

裂蹄木层孔菌抗肿瘤作用及其机制研究

张 问¹, 焦 燕¹, 李 航², 李敬轩², 蔡 云³, 李 红^{1*}, 杨世杰¹

1. 吉林大学白求恩医学院 药理学系, 吉林 长春 130021

2. 长春日惠食用菌研究所, 吉林 长春 130000

3. 福建省农业科学院, 福建 福州 350013

摘 要: **目的** 研究裂蹄木层孔菌的抗肿瘤作用及其机制。**方法** 制备 S₁₈₀、H₂₂、MFC 实体瘤小鼠模型和 S₁₈₀ 腹水瘤小鼠模型。将 3 种实体瘤模型小鼠均分为模型组, 裂蹄木层孔菌低、中、高剂量 (0.5、1.0、2.0 g/kg) 组和环磷酰胺 (CTX) 阳性对照组, S₁₈₀ 腹水瘤小鼠模型加设对照组。观察裂蹄木层孔菌对腹水瘤小鼠生存时间以及实体瘤小鼠瘤质量、胸腺和脾脏指数、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。**结果** 与模型组比较, 裂蹄木层孔菌低、中、高剂量均能延长 S₁₈₀ 腹水瘤小鼠的生存时间 ($P < 0.05$), 抑制肿瘤生长 ($P < 0.05$), 提高胸腺和脾脏指数 ($P < 0.05$) 及血清 IL-2 ($P < 0.05$) 和 TNF- α 水平 ($P < 0.01$)。**结论** 裂蹄木层孔菌对小鼠肉瘤 S₁₈₀、肝癌 H₂₂ 细胞、前胃癌 MFC 肿瘤的生长有明显抑制作用, 显示一定的抗肿瘤效应, 其可能通过提高免疫器官指数及血清中 IL-2、TNF- α 的水平达到抗肿瘤目的。

关键词: 裂蹄木层孔菌; 抗肿瘤; 白细胞介素-2; 肿瘤坏死因子- α ; 腹水瘤

中图分类号: R285.5; R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-2047-04

Antitumor effect of *Phellinus linteus* and its mechanism

ZHANG Wen¹, JIAO Yan¹, LI Hang², LI Jing-xuan², CAI Yun³, LI Hong¹, YANG Shi-jie¹

1. Department of Pharmacology, Norman Bethune College of Medicine, Jilin University, Changchun 130021, China

2. Ri Hui Edible Fungi Research Institute, Changchun 130000, China

3. Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China

Abstract: **Objective** To study the antitumor effect of *Phellinus linteus* and preliminarily discuss its mechanism. **Methods** MFC-bearing, H₂₂-bearing, S₁₈₀-bearing, and S₁₈₀ ascites tumors mice models were established. Five groups, model group, cyclophosphamide (CTX) group, high- (2 g/kg), middle- (1 g/kg) and low-dose (0.5 g/kg) of *P. linteus* groups, were studied for the former three models and a normal control group was added for S₁₈₀ ascites tumors mice model. Then the life span prolongation of ascites tumor mice and tumor weight, thymus and spleen indexes, and interleukin-2 (IL-2) and tumor necrosis factor (TNF- α) levels of S₁₈₀-bearing mice were determined. **Results** Compared with model group, high-, middle-, and low-dose groups of *P. linteus* could prolong life span ($P < 0.05$), inhibit tumor growth ($P < 0.05$), increase thymus and spleen indexes ($P < 0.05$), and elevate IL-2 and TNF- α levels ($P < 0.01$) of ascites tumors mice. **Conclusion** *P. linteus* shows antitumor effects and can obviously inhibit the cell growth of MFC, H₂₂ and S₁₈₀ through increasing index of immune organ and the IL-2 and TNF- α levels of serum.

