

乙肝清

乙肝清是云芝糖肽的制剂。云芝糖肽(polystictus proteoglycan, PSP) 是从天然产物担子菌纲云芝中提取的一种混合蛋白多糖(Proteoglycan), 有文献报道其系由 15%蛋白质组成的蛋白多糖体, 具有免疫调节作用, 临床用于抗肿瘤, 抑制动脉硬化, 保肝、抗乙肝、消炎, 改善学习记忆和延缓衰老等作用。其药理作用主要体现在:

一、免疫调节作用

研究发现, PBP 提取物介导的免疫调节作用取决于靶细胞。多糖肽诱导乳腺癌 MCF-7 细胞生长抑制, 产生 $\text{TNF-}\alpha$ 依赖性现象, 但白细胞介素-6 和其他细胞因子不受影响。研究还发现, 蛋白结合多糖时间依赖方式显著增强血淋巴细胞的增殖反应, 这与 IL-6 和 IL-1 β mRNA 上调有关, 并且细胞对 PBP 刺激的反应可能与其浓度成反比⁽¹⁾ (图 1-5)。

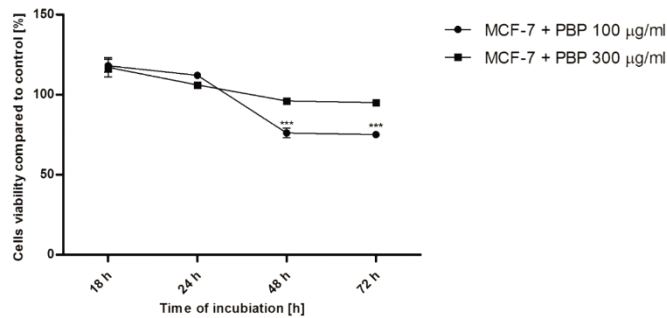


图 1.云芝提取物 PBP 对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用

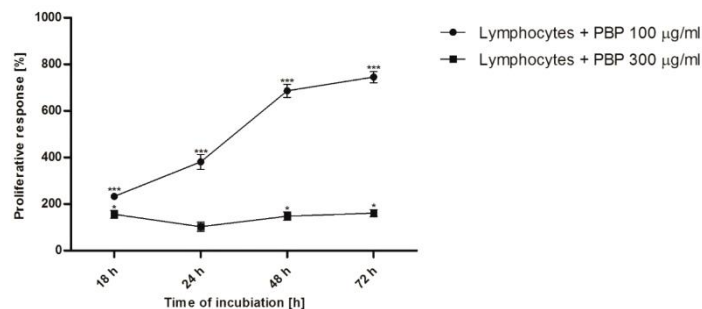


图 2.云芝提取物 PBP 对血淋巴细胞有丝分裂的影响

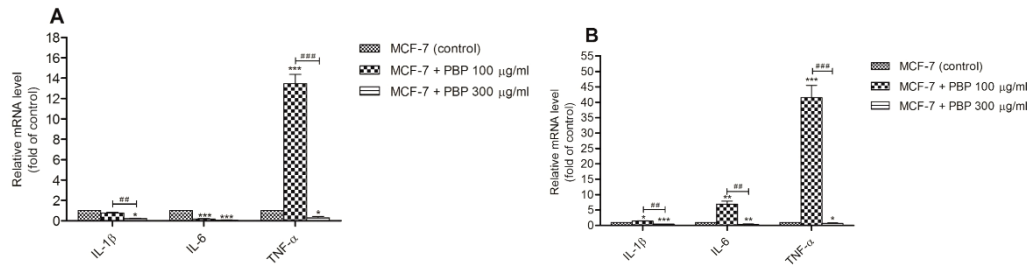


图 3.PBP 对 MCF-7 细胞 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达的影响。

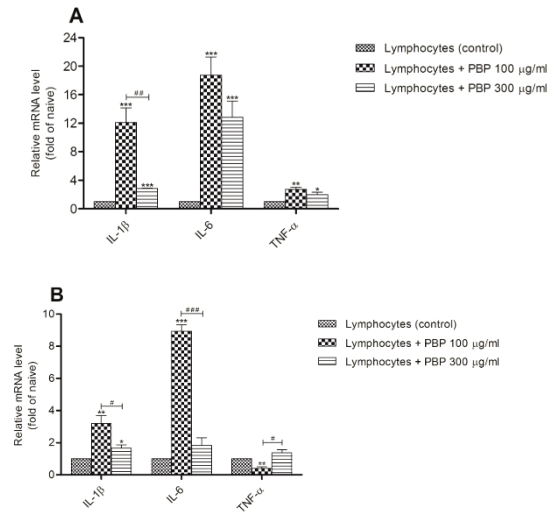


图 4.PBP 对淋巴细胞 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达的影响

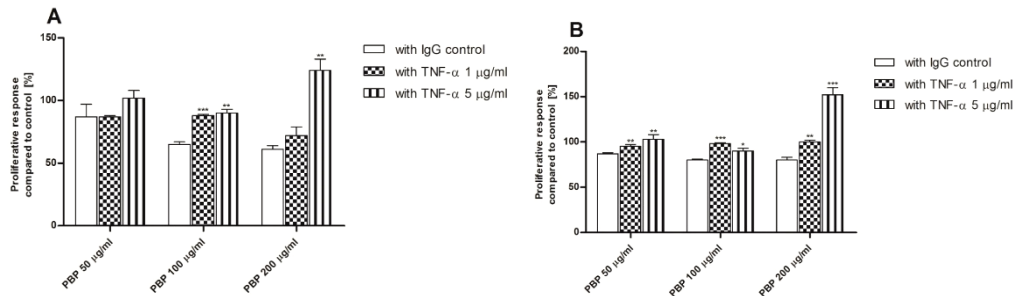


图 5.TNF- α 中和抗体对 CV 蛋白结合多糖介导的 MCF-7 细胞增殖的影响

在 RAW 264.7 巨噬细胞条件培养基中培养的 4T1 乳腺癌细胞产生的促炎性细胞因子 (IL-6 和 TNF- α)：未处理组 (CM-NT) 或 PBP 处理组 (CM-PBP)。在 50% 条件培养基中培养细胞 72 小时，然后通过 ELISA 方法测量上清液中的细胞因子水平。如图所示，与对照组相比，用 CM-NT 和 CM-PBP 处理细胞均显著促进了 4T1 乳腺癌细胞对促炎细胞因子的产生。但是，当在 50% CM-PBP 中培养 4T1 细胞时，IL-6 和 TNF- α 的分泌都显著高于 50% CM-NT 中的分泌 IL-6⁽²⁾ (图 6)。

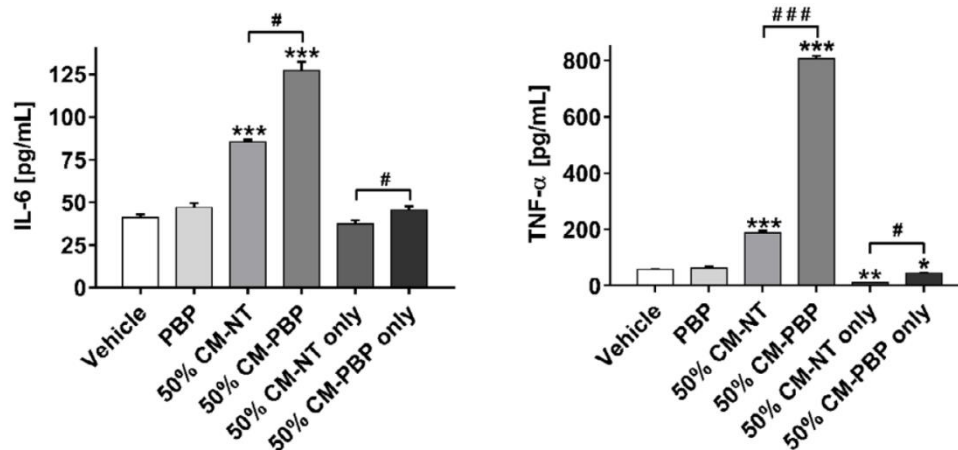


图 6.PBP 对巨噬细胞 IL-6 和 TNF- α 的影响

对 40 例手术确诊的卵巢和子宫体癌患者，按期别及年龄配对分成 2 组，各 20 例。A 组（试验组）接受化疗加云芝糖肽。B 组（对照组）单纯化疗。观察两组治疗前后血免疫指标及生活质量指数的变化。结果治疗前后 Karnofsky 评分值 A 组分别为 84 ± 9.6 分及 90 ± 8.6 分 ($P < 0.05$)，B 组分别为 83 ± 9.2 分及 80 ± 12.8 分 ($P > 0.05$)，治疗后 A 组比 B 组高 10 分 ($P < 0.05$)；治疗后 A 组和 B 组的 CD+4 分别为 28.14 ± 4.10 及 23.12 ± 3.97 ($P < 0.05$)；CD+4/CD+8 为 0.96 ± 0.17 及 0.75 ± 0.21 ($P < 0.01$)；NK 为 23.80 ± 4.90 及 15.32 ± 3.90 ($P < 0.01$)，A 组均明显高于 B 组⁽³⁾，提示云芝糖肽能提高卵巢和子宫体癌患者的细胞免疫和生活质量（表 1-3）。

表 1.PSP 试验组与对照组化疗前后 KPS 积分变化(例)

KPS积分		50	60	70	80	90	100
A组 (n = 20)	治疗前*	0	1	2	8	7	2
	治疗后* Δ	0	0	1	4	10	5
B组 (n = 20)	治疗前**	0	1	3	7	8	1
	治疗后** Δ	0	2	3	8	7	0

* $P < 0.05$ ** $P > 0.05$ Δ $P < 0.05$

表 2.PSP 试验组与对照组化疗前血免疫细胞测定

	CD4	CD4	CD8	CD4 /CD8	NK
A组 (n = 20)	55.05 ± 6.1	23.1 ± 3.84	31.94 ± 7.11	0.72 ± 0.20	15.93 ± 5.46
B组 (n = 20)	54.84 ± 5.87	23.8 ± 4.15	30.46 ± 6.19	0.78 ± 0.19	16.12 ± 4.83
P值	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

表 3.PSP 试验组与对照组化疗后血免疫细胞测定

	CD3	CD4	CD8	CD4 /CD8	NK
A组 (n= 20)	56.14± 7.40	28.14± 4.10	29.42± 5.90	0.96± 0.17	23.80± 4.90
B组 (n= 20)	56.16± 4.27	23.12± 3.97	30.75± 0.21	0.75± 0.21	15.32± 3.90
P值	> 0.05	< 0.05	> 0.05	< 0.01	< 0.01

用 32 只雄性 Balb/C 小鼠随机分为 4 组，每组 8 只。PSP 低、高剂量组分别予以相应浓度的 PSP 溶液灌胃，正常对照组及模型组予以生理盐水灌胃作为对照，连续 25 d。用药第 17 天和第 21 天除正常对照组外分别予以腹腔注射环磷酰胺制备小鼠免疫低下模型，观察小鼠外周血 WBC、淋巴细胞亚群

（CD3+CD4+、 CD3+CD8+、 CD3-CD19+）及胸腺和脾指数变化。用药第 22 天 PSP 低剂量组白细胞下降幅度较小，与模型组相比有统计学差异；PSP 低、高剂量组的淋巴细胞亚群数目下降水平与模型组相比也明显减少，差别有统计学意义。第 26 天 PSP 低、高剂量组 WBC 均较模型组明显改善，与正常对照组相比无统计学差异；PSP 低剂量组淋巴亚群细胞数目显著增加与模型组相比有统计学差异；模型组 CD3+ CD4+淋巴细胞与 PSP 高剂量及正常对照组相比均无统计学差异；各组小鼠脾脏及胸腺指数无统计学差异。实验结果说明 PSP 体内发挥免疫调节作用的机制可能是通过抑制小鼠 WBC 减少、调节 T 淋巴细胞亚群、增加 B 淋巴细胞数量⁽⁴⁾实现的（图 7，表 4-5）。

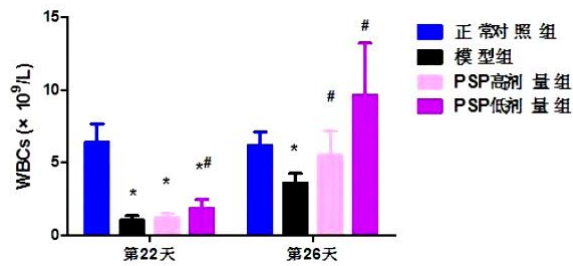


图 7.各组白细胞计数比较

表 4.第 22 天对外周血淋巴细胞亚群的影响 (x±s)

组别	n	CD3 ⁺ CD19 ⁺ (×10 ⁷ /L)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (×10 ⁹ /L)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (×10 ⁹ /L)
正常对照组	8	148.03±36.39 [#]	0.86±0.24 [#]	0.24±0.08 [#]
模型组	8	0.67±0.40	0.29±0.13	0.06±0.03
PSP高剂量组	8	1.97±0.97 ^{*#}	0.49±0.13 ^{*#}	0.10±0.03 ^{*#}
PSP低剂量组	8	2.19±2.05 ^{*#}	0.86±0.29 [#]	0.18±0.08 [#]

注：与正常对照组比较，*P<0.05；与模型组比较，#P<0.05。

表 5.第 26 天对外周血淋巴亚群的影响 (x±s)

组别	n	CD3 ⁺ CD19 ⁺ (×10 ⁷ /L)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (×10 ⁹ /L)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (×10 ⁹ /L)
正常对照组	8	137.25±44.78 [#]	0.94±0.16	0.23±0.04 [#]
模型组	7	1.89±0.79	0.89±0.19	0.17±0.04
PSP 高剂量组	8	5.38±2.63 ^{*#}	1.60±0.88	0.35±0.17 [#]
PSP 低剂量组	7	7.68±3.70 ^{*#}	3.06±1.27 ^{*#}	0.64±0.22 ^{*#}

注：与正常对照组比较，*P<0.05；与模型组比较，#P<0.05。

环孢素对人淋巴细胞增殖、细胞周期、细胞死亡、免疫表型和细胞周期调控蛋白均产生影响。实验结果表明，PSP 分别通过促进和抑制静息态和植物血凝素（PHA）刺激的淋巴细胞的增殖。PHA 刺激的淋巴细胞出现 G0/G1 细胞周期阻滞，PSP 处理后细胞周期蛋白 E 表达降低。PSP 和环孢素均能阻断受刺激淋巴细胞 CD4/CD8 比值的降低。PSP 不诱导人淋巴细胞死亡，但 Fas 受体的抑制提示 PSP 对外源性细胞死亡信号具有保护作用。与单独使用真菌代谢物相比，PSP 和环孢素联合治疗的稳态效应更为有效⁽⁵⁾，PSP 在抑制活化的人淋巴细胞的异常增殖方面具有类似于环孢素的抑制机制（图 8-11，表 6-8）。

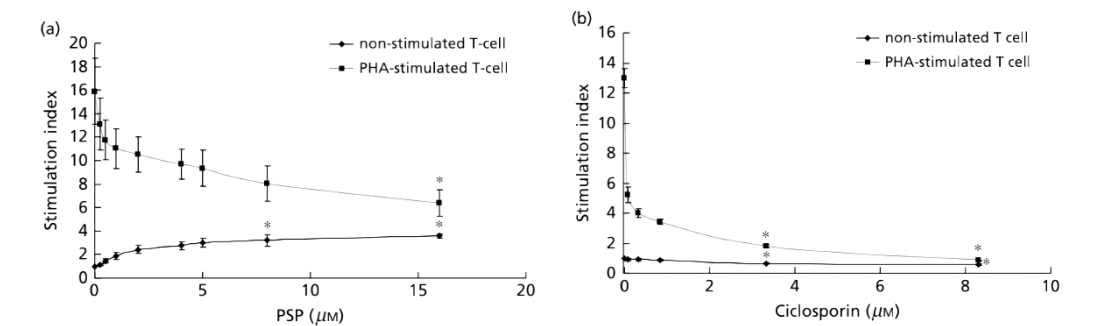


图 8.云芝多糖肽和环孢素对淋巴细胞 DNA 合成的影响

表 6.云芝多糖肽和环孢素对淋巴细胞周期分布的影响

Treatment	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Non-PHA	94.49 ± 2.89	2.44 ± 1.22	3.08 ± 1.67
PHA	73.46 ± 0.80 ⁺⁺	22.78 ± 0.88 ⁺⁺⁺	3.76 ± 0.32
+ PSP	82.87 ± 0.82 ^{**}	14.48 ± 0.90 ^{**}	2.66 ± 0.14
+ ciclosporin	91.14 ± 2.37 ^{**}	7.01 ± 1.97 [*]	1.85 ± 0.46 [*]
+ ciclosporin + PSP	94.27 ± 2.10 ^{**} , ^{##}	3.95 ± 1.05	1.78 ± 1.06 ^{***} , [#]

Non-phytohaemagglutinin (PHA) and PHA (5 μg/ml)-stimulated lymphocytes were incubated with polysaccharopeptide (PSP; 5 μM), ciclosporin (0.83 μM), or both, for 48 h. The cell cycle distribution was determined by flow cytometry with propidium iodide staining. Data are the mean ± SEM, n = 4, and compared by Student's *t*-test. *, **, ****P* < 0.05, 0.01 and 0.001 PHA + PSP, PHA + ciclosporin, PHA + ciclosporin + PSP vs PHA. [#], ^{##}*P* < 0.05 and 0.01 PHA + PSP vs PHA + ciclosporin + PSP. ⁺⁺, ⁺⁺⁺*P* < 0.01 and 0.001 PHA vs non-PHA.

