

云芝多糖防止氧化型低密度脂蛋白所致巨噬细胞泡沫样变 和预防实验性动脉粥样硬化形成

陈 瓊 周 玫

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

动脉粥样硬化(As)的发生发展与低密度脂蛋白(LDL)受到氧化修饰有关已为越来越多的研究所证实^[1~3]。体内与As发生有关的内皮细胞(EC)、平滑肌细胞以及巨噬细胞(MP)等都能对LDL进行氧化修饰。氧化的LDL(oxLDL)是造成早期内皮细胞损伤和进一步病理变化的关键性因子,它不但直接损伤EC,而且诱导EC表达粘附蛋白VCAM-1,促使单核细胞粘着和迁移入内膜下。进入内膜下的单核细胞受到oxLDL的作用分化为MP,MP摄取oxLDL形成泡沫细胞(foam cell,FC),过量的oxLDL成为进一步促进As发展的恶性循环源^[4]。最近的研究还揭示MP泡沫样变后对LDL氧化修饰的能力增强^[5]。因此防止LDL氧化已成为防止As的重要措施。特别是唯一能有效地缓解纯合子型家族性胆固醇血症患者的皮肤和肌腱黄色瘤和阻止纯合子型 watanabe 遗传性高脂血症家兔As发展的药物 probucol 的主要作用是阻断LDL氧化,而不是它的降胆固醇作用^[7]。已有许多报道说明能防止LDL氧化修饰的抗氧化剂能阻止As的形成,如维生素E能使 watanabe 遗传性家兔的主动脉弓区斑块面积降低32%^[12],抗氧化剂 DPPD(NN'-diphenyl-1,4-phenylenediamine)能使饲以高胆固醇食物的新西兰白兔的胸主动脉斑块面积降低71%^[13],DPPD由于它的毒性而不能应用于实际。

泡沫细胞是As斑块中最早出现的细胞成分,FC形成是As发生的重要病变,FC主要来源于单核巨噬细胞。传统认为它的形成与MP的清道夫受体不受细胞内胆固醇含量的反馈调节有关^[1]。我们通过丙二醛修饰的LDL(MDA-LDL)和oxLDL对MP高密度脂蛋白(HDL)结合量和细胞内胆固醇酯聚集量的影响,说明oxLDL对MP的毒性效应是FC形成的主要原因^[14]。我们根据这一论点,设想能否有一种药物能提高MP的抗氧化能力防止MP泡沫样变,以此阻断As病理变化的发展。研究发现云芝多糖(PSK)体内注射能保护MP免受脂质过氧化损伤和防止oxLDL所致泡沫

样变,以及防止实验性As形成,其机理可能与其能提高MP SeGSHPx 基因表达有关。

1 云芝多糖防止叔氢基氢过氧化物对巨噬细胞的脂质过氧化损伤^[15~19]

1.1 叔氢基氢过氧化物(tBOOH)、oxLDL对MP吞噬阳性率和FC受体阳性率的影响以及PSK的保护作用

tBOOH组($10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与MP温育,随着作用时间延长,吞噬阳性率和FC受体阳性率都不断下降,呈现明显的时效关系。oxLDL与tBOOH的作用规律相一致,随着作用时间延长,吞噬阳性率和FC受体阳性率都不断下降,有明显的时效关系。不同浓度tBOOH与巨噬细胞温育时(1h),随着tBOOH浓度的增加吞噬阳性率和FC受体阳性率不断下降,显示明显的量效关系。

云芝多糖事先处理小鼠能明显地减轻tBOOH对MP吞噬功能和FC受体表达的影响。tBOOH($10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)随着温育时间延长,吞噬阳性率和FC受体阳性率不断下降,PSK+tBOOH组下降则不明显。温育4小时,tBOOH组吞噬阳性率和FC受体阳性率分别下降56.26%和74.59%,而PSK+tBOOH组下降则为13.56%和13.24%。

