

灵芝菌丝体碱提多糖对小鼠细胞免疫的作用*

张 擎¹, 胡质毅^{1,2}, 王 荃¹, 张 弛^{1,3}, 李宝健¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405;

3. 中山大学药学院, 广东 广州 510080)

摘 要: 体外灵芝菌丝体碱提多糖对脾细胞增殖反应和巨噬细胞的吞噬能力均有促进作用, 但显示出低剂量增强、高剂量抑制的双向调节能力。体内实验表明灵芝菌丝体碱提多糖高、低剂量组灌胃给药在第10天时, 能够最大增强淋巴细胞增殖反应。同时, 显著升高 CD⁴⁺T 细胞的百分率, 而对 CD⁸⁺T 细胞的百分率无影响, 从而改善 CD⁴⁺T/CD⁸⁺T 细胞的比值, 促进荷瘤小鼠恢复正常的免疫平衡状态。因此, 灵芝菌丝体碱提多糖对小鼠体内外细胞免疫有直接作用, 但有剂量和时间依赖性。

关键词: 灵芝菌丝体; 脾细胞; 巨噬细胞; T 淋巴细胞

中图分类号: R966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 05-0079-05

灵芝作为传统的扶正固本中药在预防和治疗恶性肿瘤的疾患起着非常重要的作用^[1]。灵芝的主要的化学成分多糖、三萜类物质更是近年来研究的热点^[2,3]。灵芝菌丝体、孢子体和子实体均具有增强动物和人体的免疫功能的作用, 并抑制动物移植性肿瘤的生长^[4]。灵芝碱溶性多糖尤其显示相当强的抑制 S₁₈₀ 生长的活性^[5], 灵芝多糖体中的中性及碱性成分对爱滋病毒通过 T 淋巴细胞也可抑制其增生^[6]。本研究在确证灵芝菌丝体具有较高的抗肿瘤效果基础上, 探讨了灵芝菌丝体可能的主要的活性成分的作用, 本文就灵芝菌丝体碱提多糖对小鼠进行了细胞免疫作用的研究, 以便进一步用于药用真菌的研究开发。

1 材料与方法

1.1 药物与制备

灵芝菌丝体为赤灵芝 AM-9 发酵所得菌粉, 由本实验室提供^[7]。碱溶性粗多糖制备: 灵芝菌丝体粉加 10 倍 100 mmol/L NaOH 体积的溶液, 设温 60 ℃, 减压旋转蒸发 2 h, 提取 2 次。过滤, 合并滤液, 用 2 mol/L HCL 中和至 pH 6.7~7.0, 对流水透析 24 h, 蒸馏水透析 24 h。沉淀用 0.5 mmol/L NaOH 搅拌溶解, 离心 4 000 r/min, 15 min 取上清液用三倍无水乙醇醇析, 离心, 沉淀真空干燥得灵芝

菌丝体碱提水溶性粗多糖, -20 ℃ 保存。配制成不同浓度的灵芝碱提多糖溶液, 每次每鼠按每 10 g 体质量给药 0.2 mL。

1.2 动物和细胞株

清洁级昆明小鼠由广东省医学实验动物中心提供(合格证号 26-99A028)小鼠体质量 18~22 g, 每组实验使用同一性别, 雄性, 每组均 10 只, 饲养于清洁级实验室内。S₁₈₀ 小鼠肉瘤由中山大学实验动物中心提供, 本室继代保种。

1.3 试剂和仪器

刀豆蛋白 A (ConA)、细菌脂多糖 (LPS) 和 MTT 购自 Sigma 公司。RPMI-1640 购自 Hyclone 公司。CD⁴⁺T 和 CD⁸⁺T 检测试剂盒购自武汉博士德公司。其他分析纯试剂均为国产。ELX800 全自动酶标仪为美国宝特公司制造。

