

• 基础实验研究论著 •

灵芝酸 G 对小鼠巨噬细胞免疫活性的研究*

李仲娟^{1,2}, 杨朝令¹, 胡芳², 喻昕¹, 汪宏良^{1,2Δ}

(1. 湖北理工学院医学院检验系, 湖北黄石 435003; 2. 黄石市中心医院, 湖北黄石 435000)

摘要:目的 研究灵芝酸 G 对小鼠巨噬细胞活化及肿瘤细胞的杀伤作用。方法 流式细胞仪测定小鼠巨噬细胞的表面分子表达; ELISA 法检测小鼠腹腔巨噬细胞分泌 IL-1 和 TNF 的水平; MTT 法检测巨噬细胞因子对肿瘤细胞的抑制能力。结果 灵芝酸 G 经过 3 天刺激能激活小鼠巨噬细胞表面分子 CD68; 体外实验显示, 1 μg/mL 灵芝酸可以诱导小鼠巨噬细胞分泌 IL-1 和 TNF-α; 灵芝酸 G 诱导巨噬细胞因子抑制肿瘤细胞的能力与 5 μg/mL 吉西他滨没有显著不同, 但二者明显高于空白对照组。结论 灵芝酸 G 能诱导小鼠巨噬细胞产生 M1 型细胞因子, 杀伤肿瘤细胞。

关键词:灵芝; 巨噬细胞; 白细胞介素 1; 细胞因子类; 流式细胞术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)13-1640-02

Effect of ganoderic acid G chalcone-G on Macrophages of immunity activity in mice*

Li Zhongjuan^{1,2}, Yang Chaoling¹, Hu Fang², Yu Xin¹, Wang Hongliang^{1,2Δ}

(1. Department of of Clinical Laboratory, Huangshi, Hubei 435003, China; 2. Huangshi Central Hospital Hubei Polytechnic College of Medical College, Huangshi, Hubei 435000, China)

Abstract: **Objective** To study the ganoderic acid Gon macrophage activation in mice and cell-killing effect on tumor cells. **Methods** Macrophages subface were measured with flow cytometry. IL-1 and TNF-α in mice peritoneal macrophages were detected by ELISA. In hibition effect of macrophage factor on tumor cells was measured with MTT assay. **Results** After stimulation with ganoderic acid G, mice peritoneal macrophages in an increased expression of CD68 was up regulated and the IL-1 and TNF levels secreted by macrophages at 1 μg/mL with ganoderic acid G in vitro experiments. Compared with inhibition effect of tumor cells, there was no significant difference between ganoderic acid G induced macrophage cytokine and 5 μg/mL gemcitabine, but there was significant difference with the control group. **Conclusion** Type M1 macrophages in mice maybe is activated by ganoderic acid G, killing tumor cells.

Key words: ganoderma lucidum; macrophages; interleukin-1; cytokines; flow cytometry

灵芝酸 G 是从赤芝中以高效液相色谱法分离出的 15 种三萜类活性成分之一^[1]。虽然目前有更多的分离方法都能分离出灵芝酸 G 或更多的单体成分^[2-3], 但由于分离样品量的限定, 只有少数单体如灵芝酸 A、灵芝酸 B 和灵芝酸 H 等的药理作用被研究^[4-7], 本实验拟通过灵芝酸 G 诱导小鼠体内巨噬细胞活化, 研究灵芝酸 G 对小鼠巨噬细胞产生细胞因子的影响及杀肿瘤细胞的机理。

1 材料与与方法

1.1 试剂 浓度为 20 mg/mL 灵芝酸 G 由日本灵芝研究所友情提供。小鼠 INF-γ 抗体和 A20 细胞由日本东京女子医科大学免疫室友情提供。FITC-CD68 抗体购自贝克曼公司, 酶标板、PRMI-1640 培养粉购自 GIBCO 公司, Hanks 液、胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司, IL-1 和 TNF 试剂盒购自上海博谷生物科技有限公司。

