

ABM 热水提取物对小鼠抗体生成细胞的作用

A.Nakajima^a, T.Ishida^a, M.Koga^a, T.Takeuchi^b, O.Mazada^c, M.Takeuchi^{a*}

^a 603-8555 京都市北区上贺茂本山京都产业大学工程学院生物技术系

^b 日本鹿儿岛鹿儿岛大学医学院保健学系

^c 日本东京京都府立医科大学微生物系

摘要: 通过对绵羊红细胞 (SRBC) 抗原反应形成的溶血性空斑细胞 (PFC) 试验来检测 ABM 提取物对抗体生成的影响, 进一步验证 ABM 水提物的免疫增强作用。腹腔注射 25mg/kg 的 ABM, 我们发现小鼠脾脏中的 PFC 数量明显高于对照组 ($p < 0.01$), Mac-1 或 CD25 阳性细胞数量也有明显的增加 ($p < 0.01, p < 0.001$)。但是 ABM 试验组与对照组相比, CD19 阳性细胞数量并没有明显差异。无论是在脾细胞还是腹膜巨噬细胞中, ABM 将增强 IL-6 和 IL-1 β 的 mRNA 的表达。这个结论表明 ABM 可能是有效的刺激因子, 刺激 T 细胞和巨噬细胞释放 IL-6 和 IL-1 β , 从而加强了与 SRBC 抗原反应的抗体的生成。

1 引言

由于化疗药物和一些合成的化合物在抗肿瘤的同时也具有巨大的副作用, 因此人们开始对一些无副作用且具有活性成分尤其是抗肿瘤活性的天然物质非常关注。目前, 各种蘑菇被用作免疫增强剂, 从蘑菇中分离出来的许多多糖和肽都有抗肿瘤的活性。如黑木耳, 猴头菇, 龟裂马勃。当然巴西蘑菇 (ABM) 也被报道有抗肿瘤的活性。在皮耶达德, 一个坐落在巴西圣保罗的郊区, ABM 在那里是作为传统的药物。ABM 的多糖成分有抗肿瘤的活性能抵抗 Sacoma180, 多糖的结构包括 β -1, 6-吡喃葡聚糖残基。ABM 提取物主要包括 (1-4)- α -D-葡聚糖和 (1-6)- β 分支, 它通过介导自然杀伤细胞的活性和细胞凋亡来杀死肿瘤细胞。ABM 的肽葡聚糖对于 Meth A 肿瘤细胞有直接的细胞毒作用, 对于小鼠荷瘤有间接的免疫增强的作用。在用巴西蘑菇处理过的小鼠中, 我们发现 ABM 多糖能改变 T 细胞亚群中脾脏 Thy1,2-, L3 T4 阳性细胞的百分比。这些报告表明, ABM 多糖通过免疫调节对肿瘤细胞产生细胞毒作用。尽管许多报道指出很多天然物质特别是 ABM, 拥有肿瘤杀伤活性, 但是关于延迟型超敏反应或抗体反应的免疫增强作用很少被报道, 我们尚不清楚 ABM 提取物如何激活免疫系统, 也没有相关报道证明 ABM 有增强抗体产生的功效。因此, 本文主要对巴西蘑菇是否可以诱导抗体产生及产生的机理进行研究。

2 材料和方法

2.1 小鼠

C57BL/6 品系的雌小鼠 (8-10 周大)。小鼠由日本 (SLC) 提供, 12 只小鼠进行实验。根据 Kyoto Sangyo 大学动物委员会伦理标准对小鼠进行处理。

2.2 ABM 的制备

ABM 的沸水提取物来自 Kyoto Engineering。ABM 提取物根据 Mizuno et al. 方法提取。用沸水对 ABM 干体进行提取, 提取物在 1800 \times g 离心 10 分钟, 冻干, 再用浓度为 10mg/ml 的含有自由离子 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ Dulbecco's PBS 缓冲液中重新溶解, 再通过 0.45 μ m 滤膜进行过滤。4 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.3 溶血空斑试验

