

木蹄层孔菌多糖对免疫抑制小鼠免疫功能及细胞因子产生的影响

周桂保¹ 高慧灵² 丁佩娥¹ 张群¹ 余传林¹ 雷林生¹

(1. 南方医科大学 药学院, 广东 广州 510515; 2. 包头市第四医院 药剂科, 内蒙古 包头 014030)

摘要: 目的 探讨木蹄层孔菌多糖(*Fomes fomentarius* polysaccharides, FFP, 木蹄多糖) 对免疫抑制小鼠单核/巨噬细胞吞噬功能、体液免疫功能及 T 淋巴细胞分泌白介素 2(IL-2)、干扰素 γ (IFN- γ) 的影响。方法 环磷酰胺(15 mg/kg) 皮下注射 连续 7 d 建立免疫抑制小鼠模型 碳粒廓清法检测单核/巨噬细胞的吞噬功能, 兔红细胞免疫法检测小鼠体液免疫功能, 显微镜计数法检测外周血白细胞总数, 刀豆素 A(Con A)刺激法检测 T 淋巴细胞分泌细胞因子的能力, ELISA 法检测 IL-2、IFN- γ 的含量。结果 FFP(200、100 mg/kg) 能显著提高免疫抑制小鼠单核/巨噬细胞的吞噬功能, 促进免疫抑制小鼠抗兔红细胞特异性抗体(溶血素)的生成, 增加免疫抑制小鼠外周白细胞总数, 增强免疫抑制小鼠脾细胞在 Con A 刺激下产生 IL-2 和 IFN- γ 的能力。结论 木蹄多糖可提高免疫抑制小鼠非特异性免疫和体液免疫功能, 增强免疫抑制小鼠 T 淋巴细胞产生 IL-2 及 IFN- γ 的能力。

关键词: 木蹄层孔菌; 多糖; 免疫抑制; 碳粒廓清; 溶血素; 细胞因子

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2011.01.016

文章编号: 1006-8783(2011)01-0060-05

Effects of *Fomes fomentarius* polysaccharides on immune function and cytokines production of immunosuppressive mice

ZHOU Gui-bao¹, GAO Hui-ling², DING Pei-e¹, ZHANG Qun¹, YU Chuan-lin¹, LEI Lin-sheng¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China;
2. Department of Pharmacy, The Fourth Hospital of Baotou City, Baotou, Neimenggu 014030, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of *Fomes fomentarius* polysaccharides (FFP) on humoral immune response phagocytic activities of mononuclear macrophages and production of interleukin-2 (IL-2) and interferon- γ (IFN- γ) by T lymphocytes in immunosuppressive mice. Methods Immunosuppressive mice model were established by subcutaneous administration of cyclophosphamide (15 mg/kg) for 7 consecutive days. Phagocytic activity of mononuclear macrophages was determined with carbon clearance test. Humoral immunity was evaluated with the production of specific antibody (haemolysin) against rabbit red blood cells (RRBC). Peripheral white blood cells was counted under microscope. Cytokines production of T lymphocytes was induced by concanavalin A (Con A). The amounts of IL-2 and IFN- γ were measured with ELISA assay. Results It was found that FFP (200 and 100 mg/kg) significantly enhanced the phagocytic activity of mononuclear macrophages, increased the level of serum hemolysin induced by RRBC immunization, raised the total number of peripheral white blood cells and promoted the

收稿日期: 2010-10-25

基金项目: 广东省自然科学基金(7005189)

作者简介: 周桂保(1982-)男, 硕士研究生, 主要从事抗炎免疫药物药理学研究, Email: zhougui_bao@126.com; 通讯作者:

雷林生, 博士, 博士生导师, 教授, 主要从事抗炎免疫药物药理学研究, Email: lls@fimmu.com。

网络出版时间: 2011-01-21 16:18 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1413.R.20110121.1618.004.html>

production of IL-2 and IFN- γ by T lymphocytes in immunosuppressive mice. Conclusion FFP can enhance non-specific immune function and humoral immune response of immunosuppressive mice, and promote production of IL-2 and IFN- γ by T lymphocytes in the mice.