Key words: *Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) Teng; antitumor; interleukin-2 (IL-2); tumor necrosis factor- α (TNF- α); ascites tumor

裂蹄木层孔菌 *Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) Teng 作为桑黄 *P. igniarius* (L. ex Fr.) Quél. 品种使用。由于桑黄具有利尿作用而受到中医的重视, 其在《神农本草经》、《本草纲目》中均有记载。裂蹄木层孔菌主要化学成分是子实体、菌丝体以及发酵液中的胞外多糖, 此外还有黄酮及其衍生物、香豆素类、甾醇类化合物; 其子实体、菌丝体及提取物

(主要为多糖)、胞外多糖在抗炎、抗氧化、抑制肿瘤生成、增强免疫力、保肝、预防和治疗关节炎等方面有显著活性^[1], 桑黄提取物具有抗肿瘤作用^[2]。本课题组观察裂蹄木层孔菌对 S₁₈₀、H₂₂、MFC 实体瘤小鼠模型和 S₁₈₀ 腹水瘤小鼠模型的影响, 以探讨其抗肿瘤作用及其机制, 为开发新型抗肿瘤药物提供依据。

收稿日期: 2011-06-23

作者简介: 张 问 (1986—), 女, 硕士研究生, 主要从事分子药理学研究。Tel: 15143171046 E-mail: zhang.jiawen163@163.com

*通讯作者 李 红 Tel: (0431)85619483 E-mail: lhong@jlu.edu.cn

1 材料

1.1 药品与试剂

裂蹄木层孔菌水提取物(多糖质量分数>15%),由长春日惠食用菌研究所提供;环磷酰胺(CTX),江苏恒瑞医药股份有限公司产品,批号10070221;小鼠白细胞介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)定量ELISA试剂盒,均由RD公司提供。

1.2 动物

ICR小鼠,清洁级,6~8周龄,体质量18~22 g,雌雄各半,吉林大学白求恩医学院实验动物中心提供,合格证号SCXK(吉)2007-0003。

1.3 肿瘤细胞

小鼠S₁₈₀瘤株、H₂₂瘤株、MFC瘤株,由吉林大学白求恩医学院药理学系常规传代培养。

1.4 主要仪器

LDZ5—2型离心机,北京医用离心机厂;LD24—1.8型低速自动平衡离心机,北京雷勃尔离心机有限公司;SW—CJ—1F超净工作台,万净集团安泰公司;ESJ60—4电子天平,沈阳龙腾电子称量仪器有限公司;恒温循环水浴箱,北京医疗设备厂;酶标仪,Sunrise公司。

2 方法

2.1 裂蹄木层孔菌水提取物的制备

裂蹄木层孔菌子实体粉碎成直径1~2 cm的小块,水洗、精选去掉杂物,加10倍体积热水于95~100℃提取3 h,反复抽提3次。合并提取液浓缩,经喷雾干燥得提取物。提取物主要有效成分为多糖,质量分数>15%。

2.2 S₁₈₀实体瘤模型的制备^[3]

无菌条件下抽取已接种7~8 d的S₁₈₀腹水瘤小鼠的腹水,与无菌生理盐水按1:3的比例稀释,台盼蓝染色进行活细胞计数、检查细胞活性>95%,调整细胞浓度为 1×10^7 /mL或 2×10^7 /mL,超净工作台上于小鼠右腋窝皮下接种细胞悬液,每只0.2 mL,30 min内接种完成。H₂₂实体瘤小鼠模型与MFC实体瘤小鼠模型按同法制备。

2.3 S₁₈₀腹水瘤模型的制备^[3]

无菌条件下抽取已接种7~8 d的S₁₈₀腹水瘤小鼠的腹水,与无菌生理盐水按1:3的比例稀释,台盼蓝染色进行活细胞计数,检查细胞活性>95%,调整细胞浓度为 $2 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$ /mL,在无菌操作条件下,每只小鼠腹腔接种S₁₈₀腹水瘤细胞悬液0.2 mL。