1.2 tBOOH对MP呼吸爆发的影响以及PSK的保护作用

tBOOH与MP温育,随着tBOOH浓度的增加($5 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)MP化学发光反应动力学曲线依次降低,以化学发光峰值为准与正常MP相比,分别下降20%、35%、47%,显示tBOOH对MP呼吸爆发有强烈的抑制作用,并有明显的量效关系。当tBOOH浓度一定时($5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),随着培养时间的延长(12、24、48h)发光值不断下降,显示明显的时效关系,PSK+tBOOH组的MP化学发光峰值显著高于相应浓度tBOOH组。

当一定浓度tBOOH($5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与MP温育24h和48h,PSK+tBOOH组的MP化学发光峰值也

都明显高于相应的 tBOOH 组,即使作用 48 h, PSK + tBOOH 的化学发光峰值还近似于正常对照组。

1.3 tBOOH 对 MP 形态结构的影响以及 PSK 的保护作用

显微镜观察,正常 MP 培养 24 h 贴壁完全,98% 细胞呈梭型,细胞边缘清晰并见伸展的伪足,可见核染色质。在培养基中加入 tBOOH ($5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),温育 24 h 后伸长性下降,伪足消失,出现核固缩。经 PSK 处理的巨噬细胞在上述浓度 tBOOH 作用下仍保持正常完整形态。

电镜观察,透射电镜下,正常培养 48 h 的 MP 有长而致密的微绒毛,细胞膜结构清晰,细胞浆内可见清晰的线粒体,粗面内质网、溶酶体、吞噬体,核膜清晰,细胞核正常。 tBOOH ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 48 h 细胞内出现明显脂滴,线粒体和粗面内质网损伤严重,不易辨认,而经 PSK 事先处理的 MP 在同样浓度 tBOOH 作用下,微绒毛较长,胞浆有大量线粒体,仅部分线粒体肿胀和脊模糊,可见溶酶体,无脂滴,核周围间隙变宽,核基质基本正常,与 tBOOH 损伤组相比损伤明显减轻。

以上结果提示 PSK 能防止和减轻 tBOOH 对 MP 吞噬功能、FC 受体和呼吸爆发的抑制作用和提高 MP 对 tBOOH 形态损伤的抵抗力。

2 云芝多糖防止氧化型低密度脂蛋白所致巨噬细胞泡沫样变

氧化型低密度脂蛋白与 MP 温育时,LDL 被 MP 识别、内饮使细胞内脂质过氧化物 (LPO) 含量增加,并随着温育时间的延长而不断增加^[14]。Ball 等在含 10% 无脂蛋白胎牛血清的培养基中加入 LDL,培养的 MP 内很快出现紫褐色 (ceroid) 积聚,但在同样的条件下加入 LDL、乙酰化 LDL 或硫酸葡聚糖 LDL 复合物,MP 内就不出现这样的积聚^[20]。

我们用 ACS570 粘附式细胞仪和 2,7-二氯二乙酸荧光素 (2,7-dichlorofluorescein) 测定了受到 OLDL 作用的 8 个单个细胞 LPO 含量的动态变化以及 PSK 的影响。未经 PSK 处理小鼠的 MP 在受到 OLDL 作用的 15 min 内荧光值迅速增加而经 PSK 处理的 MP 荧光值的增加不显著,在扫描的第 15 min,对照组的平均荧光值为 960 ± 270 单位,而 PSK 组为 290 ± 200 单位。进一步对 OLDL 与巨噬细胞作用一定时间后多个细胞 (79 和 108 个) 荧光的平均值的测定也显示 PSK 组的荧光值明显低于对照组。2,7-二氯二乙酸荧光素可以和细胞内 LPO 氢或过氧化物以 1:1 结合产生荧光。荧光值的高低反映细胞内 LPO 含量的高低。PSK 组的

荧光值不论是 OLDL 作用的动态观察还是 OLDL 作用一定时间后的测定都较对照组低,说明 PSK 能抑制 OLDL 致的 MP 内 LPO 量的积聚^[21]。

