

灵芝多糖 GL-B 的抑瘤作用和机制研究*

张群豪 林志彬

内容提要 目的:探讨灵芝多糖 GL-B 的抗肿瘤作用及其机制。方法:采用体内体外实验相结合方法,MTT 法测肿瘤细胞增殖程度,流式细胞仪测细胞凋亡,同时采用生物法测定 $\text{TNF}\alpha$, ELISA 测定 $\text{IFN}\gamma$, 并用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 mRNA 表达。结果:(1)GL-B 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 显著抑制小鼠移植性肉瘤 S180 的生长;(2)GL-B 直接加入人急性早幼粒白血病细胞(HL-60)体外培养不能抑制其生长,亦无诱导其凋亡的作用。(3)GL-B 与小鼠腹腔巨噬细胞和脾淋巴细胞共同培养上清显著抑制 HL-60 细胞生长并诱导其凋亡,培养上清中 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IFN}\gamma$ 水平显著升高, GL-B 并显著促进其 mRNA 的表达。结论:GL-B 无直接的抗肿瘤作用,其抗肿瘤作用是通过促进 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IFN}\gamma$ mRNA 表达,增加 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IFN}\gamma$ 的分泌而实现的。

关键词 灵芝多糖 细胞凋亡 肿瘤坏死因子 α 干扰素 γ 酶联免疫吸附试验 逆转录-聚合酶链反应

Study on Antitumor Activity and Mechanism of *Ganoderma* Polysaccharides B Zhang Qunhao, Lin Zhibin
Department of Pharmacology, School of Basical Medical Sciences, Beijing Medical University, Beijing (100083)

Objective: To study the antitumor activity and mechanism of *Ganoderma* polysaccharides (GL-B). **Methods:** Both in vivo and in vitro experiments were conducted in the study. Proliferation of tumor cells was detected by MTT method, tumor necrosis factor α ($\text{TNF}\alpha$) was detected by biological assay, and interferon γ ($\text{IFN}\gamma$) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The level of mRNA was detected with the method of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** (1)GL-B 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inhibited the growth of implanted sarcoma 180 in vivo significantly and dose-dependently. (2)GL-B directly adding to the cultured medium neither induced HL-60 apoptosis nor restrained its proliferation in vitro. (3)The macrophages and T lymphocytes cultured medium treated with GL-B significantly induced HL-60 apoptosis and inhibited its proliferation. GL-B significantly increased $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IFN}\gamma$ release and their mRNA expression in the cultured medium. **Conclusion:** The anti-tumor activity of GL-B was derived from promoting mRNA expression of $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IFN}\gamma$, resulting in $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IFN}\gamma$ release.

Key words *Ganoderma* polysaccharides (GL-B), apoptosis, tumor necrosis factor α , interferon γ , enzyme-linked immunosorbent assay, reverse transcriptase-polymerase chain reaction

灵芝〔赤芝, *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.〕是最常用的灵芝属真菌之一,具有滋补强壮,扶正固本功效。灵芝含有多种有效成分,多糖类是其主要有效成分之一。灵芝多糖具有抗肿瘤作用,其抗肿瘤作用可能与多糖的免疫增强作用有关^{〔1〕},但其抗肿瘤机制至今尚未完全阐明,需进一步的研究。本研究从整体、细胞、分子水平、体内体外实验相结合,观察了灵芝多糖 GL-B 的抗肿瘤作用机

制。

材料与方法

1 药物 GL-B:系从灵芝子实体中提取的多糖成分,分子量 7100~9300,为浅黄色粉末,易溶于水,由北京医科大学药学院中药研究室提供;足叶乙甙(VP-16);连云港制药厂;环磷酰胺(CY):上海华联制药有限公司。

2 L929 细胞 购自北京医科大学基础医学院免疫学系;HL-60、S180 细胞:购自北京肿瘤研究所;小鼠 ELISA IL-6 试剂盒:美国 Endogen 公司产品。

* 中国博士后基金资助课题

北京医科大学基础医学院药理学系(北京 100083)

