

转人小肠三叶因子侧耳中 hITF 的表达 及在大鼠体内生物活性研究

徐晓晶 张 竞 袁 燕 俞梅敏 茹炳根*

(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 将人小肠三叶因子(hITF)用原生质体法导入糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)中, 检测表明, hITF在侧耳新鲜菌丝体中的表达量约为1 000~2 000 ng/g, 最高约达2 250 ng/g. 体内生物学活性研究证实, 口服转hITF侧耳可有效地防止乙醇诱导的大鼠胃溃疡, 其中的两种主要活性成分侧耳多糖和hITF均有预防治疗的功效.

关键词 人小肠三叶因子(hITF), 糙皮侧耳, 表达, 多糖, 生物活性

学科分类号 Q943

溃疡病是一种常见病, 多见于成年人, 发病率为人口的10%左右. 尽管已有多种抗溃疡药应用于临床, 但目前使用的抗溃疡药大多局限于单纯降低攻击因子的攻击性或在消化道粘膜上形成一层物理屏障, 因此具有很大的局限性. 对于溃疡病, 尤其是慢性溃疡病, 病程长且易反复发作, 应采取新的更积极的策略, 开发新型综合治疗和预防药品. 人小肠三叶因子(human intestinal trefoil factor, hITF)是近年来发现的一种胃肠道黏膜修复因子, 由59个氨基酸组成, 分子中含有7个高度保守的半胱氨酸, 形成3个链内二硫键, 以Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6方式连接形成紧凑的三叶结构域, 使hITF能够抵抗蛋白酶或胃酸的分解. 除三叶结构域中6个保守的Cys外, hITF C端的第57个氨基酸也是Cys, 它不参与链内二硫键的形成, 却与另一个hITF的Cys57形成二硫键, 构成hITF双体. hITF的表达具有一定的组织特异性, 主要在小肠和大肠杯状细胞表达并分泌到肠表面, 但有人在小鼠的下丘脑、啮齿类动物淋巴组织和人的唾液腺中也发现了hITF的表达. 作为一种黏膜修复因子, hITF主要通过促进胃肠道表皮细胞的迁移进行损伤修复, 并在完整的胃肠道表面与黏蛋白一起形成一层物理屏障, 阻止损伤因子的攻击, 防止溃疡的发生. 实验表明, 正常情况下在小肠中表达的ITF经皮下注射后对胃部损伤有明显的保护和治疗作用^[1-3], 其抗胃酸分解的特点, 也非常适用于口服治疗. 我国历来有食疗的传统, 受此启发, 我们认为, 将hITF基因在糙皮侧耳(俗称平菇)中表达, 有可能培育出对胃溃疡有防治作用的低成本药品. 本文以侧耳作为受体系统进行

hITF基因的转化研究, 获得了转基因再生菌株, 并研究高表达hITF转基因侧耳对乙醇诱导型大鼠胃溃疡的生物活性.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 含有hITF cDNA的质粒pCWTF由本实验室构建, *Escherichia coli* DH5 α 为本实验室保存, 测序载体pMDT购自Takara公司. 含两个串联的CaMV35S启动子和除草剂抗性基因(bar)的表达载体pGPTVd35S由本实验室构建^[4]. “中蔬10号”糙皮侧耳*Pleurotus ostreatus*, 购于中国农业科学院.

1.1.2 主要试剂: 各种限制性内切酶、T4DNA连接酶、Taq DNA聚合酶等购自Promega公司, Hybond-N膜购自Amersham公司; hITF产品为本实验室用酵母发酵方法生产纯化, 纯度达到95%以上作为实验的参照品; hITF多抗为本实验室自制, 二抗为中山公司的辣根过氧化物羊抗兔IgG免疫球蛋白, 溶壁酶购自广东微生物研究所, 蛋白胨、酵母抽提物为Difco公司产品.

1.1.3 培养基: 菌丝体培养基为PDY液体培养基, 含20%马铃薯, 2%葡萄糖, 0.2%蛋白胨, 0.2%酵母抽提物, 0.15% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 10 mg/L维生素B₁, 2%琼脂. 再生培养基为CYM完全培养基, 含1%麦芽糖, 2%葡萄糖, 0.2%蛋白胨, 0.2%酵母抽提物, 0.46%

* 通讯联系人.

Tel: 010-62751842, E-mail: rulab@pku.edu.cn

收稿日期: 2004-03-11, 接受日期: 2004-04-07

KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. MM 培养基, 含 0.2% 天冬酰胺, 0.03% L-谷氨酰胺, 2% 葡萄糖, 0.1% K_2HPO_4 , 0.46% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L 维生素 B_1 , 0.02% 酪氨酸.