1.2 动物 清洁级 C57BL/6 纯系小鼠, 雄性, 8 周龄, 体质量 18~22 g, (武汉大学实验动物学部提供, 许可证号 SCXK(鄂)2008-0004), 小鼠随机分为溶剂对照组和灵芝酸 G 组, 每组 10 只, 实验室饲养 1 周后, 连续腹腔注射蒸馏水或灵芝酸 G 3 天, 收集小鼠腹腔细胞进行试验。

1.3 方法

1.3.1 小鼠腹腔巨噬细胞的分离及培养 取 C57BL/6 小鼠, 脱颈椎处死, 腹腔注入冰冷的 10% FCS RPMI 1640 5 mL, 轻揉腹部 2 min, 吸出腹腔液, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 细胞洗涤 3 次后, 0.04% 台盼蓝染色计数活细胞。将 2 × 10⁶ 个细胞加入 35 mm 细胞培养皿中放入 37 °C 5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱内培养 1 h 后, 收集贴壁细胞, 即为小鼠腹腔巨噬细胞。

1.3.2 细胞表面分子 CD68 的检测 用 4 °C 预冷的 PBS 收集 12 孔细胞培养板中的巨噬细胞, 并用冰冷的流式细胞缓冲液 (FACS 液) 洗涤 2 次, 加入纯化的鼠 IgG 封闭细胞表面 Fc 受体, FITC 标记的抗小鼠 CD68 单抗 4 °C 冰浴 30 min 染色, FACS 液淋洗 3 次, 经流式细胞仪进行样本测定设 FITC 标记的同种型 IgG 作对照。

1.3.3 细胞因子的检测 IL-1(或 TNF-α) 的检测按说明书进行。简而言之, 取包被抗单克隆抗体 96 孔酶标板, 加入 100 μL 巨噬细胞培养上清或已知浓度的标准抗体, 37 °C 孵育 1 h 洗涤 3 次。再加入 100 μL 酶标抗体, 继续孵育 1 h, 洗涤 3 次后加入等量底物液, 室温孵 15 min 加入终止液。450 nm 测定光密度值(D₅₅₀), 绘制标准曲线, 计算样本细胞因子水平。

1.3.4 肿瘤细胞抑制检测 取对数期 A20 细胞用 10% PR-

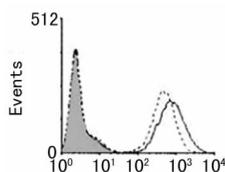
* 基金项目:湖北省科技项目(编号 2011Cdc116);黄石市科技项目(黄科农[2011]1 号-16);湖北理工学院项目(编号:RCYJ20113012);并获得湖北省重点学科湖北理工学院药理学学科资助。 作者简介:李仲娟,女,博士,副教授,主要研究领域为细胞免疫。 Δ 通讯作者, E-mail: jy69970@163.com。

MI-1640 洗涤 2 次,调整细胞浓度为 10^7 个/mL。将细胞悬液分别加入 96 孔培养板中,3 孔为一个平行样,首 3 孔为对照,每孔最终为 0.2 mL。一组加入 $5 \mu\text{g/mL}$ 吉西他滨,另一组加腹腔巨噬细胞上清液 $100 \mu\text{L}$ 。置 $5\% \text{CO}_2$ 37°C 培养。培养结束前 4 h,每孔轻轻吸去上清液 $180 \mu\text{L}$,加入 $130 \mu\text{L}$ RPMI 1640 细胞培养液,同时加入 MTT(5mg/mL) $50 \mu\text{L/孔}$ 继续培养到 72 h,加入 1 mL 盐酸异丙醇混匀,使紫色结晶完全溶解。酶联免疫检测仪上波长 570nm 比色测定。

1.34 统计学处理 采用 SPSS 14.0 统计学软件,用量样板 *t* 检验对各组数据进行比较。 $P < 0.05$ 有统计学意义,所有结果均经过 3 次的重复实验。

