

吕建敏,龚金炎,刘士旺. 秀珍菇粉对 H22 荷瘤小鼠体内抗肿瘤作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 216-223.

Lyu JM, Gong JY, Liu SW. Anti-tumor activities of *Pleurotus geesteranus* fruit body powder on H22 tumor-bearing mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 216-223.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.02.010

秀珍菇粉对 H22 荷瘤小鼠体内抗肿瘤作用研究

吕建敏^{1*}, 龚金炎², 刘士旺²

(1. 浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究所, 杭州 310053; 2. 浙江科技学院生物与化学工程学院/轻工学院, 杭州 310023)

【摘要】 目的 本试验旨在研究秀珍菇抗肿瘤作用及其抑瘤机制。**方法** 选用 ICR 雄性小鼠 60 只, 取 10 只作为空白组, 剩余 50 只小鼠通过腋部皮下接种 H22 小鼠腹水构建荷瘤小鼠模型, 造模后随机分为模型组、阳性药 (CTX) 组、秀珍菇低、中、高剂量组, 每组 10 只。模型组小鼠灌服生理盐水, 阳性药组小鼠按 20 mg/kg 体重隔天腹腔注射注射环磷酰胺 (CTX) 生理盐水溶液, 秀珍菇低、中、高剂量组小鼠分别按 750、1500、3000 mg/kg 体重每天剂量灌服秀珍菇生理盐水混悬液。给药 10 d 后, 测定各组小鼠平均瘤重, 肿瘤抑制率; 测定免疫器官脏器指数、血清免疫球蛋白和细胞因子含量; 测定肝、肾抗氧化指标; 观察肿瘤和脾组织 HE 染色病理切片。**结果** (1) CTX 及秀珍菇低、中、高剂量组小鼠的平均瘤重均极显著低于模型组 ($P < 0.01$), 四组小鼠肿瘤抑制率分别为 55.18%, 29.06%、47.47% 和 48.80%。(2) 与空白组比较, 模型组小鼠脾指数、血清 IgA 和 TNF- α 含量及肝 MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 血清 IL-6 含量有上升趋势 ($P > 0.05$), 而血清 IL-2 含量、肝 CAT 和 GSH-Px 活性及肾 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 同时, CTX 组小鼠胸腺指数显著低于空白组 ($P < 0.05$)。(3) 秀珍菇对荷瘤小鼠免疫和抗氧化功能异常改变具有逆转作用: 与模型组比较, 秀珍菇各剂量组小鼠血清 IgA 和 TNF- α 含量及高剂量组小鼠 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 低剂量组小鼠血清 IL-2 水平显著升高 ($P < 0.01$); 秀珍菇处理还显著提高了各剂量组荷瘤小鼠肝 CAT 活性及肾 SOD 和 CAT 活性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 显著升高中、高剂量组肝 GSH-Px 活性和低、中剂量组肾 GSH-Px 活性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并显著降低中剂量组的肝 MDA 含量 ($P < 0.05$)。(4) 与 CTX 组比较, 秀珍菇高剂量组小鼠脾指数显著提高 ($P < 0.05$), 而血清 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$)。(5) 肿瘤组织病理切片显示 CTX 组和秀珍菇各剂量组的肿瘤坏死面积明显增加。**结论** 秀珍菇可抑制 H22 实体移植瘤生长, 其机制与其具有较强的免疫调节和抗氧化作用有关。

【关键词】 秀珍菇; 抗肿瘤; H22 荷瘤小鼠; 免疫功能; 抗氧化能力

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 02-0216-08

Anti-tumor activities of *Pleurotus geesteranus* fruit body powder on H22 tumor-bearing mice

LYU Jianmin^{1*}, GONG Jinyan², LIU Shiwang²

(1. Laboratory Animal Research Center/Comparative Medicine Research Institute, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China. 2. School of Biological Chemical Engineering/School of Light Industry, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023)
Corresponding author: LYU Jianmin. E-mail: ljm6666@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the anti-tumor effects and mechanism of *Pleurotus geesteranus* powder (PGP) on H22 tumor-bearing mice. **Methods** The mouse tumor-bearing model was established by subcutaneous injection

[基金项目] 浙江省重大科技专项 (2015C02053)。
Funded by Provincial Key Science and Technology Project of Science Technology Department of Zhejiang Province (2015C02053).
[通信作者] 吕建敏 (1971—), 女, 研究员, 博士, 研究方向: 实验动物与比较医学。Email: ljm6666@163.com

