

亮菌多糖 ATPS II-2 的抗肿瘤活性分析

蔡凤^{1,2}, 解彦刚^{1*}, 黄纯², 樊一桥²

(1. 南通职业大学 化学与生物工程学院, 江苏 南通 226007; 2. 中国药科大学, 南京 211100)

[摘要] **目的:**研究亮菌多糖 ATPS II-2 的抗肿瘤活性及其对荷瘤小鼠免疫功能的影响。**方法:**以4种人肿瘤细胞株为模型,采用噻唑蓝法检测体外抗肿瘤活性;建立小鼠 S180 荷瘤模型,以抑瘤率检测 ATPS II-2 的体内抗肿瘤作用,以对荷瘤小鼠脾脏指数和胸腺指数的影响评价 ATPS II-2 对小鼠免疫功能的作用;ELISA 法检测对荷瘤小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-2 (IL-2) 水平的影响。**结果:**ATPS II-2 对人肺癌细胞株的生长具有抑制作用,对 HeLa, K562 和 HepG2 细胞的增殖无明显的抑制作用;ATPS II-2 高、中、低剂量组对 S180 的抑瘤率分别为 52.7%、45.9% 和 12.8%,且能提高荷瘤小鼠脾脏和胸腺指数。与阴性组比较,ATPS II-2 多糖高、中剂量组可提高荷瘤小鼠血清中细胞因子 IL-2 和 TNF- α 的水平,差异有统计学意义。**结论:**亮菌多糖 ATPS II-2 有一定的细胞毒活性,有较强的体内抗肿瘤活性,其机制与调节血清细胞因子水平、增强机体免疫功能有关。

[关键词] 亮菌多糖; 抗肿瘤活性; 噻唑蓝法; 抑瘤率

[中图分类号] R945;R979.1;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0010-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210010

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150924.1058.018.html>

[网络出版时间] 2015-09-24 10:58

Anti-tumor Activity Analysis of *Armillariella tabescens* Polysaccharides II-2 CAI Feng^{1,2}, XIE Yan-gang^{1*}, HUANG Chun², FAN Yi-qiao² (1. Chemical and Biological Engineering, Nantong Vocational University, Nantong 226007, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211100, China)

[Abstract] **Objective:** To study on anti-tumor activity of *Armillariella tabescens* polysaccharides II-2 (ATPS II-2) and investigate its effect on immune functions of tumor-bearing mice. **Method:** Taking four kinds of human tumor cell lines as models, MTT method was adopted to detect anti-tumor activity *in vitro*. S180 tumor-bearing model of mice was established, anti-tumor function *in vivo* of ATPS II-2 was detected with inhibition rate as index. Effect of ATPS II-2 on immune functions of mice were evaluated based on effects on spleen index and thymus index of tumor-bearing mice. Effects of ATPS II-2 on tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-2 (IL-2) levels in serum of tumor-bearing mice were detected by ELISA method. **Result:** ATPS II-2 had inhibitory effect on growth of humans lung cancer cell lines, but without significant inhibition on proliferation of HeLa, K562 and HepG2 cells. Tumor inhibition rates of ATPS II-2 with high, middle and low doses on S180 were 52.7%, 45.9% and 12.8%, respectively; and spleen and thymus index of tumor-bearing mice can be improved. Compared with the negative group, ATPS II-2 with high and middle doses can significantly increase levels of TNF- α and IL-2 in serum of tumor-bearing mice. **Conclusion:** ATPS II-2 has some cytotoxic activity and obvious anti-tumor activity *in vivo*, whose mechanism is associated with regulation of serum cytokine levels and enhancement of immune function.

