

· 论 著 ·

[文章编号] 1000-8861 (2010) 12-0000-04

灵芝孢子油的抑瘤作用及对荷瘤鼠免疫功能的影响

聂运中, 赵树立, 赵光锋, 侯亚义*

[摘要] 目的 研究灵芝孢子油作用下荷瘤小鼠免疫功能的变化。方法 采用灌胃的方法给荷瘤小鼠喂药, 分为低剂量组、中剂量组和高剂量组, 20 d 后检测荷瘤鼠肿瘤大小, 脾脏的变化, 脾脏和外周血中免疫细胞的变化以及相关免疫细胞的功能的变化。结果 灵芝孢子油可以有效的提高荷瘤小鼠的存活率, 并能显著提高荷瘤鼠外周血中的淋巴细胞比率, 提高 CD4⁺T 细胞比率以及 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比, 并能增加骨髓来源 DC 细胞表面 CD80 和 CD86 分子的表达, 而对脾脏淋巴细胞分布和腹腔巨噬细胞的吞噬能力无明显改变。结论 灵芝孢子油提高荷瘤小鼠的免疫功能, 抑制肿瘤生长并提高小鼠的存活率。

[关键词] 灵芝孢子油; H22 荷瘤鼠 免疫功能

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

Ganoderma Lucidum spores oil-induced anti-tumor effect and immunological function change in tumor-bearing mice

NIE Yunzhong, ZHAO Shuli, ZHAO Guangfeng, HOU Yayi

State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210093, China

[Abstract] Ganoderma Lucidum spores oil is rich in Triterpenes, sterols, fat and fatty acids, which play important roles in adjusting immunological function. Here, we aimed to study immunological function change of tumor-bearing mice with Ganoderma Lucidum spores oil. Firstly, we administrated Ganoderma Lucidum spores oil to tumor-bearing mice with three doses (low, middle and high) every two days. 20 days later, we compared tumors size, detected the rate change of immunocytes in spleen and PBMC and checked the changes of peritoneal macrophage and bone marrow dendritic cell in all groups. Then we compared the administration groups with the tumor group, and found that mice survival rate, and lymphocyte rate, CD4⁺T cell rate and CD4⁺/CD8⁺T cell in PBMC can be significantly improved by Ganoderma Lucidum spores oil, furthermore the bone marrow dendritic cell surface markers, CD80 and CD86 were also increased. While subsets of lymphocyte and phagocytosis of peritoneal macrophages have few change in spleen. The results showed that Ganoderma Lucidum spores oil can strengthen the immunological function of tumor-bearing mice, suppress tumor proliferation, and improve the survival rate of mice.

[Key words] Ganoderma Lucidum spores oil; H22; Tumor-bearing mice; Immunological function

近年来, 对灵芝属真菌的化学成分及临床研究颇多, 由于灵芝临床应用的深入, 对灵芝的孢子药用价值的研究也颇受重视。灵芝孢子油是采用超临界二氧化碳萃取技术从灵芝孢子粉中提取^[1], 其抑瘤作用已经得到广泛的认可^[2]。然而在抑制肿瘤生长的同时, 对机体本身的免疫功能的影响鲜有报道。本文采用肝癌 H22 荷瘤鼠模型, 对荷瘤鼠进行喂药处理, 分析荷瘤鼠的存活率、肿瘤变化、脾脏大小及免疫细胞的变化、血液中免疫细胞的变化及免疫细胞的功能, 为灵芝孢子油的抑瘤作用提供辅助性依据。

作者单位 210093, 南京大学医学院国家生物医药技术重点实验室 (聂运中, 赵光辉, 侯亚义) 210006, 南京市第一医院中心实验室 (赵树立)

* 通信作者 侯亚义, E-mail: yayihou@nju.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料 药物 灵芝孢子油, 由南京中科药业有限公司馈赠。瘤株 H22, 小鼠肝癌细胞株, 购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。实验动物: Balb/c 小鼠, 4~6 周龄, 雌性小鼠 90 只, 体质量 18~20 g, 购于扬州大学比较医学中心。实验进行前, 小鼠在动物房饲养至少 1 周, 在室温条件下, 自由摄食和饮水。

