

滑子菇多糖的免疫活性及抗肿瘤作用

陈健, 向莹

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文选用豚鼠血清为补体的模型进行体外抗补体实验的检测、采用体外对小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7 的毒性试验、腹腔巨噬细胞吞噬中性红活性能以及刺激巨噬细胞产生 NO 和 H₂O₂ 的能力来研究滑子菇多糖的免疫活性;通过对人体前列腺癌 22Rv.1 细胞和人体肝癌 Hep 2B 细胞增殖的抑制作用试验对滑子菇多糖的抗肿瘤活性进行研究。实验显示, 滑子菇多糖具有较好的抗补体活性, 并且活性随多糖浓度增大而增强, 多糖浓度达到 12.5 mg/mL 活性变化不大, 多糖浓度在 0.005~0.5 mg/mL 范围在一定程度上能够促进巨噬细胞的增殖, 能增强腹腔巨噬细胞吞噬中性红活性能, 并且促进巨噬细胞分泌 NO 和 H₂O₂ 能力, 表明滑子菇多糖具有较好的免疫活性; 对人体前列腺癌细胞和人体肝癌细胞这两种癌细胞具有较强的抑制作用, 并且活性与浓度呈现量效关系。

关键词: 多糖; 免疫活性; 巨噬细胞; 抗肿瘤

文章编号: 1673-9078(2013)8-1800-1804

Immunological and Antitumor Activities of the Polysaccharides from *Pholiota nameko*

CHEN Jian, XIANG Ying

(School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Guinea pig blood serum was chosen as the complement to study anticomplement research and mouse peritoneal macrophages RAW264.7 was used for toxicity test. The capabilities of macrophage englobing neutral red and secreting NO and H₂O₂ were investigated to study *Pholiota nameko* polysaccharides (PNP) immunocompetence. The antitumor activities of the PNP were studied through prostatic cancer 22Rv.1 cells and human hepatoma Hep 2B cells inhibition. The results showed that the PNP owned good anticomplement activity and activity of PNP was strengthened with its concentration increased when increasing the polysaccharides to 12.5 mg/mL above. In concentration of 0.005~0.5 mg/mL, PNP could promote the proliferation of macrophages and peritoneal macrophage phagocytic ability, and increased NO and H₂O₂ secreting, indicating that PNP had good immunological activity. PNP had strong inhibition to the prostate cancer cells and liver cancer cells, with a concentration-response relationship.

Key words: polysaccharides; immunological activity; macrophage; antitumor activity

滑子菇 (*Pholiota nameko*), 是一种可食用和药用的真菌, 除了含有丰富的碳水化合物、蛋白质、核酸和维生素外还含有大量的矿物质, 尤其是钙、铬、镁、钠等人体所需的元素。其子实体肉质细嫩, 味道鲜美, 营养丰富, 是一种高蛋白、低脂肪、低热量的“保健食品”。现代药理研究表明, 滑子菇多糖对人体有多种药效作用, 如抗肿瘤、抗氧化^[1]、降血脂^[2]、抑菌、提高免疫力、促进单核细胞分裂繁殖、提高红细胞变形能力、抗血栓形成、提高免疫器官胸腺^[3]和脾脏重量, 促进溶血素形成等。据报道^[4], 滑子菇多糖对 S-180 瘤细胞的生长抑制率高达 86.6%, 免疫细胞中的 LAK 细胞、NK 细胞活性增强, 红细胞花环形成率显著提高, 肿瘤块外缘形成一层较厚、能阻止肿瘤生长的纤

收稿日期: 2013-03-31

作者简介: 陈健 (1967-), 男, 博士, 副教授, 天然产物与分离技术

维包膜, 并且单核细胞增殖比例提高, 巨噬细胞的吞噬率达 64.17%。刘莹^[5]研究表明滑子菇多糖还可以预防葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎杆菌、结核杆菌的感染。长期食用滑子菇, 对肝炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、慢性胃炎、尿道炎、中年肥胖症等疾病也有一定的疗效, 还可延年益寿。滑子菇是一种比较容易进行人工栽培的菌类, 能利用多种农副产品下脚料进行半熟料和熟料栽培, 它的生活力强、抗逆性好, 生物转化率可达 80~100%, 具有较高的经济效益。目前, 滑子菇的使用主要停留在食用的基础上, 由于产品较低的科技含量, 在市场上缺乏良好的竞争力。因此, 对滑子菇的营养成分、多糖的结构分析以及活性功能进行深入研究, 为将来更好地开发和利用滑子菇资源提供理论依据和基础数据。