of ascites of H22 hepatocellular carcinoma into mice via the axilla. Sixty male ICR mice were randomly divided into one blank control (C) and five H22 tumor-bearing groups including tumor model control, positive control (cyclophosphamide, CTX) and three PGP groups. The mice in the model control group received 0.9% saline solution by oral gavage, the mice in the positive control group were intra-abdominally injected with CTX saline solution (20 mg/kg body weight every other day), and mice in the PGP-treated groups were administered PGP (dispersed in 0.9% saline solution) at low (750 mg/kg body weight, PGP-L), mid (1500 mg/kg body weight, PGP-M) and high (3000 mg/kg body weight, PGP-H) doses per day. The administration cycle was 10 d. When the trial was finished, the mean tumor weight, tumor inhibition rate and immune organ index were calculated, and the levels of serum immunoglobulins and cytokines, and antioxidant parameters in the liver and kidney were determined. Microscopic morphology of tumor and spleen tissues were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. **Results** (1) The mean tumor weight in the CTX and three PGP groups was significantly decreased compared with the model control ($P < 0.01$). The tumor inhibition rate in the CTX and three PGP groups (low, mid, high) were 55.18%, 29.06%, 47.47%, and 48.80%, respectively. (2) Compared with the blank control, the spleen index ($P < 0.01$), levels of serum immunoglobulin A (IgA, $P < 0.01$) and tumor necrosis factor α (TNF- α , $P < 0.05$), and liver malondialdehyde (MDA, $P < 0.05$) were increased in the model group, whereas serum interleukin-2 (IL-2) content ($P < 0.01$), activities of liver catalase (CAT, $P < 0.01$), glutathione peroxidase (GSH-Px, $P < 0.01$), kidney superoxide dismutase (SOD, $P < 0.01$), GSH-Px ($P < 0.05$), and CAT ($P < 0.01$) in the model group were significantly decreased. Furthermore, the serum IL-6 content in the model group tended to be increased ($P > 0.05$). The thymus index in the CTX group was significantly higher than in the blank control ($P < 0.05$). (3) Treatment with PGP reversed the above abnormal performance in the model control. Levels of IgA and TNF- α in the three PGP treated (low, mid, high) groups (IgA: $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$; TNF α : $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), IL-6 levels in the PGP-H group ($P < 0.05$), and liver MDA content in the PGP-M group ($P < 0.05$) were lower than in the model control group. IL-2 levels in the PGP-L group ($P < 0.05$), activities of liver CAT ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$), kidney CAT ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$) and kidney SOD ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$) in three PGP-treated (low, mid, high) groups, liver GSH-Px in the PGP-M and PGP-H groups ($P < 0.05$), and kidney GSH-Px in the PGP-L and PGP-M groups ($P < 0.01$) were significantly higher than in the model control group. (4) Compared with the CTX group, the spleen index in the PGP-H group was increased, and IL-6 levels were decreased significantly ($P < 0.05$). (5) Furthermore, compared with the model control group, increased necrotic areas of tumors in the CTX group and all PGP groups were observed by HE staining. **Conclusions** PGP might have anti-tumor effects related to its immunoregulatory and antioxidant functions.

[Keywords] *Pleurotus geesteranus*; anti-tumor; H22 tumor-bearing mice; immune function; antioxidant function

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

原发性肝癌位居全球肿瘤死亡率第 2 位^[1],常用的手术和西药疗法存在疗效欠佳且药物不良反应严重等问题,而副作用较小的中草药抗癌制剂在肿瘤辅助治疗中具有独特优势^[2]。小鼠肝癌 22 (H22)是最常用的小鼠可移植性肿瘤细胞系之一,广泛用于肿瘤动物模型复制,在中草药抗肿瘤药效学评价中发挥着重要作用^[3-5]。秀珍菇 *Pleurotus geesteranus* 是一种珍稀的药食兼用食用菌,隶属担子菌亚门,层菌纲,伞菌目,侧耳科,侧耳属^[6],研究发现,秀珍菇中所含多糖具有抗氧化、抗炎、抗衰老、保护肝等药理功效^[7-10]。尽管目前已利用 H22 荷瘤小鼠模型证实许多药食兼用食用菌及其提取物具有抗肿瘤功效,且其抑瘤作用主要源于食用菌中的活性成分对机体免疫和抗氧化功能的改

善^[11-13],但对秀珍菇的相关研究仍主要集中在多糖提取及其他药理作用上^[7-10],还鲜有秀珍菇抗肿瘤作用的报道。我们前期研究发现,秀珍菇粉具有增强机体免疫功能和抗氧化的作用(尚未发表),据此推测,秀珍菇可能也具有抗肿瘤功效。因此,本研究使用 H22 荷瘤小鼠模型,研究秀珍菇体内抗肿瘤作用效果和机制,旨在为后续秀珍菇药品和功能食品的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 秀珍菇粉

新鲜秀珍菇由浙江省缙云县珍稀食用菌专业合作社生产,并由浙江科技学院刘士旺教授鉴定。

将新鲜秀珍菇于 50 ~ 70℃ 下烘 8 h,磨成粉末,过 40 目筛后装在封口袋中放置于阴凉干燥处保存。秀珍菇粉末主要营养成分经绿城农科检测技术有限公司检测,结果见表 1。

表 1 秀珍菇粉主要营养成分表

Table 1 Nutrient values of *Pleurotus geesteranus* fruit body powder

营养成分 Nutrient value	含量 Content
脂肪 Fat (g/100 g)	2.2
粗纤维 Crude fiber (%)	5.6
总糖 Total sugar (以蔗糖计 in the form of a sucrose, g/100 g)	2.1
总蛋白 Crude protein (%)	19.96
氨基酸 Animo acid (总量 Total,%)	17.66
天门冬氨酸 Asp (%)	1.58
苏氨酸 Thr (%)	0.92
丝氨酸 Ser (%)	0.94
谷氨酸 Glu (%)	3.03
甘氨酸 Gly (%)	0.92
丙氨酸 Ala (%)	1.31
缬氨酸 Val (%)	1.00
蛋氨酸 Met (%)	0.29
异亮氨酸 Ile (%)	0.82
亮氨酸 Leu (%)	1.32
酪氨酸 Tyr (%)	0.54
苯丙氨酸 Phe (%)	0.84
组氨酸 His (%)	1.58
赖氨酸 Lys (%)	1.07
精氨酸 Arg (%)	0.78
脯氨酸 Pro (%)	0.72

