

文章编号:1673-1689(2007)06-0031-05

灰树花菌丝体糖肽 GFPS1b 体内抗肿瘤作用的研究

崔凤杰^{1,2}, 张志才¹, 黄达明¹, 吴其飞¹,
管国强¹, 许弘瑜^{2,3}, 许正宏^{2,3}, 陶文沂^{2,3}

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122; 3. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 采用移植型小鼠黑色素瘤 B₁₆ 模型进行试验, 研究灰树花菌丝体糖肽 GFPS1b 的体内抗肿瘤作用。结果表明, 灰树花菌丝体糖肽 GFPS1b 对移植型小鼠黑色素瘤 B₁₆ 有显著的抑制作用, 抑瘤率在 30% 以上; 样品作用组瘤体积分生长速率比阴性对照组慢, 且瘤体体积小; 同时能延长荷瘤小鼠的存活期; HE 染色结果表明, GFPS1b 中、高剂量组能使 B16 肿瘤细胞呈团索状实性排列或弥漫性分布, 并有肿瘤细胞大片坏死, 坏死区周围可见凋亡细胞; 免疫组化技术进一步显示, GFPS1b 能诱导瘤组织中 Bax 基因蛋白表达, 同时也能显著下调 Bcl-2 蛋白的表达。研究表明, GFPS1b 对小鼠移植性肿瘤有显著的抑瘤作用。

关键词: 灰树花; 糖肽; 抗肿瘤作用; Bax; Bcl-2

中图分类号: R 979.1

文献标识码: A

Antitumor Activity of Polysaccharide-Peptide GFPS1b from The Cultured Mycelia of *Grifola frondosa* GF9801 *in vivo*

CUI Feng-jie^{1,2}, ZHANG Zhi-cai¹, Huang Da-ming¹, WU Qi-fei¹,
GUAN Guo-qiang¹, XU Hong-yu^{2,3}, XU Zheng-hong^{2,3}, TAO Wen-yi^{2,3}

(1. School of Food and Biotechnology, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The antitumor effects of the novel polysaccharide-peptide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801 were evaluated with the mice transplanted B₁₆ tumor *in vivo*. The results showed that GFPS1b had significant antitumor activity, could inhibit tumor growth and extend survival span. The histopathology of tumors from the various groups indicated that the tumor cells of untreated mice grew vigorously, however, the tumor cells from the different GFPS1b treated groups had clear nucleus pycnosis and necrosis areas in different degree. The expression of tumor gene Bax and Bcl-2 in tumor tissues were also detected with immunohistochemistry. After the treatment of GFPS1b, there was obvious difference in the quantities of Bax and Bcl-2 genes expression between the experimental and control groups, which indicated

收稿日期: 2006-11-01.

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金项目(07KJD350034); 江苏大学基金项目(07J0G020).

作者简介: 崔凤杰(1980-), 男, 安徽阜阳人, 工学博士, 讲师, 主要从事食品生物技术研究. Email: fengjiecu@163.com

通讯作者: 陶文沂(1946-), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博导, 主要从事发酵工程与生物制药研究.

Email: wytao@jiangnan.edu.cn

that GFPS1b could control growth of tumor and accelerate the tumor cell apoptosis by influencing the expression of related tumor genes. Above results indicated that GFPS1b had obvious antitumor effects against transplanted B₁₆ tumor in mice by influencing the expression related tumor genes such as Bax and Bcl-2.

