

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.18.019

灵芝多糖对小鼠黑色素瘤细胞体外免疫的影响

齐 曼¹, 郑艳杰¹, 李卫东², 李 敏², 孙立新³, 宋 冀^{*}

(1. 承德市中心医院, 河北省承德市双桥区广仁大街(西大街)11号, 067000; 2. 北京大学医学部基础医学院药理学系; 3. 承德医学院附属医院)

摘要 目的 探讨灵芝多糖提高抗肿瘤免疫反应的可能作用机制。方法 用灵芝多糖处理体外培养的小鼠黑色素瘤细胞 B16F10, 按灵芝多糖浓度分为低、中、高剂量组, 浓度分别为 200、400、600 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 以 RPMI-640 培养液作对照, 共 4 组。在经灵芝多糖处理的 B16F10 细胞中加入小鼠脾淋巴细胞 $1 \times 10^6/\text{孔}$, 分别培养 18 h、5 天后, 分别测定脾淋巴细胞表面活化分子 CD69 和 FASL 表达。在经 GL-PS 处理的 B16F10 细胞中加入小鼠脾淋巴细胞 $5 \times 10^5/\text{孔}$, 培养 5 天后, ELISA 法测定 IFN- γ 含量。结果 低、中、高剂量组 CD69 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 中、高剂量组 FASL 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$); 中、高剂量组 FASL 水平明显高于低剂量组 ($P < 0.05$), 各剂量组之间 CD69 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。低、中、高剂量组 IFN- γ 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 中剂量组 IFN- γ 水平明显高于低剂量组和高剂量组 ($P < 0.05$)。结论 灵芝多糖能提高淋巴细胞的抗肿瘤免疫能力, 可能与激活小鼠脾淋巴细胞表达 CD69 和 FASL 及促进 IFN- γ 分泌有关。

关键词 灵芝多糖; 黑色素瘤; 细胞免疫

黑色素瘤是一种高度恶性的肿瘤, 早期极易发生转移, 死亡率高, 预后差, 治疗效果不佳, 常用药物毒副作用明显。灵芝是我国传统的补益中药, 灵芝多糖是灵芝的主要成分^[1], 具有抗肿瘤及免疫调节作用^[2-7], 但在其对黑色素瘤细胞抗肿瘤免疫反应的效果方面尚未深入研究。本研究观察了灵芝多糖在体外对小鼠黑色素瘤细胞的免疫调节作用, 以阐明灵芝多糖提高抗肿瘤免疫反应的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及动物

小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 购自南京凯基生物技术公司。雌性 BALB/c 小鼠 100 只, 清洁级, 8~10 周龄, 体重 20~22 g, 购自北京大学医学部实验动物中心, 实验动物合格证号: SCXK2007-0001。

1.2 主要药品、试剂与仪器

灵芝多糖为北京大学医学部基础医学院药理学系林志彬教授惠赠, 由福州绿谷生物药业技术研究

所分离提取。将灵芝多糖溶于 RPMI1640 (Gibco Invitrogen) 液, 过滤除菌, 置 4℃ 冰箱备用, 使用前用 RPMI1640 液稀释成不同浓度; γ 干扰素 (IFN- γ) ELISA 试剂盒 (上海 Boctman 生物技术公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 天津市天大化工实验厂); 碘化丙锭 (PI, Sigma 公司); 噻唑蓝 (MTT, Sigma 公司); 仓鼠抗小鼠 CD69-PE (Beckman Coulter); FASL-FITCC Santa (墨西哥 Ruz 集团有限公司); Hamster IgG-PE (Beckman Coulter); 胎牛血清 (天津血液学研究所)。流式细胞仪 (FACSCalibur 型, 美国 BD 公司); 洁净工作台 (YT-CJ-1N 型, 北京亚泰科隆实验科技开发中心); CO₂ 恒温培养箱 (MCO-15AC 型, 日本三洋公司) 680 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 细胞培养

将小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 接种于含青霉素 (80 万 U/ml)、链霉素 (100 mg/ml)、10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养, 取对数生长期细胞用于实验。