1.4 小鼠脾细胞体外增殖试验

常规制备小鼠脾细胞悬液 5×10^7 个/mL。加入 96 孔细胞培养板, 每孔 60 μ L (3×10^6 个/mL)、ConA (10 μ g/mL) 或 LPS (50 μ g/mL) 40 μ L, 使用 RPMI-1640 培养配置成的不同质量浓度的灵芝菌丝体碱提多糖的溶液 100 μ L, 设细胞对照和碱提多糖对照孔, 置 $\varphi = 5\%$ CO₂、37 ℃ 培养 72 h, 轻轻吸弃上清。加入 MTT 溶液 (MTT 质量浓度为 1 mg/mL) 50 μ L, 于振荡器振荡 1 min。放置 37 ℃、 $\varphi =$

* 收稿日期: 2004-12-14

基金项目: 中山大学青年教师启动基金资助项目

作者简介: 张擎 (1966 年生), 男, 讲师; 通讯联系人: 李宝健; E-mail: ls80@zsu.edu.cn

5% CO₂ 孵箱内反应 2 h。取出反应物, 2 000 r/min, 离心 5 min, 吸弃上清, 每孔加入酸化异丙醇(含 0.04 mol/L HCl), 于振荡器上振荡 30 s。在酶标光度计 570 nm 处测 A 值。

1.5 腹腔巨噬细胞功能测定

小鼠腹腔注射 $w = 3\%$ 硫乙醇酸钠 3 mL, 96 h 后用 $w = 10\%$ 肝素-Hanks 液冲洗腹腔, 收集腹腔巨噬细胞, 经离心沉淀细胞去上清, 用含 $w = 10\%$ 小牛血清 RPMI-1640 配成 2×10^6 细胞悬液, 加 0.1 mL 于 96 孔培养板内, 37 °C, $\varphi = 5\%$ CO₂ 培养 3 h 后, 用 Hanks 液洗 3 次, 最后用 RPMI-1640 液除去非粘附细胞, 然后加入不同质量浓度灵芝提取液含 $w = 10\%$ 小牛血清 RPMI-1640 培养液。向每孔加入 $w = 0.04\%$ 中性红生理盐水溶液, 0.2 mL。37 °C, $\varphi = 5\%$ CO₂ 培养 30 min, 去除中性红溶液, 再用 Hanks 液洗 3 次, 向各孔加入细胞裂解液 0.2 mL (由 0.1 mol/L 的冰醋酸与乙醇按 1:1 混合配成)。静置过夜, 待细胞全部溶解后, 用酶标仪波长 550 nm 处测定 A 值。

1.6 小鼠 T 淋巴细胞体内增殖试验

取移植 S₁₈₀ 荷瘤小鼠给药后的脾脏, 经碾碎后, 用蒸馏水崩解红细胞, 连续二次过尼龙柱收集非粘附细胞, 作为 T 淋巴细胞来源, 调节细胞密度至 5×10^5 个/mL, 加入 96 细胞培养板, 每孔 100 μ L, 设空白对照组、肿瘤阴性对照组和高、低试验组, 每孔 50 μ L ConA (10 μ g/mL) 置 $\varphi = 5\%$ CO₂、37 °C 培养 60 h, 轻轻吸弃上清。加入 MTT 溶液 (MTT 质量浓度为 1 mg/mL) 50 μ L, 于振荡器振荡 1 min。放置 37 °C、 $\varphi = 5\%$ CO₂, 孵箱内反应 2 h。取出反应物, 2 000 r/min, 离心 5 min, 吸弃上清, 每孔加入酸化异丙醇, 于振荡器上振荡 30 s。在酶标光度计 570 nm 处测 A 值。淋巴细胞转化指数 = 实验组 A 值 (或阴性组 A 值) / 空白对照组 A 值。

1.7 外周血 T 淋巴细胞及其亚群测定

1.7.1 T 细胞分离 取移植 S₁₈₀ 荷瘤 10 d 给药后的小鼠眼眶取血经肝素, 抗凝后加入等量 Hanks 液, 置于淋巴细胞分离液上进行密度梯度离心, 分离出单核细胞, 调成密度为 5×10^6 个/mL 的细胞悬液。

1.7.2 T 淋巴细胞及其亚群测定 应用免疫组化 SABC 方法于 48 孔 U 型塑料板内进行。每孔加入细胞悬液 50 μ L 和等体积的兔抗鼠 T 细胞 CD⁴T 或 CD⁸T 单抗, 4 °C 孵育过夜, 0.1 mol/L PBS 洗涤 2 min, 加 3 滴生物素化山羊抗兔 IgG, 室温 30 min, 0.1 mol/L PBS 洗涤 2 min。

