

文章编号: 1673 1689(2011)01-0065-05

桦褐孔菌多糖的抗肿瘤活性研究

陈义勇^{1,2}, 顾小红¹, 汤坚¹

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 常熟理工学院 生物与食品工程学院, 江苏 常熟 215500)

摘要: 研究桦褐孔菌多糖对肿瘤细胞增殖的抑制和对荷瘤裸鼠的体内抑瘤作用。采用 MTT 法检测桦褐孔菌多糖对 Jurkat 和 Daudi 细胞增殖的影响, 建立 Jurkat 荷瘤裸鼠模型, 研究给药后对荷瘤裸鼠的抗肿瘤作用。表明桦褐孔菌多糖在体外具有直接杀死 Jurkat 和 Daudi 肿瘤细胞的作用, 最高抑制率分别为 62.29% 和 66.42%, 具有良好的剂量-效应关系, 同时具有显著的体内抗肿瘤活性, 大小剂量对 Jurkat 荷瘤的抑制率分别为 43.52% 和 57.48%, 并且能显著提高裸鼠的脾脏指数, 表明桦褐孔菌多糖具有显著的抗肿瘤活性和增强免疫功能。

关键词: 桦褐孔菌; 多糖; 抗肿瘤

中图分类号: Q 53

文献标识码: A

Study on Anti-Tumor Activities of Polysaccharides from *Inonotus obliquus*

CHEN Yiyong^{1,2}, GU Xiaohong¹, TANG Jian¹

(1. State Key Laboratory of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

Abstract: The research aimed to study the anti-tumor effect of polysaccharides from *Inonotus obliquus* (IOP) on tumor cell proliferation in vitro and on tumor-bearing nude mice in vivo. The effect of polysaccharides from *Inonotus obliquus* (IOP) on tumor Jurkat and Daudi cell proliferation was measured by MTT assay. The model of jurkat tumor-bearing nude was established. The anti-tumor effect of IOP on tumor-bearing nude mice in vivo was studied. The result showed that IOP could kill jurkat and daudi tumor cell directly in vitro. The highest inhibition rate was 62.29% and 66.42%, respectively, which showed an excellent dose response relation. Similarly, IOP also shown the obvious anti-tumor activities in vivo. The inhibition rate at low and high dose were 43.52% and 57.48%, respectively. IOP increased obviously the spleen index. It was concluded that IOP had obvious anti-tumor activities and improved immunological function.

Key words: *Inonotus obliquus*, polysaccharide, anti-tumor

收稿日期: 2010-01-11

作者简介: 陈义勇(1974-), 男, 河南西平人, 食品科学与工程博士研究生, 讲师, 主要从事食品科学与天然活性成分研究。Email: chenyyxp@126.com

桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*)是一种应用很广泛的药用真菌,主要寄生于白桦树、银桦、赤杨等的树干或树皮,菌丝体极其耐寒,能耐受-40℃的低温,主要分布在北纬45~50℃地区的北美、芬兰、波兰、俄罗斯的西伯利亚及远东部分地区、中国的黑龙江和吉林、日本的北海道等国家和地区^[1]。桦褐孔菌多糖具有抗肿瘤活性^[2-4]、降血糖活性^[5]、免疫调节活性^[6-8]、抗氧化、降血脂等功能,因此在医药工业上有着广阔的应用前景。作者从桦褐孔菌多糖制备入手,研究桦褐孔菌多糖的抗肿瘤活性,为其在医药、保健食品等领域的应用奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

桦褐孔菌:购自黑龙江亚布力土产公司,经常熟理工学院冀宏研究员鉴定为担子菌亚门、多孔菌科桦褐孔菌褐卧孔菌属。

Jurkat 细胞(人 T 淋巴细胞白血病细胞株)、Daudi 细胞(人 B 淋巴瘤细胞):中国人民解放军军事医学科学院惠赠。

Balb/c nu/nu 裸鼠:雌雄各半,3~5 周龄,体重(20±2)g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,实验室适应性喂养 3 d 后开始实验。