3 试剂及仪器 TRIZOL 试剂(RNA 提取剂); Gibco BRL 公司产品。RT-PCR 试剂盒:美国 Promega 公司产品。

4 实验方法 肿瘤细胞体外增殖抑制试验:采用 MTT 方法⁽²⁾,小鼠 S180 肉瘤的抑瘤试验采用常规方法⁽³⁾,肿瘤细胞凋亡检测采用流式细胞仪测定。

4.1 细胞因子检测 正常健康 Balb/c 小鼠颈椎脱臼处死,常规制备腹腔巨噬细胞(PM ϕ)和脾淋巴细胞,于含 1×10^6 PM ϕ 和脾淋巴细胞的 24 孔培养板中加入不同浓度的药物和诱导剂脂多糖(LPS, 5mg/L),培养一定时间后收集上清,用结晶紫染料摄入法⁽⁴⁾测定培养上清中肿瘤坏死因子 α (TNF α)的含量,用小鼠 γ 干扰素(IFN γ)ELISA 试剂盒测定 IFN γ 含量。

4.2 RT-PCR 方法 同上分别制备 Balb/c 小鼠 PM ϕ 和脾淋巴细胞,分别于含 PM ϕ 和脾淋巴细胞的细胞培养瓶中加入不同浓度的药物和诱导剂 LPS (5mg/L)及刀豆素(ConA, 2.5mg/L),培养 48h 后用 TRIZOL 试剂提取细胞总 RNA,紫外可见分光光度计对 RNA 样品定量。逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TNF α 、IFN γ 及 β -actin mRNA 的表达,扩增反应条件参照试剂盒操作手册,反应体系为 5 μ l,反转录与聚合酶链反应一步完成。引物根据文献资料设计^(5,6),由中国科学院微生物研究所合成。序列为:TNF α 产物 422bp;IFN γ 产物 220bp; β -actin 产物 478bp;取 RT-PCR 产物 10 μ l,加入 2 μ l 上样缓冲液混合,加样于 15g/L 的琼脂糖凝胶,分别以 385、485、585bp 和 154、220、344bp 的 DNA 片断为 DNA marker,0.5 $\times$ TBE 为电泳缓冲液,5V/cm 恒压电泳 2h 检测 RT-PCR 产物,紫外透射仪观察并照相。RT-PCR 结果用图像分析仪对胶片上每一泳带进行光密度扫描定量,结果用各组的 A.V.OD 值与 β -actin 的 A.V.OD 之比表示。RT-PCR 结果以 3 次以上实验测定值与相应对照的比值的 $\bar{x} \pm s$ 表示。

统计学方法 各组间的显著性检验均采用 Duncan's test, ANOVA, SAS6.04。

结 果

1 GL-B 整体给药对小鼠 S180 肉瘤的抑制作用 GL-B 50、100、200mg/kg 可以显著抑制 Balb/c 小鼠移植性肉瘤 S180 的生长,其抑瘤率分别为 27.70%、55.83% 和 66.70%,见表 1。由表 2 可见,GL-B 和 CY 联合用药组比单独用 GL-B 或 CY 抑瘤率都高,抑瘤率分别为 80.98%、45.45% 和 75.95%。

2 GL-B 体外给药对 HL-60 细胞增殖的直接作

表 1 GL-B 整体给药对 Balb/c 小鼠移植性 S180 肉瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	体重(g)		瘤重 (mg)	抑制率 (%)
		实验前	增加值		
NS	—	23.61 $\pm$ 1.40	10.32 $\pm$ 2.60	2.02 $\pm$ 0.16	
GL-B	50	24.05 $\pm$ 1.75	7.57 $\pm$ 1.82*	1.46 $\pm$ 0.61	27.70
	100	23.90 $\pm$ 1.62	6.33 $\pm$ 1.77**	0.89 $\pm$ 0.45**	55.83
	200	23.52 $\pm$ 1.48	6.46 $\pm$ 1.46**	0.67 $\pm$ 0.47**	66.70
CY	20	23.84 $\pm$ 1.43	5.84 $\pm$ 1.68**	0.44 $\pm$ 0.54**	78.02