2.4 分组与给药

于接种肿瘤细胞24 h后,腹水瘤模型动物随机分成5组,每组6只小鼠。模型组ig蒸馏水0.1 mL/10 g,CTX组ip CTX 30 mg/kg,裂蹄木层孔菌组ig裂蹄木层孔菌液(蒸馏水配制)0.5、1.0、2.0 g/kg,给药体积0.1 mL/10 g,各组均每天给药或蒸馏水1次,直至死亡。实体瘤模型动物随机分成6组,每组10只小鼠,除加设对照组(仅用于S₁₈₀实体瘤小鼠血清IL-2和TNF- α 水平检测对照)外,给药方法和剂量同腹水瘤模型,各组均连续给药10 d。

2.5 检测指标

给药结束后第1天,小鼠称体质量,眼眶静脉丛取血(1~1.5 mL),处死,血样3 000 r/min离心10 min,取上清,-20℃保存待检。取血清,每个检测指标均设2个复孔,采用双抗体夹心ABC-ELISA法,严格按照试剂盒使用说明测定小鼠血清IL-2和TNF- α 。实体瘤模型小鼠,取瘤组织,称质量,计算抑瘤率[抑瘤率=(模型组瘤质量-给药组瘤质量)/模型组瘤质量];S₁₈₀实体瘤模型小鼠取胸腺、脾脏,计算脏器指数;S₁₈₀腹水瘤模型小鼠记录存活时间,计算生命延长率[生命延长率=(给药组生存时间-模型组生存时间)/模型组生存时间]。

2.6 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 对S₁₈₀实体瘤小鼠的影响

裂蹄木层孔菌3个剂量组及CTX组小鼠的瘤质量均明显低于模型组,表明裂蹄木层孔菌及CTX对肿瘤生长均有显著的抑制作用,其中以裂蹄木层孔菌高、中剂量效果较好。结果见表1。

3.2 对H₂₂实体瘤小鼠的影响

裂蹄木层孔菌3个剂量组及CTX组小鼠的瘤质量均明显低于模型组,表明裂蹄木层孔菌及CTX对肿瘤生长均有显著的抑制作用。结果见表2。

3.3 对MFC实体瘤小鼠的影响

裂蹄木层孔菌3个剂量组及CTX组小鼠的瘤质量均明显低于模型组,表明裂蹄木层孔菌及CTX对肿瘤生长均有显著的抑制作用。结果见表3。

3.4 对S₁₈₀腹水瘤小鼠的影响

裂蹄木层孔菌组与CTX组小鼠从给药第5天起腹部开始逐渐增大,但腹围增加不显著;而模型组小鼠从接种第5天起腹部已明显增大,活动、饮食

表 1 裂蹄木层孔菌对 S₁₈₀ 实体瘤小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 1 Effects of *P. linteus* on S₁₈₀-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组 别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g		瘤质量/g	抑瘤率/%
		给药前	给药后		
模型	—	20.80±1.15	23.51±3.64	1.92±0.50	—
裂蹄木层孔菌	0.5	19.20±1.25	21.20±1.93	1.19±0.26 ^{*△△}	38.0
	1.0	20.60±2.00	22.20±2.48	0.99±0.38 ^{*△△}	48.4
	2.0	21.30±1.30	24.91±2.09 [△]	0.89±0.28 ^{*△}	53.6
CTX	0.030	20.60±2.19	22.50±2.89	0.50±0.19 ^{**}	74.0

与模型组比较: ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01; 与 CTX 组比较: [△]P<0.05 ^{△△}P<0.01^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01 vs model group; [△]P<0.05 ^{△△}P<0.01 vs CTX group表 2 裂蹄木层孔菌对 H₂₂ 实体瘤小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Effects of *P. linteus* on H₂₂-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组 别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g		瘤质量/g	抑瘤率/%
		给药前	给药后		
模型	—	20.30±2.26	25.90±2.79	1.96±0.55	—
裂蹄木层孔菌	0.5	19.80±2.10	27.60±3.15 ^{△△}	1.21±0.31 ^{*△△}	38.27
	1.0	19.60±1.85	25.50±3.31 ^{△△}	1.02±0.30 ^{**△△}	47.96
	2.0	20.60±1.61	27.10±3.35 ^{△△}	0.87±0.15 ^{**△△}	55.61
CTX	0.030	19.50±2.23	22.00±2.85	0.46±0.25 ^{**}	76.53