通过对滑子菇子实体的进行分离纯化, 得到一种

滑子菇多糖 (PNP)。本文对该多糖的免疫和抗肿瘤活性进行研究。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与仪器

主要实验材料: 滑子菇, 购于广州一德路干货市场; 肝素、MTT、脂多糖 (LPS), Sigma 公司; DMEM (低糖)、PBS、胎牛血清, Gibco 公司; 胰蛋白酶、抗生素、5-氟尿嘧啶, Newprobe 公司; 中性红、绵阳红细胞、溶血素, 南方制药厂; NO 试剂盒、H₂O₂ 试剂盒, 南京建成有限公司; 人体肝癌 Hep 2B 和前列腺癌 22Rv.1 细胞有中山三院提供; 小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7, 购于中大细胞库。

主要实验仪器: 3543 培养箱, Thermo scientific; CK40-F200 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 680 型酶标仪, BIO-RAD 产于日本; MSI 振荡器, IKA 生产; 低速离心机, 科大创新股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 抗补体活性

1) 致敏绵羊红细胞的制备: 取适量绵羊红细胞与生理盐水按 1:1 混合。将溶血素 (1:4000) 用 GVB (含 5 mM 巴比妥钠, 0.14 M 的 NaCl, 2.5% 葡萄糖, 0.1% 明胶, 1mmol/L MgCl₂, 0.15 mmol/L, CaCl₂, pH 7.4) 稀释到 2%, 再将配好的绵羊红细胞与溶血素 1:1 配制, 即为致敏绵羊红细胞。

2) 豚鼠血清最佳浓度确定: 将豚鼠血清配制成 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160, 进行最佳抗敏性实验, 找出最佳浓度。

3) 抗补体活性测定: 取 50 μL 最佳浓度豚鼠血清与 30 μL 各浓度糖液混合, 37 °C 水浴 10 min, 加入 200 μL 致敏绵羊红细胞, 水浴 30 min, 2000 r/min 离心 10 min, 取 100 μL 上清液, 在 405 nm 处测定吸光值。

抑制率 = $[(A_0 - A) / A] \times 100\%$ 。

注: A 样品吸光值, A₀ 对照样吸光值。肝素为阳性对照。

1.2.2 细胞毒性^[6]

将小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 以 1×10^6 个/mL 浓度接种于 96 孔细胞培养板 (100 μL/孔), 置 37 °C、5% 二氧化碳培养箱中培养。24 h 后, 去除上清液换新鲜培养液, 加入 20 μL 的不同浓度多糖药物或阳性对照物 LPS, 继续培养。24 h 后取出, 加入 5 mg/mL MTT 液 20 μL 继续培养 4 h。去除上清液, 加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min。用酶联免疫检测仪在波长为 490 nm 下测定其吸光度值, 根据上述公式计算细胞的相

对增殖度 (RGR)。只加培养液的为阴性对照。

$RGR/\% = \text{试验组平均吸光度值} / \text{空白对照组平均吸光度值} \times 100\%$

表 1 细胞毒性反应分级^[7]

反应级别	相对增殖度 RGR/%
0 级	≥100
1 级	80~99
2 级	50~79
3 级	30~49
4 级	0~29

注: 根据 RGR 按表分级判定, 设立阳性对照, 阴性对照, 实验组。阴性组不大于 1 级, 阳性对照组至少为 3 级反应。

1.2.3 巨噬细胞 (Peritoneal macrophages, PMφ) 吞噬能力^[8]

将培养好的小鼠腹腔巨噬细胞配成细胞浓度 1×10^6 个/mL 加 100 μL 于 96 孔板中, 培育 12 h 后加多糖样品和 100 μL 新鲜培养液。培养 48 h 后去上清, 加 150 μL 0.075% 中性红溶液, 培养 1 h 后用 PBS 清洗, 加 150 μL 裂解液 (乙醇:乙酸=1:1, V/V), 裂解 2 h 后于 550 nm 下测量。

