

香菇多糖对荷瘤小鼠 IFN_mRNA 和 SOD_mRNA 的影响

梅 兵 朱 慧 吴自荣 蒋建平¹ 潘金友² 骆训懿³(上海 200062 华东师范大学生物系;¹ 生物系 99 届毕业生;² 铁道大学附属甘泉医院;³ 解放军海军总医院)

摘要 目的: 通过研究香菇多糖(LNT)对小鼠肝组织中干扰素(IFN)_mRNA 和超氧化物歧化酶(SOD)_mRNA 的影响, 从分子水平探讨 LNT 的药理作用机制。方法: C₅₇BL/6 小鼠随机分成四组, 其中三组左腋皮下接种 S₁₈₀ 肉瘤细胞。48h 后, 两组荷瘤小鼠分别腹腔注射 5mg/kg 和 30mg/kg LNT, 一天一次; 另一组荷瘤小鼠及正常鼠等量注射生理盐水。6 天后杀鼠取肝, 以斑点杂交的方法检测肝组织中 IFN_mRNA 和 SOD_mRNA 的表达量。结果: 5mg/kg LNT 对 S₁₈₀ 肉瘤的生长有较明显的抑制作用; 5mg/kg 和 30mg/kg 的 LNT 均能提高 IFN_mRNA 和 SOD_mRNA 的表达量, 且以 5mg/kg 剂量组的作用稍强。结论: LNT 抗

肿瘤和抗衰老的机理之一可能是促进了 IFN mRNA 和 SOD mRNA 的表达。

关键词 香菇多糖; 斑点杂交; 干扰素; 超氧化物歧化酶

Effect of lentinan on IFN mRNA and SOD mRNA in S₁₈₀-bearing C₅₇BL/6 mice

Mei Bing (Mei B) Zhu Hui (Zhu H) Wu Zirong (Wu ZR) Jiang Jianping (Jiang JP) (Department of biology, East China Normal University, Shanghai, 200062)

Pan Jinyou (Pan JY) (Ganquan hospital, Shanghai, 200065) Luo Xunyi (Luo XY) (The navy general hospital of PLA, Beijing, 100037)

ABSTRACT OBJECTIVE: Through the research on the impact of lentinan (LNT) to the IFN mRNA and SOD mRNA in mice liver, this article discussed the medicine mechanism of LNT on a molecular level. **METHOD:** We divided randomly the C₅₇BL/6 mice into four groups. Three groups of mice were injected with S₁₈₀ cells (9 × 10⁶ cells per mouse). After 48h, Two groups of S₁₈₀ bearing mice were injected with 5mg/kg and 30mg/kg lentinan respectively, and the other one S₁₈₀-bearing group and one model mice were injected with the same amount of 0.9% NaCl. After six days, kill the mice, weigh each S₁₈₀ and observe the content of IFN mRNA and SOD mRNA in liver with dot blot. **RESULTS:** 5mg/kg lentinan has a good inhibition on the growing of S₁₈₀; both 5mg/kg and 30mg/kg lentinan can increase the content of IFN mRNA and SOD mRNA and 5mg/kg lentinan has a stronger effect than 30mg/kg LNT. **CONCLUSION:** LNT could increase the content of IFN mRNA and SOD mRNA, which might be one of its mechanism against cancer and ageing.

KEY WORDS lentinan, dot blot, interferon, superoxide, dismutase

香菇多糖 (lentinan, LNT) 是从香菇子实体中提取的一种葡聚糖, 具有抗肿瘤、抗衰老、降低胆固醇等作用。动物与临床研究一般从检测免疫活性细胞或 IFN 等细胞因子的活性入手, 其结果表明 LNT 无直接的细胞毒作用, 它的抗肿瘤等作用主要是通过提高机体免疫力来实现的^[1]; LNT 的抗衰老作用也是通过提高 SOD 的活性, 从而增强机体对 O₂⁻ 的清除能力来实现的^[2]。而 LNT 除了能提高 IFN 和 SOD 的活性外, 在分子水平 (转录水平或翻译水平) 上的影响如何, 尚未见报道。本文以荷瘤小鼠为实验模型, 采用斑点杂交的方法研究 LNT 对肝组织中 IFN mRNA 和 SOD mRNA 的影响, 旨在从分子角度探讨 LNT 的药理机制, 并为已有的研究成果予以分子水平上的理解。

