

硫酸酯化马尾松花粉多糖对小鼠脾脏 B淋巴细胞免疫调节作用的研究

刘 铭 李娜娜 耿 越*

(山东省动物抗性生物学重点实验室, 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

摘要 研究60%乙醇提取的马尾松花粉多糖组分D(PPM60-D)及其硫酸酯化物(SPPM60-D)对小鼠脾脏B淋巴细胞增殖、细胞内游离钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)及抗体生成的影响。水煮醇沉法提取得到粗多糖, 乙醇分级沉淀得到60%乙醇沉淀多糖PPM60, Sephacryl S-400HR分离纯化得到多糖组分D, 用氯磺酸-吡啶法对组分D进行硫酸酯化, 尼龙毛法分离B淋巴细胞, MTT法测定其增殖, 荧光分光光度计测定B淋巴细胞 $[Ca^{2+}]_i$, 溶血空斑实验(PFC)和定量溶血分光光度(QHS)法测定B细胞抗体生成情况。结果显示, SPPM60-D相对于PPM60-D能更显著地提高B淋巴细胞的增殖以及 $[Ca^{2+}]_i$ ($P < 0.01$); 经TAK-242、LY294002、U73122、低分子肝素、维拉帕米和2-APB抑制剂作用后, 均可抑制SPPM60-D和PPM60-D所致的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); PFC和QHS检测证实, SPPM60-D对于促进B淋巴细胞的分化及抗体的生成有显著作用, 而PPM60-D的作用较弱。以上研究表明, PPM60-D经过硫酸酯化改性后, 活性明显提高, 推测SPPM60-D可与B淋巴细胞上TOLL样受体4(TLR4)结合, 通过TLR4-PI3K-PLC-IP₃R信号通路使钙库释放激活的钙通道(CRAC)打开, 从而使 $[Ca^{2+}]_i$ 升高来激活B淋巴细胞, 进而提高其体外增殖和抗体生成能力。

关键词 马尾松花粉; 硫酸酯化多糖; B淋巴细胞; 增殖; $[Ca^{2+}]_i$; 抗体生成

Influences of Sulfated Polysaccharide from Pine (*Pinus massoniana*) Pollen on the Immunomodulatory Effects of B Lymphocytes in Mice

Liu Ming, Li Nana, Geng Yue*

(Key Laboratory of Animal Resistance Biology of Shandong Province, College of Life Science,
Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract We investigated the influences of a polysaccharide component D (PPM60-D) and its sulphate (SPPM60-D) from masson pine pollen on the proliferation, intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) and antibody production of B lymphocytes in mice. Polysaccharides (PPM60) were extracted from masson pine pollen with hot water and precipitated by 60% ethanol. PPM60-D was purified from PPM60 with Sephacryl S-400HR. Sulfated polysaccharides (SPPM60-D) was derivated by chlorosulfonic acid-pyridine method. B lymphocytes were separated through nylon wool column. $[Ca^{2+}]_i$ of B lymphocytes were measured by fluorescence sepectrophotometer. The antibody production were measured by PFC and QHS methods. The results showed that SPPM60-D could more significantly improve the proliferation, $[Ca^{2+}]_i$ and antibody production of B lymphocytes than PPM60-D

收稿日期: 2013-10-21 接受日期: 2013-12-24

山东省自然科学基金(批准号: Y2008D13)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0531-86180196, E-mail: gengyue@sdu.edu.cn

Received: October 21, 2013 Accepted: December 24, 2013

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (Grant No. Y2008D13)

*Corresponding author. Tel: +86-531-86180196, E-mail: gengyue@sdu.edu.cn

网络出版时间: 2014-03-24 11:08 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0337.html>

($P < 0.01$). TAK-242, LY294002, U73122, low molecular heparin, verapamil and 2-APB could inhibit the increase of $[Ca^{2+}]_i$ in B lymphocytes which was induced by PPM60-D and SPPM60-D ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). These suggested that SPPM60-D had higher activity than PPM60-D and one of the possible receptors of SPPM60-D was toll like receptor 4 (TLR4). We speculated that SPPM60-D could increase $[Ca^{2+}]_i$ via Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channel which was activated by TLR4-PI3K-PLC-IP₃R signaling pathway, so that it could improve the ability of proliferation and antibody production of B lymphocytes.

