

黑酵母 β -1,3-1,6-葡聚糖对小鼠肿瘤及免疫功能的影响

张亚茹, 丛峰松*

(上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要: 目的: 探讨黑酵母 β -1,3-1,6-葡聚糖对S180腹水移植瘤荷鼠瘤体生长以及免疫功能的影响。方法: 建立BALB/c小鼠S180腹水移植瘤模型, 每日给予 β -1,3-1,6-葡聚糖干预, 并测量瘤体积。21d后, 检测小鼠血清中10种细胞因子IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IFN- γ 、TNF- α 、TNF- β 和G-CSF的水平, 以及CD4、CD8、补体C3、IgG和IgM的含量。结果: β -1,3-1,6-葡聚糖能显著抑制S180移植瘤的生长($P<0.01$)。与空白对照组比较, 多糖灌胃组小鼠血清中细胞因子IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、TNF- α 、TNF- β 、IFN- γ 和G-CSF水平显著上升($P<0.01$, $P<0.05$)。CD4、CD8、CD4/CD8、补体C3、IgG和IgM含量也明显增加($P<0.01$, $P<0.05$)。结论: β -1,3-1,6葡聚糖对S180腹水移植瘤生长具有明显抑制作用, 其机制可能是通过促进细胞免疫和体液免疫的功能而实现的。

关键词: β -1,3-1,6-葡聚糖; 抗肿瘤; 免疫功能

Effects of Black Yeast β -1, 3-1, 6-Glucan on the Growth of Transplanted Ascites Tumors and the Immune System in Mice

ZHANG Ya-ru, CONG Feng-song*

(School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Objective: To investigate the inhibition of β -1,3-1,6 glucan derived from black yeast on the growth of transplanted ascites tumors and immune functions in mice. Methods: BALB/c mouse models with transplantation of S180 ascites tumors were established. The BALB/c mice bearing S180 ascites tumors were intervened by oral administration of black yeast β -1,3-1,6 glucan once daily. The volume of S180 ascites tumors was measured regularly during the 21-day administration period. Moreover, the levels of ten cytokines including IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , TNF- β and G-CSF in mouse serum were assayed and the contents of CD4, CD8, C3, IgG and IgM were also measured. Results: Compared with the blank control group, the intervention group showed a significant increase in the levels of the ten cytokines ($P<0.01$, $P<0.05$). In addition, the levels of CD4, CD8, CD4/CD8 ratio, C3, IgG and IgM were also increased significantly ($P<0.01$, $P<0.05$). Conclusion: β -1,3-1,6 glucan derived from black yeast can considerably inhibit the transplanted tumor growth of S180 and the mechanism underlying this great inhibitory effect may be related to improved cellular and humoral immune functions.

Key words: β -1,3-1,6-glucosan; anti-tumor activity; immune function

中图分类号: R730.53

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)19-0306-04

在药用食用菌领域, β -1,3-1,6-葡聚糖是一种大家都熟知的真菌多糖活性成分。其中最有名的是香菇多糖和裂褶多糖。这两种多糖已被许可作为抗癌剂药品投入使用。

黑酵母 β -1,3-1,6-葡聚糖(β -1,3-1,6 glucan)是日本学者从天然黑酵母(金霉素孢芽FERM-P4257)培养生产出

具有很高生理活性的水溶性胞外葡聚糖^[1]。这种 β -葡聚糖的结构, 与香菇多糖或裂褶多糖的结构极为相似, 分子呈三螺旋结构, 而相对分子质量大约在 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 之间。Ikewaki等^[2]采用黑酵母 β -葡聚糖外培养外周血单核细胞(PBMC), 发现可诱导IL-8的产生增加。Yatawara等^[3]发现黑酵母 β -葡聚糖作为免疫调节剂, 通过提高巨噬细

收稿日期: 2011-08-04

作者简介: 张亚茹(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤药物的研究开发。E-mail: zhangyaru85@sjtu.edu.cn

*通信作者: 丛峰松(1970—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为肿瘤药物的研究开发。E-mail: fscong@sjtu.edu.cn

胞及NK细胞的活性,对黑热病病原体亚马逊利什曼原虫(*L.amazonensis*)发挥噬菌作用。

本实验通过研究黑酵母 β -1,3-1,6-葡聚糖对S180移植瘤小鼠抑瘤作用以及免疫功能的影响,探讨其抗肿瘤机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

β -1,3-1,6葡聚糖(日本Sophy公司生产),由日本互惠交易株式会社惠赠;S180小鼠腹水瘤细胞购自中国科学院细胞库。

1640培养基 美国Gibco公司;胎牛血清 美国Hyclone公司;各类细胞因子检测试剂盒 美国R&D公司。

1.2 动物

BALB/c小鼠,雄性,SPF级,6~8周龄,20~22g/只,购自上海碧凯动物实验有限公司(生产许可证号:SCXK(沪)2003-00012)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与给药方法

