

橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 体外免疫调节活性、细胞毒性和抗肿瘤活性的研究

朱 森¹, 侯怡铃¹, 唐 贤¹, 宋志强¹, 丁 祥^{2*}

¹西华师范大学生命科学学院; ²西华师范大学环境科学与工程学院, 南充 637009

摘要:为研究橙盖鹅膏多糖的体外免疫调节活性、细胞毒性和抗肿瘤活性,本研究运用细胞学技术探究 AC-1 对 T 细胞、B 细胞和 RAW264.7 三种免疫细胞的体外免疫调节活性;研究 AC-1 对小鼠成纤维细胞(L929)的细胞毒性以及对小鼠胃癌细胞(MFC)、小鼠肉瘤细胞(S₁₈₀)的体外抗肿瘤活性。结果表明,AC-1 能在体外显著刺激三种免疫细胞的增殖及 RAW264.7 细胞的吞噬,表明 AC-1 在增强机体免疫方面具有重要作用,进一步研究发现 AC-1 主要通过显著促进 Ig E 和 Ig G 的分泌来增强体液免疫。在浓度为 5~20 μg/mL 时 AC-1 对 L929 细胞无显著的促进及抑制作用,说明 AC-1 对正常细胞无毒性;在浓度为 10~20 μg/mL 时 AC-1 能显著抑制小鼠胃癌细胞(MFC)的生长,但对小鼠肉瘤细胞(S₁₈₀)的抑制效果较弱,说明 AC-1 在体外能够直接抑制肿瘤细胞的生长,但对不同的肿瘤细胞具有不同的抑制效果。综上所述,橙盖鹅膏多糖(AC-1)在体外具有良好的免疫调节活性、抗肿瘤活性,但对不同的肿瘤细胞具有不同的抑制效果并且对正常细胞无毒性。

关键词:橙盖鹅膏;多糖;免疫调节活性;细胞毒性;抗肿瘤活性

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)9-1481-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.9.001

The study of immunomodulatory activities, cytotoxicity and anti-tumor activities of polysaccharide from *Amanita caesarea* (AC-1) *in vitro*

ZHU Miao¹, HOU Yi-ling¹, TANG Xian¹, SONG Zhi-qiang¹, DING Xiang^{2*}

¹College of Life Sciences, China West Normal University;

²College of Environmental Science and Engineering, China West Normal University, Nanchong 637009, China

Abstract: The purpose of this study is to investigate the immunomodulatory activities, cytotoxicity and anti-tumor activities of polysaccharide from *Amanita caesarea* (AC-1) *in vitro*. In this study, we used cytological techniques to explore the immunomodulatory activities of AC-1 on T cells, B cells and RAW264.7 cells *in vitro*, the cytotoxicity of AC-1 on mouse fibroblasts (L929) and the antineoplastic activities of AC-1 on mouse gastric cancer cells (MFC) and mouse sarcoma cells (S₁₈₀) *in vitro*. The results showed that AC-1 could significantly stimulate the proliferation of three kinds of immune cells *in vitro*, and could enhance the phagocytosis activities of RAW264.7 cells, which indicated that AC-1 played an important role in enhancing immunities of the body. Further studies found that AC-1 mainly enhanced humoral immunity by promoting the secretion of Ig E and Ig G. When the concentration of AC-1 was 5-20 μg/mL, it had no obvious promotion or inhibition on L929 cells, suggesting that AC-1 was non-toxic to normal cells. AC-1 could significantly inhibit the growth of mouse gastric cancer cells (MFC) at the concentration of 10-20 μg/mL, but had a weak inhibitory effect on mouse sarcoma cells (S₁₈₀). This indicated that AC-1 could directly inhibit the growth of tumor cells *in vitro*, but had different inhibitory effects on different tumor cells. In conclusion, *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1) has good immunomodulatory activities, non-toxic to normal cells and good anti-tumor activities *in vitro*, however, it has different inhibitory effects on different cancer cells.

Key words: *Amanita caesarea*; polysaccharide; immunomodulatory activities; cytotoxicity; antitumor activities

收稿日期:2019-05-06 接受日期:2019-08-21

基金项目:四川省科技厅应用基础重点项目(2018JY0087);四川省科技厅重点研发项目(2018NZ0055);四川省教育厅重大培育项目(16CZ0018);南充市科技局项目(16YFZJ0043)

* 通信作者 Tel:86-18780759981; E-mail:biostart8083@126.com

真菌多糖为天然的高分子化合物,对细胞的分裂分化及生长衰老具有重要作用^[1],因其所具有的生物活性及药理价值而成为当今研究的热点^[2]。

鹅膏菌属 (*Amanita*) 是大型真菌中一个种类繁多、分布广泛的种属,其多糖备受关注并已有广泛的研究。Ruthes 等^[3]发现,毒蝇鹅膏多糖具有抗炎镇痛的作用;Karaman 等^[4]研究发现,松果鹅膏多糖具有镇痛作用,并能较好地清除 OH^- ;Tang 等^[5]发现,黄盖鹅膏多糖和豹斑毒鹅膏多糖能够抑制人胃癌细胞 (MGC) 的生长;祝雪娇等^[6]发现,红黄鹅膏多糖具有抗肿瘤活性,能够抑制小鼠黑色素瘤细胞 (B16) 的生长。以上研究均是对鹅膏菌属中所含粗多糖的报道,但对其所含多糖的精细结构并未表征,因此相关活性及其分子机制研究存在一定的不确定性。

