

Fas 在云芝糖肽诱导 HL-60 细胞凋亡中的作用

李丽美¹, 杨晓彤¹, 糜可¹, 杨庆尧^{1,2}

(1. 上海师范大学 生命与环境科学学院微生物与免疫学研究所, 上海 200234;

2. 上海杨杨百草研究所, 上海 200234)

摘要:目的:探讨云芝糖肽(PSP)诱导 HL-60 细胞凋亡的 Fas 死亡受体信号转导途径. 方法:观察 PSP 处理后 HL-60 细胞的形态变化,并采用流式细胞仪及免疫印迹检测细胞 Fas, FADD 蛋白的表达及 Caspase-8 凋亡酶的激活. 结果:100,400 g/mL PSP 处理 HL-60 细胞 48h 后,细胞出现明显凋亡特征,同时伴随 Caspase-8 酶原被激活和 Fas 抗原的表达量增加,表现为剂量依赖关系. 400 g/mL PSP 处理 36h 时 Caspase-8 酶原开始被剪切激活,48h 时激活更为显著. 各实验组 FADD 的表达量基本没有变化. 结论:Fas 死亡受体信号可能参与了 PSP 诱导 HL-60 细胞凋亡.

关键词:云芝糖肽(PSP); HL-60; 细胞凋亡; Fas; FADD; Caspase-8

中图分类号: Q942 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2007)01-0060-05

0 引言

国家二类新药云芝糖肽(Polysaccharopeptide of *Coriolus versicolor*, PSP)是从云芝 Cov-1 菌株深层培养菌丝体内提取的结合蛋白多糖,药理学研究表明 PSP 具有十分明显的扶正固本作用:能增强机体的免疫功能,诱导 α -干扰素和 γ -干扰素的产生,激活巨噬细胞、NK 细胞、LAK 细胞及 TIL 等抗癌免疫细胞的活性;提高 IL-2, IL-6, 及 TNF 等免疫因子的合成,拮抗化疗药物导致的免疫抑制,加速恢复射线对骨髓造血细胞的伤害,是肿瘤综合治疗中的生物效应调节剂^[1]. PSP 也能够抑制多种肿瘤细胞生长,其机理过去被认为是通过增强宿主免疫功能、间接杀伤肿瘤而实现的^[2],近年来发现 PSP 可以通过诱导肿瘤细胞凋亡的方式直接抑制肿瘤细胞的活性^[3,4]. 细胞凋亡是细胞自身维持体内环境稳态平衡的一种程序性自杀机制,凋亡过程受到一系列调控分子的精密顺序作用,其信号转导通路大致可分为内源线粒体途径和外源死亡受体途径两类. Fas 介导的死亡受体通路是外源凋亡信号通路的一种. Fas 抗原位于细胞膜表面,属于 TNFR/NGFR 超家族成员,表达于多种类型的细胞表面,受到其配体(FasL)或其他激动性抗体激活后通过一系列凋亡分子转导死亡信号从而诱导细胞凋亡. 研究表明,一些抗肿瘤药物在诱导肿瘤细胞凋亡的过程中可上调 Fas 的表达,如果阻断 Fas 信号会部分抑制凋亡的发生^[5]. 已有报道 PSP 可以通过线粒体通路诱导白血病细胞凋亡,但死亡受体信号通路在 PSP 诱导肿瘤细胞凋亡中的作用尚未见报道,本实验研究了 Fas 信号途径在 PSP 诱导 HL-60 细胞凋亡中的作用,为 PSP 的临床

收稿日期: 2006-12-26

基金项目: 香港保健协会;上海杨杨百草研究所.

作者简介: 李丽美(1980-),女,上海师范大学生命与环境学院硕士研究生. 杨晓彤(1967-),男,博士,上海师范大学生命与环境科学学院副研究员.

应用提供更多的实验和理论依据.

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

云芝糖肽(PSP)由香港保健协会提供. 鼠抗人 Fas, 鼠抗人 FADD, 鼠抗人 Caspase-8, cocktail(由 aprotinin, leupeptin, pepstatinA, PMSF, phenanthroline, benzamidine HCl 组成)均为 BD Pharmingen 公司产品; 鼠抗人 Actin 及 HRP 标记的羊抗鼠的二抗购于 Santa Cruz 生物工程公司; 沉淀型 TMB 底物溶液购自北京天为时代有限公司; γ 吖啶橙(AO), 溴化乙啶(EB), 鼠抗人 IgG Isotype 均购自 sigma 公司. 流式细胞仪型号为 BD FACS Calibur, USA BECTON DICKINSON 公司产品, Cellquest 软件分析处理其数据; 荧光显微镜型号为 BX-41, Olympus 公司生产; 垂直电泳槽型号为 VE180, 转移电泳槽型号为 VE186, 电泳仪型号为 EPS-300, 均为上海天能公司产品; 冷冻干燥器型号为 2KBTES-55, 美国生产; 离心机型号为 GS-15R, BECKMAN 公司生产; 凝胶成像仪型号为 FR-200A, 上海复日科技有限公司产品.