1 材料与方法

1.1 实验材料

C₅₇BL/6 雄性小鼠, 体重 18 ± 1 g; S₁₈₀ 肉瘤细胞: 以上均由中科院药物研究所提供。分别含人 IFN 和人锰 SOD 基因片段的质粒载体: 南海海丰生物工程公司和海军总医院提供。药品: LNT 粗制品, 含 40% LNT, 上海通惠生物制品有限公司提供。试剂: 焦碳酸二乙酯 (DEPC), Fluka 公司产品; 其他试剂为国产分析纯品。器材: 硝酸纤维素膜 (NC 膜), 上海华美生物工程公司产品。

1.2 实验方法

C₅₇BL/6 健康小鼠, 左腋下接种 S₁₈₀ 肉瘤细胞 (9 × 10⁶ 个细胞/只) 后成荷瘤鼠。48h 后, 将荷瘤鼠分组如下 (4 只/组): B. 荷瘤组: 每天腹腔注射 0.2 ml 灭菌生理盐水; C. 荷瘤 + 低 LNT 组: 每天注射 0.2 ml (终浓度 5mg/kg) 灭菌 LNT

水溶液; D. 荷瘤 + 高 LNT 组: 每天注射 0.2 ml (终浓度 30mg/kg) 灭菌 LNT 水溶液。另设 A 组 (对照组): 同批不荷瘤小鼠, 每天等量注射生理盐水。6 天后断颈处死小鼠, 剖取其左腋下瘤体, 迅速称重并记录。

参考 Chomczynski 等方法^[3], 提取和纯化鼠肝总 mRNA, 保存于 50 μl DEPC 水 (含 0.1% DEPC) 中, 置 -70℃ 待用。操作所用器皿和试剂均用 DEPC 水处理, 以抑制 RNA 酶的活性。

以碱裂解法^[4]分别提取和纯化含 IFN 和 SOD 基因的质粒 DNA, 按吴自荣等专利方法, 以辣根过氧化物酶分别标记 IFN 和 SOD 的 DNA。

按方法^[6]进行斑点杂交, mRNA 点样量为每次 2 μl, 共 12 μl。待印迹斑点清晰现出后于清水里漂洗三次, 放在滤纸上吸干, 避光保存。

2 结果

2.1 香菇多糖对小鼠瘤重的影响

给药六天后解剖小鼠, 发现荷瘤小鼠左腋下均生有瘤体, 而正常组小鼠未见, 说明荷瘤模型建立成功。称量 B、C、D 各组小鼠的瘤体, 可见荷瘤组的瘤体最重, 荷瘤 + 高 LNT 组的瘤体次重, 荷瘤 + 低 LNT 组的瘤体最轻 (见表 1)。证实了一定剂量 LNT (5mg/kg) 能抑制小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的生长。

2.2 LNT 对 IFN mRNA 和 SOD mRNA 的影响

将点样 NC 膜放入染色液后 1 ~ 2 min, 在与 IFN 探针杂交的 NC 膜上, 首先是低剂量 LNT 组和高剂量 LNT 组的大部分点样点现出褐色, 其后是荷瘤组, 最后是正常对照组。至此斑点颜色出现明显差异, 正常对照组在点样处有浅浅的

颜色, 荷瘤组较深, 高剂量组与低剂量组最深, 而后者颜色更深于前者(见图 1(a))。与 SOD 探针杂交的 NC 膜上, 颜色出现顺序及深浅和与 IFN 探针杂交的 NC 膜趋势几乎一致(见图 1(b))。在提取和纯化 B3 鼠肝总 mRNA 的过程中, 由于操作不慎, 未能得到所要的总 mRNA; 在注射 LNT 后的第六天, 发现 C3 鼠死亡, 经查死亡原因系鼠间争斗所致; 同法提取该鼠肝的总 mRNA, 未得到所要的样品, 推测系 RNA 酶作用的结果。

