

姬松茸多糖对大鼠胸腺细胞凋亡和线粒体膜电位的影响

黄清松^{1*}, 李红枝¹, 陈爱葵²

(1. 广东药学院基础学院, 广州 510006; 2. 广东第二师范学院生物系, 广州 510303)

[摘要] 目的: 观察姬松茸多糖对地塞米松(dexamethasone, DEX)诱发大鼠胸腺细胞凋亡和线粒体膜电位的影响。方法: Wistar 大鼠随机分为 4 组: 正常组, 模型组, 姬松茸多糖低、高剂量组, 每组 10 只。正常组和模型组灌胃(ig)生理盐水, 姬松茸多糖低、高剂量组 ig 姬松茸多糖溶液(60, 120 mg·kg⁻¹), 1 次/d, 连续 7 d。模型组和姬松茸多糖低、高剂量于第 7 日腹腔注射 DEX(0.02 g·kg⁻¹)。3 h 后处死各组动物, 迅速无菌取胸腺, 采用显微观察、流式细胞技术观察胸腺细胞形态学改变, 胸腺细胞凋亡、脱氧核糖核酸(DNA)断裂百分率及线粒体膜电位变化, 胸腺组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的变化。结果: 与模型组比较, 姬松茸多糖组大鼠胸腺细胞线粒体嵴肿胀明显减轻; 姬松茸多糖组大鼠胸腺细胞凋亡率[低、高剂量(5.96 ± 1.14)%, (5.07 ± 1.02)%], DNA 断裂率[低、高剂量(3.67 ± 0.49)%, (3.24 ± 0.45)%]及胸腺组织 MDA 含量[低、高剂量(1.87 ± 0.25), (1.72 ± 0.23) μg·mg⁻¹]均明显低于模型组[(7.14 ± 1.62)%, (4.25 ± 0.86)%, (2.16 ± 0.38) μg·mg⁻¹]; 姬松茸多糖组大鼠胸腺细胞线粒体膜电位(荧光指数: 低剂量 38.57 ± 6.29, 高剂量 41.36 ± 7.18)及胸腺组织 SOD 活性量[低、高剂量(25.78 ± 3.94), (27.36 ± 4.21) U·mg⁻¹]明显高于模型组(32.76 ± 5.48) 荧光指数, (21.45 ± 3.52) μg·mg⁻¹。结论: 姬松茸多糖可阻断胸腺细胞 DNA 断裂和线粒体膜电位的下降, 有效抑制 DEX 诱导的胸腺细胞凋亡, 其作用机制与姬松茸多糖提高胸腺组织抗氧化功能有关。

[关键词] 姬松茸多糖; 胸腺细胞; 凋亡; 线粒体膜电位

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0232-04

[doi] 10.11653/syfy2013100232

Effect of *Agaricus blazei* Polysaccharide on Thymocyte Apoptosis and Mitochondrial Membrane Potential in Rats

HUANG Qing-song^{1*}, LI Hong-zhi¹, CHEN Ai-kui²

(1. School of Basic Courses of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Biology Department of Guangdong University of Education, Guangzhou 510303, China)

[收稿日期] 20121124(005)

