



灵芝多糖拮抗前列腺素E2对小鼠脾细胞IFN- γ 和TNF- α mRNA表达的抑制作用

灵芝[Ganoderma lucidum (Leyss ex Fr. Karst.)]是灵芝菌科灵芝属真菌。化学分析表明灵芝含有多种生物活性成分,如多糖类、核苷类、多肽类、三萜类等。其中,多糖是灵芝中主要的生物活性成分之一。研究报道,灵芝多糖具有增强免疫功能和抗肿瘤作用[1][2][3],但其抗肿瘤作用的机制却不十分清楚。肿瘤逃避免疫监视的机制比较复杂,其中之一是有些肿瘤细胞能分泌前列腺素E2(PGE2)[4][5],后者对免疫系统产生广泛的抑制作用,肿瘤得以逃避免疫系统的攻击,在体内无限生长。本研究的目的是观察灵芝多糖能否拮抗PGE2对小鼠脾细胞干扰素 γ (IFN- γ)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) mRNA表达的抑制作用,探讨灵芝多糖在免疫方面的抗肿瘤机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 C57BL/6j(批号:2004A065)及BALB/c(批号:2004A066)小鼠(SPF级),8至10周龄,雌雄兼用,购自南方医科大学实验动物中心。

1.1.2 药品与试剂 RPMI 1640培养基(GIBCO公司产品),新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司产品),HEPES(MDBio,分装)。DEPC、PGE2均为Sigma产品。RNAoutTM(深圳市华氏生物技术有限公司产品)。傻瓜RT反应体系(AccuPower RT PreMix,内含逆转录酶、dNTPs、RNA酶抑制剂、缓冲剂等),傻瓜PCR反应体系(PCR PreMix,内含Tag DNA聚合酶、dNTPs、PCR增强剂、缓冲剂、上样染料及稳定剂),均购自赛百盛公司。oligo d(T)18(TaKaRa产品),琼脂糖(Biowest Agarose,上海YITO生物器材企业有限公司分销),溴化乙锭(EB,上海博彩生物工程公司产品)。灵芝多糖参照文献[6]方法提取,为多糖组分,呈浅棕色,易溶于水,相对分子质量7000~9000。其余化学试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器 CO₂培养箱(美国Forma Scientific公司),AB-120型电子分析天平(美国Denver Instrument公司),台式低温高速离心机(Bechman公司),PCR循环仪(PTC-100TM,美国MJ Research Inc.公司),电泳仪(Power PAL3000, Bio-RAD公司),凝胶成像分析系统(摄像暗箱:TFP-M/ML;分析软件:Bio-CAPT v.97;法国Ets VILBER LOURMAT公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 以混合淋巴细胞培养反应作为实验模型,具体操作参照文献[7]。无菌分离C57BL/6j及BALB/c小鼠脾细胞,1:1混合,用含10%新生牛血清的RPMI 1640培养基接种于96孔板中,细胞密度为每孔 8×10^5 个,另加实验药品,总体积为200 μ l。于37 $^{\circ}$ C、含5%CO₂饱和和水蒸气的孵箱中根据实验不同培养所需的时间,检测IFN- γ mRNA表达时为4 h,检测TNF- α mRNA表达时为8 h。

1.2.2 实验方案 为了确定合适的PGE2浓度作为抑制模型,首先研究PGE2抑制IFN- γ mRNA表达的剂量关系。设4个PGE2浓度组,分别为5、10、20、40 μ mol/L,对照组加等体积的培养液,得半效抑制浓度约为

20 $\mu\text{mol/L}$ 。然后固定PGE2浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ ，在其中再加入不同浓度的灵芝多糖(100、200 mg/L)，观察灵芝多糖拮抗PGE2对IFN- γ 或TNF- α mRNA表达的抑制作用，共设5组，即：空白对照组(加等体积培养液)，灵芝多糖(200 mg/L)促进表达组，PGE2(20 $\mu\text{mol/L}$)抑制表达组，PGE2(20 $\mu\text{mol/L}$)+灵芝多糖(100 mg/L)组，PGE2(20 $\mu\text{mol/L}$)+灵芝多糖(200 mg/L)组。

1.2.3 总RNA提取 根据厂家说明书所提供的方案按比例缩小进行操作。细胞在培养4 h(检测IFN- γ mRNA)或8 h(检测TNF- α mRNA)后，先吸弃96孔板中的培养液，然后，每孔加RNAoutTM试剂40 μl ，每组收集10孔裂解液于1 ml Eppendorf管中，提取总RNA。