1.2 主要试剂

小牛血清:Sigma 公司产品;RPM 11640 培养液:美国 Gibco 公司产品;四氮甲基偶氮哇盐(MTT):Sigma 公司产品;二甲基亚砷(DMSO):Sigma 公司产品;5 氟尿嘧啶:上海旭东海普药业有限公司产品;葡萄糖、苯酚、浓硫酸、乙醇等均为分析纯。

1.3 主要仪器

DJ-04 粉碎机:上海淀久中药机械制造有限公司生产;RE-52A 型旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器公司生产;752 型紫外-可见分光光度计:上海精密科学仪器有限公司生产;FA1104 电子分析天平:上海天平仪器厂生产;LD4ZA 型离心机:北京医用离心机厂生产;SHB-B 循环水式真空泵:郑州长城科工贸公司生产;LGJ10 冷冻干燥仪:南京百思威科技有限公司生产;DG3022 型酶标仪:美国 Bio Rad 公司生产;Nu-3500 型 CO₂ 培养箱:德国 Nuairice 公司生产。

1.4 试验方法

1.4.1 原料预处理 桦褐孔菌首先经过机械破碎使其粉碎成较细小的粉末,以便它与下一步的提取

剂有更大的接触面积,使多糖最大限度地提取和保留。桦褐孔菌经过粉碎后,过 40 目筛,用体积分数为 80% 的乙醇溶液在 70℃ 条件下回流 2 次,每次 3 h,这样可以有效的去除部分醇溶性物质,然后 1 000 r/min 离心 20 min,去除上清液,沉淀在 60℃ 真空干燥,得到预处理桦褐孔菌粉。

1.4.2 桦褐孔菌多糖的制备 取经过处理的桦褐孔菌粉,以水作为溶剂提取多糖,提取液离心去掉沉淀,合并滤液,减压浓缩,在滤液中加入体积分数 95% 乙醇,使乙醇体积分数达到 80%,静置过夜,次日经过离心后收集沉淀,用乙醇洗涤 3 次,冷冻干燥。将冷冻干燥后的桦褐孔菌粗多糖分别加入一定量的去离子水溶解,用 Sevag 法去除游离蛋白:将 Sevag 试剂(V(氯仿):V(丁醇)=4:1)加入样品中,体积为样品体积的 1/4,充分震荡,离心(3 000 r/min,30 min)去除蛋白质形成的沉淀,重复 6 次。上清液浓缩后流水透析 2 d,去离子水透析 2 d,离心(3 000 r/min,30 min),浓缩,冷冻干燥,得到纯化的桦褐孔菌多糖备用。

1.4.3 细胞培养 在 RPMI1640 培养基中加体积分数为 10% 的小牛血清,在 37℃,体积分数为 5% 的 CO₂ 孵箱中对 Jurkat、Daudi 肿瘤细胞常规培养,隔天传代,调整细胞生长状态,取对数生长期、生长良好的细胞,再调整细胞密度为 2×10⁶ 个/mL 进行实验。

1.4.4 桦褐孔菌多糖对肿瘤细胞增殖的影响 MTT 比色法 取对数生长期的 Jurkat 细胞和 Daudi 细胞(细胞悬浮液浓度为 2×10⁶ 个/mL),每孔 100 μL,接种于 96 孔塑料培养板内,静止培养 12 h 后,对照组不加桦褐孔菌多糖,样品组每孔内分别加入桦褐孔菌多糖使其终质量浓度分别为 0.7、2.3、7、70、200 μg/mL,每个浓度设 3 个平行孔,然后将培养板移入 CO₂ 培养箱中,在 37℃,体积分数 5% CO₂ 以及饱和湿度条件下培养 48 h 后,每孔内分别加入 MTT 试剂 20 μL,其终质量浓度为 500 mg/L。37℃ 继续孵育 4 h 后,终止培养,吸取弃除上清液后,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷(DMSO),轻轻振荡 10 min,使 MTT 还原产物完全溶解,用酶标仪在 570 nm 处测定对照组和样品组各孔吸光度(OD)值,按以每组 3 个孔的平均值作为各组的平均 OD 值,根据下列公式计算肿瘤细胞 Jurkat 和 Daudi 的抑制率^[9]。