BALB/c小鼠适应性喂养一周后造模,随机分为两组,空白对照组与 β -1,3-1,6葡聚糖药物组,每组10只。药物组给药剂量为5mg/100g,造模当天给药,每日一次,每次0.2mL口服灌胃。空白对照组给予与药物组同等剂量的生理盐水。

1.3.2 腹水移植瘤模型的建立

S180用含10%胎牛血清的1640培养基,于5%CO₂、37℃培养箱中培养。待其生长到对数生长期后,收集,调整细胞浓度为 1.0×10^7 个/mL。每只小鼠腋下种植0.2mL细胞悬液。

1.3.3 腹水移植瘤生长曲线的测定

造模9d后开始测定瘤体大小,测量瘤体的最长径(*a*)和最短径(*b*),之后每2d测定一次。根据公式 $V=ab^2/2$ 计算肿瘤体积,绘制腹水移植瘤生长曲线。计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率}/\% = \frac{\text{空白对照组瘤体体积} - \text{药物组瘤体体积}}{\text{空白对照组瘤体体积}} \times 100$$

1.3.4 样本处理

灌胃21d后,对小鼠进行眼眶采血,室温静置1.5h后,离心取上清,于-20℃冰箱保存。断颈处死小鼠,取瘤体称质量后,迅速冻在液氮中,后转移于-80℃冰箱保存。

1.3.5 细胞因子检测

选用细胞因子试剂盒,检测各种细胞因子的浓度,具体步骤严格按照试剂盒说明进行。

1.3.6 小鼠血清中补体C3水平的检测

按试剂盒说明书测定小鼠血清中补体C3的含量。

1.3.7 小鼠血清IgG、IgM水平的测定

按试剂盒说明书方法测定血清IgG、IgM含量。

1.3.8 小鼠血清CD4和CD8含量的测定

按试剂盒说明书方法测定小鼠血清中CD4和CD8含量。

1.4 数据统计

采用Excel软件进行数据分析,采用双样本方差分析, *t*检验,以 $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 肿瘤生长曲线及抑瘤率的测定

实验开始前,所有BALB/c小鼠生理状态均无明显差异。小鼠腋下移植瘤种植9d后,开始测量小鼠瘤体的生长曲线。

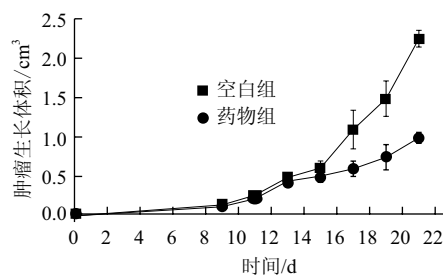


图1 S180腹水移植瘤生长曲线

Fig.1 Growth curve of transplanted S180 ascites tumors in BALB/c mice

由图1可知,随着时间的推移,空白对照组小鼠的瘤体生长速度较快, β -1,3-1,6-葡聚糖组小鼠的瘤体生长速度缓慢。21d后,小鼠采血后,断颈处死,剥离瘤体称质量,结果见表1。

表1 瘤质量及体质量($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effects of β -1,3-1,6 glucan on S180 tumor growth and mouse body weight ($\bar{x} \pm s, n=10$)

项目	空白对照组	药物组
体质量/g	25.310 \pm 2.410	23.600 \pm 1.460
瘤质量/g	3.081 \pm 0.998	0.898 \pm 0.396**
实际体质量/g	22.230 \pm 2.678	22.700 \pm 1.248
瘤质量/实际体质量	0.143 \pm 0.057	0.039 \pm 0.017**
抑瘤率/%		70.85

注:*.与空白对照组比较,差异显著($P < 0.05$);**.与空白对照组比较,差异极显著($P < 0.01$)。下同。

由表1可知, β -1,3-1,6-葡聚糖组与空白对照组相比瘤体大小差异显著($P < 0.01$),抑瘤率达70.85%。

2.2 β -1,3-1,6葡聚糖对移植瘤小鼠小鼠血清中细胞因子的影响

由表2可知, β -1,3-1,6-葡聚糖灌胃后,小鼠血清

中IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、G-CSF、TNF- α 、TNF- β 的含量均上升,与空白对照组比较,差异极显著($P<0.01$),差异具有统计学意义。IFN- γ 含量与空白对照组相比较,差异显著($P<0.05$)。

表2 小鼠血清中细胞因子的测定($\bar{x} \pm s, n=10$)