注:与 NS 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;每组样本数为 10

表 2 GL-B 整体给药对 Balb/c 小鼠移植性 S180 肉瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	体重(g)		瘤重 (mg)
		实验前	增加值	
NS	—	23.14 $\pm$ 1.62	9.58 $\pm$ 2.11	1.87 $\pm$ 0.78
GL-B	100	22.79 $\pm$ 1.41	7.22 $\pm$ 1.73	1.02 $\pm$ 0.51* $\Delta\Delta$
CY	20	22.87 $\pm$ 1.55	6.65 $\pm$ 1.42	0.45 $\pm$ 0.48** Δ
GL-B+CY	100+20	23.35 $\pm$ 1.34	6.70 $\pm$ 1.36	0.36 $\pm$ 0.17**

注:与 NS 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 GL-B+CY 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;每组样本数为 10

用 MTT 在活细胞线粒体内的线粒体脱氢酶作用下,由淡黄色还原为紫色的甲瓞颗粒,甲瓞颗粒经酸化异丙醇溶解后,用酶标仪在 570nm 波长处比色测 OD 值,根据 OD 值判断活细胞数,从而判定药物对肿瘤细胞的杀伤作用。直接加 GL-B 至肿瘤细胞培养基中,当 GL-B 浓度为 50、100、200 μ g/ml 时,OD 值分别为 0.384 $\pm$ 0.137、0.402 $\pm$ 0.440、0.465 $\pm$ 0.139, RPMI1640 对照组为 0.346 $\pm$ 0.041,即 GL-B 的此 3 个剂量组对 HL-60 细胞增殖均无显著抑制作用($P > 0.05$)。相反,GL-B 浓度为 400 μ g/ml 时,反而促进其增殖($P < 0.05$)。

3 GL-B 体外给药对 HL-60 细胞凋亡的影响 GL-B 浓度为 50、100、200 μ g/ml 时,HL-60 凋亡细胞的百分数分别为 (0.87 $\pm$ 0.24)%、(0.65 $\pm$ 0.31)%、(0.63 $\pm$ 0.45)%, RPMI1640 对照组的凋亡细胞为 (1.94 $\pm$ 0.41)%,给药组与 RPMI1640 对照组有显著差别($P < 0.05$),即 GL-B 不诱导体外培养的 HL-60 细胞凋亡。阳性对照药 Vp-16 则可明显诱导 HL-60 细胞凋亡,其凋亡百分数为 (67.7 $\pm$ 4.0)%。

4 GL-B 与脾细胞、腹腔巨噬细胞共同培养上清对 HL-60 细胞体外增殖的影响 GL-B 50、100、200 μ g/ml 与腹腔巨噬细胞共同培养上清(GL-B-M ϕ -CM)可明显抑制 HL-60 细胞的体外增殖,OD 值分别为 0.489 $\pm$ 0.178、0.418 $\pm$ 0.154、0.267 $\pm$ 0.109,正常腹腔巨噬细胞培养上清(N-M ϕ -CM)的 OD 值为 0.576 $\pm$ 0.143,两者比较,有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。阳性对照药 Vp-16 亦能显著抑制 HL-60 细胞增殖,OD 值

为 0.247 ± 0.097 ($P < 0.01$)。GL-B 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 与小鼠脾细胞共同培养上清 (GL-B-S-CM) 亦明显抑制 HL-60 细胞体外增殖, OD 值分别为 0.476 ± 0.123 、 0.439 ± 0.162 、 0.266 ± 0.102 , 正常小鼠脾细胞培养上清 (N-S-CM) OD 值为 0.577 ± 0.141 , 两者比较, 有显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 阳性对照药 Vp-16 亦显著抑制 HL-60 细胞增殖, OD 值为 0.208 ± 0.116 ($P < 0.01$)。