1.2 方法

1.2.1 表达载体 pGPTVd35S-ITF 的构建: 设计一对引物, 5' 端引物 (引物 1) 为 GCTCTAGA-AACAATGGAGGAGTACGTGGGCCTG, 3' 端引物 (引物 2) 为 CGAGCTCCTATCAGAAGGTGCATTCTGC, 通过 PCR 在 5' 端引入一个 *Xba* I 酶切位点, 在 3' 端引入一个 *Sac* I 酶切位点, 以质粒 pCWTF 为模板, 扩增 hITF cDNA 片段. *Xba* I / *Sac* I 双酶切后, 插入质粒 pMDT 中, 测序证明序列正确. 将带有 hITF cDNA 片段的质粒 pMDThITF 和表达载体 pGPTVd35S 分别用 *Xba* I / *Sac* I 双酶切, 回收 ITF 片段和载体, 进行体外连接. 转化 DH5 α 感受态, 在 Kan^r 抗性板上筛选重组体. 然后酶切鉴定.

1.2.2 原生质体的制备及再生培养: 野生侧耳菌丝以 PDY 液体培养基 25℃ 培养 5~7 天, 纱布过滤, 无菌操作收集菌丝, 先后用无菌水、0.6 mol/L 甘露醇洗涤以维持渗透压, 吸水纸吸干水分后, 将菌丝称重, 按菌丝体 (g): 酶量 (ml) 加入 1.5% 溶壁酶 (lywallzyme 以 0.6 mol/L 甘露醇和 pH 5.6 0.1 mol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液配制, 过滤除菌后备用), 34℃ 水浴中酶解 2~4 h, 镜检观察有大量原生质体释放时, 加入等量 0.6 mol/L 甘露醇稀释终止反应, 过滤去菌丝残片, 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 再用 0.6 mol/L 甘露醇洗涤 2 次, 即得纯化的原生质体. 取原生质体悬液 10 μl 、50 μl 、100 μl 分别以双层法培养于 CYM 再生培养基上, 25℃ 培养至有绒毛星状菌落出现^[5].

1.2.3 转基因菌株的 PCR 检测: 用 SDS 法^[6] 提取转化菌株和野生菌株液体培养菌丝体总 DNA 用作模板. 以引物 1 和引物 2 进行 PCR 扩增. 94℃ 变性 7 min 后进入循环, 94℃ 变性 1 min, 60℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 30 个循环后, 72℃ 延伸 10 min. 预期的 PCR 产物长度为 200 bp 左右.

1.2.4 酶联免疫吸附检测 (ELISA): 取培养 7~10 天新鲜的转基因侧耳菌丝体, 加液氮研成粉末, 10 000 r/min 离心 10 min (4℃) 后, 取上清液直接用于检测, 设野生侧耳为阴性对照. 以本实验室制备的重组 hITF^[7] (紫外扫描及 HPLC 鉴定纯度 >95%) 为抗原免疫家兔, 得到兔抗人 ITF IgG.

此抗血清经过蛋白质 A 琼脂糖 (1.4 cm × 2.8 cm) 进一步纯化, 得到兔抗 hITF 多克隆抗体 (一抗). 分析步骤参照文献 [8].

1.2.5 蛋白质印迹: 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离菌丝体总蛋白后, 按照文献 [9] 提供的程序进行蛋白质印迹分析.

1.2.6 侧耳中多糖含量测定: 以葡萄糖作为参照, 采用改良的苯酚-硫酸法^[10] 测定多糖含量.

1.2.7 侧耳多糖的提取: 参照文献 [11] 方法略有改动, 新鲜侧耳子实体热水抽提 20 h, 10 000 r/min 离心 3 min, 上清液抽滤后, 减压浓缩. 按照 Sevag 法^[12] 去除蛋白, 加 50% 乙醇, 于 -20℃ 沉淀 2 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 沉淀干燥后备用.

1.2.8 生物活性研究:

a. 乙醇诱导的大鼠胃溃疡模型的建立: SD 大鼠, 体重 180~200 g, 禁食 24 h, 自由饮水, 置于有网眼的铁丝笼, 以防止自食粪便. 每个指标测定用 6~8 只大鼠, 根据给药的种类不同分 5 大组: 转基因侧耳组、野生侧耳对照组、多糖组、hITF 对照组及多糖和 hITF 共同作用组. 各组大鼠先灌胃不同剂量的相应药物, 1 h 后灌胃 1 ml 无水乙醇, 1 h 后断颈处死. 设正常对照组 (均灌胃 1 ml 的生理盐水) 和完全诱导溃疡组 (先 1 ml 的生理盐水, 然后灌胃 1 ml 无水乙醇).

b. 溃疡级别及损伤指数的确定: 将大鼠胃沿胃大弯剪开, 生理盐水轻轻漂洗, 由两人双盲法记数评定损伤指数. 损伤为局限于胃粘膜的条索状、点状出血、坏死灶, 将全胃各病灶长度之和作为损伤指数, 以 mm 表示. 以对照完全诱导溃疡组的胃损伤指数作为 100%, 计算实验组对溃疡抑制率.

c. 胃酸分析: 收集大鼠胃液, 用精密 pH 试纸测量其 pH 值, 并用标准 NaOH 液滴定, 酚红为指示剂, 测定游离酸量.

d. 组织病理学检测: 将实验组和对照组大鼠胃于中性甲醛中固定, 石蜡包埋, 切片, 苏木精-伊红染色, 镜检, 照相.

