

灵芝多糖对 C57BL/6 鼠巨噬细胞 MHC I 类分子表达的影响

Effect of Ganoderma Lucidum Polysaccharide on MHC Class I Molecule Expression on C57BL/6 Mouse Macrophages

杨玉霞 孙宇 车皎子 谢琦琦 段昕所*

Yuxia Yang Yu Sun Jiaozi Che Yuyu Xie Xinsuo Duan*

承德医学院附属医院 中国·河北承德 067000

Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China

摘要: 目的: 探讨灵芝多糖对 C57BL/6 小鼠腹腔巨噬细胞 MHC I 类分子 (H-2Kb 和 H-2Db) 表达的影响。方法: 提取小鼠腹腔巨噬细胞, 贴壁培养 24h 纯化细胞, 分为对照组和实验组 (灵芝多糖浓度分别为 0.2 μ g/mL、0.8 μ g/mL、3.2 μ g/mL、12.8 μ g/mL), 灵芝多糖作用 48h。采用 q RT-PCR 技术检测灵芝多糖处理后 MHC I 类分子 (H-2Kb 和 H-2Db) 的表达情况。结果: RT-qPCR 结果显示, 各组巨噬细胞 H-2Kb mRNA 的相对表达量分别为 1.00 \pm 0.00、0.99 \pm 0.43、1.45 \pm 0.46、1.31 \pm 0.55、1.28 \pm 0.53, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组巨噬细胞 H-2Db mRNA 的相对表达量分别为 1.00 \pm 0.00、3.19 \pm 3.22、10.89 \pm 0.80、12.80 \pm 2.74、7.27 \pm 5.10, 其中 0 μ g/mL 组分别与 0.8 μ g/mL 组、3.2 μ g/mL 组、12.8 μ g/mL 组, 0.2 μ g/mL 组分别与 0.8 μ g/mL 组、3.2 μ g/mL 组、12.8 μ g/mL 组, 3.2 μ g/mL 组与 12.8 μ g/mL 组之间 H-2Db mRNA 的相对表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 灵芝多糖对巨噬细胞 H-2Db 分子的表达具有促进作用。

Abstract: Objective: Explore the effect of Ganoderma lucidum polysaccharides on the expression of MHC class I molecules (H-2Kb and H-2Db) in peritoneal macrophages of C57BL/6 mice. **Methods:** Extract mouse peritoneal macrophages and culture them on the wall for 24 hours to purify cells. Divide them into a control group and an experimental group (the concentrations of Ganoderma lucidum polysaccharides were 0.2 μ g/mL, 0.8 μ g/mL, 3.2 μ g/mL, and 12.8 μ g/mL, respectively). Ganoderma lucidum polysaccharides were treated for 48 hours. The expression of MHC class I molecules (H-2Kb and H-2Db) after treatment with Ganoderma lucidum polysaccharides was detected using q RT-PCR technology. **Results:** The RT-qPCR results showed that the relative expression levels of H-2Kb mRNA in macrophages of each group were 1.00 \pm 0.00, 0.99 \pm 0.43, 1.45 \pm 0.46, 1.31 \pm 0.55, and 1.28 \pm 0.53, respectively, with no statistically significant difference ($P > 0.05$). The relative expression levels of H-2Db mRNA in macrophages of each group were 1.00 \pm 0.00, 3.19 \pm 3.22, 10.89 \pm 0.80, 12.80 \pm 2.74, 7.27 \pm 5.10, respectively. There was a statistically significant difference in the relative expression levels of H-2Db mRNA between the 0 μ g/mL group and the 0.8 μ g/mL group, 3.2 μ g/mL group, and 12.8 μ g/mL group, and between the 3.2 μ g/mL group and 12.8 μ g/mL group, respectively ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ganoderma lucidum polysaccharide can promote the expression of H-2Db on macrophages.

关键词: 灵芝多糖; 巨噬细胞; MHC I 类分子

Keywords: ganoderma lucidum polysaccharide; macrophage; MHC class I molecules

DOI: 10.12346/pmr.v4i6.7941

1 引言

巨噬细胞作为重要的免疫细胞, 不仅在免疫系统中发挥重要的非特异性免疫功能, 还是除树突状细胞外的重要抗原

递呈细胞, 在特异性免疫中发挥重要作用。启动特异性免疫反应必须由抗原递呈细胞将大分子抗原加工处理成小分子抗原肽, 并与 MHC 分子结合成复合物, 被 T 淋巴细胞识别,

