

# 香菇多糖增强肿瘤浸润淋巴细胞杀伤活性及 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IFN-}\gamma$ 的分泌

李广宙 康白<sup>1</sup> 郭宝强(潍坊 261031 潍坊医学院附属医院核医学科;<sup>1</sup> 潍坊医学院药理教研室)

**摘要** 目的:研究香菇多糖对肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)杀伤活性及细胞因子分泌的影响。方法:将从肺癌中分离的TIL分别置于含IL-2或IL-2加香菇多糖培养液中培养30天,观察TIL的杀伤活性和 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IFN-}\gamma$ 的分泌作用。结果:用两种方法分别培养25天时,IL-2加香菇多糖培养的TIL杀伤活性及 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IFN-}\gamma$ 的分泌作用均明显高于IL-

2 培养的 TIL ( $P < 0.05$ )。结论:香菇多糖具有增强 TIL 杀伤活性及 TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  的分泌作用。

关键词 香菇多糖;肿瘤浸润淋巴细胞;白细胞介素-2

## The study of Lentinan to increase antitumor activity and secretion of cytokines of tumor infiltrating lymphocytes

Li Guangzhou( Li GZ ), Kang Bai( Kang B ), Guo Baoqiang( Guo BQ ) ( *Department of Nuclear Medicine , Affiliated Hospital of Weifang Medical College , Weifang 261031* )

**ABSTRACT OBJECTIVE:** To study the influences of Lentinan on antitumor activity and secretion of cytokines of tumor infiltrating lymphocytes( TIL ). **METHOD:** TIL isolated from patients with lung cancer was cultured in IL-2 or IL-2 combined with Lentinan for 30 days, respectively. Antitumor activity and production of TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  of TIL were observed. **RESULTS:** After 25 days, antitumor activity and production of TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  of TIL cultured in IL-2 combined with Lentinan were higher than that of TIL cultured in IL-2 ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** Lentinan has an increasing action on antitumor activity and secretion of cytokines of TIL.

**KEY WORDS** Lentinan, tumor infiltrating lymphocyte, interleukin-2

研究发现某些具有免疫调节作用的中草药如黄芪、人参皂甙、茯苓多糖等能提高小鼠单核-巨噬细胞功能,增强 NK、LAK 和 TIL 的免疫活性和抗肿瘤作用<sup>[1-3]</sup>。本文观察了香菇多糖(Lentinan)对肺癌肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的杀伤活性及细胞因子分泌的影响,现报告如下。

### 1 材料

1.1 肺癌标本 22 例肺癌标本均为手术切除后立即以无菌操作收集于含抗生素的培养液中,术前未接受任何治疗,术后病理证实,其中鳞癌 11 例,腺癌 11 例。

1.2 药品 香菇多糖(日本国味之素株式会社)、IL-2(长春生物制品研究所)、<sup>51</sup>Cr 铬酸钠注射液(北京原子能研究院同位素所)、TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$  酶联试剂盒(北京邦定生物医学公司)。

1.3 仪器 3319 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Forma Sdientific 公司)、FT-630 型  $\gamma$  计数器(北京核仪器厂)、DG-3022A 型酶联免疫检测仪(南京国营华东电子管厂)。

1.4 靶细胞 自体瘤细胞(Auto-Tu)(本室从肺癌标本中分离制备)、K<sub>562</sub> 和 Raji 细胞(山东省医学科学院肿瘤生物治疗中心)。

### 2 方法

2.1 TIL 的分离制备 按文献介绍方法分离<sup>[4]</sup>。

2.2 TIL 的培养和激活 将分离得到的 TIL( $1 \times 10^5$ /ml) 分别置于含 IL-2(1000u/ml) 或 IL-2 加香菇多糖(100 $\mu$ g/ml) 的 10% 小牛血清 RPMI 1640 完全培养液中,置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,每 3~5 天换液一

次,隔日细胞计数一次,根据细胞扩增情况,更换培养液,补充 IL-2 及香菇多糖。从第 5 天起,每隔 5 天收集部分 TIL 及上清液,分别用于体外杀伤活性测定及 TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$  含量测定。

2.3 TIL 体外杀伤活性测定 TIL 杀伤活性检测采用标准的 4h <sup>51</sup>Cr 释放实验<sup>[5]</sup>。靶细胞为 Auto-Tu、K<sub>562</sub> 及 Raji 细胞,效-靶比为 20:1,杀伤活性按下列公式计算:

$$\text{杀伤活性}(\%) = \frac{\text{实验组 cmp} - \text{自发释放 cmp}}{\text{最大释放 cmp} - \text{自发释放 cmp}} \times 100\%$$