Key words masson pine pollen; sulfated polysaccharide; B lymphocyte; proliferation; $[Ca^{2+}]_i$; antibody production

多糖(polysaccharide)是一类广泛存在于动植物体内和微生物细胞壁中、由多个单糖分子聚合而成的天然高分子聚合物,是构成生命的四大基本物质之一^[1]。硫酸酯化多糖(sulfated polysaccharides, SPS)是多糖中研究较多的一类天然或人工化学修饰多糖,具有广泛的生物学性质,如抗病毒、抗肿瘤、抗艾滋病、抗疲劳、抗凝血和活化免疫系统作用等,因而受到了极大的关注^[2]。为了进一步提高多糖的生物活性或增强多糖原有的生物功能,利用化学方法对多糖进行硫酸化修饰已是近年来比较成熟和有效的方法之一。

研究表明,多糖及硫酸酯化多糖对免疫系统有重要的调节作用,通过与免疫细胞表面的受体结合后,可以激活细胞内多种信号通路,最终表现为能够刺激淋巴细胞增殖并产生免疫相关因子等^[3-6]。钙离子信号通路在调控淋巴细胞的增殖、分化、基因转录和免疫应答方面发挥着重要作用^[7]。本研究前期已证实,硫酸酯化马尾松花粉多糖能促进脾脏淋巴混悬细胞的增殖,提高 $[Ca^{2+}]_i$ 并促进细胞因子IL-2和IL-4的产生^[8],同时能够增强小鼠体内的抗肿瘤和机体免疫能力^[9],但是并没有进一步研究硫酸酯化马尾松花粉多糖对经分离纯化的T、B淋巴细胞的具体作用效果。本实验通过从小鼠脾脏中分离B淋巴细胞,研究马尾松花粉多糖酯化前后对B淋巴细胞增殖、 $[Ca^{2+}]_i$ 、钙离子信号通路以及抗体生成的影响。

1 材料与方

1.1 材料与试剂

破壁马尾松(*Pinus massoniana*)花粉由烟台新时代健康产业集团提供,破壁率大于95%。参照本实验室的方法^[10]提取纯化多糖,60%乙醇沉淀组分命名为PPM60。经Sephacryl S-400HR分离纯化后得到5个组分,选取其中含量较高的组分命名为

PPM60-D。用氯磺酸-吡啶法对PPM60-D进行硫酸酯化,得到相应的酯化多糖SPPM60-D,经红外光谱分析,并用硫酸钡比浊法测定硫含量代入公式计算得硫酸基的取代度。

RPMI1640(Gibco, 美国); HBSS(含钙镁, Hyclone, 美国); 胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司); MTT(Klontech, 美国); 石蜡、LPS、U73122、2-APB、EGTA(Sigma, 美国); LY294002(上海碧云天生物技术有限公司); DMSO(北京索莱宝科技有限公司); TAK-242(Invitrogen, 美国); Fura-2/AM、Pluronic F127(Dojin, 日本); Triton X-100、2-巯基乙醇(Amresco, 美国); 维拉帕米(Verapamil, Ver.)注射液(上海禾丰制药有限公司); 低分子肝素(LMWH)钠注射液(Sanofi-aventis, 法国); Anti-Mouse-CD19 PE(eBioscience, 美国); 尼龙毛(Kisker, 德国); 无菌脱纤维绵羊血、豚鼠血清(广州瑞特生物有限公司); 其他均为国产分析纯试剂。

昆明种小鼠,2月龄,购自山东中医药大学SPF级实验动物中心。

1.2 仪器

TU-1810PC紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); StatFax-2100型酶联免疫检测仪(Awareness, 美国); 双波长荧光分光光度计(Cary Eclipse, 美国); 二氧化碳培养箱(NUAIRE, 美国); 5804R离心机(Eppendorf, 德国); 倒置显微镜(Olympus, 日本)。