与模型组比较: ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01; 与 CTX 组比较: ^{△△}P<0.01^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01 vs model group; ^{△△}P<0.01 vs CTX group表 3 裂蹄木层孔菌对 MFC 实体瘤小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 3 Effects of *P. linteus* on MFC-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组 别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g		瘤质量/g	抑瘤率/%
		给药前	给药后		
模型	—	21.50±2.70	24.60±3.56	1.74±0.53	—
裂蹄木层孔菌	0.5	22.40±1.70	26.10±2.85 [*]	0.96±0.28 ^{*△}	44.83
	1.0	21.70±1.71	25.10±3.10	0.91±0.55 ^{*△}	47.70
	2.0	22.60±2.65	27.30±3.23 ^{**△}	0.85±0.16 ^{**△}	51.15
CTX	0.030	22.32±2.89	25.63±3.06	0.54±0.20 ^{**}	69.00

与模型组比较: ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01; 与 CTX 组比较: [△]P<0.05^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01 vs model group; [△]P<0.05 vs CTX group

尚可。与模型组相比,裂蹄木层孔菌组小鼠在治疗过程中精神状况良好、活泼、皮毛有光泽,出现贫血症状较晚(约第 10 天);CTX 组小鼠厌食、活动减少、喜聚堆、体质量增加缓慢、精神萎靡、皮毛无光泽、有竖毛现象,出现贫血症状早(约第 7 天)。

与模型组比较,裂蹄木层孔菌低、中、高剂量均能延长小鼠的存活时间($P<0.05$),给药后模型小鼠生命延长率均超过“抗癌药体内药效试验规程”限定标准的 30%^[4],其中以高、中剂量效果最为显著($P<0.001$)。与模型组比较,CTX 组不能延长

小鼠的存活时间,生命延长率为 19.78%,这可能与 CTX 对免疫力的抑制作用有关。结果见表 4。

3.5 对 S₁₈₀ 实体瘤小鼠脏器指数的影响

与模型组、CTX 组比较,裂蹄木层孔菌低、中、高剂量组小鼠的胸腺指数、脾脏指数均提高($P<0.05$ 、 0.01)。与模型组比较,CTX 组小鼠胸腺指数、脾脏指数有所下降,但无统计学意义($P>0.05$)。结果见表 5。

3.6 对 S₁₈₀ 实体瘤小鼠血清 IL-2 和 TNF- α 的影响

与对照组相比,模型组小鼠血清 IL-2、TNF- α

表 4 裂蹄木层孔菌对 S₁₈₀ 腹水瘤小鼠体质量及生存时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 4 Effects of *P. linteus* on weight and life span of S₁₈₀ ascites tumors mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g		存活时间/d	生命延长率/%
		给药前	给药后		
模型	—	20.50±1.99	27.96±2.27	15.17±1.72	—
裂蹄木层孔菌	0.5	20.48±1.64	28.14±1.98 ^{△△}	20.50±2.59*	35.14
	1.0	20.76±2.66	27.98±1.92 ^{△△}	21.00±1.79***	38.43
	2.0	20.90±2.23	29.02±1.41 ^{△△}	21.83±2.32***	43.90
CTX	0.030	20.84±2.31	22.06±2.21	18.17±1.47*	19.78

与模型组比较: **P*<0.05 ****P*<0.001; 与 CTX 组比较: ^{△△}*P*<0.01**P*<0.05 ****P*<0.001 vs model group; ^{△△}*P*<0.01 vs CTX group表 5 裂蹄木层孔菌对 S₁₈₀ 实体瘤小鼠胸腺及脾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 5 Effects of *P. linteus* on thymus and spleen indexes of S₁₈₀-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	胸腺指数/(mg·g ⁻¹)	脾脏指数/(mg·g ⁻¹)
模型	—	2.43±0.84	7.18±1.92
裂蹄木层孔菌	0.5	4.23±0.57* ^{△△}	10.72±1.82* ^{△△}
	1.0	4.08±0.44* ^{△△}	10.60±3.10* [△]
	2.0	4.53±0.53** ^{△△}	9.30±1.46 [△]
CTX	0.030	2.20±0.35	5.47±1.54