1.2.4 促 NO 生成活性测定^[9]

将小鼠腹腔巨噬细胞和样品于 96 孔板 (100 μL/孔) 中培养 24 h 后, 吸取上清液 100 μL, 加入等体积的 Griess 试剂, 10 min 后于 540 nm 下测量。Griess 法测定 NO₂ 含量标准曲线的绘制: 制成浓度分别为 0 μmol/L~100 μmol/L 的 NaNO₂ 的标准品溶液。取上述配置好的稀释液加入 96 孔板中, 100 μL/孔, 再加入等体积的 Griess 试剂进行反应。10 min 后, 用酶标仪检测 OD_{540nm} 的吸光值。

1.2.5 促 H₂O₂ 生成活性测定

将小鼠腹腔巨噬细胞加入 96 孔板中, 1×10^6 cells/孔。再加入待测样品, 培养 24 h 后吸取细胞培养上清 (100 μL) 加入 96 孔培养板中, 再并加入等体积的 H₂O₂ 试剂, 反应 10 min 后, 用酶标仪检测 OD_{540nm} 的吸光值。根据试剂盒所带标准品溶液计算出 H₂O₂ 的产量。

1.2.6 对人体前列腺癌细 22Rv.1 和肝癌 Hep 2B 细胞增殖的抑制作用

方法同 1.2.2。

5-氟尿嘧啶为阳性对照。

细胞抑制率 IR = $(1 - \text{试验组平均吸光度值} / \text{空白对照组平均吸光度值}) \times 100\%$ 。

2 结果与讨论

2.1 抗补体作用

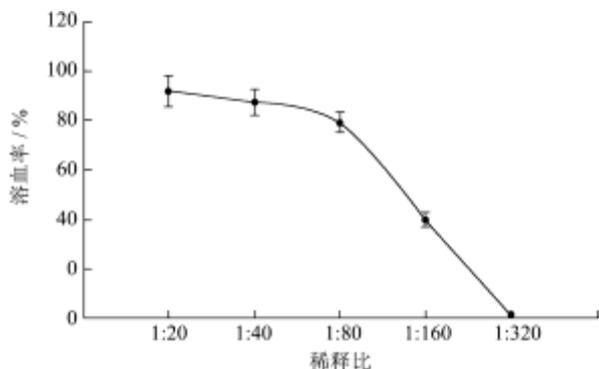


图1 不同稀释比豚鼠血清的溶血率

Fig.1 Hemolysis rate of various dilutions of guinea sera

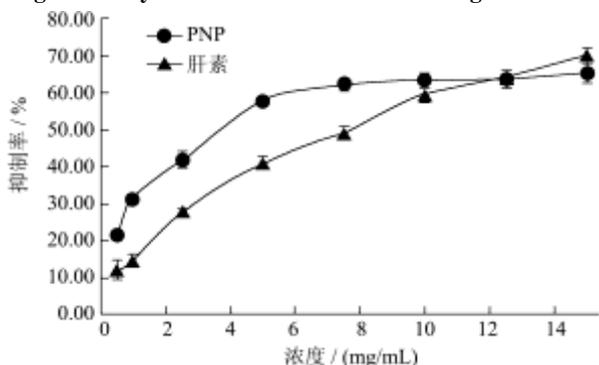


图2 滑子菇多糖 (PNP) 对补体的抑制作用

Fig.2 The anti-complementary activity of PNP

通过豚鼠血清最佳浓度试验结果 (图 1), 确定 1:80 为最佳浓度比。肝素是一种硫化多糖, 是一种较为成熟的补体抑制剂, 常用作阳性对照^[10]。由图 2 可以看出, 滑子菇多糖 (PNP) 的质量浓度在 0.5~7.5 mg/mL, 补体抑制率从 21.68% 提高到 62.28%, 且抑制率提高速率快, 当浓度大于 7.5 mg/mL 时, PNP 对补体的抑制作用变化不大; 而肝素对补体的抑制率随着肝素钠的浓度增大而增加, 当肝素钠的浓度小于 12.5 mg/mL 时, 肝素对补体的抑制作用弱于 PNP。通过分析发现, PNP 具有明显的抗补体活性, 但在高浓度时抗补体活性增加不明显, 说明 PNP 不是浓度越高活性越好。这是因为多糖的抗补体活性主要与多糖的组成、分子量、键的连接方式、链的分化程度、硫酸基团等结构有关^[11]。