细胞抑制率(Inhibition Ratio, IR)(%) = (1 - 样品组 OD 值 / 对照组 OD 值) × 100

1.4.5 Jurkat 荷瘤裸鼠模型的建立 Balb/c nu/

nu 裸鼠放置在空气净化室饲养, 室内温度保持(25 ± 2) °C, 全部实验过程达到无特定病原体(Specific Pathogen Free, SPF) 条件, 自由摄取无菌水和灭菌标准饲料, 观察一周后, 经过 Co60 照射(剂量 200 cGy) 3 d 后, 在裸鼠背部皮下接种经过培养的 Jurkat 细胞(2 × 10⁶ 个/mL) 0. 2 mL/ 只, 每只小鼠 2 个注射点, 每天观察裸鼠体质量和肿瘤形成情况。5 d 后接种区皮下开始出现结节, 裸鼠皮下形成约 5 mm 大小隆起, 荷瘤鼠模型建立, 成瘤率 100%。

1. 4. 6 动物分组及给药 用 9 g/L 生理盐水稀释至 Jurkat 细胞数为 2 × 10⁶ 个/mL, 无菌条件下用其对 40 只小鼠进行右腋下接种(0. 2 mL/ 只), 每组 10 只。次日将接种裸鼠随机分为阴性对照组(灌胃 10 mL/(kg · d) 生理盐水), 阳性对照组(灌胃 5-氟尿嘧啶 20 mg/(kg · d)), 桦褐孔菌多糖大剂量组(灌胃 100 mg/(kg · d)), 小剂量组(灌胃 50 mg/(kg · d))。连续喂养 10 d 并称重。

1. 4. 7 桦褐孔菌多糖对 Jurkat 肉瘤裸鼠的抑制作用 连续喂养 10 d 并称重, 脱颈致死并解剖剥取瘤块称重, 根据下列公式计算抑制肿瘤率。

肿瘤抑制率 = ((阴性对照组平均瘤质量 - 实验组平均瘤质量) / 阴性对照组平均瘤质量) × 100%

1. 4. 8 桦褐孔菌多糖对 Jurkat 肉瘤裸鼠免疫器官的影响 喂养 10 d 脱颈致死并解剖剥取脾脏称重, 根据下列公式计算脾脏指数。

脾脏指数 = 脾脏重量(mg) / 体重(g)

1. 4. 9 桦褐孔菌多糖对 Jurkat 肉瘤裸鼠单核巨噬细胞吞噬功能的影响 连续给药 10 d, 末次给药 30 min 后, 每只裸鼠尾静脉注射稀释 10 倍的中华墨汁生理盐水(0. 1 mL/ 10 g 体重)。注射墨汁后 5 min 和 25 min 时, 用定量采血管分别在裸鼠眼眶后静脉丛取血 20 μL, 迅速放入含有 2 mL 质量分数为 0. 1% Na₂CO₃ 的试管中, 摇匀, 置分光光度计 680 nm 波长处分别测定光密度值, 按下式计算吞噬指数 $K^{[10-11]}$ 。

1. 4. 10 数据统计分析 数据以平均数和标准偏差($\bar{x} \pm s$) 表示, Duncan 程序进行多重比较。

2 结果与讨论

2. 1 桦褐孔菌多糖体外对肿瘤细胞增殖的影响

研究不同质量浓度的桦褐孔菌多糖对肿瘤细胞 Jurkat 和 Daudi 的增殖的影响。从表 1 和表 2 可以看出: 桦褐孔菌多糖对肿瘤细胞 Jurkat 和 Daudi 的增殖具有明显的直接抑制作用, 抑制率分

别从 6. 89% 增加到 62. 29% 和 20. 23% 增加到 66. 42%, 随着多糖质量浓度的增加呈现出作用增强的趋势, 具有量效依赖性, 与对照组相比有显著性差异($p < 0. 01$), 差异具有统计学意义, 其有效剂量为 7 μg/mL。