2 结 果

2.1 表达载体 pGPTVd35S-ITF 的构建

如图 1 所示, 表达载体 pGPTVd35S-ITF 携带两个串联的 CaMV35S 启动子、增强目的基因 mRNA 转译效率的 AMV 5' 端非转译序列、外源基因 (hITF cDNA)、Nos 终止子以及用于筛选的标

记基因 *bar* (除草剂抗性基因)。

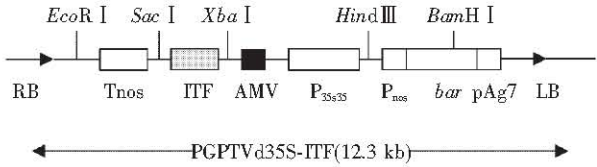


Fig. 1 Structure of the T-DNA of the expression vector pGPTVd35S-ITF

2.2 转基因侧耳的获得及分子检测

通过电击法将目的基因转化入侧耳原生质体中。经过再生培养基培养，再用含 0.1 mg/L 除草剂培养基初步筛选及含 0.2 mg/L 除草剂培养基复筛，共获得 120 株抗性菌株。取新鲜的抗性菌株液体培养菌丝体提取总 DNA，做 PCR 检测，有 29 株在 200 bp 处扩增出目的条带。说明目的基因已整合到侧耳的染色体组中，外源目的基因的整合率约为 24.2% (图 2)。

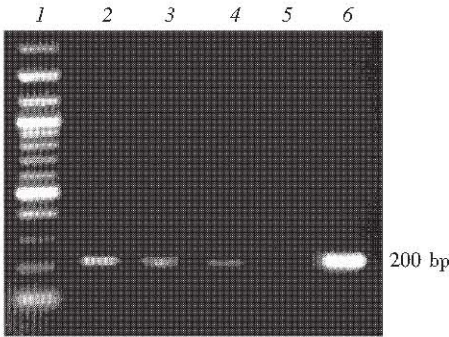


Fig. 2 Identification of transgenic *P. ostreatus* by ITF gene with PCR assay

1: 100 bp DNA marker, 2~4: Positive transgenic *P. ostreatus*;
5: Negative control; 6: Positive control.

2.3 转基因侧耳中 hITF 的表达检测

2.3.1 直接型 ELISA 测 hITF 多抗的效价: 兔抗人 ITF 多抗 (一抗) 为 hITF 蛋白免疫家兔，经纯化后得到的多抗，经检验自制多抗与人 ITF、酵母重组 ITF 及本实验中侧耳表达的重组 ITF 均有良好的免疫反应，与其他蛋白质的非特异性结合很低。以直接型 ELISA 法测 hITF 一抗的效价，每个样品做 3 个平行重复，取平均值 ($P < 0.05$) 经计算 hITF 一抗效价较高，为 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 。

2.3.2 竞争型 ELISA 测定转 hITF 基因侧耳中 hITF 的表达情况: 由于竞争型 ELISA 通过设立阴性野

生侧耳对照，可以较好地扣除非特异性免疫反应造成的本底误差，本实验采用竞争型 ELISA 进行转基因菌株中 hITF 蛋白表达菌株的筛选和含量测定。

待测的 29 株 PCR 检测阳性转基因侧耳菌株及野生侧耳菌株对照，其上清提取液和一定浓度梯度的 hITF ($40 \sim 2\,500 \mu\text{g/L}$ ，用于标定标准曲线) 同时进行上述步骤的检测。选取一抗稀释度为 1:5 000，二抗稀释度为 1:5 000。设立包被液及野生菌丝体上清提取液为阴性对照，每份参照品和样品做 4 个平行样，重复 3 次。未知样品中 hITF 的含量由经过线性回归方程计算得到。结果表明: 29 株 PCR 检测阳性的转基因侧耳菌株中有 17 株 hITF 表达阳性，约占转基因菌株的 58.6%。

其中 hITF 有显著表达的转基因侧耳表达量分为 3 段: 表达量为 $(1\,041 \pm 20.05) \text{ ng/g}$ 的有 4 株; 表达量为 $(1\,486 \pm 253.73) \text{ ng/g}$ 的有 3 株; 表达量高达 $(2\,176 \pm 125.42) \text{ ng/g}$ 的有 6 株。

紫外吸收法测定侧耳中总可溶性蛋白含量，计算表达率为: $(1.1 \pm 0.4)\%$ 。

2.4 SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析

提取 hITF 表达量最高 $2\,250 \text{ ng/g}$ 菌株的总蛋白进行 SDS-PAGE 分析，与野生侧耳相比，在 hITF 单体 (6.5 ku) 和二聚体 (13.1 ku) 位置有可见的阳性表达条带 (图 3)。由此可知，外源蛋白在转基因侧耳中的表达比一般转基因植物中高，

