

灵芝多糖 GLP 抑制小鼠骨肉瘤细胞 S-180 在体内生长的作用机制 *

卢见行¹ 肖 传² 田华张¹ 曾凡杞²

(1 深圳市宝安区石岩人民医院 广东 深圳 518108 ;2 湖南省衡阳市中医医院 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的 探讨灵芝多糖成分(GLP)抑制肿瘤的作用机制。方法 在小鼠右腋皮下接种 1×10^6 TC-1 细胞后 7 天后,用 100mg/kg、200mg/kg 和 400mg/kg 3 种剂量给小鼠口服灌胃给药 20 天,然后观察肿瘤的重量,并用 ELISA 检测小鼠血清中 IL-2、IL-6 和 TNF- α ,用流式细胞仪检测其外周血中 CD4⁺ 和 CD8⁺。结果 100mg/kg、200mg/kg 和 400mg/kg 3 种剂量给小鼠口服灌胃给药 20 天,与对照组比较,抑瘤率分别可以达到 53%、59%和 58% $P < 0.05$;小鼠外周血血清中的 IL-2 从 1.27ng/mL 提高到了 2.88ng/mL $P < 0.05$;TNF- α 从 1.05ng/mL 提高到了 1.82ng/mL $P < 0.05$ 而 IL-6 则没有明显的变化。CD4⁺ 细胞水平升高(从 54.80% 提高到了 58.27%) 但差异无统计学意义($P > 0.05$) CD8⁺ 细胞明显增多(从 24.15%提高到了 45.36%) 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 GLP 有明显抑瘤作用,但抑瘤作用与 GLP 剂量不存在依赖关系。GLP 对肿瘤细胞生长的抑制是通过提高小鼠的细胞免疫能力来实现,而并非直接杀伤肿瘤细胞。

关键词 灵芝多糖;抑制肿瘤;作用机制

中图分类号 Q95-3 R730.5 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)02-262-03

Inhibition of Ganoderma Lucidum Polysaccharides on Mouse Sarcoma S-180 Cell Proliferation in Vivo and its Mechanism*

LU Jian-xing¹, XIAO Chuan², TIAN Hua-zhang¹, ZENG Fan-q²

(1 Shiyuan people hospital of Baoan, ShenZhen, 518108;

2 Traditional Chinese Medicine Hospital of Hengyang city,Hunan, 421001)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of ganoderma lucidum polysaccharides(GLP) on mouse sarcoma S-180 cell proliferation in vivo and its mechanism. **Methods:** The mice were divided into 5 groups including saline control group, positive drug controlled group, treated groups (high, medium and low-dose group), the treated groups were treated with different dose of GLP(400,200 and 100 mg/kg, respectively). 20 days later, the tumor weights were detected. The expression of CD4⁺ and CD8⁺ were assayed by flow cytometry. The concentrations of IL-2,IL-6 and TNF- α in serum were also assayed by ELISA. **Results:** Compared with that in the control group, the inhibitory rate of high, medium and low-dose group was 58%, 59% and 53%, respectively; The IL-2 were improved from 1.27 to 2.88ng/mL, TNF- α were improved from 1.05 to 1.82ng/mL, while there were no change in IL-6. CD8⁺ increased from 24.15% to 45.36% ($P < 0.05$), CD4⁺ increased significantly from 54.80% to 58.27% ($P > 0.05$). **Conclusion:** GLP can inhibit the growth of tumor, but the inhibiting effect has no relation with GLP dose. It was suggested that GLP inhibit the growth of tumor by improving cellular immunity instead of killing the tumor cells directly.

Key words: Ganoderma Lucidum Polysaccharides; Tumor Inhibition; Mechanism

Chinese Library Classification: Q95-3, R730.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)02-262-03

前言

灵芝(Ganoderma lucidum Karst Fr)是常用的药用真菌,具有滋补强壮、扶正固本的功效。灵芝含有多种有效成分,灵芝多糖(Ganoderma Lucidum Polysaccharides, GLP)是其主要有效成分之一。自七十年代以来,多项研究结果均提示,GLP 对动物移植性肿瘤具有抑制作用,可使瘤重减轻,生存时间延长^[1-5]。然而,灵芝的抗肿瘤作用是如何产生的?灵芝是直接杀死肿瘤细胞,还是通过机体内部的抗肿瘤机制间接杀死肿瘤细胞,这些问题一直是学术界探讨的热点。本研究旨在采用体内抗肿瘤试验相结合的方法,并利用现代的生物医学技术探讨了灵芝多糖的