对受 OLDL 攻击 MP 形态和结构改变的观察,MP 经 48 h 培养,在显微镜下有 1/2 数量的细胞呈梭形贴壁,另 1/2 呈小圆形,细胞壁清晰,内无吞噬颗粒,与 OLDL 共同培养 48 h 后梭形细胞消失或减少,细胞变化呈圆形,胞壁模糊,周边有颗粒沉积并出现典型的空泡,而经 PSK 处理的 MP 与 OLDL 共同温育 48 h,大部分细胞形态正常,仅个别细胞出现泡沫样变^[22]。以上结果提示 PSK 能通过降低 OLDL 致的 MP LPO 含量积聚以减低 OLDL 的毒性效应和防止泡沫样变。

3 云芝多糖保护作用的机理

氧化型低密度脂蛋白是 LPO 的载体^[23,24],OLDL 的损伤作用在于其中的 LPO,OLDL 和 tBOOH 对 MP 的毒性效应主要是通过 LPO 或 tBOOH 均裂产生的脂 (或烷) 过氧基 $\text{LOO} \cdot$ 和脂 (烷) 氧基 $\text{LO} \cdot$ 对细胞膜脂质双分子层引发的脂质过氧化损伤。而机体细胞抗氧化系统对过氧化物应激反应的特点是提高过氧化物酶的基因表达^[25]。为了探讨 PSK 提高巨噬细胞抗脂质过氧化损伤的机理,我们^[17,18]测定了经 PSK 处理的 MP SeGSHPx 活性及其在 tBOOH 作用下 SeGSHPx 活性的变化。PSK 一次腹腔注射后 3 天,细胞酶活性明显增高,与对照组相比,增高 1.35 倍,PSK 三次和九次连续注射与单次注射一样,显示类似的增强效应。

tBOOH 可以使 MP SeGSHPx 活性降低,随着 tBOOH 浓度的增加,酶活性的下降程度更为明显,呈现明显的量效关系,而 PSK 事先处理对 tBOOH 致的 MP 酶活性下降有明显的保护作用。其特点是:经 PSK 处理的 MP 酶活性在对应的不同浓度 tBOOH 作用点,都较非 PSK 处理组为高,经 PSK 处理的 MP 随着 tBOOH 浓度的增加,酶活性的下降也显示一定的量效关系,但变化的幅度不大,浓度从 $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时酶活性仅下降 17.86%,而非经 PSK 处理的在同样的 tBOOH 浓度变化时下降则达 34.65%;经 PSK 处理的 MP 即使在最大浓度 tBOOH 作用下,其酶活性还是比最低浓度 tBOOH 作用下的非 PSK 处理组的酶活性还要高。

以上结果提示 PSK 能提高 MP SeGSHPx 活性,并防止 tBOOH 对其酶活性的抑制作用。为了进一步阐明 PSK 增强 SeGSHPx 活性机理,我们^[26]还探讨了 PSK 对 MP SeGSHPx 基因表达的影响,与对照组相比,PSK 能明显地增加 MP SeGSHPx mRNA 含量。PSK 注射 1 天和连续 5 天都显示同样的效应,与上面提到

的 PSK 注射不同天数 MP 增加 SeGSHPx 活性程度相同相一致,提示 PSK 致 MP SeGSHPx 活性增加可能发生在基因转录水平。SeGSHPx 的功能呈催化脂质过氧化作用产物 LPO 分解,生成无毒性的醇以终止脂质过氧化反应,防止和减轻 tBOOH 和 LDL 对 MP 的损伤作用,以及防止 LDL 致的 MP 泡沫样变。

