

灵芝合剂的体内外抗肿瘤作用研究

唐学敏^{1*} 吴仲鑫²

(1. 南阳理工学院张仲景国医学院, 河南省南阳市长江路 80 号, 473000; 2. 河南中医学院)

* 通讯作者: nylgtxm@163.com, 15937751101

[摘要] 目的 观察灵芝合剂抗肿瘤作用及其可能机制。方法 采用体外细胞培养方法观察灵芝合剂对人肝癌细胞株 QGY7703、大鼠肝癌细胞株 CBRH7919、人胃癌细胞株 BGC823 的增殖抑制作用; 体内试验将 50 只小鼠随机分为正常对照组、模型组、环磷酰胺组、灵芝合剂组和联合组各 10 只, 除正常对照组外建立 S180 荷瘤小鼠模型, 环磷酰胺组以 30 mg/kg 腹腔注射环磷酰胺, 灵芝合剂组以 50 mg/kg 灵芝合剂灌胃, 联合组给予灵芝合剂和环磷酰胺, 正常对照组及模型组灌胃等量生理盐水, 各组连续给药 14 天。计算各组小鼠抑瘤率、脾脏指数、胸腺指数, 检测小鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 的水平。结果 灵芝合剂组 0.4~6.4 mg/ml 药物浓度对 CBRH7919、BGC823 肿瘤细胞株具有明显的增殖抑制效果, 且有一定的浓度依赖性 ($P < 0.05$)。灵芝合剂组、环磷酰胺组和联合组抑瘤率分别为 47.90%、69.57%、78.67%。灵芝合剂组及联合组小鼠的脾脏指数和胸腺指数与环磷酰胺组比较明显提高 ($P < 0.05$)。除环磷酰胺组 IL-6 含量与正常对照组比较差异无统计学意义外, 3 个给药组 TNF- α 、IL-6 的含量均高于正常对照组 ($P < 0.05$)。结论 灵芝合剂有一定的抗肿瘤活性, 其作用机制可能与增强荷瘤小鼠免疫力, 提高其血清 TNF- α 、IL-6 含量有关。

[关键词] 灵芝合剂; 肿瘤细胞株; S180 肉瘤; 抑瘤率; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6

In Vitro and In Vivo Anti-Tumor Effects of Ganoderma Compound

TANG Xuemin¹, WU Zhongxin²

(1. Nanyang Institute of Technology, Henan Province 473000; 2. Henan University of TCM)

ABSTRACT Objective To observe the anti-tumor effects of Ganoderma Compound and its possible mechanism. **Methods** The in vitro cell culture method was used to observe the inhibitory effect of Ganoderma Compound on the proliferation of human hepatoma cell line QGY7703, rat hepatoma cell line CBRH7919 and human gastric cancer cell line BGC823. In vivo experiment fifty mice were randomized into the normal control group, model group, Cyclophosphamide group, Ganoderma Compound group and combo therapy group, with 10 in each. The S180 tumor-bearing mouse models were established except the normal control group. The Cyclophosphamide group was given intraperitoneal injection of 30 mg/kg Cyclophosphamide. The Ganoderma Compound group was gavaged with 50 mg/kg Ganoderma Compound. The combo therapy group was given Cyclophosphamide and Ganoderma Compound. The normal control group and model group were given the same amount of normal saline. Each group was administered for 14 continuous days. The tumor inhibition rate, spleen index and thymus index was calculated. The serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were detected. **Results** The drug concentration of 0.4 to 6.4 mg/ml in the Ganoderma Compound group had a significantly inhibitory effect on the proliferation of CBRH7919 and BGC823 tumor cell lines with a concentration dependent manner ($P < 0.05$). The tumor inhibition rate in the Ganoderma Compound group, Cyclophosphamide group and combo therapy group was 47.90%, 69.57% and 78.67% respectively. Comparing with the Cyclophosphamide group, the spleen index and thymus index in the Ganoderma Compound group and combo therapy group was significantly increased ($P < 0.05$). The levels of TNF- α and IL-6 in three administration groups were significantly higher than those in the normal control group except for the IL-6 level in the Cyclophosphamide group ($P < 0.05$). **Conclusion** The Ganoderma Compound has a certain anti-tumor activity and its mechanism may be related to enhancing the immunity and improving the serum contents of TNF- α and IL-6 in tumor-bearing mice.