Key words: *Fomes fomentarius*; polysaccharides; immunosuppression; carbon clearance; cytokine; hemolysin

木蹄层孔菌(*Fomes fomentarius* L. ex. Fr)为多孔菌目真菌,多寄生在阔叶树杆或木桩上。在我国多省区均有分布,资源丰富。研究报道,其乙醇提取物对S-180荷瘤鼠有很强的抑瘤活性^[1-2],甲醇提取物对小鼠有抗炎和抗伤害性疼痛作用^[3]。木蹄层孔菌深层培养所得胞外多糖对人胃癌细胞株SGC-7901有直接的抑制增殖效应,并能增加癌细胞对阿霉素的敏感性^[4],从木蹄子实体中提取的多糖具有良好的免疫促进作用^[5]。本研究观察木蹄层孔菌多糖(*Fomes fomentarius* polysaccharides, FFP,木蹄多糖)对环磷酰胺所致免疫抑制小鼠免疫功能的影响,为木蹄层孔菌多糖的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 木蹄层孔菌(购于广州市宝芝林大药房);小鼠IL-2、IFN- γ 检测试剂盒(eBioscience公司);RPMI 1640培养基(GIBCO公司);新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司);印度墨汁(美国Amresco公司);刀豆素A(Con A,Sigma公司)。其他试剂均为分析纯;木蹄多糖和灵芝多糖参照文献[5-6]方法提取。

1.1.2 动物 KM小鼠,SPF级,雌雄兼用,体质量(20±2)g;健康豚鼠,雄性,体质量(275±25)g;新西兰家兔2~3kg,由南方医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2006-0015。

1.1.3 仪器 Benchmark Plus连续波长酶标仪(Bio-RAD公司);ST-21型高速冷冻离心机(美国杜邦公司);Universal 16A型低速离心机(Ttettich公司);5410型CO₂培养箱(Thermo公司);FA2004型电子天平(上海上天公司);RE-52A型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);DZF-6050型真空干燥箱(上海博迅实业有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 对免疫抑制小鼠单核/巨噬细胞吞噬功能的影响 取KM小鼠60只,雌雄各半,随机分为6组,

即正常对照组、环磷酰胺(15 mg/kg)模型组、FFP[高、中、低剂量(200、100、50 mg/kg)]+环磷酰胺处理组、灵芝多糖(100 mg/kg)+环磷酰胺处理组,每组10只。FFP和灵芝多糖采用腹腔注射给药,0.01 mL/g,与此同时,正常对照组和环磷酰胺模型组用等体积生理盐水代替,每天1次,连续7d;环磷酰胺采用皮下注射给药,0.01 mL/g,与此同时,正常对照组、FFP和灵芝多糖组用等体积生理盐水代替,每天1次,连续7d。于第7天给药后2 h,先称体质量,然后每只小鼠尾静脉注射生理盐水5倍稀释的印度墨汁0.01 mL/g,分别于注射后2 min(t₁)和12 min(t₂),用预先经肝素溶液湿润过吸头的微量加样器自眶后静脉丛取血10 μL,加入到1 mL蒸馏水中,摇匀,然后取100 μL放入96孔板中,用酶标仪在450 nm波长处测吸光度A值,以100 μL蒸馏水小孔的A值作为调零孔。最后将小鼠颈椎脱臼处死,分别称取肝、脾质量。按下式计算吞噬速率(K)和校正的吞噬指数(A)。

$$K = (\log A_1 - \log A_2) / (t_2 - t_1),$$

$$A = K^{1/3} \times \text{体质量} / (\text{肝质量} + \text{脾质量})。$$

1.2.2 对免疫抑制小鼠血清溶血素水平的影响

小鼠分组与给药方法同“1.2.1”,给药2 d后,各鼠分别腹腔注射体积分数为20%的生理盐水免红细胞0.2 mL进行免疫,同日下午继续给药,每天1次,免疫后第4天(免疫当天为d 0)小鼠摘眼球取血,分离血清,按照文献[7]方法测定溶血素水平。