4 云芝多糖对实验性动脉粥样硬化形成的预防作用

在以上研究的基础上,我们进行了 PSK 预防 As 形成试验^[27,28]。雄性新西兰白兔饲以高脂高胆固醇食物,预防组腹腔注射 PSK,造型组以生理盐水代替 PSK,观察期为 60 天。在实验过程中于第 0、15、30、45 和 60 天分别测定血浆总胆固醇(TC)和 LDL 胆固醇(LDL-C)含量、血浆总脂质过氧化物(TLPO)和 LDLPO 含量、血浆 SeGSHPx 活性、总甘油三酯含量及磷酸肌酸激酶活性。在第 60 天取血后处死动物,收集腹腔 MP 测定 SeGSHPx mRNA 含量,取主动脉、心脏、肝脏测定 LPO 含量和 SeGSHPx 活性。取出整条主动脉固定,苏丹Ⅲ染色,计算每条主动脉 As 斑块面积及主动脉内膜总面积,求出病变面积的百分比,以同样方法求出主动脉弓区和腹主动脉区病变面积的百分比。计数腹主动脉区各动脉分支开口处斑块的形成数。在心脏横切面上中上 1/3 交界处取材观察心室内冠状动脉大中分支的狭窄级别和心肌内膜变化。

4.1 云芝多糖减轻实验性动脉粥样硬化家兔的脂质过氧化损伤^[27]

总胆固醇和 LDL-C 含量随实验时间延长持续升高,仅第 45 天 PSK 组 FC 和 LDL-C 都低于造型组,但至第 60 天又无明显差别;TLPO 和 LDL LPO 在第 30 天 PSK 组即明显低于造型组,至第 60 天两组差别更加显著;血浆 SeGSHPx 活性 PSK 组在第 15 天有一升高,第 30 天开始下降,而造型组自 15 天即开始明显下降,在第 15、30 天 PSK 组酶活性明显高于造型组,第 45 天开始两组酶活性皆明显下降无明显差别;以代表抗氧化能力的参数 SeGSHPx/LPO 比值表示在各时间点 PSK 组皆高于造型组;CPK 在测定的二个时间点 PSK 组都低于造型组;甘油三酯含量随时间的延长两组均呈上升趋势,但各时间点都未见差异;主动脉、心脏和肝脏 LPO 含量在 PSK 组都明显低于造型组,而 SeGSHPx 活性仅心脏 PSK 组较造型组为高具有统计学意义,但三个脏器的 SeGSHPx/LPO 比值均高于造型组;PSK SeGSHPx mRNA 含量明显高于造型组。结果说明实验性 As 家兔机体受到脂质过氧化损伤和机体的抗氧化能力下降,与我们先前的工作相一致^[23,29]。

云芝多糖能明显地减轻这种损伤和变化,心肌特异性酶 CPK 在 PSK 组明显低于造型组也提示云芝多糖对心肌有一定程度的保护作用。从整个观察过程来看 PSK 未能有效地降低胆固醇水平也无降脂作用,联系到以下的病理观察提示胆固醇和甘油三酯含量与高胆固醇动物病变无相关性,胆固醇和甘油三酯不完全是判断 As 严重程度的指标。

4.2 云芝多糖对实验性动脉粥样硬化家兔斑块形成的预防作用^[28]

病理形态学观察主动脉病变面积的百分比,PSK 组比造型组斑块面积减少 69.9%,在造型组中病变面积百分数最高者为 25.90%,而 PSK 组最高者仅为 10.18%;造型组中面积百分比最低的也可达 3.25%,而 PSK 组最低的为 0.47%;造型组中三条病变最重的主动脉,其病变面积百分比分别达到 25.90%、16.98%和 16.26%,而 PSK 组仅 1 例为 10.18%。PSK 组主动脉弓区和腹主动脉区斑块面积较造型组分别减少 58.5%和 82.7%。腹主动脉区各动脉分支开口斑块形成率 PSK 组也明显小于造型组;心室内冠状动脉大中分支狭窄级别的比较,PSK 组明显轻于造型组;在 PSK 组中 2 级狭窄 25%~50%以下的占 97.9%,造型组占 85.4%;PSK 组中无一例狭窄程度超过 75%,而在造型组中则有 14.6%。主动脉病变和冠状动脉狭窄程度相一致,狭窄程度大于 75%的都发生在主动脉病变最严重的造型组中的三只家兔中。

