

- seizures produce necrotic, apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage; implications for programmed cell death mechanisms [J]. *Neuroscience*, 2000, 98: 41-53.
- [8] Kuang Z S, Xie Y H, Li L, *et al.* Protective effect of the extract of *Acrous tatarinowii* Schott on neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Guangdong Med J* (广东医学), 2002, 23(5): 459-460.

- [9] Sermadiras D M, Joly B R. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain [J]. *Br J Dermatol*, 1997, 137: 883-889.
- [10] Oltvai Z N, Millman C L, Kovsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. *Cell*, 1993, 74: 609-619.

黄蘑多糖对荷瘤小鼠化疗的减毒增效作用

马 岩¹, 张 锐¹, 于小凤², 曲绍春², 徐华丽², 睢大员^{2*}

(1. 吉林大学基础医学院 生物化学与分子生物学教研室, 吉林 长春 130021;

2. 吉林大学药学院 药理教研室, 吉林 长春 130021)

摘要:目的 研究黄蘑 *Hohenbuehelia serotina* 多糖对环磷酰胺 (CTX) 化疗 H₂₂ 荷瘤小鼠的减毒和增效作用。方法 建立小鼠体内移植性肝癌模型; 小、中、大剂量治疗组分别 ip 黄蘑多糖提取物 20、40、80 mg/kg, 连续给药 10 d, 测定荷瘤小鼠的生命延长率和化疗药物 CTX 的毒副作用以及黄蘑多糖对 CTX 的减毒和增效作用。同时检测黄蘑多糖对淋巴细胞转化率、IL-2 水平等免疫系统功能的影响。结果 中、大剂量黄蘑多糖具有抑制肿瘤生长, 延长荷瘤小鼠的生存率的作用。与 CTX 伍用可发挥协同作用, 提高抑瘤率 ($P < 0.05, 0.01$); 提高荷瘤小鼠生存质量, 体重、白细胞计数及免疫器官指数, 与 CTX 阳性对照组比较均显示显著差异 ($P < 0.05, 0.01$); 实验结果显示黄蘑多糖与 CTX 伍用具有良好的减毒和增效作用, 可增强荷瘤小鼠机体免疫力, 提高淋转和 IL-2 的水平 ($P < 0.05, 0.01$)。结论 黄蘑多糖作为生物反应调节剂可提高机体的免疫力, 增强 CTX 的抗肿瘤作用, 同时减轻 CTX 的毒性。

关键词: 黄蘑多糖; 环磷酰胺; 减毒; 增效

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)08-1199-04

Decreasing toxicity and synergistic effects of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharide extracts to tumor-bearing mice treated by cytoxan

MA Yan¹, ZHANG Rui¹, YU Xiao-feng², QU Shao-chun², XU Hua-li², SUI Da-yuan²

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Science, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: **Objective** To study the toxicity-decreasing and synergistic effect of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides on H₂₂ mice treated by cytoxan (CTX). **Methods** The tumor-bearing mice models with Hepatoma-22 were established and divided into three groups. *H. serotina* polysaccharides extracts were administered with dosages of 20, 40, and 80 mg/(kg · d) through ip for 10 d, respectively to observe their life prolongable rates, the side and toxic reactions of CTX, lymphocyte transformations, and IL-2 levels. **Results** The group treated with large and medium dosages showed *H. serotina* polysaccharides could inhibit the tumor development with increasing the survival rate, have good synergism and attenuation of toxicity with CTX, enhance the inhibition on growth of Hepatoma ($P < 0.05, 0.01$), increase the weight, WBC count, and immune system index of tumor-bearing mice ($P < 0.05, 0.01$), stimulate the immune system, and improve lymphocyte transformation and IL-2 levels ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** As biological response modifier, *H. serotina* polysaccharides can increase the activity of body immunity, improve the anti-tumor effects of CTX, and attenuate the toxicity of CTX as well. They should be studied and exploited furtherly.

