

云芝多糖对增强巨噬细胞抗肿瘤作用的实验研究*

邵 伟

(天津师范大学 生物系)

提高机体免疫水平的措施控制肿瘤生长,已成为人们比较注意的研究课题。自1961年以来,曾发现某些菌体制剂如卡介苗(BCG)等,可刺激巨噬细胞活性并增强其对小鼠多种肉瘤生长的抑制作用^[6,9]。近十年来又相继发现某些担子菌多糖有很强的抗癌活性^[2],并且对其中的香菇多糖(Lentin)和云芝多糖(Crestin)的抗癌机理进行了广泛研究,证实它们能够活化T淋巴细胞并通过细胞免疫抑制肿瘤生长,但对机体巨噬细胞无作用^[1,4,8]。只是近年来见有报道^[9],当载瘤小鼠经香菇多糖治疗,它的腹膜巨噬细胞同瘤细胞进行混合接种时,可呈现显著的抗肿瘤作用。

本文报告的是关于云芝多糖对增强巨噬细胞抗肿瘤活性的实验研究结果。

材 料 和 方 法

实验用动物均为ICR或Iaca纯系小白鼠,雄性,体重在18—24克。

多糖的制备^[7],先将野生云芝子实体粉碎,用热水浸提,滤液减压浓缩后醇析,醇析物水溶后,用赛瓦格法(丁醇、氯仿为1:4)去蛋白,再用透析袋流水透析除低分子物质。再次醇析,沉积物经无水乙醇及乙醚洗涤,干后为半精制品的灰黄色粉末,多糖含量在400—500毫克/克。

抑瘤实验,先在小白鼠右前肢腋部皮下接种 1.8×10^6 艾氏腹水癌细胞,24小时后,每天一次口服云芝多糖300毫克/公斤体重,连续10天。接瘤至四周,取瘤称重,计算抑瘤效果。每组用鼠10只,接瘤后以幸存的鼠数做为一组计算抑瘤率。

巨噬细胞吞噬实验,先在小白鼠右前肢腋部皮下接种 1.5×10^6 个艾氏腹水癌细胞后,连续6天每天1次口服云芝多糖300毫克/公斤体重,于第七天全部实验小白鼠腹腔注射8%淀粉肉汤3毫升,24小时后,各鼠再腹腔注射2%鸡红血球0.5毫升,1小时处死小鼠,取腹腔液涂片,甲醇固定,吉姆萨(Giemsa)染色。用油镜检查巨噬细胞,每只鼠分别计算出100个巨噬细胞吞噬鸡红血球的百分数和吞噬指数。

混合接种的抑瘤实验,采用皮姆和贝尔万(Pimm, Balwin, 1975^[9])建立的方法。细胞培养液用日本制的No. 199粉末配成的,其中含10%小牛血清,每毫升培养液中含双抗各100单位,最后以3.5%碳酸氢钠调pH7供使用。每0.2毫升混合培养液中的瘤细胞、巨噬细胞以及云芝多糖用量(见表3—4)。混匀后在37℃恒温箱内培养4小时,期间每隔半小时摇动一次。给小白鼠皮下接种后至两周或三周,取瘤称重,按下式计算抑瘤效果:

$$\text{抑瘤率} = \left(1 - \frac{\text{实验组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}}\right) \times 100$$

实 验 结 果

(一) 云芝多糖对艾氏实体瘤生长的抑制
接瘤的小白鼠经云芝多糖治疗10次,至28天时肿瘤与对照组比较,明显缩小(见表1)。对照组各鼠的肿瘤大小比较均匀,生长至28天的瘤重都达1克左右。实验组的肿瘤大小不等,有的完全消失。对照组平均瘤重是 $1.074 \pm$

* 参加工作的还有吉林省生物研究所的杨风和东北师大生物系张晓萍同志。

0.253 克, 实验组平均瘤重仅为 0.406 ± 0.151 克, 抑瘤率 62%。

(二) 云芝多糖对巨噬细胞吞噬活性的影响 用腹膜巨噬细胞吞噬鸡红血球的百分数和吞噬指数做指标, 载瘤小鼠经云芝多糖治疗后, 巨噬细胞的吞噬活性比正常鼠和载瘤鼠增高很多(见表 2), 以吞噬指数为例, 正常鼠是 1.385 ± 0.277 , 载瘤鼠是 1.320 ± 0.135 , 两者很

表 1 云芝多糖对小白鼠艾氏实体瘤生长的抑制效果

项目	鼠数	小鼠品系	多糖剂量 (毫克/公斤 体重×天)	平均瘤重 (克±S.E)	抑瘤率 (%)	肿瘤消 退数
实验组	9	ICR	7×10	0.406 ± 0.151	62.0	2/9
对照组	8	ICR	—	1.074 ± 0.253		0/8