1.3 SPPM60-D对B淋巴细胞增殖的影响

实验室常规无菌制备小鼠脾脏细胞,采用尼龙毛柱法分离制备B淋巴细胞。经台盼蓝(Trypan blue)排斥实验检查细胞成活率 $\geq 90\%$,将所得的B淋巴细胞悬液加入PE染料标记的CD19单克隆抗体后,经流式细胞仪检测细胞纯度 $\geq 65.5\%$ 。调整细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$,MTT法检测对B淋巴细胞增殖的

影响。以10 mg/L的LPS作为阳性对照, PPM60-D和SPMM60-D的终浓度分别为50, 100, 200, 400 mg/L, 于37 °C、5% CO₂培养箱中培养24, 48, 72 h后, 每孔加入MTT作用液20 μL, 孵育4 h后, 离心去上清, 再在每孔加入150 μL DMSO, 测定吸光值。

1.4 B淋巴细胞[Ca²⁺]_i的测定

调细胞浓度为1×10⁷/mL, LPS终浓度为10 mg/L, PPM60-D和SPPM60-D的终浓度为200 mg/L, 参照文献[11]的方法进行。[Ca²⁺]_i计算公式如下:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R}$$

生理条件下, K_d=224 nmol/L, Ca²⁺浓度的单位为nmol/L。

1.5 SPPM60-D与钙离子信号通路抑制剂对B细胞[Ca²⁺]_i的影响

调细胞浓度为1×10⁶/mL, 实验组分别加入终浓度为200 mg/L的PPM60-D或SPPM60-D。抑制剂组分别加入TAK-242(终浓度1 mg/L)、LY294002(终浓度20 μmol/L)、U73122(终浓度10 μmol/L)、低分子量肝素(终浓度0.1 IU/L)、维拉帕米(终浓度10 mg/L)和2-APB(终浓度50 μmol/L)孵育后, 再加入PPM60-D和SPPM60-D, 之后的[Ca²⁺]_i的测定同“1.4”进行。