2.2 细胞毒性实验结果

从实验结果看, 随着 PNP 浓度的增加, 巨噬细胞的增殖度也逐渐增大, 在 0.005~0.5 mg/mL 浓度范围内, PNP 对巨噬细胞的毒性等级均不大于 1 级, 表明 PNP 对该细胞的毒性不明显。阴性对照的毒性等级为 1, 阳性对照 LPS 浓度在 0.005~0.5 mg/mL 这个范围,

细胞的毒性等级均为 2, 根据规定, 满足 LPS 作为阳性对照细胞毒性范围内。

表 2 PNP 对巨噬细胞相对增殖度和毒性等级影响

Table 2 Effect of PNP at different concentrations on growth rates and cytotoxicity levels

组别	浓度 / (mg/mL)	增殖度 RGR / %	等级
阴性对照(空白)	0	92.33±0.65	1
	0.005	84.43±0.23	1
	0.01	90.66±0.35	1
	0.025	94.91±0.18	1
	0.05	98.21±0.26	1
	0.1	101.15±0.19	0
	0.25	104.63±0.11	0
	0.5	106.22±0.33	0
阳性对照	0.005	52.04±0.051	2
	0.01	56.11±0.11	2
	0.025	67.84±0.25	2
	0.05	69.98±0.14	2
	0.1	71.08±0.31	2
	0.25	73.52±0.03	2
	0.5	77.78±0.17	2

2.3 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力

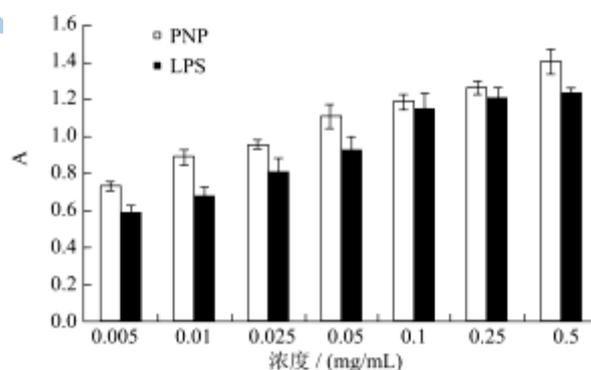


图3 PNP 对巨噬细胞吞噬能力影响

Fig.3 Effect of PNP on phagocytosis of macrophage

巨噬细胞能直接吞噬外来异物及衰老的自身细胞, 因此采用吞噬中性红的方法测定巨噬细胞的吞噬能力。由图 3 结果看出, PNP 比 LPS 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响大, 并且 PNP 随着浓度的增加, 吞噬能力也会显著增强。巨噬细胞的吞噬能力也会随 LPS 浓度增加而增强, 但当 LPS 浓度达到 0.25 mg/mL, 细胞吞噬能力升高不明显, 说明 PNP 能够促进巨噬细胞的吞噬能力。吞噬细胞的吞噬能力的增强, 可以明显增加免疫器官重量同时能促进淋巴小结的增生, 促

进 T、B 细胞生成, 从而提高机体免疫力。

2.4 PNP 对小鼠腹腔巨噬细胞分泌 NO、H₂O₂

的影响

根据 Griess 法测定 NO₂ 得到标曲为 $y=4.667x+0.0457$; 其中 y 为吸光度, x 为含量。

PNP 和 LPS 浓度在 0.005~0.5 mg/mL 范围内均促进小鼠腹腔巨噬细胞分泌 NO 和 H₂O₂, 并且在该试验范围内对巨噬细胞的激活作用与浓度成一定的正相关。从表 3 来看, PNP 浓度在 0.005~0.1 mg/mL 具有类似 LPS 的作用, 能够刺激巨噬细胞的生产与释放 NO 和 H₂O₂。NO 和 H₂O₂ 是活化后的巨噬细胞分泌近百种生物活性物质中的两种, 与免疫应答及一些炎症有关^[12]。

