

## 红色诺卡氏菌的生物活性

张祝兰\* 唐文力 黄颖桢 洪金基

(福建省微生物研究所 福建 福州 350007)

**摘要:** 为了考察红色诺卡氏菌菌体(NC)的生物活性,通过一定浓度的 NC 对小鼠灌胃给药,检测其毒性及对免疫器官、巨噬细胞(MΦ)吞噬功能的影响和对肉瘤 S<sub>180</sub> 抑制作用。结果表明小鼠口服 NC, LD<sub>50</sub>>10 g/kg; NC 明显增加小鼠胸腺脾脏重量、提升白细胞数量和提高小鼠 MΦ 的吞噬活性;对小鼠腹腔 MΦ 具有明显的激活作用,激活了的 MΦ 能增强抑杀白色念珠菌作用,正常的小鼠 MΦ 也有一定的杀菌作用,两者差异显著;对小鼠 S<sub>180</sub> 腹水型转实体瘤具有明显的抑制作用。由此得出的结论是,NC 毒性低,能显著增强机体免疫功能,具有抗病原微生物感染及明显的抑瘤作用。

**关键词:** 红色诺卡氏菌, 免疫, 抑瘤, 生物活性

## Bioactivity of *Nocardia rubra* Cell

ZHANG Zhu-Lan\* TANG Wen-Li HUANG Ying-Zhen HONG Jin-Ji

(Fujian Provincial Institute of Microbiology, Fuzhou, Fujian 350007, China)

**Abstract:** To investigate the bioactivity of *Nocardia rubra* Cell (NC), the mice were used to assay the toxicity, the effects on immune organs, phagocytes of peritoneal macrophage and the antitumor activity by perfusion of NC to the stomach of mice. Results indicated that NC could obviously stimulate *in vitro* the phagocytosis of peritoneal macrophage from mice, and remarkably inhibit the growth of S<sub>180</sub> in mice, and its LD<sub>50</sub> was more than 10 g/kg. In conclusion, NC had low toxicity, it could significantly enhance the organism immunologic function and had obvious antitumor effect and the anti-infection effect against a pathogenic microorganism.

**Keywords:** *Nocardia rubra* Cell, Immunity, Antitumor, Bioactivity

在从微生物筛选生物活性物质过程中,筛选到一株红色诺卡氏菌 *Nocardia rubra* 03-PO-8<sup>[1]</sup>, 其细胞壁骨架 (*Nocardia rubra* cell wall skeleton, N-CWS)与 BCG、CP、干扰素、胸腺因子 D 等同属生物反应调节剂,已证实 N-CWS 能激活机体免疫功能,增强免疫细胞的活性,诱导干扰素等细胞因子<sup>[2,3]</sup>,适用于各种肿瘤引起的胸腹水的控制,肺癌、恶性黑色素瘤、膀胱癌、恶性淋巴瘤、晚期胃癌和食道癌的

辅助治疗<sup>[4,5]</sup>。但临床上应用的是 N-CWS 针剂,注射给药可能出现局部皮肤红肿结节,个别会溃疡,部分患者有发热反应等副作用,有的患者因此被迫停药,影响病人的继续治疗<sup>[6]</sup>。目前尚未见红色诺卡氏菌菌体(NC)的相关免疫药理药效学方面的报道,本研究通过对小鼠灌胃给药探讨 NC 的毒性、免疫活性及抑瘤活性,旨在为寻找最佳的给药途径提供依据。

\* 通讯作者: Tel: 86-591-83470740; ✉: jessylan9963@sina.com  
收稿日期: 2008-07-31; 接受日期: 2008-11-07

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株: *Nocardia rubra* 03-PO-8, *Candida albicans* ATCC 11653(本所提供)。

1.1.2 试剂: 葡萄糖(分析纯, 中国医药集团上海化学试剂厂), 酵母粉(DIFCO)。

1.1.3 动物: ICR 小白鼠(购自福建医科大学动物实验中心, 雌雄各半, 体重 18 g~22 g)。

1.1.4 瘤株: 肉瘤 S<sub>180</sub>(购自中国科学院上海药物所, 福建医科所传代保种)。

1.1.5 培养基: YD 培养基。

1.1.6 0.075%中性红: 称 75 mg 中性红(Neutral red, C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>Cl, 生物染色素, 上海试剂三厂)溶于 100 mL 生理氯化钠溶液中, 高压灭菌。

1.1.7 细胞裂解液: 0.1 mol/L 乙酸:乙醇=1:1(V/V)。

1.1.8 仪器: J6-HC 高速离心机(BECKMAN), 双目显微镜(OLYMPUS), XDS-1 倒置显微镜(重庆光学仪器厂), CO<sub>2</sub>培养箱(Cole Parmer), DG3022A 酶联免疫检测仪(国营华东电子管厂)。