1.2.4 逆转录反应 先将DEPC处理水配制的oligo dT18(10 nmol/L)与DEPC处理水配制的总RNA(0.1 mg/L)按体积比1:1混合于Eppendorf管中，70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育5 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却2 min。吸取上述混合液20 μl 加入AccuPower RT PreMix管中，振荡混匀，快速离心数秒，置PCR循环仪中反应。反应参数如下：42 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录反应60 min，然后94 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应5 min。

1.2.5 PCR扩增 PCR引物采用在线软件Primer3进行设计。小鼠IFN- γ 上游引物：5'-ttt gag gtc aac aac cca ca-3'，下游引物：5'-cgcaat cac agt ctt ggc ta-3'，PCR扩增产物为388 bp。小鼠TNF- α 上游引物：5'-agt ccg ggc agg tct act tt-3'，下游引物：5'-gca cct cag gga aga gtc tg-3'，PCR扩增产物为422 bp。小鼠 β -actin上游引物：5'-cca gag caa gag agg tat cc-3'，下游引物：5'-ggg gtg ttg aag gtc tca aa-3'，PCR扩增产物为216 bp。PCR操作如下：在PCR PreMix 管中加入消毒双蒸水8 μl ，被检测基因mRNA逆转录产物或内参 β -actin mRNA逆转录产物2 μl ，相应的上、下游引物各5 μl (15 pmol)，振荡混匀，加石蜡油15 μl ，快速离心数秒，置PCR循环仪中反应。反应参数如下：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2.5 min，然后进入以下28个循环：94 $^{\circ}\text{C}$ 变性45 s，57 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1.5 min。循环完毕，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。

1.2.6 半定量分析 取被检测基因和 β -actin RT-PCR扩增产物上样于2%琼脂糖凝胶(含EB 0.05%)梳孔中，采用0.5 \times TBE电泳缓冲液，在3 v/cm电压条件下电泳50 min。将凝胶转移至凝胶分析系统暗箱中，在紫外线照射下测定PCR扩增产物的荧光强度值。结果表示为：(被检测基因扩增产物荧光强度值 \div 相应 β -actin扩增产物荧光强度值) \times 100%。

1.3 统计学处理

组间显著性差异采用配对资料的t检验。

2 结果

2.1 PGE2对混合淋巴细胞培养反应(MLR)中IFN- γ mRNA表达的抑制作用

不同浓度PGE2连续作用4 h后，MLR中小鼠脾细胞IFN- γ mRNA表达受到不同程度的抑制，随着PGE2浓度的增加，抑制作用不断增强。PGE2浓度在10 $\mu\text{mol/L}$ 以上时与空白对照组比较，其抑制作用具有统计学意义($P < 0.01$, $n=5$, 图1)，半效抑制浓度约为20 $\mu\text{mol/L}$ 。因此，选择20 $\mu\text{mol/L}$ 的PGE2作为抑制模型的造模浓度。

2.2 灵芝多糖拮抗PGE2对MLR中脾细胞IFN- γ mRNA表达的抑制作用

在MLR中，固定PGE2浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ ，在其中再加入不同浓度的灵芝多糖(100或200 mg/L)，观察灵芝多糖对PGE2的拮抗作用。培养4 h后，灵芝多糖(200 mg/L)明显促进小鼠脾细胞IFN- γ mRNA的表达，而PGE2(20 $\mu\text{mol/L}$)呈明显的抑制作用($P < 0.01$, $n=5$)。当灵芝多糖为100和 200 mg/L时可部分对抗PGE2(20 $\mu\text{mol/L}$)对IFN- γ mRNA表达的抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$, $n=5$, 图2)。

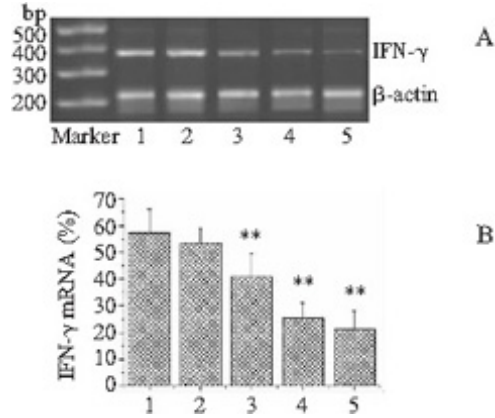


图1 PGE2对小鼠混合淋巴细胞培养反应中脾细胞IFN-γ mRNA表达的抑制作用

Fig.1 PGE2 inhibits murine splenocyte IFN-γ mRNA expression in mixed lymphocyte culture reaction (MLR)

1: Control; 2: PGE2 (5 μmol/L); 3: PGE2 (10 μmol/L); 4: PGE2 (20 μmol/L); 5: PGE2 (40 μmol/L); **P<0.01 vs control; A: A representative gel electrophoretogram of 5 experiments. B: Percentages of IFN-γ mRNA PCR product relative to that of β-actin by digital gel image analysis.