1.2 方法

1.2.1 样品预处理

胶囊形式的 PSP 溶于三蒸水中, 离心, 上清液冰冻干燥制成干粉. 将 PSP 冻干粉溶于 CRPMI 中配置成 10mg/mL 的贮备液, 并用 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C 保存.

1.2.2 细胞培养

人急性早幼粒白血病细胞系 HL-60 细胞由香港大学 Jennifer Wan 博士惠赠, 液氮冻存于本研究所中. 复苏后培养在含 10% 胎牛血清, 100 g/mL 链霉素, 100U/mL 青霉素的完全 RPMI-1640 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 及饱和湿度条件下, 2~3d 传代一次, 处于对数生长期的细胞用于实验.

1.2.3 形态学上观察细胞凋亡

细胞密度为 1×10^5 个/mL 的 HL-60 细胞接种于 24 孔板, 24h 后分别加入终浓度为 25 100 400 g/mL 的 PSP. 继续培养 48h 后离心收取, PBS 洗一次, $2.5 \sim 3.5 \times 10^5$ 个细胞加 2 g/mL 的 AO/EB 双重染液 20 L, 室温暗处染 3min, 制成装片, 在荧光显微镜下观察(激发波长: 450~480nm).

1.2.4 流式细胞仪免疫荧光分析 Fas 抗原的表达水平

100 g/mL 的 PSP 处理细胞 48h, 收获细胞, 冷的 PBS 洗两次, 加 1: 200 稀释的鼠抗人 Fas 抗体, 室温结合 1h, 含 1% BSA 的 PBS 洗两次, 加 1: 1000 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠的二抗, 室温暗处结合 1h, PBS 洗两次后用流式细胞仪检测细胞的平均荧光强度. 以 mouse IgG isotype control 代替 Fas 抗体的样品作为阴性对照, 样品实际测得的平均荧光强度减去阴性对照的平均荧光强度, 即为 Fas 抗原的相对表达水平.

1.2.5 免疫印迹分析

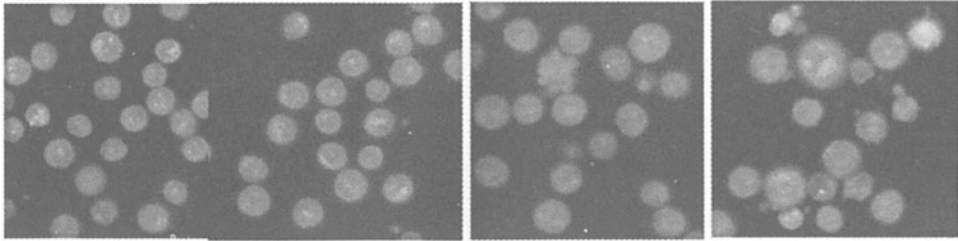
收集的细胞用细胞裂解液裂解(含 25mM HEPES, 150mM NaCl, 0.5% 去氧胆酸钠, 1.0mM DTT, 1mM EDTA, 1% NP40, 0.5mg/mL trypsin inhibitor 的混合液, pH: 7.4), Lowry 法测定蛋白质浓度并调整为一一致. 蛋白质样品经过 SDS-PAGE 电泳(分离胶浓度 12%)后转移到 PVDF 膜上, 用含有 2% 脱脂奶粉的 PBST(含 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液)室温封闭 1h, 加封闭液稀释鼠抗人 Caspase-8 抗体(1: 1000 稀释)或鼠抗人 Fas 抗体(1: 500 稀释), 或鼠抗人 FADD 抗体(1: 1000 稀释), 或鼠抗人 Actin 抗体(1: 500 稀释)室温孵育 2h, 洗涤后加封闭液 1: 2000 稀释的 HRP-羊抗鼠二抗并于室温孵育 1h. 最后膜经 PBST 洗涤后加沉淀型 TMB 底物溶液显色, 凝胶成像仪记录.