【作者简介】杨玉霞 (1995-), 女, 中国河北石家庄人, 硕士, 医师, 从事皮肤肿瘤免疫研究。

【通讯作者】段昕所 (1964-), 男, 教授、主任医师, 硕士生导师, 从事皮肤肿瘤、药物变态反应研究。

使淋巴细胞活化才能实现。MHC I类分子表达于包括巨噬细胞在内的几乎所有核细胞,其经典功能是参与内源性抗原递呈,并将信号传递 CD8⁺ T 细胞。MHC I类分子也参与抗原交叉递呈。巨噬细胞 MHC I类分子的表达对巨噬细胞发挥功能至关重要。灵芝多糖是中药灵芝中的重要有效成分,具有多种生物活性,但其对巨噬细胞 MHC I类分子的影响尚未完全阐明,有待进一步明确。

2 材料和方法

2.1 实验动物

C57BL/6 鼠, 6~8 周龄, 购于北京维通利华公司。

2.2 实验仪器和设备

流式细胞仪为 Beckman Coulter 公司产品; 实时荧光定量 PCR 仪为 Roche 公司产品; CO2 培养箱为 SANYO 公司产品; 离心机为雷勃尔公司产品; DMEM 培养基购自普诺赛公司; 胰蛋白酶购自天津灏洋公司; 灵芝多糖, 由福州绿谷生物药业技术研究所分离提取; TRIzol 购自 Invitrogen 公司; 引物由北京天根公司设计合成; 反转录试剂盒、扩增试剂盒购自北京天根公司; 6cm 培养皿购自洁特公司。

2.3 提取巨噬细胞

取 6~8 周小鼠, 颈椎脱臼, 泡于酒精消毒, 腹腔注射培养基 5mL/只, 置于摇床上摇 8min, 剪开腹膜, 吸出腹腔液, 置于 50mL 离心管中, 2400rpm 离心 5min, 弃上清, 培养基重悬计数, 每皿接种细胞个数为 5×10^6 个。贴壁培养 24h 后换液。

2.4 实验分组

实验分为分别为对照组与实验组(灵芝多糖浓度为 0.2 μ g/mL、0.8 μ g/mL、3.2 μ g/mL、12.8 μ g/mL)。

2.5 qRT-PCR 检测巨噬细胞 MHC I 分子的表达

2.5.1 提取总 RNA

灵芝多糖作用于巨噬细胞 48h 后采用胰酶消化法收集细胞, 收集细胞沉淀, 管中加入 1mL TRIzol 裂解 30min, 加入氯仿 200 μ L 萃取 RNA, 吸出水相层, 加入与水相层等体积的异丙醇以沉淀 RNA, 1mL 无水乙醇洗涤沉淀, 离心弃上清, 室温干燥, 加入 20 μ L 无水水溶解总 RNA, 测量总 RNA 的纯度及含量。提取 RNA 过程中的所有离心条件均为 4 $^{\circ}$ C、12000g、10min。

2.5.2 反转录

取 1 μ g RNA 反转录为 cDNA。

2.5.3 目的基因扩增

对目的基因及内参基因 GAPDH 进行 qRT-PCR 扩增。扩增体系为 20 μ L, 记录 Ct 值, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对量。

2.5.4 统计

采用 SPSS25.0 统计分析实验数据, 统计结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析进行多组间比较, 采用 LSD 检

验进行两两比较, 采用 GraphPad Prism 8.4.2 软件作图, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

qRT-PCR 检测巨噬细胞表面分子 H-2Kb、H-2Db 的表达:

RT-qPCR 结果显示(图 1), 各组巨噬细胞 H-2Kb mRNA 的相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 0.99 ± 0.43 、 1.45 ± 0.46 、 1.31 ± 0.55 、 1.28 ± 0.53 , 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

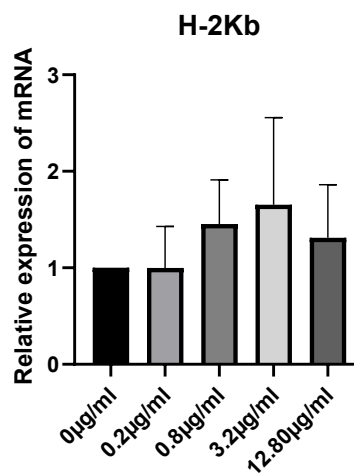


图 1 RT-qPCR 检测巨噬细胞 H-2kb 的表达

如图 2 所示, 各组巨噬细胞 H-2Db mRNA 的相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 3.2 ± 3.22 、 10.89 ± 0.79 、 12.97 ± 2.74 、 7.27 ± 5.10 , 两两比较 0 μ g/mL 组分别与 0.8 μ g/mL 组、3.2 μ g/mL 组、12.8 μ g/mL 组, 0.2 μ g/mL 组分别与 0.8 μ g/mL 组、3.2 μ g/mL 组、12.8 μ g/mL 组, 3.2 μ g/mL 组与 12.8 μ g/mL 组 H-2Db mRNA 的相对表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

