

灵芝 mg/mL	MMC $\mu\text{g/mL}$	中期分 裂相数	试 验 一					试 验 二				
			M1	M2	M3	P	M1:M3	M1	M2	M3	P	M1:M3
0	0.00	100	29	26	45		0.64	33	32	35		0.94
0	0.05	100	36	32	32		1.13	20	27	53		0.38
1	0.05	100	32	33	35	>0.05	0.91	28	26	46	>0.05	0.61
5	0.05	100	55	28	17	<0.005	3.24	50	34	16	<0.005	3.13
25	0.05	100	62	32	6	<0.005	10.33	74	22	4	<0.005	18.50
25	0.00	100	68	20	12	<0.005	5.67	64	27	9	<0.005	7.11

用 χ^2 检验。灵芝组与空白对照组比较,灵芝+MMC组与MMC对照组比较。

3 讨论

灵芝是一种传统中草药,其药理作用研究较多。我们在作 SCE 实验的同时观察了灵芝对细胞增殖周期的影响,结果表明灵芝有显著的抑制细胞分裂、延缓细胞增殖周期的作用,M1:M3 的比值与灵芝呈剂量反应关系。M2 期细胞变化不明显。两次实验结果一致。灵芝剂量在 1 mg/mL 各期细胞与对照组比,差异不明显,因本实验未设置 1 mg/mL 以下的剂量,更低的剂量是否有促进细胞分化、缩短细胞周期的作用尚未可知,但可以说灵芝剂量小于 1 mg/mL 时,对细胞周期无抑制作用。谢大为等报导,^[7]灵芝具有双向调节作用,灵芝提取物 BN₃C 在 1~4 mg/mL 时,促进活化 T 细胞的增殖,BN₃C > 4 mg/mL 时抑制活化 T 细胞的增殖。灵芝的粗提取物中含有细胞毒性物质能影响胸腺嘧啶的摄取,^[9]提纯的免疫调节蛋白 ling zhi-8 在一定范围内(0.13~3.13 $\mu\text{g/mL}$),有促进外周培养的脾细胞摄取 ³H-TdR 的作用,并有剂量反应关系,剂量再增大时,灵芝的剂量则与 ³H-TdR 的摄取呈负相关。^[9]顾立刚^[6]报导,灵芝在 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 时对小鼠脾淋巴细胞增殖反应和 IL-2 的产生均有促进作用,在 25 $\mu\text{g/mL}$ 时则产生明显的抑制作用。许津等报导^[3]灵芝对体外培养的正常 BALB/c 小鼠脾淋巴细胞 DNA 合成有显著的抑制作用,抑制率与灵芝剂量呈正相关。^[3]灵芝多糖 D₆ 体内能加速骨髓细胞的核酸蛋白质合成、促进其分裂增殖;而体外则无作用。对 S₁₈₀ 细胞、艾氏腹水瘤细胞有抑制作用,对体外培养的骨髓细胞影响不明显。^[4]以上资料表明灵芝的作用非常复杂,不同剂量的灵芝其作用

不同,体内、体外的作用不同。本实验从细胞周期变化情况进一步证实,超过一定剂量后,灵芝有显著抑制细胞分裂、延缓细胞增殖周期的作用,与上述文献报道一致。本实验结果对研究灵芝的抗癌、抗突变作用,及双向调节作用的机理可能有某种启示。

4 参考文献

- 1 Snope AJ, et al. Cell duration sister chromatid exchange frequency in cultured human lymphocytes. *Mutat Res.* 1979,63(2):345
- 2 何来英,等. 灵芝的抗突变作用. *中国食品卫生杂志*, 1994,6(2):1
- 3 许津,等. 灵芝对小鼠免疫细胞的调节作用. *中国医学科学院学报*, 1985,7(4):301
- 4 关洪昌,丛铮. 灵芝多糖 D₆ 对核酸、蛋白质合成的影响及其初步分析. 1981,13(4):261
- 5 夏冬,等. 灵芝多糖对小鼠免疫功能的影响. *北京医学院学报*, 1989,21(6):533
- 6 顾立刚,等. 薄盖灵芝对小鼠体内、外免疫反应的实验研究. *上海免疫学杂志*, 1989,9(3):145
- 7 谢大为,等. 灵芝多糖成分 BN₃C 及苦参碱对小鼠 T 淋巴细胞的作用. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1985,5(1):8
- 8 高斌,扬贵贞. 树舌多糖的免疫调节效应及其抑瘤作用. *中国免疫学杂志*, 1989,5(6):363
- 9 Kohsuke kino, et al. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi - 8, from *Ganoderma Lucidum*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989,264(1):472~478

