

云芝多糖对受氧化型低密度脂蛋白攻击的小鼠腹腔巨噬细胞泡沫样变性及衰减的影响

娄宁 周玫 陈媛

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

Effect of Polysaccharide on Foam-like Change and Attenuation of Murine Peritoneal Macrophages Attacked by Oxidized Low Density Lipoprotein

LOU Ning, ZHOU Mei and CHEN Yuan

(Research Laboratory of Free Radical Medicine, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT With mimicking the injury model from murine peritoneal macrophages attacked by oxidized low density lipoprotein (OLDL), the time-dependant and concentration-dependant effect of polysaccharide K (PSK) on the foam-like change and attenuation of murine peritoneal macrophages attacked by OLDL was observed. After incubated with 10, 50 and 100 mg · L⁻¹ OLDL for 24, 48, 72 hours in vitro, the figure of PSK-treated macrophages was maintained normal relatively. Moreover, in PSK-treated group, the amount of survival cells were higher with counted by MTT colorimetric analysis at every time points. So PSK could inhibit the foam-like change of macrophages efficiently. And after the change in macrophages formed, PSK could prolong the survival time of these macrophages.

KEY WORDS Polysaccharide K; Oxidized low density lipoprotein; Foam-like change; MTT colorimetric analysis

摘要 以氧化修饰低密度脂蛋白攻击小鼠腹腔巨噬细胞为损伤模型, 观察了云芝多糖对巨噬细胞泡沫样变性及衰减的影响的时效和量效关系。腹腔注射云芝多糖的小鼠腹腔巨噬细胞在体外与 10、50、100 mg ·

L⁻¹等三种浓度的氧化型低密度脂蛋白共同培养 24、48 和 72 h 后, 细胞形态未有较大改变。用 MTT 比色法计数各时间点细胞存活数, 受云芝多糖保护的巨噬细胞存活数较高。结果表明, 云芝多糖能抑制巨噬细胞泡沫样变性, 以及巨噬细胞泡沫样变性后, 云芝多糖能延长其生存时间, 防止其死亡, 这对抑制动脉粥样硬化的进程有益处。

关键词 云芝多糖; 氧化型低密度脂蛋白; 泡沫样变性, MTT 比色分析法

在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病变的早期, 泡沫细胞主要由单核细胞系的巨噬细胞吞噬大量脂质而形成^[1]。近几年的研究发现低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)氧化修饰可被巨噬细胞识别, 并大量吞噬, 形成泡沫细胞^[2]。我们的工作已证明, 云芝多糖(polysaccharide K, PSK)作为一种免疫增强剂, 能抑制氧化型 LDL 在巨噬细胞中堆积而转变为泡沫细胞^[3]。另外, PSK 还能增强巨噬细胞抵抗叔丁基氢过氧化物氧化攻击的能力^[4], 提高其谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-POA)活性^[5], 使其具备抗活性氧损伤的能力。本实验以氧化型 LDL 攻击小鼠腹腔巨噬细胞为损伤模型, 观察了 PSK 对巨噬细胞泡沫样变性及衰减的影响。

1 材料和方法

1.1 低密度脂蛋白的制备

人血浆 LDL(密度 1.040~1.063 g · ml⁻¹), 采用一次性密度梯度超速离心法^[6]获得。

1.2 低密度脂蛋白的氧化修饰

将无乙二胺四乙酸二钠(ethylenediaminetetra-

acetic acid, disodium salt, EDTA) 的 LDL ($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 置含 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 的磷酸缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 中, 37°C 水浴温育 24 h。修饰后的 LDL 加 EDTA 至终浓度为 $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 于含 $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的 PBS 中透析 24 h (4°C), 超滤除菌保存。修饰后的 LDL 中硫代巴比妥酸反应物质 (thio-barbituric acid reactive substance, TBARS) 含量为 $25.0 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ LDL。

1.3 云芝多糖的给药方法

昆明小鼠 (雄性 $20 \pm 2 \text{ g}$) 购自本校实验动物中心, 随机分为 PSK 处理组 2 只, 对照组 2 只, 正常组 1 只, 共 5 只。PSK 组每只小鼠腹腔注射 $1.5\% \text{ PSK } 0.2 \text{ ml}$, 对照组小鼠腹腔注射同体积的生理盐水, 正常组小鼠不作任何处理, 连续 4 天, 停 1 天后, 将小鼠拉颈处死。

