF, et al. Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms[J]. *J Biosci Bioeng*, 2011,111(5):501-511
- [10] Takei F. LAK cell therapy of AML: Not to be lost in translation[J]. *Exp Hematol*, 2011,39(11):1045-1046
- [11] He M, Wang Y, Shi WJ, et al. Immunomodulation of inducible co-stimulator (ICOS) in human cytokine-induced killer cells against cholangiocarcinoma through ICOS/ICOS ligand interaction[J]. *J Dig Dis*, 2011,12(5):393-400
- [12] Huang X, Chen YT, Song HZ, et al. Cisplatin pretreatment enhances anti-tumor activity of cytokine-induced killer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(25):3002-3011
- [13] Zhong R, Teng J, Han B, et al. Dendritic cells combining with cytokine-induced killer cells synergize chemotherapy in patients with late-stage non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011,60(10):1497-1502
- [14] Laport GG, Sheehan K, Baker J, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011,17(11):1679-1687
- [15] Han H, Peng JR, Chen PC, et al. A novel system of artificial antigen-presenting cells efficiently stimulates Flu peptide-specific cytotoxic T cells in vitro[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011,411(3):530-535
- [16] Minhthly L, Ngugen, Steven J, et al. Lycopene :Chemical and Logical Properties[J]. *Food Technology*,1999,53(2):38-45
- [17] Palozza P, Parrone N, Simone R, et al. Role of lycopene in the control of ROS-mediated cell growth: implications in cancer prevention[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(12):1846-1860
- [18] Glauert HP, Calfee-Mason K, Stemm DN, et al. Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: a review[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54(7):875-896
- [19] Tabassum A, Bristow RG, Venkateswaran V. Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: a good thing?[J]. *Cancer Treat Rev*, 2010,36(3):230-234
- [20] Yin X, Yan X, Yang Q, et al. Antitumor mechanism of recombinant murine interleukin-12 vaccine[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2010, 25(3):263-268
- [1] (上接第 2637 页)
- [11] O'reilly MS, Boehm T, Folkman J, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *Cell*, 1997,88(2):277-285
- [12] Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, et al. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(3):1024-1029
- [13] Bloch W, Huggel K, Sasaki T. The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing [J]. *FASEB J*, 2000, 14 (45):2373-2376
- [14] MacDonald NJ, Shivers WY, Narum DL, et al. Endostatin binds tropomyosin. A potential modulator of the antitumor activity of endostatin[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(27):25190-25196
- [15] 任明华,王淑静,林雪松,等.重组人内皮抑素的结构改造及抗肿瘤活性变化 [J].*中国生物化学与分子生物学报*, 2005, 21(1):45-52
Ren Ming-hua, Wang Shu-jing, Lin Xue-song, et al. Structural Modification and Anti-tumor Activity Change of Recombinant Human Endostatin [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 21(1):45-52
- [16] Saiki I, Murata J, Matsuno K, et al. Anti-metastatic and anti-invasive effects of polymeric Arg-Gly-Asp (RGD) peptide, poly(RGD), and its analogues[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1990,81(6-7):660-667
- [17] Kumagai H, Tajima M, Ueno Y, et al. Effect of cyclic RGD peptide on cell adhesion and tumor metastasis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 31:177(1):74-82
- [18] X W, Ye P, Li Z, et al. Endostar, a recently introduced recombinant human endostatin, inhibits proliferation and migration through regulating growth factors, adhesion factors and inflammatory mediators in choroid-retinal endothelial cells [J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2010,44(4): 664-670
- [19] Feng R, Huang Xj. Preliminary study on the anti-leukemia effect of recombinant human endostatin [J]. *Chinese Journal of Hematology*, 2010, 31(7):461-465
- [20] Xiao H, Kan X, Jin DJ, et al. The inhibitory mechanism of endostatin on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2006, 6(7):24-26
- [21] Mao W, Kong J, Dai J, et al. Evaluation of recombinant endostatin in the treatment of atherosclerotic plaques and neovascularization in rabbits[J]. *Zhejiang Univ Sci B*, 2010, Aug,11(8):599-607