灵芝对细胞增殖周期的影响

何来英 戴寅 卫生部食品卫生监督检验所 (100021)
蔡有余 鞠丽梅 马耀文 中国医学科学院实验动物研究所 (100021)

摘要 在检测灵芝对丝裂霉素 C (*mitomycin C*, MMC) 诱导的人外周血淋巴细胞姐妹染色单体交换 (sister chromatoid exchange, SCE) 和染色体畸变 (chromosome aberration, CA) 的影响时, 发现灵芝有延缓细胞增殖周期的作用, 使 M1 期细胞的比例显著增高, M3 期的细胞比例显著减少。延缓指数 (M1:M3) 与灵芝呈剂量反应关系。

关键词 灵芝 中期 丝裂霉素 C 姐妹染色单体交换 染色体畸变

灵芝是一种扶正固本, 滋补强壮的中草药, 其生物学作用得到了广泛的研究。我们在研究灵芝的抗突变作用时发现, 在 Ames 实验和小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验中, 灵芝的抗突变作用均呈明显的剂量反应关系, 而在体外培养的人外周血淋巴细胞 SCE 和 CA 实验中, 高剂量灵芝组的 SCE 和 CA 频率比低剂量组高。^[2] 培养中的细胞增殖率是 SCE 频率的一个较重要的决定因素。高剂量的灵芝是否影响细胞增殖周期, 使每个细胞受致突变剂 MMC 作用的时间延长, 摄取的 MMC 剂量增加, 因而使 SCE、CA 频率增加呢? 为此, 我们在作 SCE、CA 实验的同时, 观察了各周期中期分裂相细胞的比例, 研究灵芝对细胞增殖周期的影响。

1 材料和方法

1.1 赤灵芝水提取液 (Aqueous Extract of Ganoderma Lucidum, AEGL) 赤灵芝子实体购自北京通县永乐店农场后营村灵芝厂。将灵芝用清水轻轻涮洗, 去除表面灰尘, 凉干, 切碎。每 400 g 加水 5 L, 煮沸 30 min 后用 300 目尼龙筛网过滤。再重复煮 2 次。将滤液置 60℃ 水浴减压蒸发浓缩至 2.5 g/mL (相当于生药)。置 20℃ 保存备用。

1.2 MMC 第一次实验为 Sigma 产品, 第二次实验为日本产注射用 MMC。用少量二甲基亚砷溶解后, 再用蒸馏水稀释至所需浓度。

1.3 BRdU 瑞士 Fluka 产品, 使用浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.4 培养液 RPMI-1640 完全培养液, 含小牛血清 20% (未灭活), 双抗 1%, pH 7.2。

1.5 人外周血 采自 30 岁的健康男子。

于 4.5 mL RPMI-1640 完全培养液中加入肝素抗凝血 0.5 mL、PHA 0.5 mg。共 12 瓶, 每组两瓶。于 37℃ 恒温孵箱培养 24 h 后, 每瓶加入 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BRdU 100 μL (终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MMC 50 μL (终浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 不同浓度的 AEGL 50 μL (三个剂量组的灵芝终浓度分别为 25、5 和 1 mg/mL)。MMC 对照和空白对照分别加 MMC 和生理盐水 50 μL 。于 37℃ 培养箱培养 44 h, 再每瓶加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的秋水仙素 50 μL (终浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 培养 2 h 后收获细胞。按常规方法制备染色体。室温老化一周后分化染色。每组观察 100 个分散良好的中期分裂相细胞, 记录 M1、M2、M3 期细胞的百分率。掺入了 BUdR 的染色体染色浅, 未掺入 BUdR 的染色体染色深。染色体全部深染的为第一次分裂的中期相细胞 (M1), 部分深染的为第二次分裂的中期相细胞 (M2), 全部浅染的为第三次或分裂三次以上的中期相细胞 (M3)。

2 结果

高剂量 (25 mg/mL) 灵芝组与空白对照组比, M1 期细胞显著增加, M3 期细胞显著减少。加灵芝组与丝裂霉素对照组比, M1 期细胞比例显著增加, M3 期细胞比例显著减少, M1:M3 的比值与灵芝呈剂量反应关系。M2 期细胞变化不明显。结果见表。