

云芝多糖在 NO 诱导的巨噬细胞凋亡中的分子基础^{*}

王瑾雯¹, 陈 媛², 王 霖章¹

(1. 中山大学生物防治国家重点实验室/生物医药中心, 广东 广州 510275;

2. 第一军医大学生化教研室, 广东 广州 510515)

摘 要: 在应用云芝多糖的基础上, 用 NO 诱导巨噬细胞凋亡, 发现云芝多糖可加强 NO 诱导的细胞凋亡; 通过 RT-PCR 观察诱生性一氧化氮合酶基因的表达情况, 结果表明云芝多糖能诱导一氧化氮合酶基因表达, 并可增强 γ 干扰素和脂多糖的诱导作用, 提示云芝多糖在动脉粥样硬化中的防治作用是通过诱导诱生性一氧化氮合酶表达而实现的.

关键词: 云芝多糖; 细胞凋亡; 诱生性一氧化氮合酶; 动脉粥样硬化

中图分类号: Q291; R363.2⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 02-0068-04

云芝多糖 (polysaccharide krestin, PSK) 是从漆柄云芝 *Polystictus versicolor* (*Coriolus versicolor*) 中提取的一种蛋白多糖, 被认为是一种免疫增强剂. 中山大学生物防治国家重点实验室近年来对 PSK 在动脉粥样硬化中的作用进行了一系列的研究, 发现它有刺激巨噬细胞产生 NO, 抑制低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 氧化修饰, 抗动脉粥样硬化的作用. 巨噬细胞是研究动脉粥样硬化发病机制通常采用的细胞, 为了探明 PSK 的作用机制, 我们用 NO 诱导巨噬细胞凋亡, 观察应用 PSK 后细胞凋亡的情况, 并通过 RT-PCR 研究其作用的分子机制.

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雄性昆明鼠 (清洁级, 4~5 周龄, 18~20 g), 购自第一军医大学实验动物中心.

1.1.2 实验试剂 IFN- γ 、LPS、L-Arg、GSNO、RNase、dNTPs、10 $\times$ PCR buffer、Taq DNA 聚合酶等均购自美国 Sigma 公司. 羊抗 P53 抗体, 为美国 Santa Cruz Biotechnology 公司产品. 鼠抗 Bcl-2 抗体、FITC 标记兔抗羊抗体、FITC 标记羊抗鼠抗体, 购自北京中山生物技术有限公司. PSK 由中山大学生物防治国家重点实验室从云芝子实体提取 (传统方法), 用生理盐水配成 150 g/L 的溶

液 (LPS 质量浓度在 50 μ g/mL 以下). 所用其它试剂均为国产分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 动物处理与细胞培养 小鼠随机分为 PSK 处理组和对照组. PSK 处理组腹腔注射 PSK 0.2 mL/日 (共 3 mg PSK), 连续 3 d, 对照组注射等量生理盐水. 停止注射 2 d 后, 将小鼠拉颈处死, 用 $\varphi=70\%$ 酒精消毒, 用 PBS 腹腔灌洗收集腹腔巨噬细胞, 1 000 r/min 离心 6 min, 将细胞沉淀用含 $w=10\%$ 小牛血清的 1640 制成悬液, 调整细胞浓度, 接种于培养瓶、6 孔、24 孔、96 孔或 Petri 细胞培养板. 置 37 $^{\circ}$ C、 $\varphi=5\%$ CO₂ 的孵箱中培养, 2 h 后洗去未贴壁细胞, 根据需要加入含不同成分的培养基继续培养. Raw264.7 巨噬细胞系细胞的培养同前.

1.2.2 细胞凋亡诱导 NO 诱导细胞凋亡^[1,2], 培养的巨噬细胞中加入 500 μ mol/L GSNO (外源性 NO) 或加入 100 u/mL IFN- γ 、2 μ g/mL LPS 和 1 mmol/L L-Arg (内源性 NO).

1.2.3 透射电镜观察 处理后的巨噬细胞按每个样品 1×10^6 个细胞用细胞刮从培养板上刮下, 用琼脂预包埋法^[3]制样, 按常规方法进行固定、切片, 透射电镜观察.

1.2.4 凋亡相关蛋白表达检测 待测细胞培养在 96 孔细胞培养板上, 用 $\rho=4\%$ 多聚甲醛-NaH₂PO₄/NaOH 固定液固定后, 按常规免疫荧光

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39570867)

收稿日期: 2000-05-26; 作者简介: 王瑾雯 (1969—), 女, 博士后, 讲师, 通讯联系人: 王霖章.

