

银耳孢糖对小鼠体内移植性肿瘤及免疫功能的影响

徐华丽,于晓凤,曲绍春,张瑞,王迎庆,睢大员* (吉林大学药学院药理教研室,长春 130021)

摘要:目的 研究银耳孢糖 (*Tremella fuciformis* spores polysaccharide, TSP)对小鼠移植性肿瘤及免疫功能的影响。方法 利用小鼠肝癌 H22及小鼠肉瘤 S180的体内移植性肿瘤模型,腹腔连续给予 TSP 12 d,称小鼠体重及肿瘤、脾脏和胸腺重量,测定脾淋巴细胞转化率及 NK细胞杀伤活性。同时观察 TSP对正常小鼠免疫器官重量和碳粒廓清的影响。结果 TSP 25, 50, 100 mg·kg⁻¹对小鼠肝癌 H22及小鼠肉瘤 S₁₈₀有一定的抑制作用,抑瘤率分别为 17.8%, 27.6%, 34.9%; 32.8%, 36.1%, 44.0%; TSP 50, 100 mg·kg⁻¹能提高荷瘤小鼠脾 NK细胞杀伤活性及淋巴细胞转化率 ($P < 0.05$)。此外, TSP 50, 100 mg·kg⁻¹亦能明显提高正常小鼠脾脏和胸腺的重量及网状内皮系统吞噬功能 ($P < 0.05$)。结论 TSP对小鼠移植性肿瘤有一定的对抗作用,其抗肿瘤作用可能与增强机体免疫能力有关。

关键词:银耳孢糖;抗肿瘤;淋巴细胞转化;天然杀伤细胞

中图分类号: R931.6; R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2008)02-0093-03

Effect of *Tremella fuciformis* Spores Polysaccharides on Transplanted Tumor and Immunological Function in Mice

XU Hua-li, YU Xiao-feng, QU Shao-chun, ZHANG Rui, WANG Ying-qing, SUI Da-yuan* (Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of *Tremella fuciformis* spores Polysaccharides (TSP) on transplanted tumor and the immunological function in mice. **METHODS** The transplanted tumor model with Hepatoma-22 and Sarcoma 180 were established for anti-tumor experiment. TSP was administered i.p. for 12d and the body weight, tumor, spleen and thymus weight were detected, meanwhile lymphocyte transformation, the activity of NK cells were determined with MTT assay. The immune organ weights and carbon clearance were examined in normal mice. **RESULTS** After treatment with TSP 25, 50, 100 mg·kg⁻¹ the inhibition rate (IR) on Hepatoma-22 and Sarcoma 180 were 17.8%, 27.6%, 34.9%; 32.8%, 36.1%, 44.0% respectively. TSP 50, 100 mg·kg⁻¹ also increased lymphocyte transformation, the activity of NK cells significantly in tumor-bearing mice ($P < 0.05$). The spleen and thymus weight and the phagocytosis of reticuloendothelial system in normal mice were enhanced obviously. **CONCLUSION** TSP has the antagonistic effect on transplanted tumor. It may be related with the enhancement of immunological function.

KEY WORDS: *Tremella fuciformis* spores Polysaccharides; anti-tumor; lymphocyte transformation; nature killer cells

近年来,银耳 (*Tremella fuciformis* Berk)的化学及药理研究报道较多,其药理活性多数与银耳孢糖 (*Tremella fuciformis* spores polysaccharide, TSP)有关。TSP是银耳孢子经深层发酵的产物,具有广泛的药理活性,在调节机体免疫力,提高巨噬细胞吞噬功能,提高细胞和体液免疫能力方面有很好的作用,在抗疲劳、抗衰老、清除氧自由基、降血糖、抗肿瘤及抗艾滋病等方面也有良好的疗效^[1-3]。但有关 TSP作为生物免疫调节剂用于肿瘤的治疗尚未见报道。笔者通过小鼠体内移植性肿瘤模型,对 TSP的抗肿瘤作用进行研究,并初步探讨其作用机制。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

