

猴头菇多糖的免疫调节作用*

徐杭民¹ 谢志慧¹ 张蔚羽¹ 蒋为葶²

内容提要 应用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色分析法检测细胞的代谢活性及增殖反应。实验结果显示,猴头菇多糖对由刀豆球蛋白(Con A)活化的小鼠胸腺细胞(前 T 细胞)有较强的促进增殖的作用,其 OD 值为单独使用刀豆球蛋白 A 的 2 倍以上;在脾脏淋巴细胞培养中,单独使用猴头菇多糖可以显著地促进细胞的增殖,其作用较对照组明显。对脂多糖(LPS)刺激的 B 细胞也有协同作用。

关键词 猴头菇多糖 淋巴细胞 免疫调节 刀豆球蛋白

Immunomodulatory Function of Polysaccharide of *Heridium erinaceus* Xu Hang-min, Xie Zhi-hui, Zhang Wei-yu, et al Zhejiang College of TCM, Hangzhou(310009)

Heridium erinaceus is a Chinese herbal medicine. The Apollo oral liquid contains polysaccharide of *H. erinaceus* (PHE). The effects of PHE on proliferation of mice T and B lymphocytes were studied. Results showed that (1) 3-fold proliferation of thymocytes was demonstrated when PHE were administrated with Con A than Con A alone. Such effect on thymocyte was not observed when PHE was used alone. (2) Proliferation of spleen lymphocytes was also stimulated when PHE were taken together with lipopolysaccharide, which was 50% and 3 times stronger than that of using lipopolysaccharide and PHE alone respectively.

Key words polysaccharides of *Heridium erinaceus*, T and B lymphocyte, lipopolysaccharide, Concanavalin A

猴头菇(*Heridium erinaceus*)属担子菌纲,多孔菌目齿菌科。其性平、味甘,利五脏。据报道,猴头菌的有效成份为多糖和多肽类物质,水解后的糖部分经薄层层析,鉴定为葡萄糖,阿拉伯糖和木糖等⁽¹⁾。体外实验发现,它有抑制艾氏腹水癌(EAC)细胞 DNA 和 RNA 的合成作用⁽²⁾。临床已证明,猴头菇菌及其菌丝体治疗慢性胃炎的总有效率达 96.3%,胃及十二指肠溃疡总有效率为 93%,特别是胃镜像及病理好转率达 77.4%⁽³⁾。本文采用四甲基偶氮唑蓝(MTT) [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 法在体外观察了猴头菇多糖及其协同刀豆球蛋白 A(Con A)、脂多糖(LPS)对小鼠 T、B 淋巴细胞的影响。

材料与方

1 实验材料 实验动物,均为雄性 NIH 小鼠,6~8 周龄,体重为 18~22 g,由浙江省实验动物中心供应;猴头菇多糖(polysaccharides Isolated from the *Heridium erinaceus* Pers. 简称 PHEP),由广东太阳神集团公司提供口服液,经本校中药系化学教研室提取,多糖含量为 55%。其他实验材料来源是:MTT,瑞士 Fluka 公司生产,批号为 No. 88415;RPMI-1640,美国 GIBCO 公司生产;LPS,中国第二军医大学产品,批号为 No. 89012;96 孔平底培养板,丹麦 NUNC 公司产品。

2 胸腺细胞(前 T 细胞)增殖反应 参考 Mosmann 方法⁽⁴⁾稍加改进。无菌摘取胸腺,剔除周围脂肪,剪碎组织,置钢性细胞筛挤压,同时用含有 10% FCS(小牛血清)的培养基(RPMI-1640,每毫升含 100 u 的青霉素 G 和 100 μg 的链霉素以及 3 μg 的二性霉素 B,美国 GIBCO 公司产品)冲洗,制成单个胸腺细胞悬液,洗涤 2 次(1500 r/min, 5 min),重悬细胞,将细胞浓度调整至 1×10^7 /ml,并加入 96

* 本文曾在 1993 年 8 月香港举行的第一届国际真菌生物学和产品会议上交流

1 浙江中医学院(杭州 310009)

2 广东太阳神集团公司科研中心

孔平底培养板, 每孔 $100\ \mu\text{l}$, 再加入各样品, 每孔 $100\ \mu\text{l}$, 使每孔的总体积为 $200\ \mu\text{l}$, 重复 3 份。置 $5\%\text{CO}_2/95\%\text{空气}$ (无菌), 37°C 细胞培养箱培养 72 h, 在培养结束前 4 h, 加入 MTT [pH 6.9, 磷酸盐缓冲液(PBS)配制] 每孔 $10\ \mu\text{l}$, 使终浓度达到 $0.5\ \text{mg/ml}$, 继续培养 4 h。终止培养后, 用 96 孔平板离心机离心($1500\ \text{r/min}$, $10\ \text{min}$), 弃上清, 经 PBS 洗涤 1 次后, 每孔加入 $100\ \mu\text{l}$ 含 $0.04\ \text{mol/L}$ HCl 的酸化异丙醇($50\ \text{ml}$ 异丙醇+浓 HCl $0.167\ \text{ml}$), 振荡(微型振荡器)约 5~10 min 后, 用 DG-II 型酶联免疫检测仪, 测定各样品光密度 OD 值, 选择波长为 $570\ \text{nm}$ 和 $630\ \text{nm}$ (参考波长)。