表 1 桦褐孔菌多糖对 Jurkat 细胞增殖的影响

Tab. 1 Effect of polysaccharides from *Inonotus obliquus* on jurkat cell proliferation in vitro($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量浓度/ (μg/mL)	A_{570nm}	抑制 率/%
对照组	0	1. 233 ± 0. 003	0
	0. 7	1. 148 ± 0. 053	6. 89
	2. 3	1. 038 ± 0. 003 ^a	15. 82
	7. 0	0. 931 ± 0. 016 ^b	24. 49
桦褐孔菌多糖组	23	0. 666 ± 0. 013 ^b	45. 99
	70	0. 523 ± 0. 006 ^b	57. 58
	200	0. 465 ± 0. 007 ^b	62. 29

注: 与对照组比较, a: $p < 0. 05$; b: $p < 0. 01$

表 2 桦褐孔菌多糖对 Daudi 细胞增殖的影响

Tab. 2 Effect of polysaccharides from *Inonotus obliquus* on daudi cell proliferation in vitro($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量浓度/ (μg/mL)	A_{570nm}	抑制 率/%
对照组	0	1. 087 ± 0. 021	0
	0. 7	0. 867 ± 0. 006 ^b	20. 23
	2. 3	0. 630 ± 0. 010 ^b	42. 04
	7. 0	0. 523 ± 0. 058 ^b	51. 89
桦褐孔菌多糖组	23	0. 393 ± 0. 006 ^b	63. 85
	70	0. 373 ± 0. 006 ^b	65. 69
	200	0. 365 ± 0. 007 ^b	66. 42

注: 与对照组比较, b: $p < 0. 01$

2. 2 桦褐孔菌多糖对 Jurkat 荷瘤裸鼠一般状态的影响

观察发现, 桦褐孔菌多糖大、小剂量组裸鼠在治疗期间活动度佳, 食欲好, 而阴性对照组食欲不佳, 活动度差, 5-氟尿嘧啶组裸鼠明显消瘦, 一般状态较差。

2. 3 桦褐孔菌多糖体内对 Jurkathel 荷瘤裸鼠的抑瘤作用

桦褐孔菌多糖对 Jurkat 荷瘤裸鼠的抑制作用结果见表 3。从表 3 可以看出: 桦褐孔菌多糖对 Jurkat 荷瘤裸鼠具有明显的抑制作用, 与阴性对照组相比较有显著性差异($P < 0. 01$), 差异具有统计

学意义, 桦褐孔菌多糖大、小剂量组的肿瘤抑制率分别为 57.48%, 43.52%。

表 3 桦褐孔菌多糖对 Jurkat 荷瘤裸鼠的抑瘤作用 ($x \pm s, n = 10$)

Tab. 3 Anti tumor effect of polysaccharides from *Inonotus obliquus* on Jurkat tumor bearing nude mice in vivo ($x \pm s, n = 10$)

组别	动物数/只	剂量/(mg/kg)	瘤质量/g	抑制率/%
对照组	10	-	3.47 ± 0.04	-
5-Fu	10	20	1.46 ± 0.03 ^b	57.93
桦褐孔菌多糖低剂量组	10	50	1.96 ± 0.05 ^b	43.52
桦褐孔菌多糖高剂量组	10	100	1.51 ± 0.02 ^b	57.48

注: 与对照组比较, b: $P < 0.01$

2.4 桦褐孔菌多糖对 Jurkat 荷瘤裸鼠免疫器官的影响

桦褐孔菌多糖对 Jurkat 荷瘤裸鼠脾脏的影响结果见表 4。接种 Jurkat 肉瘤瘤株各组裸鼠的脾脏指数均有不同程度的增高, 与阴性对照组比较, 5-氟脲嘧啶组的脾脏指数高于阴性对照组 ($P < 0.05$), 两个剂量组的脾脏指数都明显高于阴性对照组, 高剂量组达到了极显著差异 ($P < 0.01$), 表现出剂量依赖关系, 说明桦褐孔菌多糖具有良好的保护裸鼠免疫器官的作用。