Key words: *Grifola frondosa*; polysaccharide-peptide; anticancer activity; Bax; Bcl-2

近年来,对多糖及其复合物的生物活性研究以及药理实验证明,已有50个属178种的高等真菌多糖具有抑制小鼠S₁₈₀肉瘤及艾氏腹水瘤等细胞生长的生物学效应,如云芝多糖对小鼠移植性S₁₈₀肉瘤有明显抑制作用,香菇多糖对实体瘤也有明显的抑制作用^[1]。

灰树花作为研究较多的药食用真菌之一,具有明显的抗肿瘤、改善免疫系统功能,调节血糖、血脂及胆固醇水平、降血压等作用,其多糖的某些活性甚至超过已经临床应用的香菇多糖、云芝多糖和裂褶菌多糖^[2]。

作者考察了具有体外活性的灰树花菌丝体糖肽GFPS1b^[3]体内的抗肿瘤活性,通过建立移植型小鼠黑色素瘤B₁₆模型,采用抑瘤率、肿瘤体积变化和生存周期等指标评价样品的体内抗肿瘤作用,并通过免疫组化方法检测经GFPS1b处理过的不同组荷瘤小鼠的肿瘤组织中抑癌基因Bcl-2蛋白和癌基因Bax蛋白的表达情况,初步分析灰树花糖肽GFPS1b可能的抑瘤作用机理。

1 材料与方 法

1.1 材料

菌丝体与GFPS1b样品:制备方法如文献[3~5]中所述;细胞株:小鼠黑色素瘤细胞B₁₆,江南大学生物工程学院生物制药研究室张家骊老师惠赠,常规体外细胞传代,培养基为RPMI 1640完全培养基;实验动物:昆明种小鼠,购于南京动物试验中心,6周龄,体重(18±2)g,雌雄兼用。

注射用环磷酰胺(简称CY):江苏恒瑞医药股份有限公司产品;瑞氏染色液、HE染色液:无锡市第三人民医院提供;兔抗鼠Bcl-2、Bax多克隆即用型免疫组化试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)染色剂:武汉博士德生物技术有限公司产品。

1.2 仪器

倒置相差显微镜、照相机:日本Olympus公司产品;超净工作台:苏州净化设备厂产品;游标卡尺:上海恒胜工具有限公司产品;注射器、皮下针头:美国B. D.公司产品;无菌解剖器械:上海医疗

器械有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立 收集培养至对数生长期的B₁₆细胞,用生理盐水将细胞浓度调整为1×10⁷个/mL,于小鼠左下肢腹部进行无菌皮下接种,每只小鼠接种0.2 mL细胞悬液,即细胞总数为2×10⁶个。待小鼠瘤体积达到500 mm³左右进行实验。

1.3.2 给样方式 将建模成功的小鼠分组与给样,方案如下:荷瘤小鼠随机分成5组,每组10只,次日开始注射待测样品GFPS1b,样品设低、中、高3个剂量,即25、50、75 mg/d(以每千克体重计);阳性对照组给予用生理盐水稀释的环磷酰胺20 mg/d(以每千克体重计),每日腹腔注射(ip)给药一次,每次每鼠给药体积为0.2 mL,连续10 d;阴性对照组每日给予等量无菌的质量分数0.9%的生理盐水。

1.3.3 抑瘤率测定 荷瘤小鼠停药24 h后断颈处死,剥离瘤块,称重并计算肿瘤抑制率。肿瘤生长抑制率按下式计算:

$$\text{肿瘤抑制率} = \frac{(X_1 - X_2)}{X_1} \times 100\%$$

式中: X₁ 为对照组平均瘤质量, X₂ 为实验组平均瘤质量。

1.3.4 肿瘤体积生长曲线和荷瘤小鼠存活时间 荷瘤小鼠随机分为5组,每组10只,给药方式同上,给样后30 d内隔两天记录肿瘤生长的情况,测量肿瘤的长径(a)和短径(b)(单位: mm),按公式计算肿瘤体积: $V = \frac{(a \times b^2)}{2} \text{ mm}^3$,并作出时间—肿瘤体积变化曲线图^[5]。