Keywords Ganoderma Compound; tumor cell lines; S180 sarcoma; tumor inhibition rate; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6

灵芝为担子菌纲、多孔菌科、属真菌。现代医学实验证明, 灵芝有提高机体免疫力、抑制肿瘤、抑制氧自由基的产生、增强机体清除自由基的能力、抑制组织细胞脂质过氧化等广泛的药理活性^[1]。同时, 增强免疫功能可以介导灵芝的抗肿瘤作用^[2]。蛇莓

为蔷薇科蛇莓属植物, 具有清热解毒、消肿散结、收敛止血、凉血之功效, 近年来发现蛇莓具有显著的抗肿瘤作用^[3-4]。冬凌草为唇形科香茶菜属植物, 有研究表明其对白血病以及食管癌、肝癌、结肠癌等有一定的疗效^[5-7]。本研究拟以灵芝为主药, 配伍蛇

莓、冬凌草组成灵芝合剂,以消化系肿瘤细胞株为对象,体外观察灵芝合剂抗肿瘤的作用机理,为其进一步开发利用提供实验依据。

1 材料及方法

1.1 动物与细胞株

SPF级昆明种小鼠50只,雄性,体重18~22g,购于河南中医学院实验动物中心,动物合格证号:SCXK(豫)2010-0002;人肝癌细胞株QGY7703,大鼠肝癌细胞株CBRH7919,人胃癌细胞株BGC823及S180细胞株,购于郑州大学医学院细胞中心。

1.2 药品、试剂及仪器

灵芝合剂:灵芝产地山东;冬凌草、蛇莓产地河南,3种中药以1:1:1比例混合后常规水煎2次,药液经纱布过滤后混合并浓缩至1g生药/ml,4℃保存,用时以生理盐水稀释;注射用环磷酰胺(CTX),0.2g/支,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号11031521;胎牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司;5-氟尿嘧啶(5-Fu),上海旭东海普药业有限公司,批号11081102;450型酶标仪,日本Ricoh公司;倒置相差显微镜,日本Olympus公司。

1.3 细胞培养

用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液,37℃、5%CO₂条件下常规培养细胞。细胞于指数生长期用不同浓度的药物处理相应时间后进行检测。

1.4 灵芝合剂对不同肿瘤细胞增殖的影响

取指数生长期的细胞加入96孔板中,每孔6000个细胞。灵芝合剂组设5个浓度:0.4、0.8、1.6、3.2、6.4mg/ml,阳性药物5-Fu采用终浓度10μg/ml(阳性对照组),同时设置空白对照组。每组设6个平行孔,置37℃条件下培养48h,MTT法检测490nm波长下每孔的OD值,按下列公式计算生长抑制率:生长抑制率=(1-用药组平均OD值/空白对照组平均OD值)×100%。

1.5 S180荷瘤小鼠模型的建立^[8]

选择腹腔接种S180瘤细胞1周左右的小鼠1只颈椎脱臼处死,无菌抽取腹水,用生理盐水稀释,调整细胞数为 2×10^7 /ml的细胞混悬液,0.2%台盼蓝染色,计算活细胞数为95%~98%。小鼠右侧腋窝消毒后皮下注射0.2ml细胞悬液。

1.6 分组及给药

按随机数字表法选取10只小鼠为正常对照组,

其余小鼠接种24h后,按随机数字表法分为模型组、环磷酰胺组、灵芝合剂组、联合组,每组10只。其中环磷酰胺组以30mg/kg腹腔注射CTX,隔日1次;灵芝合剂组以50mg/kg灵芝合剂浓缩液灌胃,每日1次;联合组给予灵芝合剂和CTX,剂量和方法同环磷酰胺组和灵芝合剂组;正常对照组及模型组灌胃等量生理盐水,每日1次。各组连续给药14天。

1.7 一般情况观察及指标检测

实验期间观察小鼠体重、活动度等一般情况。于末次给药1h后,摘眼球取血,分离血清,-20℃保存备用。处死小鼠,完整剥离瘤块、脾脏、胸腺,用电子天平称重并记录,计算抑瘤率、脾脏指数、胸腺指数。肿瘤抑制率=(模型组平均瘤重-治疗组平均瘤重)/模型组平均瘤重×100%;胸腺指数=胸腺重量/体重;脾指数=脾重/体重^[9]