1.2 荷瘤小鼠模型建立 采用腹腔内活化的 H22 瘤细胞。取 1×10^6 细胞接种于小鼠左腹股沟皮下 1.0 cm 处, 荷瘤小鼠随即分为 4 组: 荷瘤鼠对照组 (Tumor, 20 只)、低剂量组 (Tumor + 0.05 ml, 20 只)、中剂量组 (Tumor + 0.1 ml, 20 只)、高剂量组 (Tumor + 0.2 ml, 20 只)。取正常小鼠做正常对照 (control, 10 只)。动物适

应 3 d 后分别以 2.5、5、10 $\mu\text{l/g}$ 的剂量灌胃。正常组以 10 μl 的蒸馏水进行灌胃。隔天灌胃,处理 20 d, 21 d 时处死小鼠。采取小鼠血样、剥离肿瘤以及脾脏组织进行各项检测。

1.3 脾脏和外周血中淋巴细胞亚群分析 CD8⁺T 细胞利用 CD3 PerCP-Cy5.5/CD8a-FITC 双抗体进行标记, CD4⁺T 细胞利用 CD3 PerCP-Cy5.5/CD4-PE 双抗体进行标记, NK 细胞利用 CD49b-APC 进行标记, DC 细胞利用 CD11c-PE 抗体标记。流式抗体均购于 eBioscience。加入抗体后室温静置 30 min, 30 min 后用 PBS 洗涤 2 次, 用 400 μl 1% 多聚甲醛固定, 利用流式细胞仪检测小鼠脾脏和血液中各免疫细胞所占比例。

1.4 巨噬细胞的吞噬作用 用 PBS 洗出小鼠的腹腔局势细胞, 贴壁 2 h。2 h 后收集细胞, 1 300 r/min 离心 5 min 弃去上清, 加 dextran-FITC 染液, 置于孵箱内孵育 1 h, 另设对照组于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育(此时细胞不发生吞噬) 孵育后用 PBS 洗两次, 用 300 μl 1.2 mg/ml 的台盼蓝重悬, 以除去胞外荧光; 上流式检测吞噬 dextran-FITC 的阳性细胞百分率。

1.5 统计学处理 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。所有流式标本均用 CellQuest 软件分析。

2 结果

2.1 荷瘤鼠存活曲线以及肿瘤和脾脏的变化 小鼠接种 H22 瘤株后进行药物灌胃, 图 1a 表示的是给药期间小鼠的存活情况。在第 9 天时有小鼠死亡, 第 22 天时小鼠的存活率分别为 30% (tumor)、44.4% (tumor+0.05 ml)、40% (tumor+0.1 ml) 和 60% (tumor+0.2 ml)。21 d 后取出存活小鼠的肿瘤, 发现给药组与对照组相比, 肿瘤有明显的减小的趋势(图 1b)。并且我们发现小鼠肿瘤后, 脾脏发生肿大, 这种现象在给药后

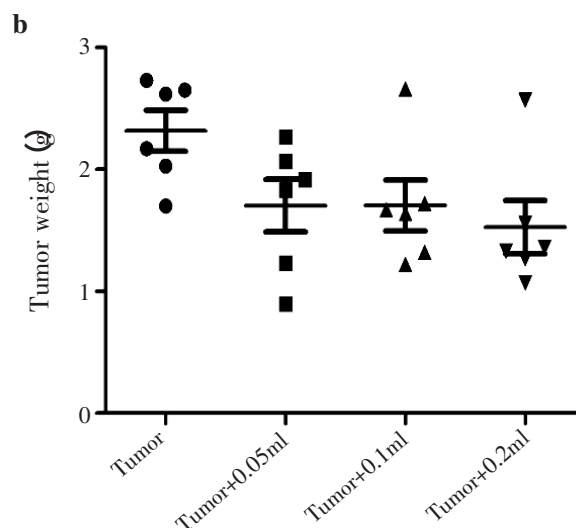
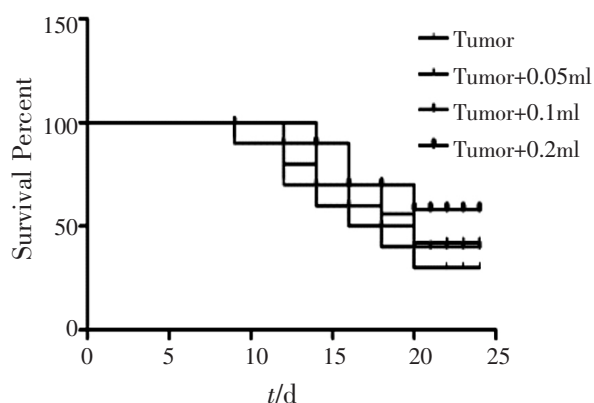