5 GL-B 与脾细胞、腹腔巨噬细胞培养上清对 HL-60 细胞凋亡的影响 GL-B 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 与 GL-B-M ϕ -CM 可诱导 HL-60 细胞发生凋亡, 细胞凋亡发生率分别为 $(18.81 \pm 0.93)\%$ 、 $(20.98 \pm 1.57)\%$ 、 $(23.00 \pm 0.56)\%$, N-M ϕ -CM 只有 $(7.44 \pm 1.07)\%$ 的细胞发生细胞凋亡, 两者差异显著 ($P < 0.01$)。GL-B 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 与 GL-B-S-CM 可诱导 HL-60 细胞发生凋亡, 细胞凋亡发生率分别为 $(19.39 \pm 1.13)\%$ 、 $(21.94 \pm 0.84)\%$ 、 $(22.85 \pm 1.49)\%$, 与 N-S-CM 只有 $(7.44 \pm 1.07)\%$ 的细胞发生凋亡比较, 两者差异显著 ($P < 0.01$)。而阳性对照药 VP-16 则可使 $(71.45 \pm 2.43)\%$ 的细胞凋亡, 差异更为显著 ($P < 0.01$)。

6 GL-B 与小鼠腹腔巨噬细胞共同培养上清中 TNF α 的诱导 图 1 显示 GL-B 在 12.5~400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内与小鼠腹腔巨噬细胞共同培养上清中 TNF α 的含量随浓度的升高而增加。

