

小黄蘑多糖对 H₂₂ 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究

沈明花, 李 巍, 金梅花

延边大学基础医学院, 吉林 延吉 133000

摘要: 目的 探讨小黄蘑多糖对小鼠肝癌 H₂₂ 移植性实体瘤的抑制作用及其机制。方法 将 H₂₂ 瘤株接种于小鼠, 制备移植性实体瘤模型。将 60 只小鼠随机分为 6 组: 对照组, 模型组, 环磷酰胺 (200 mg/kg) 阳性对照组, 小黄蘑多糖低、中、高剂量 (50、100、200 mg/kg) 组, 于小鼠接种 H₂₂ 瘤株第 2 天开始连续 ig 给药 10 d, 每天 1 次。观察给药后小鼠体质量变化, 计算肿瘤抑制率、胸腺及脾脏指数; 测定血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-2 (IL-2)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和白蛋白 (Alb) 的水平; 测定肝组织超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化物酶 (CAT) 活性以及还原型谷胱甘肽 (GSH) 和丙二醛 (MDA) 的量; 测定白细胞数。结果 小黄蘑多糖抑瘤率高于 30%; 与环磷酰胺组相比, 小黄蘑多糖各组显著提高小鼠体质量、胸腺指数以及 IL-2 和白细胞的水平, 降低 VEGF 的水平, 不同程度地提高肝组织中 SOD、GSH-Px、CAT 活性和 GSH 的量, 降低 MDA 的量。结论 小黄蘑多糖对 H₂₂ 荷瘤小鼠有一定的抑瘤作用, 其机制可能与通过提高机体的抗氧化能力、调节免疫功能、抑制肿瘤组织血管生成有关。

关键词: 小黄蘑多糖; 抗肿瘤; 肝癌 H₂₂ 细胞; 抗氧化; 免疫功能; 血管生成

中图分类号: R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)17-2433-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.17.017

Antitumor effect of *Hygrophorus lucorum* polysaccharide on H₂₂ bearing mice

SHEN Ming-hua, LI Wei, JIN Mei-hua

Medical College of Yanbian University, Yanji 133000, China

Abstract: Objective To study the inhibition and the mechanism of *Hygrophorus lucorum* polysaccharide (HLP) on H₂₂ transplanted tumor in mice. **Methods** The H₂₂ transplanted models of mice were established. Sixty mice were divided into six groups: control, model, cytoxan (CTX, 200 mg/kg) positive control, low-, mid-, and high-dose (50, 100, and 200 mg/kg) HLP groups. On the day 2 after being inoculated with H₂₂ tumor cells, mice were ig given HLP once daily for consecutive 10 d. And then the body weight change, tumor growth inhibitory rate, and spleen and thymus indexes were calculated; the serum levels of TNF- α , IL-2, VEGF, and albumin (Alb) were determined. The activities of SOD, GSH-Px, CAT, and the contents of GSH and MDA in liver homogenates, as well as the number of WBC were detected. **Results** The tumor growth inhibitory rate of HLP was over 30%. The treatment with HLP significantly increased the body weight, spleen index, and the number of WBC, elevated the serum levels of IL-2, reduced the VEGF, promoted the hepatic SOD, GSH-Px, CAT activities, and GSH content, and decreased the MDA in liver homogenates. **Conclusion** HLP has an antitumor effect on H₂₂ transplanted tumor in mice, and the possible mechanisms may be due to its antioxidant activity, regulation of immunofunction, and anti-angiogenetic action.

Key words: *Hygrophorus lucorum* polysaccharide; antitumor; hepatoma H₂₂ cell; anti-oxidation; immunofunction; angiogenesis

食用菌多糖是食用菌的主要活性成分之一, 具有抗肿瘤、调节免疫功能、抗氧化、保肝、调血脂等多种药理活性^[1-6]。小黄蘑 *Hygrophorus lucorum* Kalchbr., 又称柠檬黄蜡伞, 为蜡伞科真菌。前期研究检测了小黄蘑的体外抗氧化活性, 结果显示小黄

蘑多糖具有清除·OH 和 DPPH 等自由基的能力, 并能够提高受损肝组织抗氧化酶的活性^[7]。本实验采用肝癌 H₂₂ 移植瘤小鼠模型, 观察小黄蘑多糖给药后对模型小鼠的抑瘤作用及其机制, 为其进一步开发提供实验依据。

收稿日期: 2012-11-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30760150)

作者简介: 沈明花 (1970—), 女, 副教授, 研究方向为天然物质活性研究。E-mail: sdjjch@ybu.edu.cn

1 材料

1.1 药品与试剂

小黄蘑多糖,水提醇沉法自制,经苯酚-硫酸法测定质量分数为 87.6%; TNF- α 、IL-2、VEGF 试剂盒,北京博雅祥达科技有限责任公司; SOD、MDA、GSH-Px、CAT、GSH、蛋白质测定试剂盒,南京建成科技有限公司。