### 1.2 方法

1.2.1 NC 的制备: 采用摇瓶发酵法, 在 500 mL 三角瓶中加入 100 mL 的 YD 培养液, 并接种一定量的红色诺卡氏菌 03-PO-8 菌丝块, 32°C 二级培养 96 h, 收集菌体并加工处理获得红色诺卡氏菌菌体(简称 NC)。

1.2.2 毒性试验: 选用 NC 样品最大浓度最大给药量进行最大耐受量试验, 即 NC 250 mg/mL, 每只小鼠灌胃 0.80 mL, 连续观察 14 d。

1.2.3 免疫器官影响试验: 试验组(剂量分别为 NC 5.00 g/kg、2.50 g/kg、1.25 g/kg)每只小鼠每日定时灌胃 0.5 mL, 连续 15 d, 对照组以等量的生理氯化钠溶液代替, 停药次日眼眶静脉穿刺采血, 行外周白细胞计数, 处死小白鼠, 分别取出胸腺、脾脏并称重。

1.2.4 巨噬细胞(MΦ)功能影响试验: 1) MΦ 吞噬中性红。NC 灌胃给药同 1.2.3 方法, 停药次日处死小白鼠, 以无菌操作法采取腹腔液, 离心洗涤, 镜检计数, 并以 0.5% 萘酚蓝观察其活性在 95% 以上, 调节悬液的 MΦ 浓度为  $2 \times 10^6$ /mL, 于 96 孔培养板中每孔加 100 μL, 置 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 4 h, 弃上清, 洗涤, 加入一定量的 0.075% 中性红溶液, 37°C、

5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 1 h。取出培养板, 弃中性红, 清洗, 加入细胞裂解液 150 μL。静置过夜, 于酶联免疫仪上测 570 nm 的吸光值 OD<sub>570</sub>。2) MΦ 吞噬白色念珠菌<sup>[7]</sup>。白色念珠菌 ATCC 11653 接种在 Sabourand's 培养基斜面上, 28°C 培养 18 h~24 h。用 PBS 洗涤下菌体, 离心(200 × g, 8 min), 采用光度比浊法计数, 以培养液调整  $2 \times 10^4$ /mL 浓度的白色念珠菌悬液。腹腔 MΦ 悬液制备同 1) 方法。取 50 μL MΦ 悬液接种于经灭菌处理的 96 孔微量细胞培养板各孔中, 同时加入 50 μL 白色念珠菌悬液(效靶比=100:1、50:1、10:1), 设培养液空白调零孔和白色念珠菌生长对照孔。于 5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱中 37°C 培养 18 h, 加入无菌蒸馏水溶解 MΦ 后, 各孔加 5 mg/mL MTT 10 μL, 37°C 继续培养 4 h, 以快速倾倒数去除上清, 加入 100 μL DMSO 终止反应, 微型振荡器振荡使 formazan 完全溶解后, 以酶联仪测定波长 570 nm 的吸光值 OD<sub>570</sub>, 并计算出白色念珠菌的生长抑制率。抑制率=(白色念珠菌生长对照组 OD<sub>570</sub>-实验组 OD<sub>570</sub>)/白色念珠菌生长对照组 OD<sub>570</sub> × 100%。

1.2.5 抑瘤试验<sup>[7]</sup>: 抽取生长 7 d 的 S<sub>180</sub> 小鼠腹水调整成  $5 \times 10^6$  细胞/mL 的悬液, 每只小鼠右腋皮下接种 0.2 mL, 接种次日进行治疗, 试验组按 3 个 NC 剂量(2.0 g/kg、4.0 g/kg、8.0 g/kg)每只每日定时灌胃给药 0.5 mL~1 mL, 对照组灌胃等量蒸馏水, 连续 15 d, 停药次日解剖, 称瘤重并计算肿瘤抑制率。抑瘤率=(对照组瘤重-治疗组瘤重)/对照组瘤重 × 100%。

## 2 结果

### 2.1 NC 的毒性

以 NC 样品最大浓度 250 mg/mL, 每只小鼠灌胃 0.80 mL, 给药后未见小鼠有任何异常, 继续观察 14 d, 小鼠未见任何毒性反应, 结果表明 NC 的 LD<sub>50</sub> >10 g/kg。

### 2.2 NC 对免疫器官的影响

通过灌胃给药 NC 免疫小鼠, 采血, 白细胞计数, 并取出胸腺脾脏称重, 结果见表 1。与对照组比较, 低剂量组显著提高白细胞数量( $P < 0.05$ ), 中剂量组显著提高白细胞数量和小鼠胸腺明显增重( $P < 0.05$ ), 高剂量组显著提高白细胞数量和小鼠胸腺脾脏均明显增重( $P < 0.05$ )。提示适当剂量的 NC 对小鼠免疫系统具有明显的刺激作用。