1.7.2 DAB 显色 滴加 SABC, 20 ~ 37 °C, 20 min,

0.1 mol/L PBS 洗涤 5 min。使用 DAB 显色盒, 镜下控制反映时间, 20 min, 蒸馏水洗涤。苏木素轻度复染。镜下计数 100 个淋巴细胞的阳性细胞百分率。

1.8 统计方法

检测结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间显著性检验用方差分析。

2 结果

2.1 灵芝菌丝体碱提多糖体外对脾细胞体外增殖试验

结果见图 1 所示, 灵芝菌丝体碱提多糖在低剂量时 (3.6 ~ 14.4 μ g/mL) 吸收 A 显著高于空白对照的基值, 说明小鼠脾细胞促进了 ConA 诱导的 T 细胞增殖; 高剂量时 (28.8 ~ 220.4 μ g/mL) 其显著低于空白对照的基值, 说明抑制了 T 细胞增殖, 对 LPS 诱导的 B 细胞增殖无作用。提示灵芝菌丝体碱提取物的根据剂量不同, 可能存在着双向的 T 细胞介导的免疫反应, 而对 B 细胞介导的体液免疫无影响。

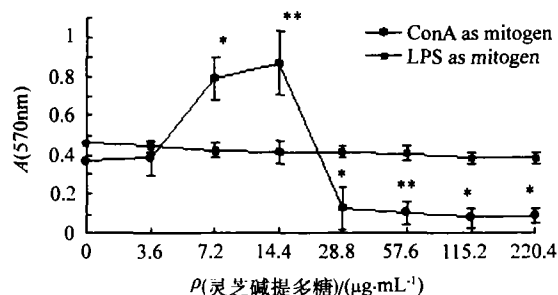


图1 灵芝菌丝体碱提多糖不同作用剂量对小鼠脾细胞增殖影响

Fig.1 Effects of Mycelium Alkaline Extraction on ConA or LPS stimulated murine splenocyte proliferation at difference concentrations in vitro

(数值为 $\bar{x} \pm s$, $n = 6$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 和对照组 (0 μ g/mL) 相比较)

2.2 灵芝菌丝体碱提多糖体外对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响

结果如表 1 所示, 利用硫乙醇酸钠刺激小鼠腹腔巨噬细胞, 可使其激活并获得应答能力而表达吞噬功能。在不同浓度下的灵芝菌丝体碱提多糖的作用下, 其吞噬功能有所不同。剂量过小或过大时均不增强巨噬细胞吞噬功能, 只有在剂量在 0.1 ~ 0.4 mg/mL 时, 其吞噬功能较对照组有显著的增强作用, 表明灵芝菌丝体碱提多糖可增强小鼠的非特异细胞免疫。

表 1 灵芝碱提多糖对小鼠巨噬细胞的影响

Tab.1 Effect of Mycelium Alkaline Extraction on murine peritoneal macrophages in vitro

药 物	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	巨噬细胞吞噬 中性红 (A)	p 值
空白对照	-	0.443 ± 0.024	-
灵芝提取液	50	0.567 ± 0.054	> 0.05
灵芝提取液	100	0.646 ± 0.073	< 0.001
灵芝提取液	200	0.583 ± 0.064	< 0.01
灵芝提取液	400	0.498 ± 0.046	< 0.01
灵芝提取液	800	0.468 ± 0.034	> 0.05

2.3 灵芝菌丝体碱提多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠 T 淋巴细胞增殖反应的影响

在 S₁₈₀ 接种后第 2 天, 使用低剂量 1 mg/kg 和高剂量 10 mg/kg 的灵芝菌丝体碱提多糖每日分别小鼠灌胃给药。于 5 d、10 d 和 15 d 分别检测 T 淋巴细胞增殖率。结果见图 2 所示, 对照组和高低剂量组在 5 d 时, T 淋巴细胞的转化率未显示提高。在 10 d 时, 高、低剂量组 T 淋巴细胞的转化率显著升高, 与对照组有显著差异。到 15 d 时, 所有组别 T 淋巴细胞转化率明显降低。