1.2 动物与瘤株

昆明种小鼠,体质量 18~22 g,雌雄各半,由延边大学医学院动物科提供,许可证号 SCKK(吉)2007-0004。

小鼠肝癌 H₂₂ 瘤株,本校预防医学教研室提供。

1.3 仪器

RT-2100 酶标仪,深圳雷杜公司; Hitachi Himac CP 100MX 超速离心机,日本日立公司; 722 型分光光度计,上海棱光技术有限公司产品; LT502 精密型电子天平,北京恒奥德仪器仪表有限公司。

2 方法

2.1 模型制备、分组与给药

将 60 只小鼠随机分为 6 组:对照组,模型组,环磷酰胺(20 mg/kg)阳性对照组,小黄蘑多糖低、中、高剂量(50、100、200 mg/kg)组。除对照组外,于每只小鼠的右前肢腋部皮下接种密度为 5×10⁵/mL 的 H₂₂ 细胞悬液 0.2 mL。接种第 2 天开始,小黄蘑多糖各组每天 ig 给药 1 次,连续给药 10 d; 环磷酰胺组隔日 ig 给药 1 次; 对照组和模型组 ig

等体积 0.9%氯化钠溶液。

2.2 检测指标

末次给药后次日称取小鼠体质量,摘眼球取血,处死小鼠,取瘤块称质量,计算抑瘤率。剖取胸腺和脾脏,计算脏器指数。

$$\text{抑瘤率} = (\text{模型组平均瘤质量} - \text{用药组平均瘤质量}) / \text{模型组平均瘤质量}$$

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量} / \text{体质量}$$

将血样分离血清后,按试剂盒说明书检测血清白蛋白、TNF- α 、IL-2 和 VEGF 水平。

剖取肝脏,制备 10%肝匀浆液,按试剂盒说明书检测 SOD、GSH-Px、CAT 的活性和 GSH、MDA 的量。

每只小鼠取血 20 μ L,加入 380 μ L 的白细胞计数液,混匀,计白细胞数。

2.3 统计学处理

采用 SPSS 统计软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对 H₂₂ 荷瘤小鼠体质量及瘤质量的影响

与模型组相比,不同剂量的小黄蘑多糖对 H₂₂ 荷瘤小鼠均有一定的抑瘤作用 ($P < 0.05$ 、 0.01),其中中剂量组的抑瘤作用最显著,与环磷酰胺的作用相当。与模型组相比,环磷酰胺组小鼠体质量下降明显,而小黄蘑多糖组小鼠体质量增加,表明小黄蘑多糖的毒性较小。结果见表 1。

表 1 小黄蘑多糖对 H₂₂ 荷瘤小鼠体质量及瘤质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Effect of HLP on body weight and tumor weight of H₂₂ bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	体质量 / g		瘤质量 / g	抑瘤率 / %
		给药前	给药后		
对照		21.0±1.6	26.2±2.1 ^{▲▲}	—	—
模型		21.2±1.5	27.6±1.8	2.3±0.4	—
小黄蘑多糖	200	21.3±1.2	30.2±3.2 ^{▲▲}	1.6±0.3 ^{**}	30.43
	100	21.5±1.7	29.1±1.8 ^{▲▲}	1.4±0.5 ^{**}	39.13
	50	20.5±1.5	29.8±2.9 ^{▲▲}	1.5±0.3 ^{**}	34.78
环磷酰胺	20	21.4±1.2	25.6±2.7 [*]	1.4±0.5 ^{**}	39.13

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与环磷酰胺组比较: ▲▲ $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; ▲▲ $P < 0.01$ vs CTX group

3.2 对 H₂₂ 荷瘤小鼠白细胞、血清白蛋白、胸腺和脾脏指数的影响

与对照组相比,模型组小鼠胸腺指数和血清白蛋白水平显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组相

比,环磷酰胺组小鼠的胸腺指数和白细胞数显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01),而小黄蘑多糖组小鼠的这 2 项指标无显著性变化且明显高于环磷酰胺组,提示小黄蘑多糖的不良反应小于环磷酰胺。与模型组相

比, 环磷酸胺组小鼠血清白蛋白水平无显著变化, 而小黄蘑多糖组小鼠血清白蛋白水平显著高于模型组。结果见表 2。

3.3 对 H₂₂ 荷瘤小鼠细胞因子的影响

与模型组相比, 小黄蘑多糖高剂量组小鼠血清 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$), 而其他各组细胞因子的水平无显著变化。与环磷酸胺组相比, 小黄蘑多糖组小鼠血清中 IL-2 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 而 VEGF 水平降低显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 3。