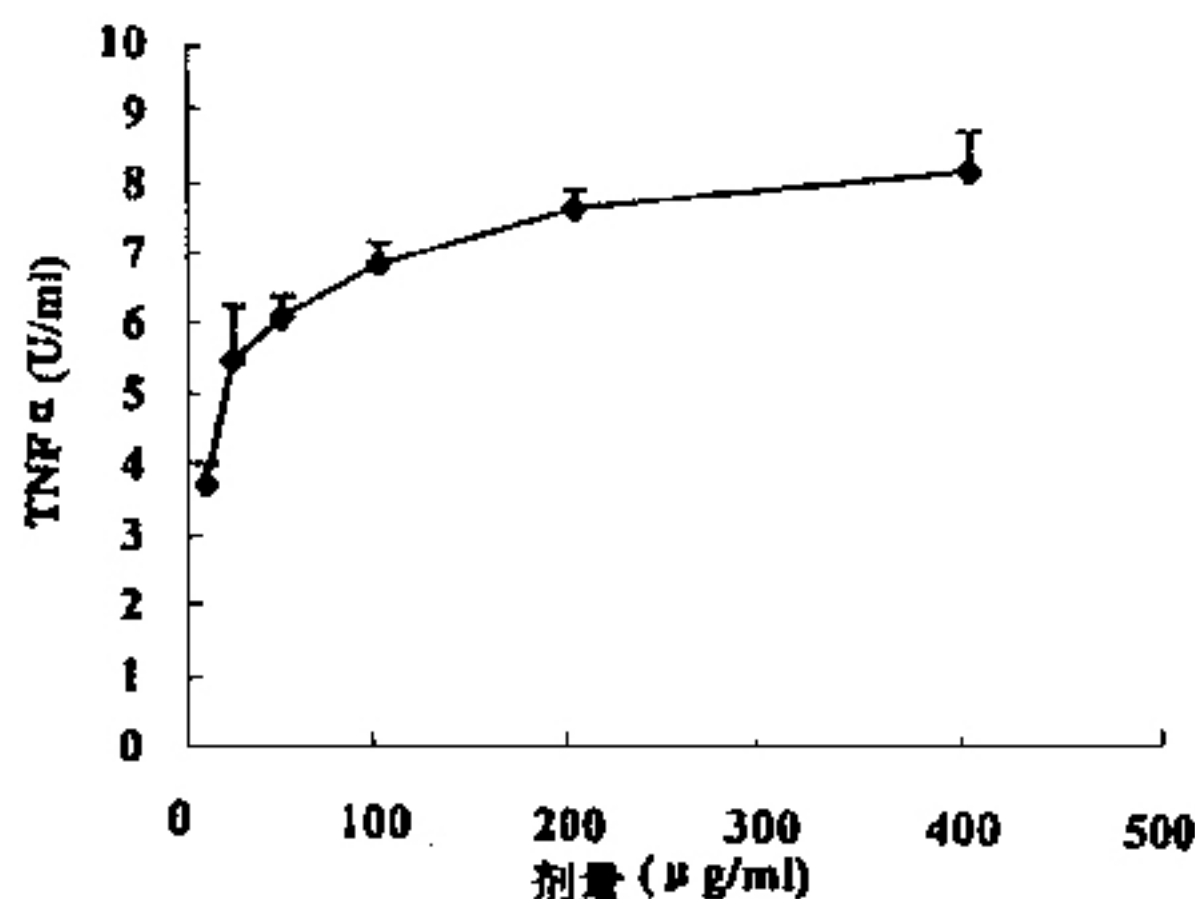


图 1 GL-B 与小鼠腹腔巨噬细胞共同培养上清中 TNF α 的含量

7 GL-B 与脾细胞共同培养上清中 IFN γ 的检测 图 2 显示 GL-B 在 12.5~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内与小鼠脾细胞共同培养上清中 IFN γ 的含量随浓度的升高而增加, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上开始有所减少。