1.1.2 实验动物与瘤株

60 只雄性 SPF 级 ICR 小鼠,年龄为 4 周龄,体重为 17 ~ 20 g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2018-0006】。饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心 SPF 级动物实验室【SYXK(浙)2018-0012】。饲养期间各组小鼠自由饮水,饲喂小鼠维持饲料由仪征安利卵生物科技有限公司提供。饲养环境:昼夜各半循环照明,相对湿度 40% ~ 70%,温度控制在 22 ~ 25℃,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。所有操作均符合浙江中医药大学动物实验研究中心动物实验伦理学要求(审批号:IACUC 2018091705)。H22 小鼠肝癌瘤株购于中国医学科学院,由浙江中医药大学动物实验研究中心传代保种。

1.1.3 试剂与仪器

环磷酰胺 (CTX, Meilunbio, M0915A);注射用氯化钠(浙江国镜药业有限公司, B18050702);小鼠免疫球蛋白(IgA、IgM、IgG)、小鼠细胞因子(TNF-α、IL-6、IL-2)酶联免疫检测试剂盒(南京建成生物公

司,20181206);SOD、GSH-Px、CAT 和 MDA 检测试剂盒(南京建成生物公司,批号分别为 20181207、20180817、20181205、20181208)。

电子天平(JJ300,常熟双杰测试仪器厂);电子分析天平(Mettler Toledo, 瑞士)。酶标仪(BIO-RAD, 美国)。MICROM AP-280 组织包埋机、MICROM HM-335E 型轮转切片机(MICROM, 德国);LEICA 染色机(LEICA, 瑞士), NanoZoomer - 2.0RS 数字切片扫描仪(滨松光电,日本)。

1.2 方法

1.2.1 荷瘤小鼠实体瘤模型的建立

按常规方法复苏 H22 小鼠肝癌细胞,取 0.2 mL 细胞悬液注射到雄性 ICR 小鼠腹腔内,连续传两代获得 H22 腹水瘤小鼠,用于本实验。依据参考文献^[12, 14]的方法,在超净工作台中,取 H22 腹水瘤小鼠的腹水,经生理盐水清洗后稀释成浓度为 1×10⁶/mL 细胞悬液,按每只 0.2 mL 接种剂量接种于经适应性喂养 1 周后的 ICR 小鼠左侧腋部皮下。

1.2.2 分组、给药

ICR 小鼠接瘤 24 h 后随即分组,即模型组(Modle)、环磷酰胺阳性药组(CTX)、秀珍菇低(PGP-L)、中(PGP-M)、高(PGP-H)剂量组,每组 10 只小鼠,另取 10 只正常小鼠作为空白对照组(Blank)。依据参考文献^[12, 15]设置 CTX 和秀珍菇给药剂量,空白组不给药及生理盐水,模型组灌服生理盐水,阳性药组隔天按 20 mg/kg 体重的剂量腹腔注射 CTX 生理盐水溶液,秀珍菇低、中、高剂量组分别按 750、1500 和 3000 mg/kg 体重每天剂量灌服秀珍菇粉生理盐水混悬液。各组小鼠接种瘤株后第 2 天开始给药,给药容量为 0.2 mL/10 g,连续给药 10 d。

1.2.3 肿瘤抑制率和脏器指数测定

末次给药 24 h 后麻醉处死小鼠,剥取瘤块,取脾、胸腺,称重并计算抑瘤率和免疫器官脏器指数。肿瘤生长抑制率=(模型组平均瘤重 - 给药组平均瘤重)/模型组平均瘤重×100%;脏器指数=脏器质量(g)/体重质量(g)×100。

1.2.4 血清免疫球蛋白和细胞因子测定

实验结束,小鼠颌下静脉取血,分离血清,参照试剂盒说明书,利用酶联免疫(ELISA)法测定小鼠血清中 IgA、IgG 和 IgM 含量及 TNF-α、IL-6 和 IL-2 的含量。

1.2.5 肝、肾组织抗氧化指标测定

麻醉处死小鼠,取肝、肾,制备肝、肾匀浆,参照

试剂盒说明书,利用酶标仪测定分别测定小鼠肝、肾中 SOD,GSH-Px 和 CAT 的活性及 MDA 含量。

1.2.6 肿瘤和脾的组织病理学观察

分别取各组小鼠瘤块和脾,置于 4% 中性甲醛固定,将固定好的组织用常规石蜡包埋,再将石蜡包埋块切片、脱蜡,进行 HE 染色,最后用数字切片扫描仪对切片进行图像扫描。

1.3 统计学分析

结果用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据均用 SAS 8.1 统计软件的 ANOVA 分析进行单因素方差分析,并进行 Duncan 氏多重比较。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 H22 荷瘤小鼠模型成模和带瘤生存情况

自接种 H22 瘤株第 3 天起,所有荷瘤小鼠腋窝处均出现明显瘤组织,并逐天增大,表明模型复制成功。在实验期间,所有荷瘤小鼠无自然死亡情况。

2.2 小鼠平均瘤重和肿瘤抑制率

由表 2 可见,阳性药组及秀珍菇各剂量组小鼠平均瘤重均极显著低于与模型组($P < 0.01$);肿瘤抑制率以阳性药组最高、秀珍菇高、中剂量组次之,秀珍菇低剂量组最低。