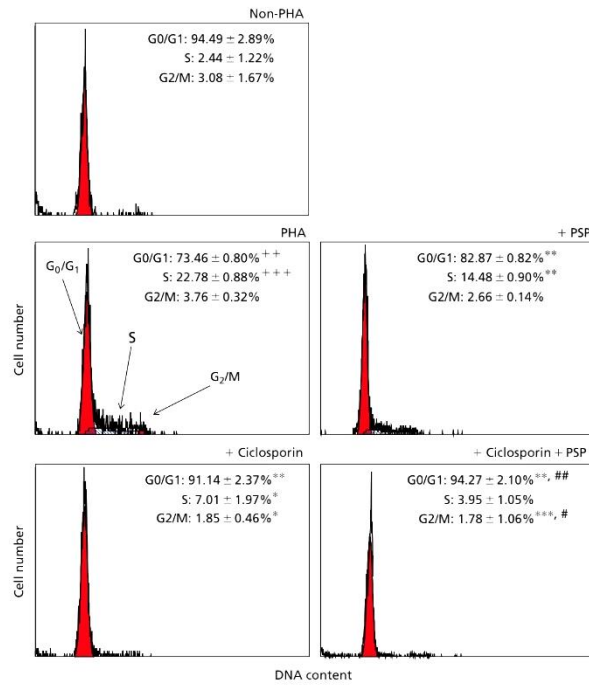


图 9.云芝多糖肽和环孢素对淋巴细胞细胞周期的影响

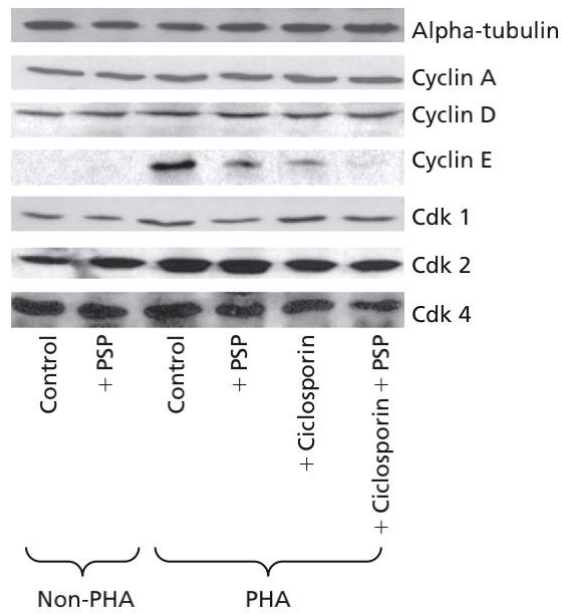


图 10.云芝多糖肽和环孢素对 lym 光细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖激酶表达的影响

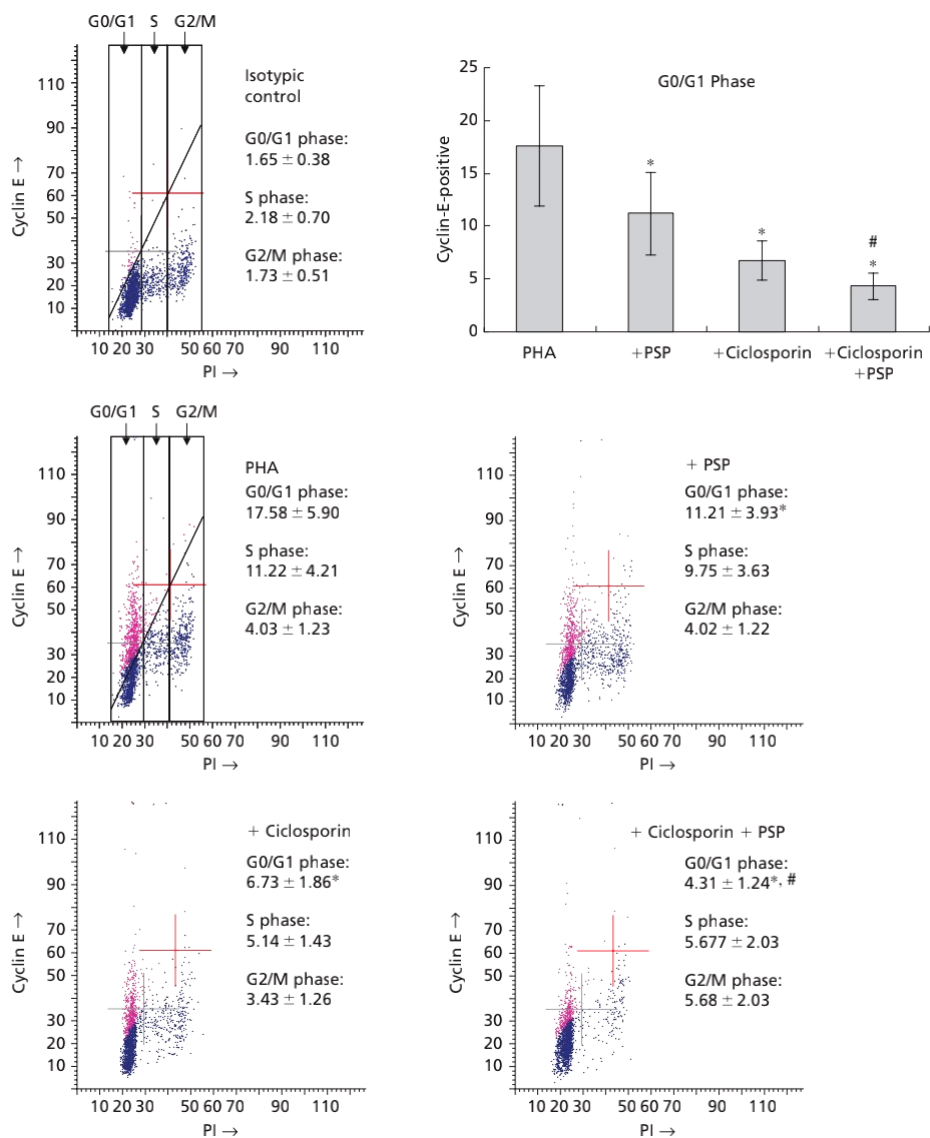


图 11.云芝多糖肽和环孢素对淋巴细胞周期中细胞周期蛋白 E 表达的影响

表 7 云芝多糖肽和环孢素对淋巴细胞凋亡及 Fas 受体 (CD3+CD95+) 表达的影响

Treatment	Apoptosis	Viable	Necrosis	CD3 ⁺ CD95 ⁺
Non-PHA	4.21 ± 1.39	87.85 ± 3.27	6.63 ± 1.69	8.21 ± 2.22
+ PSP (1 μ M)	4.72 ± 1.59	85.47 ± 3.54	9.09 ± 2.01	7.45 ± 2.29
+ PSP (5 μ M)	4.33 ± 1.37	83.30 ± 4.19	11.71 ± 2.86	$3.12 \pm 0.74^*$
PHA	$9.74 \pm 2.91^*$	$66.88 \pm 6.23^*$	$19.37 \pm 4.32^*$	$54.42 \pm 0.82^*$
+ PSP (1 μ M)	9.69 ± 2.90	67.11 ± 5.50	19.49 ± 3.92	54.78 ± 3.46
+ PSP (5 μ M)	12.47 ± 3.61	66.51 ± 5.30	17.84 ± 2.89	49.88 ± 4.36
PHA + cyclosporin	$14.15 \pm 4.56^*$	$66.02 \pm 6.34^*$	$16.37 \pm 2.88^*$	$39.51 \pm 3.63^{*,*}$
+ PSP (1 μ M)	11.16 ± 3.43	69.08 ± 5.10	17.14 ± 3.53	$34.97 \pm 3.30^*$
+ PSP (5 μ M)	11.56 ± 3.42	68.33 ± 5.06	17.99 ± 3.30	$20.94 \pm 1.51^*$

表 8.云芝多糖肽和环孢素对辅助性 T 淋巴细胞（CD3+CD4+）、细胞毒性 T 淋巴细胞（CD3+CD8+）和 B 淋巴细胞（CD19+）的调节作用

Treatment	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD19 ⁺ (%)
Non-PHA	36.09 ± 1.80	22.54 ± 2.44	1.66	14.71 ± 0.40
+ PSP	39.41 ± 3.19	18.95 ± 1.88	2.17	14.23 ± 1.20
PHA	32.70 ± 0.83	49.46 ± 1.43 ⁺⁺⁺	0.66 ⁺⁺	12.11 ± 0.68 ⁺
+ PSP	30.34 ± 1.99	37.69 ± 3.30 ^{**}	0.84	10.85 ± 1.07
+ ciclosporin	27.92 ± 1.64 [*]	24.83 ± 2.95 ^{***}	1.21	5.97 ± 0.29 ^{***}
+ ciclosporin + PSP	29.34 ± 1.82	21.15 ± 0.50 ^{***}	1.40 ^{**}	8.33 ± 0.18 ^{***,*}

将 PSP 与小鼠骨髓未成熟树突状细胞共同孵育，48 小时后可见细胞表面产生明显树突状突起，FACS 分析 MHC-II，CD80，CD86 阳性细胞比例，发现分别有 6.5%、7.1%和 5.0%的增加。孵育后的细胞培养液用 ELISA 检测树突状细胞产生的 TNF- α 和 IL-12 细胞因子，结果发现 PSP 可显著诱导 TNF- α 和 IL-12 的产生，100 g/ml 时诱导的生成量分别是对照的 1.96 和 1.85 倍。这些结果显示⁽⁶⁾，PSP 免疫调节机制与促进树突状细胞成熟、产生调控细胞因子并递呈抗原有关。

应用 cDNA 微阵列和细胞因子抗体阵列检测 PSP 对 PBMCs 的差异基因表达谱和细胞因子分泌，RT-PCR 或 Westernblot 检测 TLR 信号转导及其下游途径的关键基因和蛋白的表达，研究 PSP 对人外周血单个核细胞（PBMCs）免疫信号转导相关基因表达和细胞因子分泌的影响。结果发现，PSP 可上调 IFN- γ 、CXCL10、CXCL10 等 22 个基因的表达，在 117 个与 TLR（如 TLR4，TLR5）信号相关的基因中表达。在 PSP 作用下，PBMCs 中与 TLR 信号通路相关的 23 个基因（如 TLR9、TLR10、SARM1、TOLLIP）下调。5 种细胞因子（GCSF、GM-CSF、IL-1 α 、IL-6、IFN- γ ）在 PSP 作用下上调了 1.3 倍以上，TLR 信号通路的关键分子 TRAM、TRIF 和 TRAF6 的 mRNA 水平显著升高⁽⁷⁾。此外，TRAF6 蛋白水平也显著升高。结果表明 PSP 调节人外周血单个核细胞 TLR 信号通路相关基因表达和细胞因子分泌，特别是 TLR 的 TRAM-TRIF-TRAF6 辅助途径可能是 PSP 免疫调节的关键相关信号途径之一（图 12-14，表 9-10）。

表 9.PSP 使 PBMCs 中与 TLR 信号通路相关的基因上调状况

GenBank	Symbol	Description	Function	Fold change
NM_001228	CASP8	Caspase 8	Apoptosis-related cysteine protease	3.617
NM_005191	CD80	CD80 antigen	Immune response	5.187
NM_014358	CLECSF9	C-type lectin domain family 4, member E	Antimicrobial humoral response	2.542
NM_000758	CSF2	Colony-stimulating factor 2	Cell surface receptor linked signal transduction	5.867
NM_000759	CSF3	Colony-stimulating factor 3	Immune response	59.959
NM_001565	CXCL10	Chemokine ligand 10	Positive regulation of cell proliferation	3.368
NM_005229	ELK1	Member of ETS oncogene family	Regulation of transcription	3.182
NM_003824	FADD	Fas-associated via death domain	Cell surface receptor linked signal transduction	3.530
NM_005343	HRAS	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	Small GTPase-mediated signal transduction	5.950
NM_002154	HSPA4	Heat shock 70 kDa protein 4	Heat shock protein activity	2.892
NM_002155	HSPA6	Heat shock 70 kDa protein 6	Protein folding	15.177
NM_000619	IFNG	Interferon γ	Immune response; cytokine activity	2.360
NM_005582	LY64	Lymphocyte antigen 64 homolog	Receptor activity	4.518
NM_004834	MAP4K4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	Protein kinase cascade	3.369
NM_002754	MAPK13	Mitogen-activated protein kinase 13	Protein amino acid phosphorylation	2.269
NM_021255	PELI2	Pellino homolog 2	<i>Drosophila</i>	2.027
NM_000963	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Peroxidase activity	3.893
NM_021649	TICAM2	Toll-like receptor adaptor molecule 2	Signal transducer activity	2.283
NM_003266	TLR4	Toll-like receptor 4	Signal transduction; immune response; macrophage activation	3.580
NM_003268	TLR5	Toll-like receptor 5	Signal transduction; Immune response; transmembrane receptor activity	5.991
NM_006068	TLR6	Toll-like receptor 6	Signal transduction; immune response; transmembrane receptor activity	8.987
NM_016562	TLR7	Toll-like receptor 7	Signal transduction; immune response; transmembrane receptor activity	7.5452

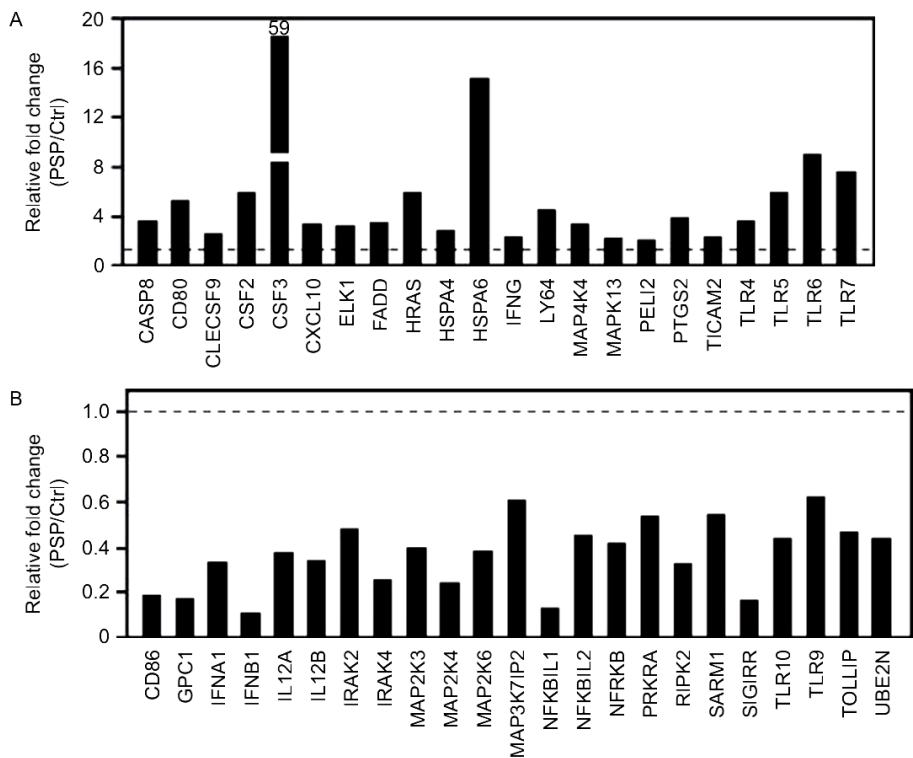


图 12.微阵列分析显示 PSP 调节 PBMCs TLR 信号通路及其下游信号相关基因的
表达

表 10.在 PSP 刺激的 PBMCs 中, 23 个与 TLR 信号相关的基因表达下调了两倍以上

GenBank	Symbol	Description	Function	Fold change
NM_006889	CD86	CD86 antigen	Immune response	0.140
NM_002081	GPC1	Glypican 1	Integral to plasma membrane	0.128
NM_024013	IFNA1	Interferon, α 1	Interferon-class cytokine receptor binding	0.254
NM_002176	IFNB1	Interferon, β 1	Negative regulation of cell proliferation	0.077
NM_000882	IL12A	Interleukin 12A	Natural killer cell stimulatory factor 1	0.029
NM_002187	IL12B	Interleukin 12B	Interleukin-12 receptor binding	0.264
NM_001570	IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	Protein amino acid phosphorylation	0.374
NM_016123	IRAK4	Interleukin-1 receptor-associated kinase 4	Transferase activity	0.193
NM_002756	MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	MAP kinase kinase activity	0.304
NM_003010	MAP2K4	Mitogen-activated protein kinase kinase 4	JNK cascade	0.180
NM_002758	MAP2K6	Mitogen-activated protein kinase kinase 6	DNA damage induced protein phosphorylation	0.297
NM_015093	MAP3K7IP2	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2	Signal transducer activity	0.476
NM_005007	NFKBIL1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1	Cytoplasmic sequestering of transcription factor	0.096
NM_013432	NFKBIL2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 2	Transcription corepressor activity	0.354
NM_006165	NFRKB	Nuclear factor related to kappa B binding protein	Inflammatory response	0.324
NM_003690	PRKRA	Protein kinase, interferon-inducible double-stranded RNA-dependent activator	Negative regulation of cell proliferation	0.417
NM_003821	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	Protein amino acid phosphorylation	0.250
NM_015077	SARM1	Sterile alpha and TIR motif containing 1	Inflammatory response	0.423
NM_021805	SIGIRR	Single Ig IL-1R-related molecule	Transmembrane receptor activity	0.126
NM_030956	TLR10	Toll-like receptor 10	Immune response; inflammatory response	0.339
NM_017442	TLR9	Toll-like receptor 9	Immune response; inflammatory response	0.488
NM_019009	TOLLIP	Toll interacting protein	Intracellular signaling cascade; inflammatory response	0.362
NM_003348	UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N	Ubiquitin-protein ligase activity	0.340