Key words: polysaccharides of *Hohenbuehelia serotina* (Schrad.) Sing.; cytoxan (CTX); decreasing toxicity; synergistic effect

收稿日期: 2005-12-22

基金项目: 吉林省科技发展计划项目资助课题 (20020803)

作者简介: 马 岩 (1952-), 女, 吉林长春人, 教授, 主要从事多糖抗肿瘤作用及机制研究。

Tel: (0431) 5621905 E-mail: mayan@email.jlu.edu.cn

* 通讯作者 睢大员 Tel: (0431) 5778520 E-mail: dayuansui@163.com

化学治疗是目前肿瘤综合治疗中必不可少的手段之一,但单纯化疗常引起免疫抑制,导致恶性反复感染,机体衰弱,预后不良而加速患者的死亡^[1]。环磷酰胺(CTX)作为临床常用的化疗药物,可干扰淋巴细胞的增殖,抑制免疫系统。因此,抗癌药物的研究要充分考虑到机体与肿瘤的关系,积极调动机体的自身免疫功能。寻找新的高效低毒抗癌药物或抗癌增效、减毒剂,探索抗肿瘤的天然活性成分是人类战胜恶性肿瘤的可能途径之一^[2]。黄蘑多糖提取物具有免疫调节作用^[3],对 H₂₂、S₁₈₀、艾氏腹水瘤等有较强的抑制作用^[4]。本实验通过建立小鼠体内移植性肝癌模型,对黄蘑多糖水溶性提取物延长荷瘤小鼠的生命率及与 CTX 联合应用的抗肿瘤作用进行实验研究,为黄蘑多糖作为化疗辅助药的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物:昆明种小鼠,6~8 周龄,体重 18~22 g,雌雄兼用(每批实验采用同一性别,实验前 3 d 在实验室常规饲养),由长春高新医学实验动物中心提供,合格证号:10-5113。

1.2 药物与仪器:黄蘑多糖为 β -D-葡聚糖蛋白,相对分子质量 22 000,含总糖 88.3%,含蛋白质 10.8%,葡萄糖为主要构成糖,比旋光度 +14.0°,由吉林大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室提供,日本静岡大学生化研究室河岸洋河教授鉴定;注射用 CTX:上海华联制药有限公司生产,批号 20040205,规格:每支 200 mg,以氯化钠注射液配成不同质量浓度的溶液,现用现配;H₂₂瘤株由吉林省肿瘤医院提供;Yac-1、L929、CTLL2 由吉林大学基础医学院免疫教研室提供;ConA 为美国 Sigma 公司产品;MTT 为美国 Amersco 公司产品;RPMI-1640 为美国 Gibco 公司产品;DMSO 为北京益力精细化学品有限公司产品;其他试剂均为国产分析纯;MCO-17AIC 二氧化碳培养箱为日本 SANYO 公司产品;IX71 倒置显微镜为日本 Olympus 公司产品;Bio-Rad 550 酶标仪型为美国 B. D 公司产品。

1.3 肿瘤动物模型的建立^[5]:取腹腔内传代 7 d 的肝癌 H₂₂ 小鼠,脱臼处死小鼠,在无菌条件下抽取腹腔内瘤细胞,并以生理盐水洗涤 3 次,2 500 r/min 离心 3 min,弃上清液,用无菌生理盐水调整瘤细胞浓度为 5×10^6 /mL,接种于昆明种小鼠左侧腹股沟皮下,每只小鼠接种 0.2 mL。

1.4 黄蘑多糖对 H₂₂ 荷瘤小鼠生命延长率的影响^[6]:于接种 24 h 内随机分组给药。空白对照组给

予生理盐水;阳性对照组给予 CTX 30 mg/kg;治疗组分别给予黄蘑多糖 20、40、80 mg/kg。各组均每天 ip 给药 0.02 mL/g,连续给药 10 d,停药后继续观察 35 d,每天记录体重。若治疗期间对照组动物死亡率 $\geq 20\%$ 或其 20% 存活时间长于 4 周以上,实验均应作废,按公式计算生命延长率。

生命延长率 = (治疗组平均存活时间/对照组平均存活时间 - 1) $\times 100\%$

1.5 黄蘑多糖对 CTX 的增效作用实验^[4]:用小鼠肝癌 H₂₂ 建立小鼠体内转移性肿瘤模型,接种方法同 1.3。于接种 24 h 内随机分组给药。对照组给予生理盐水;CTX 小剂量对照组给予 CTX 10 mg/kg;黄蘑多糖组分别给予黄蘑多糖 40 和 80 mg/kg;CTX 小剂量 + 黄蘑多糖组分别给予 CTX 10 mg/kg + 黄蘑多糖 40 mg/kg、CTX 10 mg/kg + 黄蘑多糖 80 mg/kg;CTX 大剂量对照组给予 CTX 20 mg/kg;CTX 大剂量 + 黄蘑多糖组给予 CTX 20 mg/kg + 黄蘑多糖 40 mg/kg、CTX 20 mg/kg + 黄蘑多糖 80 mg/kg。以上各组均每天 ip 给药 0.02 mL/g,连续给药 10 d,末次给药后 24 h 脱臼处死荷瘤小鼠,取瘤并称质量,比较单纯用 CTX 治疗组与加用黄蘑多糖组间抑瘤率的差异,观察黄蘑多糖的增效作用。