图 1 荷瘤小鼠的存活率曲线(a)和肿瘤大小(b)

Fig 1 The survival curve (a) and tumor size (b) of tumor-bearing mice

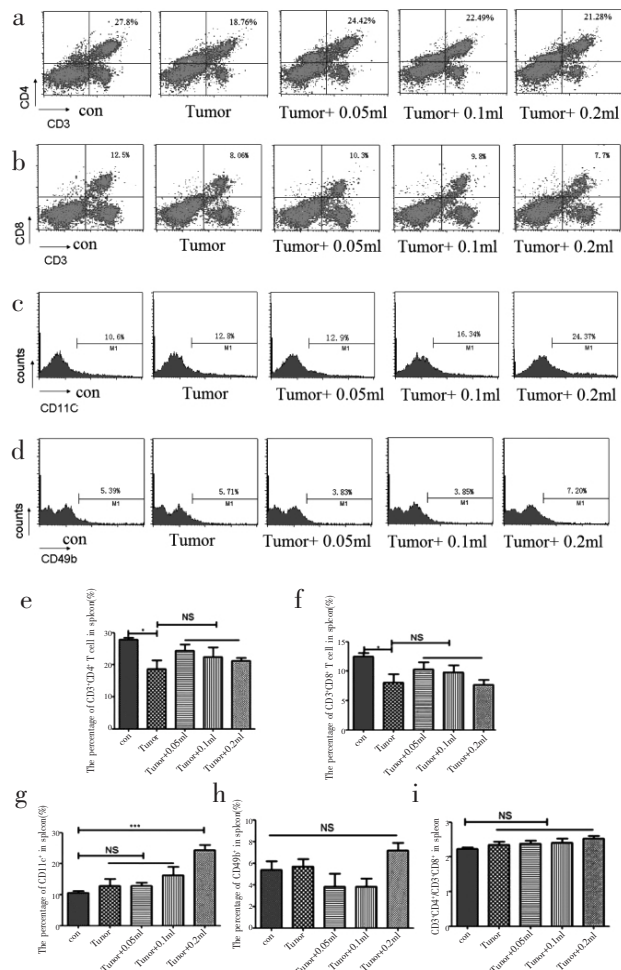
发生的明显的变化。图 1 的结果显示, 灵芝孢子油可以提高小鼠的存活率, 并可以有效的抑制体内肿瘤的生长。

2.2 荷瘤小鼠脾脏免疫细胞的影响 利用流式细胞仪检测脾脏中各免疫细胞的变化。与正常小鼠(con)相比, 荷瘤鼠(tumor)中 CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞所占百分比显著减少(图 2a 和 2b), 但 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比例无明显变化(图 2i)。给药组中的 CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞所占百分比未有显著性改变(图 2e 和 2f)。同时检测了脾脏中 CD11c⁺DC 细胞与 CD49b⁺NK 细胞所占百分比, 在高剂量给药时 CD11c⁺DC 细胞显著的增高(图 2g), 而 CD49b⁺NK 细胞变化不明显(图 2h)。这提示我们, 灵芝孢子油对脾脏免疫细胞的影响可能不是影响免疫细胞的含量的分布, 可能是通过影响免疫细胞的其他方面来降低肿瘤在脾脏中的浸润。

