

灵芝提取物抗肿瘤作用的实验研究

李鹏^a, 魏晓霞^b, 许建华^{b*} (福建医科大学药学院, a.天然药物学系, b.药理学系, 福州 350004)

摘要: 目的 探讨一种灵芝提取物体内抗肿瘤作用。方法 应用小鼠 H22 肝癌移植瘤模型, 研究灵芝提取物的体内抗肿瘤作用; 采用 MTT 法检测灵芝提取物的体外抗肿瘤活性。结果 ①灵芝提取物对 H22 移植瘤呈剂量依赖性抑制作用, 500 mg·kg⁻¹ 组的瘤重抑制百分率达 59.3%, 与阴性对照组比较有统计学差异($P < 0.01$); ②MTT 法检测显示灵芝提取物对 K562 和 HL60 两种瘤株有较强抑制作用, 对 SMMC7221、HepG2、SW480、SW1116 和 SGC7901 五种瘤株抑制作用较弱。结论 灵芝提取物在体外及体内均有较强的抗肿瘤作用, 其有效成分及机制有待进一步研究。

关键词: 灵芝; 抗肿瘤; H22; 抗癌

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)09-0789-04

Experimental Study on Anti-tumor Effects of Extracts from *Ganoderma Lucidum*

LI Peng^a, WEI Xiaoxia^b, XU Jianhua^{b*} (Fujian Medical University, School of Pharmacy, a. Department of Natural Medicines, b. Department of Pharmacology, Fuzhou 350004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore anti-tumor effects of extracts from *Ganoderma Lucidum*(GLE). **METHODS** Anticancer effects of GLE were experimented by mice bearing H22 hepatocarcinoma transplantation tumor model *in vivo* and MTT reduction test *in vitro*. **RESULTS** ①GLE could inhibit H22 transplanted tumor growth in mice in a dose-dependent manner, the inhibitive percentage of carcinoma weight was 59.3% in 500 mg·kg⁻¹ group and there was obviously differentiation when comparing with negative control group($P < 0.01$). ②GLE had an inhibitory effect on the proliferation of K562 and HL60 human tumor cells and had less inhibitory activity on SMMC7221, HepG2, SW480, SW1116 and SGC7901 human tumor cells. **CONCLUSION** This study confirms that GLE has significant anticancer effect *in vitro* and *in vivo*. However, the mechanism and active ingredients remain to be studied.

KEY WORDS: *Ganoderma Lucidum*; anticancer; H22; anti-tumor

灵芝是担子纲菌多孔菌科植物灵芝属真菌的总称, 是我国传统的补益中药, 具有扶正固本、延年益寿之功效。大量临床及实验研究表明, 灵芝及其提取物具有抗肿瘤、抗血栓及免疫调节等作用^[1]。福建医科大学新药研究所从灵芝中分离纯化得到一种提取物 (Extracts from *Ganoderma Lucidum*, GLE), 本研究着重观察了 GLE 的体内、外抗肿瘤作用, 为灵芝抗肿瘤的临床应用提供科学依据, 为灵芝抗肿瘤新药的研发奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物及主要试剂 赤芝由福建仙芝楼生物科技有限公司提供, 经福建医科大学药学院天然药物学系生药学教研室石冬梅讲师鉴定为 *Ganoderma lucidum*(Leyss.ex Fr.) Karst., 灵芝提取物(GLE, 由福建医科大学新药研究所提供, 1 g 相

当于原生药 93 g, 香草醛-高氯酸比色法测定灵芝三萜含量为 56.7%)用泊洛沙姆 188(F68)制备成固体分散体, 浓度分别为 12.5, 25 和 50 mg·mL⁻¹, 置 4 °C 保存备用。

环磷酸腺苷(CTX, 江苏恒瑞医药有限公司); 四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma 公司); 二甲亚砜(DMSO, 国药集团化学试剂有限公司); RPMI1640 培养基及 DMEM 培养基(Gibco 公司); 小牛血清(杭州江滨生物技术有限公司); 泊洛沙姆 188(F68, BASF 公司); 生理盐水(福州海王福药制药有限公司)。

1.1.2 主要仪器 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Forma 公司); 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); J2-21 低温高速离心机(Beckman 公司); 倒置显微镜(Olympas 公司); AB204-E 电子分析天平(Mettler Toledo 公司)。

