

· 中医药实验研究 ·

桑黄胞外多糖抗肿瘤活性研究*

杨全^{1,2} 张卉² 王琦³ 王文全²

(1 广东药学院中药学院 广东 510006; 2 北京中医药大学中药学院; 3 吉林农业大学中药材学院)

摘要:目的 研究桑黄胞外多糖对小鼠 S₁₈₀ 实体瘤、腹水瘤的生长抑制作用。方法 将昆明种小鼠接种 S₁₈₀ 实体瘤或腹水瘤后随机分组,灌胃给予不同剂量 100、200、400 mg/(kg·d) 的桑黄胞外多糖,以灌胃生理盐水和环磷酰胺为空白对照组和阳性对照组。检测受试药物对小鼠 S₁₈₀ 实体瘤生长的抑制作用以及对荷瘤小鼠脾脏指数和胸腺指数的影响,计算腹水型荷瘤小鼠的存活时间。结果 桑黄胞外多糖显著增加荷瘤小鼠的脾脏指数和胸腺指数;3 个剂量的桑黄胞外多糖对 S₁₈₀ 实体瘤的抑瘤率分别为 31.25%、36.86%、44.38%;并且可以降低 S₁₈₀ 腹水瘤细胞的分裂指数,延长腹水型荷瘤小鼠的存活时间。结论 桑黄胞外多糖具有较强的抗肿瘤作用。

关键词:桑黄;胞外多糖;抗肿瘤;小鼠

中图分类号: R285.5

Anti-tumor effect of exopolysaccharide from *Phellinus igniarius*

YANG Quan^{1,2}, ZHANG Hui², WANG Qi³, et al

(1 School of Chinese medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006; 2 School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine; 3 College of Chinese Traditional Medicine, Jilin Agriculture University)

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of exopolysaccharide (Pi-EPS) from *Phellinus igniarius*, a medicinal fungus, on growth of S₁₈₀ solid tumor and ascites tumor in mice. **Methods** Pi-EPS was intragastrically given to mice with S₁₈₀ solid tumor and ascites tumor at the dose of 100, 200 and 400 mg/(kg·d). Normal sodium and cyclophosphamide were taken as blank control and positive control respectively. The tumor weight, spleen index, thymus index, karyokinesis index, and survival time were measured. **Results** Pi-EPS significantly increased the spleen index and thymus index, decreased the divisional index of tumor cells in S₁₈₀ ascites and prolonged survival time of mice with S₁₈₀ ascites tumor. The inhibiting tumor rates at the doses of 100, 200 and 400 mg/(kg·d) were 31.25%, 36.86% and 44.38%, respectively. **Conclusion** Pi-EPS showed potent anti-tumor effect.

Key words: *Phellinus igniarius*; exopolysaccharide; anti-tumor effect; mice

桑黄^[1] [*Phellinus igniarius* (L. ex Fr.) Quel] 又称火木层孔菌或针层孔菌,属于多孔菌科木层孔菌(针层孔菌)属真菌,子实体入药,味微苦,能利五脏,排毒,止血。近年来,一些学者^[2-3]对桑黄的化学成分进行了研究,除(子实体)多糖外,还含有黄酮及其衍生物、香豆素类、甾醇类、氨基酸等化合物。药理研究结果表明子实体的热水提取物在抗肿瘤、抗发炎、抗氧化、抗突变、提高免疫力等方面具有显著功效^[4-5]。尤其是抗肿瘤方面,桑黄子实体多糖对肿瘤生长具有

显著的抑制作用,并可增强荷瘤小鼠的细胞免疫功能^[6]。本文对桑黄液体深层发酵生产的胞外多糖(从发酵液中提取)的抗肿瘤活性进行了研究,旨在为桑黄多糖的进一步开发利用奠定基础。

1 材料

1.1 桑黄菌种

桑黄子实体采自吉林长白山,由本实验室分离、纯化菌种并保存,菌种编号为 Pi-200403。

杨全,男,在读博士生,讲师

* 广东药学院科研基金资助项目 (No. 43540061)

1.2 桑黄胞外多糖

根据文献报道的工艺^[7],通过深层发酵培养桑黄菌丝体,滤取菌丝体后获得菌丝体培养液(发酵液)。将发酵液浓缩为原体积的 1/5,用 3 倍体积 95%乙醇 4 沉淀过夜,5 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,再用乙醚、丙酮、无水乙醇分别洗涤 2 次后真空干燥得桑黄胞外多糖(Phellinus igniarius-exopolysaccharide)。

1.3 阳性对照药物

环磷酰胺为上海华联制药有限公司产品,规格为 200 mg/瓶,批号:020804。

1.4 动物

昆明种小鼠,体重(20 ±2) g,6 周龄,雄性,广东省医学实验动物中心提供,合格证编号:0501452; S₁₈₀肿瘤种鼠由中山大学医学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 S₁₈₀移植性实体瘤的接种