橙盖鹅膏 (*Amanita caesarea*) 是鹅膏菌属 (*Amanita*) 的一种食用真菌,菌盖为橙色,也被称为“鸡蛋菌”。在我们前期的研究中,从采摘于四川的橙盖鹅膏子实体中提取了一种结构新颖的多糖 (AC-1) (图 1),重均分子量 M_w 为 19 329 Da。其精细结构特征是以 α -(1 \rightarrow 4)-D-葡萄糖和 α -(1 \rightarrow 3)-D-葡萄糖为骨架, α -(1 \rightarrow 3)-D-葡萄糖 6-C 上连接一个 \rightarrow 1)- α -D-来苏糖的侧链, α -D-葡萄糖和 α -D-来苏糖的比例为 2:1^[7]。然而,关于该橙盖鹅膏多糖的免疫调节和抗肿瘤活性的研究目前未见报道。本实验以橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 为研究对象,探究其对三种免疫细胞 (T 细胞、B 细胞和 RAW264.7)、小鼠成纤维细胞 (L929)、小鼠胃癌细胞 (MFC) 和小鼠肉瘤细胞 (S_{180}) 的影响。希望通过研究能够进一步明确橙盖鹅膏多糖的体外免疫调节、细胞毒性和抗肿瘤活性,为开发利用橙盖鹅膏多糖资源提供一定的参考依据。

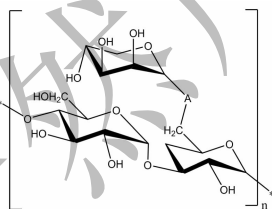


图 1 橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 的结构

Fig. 1 The structure of *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1)

1 材料与方法

1.1 实验材料

橙盖鹅膏菌 (*Amanita caesarea*) 采自于四川省甘孜州,橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 参考文献^[7]的方法制备。T 细胞、B 细胞、小鼠腹腔巨噬细胞 (RAW264.7)、小鼠成纤维细胞 (L929)、小鼠胃癌细胞 (MFC) 和小

鼠肉瘤细胞 (S_{180}) 由中科院上海生命科学研究院生化与细胞所提供。

1.2 主要试剂和实验仪器

PRMI 1640 培养基、双抗、胰蛋白酶 (Gibco)、脂多糖 (LPS) 购于 Sigma 公司; Cell Counting Kit-8 (CCK-8 试剂) 购于美国 ZETA LIFE 公司;中性红试剂购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司;甘露聚糖肽 (Mannatide) 购于成都利尔药业有限公司;ELISA 检测试剂盒购于 R&D 公司;无水乙醇购于河南天冠集团,乙酸购于江苏索普公司;3111 型 CO_2 细胞培养箱 (Thermo scientific);Multiskan Go 型酶标仪 (Thermo scientific)。

1.3 实验方法

1.3.1 橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 对三种免疫细胞 (T 细胞、B 细胞和巨噬细胞 RAW264.7) 增殖的影响

将细胞用培养液稀释至 $1 \times 10^5/\text{mL}$,然后以每孔 100 μL 加入 96 孔板。实验设置空白对照组,AC-1 药物组 (设置 1.25、2.5、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 共 4 个终浓度梯度),LPS 阳性对照组 (终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每个浓度 6 个重复。参照文献^[8]的方法检测 AC-1 对三种免疫细胞的增殖效应并记录实验结果。

$$\text{增殖率}(\%) = [\text{OD 值}(\text{实验组}) - \text{OD 值}(\text{空白对照组})] / \text{OD 值}(\text{空白对照组}) \times 100\%$$

注:实验组为 AC-1 药物组和 LPS 阳性对照组。

1.3.2 橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 对 B 细胞分泌抗体的影响

本实验用 ELISA 试剂盒检测 AC-1 刺激 B 细胞分泌的抗体 Ig A、Ig M、Ig G 和 Ig E^[9]。实验设置空白对照组,AC-1 药物组 (2.5、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 LPS 阳性对照组 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),按照试剂盒说明书操作。用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔吸光度值 (OD 值),记录实验结果。

1.3.3 橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 对巨噬细胞 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响

取巨噬细胞 RAW264.7 用培养液稀释至 $5 \times 10^5/\text{mL}$ ^[10],然后以每孔 100 μL 的剂量加入 96 孔板中,37 $^\circ\text{C}$ 、5% 的 CO_2 培养箱中培养 24 h 后,依次加入 100 μL 细胞培养液 (空白对照)、终浓度为 1.25、2.5、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 溶液 (AC-1 药物组)、终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 溶液 (阳性对照组),每组 6 个重复,继续培养 24 h 后,吸出上清,每孔中加入 100 μL 的 0.075% 的中性红试剂,在培养箱中孵育 15 min。15 min 后,用 PBS 洗三次,然

后每孔分别加入 100 μL 细胞裂解液(由无水乙醇和乙酸按 1:1 的体积比配制而成),培养箱中裂解 2 h,利用酶标仪在 540 nm 波长下测 OD 值,并记录实验结果。

1.3.4 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对小鼠成纤维细胞(L929)的细胞毒性实验

实验参照 1.3.1 中 AC-1 对三种免疫细胞增殖影响的方法检测 AC-1 对小鼠成纤维细胞(L929)的细胞毒性实验,AC-1 药物组设置 5、10、15、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 共 4 个终浓度梯度,其余步骤同 1.3.1。

1.3.5 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对小鼠胃癌细胞(MFC)和小鼠肉瘤细胞(S_{180})的体外抑制

将配好的细胞悬液以每孔 100 μL 的剂量加入 96 孔板中培养 24 h 后,依次加入 100 μL 细胞培养液(空白对照)、终浓度为 5、10、15、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AC-1 溶液(AC-1 药物组),终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的甘露聚糖肽(Man)溶液(阳性对照组)后,继续培养 24 h,利用酶标仪在 450 nm 波长下测 OD 值,并记录实验结果。

$$\text{抑制率}(\%) = [\text{OD 值(空白对照组)} - \text{OD 值(实验组)}] / \text{OD 值(空白对照组)} \times 100\%$$

注:实验组为 AC-1 药物组和 Man 阳性对照组。

1.4 统计学分析

实验数据用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行统计学处理,差异分析采取单因素方差分析,与空白对照组相比, $P < 0.05$ 为差异性显著,用“*”表示; $P < 0.01$ 为差异性极显著,用“**”表示。