2 结 果

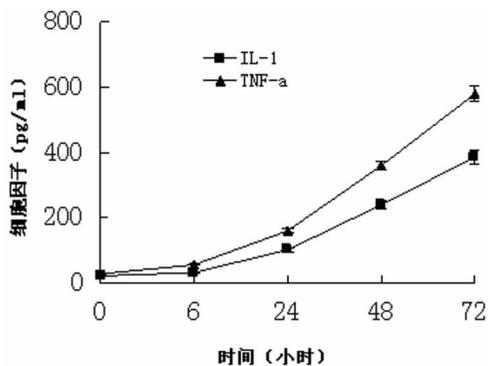
2.1 灵芝酸 G 对小鼠腹腔巨噬细胞表面受体 CD68 表达的测定 本实验通过灵芝酸 G 或 $\text{INF-}\gamma$ 抗体对巨噬细胞培养 3 d,收集巨噬细胞进行染色,流式细胞仪测定 CD68 分子的表达,图 1 显示灵芝酸 G 通过 CD68 分子激活巨噬细胞。实验结果为 3 次中的 1 次代表。



巨噬细胞每孔 1×10^6 ,分别加入 $1 \mu\text{g/mL}$ 灵芝酸 G 或 $\text{INF-}\gamma$ 抗体培养 48 h 后,收集巨噬细胞用 FITC 标记的小鼠 CD68 抗体染色,流式细胞仪测定。灰色标记没有加入刺激物的细胞,虚线表示小鼠 $\text{INF-}\gamma$ 抗体诱导活化的细胞,黑色线是灵芝酸 G 诱导活化的细胞。

图 1 灵芝酸 G 诱导巨噬细胞 CD68 表达

2.2 灵芝酸 G 诱导小鼠巨噬细胞产生细胞因子 灵芝酸 G 通过 CD68 分子激活巨噬细胞,分析 $1 \mu\text{g/mL}$ 灵芝酸 G 的细胞培养上清液发现,灵芝酸 G 诱导的巨噬细胞 G 24 h 开始细胞因子,72 h 到达顶峰。灵芝酸 G 对 MII 型细胞因子无影响,但对 MI 细胞因子的分泌有明显的增高, $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-1 的含量分别为 580pg/mL 和 386pg/mL 。与空白孔相比,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。

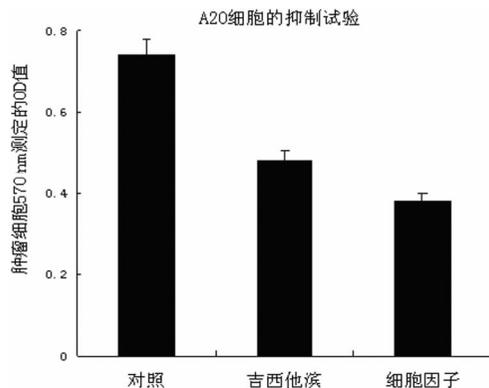


巨噬细胞每孔 3×10^6 ,分别加入 $1 \mu\text{g/mL}$ 灵芝酸 G,24 孔板培养 72 h 后 ELISA 法检测吸光度。

图 2 灵芝酸 G 诱导巨噬细胞分泌细胞因子

2.3 灵芝酸 G 诱导的细胞因子对小鼠肿瘤细胞 A20 的抑制作用 细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 可以促进肿瘤细胞的凋亡,本实验通过检测灵芝酸 G 诱导巨噬细胞分泌的 $\text{TNF-}\alpha$ 对小鼠肿瘤细胞 A20 的作用显示,阳性对照吉西他滨对肿瘤细胞 A20 的作用

明显,与对照细胞相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。细胞因子对肿瘤细胞 A20 优于吉西他滨,两者之间有显著差异($P < 0.05$),见图 3。



肿瘤细胞每孔 1×10^6 ,分别加入细胞培养液、细胞因子 $100 \mu\text{L}$ 和 $5 \mu\text{g/mL}$ 吉西他滨,培养 24 h 后 MMT 测定吸光度。

图 3 细胞因子对肿瘤细胞的抑制作用

3 讨 论

巨噬细胞在机体炎症反应中扮演着重要的角色,有报道指出,灵芝三萜类活性成分能调节巨噬细胞参与机体炎症反应^[8-10]。巨噬细胞的成熟与机体内的微环境分不开^[11-12],我们前期的研究显示,灵芝多糖对巨噬细胞的活化是通过经典活化途径来实现^[13],本次通过 $\text{INF-}\gamma$ 诱导的巨噬细胞活化作为灵芝酸 G 的阳性对照,探讨巨噬细胞表面受体 CD68 的表达发现, $\text{INF-}\gamma$ 或灵芝酸 G 诱导的 CD68 的表达图形基本一致,这充分说明两种诱导方式可能相同。随后的细胞因子测定也证明了该结论。本次细胞因子测定说明,灵芝酸 G 对 M2 型细胞因子并无影响,而对 M1 型细胞因子 IL-1 和 $\text{TNF-}\alpha$ 的分泌有促进作用。