ELISA法检测血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)水平,试剂盒均购自广州齐云生物技术有限公司,批号分别为dy510、A2005,实验按试剂盒说明书操作,492nm波长处测吸光度,计算血清样本TNF-α和IL-6含量。

1.8 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件分析,计量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,多组间两两比较,若方差齐用LSD法检验,若方差不齐用Tamhane's T2法。

2 结果

2.1 灵芝合剂对不同肿瘤细胞株细胞增殖的影响

表1示,灵芝合剂组0.4、0.8、1.6mg/ml药物浓度对QGY7703、CBRH7919、BGC823GM肿瘤细胞株生长抑制率均较阳性对照组低($P < 0.05$);灵芝合剂组3.2、6.4mg/ml药物浓度对QGY7703肿瘤细胞株生长抑制率亦较阳性对照组低($P < 0.05$)。灵芝合剂组0.4~6.4mg/ml药物浓度对CBRH7919、BGC823肿瘤细胞株具有明显的增殖抑制效果,且呈现量效依赖关系,其中对CBRH7919细胞株各浓度间差异有统计学意义($P < 0.05$),对BGC823细胞株除0.8、1.6mg/ml两个浓度间无统计学差异外,其他浓度间差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。灵芝合剂组对QGY7703的抑制作用不明显,除0.4、0.8mg/ml两个浓度间无统计学差异外,其余各浓度间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 灵芝合剂对不同肿瘤细胞株细胞生长抑制率的比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	药物浓度(mg/ml)	样本数	QGY7703	CBRH7919	BGC823
阳性对照组	0.01	6	71.40±3.27	69.70±4.29	66.50±4.14
灵芝合剂组	0.4	6	14.22±1.74*	31.43±1.77*	22.64±1.58*
	0.8	6	13.80±1.61*	36.07±1.90*△	35.16±1.45*△
	1.6	6	17.17±1.80*△▲	41.24±2.14*△▲	37.27±1.38*△
	3.2	6	29.32±2.12*△▲▽	49.62±2.14△▲▽	53.19±1.21△▲▽
	6.4	6	22.86±2.12*△▲▽▼	56.71±1.19△▲▽▼	62.33±1.21△▲▽▼

注:与阳性对照组比较,* $P<0.05$;与 0.4 mg/ml 比较,△ $P<0.05$;与 0.8 mg/ml 比较,▲ $P<0.05$;与 1.6 mg/ml 比较,▽ $P<0.05$;与 3.2 mg/ml 比较,▼ $P<0.05$

2.2 各组小鼠抑瘤率及脏器指数的比较

灵芝合剂组、环磷酰胺组和联合组抑瘤率分别为 47.90%、69.57%、78.67%。表 2 示,与正常对照组比较,环磷酰胺组小鼠脾脏指数、胸腺指数均显著降低($P<0.05$);灵芝合剂组及联合组小鼠的脾脏指数和胸腺指数与环磷酰胺组比较有明显提高($P<0.05$)。

表 2 各组小鼠抑瘤率及脏器指数的比较(mg/g, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	脾脏指数	胸腺指数
正常对照组	10	3.32±0.32	1.89±0.31
模型组	10	2.27±0.55	1.64±0.48
环磷酰胺组	10	1.92±0.71*	1.52±0.25*
灵芝合剂组	10	2.72±0.25△	1.96±0.58△
联合组	10	2.96±0.79△	2.09±0.56△

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与环磷酰胺组比较,△ $P<0.05$

2.3 各组小鼠血清 TNF- α 、IL-6 含量的比较

表 3 示,灵芝合剂组、环磷酰胺组和联合组与模型组比较 TNF- α 、IL-6 含量差异均有统计学意义($P<0.05$);除环磷酰胺组 IL-6 含量与正常对照组比较差异无统计学意义外,3 个给药组 TNF- α 、IL-6 的含量均高于正常对照组($P<0.05$)。

表 3 各组小鼠血清 TNF- α 、IL-6 含量的比较(ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TNF- α	IL-6
正常对照组	10	4.30±0.27	0.19±0.06
模型组	10	5.44±0.21	0.17±0.03
环磷酰胺组	10	6.36±0.26*△	0.22±0.04△
灵芝合剂组	10	7.38±0.42*△	0.36±0.07*△
联合组	10	6.21±0.25*△	0.40±0.07*△