3.4 对 H₂₂ 荷瘤小鼠肝组织 SOD、CAT、GSH-Px 活性和 GSH、MDA 量的影响

与对照组相比, 模型组小鼠肝组织中 SOD、CAT、GSH-Px 活性和 GSH 的量显著下降 ($P < 0.05$ 、0.01), 而 MDA 的量显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 环磷酸胺组小鼠肝组织中 CAT 和 GSH-Px 的活性显著提高, 而 MDA 的量显著下降; 小黄蘑多糖高、中剂量 3 个抗氧化酶活性显著高于模型组和环磷酸胺组, 而 MDA 的量显著低于模型组 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 4。

表 2 小黄蘑多糖对 H₂₂ 荷瘤小鼠白细胞、白蛋白及器官指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of HLP on WBC, Alb, and organ indexes of H₂₂ bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	脾脏指数 / (mg·g ⁻¹)	胸腺指数 / (mg·g ⁻¹)	白细胞数 / ($\times 10^7$)	白蛋白 / (g·L ⁻¹)
对照	—	6.9 ± 2.6	4.0 ± 1.1 ^{▲▲}	6.4 ± 1.4	45.1 ± 3.3
模型	—	5.8 ± 1.1	2.3 ± 0.6 [#]	6.8 ± 1.4	34.4 ± 5.9 ^{###}
小黄蘑多糖	200	6.3 ± 1.3	2.3 ± 0.5 [▲]	6.0 ± 1.0 [▲]	41.5 ± 7.3 [*]
	100	5.2 ± 0.4	2.3 ± 0.4 [▲]	6.7 ± 1.4 ^{▲▲}	39.0 ± 3.8 [*]
	50	5.6 ± 1.0	2.4 ± 0.9 [▲]	8.2 ± 0.4 ^{▲▲}	37.0 ± 2.5
环磷酸胺	20	5.4 ± 0.9	1.7 ± 0.5 [*]	4.2 ± 0.8 ^{**}	38.6 ± 8.7

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与环磷酸胺组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$, 下表同
[#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs CTX group; same as below

表 3 小黄蘑多糖对 H₂₂ 荷瘤小鼠血清 IL-2、VEGF、TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of HLP on serum levels of IL-2, VEGF, and TNF- α of H₂₂ bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	IL-2 / (ng·L ⁻¹)	VEGF / (ng·L ⁻¹)	TNF- α / (ng·L ⁻¹)
对照	—	348.8 ± 3.7	11.0 ± 1.7 [▲]	21.4 ± 6.8
模型	—	365.5 ± 22.3	12.6 ± 1.6	20.6 ± 6.9
小黄蘑多糖	200	387.5 ± 20.9 [▲]	11.4 ± 0.6 ^{▲▲}	27.7 ± 4.2 [*]
	100	378.5 ± 11.7 [▲]	10.7 ± 0.9 ^{▲▲}	23.6 ± 5.9
	50	375.2 ± 9.7 ^{▲▲}	11.5 ± 0.9 [▲]	26.5 ± 5.1
环磷酸胺	20	354.1 ± 11.2	12.6 ± 0.6	27.2 ± 4.4

表 4 小黄蘑多糖对 H₂₂ 荷瘤小鼠肝组织中 SOD、CAT、GSH-Px 活性和 GSH、MDA 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of HLP on activities of SOD, CAT, and GSH-Px and content of GSH and MDA of H₂₂ bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	SOD / (U·mg ⁻¹)	CAT / (U·mg ⁻¹)	GSH-Px / (U·mg ⁻¹)	GSH / (mg·g ⁻¹)	MDA / (nmol·mg ⁻¹)
对照	—	81.1 ± 4.5 [▲]	56.8 ± 1.4	76.1 ± 1.0 ^{▲▲}	2.0 ± 0.2 ^{▲▲}	0.8 ± 0.2
模型	—	75.5 ± 5.9 [#]	48.3 ± 7.2 ^{###}	64.9 ± 1.5 ^{###}	1.2 ± 0.1 ^{###}	1.1 ± 0.2 ^{##}
小黄蘑多糖	200	89.3 ± 2.7 ^{**▲▲}	63.4 ± 2.9 ^{**▲▲}	102.8 ± 13.5 ^{**▲▲}	1.6 ± 0.5 ^{*▲}	0.8 ± 0.2 [*]
	100	83.5 ± 2.2 ^{**▲▲}	64.1 ± 3.6 ^{**▲▲}	84.0 ± 1.7 ^{**▲▲}	1.6 ± 0.5 ^{*▲}	0.5 ± 0.1 ^{**▲}
	50	66.8 ± 2.9 ^{**▲▲}	50.6 ± 2.8 ^{▲▲}	65.5 ± 2.2 ^{▲▲}	1.1 ± 0.1 ^{**}	0.6 ± 0.2 ^{**▲▲}
环磷酸胺	20	77.4 ± 2.0	57.8 ± 3.4 ^{**}	68.9 ± 1.6 ^{**}	1.0 ± 0.4	0.8 ± 0.2 [*]