1.2.3 对免疫抑制小鼠外周血白细胞计数的影响

小鼠分组与给药方法同“1.2.1”,于第7天给药后2 h,每只小鼠自眶后静脉丛取血20 μL,加入0.38 mL白细胞计数液(1%冰乙酸)中混匀,取20 μL稀释液滴入计数板中,静置1 min,使细胞下沉,用倒置显微镜低倍镜计数四角大方格中白细胞总数,并换算成每升全血中的白细胞数。

1.2.4 对免疫抑制小鼠脾细胞分泌IL-2和IFN- γ 的影响 取KM小鼠15只,雄性,随机分为5组,每组3只。除不设FFP低剂量组以外,其他分组与给药方法同“1.2.1”。于第7天给药后2 h,小鼠颈椎

脱臼处死，无菌取出脾脏，每只脾脏剪取 1/3，冰浴下将每组脾脏组织合并放入预先盛有 4 mL 含 5% (φ) 小牛血清的 Hank's 液的培养皿中，用 2 块载玻片轻轻挤压脾脏组织，将脾细胞挤出，收集细胞液于离心管中，用吸管吹打使细胞充分分散，然后用 200 目尼龙布过滤，滤液收集于另一离心管中，1 500 r/min 离心 3 min，吸弃上清，另加 3 mL Hank's 液，混匀，再离心洗涤 1 次，然后用 2 mL 含 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养液(全培)重悬细胞，计数，调整细胞浓度为 4×10^6 个/mL，于 96 孔板中每孔加入上述细胞悬液 100 μL，另加全培配制的 Con A 100 μL，终浓度为 2 μg/mL，每组做 3 个复孔。将 96 孔板置于培养箱中，在饱和湿度、φ = 5% CO₂、37 °C 条件下培养 48 h 后收集培养上清液，每组上清液合并为 1 份，-70 °C 冻存备用。以上过程重复 5 次(5 批)。将 5 批实验的细胞培养上清液样品同时解冻，采用 ELISA 方法分别检测上清液中 IL-2 和 IFN-γ 含量。测 IL-2 时，取上清液 50 μL；测 IFN-γ 时，取上清液 25 μL；另取 5 个不同稀释度的标准品各 50 μL 加入酶标板小孔中，用样品缓冲液补足至 100 μL，其他步骤严格按照试剂盒说明书操作。

1.3 统计分析

结果以($\bar{x} \pm s$) 表示，采用 SPSS 11.5 统计软件分析。IL-2 和 IFN-γ 数据的组间差异采用配对资料 t 检验；其余数据采用单向方差分析(One-way ANOVA)，方差齐性时，采用 LSD 方法进行组间两两比较；方差不齐时，用 Dunnett's T3 方法进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FFP 增强免疫抑制小鼠单核/巨噬细胞的碳粒廓清能力

环磷酰胺(15 mg/kg)可使小鼠校正的吞噬指数明显下降，与对照组比较有统计学意义($P < 0.01$)，说明非特异性免疫抑制模型成功。FFP 高、中剂量(200、100 mg/kg)可以明显提高免疫抑制小鼠校正的吞噬指数，与环磷酰胺模型组比较有统计学意义($P < 0.05$)，低剂量(50 mg/kg)与模型组比较无统计学意义。阳性对照药灵芝多糖(100 mg/kg)可提高免疫抑制小鼠校正的吞噬指数($P < 0.05$)，见表 1。