1.4 腹腔巨噬细胞的制备、培养、观察

小鼠处死后, 腹腔注入无血清 RPMI 1640 培养液, 收集腹腔液, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 液调整细胞浓度一致, 加入 96 孔板, 每孔 $100 \text{ } \mu\text{l}$, $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱 (37°C) 培养 2 h 后洗去未贴壁细胞。PSK 组和对照组, 以 6 孔为 1 小组, 分别加入含 $10, 50, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氧化型 LDL 的完全培养基继续培养, 显微镜下观察 24、48、72 h 的细胞形态变化并摄影, 同时用 MTT 比色分析法^[7]测定各时间点各孔的光密度值。MTT 比色分析法的基本原理是利用活细胞线粒体对 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 的代谢产生紫色的甲臆结晶, 溶解甲臆后, 可直接通过测定 570 nm 波长处的吸光度反映出细胞的增殖或衰减, 因在一定范围内紫色深浅与活细胞浓度呈线性关系。另外, 正常细胞对照不作任何处理, 仅用 RPMI 1640 完全培养基培养, 同时观察各时间点正常细胞形态并用 MTT 法测定细胞存活数。

1.5 其它测定方法

蛋白质测定用 Lowry's 法, TBARS 测定用改良的 Schu^[8] 法。

2 结果

2.1 云芝多糖对巨噬细胞形态和结构的保护作用

正常小鼠腹腔巨噬细胞培养 24 h 后于显微镜下观察, 细胞呈梭形贴壁和小圆形, 细胞壁清晰, 内无吞噬颗粒 (Figure 1 A), 第 48、72 h 细胞形态和结构依然正常。与 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氧化型 LDL 共同培养 24 h 的巨噬细胞, 大部份已成大圆形, 只有小部分呈小圆形, 细胞内已可见沉积的小黑颗粒, 个别细胞有小空泡 (Figure 1 B); 培养 48 h 后, 梭形细胞消失或极少, 细胞圆形变大, 吞噬颗粒增多, 细胞壁模糊 (Figure 1 C); 72 h 后, 视野中细胞数已明显减少, 有较多细胞悬浮于培养液中, 多数细胞有典型的脂肪空泡形成 (Figure 1 D)。与更高浓度 ($50, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的氧化型 LDL 共同培养的巨噬细胞, 损伤更加明显, 第 24 h 就有明显的形态变化。

PSK 处理的小鼠腹腔巨噬细胞与 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氧化型 LDL 共同培养 24 h, 其形态与正常细胞无异; 培养 48 h 后, 细胞仍呈梭形和小圆形, 胞壁清晰, 只见少数细胞有少许黑颗粒沉积, 未见脂肪空泡 (Figure 1 E); 培养 72 h 后, 大部份细胞形态仍正常, 少数变大变圆, 只有个别细胞泡沫样变性 (Figure 1 F)。与 $50, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氧化型 LDL 共同培养的巨噬细胞, 其形态变化稍大, 但和未经 PSK 处理的巨噬细胞相比较, 其损伤程度较轻。

Table. Effect of OLDL at various incubation times on surviving number of macrophages

(570 nm OD value, $\bar{x} \pm s$, $n=6$).

Concentration of OLDL ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	24 h	48 h	72 h
0	381 ± 19	380 ± 19	345 ± 83
10	$266 \pm 18^*$	$190 \pm 36^*$	$178 \pm 51^*$
50	$246 \pm 27^*$	$172 \pm 31^*$	147 ± 13
100	$195 \pm 32^*$	$163 \pm 26^*$	$118 \pm 32^*$