[Key words] *Armillariella tabescens* polysaccharides; anti-tumor activity; MTT method; tumor inhibition rate

[收稿日期] 20150415(013)

[基金项目] 江苏省高等职业院校国内高级访问学者计划项目(GF2014-47)

[第一作者] 蔡凤, 硕士, 副教授, 从事生物制药研究, Tel:0513-81050856, E-mail: cf4432906@163.com

[通讯作者] *解彦刚, 硕士, 讲师, 从事生物化工研究, Tel:0513-81050856, E-mail: x_yangang@126.com

亮菌多糖(*Armillariella tabescens* polysaccharides, ATPS)是亮菌中重要的天然有效成分,具有抗肿瘤防辐射、增强免疫力、清除自由基、抗衰老、加速造血而起到升白等作用^[1-2]。目前,主要通过液体发酵所得菌丝体中提取出亮菌粗多糖,其中含有许多杂质。因纯度不高的多糖难以在临床上应用,在前期工作中,市售亮菌粗粉经过水提醇沉,Sevag法脱蛋白[三氯甲烷-正丁醇(5:1)],DEAE(二乙胺乙基)纤维素离子交换色谱,Sephadex(葡聚糖凝胶)G-100,凝胶过滤色谱等方法得到亮菌多糖ATPS II-1和ATPS II-2共2种多糖类成分^[3]。本实验用体外培养的肿瘤细胞测定ATPS II-2对肿瘤细胞的细胞毒作用,用小鼠肿瘤模型观察ATPS II-2对移植性肿瘤的抑制作用,对荷瘤小鼠血清中白细胞介素-2(IL-2)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平的影响进行探索,以便与前期ATPS II-1获得的数据进行比较,为ATPS抗肿瘤作用的机制分析提供实验依据。

1 材料

Primo R型高速冷冻离心机(德国 Heraeus Biofuge公司),722型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),FD-1B-50型冷冻干燥机(常州锐品精密仪器有限公司),3701型二氧化碳培养箱(美国 Forma Scientific公司),DG3022 A型酶联免疫检测仪(国营华东电子管厂)。

亮菌多糖ATPS II-2(自制),注射用顺铂(齐鲁制药有限公司),注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司),RPMI1640培养基(美国 Gibco公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程研究所),四甲基偶氮唑盐(MTT,上海生工生物工程技术有限公司),小鼠白细胞介素-2酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA试剂盒(上海宝曼生物科技有限公司),其他试剂均为国产分析纯。

小鼠肉瘤S180,清洁级ICR小鼠(雌雄不分,18~22g)由南京医科大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(苏)2013-0005;人宫颈癌细胞(Hela),人红白血病细胞(K562),人肺癌细胞株(A549),人肝癌细胞(HepG2)均由中国药科大学新药中心提供。

2 方法与结果

2.1 ATPS II-2体外抗肿瘤活性测试 采用MTT法测定^[4]。将冻存在液氮中的癌细胞复苏并选取处于对数生长期的细胞,加入0.25%胰酶溶液作为消

化液,用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液调整细胞浓度至 $4 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ 个/mL。取调整浓度后的细胞接种于96孔板中,每孔100 μ L,置于37 $^{\circ}$ C,5%二氧化碳饱和湿度培养箱中培养。培养24 h后吸去原培养基,每孔加入以无血清培养液配制的不同浓度药物(取实验室制备的ATPS II-2粉末,将其按实验设计所需由高质量浓度到低质量浓度稀释,分别为62.5,125,250,500,1 000,2 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)100 μ L,每个质量浓度设6个复孔。同时设阴性组、阳性组(取顺铂血浆峰值质量浓度的10倍,即20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)各100 μ L,每组设6个复孔。37 $^{\circ}$ C培养48 h后,每孔加入5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT溶液10 μ L,37 $^{\circ}$ C继续孵育4 h后终止培养,小心吸弃孔内上清液。每孔加入二甲基亚砜150 μ L,微量震荡器震荡10 min,于酶标仪490 nm处测定吸光度A,每次试验重复3次,按细胞增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{给药组}}/A_{\text{阴性组}}) \times 100\%$ 计算。