TSP:由吉林省中医中药研究院方剂室提供,纯度为95%,批号:020501,临用前用生理盐水稀释至所需浓度;注

射用环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX):上海华联制药有限公司,批号:20010205,以氯化钠注射液配成所需浓度的溶液,现用现配;小鼠肝癌 H₂₂、S₁₈₀瘤株由吉林省肿瘤医院提供;Yac-1细胞由吉林大学基础医学院免疫教研室提供;刀豆蛋白 A (ConA),四甲基偶氮唑盐 (MTT)为 Sigma公司产品;PRMI1640培养基为美国 Invitrogen公司产品;新生小牛血清 (FCS)购自杭州四季青生物有限公司;DMSO为北京北化精细化学品责任有限公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物

清洁级昆明种小鼠,雌雄兼用,体重 18~22 g,8周龄,实验前在实验室常规饲养 7d,合格证号为:医动字第 10-5112,由长春高新医学动物研究中心供给。

2 方法与结果

2.1 对小鼠移植性肿瘤的抑制作用及免疫器官重量的影响

基金项目:国家九五科技攻关课题 (96-901-06-68),吉林省科技发展计划重点项目 (20010443)

作者简介:徐华丽,男,博士生,讲师 * 通讯作者:睢大员,男,博士,教授 Tel: (0431) 85619705 E-mail: suiday@jlu.edu.cn

取腹腔内传代 7 d 的肝癌 H₂₂、肉瘤 S₈₀ 小鼠,脱臼处死小鼠,在无菌条件下抽取腹腔内瘤细胞,以生理盐水洗涤 3 次,1 000 r• min⁻¹离心 5 min,弃上清液,用无菌生理盐水调整瘤细胞浓度为每毫升 1 × 10⁷,接种于昆明种小鼠左侧腹股沟皮下,每只鼠接种 0.2 mL。接种 24 h 后将小鼠随机分成 5 组,每组 12 只。溶剂对照组给予生理盐水;阳性对照组给予 CTX 20 mg• kg⁻¹;根据前期筛选结果,治疗组分别给予 TSP 25、50 和 100 mg• kg⁻¹。各组均每日腹腔注射(ip)给药 1 次,给药容积为 20 mL• kg⁻¹,连续 12 d,每天记录体重,停药次日处死动物,剥离瘤块、脾和胸腺并称量,按文献方法^[4-5]计算肿瘤抑制

表 1 TSP 对小鼠肝癌 H22 的抑制作用及对免疫器官重量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Anti-tumor effect of TSP and its adverse effect on liver cancer (H₂₂) in vivo ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量 /mg• kg ⁻¹	瘤重 /g	抑瘤率 /%	动物数 药前/药后	体重 /g	胸腺指数 /g• 100 g ⁻¹	脾指数 /g• 100 g ⁻¹
对照组	0	1.77 ± 0.51	0	12/11	25.1 ± 1.71	0.183 ± 0.057	0.849 ± 0.111
环磷酰胺	20	0.47 ± 0.22 ²⁾	73.6	12/9	20.1 ± 1.81 ²⁾	0.076 ± 0.022 ²⁾	0.369 ± 0.091 ²⁾
银耳孢糖	25	1.45 ± 0.44	17.8	8/8	25.3 ± 2.11	0.191 ± 0.069	0.867 ± 0.184
银耳孢糖	50	1.28 ± 0.53 ¹⁾	27.6	8/8	25.0 ± 2.16	0.204 ± 0.070	0.882 ± 0.120
银耳孢糖	100	1.15 ± 0.49 ²⁾	34.9	8/8	25.5 ± 1.58	0.211 ± 0.078	0.912 ± 0.181

注:与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compared with model group

表 2 TSP 对小鼠肉瘤 S₈₀ 的抑制作用及对免疫器官重量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Anti-tumor effect of TSP and its adverse effect on sarcoma (S₈₀) in vivo ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量 /mg• kg ⁻¹	瘤重 /g	抑瘤率 /%	动物数 药前/药后	体重 /g	胸腺指数 /g• 100 g ⁻¹	脾指数 /g• 100 g ⁻¹
对照组	0	1.58 ± 0.50	0	12/11	26.0 ± 1.77	0.289 ± 0.039	0.805 ± 0.101
环磷酰胺	20	0.39 ± 0.19 ²⁾	75.3	12/9	18.6 ± 1.39 ²⁾	0.104 ± 0.011 ²⁾	0.302 ± 0.101 ²⁾
银耳孢糖	25	1.06 ± 0.34 ¹⁾	32.8	8/8	25.6 ± 1.69	0.289 ± 0.048	0.782 ± 0.076
银耳孢糖	50	1.01 ± 0.46 ¹⁾	36.1	8/8	26.3 ± 2.15	0.295 ± 0.056	0.822 ± 0.078
银耳孢糖	100	0.89 ± 0.37 ²⁾	44.0	8/8	26.1 ± 2.12	0.305 ± 0.039	0.854 ± 0.085