* Compared with the normal group, at the same time point, $P < 0.01$

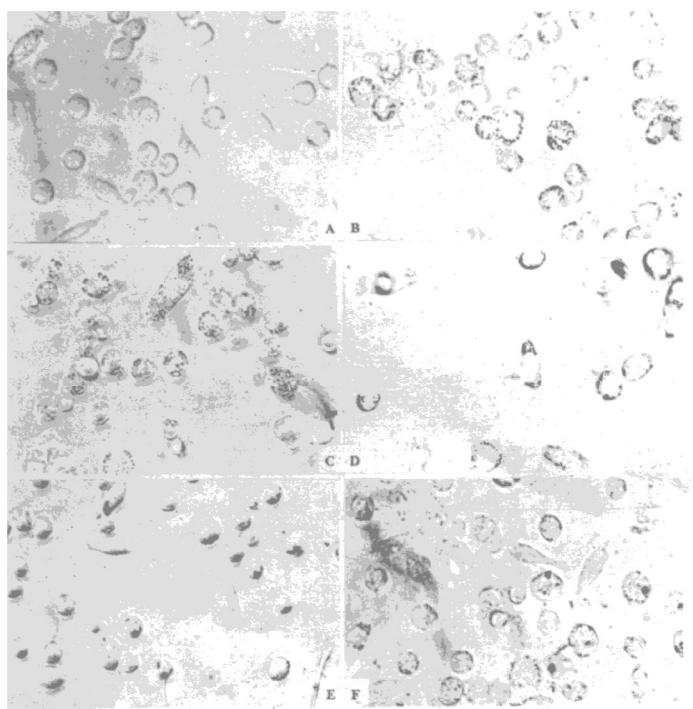


Figure 1. Effect of PSK on foam-like degeneration of murine peritoneal macrophages attacked by OLDL. A. Normal macrophages incubated for 24 h($\times 400$); B. Control macrophages incubated for 24 h($\times 400$); C. Control macrophages incubated for 48 h($\times 400$); D. Control macrophages incubated for 72 h($\times 400$); E. PSK-treated macrophages incubated for 48 h($\times 4000$); F. PSK-treated macrophages incubated for 72 h($\times 4000$).

2.2 云芝多糖对巨噬细胞存活数的影响

见 Table 所示,与不同浓度(10, 50 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的氧化型 LDL 共同培养 24、48、72 h 后,其细胞存活数随培养时间的延长,氧化型 LDL 浓度的升高而减少,明显低于同时点未受到损伤的正常细胞。而受相同浓度氧化型

LDL 攻击并受 PSK 保护的巨噬细胞的存活数较同时点对照组细胞为高。Figure 2 和 3 分别显示受 $50, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氧化型 LDL 攻击的巨噬细胞受到了 PSK 的保护。

3 讨论

泡沫细胞是 As 斑块中最早出现的细胞成

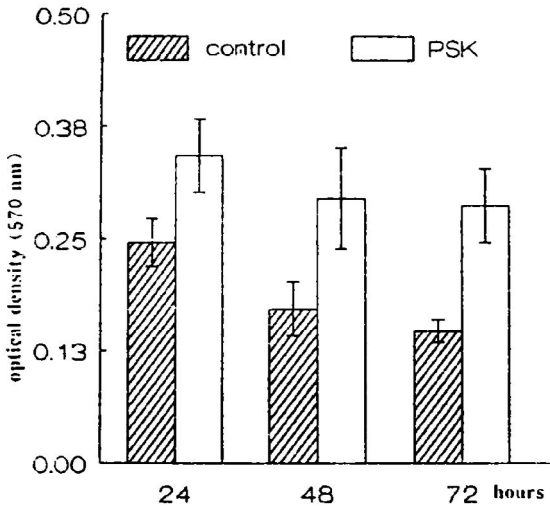


Figure 2. Effect of PSK on surviving number (570 nm OD) of macrophages incubated with 50 mg · L⁻¹ OLDL for 24, 48 and 72 hours (compared with the control group, P < 0.01).

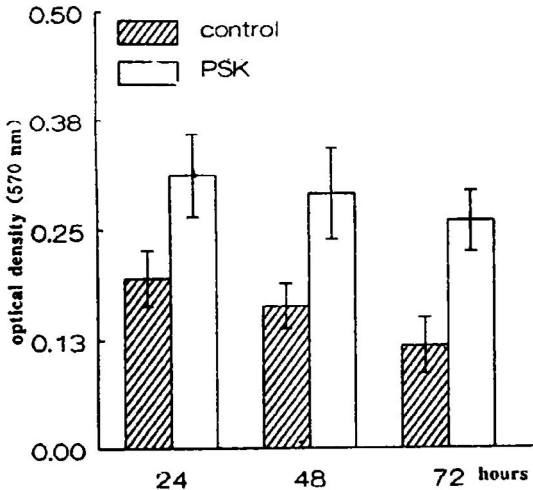


Figure 3. Effect of PSK on surviving number (570 nm OD) of macrophages incubated with 100 mg · L⁻¹ OLDL for 24, 48 and 72 hours (compared with the control group, P < 0.01).

份,它主要来源于单核巨噬细胞^[11]。近年来关于泡沫细胞形成机理的研究有了重大进展,认为当 LDL 受到脂质过氧化作用形成的氧化型 LDL 后,能为巨噬细胞的清道夫受体所辨认、

内饮而形成泡沫细胞^[2]。本实验即用氧化型 LDL 攻击小鼠腹腔巨噬细胞制备损伤模型,观察了 PSK 对巨噬细胞泡沫样变性及衰减的影响。结果表明,云芝多糖腹腔注射能明显地防止或减轻氧化型 LDL 的损伤作用,表现在受到 PSK 保护的巨噬细胞,其细胞形态和结构未有较大的改变,且生存时间延长。而未受到保护的巨噬细胞,其形态变大变圆,细胞壁模糊,可见有明显的黑色颗粒(即紫褐质,泡沫细胞的特点之一)沉积,有典型的脂肪空泡形成,且细胞数明显减少,这种变化随着氧化型 LDL 的浓度升高,培养的时间延长而更明显,表现出明显的时效和量效关系。