2.3 荷瘤小鼠外周血中免疫细胞的影响 利用流式细胞仪检测外周血中淋巴细胞的含量。如图 3f 所示, 荷瘤鼠外周血中淋巴细胞数明显低于正常小鼠组, 在高剂量给药时, 淋巴细胞的含量有所升高。在低剂量和中剂量用药时 CD3⁺CD4⁺T 细胞和 CD3⁺CD8⁺T 细胞含量与荷瘤鼠(tumor)比较无差异。在高剂量用药是血液淋巴细胞中 CD3⁺CD4⁺T 细胞明显升高(图 3g), 而 CD3⁺CD8⁺T 细胞变化不明显(图 3h), 同时比较了血液淋巴细胞中 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比例在高剂量用药时明显升高, 基本接近正常小鼠中的比值(图 3k)。荷瘤鼠血液中 CD11c⁺DC 细胞含量高于正常小鼠, 然而这种含量的增加在给药后受到了一定的抑制(图 3i)。CD49b⁺NK 细胞在荷瘤小鼠血

液中的含量有所降低,在高剂量给药的同时,NK 细胞的含量有所回升(图 3j)。结果说明,灵芝孢子油对荷瘤鼠体液免疫具有很大的影响,其中可以通过增加荷瘤鼠血液中的淋巴细胞含量来增强小鼠的免疫力,同时部分恢复肿瘤对小鼠体液免疫的抑制。

2.4 巨噬细胞的吞噬能力及骨髓来源 DC 表面标志的变化 利用 dextran-FITC 阳性率表示巨噬细胞的吞噬能力(图 4a),荷瘤小鼠腹腔的巨噬细胞吞噬能力明显低于正常小鼠,而这种能力的下降在给药处理后也未得到明显的改善。取小鼠骨髓细胞诱导为 DC 细胞,其 CD11c(图 4b)表达率在给药前后无明显改变,但 CD80 和 CD86(图 4c 和 4d)的表达率显著性升高。结果表明,灵芝孢子油对荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞的作用不明显,但可以明显改善荷瘤小鼠骨髓诱导的 DC 的功能。



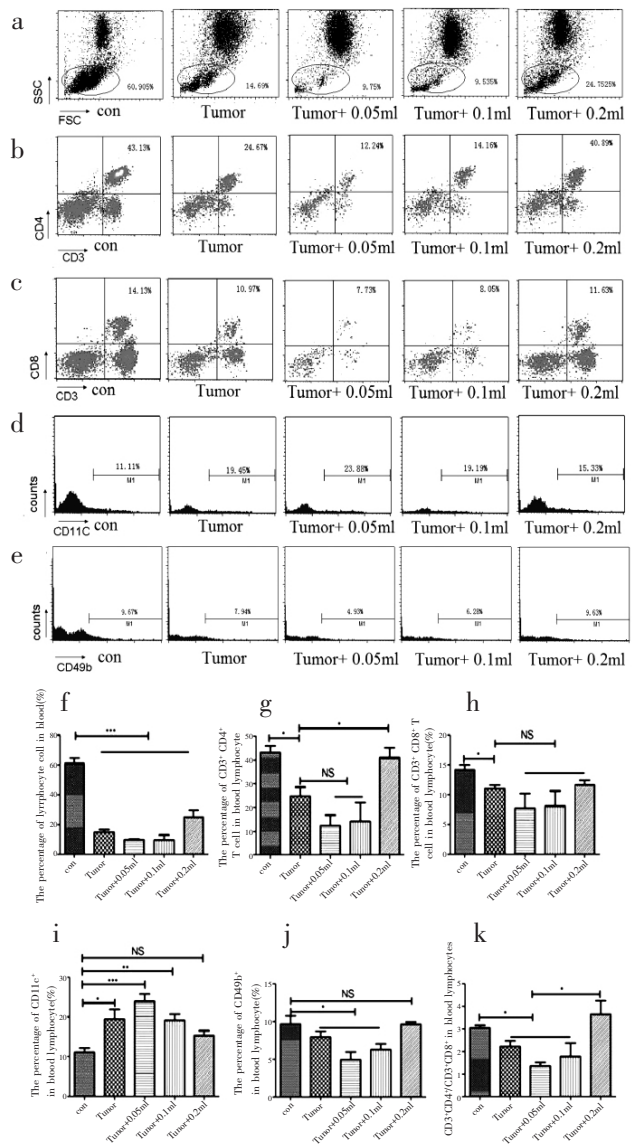
a) CD3⁺CD4⁺ T cell; b) CD3⁺CD8⁺ T; c) CD11⁺ DC cell; d) CD49a⁺ NK cell; e-h) the statistical result for FACS (a-d); i) The rate of CD4⁺ T cell/CD8⁺ T cell. **P*<0.05; ***P*<0.001; NS: no significance.