5 结语

以上研究结果说明 PSK 能预防实验性 As 斑块形成,其机理可能与 PSK 能提高 MP SeGSHPx 基因表达有关。增加 MP 的抗氧化能力防止 FC 形成,由此阻断了 As 病理变化的发展。MP 的主要功能之一是消除机体异物,LDL 受到氧化修饰后成为机体异物,MP 抗氧化能力的增加提高了消除具有毒性作用的 LDL 的能力,这可能解释了 PSK 能使 TLPO 和 LDL LPO 降低(与造型组相比)的原因。有关 PSK 防止 As 形成及提高 MP SeGSHPx 基因表达的机理尚待更深入的研究。

云芝多糖保护 MP 防止脂质过氧化损伤和泡沫样变,以及其能提高 MP SeGSHPx 基因表达和防止 As 形成都未见有文献报道。本研究的意义在于证实了我们提出的 LDL 的脂质过氧化损伤是造成 MP 泡沫的主要原因,并进一步说明 As 的发生发展与 LDL 受到氧化修饰有关。提高巨噬细胞抗氧化能力、防止泡沫样变、促进 LDL 清除是防治 As 的又一重要途径。本结果亦为云芝多糖的实际应用提供了实验依据。

参考文献

- 1 Steinberg D, et al. *N Engl J Med*, 1989, **320**(14):915~924.
- 2 Steinbrecher UP, et al. *Free Radical Biol Med*, 1990, **9**: 155~168.
- 3 Steinberg D, Witztum JL. *JAMA*, 1990, **264**(23):3 047~52.
- 4 Witztum JL, Steinberg D. *J Clin Invest*, 1991, **88**:1 785~92.
- 5 Parthasarathy S, et al. *Ann Rev Med*, 1992, **43**:219~25.
- 6 陈璠,周玫. 生物化学与生物物理进展, 1989, **14**(2): 278~283.
- 7 陈璠,周玫. 见:自由基医学. 陈璠、周玫主编, 北京:人民军医出版社, 1991, 223~257.
- 8 陈璠,周玫. 衡阳医学院学报, 1991, **19**(3):32~38.
- 9 周玫,陈璠. 中国动脉硬化杂志, 1993, **1**(1):69~73.
- 10 Ross R. *Nature*, 1993, **362**:801~809.
- 11 Bolton EJ, et al. *Atherosclerosis*, 1994, **106**:213~223.
- 12 William RJ, et al. *Atherosclerosis*, 1992, (2~3): 153~159.
- 13 Sparrow CP, et al. *J Clin Invest*, 1992, **86**(6): 1 885~91.
- 14 刘尚喜, et al. 中国动脉硬化杂志, 1993, **1**(1):30~35.
- 15 郭志刚, et al. 中华微生物学和免疫学杂志, 1991, **11**(4): 226~229.
- 16 李军, et al. 第一军医大学学报, 1992, **12**(4): 331~333.
- 17 Li Jun(李军), et al. *Int J Immunopharmac*, 1993, **15**(3): 429~433.
- 18 郭志刚, et al. 第一军医大学学报, 1992, **12**(4): 312~313.
- 19 Chen Yuan(陈璠), et al. *J Clin Lab Immunol* 1995(in press).
- 20 Ball Ry, et al. *Atherosclerosis*, 1986, **60**: 173~181.
- 21 刘尚喜, et al. 第一军医大学学报(待发表)
- 22 乐毅, et al. 第一军医大学学报, 1994, **14**(1): 12~14.
- 23 陶津, et al. 中华医学杂志, 1991, **71**(6): 345~346.
- 24 孙娟, et al. 第一军医大学学报, 1994, **14**(1): 56~57.
- 25 陈璠,周玫. 生命的化学, 1994, **14**(6): 3~6.
- 26 刘尚喜, et al. 第一军医大学学报, 1993, **13**(4): 291~293.
- 27 姜宁, et al. 第一军医大学学报(待发表)
- 28 姜宁, et al. 第一军医大学学报(待发表)
- 29 Chen Yuan(陈璠), et al. *Chen Med J*, 1993, **106**(2): 110~114.