抗肿瘤作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

U251 细胞由中国典型培养物保藏中心提供,GLP 是从灵芝菌丝体中分离纯化得到的灵芝多糖,为浅黄色粉末,购自 Sigma 公司,环磷酰胺(CTX)购自浙江恒瑞制药有限公司,细胞因子 IL-2、IL-6 以及 TNF- α 的放射免疫检测试剂盒购自天津九鼎医学学生物工程有限公司;进行流式细胞仪检测的抗 CD4⁺ 和 CD8⁺ 的单克隆抗体购自 IQ Products 公司,Balb/C 小鼠购自广东省医学动物实验中心。

* 基金项目 深圳市宝安区科技计划资助项目(2010673)

作者简介 卢见行(1974-) 本科,主管药师,研究方向 药学。联系电话:0755-27601215 转 9211 E-Mail: zhanghaiyanbox@163.com

(收稿日期 2011-06-03 接受日期 2011-06-28)

1.2 试验方法

细胞因子 IL-2、IL-6、TNF-α 及 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞的检测根据试剂盒的说明书操作，小鼠外周血的采集采用眼眶取血法。

1.3 GLP 对 S-180 的体内抑制试验

将 6 周龄体重为 18~22g 的 BALB/C 雄性小鼠按生理盐水对照组、阳性药物 CTX 对照组及 GLP 高、中、低剂量分为 5 组，每组 10 只小鼠。GLP 的高、中、低剂量组的剂量分别为 400mg/kg、200mg/kg 和 100mg/kg。按照上述分组及剂量(CTX 组除外)每天口服灌胃小鼠 1 次，每只小鼠灌胃体积为 0.2mL。灌胃 20 天后，以浓度 5×10⁶/mL 在小鼠的皮下接种 S-180 细胞 0.2mL，然后按上述的分组及剂量继续灌胃，于第 30 天断颈处死小鼠，取瘤称重，取平均值计算 GLP 的抑瘤率。CTX 组首先用生理盐水灌胃 20 天，在接种 U251 瘤细胞后的第四天、第七天腹腔注射 80mg/kg CTX 2 次，也于第 30 天处死小鼠，取瘤称重，计算 CTX 的抑瘤率。按下面的公式计算抑瘤率。

抑瘤率 % = (对照组瘤重 - 给药组瘤重 / 对照组瘤重) × 100 %

采集外周血取血清，检测细胞因子 IL-2、IL-6 以及 TNF-α。GLP 对小鼠血清中细胞因子 IL-2、IL-6 和 TNF-α 的影响试验采用放射免疫的方法进行，详细操作按试剂盒提供的方法进行。

1.4 GLP 在体内对小鼠 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞增殖的影响

将 6 周龄体重为 18~22g 的 BALB/C 雄性小鼠用 200mg/kg 的 GLP 灌胃 20 天后，取外周血检测 CD4⁺ 和 CD8⁺，操作按试剂盒提供的说明书进行。

2 结果

2.1 GLP 小鼠体内抑制 S-180 试验

图 1 为 GLP 抑制小鼠 U251 的体内试验结果。生理盐水对照组的 S-180 肉瘤瘤重为 1.04±0.148g/只，而 GLP 高、中、低

剂量组的 S-180 肉瘤重量分别为 0.432±0.08g/只、0.428±0.09g/只以及 0.488±0.10g/只，CTX 组的 S-180 肉瘤重量为 0.273±0.08g/只。与对照组相比，GLP 有明显的抑瘤作用，但是抑瘤作用的强度与 GLP 的浓度没有剂量依赖关系。其中，CTX 对 S-180 的抑瘤率为 73%，而 GLP 的低、中、高剂量组的抑瘤率分别为 53%、59%和 58%。

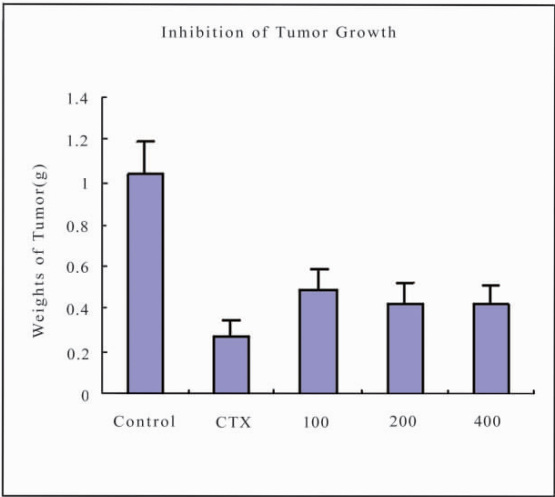


图 1 GLP 抑制小鼠 U251 的体内试验结果

Fig. 1 The inhibitory effects of oral administration of different dose GLP and CTX on the growth of mice S-180 cells