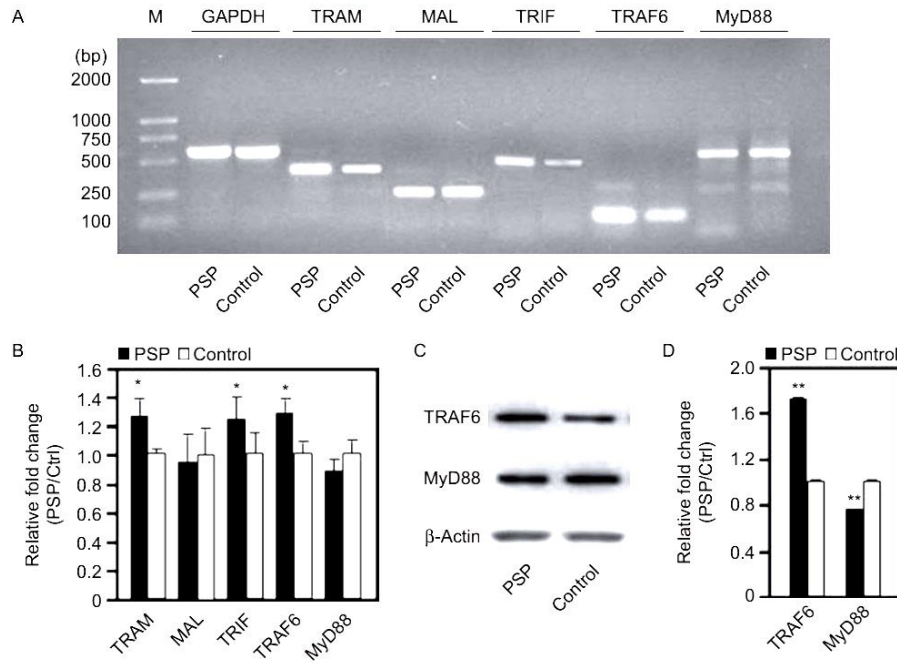


图 13.PSP 刺激 PBMCs 中 TLR 信号的关键基因

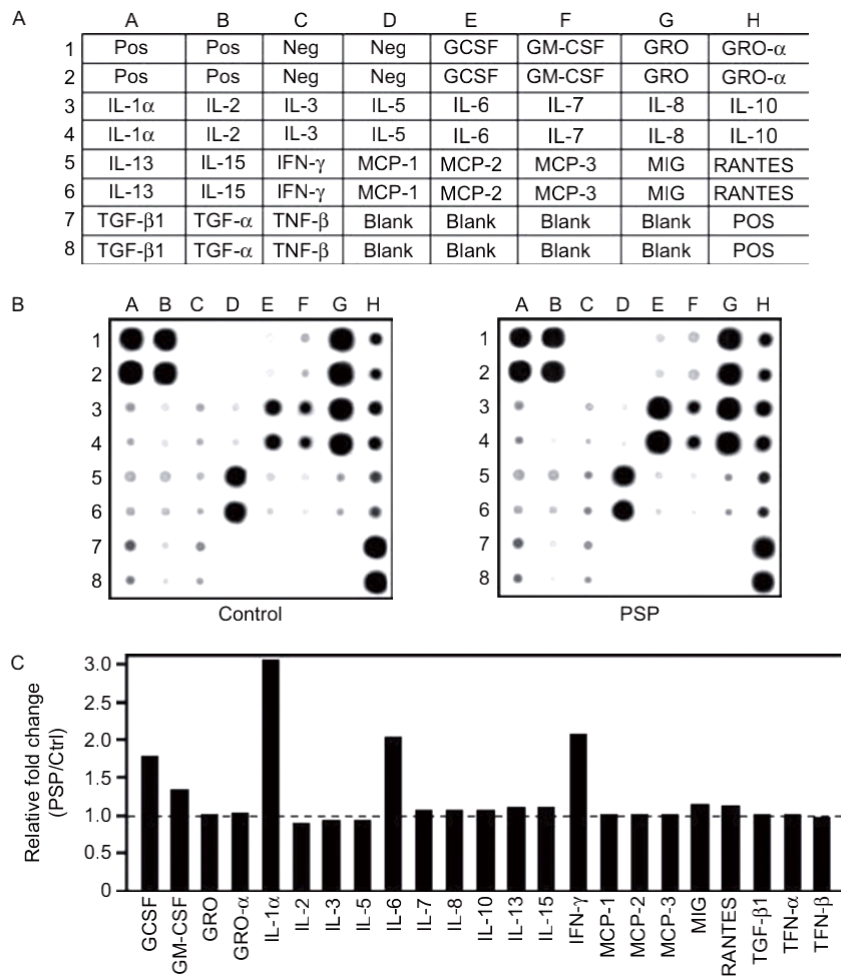


图 14.PSP 控制细胞因子分泌与细胞因子抗体阵列分析的 TLR 信号有关

云芝糖肽免疫刺激作用的可能潜在机制为：（A）通过 TLR（s）（可能还有其他受体）检测 T 淋巴细胞上的多糖肽（PSP）会启动信号级联，如 p38mapk 通路，导致 T 细胞增殖增强，并释放大促炎性细胞因子，如 IL-2 和 IFN- γ 。（B）PSP 与巨噬细胞上的任何/所有 Dectin-1、CR3 或 TLR 结合，可激活增强吞噬活性的遗传事件，并诱导产生氧化自由基和细胞因子，如肿瘤坏死因子- α 。（C）BCR 对 PSP 的识别导致 B 细胞活化、克隆增殖，最终分化为 IgM+或 IgG+血浆和记忆 B 细胞。或者，PSP 可能以类似于 T 细胞的方式作用于 B 细胞，通过 TLR（s）非特异性激活 B 细胞，并导致多克隆 IgM 和 IgG 水平的普遍增加⁽⁸⁾（图 15）。

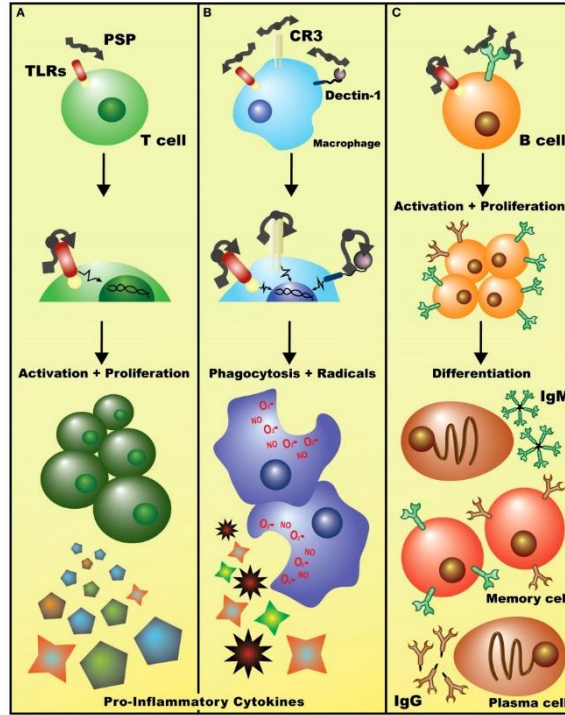


图 15.云芝糖肽免疫刺激作用的潜在机制。

PSP 作为一种生物反应调节剂，诱导 $INF-\gamma$ 、 $IL-2$ 释放增加和 T 淋巴细胞增殖，激活巨噬细胞、自然杀伤细胞、淋巴因子活化的杀伤细胞 (lymphokine-activated killer cells, LAK 细胞) 及肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor-infiltration lymphocyte, TIL 细胞) 等免疫细胞的活性。抑制小鼠 WBC 减少、提升受抑 T 淋巴细胞亚群、增加 B 淋巴细胞数量，促进 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 和 $TNF-\alpha$ mRNA 的表达，促进淋巴细胞有丝分裂，促进树突状细胞，CD80，CD86 阳性细胞生长与成熟，上调免疫因子 GCSF、GM-CSF、 $IL-1\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IFN-\gamma$ 的基因表达，提示，PSP 通过体液免疫、细胞免疫调节机体的免疫功能。

二、抗肿瘤作用

采用双变量溴脱氧尿苷/碘化丙啶 (BrdUrd/PI) 流式细胞术检测 BrdUrd 阳性标记细胞在 HL-60 细胞上的相对运动 (RM) 和 DNA 合成时间 (T_s)。用 AnnexinV/PI 流式细胞术分析活细胞、死细胞和凋亡细胞。采用 AnnexinV/PI 流式细胞仪和 western 印迹法检测细胞周期蛋白 E 和细胞周期蛋白 B1 的表达。用人外周血单个核细胞检测 PSP 和 CPT 的细胞毒性。结果显示 PSP 抑制 HL-60

细胞增殖，抑制细胞通过 S 期和 G2 期的进展，减少 ^3H 胸腺嘧啶核苷的摄取，延长 DNA 合成时间（Ts）。CPT 细胞毒性增强。细胞对 CPT 细胞毒作用的敏感性在细胞周期的 S 期最高，在 G2 期的敏感性很小⁽⁹⁾。另一方面，无论是 PSP 还是 CPT，正常人外周血单个核细胞无明显细胞死亡。实验结果说明 PSP 可增强 HL-60 细胞对 CPT 诱导的细胞凋亡的敏感性。癌细胞的敏感性与 HL-60 细胞相似。PSP 能迅速阻止和/或杀伤 S 期细胞，且干扰 CPT 的抗癌作用（图 16-25，表 11）。

