

香菇多糖对小鼠T淋巴细胞膜上离子通道基因表达的影响

刘国欣^{1*}, 邢建国², 李明春^{3#}, 付青姐³, 张彬³(1.石河子大学药学院, 新疆石河子 832000; 2.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830000; 3.解放军第401医院, 山东青岛 266000)

中图分类号 R285;R967 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1361-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.06

摘要 目的:研究香菇多糖对小鼠T淋巴细胞膜上离子通道基因表达的影响。方法:40只KM小鼠随机分为对照(等容生理盐水)组与香菇多糖高、中、低剂量(12.5、2.5、0.5 mg/kg)组,腹腔注射,每天1次,连续30 d。末次给药1 h后处死小鼠,采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法检测小鼠T淋巴细胞内电压门控钾离子通道(KV1.3)、Ca²⁺激活的钾离子通道(KCa3.1)、阳离子通道(TRPM7)、氯离子通道(Clswell)以及钙离子通道(CRAC)激活的调控元件基质相互作用因子1(STIM1)和组成分子orai1 mRNA的表达。结果:与对照组比较,香菇多糖中剂量组小鼠T淋巴细胞KV1.3、KCa3.1、STIM1、orai1、TRPM7、Clswell mRNA表达增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:香菇多糖可提高小鼠T淋巴细胞增殖及活性,其机制与增强T细胞上的KV1.3、KCa3.1、orai1、STIM1、TRPM7、Clswell mRNA表达有关。

关键词 香菇多糖;T淋巴细胞;离子通道

Effects of Lentinan on Gene Expression of Ion Channels in T Lymphocyte Membrane Isolated from Mice

LIU Guo-xin¹, XING Jian-guo², LI Ming-chun³, FU Qing-jie³, ZHANG Bin³(1.Pharmaceutical College of Shihezi University, Xinjiang Shihezi 832000, China; 2.Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830000, China; 3. No. 401 Hospital of PLA, Shandong Qingdao 266000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the effects of lentinan (LTN) on gene expression of ion channels in T lymphocyte membrane of mice. METHODS: 40 KM mice were randomly divided into 4 groups: normal control group (constant volume of normal saline) and LTN high-dose, medium-dose and low-dose groups (12.5, 2.5, 0.5 mg/kg) intravenously once a day for consecutive 30 days. All mice were sacrificed 1 h after last administration. RT-q PCR was used to measure the mRNA expression of KV1.3, KCa3.1, STIM1, orai1, TRPM7 and Clswell in T lymphocytes isolated from mice. RESULTS: Compared with normal control group, there was statistical significance in the expression of KV1.3, KCa3.1, STIM1, orai1, TRPM7, Clswell gene in T lymphocytes isolated from mice in LTN medium-dose group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: The lentinan enhance the proliferation and activity of T lymphocytes isolated from mice, which is associated with the expression of KV1.3, KCa3.1, STIM1, orai1, TRPM7 and Clswell genes.

KEYWORDS Lentinan; T lymphocytes; Ion channel

T淋巴细胞是生物体内最重要的免疫活性细胞之一,主行细胞免疫应答,并参与体液免疫应答,在人体的免疫系统功能中发挥着重要作用。T淋巴细胞膜上主要有电压门控钾离子通道(KV1.3)、Ca²⁺激活的钾离子通道(KCa3.1)、阳离子通道

(TRPM7)、氯离子通道(Clswell)4种离子通道^[1]以及钙离子通道(CRAC)激活的调控元件[基质相互作用因子(STIM)1和组成分子orai1],这些离子通道的活动与离子跨膜运动、膜电位变化以及T淋巴细胞活化、增殖密切相关。KV1.3受膜电位控