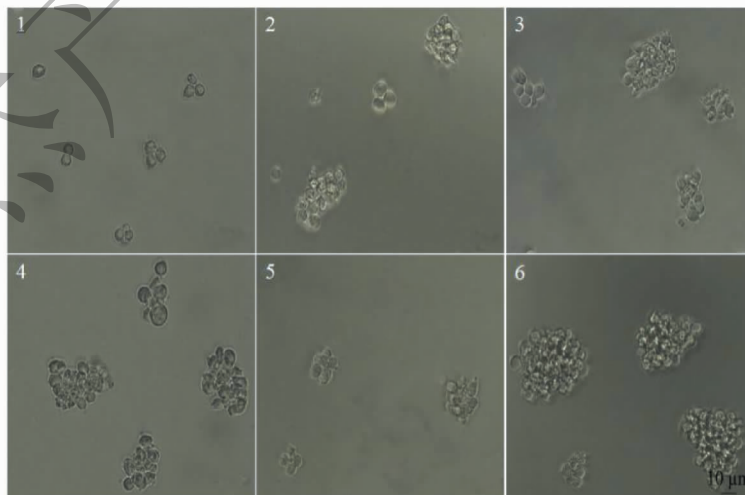


图 3 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对 T 细胞形态的影响

Fig. 3 Effect on T cells morphology by *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1)

注:1 为空白对照组,2~5 为 AC-1 药物组,其终浓度分别为 1.25、2.5、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,6 为 LPS 阳性对照组(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),细胞放大倍数(10 \times 20)。Note: 1 was control group. 2-5 were AC-1 group, the final concentration were 1.25, 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. 6 was LPS positive control group (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cell magnification (10 \times 20)

< 0.01 为差异性极显著,用“**”表示。

2 实验结果

2.1 橙盖鹅膏多糖(AC-1)体外免疫调节活性

2.1.1 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对 T 淋巴细胞增殖的影响

T 细胞是在胸腺分化成熟的一类免疫细胞,它通过辅助激活 B 细胞以及产生细胞因子等方式参与机体免疫。AC-1 对 T 细胞增殖的作用如图 2 所示,AC-1 的终浓度为 1.25 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,均能够促进 T 细胞的增殖($P < 0.01$),且低中等浓度的 AC-1 对 T 细胞增殖效应较好。细胞与药物共培养 24 h 后 T 细胞的生长形态如图 3 所示,正常生长的 T 细胞悬浮生长、成团较小。在浓度为 1.25 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

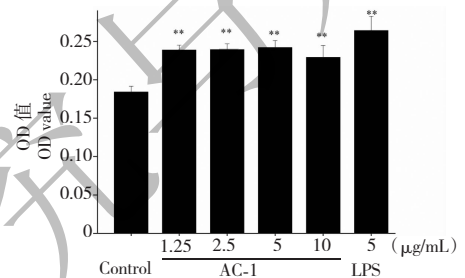


图 2 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对 T 淋巴细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect on the proliferation of T cells by

Amanita caesarea polysaccharide (AC-1)

注:与空白对照组相比, $P < 0.05$ 为差异性显著,用“*”表示; $P < 0.01$ 为差异性极显著,用“**”表示。Note: Compared with control group, $P < 0.05$ was significant difference, expressed by “*”; $P < 0.01$ was extremely significant, expressed by “**”.

时,T 细胞生长状态良好,数量增多,成团变大。以上结果表明,AC-1 可极显著刺激 T 细胞的增殖及成团,在机体的细胞免疫方面具有重要的作用。

2.1.2 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对 B 淋巴细胞增殖的影响

B 细胞是在骨髓中发育和分化的一种淋巴细胞,能够参与机体的体液免疫,对于维持机体的稳态具有重要作用。AC-1 对 B 细胞增殖的影响如图 4 所示,AC-1 的终浓度为 1.25 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均能够促进 B 细胞的增殖,且浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时促进 B 细胞增殖的效应最好。同等浓度下(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),B 细胞在 AC-1 作用下的增殖率(36.98%)高于 LPS 作用下的增殖率(17.30%)。细胞与药物共培养 24 h 后 B 细胞的生长形态如图 5 所示,在 AC-1 浓度为 1.25 ~ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,随着浓度的增加,B 细胞的数量增多,成团变大。以上结果表明,AC-1 可显著刺激

B 细胞的增殖及成团,在机体的体液免疫方面具有重要的作用。

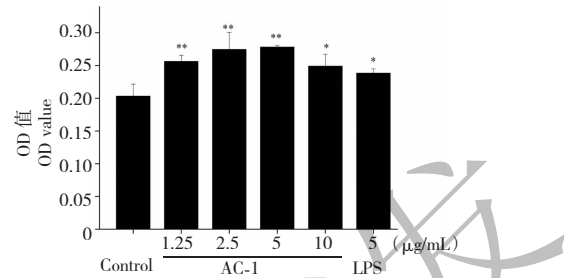


图 4 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对 B 淋巴细胞增殖的影响

Fig. 4 Effect on the proliferation of B cells by *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1)

注:与空白对照组相比, $P < 0.05$ 为差异性显著,用“*”表示; $P < 0.01$ 为差异性极显著,用“**”表示。Note: Compared with control group, $P < 0.05$ was significant difference, expressed by “*”; $P < 0.01$ was extremely significant, expressed by “**”.