存活时间的观察: 各组小鼠连续给样10 d后,停止给药,正常饲养,隔天观察并纪录小鼠的存活状况,直至自然死亡^[6]。

1.3.5 荷瘤小鼠白细胞计数 对荷瘤小鼠剪尾取外周血,滴加于载玻片上,取另一载玻片斜靠其上迅速制备细胞分布均匀的血涂片。在空气中自然晾干,过酒精灯固定后滴加瑞氏染色液2滴,用滴管铺开染色液使其覆盖血膜,1~2 min后洗去染色液,自然待干。取制备好的血涂片,在油镜下进行白细胞计数,并进行统计分析。

1.3.6 对小鼠肿瘤 B₁₆ 组织病理学的影响 将剥离的 B₁₆ 瘤块分组置福尔马林中固定。固定后的瘤组织以石蜡包埋,然后切成 5~7 μm 厚的切片。切片经 HE 染色后即可在光学显微镜下选取瘤组织^[7]。观察不同剂量的 GFPS1b 对小鼠肿瘤组织的影响。

1.3.7 免疫组化法检测 B₁₆ 肿瘤组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达 肿瘤组织块经质量分数 10% 的多聚甲醛溶液固定后,石蜡包埋,5 μm 厚连续切片。Bax 及 Bcl-2 蛋白表达检测采用 SABC 法,组织切片用体积分数 3% 的 H₂O₂ 室温封闭 10 min, PBS 洗,浸泡于 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液,微波加热修复抗原,间隔 5~10 min 后,反复 1~2 次。冷却至室温后 PBS 洗涤 1 或 2 次。滴加质量分数 5% 的 BSA 溶液封闭液 37 °C 20 min,甩去多余液体,加入一抗兔 IgG 4 °C 过夜, PBS 洗涤;滴加二抗 37 °C 20 min, PBS 洗涤 3 次,滴加 SABC 试剂 37 °C 20 min, PBS 洗涤;DAB 室温显色,苏木素复染,显微镜观察。Bax、Bcl-2 抗体是武汉博士德生物有限公司多

克隆抗体(1:100),以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3.8 数据分析 所测数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示,如果数据符合正态分布,统计方法采用双侧 *t* 检验, $\alpha = 0.05$; 如数据不符合正态分布,则采用 *F* 检验。

2 结果与讨论

2.1 GFPS1b 对 B₁₆ 荷瘤小鼠的抑瘤作用

荷瘤小鼠给药 10 d 后断颈处死,取瘤块称重计算各组抑瘤率。实验结果表明(见表 1),样品在对宿主生存数和动物增重均无显著影响的情况下,对小鼠体内 B₁₆ 的生长具有明显的抑制作用。

其中 GFPS1b 高剂量条件下抑瘤率达到 45.39%,与环磷酰胺(CY)组相当,与阴性对照组之间的抑瘤率差异均显著($P < 0.05$)。CY 组虽然抑瘤率较高,但小鼠饮食减少,皮毛无光泽,竖毛现象明显,活动明显减少,常拥挤在一起;而 GFPS1b 组小鼠明显比环磷酰胺组小鼠活泼,皮毛有光泽,竖毛现象不明显。

表 1 样品对小鼠黑色素瘤 B₁₆ 抑制作用

Tab. 1 Antitumor effect of GFPS1b on transplanted B₁₆ melanoma *in vivo*

组别	剂量/(mg/d) (以每千克体重计)	鼠数/只	动物增重/g	平均瘤 质量/g	抑瘤率/%
阴性对照组	—	10	10.31±1.19	2.71±0.51	—
CY 组	20	10	2.64±0.35	1.54±0.46**	43.17
低剂量组	25	10	4.77±0.89	2.25±0.62	16.97
中剂量组	50	10	5.68±0.71	1.83±0.48*	32.47
高剂量组	75	10	5.48±0.92	1.48±0.79**	45.39