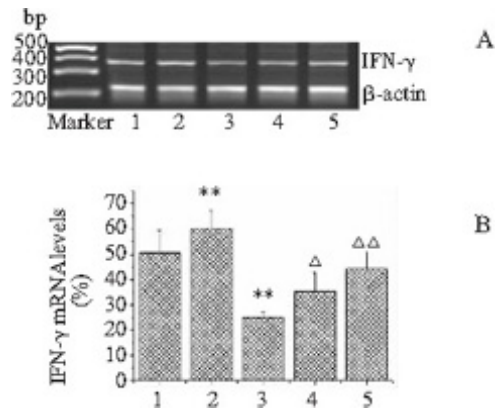


图2 灵芝多糖拮抗PGE2对小鼠混合淋巴细胞培养反应中脾细胞IFN-γ mRNA表达的抑制作用

Fig.2 Ganoderma polysaccharides (GLB) antagonize PGE2-induced inhibition of murine splenocyte IFN-γ mRNA expression in MLR

1: Control; 2: GLB (200 mg/L); 3: PGE2 (20 μmol/L); 4: PGE2 (20 μmol/L)+GLB (100 mg/L); 5: PGE2 (20 μmol/L)+GLB (200 mg/L); **P<0.01 vs control, ΔP<0.05, ΔΔP<0.01 vs group PGE2; A: A representative gel electrophoretogram of 5 experiments. B: Percentages of IFN-γ mRNA PCR product relative to that of β-actin.

2.3 灵芝多糖拮抗PGE2对MLR中脾细胞TNF-α mRNA表达的抑制作用

在同样实验模型条件下，灵芝多糖(200 mg/L)作用8 h后可以促进TNF-α mRNA的表达(P<0.05, n=5)，相反，PGE2(20 μmol/L)产生抑制作用(P<0.01, n=5)。在同样条件下，在实验体系中同时加入灵芝多糖(100或200 mg/L)和PGE2(20 μmol/L)，TNF-α mRNA表达水平比单独使用PGE要高(P<0.01, n=5)，但不能达到空白对照组的水平，表明灵芝多糖可部分对抗PGE2对TNF-α mRNA表达的抑制作用(图3)。

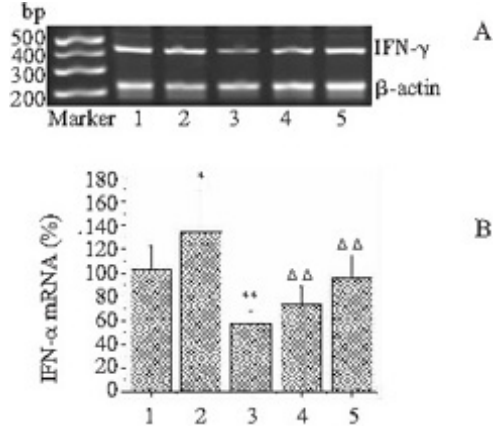


图3 灵芝多糖拮抗PGE2对小鼠混合淋巴细胞培养反应中脾细胞TNF- α mRNA表达的抑制作用
Fig.3 GLB antagonize PGE2-induced inhibition of murine splenocyte TNF- α mRNA expression in MLR

1: Control; 2: GLB (200 mg/L); 3: PGE2 (20 μ mol/L); 4: PGE2 (20 μ mol/L)+GLB (100 mg/L); 5: PGE2 (20 μ mol/L)+GLB (200 mg/L); *P<0.05 vs control; $\Delta\Delta$ P<0.01 vs group PGE2; A: A representative gel electrophoretogram of 5 experiments; B: Percentages of TNF- α mRNA PCR product relative to that of β -actin.

3 讨论

MLR是同种异型抗原刺激诱发的特异性细胞免疫反应模型，具有特异性免疫应答的一般特征。在MLR过程中，伴随多种细胞因子基因的表达与相应蛋白质产物的合成与分泌，如白介素-1、白介素-2、IFN- γ 、TNF- α 等，这些因子在机体的防御机制中发挥重要作用。因此，用这一模型进行实验所得到的结果具有较好的临床参考价值。