[通讯作者] * 黄清松, 硕士, 高级实验师, 从事细胞生物学研究, Tel: 13416349399, E-mail: p84188896@163.com

- [3] 李新荣, 李艳平. 丹参酮 II_A 对大鼠血管平滑肌细胞的增殖作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(31): 55.
- [4] 何劲松, 王强, 易自刚, 等. 冠通方对冠状动脉裸金属支架植入术后再狭窄的影响[J]. 中医杂志, 2010, 51(5): 423.
- [5] 李丹, 何宜荣, 刘濮华, 等. 冠通方及其拆方含药血清对 Ang II 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(9): 59.
- [6] Baxter G D, Lavin M F. Specific protein dephosphorylation in apoptosis induced by ionizing radiation and heat shock in human lymphoid tumor lines[J]. J Immunol, 1992, 148(6): 1949.
- [7] 王平, 程静, 田代志, 等. 固本化痰通脉方含药血清对大鼠血管平滑肌细胞增殖及细胞周期素 D₁ 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(9): 22.
- [8] 曹文疆, 邢建国, 王新春, 等. 香青兰总黄酮对 TNF-α 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 159.
- [9] 袁禄根, 刘玉晖, 游宇, 等. 补阳还五汤抑制同型胱氨酸介导的血管平滑肌细胞增殖[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 166.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: To investigate effects of *Agaricus blazei* polysaccharide (ABP) on rat thymocyte apoptosis and mitochondrial membrane potential which were induced by dexamethasone (DEX). **Method:** Forty Wistar rats were divided into four groups randomly with 10 in each group. The four groups were as follows: normal group, model group, low dose ABP group and high dose ABP group. Normal group and model group were prepared by normal saline solution; low dose ABP group and high dose ABP group were prepared by ABP solution (60, 120 mg·kg⁻¹), once a day for seven days continuously. Model group and low dose ABP group were injected through belly by DEX (0.02 g·kg⁻¹). All groups were killed three hours later and rat thymocyte was taken out cleanly. Microscopic observation and flow cytometry were used to observe morphological changes and apoptosis of rat thymocyte, percentage of deoxyribonucleic acid (DNA) strand breakage, mitochondrial membrane potential changes and contents of superoxide dismutase (SOD) in rat thymocyte and malondialdehyde (MDA). **Result:** Mitochondria cristal dilatation of thymocyte obviously released in ABP group compared with model group. Rate of rat thymocyte apoptosis in ABP group [low dose (5.96 ± 1.14)%, high dose (5.07 ± 1.02)%], DNA breakage rate [low dose (3.67 ± 0.49)%, high dose (3.24 ± 0.45)%] and MDA content in rat thymocyte [low dose (1.87 ± 0.25) μg·mg⁻¹, high dose (1.72 ± 0.23) μg·mg⁻¹] were obviously lower than model group [(7.14 ± 1.62)%, (4.25 ± 0.86)%, (2.16 ± 0.38) μg·mg⁻¹]; mitochondrial membrane potential in rat thymocyte (fluorescence index; low dose 38.57 ± 6.29, high dose 41.36 ± 7.18) and SOD content in rat thymocyte [low dose (25.78 ± 3.94) μg·mg⁻¹, high dose (27.36 ± 4.21) μg·mg⁻¹] were significantly higher than model group (32.76 ± 5.48) fluorescence index, (21.45 ± 3.52) μg·mg⁻¹. **Conclusion:** ABP prevent DNA strand breakage and the decreasing of mitochondrial membrane potential which can inhibit rat thymocyte apoptosis induced by DEX. The mechanism may be that ABP strengthen antioxidant function of thymus.

[Key words] *Agaricus blazei* polysaccharide; thymocyte; apoptosis; mitochondrial membrane potential

姬松茸为蘑菇科蘑菇属真菌,富含蛋白质和糖类。姬松茸多糖是从姬松茸子实体中提取的有效活性成分,具有螺旋状的三维立体结构,是一种β型的葡聚糖。据相关研究报道,姬松茸多糖具有降血糖、提高免疫力、抗病毒、抗肿瘤等作用^[1-3]。本研究以地塞米松(DEX)诱导大鼠胸腺细胞凋亡,采用显微观察、流式细胞技术观察姬松茸多糖对胸腺细胞形态学,细胞凋亡、脱氧核糖核酸(DNA)断裂率及线粒体膜电位等的干预作用,为更好的开发利用姬松茸资源提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级Wistar大鼠40只,体重180~200g,雄性,由广东省医学实验动物中心提供,生产许可证号,SCXK(粤)2008-0002。

1.2 药品制备 姬松茸(*Agaricus blazei* Murill)由广东药学院中药学院中药资源系刘基柱副教授鉴定。姬松茸多糖由本研究组自制:取姬松茸原菌体1000g,加约5倍蒸馏水浸泡12h,文火煮沸1h,收集煎液,再加等体积的蒸馏水文火煮沸30min,收集煎液。合并2次煎液,静置12h,过滤,浓缩至一定体积后,加入80%的乙醇沉淀12h,离心,收集醇沉物。醇沉物于恒温干燥箱(75~80℃)至相对干燥,得姬松茸