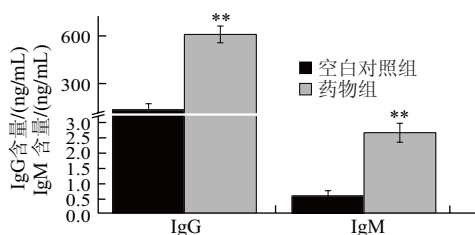
Table 2 Effects of β -1,3-1,6 glucan on cytokine levels in mouse blood

serum($\bar{x} \pm s, n=10$)			pg/mL
指标	空白对照组	药物组	
IL-2	216.576 \pm 66.004	912.878 \pm 72.036**	
IL-4	30.257 \pm 8.327	80.620 \pm 16.163**	
IL-6	34.515 \pm 2.999	82.946 \pm 13.628**	
IL-8	57.285 \pm 8.785	166.316 \pm 12.630**	
IL-10	404.768 \pm 35.001	673.272 \pm 40.305**	
IL-12	0.995 \pm 0.198	5.284 \pm 0.660**	
IFN- γ	425.537 \pm 52.853	503.201 \pm 43.922*	
TNF- α	217.007 \pm 33.128	573.126 \pm 38.860**	
TNF- β	66.628 \pm 5.625	130.744 \pm 6.332**	
G-CSF	275.950 \pm 59.676	758.219 \pm 69.910**	

2.3 β -1,3-1,6葡聚糖对移植瘤小鼠血清中补体C3含量的影响

通过检测小鼠血清中补体C3含量,发现 β -1,3-1,6-葡聚糖组补体C3含量(675.354 \pm 70.832) μ g/mL与空白对照组补体C3含量(259.993 \pm 30.594) μ g/mL相比较,差异极显著($P<0.01$)。说明 β -1,3-1,6葡聚糖促进小鼠血清中补体C3含量的上升。

2.4 β -1,3-1,6葡聚糖对移植瘤小鼠血清中IgG及IgM含量的影响



**与空白对照组比较,具有极显著差异($P<0.01$)。

图2 β -1,3-1,6葡聚糖对小鼠血清中IgG及IgM含量的影响

Fig.2 Effects of β -1, 3-1,6-glucan on IgG and IgM in mouse blood serum

由图2可知, β -1,3-1,6葡聚糖组IgG的含量为(609.813 \pm 52.963)ng/mL,空白对照组IgG的含量(134.244 \pm 38.290)ng/mL,两者相比差异极显著($P<0.01$)。 β -1,3-1,6葡聚糖IgM的含量为(2.902 \pm 0.342)ng/mL,空白对照组为(0.616 \pm 0.191)ng/mL,两者相比差异极显著($P<0.01$)。说明 β -1,3-1,6葡聚糖能促进移植瘤小鼠免疫球蛋白IgG及IgM的分泌合成。

2.5 β -1,3-1,6葡聚糖对移植瘤小鼠外周血CD4和CD8含量的影响

表3 β -1,3-1,6葡聚糖对小鼠外周血中CD4和CD8含量的影响

Table 3 Effects of β -1,3-1,6 glucan on CD4 and CD8 in mouse blood serum

组别	CD4含量/(U/mL)	CD8含量/(U/mL)	CD4/CD8
空白对照组	3.578 \pm 0.718	20.565 \pm 2.700	0.133 \pm 0.022
药物组	10.068 \pm 0.866**	60.211 \pm 2.409**	0.166 \pm 0.028*

由表3可知,与空白对照组相比, β -1,3-1,6葡聚糖CD4和CD8含量极显著增加($P<0.01$),CD4/CD8的比值显著升高($P<0.05$)。

3 讨论

临床实践表明,几乎所有的化学抗癌药物在杀伤肿瘤细胞的同时也杀伤正常的组织细胞,造成机体的免疫功能下降,降低了对放化疗药物的耐受性,因此,寻找既能抗癌又能保护机体免疫功能的辅助药物就显得极为必要。本实验中, β -1,3-1,6葡聚糖能明显减小S180移植瘤小鼠瘤体质量($P<0.01$),抑瘤率达到70.85%,抑瘤效果明显。