表 4 桦褐孔菌多糖对 Jurkat 荷瘤裸鼠免疫器官的影响 ($x \pm s, n = 10$)

Tab. 4 Effect of polysaccharides from *Inonotus obliquus* on immune organ of Jurkat tumor bearing nude mice in vivo ($x \pm s, n = 10$)

组别	动物数/只	剂量/(mg/kg)	脾脏指数/(mg/g)
对照组	10	-	3.68 ± 0.89
5-Fu	10	20	4.61 ± 1.43 ^a
桦褐孔菌多糖低剂量组	10	50	4.91 ± 1.51 ^a
桦褐孔菌多糖高剂量组	10	100	5.23 ± 1.03 ^b

注: 与对照组比较, a: $p < 0.05$; b: $P < 0.01$

2.5 桦褐孔菌多糖对 Jurkat 肉瘤裸鼠单核巨噬细胞吞噬功能的影响

桦褐孔菌多糖对 Jurkat 肉瘤裸鼠单核巨噬细胞吞噬功能的影响结果见表 5。结果表明: 桦褐孔

菌多糖可以显著提高裸鼠的免疫吞噬指数 ($P < 0.01$), 揭示桦褐孔菌多糖对 Jurkat 肉瘤裸鼠单核巨噬细胞吞噬功能有明显的增强作用。

表 5 桦褐孔菌多糖对 Jurkat 肉瘤裸鼠单核巨噬细胞吞噬功能的影响 ($x \pm s, n = 10$)

Tab. 5 Effect of polysaccharides from *Inonotus obliquus* on macrophage phagocytosis in Jurkat tumor bearing nude mice ($x \pm s, n = 10$)

组别	动物数/只	剂量/(mg/kg)	吞噬指数/ ($\times 10^2$)
对照组	10	-	3.87 ± 0.27
5-Fu	10	20	(4.74 ± 0.21) ^a
桦褐孔菌多糖低剂量组	10	50	(5.13 ± 0.11) ^b
桦褐孔菌多糖高剂量组	10	100	(5.74 ± 0.07) ^b

注: 与对照组比较, a: $p < 0.05$; b: $P < 0.01$

3 结语

目前我国对桦褐孔菌作为药用真菌的研究相对还比较薄弱, 主要集中在三萜类化学成分的研究上, 对桦褐孔菌多糖的系统研究还不够深入, 相对还比较薄弱, 对桦褐孔菌多糖药理作用的研究才处于起步阶段。大量药理学实验研究表明, 许多真菌来源的多糖具有一定的抗肿瘤活性, 其作用机制被认为主要与增强机体的免疫细胞功能有关, 而不是直接抑制瘤细胞的生长, 如红缘层孔菌多糖^[12]、香菇多糖^[13]等。但也有研究发现一些多糖对肿瘤细胞有直接的细胞毒活性, 在体外可直接杀死癌细胞, 齐春会等^[14]的研究表明六味地黄多糖 CA4-3B 和 P-3 体外对 L1210 和 H-60 肿瘤细胞具有抑制作用, 姜自彬等研究发现^[15]糙皮侧耳糖蛋白表现出体外抗肿瘤活性。

作者通过研究表明桦褐孔菌多糖具有很强的体内外抗肿瘤活性, 可以在体外直接杀死 Jurkat 和 Daudi 肿瘤细胞, 并随剂量的增大呈剂量依赖关系, 同时在体内可以起到有效保护免疫器官的作用, 对 Jurkat 肉瘤裸鼠单核巨噬细胞吞噬功能有明显的增强作用, 揭示桦褐孔菌多糖可能是具有免疫调节和直接抑瘤双重作用的活性真菌多糖, 其确切机制还有待进一步深入研究。

参考文献(References):