2.2 FFP 促进免疫抑制小鼠抗兔红细胞溶血素的生成

表 1 FFP 增强免疫抑制小鼠单核/巨噬细胞的碳粒廓清能力

Table 1 *Fomes fomentarius* polysaccharides increase carbon clearance capacity of mononuclear macrophages in immunosuppressive mice *in vivo* ($\bar{x} \pm s$ $n = 10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	校正的 吞噬指数
空白对照组	-	$3.43 \pm 0.68^{**}$
环磷酰胺组	15	2.52 ± 0.50
环磷酰胺 + FFP 高剂量组	15 + 200	$3.25 \pm 0.64^*$
环磷酰胺 + FFP 中剂量组	15 + 100	$3.09 \pm 0.62^*$
环磷酰胺 + FFP 低剂量组	15 + 50	2.74 ± 0.55
环磷酰胺 + 灵芝多糖组	15 + 100	$3.15 \pm 0.65^*$

与环磷酰胺组比较： $^* P < 0.05$ ， $^{**} P < 0.01$

环磷酰胺(15 mg/kg)可使小鼠抗兔红细胞血清溶血素的含量明显下降，与对照组比较有统计学意义($P < 0.01$)，说明体液免疫抑制模型成功。FFP 高、中剂量(200、100 mg/kg)可以明显提高免疫抑制小鼠血清溶血素水平，与环磷酰胺模型组比较有统计学意义($P < 0.01$ ， $P < 0.05$)，低剂量(50 mg/kg)与模型组比较，但无统计学意义。阳性对照药灵芝多糖(100 mg/kg)可提高免疫抑制小鼠血清溶血素水平($P < 0.05$)，见表 2。

表 2 FFP 促进免疫抑制小鼠抗兔红细胞溶血素的生成

Table 2 *Fomes fomentarius* polysaccharides promote production of hemolysin against rabbit red blood cells in immunosuppressive mice *in vivo* ($\bar{x} \pm s$ $n = 10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	溶血素 (A ₄₅₀)
空白对照组	-	$0.271 \pm 0.06^{**}$
环磷酰胺组	15	0.168 ± 0.03
环磷酰胺 + FFP 高剂量组	15 + 200	$0.235 \pm 0.05^{**}$
环磷酰胺 + FFP 中剂量组	15 + 100	$0.213 \pm 0.04^*$
环磷酰胺 + FFP 低剂量组	15 + 50	0.186 ± 0.04
环磷酰胺 + 灵芝多糖组	15 + 100	$0.209 \pm 0.04^*$

与环磷酰胺组比较： $^* P < 0.05$ ， $^{**} P < 0.01$

2.3 FFP 提升免疫抑制小鼠外周血白细胞总数

环磷酰胺(15 mg/kg)可使小鼠外周血白细胞总数明显下降，与对照组比较有统计学意义($P < 0.01$)，说明免疫抑制模型成功。FFP 高、中剂量(200、100 mg/kg)可以明显提高免疫抑制小鼠外周血白细胞总数，与环磷酰胺模型组比较有统计学意

义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。低剂量(50 mg/kg)与模型组比较无统计学意义。阳性对照药灵芝多糖(100 mg/kg)可升高免疫抑制小鼠外周血白细胞总数($P < 0.05$)。见表3。

2.4 FFP 增强 ConA 诱导的免疫抑制小鼠脾细胞产生 IL-2 和 IFN- γ 的能力

小鼠经环磷酰胺(15 mg/kg)处理后,脾细胞对Con A刺激产生IL-2和IFN- γ 的能力明显下降,与对照组比较有统计学意义($P < 0.01$),说明免疫抑制模型成功。FFP高、中剂量(200、100 mg/kg)可以明显提高免疫抑制小鼠脾细胞产生IL-2和IFN- γ 的能力,与环磷酰胺模型组比较有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。阳性对照药灵芝多糖(100 mg/kg)可提高免疫抑制小鼠脾细胞产生IL-2和IFN- γ