绵羊的红细胞 (SRBC) 用做抗原 (Nikken 生化实验室)。SRBC 用盐水洗涤三次。小鼠同时腹腔注射 1 \times 10⁸ 个 SRBC 和 ABM 提取物 (25mg/kg), 对照组用 PBS。4 天后, 取出小鼠的脾脏, 脾细胞在 490 \times g 离心 5 分钟离心 2 次, 在 10 ml 的 Eagle's MEM 中重新悬浮。台盼蓝染色排除试验检测存活细胞。通过 Cunnig-ham 和 Szenberg 方法确定与 SRBC 抗原反应的每 10⁶ 脾细胞或脾中的 PFC 数量。100 μ l 脾细胞悬浮液中加入 50 μ l 50% 的 SRBC 和 24% 的补体使终体积达到 500 μ l。取 100 μ l 样品在 37 $^{\circ}$ C 下 (Cunningham's chamber) 中温育 1 小时通过菌落计数器对 SRBC 的溶血空斑进行计数。

2.4 IL-1 β 和 IL-6 mRNA 的表达

(1) RNA 的提取。(a) 脾细胞. 用 ABM 提取物或 PBS 对小鼠进行腹腔注射。4 天后, 取出脾脏, 用钢丝网剁碎, 过纱布层。通过 (AGPC) 方法提取脾细胞的所有 RNA。(b) 腹膜细胞. 巨噬细胞培养基用 10ml 的 PBS 灌胃收集的腹腔渗透液制成。把渗出液注入塑料试管, 在 250 \times g 下离心 10 分钟。颗粒状渗出细胞在加入 10% 的 FCS 的 RPMI 中再次悬浮。等量的腹膜细胞放入 96-well 的培养皿 (5 \times 10⁵ cell/0.1ml/well) 中, 在其中分别加入 0.1 或 1mg/ml 的 ABM 提取物, 或者不加入, 在 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 为 5% 的潮湿空气中进行培养。24 或 48 小时后, 用 AGPC 方法提取总的 RNA。

(2) RT-PCR 用 MLV 逆转录酶把 RNA 逆转录为 cDNA。寡核苷酸引物序列为已公布的 IL-1 β (250bp), IL-6 (290bp) 和 β -actin (268bp) 这类看家基因。cDNA 序列通过以下的引物碱基对用 PCR 技术进行扩增, IL-1 β 循环 30 次, IL-6 循环 32 次。 β -actin 序列 (5'GCATTGTTACCAACTGGGAC-3')。 β -actin 的反义序列为 (5'-TCTCCGGAGTCCATCACAAT-3') 和 IL-1 β 反义序列为 (5'-GTCGTTGCTTGGTTCTCCTT-3') IL-6 反义序列为 (5'-GGTCCTTAGCCTCTGCTTCTGTG-3')。扩增阶段为 94 $^{\circ}$ C 下变性 1 分钟, 56 $^{\circ}$ C 下退火 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 下延伸 1 分钟, 当进行最后一次循环时, 需在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 分钟, 反应在冷却到 4 $^{\circ}$ C 度时停止。PCR 的产物可以用加入溴化乙锭的 30% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行观测。用 Scion Image 对 IL-6, IL-1 β mRNA 的表达进行量化测定。

表 1 ABM 提取物对 PFC 数量的影响

	PFC ^a 的数量		脾细胞总数量 ($\times 10^4$ cells)
	每 10^6 个脾细胞	每单位脾 ($\times 10^4$ cells)	
对照组	425.19 \pm 283.71 ^b	3.86 \pm 2.20	0.98 \pm 0.20
ABM ^c	897.09 \pm 439.78*	10.59 \pm 5.63*	1.11 \pm 0.29

a: SRBC 抗原免疫反应 4 天后,用 PFC 方法检测

b: 每个值代表 mean \pm S. D. (n=12)

c: 同时腹腔注射 1×10^8 个 SRBC 和 ABM 提取物 (25mg/kg)