取昆明种小鼠 50 只,按移植性肿瘤研究法^[8]接种 S₁₈₀实体型。在无菌操作下取瘤块,称重,用玻璃组织匀浆器研磨,磨匀后放入无菌容器内,加生理盐水稀释成 1:3 的细胞悬液,容器置冰块上,用空针抽吸,每次抽吸前将细胞混匀,每只小鼠右前肢腋窝皮下接种 0.2 mL。接种后 24 h 称鼠重,并随机分为 5 组,每组 10 只,即空白对照组(生理盐水)、环磷酰胺组(20 mg/kg)、桑黄胞外多糖低剂量组(100 mg/kg)、中剂量组(200 mg/kg)、高剂量组(400 mg/kg)。同时在接种 24 h 后灌胃给药,灌胃体积为 20 mL/kg,每日 1 次,连续 8 d,停药后次日处死荷瘤小鼠称重,并无菌取肿瘤组织、脾脏、胸腺,去血污称重,按下式计算抑瘤率和各脏器指数,比较多糖对免疫器官的影响。

抑瘤率(%) = [对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重] / 对照组平均瘤重 × 100%

脾脏指数 = 脾重 / 体重 (mg/g)

胸腺指数 = 胸腺重 / 体重 (mg/g)

2.2 S₁₈₀腹水瘤的接种

取昆明种小鼠 50 只,按移植性肿瘤研究法^[8]接

种 S₁₈₀腹水型。在无菌操作下取瘤块,称重,用玻璃组织匀浆器研磨,磨匀后放入无菌容器内,加生理盐水稀释成 1:3 的细胞悬液,容器置冰块上,用空针抽吸,每次抽吸前将细胞混匀,每只小鼠腹腔接种 0.2 mL。实验分组、给药方式及剂量同 2.1,连续给药 5 d 后取少量腹水涂片,改良苯酚 - 品红染色,二甲苯透明后树胶封片,每只鼠显微镜下随机计数 1 000 个细胞中处于分裂中期的细胞数,计算有丝分裂指数。小鼠继续给药 5 d 后停止给药,以接种肿瘤之日算起,记录死亡时间,计算生命延长率。

生命延长率(%) = [实验组小鼠生存时间 - 对照组小鼠生存时间] / 对照组小鼠生存时间 × 100%

2.3 统计方法

利用 SPSS 12.0 软件进行统计学处理(t-test 检验),分析组间差异,实验结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

3 结果

3.1 桑黄胞外多糖对 S₁₈₀移植性实体瘤的抑制作用

与生理盐水对照组相比,桑黄胞外多糖 3 个剂量组均有显著抑制 S₁₈₀的肿瘤生长作用,且呈剂量效应关系,高剂量下能显著抑制肿瘤细胞的生长。桑黄胞外多糖在发挥抗肿瘤作用的同时对小鼠的体重增加没有明显的抑制作用。环磷酰胺虽然抑瘤效果最好,但是其对小鼠体重的增长有明显的抑制作用。结果见表 1。

3.2 桑黄胞外多糖对荷瘤鼠免疫器官的影响

化疗药物环磷酰胺的抑瘤率虽然最高,但对小鼠的胸腺和脾脏等免疫器官抑制作用较大,胸腺指数和脾脏指数均低于空白对照组(P < 0.05),提示环磷酰胺在抗肿瘤的同时对机体的免疫能力有抑制,桑黄胞外多糖药物在发挥抗肿瘤作用的同时,小鼠机体的胸腺指数和脾脏指数均有不同程度的提高,即小鼠的免疫力同时得到了提高。结果见表 2。

3.3 桑黄胞外多糖对 S₁₈₀腹水瘤的抑制作用

中、高剂量的桑黄胞外多糖明显降低 S₁₈₀腹水瘤细胞的分裂指数,延长生存时间,平均延长约 3.37 d,生命延长率最高达 26.84%。结果见表 3。

表 1 桑黄胞外多糖对 S₁₈₀移植性实体瘤的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	剂量 / (mg/kg)	小鼠体重 / g		瘤重 / g	抑瘤率 / %
		给药前	给药后		
空白对照组		19.89 ± 1.21	27.18 ± 2.05	1.60 ± 0.58	0.00
环磷酰胺组	20	20.02 ± 1.28	22.75 ± 1.38**	0.59 ± 0.41**	63.13
桑黄胞外多糖小剂量组	100	19.79 ± 1.31	26.95 ± 1.83	1.10 ± 0.33*	31.25
桑黄胞外多糖中剂量组	200	19.68 ± 1.32	27.29 ± 1.96	1.01 ± 0.60**	36.86
桑黄胞外多糖大剂量组	400	19.91 ± 1.39	27.35 ± 2.01	0.89 ± 0.21**	44.38

注:与空白对照组比较 * P < 0.05 ** P < 0.01

表 2 桑黄胞外多糖对荷瘤鼠免疫器官的影响 (mg/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 / (mg/kg)	胸腺指数	脾脏指数
空白对照组	10		2.71 ± 0.66	5.95 ± 1.10
环磷酰胺组	10	20	1.48 ± 0.31*	3.58 ± 0.77*
桑黄胞外多糖小剂量组	10	100	3.97 ± 0.73**	9.15 ± 0.75**
桑黄胞外多糖中剂量组	10	200	4.06 ± 0.91**	8.35 ± 0.51*
桑黄胞外多糖大剂量组	10	400	3.90 ± 0.55*	9.09 ± 0.61**