1.4 淋巴细胞的制备

脱颈处死小鼠, 完全浸入 75% 酒精 5 min, 无

* 通讯作者: sjcd006@126.com, (0314) 2026786

菌取出小鼠脾脏, 收集脾细胞, 在离心管中加入 2 ml 淋巴细胞分离液, 将收集到的淋巴细胞缓慢悬于分离液之上, 于低速冷冻离心机中以 2000 r/min 离心 20 min, 吸出淋巴细胞层, 加入 10 ml 完全培养液, 再以 2000 r/min 于低速冷冻离心机中离心 10 min, 将所得到的淋巴细胞悬于完全培养液中, 于计数板上计数后, 按一定密度用于实验中 (24 孔板, 1×10^6 细胞/孔; 96 孔板, 5×10^5 细胞/孔)。

1.5 灵芝多糖处理 B16F10 细胞

取对数生长期 B16F10 细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 按 2×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板内, 待细胞完全贴壁后, 吸弃培养液, 加入灵芝多糖, 按浓度分为低、中、高剂量组 3 组, 终浓度分别为 200、400、600 $\mu\text{g/ml}$, 以 RPMI-1640 培养液作对照, 共 4 组, 每组设 5 个复孔, CO_2 培养箱中培养 48 h 后, 丝裂霉素 (100 $\mu\text{g/ml}$) 灭活, 以 PBS 洗 3 遍后, 备用。

1.6 脾淋巴细胞表面活化分子 CD69 表达测定

采用流式细胞术。在经灵芝多糖处理的 B16F10 细胞中加入小鼠脾淋巴细胞 1×10^6 /孔, 置于培养箱中继续培养 18 h 后, 收集脾淋巴细胞, 直接吹打制备淋巴细胞悬液, 1500 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 获得的沉淀即为小鼠脾淋巴细胞, 加入 PBS 10 ml, 1500 r/min 离心 10 min, 洗两遍。于显微镜下观察以除外肿瘤细胞掺杂 (肿瘤细胞贴壁生长, 淋巴细胞悬浮生长, 贴壁生长的肿瘤细胞不易被吹打下来, 所以一般吹打下来的为淋巴细胞, 但也需镜下观察确认)。弃去上清, 加入仓鼠抗小鼠 CD69-PE 0.2 μg 、IgG-PE 0.2 μg , 震荡混匀后室温避光 30 min, 加入 500 μl PBS 混匀, 流式细胞仪检测脾淋巴细胞表面活化分子 CD69 表达。

1.7 脾淋巴细胞表面活化分子 FASL 表达测定

采用流式细胞术。在经灵芝多糖处理的 B16F10 细胞中加入小鼠脾淋巴细胞 1×10^6 /孔, 置于培养箱中继续培养 5 天后, 收集脾淋巴细胞, 收集方法同 1.6。PBS 洗 2 遍后, 弃去上清, 加入小鼠 FC 段封闭试剂 1 μg , 震荡混匀后 4℃ 避光 5 min, 加入 FAS 配体 (FASL) 抗体 1 μg , 震荡混匀后 4℃ 避光 45 min, PBS 洗 1 遍, 检测脾细胞表面活化分子 FASL 的表达。

1.8 脾淋巴细胞 IFN- γ 含量测定

在经灵芝多糖处理的 B16F10 细胞中加入小鼠脾淋巴细胞 5×10^5 /孔, 置于培养箱中继续培养 5

天, 收集培养上清, 常温下 1500 r/min 离心 5 min, 弃去沉淀。ELISA 法检测上清中 IFN- γ 的含量, 步骤按试剂盒说明书进行, 用酶标仪于 450 nm 处测 OD 值, 计算出每份标本中 IFN- γ 的含量。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计学软件进行统计处理。实验数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 符合正态分布数据组间比较采用单因素方差分析, 不呈正态分布数据计算几何均值进行统计分析。