Pharmacol Ther, 2006, 24(8): 1 179.
[7] 张瑞晨,刘斌,孙震晓,等.何首乌提取物对人正常肝细胞L02周期阻滞及凋亡的影响[J].中西医结合学报, 2010, 8(6): 554.
[8] 张瑞晨,张超,孙震晓,等.何首乌不同分离部位对人正常肝L02细胞和肝癌HepG2细胞的杀伤作用[J].中国中药杂志, 2012, 37(12): 1 830.
[9] 黄伟,张亚囡,孙蓉.何首乌不同组分单次给药对小鼠肝

毒性“量-时-毒”关系研究[J].中国药物警戒, 2011, 8(4): 193.
[10] 张超,张瑞晨,孙震晓.何首乌生品与炮制品对大鼠肝脏的毒理学研究[J].中药材, 2013, 36(9): 1 416.
[11] 杨红莉,孙震晓.何首乌含药血清对体外培养肝脏细胞活力的影响[J].中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(1): 110.
[12] 杨红莉,葛珍珍,孙震晓.何首乌药理研究最新进展[J].中药材, 2013, 36(10): 1 713.
[13] 张挺,吕圭源.炮制前后何首乌蒽醌类含量的比较研究[J].浙江中医药大学学报, 2009, 33(6): 872.

(收稿日期:2013-12-19 修回日期:2014-02-13)

* 硕士研究生。研究方向:免疫药理学。电话:0532-51872904。E-mail: liuguoxin44@163.com

通信作者:主任药师,教授,硕士。研究方向:免疫药理学。电话:0532-51870086。E-mail: LMC401y@163.com

制,主要维持T淋巴细胞的静息膜电位,它功能异常时,静息电位降低,可抑制Ca²⁺进入细胞,故它可以通过影响Ca²⁺浓度来影响T淋巴细胞的激活与功能,此外还参与T淋巴细胞的体积调节过程。KCa3.1受细胞内Ca²⁺浓度调节,细胞内Ca²⁺浓度升高是KCa3.1开放的主要原因,它在T淋巴细胞的活化过程中具有重要的作用^[2]。T淋巴细胞上CRAC是细胞外Ca²⁺进入细胞的唯一通路,它通过调控细胞内Ca²⁺浓度来调控T淋巴细胞的活活动^[1]。TRPM7是一种非选择性的阳离子通道,对Ca²⁺、Mg²⁺、K⁺、Na⁺在内的众多阳离子有通透性^[3],同时作为一种蛋白激酶可使自身或底物磷酸化^[4]。Clswell是T淋巴细胞上的Cl⁻通道,正常状态下不开放,当细胞体积增大时,激活Clswell通道,Cl⁻由细胞内流向细胞外,直至细胞体积恢复至原来体积时Clswell通道关闭^[1]。总之,T淋巴细胞膜上的离子通道作为T淋巴细胞内信号转导的一条重要途径,在T淋巴细胞的激活、分化等其他功能中具有重要作用。

香菇多糖是从担子菌伞科真菌香菇子实中提取出来的β-1,3-d-葡聚糖,从1970年Chihara第一次报道证实香菇多糖具有很强的抗肿瘤活性后,它被陆续证实具有明显的抗菌、提高机体免疫等作用^[5]。香菇多糖注射液作为一种具有免疫调节作用的抗肿瘤辅助药物,广泛应用于临床,调查显示它在许多医院中药制剂的应用中排在前三位^[6]。目前,对香菇多糖促进T淋巴细胞增殖与活化的机制研究相对较少,并且对T淋巴细胞的增殖与活化是否与T淋巴细胞膜上的离子通道有关的研究仍未见报道。本研究将从基因水平对香菇多糖的作用机制进行研究,主要针对香菇多糖对小鼠T淋巴细胞膜上的离子通道基因表达的影响进行探讨。

1 材料

1.1 仪器

DynaMag-15型磁力架(美国Life Technologies公司);超低温冰箱(青岛澳柯玛电器公司);TL988型实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)仪(西安天隆科技有限公司);MTC100型恒温混匀仪(杭州米欧仪器有限公司);TGL16型高速低温离心机(长沙英泰仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