注:与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$

Note: ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$, compared with model group

2.2 对小鼠脾脏 T 淋巴细胞转化功能的影响

昆明种小鼠在观察 H₂₂ 抑瘤率的同时,无菌取脾制成单细胞悬液,离心洗涤,按文献^[6]计算 T 淋巴细胞转化率。TSP 50、100 mg• kg⁻¹ 能使 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞的增殖反应明显提高 ($P < 0.05$); 25 mg• kg⁻¹ 也能促进淋巴细胞的增殖,但同对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.3 对小鼠 NK 细胞活性的影响

昆明种小鼠在观察 H₂₂ 抑瘤率的同时,无菌取脾制成单细胞悬液,离心洗涤,按文献方法^[7-8]计算 NK 细胞毒百分率。TSP 50、100 mg• kg⁻¹ 能使 NK 细胞的杀伤活性明显提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 25 mg• kg⁻¹ 也能提高 NK 细胞的活性,但同对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.4 对正常小鼠免疫器官重量的影响^[9]

取体重 16 ~ 17 g 小鼠 40 只每天给药一次,连续 7 d。第 8 天断颈处死小鼠,摘取胸腺及脾脏,用电子天平称量,结果见表 3。从表中可以看出 TSP 50、100 mg• kg⁻¹ 能明显提高小鼠免疫器官的重量 ($P < 0.05$), TSP 25 mg• kg⁻¹ 也有提高的作用。

率及胸腺(脾)指数。TSP 50、100 mg• kg⁻¹ 剂量组对小鼠肝癌 H₂₂ 有明显抑制作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 25 mg• kg⁻¹ 剂量组虽有抑制作用但同对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。阳性药环磷酰胺组对小鼠肝癌 H₂₂ 有明显抑制作用 ($P < 0.01$) 但动物有死亡发生而且胸腺和脾指数明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 提示环磷酰胺虽然抗肿瘤作用强但不良反应明显。TSP 各剂量组的动物无死亡发生而且胸腺和脾指数与对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。TSP 对小鼠肉瘤 S₈₀ 也得到了相似的结果,说明 TSP 对小鼠肝癌 H₂₂ 和肉瘤 S₈₀ 有抑制作用而且没有或不良反应较轻,结果见表 1、2。

2.5 对正常小鼠网状内皮系统吞噬功能的影响

取雄性小鼠,体重 18 ~ 20 g,每天给药一次,连续 7 d,末次药后 1 h,经尾静脉注入印度墨汁(用生理盐水稀释 5 倍) 10 mL• kg⁻¹,注入后 1 min (T₁), 5 min (T₂), 分别从眼眶静脉取血 20 μL,溶于 2 mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中摇匀,用 722 - 2 型光栅分光光度计 ($\lambda = 680$ nm) 比色测定吸光度值 A 并称取体重、肝、脾重量,按文献方法^[9]计算吞噬指数 K 及吞噬活性 α , 结果见表 3。由表 3 可见, TSP 25、50、100 mg• kg⁻¹ 均能明显提高小鼠静脉注射胶体碳粒的廓清速率。提示 TSP 对小鼠网状内皮吞噬功能具有明显的激活及增强作用。

3 讨论

银耳属担子菌亚纲,担子类植物多糖如香菇多糖、灵芝多糖等均有提高免疫功能的作用^[11]。我们对 TSP 的抗肿瘤活性进行了研究,发现 TSP 有一定的抗癌作用。体重是衡量药物毒性作用的综合性指标,研究发现,阳性药环磷酰胺明显降低小鼠体重的增长速度,甚至出现负增长,有些小鼠在停药前就已经死亡,而给予 TSP 的各组荷瘤小鼠则未发生此种情况,体重、胸腺和脾不仅无减轻现象,相反还有一定的促