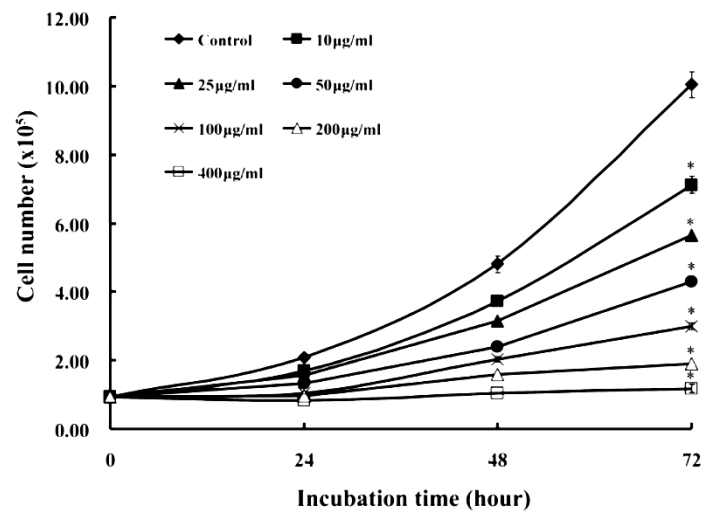


图 16.PSP 对人白血病 HL-60 细胞增殖的影响

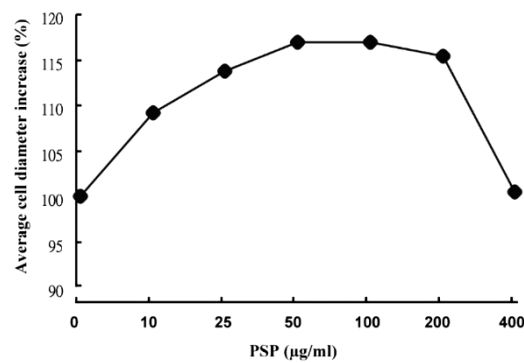


图 17.PSP 对 HL-60 细胞平均大小的影响

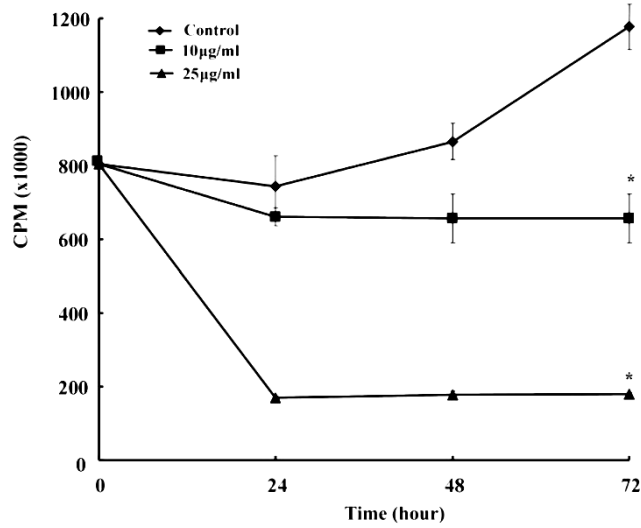


图 18.PSP 对 HL-60 细胞摄取 $[^3\text{H}]$ 胸苷的影响

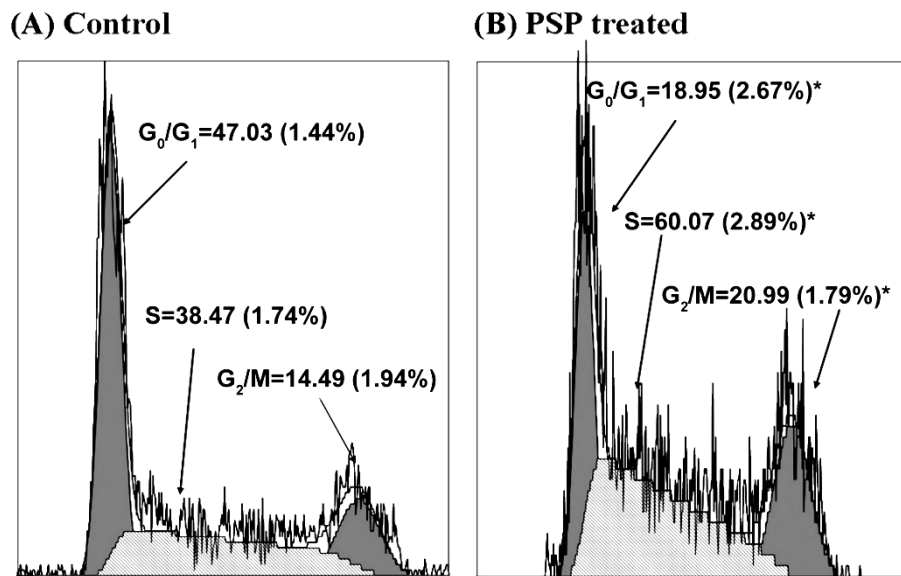


图 19.PSP 对 HL-60 细胞周期分布的影响

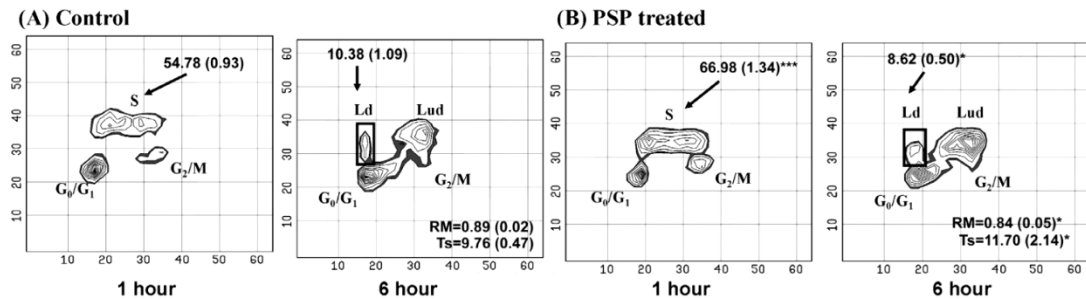


图 20.用流式细胞仪分析 DNA 的双变量 BrdUrd/PI 标记

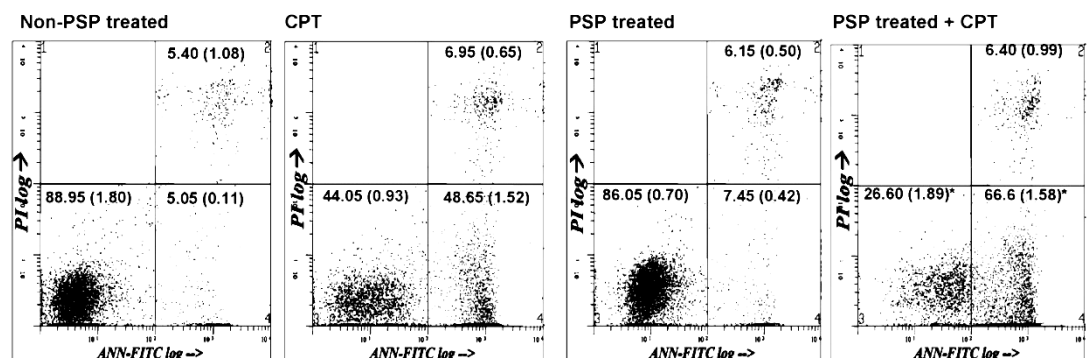


图 21. PSP、CPT 和 PSP+CPT 治疗对 HL-60 细胞凋亡的影响

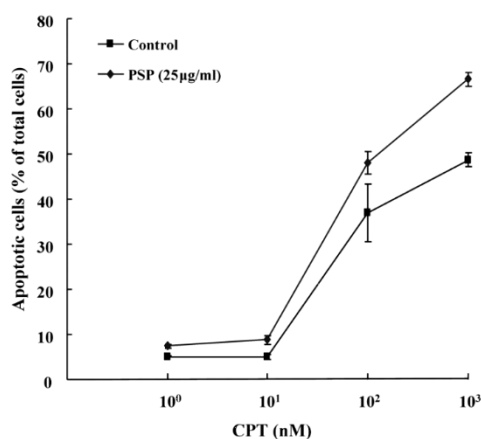


图 22.用 Annexin V/PI 流式细胞术分析经 PSP、CPT 和 PSP+CPT 治疗的 HL-60 细胞凋亡

表 11.CPT 和 CPT 加 PSP 预处理对正常人外周血单个核细胞的影响。

Treatment	Viable cells	Apoptotic cells	Necrotic cells
Control	37.93 (5.75)	29.62 (1.87)	31.51 (5.00)
PSP (25 µg/ml)	39.33 (4.70)	28.26 (2.18)	31.49 (4.11)
CPT (1 µM)	34.91 (5.39)	30.95 (2.49)	33.33 (5.05)
PSP (25 µg/ml) + CPT (1 µM)	40.80 (9.26)	28.85 (4.51)	29.38 (6.52)

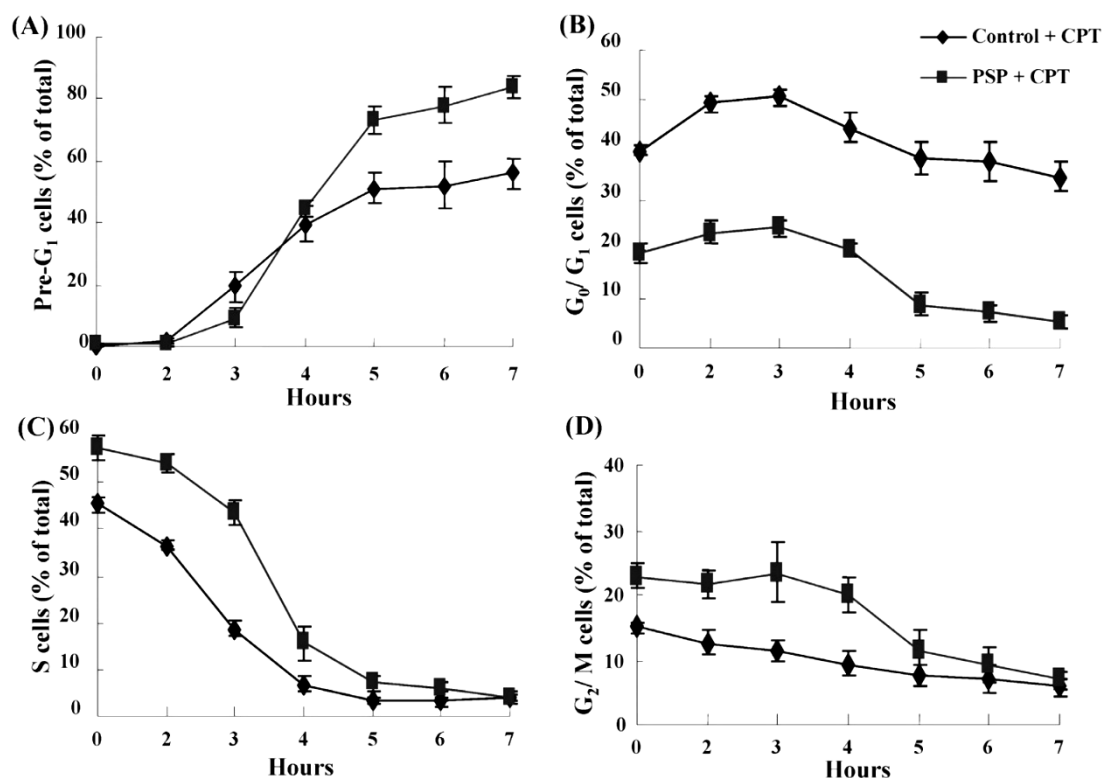


图 23.HL-60 细胞凋亡群体和细胞周期分布变化的 DNA 流式细胞仪分析

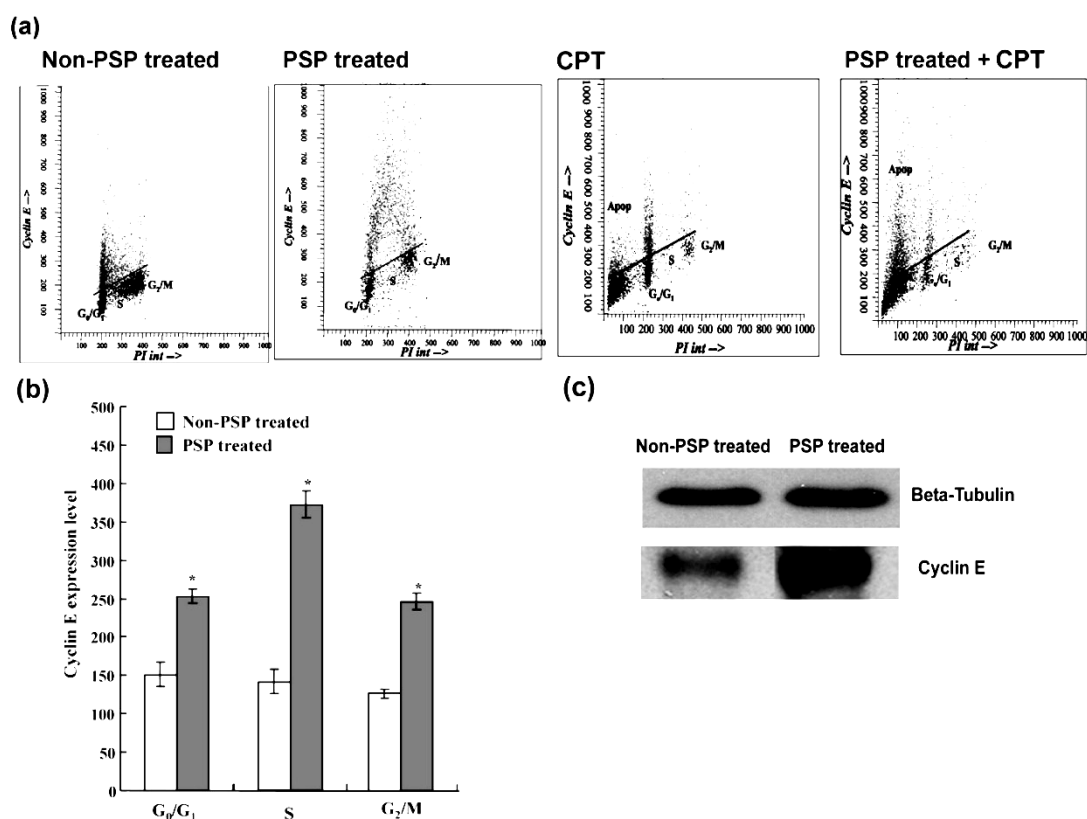


图 24. PSP、CPT 及 PSP+CPT 对 HL-60 细胞周期蛋白 E 表达的影响

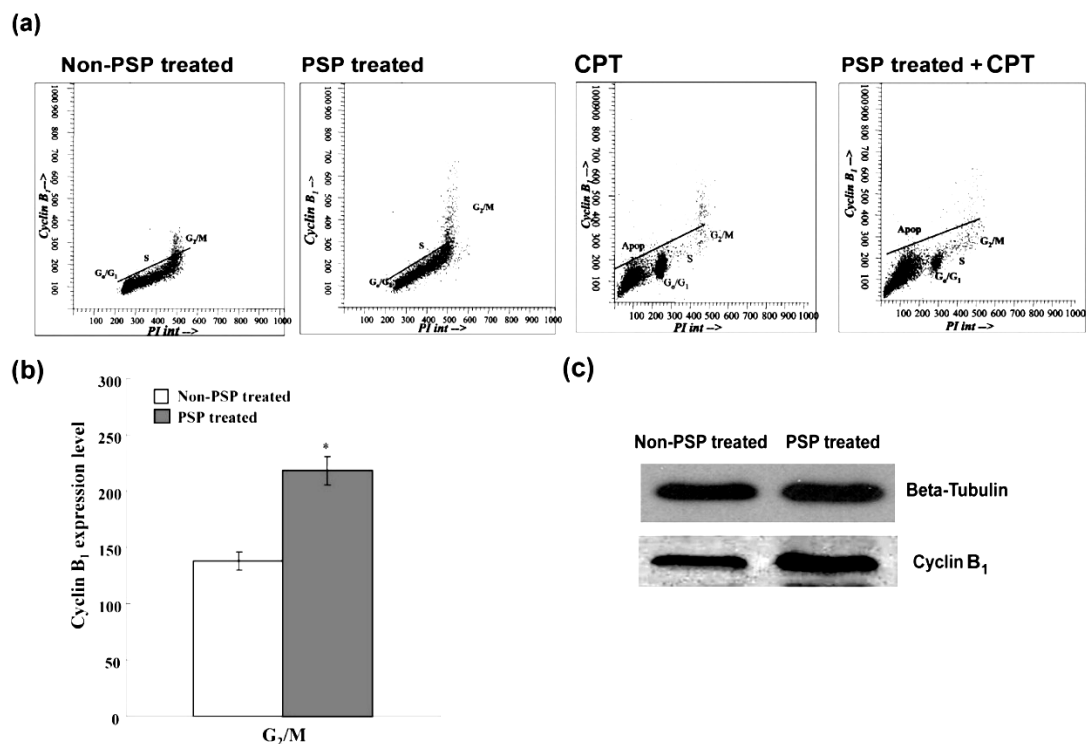


图 25.PSP、CPT 及 PSP+CPT 对 HL-60 细胞周期蛋白 B1 表达的影响

采用小鼠移植性肿瘤病理模型，观察云芝糖肽对 S-180 荷瘤小鼠的抑瘤作用和对生命延长率的影响。结果：PSP 25mg/kg 腹腔给药，抑瘤率为 34.85%；1000mg/kg 口服给药，抑瘤率为 32.99%；连续腹腔给药 25mg/kg，1 周后腹腔接种 S-180，生命延长率达 44.62%。表明 PSP 能有效地抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长，可明显延长 S-180 腹水小鼠的存活期⁽¹⁰⁾（表 11-13）。

表 11.PSP 对荷 S-180A 腹水癌小鼠生命延长率的影响

组别(mg/ kg)	存活(天数)	生命延长(%)
NS	16. 25±1. 05	
PSP 50	22. 60±4. 15	39. 08
PSP 25	23. 50±3. 81	44. 62

表 12.PSP 口服给药对荷 S-180 小鼠的抑瘤作用

组别 (mg/ kg)	鼠数 (开始/ 结束)	给药 天数	瘤重 (g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率 (%)	P 值
NS	12/ 10	9	1.94±0.14		
PSP 500	10/ 9	9	1.32±0.43	31.96	< 0.05
PSP 1000	10/ 10	9	1.30±0.49	32.99	< 0.05
PSP 1500	10/ 9	9	1.35±0.35	30.41	
CY 30ip	10/ 9	2	0.15±0.02	92.27	< 0.001

表 13.PSP 腹腔给药对荷 S-180A 小鼠的抑瘤作用

组别 (mg/ kg)	鼠数 (开始/ 结束)	给药 天数	瘤重 (g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率 (%)	P 值
NS	12/ 11	9	1.98±0.45		
PSP 12.5	10/ 10	9	1.38±0.63	30.30	
PSP 25	10/ 10	9	1.29±0.74	34.85	< 0.05
PSP 50	10/ 9	9	1.44±0.59	27.27	
CY 30ip	10/ 9	2	0.15±0.02	92.42	< 0.001

采用流式细胞术 BrdU/DNA 双染法获得各时相细胞分布状况和细胞周期的动力学参数。结果：0.1mg/ml PSP 处理 12h 后，G2/M 期细胞百分比由对照组的 11.09%减少至 3.69%。DNA 合成时间由 12.10 h 延长至 108.40 h。24h 处理组中，S 期细胞百分比由对照组的 43.29%增加至 67.26%，而 G0/G1 期和 G2/M 期细胞百分比均减少，G0/G1 期细胞百分比由对照组的 37.47%减少至 27.43%，G2/M 期细胞百分比由对照组的 19.24%降低至 5.31%。DNA 合成时间更是由 11.95h 延长至 114.52h 即 PSP 对人急性淋巴母细胞白血病 Molt-4 细胞周期的阻滞作用在于 S 期，该作用与 DNA 合成抑制有关⁽¹¹⁾（图 26-27，表 14）。

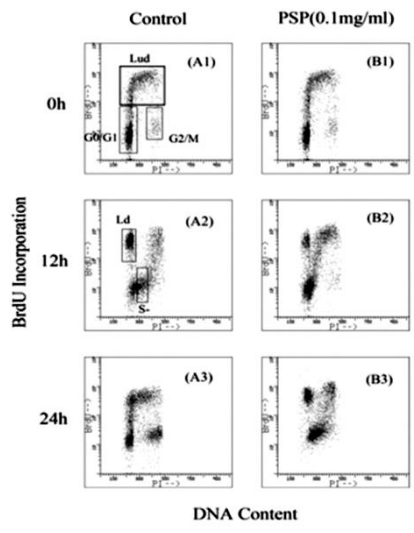


图 26.流式细胞术 BrdU/DNA 双染法得到的 BrdU/DNA 双参数直方图

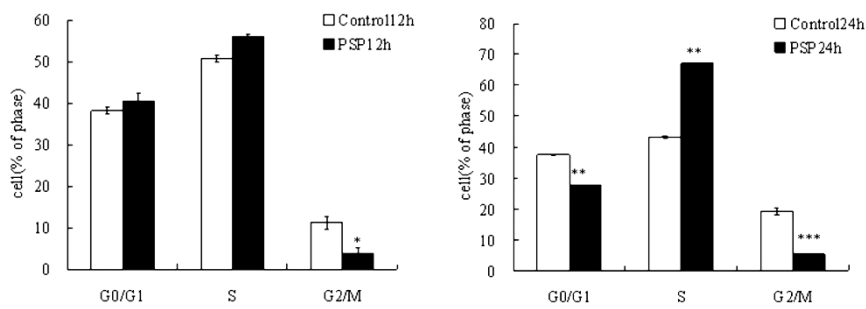


图 27. PSP 0.1mg/ml 处理 Molt-4 细胞 12h、24h 各周期时相细胞分布百分比的变化

表 14.PSP 对 Molt-4 细胞周期相对移动参数和 DNA 合成时间的影响

	Time(h)	RM	Ts
Control	12	1.05± 0.01	12.10± 0.58
PSP (0.1 mg/ml)	12	0.61± 0.00*	108.40± 0.22*
Control	24	1.55± 0.01	11.95± 0.43
PSP (0.1 mg/ml)	24	0.65± 0.00*	114.52± 0.31*

通过体外分离乳腺癌患者或健康人外周血单个核细胞（PBMC），将其分别分为 PSP 组（分别加入终浓度为 25 μ g / ml 的 PSP 和终浓度为 100 μ g / ml 的 PHA）和对照组（只加入终浓度为 100 μ g / ml 的 PHA），采用 TLR4 单克隆抗体对各组细胞进行免疫荧光染色。将乳腺癌患者 PBMC 分为空白对照组、TLR4 抗体组、PSP 组和 PSP+TLR4 抗体组，采用 Q-PCR 检测各组 PBMC IL-12、IL-6 和 TNF- α 的表达水平。结果健康志愿者对照组 PBMC 荧光强度较强，而健康志愿者 PSP 组 PBMC 荧光强度较弱；乳腺癌患者 PSP 组与乳腺癌患者