香菇多糖注射液(金陵药业股份有限公司,批号:121001.1,规格:1.0 mg/2 ml);胎牛血清、免疫磁珠试剂盒(美国Hyclone公司);RNA提取试剂盒、引物(基因序列见表1)、cDNA试剂盒、RNA扩增试剂盒(大连宝生物工程有限公司)。

表1 基因序列

Tab 1 Gene sequences

基因名称	碱基序列	序列号
KV1.3	F:CTGGTGGGCAGTAGTAACCATGA R:ACACCTGCGATGGCACAAAG	NM_008418.2
KCa3.1	F:ATTCCGATCACATTCCTGACCA R:GCCTGTGTGAACCTCCAGCTTCC	NM_008433.4
orai1	F:CGCCAAGCTCAAAGCTTCC R:CAGGCACTAAAGACGATGAGCA	NM_175423.3
STIM1	F:TGAGGCCGTCGCAAAATC R:TCACTGTTGGTTCATGGTAATTGAG	NM_009287.4
TRPM7	F:CTGCCAATCTAGGAGAAGATGCAAT R:AGGCGTGTAGTCATTCCTCTTCAA	NM_001164325.1
Clswell	F:CAGTTGTGCTAGCGCTCATATTTA R:TCCCTGCAATGGCTCCAA	Q8BHY3.2
GAPDH	F:TGTGTCCGTCGTGGATCTGA R:TTGCTGTTGAAGTCGAGGAG	NM_008084.2

1.3 动物

健康KM小鼠40只,6~8周,♂,体质量(24±4)g,由山东

青岛实验动物与动物实验中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(鲁)20090007]。

2 方法

2.1 分组与给药

40只KM小鼠随机均分为4组,即对照(等容生理盐水)组与香菇多糖高、中、低剂量(12.5、2.5、0.5 mg/kg)组。ip给药,每天1次,连续30 d。

2.2 T淋巴细胞的提取

末次给药1 h后,处死小鼠,取出脾脏,置于冷PBS(含0.1%胎牛血清+0.02%柠檬酸钠)中,用免疫磁珠法从脾脏中提取T淋巴细胞。

2.3 qRT-PCR的测定

收集细胞,Trizol法提取RNA,鉴定完RNA纯度和完整性后,反转录制备cDNA;PCR条件为:95℃预变性30 s;95℃变性15 s,55℃退火30 s,60℃延伸30 s,循环数40次;72℃延伸5 min终止反应。qRT-PCR结束后,定量分析PCR获得的熔解曲线和扩增曲线结果的可靠性并设定循环阈值(C_t),以目的基因β-actin比值分别代表各自相对表达水平。各组设3个复孔,实验重复3次。

2.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS17.0软件处理分析实验数据。采用单因素方差分析获得离子通道基因表达结果。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 香菇多糖对小鼠脾脏T淋巴细胞KV1.3 mRNA表达的影响

与对照组比较,香菇多糖中剂量组小鼠脾脏T淋巴细胞KV1.3 mRNA表达增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明,中剂量香菇多糖可以使小鼠脾脏T淋巴细胞上KV1.3 mRNA表达增强。小鼠脾脏T淋巴细胞KV1.3 mRNA的表达见图1。

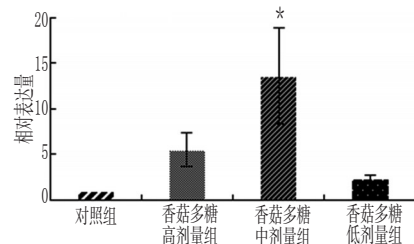


图1 小鼠脾脏T淋巴细胞KV1.3 mRNA的表达

与对照组比较: * $P < 0.05$

Fig 1 mRNA expression of KV1.3 in T lymphocytes isolated from mice

vs. control group: * $P < 0.05$

3.2 香菇多糖对小鼠脾脏T淋巴细胞KCa3.1 mRNA表达的影响

与对照组比较,香菇多糖中剂量组小鼠脾脏T淋巴细胞KCa3.1 mRNA表达增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明,中剂量香菇多糖可以使小鼠脾脏T淋巴细胞上KCa3.1 mRNA的表达增强。小鼠脾脏T淋巴细胞KCa3.1 RNA的表达见图2。