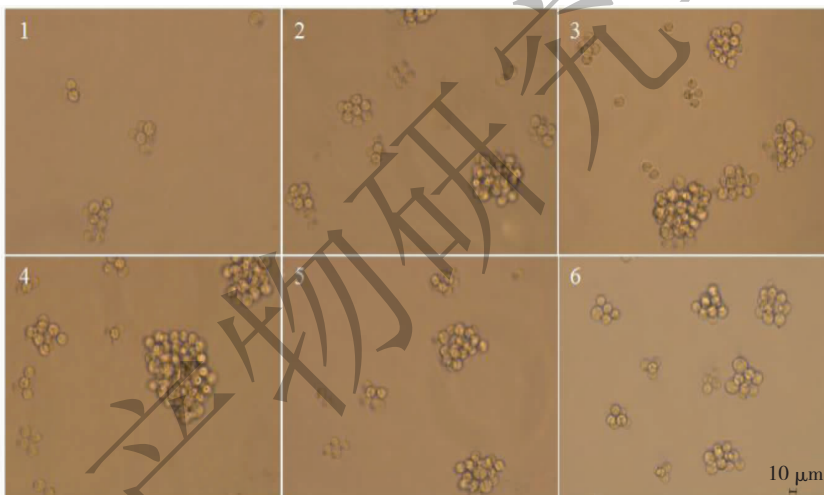


图 5 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对 B 细胞形态的影响

Fig. 5 Effect on B cells morphology by *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1)

注:1 为空白对照组,2~5 为 AC-1 药物组,其终浓度分别为 1.25、2.5、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,6 为 LPS 阳性对照组(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),细胞放大倍数(10 \times 20)。Note: 1 was control group, 2-5 were AC-1 group, the final concentration were 1.25, 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. 6 was LPS positive control group (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cell magnification (10 \times 20).

2.1.3 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对 B 细胞分泌抗体的影响

B 淋巴细胞在抗原的刺激下分化形成浆细胞,浆细胞分泌的抗体能够将入侵的抗原进行清除。借助 ELISA 检测试剂盒,我们对 B 细胞分泌抗体的情况进行了统计,结果如图 6 至图 9 所示,在浓度为 2.5 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,AC-1 能够促进 B 淋巴细胞分泌 Ig A、Ig E、Ig G 和 Ig M 抗体,但促进 Ig A 和 Ig G 抗体分泌的最适浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而促进 Ig E、Ig

M 抗体分泌的最适浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.1.4 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖的影响

巨噬细胞是比较特殊的一类免疫细胞,它既能参与机体的固有免疫,也能参与机体的特异性免疫,在免疫系统中具有重要的作用。AC-1 对 RAW264.7 的效应如图 10 所示,AC-1 的终浓度为 1.25 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,均能够促进 RAW264.7 的增殖,在浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 RAW264.7 的增殖效应

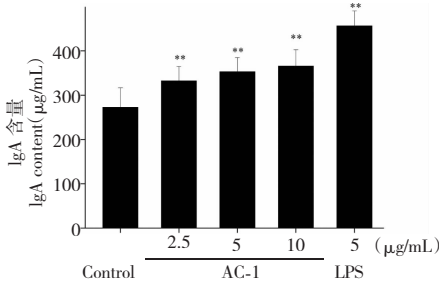


图6 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对B细胞分泌IgA抗体的影响

Fig. 6 Effect of *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1) on secretion of IgA antibody from B cells

注:与空白对照组相比, $P < 0.05$ 为差异性显著,用“*”表示; $P < 0.01$ 为差异性极显著,用“**”表示。Note:Compared with control group, $P < 0.05$ was significant difference,expressed by “*”; $P < 0.01$ was extremely significant,expressed by “**”.

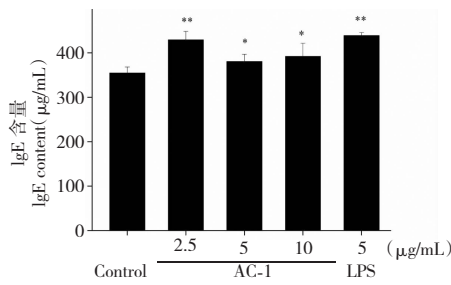


图7 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对B细胞分泌IgE抗体的影响

Fig. 7 Effect of *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1) on secretion of IgE antibody from B cells

注:与空白对照组相比, $P < 0.05$ 为差异性显著,用“*”表示; $P < 0.01$ 为差异性极显著,用“**”表示。Note:Compared with control group, $P < 0.05$ was significant difference,expressed by “*”; $P < 0.01$ was extremely significant,expressed by “**”.

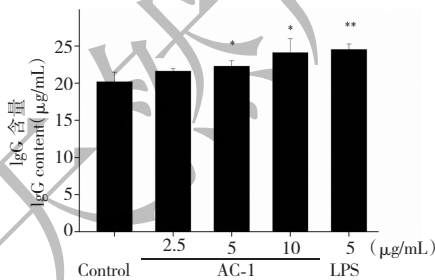


图8 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对B细胞分泌IgG抗体的影响

Fig. 8 Effect of *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1) on secretion of IgG antibody from B cells

注:与空白对照组相比, $P < 0.05$ 为差异性显著,用“*”表示; $P < 0.01$ 为差异性极显著,用“**”表示。Note:Compared with control group, $P < 0.05$ was significant difference,expressed by “*”; $P < 0.01$ was extremely significant,expressed by “**”.

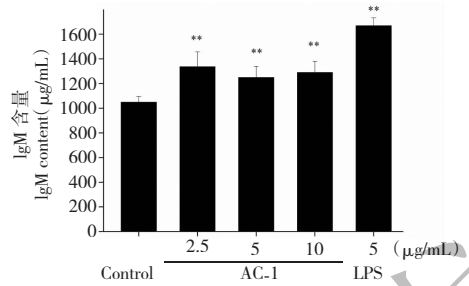


图9 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对B细胞分泌IgM抗体的影响

Fig. 9 Effect of *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1) on secretion of IgM antibody from B cells

注:与空白对照组相比, $P < 0.05$ 为差异性显著,用“*”表示; $P < 0.01$ 为差异性极显著,用“**”表示。Note:Compared with control group, $P < 0.05$ was significant difference,expressed by “*”; $P < 0.01$ was extremely significant,expressed by “**”.