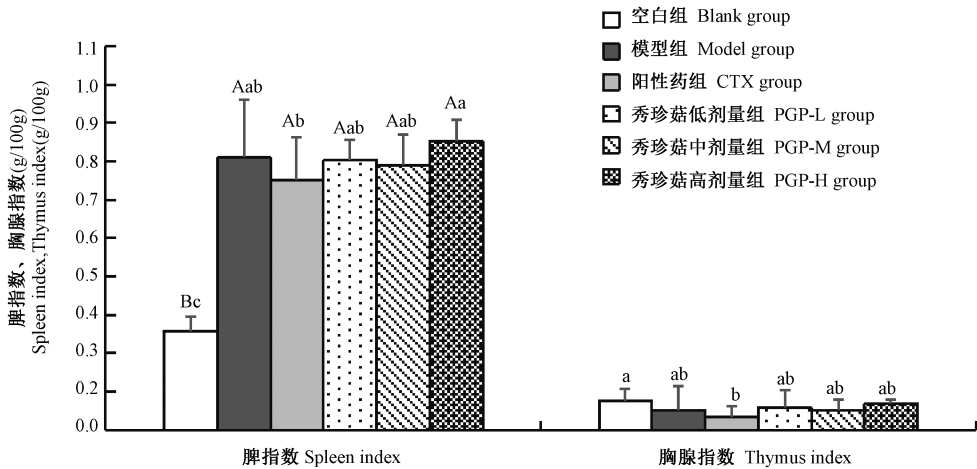
2.3 小鼠脾指数和胸腺指数

由图 1 可见,与空白组比较,模型组、阳性药组和秀珍菇各剂量组小鼠脾指数均极显著升高($P < 0.01$),阳性药组小鼠胸腺指数显著降低($P < 0.05$)。秀珍菇各剂量组小鼠的脾和胸腺指数都有高于阳性药组的趋势,其中高剂量组的脾指数与阳性药组比较有显著性差异($P < 0.05$)。

表 2 秀珍菇粉对 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长的的影响

Table 2 Effects of <i>Pleurotus geesteranus</i> fruit body powder on growth of tumor in H22 tumor-bearing mice				
组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage (mg/kg)	动物数 (只) Number of mice	平均瘤重 (g) Average tumor weight (g)	肿瘤抑制率 (%) Tumor inhibition rate (%)
空白组 Blank group	—	10	—	—
模型组 Model group	—	10	1.54 ± 0.40 ^{Aa}	—
阳性药组 CTX group	20	10	0.69 ± 0.24 ^{Bc}	55.18
秀珍菇低剂量组 PGP-L group	750	10	1.09 ± 0.41 ^{Bb}	29.06
秀珍菇中剂量组 PGP-M group	1500	10	0.81 ± 0.29 ^{Bbc}	47.47
秀珍菇高剂量组 PGP-H group	3000	10	0.79 ± 0.21 ^{Bbc}	48.80

注:同列数值肩标上无字母或有相同字母表示差异不显著($P > 0.05$),肩标上小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),肩标上大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$)。下表同。
Note. In the same line, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$), while values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letter superscripts mean very significant difference ($P < 0.01$). The same in the flowing tables.



注:各组间比较,小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$)。

图 1 秀珍菇粉对 H22 荷瘤小鼠脾指数和胸腺指数的影响

Note. Compared among groups, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letter superscripts mean very significant difference ($P < 0.01$).

Figure 1 Effects of *Pleurotus geesteranus* fruit body powder on spleed and thymus indices of H22 tumor-bearing mice

2.4 小鼠血清免疫球蛋白及细胞因子含量

由表 3 可知,与空白组比较,模型组小鼠血清 IgA 和 TNF-α 含量显著升高($P < 0.01, P < 0.05$),模型组和秀珍菇中剂量组小鼠血清 IL-2 含量显著降低($P < 0.01, P < 0.05$),模型组和秀珍菇低、中剂量组小鼠血清 IL-6 含量有上升趋势($P > 0.05$)。与模型组比较,阳性药组和秀珍菇各剂量组小鼠血清 IgA 和 TNF-α 含量显著降低($P < 0.01, P < 0.05$),阳性药组和秀珍菇低剂量组小鼠血清 IL-2 含量显著升高($P < 0.05$),秀珍菇高剂量组小鼠血清 IL-6 含量也显著低于模型组($P < 0.05$)。

2.5 小鼠肝组织抗氧化指标

由表 4 可知,与空白组比较,模型组小鼠肝 MDA 含量显著升高($P < 0.05$),GSH-Px 和 CAT 活力极显著降低($P < 0.01$);阳性药组和秀珍菇各剂量组小鼠肝 GSH-Px 活性显著降低($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,阳性药组、秀珍菇各剂量组小鼠肝 CAT 活性均显著升高($P < 0.05, P <$

0.01),秀珍菇中、高剂量组肝 GSH-Px 活力显著高于模型组($P < 0.05$),而秀珍菇中剂量组小鼠肝 MDA 含量显著低于模型组($P < 0.05$)。

2.6 小鼠肾组织抗氧化指标

由表 5 可知,模型组小鼠肾组织 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性均显著低于空白组($P < 0.01, P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,阳性药组和秀珍菇各剂量组小鼠肾 SOD 和 CAT 活性极显著升高($P < 0.01$),秀珍菇低、中剂量组小鼠肾 GSH-Px 活性也显著高于模型组($P < 0.05$)。