* 与阴性对照组相比, $P < 0.05$; ** 与阴性对照组相比, $P < 0.01$

2.2 GFPS1b 对荷瘤小鼠肿瘤体积和小鼠生存率的影响

试验小鼠注射 B₁₆ 细胞造模,当各小鼠体内瘤体积在 500 mm³ 左右时分组给药 10 d,考察各给药组荷瘤小鼠瘤体积增长趋势(图 1)。试验结果表明,瘤体积在给药后 6 d 内增长速率缓慢,其后增长速度加快,但各组瘤体积增长速率各不相同,环磷酰胺组瘤体积变化幅度最小,其次为高剂量的 GFPS1b 组,阴性对照组瘤体积增长速率最大。并且 GFPS1b 的 3 个剂量组结果呈现剂量依赖关系。由图 1 和表 1 可以看出,作为评价样品的抑瘤率指标时,瘤体积和瘤质量具有很好的相关性,结果均表明样品对小鼠黑色素瘤有不同程度的抑制作用,抑制作用与剂量有关。因此结合两者更好地证明了样品对荷 B₁₆ 黑色素瘤小鼠具有很好的抗肿瘤作用。

小鼠的存活率实验结果表明(图 2),样品 GFPS1b 组与阴性对照组相比,能显著延长荷瘤小鼠的

存活期。从图中同样可以直观地看出荷瘤小鼠开始出现死亡的时间比阴性对照组延长。CY 组的生存期比较短,结合饲养过程中小鼠的形态表现等方面考虑,可能与化疗药物严重的毒副作用有关。

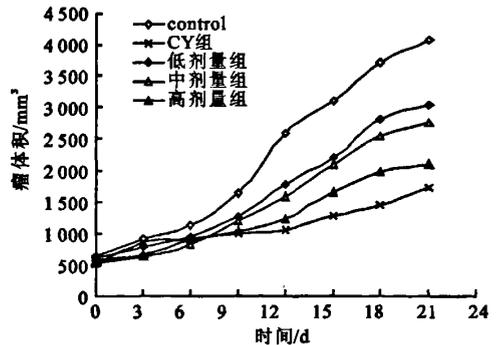


图 1 瘤体积增长趋势

Fig. 1 Growth curve of B16 melanoma tumors in control and treated mice

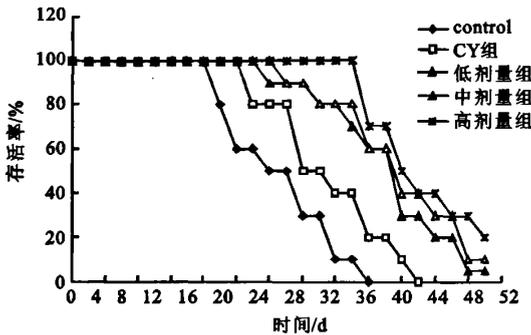


图2 对荷瘤小鼠生存期的影响
Fig.2 Effect of treatment on survival ratio in mice injected with B16 melanoma cells

2.3 对小鼠 B₁₆ 肿瘤组织病理形态学的影响

将各给药组和阴性对照组的瘤块作组织切片, 常规 HE 染色, 镜下观察肿瘤组织病理形态学变化, 结果见图 3。从图中可以看出, 阴性对照组肿瘤细胞排列密集, 体积大小不一, 多呈团灶状分布, 间

质血管扩张充血; 有的呈侵袭性生长; 在低剂量 GFPS1b 作用下, 肿瘤细胞基本形态正常, 细胞器清晰, 片状坏死部分较少; 在高剂量的 GFPS1b 作用后, 肿瘤细胞呈团索状实性排列或弥漫性分布, 并可看到肿瘤细胞大片坏死。