IFN- γ 是重要的Th1型细胞因子，通过调节数百种不同基因的表达而发挥其效应[8]。肿瘤病人血清中IFN- γ 的水平通常比正常人低[9][10]。体外实验证明PGE2抑制人外周血细胞[11]、T细胞[12] IFN- γ 的产生，因此，PGE2被认为是肿瘤病人内源性免疫抑制因子。本研究发现，PGE2可抑制MLR中脾细胞IFN- γ mRNA的表达，进一步从基因表达水平证明了PGE2抑制IFN- γ 产生的机制。另外，灵芝多糖可部分拮抗PGE2对MLR中脾细胞IFN- γ mRNA表达的抑制作用。由于IFN- γ 是重要的内源性抗肿瘤细胞因子，而灵芝多糖对肿瘤细胞没有直接的细胞毒作用，但在整体条件下却具有明显的抗肿瘤效应，因此设想拮抗PGE2对免疫细胞IFN- γ mRNA的表达可能是灵芝多糖抗肿瘤的机制之一。

大量研究表明TNF- α 在抗肿瘤方面发挥重要作用。在多种情况下，PGE2抑制巨噬细胞产生TNF- α [13][14]，从而削弱这一宿主自身的抗肿瘤机制。本研究显示，灵芝多糖可部分拮抗PGE2对MLR中脾细胞TNF- α mRNA表达的抑制作用，提示这一作用可能是灵芝多糖抗肿瘤作用的另一机制。

总之，本研究证实灵芝多糖可部分对抗PGE2对小鼠脾细胞IFN- γ 和TNF- α mRNA表达的抑制作用，提示灵芝多糖抗肿瘤作用与拮抗PGE2的免疫抑制作用有关。

参考文献:

[1]王庆彪, 雷林生, 孙莉莎, 等. 灵芝多糖体外对小鼠脾细胞IL-2, IL-3 mRNA表达的影响[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(4): 342-4.

Wang QB, Lei LS, Sun LS, et al. Effects of Ganoderma polysaccharide on IL-2 and IL-3 mRNA expressions in murine splenocytes in vitro[J]. Chin Pharmacol Bull, 1998, 14(4): 342-

4.

[2]雷林生, 王庆彪, 孙莉莎, 等. 灵芝多糖对小鼠脾细胞白细胞介素 1、肿瘤坏死因子的产生及其 mRNA 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(2): 16-8.

[3]Wang SY, Hsu ML, Hsu HC, et al. The anti-tumor effect of Ganoderma lucidum is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes[J]. Int J Cancer, 1997, 70(6): 699-705.

[4]Ye F, Wu J, Dunn T, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity in head and neck cancer cells by genistein[J]. Cancer Lett, 2004, 211(1): 39-46.

[5]Mitsuhashi M, Liu J, Cao S, et al. Regulation of interleukin-12 gene expression and its anti-tumor activities by prostaglandin E2 derived from mammary carcinomas[J]. J Leukoc Biol, 2004, 76(2): 322-32.

[6]李荣芷, 何云庆. 灵芝抗衰老机理与活性成分: 灵芝多糖的化学与构效研究[J]. 北京医科大学学报, 1991, 23(6): 473-5.

[7]张 庆, 雷林生, 杨淑琴, 等. 大枣中性多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(6): 426-8.

Zhang Q, Lei LS, Yang SQ, et al. Effects of neutral jujube date polysaccharide on the proliferation of mouse splenocytes[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(6): 426-8.

[8]潘 焯, 郑 起. 干扰素在肿瘤治疗中应用的研究进展[J]. 国外医学·外科学分册, 2005, 32(1): 10-3.

[9]姜维洁, 李培成, 张金福. 肺癌患者 IFN- γ 和 IL-10 水平的变化[J]. 上海医学检验杂志, 2000, 15(3): 157-8.

[10]甘雪婷, 白宪光, 冯志华, 等. 血清转化生长因子 β 1 和干扰素 γ 在肝硬化及肝癌中的表达及其临床意义[J]. 临床内科杂志, 2003, 20(9): 484-6.

[11]Miles EA, Aston L, Calder PC. In vitro effects of eicosanoids derived from different 20-carbon fatty acids on T helper type 1 and T helper type 2 cytokine production in human whole-blood cultures[J]. Clin Exp Allergy, 2003, 33(5): 624-32.

[12]Della-Bella S, Molteni M, Compasso S, et al. Differential effects of cyclooxygenase pathway metabolites on cytokine production by T lymphocytes[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1997, 56(3): 177-84.

[13]Treffkorn L, Scheibe R, Maruyama T, et al. PGE2 exerts its effect on the LPS-induced release of TNF- α , ET-1, IL-1 α , IL-6 and IL-10 via the EP2 and EP4 receptor in rat liver macrophages[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2004, 74(1-4): 113-23.

[14]Vassiliou E, Jing H, Ganea D. Prostaglandin E2 inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells[J]. Cell Immunol, 2003, 223(2): 120-32.