2 结果

2.1 各组脾淋巴细胞表面活化分子 CD69、FASL 表达比较

表 1 示, 低、中、高剂量组 CD69 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 中、高剂量组 FASL 水平亦明显高于对照组 ($P < 0.05$); 中、高剂量组 FASL 水平明显高于低剂量组 ($P < 0.05$); 各剂量组之间 CD69 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组脾淋巴细胞表面活化分子 CD69、FASL 表达及 IFN- γ 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	CD69 (%)	FASL (%)	IFN- γ (pg/ml)
对照组	5	10.40 $\pm$ 2.57	69.26 $\pm$ 6.11	15.41 $\pm$ 3.24
低剂量组	5	15.85 $\pm$ 0.93*	67.06 $\pm$ 10.8	60.08 $\pm$ 1.50*
中剂量组	5	16.13 $\pm$ 3.21*	86.24 $\pm$ 6.11 ^{*Δ}	106.49 $\pm$ 1.20 ^{*Δ}
高剂量组	5	15.62 $\pm$ 2.52*	83.98 $\pm$ 9.58 ^{*Δ}	67.19 $\pm$ 1.90 ^{*Δ}

注: IFN- γ , γ 干扰素; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组脾淋巴细胞 IFN- γ 含量比较

表 1 示, 低、中、高剂量组 IFN- γ 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$); 中剂量组 IFN- γ 水平明显高于低剂量组及高剂量组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

研究证实, 灵芝多糖可增强体液免疫和细胞免疫反应, 在体外灵芝多糖可显著增强刀豆素 A、细菌内毒素脂多糖诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖反应和混合淋巴细胞反应^[8-11]。CD69 又称活化诱导分子, 静止状态的 T 细胞不表达 CD69, 但当 T 细胞活化后可诱导性表达 CD69, 且表达极快, 是 mR-NA 合成后首先被发现的分子, T 细胞激活后 1 ~ 2 h 细胞表面就可测出 CD69 的表达并迅速达到高峰, 可持续表达 72 h^[12-13] 为 T 细胞活化标志。本研究结果显示, 经灵芝多糖处理的 B16F10 细胞与淋巴细胞共培养, 淋巴细胞 CD69 水平高于对照

组,提示灵芝多糖可促进 B16F10 肿瘤细胞对淋巴细胞的活化。低、中、高剂量组之间比较差异无统计学意义,说明灵芝多糖能增强 B16F10 细胞诱导的小鼠脾淋巴细胞表达 CD69,无明显浓度依赖性。

FAS 属于肿瘤坏死因子/神经生长因子受体家族成员。FASL 于 1993 年由 Suda 等从 CTL 杂交瘤衍生的细胞系 PC60-d10S 细胞系中克隆成功,静息的 T 淋巴细胞不表达 FASL,但当受到抗原或丝裂原刺激后快速表达。FASL 与靶细胞的 FAS 结合后,诱导靶细胞凋亡^[4]。因此,淋巴细胞表面 FASL 的表达是杀伤靶细胞的重要机制,可以反映淋巴细胞的活化。本实验中灵芝多糖处理的 B16F10 细胞与小鼠脾淋巴细胞共培养后小鼠脾淋巴细胞表面 FASL 表达增多,以中、高剂量组明显,表明灵芝多糖能增强 B16F10 细胞活化小鼠脾淋巴细胞的能力。

IFN- γ 是淋巴细胞活化的重要效应分子,有着广泛的免疫调节作用,包括对 APC、巨噬细胞、NK 细胞、B 细胞的膜分子表达、活化和分化的影响^[5-10]。本研究结果显示,经灵芝多糖处理过的 B16F10 细胞与淋巴细胞共培养后,其培养上清中 IFN- γ 的含量高于对照组,提示灵芝多糖可促进 B16F10 细胞活化小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN- γ ,进一步证明了灵芝多糖能增强 B16F10 细胞活化小鼠脾淋巴细胞的能力。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Yue QX, Guan SH, Xie FB, et al. Interaction of ganoderma triterpenes with docetaxel and cisplatin in cytotoxicity against human carcinoma cells [J]. Chin J Nat Med, 2008, 6(5): 367-371.
- [3] Cao LZ, Lin ZB. Regulatory effect of Ganoderma lucidum polysaccharides on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells in vitro [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(4): 321-326.
- [4] Wang J, Zhang L, Yu Y, et al. Enhancement of antitumor activities in sulfated and carboxymethylated polysaccharides