2.7 荷瘤小鼠肿瘤细胞形态学观察

由图 2 可见,模型组肿瘤细胞形状多呈椭圆形,体积大小不同,且排列密集,极少有出血坏死情况;CTX 组的肿瘤细胞排列松散且呈不规则变形,多数肿瘤细胞破裂有明显的胞浆溢出;秀珍菇各剂量组均可观察到有肿瘤坏死细胞,且细胞形状不规则,特别是秀珍菇中、高剂量组出现细胞破裂、坏死细胞堆积的情况较为明显。

表 3 秀珍菇粉对 H22 荷瘤小鼠血清免疫球蛋白及细胞因子含量的影响

Table 3 Effects of *Pleurotus geesteranus* fruit body powder on serum contents of immunoglobulins and cytokines in H22 tumor-bearing mice

组别 Groups	IgA (mg/mL)	IgG (mg/mL)	IgM (μg/mL)	IL-2 (ng/L)	IL-6 (ng/L)	TNF-α (ng/L)
空白组 Blank group	0.65 ± 0.04 ^{Bb}	25.93 ± 1.42	326.27 ± 49.66	94.43 ± 10.57 ^{Aa}	24.98 ± 2.25 ^{ab}	140.88 ± 14.88 ^{ABb}
模型组 Model group	0.86 ± 0.10 ^{Aa}	21.32 ± 1.49	333.67 ± 59.84	79.01 ± 7.65 ^{Bc}	28.18 ± 2.96 ^a	160.81 ± 22.96 ^{Aa}
阳性药组 CTX group	0.67 ± 0.04 ^{Bb}	25.30 ± 2.96	300.69 ± 58.95	88.69 ± 2.58 ^{ABab}	28.23 ± 2.02 ^a	135.76 ± 8.62 ^{ABb}
秀珍菇低剂量组 PGP-L group	0.66 ± 0.03 ^{Bb}	22.63 ± 4.47	318.33 ± 23.30	90.63 ± 5.32 ^{ABa}	26.34 ± 3.36 ^{ab}	138.89 ± 11.47 ^{ABb}
秀珍菇中剂量组 PGP-M group	0.67 ± 0.07 ^{Bb}	23.69 ± 4.19	301.77 ± 68.30	81.42 ± 4.97 ^{Bbc}	26.78 ± 2.88 ^{ab}	133.71 ± 12.54 ^{Bb}
秀珍菇高剂量组 PGP-H group	0.67 ± 0.03 ^{Bb}	21.23 ± 5.11	294.47 ± 78.71	86.07 ± 2.33 ^{ABabc}	24.14 ± 3.32 ^b	140.88 ± 4.5 ^{ABb}

表 4 秀珍菇粉对 H22 荷瘤小鼠肝组织抗氧化指标的影响

Table 4 Effects of *Pleurotus geesteranus* fruit body powder on antioxidant indices in liver of H22 tumor-bearing mice

组别 Groups	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/mgprot)	GSH-Px (U/mgprot)	CAT (U/mgprot)
空白组 Blank group	208.30 ± 16.93	0.66 ± 0.08 ^b	608.92 ± 60.05 ^{Aa}	61.37 ± 5.52 ^{Aa}
模型组 Model group	182.85 ± 16.23	0.94 ± 0.16 ^a	334.41 ± 84.57 ^{Bd}	34.90 ± 4.54 ^{Cc}
阳性药组 CTX group	208.42 ± 23.88	0.81 ± 0.12 ^{ab}	456.60 ± 232.71 ^{Bbcd}	44.29 ± 3.18 ^{BCb}
秀珍菇低剂量组 PGP-L group	210.01 ± 21.97	0.77 ± 0.16 ^{ab}	416.47 ± 26.54 ^{Bcd}	44.20 ± 10.33 ^{BCb}
秀珍菇中剂量组 PGP-M group	205.17 ± 10.31	0.72 ± 0.10 ^b	506.37 ± 36.56 ^{ABb}	45.28 ± 2.61 ^{BCb}
秀珍菇高剂量组 PGP-H group	205.46 ± 22.55	0.83 ± 0.20 ^{ab}	479.96 ± 83.63 ^{Bbc}	52.27 ± 5.59 ^{ABb}

表 5 秀珍菇粉对 H22 荷瘤小鼠肾组织抗氧化指标的影响

Table 5 Effects of *Pleurotus geesteranus* fruit body powder on antioxidant indices in kidney of H22 tumor-bearing mice

组别 Groups	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/mgprot)	GSH-Px (U/mgprot)	CAT (U/mgprot)
空白组 Blank group	120.35 ± 15.36 ^{Aa}	2.64 ± 0.51	391.30 ± 37.84 ^{AaBbCc}	49.62 ± 2.47 ^{Aa}
模型组 Model group	100.78 ± 5.42 ^{Bb}	2.76 ± 0.24	315.09 ± 38.70 ^{Cd}	36.52 ± 3.37 ^{Bb}
阳性药组 CTX group	129.18 ± 8.71 ^{Aa}	2.78 ± 0.23	348.13 ± 36.77 ^{BCcd}	46.32 ± 3.58 ^{Aa}
秀珍菇低剂量组 PGP-L group	132.84 ± 12.71 ^{Aa}	2.77 ± 0.39	429.22 ± 64.87 ^{Aa}	46.46 ± 6.33 ^{Aa}
秀珍菇中剂量组 PGP-M group	121.21 ± 6.85 ^{Aa}	2.64 ± 0.42	411.46 ± 9.56 ^{AaBb}	45.10 ± 5.47 ^{Aa}
秀珍菇高剂量组 PGP-H group	123.34 ± 10.37 ^{Aa}	2.65 ± 0.18	363.85 ± 44.07 ^{ABbCcd}	44.97 ± 2.92 ^{Aa}