2 结果

2.1 HL-60 细胞形态变化

PSP 处理 HL-60 细胞 48h 后, 细胞形态显著变化, 细胞膜出泡, 染色质边集, 核聚缩碎裂, 并产生凋

亡小体等典型凋亡特征(图1).这些形态变化随PSP浓度的增加而增多,并且在400 g/mL PSP处理组中见到大量凋亡小体及可被EB染色的晚期凋亡细胞(实线箭头所指)



→:具有凋亡特征的细胞;

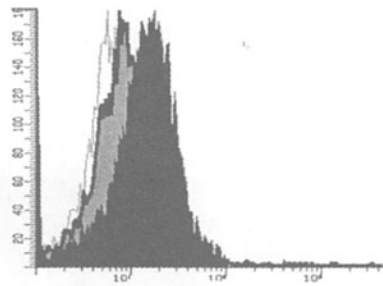
图1 不同浓度的PSP处理48h对HL-60细胞形态的影响(AO/EB双染, x40倍)

2.2 流式细胞仪检测PSP对HL-60细胞Fas抗原表达的影响

免疫荧光染色后,流式细胞仪检测Fas蛋白平均荧光强度,结果显示:HL-60细胞Fas抗原表达量较低,相对平均荧光强度为6.11,100 g/mL PSP处理HL-60细胞48h,Fas抗原的相对平均荧光强度达到17.99,比未处理组的HL-60细胞增加了11.88,说明PSP能上调HL-60细胞Fas抗原的表达(图2).

2.3 Western Blot分析PSP处理后的HL-60细胞Fas,Caspase-8,FADD蛋白的表达

Western Blot的结果显示与对照组相比,100,400 g/mL PSP处理48h后HL-60细胞Caspase-8酶原被剪切激活,出现Caspase-8激活后切片的片段(43/41kd),该条带随PSP药物浓度的增加而加强,表现为剂量依赖关系,Fas蛋白的表达量较对照组有所增加,表明PSP诱导HL-60细胞凋亡与死亡Fas受体信号通路调控有关.400 g/mL PSP处理36h时Caspase-8酶原开始被剪切激活,达到48hCaspase-8酶原的激活更加显著,各实验组FADD蛋白的表达量基本没有变化(图3).



□:阴性对照组;■:CK的Fas蛋白表达组;

■:100 g ml PSP处理后Fas蛋白表达组

图2 流式细胞仪检测细胞表面Fas蛋白的表达

3 讨论

云芝糖肽是用于肿瘤病人辅助治疗的国家二类新药,用于提高机体免疫功能、抑制肿瘤、拮抗化疗、放疗产生的毒副作用并提高化疗、放疗和手术治疗的抗癌效果,可以减轻癌症病人痛苦,改善癌症患者食欲减退,提高癌症病人的生存质量^[6].诱导凋亡是肿瘤治疗中的重要手段之一,PSP直接抑瘤活性与诱导肿瘤细胞凋亡有关^[3,4].Yang等进一步研究了PSP诱导HL-60细胞凋亡的机理,发现PSP可促进细胞色素c释放、Bcl-2/Bax比例下调、线粒体膜电位丧失、Caspase-3和-9激活等发生,表明PSP诱导的凋亡与内源性线粒体信号转导途径有关^[4].但死亡受体信号在PSP诱导凋亡的过程的作用还未见报道.外源信号通路又称死亡受体信号通路,由属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族的死亡受体分子介导,主要包括Fas(Apo-1/CD95)、TNFR1、DR3、DR4和DR5.目前研究的比较清楚的是Fas介导的细胞凋亡途径.Fas具有3个富含半胱氨酸的胞外区和1个称为死亡结构域(Death domain,DD)的胞内区.Fas在其配体FasL(Fas ligand)或其他激动性抗体的刺激下激活后,Fas三聚化使胞内的DD区构象改变,然后与接头蛋白FADD(Fas-associated death domain)的DD区结合,而后FADD的N端DED区(death