3.3 香菇多糖对小鼠脾脏T淋巴细胞orai1 mRNA表达的影响

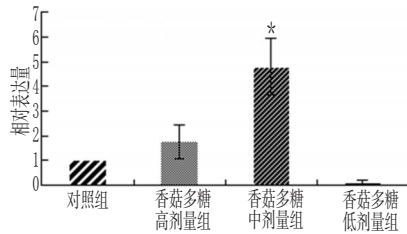


图2 小鼠脾脏T淋巴细胞KCa3.1 mRNA的表达
与对照组比较: * $P < 0.05$

Fig 2 mRNA expression of KCa3.1 in T lymphocytes isolated from mice
vs. control group: * $P < 0.05$

与对照组比较,香菇多糖中剂量组小鼠脾脏T淋巴细胞orai1 mRNA表达增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明,中剂量香菇多糖可以使小鼠脾脏T淋巴细胞CRAC通路上的调控元件orai1 mRNA表达增强。小鼠脾脏T淋巴细胞orai1 mRNA的表达见图3。

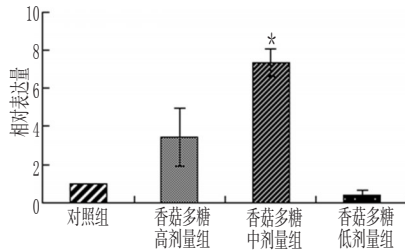


图3 小鼠脾脏T淋巴细胞orai1 mRNA的表达
与对照组比较: * $P < 0.05$

Fig 3 mRNA expression of orai1 in T lymphocytes isolated from mice
vs. control group: * $P < 0.05$

3.4 香菇多糖对小鼠脾脏T淋巴细胞STIM1 mRNA表达的影响

与对照组比较,香菇多糖中剂量组小鼠脾脏T淋巴细胞STIM1 mRNA表达增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明,中剂量香菇多糖可以使小鼠脾脏T淋巴细胞CRAC通路上的调控元件STIM1 mRNA表达增强。小鼠脾脏T淋巴细胞STIM1 mRNA的表达见图4。

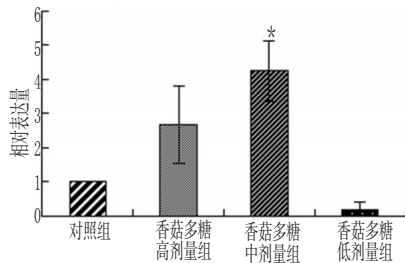


图4 小鼠脾脏T淋巴细胞STIM1 mRNA的表达
与对照组比较: * $P < 0.05$

Fig 4 mRNA expression of STIM1 in T lymphocytes isolated from mice
vs. control group: * $P < 0.05$

3.5 香菇多糖对小鼠脾脏T淋巴细胞TRPM7 mRNA表达的影响

与对照组比较,香菇多糖中剂量组小鼠脾脏T淋巴细胞TRPM7 mRNA表达增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果

表明,中剂量香菇多糖可以使小鼠脾脏T淋巴细胞上TRPM7 mRNA表达增强。小鼠脾脏T淋巴细胞TRPM7 mRNA的表达见图5。

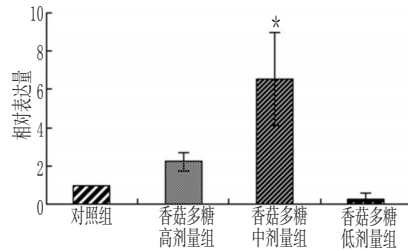


图5 小鼠脾脏T淋巴细胞TRPM7 mRNA的表达
与对照组比较: * $P < 0.05$

Fig 5 mRNA expression of TRPM7 in T lymphocytes isolated from mice
vs. control group: * $P < 0.05$