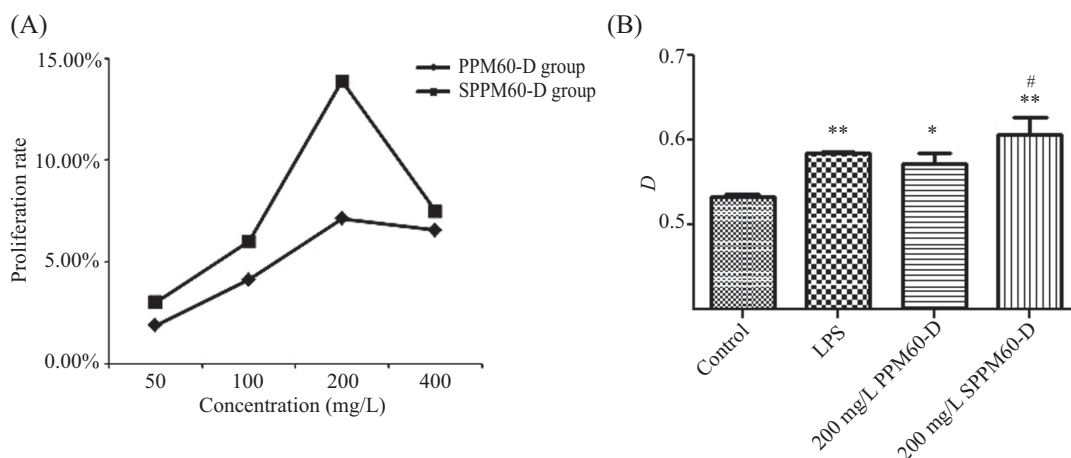
1.6 B淋巴细胞免疫功能的检测

溶血空斑实验(plaque forming cell assay, PFC)和定量溶血分光光度法(quantitated hemolysis spec-

trophotometric method, QHS)参照文献[12-15]并进行适当修改。实验分为体外免疫实验和体内免疫体外刺激实验两部分。

体外免疫实验: 处死小鼠, 常规无菌取脾, 制成约5×10⁶/mL的细胞悬液并分别用LPS(10 mg/L)、PPM60-D(200 mg/L)和SPPM60-D(200 mg/L)培养。3 d后IgM水平通过QHS法测定, 抗体生成细胞(antibody forming cells, AFCs)用PFC实验来计数。PFC实验采用Cunningham-Szenberg小室液相法, 将免疫的细胞、15% SRBC以及1:5稀释的补体(使用前已经SRBC吸收)混合后成为小室液(共2 000 μL), 分别取40 μL各组小室液注入一对小室中, 小室两端封蜡后连同剩余的小室液于37 °C培养箱中孵育, 1 h后显微镜下计数空斑并以AFCs/10⁶细胞计数。将剩余的小室液取出, 1 500 r/min离心5 min, 取上清液在413 nm处检测SRBC释放的血红蛋白值, 以光吸收值表示B淋巴细胞IgM抗体的产量。

体内免疫体外刺激实验: 用5% SRBC对小鼠进行免疫, 4 d后处死小鼠, 常规无菌取脾, 制成约1×10⁷/mL的细胞悬液备用, 参照“体外免疫实验”的方法制备小室液, 其中小室液分为空白对照组和实验组, 实验组中的小室液分别含LPS(10 mg/L)、PPM60-D(200 mg/L)和SPPM60-D(200 mg/L)。分别取40 μL各处理组小室液注入一对小室中, 小室两端封蜡后连同剩余的小室液于37 °C培养箱中孵育, 1 h后按“体外免疫实验”的方法进行检测。



A: B淋巴细胞在不同浓度PPM60-D、SPPM60-D作用下48 h的增殖率; B: B淋巴细胞在200 mg/L浓度PPM60-D和SPPM60-D作用下48 h增殖效果的比较。**P*<0.05, ***P*<0.01, 与空白对照组比较; #*P*<0.05, 与PPM60-D处理组比较。

A: the proliferation rate of B lymphocytes in different PPM60-D and SPPM60-D concentrations at 48 h; B: the proliferation effect of B lymphocytes in 200 mg/L PPM60-D and SPPM60-D at 48 h. **P*<0.05, ***P*<0.01 compared with control group; #*P*<0.05 compared with PPM60-D group.

图1 B淋巴细胞在不同浓度PPM60-D、SPPM60-D作用下48 h的增殖情况

Fig.1 The proliferation effects of B lymphocytes in different PPM60-D and SPPM60-D concentrations at 48 h

1.7 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析, 结果以($\bar{x}\pm s$)表示, 组间差异用t检验进行显著性分析。

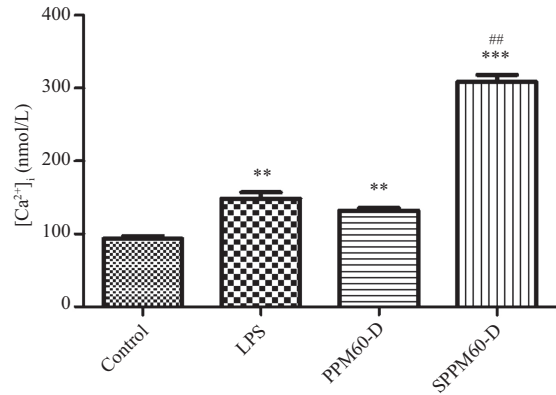
2 结果

2.1 SPPM60-D的红外光谱分析和取代度测定

红外光谱分析证实, SPPM60-D具有硫酸酯化的特征性吸收峰, 表明PPM60-D已被成功硫酸酯化。经硫酸钡比浊法测得硫含量, 代入公式计算得SPPM60-D的取代度为1.202。