方法, 用特异性抗体标记, 荧光二抗显示后, 用 ACAS570 激光扫描共聚焦显微镜扫描, Single Image-Histogram 系统分析得出反映基因表达水平的细胞平均 FITC 荧光值及标准差。抗体滴度选择: 鼠抗 Bcl-2 抗体为 1 :70, 羊抗 P53 抗体、FITC 标记羊抗鼠抗体、兔抗羊抗体为 1 :100。

1.2.5 RT-PCR

(1) 细胞总 RNA 的提取 采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步抽提法提取^[4]。

(2) RT-PCR 引物设计 根据 GenBank 中小鼠 iNOS 和 β -actin 的 cDNA 序列设计引物。

小鼠 iNOS 上游引物: 5' - AGACATGGCTTG CCCCTGG - 3', 下游引物: 5' - GATCAGGAGGG ATTTCAAAGACCT - 3', 扩增片段为 674 bp β -actin 上游引物: 5' - TCATGAAGTGTGACGTGACATCC GTAAAG - 3', 下游引物: 5' - CCTAGAAGC ATTTCGGT - 3', 扩增片段为 285 bp。

(3) cDNA 的合成 将 100 ng RNA 加入以下逆转录体系中: Oligo (dT) 2 μ mol/L, 4 种 dNTPs 各 500 μ mol/L, Tris-HCl 50 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 10 mmol/L, AMV-RT 酶 5 u, 总体积 25 μ L, 混匀后 43 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冰浴 2 min。

(4) PCR 反应 取 2 μ L 模板加至 PCR 扩增反应体系中, iNOS 和 β -actin 两对引物各 20 pmol/L, dNTPs 200 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 1 u, 2.5 μ L 10 $\times$ PCR buffer, 总体积 25 μ L, 混匀、95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环 30 次, 最后于 72 $^{\circ}$ C 补平 10 min。

2 结 果

2.1 细胞形态学改变

透射电镜观察 MPM 的超微结构变化, 结果显示: 正常巨噬细胞形状不规则, 胞核呈卵圆形, 异染色质多分布于核膜内侧, 胞膜有很多长短形状不一的突起 (图 1a); 用 NO 诱导凋亡的 MPM 胞膜突起明显减少, 溶酶体间可见到溶噬现象, 胞核中染色质固缩成均质状、电子密度高的染色质块边集在核膜下, 核固缩、碎裂 (图 1b); 预先用 PSK 处理的细胞, 再用内源性 NO 诱导, 细胞结构呈明显凋亡状态, 甚至有凋亡小体形成 (图 1c)。

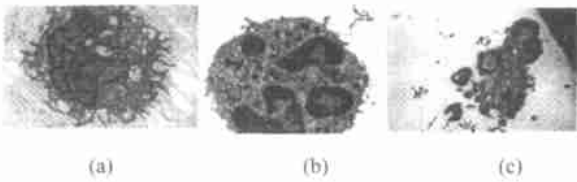


图 1 透射电镜观察 NO 和 PSK 处理后巨噬细胞的形态学变化

Fig. 1 Transmission electron micrographs of MPMs treated with NO and PSK

- a 正常巨噬细胞;
- b 内源性 NO 处理 36 h 后的巨噬细胞;
- c PSK 组用内源性 NO 处理 36 h 后的巨噬细胞

2.2 巨噬细胞凋亡相关基因表达的变化

2.2.1 P53 平均细胞荧光强度变化 免疫荧光技术结合激光扫描共聚焦显微镜技术检测巨噬细胞 P53 蛋白平均细胞荧光强度变化显示, NO 处理的 Raw264.7 巨噬细胞 P53 蛋白表达增强; PSK 可增强 NO 刺激的巨噬细胞 P53 蛋白的表达 (表 1)。

表 1 P53 平均细胞荧光强度变化
Tab 1 The effects of NO on the mean P53 fluorescence value per cell

分组	非 NO 处理组	NO 处理组
非 PSK 组	1 480.27 $\pm$ 111	1 589.12 $\pm$ 190.19 ¹⁾
PSK 组	1 368.91 $\pm$ 155.75	1 840.99 $\pm$ 254.32 ^{1,2)}

1) NO 组 vs 非 NO 组, $P < 0.05$; 2) PSK 组 vs 非 PSK 组, $P < 0.05$

2.2.2 Bcl-2 平均细胞荧光强度变化 免疫荧光技术结合激光扫描共聚焦显微镜技术检测巨噬细胞 Bcl-2 蛋白平均细胞荧光强度变化显示, NO 处理的 Raw264.7 巨噬细胞 Bcl-2 蛋白表达下降, PSK 可进一步增强 NO 下调 Bcl-2 蛋白的表达 (表 2)。