1.1.3 细胞株及培养条件 人慢性粒细胞白血病细胞株 K562、人髓系白血病细胞株 HL60、人胃

基金项目: 福建医科大学苗圃科研基金项目(2010MP044)

作者简介: 李鹏, 男, 博士, 讲师 Tel: (0591)22862016
教授, 博导 Tel: (0591)83569307 E-mail: pengli@mail.fjmu.edu.cn

E-mail: pengli@mail.fjmu.edu.cn

*通信作者: 许建华, 男, 博士,

E-mail: xjh@mail.fjmu.edu.cn

癌细胞株 SGC7901、人结肠癌细胞株 SW1116、人结肠癌细胞株 SW480、人肝癌细胞株 SMMC7221 和人肝癌细胞株 HepG2 均购自上海细胞生物研究所, 由福建医科大学药学院临床药理所保存, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 置 37 °C, 5% 饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养(人肝癌细胞株 SMMC7221 及人结肠癌细胞株 SW480 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液培养)。

1.1.4 实验动物和瘤源 普通级昆明种小鼠, 体重 18~22 g, ♀ ♂ 各半, 实验动物合格证号: SYXK(闽)2008-0001, 按体重随机分组, 分笼饲养, 自由饮水和进食。小鼠 H22 肝癌细胞由福建医科大学药学院临床药理所传代维持。

1.2 方法

1.2.1 GLE 对 K562 及 HL60 细胞增殖的影响 按文献[2]方法, 取对数生长期的 K562 及 HL60 细胞以 1×10^5 个·mL⁻¹ 的初始浓度分别接种于 96 孔培养板中, 每孔 190 μL, 实验组每孔加入不同浓度药物 10 μL, 细胞对照组加含等量浓度 DMSO 的无血清培养液, 空白对照组为 190 μL RPMI 1640 加 10 μL 无药溶剂, 每组 3 个复孔。K562 及 HL60 细胞分别孵育 0, 24, 48 和 72 h 后, 每孔加入 5 g·L⁻¹ 的 MTT 20 μL, 37 °C 孵育 4 h 后离心(2 000 r·min⁻¹, 10 min), 小心吸去上清, 每孔加 150 μL DMSO 混匀, 各组均于 570 nm 波长处测定各孔的 OD 值, 计算细胞生长抑制率, 抑制率=(1-药物处理孔平均 OD 值/细胞对照孔平均 OD 值)×100%。以药物浓度为横轴, 抑制率值为纵轴绘制细胞增殖抑制量效关系曲线; 以作用时间为横轴, 抑制率值为纵轴绘制细胞增殖抑制时效关系曲线。

1.2.2 GLE 广谱抗肿瘤细胞增殖的研究 采用 MTT 法, 按“1.2.1”项下方法。取对数生长期的 SMMC7221、HepG2、SW480、SW1116 及 SGC7901 细胞, 根据细胞株不同按一定的密度接种于 96 孔培养板中。悬浮细胞接种细胞后立即加药, 贴壁细胞则先培养 1 d, 第 2 天待细胞贴壁后再加药。孵育 48 h 后计算各组细胞增殖抑制率。以药物浓度为横轴, 抑制率值为纵轴绘制细胞增殖抑制量效关系曲线。

1.2.3 GLE 对小鼠 H22 肝癌细胞生长的影响 按常规方法^[3-4]接种肿瘤细胞: 取腹腔传代 6~8 d 生长良好的乳白色腹水, 用生理盐水稀释至 1×10^7 个·mL⁻¹。取 50 只小鼠, ♀ ♂ 各半, 在小鼠右前肢

腋下皮下注射接种 0.2 mL 肿瘤细胞悬液, 制成实体瘤实验动物模型。接种次日称量, 小鼠随机分为 5 组, 即阴性对照组(灌胃给药与 GLE 组等体积的生理盐水)、阳性对照组(灌胃给药 CTX 30 mg·kg⁻¹, 3 d 给药 1 次)、GLE 低、中、高剂量组(灌胃给药, GLE 剂量分别为 125, 250 和 500 mg·kg⁻¹), 连续给药 7 d, 1 次·d⁻¹。末次给药 24 h 后称重, 颈椎脱臼处死动物。剥离肿瘤组织, 用滤纸吸干后称瘤重, 计算抑瘤率, 抑瘤率=(1-实验组瘤重/阴性对照组瘤重)×100%。