2.8 小鼠脾组织形态学观察

由图 3 可见,空白组小鼠脾细胞排列正常,红髓与白髓两者分界清晰,模型组和秀珍菇各剂量组小鼠脾细胞均较空白组增多,模型组脾红髓与白髓分界模糊,CTX 组和秀珍菇低剂量部分区域出现脾红髓与白髓模糊不清现象,秀珍菇中、高剂量组脾红髓与白髓两者分界较清晰。

3 讨论

3.1 秀珍菇对 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用

食用菌抗肿瘤作用及有效成分提取近年来备受关注^[16],已有研究表明,香菇、灰树花、猴头菇、灵芝等药食兼用食用菌均具有抗肿瘤功效^[11-12, 17-18],并发现食用菌中多糖是主要抑瘤活性成分^[11,19]。目前有关秀珍菇及其提取物的药理作用研究主要侧重于抗氧化、抗炎、保护肝等方面^[7-9],很少涉及

抗肿瘤作用研究,因此,我们在前期研究发现秀珍菇粉具有抗氧化、增强免疫功能的基础上(还未发表),进一步研究秀珍菇的抑瘤功效。本研究首先建立 H22 荷瘤小鼠模型,发现小鼠腋部接种 H22 瘤株 3 d 后即出现明显肿块,病理切片观察结果显示模型组小鼠肿瘤细胞呈椭圆形,且排列密集,表明肿瘤模型建立成功。研究还发现,低、中、高剂量秀珍菇均具有的抑瘤效果,秀珍菇中、高剂量组抑瘤率分别达到 47.47% 和 48.80%,已接近阳性药 CTX 的抑瘤效果(55.08%),符合抗肿瘤中草药有效性的标准(抑瘤率 > 30%)要求^[20]。从病理切片上也观察到荷瘤小鼠经秀珍菇处理后出现了肿瘤细胞坏死,且坏死区域明显增加现象,充分验证了秀珍菇的抑瘤效果。

3.3 秀珍菇对 H22 荷瘤小鼠的免疫功能影响

脾指数和胸腺指数分别反映体液和细胞免疫

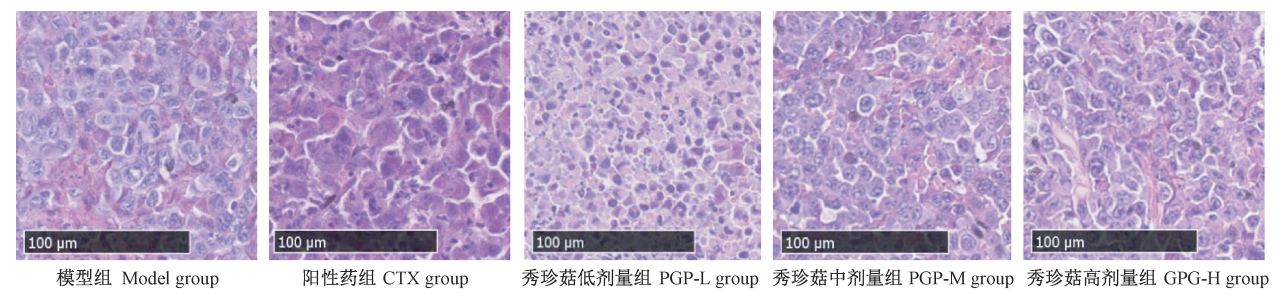


图 2 H22 荷瘤小鼠肿瘤细胞 HE 染色切片(×200)

Figure 2 HE stained sections of tumor cells from H22 tumor-bearing mice (×200)

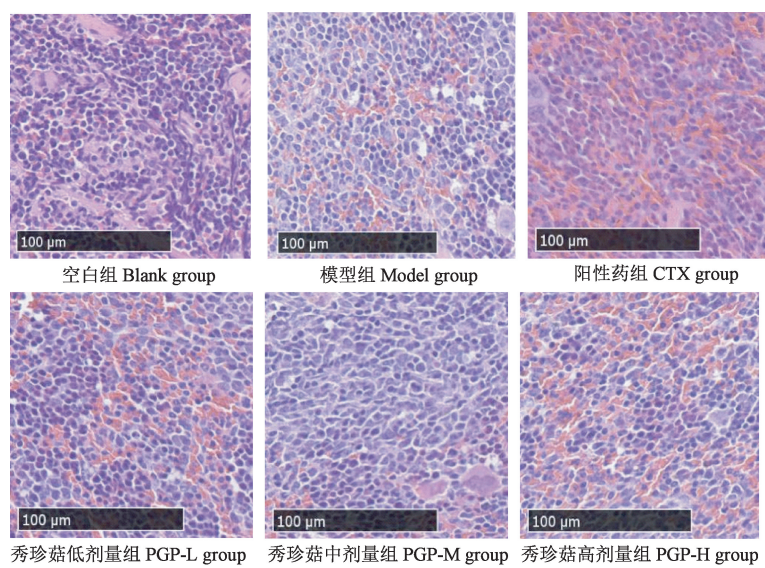


图 3 小鼠脾细胞 HE 染色切片(×200)

Figure 3 HE stained sections of spleen cells in mice (× 200)