近年来, $\text{TNF-}\alpha$ 在诱导 T 细胞增殖和杀肿瘤细胞引起广泛关注^[14]。为了进一步了解巨噬细胞杀肿瘤方面的能力,通过体外实验测定抗肿瘤药物吉西他滨 15 对小鼠肿瘤细胞 A20 的杀伤作用来对照灵芝酸 G 诱导的 M1 型细胞因子的杀伤能力。吉西他滨对 A20 的抑制吸光度为 0.52,与正常生长巨噬细胞吸光度 0.78 相比有显著性差异,灵芝酸 G 诱导 M1 型细胞因子比吉西他滨对 A20 的抑制吸光度更低说明,灵芝酸 G 诱导产生 M1 型细胞因子对 A20 的抑制能力可能更强。这些结论还需通过灵芝酸 G 杀肿瘤细胞的信号途径和肿瘤细胞凋亡家族的酶的活性来证实。

参考文献

[1] Gao JJ, Nakamura N, Min BS, et al. Quantitative determination of bitter principles in specimens of Ganoderma lucidum using high-performance liquid chromatography and its application to the evaluation of Ganoderma products[J]. Chem Pharm Bull, 2004, 52 (6): 688-695.
 [2] Wang XM, Yang M, Guan SH, et al. Quantitative determination of six major triterpenoids in Ganoderma lucidum and related species by high performance liquid chromatography[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41(3): 838-844.
 [3] Yang M, Wang X, Guan S, et al. Analysis of triterpenoids in Ganoderma lucidum using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry[J]. J Am (下转第 1644 页)

PCT 的临床解释未采用盲法,则 PCT 的检测结果会在很大程度上影响临床医师的判断,PCT 增高的患者可能更容易被怀疑为 IE,更可能接受到超声心动图和血培养等检查,这种情形显然不利于“客观”评价 PCT 对 IE 的诊断价值。

总之,本研究对已经发表的关于 PCT 诊断 IE 的研究进行了系统评价和 Meta 分析,明确了 PCT 诊断 IE 的循证医学证据。鉴于已经发表的研究无论是在研究质量还是报告规范上都存在一定的欠缺,因此有必要进一步开展多中心的、多种族的、大样本的、前瞻性的研究,以进一步明确 PCT 对 IE 的诊断价值。此外,今后的研究在撰写论文的过程中,应严格遵循 STARD 报告规范,提供尽可能多的试验设计细节,供循证医学研究人员对研究的质量做出科学的评价与分析,促进临床研究成果向临床实践的转化。

参考文献

- [1] 王鹤,王红. 感染性心内膜炎预防与治疗进展[J]. 临床和实验医学杂志,2012,11(17): 1426-1427.
- [2] Thuny F, Grisoli D, Collart F, et al. Management of infective endocarditis: challenges and perspectives [J]. *Lancet*, 2012, 379(9819): 965-975.
- [3] Que YA, Moreillon P. Infective endocarditis [J]. *Nature reviews Cardiology*, 2011, 8(6): 322-336.
- [4] Durack DT, Lukes AS, Bright DK. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service [J]. *The American journal of medicine*, 1994, 96(3): 200-209.
- [5] Li JS, Sexton DJ, Mick N, et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis [J]. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2000, 30(4): 633-638.
- [6] 呼新建,常晓悦. 降钙素原的研究进展 [J]. 医学综述,2010,16(12): 1795-1797.
- [7] Whiting P, Rutjes AW, Reitsma JB, et al. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews [J]. *BMC Med Res Methodol*, 2003, 25(3): 305-310.
- [8] Walter SD. Properties of the summary receiver operating characteristic (SROC) curve for diagnostic test data [J]. *Stat Med*,

2002, 21(9): 1237-1256.