与模型组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01与 CTX 组比较: [△]*P*<0.05 ^{△△}*P*<0.01**P*<0.05 ***P*<0.01 vs model group[△]*P*<0.05 ^{△△}*P*<0.01 vs CTX group

水平明显降低 (*P*<0.05)。与模型组相比, 裂蹄木层孔菌低、中、高剂量组小鼠血清 IL-2、TNF-α 水平明显升高 (*P*<0.05、0.01), 与 CTX 组相比也有明显差异 (*P*<0.05), 仅裂蹄木层孔菌低剂量组 TNF-α 水平与 CTX 组比较无统计学意义 (*P*>0.05)。结果见表 6。

4 讨论

桑黄系药用真菌, 具有利五脏、宣肠气、止血、排毒的功效, 古代医书中称其“桑耳”、“桑臣”、“胡孙眼”等。本实验所用裂蹄木层孔菌是桑黄品种中的一种。本实验结果显示, 裂蹄木层孔菌可有效抑制小鼠肉瘤 S₁₈₀、小鼠肝癌 H₂₂、小鼠前胃癌 MFC 肿瘤的生长; 各给药组的 S₁₈₀ 腹水瘤小鼠生存状况优于模型组和 CTX 组, 小鼠活泼、皮毛有光泽, 饮食、精神状况良好, 表明裂蹄木层孔菌可提高小鼠的生存质量和延长生存期。裂蹄木层孔菌各组小鼠的胸腺指数、脾脏指数与模型组比较均显著提高, 表明裂蹄木层孔菌可提高 S₁₈₀ 实体瘤小鼠的免疫功能。裂蹄木层孔菌各给药组可不同程度地提高 S₁₈₀

表 6 裂蹄木层孔菌对 S₁₈₀ 实体瘤小鼠血清 IL-2 和 TNF-α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 6 Effect of *P. linteus* on IL-2 and TNF-α levels in serum of S₁₈₀-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-2/(ng·L ⁻¹)	TNF-α/(ng·L ⁻¹)
对照	—	878.26±61.72	596.80±42.73
模型	—	793.89±43.22 [#]	536.46±35.31 ^{#△}
裂蹄木层孔菌	0.5	906.66±35.56** ^{△△}	631.57±49.86**
	1.0	888.18±70.50* [△]	638.14±43.36** [△]
	2.0	925.68±46.79** ^{△△}	650.64±38.29** ^{#△}
CTX	0.030	805.98±55.81 [#]	582.77±43.00

与模型组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01; 与对照组比较: [#]*P*<0.05;与 CTX 组比较: [△]*P*<0.05 ^{△△}*P*<0.01**P*<0.05 ***P*<0.01 vs model group; [#]*P*<0.05 vs control group;[△]*P*<0.05 ^{△△}*P*<0.01 vs CTX group

实体瘤小鼠血清中 IL-2、TNF-α 水平, 说明其抑瘤作用与这两个因子相关。

综上所述, 裂蹄木层孔菌可能是通过提高免疫器官指数及血清中 IL-2、TNF-α 的水平, 增强、调节机体免疫功能, 从而达到抑制肿瘤细胞生长的作用。但其抑瘤作用的确切机制尚待深入研究。

参考文献

- [1] 刘春辉, 陈体强, 林跃鑫. 药用真菌桑黄的研究进展 [J]. 菌物研究, 2004, 2(2): 53-59.
- [2] 刘妍, 关凤英, 杨世杰. 桑黄抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 中草药, 2006, 37(增刊): 38-39.
- [3] 李巧兰, 李斌, 何谨瑜, 等. 五叶草莓煎液对荷瘤小鼠免疫功能及抑瘤率的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(1): 85-87.
- [4] 肖洪彬, 毛晶磊, 秦书芝. 瑶宝克癌灵胶囊对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠细胞因子水平及抑瘤率的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(5): 877-878.