2.4 酶联免疫测定 TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$  的酶联免疫分析,严格按药盒说明书操作步骤进行。

2.5 统计学处理 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,均数差异用组间  $t$  检验。

### 3 结果

3.1 香菇多糖对 TIL 体外杀伤活性的作用 用 IL-2 和 IL-2 加香菇多糖培养的 TIL 杀伤活性均与培养时间有关(见表 1)。在培养 15 天时,TIL 的杀伤活性明显增大,25 天达高峰,此后开始下降。由表 1 可看出,IL-2 加香菇多糖培养 TIL 对自体瘤细胞、K<sub>562</sub> 及 Raji 细胞的最大杀伤活性均明显高于 IL-2 培养的 TIL ( $P < 0.05$ )。

3.2 香菇多糖对 TIL 分泌 TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$  的影响 表 2 显示在不同培养时间 IL-2 和 IL-2 加香菇多糖的 TIL 分泌 TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$  的数量不同,二者的变化趋势与其杀伤活性的变化相似。

### 4 讨论

香菇多糖是从香菇子实体中提取纯化的抗肿瘤多糖,对动物同系肿瘤及自体肿瘤有明显的抑制其增殖

表 1 香菇多糖对 TIL 体外杀伤活性(%)的影响/样本  $n = 22, \bar{x} \pm s$

培养天数	IL-2(1000u/ml)			IL-2 + Lentinan(100 $\mu$ g/ml)		
	Auto Tu	K562	Raji	Auto Tu	K562	Raji
5	7.21 $\pm$ 4.16	10.06 $\pm$ 4.93	8.11 $\pm$ 5.26	8.52 $\pm$ 4.65	15.23 $\pm$ 7.38	10.37 $\pm$ 5.80
10	16.52 $\pm$ 5.28	20.76 $\pm$ 6.56	13.27 $\pm$ 6.72	16.87 $\pm$ 5.71	25.28 $\pm$ 10.46	18.95 $\pm$ 7.53
15	25.94 $\pm$ 7.13	38.21 $\pm$ 10.57	29.30 $\pm$ 8.62	33.75 $\pm$ 10.28	49.57 $\pm$ 12.74	34.39 $\pm$ 12.54
20	31.58 $\pm$ 8.72	45.18 $\pm$ 11.74	33.86 $\pm$ 10.14	44.18 $\pm$ 11.66	64.93 $\pm$ 14.78	49.16 $\pm$ 13.25
25	43.81 $\pm$ 12.17	50.83 $\pm$ 13.56	45.41 $\pm$ 13.76	67.18 $\pm$ 14.73*	71.25 $\pm$ 15.86*	66.15 $\pm$ 15.07*
30	32.38 $\pm$ 10.34	38.75 $\pm$ 12.82	30.19 $\pm$ 12.34	35.67 $\pm$ 13.17	50.81 $\pm$ 14.22	41.37 $\pm$ 13.41

注:与 IL-2 相应组比较,\*  $P < 0.05$

表 2 香菇多糖对 TIL 分泌 TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$  的影响/样本  $n = 22, \bar{x} \pm s$

培养天数	IL-2(1000u/ml)		IL-2 + Lentinan(100 $\mu$ g/ml)	
	TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L)	INF- $\gamma$ ( $\mu$ g/L)	TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L)	INF- $\gamma$ ( $\mu$ g/L)
5	0.28 $\pm$ 0.10	0.54 $\pm$ 0.22	0.36 $\pm$ 0.11	0.73 $\pm$ 0.25
10	0.39 $\pm$ 0.15	0.67 $\pm$ 0.26	0.45 $\pm$ 0.13	0.79 $\pm$ 0.35
15	0.46 $\pm$ 0.18	0.81 $\pm$ 0.31	0.62 $\pm$ 0.21	0.95 $\pm$ 0.38
20	0.58 $\pm$ 0.26	0.95 $\pm$ 0.42	0.96 $\pm$ 0.37	1.38 $\pm$ 0.53
25	0.75 $\pm$ 0.28	1.13 $\pm$ 0.62	1.19 $\pm$ 0.56*	1.97 $\pm$ 0.66*
30	0.62 $\pm$ 0.26	1.06 $\pm$ 0.56	0.90 $\pm$ 0.35	1.30 $\pm$ 0.51