注:与空白对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

表 3 桑黄胞外多糖对 S_{180} 腹水瘤和小鼠存活期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 / (mg/kg)	有丝分裂指数 / %	生存时间 / d	生命延长率 / %
空白对照组	10		13.69 ± 3.27	17.10 ± 1.95	
环磷酰胺组	10	20	7.98 ± 2.93**	23.51 ± 1.48**	37.49
桑黄胞外多糖小剂量组	10	100	13.55 ± 3.85	18.60 ± 2.17	8.77
桑黄胞外多糖中剂量组	10	200	11.79 ± 3.56*	21.13 ± 2.95**	23.57
桑黄胞外多糖大剂量组	10	400	9.89 ± 1.93**	21.69 ± 1.39**	26.84

注:与空白对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

3 讨论

桑黄的来源主要是野生采集,但是,受生理生态的特殊性和复杂性以及外部环境条件的制约,造成在自然界中形成子实体稀少,特别是形成可用品子实体需要多年,资源匮乏,桑黄的开发利用受到了限制。王氏等^[9-11]对桑黄的人工栽培技术进行了研究,但是子实体的生产周期较长,一般为 3~4 年,难以满足市场的需求。而利用液体深层发酵技术生产的菌丝体和培养液(发酵液)中同样含有抗肿瘤活性成分^[11]。因此,通过液体发酵生产菌丝体获取其活性成分将成为一种有效手段。杨氏^[7,12]对桑黄的液体发酵及多糖的提取工艺进行了系统的研究,为桑黄的进一步开发利用奠定了基础。

本实验对桑黄胞外多糖抗 S_{180} 肿瘤活性做了研究,结果表明桑黄胞外多糖具有和子实体多糖^[6]、菌丝体多糖^[13]相同的药理活性,桑黄胞外多糖对 S_{180} 实体瘤有较强的抑制作用,抑制率高达 44.38%,并能够显著增加小鼠机体的胸腺指数和脾脏指数。在较高的剂量下,桑黄胞外多糖对荷瘤鼠的生命延长率比环磷酰胺对小鼠的生命延长率虽然略低,但是比空白对照组延长小鼠的生存期长 4.59 d,生命延长率达 26.84%。

本实验研究了桑黄胞外多糖对移植性肿瘤 S_{180} 的抗肿瘤作用,进一步的工作应研究桑黄胞外多糖对其他瘤株如肝癌腹水型(HepA)、白血病腹水型(P388)等移植肿瘤的药理活性,同时对桑黄多糖的抗肿瘤机理进行研究,为开展桑黄多糖的临床应用提供实验依据。

参考文献:

[1] 卯晓岚. 中国经济真菌 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 535

- [2] 莫顺燕, 杨永春, 石建功, 等. 桑黄化学成分研究 [J]. 中草药, 2004, 35(10): 1095 - 1097.
- [3] 陈体强, 吴锦忠, 纪建英, 等. 桑黄栽培子实体成分分析及其显微形态观察 [J]. 菌物研究, 2005, 3(1): 30 - 34.
- [4] 张万国, 胡晋红, 蔡 溱, 等. 桑黄抗大鼠肝纤维化与抗脂质过氧化 [J]. 中成药, 2002, 24(4): 281 - 283.
- [5] 温 克, 陈 劲, 李 红, 等. 桑黄等四种抗癌药物抗癌活性比较 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2002, 2(3): 247 - 249.
- [6] 车会莲, 孟繁岳, 杜 杰, 等. 桑黄提取物对肿瘤生长和细胞免疫功能的影响 [J]. 中国公共卫生, 2005, 21(1): 79 - 81.
- [7] 杨 全, 严寒静, 李艳辉, 等. 药用真菌桑黄液体发酵工艺的研究 [J]. 广东药学院学报, 2004, 20(3): 5 - 7.
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1758.
- [9] 王秋颖, 陈邦国, 秦绍新. 桑黄菌人工栽培技术研究 [J]. 食用菌, 2005(5): 32 - 33.
- [10] 刘 利, 刘 冰, 刘明才, 等. 长白山野生桑黄菌人工栽培初探 [J]. 食用菌, 2005(3): 32.
- [11] 杨 全. 桑黄的液体发酵及其粗多糖抗肿瘤作用的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2002.
- [12] 杨 全, 严寒静, 李艳辉, 等. 药用真菌桑黄菌丝体多糖提取工艺的研究 [J]. 广东药学院学报, 2005, 21(6): 697.
- [13] 杨 全, 胡旭光, 王 琦, 等. 药用真菌桑黄菌丝体多糖抗肿瘤作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(20): 1713 - 1715.

(收稿日期: 2006-04-04)