表 1 NC 对小鼠免疫器官的影响  
Table 1 Effects of *Nocardia rubra* Cell on immune organs of mice

Groups	Control	1.25 g/kg	2.50 g/kg	5.00 g/kg
No. of mice	17	10	10	10
Initial weight(g)	19.15 ± 1.19	18.52 ± 1.16	18.79 ± 0.85	19.55 ± 1.25
Terminal weight(g)	29.14 ± 2.80	28.90 ± 2.97	27.06 ± 1.82	29.69 ± 1.78
Thymus weight(mg)	102.12 ± 43.06	132.34 ± 25.04	162.32 ± 36.02*	173.04 ± 46.51
Spleen weight(mg)	99.09 ± 20.87	106.34 ± 19.73	112.64 ± 11.25	128.36 ± 19.70
WBC(10 <sup>6</sup> /mL)	9.00 ± 3.62	16.00 ± 3.93*	16.80 ± 5.50*	18.62 ± 7.31*

注：与对照组比较, \* :  $P < 0.05$ .  
Note: \*:  $P < 0.05$  (Compared with control).

2.3 NC 对 MΦ 吞噬功能的影响

NC连续定时灌胃给药 15 d, 停药次日测定小鼠的 MΦ 吞噬中性红和白色念珠菌的作用。与对照组比较, NC 低、中剂量组均具有明显地提高小鼠 MΦ 吞噬中性红的作用( $P < 0.05$ ), 说明其具有明显的激活小鼠腹腔 MΦ 和机体应激能力, 而高剂量组非常显著地提高小鼠 MΦ 吞噬中性红的作用( $P < 0.001$ ), 表明其激活小鼠腹腔 MΦ 和机体应激能力, 提高机体免疫功能呈剂量依赖性, 见表 2。不同效靶比(100 : 1、50 : 1、10 : 1)的 MΦ 体外与白色念珠菌共培养吞噬菌体抑制细胞生长, 对照组有一定的吞噬白色念珠菌作用, 低、中剂量组均显著提高 MΦ 吞噬白色念珠菌作用( $P < 0.05$ ), 高剂量组非常显著地提

高了 MΦ 吞噬白色念珠菌作用, 其吞噬杀菌能力随着效靶比的加大而增强( $P < 0.001$ )。表明激活了的 MΦ 具有增强吞噬杀菌作用, 正常的小鼠 MΦ 也有一定的吞噬杀菌作用, 见表 3。提示 NC 能增强小鼠腹腔 MΦ 吞噬杀菌作用, 为其在治疗深部真菌感染上的应用提供理论依据。

2.4 NC 的抑瘤作用

按 3 个不同剂量组的 NC 对小鼠灌胃治疗给药, 与对照组比较, 治疗给药低剂量、中剂量和高剂量组对小鼠 S<sub>180</sub> 的抑瘤率分别为 41.1%、45.2%、49.9%, 表明在一定剂量范围内其抑瘤作用与剂量呈正相关, 见表 4。说明口服给药对 S<sub>180</sub> 腹水型转实体瘤具有明显的治疗作用。

表 2 NC 对小鼠巨噬细胞吞噬中性红的影响  
Table 2 Effects of *Nocardia rubra* Cell on murine peritoneal MΦ phagocytic neutral red

Groups	Control	1.25 g/kg	2.50 g/kg	5.00 g/kg
No. of mice	10	10	10	10
Phagocytosis OD <sub>570</sub> value	0.142 ± 0.012	0.260 ± 0.069*	0.305 ± 0.087*	0.260 ± 0.031

注：与对照组比较, \* :  $P < 0.05$  , \*\* :  $P < 0.001$ .  
Note: \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.001$ (Compared with control).

表 3 NC 对小鼠巨噬细胞吞噬白色念珠菌的影响  
Table 3 *In vitro* effects of *Nocardia rubra* Cell on phagocytosis of murine peritoneal MΦ

Groups	Control	1.25 g/kg	2.50 g/kg	5.00 g/kg
No. of mice	17	10	10	10
A, Inhibitory rate(%)	19.15 ± 1.19	18.52 ± 1.16	18.79 ± 0.85	19.55 ± 1.25
B, Inhibitory rate(%)	29.14 ± 2.80	28.90 ± 2.97	27.06 ± 1.82	29.69 ± 1.78
C, Inhibitory rate(%)	102.12 ± 43.06	132.34 ± 25.04	162.32 ± 36.02	173.04 ± 46.53

注：与对照组比较, \* :  $P < 0.05$ ; \*\* :  $P < 0.001$ ; A: 效靶比 100 : 1; B: 效靶比 50 : 1; C: 效靶比 10 : 1.  
Note: \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.001$ (Compared with control); A: Ratio of MΦ to *Candida albicans* = 100:1; B: Ratio of MΦ to *Candida albicans* = 50:1; C: Ratio of MΦ to *Candida albicans* = 10:1.