多糖粗制品,每1g浸膏相当于生药3.0g。

1.3 仪器 FC500型流式细胞分析仪(美国,贝克曼库尔特公司),JCM5000型扫描电镜(日本,电子JEOL公司)。

1.4 试剂 Annexin V-FITC & PI试剂盒(美国,Pharmingen公司,批号2010021401),JC-1试剂盒[美国,Cell Technology(细胞工程)公司,批号091106],超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物研究所,批号20100814),地塞米松(DEX)磷酸钠注射液(辰欣药业股份有限公司,批号20091204),Rhodamine123(Sigma公司,批号20100507),其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 动物分组与给药 动物随机分为4组,每组10只:正常对照组,胸腺细胞凋亡模型组,姬松茸多糖低、高剂量给药组。正常组和模型组ig生理盐水,姬松茸多糖低、高剂量组分别ig剂量为60,120mg·kg⁻¹的姬松茸多糖溶液(用蒸馏水配制),1次/d,连续7d。模型组和姬松茸多糖低、高剂量于第7日下午4:00时ip DEX注射液(0.02g·kg⁻¹)。3h后处死各组动物,迅速无菌取胸腺,进行各指标观察。

2.2 胸腺细胞病理观察 无菌条件下迅速分离胸腺,取部分胸腺石蜡切片,行 HE 染色,光镜下观察。取石蜡包埋胸腺,超薄切片,行醋酸铀与柠檬酸铅染色,透射电镜下观察。

2.3 胸腺细胞凋亡率 迅速无菌取部分胸腺组织,匀浆,过 300 目筛网制备胸腺细胞悬液,细胞密度调整至 $(2 \sim 5) \times 10^6/L$ 。采用碘化丙啶及 Annexin-v 双标试剂盒检测悬液内细胞 1 000 个,计凋亡区内细胞数。

$$\text{细胞凋亡率} = (\text{凋亡区内细胞数}/1\ 000) \times 100\%$$

2.4 胸腺细胞 DNA 断裂率 取等量低张细胞膜裂解缓冲液与 2.3 项制备的细胞悬液 300 μL 混匀,使细胞膜破裂,但核膜不破,室温下离心 ($13\ 000\ r \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min),置上清液于其他试管,按二苯胺法测定并计算 DNA 断裂率。

$$\text{DNA 断裂率} = [\text{上清液 DNA 含量}/(\text{上清液 DNA 含量} + \text{沉淀 DNA 含量})] \times 100\%$$

2.5 胸腺细胞线粒体膜电位测定 取 2.3 项制备的胸腺细胞悬液(约 2×10^6 个细胞),冰预冷磷酸缓冲液(PBS)冲洗 3 次,以 0.5 mL PBS 重悬细胞,取 $1\ g \cdot L^{-1}$ 的 Rhodamine123 储存液($-20\ ^\circ C$ 下溶于二甲基亚枫)加入到上述细胞悬液中,终浓度调整为

$10\ mg \cdot L^{-1}$,染色 30 min($37\ ^\circ C$ 下),行流式细胞分析。

2.6 胸腺组织 SOD,MDA 测定 取部分胸腺,于玻璃培养皿中剪碎,加入匀浆介质,制成 10% 组织匀浆。采用 ELISA 法严格按试剂盒说明操作,检测各组大鼠胸腺组织 SOD,MDA。

2.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16 软件进行统计,组间比较行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 胸腺组织病理观察 正常组胸腺细胞分布于胸腺皮质,较密集,细胞膜完整,胞质少,细胞核呈圆形或椭圆形;线粒体嵴无肿胀。模型组胸腺皮质区细胞呈松散状分布,可见散在的细胞碎片,有的细胞核碎裂,线粒体嵴呈明显肿胀,现空化现象。姬松茸多糖组胸腺细胞碎片较少,线粒体嵴肿胀明显减轻。