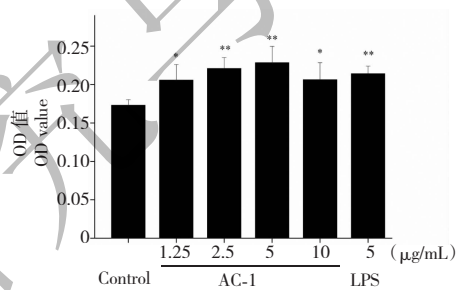


图10 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对RAW264.7细胞增殖的影响

Fig. 10 Effect on the proliferation of RAW264.7 cells by *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1)

注:与空白对照组相比, $P < 0.05$ 为差异性显著,用“*”表示; $P < 0.01$ 为差异性极显著,用“**”表示。Note:Compared with control group, $P < 0.05$ was significant difference,expressed by “*”; $P < 0.01$ was extremely significant,expressed by “**”.

最好。细胞与药物共培养 24 h 后 RAW264.7 的生长形态如图 11 所示,正常状态下的巨噬细胞贴壁生长并呈椭圆形,在浓度为 1.25 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,RAW264.7 伸出伪足的细胞数量明显增多,该结果提示 AC-1 能够活化 RAW264.7 细胞,在机体的固有免疫和特异性免疫方面具有重要的作用。

2.1.5 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7 吞噬能力的影响

AC-1 对 RAW264.7 吞噬中性红能力的影响如图 12 所示,当 AC-1 的终浓度为 1.25 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均能够促进巨噬细胞吞噬中性红 ($P < 0.01$),最适浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,此时吞噬率可达 89.50%。同等浓度下(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),AC-1 刺激下 RAW264.7 的吞

噬率(69.69%)高于 LPS 刺激下的吞噬率(19.34%)。以上结果进一步表明 AC-1 不仅能显著刺激 RAW264.7 增殖,还能显著增强 RAW264.7 的吞噬

功能,在激活机体免疫、维持机体内环境稳态方面具有重要的作用。

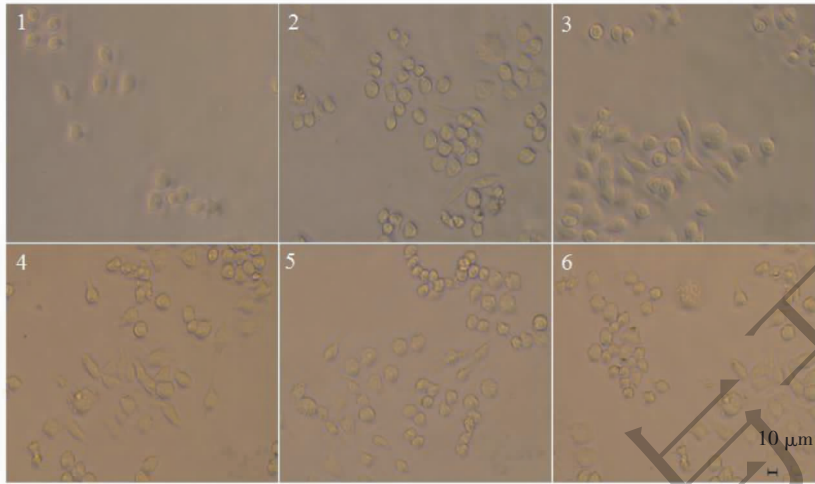


图 11 橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 对 RAW264.7 细胞形态的影响

Fig. 11 Effect on RAW264.7 cells morphology by *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1)

注:1 为空白对照组,2~5 为 AC-1 药物组,其终浓度分别为 1.25、2.5、5、10 $\mu\text{g/mL}$,6 为 LPS 阳性对照组(5 $\mu\text{g/mL}$),细胞放大倍数(10 \times 20)。Note:1 was control group,2-5 were AC-1 group,the final concentration were 1.25,2.5,5,10 $\mu\text{g/mL}$,respectively.6 was LPS positive control group (5 $\mu\text{g/mL}$),cell magnification (10 \times 20).

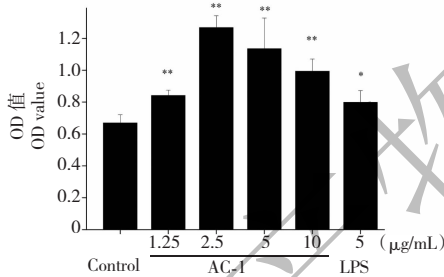


图 12 橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 对巨噬细胞 RAW264.7 吞噬中性红能力的影响

Fig. 12 Effect of *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1) on the ability of macrophages to phagocytose neutral red

注:与空白对照组相比, $P < 0.05$ 为差异性显著,用“*”表示; $P < 0.01$ 为差异性极显著,用“**”表示。Note:Compared with control group, $P < 0.05$ was significant difference,expressed by “*”; $P < 0.01$ was extremely significant,expressed by “**”.

2.2 橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 对小鼠成纤维细胞 (L929) 的细胞毒性实验

L929 细胞为小鼠成纤维细胞,贴壁生长,是细胞毒理性实验的常用细胞。本实验以 L929 细胞为模型探究 AC-1 对正常细胞的毒性作用,实验结果如图 13 所示,在 AC-1 的浓度为 5 ~ 20 $\mu\text{g/mL}$ 时对 L929 细胞无显著的增殖及抑制作用,说明 AC-1 对

正常细胞无毒性。

2.3 橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 体外抗肿瘤活性

2.3.1 橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 对小鼠胃癌细胞 (MFC) 生长的影响

胃癌是对人类健康有危害的恶性肿瘤之一,致死率在全恶性肿瘤中排第二位。AC-1 对 MFC 细胞的影响如图 14 所示,AC-1 在终浓度为 10 ~ 20 $\mu\text{g/mL}$ 时能够抑制 MFC 细胞的生长 ($P < 0.01$)。并且当 AC-1 浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制率高达 30.09%。细胞与药物共培养 24 h 后 MFC 的形态如图 15 所示,当 AC-1 浓度为 10 ~ 20 $\mu\text{g/mL}$ 时,随着浓度的增加,细胞的数量逐渐变小,细胞之间的间隙变大,提示 AC-1 在浓度为 10 ~ 20 $\mu\text{g/mL}$ 时能够对 MFC 细胞骨架产生一定的影响,且随着浓度的增加,效果越明显。

2.3.2 橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 对小鼠肉瘤细胞 (S_{180}) 生长的影响