对照组相比，细胞荧光强度更弱。与空白对照组比较，TLR4 抗体组 PBMC IL-12 和 TNF- α 的表达水平均显著降低，PSP 组 PBMC IL-12、IL-6 和 TNF- α 的表达水平均显著上调；与 PSP 和 TLR4 抗体组比较，PSP+TLR4 抗体组 PBMC IL-12、IL-6 和 TNF- α 的表达水平均显著上调⁽¹²⁾，提示 TLR4 可能是 PSP 的作用受体之一（图 28）。

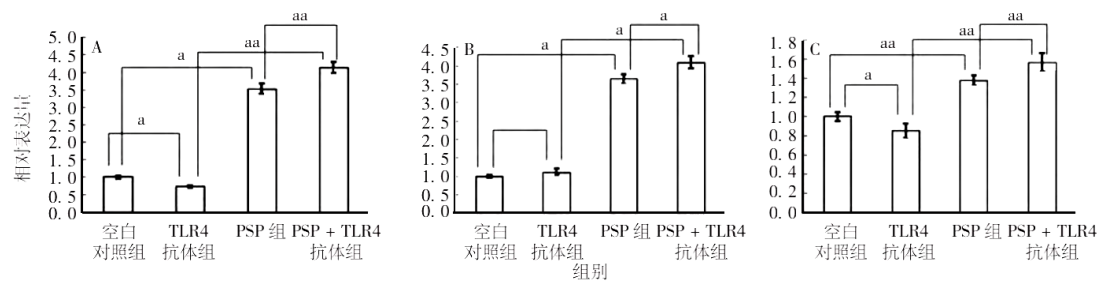


图 28.各组 PBMC 3 种细胞因子的表达水平

注：与空白对照组比较，a 表示 $P < 0.05$ ，aa 表示 $P < 0.01$ ；与 PSP+TLR4 抗体组比较，a 表示 $P < 0.05$ ，aa 表示 $P < 0.01$ 。

通过体外分离乳腺癌患者 PBMC 并将每份细胞分为 2 组，设为对照组和 PSP 组，采用实时荧光定量 PCR(Q-PCR)检测各组 PBMC 中 TLR 信号通路 MyD88 途径相关基因的表达情况并进行定量分析，同时使用 Western blot 检测信号末端蛋白的表达情况。显示 PSP 能够显著提高 TLR 信号通路中 TLR4、TLR5、TLR6、IRAK4、TRAF6、IRF5、TAK1、IKK α 、NF- κ B、ERK、P38、JNK、AP-1、IL-1 β 和 IL-8 基因的相对表达量，信号末端蛋白 NF- κ B、AP-1 和 IRF5 均有上调，表明 PSP 对乳腺癌患者 PBMC 中 TLR 通路的调控可能主要是通过 MyD88 途径促使终端效应因子的释放从而发挥其免疫调节作用⁽¹³⁾（图 29-30）。

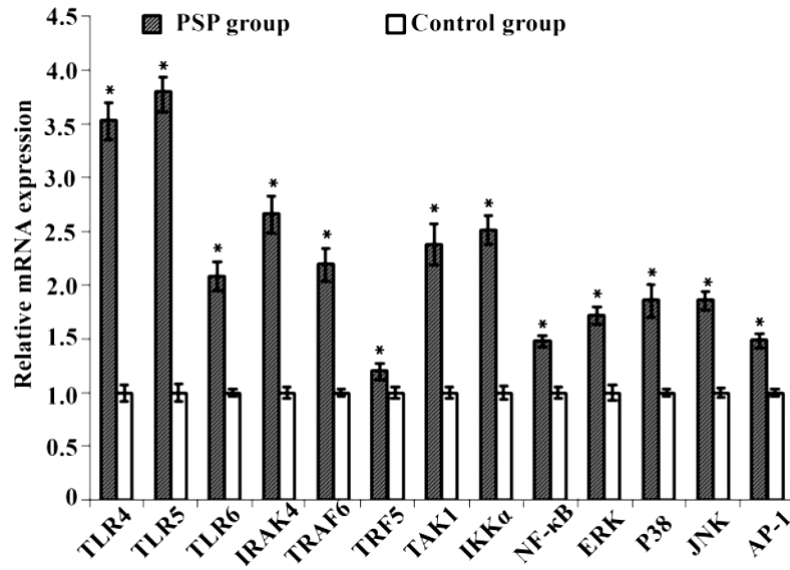


图 29.Q-PCR 检测 PSP 组与对照组 PBMC 中相关基因的相对表达量

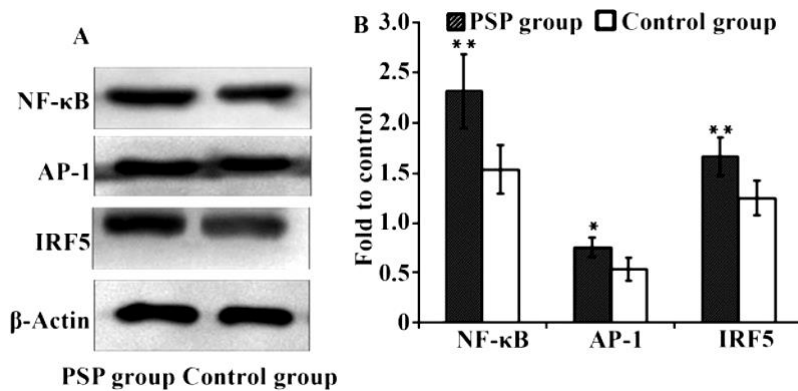


图 30.PSP 对 NF-κB、AP-1 和 IRF5 蛋白水平的影响

为了探讨 PBP_s 诱导乳腺癌细胞坏死的分子信号通路，用定量 PCR 方法检测了 TNF- α /TNFR1 的表达。如图所示，与对照细胞相比，经 PBP_s 处理的 MCF-7 细胞，肿瘤坏死因子- α 和肿瘤坏死因子受体 1 的 mRNA 水平呈剂量依赖性增加。与对照细胞相比，200 μ g/ml PBP_s 刺激乳腺癌细胞 TNF- α mRNA 表达增加 3.9 ± 0.19 倍，TNFR1 mRNA 表达增加 5.27 ± 0.55 倍。表明 PBP_s 增强乳腺癌坏死细胞自分泌 TNF- α 的能力⁽¹⁴⁾（图 31）。

MCF-7

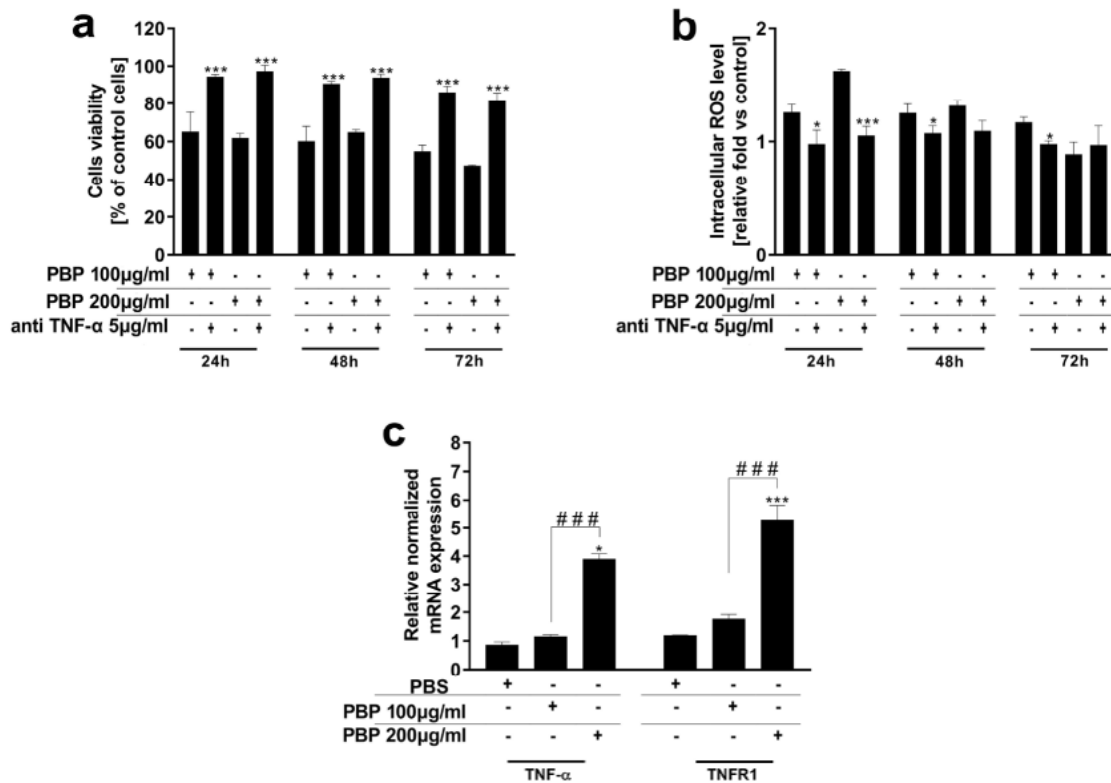


图 31.PBPs 诱导乳腺癌细胞坏死的 TNF-α/TNFR1 的表达

JNK 在程序性坏死中起重要作用，被 ROS 激活并控制 ROS 的产生。如图所示，用选择性 JNK 抑制剂处理 12 和 24 小时后减弱了由 PBP 诱导的细胞死亡作用。此外，抑制 JNK 导致 PBPs 提取物诱导的细胞内 ROS 产生显著减少。实验证明，JNK 激酶调节线粒体 ROS 的产生。通过抑制其抑制剂 SP600125 抑制 JNK 的磷酸化，JNK 需要由 PBPs 提取物触发的黑色素瘤细胞的 ROS 产生和细胞死亡。这些结果表明，包括 JNK 激活和 ROS 产生在内的多种机制都有助于 PBPs 诱导的细胞毒性。PBPs 诱导的酪质黑色素瘤细胞死亡是通过不依赖 caspase 的机制介导的，其中涉及细胞内 ROS。为了进一步表征 PBPs 处理后非色素黑色素瘤细胞中的细胞死亡途径，研究了 RIP1 激酶的作用。测试了 RIP1 激酶的选择性抑制剂 Nec-1 (30μM) 对 PBPs 诱导的黑色素瘤细胞死亡的影响。在两种浓度分别为 100μg/ml 和 200μg/ml 的 PBP 存在下用 Nec-1 进行治疗消除了 PBP 诱导的细胞毒性。与仅用 PBPs 处理的细胞相比，用 Nec-1 细胞共处理后 LDH 的释放显著减少⁽¹⁵⁾ (图 32)。

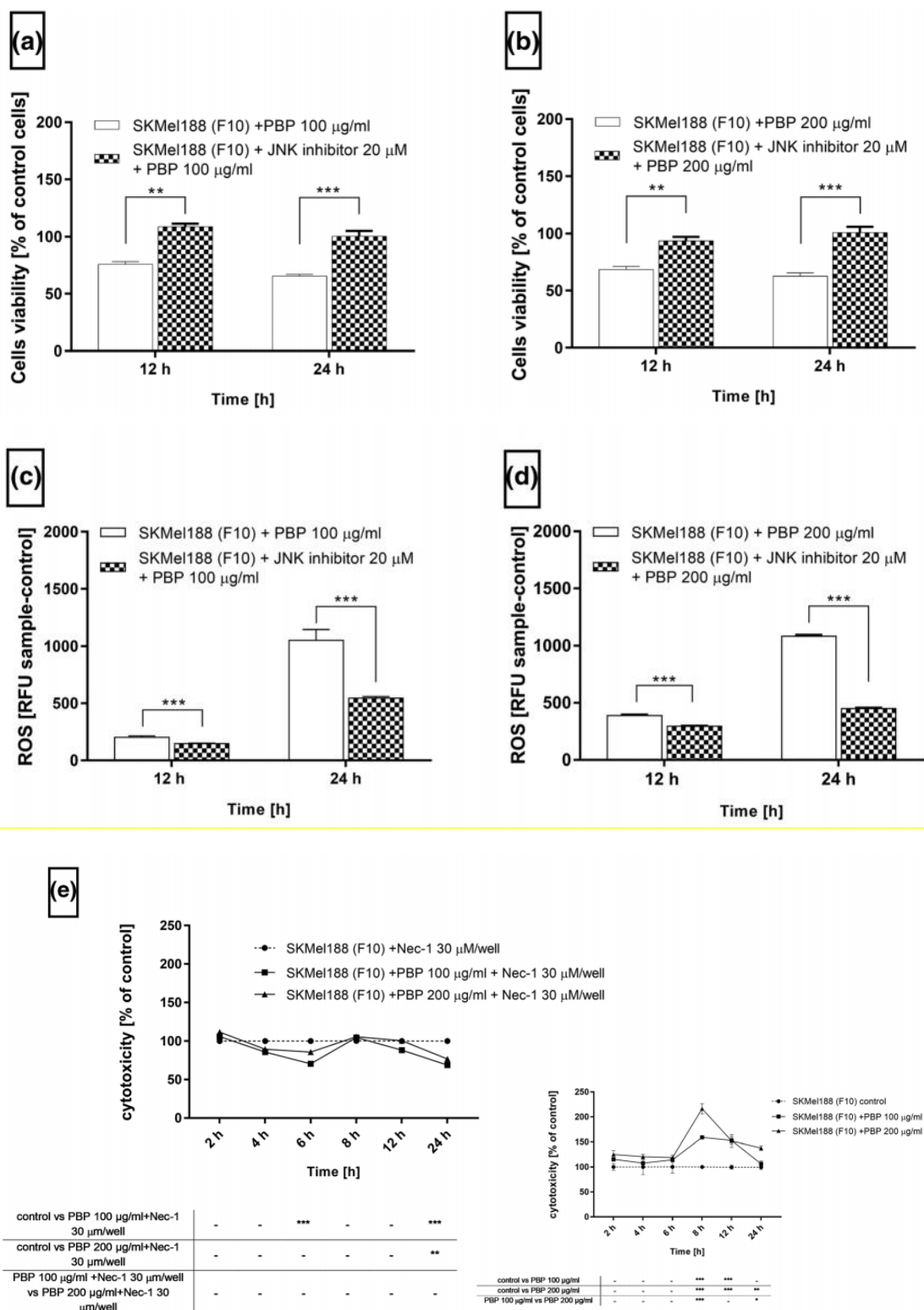


图 32.JNK 和相互作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(RIPK1)参与了 PBP 的细胞毒作用。(a 和 b)用 JNK 抑制剂 SP600125 预处理 30min, 用 PBP 提取物(100 或 200µg/ml)刺激 12 和 24 小时后, 检测无色 SKMEL-188 细胞的细胞存活率(c 和 d)活性氧的产生。所有数据均以平均值±SEM 表示(**p<.01, *p<.001)。(E)NEC-1 对 PBP 对无色性黑色素瘤细胞的细胞毒作用的影响。用受体相互作用蛋白-1 激酶抑制剂(Nec-1, 30µM)和 PBP 提取物(100 或 200µg/ml)共同处理细胞, 检

测乳酸脱氢酶漏出量。数值为均值±扫描电镜，以对照细胞诱导的细胞毒性百分比表示，仅 Nec-1 处理(**p<.01, *p<.001)。JNK, c-Jun 氨基末端激酶；Nec-1, Necrostatin-1；PBP, 蛋白结合多糖。

为了研究云芝提取物的抗迁移活性，进行了伤口愈合实验，以评估细胞的迁移。划痕愈合程度反映了云芝提取物对肿瘤细胞和内皮细胞在促炎环境中迁移能力的抑制作用。如图所示，单用云芝提取物处理最有效地抑制了 HUVEC 细胞(48.2±2.1%)和 MCF-7 细胞(22.9±2.2%)的迁移。相比之下，细胞 LPS 刺激的愈合率最高(分别为 76.5±3.6%和 68.4±3.0%)。重要的是，在 LPS 处理的培养基中，云芝提取物的存在部分地抑制了这一效应(分别为 57.5±2.5%和 34.1±3.8%)⁽¹⁶⁾ (图 33)。