1.6 黄蘑多糖对 CTX 的减毒作用实验^[5]:用小鼠肝癌 H₂₂ 建立小鼠体内转移性肿瘤模型,接种方法、分组和给药同 1.5。末次给药后 24 h 脱臼处死荷瘤小鼠,取瘤并称质量,比较单纯用 CTX 治疗组与加用黄蘑多糖给药组间动物体重,计算脏器系数,按常规方法计数外周血白细胞数目,观察黄蘑多糖的减毒作用。

1.7 MTT 法检测黄蘑多糖对小鼠 T 淋巴细胞转化功能的影响^[2]:取昆明种小鼠按上述方法接种肝癌 H₂₂ 并分组给药,连续 10 d。无菌取脾脏制成单细胞悬液,离心洗涤,用含有 10% FCS 的 RPMI-1640 培养液调整脾细胞浓度为 1×10^7 /mL。加入 96 孔培养板,每孔 100 μ L,每只鼠设 3 个复孔。对照孔每孔加 100 μ L 的 RPMI-1640,ConA 刺激孔每孔加入 100 μ L ConA (终质量浓度为 5 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱培养 24~48 h,加入 MTT (5 mg/mL) 每孔 10 μ L,继续孵育 4 h。小心吸去上清液,加入 MTT 溶解液 DMSO,每孔 100 μ L,振荡 10 min,使颗粒完全溶解后吹打均匀。在酶标仪上于 570 nm 波长处读取吸光度 (A) 值,计算刺激指数 (SI)。

SI = ConA 刺激孔 A 均值/对照孔 A 均值

1.8 黄蓍多糖对荷瘤小鼠 IL-2 水平的影响^[2]:采用依赖细胞株增殖测定法检测黄蓍多糖对荷瘤小鼠 IL-2 活性的影响。制备 ConA 诱导的小鼠脾细胞 IL-2 反应细胞。将 IL-2 标准品用培养液倍比稀释,以 3 复孔加入 96 孔板中,每孔 100 μ L。将待测上清液设 1:2、1:4、1:8 共 3 个稀释度,亦按 3 复孔加入到 96 孔板内。将生长状态良好的 CTLL2 配制成 5×10^5 /mL 浓度的细胞悬液,向每孔中加入 100 μ L 细胞悬液,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 孵箱孵育 22 h 后,各孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 10 μ L,同样的条件下继续孵育 4 h 终止培养,小心吸弃孔内上清液,每孔加入 100 μ L DMSO,振荡 10 min。用酶标仪在 570 nm 波长处测定 A 值。用稀释度的对数值 (X) 和各稀释度对应的 A 值 (Y) 作直线回归,分析计算待测样品的 IL-2 水平。

1.9 统计学处理:所有结果均采用 Excel 进行 *t* 检验显著性差异检测,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 黄蓍多糖对 H₂₂ 荷瘤小鼠生命延长率的影响:黄蓍多糖对腹水型的荷瘤小鼠的生存率与对照组和阳性药组相比有显著的差异,结果见表 1。对照组小鼠逐渐行动迟缓,毛发不荣,饮食和饮水量减少,体重增加缓慢,阳性对照组甚至在给药的过程中就已经死亡,与之相比给药组小鼠活动较为灵活,毛色光泽亮丽,体重增加较快,机体状态良好。生命延长率的增加与给药剂量体现一定的量效关系。

表 1 黄蓍多糖对 H₂₂ 荷瘤小鼠生命延长率的影响

Table 1 Effects of *H. serotina* polysaccharides on life prolongable rate in H₂₂ mice

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物/ 只	生存时间 ($\bar{x} \pm s$)/d	生命延长率/%	
				与对照组比较	与 CTX 组比较
对照	—	21	26.30 $\pm$ 5.89	—	—
CTX	30	21	17.53 $\pm$ 5.96**	-33.35	—
黄蓍多糖	20	14	32.53 $\pm$ 3.59***	23.69	85.57
	40	14	33.72 $\pm$ 2.87***	28.21	92.24
	80	14	34.14 $\pm$ 4.64***	29.81	94.75