3 脾脏淋巴细胞的增殖反应 参考 Mosmann 方法⁽⁴⁾稍加改进。无菌取脾脏, 制成单个细胞悬液, 并采用低渗法破坏红细胞, 洗涤后, 重悬细胞, 将细

胞浓度调整至 $5\times 10^6/\text{ml}$ 。操作步骤与胸腺细胞增殖反应相同。

结 果

1 胸腺细胞(前 T 细胞)增殖反应 猴头菇多糖不同剂量与 Con A 联合使用时, 对小鼠胸腺细胞有显著的促进增殖作用。当 Con A 浓度在 $2\ \mu\text{g/ml}$ 时($n=3$, 下同), 加入猴头菇多糖浓度为 0、0.78、1.56、3.12、6.25、12.5、 $25\ \mu\text{g/ml}$, 胸腺细胞增殖的 OD 值分别为: 0.14 ± 0.01 、 0.15 ± 0.01 、 0.17 ± 0.02 、 $0.20\pm 0.01^*$ 、 $0.25\pm 0.02^*$ 、 $0.35\pm 0.03^{**}$ 、 $0.44\pm 0.01^{**}$ (与对照组相比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$)。当单独使用猴头菇多糖(同上各浓度, $n=3$, 对照组)时均未显示促进作用。猴头菇多糖协同 Con A 对胸腺细胞增殖有促进作用, 并随多糖浓度的提高

附表 猴头菇多糖加入不同基质的药理作用 ($\bar{x}\pm S$)

药物	猴头菇多糖($\mu\text{g/ml}$)					
	0	3.125	6.25	12.5	25	50
Con A ($2\ \mu\text{g/ml}$)	0.14 ± 0.01	$0.20\pm 0.01^*$	$0.25\pm 0.02^*$	$0.35\pm 0.03^{**}$	$0.44\pm 0.01^{**}$	—
RPMI-1640	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	$0.08\pm 0.01^*$	$0.11\pm 0.02^{**}$	$0.14\pm 0.01^{**}$	$0.17\pm 0.02^{**}$
LPS ($50\ \mu\text{g/ml}$)	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.29 ± 0.01

注: 与不加猴头菇多糖组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$

而增强。

2 脾脏淋巴细胞的增殖反应 见附表。单独使用猴头菇多糖, 对脾脏淋巴细胞有显著的促进增殖的作用。但对由 LPS 激活的 B 淋巴细胞增殖, 猴头菇多糖未见有协同作用。

讨 论

对由 Con A 引起活化的 T 淋巴细胞, 猴头菇多糖(PHEP)有显著的促进其增殖的作用。然而, 这是一个协同作用, 其协同作用只有在 Con A 存在的条件下, 才能得到体现, 而单独用各种浓度的猴头菇多糖并不能使 T 淋巴细胞增殖。这可能是与药物作用于细胞的周期不同有关⁽⁵⁾。在单独使用猴头菇多糖时, 脾脏混合淋巴细胞的增殖作用得到了显著提高, 这从某种意义上来看, 要比协同 Con A 促进前 T 细胞增殖的作用更为重要。脾脏淋巴细胞均为成熟的, 具有功能性的细胞, 比如在脾脏中的 T 细胞, 它已完成抗原识别受体的基因重排及分子表达, 使细

胞自身具备识别外来抗原, 并应答和自身抗原耐受的能力。这对于机体抵御疾病和康复, 有着重要的意义。

参 考 文 献

1. 钱伏刚, 等. 猴头菌培养物化学成分的研究. 中草药 1988; 7(2): 1.
2. 徐静彬, 等. 猴头二级菌丝体细胞核有丝分裂初探. 食用菌 1985; 4(4): 36.
3. 王 宁, 等. 猴头健胃灵治疗慢性胃炎 53 例临床疗效观察. 中药药理与临床 1987; 3(1): 46.
4. Mosmann, T.J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Method 1983; 65: 55.
5. 徐杭民, 等. 前益母草素(prehispanolone)对小鼠 T、B 淋巴细胞的影响. 药学学报 1992; 27(11): 812.

(收稿: 1993—08—18 修回: 1994—01—04)