3.2 胸腺细胞凋亡、DNA 断裂率及线粒体膜电位比较 与正常组比较,模型组大鼠胸腺细胞凋亡、DNA 断裂率均显著提高($P < 0.01$),线粒体膜电位显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,姬松茸多糖组大鼠胸腺细胞凋亡、DNA 断裂率均明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),线粒体膜电位明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 姬松茸多糖对大鼠胸腺细胞凋亡、DNA 断裂率及线粒体膜电位变化的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $mg \cdot kg^{-1}$	细胞凋亡率/%	DNA 断裂率/%	线粒体膜电位/荧光指数
正常	-	$1.56 \pm 0.28^{2)}$	$0.84 \pm 0.17^{2)}$	$94.37 \pm 11.65^{2)}$
模型	-	7.14 ± 1.62	4.25 ± 0.86	32.76 ± 5.48
姬松茸多糖	60	$5.96 \pm 1.14^{1)}$	$3.67 \pm 0.49^{1)}$	$38.57 \pm 6.29^{1)}$
	120	$5.07 \pm 1.02^{2)}$	$3.24 \pm 0.45^{2)}$	$41.36 \pm 7.18^{2)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 胸腺组织 SOD 和 MDA 比较 与正常组比较,模型组大鼠胸腺组织 SOD 活性显著下降($P < 0.01$),MDA 活性显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,姬松茸多糖组大鼠胸腺组织 SOD 含量均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),MDA 含量明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 姬松茸多糖对大鼠胸腺组织 SOD,MDA 含量变化的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $mg \cdot kg^{-1}$	SOD/ $U \cdot mg^{-1}$	MDA/ $\mu g \cdot mg^{-1}$
正常	-	$35.28 \pm 4.76^{2)}$	$1.08 \pm 0.19^{2)}$
模型	-	21.45 ± 3.52	2.16 ± 0.38
姬松茸多糖	60	$25.78 \pm 3.94^{1)}$	$1.87 \pm 0.25^{1)}$
	120	$27.36 \pm 4.21^{2)}$	$1.72 \pm 0.23^{2)}$

4 讨论

细胞凋亡是细胞在一定条件下,遵循自身规律,经基因调控程序性地死亡。免疫细胞(尤其是 T 淋巴细胞)在胸腺组织中的分化、成熟与细胞凋亡过程有着十分密切的关系。因此,开展胸腺细胞凋亡的相关研究,有利于揭示免疫活性细胞发育、免疫耐受机制的形成等免疫学问题。

生理剂量的糖皮质激素通过细胞凋亡机制参与调节 T 细胞的发育、分化过程^[4]。临床上,大剂量应用糖皮质激素可诱导胸腺细胞凋亡,引起胸腺急性萎缩。1980 年,Wyllie 等首先将糖皮质激素和胸腺细胞共同孵育,证实糖皮质激素可体外诱导胸腺细胞凋亡。1992 年,Cohen 使用糖皮质激素在去除

肾上腺的动物体内诱导胸腺细胞发生凋亡。糖皮质激素诱导胸腺细胞凋亡成为研究细胞凋亡的经典模型。

线粒体是真核细胞中由双层高度特化的单位膜围成的细胞器,由两层膜包被^[5],外膜平滑,内膜向内折叠形成嵴。线粒体中央由内膜包绕为内室,两层膜之间为外室。内膜存在有质子泵,质子泵将质子从内室泵出,进入外室,从而形成内室为负、外室为正的横跨线粒体内膜的线粒体膜电位,该电位对维持线粒体正常功能极为重要^[6-7]。在细胞凋亡发生早期,凋亡细胞线粒体出现一系列变化,尤为突出的是线粒体膜电位的下降^[8]。细胞凋亡时,线粒体膜的通透性增大^[9],膜两侧的离子重新分布,从而造成线粒体膜电位的迅速下降^[10-11]。稳定线粒体膜电位成为抑制细胞凋亡的重要机制之一。