表 2 云芝多糖对小白鼠腹膜巨噬细胞吞噬功能的影响

项目	鼠数	小白鼠品系	吞噬活性		机率(P)
			吞噬百分数 (均值±S.E)	吞噬指数 (均值±S.E)	
正常鼠	6	杂鼠	47.33 ± 4.381	1.385 ± 0.277	P<0.001
载瘤鼠	6	杂鼠	50.38 ± 3.319	1.320 ± 0.135	
载瘤给药鼠	6	杂鼠	80.50 ± 2.720	2.763 ± 0.121	

相近, 而载瘤鼠经云芝多糖治疗, 吞噬指数则增至 2.763 ± 0.121 , 高于正常鼠一倍, 经统计学处理, 差异非常显著 ($P < 0.001$), 说明云芝多糖对小鼠腹膜巨噬细胞的吞噬活性有增强作用。

(三) 混合接种的抑瘤效果 把豚鼠腹膜巨噬细胞同艾氏腹水癌细胞按一定比率混合, 经体外短时间培养给小鼠接种于皮下, 有明显的抑瘤作用; 如果在接种液内加入微量的云芝多糖, 可显出强烈的抑瘤效果, 而且有很好的重复性(见表 3)。例如, 当瘤细胞与巨噬细胞比率为 1:1, 抑瘤率是 78.3%, 其中加有云芝多糖, 抑瘤率则增至 98.8%, 肿瘤消退数也相应增多。另外, 改变巨噬细胞与瘤细胞的比率, 可提高抑瘤效果, 如增加巨噬细胞用量使两者比例为 1:7 时, 抑瘤率可达 95.1%。

用同品系小白鼠的腹膜巨噬细胞进行类似混合接种实验, 获得实验结果同以上实验大体相同, 若瘤细胞与巨噬细胞混合接种的抑瘤率是 66.6%, 而瘤细胞与巨噬细胞加有云芝多糖混合接种时, 抑瘤率可达 96.3%。值得注意的是, 只是瘤细胞同云芝多糖混合接种, 同样能抑制肿瘤生长, 抑瘤率可达 70.3%, 原因可能是云芝多糖对瘤细胞直接伤害而引起的。据报道, 云芝多糖对体外培养的瘤细胞, 能引起一定的形态变化。

为了说明云芝多糖能增强巨噬细胞活性, 在混合接种液中加入硅酸粉尘封阻巨噬细胞活性后再接种。从肿瘤生长至两周的抑瘤效果, 可看出巨噬细胞活性因封阻而抑瘤效果下降(表 4)。

从表 4 看出, 在瘤细胞、巨噬细胞、云芝多糖混合接种情况下, 抑瘤率为 80.6%, 当混合接

表 3 瘤细胞同巨噬细胞以及加云芝多糖混合接种的抑瘤效果

项目	鼠数	小鼠品系	0.2 毫升混合接种液			平均瘤重 (克)	抑瘤率 (%)	肿瘤消退数
			瘤细胞数	巨噬细胞数	云芝多糖 (微克)			
实验组 I	8	ICR	2.2×10^6	2.4×10^6	1×10^3	0.013	98.8	7/8
实验组 II	8	ICR	2.2×10^6	2.4×10^6		0.231	78.3	3/8
对照组	8	ICR	2.2×10^6			1.068		0/8
实验组 I	10	ICR	1.4×10^6	9.5×10^6	3.3×10^3	0.032	95.1	7/10
实验组 II	10	ICR	1.4×10^6	9.5×10^6		0.035	94.5	9/10
对照组	10	ICR	1.4×10^6			0.642		0/10
实验组	10	Laca	1×10^6	2×10^6	1×10^3	0.001	99.9	9/10
对照组	10	Laca	1×10^6			0.718		0/10

表 4 瘤细胞、巨噬细胞、云芝多糖混合接种液加硅酸粉尘的抑瘤效果

项目	鼠数	小鼠品系	0.2毫升混合接种液				平均瘤重 (克)	抑瘤率 (%)	肿瘤消退数
			瘤细胞数	硅酸粉尘 (1毫克/0.1毫升)	巨噬细胞数	云芝多糖 (微克)			
实验组 I	8	Laca	1×10^6	—	2×10^6	1×10^8	0.045	80.6	4/8
实验组 II	10	Laca	1×10^6	2	2×10^6	1×10^8	0.111	52.3	0/10
对照组	8	Laca	1×10^6	—	—	—	0.233		0/8