表 3 PNP 对小鼠巨噬细胞分泌 NO、H₂O₂ 的影响

Table 3 Effect of PNP on NO and H₂O₂ activity

组别	浓度 (mg/mL)	NO 含量 ($\mu\text{mol/mL}$)	H ₂ O ₂ 含量 ($\mu\text{mol/mL}$)
空白	0	1.21±0.01	0.41±0.00
PNP	0.005	3.03±0.01	1.47±0.01
	0.01	3.12±0.01	1.80±0.02
	0.025	3.26±0.02	3.96±0.04
	0.05	3.43±0.09	6.31±0.04
	0.1	3.64±0.01	9.85±0.03
	0.25	3.98±0.10	12.81±0.05
	0.5	4.21±0.01	15.41±0.06
阳性对照			
LPS	0.005	2.82±0.07	2.32±0.04
	0.01	3.04±0.02	4.89±0.03
	0.025	3.24±0.01	6.42±0.05
	0.05	3.64±0.01	8.21±0.11
	0.1	3.88±0.01	9.23±0.09
	0.25	4.02±0.03	10.72±0.11
	0.5	4.78±0.02	12.01±0.08

2.5 PNP 对前列腺癌 22Rv.1 和肝癌 Hep 2B 细

胞的抑制作用

多糖类化合物重要生物活性之一是抗肿瘤活性, 毒副作用小、安全性高, 与药物适当组合有协同作用。从表 4 可以表明, PNP 对人体前列腺癌 22Rv.1 和肝癌 Hep 2B 细胞增殖均有较好的抑制作用, 并且 PNP 浓度在 0.025~2.0 mg/mL 对这两种癌细胞抑制作用呈剂量依赖性, 随剂量的增加而增大。阳性对照 5-氟尿

嘧啶 (5-Fu) 人体前列腺癌 22Rv.1 和肝癌 Hep 2B 细胞增殖具有显著的抑制作用, 并随浓度的增加而增大。当 PNP 浓度在 2.0 mg/mL 时对前列腺癌 22Rv.1 细胞的抑制率高达 73.51%, 类似阳性对照 5-Fu 浓度在 0.5 mg/mL 对人体前列腺癌 22Rv.1 细胞的抑制率; 当 PNP 浓度 2.0 mg/mL 对人体肝癌 Hep 2B 细胞增殖的抑制率为 67.81%, 高于 5-Fu 浓度在 0.25 mg/mL 对人体肝癌 Hep 2B 细胞增殖的抑制率。

表 4 PNP 对 22Rv.1 和 Hep 2B 细胞的抑制作用

Table 4 Anti-tumor activity of the polysaccharides PNP

组别	浓度 (mg/mL)	22Rv.1 (抑制率/%)	Hep 2B (抑制率/%)
空白对照	0	-	-
NP	0.025	6.78±0.03	12.91±0.04
	0.05	11.50±0.07	16.19±0.02
	0.1	26.19±0.14	25.62±0.09
	0.25	34.19±0.22	32.73±0.13
	0.5	42.64±0.09	38.72±0.28
	1	56.46±0.27	49.24±0.06
	2	73.51±0.23	67.81±0.15
阳性对照			
5-Fu	0.025	25.84±0.12	30.61±0.07
	0.05	37.15±0.02	42.09±0.32
	0.1	47.69±0.25	51.83±0.23
	0.25	54.97±0.16	60.66±0.13
	0.5	72.37±0.22	76.89±0.08

3 结论

3.1 免疫活性和抗肿瘤活性是多糖类物质所显示的重要药理作用。多糖通过多途径、多层次发挥免疫增强作用。雪茶多糖能^[13]能增加免疫器官重量, 促进巨噬细胞的吞噬能力, 牛膝多糖^[14]能升高血清溶血素和脾脏内抗体形成细胞束, 激活巨噬细胞和淋巴细胞的增殖, 活化补体和促进细胞因子的生成。多糖抗肿瘤主要是通过细胞毒直接抗癌和靠提高宿主免疫功能的间接抗癌这两种方式, 而目前, 大多数食用菌多糖是通过间接抗癌的方式。多糖可通过活化巨噬细胞、淋巴细胞, 促进细胞因子分泌, 提高宿主抗肿瘤免疫功能^[15], 或者刺激巨噬细胞表面分子的表达, 具有抗肿瘤作用。