3.6 香菇多糖对小鼠脾脏T淋巴细胞Clswell mRNA表达的影响

与对照组比较,香菇多糖中剂量组小鼠脾脏T淋巴细胞Clswell mRNA表达增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明,中剂量香菇多糖可以使小鼠脾脏T淋巴细胞上Clswell mRNA表达增强。小鼠脾脏T淋巴细胞Clswell mRNA的表达见图6。

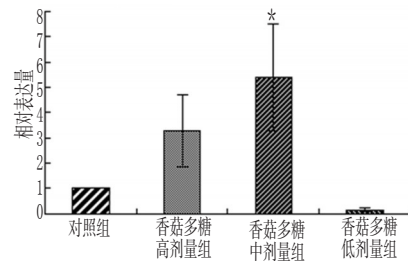


图6 小鼠脾脏T淋巴细胞Clswell mRNA的表达
与对照组比较: * $P < 0.05$

Fig 6 mRNA expression of Clswell in T lymphocytes isolated from mice
vs. control group: * $P < 0.05$

4 讨论

香菇多糖主要用于肿瘤患者,临床试验证明,它对人的恶性肿瘤具有有效的抑制作用^[6]。它主要的作用机制是促进T、B淋巴细胞增殖^[7],提高自然杀死(NK)细胞的活性,调节免疫力,从而维持机体内环境稳定,同时它还能促进T淋巴细胞产生一氧化氮(NO)、白细胞介素(IL)-2来抵抗放疗对机体的损伤^[8]。T淋巴细胞上的CRAC是细胞外Ca²⁺进入细胞内的重要通路^[1]。STIM1和orai1作为CRAC通路中的调控元件作用于内质网上的Ca²⁺库,以致Ca²⁺持续释放到细胞液内,使游离Ca²⁺浓度升高,一定浓度的Ca²⁺与STIM1、orai1共同作用使细胞外的Ca²⁺进入到细胞内,使细胞内的Ca²⁺浓度升高^[9]。Ca²⁺作为第二信使,浓度升高能够激活细胞内的基因表达,活化T淋巴细胞。Ca²⁺浓度升高还能激活离子通道KCa3.1,研究表明,KCa3.1的高表达能够强烈地增强T淋巴细胞的活性并促进其增殖^[10]。早在1988年就有研究表明,钾离子通道的高表达能够迅速地使小鼠胸腺细胞增殖^[11]。KV1.3通道的表达与激活T淋巴细胞的活性以及增殖有着密切的关系^[12]。qRT-PCR结果显示,中剂量香菇多糖使KV1.3、KCa3.1、STIM1、orai1的基因

表达明显增强,因此可以推断香菇多糖可以明显增强小鼠T淋巴细胞的增殖和活性,其机制与影响KV1.3、KCa3.1、STIM1、orail的基因表达有密切关系。

香菇多糖对细胞的体积具有一定的调控作用。T淋巴细胞上的Clswell在T淋巴细胞的体积调节过程中发挥着至关重要的作用,因此又称它为容量调控氯离子通道^[1]。通常Clswell与钾离子通道共同作用使容积变大的T淋巴细胞恢复至正常体积,从而使T淋巴细胞内环境稳定,发挥细胞免疫的功能。TRPM7是一种非选择性的阳离子通道,对Ca²⁺、Mg²⁺、K⁺、Na⁺等众多二价和单价阳离子有通透性,同时又是一种蛋白激酶,可使自身或底物磷酸化^[4]。在T淋巴细胞的增殖活化过程中离不开底物磷酸化,同时,在T淋巴细胞正常功能的维持过程中离不开Ca²⁺、Mg²⁺、K⁺、Na⁺等众多二价和单价阳离子平衡。因此,在T淋巴细胞的增殖活化过程中离不开Clswell通道和TRPM7通道。由此推断香菇多糖对T淋巴细胞的一系列作用与对Clswell通道和TRPM7通道的基因表达关系密切。