通常,人们认为 β -葡聚糖的抗肿瘤活性主要是通过增强机体免疫力来实现的。多糖具有激活网状内皮系统、巨噬细胞、T细胞和B细胞以及补体系统^[4]。本实验中,与空白对照组相比, β -1,3-1,6葡聚糖小鼠血清中细胞因子IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、TNF- α 、IFN- γ 、TNF- β 和G-CSF水平显著上升,差异具有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$)。在天然免疫应答及获得性免疫应答过程中,细胞因子表现出重要的调节功能。只有当炎症细胞因子和抗炎细胞因子达到相对平衡,才能维持机体正常的免疫状态、抗病和正常生理活动^[5]。本实验中, β -1,3-1,6葡聚糖不仅促进IL-6、IL-8、TNF- α 、IFN- γ 等炎症细胞因子的分泌,也同时促进抗炎细胞因子IL-4、IL-10的合成。说明 β -1,3-1,6葡聚糖能刺激肠黏膜中的肠上皮细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、抗原呈递细胞、NK细胞等分泌各种细胞因子,细胞因子作为信号分子进而影响产生细胞因子的免疫细胞及其他细胞,最终发挥介导免疫应答、炎症反应并进行调节等一系列免疫调节功能,以达到抗肿瘤的效果。

本实验中, β -1,3-1,6葡聚糖灌胃组小鼠外周血中CD4和CD8的含量明显上升,说明小鼠体内大量的T细胞被激活,T细胞表面的CD4及CD8的抗原表达上升^[6]。推测 β -1,3-1,6葡聚糖可能激活CD4细胞,增强细胞免疫,同时促使荷瘤机体CD8细胞的增殖与活化,诱导细胞毒性T细胞的产生,直接杀伤肿瘤细胞,从而产生抗肿瘤的效应。CD4/CD8的比值上升,提示免疫应答的正调节占

优势。

在调节B细胞应答方面,作为天然免疫系统重要成员的补体,起到了至关重要的作用^[7-9]。以往的研究已经证实, β -葡聚糖通过途径活化补体^[10],促进补体C3的提高^[11]。这与实验的结论是一致的,当用 β -1,3-1,6葡聚糖灌胃小鼠后,促进小鼠补体C3含量上升。

IgG、IgM 水平反映体液免疫能力。体液免疫就是通过B细胞分泌的抗体(免疫球蛋白)来杀灭病原体和癌细胞。本实验中,多糖灌胃组小鼠血清中IgG 及IgM的含量相比较空白对照组明显上升。说明 β -1,3-1,6葡聚糖不仅能促进以宿中介导的T 淋巴细胞免疫,也能刺激B淋巴细胞分泌抗体,增强体液免疫的功能。

β -葡聚糖作为一种免疫调节剂,能够通过肠黏膜系统的受体相互作用,影响细胞因子的分泌,从而调节机体的免疫系统,达到抑制肿瘤的作用。本实验的研究结果为其在功能性食品和其他一些领域的应用提供了参考,并为其发挥免疫调节作用抗肿瘤的分子机制提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 池胁信直,藤井升,尾仲隆,等. 由金霉素芽孢FERM-P4257提取的新微生物多糖对于生物体免疫反应的影响特征[J].日本临床免疫, 2002, 38(3): 313-319.
- [2] IKEWAKI N, FUJII N, ONAKA T, et al. Immunological actions of sophy- β -glucan (β -1,3-1,6 glucan), currently available commercially as a health food supplement[J]. Microbiol Immunol, 2007, 51(9): 861-873.
- [3] YATAWARA L, WICKRAMASINGHE S, NAGATAKI M, et al. Aureobasidium-derived soluble branched (1,3-1,6) β -glucan (sophy β -glucan) enhances natural killer activity in leishmania amazonensis-infected mice[J]. Korean J Parasitol, 2009, 47(4): 345-351.
- [4] 白日霞. 多糖免疫药物研究进展[J]. 大连民族学院院报, 2003, 5(1): 38-40.
- [5] 庞广昌. 食品免疫论: 关于胃肠黏膜免疫和细胞因子网络的科学[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [6] 胡颖, 宋作珪. 自身免疫性疾病患者血清可溶性CD4、CD8的测定及临床意义[J]. 浙江医学, 2003, 25(12): 719-720.
- [7] Da COSTA X J, BROCKMAN M A, ALIEOT E, et al. Humoral response to herpes simplex virus is complement-dependent[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(22): 12708-12712.
- [8] MOLINA H, HOIERS V M, LI Bin, et al. Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2[J]. Proc Nad Acad Sci USA, 1996, 93(8): 3357-3361.
- [9] DEMPSEY P W, ALLISON M E D, AKKARAJU S, et al. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity[J]. Science, 1996, 271: 348-350.
- [10] CZOP J K, AUSTEN K F. Properties of glycans that activates the human alternative complement pathway and interact with the human monocyte beta-glucan receptor[J]. Immunol, 1985, 135(5): 3388-3393.
- [11] 郭波, 李华, 郑萍, 等. β 葡聚糖对小鼠抗体产生的影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(11): 946-948.