S_{180} 为小鼠肉瘤细胞(腹水瘤细胞系),通常作为抗肿瘤活性实验的研究对象。AC-1 对 S_{180} 细胞的影响如图 16 所示,当 AC-1 的终浓度为 5 ~ 20 $\mu\text{g/mL}$ 时均可显著抑制 S_{180} 细胞的生长 ($P < 0.05$)。细胞与药物共培养 24 h 后 S_{180} 细胞生长形态如图 17

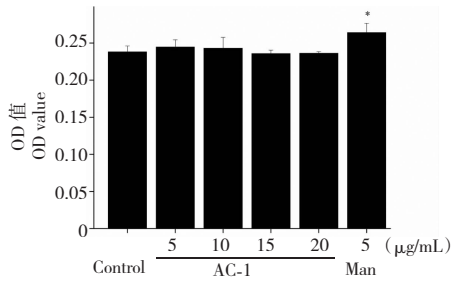


图 13 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对小鼠成纤维细胞(L929)的影响

Fig. 13 Effect of *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1) on the mouse fibroblast (L929)

注:与空白对照组相比, $P < 0.05$ 为差异性显著,用“*”表示; $P < 0.01$ 为差异性极显著,用“**”表示。Note:Compared with control group, $P < 0.05$ was significant difference, expressed by “*”; $P < 0.01$ was extremely significant, expressed by “**”.

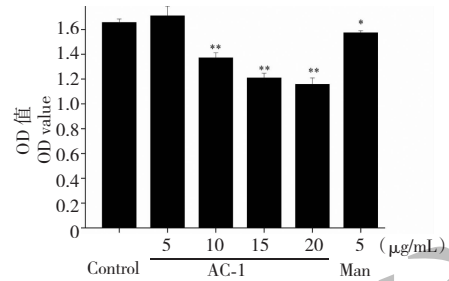


图 14 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对小鼠胃癌细胞(MFC)的影响

Fig. 14 Effect of *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1) on the gastric cancer cells (MFC)

注:与空白对照组相比, $P < 0.05$ 为差异性显著,用“*”表示; $P < 0.01$ 为差异性极显著,用“**”表示。Note:Compared with control group, $P < 0.05$ was significant difference, expressed by “*”; $P < 0.01$ was extremely significant, expressed by “**”.

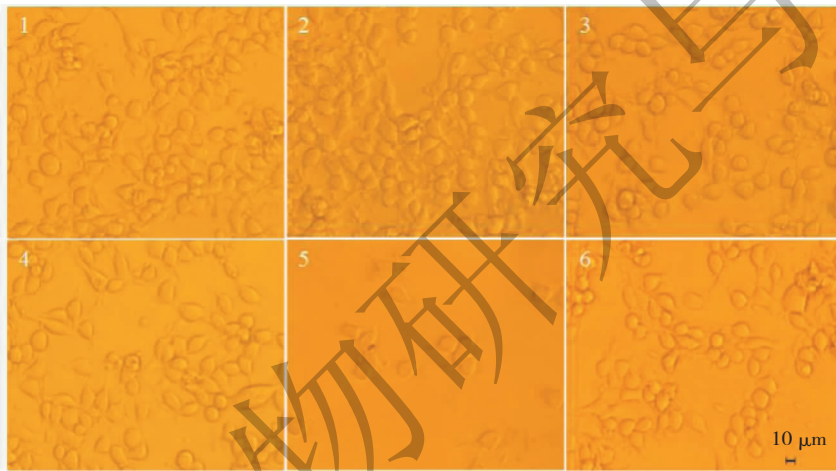


图 15 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对小鼠胃癌细胞(MFC)形态的影响

Fig. 15 Effect on gastric cancer cells (MFC) morphology by *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1)

注:1 为空白对照组,2~5 为 AC-1 药物组,其终浓度分别为 5、10、15、20 μg/mL,6 为 Man 阳性对照组(5 μg/mL),细胞放大倍数(10×20)。

Note:1 was control group,2-5 were AC-1 group,the final concentration were 5,10,15,20 μg/mL,respectively.6 was Man positive control group (5 μg/mL),cell magnification (10×20).

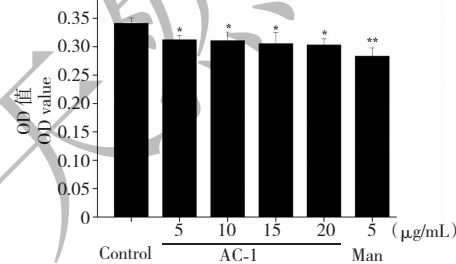


图 16 橙盖鹅膏多糖(AC-1)对小鼠肉瘤细胞(S₁₈₀)的影响

Fig. 16 Effect of *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1) on the mouse sarcoma cells (S₁₈₀)

注:与空白对照组相比, $P < 0.05$ 为差异性显著,用“*”表示; $P < 0.01$ 为差异性极显著,用“**”表示。Note:Compared with control group, $P < 0.05$ was significant difference, expressed by “*”; $P < 0.01$ was extremely significant, expressed by “**”.

所示,AC-1 在终浓度为 10~20 μg/mL 时,随着浓度的增加,细胞之间的间隙变大,提示 AC-1 在浓度为 10~20 μg/mL 时能够直接对 S₁₈₀ 细胞产生抑制效果,并能够对 S₁₈₀ 细胞骨架产生一定的影响,但其抑制效果相对于 MFC 细胞较弱,提示 AC-1 对于不同的肿瘤细胞具有不同的抑制效果,其相关机制有待进一步研究。

3 结论

本实验以从四川采摘的橙盖鹅膏子实体中提取的结构新颖的多糖 AC-1 为研究对象,探究了其体外免疫调节活性、细胞毒性和抗肿瘤活性。实验结果表明,AC-1 能够在体外促进三种免疫细胞(B、T