- of Ganoderma lucidum [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(22): 10565-10572.
- [5] Cao QZ, Lin ZB. Ganoderma lucidum polysaccharides peptide inhibits the growth of vascular endothelial cell and the induction of VEGF in human lung cancer cell [J]. Life Sci, 2006, 78(13): 1457-1463.
- [6] Song YS, Kim SH, Sa JH, et al. Anti-angiogenic and inhibitory activity on inducible nitric oxide production of the mushroom Ganoderma lucidum [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 90(1): 17-20.
- [7] Li W, Nie S, Chen Y, et al. Enhancement of cyclophosphamide-induced antitumor effect by a novel polysaccharide from Ganoderma atrum in Sarcoma 180-bearing mice [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(8): 3707-3716.
- [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] 林志彬. 灵芝的现代研究 [M]. 北京: 北京大学中国协和医科大学联合出版社, 1996: 135-140.
- [10] Lei LS, Lin ZB. Effects of Ganoderma polysaccharides on T cell subpopulations and production of interleukin 2 in mixed lymphocyte response [J]. Acta Pharm Sin, 1992, 27(5): 331-335.
- [11] Lei LS, Lin ZB. Effects of Ganoderma polysaccharides on the activity of DNA polymerase in spleen cells stimulated by allo antigens in mice in vitro [J]. Beijing Med Univ, 1991, 23(4): 329-333.
- [12] 侯彦强, 王克强. CD69 分子的研究进展 [J]. 泰山医学院学报, 2003, 24(1): 85-86.
- [13] 申蓉, 李丽珍. CD69 与免疫功能的调节 [J]. 国外医学免疫学分册, 2004, 27(1): 24-27.
- [14] Caldwell SA, Ryan MH, Mc Duffie E, et al. The Fas/Fas ligand pathway is important for optimal tumor regression in a mouse model of CTL adoptive immunotherapy of experimental CM S4 lung metastases [J]. J Immunol, 2003, 171(5): 2402-2412.
- [15] Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, et al. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses [J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 713-758.
- [16] Schneider B, Hone A, Tolba RH, et al. Simultaneous persistence of multiple genome variants of human parvovirus B19 [J]. J Gen Virol, 2008, 89(Pt1): 164-176.

The Effects of Ganoderan on Immunization of Melanoma Cells in Mice in Vitro

QI Man¹, ZHENG Yanjie¹, LI Weidong², LI Min², SUN Lixin³, SONG Yi¹

(1. Central Hospital of Chengde, Hebei Province, 067000; 2. School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center; 3. Hospital Affiliated to Chengde Medical College)

ABSTRACT Objective To explore the possible functional mechanism of ganoderan in improving anti-tumor immune response. **Methods** Melanoma cells of mice B16F10 cultured in vitro were treated using ganoderan, and

were divided into low (200 $\mu\text{g/ml}$), middle (400 $\mu\text{g/ml}$), and high (600 $\mu\text{g/ml}$) dosage groups according to the ganoderan concentration, while RPMI-640 nutrient solution was used as the control group. Mice spleen lymphocytes 1×10^6 /hole were added into ganoderan treated B16F10 cells, and after being cultured for 18 h or five days, respectively, the expression of activated molecule of CD69 and FASL on the surface of spleen lymphocytes were examined respectively. Mice spleen lymphocytes 5×10^5 /hole were added into Gl-PS treated B16F10 cells, and after being cultured for 5 days, the content of IFN- γ was detected using ELISA method. **Results** CD69 levels in low, middle and high dosage groups were remarkably higher than that in control group ($P < 0.05$). FASL levels in middle and high groups were remarkably higher than that in control group ($P < 0.05$); and FASL levels in middle and high groups were remarkably higher than that in low group ($P < 0.05$). There were no statistically significant differences in CD 69 levels between each dosage group ($P > 0.05$). IFN- γ level in low, middle and high dosage groups were remarkably higher than that in control group ($P < 0.05$). IFN- γ level in middle dosage group was remarkably higher than that in low and high dosage groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Ganoderan could improve anti-tumor immune immunocompetence of lymphocytes, which may had a relationship with activating the expression of CD69 and FASL of mice spleen lymphocytes and improving secretion of IFN- γ .