1.2.4 数据处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理采用组间 *t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GLE 体外对 K562 及 HL60 细胞增殖的影响

GLE 对 K562 及 HL60 细胞增殖有较强的抑制作用, 均表现出明显的量效关系和时效关系, 质量浓度 70 mg·L⁻¹ 处理 24 h 后 HL60 细胞增殖基本被抑制, 处理 48 h 后 K562 细胞增殖基本被抑制。药物作用于 K562 细胞 24, 48 和 72 h 的 IC₅₀ 值分别是 23.87, 13.27 和 10.08 mg·L⁻¹; 作用于 HL60 细胞 24, 48 和 72 h 的 IC₅₀ 值分别是 20.0, 14.58 和 15.25 mg·L⁻¹。结果见图 1 和图 2。

2.2 GLE 对 5 种肿瘤细胞增殖抑制的 MTT 法检测结果

GLE 对所检测的 5 种肿瘤细胞株的增殖抑制活性较弱, 结果见图 3。

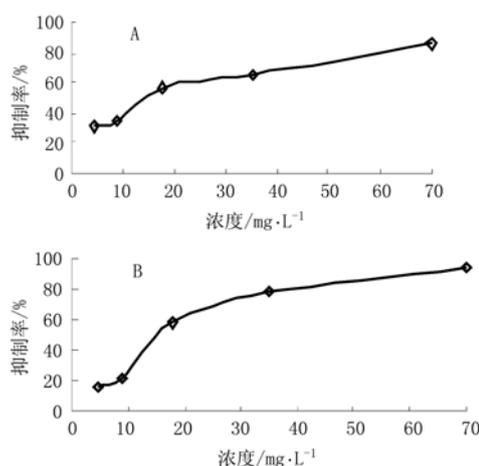


图 1 GLE(作用 48 h)对 K562 及 HL60 细胞增殖抑制作用的量效关系曲线

A-GLE 对 K562 的量效关系; B-GLE 对 HL60 的量效关系

Fig 1 The dose-effect curves of GLE inhibiting K562 and HL60 cell proliferation

A-the dose-effect curve of GLE on K562; B-the dose-effect curve of GLE on HL60

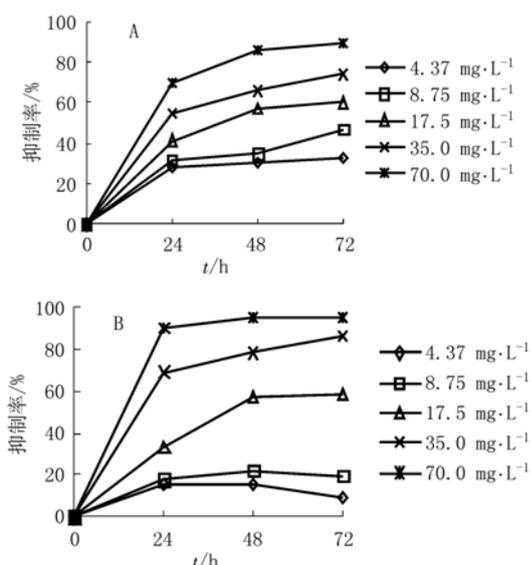


图2 不同浓度GLE对K562及HL60细胞增殖抑制作用的时效关系曲线

A-GLE对K562的时效关系; B-GLE对HL60的时效关系

Fig 2 The time-effect curves of different concentrations of GLE inhibiting K562 and HL60 cell proliferation

A-the time-effect curves of GLE on K562; B-the time-effect curves of GLE on HL60

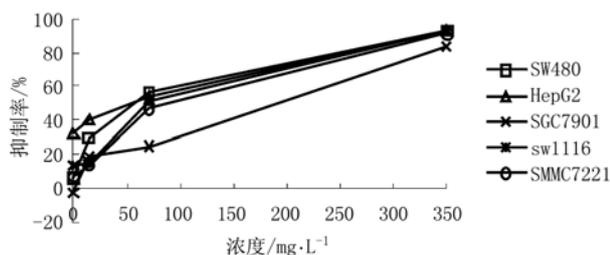


图3 GLE(作用48h)对5种人源肿瘤细胞增殖的抑制率

Fig 3 The inhibitory rate of GLE on five human-derived tumor cells growth(48 h)