4 讨论

本实验结果显示,环磷酰胺和小黄蘑多糖可不同程度地抑制小鼠 H₂₂ 移植瘤的生长,其中小黄蘑多糖中剂量组的抑瘤效果与环磷酰胺相当。与环磷酰胺不同的是,小黄蘑多糖各剂量组小鼠胸腺指数和白细胞数下降不明显,无体质量减轻,表明小黄蘑多糖对机体的毒性小。此外,小黄蘑多糖高、中剂量组小鼠血清白蛋白水平显著高于模型组,提示其具有一定的保肝作用。有文献报道环磷酰胺对荷瘤小鼠的抑瘤率高于 50%^[8-9],而在本实验中,其对 H₂₂ 荷瘤小鼠的抑瘤率为 39.13%,这可能与给药方法与时程有关。

肿瘤的发生、发展与机体的免疫功能失调有密切相关。菌类多糖的抗肿瘤作用机制除了对肿瘤细胞的直接杀伤作用外,还通过促进宿主的免疫反应而间接发挥作用。本实验观察了小黄蘑多糖对血清 IL-2、VEGF、TNF- α 水平的影响。结果表明,小黄蘑多糖不同程度地提高荷瘤小鼠血清 IL-2 和 TNF- α 水平,降低 VEGF 的量。因此推测小黄蘑多糖通过诱导 IL-2、TNF- α 等免疫相关因子的产生,调节或增强机体的免疫功能,从而阻遏肿瘤的发展。有些天然产物通过减少肿瘤组织内的血管生成而抑制肿瘤的生长^[10-11],这也与本实验结果相符。

自由基代谢紊乱与肿瘤的发生、发展有一定的关系。在正常生理状态下,在机体代谢过程中产生的自由基可被抗氧化系统所清除。当自由基的产生与消除失衡时,过多的自由基可直接损伤 DNA,也可通过脂质过氧化作用间接损伤 DNA,最终引起癌变。本实验结果显示,小黄蘑多糖可以提高机体的 SOD、CAT、GSH-Px 活性和 GSH 的量,降低 MDA 的量,提示小黄蘑多糖可提高机体的抗氧化能力,以消除体内过多产生的自由基,进而保护 DNA。

综上所述,小黄蘑多糖具有一定的抗肿瘤作用,其作用机制可能与免疫调节与抗氧化作用有关。

参考文献

- [1] Fan L, Ding S, Ai L, *et al.* Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from *Inonotus obliquus* [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(2): 870-874.
- [2] Yim M H, Shin J W, Son J Y, *et al.* Soluble components of *Hericium erinaceum* induce NK cell activation via production of interleukin-12 in mice splenocytes [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(6): 901-907.
- [3] 沈明花, 崔海丹, 王欣彤. 榛蘑多糖的抗氧化作用研究 [J]. *食品科技*, 2010, 35(5): 77-79.
- [4] 崔海丹, 沈明花. 榛蘑多糖对小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. *食品科技*, 2011, 36(10): 170-172.
- [5] 宋晓琳, 沈明花. 花脸蘑多糖对小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. *食品科技*, 2011, 36(7): 49-50.
- [6] Li H, Zhang M, Ma G. Hypolipidemic effect of the polysaccharide from *Pholiota nameko* [J]. *Nutrition*, 2010, 26(5): 556-562.
- [7] 黄月, 李巍, 王昱娇, 等. 小黄蘑多糖的抗氧化作用研究 [J]. *延边大学医学学报*, 2012, 35(2): 91-93.
- [8] 熊术道, 尹丽慧, 李景荣, 等. 苦瓜籽核糖体失活蛋白对肝癌 H22 细胞的抑制作用及其机制 [J]. *山东医药*, 2007, 47(17): 21-22.
- [9] 马凌娣, 张彦, 文世宏, 等. 苦参碱对荷瘤小鼠抑瘤作用的实验研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27(6): 339-341.
- [10] 张维东, 崔亚洲, 姚成芳, 等. 蝎毒多肽提取物抗肿瘤血管生成作用的实验研究 [J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(6): 708-711.
- [11] 郭桅, 韩雅莉, 陈少鹏, 等. 地鳖虫蛋白提取物对小鼠 S180 肉瘤及鸡胚尿囊膜血管生成的抑制作用 [J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29(3): 425-428.