图 2 荷瘤小鼠脾脏免疫细胞的变化

Fig 2 The change of immunocytes in spleen of tumor-bearing mice

3 讨论

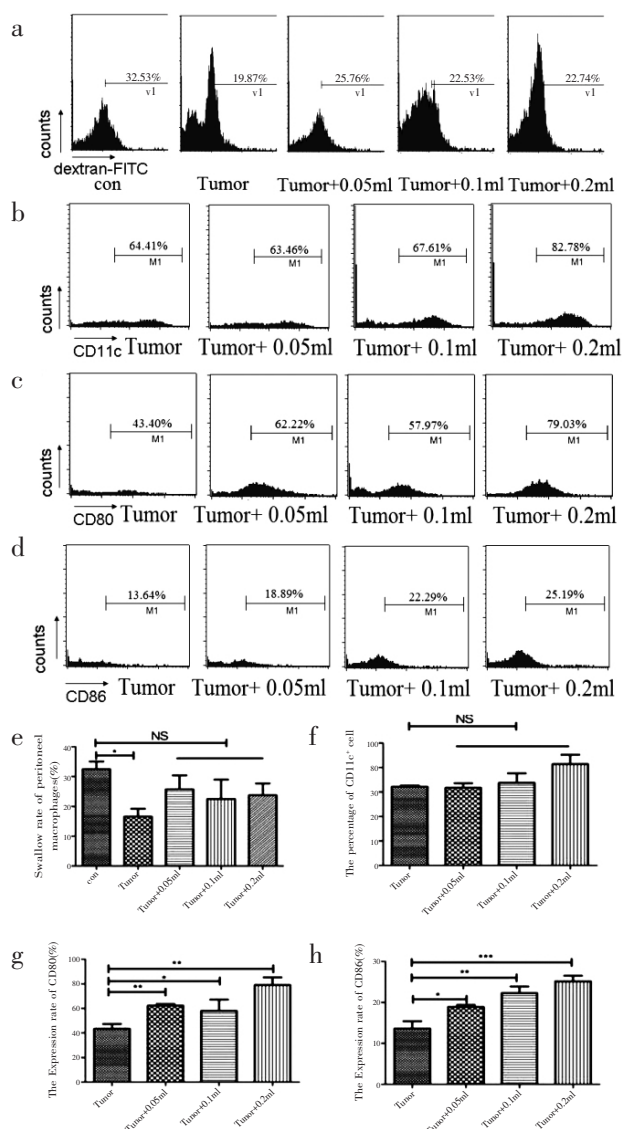
灵芝孢子油中主要含有三萜类、甾醇类、脂肪及脂肪酸等成分。采用超临界 CO₂ 萃取菌草灵芝孢子油中三萜类物质含 30.25%,是主要的活性成分。主要的三萜类物质包括灵芝孢子酸 A、B、C、E (ganosporeic acid A、B、C、E) 和 ganodermanonol 等^[3]。三萜类物质的抗癌活性已经得到广泛证实,主要表现在促进肿瘤细胞的凋亡^[4]、抑制血管内皮细胞增殖和迁移^[5]及调控肿瘤相关基因等方面^[6]。不饱和脂肪酸是菌草灵芝孢子油的另一个重要组成部分^[3],其中的亚油酸、油酸、棕榈酸、花生四烯酸、棕榈油酸和 EPA 等可以



a) the rate of lymphocytes in blood; b) CD3⁺CD4⁺ T cell; c) CD3⁺CD8⁺ T; d) CD11⁺ DC cell; e) CD49a⁺ NK cell; f-j) the statistical result for FACS (a-e); k) the rate of CD4⁺ T cell/CD8⁺ T cell. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001; NS: no significance.

图 3 荷瘤小鼠血液中免疫细胞的变化

Fig 3 The change of immunocytes in blood of tumor-bearing mice



a) the phagocytosis of peritoneal macrophages. The surface marker change in dendritic cell (bone marrow): CD11c(b), CD80(c) and CD86 (d). e-h) the statistical result for FACS(a-d). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; NS: no significance.