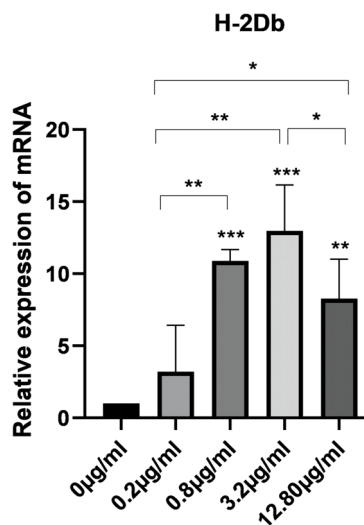


图 2 RT-qPCR 检测巨噬细胞 H-2kb 的表达

注: 与对照组相比: * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$ 。

4 讨论

MHC 被称为主要组织相容性复合体, 在人类中也称为 HLA, MHC I 类分子是由一条 α 链和一条 $\beta 2m$ 链构成的二聚体。 α 链包括 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$, 3 个结构域, 为免疫球蛋白样。其中 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 结构域高度多态性, 提供多肽结合位点, 而 $\alpha 3$ 较保守。一些 MHC I 类分子可与 $\beta 2m$ 链及多肽分离, 在结构上呈展开状态, 暴露出 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 内侧的结构域, 这类 MHC I 类分子通常被称为“开放构象”, 此类“开放构象”的 MHC I 类分子在活化淋巴细胞表面比例增加, 在增殖最活跃时达到最高, 恢复静息后又回到正常表达水平^[1]。

巨噬细胞作为必不可少的免疫细胞, 主要参与适应性免疫与先天免疫。巨噬细胞是除树突状细胞以外的另一个重要的抗原提呈细胞, 在抗原提呈细胞中功能最强, 也因此发挥重要的抗原提呈作用。而 MHC I 类分子的经典功能之一就是其抗原提呈功能。巨噬细胞表面的 MHC I 类分子可结合内质网中的内源性抗原肽片段, 并将其转运到膜表面, 再将此抗原肽片段通过 T 细胞受体提呈给 $CD8^+$ T 细胞, 促发 $CD8^+$ T 细胞的免疫应答反应。T 细胞的抗原特异性免疫应答需要第一信号和第二信号的共同参与。第一信号是 MHC-抗原肽复合物, 第二信号则是共刺激分子如 CD80、CD86。因为 $CD8^+$ T 细胞是机体抗菌、抗病毒、肿瘤杀伤的主要效应细胞, 所以其免疫反应与人的健康状况直接相关。MHC I 类分子的缺失会导致 $CD8^+$ T 细胞发育障碍。MHC I 类分子的非经典功能是通过分子间的偶联作用实现的, 免疫

或非免疫细胞表面 MHC I 类分子之间的偶联可以由某些抗体、配体等刺激触发, 通过特定通路转导特异性信号发挥其非经典功能的生物学效应。

灵芝多糖具有免疫调节^[2]、抗癌、抗炎、抑制血管生成等功能。灵芝多糖可通过 NF- κ B 通路引发巨噬细胞的免疫反应。灵芝多糖还具有促进巨噬细胞增殖、增强巨噬细胞吞噬能力、使巨噬细胞活化为 M1 型等作用。灵芝多糖不能直接杀死肿瘤, 但具有体外抑制肿瘤的能力^[3]。

在本研究中, 灵芝多糖可促进巨噬细胞 MHC I 类分子中 H-2Db 的表达, 而 MHC I 类分子的高表达有助于机体的适应性免疫应答反应。在未来研究中探索灵芝多糖与 MHC I-抗原肽复合物以及 T 细胞受体之间的深层关系, 如灵芝多糖是否有助于 MHC I-抗原肽复合物的形成, 以及是否有助于 MHC I-抗原肽复合物与 T 细胞受体的异性结合, 对于灵芝多糖免疫治疗的应用具有重要意义。

参考文献

- [1] 徐胜.MHC I 类分子和白细胞介素17对天然免疫应答的调控作用及其机制研究[D].上海:第二军医大学,2011.
- [2] Hu Y, Lin Z, Fu H, et al. Immunomodulatory effect of Ganoderma lucidum polysaccharide extract on peritoneal macrophage function of BALB/c mice[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand),2022,68(4):31-34.
- [3] Lu J, He R, Sun P, et al. Molecular mechanisms of bioactive polysaccharides from Ganoderma lucidum (Lingzhi), a review[J]. Int J Biol Macromol,2020,150:765-774.