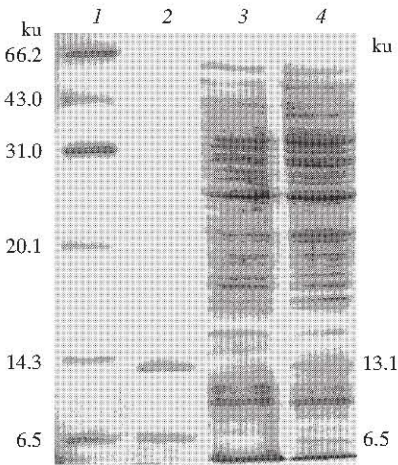


Fig. 3 Identification of transgenic *P. ostreatus* by ITF expression with SDS-PAGE assay

1: Low molecular mass marker; 2: Standard hITF protein; 3: Negative control, expression supernatant of wild *P. ostreatus*; 4: Positive transformant, expression supernatant of transgenic *P. ostreatus*.

以普通的 SDS-PAGE 分析方法也能大致判断外源蛋白表达情况. 蛋白质印迹分析进一步证明 hITF 基因在侧耳中的表达 (图 4).

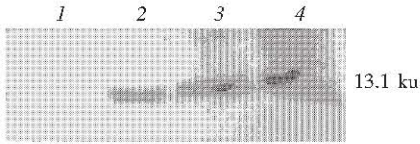


Fig. 4 Identification ITF expression in transgenic *P. ostreatus* with Western blot assay
1: Negative control, expression supernatant of wild *P. ostreatus*; 2, 3: Positive transformant, expression supernatant of transgenic *P. ostreatus*; 4: Standard hITF protein.

2.5 转基因侧耳在大鼠体内的生物活性

本实验采用乙醇诱导大鼠体内胃溃疡的模型. 提取 hITF 表达量最高 (约 2 250 ng/g) 的转基因侧耳菌株的上清液, 给大鼠灌胃, 观察其生物活性即其对大鼠体内乙醇诱导胃溃疡的作用, 并设立正常对照组和乙醇完全诱导对照组.

在正常对照组中解剖观察大鼠胃粘膜正常, 镜检观察 (图 5-*d*) 表面上皮细胞紧密排列, 胃腺细胞排列整齐, 无溃疡出血灶.

而采用乙醇完全诱导所产生的溃疡是较为严重的, 胃粘膜出现水肿、条索状、点状出血, 损伤甚至穿透粘膜肌层造成出血, 镜检观察发现大量胃壁细胞缺失, 有大片的上皮细胞溃烂、脱落, 细胞界限不清, 胃腺细胞不易辨认, 毛细血管大量不规则出血, 胃小凹消失, 局部细胞固缩形成坏死 (图 5-*a*), 粘膜下层有蛛网状水肿, 及喷射状出血.

实验组在乙醇诱导前, 按 1 g/kg, 2 g/kg, 5 g/kg, 10 g/kg (并设立相同剂量野生侧耳对照组) 的转基因侧耳菌株上清液的剂量, 给大鼠灌胃, 经乙醇诱导后, 解剖取胃, 评定损伤指数和计算溃疡抑制率, 结果表明, 转基因侧耳对乙醇诱导大鼠体内胃溃疡具有剂量依赖性的防治效果, 随着转基因侧耳的给药量的升高, 解剖学观察胃粘膜出血点及点状溃疡灶减少, 计算得到抑制率逐渐升高 (表 1), 病理学切片观察有局部胃腺细胞再生