表 3 TSP对小鼠免疫器官重量及网状内皮系统吞噬功能的影响 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effect of TSP on weight of immune organs and macrophage system in mice ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组 别	剂量 /mg• kg ⁻¹	胸腺重量 /g	脾脏重量 /g	吞噬指数 K	吞噬活性 α
对照组	0	0.054 ±0.019	0.096 ±0.029	0.022 ±0.012	3.99 ±1.13
银耳孢糖	25	0.061 ±0.033	0.114 ±0.014	0.033 ±0.011 ¹⁾	4.91 ±0.70 ¹⁾
银耳孢糖	50	0.076 ±0.016	0.121 ±0.022 ¹⁾	0.042 ±0.018 ¹⁾	5.05 ±0.86 ¹⁾
银耳孢糖	100	0.114 ±0.014 ¹⁾	0.135 ±0.024 ²⁾	0.048 ±0.018 ²⁾	5.82 ±1.06 ²⁾

注 :与对照组比较 ,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$, compared with model group

进生长的趋势但无统计学差异。提示 TSP在所用剂量下无明显毒性。

研究还发现 TSP不仅对小鼠非特异免疫功能有增强作用,促进胸腺和脾脏器官重量的增长,增强网状内皮吞噬系统的功能;而且对特异性免疫功能也有明显的促进作用,提高 T淋巴细胞的转化率,促进 T淋巴细胞的生成。T淋巴细胞反应即可以直接杀伤肿瘤细胞,又可活化免疫系统其他成分,从而有利于提高机体的免疫能力,这在控制抗原性肿瘤细胞的生长是最重要的。NK细胞 (Natural Killer)即自然杀伤细胞,分布于外周血循环和淋巴组织特别是脾脏,不需要抗原致敏或抗体辅助,即能直接杀伤肿瘤细胞,在机体免疫监视、抗肿瘤免疫过程中起重要作用。TSP 50,100 mg• kg⁻¹可提高荷瘤小鼠的 NK细胞活性,加强对肿瘤细胞的杀伤作用,提高小鼠的免疫能力。

本实验结果提示, TSP有增强机体免疫作用的功能,可望作为一种生物反应调节剂而用于肿瘤的治疗。

REFERENCES

[1] XIN X L, SHI Y L, YANG L H. Effects of Tremella polysaccharide on Isolated Skeletal Muscular Fatigue[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica(西北农业学报), 2006, 15(2): 128-130.

[2] LI Y, CAI D L, HU Tongjie, *et al.* Protective effect of Tremella Polysaccharides on Experimental Aging Mouse Model[J]. Acad J Second Mil Med Univ (第二军医大学学报), 2004, 25(10): 1104-1107.

[3] KHONDKAR P, AIDOO KE, TESTER RF. Sugar profile of extracellular polysaccharides from different Tremella species [J]. Int J Food Microbiol. 2002, 79(1-2): 121-129.

[4] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Experimental methodology of pharmacology(药理学实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002, 1757-1767.

[5] HAN R. Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques(抗癌药物研究与实验技术) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College Union House, 1997, 297.

[6] CHEN M X, XU H L, YU X F. *et al.* Studies on effect of protopanaxadiol on anti-tumor and immune regulation [J]. China Pharmacist(中国药师). 2007, 10(12): 1165-1168.

[7] LOSINNO C, WINES B D, JOHN T G, *et al.* Natural killer cell activity against cultural melanoma cells: a dye-reduction technique with subtypes [J]. Nat Immun, 1992, 11(4): 215-224.

[8] HE J S, LI R Z, ZONG T Y. Investigation of NK Cell Activity Measurement[J]. Chin J Immunol(中国免疫学杂志), 1996, 12(6): 356-358.

[9] CHEN Q. The Method of Traditional Chinese Medicine Pharmacology Research(中药药理学研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993, 779.

[10] LI Y K. The Method of Traditional Chinese Medicine Pharmacology Research(中药药理学研究方法学) [M]. Shanghai: Shanghai Technology Publishing House, 1991, 157.

[11] LADANYI A. Effect of Lentinan on macrophage cytotoxicity against metastatic tumor cells [J]. Cancerimmunol Immunother, 1993, 36: 123-126.