2.4 对小鼠 B₁₆ 肿瘤组织中 Bax 和 Bcl-2 基因蛋白表达的影响

Bcl-2 家族蛋白是细胞凋亡过程中发挥主要调控作用的一类因子, 根据其功能可分为两类: 一类促进细胞凋亡, 以 Bax、Bad、Bak、Bid 为代表; 另一类抑制细胞凋亡, 以 Bcl-2、Bcl- xl 为代表, 这些 Bcl-2 家族蛋白通过二聚体网络的形式相互作用, 调控细胞的凋亡^[8-9]。GFPS1b 的高、低剂量组中 Bax 阳性细胞数以及平均光密度(图 4)均高于对照组, 表明 GFPS1b 在较高剂量下能促进 B₁₆ 肿瘤组织细胞中 Bax 的表达; 而对于 Bcl-2 基因蛋白的影响(图 5), 高剂量组染色阳性的细胞数明显低于对照组, 同时与低剂量组相比也有一定的差异。

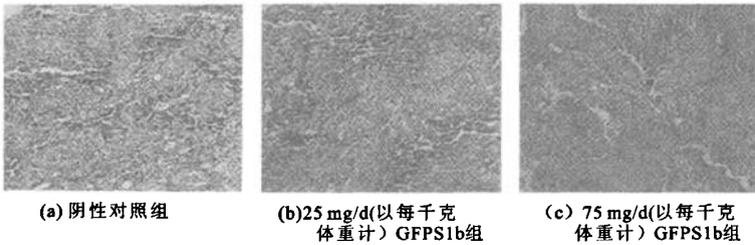


图3 GFPS1b 对小鼠 B₁₆ 肿瘤组织形态的影响(×100)

Fig.3 Histopathology of B₁₆ tumors from the transplanted tumor mice(×100)

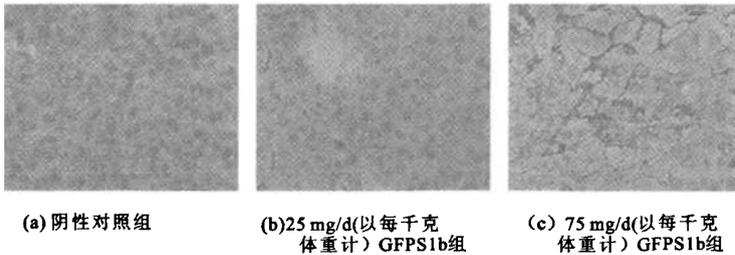


图4 GFPS1b 对小鼠 B₁₆ 瘤组织中 Bax 基因蛋白的表达影响(×400)

Fig.4 Immunohistochemical analysis of Bax in B₁₆ tumors from the transplanted tumor mice(×400)

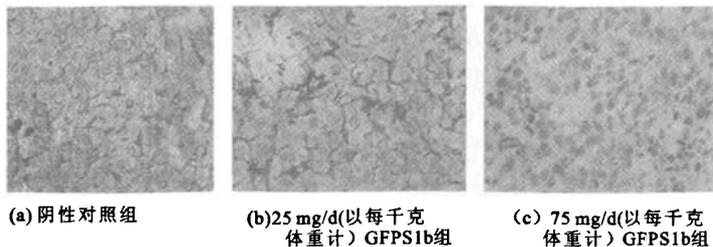


图5 GFPS1b 对小鼠 B₁₆ 瘤组织中 Bcl-2 基因蛋白的表达影响(×400)

Fig.5 Immunohistochemical analysis of Bcl-2 in B16 tumors from the transplanted tumor mice(×400)

从图4和图5中可以看出,Bcl-2和Bax阳性细胞均以弥漫性分布为主,少数也可呈局灶性分布;GFPS1b高剂量处理组中Bax表达呈强阳性,Bcl-2表达为弱阳性;这与对照组中Bax呈弱阳性,Bcl-2染色呈强阳性有显著差异。该结果提示GFPS1b可能是通过上调Bax蛋白表达、下调Bcl-2表达来增强细胞凋亡作用,从而显示抑瘤效应。

2.5 白细胞计数

从表2中可以看出,与阴性对照组相比,只有CY组中白细胞计数有所下降,而GFPS1b高、中、低的3个剂量组中白细胞略有上升。大多数的化疗药物,包括CY均有骨髓抑制这一不良反应,实验结果符合上述结论。GFPS1b在发挥抗肿瘤作用的同时,并不影响骨髓造血系统,表现出一定的优越性。