与对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01

与 CTX 组比较: ****P*<0.01

P*<0.05 *P*<0.01 vs control group

****P*<0.01 vs CTX group

2.2 黄蓍多糖对环磷酰胺的增效作用:将 3 批实验结果的平均值进行统计分析,CTX 10 mg/kg 剂量组的平均抑瘤率为 26.27%;单用黄蓍多糖 (40、80 mg/kg) 治疗组抑瘤率分别为 37.71% 和 56.35%;加用黄蓍多糖 40 和 80 mg/kg 组的平均抑瘤率分别为 40.01% 及 46.19%,提高抑瘤率 52.30%~

75.82%。CTX 20 mg/kg 剂量组的平均抑瘤率为 59.75%,而加用黄蓍多糖 40 和 80 mg/kg 组的平均抑瘤率分别为 69.92% 和 75.42%,提高抑瘤率 19.58%~28.99%。结果显示黄蓍多糖高剂量对肿瘤生长有抑制作用,抑瘤率高于 CTX 10 mg/kg 组,但不如 CTX 20 mg/kg 组抑瘤作用显著,两者伍用,显示出协同抑瘤作用。提示黄蓍多糖对 CTX 有明显的增效作用,结果见表 2。

表 2 黄蓍多糖对 CTX 的增效作用 ($\bar{x} \pm s$, *n*=12)

Table 2 Synergistic effects of *H. serotina*

polysaccharides on CTX ($\bar{x} \pm s$, *n*=12)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	平均肿瘤质量/g	平均抑瘤率/%
对照	—	2.36 $\pm$ 0.83	—
CTX	10	1.64 $\pm$ 0.39	26.27
黄蓍多糖	40	1.47 $\pm$ 0.78*	37.71
	80	1.03 $\pm$ 0.37**	56.35
CTX+黄蓍多糖	10+40	1.41 $\pm$ 0.31*	40.01
	10+80	1.27 $\pm$ 0.47***	46.19
CTX	20	0.98 $\pm$ 0.32***	58.47
CTX+黄蓍多糖	20+40	0.71 $\pm$ 0.27***	69.92
	20+80	0.58 $\pm$ 0.23***	75.42

与对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001;

与黄蓍多糖 (40 或 80 mg/kg) 组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01

P*<0.05 *P*<0.01 ****P*<0.001 vs control group

****P*<0.05 ***P*<0.01 vs *H. serotina* polysaccharides (40 or

80 mg/kg) group

2.3 黄蓍多糖对 CTX 的减毒作用:在小鼠肝癌 H₂₂ 体内模型中,CTX 10 及 20 mg/kg 组抑制肿瘤的同时,可使小鼠的体重、免疫器官及白细胞均明显下降,有些在停药前就已经死亡。黄蓍多糖与 CTX 合用可起到保护作用,能对抗 CTX 所致的体重、白细胞下降及免疫器官萎缩。提高荷瘤小鼠胸腺和脾脏质量,降低荷瘤小鼠死亡率,减轻 CTX 的毒性。尤其以 CTX 小剂量与黄蓍多糖合用治疗组效果最为明显。各组动物体重、脏器质量结果见表 3。

2.4 黄蓍多糖对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞转化功能和 IL-2 水平的影响:黄蓍多糖小、中、大剂量 ip 给药 10 d 后,ConA 诱导的小鼠淋巴细胞增殖反应明显提高,同时 CTLL2 诱导荷瘤小鼠产生的 IL-2 的量明显增加,且显示小剂量黄蓍多糖即可产生明显的免疫调节作用。结果表明,黄蓍多糖有良好的促进荷瘤小鼠 T 淋巴细胞增殖转化和提高 IL-2 水平的作用,见表 4。

3 讨论

肿瘤的发生、发展与机体的免疫水平下降有关,有效的化疗可减轻患者的痛苦,改善临床症状,提高生存质量及延长生命^[6]。如何提高肿瘤对化疗药物

表 3 黄蘑多糖对 CTX 的减毒作用 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 3 Toxicity-decreasing effects of *H. serotina* polysaccharides on CTX ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体重/g	胸腺质量/g	脾质量/g	白细胞计数/($\times 10^9\cdot L^{-1}$)
对照	—	25.8±4.41	0.020±0.086	0.088±0.017	10.7±0.5
CTX	10	20.9±3.38**	0.016±0.007*	0.074±0.018*	5.4±0.9**
CTX+黄蘑多糖	10+40	25.7±0.86**	0.020±0.009 [#]	0.109±0.03* [#]	10.5±2.8**
	10+80	24.6±2.46 [#]	0.022±0.001* [#]	0.102±0.04* [#]	8.8±0.2 [#]
CTX	20	17.0±2.49**	0.009±0.004**	0.065±0.02*	4.4±0.1**
CTX+黄蘑多糖	20+40	18.8±3.09*	0.012±0.007* [△]	0.079±0.01 [△]	6.5±0.5 [△]
	20+80	19.4±3.85 [△]	0.013±0.005* [△]	0.112±0.05* ^{△△}	8.1±0.5 ^{△△}