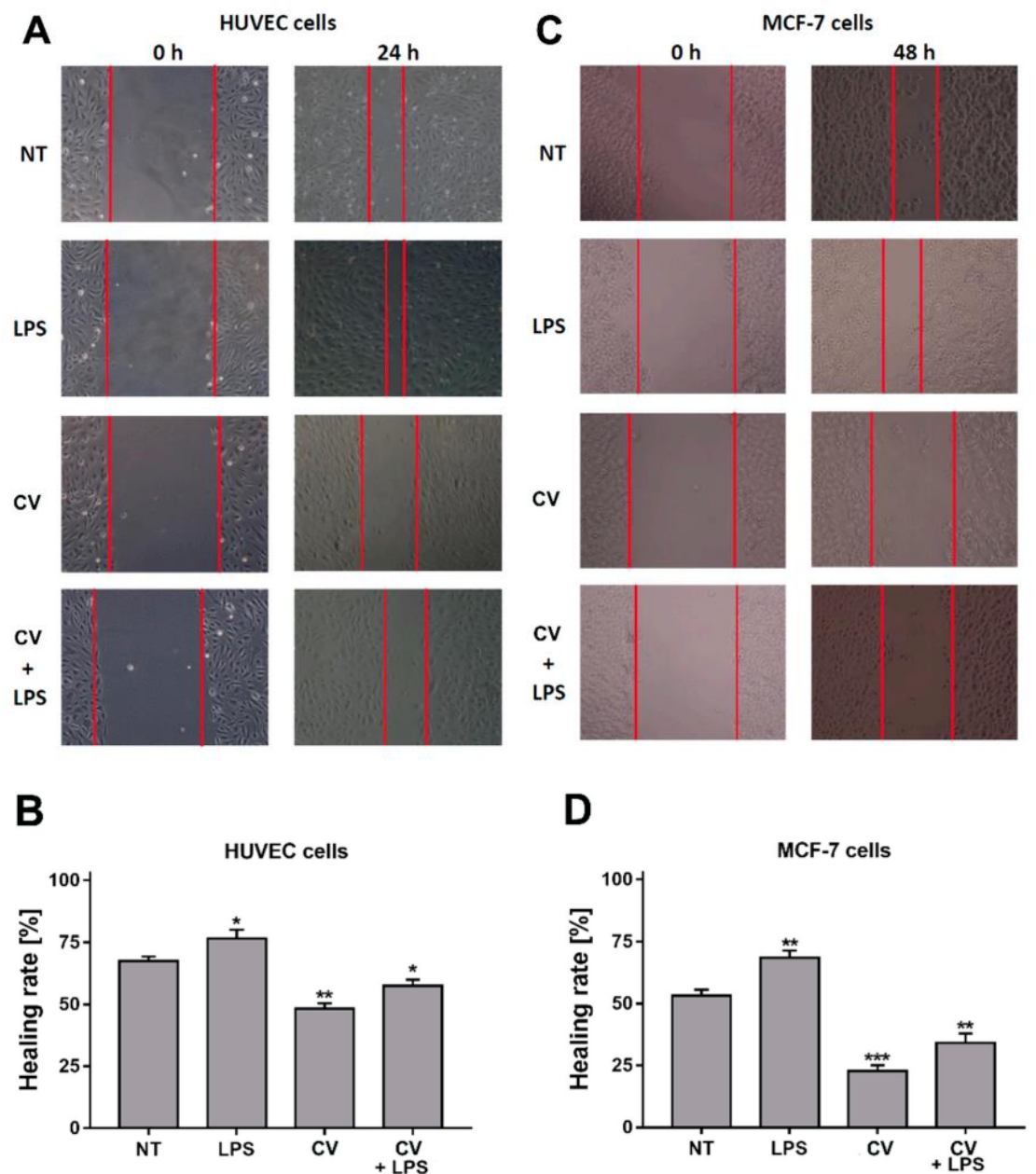


图 33.云芝提取物对人脐静脉内皮细胞(A、B)和 MCF-7 人乳腺癌细胞(C、D)的抗迁移作用

三、肝脏保护作用

PSP（80 和 160 mg/kg）显著降低酒精致肝损伤模型小鼠的谷丙转氨酶和谷草转氨酶水平，显著改善肝脏病理损伤，并通过降低氧化应激和调节免疫功能⁽¹⁷⁾，实现对小鼠酒精性肝损伤的保护作用（图 34-38）。

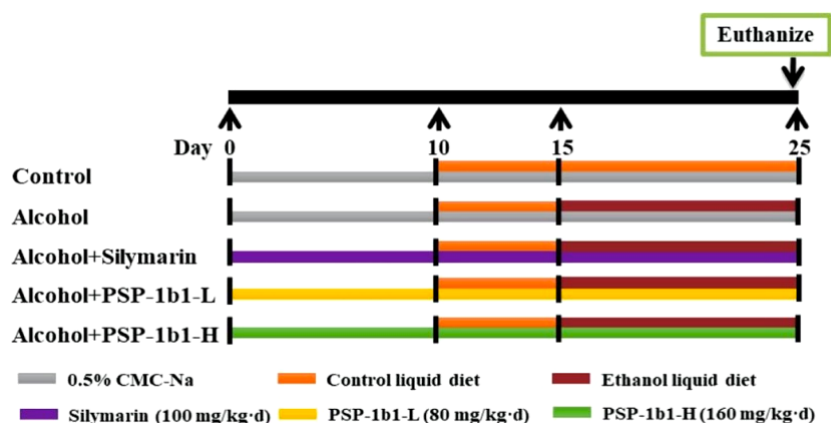


图 34.雄性 C57BL/6J 小鼠酒精性肝损伤的实验设计

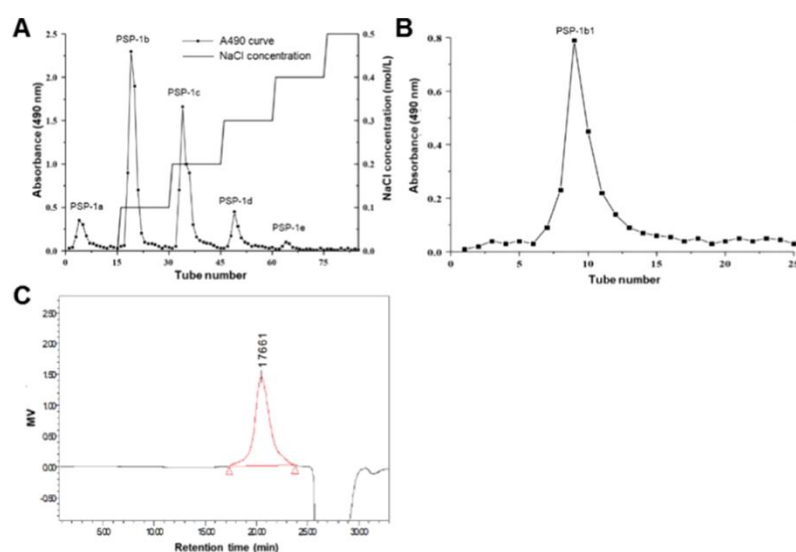


图 35.PSP-1b1 的色谱图和分子量分布

(A) 用 DEAE-FF 柱阴离子交换色谱得到 PSP-1 的洗脱曲线；(B) 用 Superdex 75 凝胶色谱柱获得的 PSP-1b 洗脱曲线；(C) PSP-1b1 组分的 Mw 分布。

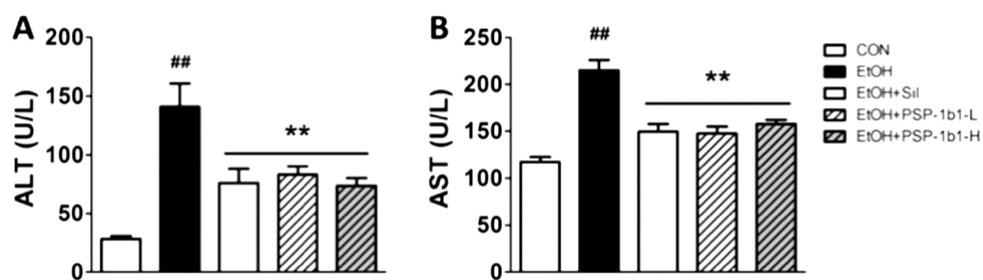


图 36.PSP-1b1(80 和 160mg/kg/d)对酒精性肝损伤小鼠血清 ALT(A)和 AST(B)水平的影响

(与对照组相比^{##}p<0.01，与酒精足相比^{**}p<0.01)

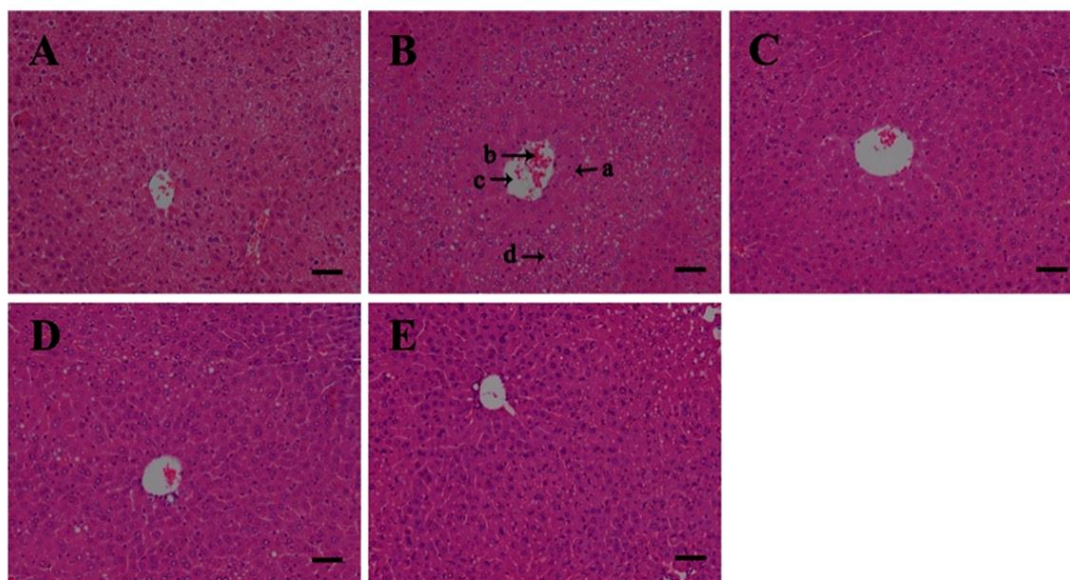


图 37.PSP 对乙醇致小鼠肝脏病理变化的影响

(A) 对照组；(B) 酒精组；(C) 水飞蓟素组；(D) PSP-1b1-L

(80mg/kg/D) 组；(E) PSP-1b1-H (160mg/kg/D) 组；A、坏死细胞；B、红细胞；C、中央静脉；D、脂质形成的孔隙。肝细胞染色采用 H&E。放大倍数为×200，比例尺=50μm

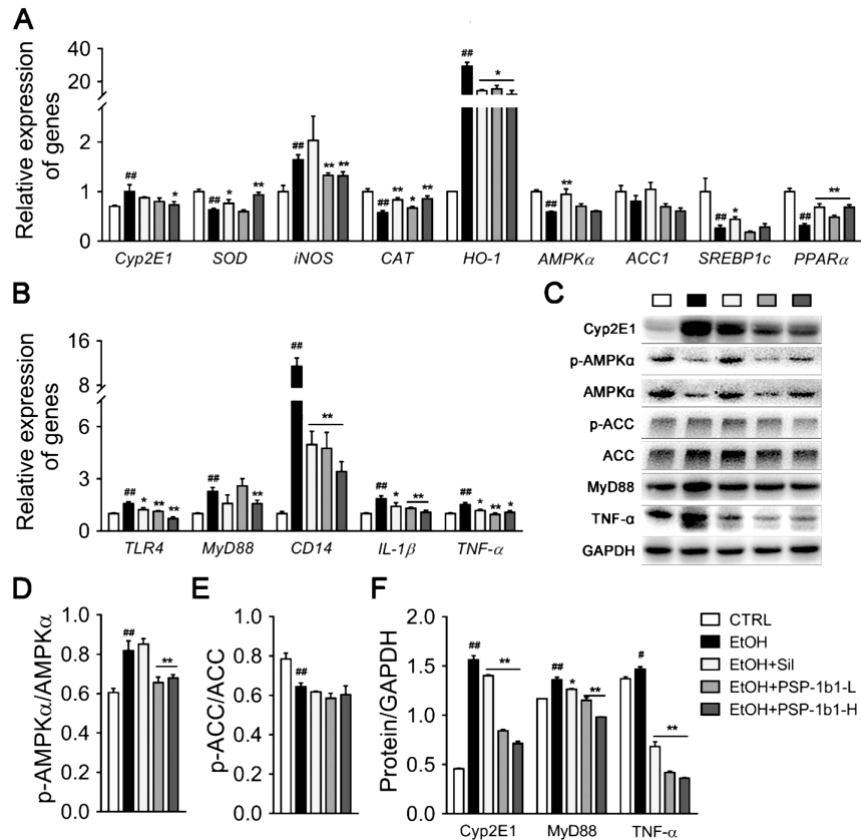


图 38. PSP-1b1 通过抗氧化、AMPK 信号转导和免疫调节减轻酒精性脂肪肝 (A-B) qRT-PCR 检测肝组织中 *Cyp2E1*、*SOD*、*iNOS*、*CAT*、*HO-1*、*AMPK α* 、*ACC1*、*SREBP1c*、*PPAR α* 、*TLR4*、*MyD88*、*CD14*、*IL-1 β* 和 *TNF- α* mRNA 的表达。(C-F) *Cyp2E1*、p-AMPK α 、AMPK α 、p-ACC、ACC 和 *MyD88* 的免疫印迹分析。Gapdh 用作加载控制。数值为平均值 $\pm$ 标准偏差 (SD; n=7 或 8)。无普通字母的平均值不同 (*pb 0.05 和 **pb 0.01 vs. EtOH 组, #pb 0.05, 和 #pb 0.01 vs. 对照组)。CTRL, 未给予酒精的小鼠; EtOH, 使用慢性/狂饮乙醇喂养方案接触酒精的小鼠; EtOH+Sil, 除乙醇暴露外, 每天给小鼠 100 mg/kg 水飞蓟素; EtOH+PSP-1b1-L 和 EtOH+PSP-1b1-H, 每天给小鼠 80 或 160 mg/kg PSP-1b1-in 除了乙醇暴露。

补充 PSP 可以减弱乙醇诱导的肝损伤模型鼠天冬氨酸转氨酶和微量丙二醛的升高。PSP 预处理也显著降低了乙醇诱导的血浆总胆固醇、三酰甘油和内毒素浓度。PSP 处理上调乙醇刺激肝脏 AMP 活化蛋白激酶 (AMPK)、乙酰辅酶 a 羧化酶 (ACC) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α) 的表达, 抑制肝

脏脂质积聚。此外，PSP 通过抑制 Toll 样受体 2（TLR2）和 Toll 样受体 4（TLR4）介导的核转录因子 NF- κ B 信号通路，显著减轻乙醇刺激的炎症反应。提示，PSP 可通过减少脂肪肝形成过程中的脂质积累，减轻内毒素介导的炎症反应，改善乙醇诱导的肝脂肪变性和损伤^{（18）}。说明，PSP 对小鼠酒精性肝损伤具有预防作用（图 39-44）。