2.2 ATPS II-2体内抗肿瘤活性测试 参照移植性肿瘤研究方法^[5],ICR小鼠腹腔注射S180细胞8 d后,腹部皮肤消毒,注射器抽取S180传代细胞,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min后弃上清,用无菌生理盐水调整肉瘤细胞密度至 1×10^8 个/mL。取50只小鼠,每只小鼠左侧腋部皮下接种0.2 mL以形成实体瘤。24 h后将50只小鼠随机分为5组,分别为阴性组(生理盐水),阳性组(环磷酰胺20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),ATPS II-2高、中、低剂量3个组(将前期实验分离纯化的ATPS II-2溶于生理盐水,给药剂量依次为80,40,10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组10只。除环磷酰胺为腹腔注射给药,其余均为灌胃给药。每日小鼠称重后,按体重调整给药量,每天给药1次,连续10 d。末次给药24 h后处死小鼠并称重,剥取胸腺、脾脏以及瘤块称重并记录。按抑瘤率 = $(1 - \text{给药组平均瘤重}/\text{阴性组平均瘤重}) \times 100\%$ 计算,并对数据进行统计学处理(*t*检验)。胸腺指数和脾脏指数计算方式为脏器指数 = 脏器质量/体重 $\times 10$ 。

2.3 ATPS II-2对荷瘤小鼠IL-2和TNF- α 的影响 选取小鼠60只,留10只作为正常组,其余50只按照2.2项下方法接种S180荷瘤造模。造模成功后,分为阴性组(生理盐水)、阳性组(环磷酰胺)及ATPS II-2高、中、低剂量3个组,每组10只。连续给药10 d,于末次给药24 h对所有小鼠进行眼球取血,分离血清冻存备用。临用前严格按照ELISA试剂盒说明书,分别检测各组小鼠血清的IL-2和TNF- α 水平。

2.4 ATPS II-2 体外抗肿瘤活性 当质量浓度为 62.5 ~ 2 000 mg · L⁻¹ 时, ATPS II-2 对体外培养的人 Hela 细胞, K562 及 HepG2 细胞无明显的抑制作用,

但对 A549 肿瘤细胞的生长具有一定抑制作用, 随着药物质量浓度的增大而增强, 并呈现良好的剂量-效应关系, 结果见表 1。

表 1 ATPS II-2 对 Hela, K562, A549, HepG2 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Inhibitions of ATPS II-2 against growth of Hela, K562, A549, HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg · L ⁻¹	Hela		K562		A549		HepG2	
		A _{490 nm}	抑制率/%	A _{490 nm}	抑制率/%	A _{490 nm}	抑制率/%	A _{490 nm}	抑制率/%
阴性	0	0.714 ± 0.011	-	0.723 ± 0.035	-	0.615 ± 0.031	-	0.841 ± 0.025	-
顺铂	20	0.278 ± 0.022 ²⁾	61.06	0.255 ± 0.047 ²⁾	64.73	0.195 ± 0.063 ²⁾	68.29	0.287 ± 0.080 ²⁾	65.87
ATPS II-2	62.5	0.710 ± 0.022	0.56	0.696 ± 0.012	3.73	0.438 ± 0.151 ¹⁾	28.78	0.825 ± 0.014	1.90
	125	0.698 ± 0.018	2.24	0.687 ± 0.042	4.98	0.412 ± 0.027 ²⁾	33.00	0.817 ± 0.066	2.85
	250	0.704 ± 0.026	1.40	0.677 ± 0.039	6.36	0.374 ± 0.025 ²⁾	39.19	0.810 ± 0.014	3.69
	500	0.721 ± 0.017	0.98	0.685 ± 0.015	5.26	0.329 ± 0.006 ²⁾	46.50	0.814 ± 0.021	3.21
	1 000	0.708 ± 0.062	0.84	0.676 ± 0.047	6.50	0.274 ± 0.013 ²⁾	55.45	0.795 ± 0.055	5.47
	2 000	0.676 ± 0.131	5.32	0.662 ± 0.039	8.44	0.218 ± 0.011 ²⁾	64.55	0.786 ± 0.062	6.54