2.2 流式细胞仪检测小鼠外周血中 CD4⁺和 CD8⁺的变化

为了阐明 GLP 是否能够提高小鼠机体的细胞免疫功能，我们用流式细胞仪对灌胃 20 天后的小鼠的外周血的 CD4⁺和 CD8⁺细胞进行测定。检测的结果显示(表 1)，GLP 可以提高 CD4⁺和 CD8⁺细胞的比例。与对照组相比，给药组 CD4⁺细胞比例有所升高(从 54.80%提高到了 58.27%)，但差异无统计学意义(P>0.05)，CD8⁺细胞的比例从 24.15%提高到 45.36%，差异有统计学意义(P<0.05)，由此推测，GLP 可以刺激机体细胞免疫功能的提高。

表 1 流式细胞仪检测小鼠外周血中 CD4⁺ 和 CD8⁺ 结果

Table 1 Results of CD4⁺ and CD8⁺ in peripheral blood cell of mice detected by Flow cytometry

Type of cell	Number of animal	Ratio of control group(%)	Ratio of test group(%)	P
CD4 ⁺	10	54.80± 2.36	58.27± 3.74	>0.05
CD8 ⁺	10	24.15± 11.3	45.36± 7.82	<0.05

2.3 GLP 对荷瘤小鼠外周血清中细胞因子变化的影响

为了进一步阐明 GLP 的抑瘤机制，本研究将荷瘤小鼠处死前提高眼眶取血收集其血清，然后用放射免疫的方法对小鼠血清中的细胞因子 IL-2、IL-6 以及 TNF-α 进行了检测，结果见表 2。从表 2 我们可以看出，血清中白细胞介素-2(IL-2)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)都有不同程度的提高，与对照组相比有显著性的差异(p<0.01)。但是，IL-6 则没有明显的变化。

3 讨论

从上世纪的 70 年代起，国内外学者就先后从灵芝的子实体和菌丝体中提取出具有抑制动物移植性肿瘤增殖的灵芝多

糖，并推测其抗肿瘤作用是宿主的，可能与加强机体的免疫功能有关。Huang FH 等的研究证实，GLP 体外培养的肿瘤细胞无直接抑制作用，也不能诱导肿瘤细胞凋亡，但对体内肿瘤有明显的抑制作用^[1]。曲红光等认为，灵芝多糖可能通过调节免疫功能间接地抑制了肿瘤细胞的生长和增生，甚至杀伤肿瘤细胞^[2-3]。其他几项研究结果提示，灵芝多糖的抗肿瘤作用与 NK 细胞激活密切相关^[4-6]。灵芝多糖能直接或间接激活自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、T 细胞、B 细胞等免疫细胞，促进未经纯化的脾细胞在体外增生，增强 DNA 多聚酶 α 的活性及促进白细胞介素(IL)分泌等，实现其免疫功能。NK 细胞活化后即可释放抗肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、IL-2、干扰素 γ (IFN-γ) 等细胞

因子,并呈正向调节作用,进一步调节巨噬细胞的功能,扩大抗肿瘤作用^[7-8]。此外,还有研究证实^[9-10],灵芝多糖能提高吞噬中性粒细胞的吞噬活性和迁移活性,并依赖 Akt 信号通路抑制体外自发的和自杀相关因子(Fas)诱导的噬中性粒细胞凋亡。

表 2 GLP 对荷瘤小鼠外周血血清中细胞因子变化的影响
Table 2 Effects of GLP on proliferation of cytokine level in peripheral blood serum of mice

Cytokine	Number of Animal	Control	GLP (200mg/kg)
IL-2	10	1.27± 0.25	2.88± 0.48 b
IL-6	10	1.75± 0.35	1.70± 0.24 c
TNF-α	10	1.05± 6.97	1.82± 7.76 d

Note: aResults are presented as mean ± S> D. (n=10). The mice were given GLP by oral administration at a dose of 1g/kg for 20 days. bp<0.01, significant difference from the control. c p>0.05, no significant difference from the control. d p<0.05, significant difference from the control

本研究结果表明,从灵芝菌丝体中提取的多糖类物质 GLP 对小鼠的移植性实体瘤 S-180 肉瘤的生长具有明显地抑制作用,当 GLP 每天的给药浓度为 200mg/kg 时对 S-180 生长的抑制作用可以达到 59%,而且 GLP 对实体瘤的抑制作用与剂量不呈正相关,没有剂量依赖关系。本次试验结果还发现,与对照组相比,实验组血清中白细胞介素-2(IL-2)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)都有不同程度的提高(P<0.01)。IL-6 则没有明显的变化。