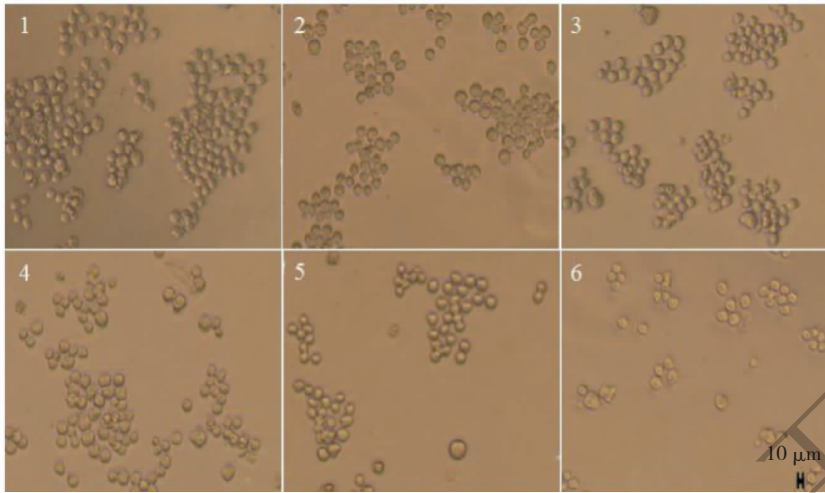


图 17 橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 对小鼠肉瘤细胞 (S_{180}) 形态的影响

Fig. 17 Effect on morphology of the Mouse sarcoma cells (S_{180}) by *Amanita caesarea* polysaccharide (AC-1)

注:1 为空白对照组,2~5 为 AC-1 药物组,其终浓度分别为 5、10、15、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,6 为 Man 阳性对照组 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),细胞放大倍数 (10×10)。

Note:1 was control group,2-5 were AC-1 group,the final concentration were 5,10,15,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,respectively,6 was Man positive control group (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),cell magnification (10×10).

和 RAW264.7) 的增殖、巨噬细胞的吞噬及 B 细胞分泌抗体。抗体分泌实验表明,AC-1 在较低浓度下促进 Ig E 分泌的效果更明显,而在较高浓度下促进 Ig G 的分泌效果最明显,提示 AC-1 在较低浓度下主要通过促进 Ig E 介导的超敏反应来发挥体液免疫功能,而在较高浓度下则是通过增强 Ig G 介导的吞噬调理等作用发挥体液免疫功能。AC-1 也能在体外抑制小鼠胃癌细胞 (MFC) 和小鼠肉瘤细胞 (S_{180}) 增殖,且对正常细胞无抑制作用,但对 S_{180} 细胞的抑制效果较 MFC 细胞弱,提示 AC-1 无细胞毒性且具有良好的体外免疫调节活性和抗肿瘤活性,但对不同的肿瘤细胞具有不同的抑制效果。

张茜^[11]研究发现,香菇多糖和银耳多糖在低于 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不能促进巨噬细胞 RAW264.7 的增殖,也不能促进 T、B 细胞增殖。而本实验的橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 在 1.25 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 都能刺激 B、T 细胞和 RAW264.7 的增殖,提示 AC-1 在此浓度下免疫增殖效果要优于香菇多糖和银耳多糖。巨噬细胞是重要的抗原递呈细胞,而吞噬功能是巨噬细胞发挥递呈抗原功能的基础,本实验结果还表明 AC-1 能够促进巨噬细胞的吞噬,增强其抗原递呈功能。体外抗肿瘤活性实验比较,AC-1 在浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对小鼠胃癌细胞 (MFC) 的抑制率为 30.09%,高于黄盖鹅膏多糖浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对人胃癌细胞 (MGC) 的抑制率 16.47%^[5],造成这两种多糖活性

的差异的原因可能与两者的结构、分子量以及纯度等具有较大的关系。

进一步分析发现,在浓度为 2.5 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,AC-1 能够促进 B 淋巴细胞分泌 Ig A、Ig E、Ig G 和 Ig M 抗体,但促进 Ig A 和 Ig G 抗体分泌的最适浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而促进 Ig E、Ig M 抗体分泌的最适浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,该结果提示不同浓度的橙盖鹅膏多糖 (AC-1) 能导致 B 淋巴细胞分泌免疫球蛋白 (Ig) 发生类别转换。Ig 类别转换是指在抗原或共刺激分子的作用下导致 B 细胞发生由产生 Ig M 抗体向产生 Ig A、Ig G 和 Ig E 转变的行为^[12]。Ig 类型的转换会受局部微环境和细胞因子的影响和调节,例如低浓度的卵清蛋白 (OVA) 主要诱导产生 Ig E 和 Ig G1,高浓度卵清蛋白 (OVA) 主要诱导产生 Ig G2a^[13];低浓度的竹节参醇提物 (HBsAg) 主要诱导产生 Ig G1,而高浓度的竹节参醇提物 (HBsAg) 主要诱导产生 Ig G2b^[14];同样,IL-4 在低浓度时主要诱导产生 Ig G1,而在高浓度时则主要诱导产生 Ig E^[15]。本实验结果显示,AC-1 在浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时能诱导 B 细胞分泌的 Ig 向 Ig E、Ig M 类别转换,而在浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时能诱导 B 细胞分泌的 Ig 向 Ig A、Ig G 类别转换,相关分子机制有待进一步研究。

一般认为,以 β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6) 或以 β -(1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6) 糖苷键连接的多糖活性较强,因为此种构型

有利于形成三股绳状螺旋立体构型,显示较高的免疫活性和抗肿瘤活性^[16]。例如以 β -(1 \rightarrow 3)-D 葡聚糖为主链的香菇多糖、猪苓多糖和奇果菌多糖均具有提高机体免疫和抗肿瘤的功能^[16];也有研究表明,以 α -D 葡聚糖为主的多糖也具有抗肿瘤活性,如对多种肿瘤细胞的生长均具有抑制作用的松茸多糖就以 α -(1 \rightarrow 6)-D 葡萄糖为主链^[17],本研究结果表明以 α -(1 \rightarrow 4)和 α -(1 \rightarrow 3)-D 葡萄糖为主链的AC-1也具有较好的免疫调节活性和抗肿瘤活性,提示多糖的活性也受到侧链单糖种类和高级结构的影响。