- [1] 陈体强, 吴锦忠. 珍稀药用菌—桦褐孔菌的研究进展[J]. 海峡药学, 2005, 17(2): 1- 3.
CHEN Ti qiang, WU Jir hong. Current study and new progress on the research of *Phaeo porus obliquus*[J]. **Strait Pharmaceutical Journal**, 2005, 17 (2) : 1- 3. (in Chinese)
- [2] Yong Ook Kim, Sang Bae Hanb, Hong Woen Lee, et al. Immuno - stimulating effect of the endo polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*[J]. **Life Sciences**, 2005, 77: 2438- 2456.
- [3] Jarosz A , Skorska M, Rzymow ska J, et al. Effect of the extracts from fungus *Inonotus obliquus* on catalase level in HeLa and *Nocardia* cells[J]. **Acta Biochem Polon**, 1990, 37(1) : 149- 152.
- [4] Yong Ook Kim, Hae Woong Park, Jong Hoon Kim, et al. Anti cancer effect and structural characterization of endo polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*[J]. **Life Sciences**, 2006, 79: 72- 80.
- [5] Mizuno T, Zhuang C , Abe K, et al. Antitumor and hypo glycemic activities of polysaccharides from the sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus*[J]. **Int J Med Mushrooms**, 1999 , 1 (4) : 301- 316.
- [6] Babitskaia VG, Shcherba VV, Ikonnikova NV. Melanin complex of the fungus *Inonotus obliquus* [J]. **PriklBiokhim Mikrobiol**, 2000, 36 (4) : 439.
- [7] Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides[J] . **Appl Microbiol Biotechnol**, 2002, 60: 258.
- [8] Rzymow ska J . The effect of aqueous extracts from *Inonotus obliquus* on the mitotic index and enzyme activities[J] . **Boll Chim Garm**, 1998, 137 (1) : 13.
- [9] Cao W, Li X Q, Liu L. Structure of an anti tumor polysaccharides from *Angelica sinensis*(*Oliv.*) Diels[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2006, 66, 149- 159.
- [10] 胡菁, 敖明章, 崔永明, 等. 甘草多糖的抗肿瘤活性及对免疫功能的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 911- 913.
HU Jing, AO Ming zhang, CUI Yong ming, et al. Anti tumor effect of polysaccharide from glycyrrhiza and its influence on immunological function[J]. **Natural Product Research and Development**, 2008, 20: 911- 913. (in Chinese)
- [11] 陈真, 郭青龙, 钱之玉, 等. 海洋真菌多糖 YCP 对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(5) : 1- 6.
CHEN Zhen , GUO Qing long , QIAN Zhi yu, et al. Study on the tumor inhibitory effect of YCP (a marine fugal polysaccharide)[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(5): 1- 6. (in Chinese)
- [12] 张丽萍, 苗春艳, 张秉信. 红缘层孔菌多糖 FP2 的结构与体外抗肿瘤作用的研究[J]. 东北师范大学学报: 自然科学版, 1994, 19(2): 74- 78.
ZHANG Li ping, MIAO Chur yan, ZHANG Bing xin. Study on structural determination and anti tumor activity of fomes pinicola polysaccharides FP2[J]. **Journal of Northeast Normal University: Natumal Science**, 1994, 19(2): 74- 78. (in Chinese)
- [13] Yamasaki K, Sons S, Yamasakita T, et al. Synergistic induction of lymphokine (IL- 22)- activated killer activity by IL- 22 and the polysaccharides lentinan and therapy of spontaneous pulmonary metastases[J]. **Cancer Immunol Immunother**, 1989, 29: 87- 92.
- [14] 齐春会, 张永祥, 李凤仙, 等. 六味地黄多糖体外抗肿瘤作用的初步研究[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(4): 323- 325.
QI Chur hui, ZHANG Yong xiang, Lli Feng xian, et al. Preliminary study on anti tumor action of polysaccharides isolated from liuwei dihuang decoction in vitro[J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**, 1999, 15(4): 323- 325. (in Chinese)
- [15] 姜自彬, 李华, 曹吉超. 糙皮侧耳糖蛋白的性质及体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2000, 17(2) : 127- 129.
JIANG Zi bin, LI Hua, CAO Ji chao. Studies on the properties and antitumor activity in vitro of the glycoprotein from *pleurotus ostreatus*[J]. **Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy**, 2000, 17(2) : 127- 129. (in Chinese)