3.2 本文通过对滑子菇多糖 (PNP) 免疫活性和抗肿瘤活性的研究, 得出 PNP 的免疫活性和抗肿瘤活性与浓度成正相关, 随浓度的增大活性均增强。从实验结果来看, PNP 浓度在 12.5 mg/mL 的抗补体活性堪比阳性对照肝素的抗补体活性; 在对小鼠腹腔巨噬细胞

影响实验中, PNP 的生物活性类似于 LPS, 甚至在对促进巨噬细胞生长上更高于 LPS; 在抗肿瘤活性研究中, PNP 具有明显的抗肿瘤活性。

参考文献

- [1] 李海平,张树海,张坤生.滑菇多糖抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2008,29(4):56-60
Li H P, Zhang S H, Zhang K S. Study on anti-oxidant activity of *Pholiota nameko* polysaccharides [J]. Food Research and Development, 2008, 29 (4): 56-60
- [2] Haiping Li, Mingming Zhang, Guiji Ma. Hypolipidemic effect of the polysaccharide from *Pholiota nameko* [J]. Nutrition, 2010, 26: 556-561
- [3] 崔英俊,李庆章.滑菇多糖对衰老模型鼠不同时期免疫功能的影响[J].东北农业大学学报,2004,35(2):159-161
Cui Y J, Li Q Z. Immune effect of *Pholiota nameko* polysaccharide on the aging model mice in the different period [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2004, 35(2): 159-161
- [4] Gan D, Ma LP, Jiang CX, et al. Production, preliminary characterization and antitumor activity in vitro of polysaccharides from the mycelium of *Pholiota dinghuensis* Bi [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84: 997-1003
- [5] Li H, Lu X, Zhang S, et al. Anti-inflammatory activity of polysaccharide from *Pholiota nameko* [J]. Biochemistry (Mosc), 2008, 73: 669-675
- [6] Pagè M, Bejaoui N, Cinq M B, et al. Optimization of the tetrazolium-based colorimetric assay for the measurement of cell number and cytotoxicity [J]. Int J Immunopharmacol, 1988, 10: 785-93
- [7] GB/T16175-2008, 医用有机硅材料生物学评价试验方法 [S]
GB/T16175-2008, Biological evaluation of medical silicone material [S]
- [8] Kitamura A, Higuchi S, Hata M, et al. Effect of β -1,6-glucan inhibitors on the invasion process of *Candida albicans*: Potential mechanism of their in vivo efficacy [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53: 3963-3971
- [9] Maity K, Kar E, Maity S, et al. Structural characterization and study of immunoenhancing and antioxidant property of a novel polysaccharide isolated from the aqueous extract of a somatic hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Calocybe indica* variety APK2 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48: 304-310
- [10] Catherine B, Elizabeth F, Catherine B V, et al. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharide (Fucans) from brown seaweed [J]. Mol Immunol, 1994, 31(4): 247-2531
- [11] Tissot B, Gonnet F, Iborra A, et al. Mass spectrometry analysis of the oligomeric C1q protein reveals the B chain as the target of trypsin cleavage and interaction with fucoidan [J]. Biochemistry, 2005, 44 (7): 2602-2609
- [12] Liu W K, Ng T B, Se S F, et al. Activation of acemannan on the generation and function of cytotoxic T-lymphocytes [J]. Immunopharm, 1993, 26(2):139-144
- [13] 张炳灿,左绍远,董莎莎.雪茶多糖对免疫功能的影响[J].亚太传统医药,2010,6(3):12-14
Zhang B C, Zuo S Y, Dong S S. Effect of *Thamnoia Vermicularis* polysaccharide on immune function in mice [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2010, 6(3): 12-14
- [14] 吕小兰,赖小平,郭惠,等.牛膝多糖研究进展[J].实用临床医学,2005,6(2):137-138
Lv X L, Lai X P, Guo H, et al. Researches of polysaccharides from *Achyranthes bidentata* [J]. Practical Clinical Medicine, 2005, 6(2): 137-138
- [15] Schepetkin I A, Quinn M T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential [J]. Int Immunopharmacol, 2006, 6 (3): 317-333