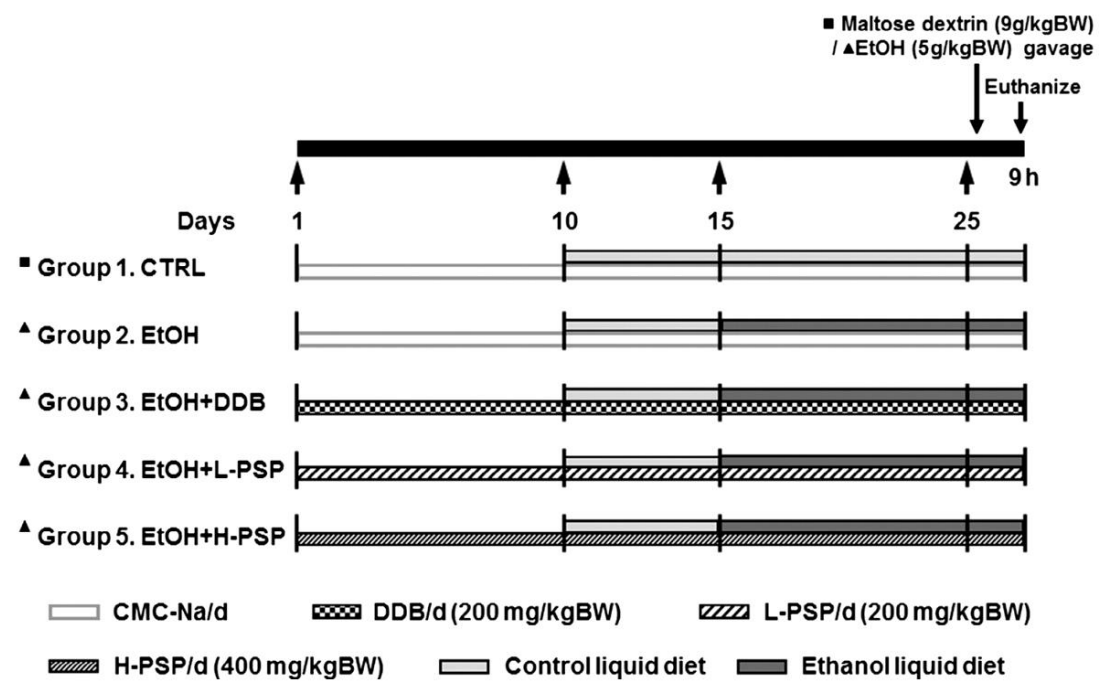


图 39.雄性 C57BL/6J 小鼠酒精性脂肪肝治疗方案的实验设计

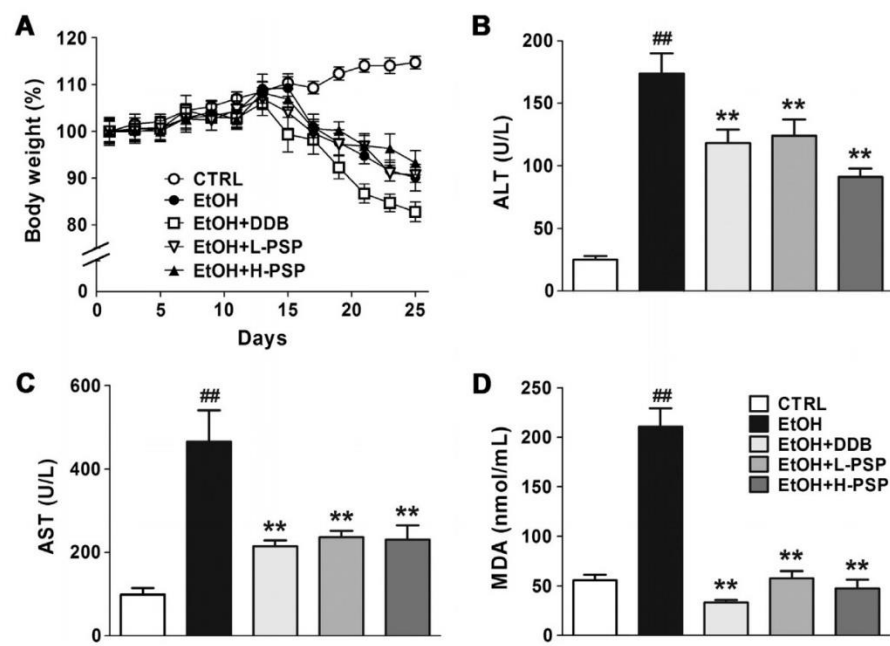


图 40.雄性小鼠在 25 天内食用对照饮食或含乙醇饮食（含或不含 PSP）的体重变化（%）

（a）喂食含或不含 PSP 的对照饲料或含乙醇饮食 25 天的雄性小鼠血清 ALT（B）、AST（C）和 MDA（D）浓度。数值为平均值 $\pm$ s.e.m；n=9。无共同字母的平均值不同，*P<0.05 和 **P<0.01 与 EtOH 组相比，#P<0.05 和 #P<0.01 与对照组相比。数值为平均值 $\pm$ s.e.m；n=9。CTRL，未给予酒精的小鼠；EtOH，通过长期过量的乙醇喂养方案接触酒精的小鼠组；EtOH+L-PSP 和 EtOH+H-PSP，除了乙醇暴露外，每天还给予 200 或 400 mg/kg PSP 的小鼠组。

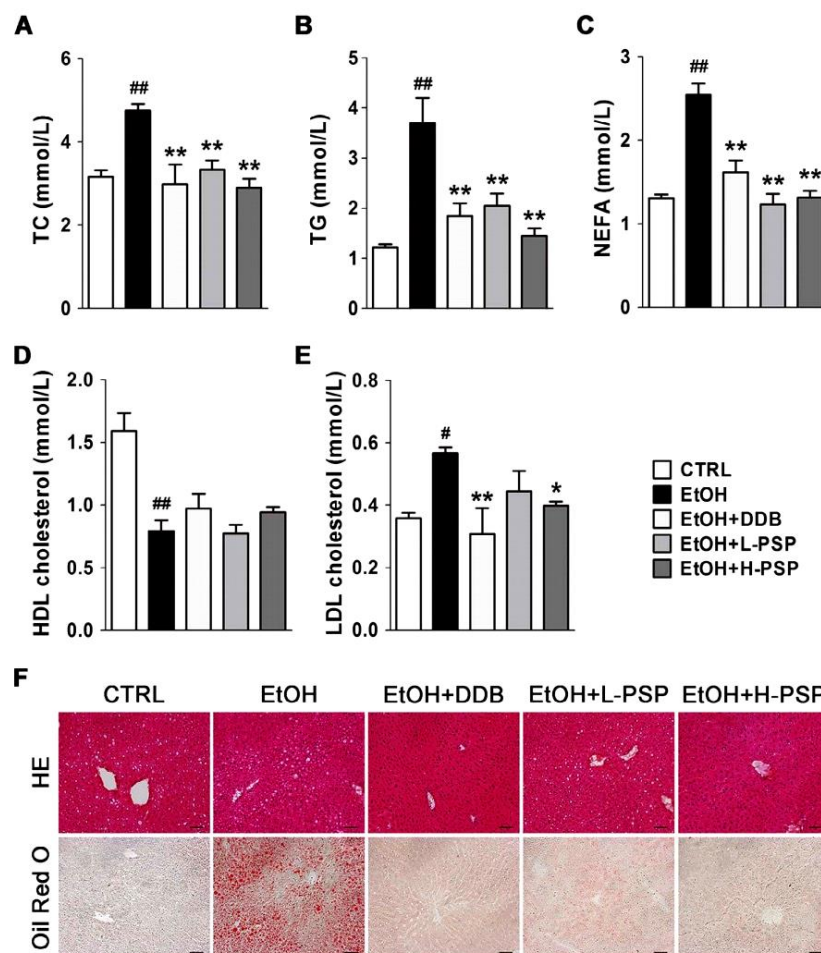


图 41.PSP 改善乙醇诱导的血脂异常

喂食对照饲料或含乙醇饮食（含或不含 PSP）25 天的雄性小鼠血清 TC（A）、TG（B）、NEFA（D）、HDL 胆固醇（C）和 LDL 胆固醇（E）的浓度。（F） 肝脏切片有代表性的 H&E 染色和油红 O 染色。比例尺，50 μ m。数

值为平均值 $\pm$ s.e.m; n=9。无共同字母的平均值不同, * $P<0.05$ 和** $P<0.01$ 与 EtOH 组相比, # $P<0.05$ 和# $P<0.01$ 与对照组相比。数值为平均值 $\pm$ s.e.m; n=9。CTRL, 未饮用酒精的小鼠; EtOH, 通过长期过量的乙醇喂养方案暴露于醇的小鼠组; EtOH+L-PSP 和 EtOH+H-PSP, 除乙醇暴露外, 每天给予 200 或 400 mg/kg PSP 的小鼠组⁽¹⁹⁾。

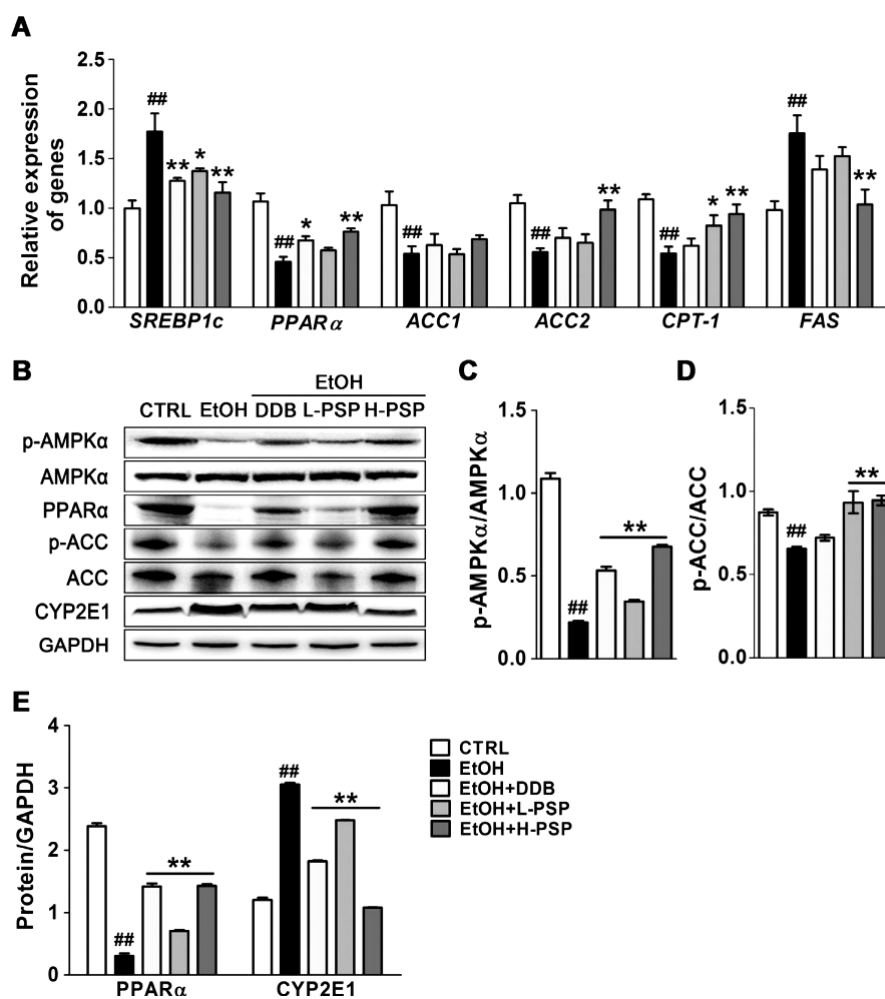


图 42.PSP 通过 AMPK 途径减轻酒精性脂肪肝

(A) 肝组织 SREBP1c、PPAR α 、ACC1、CPT-1 和 fasrna 表达的 qRT-PCR 分析。p-AMPK α 、AMPK α 、PPAR α 、p-ACC、ACC 和 CYP2E1 的免疫印迹分析。GAPDH 用作加载控制。数值为平均值 $\pm$ s.e.m; n=9。无共同字母的平均值不同, * $P<0.05$ 和** $P<0.01$ 与 EtOH 组相比, # $P<0.05$ 和# $P<0.01$ 与对照组相比。数值为平均值 $\pm$ s.e.m; n=9。CTRL, 未给予酒精的小鼠; EtOH, 通过长期过量的乙醇喂养方案接触酒精的小鼠组; EtOH+L-PSP 和 EtOH+H-PSP, 除了乙醇暴露外, 每天还给予 200 或 400 mg/kg PSP 的小鼠组。

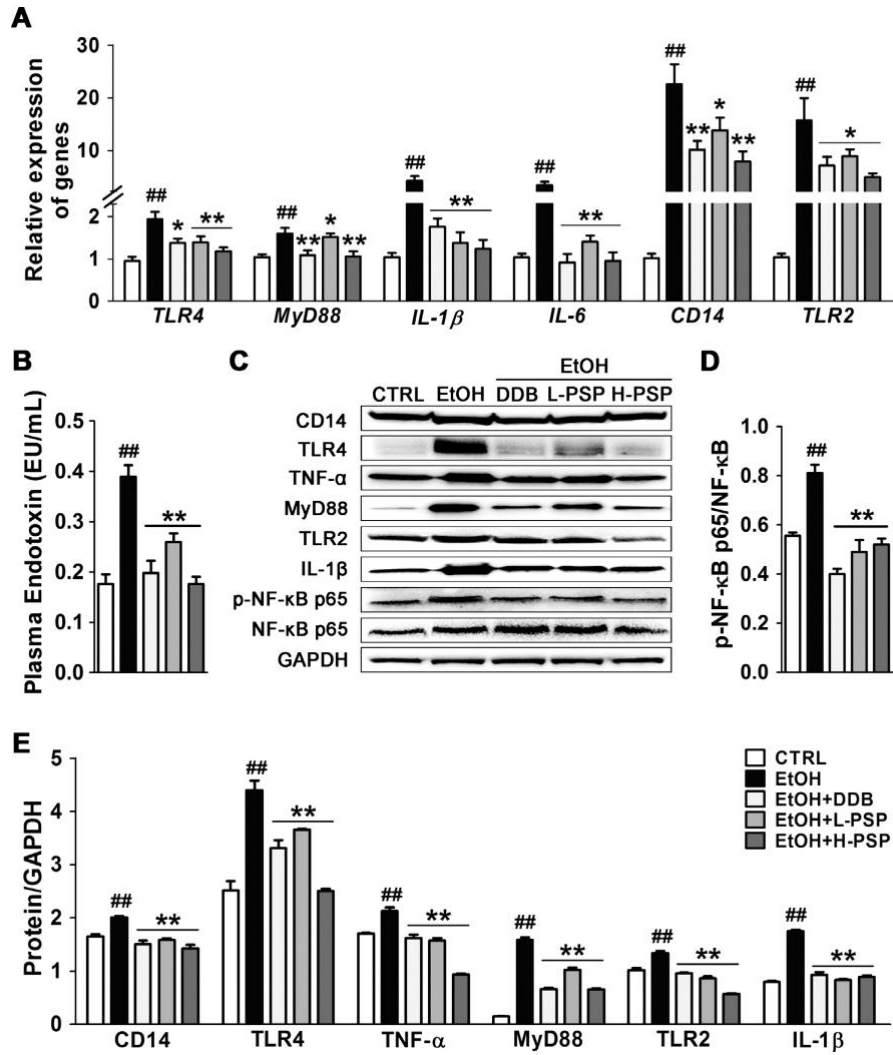


图 43.PSP 调节内毒素触发的 TLR4 介导的 NF- κ B 信号通路

(A) 肝组织 TLR4、MyD88、IL-1 β 、IL-6、CD14 和 tlr2mrna 表达的 qRT-PCR 分析。(B) 血浆内毒素水平。p-AMPK α 、AMPK α 、PPAR α 、p-ACC、ACC 和 CYP2E1 的免疫印迹分析。GAPDH 用作加载控制。数值为平均值 $\pm$ s.e.m; n=9。无共同字母的平均值不同, *P<0.05 和 **P<0.01 与 EtOH 组相比, #P<0.05 和 #P<0.01 与对照组相比。数值为平均值 $\pm$ s.e.m; n=9。CTRL, 未给予酒精的小鼠; EtOH, 通过长期过量的乙醇喂养方案接触酒精的小鼠组; EtOH+L-PSP 和 EtOH+H-PSP, 除了乙醇暴露外, 每天还给予 200 或 400 mg/kg PSP 的小鼠组。

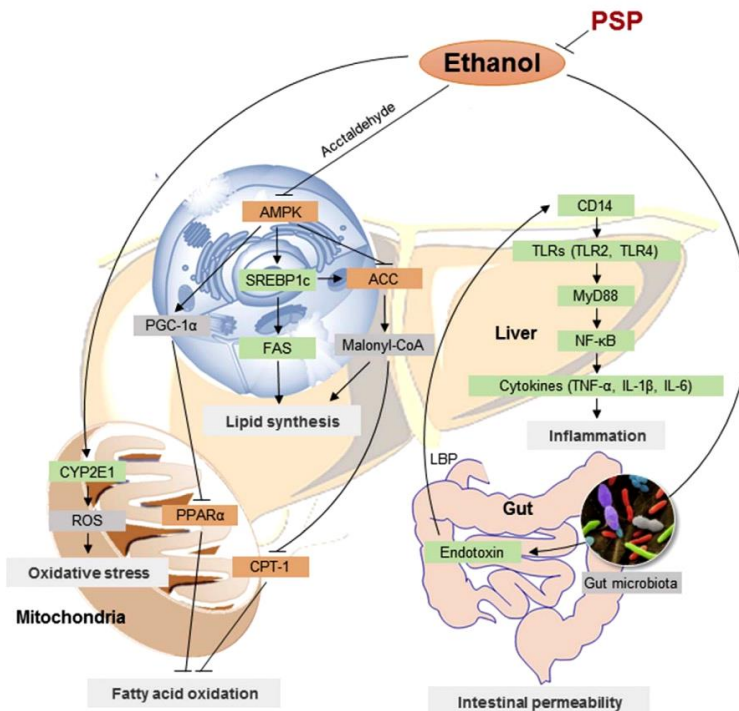


图 44.PSP 预防 ALD 的机制示意图

PSP 下调 AMPK/ACC 的表达，上调 PPAR α ，抑制肝脏脂质积聚。PSP 通过调节 TLRs 介导的炎症反应，包括 TLR4 介导的 NF- κ B 信号通路、TNF- α 和 IL-1 β 的产生，显著降低内毒素介导的炎症反应。PSP 还抑制 CYP2E1 以减少氧化应激。

以上结果提示，PSP 具有剂量依赖性保护肝损伤作用，PSP 可以减弱乙醇诱导的肝损伤模型鼠天冬氨酸转氨酶和微量丙二醛的升高，谷丙、谷草转氨酶均有显著抑制作用，还降低乙醇诱导的血浆总胆固醇、三酰甘油和内毒素浓度，上调乙醇刺激肝脏 AMP 活化蛋白激酶（AMPK）、乙酰辅酶 a 羧化酶（ACC）和过氧化物酶体增植物激活受体 α （PPAR α ）的表达，抑制肝脏脂质积聚。PSP 还通过抑制 Toll 样受体 2（TLR2）和 Toll 样受体 4（TLR4）介导的核转录因子 NF- κ B 信号通路，显著减轻乙醇刺激的炎症反应。

同时，还研究了杂色云芝粗多糖(YZ0)对扑热息痛(APAP)诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用及其作用机制。与空白组的脏器指数相比，模型组肝指数极显著增加($P<0.01$)，脾指数显著增加($P<0.05$)。与模型组相比，YZ0 治疗组肝