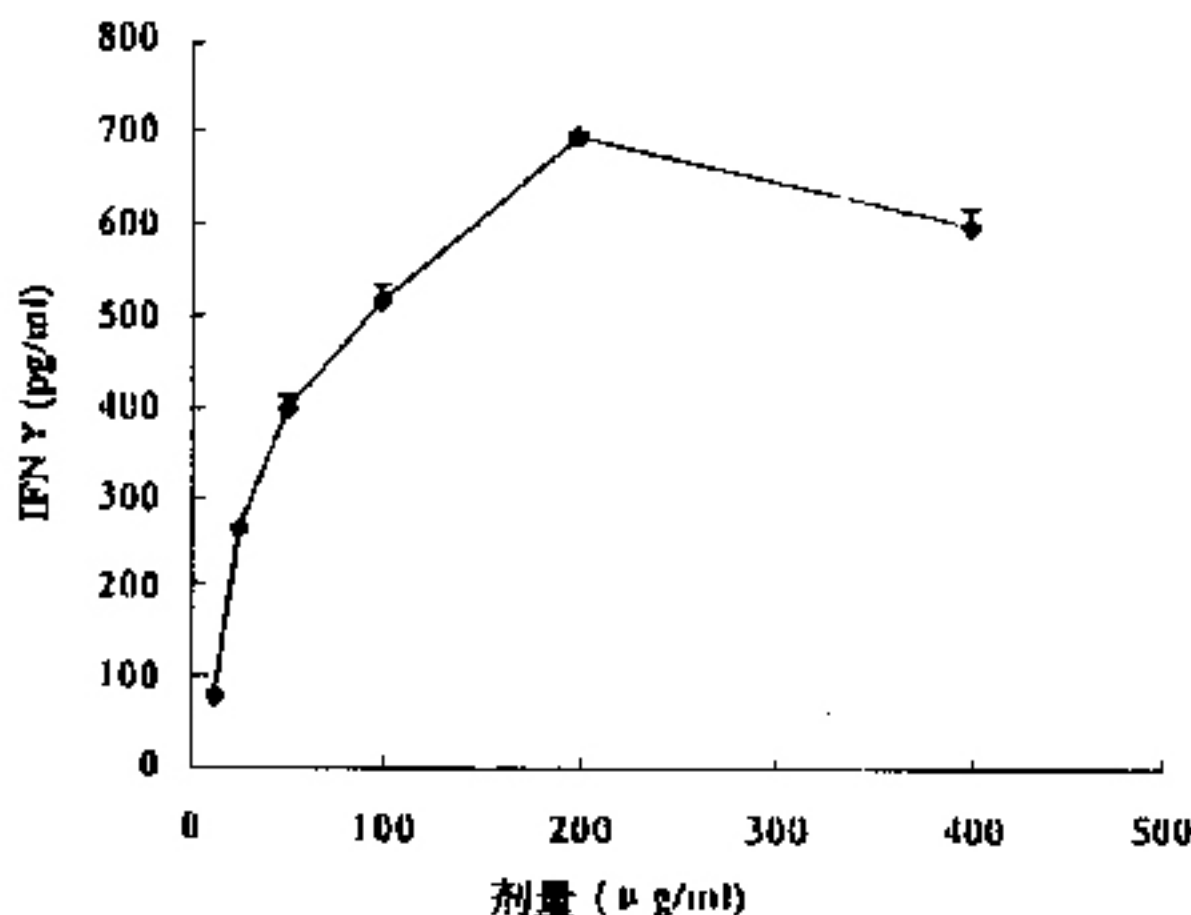


图 2 GL-B 与小鼠脾细胞共同培养上清中 IFN γ 的含量

8 GL-B 对 TNF α mRNA 和 IFN γ mRNA 表达的影响 表 3 结果显示 GL-B 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 可使小鼠腹腔巨噬细胞 TNF α mRNA 和小鼠脾细胞 IFN γ mRNA 的表达均明显高于对照组, 其辉度扫描的 mRNA 相对表达量与对照组比较亦均有显著性差异。

表 3 GL-B 对 TNF α 和 IFN γ mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度	n	mRNA 水平	
			TNF α /β-actin	IFN γ /β-actin
对照	—	3	0.036 ± 0.008	0.166 ± 0.076
GL-B	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3	0.095 ± 0.024 *	0.572 ± 0.059 *
	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3	0.194 ± 0.019 **	0.735 ± 0.044 **
	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3	0.430 ± 0.021 **	1.386 ± 0.331 **

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

从 70 年代初起, 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的灵芝多糖, 并推测其抗肿瘤作用是宿主中介性的, 可能与加强机体的免疫功能有关^[1]。本实验结果表明, GL-B 对小鼠移植性 S180 肉瘤的生长具有显著的抑制作用, 抑瘤率随剂量的加大而增加, 与以往报道一致。结果还显示 GL-B 与 CY 联合用药组抑瘤率高于单纯用 GL-B 或 CY 组。我们的研究表明, 在运用抗癌药的基础上联合运用 GL-B, 可能会有增效作用。

在整体实验证实 GL-B 在体内能抑制小鼠移植性肉瘤生长的基础上, 我们直接将 GL-B 加入体外培养的 HL-60 细胞中进行培养, 结果发现 GL-B 在体外对 HL-60 细胞并无抑制作用, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GL-B 甚至还有一定的促进 HL-60 细胞生长的作用。细胞凋亡 (apoptosis) 在肿瘤的发生、生长、细胞损伤发育、信息

传递、抗肿瘤药物治疗等方面具有重要意义。机体通过细胞凋亡能及时清除过多的或危险的细胞,介导肿瘤细胞发生“自杀”死亡⁽⁷⁾。近年来,人们逐渐认识到,肿瘤不仅是细胞增生异常的疾病,而且是细胞死亡异常的疾病,即不仅是细胞增生过度,亦是因细胞死亡过低。大多数抗癌药物均可在不同类型的敏感肿瘤中诱导细胞凋亡⁽⁸⁾。在观察 GL-B 诱导 HL-60 细胞凋亡的实验中,亦未发现 GL-B 有诱导 HL-60 细胞凋亡的作用。结果表明,GL-B 对肿瘤细胞无直接杀伤作用,亦无直接诱导 HL-60 细胞凋亡的作用。