的能力($P < 0.05$)。见表4。

表3 FFP 提升免疫抑制小鼠外周血白细胞总数

Table 3 *Fomes fomentarius* polysaccharides (FFP) raise the total number of peripheral white blood cells (WBC) in immunosuppressive mice *in vivo* ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	WBC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
空白对照组	-	5.62 ± 1.4 **
环磷酰胺组	15	3.68 ± 1.0
环磷酰胺 + FFP 高剂量组	15 + 200	5.47 ± 1.5 **
环磷酰胺 + FFP 中剂量组	15 + 100	4.92 ± 1.3 *
环磷酰胺 + FFP 低剂量组	15 + 50	4.31 ± 1.0
环磷酰胺 + 灵芝多糖组	15 + 100	5.15 ± 1.2 *

与环磷酰胺组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表4 FFP 增强 Con A 诱导的免疫抑制小鼠脾细胞产生 IL-2 和 IFN- γ 的能力

Table 4 *Fomes fomentarius* polysaccharides (FFP) promote Con A-induced production of IL-2 and IFN- γ by splenocytes in immunosuppressive mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ρ (IL-2)/(pg·mL ⁻¹)	ρ (IFN- γ)/(pg·mL ⁻¹)
空白对照组	-	4.629 ± 1.33 **	740.3 ± 148 **
环磷酰胺组	15	2.297 ± 0.92	401.6 ± 103
环磷酰胺 + FFP 高浓度组	15 + 200	3.292 ± 1.30 **	571.2 ± 119 **
环磷酰胺 + FFP 低浓度组	15 + 100	2.805 ± 1.08 *	505.7 ± 132 *
环磷酰胺 + 灵芝多糖组	15 + 100	3.040 ± 0.10 *	558.5 ± 121 *

与环磷酰胺组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

真菌多糖是免疫调节保健品的主要活性成分^[8]。临床主要作为肿瘤化疗的辅助用药,如:香菇多糖^[9]。本研究在以往证明FFP具有良好免疫促进作用的基础上进一步采用免疫抑制模型评估FFP作为保健品或作为化疗辅助用药的应用前景。

单核/巨噬细胞是机体免疫防御中的重要细胞,一方面负责抗原的处理与提呈,启动特异性免疫应答,另一方面非特异地吞噬、杀伤多种病原微生物。碳粒廓清法是检测小鼠单核/巨噬细胞吞噬功能的常用方法,FFP可提高环磷酰胺所致免疫功能低下小鼠的校正的吞噬指数,提示FFP对因化疗药物所致的单核/巨噬细胞功能损害有保护作用。

溶血素是初次免疫应答产生的IgM抗体,其水平的高低可以反映小鼠的体液免疫功能。本研究采用以兔红细胞为抗原的检测方法^[7],其优点是产生的抗体滴度适中,检测时不必做大幅度的稀释,操作

误差小。实验结果发现FFP对因环磷酰胺所致的体液免疫功能受损小鼠亦有保护作用。

外周血白细胞总数的高低反映机体免疫功能的整体状态,在化疗过程中,病人外周血白细胞数下降,容易继发各种感染。本研究结果提示FFP对因化疗药物所致的外周血白细胞数下降有拮抗作用。

小鼠脾脏含有各种免疫细胞,如:T、B淋巴细胞、树突状细胞、巨噬细胞等,参与机体的各种免疫反应,当机体免疫功能受损时,脾脏中的免疫细胞在数量和功能方面会发生相应的改变。刀豆素A(Con A)是T淋巴细胞的促有丝分裂剂,能促进T细胞分泌多种细胞因子,如:IL-2、IFN- γ 等。IFN- γ 、IL-2是机体免疫系统重要的细胞因子,在机体的免疫调节过程中发挥多种重要的生理作用^[10]。IFN- γ 的主要功能是免疫调节,同时IFN- γ 具有抗肿瘤细胞增殖作用及抗病毒作用^[11],其通过促进巨噬细胞的活化及增强TC淋巴细胞的敏感性等发挥杀灭体内病原微生物及溶解肿瘤细胞的作用。IL-2是T、B