Attia SM等^[13]研究表明,香菇多糖对DNA的损伤修护作用具有剂量依赖性。付青姐等^[14]研究香菇多糖保护小鼠脾脏抵御辐射损伤的实验结果表明,香菇多糖在2.5、0.5 mg/kg的剂量下可明显缓解辐射造成的脾脏损伤。许多研究也证实,香菇多糖的免疫调节作用具有一定的剂量依赖性。本研究表明,香菇多糖在不同剂量下基因的表达有一定差异性,所有的基因表达结果显示,中剂量的香菇多糖能够使5种离子通道的基因表达上调,而高剂量和低剂量香菇多糖对5种离子通道的基因表达虽有所影响,但是均不具有统计学意义,说明香菇多糖在适宜剂量下可以上调5种离子通道的基因表达,调节T淋巴细胞活性,从而发挥免疫调节的作用。

综上所述,香菇多糖具有增加T淋巴细胞的增殖和活性、调节免疫的作用,与提高离子通道KV1.3、KCa3.1、TRPM7、Clswell以及Ca²⁺通道调控元件STIM1、orail的基因表达有密切关联。

参考文献

[1] Cahalan MD, Chandy KG. The functional network of ion channels in T lymphocytes[J]. *Immunol Rev*, 2009, 231(1):59.
[2] Kuras Z, Yun YH, Chimote AA, et al. KCa3.1 and TRPM7 Channels at the uropod regulate migration of activated human T cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e43 859.

[3] Baldoli E, Castiglioni S, Maier JA. Regulation and function of TRPM7 in human endothelial cells: TRPM7 as a potential novel regulator of endothelial function[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e59 891.
[4] 田舜莲,江慧,施静. TRPM7:一种具有离子通道和激酶活性的双功能膜蛋白[J]. *生理科学进展*, 2009, 40(3):253.
[5] 刘丽娟,季波. 我院2010年中药注射剂应用情况分析[J]. *中国药房*, 2011, 22(35):3 342.
[6] Wang G, Lin W, Zhao R, et al. Effects of six polysaccharides extracted from plants on the immunological cells of mice[J]. *Wei Sheng Yan Jiu*, 2008, 37(5):577.
[7] 林卡莉,陈同强,黄志华,等. 香菇多糖对荷瘤鼠免疫细胞及生存率的影响[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(12):3 077.
[8] Wang Y, Li MC, Fu QJ. Protective effects of lentinan against T lymphocytes injury in mice under chronic radiation stress[J]. *Chinese Herbal Medicines*, 2013, 5(1):62.
[9] Rao A, Hogan PG. Calcium signaling in cells of the immune and hematopoietic systems[J]. *Immunol Rev*, 2009, 231(1):5.
[10] Beeton C, Wulff H, Barbaria J, et al. Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24):13 942.
[11] Lewis RS, Cahalan MD. The plasticity of ion channels: parallels between the nervous and immune systems[J]. *Trends Neurosci*, 1988, 11(5):214.
[12] Hu L, Pennington M, Jiang Q, et al. Characterization of the functional properties of the Voltage-Gated potassium channel KV1.3 in human CD4⁺ T lymphocytes[J]. *J Immunol*, 2007, 179(7):4 563.
[13] Attia SM, Harisa GI, Abd-Allah AR, et al. The influence of lentinan on the capacity of repair of DNA damage and apoptosis induced by paclitaxel in mouse bone marrow cells[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2013, 27(7):370.
[14] 付青姐,李明春,柳迎华. 辐射对小鼠脾脏损伤及香菇多糖的保护作用[J]. *中国现代应用药学*, 2013, 30(6):606.
(收稿日期:2013-11-04 修回日期:2013-12-03)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