

文章编号:1001-6880(2014)7-1108-05

香菇多糖对大鼠胶质瘤生长的影响及体外细胞抑制实验

郑玉霞¹,石军飞^{2*},李永宏³,郑志刚³,田景民⁴,庞丽纹¹,涂红⁴¹内蒙古化工职业学院,呼和浩特,010070; ²内蒙古医科大学第二附属医院,呼和浩特,010030;³内蒙古宇航人高技术产业有限责任公司,呼和浩特,010010; ⁴内蒙古医科大学,呼和浩特,010030

摘要:为评价香菇多糖对大鼠体内胶质瘤生长的影响以及对体外胶质瘤细胞的抑制作用,本研究将大鼠建模成功后,给予生理盐水和不同剂量香菇多糖,30 d后,采用免疫组化方法观测瘤组织变化。并将胶质瘤细胞在香菇多糖处理24、48、72 h后,检测细胞活性,流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期。发现荷瘤大鼠在治疗30 d后,香菇多糖低、中、高剂量治疗组肿瘤的体积呈逐渐缩小趋势,与对照组相比较,香菇多糖治疗组肿瘤组织局部出现坏死灶,细胞核染色逐渐变浅,新生血管数减少。体外实验中,香菇多糖40、80 mg/L剂量组在给药72 h后,细胞凋亡率和坏死率均明显高于对照组($P < 0.01$)。香菇多糖20、40、80 mg/L作用72 h后,G0/G1期细胞与对照组相比明显增加($P < 0.05$)。说明香菇多糖能显著抑制大鼠胶质瘤的生长,并能在体外诱导胶质瘤细胞的凋亡。

关键词:香菇多糖;胶质瘤;细胞凋亡;药物作用

中图分类号:R961.1

文献标识码:A

Inhibitory Effect of Lentinan on Glioma Growth *in Vivo* and *in Vitro*

ZHENG Yu-xia¹, SHI Jun-fei^{2*}, LI Yong-hong³, ZHENG Zhi-gang³, TIAN Jing-min⁴, PANG Li-wen¹, TU Hong⁴¹Inner Mongolia Vocational College of Chemical Engineering, Huhhot 010070, China; ²The Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010030, China; ³Inner Mongolia Yuhangren High Technology Limited Company, Huhhot 010010, China; ⁴Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010030, China

Abstract: The objective of this study was to investigate the impact of lentinan on the growth of glioma in rats and inhibition of glioma cell *in vitro*. For the animal experiment, normal saline and different doses of lentinan were gavaged to the model rats for 30d. The changes of tumor tissue were then observed by immunohistochemical methods. For the *in vitro* experiment, the glioma cells were treated by lentinan for 24, 48 and 72h. The activity, apoptosis and cycle of glioma cell were then detected by flow cytometry. The experimental results showed that the tumors volume dwindled in sample group compared with the control group; Coloration of nucleus was lighter in the sample group; Number of new blood vessels was reduced. For the *in vitro* experiment, the apoptosis rate of glioma cells of the 40 mg/L and 80 mg/L lentinan groups were significantly higher than that of control group ($P < 0.01$) after 72 h of treatment; The number of G0/G1 phase cells of the 20, 40, 80 mg/L lentinan groups, were increased significantly ($P < 0.05$) compared with that of the control group after 72 h of treatment. These results showed that the lentinan can inhibit the growth of glioma in rats, and cause the apoptosis of glioma cells *in vitro*.

Key words: lentinan; glioma; apoptosis; drug effects

神经胶质瘤简称胶质瘤,是起源于脑部神经胶质细胞,约占所有颅内肿瘤的45%左右。大多缓慢发病,自出现症状至就诊时间一般为数周至数月,少数可达数年^[1]。其主要症状表现为颅内压增高,进而引发头痛、视力减退、癫痫发作等,甚至出现精神症状。由于脑组织受肿瘤的压迫,早期可表现为刺