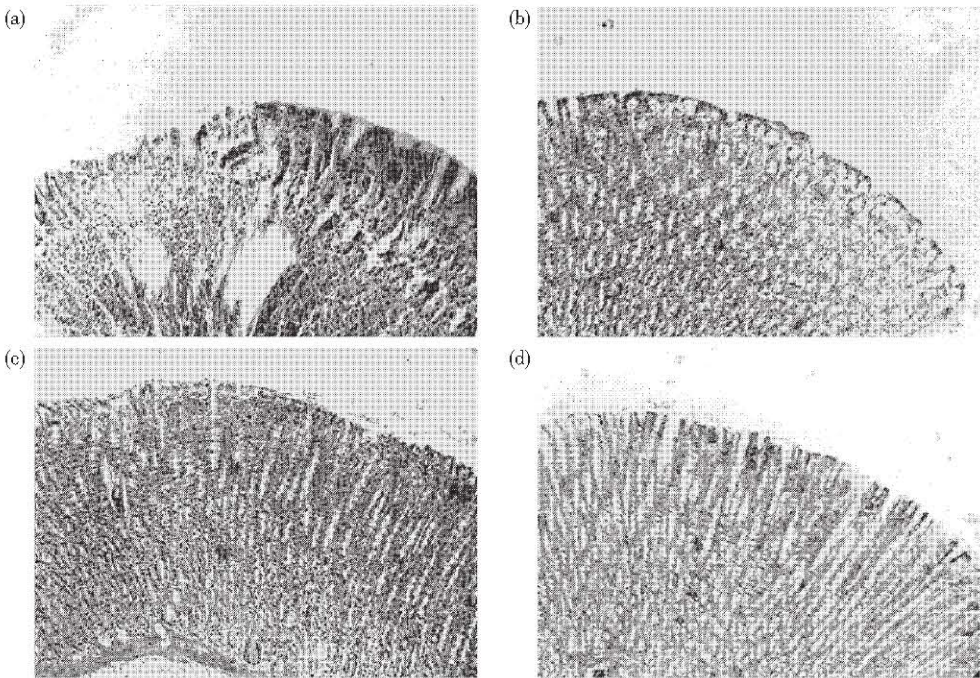


Fig. 5 Gastroprotection by administration microscopic pathology
(a) Representative rat gastric corpus treated with saline and followed by ethanol (original magnification $\times 100$); High power showing the rat stomach treated with saline without protection; (b) Representative rat stomach treated with supernatant of 1 g/kg transgenic hITF *P. ostreatus* 1 h before ethanol administration (original magnification $\times 100$); (c) Rat stomach treated with supernatant of 10 g/kg transgenic hITF *P. ostreatus* before ethanol administration (original magnification $\times 100$); (d) Representative rat gastric corpus only treated with saline without followed ethanol (original magnification $\times 100$).

等现象 (图 5). 由表 1 可知在乙醇灌胃前, 口服 1 g/kg 转基因侧耳的上清液就能够对胃粘膜起到基本的保护作用 (图 5-*b*), 溃疡抑制率为 42.6%, 口服 10 g/kg 转 hITF 侧耳的上清液就能够对胃粘膜起到较好的保护, 溃疡抑制率达到 66.9% (图 5-*c*).

Table 1 Effect of different dosages of supernatant of transgenic hITF *P. ostreatus* on ethanol induced gastric lesion in rats

Treatment	Dose/g • kg ⁻¹	Content of hITF/mg	n	pH	Total length of lesion/mm	Inhibition/%
Negative Control	—	—	8	3.0	44.4	0
Precaution	1	0.0023	8	2.5	25.5	42.6
	2	0.0045	6	3.0	21.7	51.1
	5	0.0112	8	2.5	16.8	62.2
	10	0.0225	8	3.0	14.7	66.9

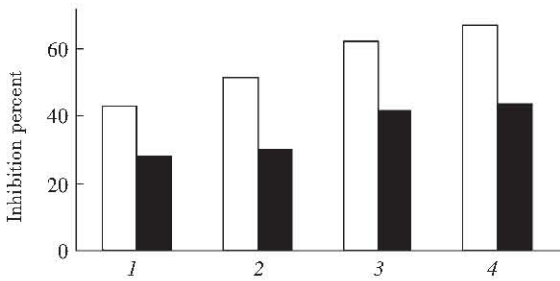


Fig. 6 Comparison of inhibition of different dosage of supernatant of wild *P. ostreatus* and transgenic *P. ostreatus* on ethanol induced gastric lesion in rats

□: Dosages of supernatant of transgenic *P. ostreatus*; ■: Dosage of supernatant of wild *P. ostreatus*. 1: 1 g/kg; 2: 2 g/kg; 3: 5 g/kg; 4: 10 g/kg.

3 讨 论

3.1 hITF 对大鼠体内乙醇诱导胃溃疡的抑制作用

为了深入研究转基因侧耳的生物活性及对乙醇诱导大鼠胃溃疡的可能作用机制, 本实验设立纯品 hITF 对照实验: 按 hITF 0.01 mg/kg、0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.5 mg/kg 的剂量, 研究 hITF 对大鼠体内乙醇诱导胃溃疡的作用和生物活性, 结果见图 7. hITF 剂量为 0.01 ~ 0.05 mg/kg 时, 溃疡抑制率为 20.7% ~ 36.6%, hITF 剂量为 0.5 mg/kg 时, 才具有显著的生物活性, 溃疡抑制率为 60.1%.

野生侧耳对大鼠体内乙醇诱导胃溃疡的抑制率比转基因侧耳约低 15% ~ 23%, 具有一定的本底的抑制溃疡作用 (图 6). 同时检验各组胃酸多为 2.0 ~ 3.0, 说明转基因侧耳和野生侧耳的生物活性均不依靠抑制胃酸分泌起作用.

3.2 侧耳多糖对乙醇诱导大鼠胃溃疡的防治作用

在野生侧耳对照组 (图 6) 的研究中发现, 野生侧耳本身具有对乙醇诱导大鼠胃溃疡本底防治作用, 结合 3.1 的结果, 推测转 hITF 侧耳中含有其他具有较强生理功能的物质, 也对乙醇诱导大鼠胃溃疡有作用. 有报道^[13]称大型食用真菌的多糖具有独特且强的生物活性, 某些也能够预防和治疗溃疡病, 于是我们提取侧耳主要的活性成分——多糖 (约占新鲜菌体总重量的 0.2%) 进行研究, 按 1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 的剂量在乙醇诱导之前灌胃大鼠. 结果表明: 侧耳多糖确具有剂量依赖性防治乙醇诱导大鼠胃溃疡的作用 (图 8).