功能^[3]。本试验发现小鼠荷瘤后脾过度增大,脾细胞明显增多,这与荷瘤后各类免疫细胞转移至脾后滞留有直接的关系^[21]。环磷酰胺 (CTX) 主要通过免疫抑制来发挥抗肿瘤作用^[22],本试验结果显示,CTX 组小鼠胸腺指数显著低于空白组,脾指数有低于模型组趋势,且脾红髓与白髓模糊不清,而秀珍菇各剂量组小鼠脾指数和胸腺指数均高于 CTX 组,且秀珍菇中、高剂量组小鼠脾红髓与白髓两者分界也较清晰,说明秀珍菇抗肿瘤机制与 CTX 不同,可能是通过保护免疫器官提高机体免疫力来达到抑瘤固本效果。

免疫球蛋白是反映机体体液免疫功能指标。研究显示动物荷瘤后血清免疫球蛋白会发生异常表达,导致功能失调^[23]。本试验发现小鼠荷瘤后血清 IgA 含量异常升高,而秀珍菇能显著降低荷瘤小鼠血清 IgA 水平,说明秀珍菇对荷瘤小鼠体液免疫功能也具有调节作用。

TNF- α 、IL-2 和 IL-6 等细胞因子通过结合相应受体调节细胞生长、分化,调控免疫应答^[24]。一定浓度范围内的 TNF- α 具有组织修复功能,但 TNF- α 浓度异常升高可引起组织损伤^[25]。很多肿瘤细胞会产生 TNF- α ,反过来 TNF- α 和 IL-6 等炎性因子又可刺激肿瘤生长^[24]。而 IL-2 可促进 T 细胞和自然杀伤细胞功能,在抑制肿瘤细胞生长的特异性免疫反应中起重要作用^[26]。在本试验中,小鼠荷瘤后,出现血清 TNF- α 含量显著上升,IL-2 含量显著下降,IL-6 含量有上升趋势等异常改变,而经秀珍菇处理后,上述异常改变得到逆转,说明秀珍菇对荷瘤小鼠细胞因子水平具有正向调节作用。

3.3 秀珍菇对 H22 荷瘤小鼠肝、肾组织抗氧化能力的影响

肿瘤的发生发展与宿主的自由基水平及其代谢产物有关^[27-28]。SOD、CAT 和 GSH-Px 等抗氧化酶活性降低会导致机体清除自由基能力下降,引起氧自由基和 MDA 的堆积,造成机体损伤^[29]。本试验观察到,小鼠荷瘤后,肝 MDA 含量显著上升,肝和肾部分抗氧化酶活性显著降低,而与模型组比较,秀珍菇各剂量组小鼠肝 CAT 活性及肾 SOD 和 CAT 活性显著升高,秀珍菇中、高剂量组小鼠肝 GSH-Px 活力及低、中剂量组肾 GSH-Px 活性均显著升高,而秀珍菇中剂量组小鼠肝 MDA 含量显著降低,表明秀珍菇能显著提高荷瘤小鼠抗氧化能力,并能清除过量表达自由基,从而起到抑制肿瘤生长

和保护正常组织作用。

综上所述,秀珍菇可显著降低荷瘤小鼠平均瘤重,具有较好的抑肿瘤作用,并具有抗氧化和免疫调节功能。由此推测秀珍菇抗肿瘤的可能机制为:通过提高机体抗氧化能力,清除体内过量自由基,下调异常升高的血清 TNF- α 和 IL-6 水平,减轻自由基和高浓度炎性细胞因子对组织损伤,进而改善机体在荷瘤状态下的免疫细胞活性,抑制肿瘤生长;同时通过上调血清 IL-2 水平,间接提高 T 细胞和 NK 细胞活性,促进肿瘤细胞坏死和凋亡,最终达到抗肿瘤效果。秀珍菇体内抗肿瘤作用也可能还有其他作用机制,尚需进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Naveenta K, Khakoo SI. Hepatocellular carcinoma: prospects for nature killer cell immunotherapy [J]. HLA, 2018, 12(2): 138-144.
- [2] Gong YL. Therapy response of Chinese herbal medicine in primary liver cancer [J]. J Clin Oncol, 2015, 33(3): 327-335.
- [3] Chang M, Wu M, Li H. Antitumor activities of novel glycyrrhetic acid-modified curcumin-loaded cationic liposomes in vitro and in H22 tumor-bearing mice [J]. Drug Deliv, 2018, 25(1): 1984-1995.
- [4] Chen L, Wei Y, Zhao S., et al. Antitumor and immunomodulatory activities of total flavonoids extract from persimmon leaves in H22 liver tumor-bearing mice [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 10523.
- [5] Zheng Y, Wang Q, Zhuang W, et al. Cytotoxic, antitumor and immunomodulatory effects of the water-soluble polysaccharides from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) seeds [J]. Molecules, 2016, 21(11): E1465.
- [6] Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, et al.. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi [J]. Mycol Res, 2007, 111(5): 509-547.
- [7] Song XL, Liu ZH, Zhang JJ, et al. Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of exopolysaccharides isolated from *Pleurotus geesteranus* on alcohol induced liver injury [J]. Sci Rep, 2018, 8: 10493.
- [8] Song XL, Shen Q, Liu M, et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of intracellular mycelium polysaccharides from *Pleurotus geesteranus* against alcoholic liver diseases [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 114: 979-988.
- [9] Sun YJ, Zhou C, Huang SC, et al. Selenium polysaccharide SPMP-2a from *Pleurotus geesteranus* alleviates H2O2-Induced oxidative damage in HaCaT cells [J]. BioMed Res Int, 2017, 2017: 4940384.
- [10] 孙玉军, 江昌俊, 任四海. 秀珍菇多糖对 D-半乳糖致衰老小鼠的保护作用 [J]. 食品科学, 2017, 38(5): 251-256.
Sun YJ, Jiang CJ, Ren SH. Protective effect of polysaccharides