*:P<0.01

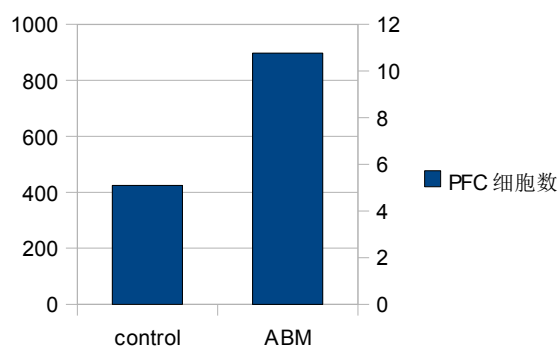
2.5 表面抗原的检测

脾细胞的表面抗原的表达用 Nicholson-Weller et al 所描述的免疫荧光法进行检测。用 ABM 提取物或者不用其提取物分别对脾细胞 (5×10^5 cell/100ul) 进行处理, 最后在 4 $^{\circ}$ C, 用 0.5ug 的 FITC-conjugated 或者是 (PE) -conjugated mAb 染色 45 分钟。FITC- conjugated anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD11b (Mac-1) mAb, 和, (PE) -conjugated anti-CD19 mAb 均有 PharMingen 提供。FITC- conjugated anti-Class II 和 anti-B7-1mAb 由 Caltag 提供。温育一段时间后, 用 1ml 的 PBS 450 \times g 下离心 5 分钟, 离心 2 次。沉淀在含有 100ug/ml CaCl₂/MgCl₂, 0.01% 的叠氮化钠和 1%FCS 的 0.5ml 的 PBS 溶液中重新悬浮, 用 FACS 进行分析。

2.6 统计分析

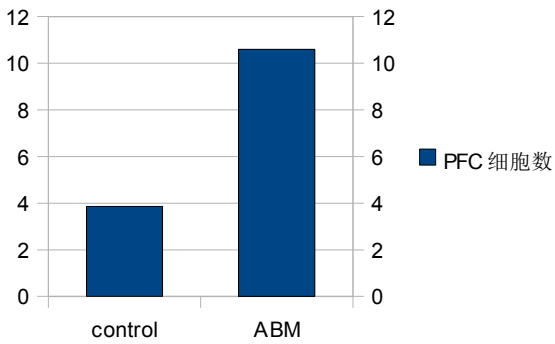
用 means \pm S. D 方法进行评估。用 student's t-test 对 ABM 处理组和对照组进行对比分析, p 值小于 0.05 均有意义。

a)



每 10^6 脾细胞中 PFC 数量

b)



每单位脾细胞 (10⁴) 中 PFC 数量

1: AMB 提取物对 PFC 数量的影响. 小鼠同时腹腔注射 1×10^8 个 SRBC 和 AMB 提取物 (25mg/kg) 对照组用 PBS (-)。4 天后, 取出小鼠的脾脏, 用 PFC 检测方法对与 SRBC 抗原反应的 PCF 细胞计数. (a) 每 10^6 个脾细胞 PFC 数量.(b) 每单位脾中的 PFC 数量. 用 means \pm S. D 方法进行评估 **: 与对照组相比显著.

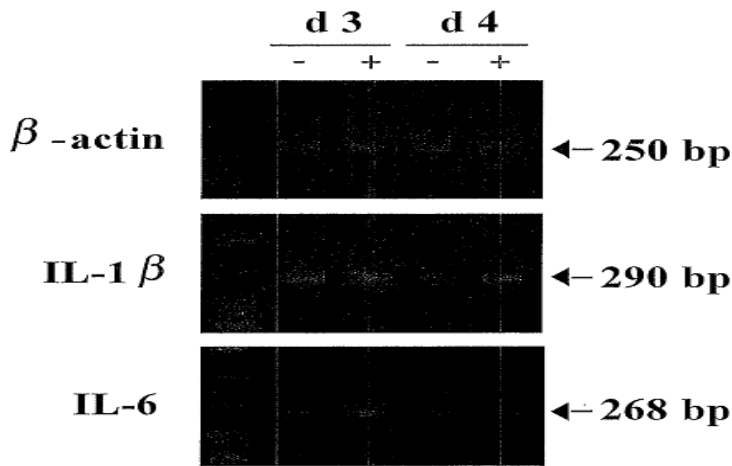


图 2 AMB 提取物对脾细胞中的 IL-1 β , IL-6mRNA 表达的影响. 小鼠腹腔注射 AMB 提取物 (25mg/kg) (+) 或无 AMB 注射 (-)。3 天或 4 天后, 取出小鼠的脾脏, 用 AGPC 方法提取总 RNA. 利用 RT-PCR 技术进行扩增, β -actin 循环 26 次, IL-1 β 循环 29 次, IL-6 循环 32 次. PCR 的产物可以用加入溴化乙锭的 30% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行观测。

2 结果

3.1 AMB 提取物对抗体生成的作用

我们通过检测每 10^6 个脾细胞的 PFC 和每单位脾中的 PFC 的数量来评价 AMB 提取物的作用。AMB 处理组中小鼠和对照组中的小鼠, 脾细胞数量没有显著的差异。如表 1 所示。尽管在对照组中每 10^6 个脾细胞的 PFC 数量是 (425 ± 283), AMB-处理组中小鼠 PFC 数量是 (897 ± 440) (如图 1a, 表 1 所示)。AMB 处理组中每单位脾中 PFC 的数量是 $3.8 \pm 2.20 \times 10^4$, 对照组中每单位脾中的 PFC 数量是 $10.5 \pm 5.63 \times 10^4$ 。因此, AMB 提取物导致了每 10^6 个脾细胞的 PFC 和每单位脾中的 PFC 数量与对照组相比有明显增加。 ($p < 0.01$)