Keywords ganoderan; melanoma; cellular Immunity

(收稿日期: 2014-12-18; 修回日期: 2015-03-16)

编辑: 王利芬

“喜来乐杯”肝复乐胶囊临床应用及基础研究征文通知

为促进中医药在肝病领域的研究应用, 更好的探索肝复乐胶囊治疗肝癌的作用机理及对各类肝损伤患者的有效影响, 完善肝病防治方案, 世界中医药联合会肝病专业委员会和中医杂志社联合康普药业股份有限公司开展“喜来乐”杯肝复乐胶囊临床应用及基础研究有奖征文活动。具体要求如下。

1. 征文内容

(1) 肝复乐胶囊在肝癌、肝硬化合并肝腹水方面的临床应用、基础研究的论著、荟萃分析、合理用药方案研究等; (2) 肝癌、肝硬化治疗联合肝复乐胶囊对血清甲胎蛋白 (AFP) 的影响; (3) 介入、微创治疗肝癌联合肝复乐胶囊的临床应用、基础研究的论著、荟萃分析、合理用药方案研究等; (4) 肝复乐胶囊在肝纤维化领域的临床应用、基础研究的论著、荟萃分析、合理用药方案研究等; (5) 典型病例和病案讨论。

2. 征文对象

临床使用过肝复乐胶囊的医生和药师、从事相关药物研究以及临床诊疗工作的临床专家、其他专业人士。

3. 征文要求

文章力求立体新颖、设计严格、数据完整, 具有新颖性和指导性; 内容具有严谨性和科学性, 论点鲜明、论据充分、逻辑严谨, 结果真实可靠; 要求未公开发表及未在全国性会议上交流。

4. 投稿邮箱

将电子版发至 398737956@qq.com, 邮件主题请注明“喜来乐杯+药品名称”字样。

5. 征文评审

主办单位将组织著名专家对来稿进行评选, 将推荐部分优秀论文在核心期刊及省级专业期刊发表并给予相关奖励。

6. 征文奖项

(1) 一等奖: 2 名, 支持科研基金 10000 元; (2) 二等奖: 4 名, 支持科研基金 7000 元; (3) 三等奖: 8 名, 支持科研基金 4000 元; (4) 纪念奖: 若干名 (参与即有), 喜来乐·礼盒。优秀科研成果将邀请参加全国性学术大会报告及交流。

7. 征文截止日期: 2015 年 10 月 31 日

联系人: 张先生, 电话: 0731-84332600、手机: 15697339291 或 QQ: 398737956。

附部分已发表的文章: 1. 郝明志等, 肝动脉栓塞化疗联合肝复乐胶囊治疗晚期肝癌临床疗效观察, 《中南药学》;

2. 邓友等, 肝复乐治疗慢性乙型肝炎肝纤维化 50 例, 《中医杂志》; 3. 高继良, 肝复乐方剂治疗晚期原发性肝癌的前瞻性、随机对照临床研究, 《中国中药杂志》; 4. 张传光等, 肝动脉栓塞化疗联合口服肝复乐治疗中晚期原发性肝癌 56 例临床观察, 《实用癌症杂志》; 5. 蔡美等, 肝复乐片治疗肝硬化腹水的临床观察, 《湖南中医药导报》; 6. 吴孝雄等, 肝复乐胶囊预防原发性肝癌经导管动脉化疗栓塞后肝损伤, 《中成药》; 7. 吴孝雄等, 肝复乐胶囊联合无水酒精瘤内注射治疗原发性肝癌临床观察, 《上海中医药杂志》; 8. 欧阳石等, 肝复乐联合恩替卡韦治疗乙型肝炎肝硬化的疗效评价, 《中国医药》; 9. 杨俊等, 肝复乐胶囊治疗慢性乙型肝炎、肝硬化临床疗效观察, 《中南药学》; 10. 邓子德等, 肝复乐对肝炎肝硬化患者血清肝纤维化指标的影响, 《中西医结合肝病杂志》