- from the fruit body of *Pleurotus geesteranus* against D-galactose-induced aging mice [J]. Food Sci, 2017, 38(5): 251-256.
- [11] Li W, Wang J, Chen Z, et al. Physicochemical properties of polysaccharides from *Lentinus edodes* under high pressure cooking treatment and its enhanced anticancer effects [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 115:994-1001.
- [12] 刘佳,包海鹰,白日忠,等. 灰树花孔菌超微粉体内抗肿瘤作用研究 [J]. 菌物学报, 2018, 37(2): 226-236.
- Liu J, Bao HY, Bai RZ, et al. Anti-tumor activities of *Grifola frondosa* submicron powder on tumor-bearing mice [J]. Mycosystema, 2018, 37(2): 226-236.
- [13] 高雪阳,夏佳乐,包海鹰,等. 硬毛粗盖孔菌子实体提取物抑制 H22 荷瘤小鼠肿瘤活性研究 [J]. 菌物学报, 2017, 36(9): 1278-1288.
- Gao XY, Xia JL, Bao HY, et al. Antitumor activities of fruiting body extract of *Funalia trogii* in H22 bearing mice [J]. Mycosystema, 2017, 36(9): 1278 - 1288.
- [14] 张园园,方肇勤,王艳明. 不同治疗方案对 H22 肝癌荷瘤小鼠的疗效比较 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3):67-77.
- Zhang YY, Fang ZQ, Wang YM. Comparison of the curative effect of three therapeutic regimens on H22 hepatoma-bearing mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(3): 67-77.
- [15] 李仪奎,金若敏,王钦茂. 中药药理试验方法学 [M]. 第二版,上海:上海科学技术出版社;2006.
- Li YK, Jin RM, Wang QM. Experimental Methodology of TCM Pharmacology [M]. Secend Edition, Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House; 2006.
- [16] Sullivan R, Smith JE, Rowan NJ. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine [J]. Perspect Biol Med, 2006, 49(2): 159-170.
- [17] 贾薇,余冬生,徐宾,等. 猴头菌子实体超临界流体技术萃取活性物质初探 [J]. 菌物学报, 2018, 37(12): 1780-1791.
- Jia W, Yu DS, Xu B, et al. A preliminary study on extraction of active substance from *Hericium erinaceus* fruit body using CO₂ supercritical fluid technology [J]. Mycosystema, 2018, 37(12): 1780-1791.
- [18] Opattova A, Horak J, Vodenkova S, et al. Ganoderma Lucidum induces oxidative DNA damage and enhances the effect of 5-Fluorouracil in colorectal cancer in vitro and in vivo [J]. Mutat Res, 2019, 845: 403065.
- [19] 汲晨锋,岳磊. 香菇多糖的化学结构及抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(18): 1536-1539.
- Ji CF, Yue L. Review on chemistry and anti-tumor effect of lentinan [J]. Chin Pharm J, 2013, 48(18): 1536-1539.
- [20] 廖子君,南克俊,韩军. 现代肿瘤治疗药物学 [M]. 北京:世界图书出版社;2002.
- Liao ZJ, Nan LJ, Han J. Modern tumor therapy [M]. Beijing: World Publishing Corporation; 2002.
- [21] 董慧,郑国强,滕安国,等. 荷瘤小鼠脾脏过度增大的机制 [J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(8): 940-943.
- Dong H, Zheng GQ, Teng AG, et al. Mechanism of splenic excess augmentation in tumor-bearing mice [J]. Cancer Res Prev Treat, 2012, 39(8): 940-943.
- [22] Garg AD, More S, Rufo N, et al. Trial watch: Immunogenic cell death induction by anticancer chemotherapeutics [J]. Oncoimmunology, 2017, 6(12): e1386829.
- [23] 张瑞奎,汪超. 苦参碱对大鼠乳腺癌细胞荷瘤生长及其炎症因子与免疫功能的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(4): 375-378.
- Zhang RK, Wang C. Effect of matrine on tumor growth and inflammatory factors and immune function in Wistar rat with breast cancer [J]. Chin J Appl Physiol, 2018, 34(4): 375-378.
- [24] Lin WW, Kari M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer [J]. J Clin Invest, 2007, 117(5): 1175-1181.
- [25] Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Ikemizu S, et al. Optimal site-specific PEGylation of mutant TNF- α improves its antitumor potency [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315(4): 808-814.
- [26] Wang G, Zhao J, Liu J, et al. Enhancement of IL-2 and IFN- γ expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid Me in vivo [J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(6): 864-870.
- [27] Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarker of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research [J]. J Nutr, 2003, 133: 933S-940S.
- [28] Khan MA, Tania M, Zhang DZ, et al. Antioxidant and enzymes [J]. Chin J Cancer Res, 2010, 22(2): 87-92.
- [29] Khan MA, Chen HC, Wan XX, et al. Regulatory effects of resveratrol on antioxidant enzymes: a mechanism of growth inhibition and apoptosis induction in cancer cells [J]. Mol Cells, 2013, 35(3): 219-225.

[收稿日期] 2019-08-30