TNF α 对肿瘤细胞有细胞毒和生长抑制作用,可诱导许多不同来源肿瘤细胞凋亡^(9~12)。IFN γ 有抗肿瘤细胞增生作用,并且可与 TNF α 协同增强诱导肿瘤细胞凋亡^(13~15)。为了进一步探讨 GL-B 的抗癌机制,我们制备腹腔巨噬细胞,加入不同浓度的 GL-B 共同培养,其后检测培养上清中 TNF α 的含量。结果表明, GL-B 有诱导 PM ϕ 产生 TNF α 的作用。将 GL-B 与 PM ϕ 共同培养上清加至 HL-60 细胞培养基中,发现可明显抑制 HL-60 细胞的生长,流式细胞仪检测,发现其有诱导 HL-60 细胞凋亡的作用,与正常 PM ϕ 培养上清比较,差异显著。将 GL-B 与小鼠脾细胞共同培养,观察其诱导脾细胞产生 IFN γ 的作用,结果与 TNF α 甚为接近。以上结果更为直接地证明了 GL-B 通过诱导 PM ϕ 产生 TNF α ,脾细胞产生 IFN γ ,进而诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞的生长。RT-PCR 结果与上述生物法和 ELISA 的结果一致, GL-B 可以促进 PM ϕ TNF α 和脾细胞 IFN γ mRNA 的表达。说明 GL-B 通过促进 PM ϕ TNF α mRNA,脾细胞 IFN γ mRNA 的表达。诱导 TNF α 和 IFN γ 的产生,进而诱导肿瘤细胞凋亡,从而达到抗肿瘤细胞生长的效果。

本研究明确地揭示灵芝多糖的免疫调节效应与其抗肿瘤效应的密切关系。(1)GL-B 在体内确有显著的抑制肿瘤细胞生长的作用;(2)GL-B 有很强的促进 PM ϕ TNF α mRNA 和脾细胞 IFN γ mRNA 表达,诱导 PM ϕ 产生 TNF α ,脾细胞产生 IFN γ 等细胞因子的作用;(3)GL-B 对体外生长的肿瘤细胞无直接的抑制作用,甚至还有一定的促进增殖的趋势。但是, GL-B 刺激的 PM ϕ 培养上清和脾细胞培养上清则有很强的抑制 HL-60 细胞增殖及诱导细胞凋亡的作用;(4)由于未经刺激的 PM ϕ 和脾细胞不产生或仅产生少量的细胞因子,对肿瘤细胞的生长亦无抑制作用, GL-B 的抗肿瘤作用显然是通过激活 PM ϕ 和脾细胞,诱导 TNF α mRNA 和脾细胞 IFN γ mRNA 的表达,从而刺激

TNF α 和 IFN γ 等细胞因子的释放,诱导肿瘤细胞的凋亡而引起的。

参 考 文 献

- 林志彬主编. 灵芝的现代研究. 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996: 135—140.
- Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* 1983;65:55—63.
- 徐叔云, 陈修, 卞如濂主编. 药理实验方法学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 1423—1431.
- 胡宝瑜, 张炳舟, 朱佑明, 等. 全血诱导 TNF 检测法. 上海免疫学杂志 1991;11(1):160—161.
- Han CW, Imamura M, Hashino S, et al. Differential effects of the immunosuppressants cyclosporin A, FK506 and KM2210 on cytokine gene expression. *Bone Marrow Transplan* 1995;15:733—739.
- Nicolas F, Gerard B, Werner R. Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *J Immunol Methods* 1997;204:57—66.
- Kerr JR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239—257.
- Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer metastasis Rev* 1992;11:121—139.
- Lanni JS, Lowe SW. P53-independent apoptosis induced by paclitaxal through an indirect mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94(18):9679—9683.
- Thomson A. The Cytokine Handbook. Academic Press, Third Printing 1992:241—256.
- Malorni W, Rainaldi G. Tumor necrosis factor α is a powerful apoptotic induce in lymphoid leukemic cells expression the P170 glucoprotein. *Int J Cancer* 1996;67:238—247.
- Rawadi G. Effects of mycoplasma formentans on the myelomonocytic lineage. *J Immunol* 1996;156:670—678.
- Volm M, Mattern J. Isolation of Dap3, a novel mediator of interferon-gamma induced cell death. *J Biol Chem* 1995;270(46):27932—27936.
- Sveinbjinsson B, Rushfeldt C. Cytotoxic effect of cytokines on murine colon carcinoma cells involves TNF-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;233(1):270—275.
- Geng YJ, Hellstrand K. Apoptotic death of human leukemic cells induced by vascular cells expressing nitric oxide synthases in response to gamma-interferon and tumor necrosis factor-alpha. *Cancer Res* 1996;56(4):866—874.

(收稿:1998-10-20 修回:1999-05-20)