2.3 GLE对小鼠H22移植瘤生长的影响

GLE对H22移植性实体瘤的抑制与阴性对照组瘤重相比, GLE的高、中、低剂量组均有显著抑制H22肝癌实体瘤生长的作用($P < 0.01$), 且随着GLE剂量增加, 抑瘤率有逐渐增加的趋势, 表明GLE的抑瘤效果具有剂量反应关系。结果见表1。

表1 GLE对小鼠H22瘤重的影响($n=10$)

Tab 1 The impact of GLE on H22 tumor in mice($n=10$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	瘤重/g	抑瘤率/%
阴性对照组	-	2.16 ± 0.42	-
阳性对照组	30	$0.73 \pm 0.15^{(1)}$	66.1
GLE低剂量组	125	$1.51 \pm 0.25^{(1)}$	30.1
GLE中剂量组	250	$1.26 \pm 0.26^{(1)}$	41.7
GLE高剂量组	500	$0.88 \pm 0.30^{(1)}$	59.3

注: 与阴性对照组比较, $P < 0.01$

Note: Compared with negative control group, $P < 0.01$

3 讨论

肿瘤是目前威胁人类健康的主要疾病之一, 关于肿瘤的治疗是全世界范围内受到广泛关注的热点课题。中药由于毒副作用小, 在肿瘤的治疗中已经开始发挥出越来越重要的作用。GLE为中药灵芝提取物, 理化分析确定主要含有灵芝三萜类成分。灵芝三萜类成分是灵芝药用功效的主要活性成分之一, 具有广泛的药理活性^[5], 其中抗肿瘤作用研究的较多。体外实验表明, GLE对人白血病细胞株K562及HL60较敏感, 而对人胃癌细胞株SGC7901、人结肠癌细胞株SW1116、人结肠癌细胞株SW480、人肝癌细胞株SMMC7221、人肝癌细胞株HepG2不敏感, 说明在体外GLE对肿瘤细胞有较好的选择性, GLE可能是灵芝抗白血病的活性组分之一。体内抑瘤实验表明, 在成功复制小鼠H22荷瘤模型的基础上, 采用不同剂量的GLE进行了干预, 结果显示所有实验组的小鼠在实验结束时瘤重均低于阴性对照组($P < 0.01$), 且随着剂量的增加, 瘤重有逐渐降低的趋势, 说明在体内GLE具有抑瘤作用, 且这种作用存在剂量效应关系。

在体外实验中对癌细胞有抑制作用和杀伤作用的药物, 在活体中由于各种综合因素的作用而不一定具有抗肿瘤作用, 反之亦然。GLE体外对人源肝癌细胞不敏感, 但本研究体内实验发现GLE对鼠源性肝癌H22有较强抑制作用。通过小鼠H22实体型移植瘤实验, 在初步了解GLE体内抑瘤量效关系的基础上, 在今后的工作中有必要对其进行上述人肿瘤细胞裸鼠移植瘤实验, 特别是对人白血病细胞株K562及HL60进行实验, 以期证实GLE体内抗白血病活性。

GLE在体内外均有较强的抗肿瘤活性, 具有一定开发中药抗癌新药的前景, 其抗肿瘤的有效成分及作用机制还有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] ZHANG X Y, YANG C Q. The chemical constituents and pharmacological activities of *Ganoderma lucidum* [J]. World Notes Plant Med(国外医药 植物药分册), 2006, 21(4): 152-155.
- [2] LIU X Y, YANG H Y, CHEN K L, et al. Mechanism of inhibition of K562 leukemia cells proliferation by resveratrol [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2006, 26(2): 133-135.
- [3] XU S Y. Methodology of Pharmacological Experiment(药理学实验方法学) [M]. 2nd Ed. Beijing: People's Medical

Publishing House, 1991: 1446-1449.

- [4] CHEN H Y, CHEN H F, LI D F, et al. Effect of Arnebia euchroma (Royle) Johnst polysaccharide on mice bearing in U14 cervical cancer *in vivo* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(12):1061-1064.

- [5] HUANG Y J, XIAO G L. The progress of pharmacology on Ganoderma Triterpene [J]. Guiding J Tradit Chin Med Pharm(中医药导报), 2008,14(9): 87-88, 97.

收稿日期: 2010-12-25