注: 与阴性组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01 (表 2, 3 同)。

2.5 ATPS II-2 对小鼠 S180 肉瘤的抑制作用 表 2 结果表明, ATPS II-2 低剂量组瘤质量与阳性组差异显著, 与阴性组相比较差异不显著, 说明低剂量 ATPS II-2 对荷瘤小鼠瘤质量影响不明显, 其作用效果较环磷酰胺差。ATPS II-2 中、高剂量组瘤重与阳性组差异不显著, 与阴性组相比较差异显著, 对瘤质量的影响接近于临床化疗药环磷酰胺。ATPS II-2 高、中、低剂量组的肿瘤抑制率分别为 52.7%, 45.9% 和 12.8%, 说明中、高剂量 ATPS II-2 在小鼠体内具有显著的抗肿瘤效果, 且存在剂量依赖关系, 与阴性组比较差异有统计学意义。

表 2 ATPS II-2 对小鼠移植性肿瘤 S180 生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Inhibitory effect of ATPS II-2 on growth of transplanted tumor S180 in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	瘤重/g	抑瘤率/%
阴性	-	1.48 ± 0.12	-
阳性	20	0.58 ± 0.20 ²⁾	60.8
ATPS II-2	80	0.70 ± 0.18 ²⁾	52.7
	40	0.80 ± 0.29 ²⁾	45.9
	10	1.29 ± 0.27 ³⁾	12.8

注: 与阳性组比较³⁾ P < 0.01 (表 3 同)。

2.6 ATPS II-2 对荷瘤小鼠免疫器官指数的影响 环磷酰胺的脾脏指数和胸腺指数显著降低, 与阴性组相比差异显著; ATPS II-2 高、中剂量组小鼠脾脏指数显著高于阳性组, 且有明显剂量依赖关系, 结果

见表 3。

表 3 ATPS II-2 对荷瘤小鼠免疫器官指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of ATPS II-2 on immune organ index of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	胸腺指数/mg · g ⁻¹	脾脏指数/mg · g ⁻¹
阴性	-	25.57 ± 1.24	65.43 ± 1.62
阳性	20	12.02 ± 1.86 ²⁾	37.42 ± 1.66 ²⁾
ATPS II-2	80	17.15 ± 1.54 ^{2,3)}	51.15 ± 1.88 ^{2,3)}
	40	14.09 ± 1.78 ²⁾	43.35 ± 1.69 ^{2,3)}
	10	12.62 ± 1.37 ²⁾	39.04 ± 1.53 ²⁾

2.7 ATPS II-2 对荷瘤小鼠 IL-2 和 TNF-α 的影响 与正常组比较, 阴性组小鼠血清中细胞因子 IL-2 和 TNF-α 含量显著降低; 与阴性组比较, ATPS II-2 多糖高、中剂量组可提高荷瘤小鼠血清中细胞因子 IL-2 和 TNF-α 的水平, 差异有统计学意义。ATPS II-2 对荷瘤小鼠 IL-2 和 TNF-α 含量的影响见表 4。

3 讨论

目前, 对恶性肿瘤的治疗, 除手术、放疗和化疗三大治疗手段外, 以免疫治疗为代表的肿瘤生物治疗已成为重要的辅助治疗方法。植物多糖是一类重要的生物反应调节剂, 通过对荷瘤机体的免疫调节作用达到抗肿瘤的效果已得到世界的公认^[6]。ATPS 是亮菌的主要活性成分之一, 近年来有学者从不同角度对亮菌多糖进行了研究, 结果显示其具有提高免疫力、抗肿瘤等多种生物活性^[1,3,7]。