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与 CTX 10 mg/kg 组比较: [#] $P<0.05$ [#] $P<0.01$; 与 CTX 20 mg/kg 组比较: [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ [#] $P<0.01$ vs CTX 10 mg/kg group; [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$ vs CTX 20 mg/kg group

表 4 黄蘑多糖对 H₂₂ 荷瘤小鼠 T 淋巴细胞转化功能和 IL-2 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effects of *H. serotina* polysaccharides on T lymphocyte transformation and IL-2 level in H₂₂ mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ST	IL-2/(ng·mL ⁻¹)		
			1:2	1:4	1:8
对照	—	1.27±0.08	3.97±0.76	3.48±0.39	3.44±0.40
CTX	10	1.08±0.12*	2.69±0.30**	2.99±0.35*	2.66±0.13*
黄蘑多糖	20	1.34±0.12*	4.88±1.27* [#]	4.85±1.08* [#]	4.46±1.38* [#]
	40	1.33±0.15*	4.73±0.15* [#]	3.99±0.53* [#]	3.38±0.97 [#]
	80	1.60±0.15**	5.32±1.48* [#]	5.03±1.26* [#]	4.62±1.26* [#]

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与 CTX 组比较: [#] $P<0.05$ [#] $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ [#] $P<0.01$ vs CTX group

的敏感性并减轻化疗药物的不良反应是目前肿瘤治疗领域中越来越引起人们重视并值得探讨的问题。减毒是指减轻病人在化疗中的不良反应;增效是指在化疗期间增强肿瘤对化疗药物的敏感性并提高其治疗效果。对化疗中的减毒、增效作用不能孤立的看,而要将两者有机的结合起来使之相辅相成。一方面减毒有利于增效,即在减毒作用的同时提高患者的免疫力,增强其免疫杀伤能力,有利于杀伤癌细胞。另一方面增效有利于减毒,增效可间接的降低化疗所需剂量,从而减轻或者避免不良反应的发生^[7]。与单纯使用化疗药物相比,与生物反应调节剂合用能更有效地提高机体的免疫力,减少化疗药物剂量,增强抑瘤效果,保证化疗顺利完成。本实验通过研究黄蘑多糖提取物对 CTX 化疗肝癌 H₂₂ 荷瘤小鼠的减毒、增效作用及对淋转、IL-2 活性等免疫系统的影响,证明实验药物具有对抗化疗药所致体重下降、白细胞降低、胸腺和脾脏等免疫器官萎缩和骨髓抑制等毒性反应,提高 CTX 的抗肿瘤效果。实验药物的抗肝癌作用机制主要是通过增强机体免疫力,提高 T 淋巴细胞增殖、IL-2 等起作用^[3],这也可能是其减毒、增效的机制之一。总之,黄蘑多糖提取物作

为一种新型的生物反应调节剂可提高机体的免疫力,辅助化疗药物增强 CTX 的抗肿瘤作用,同时减轻 CTX 的毒性,是临床肿瘤综合治疗较为理想的减毒增效剂,具有广泛的应用前景。

References:

[1] Takeda K, Smyth M J, Cretney E, et al. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development [J]. *J Exp Med*, 2002, 195(2): 161-169.

[2] Yu C L, Ye T X, Lu D Y, et al. *Modern Medical Immunology* (现代医学免疫学) [M]. Shanghai: Shanghai University of Medical Science Publishing House, 1998.

[3] Ma Y, Ma Y Z, Zhang J Y, et al. Regulatory effects of polysaccharide Fb from Huangmo on immunological function in mice [J]. *J Jilin Univ; Med Ed* (吉林大学学报:医学版), 2005, 31(5): 692-695.

[4] Cao R, Ma Y, Mizuno T. Chemical constituents of a heat-dried Chinese mushroom, *Hohenbuehelia serotina* [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(4): 654-655.

[5] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学), [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.

[6] Hasegawa H, Suzuki R, Nagaoka T, et al. Prevention of growth and metastasis of murine melanoma through enhanced natural-killer cytotoxicity by fatty acid-conjugate of protopanaxatriol [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(7): 861-866.

[7] Tsai Y J, Chen I L, Horng L Y, et al. Induction of differentiation in rat C6 glioma cells with Saiko saponins [J]. *Phytother Res*, 2002, 16(2): 117-121.