表 4 NC 治疗给药对小鼠 S<sub>180</sub> 的抑瘤作用  
Table 4 Effect of *Nocardia rubra* Cell on suppression of tumor growth of S<sub>180</sub> in mice

Groups	Control	2.0 g/kg	4.0 g/kg	8.0 g/kg
No. of mice	20	10	10	10
Tumor weight(g)	5.55 ± 2.05	3.27 ± 0.99*	3.04 ± 1.72*	2.78 ± 1.25*
Antitumor rate (%)	/	41.1	45.2	49.9

注：与对照组比较, \* :  $P < 0.05$ .

Note: \*:  $P < 0.05$  (Compared with control).

### 3 讨论

1) MΦ 是一类参与免疫反应的细胞, 在调节淋巴细胞和免疫应答上起着重要作用, 能通过其表面受体与异物结合, 将异物吞入细胞内, 激活细胞内的溶酶体酶等杀灭微生物, 也能通过其分泌多种细胞毒效应分子, 其中包括淋巴因子、NO、TNF、IL-6 等分子杀伤靶细胞。试验结果表明 NC 显著地提高 MΦ 的吞噬功能, 提示 NC 经口服途径给药可增强机体 MΦ 的非特异吞噬功能, 而且 NC 对小鼠 MΦ 的吞噬功能的促进作用有助于机体发挥抗肿瘤、抗寄生虫感染及抗胞内寄生菌和病毒感染等作用。在本试验条件下, NC 于低剂量即已显示显著的 MΦ 激活效果, 其作用强度随着剂量的加大而增强。在 MΦ 吞噬活性增强的同时可见免疫器官明显增重, 白细胞数量显著提升, 说明在适当的剂量下 NC 具有刺激 T 细胞和 B 细胞的作用, NC 通过促进细胞增殖, 又激活机体 MΦ 吞噬功能而增强其吞噬活性。

2) 同类的生物制剂 BCG、CP 在临床上是应用其菌体制剂, 而且 BCG、干扰素、胸腺因子 D 等均有口服给药的报道<sup>[8-10]</sup>, 同时口服给药途径方便、简捷、副作用小。NC 是经细胞培养、菌体收集及灭活处理等精制而成的干粉, 不易变性, 适合研制成口服剂型。通过口服毒性试验和抑瘤试验亦证明了 NC 毒性低, 具有明显抑制 S<sub>180</sub> 腹水型转实体瘤的作用。这对今后开发 NC 口服给药的临床应用具有一定的

指导意义。

### 参 考 文 献

- [1] 肖征恭, 陈君玉, 王清波, 等. 红色诺卡氏菌 03-PO-8 的分类研究. 福建医学院学报(增刊), 1992, 26: 84.
- [2] 李鹏飞, 吴德政, 赵秀华, 等. N-CWS 激活小鼠巨噬细胞抗瘤作用的研究. 中国免疫学杂志, 1998, 14(1): 30-32.
- [3] 何小丽, 张祝兰, 朱 玲, 等. 胞必佳对小鼠巨噬细胞功能的影响. 广西医科大学学报, 2006, 23(1): 75.
- [4] 余受程. 红色诺卡氏菌制备的细胞壁骨架(N-CWS) 期临床试验. 中国肿瘤临床(增刊), 1995, 22: 254-257.
- [5] 靳国华, 王敬萍, 张红梅, 等. 胞必佳(N-CWS)治疗恶性胸水的临床观察. 结核病与胸部肿瘤, 1996, 25(4): 15-17.
- [6] 陈月莞, 孙秀容, 陆海文. 介绍一种分区注射胞必佳的方法. 实用护理杂志, 2003, 19(6): 31.
- [7] 张均田. 现代药理实验方法. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998, pp.743-744, 839-845.
- [8] 赵 锐, 李 华. 细胞因子类药物的制剂研究进展. 中国医药工业杂志, 1998, 29(2): 91-94.
- [9] 吴永林, 周如姣, 谭卫东, 等. 精制人白细胞干扰素口含片的研制. 中国生化药物杂志, 1998, 19(1): 46-47.
- [10] 于华生, 李炳秀, 沈 莉, 等. 胸腺多肽胶囊的研制. 中国生化药物杂志, 1998, 19(3): 146-147.