表 2 Bcl-2 平均细胞荧光强度变化
Tab 2 The effects of NO on the mean Bcl-2 fluorescence value per cell

分组	非 NO 处理组	NO 处理组
非 PSK 组	778.39 $\pm$ 154.28	713.11 $\pm$ 90.19 ¹⁾
PSK 组	801.03 $\pm$ 112.03	689.34 $\pm$ 154.32 ^{1,2)}

1) NO 组 vs 非 NO 组, $P < 0.05$; 2) PSK 组 vs 非 PSK 组, $P < 0.05$

2.3 RT-PCR 检测 iNOS 基因的表达变化

细胞提取 RNA 前, 测亚硝酸盐的含量, 证

实处理因素对细胞释放 NO 有影响后, 进行 RT-PCR 检测. 初步实验结果表明 IFN- γ 、LPS 和 PSK 都能诱导 iNOS 基因的表达; PSK 能增强 IFN- γ 和 LPS 的诱导作用 (图 2).

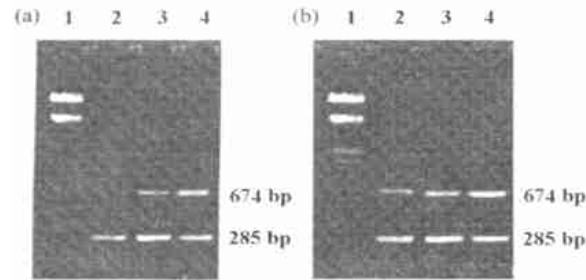


图 2 RT-PCR 分析巨噬细胞 iNOS 表达
Fig 2 Expression of Raw264.7 macrophages
iNOS as assessed by RT-PCR
a 非 PSK 处理组; b PSK 处理组
1 DNA 标准; 2 对照;
3 细胞用 IFN- γ 处理; 4 细胞用 LPS 处理;
扩增片段, iNOS: 674 bp, β -actin: 285 bp

3 讨 论

巨噬细胞来源的泡沫细胞的死亡在进展性动脉粥样硬化损伤的脂质中心形成过程中起着重要作用, 但其死亡的机制尚不清楚, 推测细胞死亡的发生是通过凋亡. 内、外源性产生的 NO 可以诱导巨噬细胞凋亡^[1,2], 有研究证明, NO 对产生它的巨噬细胞有毒害作用, 来自激活的巨噬细胞的 NO 的细胞毒性很强, 其毒性不仅能杀死靶细胞还能杀死巨噬细胞本身^[5], 体外用 LPS 和 IFN- γ 激活的依赖 NO 的 MPM 的死亡是通过凋亡的方式^[2]. PSK 能刺激巨噬细胞产生大量的 NO, 并可增强 IFN- γ 和 LPS 刺激巨噬细胞产生 NO 的作用, 在 NO 诱导的巨噬细胞凋亡中 PSK 会发挥何种作用.

我们用透射电镜观察 MPM 的超微结构变化, 结果显示 NO 诱导凋亡的巨噬细胞胞膜突起明显减少, 染色质固缩、边集, 核固缩、碎裂; 预先用 PSK 处理的细胞, 再用内源性一氧化氮诱导, 细胞结构呈明显凋亡状态, 甚至有凋亡小体形成. 巨噬细胞凋亡时, 胞内促凋亡基因蛋白 P53 急剧增多. 我们的实验结果证实了这一点, NO 诱导的巨噬细胞凋亡, 胞内 P53 荧光强度都明显增高, PSK 能增进 NO 诱导的巨噬细胞表达 P53 蛋白, 提示 NO 产生达一定量时 PSK 促进 NO 诱

导的巨噬细胞凋亡. Bcl-2 是一种凋亡抑制基因, 细胞凋亡时, Bcl-2 表达水平常下降, 实验结果也证实了这一点, NO 诱导的巨噬细胞凋亡, 胞内 Bcl-2 荧光强度都明显下降; PSK 能进一步下调 NO 诱导的巨噬细胞表达 Bcl-2 蛋白. 上述结果表明 PSK 能促进 NO 诱导的巨噬细胞凋亡.

通常情况下, iNOS 基因在细胞内不表达, 只有在 LPS 和/或细胞因子诱导某些细胞后才表达. PSK 促进 NO 诱导的细胞凋亡, 其分子机理为何, 是否可诱导 iNOS 活性, 以 Raw264.7 小鼠巨噬细胞为研究对象, 以 IFN- γ 、LPS 和 PSK 为处理因素, 运用 RT-PCR 技术观察这些因素对 iNOS 基因表达的影响, 结果发现 IFN- γ 、LPS 和 PSK 都能诱导 iNOS 基因的表达; PSK 还能增强 IFN- γ 和 LPS 的诱导作用. 说明 PSK 在巨噬细胞凋亡中的作用有可能是通过诱导 iNOS 基因表达实现的.