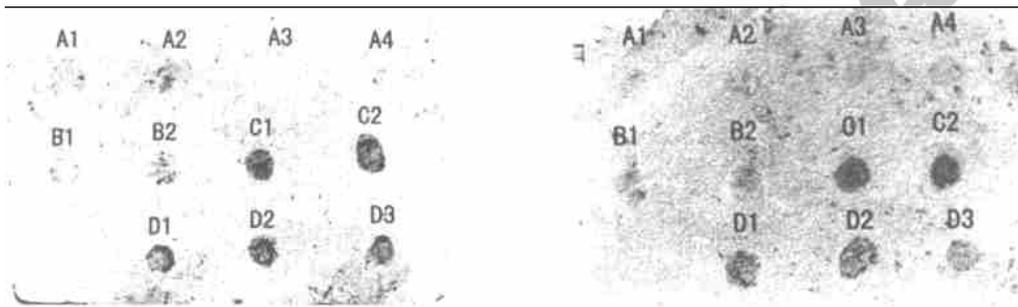


图 1 荷瘤小鼠肝脏总 mRNA 分别与 IFN 探针(a)和 SOD 探针(b)斑点杂交图

3 讨论

LNT 可抑制 S₁₈₀ 肉瘤的生长, 降低瘤重, 这与其他研究结果一致^[1]。小鼠荷瘤后, 其 IFN 和 SOD 的 mRNA 表达量较正常小鼠表达量为多, 推测这是由于机体荷瘤, 导致小鼠即时性调动免疫力, 表现为 IFN 和 SOD 的转录量增多。以往的研究表明 LNT 在细胞和蛋白质活性水平上可提高机体的免疫力^[7], 本实验在注射 LNT 后, 发现 IFN 和 SOD 的 mRNA 量也明显高于未注射 LNT 的小鼠。两组剂量 5mg/kg, 30mg/kg 相比, 前者的作用好于后者, 说明 LNT 对小鼠 IFN 和 SOD 基因的表达可能与在活性水平一样存在着浓度依赖性的双向调节作用。从本实验结果推测 LNT 除影响相关蛋白质的活性水平以外, 也可能影响蛋白质的转录水平即基因水平, 或正是因为 LNT 对 IFN 和 SOD 的转录水平产生影响, 才有 IFN 和 SOD 在活性上的变化。LNT 在蛋白质转录水平以及在分子水平的其他层次(如翻译水平、蛋白质构象)上究竟如何影响机体的功能, 还有待于进一步研究。

参考文献

1 宋炳生, 杨玉龙. 香菇多糖抗肿瘤活性的研究概况. 中草药,

表 1 香菇多糖对各组小鼠瘤体重量的影响($\bar{x} \pm s$)

	A 组 (n=4)	B 组 (n=3)	C 组 (n=3)	D 组 (n=3)
瘤湿重(g)	0	0.125±0.010	0.102±0.014	0.118±0.051
P 值			++	+*

+ P > 0.05 ++ P < 0.05 vs B 组 * P < 0.05 vs C 组

1998; 29(7): 492.

2 金道山, 韩志涛, 王士雯, 等. 香菇多糖抗衰老作用的实验研究. 老年学杂志, 1994; 14(1): 40.

3 Hamuro J, Chihara G. Lentinan, an cell-oriented immunopotentiator: Its experimental and clinical applications and possible mechanism of immune modulation. *Immune Modulation Agents and Their Mechanisms*, Marcel Dekker Inc, 1985: 409.

4 Piotr Chomczynski, Nicoletta Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 156.

5 J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版). 科学出版社, 1998: 19.

6 F. 奥斯伯, R. 布伦特, R. E. 金斯顿等. 精编分子生物学实验指南. 科学出版社, 1998: 62.

7 Chihara G. 香菇多糖的免疫药理作用. 国外医学: 植物药分册, 1993, 8(4): 165.

收稿日期: 2000-03-01