激症状如局限性癫痫,后期表现为神经功能缺失症状如瘫痪^[2]。胶质瘤治疗十分困难,目前主要的治疗手段还是手术切除和放化疗,预后存活时间相对较短。

香菇多糖(Lentinan)是从香菇子实体中提取的有效活性成分,其主要活性成分为 β - (1-3)-D-葡聚糖,研究表明香菇的活性多糖成分主要为 β - (1-3)-D-葡聚糖。香菇多糖具有抗肿瘤作用,其进入人体后诱导T细胞产生一种具有免疫活性的细胞因子,

使机体免疫系统增强,对肿瘤细胞起防御与杀伤作用^[3]。香菇多糖常作为一种免疫辅助药物用于临床,主要是抑制肿瘤的发生与转移,提高肿瘤对化疗药物的敏感性,提高患者机体免疫力,在治疗肝癌、乳腺癌、淋巴细胞性白血病等方面具有良好疗效^[4]。

为了进一步明确香菇多糖在抗肿瘤方面的作用及其机制,本研究通过建立实验动物模型,探讨香菇多糖对大鼠神经胶质瘤细胞生长的抑制作用,了解其抗肿瘤作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 雄性大鼠 65 只,体质量为 250~270 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号 SCXK(沪)2013-0008。

大鼠胶质瘤 C6 细胞株购自上海博研生物科技有限公司。香菇多糖购自南京易亨制药有限公司,批号 20121022, Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒、PI 细胞周期检测试剂盒购美国 Fermentas 公司。

细胞培养箱购自上海立德泰勃科学仪器有限公司,全自动酶标仪购自美国 thermo 公司,流式细胞仪购自德国 Heraeus 公司。

1.2 动物模型建立及分组

将脑胶质瘤 C6 细胞株培养复苏,取其中 5 只大鼠用于脑胶质瘤第一代扩增,分别接种于 5 只大鼠的腹股沟处,约 14 d 成瘤后,脱椎法处死大鼠,开腹并取瘤,瘤块用手术钳剪成 3 mm³ 大小体积碎块,用生理盐水制备成组织悬浊液,接种备用。

另外 40 只实验大鼠以 5% 水合氯醛(200 mg/kg)腹腔注射,麻醉后将大鼠固定于脑立体定位仪上,剃去前囟附近的毛发,常规消毒,右矢状缝旁开 3~5 mm 处打孔,孔径约 2 mm,每鼠缓慢注入约 100 μL 瘤组织混悬液,注射后骨蜡封闭骨孔,消毒并缝合皮肤^[5]。

剩余 60 只大鼠用随机分为香菇多糖低剂量组(给药剂量为 20 mg/kg/d),香菇多糖中剂量剂量组(给药剂量为 40 mg/kg/d),香菇多糖高剂量组(给药剂量为 80 mg/kg/d),每组 15 只。药物组隔日给药一次,连续给药 30 d,对照组给予同等剂量生理盐水。

1.3 肿瘤体积测定

分别于种植胶质瘤细胞后第 30 d 开颅取瘤,测

量肿瘤体积,计算抑瘤率。

1.4 免疫组化检测肿瘤组织

治疗后第 30 d,处死大鼠,取出肿瘤组织,经常规处理后制成 5 μm 厚石蜡切片,免疫组织化学染色法参照试剂盒说明书进行,组织切片脱蜡、水化后,置入 3% H₂O₂ 中室温 30 min,消除内源性过氧化物酶,0.02 mol/L 柠檬酸盐缓冲液中微波法抗原修复。正常山羊血清室温封闭 1 h。切片滴加一抗,湿盒中 4 ℃ 孵育过夜,滴加即用型二抗于室温 1 h。DAB 显色,显微镜下控制染色强度,苏木精复染、封片。

1.5 细胞活性检测

用 DMEM 培养基培养细胞,每 3 d 更换一次培养液。待细胞铺满培养瓶底部时,用 0.25% 胰酶消化,收集细胞,以 1 × 10⁵/L 的密度接种单细胞悬液于 96 孔培养板,每孔 50 μL,每份样品设四个复孔,预培养 12 h 后加入香菇多糖,使药物终浓度为 20、40、80 mg/L,继续培养 24、48 或 72 h 后,每孔加入 1 g/L MTT 溶液 30 μL,孵育 12 h,吸净孔内液体,每孔加入 DMSO 100 μL,震荡 20 min,使结晶物充分溶解,用酶标仪于 490 nm 处测各孔吸光度 A 值。给药 72 h 后,在加入 MTT 前,于光学倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.6 细胞凋亡