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,△ $P<0.05$

3 讨论

肿瘤是世界上迄今未克服的难治疾病,机体的免疫功能及状态与肿瘤的发生、发展及预后密切相关,随着对肿瘤学的深入研究,肿瘤与免疫的关系越来越引起重视^[10]。大多数肿瘤患者存在先天或者

后天免疫失调,机体防御机制功能下降,对肿瘤细胞监视不力,不能及时将其消灭,最终导致肿瘤细胞的生长^[11]。《黄帝内经》曰“正气存内,邪不可干”,充分肯定了中医扶正培本法的疗效。灵芝始载于《神农本草经》,其性味甘平,归心、肝、肺、肾经,具有扶正固本、补中益气、滋外强壮、延年益寿等功效。主治虚劳、失眠、神疲乏力、心悸、头晕、久咳气喘等。灵芝富含对人体有益的 17 种氨基酸以及灵芝多糖、灵芝酸、生物碱、三萜类化合物等有效成分,其子实体、孢子粉、菌丝体均可入药,大量研究表明灵芝具有免疫、抗衰老、抗肿瘤等作用^[12-15]。蛇莓除具有体内体外抗肿瘤活性外,也能增强机体免疫功能^[16-17]。冬凌草甲素对多种肿瘤细胞具有显著的抑制作用,其作用机制通过细胞毒作用、细胞凋亡、影响细胞周期来实现的,临床研究也证实冬凌草具有广泛抗肿瘤作用^[18-19]。

本研究体外实验表明,灵芝合剂在体外对大鼠肝癌细胞株 CBRH7919、人胃癌细胞株 BGC823 均有一定的增殖抑制作用,并呈现量效依赖关系,浓度为 6.4 mg/ml 的灵芝合剂作用 48h,对两种细胞株的抑制率可达 56.71% 及 62.33%;体内实验结果也表明,灵芝合剂对于小鼠 S180 荷瘤具有一定的抑制作用,给药剂量 50 mg/kg,抑瘤率达 47.9%,特别与化疗药物环磷酰胺联合应用,抑瘤率达 78.67%。并且环磷酰胺组小鼠的脾脏指数和胸腺指数与正常对照组比较明显降低($P<0.05$),说明环磷酰胺对免疫器官损伤较大,但灵芝合剂组及联合组与环磷酰胺组比较,其脾脏指数和胸腺指数有显著性提高($P<0.05$),说明灵芝合剂及联合组能改善环磷酰胺所致的免疫功能下降,提示灵芝合剂在治疗肿瘤方面抑瘤作用更具安全性。

TNF 系由激活的单核细胞和巨噬细胞系统产生,是具有广泛生物学功能的一种可溶性多效细胞因子,TNF- α 在体内实验性肿瘤效应的特征是引起

肿瘤坏死,肿瘤体积缩小以至减退,与机体免疫调节系统变化有关^[20]。IL-6 是一种多效应细胞因子,及其受体系统在机体抗肿瘤中起重要作用,是反映机体免疫功能的重要指标,它与恶性肿瘤的增殖、自身免疫性疾病密切相关^[21]。本研究表明,灵芝合剂可提高荷瘤小鼠血清的 TNF- α 、IL-6 含量,提示其可能通过促进 TNF- α 和 IL-6 分泌调节机体的免疫功能,从而起到抗肿瘤作用。