1980年,Wyllie首先发现凋亡细胞存在DNA特征性断裂。目前,人们对凋亡细胞DNA特征性断裂的详细机制还不清楚。一般认为,细胞凋亡过程激活了一种内源性核酸内切酶,这种酶存在Ca²⁺、Mg²⁺依赖性,可被Zn²⁺抑制。这种内切酶可选择性切断核小体间的连接DNA,使之成为不连续的多倍180~200 bp DNA链,在琼脂糖凝胶上电泳呈“阶梯状”条带。

细胞内氧化还原与细胞凋亡有着密切的关系。Tanaka等^[12]提出mtDNA突变可导致线粒体呼吸衰竭,而呼吸衰竭造成氧自由基(ROS)的生成增加,ROS可进一步促进mtDNA突变,引起呼吸衰竭的恶化和脂质过氧化物的形成,如此循环而导致细胞损伤。

本研究结果显示,与正常组比较,模型组大鼠胸腺细胞透射电镜观察局部可见灶状坏死及散在的细胞碎片,线粒体嵴肿胀明显;胸腺细胞凋亡、DNA断裂率均显著提高,线粒体膜电位显著下降;胸腺组织SOD活性显著下降,MDA含量显著升高。与模型组比较,姬松茸多糖组大鼠胸腺细胞碎片较少,线粒体嵴肿胀现象明显减轻;胸腺细胞凋亡、DNA断裂率均明显下降,线粒体膜电位明显升高;胸腺组织SOD活性均明显升高,MDA含量明显下降。综合本研究结果提示,姬松茸多糖可阻断胸腺细胞DNA断裂和线粒体膜电位的下降,有效抑制DEX诱导的胸腺细胞凋亡,对胸腺细胞氧化损伤有良好防护作用。

其作用机制与姬松茸多糖提高胸腺组织抗氧化功能,从而保护细胞和线粒体免受自由基损伤有关。

[参考文献]

- [1] Mizuno M, Minato K, Ito H, et al. Antitumor polysaccharide from the mycelium of liquid cultured agaricus blazei murill[J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1999, 47(4):707.
- [2] 陆利霞,谷文英,丁霄霖. 姬松茸多糖体外免疫及抗肿瘤作用初步研究药[J]. *药物生物技术*, 2002, 9(6):326.
- [3] 段县平. 姬松茸多糖对肾损伤小鼠血清中尿素氮和肌酐含量的影响[J]. *天津农学院学报*, 2010, 17(1):19.
- [4] Pallardy M, Biola A. Induction of apoptosis in lymphocytes by glucocorticoids: between physiology and pharmacology[J]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1998, 192(6):1051.
- [5] 范颖,才丽平,于彩娜,等. 参附汤、芪附汤、姜附汤对阿霉素心脏毒性损伤大鼠线粒体途径细胞凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(8):135.
- [6] 吴伟,徐蔚. 线粒体通透性转换孔结构和功能的研究进展[J]. *医学信息*, 2011, 24(3):1753.
- [7] 苏米雅,张家新. 哺乳动物细胞凋亡分子机理的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(17):1.
- [8] Zamarr N, Marehetti P, Castedo M, et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*[J]. *J Exp Med*, 1995, 181:1661.
- [9] 史伟,黄仁发,陈延强. 加味附子理中免煎颗粒对急性马兜铃酸肾病大鼠细胞凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(20):190.
- [10] 李蕾,钟进义. 葡多酚对胸腺细胞凋亡和线粒体膜电位的影响[J]. *卫生研究*, 2004, 33(2):191.
- [11] 王通,曾耀英,肇静娴,等. 地塞米松介导胸腺细胞凋亡过程中线粒体和细胞结构蛋白的变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(7):1415.
- [12] Tanaka M, Kovalenko S A, Gong J S, et al. Accumulation of deletions and point mutations in mitochondrial genome in degenerative disease[J]. *Ann Ny Acad Sci*, 1996, 786:102.

[责任编辑 聂淑琴]