将培养的胶质瘤细胞用 PBS 洗涤三次,每次 5 min,弃去 PBS 液。用胰酶消化细胞,再加入细胞培养液,反复吹打细胞悬液,待细胞完全悬浮后,1000 rpm 离心 10 min。弃上清,收集细胞。用 PBS 轻轻重悬细胞,取 5~10 万重悬的细胞,1000 rpm 离心 10 min,弃上清,加入 5 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。室温避光孵育 30 min。1000 rpm 离心 10 min,弃上清,加入 190 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞,加入 10 μL 碘化丙啶(PI)染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置。随即进行流式细胞仪检测凋亡细胞。

1.7 细胞周期检测

接种肿瘤细胞于 24 孔板,每孔细胞 2 × 10⁴,预培养 1 d 后加入香菇多糖,使药物终浓度为 20、40、80 mg/L,继续培养 72 h,收集细胞。以预冷 PBS 缓冲液洗涤细胞,3000 rpm 离心 10 min,弃去洗涤液。每管加入 2 mL 预冷的固定液,震荡细胞,4 ℃ 孵育 30 min。3000 rpm 离心 10 min,弃去固定液,以 PBS 溶液洗涤细胞 3 次,流式细胞仪分析细胞周期。

1.8 统计方法

各组数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS 15.0软件进行统计学处理。以单因素方差分析(one-way ANOVA)检验差异显著性。 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 各治疗组肿瘤体积测定结果

在各组大鼠种植胶质瘤细胞后第30 d测量瘤体体积,结果发现,对照组肿瘤组织呈增大趋势,香菇多糖低、中、高剂量组肿瘤的体积呈逐渐缩小趋势,其抑瘤率分别为($32.85 \pm 5.12\%$)、($40.26 \pm 4.81\%$)、($57.13 \pm 6.16\%$),与对照组比较,具有显著性差异($P < 0.05$),说明香菇多糖组对胶质瘤有明显的抑制作用。

2.2 免疫组化检测肿瘤组织变化

免疫组织化学染色检测可见:香菇多糖治疗组肿瘤组织局部出现坏死灶,细胞核变小,染色变浅,异形性减低。在对照组中,肿瘤细胞生长旺盛,细胞核大。染色深,异形性明显,见图1。

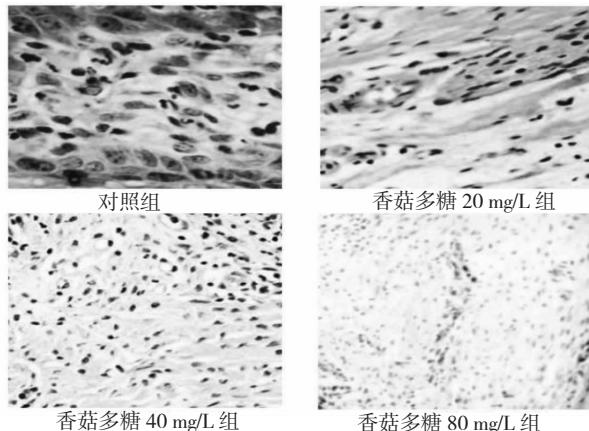


图1 免疫组化检测肿瘤组织变化

Fig. 1 Detected the changes in tumor tissue by Immunohistochemical method

2.3 香菇多糖对胶质瘤细胞形态和活性的影响

香菇多糖20、40、80 mg/L给药72 h后,肿瘤细胞数量明显减少,部分细胞皱缩变形(图2)。香菇多糖20、40、80 mg/L给药24、48、72 h后,胶质瘤细胞活性呈下降趋势($P < 0.05$),随着给药浓度的增大,肿瘤细胞活性的下降幅度也随之增大(图3)。