表 2 AMB 提取物对脾细胞中的 IL-1 β , IL-6mRNA 或 β -actin 表达的影响.

	d3 ^a		d4	
	(-) ^b	(+)	(-)	(+)
IL-1 β	16.52 ^c	30.74	8.62	26.69
IL-6	26.83 ^d	38.42	10.48	21.72

a: 注射后 3 天

b: AMB 提取物(25mg/kg)对小鼠静脉注射(+)或不注射(-)

c: IL-1 β 和 β -actinmRNA 的表达率

d: IL-6 和 β -actinmRNA 的表达率

3.2 ABM 提取物对脾细胞或腹膜细胞中 IL-1 β 和 IL-6mRNA 表达的影响

为了探讨 ABM 提取物如何使 PFC 数量增加, 我们检测了 IL-1 β 和 IL-6mRNA 的表达。这些细胞因子被认为是与 B 细胞分化抗体生成细胞有关系。我们发现, 在 SRBC 处理后三天, IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 表达达到最高的水平, ABM 处理组与对照组相比, 其表达水平在第 4 天仍然达到一个比较高的水平。(如图 2) IL-1 β 和 IL-6mRNA 的表达的量化指标(如表 2 所示)。我们检测了 ABM 提取物是否可以激活巨噬细胞。在加入 1mg/ml ABM 提取物 24 小时后 IL-1 β mRNA 达到一个高峰, 然后开始衰退。(如图 3 所示)

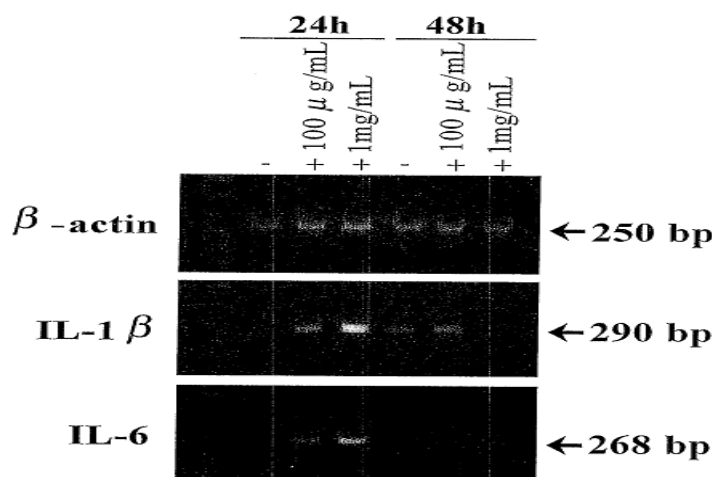


图 3 ABM 提取物对腹膜巨噬细胞中的 IL-1 β , IL-6mRNA 表达的影响. 腹膜细胞分布在 96-well 的培养皿中 (5×10^5 cell/0.1ml/well), 培养皿中分别加入或者不加 0.1 或 1mg/ml 的 ABM 提取物. 细胞在 37 $^{\circ}$ C, CO $_2$ 为 5% 的潮湿空气 中进行培养. 24 或 48 小时后, 用 AGPC 方法提取总的 RNA. RT-PCR 如前描述. PCR 的产物可以用加入溴化乙锭的 30% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行观测。

3.3 ABM 提取物对脾细胞表面抗原的影响

ABM 提取物处理组中小鼠的 B7-1, Mac-1, CD25 抗原阳性细胞的百分比为 25.4 ± 1.4 , 18.7 ± 2.0 或 26.9 ± 2.5 , 对照组的为 17.0 ± 3.6 , 11.9 ± 2.9 或 13.1 ± 2.2 。因此与对照组相比有明显的增加 ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.001$)。然而在处理组和对照组中 CD3, CD4, CD8, CD19 或 Class II 抗原阳性细胞并没有显著差异。(如表 3 所示)