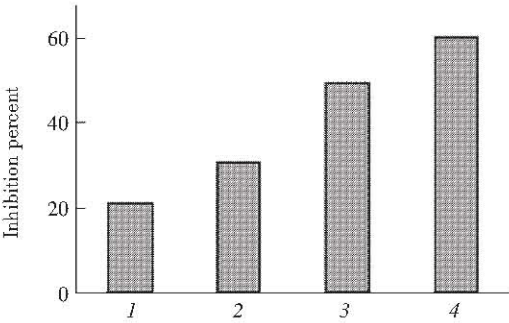


Fig. 7 Inhibition of different dosages of hITF on ethanol induced gastric lesion in rats

1 ~ 4: Dosage of hITF 0.01 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.5mg/kg.

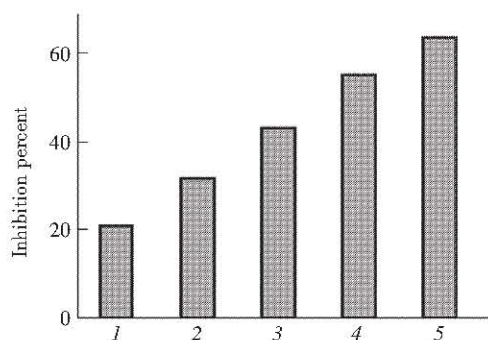


Fig. 8 Inhibition of different dosages of *P. ostreatus* polysaccharides on ethanol induced gastric lesion in rats
1~5: Dosage of *P. ostreatus* polysaccharides 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg.

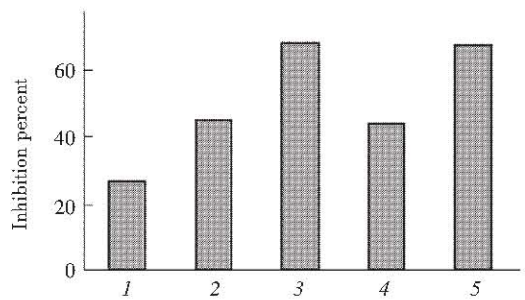


Fig. 9 Comparison of inhibition on ethanol induced gastric lesion in rats when treated under different samples
1: 0.02 mg/kg hITF; 2: 20 mg/kg *P. ostreatus* polysaccharides 3: 0.02 mg/kg hITF and 20 mg/kg *P. ostreatus* polysaccharides; 4: 10 g/kg wild *P. ostreatus* supernatant; 5: 10 g/kg transgenic *P. ostreatus* supernatant.

3.3 hITF 与侧耳多糖对乙醇诱导大鼠胃溃疡的共同作用

由表 1 可知，口服 10 g/kg 转 hITF 侧耳（约含 hITF 0.02 mg 和侧耳多糖 20 mg/kg）上清液对乙醇诱导的大鼠胃溃疡的预防效果达 66.9%。按转基因侧耳中多糖与 hITF 含量验证它们共同作用的生物活性。结果表明（图 9）：单纯使用 hITF 0.02 mg/kg 剂量的溃疡抑制率为 29.3%，活性为有相同 hITF 含量的转基因侧耳的 43.8%；单纯使用 20 mg/kg 侧耳多糖，其溃疡抑制率为 44.9%，与 10 g/kg 野生侧耳的抑制率 43.6% 大致相当，进一步证明侧耳多糖为侧耳中起主要生理活性的物质。20 mg/kg 侧耳多糖与 0.02 mg/kg hITF 联合用药时，其抑制率为 67.5%，与 10 g/kg 转 hITF 侧耳大致相当，但比两者抑制率数值的加和 74.2% 要低，说明生理活性功能的体现是一个比较复杂的过程，不表现为二者的简单加和。

3.4 hITF 对乙醇诱导大鼠胃溃疡作用的病理观察

选取 hITF 较强的生物活性剂量 0.5 mg/kg，进行生理活性实验，解剖学和组织切片观察发现：溃疡灶大部分被抑制，索状出血显著减少或表现为少量散在出血点，胃腺细胞排列较为整齐（图 10a），从粘膜层中部发生深色排列紧密的新生柱状上皮细胞，有迁移并替代原破损水肿的粘膜表层细胞趋势，再次证实前言所述，hITF 可能通过促进正常的粘膜表皮细胞向受损伤的细胞层移动，达到修复溃疡粘膜的目的。

3.5 侧耳多糖对乙醇诱导大鼠胃溃疡可能作用机制

选取侧耳多糖的较强生物活性剂量 50 mg/kg，进行生理活性实验，解剖学也发现溃疡灶大部分被抑制，组织切片观察（图 10b），靠近粘膜表层颜色很深的部分为出血灶被周围细胞吸收呈现褐