2.4 香菇多糖诱导胶质瘤细胞凋亡的作用

香菇多糖20 mg/L给药72 h后,胶质瘤细胞凋

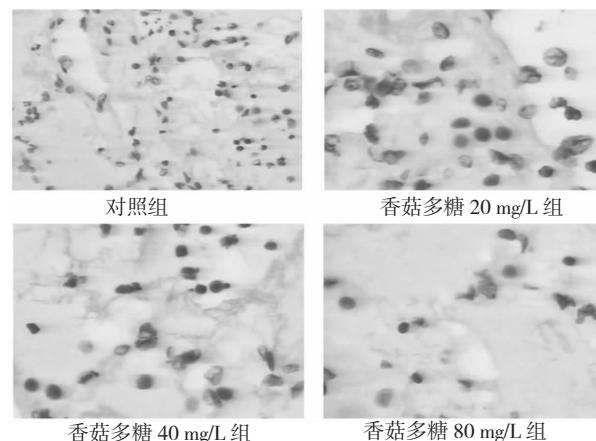


图2 香菇多糖对胶质瘤细胞形态的影响

Fig. 2 Impact of Lentinan to the modality of glioma cell

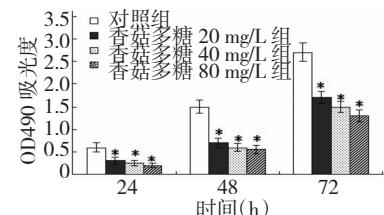


图3 对胶质瘤细胞活性的影响

Fig. 3 Impact of Lentinan to the activity of glioma cell

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。compared with the control group, * $P < 0.05$.

亡程度不明显。而香菇多糖40、80 mg/L剂量组在给药72 h后,细胞凋亡率均明显高于对照组($P < 0.05$),见图4。

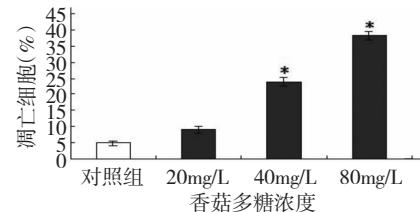


图4 香菇多糖诱导胶质瘤细胞凋亡的作用

Fig. 4 Lentinan can cause the apoptosis of Glioma cell

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。compared with the control group, * $P < 0.05$.

2.5 香菇多糖对胶质瘤细胞周期的影响

香菇多糖20、40、80 mg/L作用72 h后,G0/G1期细胞与对照组相比明显增加($P < 0.05$),而S期细胞与对照组相比,则呈减少趋势($P < 0.05$),G2/M期细胞随比对照组有所下降,但无显著性差异($P > 0.05$),见图5。

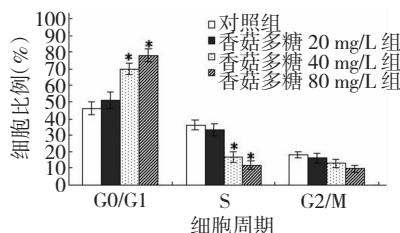


图 5 香菇多糖对胶质瘤细胞周期的影响

Fig. 5 Impact of Lentinan to the cycle of glioma cell

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, compared with the control group,
* $P < 0.05$.

3 讨论

脑胶质瘤是发生于神经外胚层的肿瘤,神经外胚层发生的肿瘤有两类,一类由间质细胞形成,称为胶质瘤;另一类由实质细胞形成,称神经元肿瘤。脑胶质瘤大多发病缓慢,自出现症状至就诊时间一般为数周至数月,少数可达 1 年以上。脑胶质瘤的治疗由于肿瘤呈浸润性生长,与脑组织无明确分界,难以彻底切除,手术治疗的原则是在保存神经功能的前提下尽可能切除肿瘤,而胶质瘤多位于运动、言语中枢,稍有不慎,即可造成患者显偏瘫、失语等严重后遗症^[6]。所以目前寻找有效的药物治疗手段是众多学者的目标。