表 3 ABM 提取物(25mg/kg)静脉注射 4 天后的脾细胞亚群数量

	阳性细胞百分比 (%)							
	CD3	CD4	CD8	CD19	Mac-1	Class-II	B7	CD25
对照组	28.94 ± 1.32^a	18.67 ± 1.73	12.24 ± 0.87	52.20 ± 3.33	16.97 ± 3.55	35.92 ± 9.64	11.92 ± 2.89	13.13 ± 2.23
ABM ^b	28.03 ± 1.21	18.98 ± 0.49	14.39 ± 1.84	53.79 ± 5.28	$25.44 \pm 1.35^*$	2.03 ± 2.02	$18.68 \pm 2.04^*$	$26.90 \pm 2.46^{**}$

a: 每个值代表 mean \pm S. D. (n=5)

b: FACS 分析, ABM 提取物(25mg/kg)静脉注射 4 天

* $p < 0.01$

** $p < 0.001$

3 讨论

尽管大家已经接受 ABM 有肿瘤杀伤作用, 但是对其能影响抗体的生成却少有报道。目前的研究表明, ABM 提取物能增强免疫反应。利用 PFC 实验, 我们揭示了 ABM 提取物对抗体生成具有一定的影响, PFC 实验是典型的检测体液免疫反应的方法。在试验组和对照组中, 尽管 B 细胞和脾细胞的数量没有差异, 但是, 在脾脏中, 与 SRBC 抗原反应的 PFC 数量增长了 3 倍。PFC 方法可以测定 IgM 的生成。ABM 的使用可以增加抗体的生成, 主要是 IgM 的产生, 通过 IgM 转化为 IgG, IgG 的增加也是有可能。免疫反应 4 天后, 取出小鼠的脾脏, 在 ABM 处理组中, Mac-1, CD25 抗原阳性细胞的百分比有显著的提高, 但是, CD-19 抗原阳性细胞的百分比和对照组相比没有明显的差异。目前认为 Mac-1 抗原是由单核-巨噬细胞, 粒细胞及活化的淋巴细胞分化产生。CD25 抗原位于活化或已分化的 T/B 淋巴细胞及已分化的单核-巨噬细胞的表面。CD19 抗原存在与非活化的 B 淋巴细胞表面。ABM 提取物可以增加 Mac-1, CD25, B7-1 染色细胞数量, 在抗体反应中, ABM 提取物可以增强单核细胞, 巨噬细胞的分化。ABM 处理对 T 细胞亚群没有影响。

然而，抗体生成和 SRBC 抗原的反应依赖 T 细胞。ABM 提取物可以刺激单核细胞，巨噬细胞和诱导 T 细胞和 B 细胞的活化。Mizuno 等表明当小鼠口服 ABM 的热溶性提取物后，Thy-1.2，CD4 和 CD8 阳性细胞群与对照组相比有显著的增加。但是本次实验并没有发现 CD4 和 CD8 阳性细胞的变化，这些差异可能是由于提取方法，服用发法和 ABM 提取物浓度不同所引起的。B 细胞分化需要一系列由 T 细胞或巨噬细胞分泌的细胞因子相互作用来完成。据报道，在 IL-1^{-/-}小鼠中，与 SRBC 抗原反应的抗体减少。GM-CSF 被证明对成熟的 APC 是有影响的，在体内，它通过增强 IL-1 的分泌和 Ia 抗原的表达从而增强免疫反应。IL-6 主要由单核细胞和 T 细胞产生，它能促进 B 细胞活化，分泌抗体；RT-PCR 中的 IL-1 β 和 IL-6mRNA 的表达有较高的灵敏度和特异性。因此，我们检测 IL-1 β 和 IL-6mRNA 的水平而不是蛋白的水平。ABM 提取物可以增加来自腹膜巨噬细胞 IL-1 β 和 IL-6mRNA 的表达。此外，在脾脏中我们也发现了相同结果，通过加入 ABM 提取物可以增加抗体生成细胞，脾细胞中的 IL-1 β 和 IL-6mRNA 的表达较对照组高。这些结果表明，ABM 提取物可以提高抗体的生成，可能是活化的 T 细胞和巨噬细胞产生 IL-1 β 和 IL-6 所导致的，其结果是导致 B 细胞分化，产生抗体。因此，ABM 的热水提取物在加强免疫力，阻止疾病的发生中起了重要作用。此外，我们有必要对 ABM 提取物引起的 PFC 数量上调机理进行调查。

致谢

我们要感谢 Kyowa Engineering 提供的 ABM 提取物。该研究得到日本文部科学省生物风险项目补助金的支持