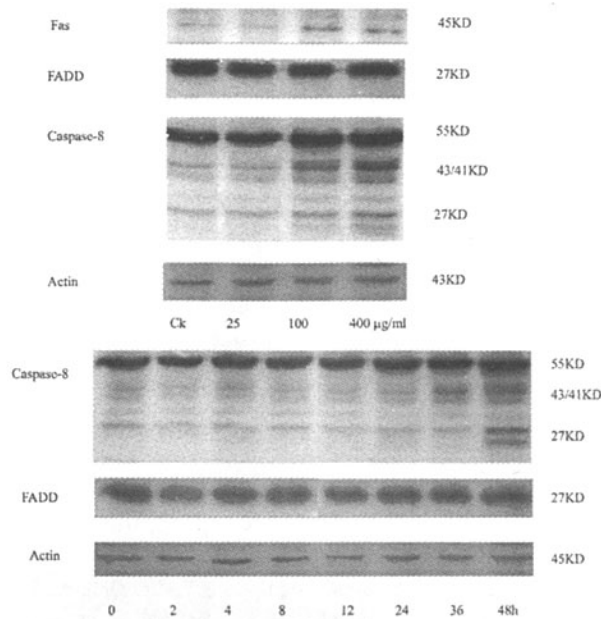


图 3 PSP 对 Fas, FADD, Caspase - 8 蛋白表达的影响

effector domain) 就能与 Caspase - 8 (或 - 10) 前体蛋白结合, 形成 DISC (death - inducing signaling complex)^[7], 引起 caspase - 8、10 通过自身剪激活, 它们启动 caspase 的级联反应, 使 caspase - 3、-6、-7 激活, 这几种 Caspase 可降解胞内结构蛋白和功能蛋白, 最终导致细胞凋亡^[8-10]. 我们的实验结果证实了 PSP 在诱导 HL - 60 细胞凋亡的过程中有 Caspase - 8 的激活和 Fas 表达的上调, 这说明 Fas 信号途径在 PSP 诱导肿瘤细胞凋亡中起着重要的作用. 死亡受体被激活后并不能把凋亡信号直接传递给 Caspases, 还需要一种称为 adaptor 的连接蛋白作为媒介, FADD 在 Fas 介导的凋亡信号传递中扮演的便是这种角色, 敲除 FADD 基因或转染 FADD 突变体, 均可影响 Fas 触发的细胞凋亡. 我们用 Western Blot 技术检测 PSP 处理后 HL - 60 细胞株 FADD 的表达发现 FADD 的表达量几乎没有变化, 因此 Fas 激活后可能是通过招募细胞内的 FADD 来传递死亡信号的. 我们将会通过共聚焦显微镜观察 FADD 在 HL - 60 细胞内的分布变化进一步证实这一推测. 此外, 死亡受体通路与线粒体通路的相互作用有待进一步阐明, 相信随着研究的不断深入, 会使 PSP 诱导白血病细胞凋亡的机制得到更清晰的阐述, 为白血病的治疗提供新的思路和方法.

参考文献:

- [1] YANG Q Y. Advance research in PSP[Z]. The Hong Kong association for health care Ltd, 1999.
- [2] LI XY. Advance in immunomodulating studies of PSP[Z]. 1999;39 - 46.
- [3] CHEUK - LUN LEE, YANG X T, JENNIFER MAN - FAN WAN. The culture duration affects the immunomodulatory and anticancer effect of polysaccharopeptide derived from *Coriolus versicolor*[J]. Enzyme and microbial technology, 2005.
- [4] YANG X T, WAI - HUNG SIT, DANIEL KWONG - ON CHAN, JENNIFER MAN - FAN WAN. The cell death process of the anticancer agent polysaccharide - peptide (PSP) in human promyelocytic leukemic HL - 60 cells[J]. Oncol rep, 2005, 13(6):1201 - 1210.

- [5] FULDA S, SIEVERTS H, FRIESEN C, et al. The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(17):3823.
- [6] YANG Q Y. Yun Zhi polysaccharopeptide (PSP) and the general aspects of its research [J]. *Fung Sci*, 1997, 12(1, 2):1-8.
- [7] KLAUS - MICHAEL DEBATIN, PETER H KRAMMER. Death receptors in chemotherapy and cancer[J]. *Oncogene* 2004, 23: 2950 - 2966.
- [8] ASHKENAZI A, DIXIT V M. Death Receptors: Signaling and Modulation[J]. *Science (Wash D C)*, 1998, 281:1305 - 1308.
- [9] SCAFFIDI C, FULDA S, SRINIVASAN A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways[J]. *EMBO J*, 1998, 17:1675 - 1687.
- [10] SCAFFIDI C, SCHMITZ I, ZHA J, et al. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274:22532 - 22538.

Polysaccharopeptide of *Coriolus versicolor* (PSP) induced apoptosis in HL-60 cells related to the upregulation of Fas

Li Li-mei¹, YANG Xiao-tong¹, MI Ke¹, YANG Qing-yao^{1,2}

(1. College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China;

2. Shanghai Yang's Herb Institute, Shanghai 200234, China)

Abstract: Objective: To investigate the apoptosis-induce-effect of PSP on human leukemia cell HL-60 cell and to study the possible role of death receptor molecules Fas in the process. Methods: Morphological study was used to detect apoptosis events. Caspase-8 activation and Fas/FADD expression were analyzed by means of western blot and Flow cytometry. Results: PSP at concentrations above 100 g/mL could significantly induce apoptosis in HL-60 cell after 48 hours treatment. During the process, caspase-8 was activated and Fas expression was up-regulated, while FADD expression remained unchanged. Conclusion: PSP can induce apoptosis in HL-60 cells, and the Fas mediated death receptor pathway may play a role in death regulatory mechanisms.

Key words: Polysaccharopeptide of *Coriolus versicolor*(PSP); HL-60; apoptosis; Fas; FADD; Caspase-8

(责任编辑:吴澄)