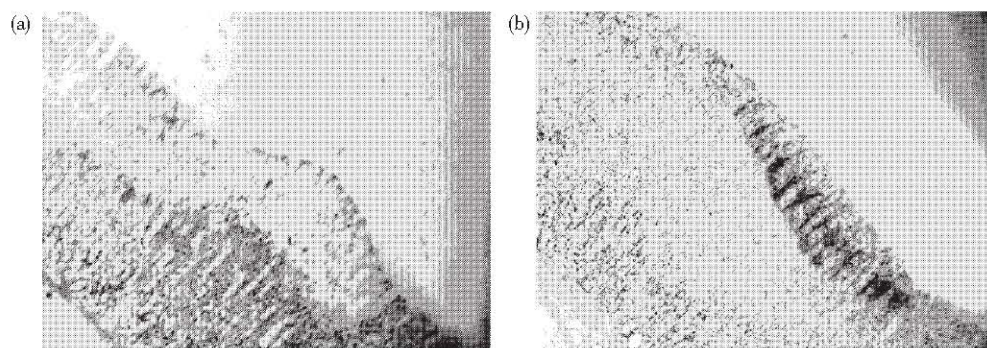


Fig. 10 Gastroprotection by administration microscopic pathology
(a) Representative rat stomach treated only with 0.5 mg/kg hITF 1 h before ethanol administration (original magnification $\times 100$); (b) Rat stomach treated with 50 mg/kg *P. ostreatus* polysaccharides before ethanol administration (original magnification $\times 100$).

色的铁色素沉着, 粘膜层主体部分则有大量着色浅的排列疏松的新生盐酸细胞出现. 镜检野生侧耳组、转基因侧耳组的组织切片与完全乙醇诱导溃疡组比较发现: 有些急性出血后的出血灶, 不再表现为大规模和无规则状态, 而被限制在局部 (图 10b) 或是被周围细胞吸收呈现褐色的铁色素沉着, 盐酸细胞普遍出现再生. 单纯的 hITF 作用组无此情况出现. 因此这种防治效果说明, 侧耳多糖可能一方面是通过其多聚半乳糖组分 A_6 ^[11] 形成一层物理屏障, 阻碍乙醇的直接损伤, 另一方面可能是通过具有强生物活性 (抗肿瘤活性) 的多聚葡萄糖 A_3 、 A_5 组分促进胃盐酸细胞的再生, 以修复溃疡面. 其细胞水平的机理值得深入研究.

综上所述, 本实验以原生质体法将含 hITF cDNA 的双 35 S 为启动子表达载体导入糙皮侧耳中, 获得了转化菌株, 外源目的蛋白表达最高可达 2 250 ng/g, 约占总可溶性蛋白的 $(1.1 \pm 0.4)\%$. 以乙醇作为溃疡诱导剂研究转 hITF 基因侧耳对胃溃疡的治疗和预防作用, 结果显示, 口服 10 g/kg 转 hITF 侧耳的上清液对乙醇诱导大鼠胃溃疡的抑制率达到 66.9%, 转基因侧耳中所含的两种有效成分 hITF 和侧耳多糖均对胃溃疡具有生理活性, 而它们起作用的机制不尽相同, 两者相互结合能够对胃粘膜起到很好的保护作用.

目前市场上治疗胃溃疡药物一般存在治疗时间长、溃疡愈合迟缓、复发率高、副作用多等问题, 因此转 hITF 侧耳可能开发为新型、低成本的具有口服治疗特点的新型胃溃疡药物.

致谢 感谢本实验室方敏同学所提供的 hITF 参照品及在实验过程中的大力协助.

参 考 文 献

- 1 Mashimo H, Wu D C, Pdolsky D K, *et al.* Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science*, 1996, **274** (5285): 262 ~ 265
- 2 Babyatsky M W, Debeaumont M, Thim L, *et al.* Oral trefoil