近来 PSK 被证明是炎症细胞因子的强有力的诱导剂, 如 IL-1、IL-6、TNF α 和趋化因子^[6], 后者也受 LPS 的诱导. PSK 的激活作用与 LPS 十分相似^[7]. 实际上, CD14 是一种 LPS 的特异受体, 它的抗体能够阻止¹²⁵I-PSK 结合到巨噬细胞系. 有报道认为 NO 可作为体内的免疫调节剂, NO 能够抑制 Th1 包括 IL-2、IL-3 等细胞因子的产生^[8], 调节 T 淋巴细胞和 NK 细胞的功能, 并可强化巨噬细胞合成 TNF- α 和 IL-1^[9]. 因此, PSK 诱导的 NO 可能有助于它们的免疫调节活动. 在我们的实验中, PSK 可诱导巨噬细胞 iNOS 基因的表达, 还能增强 LPS 和 IFN- γ 对巨噬细胞 iNOS 的诱导作用 (图 2b), 部分证实了上述观点, 也从分子机理方面解释了 PSK 与 NO 的复杂关系. 鉴于 PSK 本身是一种蛋白多糖, 它在诱导 iNOS 表达, 刺激巨噬细胞产生 NO 方面的作用与 LPS 有相似形, 其与 LPS 的内在关系究竟如何, 有待进一步深入研究.

参考文献:

- [1] MEBMER U K, LAPETINA E G, BRUNE B. Nitric oxide-induced apoptosis in Raw264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C-and protein kinase A-activating compounds[J]. Molecular Pharmacology, 1995, 47: 757—765.
- [2] ALBINA J E, CUI S, MATEO R B, et al. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages[J]. J Immunol, 1993, 150: 5080—5085.

[3] 洪涛. 生物医学超微结构与电子显微镜技术[M] . 北京: 科学出版社, 1984. 125.

[4] VEJLSTRUP N G, BOULOU MIE A, BOESGAARD A, et al Inducible nitric oxide synthase(iNOS) in the human heart: expression and localization in congestive heart failure[J] . J Mol Cell Cardiol, 1998, 30: 1215—1223.

[5] SHIMAOKA M, IIDA T, OHARA A, et al NOC, a nitric oxide-releasing compound, induces dose dependent apoptosis in macrophages[J] . Biochem Biophys Res commun, 1995, 209: 519—526.

[6] KATO M, HIROSE K, HAKOZAKI M, et al Induction of gene expression for immunomodulating cytokines in peripheral blood mononuclear cell in response to orally administered PSK immunomodulating protein-bound polysaccharide[J] . Cancer Immunol Immunother, 1995, 40: 52.

[7] ASAI K, KATO H, KIMURA S, et al Induction of gene expression for nitric oxide synthase by immunomodulating drugs in the Raw264. 7 murine macrophage cell line[J] . Cancer Immunol Immunother, 1996, 42: 275—279.

[8] MARCINKIEWICZ J, CHAIN B Differential regulation of cytokine production by nitric oxide [J] . Immunology, 1993, 80: 146.

[9] MARCINKIEWCZ J, GRABOWSKA A, CHAIN B Nitric oxide upregulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages[J] . Eur J Immunol, 1995, 25: 947.

Molecular Mechanism of Effects of PSK on
the Apoptosis of Macrophages Induced by NO

WANG Jin-wen¹, CHEN Yuan², WANG Xun-zhang¹

(1. State Key Lab for Biocontrol, Biopharmaceutical Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;
2. Department of Biochemistry and Molecular Biology,
First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: To investigate the molecular mechanism of polysaccharide krestin (PSK) on atherosclerosis's prevention and treatment. Macrophages were cultured and treated with or without PSK initially, Macrophage apoptosis was induced by NO and oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL), Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA by Raw264. 7 macrophages as assessed by RT-PCR. PSK can inhibit ox-LDL-induced macrophage apoptosis and promote NO-induced macrophages apoptosis; Raw264. 7 macrophages can be induced to express iNOS mRNA when stimulated with PSK, IFN-γ and LPS in vitro, PSK can enhance the effects of IFN-γ and LPS, suppress the inhibition effects of ox-LDL. The prevention and treatment effects of PSK on atherosclerosis may be realized by inducing iNOS.

Keywords: polysaccharide krestin; apoptosis; inducible nitric oxide synthase; atherosclerosis