种液加入硅酸粉尘再接种时，抑瘤率则下降为 52.3%。表明云芝多糖确有提高巨噬细胞抑制瘤生长的作用。

综上所述，主要的实验结果呈现出肿瘤生长受抑制情形(见图 1—3)。

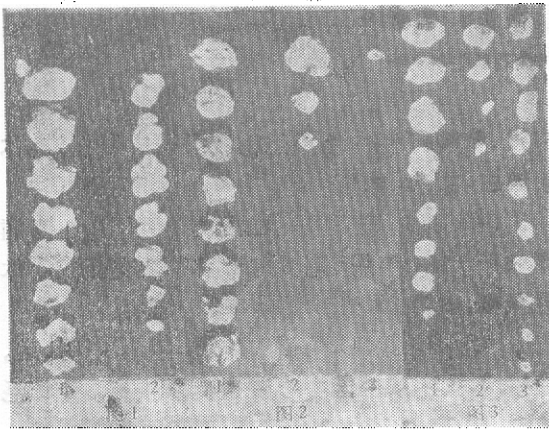


图 1 云芝多糖对 ICR 小白鼠艾氏实体瘤生长的抑制作用
1. 对照组实体瘤。 2. 经云芝多糖治疗后的实体瘤, 有 2 只鼠的肿瘤完全消失。

图 2 艾氏腹水癌细胞、豚鼠腹膜巨噬细胞、云芝多糖混合接种后的抑瘤作用

1. 对照组实体瘤。 2. 瘤细胞与巨噬细胞混合接种的实体瘤, 有 5 只鼠的肿瘤消失。 3. 瘤细胞、巨噬细胞、云芝多糖混合接种的实体瘤, 有 7 只鼠肿瘤消失。

图 3 艾氏腹水癌细胞、豚鼠巨噬细胞、云芝多糖混合接种以及加入硅酸粉尘后的抑瘤作用

1. 对照组实体瘤。 2. 瘤细胞、巨噬细胞、云芝多糖混合接种的实体瘤。 3. 混合接种液再加硅酸粉尘后接种的实体瘤。

讨 论

现代肿瘤免疫研究认为，受激活的巨噬细胞可通过释放识别因子(RF) 确认具有异体抗原性的瘤细胞, 抗原经巨噬细胞吞噬、加工、降

解后, 向 T 淋巴细胞提供免疫信息, 引起最大免疫反应, T 淋巴细胞则可放出特异性巨噬细胞武装因子(SMAF), 加强巨噬细胞对瘤细胞特异性杀伤作用。另外, 巨噬细胞同瘤细胞表面接触, 通过分泌溶酶体酶直接杀伤瘤细胞, 或者是释放生长抑制因子(GIF) 阻止瘤细胞增殖。

在大鼠和小鼠原发或移植的瘤块中证实有巨噬细胞活动, 据盖逊(Gershon)^[7] 估计, 巨噬细胞占增殖细胞数的 4—50%, 其数量往往与肿瘤容量成反比。皮姆(Pimm) 证实, 当用卡介苗同大鼠纤维肉瘤细胞或肝癌 D₂₃ 细胞混合接种于无胸腺小鼠(nu/nu) 时, 在受抑制瘤块中的巨噬细胞占细胞总量 9—25%, 暗示受激活的巨噬细胞有抑制肿瘤生长作用。60 年代以来, 发现某些菌体制剂是巨噬细胞激活剂^[6]。近 10 多年来又证明某些担子菌多糖通过活化 T 淋巴细胞的细胞介导免疫抑制肿瘤生长, 但对巨噬细胞似乎无影响[1, 4, 8]。最近秋山由纪雄等报告^[9], 载瘤小鼠用香菇多糖后, 将小鼠腹膜巨噬细胞再同 P851 或 L5178Y 瘤细胞混合接种给小鼠, 提高抑瘤率达 79—98%, 表明香菇多糖有激活巨噬细胞作用。

我们的研究表明, 采用混合接种, 云芝多糖可增强巨噬细胞的抗肿瘤活性。例如只用瘤细胞同巨噬细胞混合接种的抑瘤率为 78.3%, 而混合接种液中加入云芝多糖时的抑瘤率则提高为 98.8%, 假如用硅酸粉尘封阻巨噬细胞活性, 抑瘤效果明显下降。云芝多糖能增强巨噬细胞抗肿瘤活性的机理尚不清楚, 可能同促进巨噬细胞的溶酶体酶的分泌有关, 或者是促进巨噬细胞可溶性毒性因子的释放有连系。

参 考 文 献

- [1] 古江尚等 1977 癌化学疗法の基础と临床, 162—164。癌化学疗法社。
- [2] 邵伟 1980 真菌多糖的抗肿瘤活性, 自然杂志 3(6): 675—677。
- [3] 邵伟等 1981 云芝多糖对小白鼠实验性肝炎的某些药理作用。东北师大学报, 自然科学版 2 期: 69—80。
- [4] 前田幸子等 1976 蛋白质、核酸: 酵素, 21(6): 125。
- [5] 秋山由纪雄等 1981 蛋白质、核酸、酵素, 26(3): 208—224。
- [6] Hersh, E. M. et al., 1973: Immunotherapy of Cancer in a man. Chales c thomas, 71—74.
- [7] Nelson, S. D., 1976: "Immunobiology of the macrophage", Academic Press, 491—493.
- [8] Maeda, Y. et al., 1971: Lentinen, a new immuno-accelerator of cell-mediated responses. *Nature*, 229: 634.
- [9] Pimm, M. V. et al., 1975: BCG immunotherapy of rat tumors in a thymic nude mice. *Nature*, 254: 77—78.
- [10] Rose, R. N. et al., 1979: "Principles of Immunology", Macmillan Publishing co, INC. 155—166.