表4 ATPS II-2 对荷瘤小鼠 IL-2 和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effects of ATPS II-2 on IL-2 and TNF- α levels of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	IL-2/ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹
正常	-	83.52 ± 14.33	72.33 ± 12.24
阴性	-	50.78 ± 16.49 ¹⁾	36.78 ± 8.36 ¹⁾
阳性	20	36.76 ± 7.26 ^{1,2)}	25.92 ± 7.64 ^{1,3)}
ATPS II-2	80	87.40 ± 11.37 ³⁾	70.10 ± 9.15 ³⁾
	40	69.48 ± 6.71 ³⁾	58.71 ± 8.04 ^{1,3)}
	10	47.53 ± 9.46 ¹⁾	41.25 ± 7.61 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与阴性组比较²⁾ $P < 0.05$,

³⁾ $P < 0.01$ 。

本文对前期分离纯化得到的亮菌多糖 ATPS II-2 进行了体、内外抗肿瘤作用研究,结果显示 ATPS II-2 在 62.5 ~ 2 000 mg·L⁻¹时,对体外培养的人 HeLa 细胞, HepG2 细胞和 K562 细胞无明显的抑制作用,但对 A549 肿瘤细胞的生长具有一定的抑制作用,且随着质量浓度的增大而增强,呈现良好的剂量-效应关系,与前期试验中 ATPS 粗粉体外抗肿瘤试验结果相比较,提示 ATPS 具有一定的体外抗肿瘤活性。体内抗肿瘤试验中,ATPS II-2 高、中剂量组对小鼠 S180 移植性肿瘤有明显抑制作用,且有一定的量效关系,同时对小鼠免疫器官指数测定的结果显示,ATPS II-2 明显增加荷瘤小鼠脾脏指数、胸腺指数,这些结果说明 ATPS II-2 具有抗肿瘤和一定的免疫调节作用。

环磷酰胺作为一种抗癌药在临床中广泛使用,但在杀伤癌细胞的同时产生较强的免疫抑制作用,明显损伤快速增殖的正常细胞,对免疫系统和造血

功能产生严重损害。本文选择环磷酰胺作为免疫抑制剂复制出免疫抑制动物模型^[8],考察 ATPS 对荷瘤小鼠血清中细胞因子水平的影响。结果显示 ATPS II-2 能升高荷瘤小鼠血清中 TNF- α 和 IL-2 的水平,推测 ATPS II-2 的抗肿瘤作用可能与提高荷瘤小鼠血清中 IL-2 和 TNF- α 的水平、增强机体免疫功能有关,其增强荷瘤机体免疫功能的细胞分子机制有待深入研究,但与传统的抗肿瘤药相比,具有独特的优势。

[参考文献]

[1] 高婷,白家峰,罗霞,等.亮菌粗多糖对小鼠免疫功能的影响[J].四川大学学报:自然科学版,2005,42(2):395-398.

[2] 马金宝,沈叶寿,李峰,等.亮菌多糖-1b 清除自由基作用研究[J].中国食用菌,2008,27(6):38-40.

[3] 蔡凤,解彦刚,黄纯,等.亮菌多糖的分离纯化及体内抗肿瘤活性研究[J].基因组学与应用生物学,2013,32(6):767-770.

[4] 曹蔚,李小强,侯颖,等.当归多糖-1c II 的抗肿瘤活性研究[J].中国新药杂志,2008,17(12):1018-1021.

[5] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1757-1759.

[6] 宫丹,杜培革,崔新颖.植物多糖的免疫调节及抗肿瘤活性研究[J].北华大学学报:自然科学版,2004,5(4):326-329.

[7] 赵弋清.亮菌多糖对肿瘤免疫效应机制的研究[D].成都:四川大学,2006.

[8] 胡庭俊,陈昊然,程富胜,等.蕨麻多糖对小鼠血清中三种细胞因子水平的影响[J].中国兽医科技,2005,35(8):653-656.

[责任编辑 刘德文]