因此推测 GLP 的抗肿瘤作用机制是通过下面的途径来实现的:GLP 在小鼠体内刺激 IL-2 和 TNF-α 的分泌,IL-2 又去刺激细胞毒性 T 淋巴细胞 CTL(即 CD8+ 细胞)细胞的增殖分化,然后在 CTL 及 TNF-α 的共同作用下,抑制肿瘤细胞的生长,从而使 GLP 表现出强烈的抑制肿瘤的活性^[11-13]。我们的试验中给药组 IL-6 和对对照组的 IL-6 没有明显的变化,可能的原因是由于 GLP 刺激了机体的细胞免疫应答,这种应答对肿瘤的生长进行了有效地抑制,由于 IL-6 常常与肿瘤的生长水平保持同步关系,就是说,肿瘤生长越大,那么 IL-6 的水平就越高,反之,如果肿瘤细胞的生长受到抑制,那么 IL-6 的水平自然就会下降,因而在肿瘤的生长受到抑制的情况下,IL-6 的含量也就不会发生剧烈的变化^[14-16]。因此,灵芝多糖对肿瘤的抑制作用是通过加强宿主的免疫反应来实现的。

参考文献(References)

[1] Huang FH, Shang MH, Xiong YT, et al. Antitumor Activity and Mechanism in vivo of Low-Molecular Weight Polysaccharides from Ganoderma lucidum [J].Chinese Journal of Natural Medicines,2010(03): 114-118

[2] 曲红光,高磊,贺丹,等. 灵芝多糖逆转卵巢癌细胞株顺铂耐药的作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2011,(02) :115-120

QU Hong-guang, GAO Lei, HE Dan, et al. Effect of reversion of ganoderma lucidum polysaccharides on cisplatin resistant in ovarian cancer cells and its mechanism [J]. Journal of Jilin University(Medicine Edition), 2011,(02) :115-120

[3] 曲红光,曲悦,高磊,等. 灵芝多糖诱导耐药卵巢癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国实验诊断学, 2011, (03):102-105

Qu Hong-guang, Qu Yue, Gao Lei, et al. The Study of ganoderma lucidum polysaccharides inducing drug-resistant human ovarian cancer cell apoptosis[J]. Chinese laboratory diagnosis. 2011,(03):102-105

[4] Ma C,Guan SH,Yang Met al. Differential protein expression in mouse splenic mononuclear cells treated with polysaccharides from spores of Ganoderma lucidum[J]. Phytomedicine, 2008, 15 (4) :268-270

[5] Chan WK, Cheung CC, Law HK, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides can induce human monocytic leukemia cells into dendritic cells with immuno-stimulatory function[J]. J Hematol Oncol, 2008, (1) :9-10

[6] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. Nat Protoc, 2008, 3 (6) :1101-1108

[7] Watt PM. Screening for peptide drugs from the natural repertoire of biodiverse protein folds[J]. Nat Biotechnol, 2006, 24(2) :177-183

[8] Hsu JW, Huang HC, Chen ST, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides induce macrophage-like differentiation in human leukemia THP-1 cells via caspase and p53 activation [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2009, 14(3) :197-201

[9] Wang J, Zhang L, Yu YH, et al. Enhancement of antitumor activities in sulfated and carboxymethylated polysaccharides of Ganoderma lucidum[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57 (22) :10565-10572

[10] Hsu JW, Huang HC, Chen ST, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides induce macrophage-like differentiation in human leukemia THP-1 cells via caspase and p53 activation [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2009, 16(2) :79-85

[11] Sun LX, Lin ZB, Duan XS, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides antagonize the suppression on lymphocytes induced by culture supernatants of B16F10 melanoma cells [J]. J Pharm Pharmacol, 2011, 63(5):725-735

[12] Chen Y, Lu H, Song S, et al. Preparation of Ganoderma lucidum polysaccharides and triterpenes microemulsion and its anticancer effect in mice with transplant Hep3 tumors [J]. China journal of chinese materia medica, 2010, 35(20):2679-2683

[13] Xu Z, Chen X, Zhong Z, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities [J]. Am J Chin Med, 2011; 39(1):15-27

[14] Hao J, Chen X, Lan J. et al. Effect of light quality on growth and polysaccharides content of Ganoderma lucidum [J]. China journal of chinese materia medica, 2010, 35(17):2242-2245

[15] Liu Y, Liu Y, Qiu F, et al. Sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of five ganoderic acids in Ganoderma lucidum and its related species [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 54(4):717-721

[16] Zhang J, Tang Q, Zhou C, et al. GLIS, a bioactive proteoglycan fraction from Ganoderma lucidum, displays anti-tumour activity by increasing both humoral and cellular immune response [J]. Life Sci, 2010, 87(19-22):628-637