参考文献

- [1] Chen Y, Xie MY, Gong XF. DPPH radical scavenging effect of ganoderma atrum[J]. Nat Prod Res Devel, 2006, 18(6):28-32.
- [2] 张伟,曾园山. 灵芝孢子的研究进展[J]. 中西医结合学报, 2004, 2(6):463-465.
- [3] 吴培楠,段宏泉,姚智,等. 蛇毒中具有抗癌活性的三萜类成分[J]. 中草药, 2007, 38(9):1311-1313.
- [4] Zhou S, Dr. Huang Zhenqao's experience in treating acute leukemia; a summary for the survivors over five years [J]. J Tradit Chin Med, 2007, 27(3):199-204.
- [5] 张俊峰,刘加军,陆敏强,等. 冬凌草甲素抑制人肝癌 BEL-7402 细胞生长及诱导细胞凋亡的机制研究[J]. 中草药, 2006, 37(10):1517-1521.
- [6] 周丽,周建伟,梁振宇,等. 冬凌草治疗老年晚期食管癌临床观察[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(8):795-796.
- [7] 左海军,李丹,吴斌,等. 冬凌草的化学成分及其抗肿瘤活性[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(4):258-262.
- [8] Mantovani A, Allavena P, Sica A. et al. Cancer-related inflammation[J]. Nature, 2008, 454(7203):436-444.
- [9] 冯鹏,赵丽,赵卿,等. 灵芝孢子多糖对荷瘤小鼠的免疫调节作用[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(2):166-167.
- [10] 张葛,花宝金. 从炎性微环境探究中医肿瘤病机与治则治法[J]. 中医杂志, 2012, 53(13):1101-1105.
- [11] 陆海,范忠泽. 肿瘤多药耐药机制及中医药逆转作用研究概况[J]. 中医杂志, 2011, 52(12):1068-1071.
- [12] 李晔,肖志勇,黄宗锈. 灵芝孢子油对化学性肝损伤保护作用的研究[J]. 广西中医药, 2006, 29(3):50-51.
- [13] 戴军,石玉娥,褚兆萃,等. 灵芝代谢产物抗肿瘤作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9):2194-2195.
- [14] 马志红,吴淑慧,石红,等. 富硒灵芝对环磷酰胺的增效减毒作用研究[J]. 河北中医药学报, 2011, 26(1):34-35.
- [15] 王鹏云,王赛贞,林树钱,等. 灵芝孢子和破壁孢子多糖对体外培养的小鼠脾淋巴细胞及腹腔巨噬细胞免疫调节活性的比较[J]. 北京大学学报(医学版), 2005, 37(6):569-574.
- [16] 高延宏. 蛇莓的药理作用研究进展[J]. 黑龙江医药, 2009, 22(3):365-366.
- [17] 彭博,胡秦,王立为,等. 蛇莓总酚的抗肿瘤作及免疫学机制的初步探讨[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(8):1007-1010.
- [18] 朱国臣,肖大江,张亚男,等. 冬凌草甲素对人鼻咽癌细胞 CNE-2 的抑制作用[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(4):804-805.
- [19] 樊青霞,王瑞,王瑞林. 冬凌草单药及与化疗合用治疗食管癌 205 例[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(23):2534-2537.
- [20] 胡彦武. 灵芝孢子抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国药房, 2009, 20(15):1196-1197.
- [21] 吴家明. 肺癌患者血清 IL-6, IL-8 和 TNF 活性测定的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2004, 17(5):354-355.

(收稿日期:2012-12-13;修回日期:2013-04-15)

[编辑:邓媛]

(上接第 1322 页)

同之处,故临床应重视个体化的治疗。HDI 可以通过多靶点抑制 MM 细胞株 RPMI8226 及 U266 的增殖,然而同时也存在代偿性促生存途径激活,可能导致耐药形成,疾病难治或复发,故临床主张联合用药,使用可以靶向于 HDI 作用后代偿性促生存途径的药物,起协同作用,发挥更好的疗效。

参考文献

- [1] 沈楚云,林圣云. 白花蛇舌草的抗肿瘤机制及临床应用[J]. 河南中医, 2011, 31(11):1304-1306.
- [2] 陈小红,高瑞兰,钱煦岱,等. 白花蛇舌草注射液抑制 HL-60 细胞增殖及作用机理研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16(5):1035-1038.
- [3] 陈小红,黄斌,高瑞兰,等. 白花蛇舌草注射液抑制白血病细胞增殖及对线粒体跨膜电位的影响[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(9):1920-1924.
- [4] 周健,吴远彬,蒋东霞,等. 人骨髓瘤细胞 RPMI8226 的生物学特性[J]. 肿瘤基础与临床, 2010, 23(3):185-189.
- [5] 张蕾,陈世伦,陈文明,等. 多发性骨髓瘤血管内皮生长因子和白细胞介素-6 相互作用的研究[J]. 中华内科杂志, 2005, 44(2):85-88.
- [6] 杨柳,颜强. 细胞因子与多发性骨髓瘤的关系[J]. 国外医学输血及血液学分册, 1996, 19(6):338-341.

(收稿日期:2012-07-30;修回日期:2012-09-28)

[编辑:邓媛]