香菇(*Lentinus edodes* (Berk.) sing.)含有的多种人体必需的氨基酸,还含有多种维生素和矿物盐等。香菇中的碳水化合物中以半纤维素居多,主要成分是甘露醇、海藻糖、葡萄糖、戊聚糖、甲基戊聚糖等。香菇多糖为多聚糖肽类物质,多肽部分有包括十多种氨基酸,且肽键全部是 β -键结构,易被人吸收利用^[7]。香菇多糖是一种生物反应调节剂,它通过增强机体的抗肿瘤免疫防御反应或改变机体对肿瘤细胞的生物学效应而产生机体或细胞介导的抗肿瘤效果,发挥间接的抗肿瘤作用。香菇多糖可用于因机体免疫力低下而引起的各种疾病、慢性病毒性肝炎,也可作为肿瘤化疗的辅助药物^[8]。常规的抗肿瘤治疗手段在治疗肿瘤期间,往往有明显副作用,影响治疗的正常进行。香菇多糖在发挥抗癌的同时几乎无毒副作用,是极为理想的抗肿瘤药物,可显著改善晚期癌症患者的生活质量。

细胞周期分为 G0(静止期)、G1、S、G2 和 M 四阶段。G1 期细胞的主要活动是为 DNA 的复制和蛋白质的合成作准备。S 期主要是 DNA 复制、遗传物

质从二倍体到四倍体的整个过程。G2 期指 DNA 复制完成到有丝分裂开始这段时间。M 期即为有丝分裂期,细胞在 M 期进行分裂,M 期结束时就形成两个新的子细胞,一次细胞周期即告结束,细胞或进入下一个细胞周期的 G1 期,或进入静止期 G0 期^[9]。本实验结果表明,香菇多糖 20、40、80 mg/L 对体外培养的大鼠胶质瘤细胞的生长有显著的抑制作用。香菇多糖 40、80 mg/L 能诱导细胞凋亡,阻滞细胞周期,使 G0/G1 期细胞比例明显增加,S 期细胞比例明显降低。有文献报道,香菇多糖有诱导肿瘤细胞周期 G0/G1 期阻滞的作用、并诱导细胞凋亡,其诱导凋亡的剂量也与本实验结果基本一致^[10]。但是,也有文献报道,香菇多糖诱导人肝癌细胞凋亡的剂量较高,在 80 mg/L 作用 120 h 时才出现细胞核形态变化^[11]。

在本研究结果中,免疫组织化学染色显示荷瘤大鼠在给予不同剂量香菇多糖后,肿瘤组织局部开始出现坏死灶,细胞皱缩,新生血管数减少,局部血流明显减少,细胞核染色变浅。说明香菇多糖有效地抑制了大鼠胶质瘤细胞的生长,并对胶质瘤细胞有一定的杀伤作用。可能是通过激活、调整机体的免疫系统,增强 T 淋巴细胞、巨噬细胞活性,进而达到增强机体抗肿瘤及抗细菌侵袭的能力。

本研究表明香菇多糖对神经胶质瘤细胞生长具有显著抑制作用,该作用与诱导细胞凋亡和阻滞细胞周期有关。香菇在我国种植较为广泛,药源充足,其有效成分香菇多糖的提取工艺也相对较为成熟,这将为今后开发利用香菇多糖制剂提供良好的物质基础,随着临床工作者对其的逐步认识,香菇多糖药用价值将十分广阔,但有关其具体的用药剂量和作用机理,还需要进行深入研究。

参考文献

- Blesa JM, Molla SB. Durable complete remission of a brain-stem glioma treated with a combination of bevacizumab and cetuximab. *Case Rep Oncol*, 2012, 5:676-681.
- Aguilar HN, Hung RW. Imaging characteristics of an unusual, high-grade angiogenic glioma: A case report and review of the literature. *J Radiol Case Rep*, 2012, 6(10):1-10.
- Harada K, Itashiki Y. Effects of lentinan alone and in combination with fluoropyrimidine anticancer agent on growth of human oral squamous cell carcinoma in vitro and *in vivo*. *Int J Oncol*, 2010, 37:623-631.

(下转第 1116 页)