注:与 IL-2 相应组比较,\*  $P < 0.05$

的作用,可促进 T 细胞的增殖和 IL-2 的分布,提高 T 细胞和 NK 细胞的免疫活性,增加 LAK 细胞的产生,能激活肿瘤坏死因子的产生,与化疗药物合用能明显增强抗癌效果<sup>[6]</sup>。本组实验动态观察了香菇多糖对 TIL 抗癌活性的影响,结果显示,IL-2 加香菇多糖培养的 TIL 对自体瘤细胞、K562 和 Raji 细胞的杀伤活性,随着培养时间的延长而明显增加,培养 25 天对三种靶细胞的最大杀伤活性分别为:67.18  $\pm$  14.73、71.25  $\pm$  15.86 和 66.15  $\pm$  15.07;单纯 IL-2 培养的 TIL 对各种靶细胞的杀伤活性,虽亦随着培养的变化而增加,但在各个培养阶段其杀伤活性均低于 IL-2 加香菇多糖组,培养 25 天时,对上述三种靶细胞的最大杀伤活性分别为:43.81  $\pm$  12.17、50.83  $\pm$  13.56 和 45.41  $\pm$  13.76。两组相比有显著性差异( $P < 0.05$ )。由此可见,香菇多糖具有增强 TIL 抗癌活性的作用。

Barth 研究发现在鼠体内 TIL 的疗效与分泌 INF- $\gamma$  十分相关<sup>[7]</sup>,体内无杀伤活性的 TIL 不分泌 INF- $\gamma$ ,注射 INF- $\gamma$  单抗使体内抗肿瘤作用消失,这说明 TIL 的杀伤活性与细胞因子的分泌有密切关系。据国内学者报道,刺五加多糖及其皂甙、银耳多糖、羟甲基茯苓多糖、黄芪、人参、三七可促进人类淋巴细胞系高分泌 INF- $\gamma$ <sup>[8]</sup>;甘草多糖、西洋参茎叶皂甙、人参二醇皂甙及其树舌多糖都有不同程度的诱导 HPBL 高分泌 TNF- $\alpha$  和

INF- $\gamma$  的作用<sup>[9]</sup>。这些实验结果说明具有免疫调节作用的中草药及其有效成分的抗肿瘤作用与其促进 IL-2、TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$  等细胞因子的分泌有密切的关系。本实验研究发现,IL-2 和 IL-2 加香菇多糖培养的 TIL,其分泌 TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$  的最大量均在培养 25 天出现,但两组比较差异非常显著( $P < 0.05$ ),说明香菇多糖具有促进 TIL 分泌 TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$  的作用;同时还发现两组 TIL 分泌 TNF- $\alpha$  及 INF- $\gamma$  的变化与其杀伤活性的变化十分相似,提示香菇多糖增强 TIL 抗癌活性的作用与其促进 TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$  的分泌有一定的关系。

#### 参考文献

- 1 高学军,孙亚荣,李艳波.茯苓多糖的抗肿瘤与药理研究.中医药学报,1996,4(1):45.
- 2 赵铁华,粟锦迁.升脉散加黄芪对 LAK 细胞抗癌活性的正向调节作用.中国中西医结合杂志,1993,13(8):471.
- 3 李东复,葛焕琦,太京华,等.黄芪、人参皂甙对肺癌浸润淋巴细胞体外抗癌作用的影响.中国免疫学杂志,1997,13(5):296.
- 4 李东复,张兴义,宋玉芳,等.肺癌术后患者肿瘤浸润淋巴细胞回输的临床疗效观察.中华肿瘤杂志,1995,17(2):152.
- 5 曹雪涛编著.白细胞介素 2 的基础与临床.北京:科学技术出版社,1990:183.
- 6 吴昌平,华静,吴爱珍,等.香菇多糖对恶性肿瘤的治疗作用.新药与临床,1996,15(1):29.
- 7 Barth RJ. Interferon  $\gamma$  and tumor necrosis factor have a role in tumor regression mediated by murine CD8 + tumor-infiltrating lymphocytes. J Exp Med, 1991, 173(4): 647.
- 8 杨吉成,刘静山,盛伟华,等.中药有效成分在干扰素生物技术实验与临床研究中的应用.生物工程进展,1993,13(3):31.
- 9 常雅萍,杨贵贞.几种中药提取物诱生人干扰素.中国实验临床免疫学杂志,1992,29(2):37.

收稿日期:1999-08-03