真菌多糖具有多种生物活性,但具体发挥哪种活性与细胞内信号传递密切相关。例如具有 β -(1 \rightarrow 3)-D 葡聚糖主链的香菇多糖,能够通过 MyD88 依赖的 NF- κ B 途径解除免疫抑制^[18];具有 β -(1 \rightarrow 3)和 β -(1 \rightarrow 6)-D 葡聚糖的茯苓多糖,通过 NF- κ B/MAPK 信号通路激活巨噬细胞释放 NO^[19];具有 β -(1 \rightarrow 3)和 β -(1 \rightarrow 6)葡聚糖的灰花树多糖通过 Dec-1/Sky/NF- κ B 信号通路活化巨噬细胞,使其分泌 TNF- α 和 IL-6,达到抑瘤效果^[20]。综上所述, NF- κ B 途径在 β -葡聚糖发挥免疫作用中扮演重要的角色,然而 NF- κ B 在以 α -D-葡萄糖为主链的 AC-1 发挥生物活性时是否具有同样的作用,则有待进一步进行探究。

本实验结果表明:AC-1 具有在体外增强免疫应答和抑制肿瘤细胞生长的功能,且对正常细胞无毒副作用,这为橙盖鹅膏多糖(AC-1)作为抗肿瘤药物的开发利用提供了科学依据,但其与细胞表面的何种受体结合以及信号如何进行传递则有待进一步探究。

参考文献

- Lin J, Li P, Chen KS. Advance in studies on anti-tumor activity of polysaccharides in latest five years [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 1116-1125.
- Zhang WZ, Xu R. Research progress in edible-medicinal fungi polysaccharide [J]. Sci Tech Food Ind (食品工业科技), 2014, 35: 395-399.
- Ruthes AC, Carbonero ER, Córdova, et al. Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: structure and inflammatory pain inhibition [J]. Carbohydr Polym, 2013, 98: 761-769.
- Karaman M, Janjušević L, Jakovljević D, et al. Anti-hydroxyl radical activity, redox potential and anti-AChE activity of *Amanita strobiliformis* polysaccharide extract [J]. Nat Prod Res, 2019, 33: 1522-1526.
- Tang YL, Luo Q, Ding W, et al. Antitumor activity of polysaccharides extracted from two wild amanitas [J]. J Sichuan Univ: Health Sci (四川大学学报:医学版), 2011, 42: 792-796.
- Zhu XJ, Jia N, Wang R, et al. The effect of different polar parts and polysaccharide extracted from the fruiting bodies of *Amanita hemibapha* on the viability of B16 cells [J]. J Fungal Res (菌物研究), 2014, 12: 164-166.
- Zhu YX, Ding X, Wang M, et al. Structure and antioxidant activity of a novel polysaccharide derived from *Amanita caesarea* [J]. Mol Med Rep, 2016, 14: 3947-3954.
- Dong MM, Ding X, Song B, et al. The structure and immunomodulatory activity of polysaccharide from *Ramaria flaccida* (Fr.) Quél [J]. Sci Tech Food Ind (食品工业科技), 2019, 40(1): 66-71.
- Tian M, Li J, Ma YW, et al. The effect of milk-derived bioactive peptides on contents of Ig G, Ig A and Ig M immunized with c-strain vaccine of classical swine fever virus [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2010, 22: 705-708.
- Dai Y, Xu MS, Shangguan XC, et al. Immunomodulatory effects of chlorogenic acid on mouse peritoneal macrophages [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2015, 27: 2128-2133.
- Zhang Q. Studies on immunomodulatory activities of fungus polysaccharides [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology (华中科技大学), 2016.
- Delgado-Benito V, Rosen DB, Wang Q, et al. The chromatin reader ZMYND8 regulates Igh enhancers to promote immunoglobulin class switch recombination [J]. Mol Cell. 2018, 72: 636-649.
- Chen JJ, Wang JH, Yuan Y, et al. Effect of neonatal immunization with different dosage allergen on the immunity of mice when grown up [J]. Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg (中华耳鼻咽喉头颈外科杂志), 2013, 48: 563-567.
- Yuan Q, Cui QQ, Zhou ZY, et al. The adjuvant effect of *Panax japonicus* ethanol extract [J]. Immunol J (免疫学杂志), 2016, 32: 225-230.
- Snapper CM, Finkelman FD, Paul WE. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4 [J]. J Exp Med, 1988, 167: 183-196.
- Li LW, Zhao G. Bioactivity of medicinal fungi polysaccharides for anti-tumor immunity [J]. Chin J Cancer Prev Treat (中华肿瘤防治杂志), 2015, 22: 1156-1160.
- Chen C, Li Q, Huang WL. Review on extraction, composition and biological activities of polysaccharide from *Tricholoma*

- matsutake*[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28:1499-1503.
- 18 Moradali MF, Mostafavi H, Ghods S, et al. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi) [J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7:701-724.
- 19 Lee JY, Li C, Surayot U, et al. Molecular structures, chemical properties and biological activities of polysaccharide from *Smilax glabra* rhizome [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 120:1726-1733.
- 20 Fang JP, Wang Y, Lv XF, et al. Structure of a β -glucan from *Grifola frondosa* and its antitumor effect by activating Dectin-1/Syk/NF- κ B signaling [J]. Glycoconj J, 2012, 29:365-377.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委 (以姓氏笔划为序)

Members

王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林	刘相国
WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin	LIU Xiangguo
孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉	汪海波
SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo
沐万孟	张炳火	陈益华	林昌俊	欧阳杰	易华西
MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	CHEN Yihua	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi
罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛	夏永刚	高慧敏
LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin
唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕	曾克武	蓝蔚青
TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan	ZENG Kewu	LAN Weiqing
廖晨钟	薛永波				
LIAO Chenzhong	XUE Yongbo				