- peptides protect against ethanol and indomethacin induced gastric injury in rats. *Gastroenterology*, 1996, **110** (2): 489 ~ 497
- 3 Chinery R, Playford R J. Combined intestinal trefoil factor and epidermal growth factor is prophylactic against indomethacin induced gastric damage in the rat. *Clin Sci (Colch)*, 1995, **88** (4): 401 ~ 403
- 4 张晓钰, 李 伟, 张 竟, 等. 金属硫蛋白突变体的植物高效表达载体及其在烟草中的表达. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, **15** (6): 888 ~ 892
- 5 Zhang X Y, Li W, Zhang J, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 1999, **15** (6): 888 ~ 892
- 5 Zhang J, Nie S W, Shan L, *et al.* Transformation of metallothionein gene into mushroom protoplasts by application of electroporation. *Acta Botan Sin*, 2002, **44** (12): 1445 ~ 1449
- 6 施苏华, 章 群, 陈月琴, 等. 一种简易的植物核酸提取方法. *中山大学学报, 自然科学版*, 1996, **35** (2): 103 ~ 105
- 6 Shi S H, Zhang Q, Chen Y Q, *et al.* *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*, 1996, **35** (2): 103 ~ 105
- 7 王艳茹, 任宏伟, 安 琳, 等. 人三叶因子 3 在毕氏酵母中的表达及生物活性分析. *生物化学与生物物理学报*, 2001, **33** (6): 653 ~ 658
- 7 Wang Y R, Ren H W, An Lin, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 2001, **33** (6): 653 ~ 658
- 8 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. *生化实验方法和技术*. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997. 364 ~ 370
- 8 Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. *Method and Technique of Biochemistry Experiments*. 2nd. Beijing: Advanced Education Press, 1997. 364 ~ 370
- 9 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. *分子克隆: 实验指南*. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 16 ~ 342
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Transtaled by Jin D Y, et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. Beijing: Sciences Press, 1992. 16 ~ 342
- 10 董 群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究. *中国药理学杂志*, 1996, **31** (9): 550 ~ 553
- 10 Dong Q, Zheng L Y, Fang J N. *Chin Pharmaceutical J*, 1996, **31** (9): 550 ~ 553
- 11 Yoshika Y, Tetsuro I. Studies on antitumour activity of some fractions from basidiomycetes I. An antitumour acidic polysaccharide fraction of *P. ostreatus* (Fr.) Quel. *Cham Pharm Bull*, 1972, **20** (6): 1175 ~ 1180
- 12 齐慧玲, 魏绍云, 王继伦, 等. Sevag 法去除白及多糖中蛋白的研究. *天津化工*, 2000, (3): 20 ~ 21
- 12 Qi H L, Wei S Y, Wang J L, *et al.* *Tianjin Chemical Industry*, 2000, (3): 20 ~ 21
- 13 刘晓峰, 李 玉, 孙晓波, 等. 侧耳属真菌化学成分及药用活性研究进展. *吉林农业大学学报*, 1998, **20** (3): 92 ~ 98
- 13 Liu X F, Li Y, Sun X B, *et al.* *J Jilin Agr Univ*, 1998, **20** (3): 92 ~ 98

Expression of Human Intestinal Trefoil Factor (hITF) in *Pleurotus ostreatus* and Its Biological Activity Analysis *In vivo*

XU Xiao-Jing, ZHANG Jing, YUAN Yan, YU Mei-Min, RU Bing-Gen*

(The National Laboratory for Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Human intestinal trefoil factor (hITF) cDNA has been transferred into protoplasts of *Pleurotus ostreatus* by electroporation. Integration of the hITF cDNA into the genome *Pleurotus ostreatus* was confirmed by PCR analysis. Then competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for detection and quantitative analysis of human intestinal trefoil factor. Results show that the highest hITF protein content in mycelia is 2 000 ~ 2 250 ng/g, about 1.5% of the total soluble protein. The transgenic *Pleurotus ostreatus* is proved to have good biological activity of preventing rats from the gastric ulcer induced by ethanol, in which both of polysaccharides and hITF have a direct effect on ulcer tissue.

Key words human intestinal trefoil factor (hITF), *Pleurotus ostreatus*, expression, polysaccharides, biological activity

* Corresponding author. Tel: 86-10-62751842, E-mail: rulab@pku.edu.cn

Received: March 11, 2004

Accepted: April 7, 2004

《转基因生物安全》

曾北危主编

化学工业出版社 2004 年 5 月出版, ISBN7-5025-5434-3, 32 开, 325 页, 定价 28 元

转基因生物安全是当代科学技术的前沿课题, 也是国际贸易中的敏感问题。本书根据“以人为本”和可持续科学发展观, 概述了当代生物技术的兴起及其应用领域; 严肃地提出了生物技术所修饰的改性活生物体是祸福相倚的“双刃剑”; 介绍了卡塔赫纳《生物安全议定书》的宗旨、原则和相关内容以及各国对生物安全的基本态度; 从战略高度论述了转基因生物环境影响评价的重要性; 并从健康与生态两方面讨论了转基因生物的安全和不确定性风险; 列举了转基因生物的重要风险事件或案例; 明确提出保护物种种质遗传资源的主权以及高度警惕“生命圈地运动”; 最后讨论了转基因生物安全政治经济学方面的有关问题。

《植物细胞培养工程》

元英进主编

化学工业出版社 2004 年 5 月出版, ISBN7-5025-5389-4, 16 开, 310 页, 定价 38 元

本书主要阐述了植物细胞培养基本技术、有工业价值的植物细胞的筛选、植物细胞培养过程中的生物学特征与技术需求、诱导子的作用、植物细胞反应器的操作与设计、植物细胞固定化与固定化细胞反应器、植物细胞培养的规模放大以及植物细胞培养的应用领域等内容。本书以现代细胞培养技术和工程原理为基础, 紧紧围绕植物细胞培养过程中的关键工程技术和生物学需要, 论述了现代植物细胞培养工程的发展方向和前沿技术领域。对读者熟悉并系统掌握现代植物细胞培养工程的基本原理、理论和技术方法, 并运用这些知识进行工程的创新和开发研究将起到积极的指导作用。

以上图书在全国各大新华书店均有销售。

化学工业出版社: 北京市朝阳区惠新里 3 号 邮购电话: (010) 64918013, 64982530

欲了解更多图书信息请登录网站 www.cip.com.cn