2.4 灵芝菌丝体对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞及其亚群的影响

结果如表 2 所示, 在 S₁₈₀ 接种后第 2 天, 使用

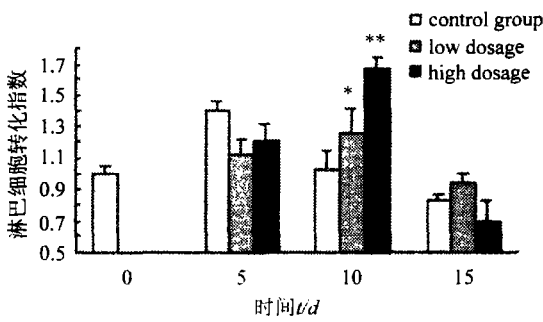


图 2 灵芝碱提多糖不同作用时间对小鼠脾细胞增殖影响

Fig.2 Effects of Ganoderma Mycelium Extraction on ConA or LPS stimulated murine splenocyte proliferation at different times in vivo

(数值为 $\bar{x} \pm s$, $n = 6$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 和对照组 ($0 \mu\text{g/mL}$) 相比较)

高剂量 10 mg/kg 灵芝菌丝体碱提多糖每日小鼠灌胃给药。于 10 d 观察 T 淋巴细胞及其亚群的变化。灵芝菌丝体碱提多糖能够调节和改善荷瘤小鼠外周血 T 淋巴辅助细胞和 T 淋巴细胞毒细胞两个亚群的分布比例, 显著升高 T 淋巴辅助细胞 CD⁴⁺T 的百分率, 而对 T 淋巴细胞毒细胞 CD⁸⁺T 的百分率与正常组比较无明显差别。从而逆转 CD⁴⁺T 细胞和 CD⁴⁺T/CD⁸⁺T 比值下降的细胞免疫缺损状态, 表明灵芝菌丝体在体内对小鼠 T 淋巴细胞有正向的免疫调节作用。

表 2 灵芝碱提多糖给药前后 T 细胞亚群检测¹⁾

Tab.2 Effect of Ganoderma Mycelium Extraction on T-lymphocytes and its subunits in vivo

项目	健康对照组	荷瘤给药前	荷瘤给药后	变化率 ¹⁾ /%	P 值
CD ⁴ ⁺ T	46.5 ± 6.2	35.8 ± 5.6	43.7 ± 6.3	+ 22.06	< 0.001
CD ⁸ ⁺ T	34.7 ± 4.7	36.3 ± 3.2	35.7 ± 0.33	- 1.65	> 0.05
CD ⁴ ⁺ T/CD ⁸ ⁺ T	1.34 ± 0.34	0.98 ± 0.13	1.22 ± 0.14	+ 24.89	$0.001 < P < 0.002$

1) 变化率 = (给药后 - 给药前) / 给药前 $\times 100\%$; P 值为荷瘤小鼠给药前后组别比较

3 讨 论

细胞免疫是以 T 细胞为主的免疫应答, T 细胞的性质状态对细胞免疫有十分重要的影响。多种灵芝提取物都有不同程度增强 T 细胞介导的免疫反应的作用^[8,9]。但灵芝菌丝体碱提多糖相关的报道极少, 本研究发现灵芝提取物在体外剂量为 1~4 mg/mL 范围内, 具有显著的增强的巨噬细胞吞噬能力。提示小剂量的灵芝菌丝体提取物也可不通过影响宿主免疫系统, 从而直接发挥其抑制肿瘤的作用, 这一结果为评价灵芝菌丝体在肿瘤防治中的地位提供了有用的线索。此外, 碱提多糖对体外脾细胞增殖, 3.6~14.4 $\mu\text{g/mL}$ 低剂量时表现出了由 ConA 诱导的