图4 腹腔巨噬细胞吞噬能力的变化以及骨髓来源DC表面标志表达的变化

Fig 4 The phagocytosis change of peritoneal macrophages and surface markers change in bone marrow derived DC

有效的对抗自由基^[1]。基于孢子油的组成特性,现代研究已表明灵芝孢子油具有抗肿瘤^[2]、降血脂^[7]、清除自由基^[1]和对神经系统的调节作用^[8]等功能。

本实验主要研究灵芝孢子油对荷瘤小鼠的中枢免疫系统与外周免疫系统的影响。实验中检测了灵芝孢子油对脾脏免疫细胞分布的影响,外周血中免疫细胞的影响,腹腔巨噬细胞以及骨髓来源DC细胞的功能的影响。荷瘤小鼠的脾脏在灵芝孢子油作用后明显减小,但脾脏中的免疫细胞分布在灵芝孢子油作用前后变化不明显,但在高剂量组是DC细胞的含量明显增加。这表明灵芝孢子油作用下减少

或抑制肿瘤细胞对脾脏的浸润,但不能完全改善肿瘤对脾脏的影响。同时我们检测了荷瘤小鼠外周血中淋巴细胞的变化,高剂量组中灵芝孢子油可以显著提高荷瘤小鼠外周血中淋巴细胞的比例,并且能够增加外周血淋巴细胞中CD3⁺CD4⁺T细胞、CD4⁺T/CD8⁺T的比率、DC细胞以及NK细胞的所占的比率。说明灵芝孢子油可以显著改善荷瘤小鼠外周血中淋巴细胞的亚群分布,增强荷瘤小鼠的体液免疫功能。体液免疫能力的增加可以有效的抑制肿瘤的发生发展,并改善小鼠的体制,从而提高荷瘤小鼠的存活率。腹腔巨噬细胞的吞噬能力在给药前后未有明显变化,这可能提示我们灵芝孢子油对巨噬细胞的影响不大。通过对骨髓诱导的DC细胞的研究,我们发现给药前后骨髓来源的DC细胞表面CD11c的表达量无明显变化,但CD80和CD86在给药前后明显上调,说明给药后诱导出的DC细胞的共刺激能力显著增强。

本实验结果显示,荷瘤小鼠的免疫功能受到明显抑制,灵芝孢子油可以有效改善这种抑制状态,提高荷瘤小鼠的免疫功能,抑制肿瘤生长并提高小鼠的存活率。

【参考文献】

- [1] 冯翠萍,程红艳,唐兵,等.灵芝孢子粉中孢子油提取及生物活性的研究[J].食用菌学报,2008,15(4):63-66.
- [2] 李向敏,谢意珍,潘鸿辉,等.灵芝孢子油检测标准与其抗肿瘤活性的关系[J].中国食用菌,2010,29(2):45-47.
- [3] 王彬,周科勤,范青生,等.超临界CO₂萃取菌草灵芝孢子油中三萜类物质和脂肪酸的测定[J].食品安全与检测,2006,22(1):74-75.
- [4] Wang W,Zhao Y,Rayburn ER,et al. In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng* [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2007, 59(5):589-601.
- [5] He MF, Liu L, Ge W, et al. Antiangiogenic activity of *Tripterygium wilfordii* and its terpenoids[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 121(1):61-68.
- [6] Li QF, Shi SL, Liu QR, et al. Anticancer effects of ginsenoside Rg1, cinnamic acid, and tanshinone IIA in osteosarcoma MG-63 cells: Nuclear matrix downregulation and cytoplasmic trafficking of nucleophosmin [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(9):1918-1929.
- [7] 李森柱,谢意珍,周静文,等.灵芝孢子油主要活性成分及降血脂功能的研究[J].中国食用菌,2006,25(5):40-42.
- [8] 朱蔚文,刘焯霖,徐浩文,等.灵芝孢子油干预治疗6-羟多巴帕金森病大鼠模型的实验研究[J].中山大学学报:医学科学版,2005,26(4):417-420.

(收稿日期:2010-09-15;修回日期:2010-10-17)

(编辑 侯瑞)