3 结 语

作者主要对灰树花菌丝体糖肽GFPS1b的体内抗肿瘤作用及其可能的机制进行了初步检测与评价,以小鼠移植黑色素瘤B₁₆模型评价GFPS1b的抑瘤效果,在高剂量(75 mg/d)下抑瘤率达45.39%,显示较强抗肿瘤作用;与阴性对照比较

表2 荷瘤小鼠白细胞计数

Tab. 2 Numbers of WBC of mice transplanted B₁₆ melanoma cells

组别	剂量/(mg/d) (以每千克 体重计)	鼠数/ 只	白细胞数/ ($\times 10^9/L$)	白细胞计数 变化比/%
阴性对照组	—	10	9.06 \pm 2.24	—
CY组	20	10	7.51 \pm 1.17	-17.11
低剂量组	25	10	9.37 \pm 1.92	3.42
中剂量组	50	10	9.53 \pm 2.01	5.18
高剂量组	75	10	9.49 \pm 1.54	4.73

GFPS1b能延缓肿瘤的生长速度;并能有效提高荷瘤小鼠的存活率;HE染色表明GFPS1b高剂量组能使B₁₆肿瘤细胞呈团索状实性排列或弥漫性分布,并有肿瘤细胞大片坏死,坏死区周围可见凋亡细胞;免疫组化技术显示GFPS1b诱导瘤组织中Bax基因蛋白表达,同时也能显著下调Bcl-2蛋白的表达,表明该组分具有较强的体内抑制肿瘤的活性。因此,值得深入研究其体内外抗肿瘤作用及机制,为进一步开展结构和功能的关系研究及开发灰树花生物活性物质奠定基础。

参考文献(References):

- [1] 肖建辉,蒋依辉,梁宗琦,等. 食药用真菌多糖研究进展[J]. 生命的化学, 2002, (22): 148-151.
XIAO Jian-hua, JIANG Nong-hui, LIANG Zong-qi, et al. Advance in research and exploitation of polysaccharides from edible and medicinal mushrooms[J]. *Chemistry of Life*, 2002, (22): 148-151. (in Chinese)
- [2] Borchers A T, Stern J S, Hanckman R M, et al. Mushrooms, Tumors, and Immunity[J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1999, 221: 281-293.
- [3] 崔凤杰,陶文沂,许泓瑜,等. 搅拌转速和通气量对灰树花深层发酵培养的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(4): 67-71.
CUI Fen-jie, TAO Wen-yi, XU Hong-yu, et al. Effects of agitation and aeration on the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Grifola frondosa* GF9801[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(4): 67-71. (in Chinese)
- [4] Cui F J, Tao W Y, Xu Z H, et al. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801[J]. *Bioresource Technol*, 2007, 98: 395-401.
- [5] 崔凤杰,郭文杰,许泓瑜,等. 灰树花菌丝体抗肿瘤糖肽GFPS1b结构的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(5): 66-76.
Cui Fen-jie, GUO Wen-jie, XU Hong-yi, et al. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(5): 66-76.
- [6] Hammond L A, Hilsenbeck S G, Eckhardt S G, et al. Enhanced antitumor activity of 6-hydroxymethylacylfulvene in combination with roptecan or paclitaxel in the MV522 lung carcinoma xenograft model[J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36: 2430-2436.
- [7] Han S B, Lee C W, Joo Y J, et al. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis[J]. *Immunopharmacology*, 1999, 41: 157-164.
- [8] Zhou G F, Sun Y P, Xin Y P, et al. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*[J]. *Pharmaco Res*, 2004, 50: 47-53.
- [9] Hale A J, Smith C A, Suthefiand L C, et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death[J]. *Eur J Biochem*, 1996, 236: 1-26.

(责任编辑:朱明)