- [9] 刘关键,吴泰相. 诊断性试验的 Meta 分析--SROC 曲线法介绍 [J]. *中国循证医学杂志*, 2003, 3(1): 41-44.
- [10] DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials [J]. *Control Clin Trials*, 1986, 7(3): 177-188.
- [11] Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, et al. Measuring inconsistency in meta-analyses [J]. *BMJ*, 2003, 327(7414): 557-560.
- [12] Zamora J, Abraira V, Muriel A, et al. Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data [J]. *BMC Med Res Methodol*, 2006, 31(6): 721-726.
- [13] Watkin RW, Harper LV, Vernalis AB, et al. Pro-inflammatory cytokines IL6, TNF-alpha, IL1beta, procalcitonin, lipopolysaccharide binding protein and C-reactive protein in infective endocarditis [J]. *The Journal of infection*, 2007, 55(3): 220-225.
- [14] Kocazeybek B, Kucukoglu S, Oner YA. Procalcitonin and C-reactive protein in infective endocarditis: correlation with etiology and prognosis [J]. *Chemotherapy*, 2003, 49(1): 76-84.
- [15] Knudsen JB, Fuursted K, Petersen E, et al. Procalcitonin in 759 patients clinically suspected of infective endocarditis [J]. *The American journal of medicine*, 2010, 123(12): 1121-1127.
- [16] Cuculi F, Toggweiler S, Auer M, et al. Serum procalcitonin has the potential to identify *Staphylococcus aureus* endocarditis [J]. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 2008, 27(11): 1145-1149.
- [17] Mueller C, Huber P, Laifer G, et al. Procalcitonin and the early diagnosis of infective endocarditis [J]. *Circulation*, 2004, 109(14): 1707-1710.
- [18] Jereb M, Kotar T, Jurca T, et al. Usefulness of procalcitonin for diagnosis of infective endocarditis [J]. *Internal and emergency medicine*, 2009, 4(3): 221-226.
- [19] Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration [J]. *Clinical chemistry*, 2003, 49(1): 17-18.
- [20] Whiting P, Rutjes AW, Reitsma JB, et al. Sources of variation and bias in studies of diagnostic accuracy: a systematic review [J]. *Ann Intern Med*, 2004, 140(3): 189-202.

(收稿日期:2012-12-28)

(上接第 1641 页)

- [3] Soc Mass Spectrom, 2007, 18(5): 927-939.
- [4] Keypour S, Rafati H, Riahi H, et al. Qualitative analysis of ganoderic acids in *Ganoderma lucidum* from Iran and China by RP-HPLC and electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS) [J]. *Food Chem*, 2010, 119(4): 1704-1708.
- [5] Tang W, Liu JW, Zhao WM, et al. Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells [J]. *Life Sci*, 2006, 80(3): 205-211.
- [6] Gao JJ, Min BS, Ahn EM, et al. New triterpene aldehydes, lucialdehydes AC, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(6): 837-840.
- [7] Liu RM, Zhong JJ. Ganoderic acid Mf and S induce mitochondria mediated apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells [J]. *Phytomed*, 2011, 18(5): 349-355.
- [8] Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1995, 35: 655-677.

- [9] Hawiger J. Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm [J]. *Immunol Res*, 2001, 23(2/3): 99-109.
- [10] Dudhgaonkar S, Thyagarajan A, Sliva D. Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *Intern Immunopharm*, 2009, 9(11): 1272-1280.
- [11] Gordon S. Alternative activation of macrophages [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(1): 23-35.
- [12] Gordon S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(1): 89-93.
- [13] 李仲娟,杨朝令,喻昕,等. 灵芝多糖对小鼠 M1 巨噬细胞活性的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(7): 1738-1739.
- [14] 李涛,陈望. TNF- α 在肿瘤中的作用 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(18): 3586-3588.
- [15] 梅开,田聆,魏于全,等. 质粒联合吉西他滨抗肿瘤作用的实验研究 [J]. *癌症*, 2005, 24(4): 397-402.

(收稿日期:2013-01-22)