脾细胞增值的上调作用, 其和水溶性多糖体外脾细胞的共培养的上清液可以明显诱导 HL-60 细胞的凋亡的报道相一致^[10], 但碱提多糖在 28.8~220.4 $\mu\text{g/mL}$ 高剂量时, 表现出的对脾细胞增值的下调作用尚未见报道, 提示碱法提取多糖不仅能够抑制酸水解和淀粉酶对灵芝活性中心的破坏^[11], 而且活性组分更为复杂, 其生理机制还需进一步的探讨。

恶性肿瘤有着复杂的发病机理, 存在着 T 淋巴细胞免疫调控功能的紊乱。表现出 CD³⁺T 和 CD4⁺T 细胞的百分率显著下降, CD⁸⁺T 细胞的百分率则是显著升高, 从而导致 CD⁴⁺T/CD⁸⁺T 下降, 降低了机体的淋巴细胞正常的转化功能, 对 B 细胞产生抗体辅助作用减弱。本研究表明灵芝菌丝体在体

内对荷瘤小鼠能够调节 T 淋巴细胞及其亚群的比例, 利于 $CD^{+4}T/CD^{+8}T$ 恢复到平衡状态, 并能增强淋巴细胞对 ConA 的转化率。这和本研究中灵芝菌丝体碱提多糖在体外能够增强 T 淋巴细胞转化指数的结果相一致, 提示灵芝菌丝体增强细胞免疫作用主要活性成分是多糖, 其不能直接抑制或杀死肿瘤细胞, 但可直接作用于巨噬细胞和脾细胞, 促其活力增强, 明显改善动物体内的细胞免疫状态。

在机体的细胞免疫网络的调控中, T 细胞担负了中心枢纽的作用, 观察 T 淋巴增殖作用可直接反映机体的免疫状态。有报道指出, 经灌服灵芝的小鼠血清明显抑制 S_{180} 的生长, 并能诱导 S_{180} 细胞的凋亡, 但研究中没有进行给药时程观察^[12]。本研究结合以上二者结果, 设计了对 S_{180} 小鼠整体给药方案, 结果表明 5 d 时出现对照组和高、低剂量组 T 淋巴细胞的转化率未见增强, 可能这与 S_{180} 癌细胞本身作为异种抗原需要一定时间激发免疫应答反应。T 淋巴细胞的转化率 10 d 时较对照组有显著增加, 而对照组的免疫应答不足以对抗癌细胞的侵袭, T 淋巴细胞的转化率快速下降, 出现了肿瘤诱发的免疫抑制。到 15 d 时, 因为停止给药, 给药组 T 淋巴细胞的转化率迅速下降, 和对照组一样呈现了免疫缺损的状态。

近年来的研究报道肯定了灵芝及其多糖在体内可直接作用于单核巨噬细胞和淋巴细胞, 而对体外的这一作用报道不一。本文以菌丝体碱提多糖对小鼠体外脾细胞增殖、巨噬细胞吞噬作用作为评估依据, 提出灵芝菌丝体碱提多糖的作用并无剂量依赖性, 可能存在着药物最适作用浓度。同时, 体内灵芝菌丝体碱提多糖给药观察到 S_{180} 小鼠给药 10 d 时, 淋巴细胞转化指数达到最大, 这些结果有助于加深灵芝菌丝体碱提多糖对体外和体内的细胞免疫

的认识, 并将指导其合理用药, 为提高其细胞免疫作用而打下基础。

参考文献:

- [1] 林志彬. 灵芝抗肿瘤活性和免疫调节作用的研究进展[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2002; 34(5): 493 - 498.
- [2] BAO X F, ZHEN Y, RUAN L et al. Purification, characterization, and modification of T lymphocyte-stimulating polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum*[J]. Chem Pharm Bull, (Tokyo), 2002, 50(5): 623 - 629.
- [3] 马林, 吴丰, 陈若芸. 灵芝三萜成分分析[J]. 药学报, 2003; 38(1): 50 - 52.
- [4] 赵东旭, 杨新林, 朱鹤孙, 等. 灵芝孢子研究进展[J]. 中草药, 1999, 30(4): 305 - 307.
- [5] KIN B K, CHUNG H S, CHUNG K S et al. Studies on antineoplastic components of Korean basidiomycetes [J]. Hanguk Kyunhakhoe Chi, 1980; 8(2): 107 - 113.
- [6] WAGNER W H. Hoe/Boy 946-a new compound with activity against the AIDS virus[J]. Arzneimittelforschung, 1989, 39(1): 112 - 113.
- [7] 李刚, 李保健. 发酵灵芝菌粉和灵芝子实体中灵芝多糖含量的比较[J]. 中国食用菌, 1999, 19(1): 35 - 37.
- [8] 林志彬. 灵芝多糖的免疫药理学研究及其意义[J]. 北京医科大学学报, 1992; 24(4): 271 - 274.
- [9] WANG S Y, HSU M L, HSU H C, et al. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T-lymphocytes[J]. Int J Cancer, 1997, 70(6): 699 - 705.
- [10] 胡映辉, 林志彬. 灵芝菌丝体多糖对 HI-60 细胞凋亡的影响[J]. 药学报, 1999, 34(4): 264 - 268.
- [11] MIYAZAKI T, NISHIJIMA M. Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1981, 29(12): 3611 - 3616.
- [12] 张群豪, 於东晖, 林志彬, 等. 用血清药理学方法研究灵芝浸膏 GLE 的抗肿瘤作用机制[J]. 北京医科大学学报, 2000, 32(3): 210 - 213.

The Effect of *Ganoderma* Mycelium Alkaline Extraction on Cellular Immunity in Mice

ZHANG Qing¹, HU Zhi-yi^{1,2}, WANG Quan¹, ZHANG Chi^{1,3}, LI Bao-jian¹

(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

3. School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Mycelium Alkaline Extraction (MAE) has a dual-directional regulation on the propagation of lymphoid cells and phagocytosis of macrophages in vitro. When given low dose of MAE, proliferation of lymphoid cell and phagocytosis of macrophage was enhanced, and inhibition is observed in high dose treated group. After the drug was given intragastrically for 10 days, the lymphocyte proliferation of Mycelium-treated group was the most significantly comparing to

that of control. Meanwhile, the percentage of $CD^{+4}T$ cells was greatly increased, while the percentage of $CD^{+8}T$ cells has not been influenced, which results in improvement of the $CD^{+4}T/CD^{+8}T$ ratio, contributing to the immunity re-equilibrium of tumor-bearing mice. Therefore, *Ganoderma* Mycelium Alkaline Extraction directly stimulate the proliferation of murine spleen lymphocytes and the phagocytosis of peritoneal macrophages both in vitro and in vivo, but the efficiency depends on dosages and treatment duration.

Key words: *Ganoderma* Mycelium; spleen cells; macrophage; T-lymphoid cells

(上接第 78 页)

Effects of Vitamin C on Cellular Activities and Serum Factors of *Claris fuscus*

LI Gui-feng, QIAN Pei-feng, SUN Ji-jia, GUO Yun-gui, ZHAO Dian-hui

(Faculty of Aquaculture, College of Animal Science, SCAU, Guangzhou 510642, China)

Abstract: *Clarias fuscus* were fed with diets containing 0 (control) 500, 1000, 1500 and 2000 mg/kg vitamins C for 12, 24, 36 or 52 days. The leucocyte phagocytic activities and the serum protein contents were evaluated respectively at each one of the assayed times. Meanwhile, the lymphocyte activities at day 24, the antiprotease activities at day 12 and 52, and the serum vitamin C levels at day 24 and 52 were also examined respectively. The results demonstrate that vitamin C could enhance the phagocytic activities slightly, stimulate obviously T lymphocyte activities but the effect was not therefore directly dose-dependent, and also effectively increase the serum protein contents of fish. However, the phagocytic index was not affected. The serum vitamin C levels of fish were inversely proportional to the doses of vitamin C and the antiprotease activities were not affected by vitamin C.

Key words: vitamin C; *Claris fuscus*; cellular activities; serum factors