指数极显著降低($P<0.01$)；而脾指数差异不显著。与空白组比较，模型组小鼠血清中 ALT、AST 水平极显著升高($P<0.01$)，说明模型组小鼠肝功能损伤严重；YZ0 治疗组与模型组相比，ALT、AST 水平均极显著降低($P<0.01$)，说明给药组对肝损伤有保护作用^{〔20〕}（表 15）。

表 15. YZ0 对 APAP 诱导的肝损伤小鼠肝、脾指数及血清 ALT、AST 的影响(n=8)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肝指数/(mg·g ⁻¹)	脾指数/(mg·g ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST(U·L ⁻¹)
空白组	0	46.07±1.95	3.54±0.49	42.86±5.95	63.80±7.99
模型组	0	59.41±2.31**	3.95±0.22*	150.21±39.26**	191.34±54.48**
YZ0	250	47.58±1.86##	3.83±0.49	56.96±19.43##	80.81±18.16##
	125	50.38±1.60##	3.69±0.53	81.62±13.13##	101.46±21.39#

与空白组比较，模型组小鼠血清细胞因子 IL-6、IL-1 β 水平极显著升高($P<0.01$)，TNF- α 水平明显升高($P<0.05$)。与模型组相比，YZ0 高剂量组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 极显著降低($P<0.01$)；低剂量组 IL-6 极显著降低($P<0.01$)，IL-1 β 、TNF- α 显著降低($P<0.05$)（表 16）。

表 16. YZ0 对 APAP 诱导的肝损伤小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的影响(n=8)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	TNF- α /(ng·L ⁻¹)
空白组	0	54.04±11.41	72.68±15.20	301.91±106.91
模型组	0	114.70±21.85**	96.20±13.73**	469.00±152.44*
YZ0	250	65.07±9.88##	75.90±9.99##	264.38±75.90##
	125	85.69±12.85##	84.25±8.07#	293.11±118.66#

与空白组相比，模型组小鼠肝组织匀浆中 SOD、CAT、GSH 活力极显著降低 ($P<0.01$)；MDA 含量极显著升高($P<0.01$)。与模型组比，YZ0 高剂量组肝组织匀浆中 SOD、CAT、GSH 活力极显著升高($P<0.01$)，MDA 含量极显著降低($P<0.01$)；低剂量组 SOD、CAT 活力极显著增加($P<0.01$)，GSH 活力显著升高 ($P<0.05$)，MDA 含量显著降低($P<0.05$)（表 17）。

表 17. YZ0 对 APAP 诱导的肝损伤小鼠肝匀浆 GSH、MDA、SOD、CAT 的影响(n=8)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	GSH/(μ mol·mg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)
空白组	0	15.21±2.35	11.06±1.13	111.51±10.22	18.26±4.52
模型组	0	4.55±1.59**	29.82±3.46**	74.95±7.49**	12.47±4.19**
YZ0	250	19.66±5.31##	19.79±2.30##	100.11±14.76##	23.47±5.14##
	125	11.25±3.16##	24.96±4.34#	88.49±13.41#	18.57±3.92##

采用 Western blotting 检测肝组织中相关蛋白的磷酸化水平。模型组小鼠在给予 APAP 后 JNK 磷酸化水平明显增加($P<0.05$), 而 YZ0 预处理的治疗组(125 mg/kg)小鼠的 JNK 磷酸化水平显著降低($P<0.05$); 同样模型组 pERK/ERK 相对蛋白表达比空白组高, 而 YZ0 预处后明显降低($P<0.05$), 说明肝组织中 ERK 的磷酸化程度得到了有效地控制(图 45)。

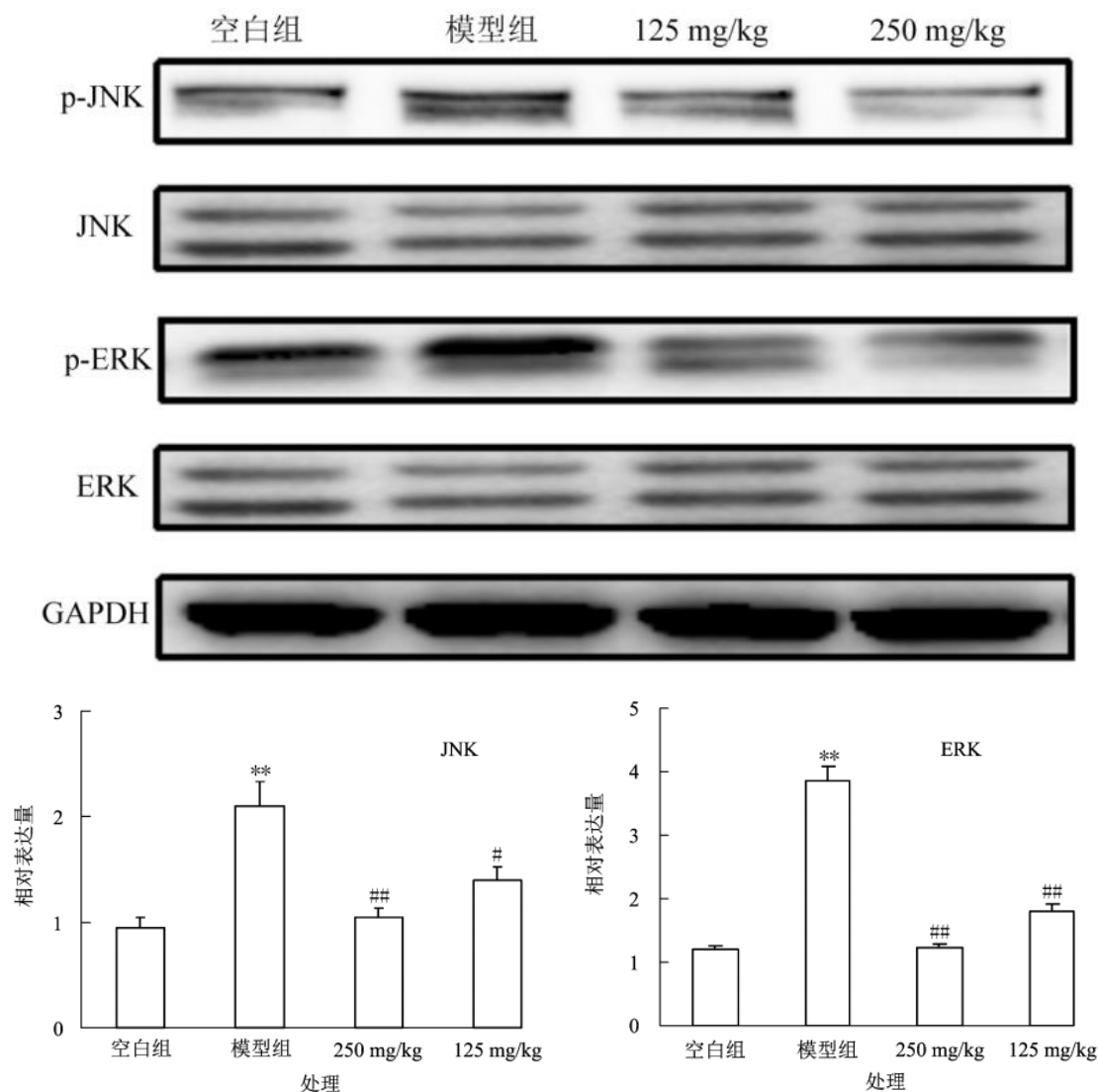


图 45. YZ0 对 APAP 诱导的小鼠肝损伤模型中 ERK 和 JNK 蛋白表达的影响

试验结果表明: YZ0 能显著地抑制 APAP 诱导的小鼠肝脏中 GSH、SOD、CAT 消耗, 说明 YZ0 可增强和恢复细胞的抗氧化酶防御系统。综上, YZ0 对

APAP 诱导的药物性肝损伤具有保护作用，这种保护作用与其抗氧化和抗炎活性相关，并且其抗炎活性的发挥可能与 MAPK 通路有关。

四、对乙肝的治疗作用

多位临床医生对云芝糖肽治疗乙肝患者的临床实验进行报道，云芝糖肽治疗乙肝患者，15 天 33 例中 24 例体征显著减轻，占 72.7%，6 例症状完全消失；治疗 30 天，28 例症状完全消失，占 84.8%，症状体征改善率达 90%，治疗 60 天，有效率达 93.9%，远高于对照组，病毒转阴 2 例。使转氨酶显著下降^{〔21〕}。云芝糖肽治疗 60 例乙肝患者，对照组与治疗组各 30 例，治疗 90 天后，治疗组 30 例中 25 例恢复正常，康复率 80%，常规治疗的对照组仅 8 例恢复正常^{〔22〕}（表 18）。

表 18 云芝糖肽对 HBV 标志物的影响

组别	例数	HBsAg	HBeAg	HBeAb
		阴转率（%）	阴转率（%）	阳转率（%）
治疗组	30	16.7（5/30）	26.7（8/30）	23.3（7/30）
对照组	30	0（0/30）	0（0/30）	0（0/30）

不仅如此，云芝糖肽与抗病毒药联合应用也产生显著效果，云芝糖肽胶囊与恩替卡韦联合治疗 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎 80 例患者，随机分为对照组（40 例）单用 ETV 口服，0.5 mg/次，1 次/d；治疗组患者（40 例）口服恩替卡韦，同时给予云芝糖肽胶囊，与对照组相比，治疗组的体征和生化指标显著改善^{〔23〕}。云芝糖肽联合阿德福韦酯治疗慢性乙型肝炎的近期疗效观察，是将 60 例乙肝患者随机分为两组，对照组单用阿德福韦酯治疗，治疗组在阿德福韦酯治疗的基础上同时服用云芝糖肽，结果治疗组与对照组比较显著改善^{〔23〕}。替比夫定联合云芝糖肽治疗慢性乙型肝炎的近期疗效是将 38 例慢性乙型肝炎患者随机分为两组，对照组单用替比夫定治疗，治疗组在替比夫定治疗的基础上同时服用云芝胞内糖肽，观察治疗前后两组患者的疗效。结果治疗组显著优于对照组^{〔24〕}。

参考文献:

- [1] Małgorzata Kowalczyńska, Jakub Piotrowski, Tomasz Jędrzejewski, Wiesław Kozak. Polysaccharide peptides from *Coriolus versicolor* exert differential immunomodulatory effects on blood lymphocytes and breast cancer cell line MCF-7 in vitro. *Immunology Letters*. 2016(16):300-311.
- [2] Tomasz Jędrzejewski, Małgorzata Pawlikowska, Justyna Sobocińska, Sylwia Wrotek. Protein-Bound Polysaccharides from *Coriolus Versicolor* Fungus Disrupt the Crosstalk Between Breast Cancer Cells and Macrophages through Inhibition of Angiogenic Cytokines Production and Shifting Tumour-Associated Macrophages from the M2 to M1 Subtype. *Cell Physiol Biochem*. 2020;54:615-628.
- [3] 严伟, 祝亚平, 孙廷慰. 化疗并用云芝糖肽对卵巢和子宫体癌患者免疫功能和生活质量的影响. *上海师范大学学报*. 2000, 29(2):75-78.
- [4] 张俊, 黄睿, 刘勇, 吴超. 云芝糖肽对环磷酰胺所致免疫抑制小鼠免疫保护作用. *辽宁中医药大学学报*. 2013, 15(7):47-49.
- [5] Cheuk-Lun Lee, Pingping Jiang, Wai-Hung Si, Xiatong Yang, Jennifer Man-Fan Wan. Regulatory properties of polysaccharopeptide derived from *Coriolus versicolor* and its combined effect with ciclosporin on the homeostasis of human lymphocytes. *Pharmacy and Pharmacology*. 2010, 62: 1028–1036.
- [6] 陈偲, 冯慧琴, 邵丽丽, 舒丽雯, 杨庆尧, 杨晓彤. 肠上皮对云芝糖肽的转运及后继对树突状细胞的激活作用. *中国菌物学会 2016 年学术年会论文摘要集*.
- [7] Wenwen Li, Manran Liu, Sihai Lai, Can Xu, Fang Lu, Xiaoqiu Xiao, Yixi Bao. Immunomodulatory effects of polysaccharopeptide (PSP) in human PBMC through regulation of TRAF6/TLR immunosignal-transduction pathways. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2010; 32(4): 445-452.

576–584.

- [8] Mohammad H. Saleh, Iran Rashedi, Armand Keating. Mohammad H. Saleh, Iran Rashedi, Armand Keating. Immunomodulatory Properties of *Coriolus versicolor*: The Role of Polysaccharopeptide. *Frontiers in Immunology*. 2017(8):1087.
- [9] Jennifer Man-Fan Wan, Wai-Hung Sit, Xiaotong Yang, Pingping Jiang, Leo Lap-Yan Wong. Polysaccharopeptides derived from *Coriolus versicolor* potentiate the S-phase specific cytotoxicity of Camptothecin (CPT) on human leukemia HL-60 cells. Wan et al. *Chinese Medicine*. 2010, 5:16.
- [10] 梁中琴, 王晓霞, 陈星炽, 顾振纶. 云芝糖肽抗肿瘤的实验研究. *苏州医学院学报* 1999, 19(7):763-765.
- [11] 刘佳, 杨晓彤, 杨庆尧. 流式细胞术 BrdU/DNA 双染法测定云芝糖肽诱导的 Molt-4 细胞周期阻滞. *现代生物医学进展*. 2011, 11(20):3826-3829.
- [12] 王静, 余爽, 陈楚, 董冰, 鲍依稀. 云芝糖肽对乳腺癌患者外周血单个核细胞 Toll 样受体 4 的作用. *中国生物制品学杂志*. 2013, 26(6):844-847.
- [13] 王静, 余爽, 陈楚, 董冰, 鲍依稀. 云芝糖肽对乳腺癌患者 PBMC 中 TLR 信号通路 MyD88 途径的调节机制. *中国免疫学杂志*. 2013, 29:236-239.
- [14] Małgorzata Pawlikowska, Tomasz Jędrzejewski, Anna A. Brożyna, Sylwia Wrotek. Protein-Bound Polysaccharides from *Coriolus Versicolor* Induce RIPK1/RIPK3/MLKL-Mediated Necroptosis in ER-Positive Breast Cancer and Amelanotic Melanoma Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2020, 54:591-604.
- [15] Małgorzata Pawlikowska, Jakub Piotrowski, Tomasz Jędrzejewski, Wiesław Kozak, Andrzej T. Słominski, Anna A. Brożyna. *Coriolus versicolor*-derived protein-bound polysaccharides trigger the caspase-independent cell death pathway in amelanotic but not melanotic melanoma cells. *Phytotherapy Research*. 2019, 1–11.
- [16] Tomasz Jędrzejewski, Justyna Sobocińska, Małgorzata Pawlikowska, Artur Działuk, Sylwia Wrotek. Extract from the *Coriolus versicolor* Fungus as an Anti-Inflammatory Agent with Cytotoxic Properties against Endothelial Cells and Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 9063.
- [17] Kang-Le Wang, Zhen-Ming Lu, Xiangjunzhi Mao, Lu Chen, Jin-Song Gong, Yilin Ren, Yan Geng, Heng Li, Hong-Yu Xu, Guo-Hua Xu, Jin-Song Shi, Zheng-Hong Xu. Structural characterization and anti-alcoholic liver injury activity of a polysaccharide from *Coriolus versicolor* mycelia. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019(137) :1102–1111.

- [18] Yilin Ren,Yan Geng,Hedi Chen,Zhen-Ming Lu,Jin-Song Shi,Zhenghong Xu. Polysaccharide peptides from *Coriolus versicolor*: A multi-targeted approach for the protection or prevention of alcoholic liver disease. *Journal of Functional Foods*. 2018(40):769–777.
- [19] 刘福文,李建阳等. 云芝糖肽治疗乙型病毒性肝炎 33 例浙江中西医结合杂志. 2002(11):692.
- [20] 白玉莹,葛唯佳,蔡恩博,祝洪艳,包海鹰,赵 岩. 杂色云芝粗多糖预防性给药对扑热息痛诱导的肝损伤小鼠的肝保护作用. *吉林农业大学学报*. 2020,42(1):56-61.
- [21] 宋子贤,梁世文. 云芝糖肽胶囊治疗慢性乙型肝炎临床观察. *广西医学*. 2000(6):1424-5.
- [22] 朱艳芳,龚力,傅茂英. 恩替卡韦联合云芝胞内糖肽胶囊治疗慢性乙型肝炎. *中西医结合肝病杂志*. 2015(5):269-70.
- [23] 邓琪,顾锡炳. 云芝胞内糖肽联合阿德福韦酯治疗慢性乙型肝炎 30 例. *实用肝脏病杂志*. 2009(6):445-6.
- [24] 俞净,谢纯红. 替比夫定联合云芝胞内糖肽治疗慢性乙型肝炎. *中国中医药咨讯*. 2011(1):276.

沈阳药科大学生理教研室

徐峰整理