云芝多糖是一种从云芝菌丝体中提取的蛋白结合多糖,其主要结构为 β-(1-3)-D 葡聚糖。PSK 作为一个非特异性免疫增强剂,在国外被广泛应用于抗肿瘤和抗感染治疗,主要用于消化道肿瘤、肺癌和乳腺癌的治疗,免疫功能低下患者的抗感染治疗。

氧化型 LDL 对巨噬细胞的毒性效应,我们曾进行了一系列的观察。它可以使培养的 U₉₃₇ 单核细胞系脂过氧化物 (lipid peroxide, LPO) 含量增加、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 下降及细胞膜的流动性降低^[9];使小鼠腹腔巨噬细胞 Fc 受体阳性率和吞噬率降低^[4],呼吸爆发强度减弱^[10]和超微结构发生明显的改变^[11]。同时,我们也发现云芝多糖能明显地防止和减轻它的损伤作用。乐毅等^[3]证明 PSK 能抑制氧化型 LDL 在巨噬细胞中堆积而转变为泡沫细胞。另外,PSK 还能增强巨噬细胞抵抗氧化攻击的能力,并提高其 GSH-POA 活性^[5]。揭示了 PSK 的抗泡沫样变性与抗脂质过氧化作用一致。

本实验的研究证明,云芝多糖能抑制巨噬细胞泡沫样变性,以及巨噬细胞泡沫样变性之后,云芝多糖能延长其生存时间,提高细胞存活数,防止其死亡,与我们用 PSK 有效地预防了实验性动脉粥样硬化的发生发展的的工作相一致^[12,13],这对抑制动脉粥样硬化的进程有益处。

(下转 299 页)

(上接第 290 页)

参考文献

- 1 陈 瑗,周 玫. 脂质过氧化损伤与动脉粥样硬化研究的新进展. 衡阳医学院学报, 1991, 19(3): 35.
- 2 刘尚喜,周 玫,陈 瑗, et al. 氧化修饰低密度脂蛋白对巨噬细胞的脂质过氧化损伤在泡沫细胞形成中的作用. 中国动脉硬化杂志, 1993, 1(1): 30.
- 3 乐 毅,陈 瑗,周 玫, et al. 云芝多糖对受 O-LDL 攻击的小鼠巨噬细胞的保护作用及其免疫调节作用. 第一军医大学学报, 1994, 14(1): 12.
- 4 郭志刚,陈 瑗,陆振刚, et al. 脂质过氧化物和氧化修饰的低密度脂蛋白对巨噬细胞免疫功能的影响. 中华微生物学和免疫学杂志, 1991, 11(4): 226.
- 5 刘尚喜,周 玫,陈 瑗, et al. 云芝多糖增强小鼠巨噬细胞 SeGSHPx 基因表达的初步研究. 第一军医大学学报, 1993, 13(4): 291.
- 6 张林华,刘秉文. 一次性密度梯度离心分离人血清脂蛋白. 生物化学和生物物理学报, 1989, 21(3): 257.
- 7 黄文栋,王亚凡. 一种测定细胞增殖和衰减的快速比色分析法. 生命的化学, 1994, 14(6): 44.
- 8 Schuh J, Faircolough MP, Ilaschemcyer I. Oxygen mediated heterogeneity of apo low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75: 3173.
- 9 李 军,周 玫,陈 瑗, et al. 脂质过氧化对培养的 U₉₃₇ 单核细胞系的损伤作用. 基础医学和临床, 1991, 11(2): 40.
- 10 Li Jun, Zhou Mei, Chen Yuan, et al. Reversal of inhibition of reactive oxygen species on respiratory burst of macrophages by polysaccharide from *Coriolus Versicolor*. *Int J Immunopharmac*, 1993, 15(3): 429.
- 11 郭志刚,陈 瑗,陆振刚, et al. 脂质过氧化物对巨噬细胞亚超微结构损伤及云芝多糖的保护作用. 第一军医大学学报, 1992, 12(4): 312.
- 12 娄 宁,陈 瑗,周 玫, et al. 云芝多糖对实验性动脉粥样硬化家兔脂质过氧化损伤的保护作用. 第一军医大学学报, 1995, 15(2): 107.
- 13 娄 宁,陈 瑗,周 玫, et al. 云芝多糖对实验性动脉粥样硬化形成的病理形态学观察. 第一军医大学学报, 1995, 15(2): 111.

(本文 1995-07-30 收到, 1995-11-19 修回)