淋巴细胞的生长因子及 TC 淋巴细胞、NK 细胞的激活因子,能刺激 LAK 细胞的增殖,具有抑制肿瘤生长和转移的作用^[12-13]。FFP 可提高环磷酰胺免疫抑制小鼠脾细胞产生 IL-2 和 IFN-γ 的能力,提示 FFP 在临床肿瘤辅助治疗方面具有重要潜在意义,FFP 一方面可以拮抗化疗药物的毒副作用,另一方面还可协同化疗药物抑制肿瘤的生长。

总之,FFP 可部分对抗环磷酰胺的免疫抑制作用,具有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] 陆勇芹,周文明,王琦,等.木蹄层孔菌化学成分及不同提取物体外抗肿瘤活性研究[J].西北林学院学报,2007,22(4):131-134.
- [2] 刘量,周守标,郑维发.木蹄层孔菌乙醇提取物对肿瘤细胞的抑制作用[J].癌变·畸变·突变,2005,17(2):0104-0106.
- [3] PARK Y M, KIM I T, PARK H J, et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Fomes fomentarius* [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(10): 1588 - 1593.
- [4] CHEN Wei ZHAO Zhao CHEN Shi-fei, et al. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro [J]. Bioresour Technol, 2008, 99(8): 3187 - 3194.
- [5] 高慧灵,雷林生,余传林,等.木蹄层孔菌多糖对小鼠免疫功能影响的实验研究[J].南方医科大学学报,2009,29(3):458-461.
- [6] 李建军,雷林生,余传林,等.灵芝多糖抗肿瘤作用的免疫学相关性研究[J].中药材,2007,30(1):71-73.
- [7] 仇成凤,雷林生,吴玉英,等.以免红细胞作为抗原建立小鼠体液免疫反应动物模型[J].南方医科大学学报,2009,29(12):2473-2476.
- [8] 郝瑞芳,景浩.真菌多糖的研究进展[J].中国食物与营养,2008,14(4):19-22.
- [9] 周林静,张桂芳,慕竹青,等.香菇多糖联合顺铂治疗恶性胸腹腔积液的临床观察[J].肿瘤基础与临床,2010,23(1):56-57.
- [10] JOZEF R, JURAJ P, ROY C, et al. Dictionary of rheumatology [M]. First Edition. New York: Springer, 2009: 106 - 107.
- [11] UEMURA A, TAKEHARA T, MIYAGI T, et al. Natural killer cell is a major producer of interferon gamma that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice [J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(3): 453 - 463.
- [12] O'BRIEN G C, CAHILL R A, BOUCHIER-HAYES D J, et al. Co-immunotherapy with interleukin-2 and taurolidine for progressive metastatic melanoma [J]. Ir J Med Sci, 2006, 175(1): 10 - 14.
- [13] DEGRATE L, NOBILI C, FRANCIOSI C, et al. Interleukin-2 immunotherapy action on innate immunity cells in peripheral blood and tumoral tissue of pancreatic adenocarcinoma patients [J]. Langenbecks Arch Surg, 2009, 394(1): 115 - 121.

(责任编辑:幸建华)

本刊与中国知网签订“优先数字出版”协议

《广东药学院学报》与中国知网(中国学术期刊光盘版电子杂志社)签订了优先数字出版协议。从 2011 年第 1 期开始,学报定稿的论文将择优在中国知网实现优先数字出版(纸质刊物出版后会把数字优先的版本替换)。

优先数字出版是新闻出版总署认可的一种正式出版形式。在期刊数字化出版、网络化传播逐步实现后,中国知网在国内率先推广学术期刊优先数字出版工作。通过优先数字出版方式,可以把优秀的文章在未能排期付印之前,通过知网免费提供的平台,发布到中国知网的文献总库中和读者见面。优先数字出版的文章著作权属编辑部或作者所有,早发表就能早传播,早产生下载和引用,因此能有效地解决纸刊出版时差滞后的问题,对保护作者首发权,增加作者和刊物的学术影响力有重要意义。

据检索,本刊 2011 年第 1 期提前 1 个月实现优先数字出版,在纸刊出版前已有近 100 次下载量,单篇论文下载量最多的达 8 次。

(本刊编辑部)