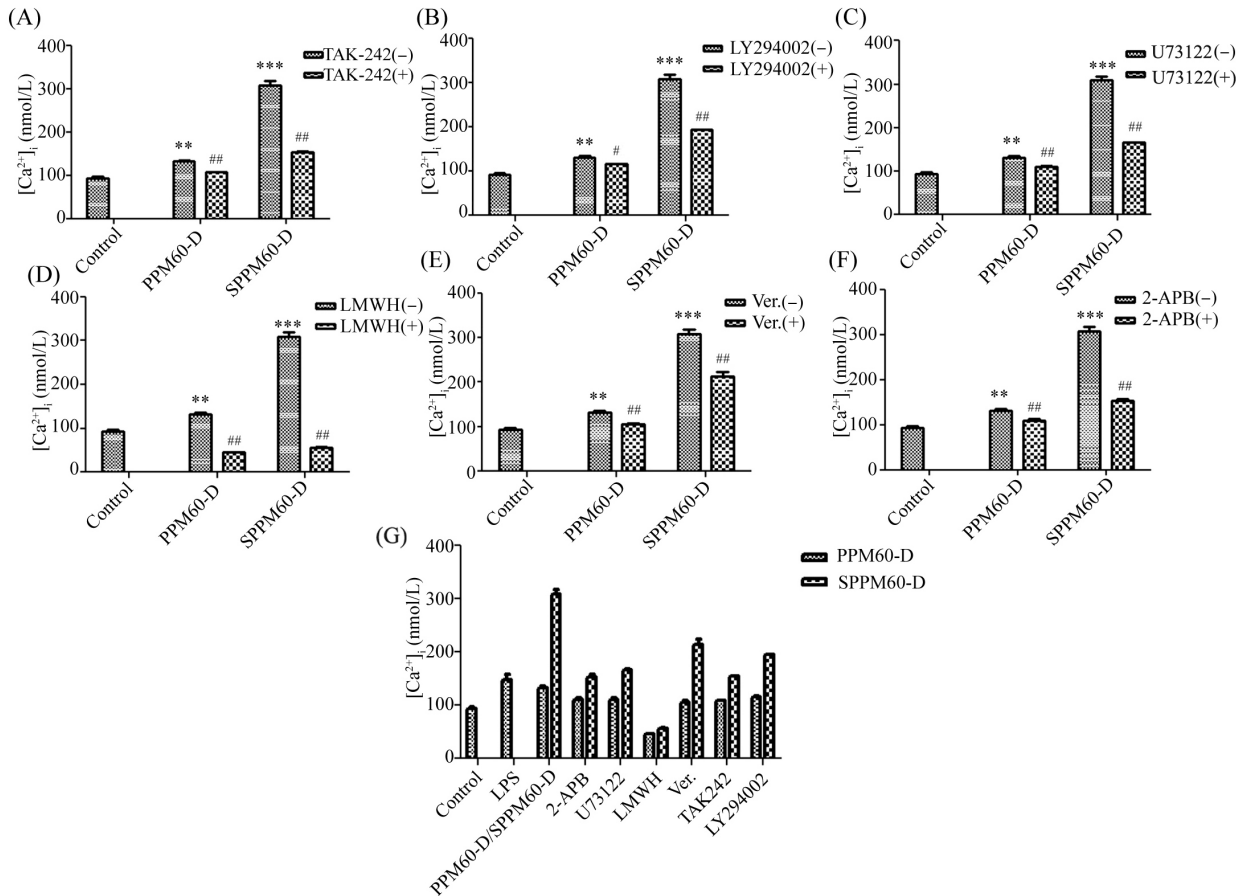
2.2 SPPM60-D对B淋巴细胞增殖的影响

在培养24, 48, 72 h后, PPM60-D和SPPM60-D对B淋巴细胞增殖有不同程度的促进作用, 且存在最适剂量(图1A)。在200 mg/L的浓度下培养48 h后, 增殖效果最高, 并且SPPM60-D的促进效果要显著高于



P<0.01, *P<0.001, 与空白对照组比较; ##P<0.01, 与PPM60-D处理组比较。
P<0.01, *P<0.001 compared with control group; ##P<0.01 compared with PPM60-D group.

图2 PPM60-D及SPPM60-D对B淋巴细胞[Ca²⁺]_i的影响
Fig.2 The influence of PPM60-D and SPPM60-D on [Ca²⁺]_i in B lymphocytes

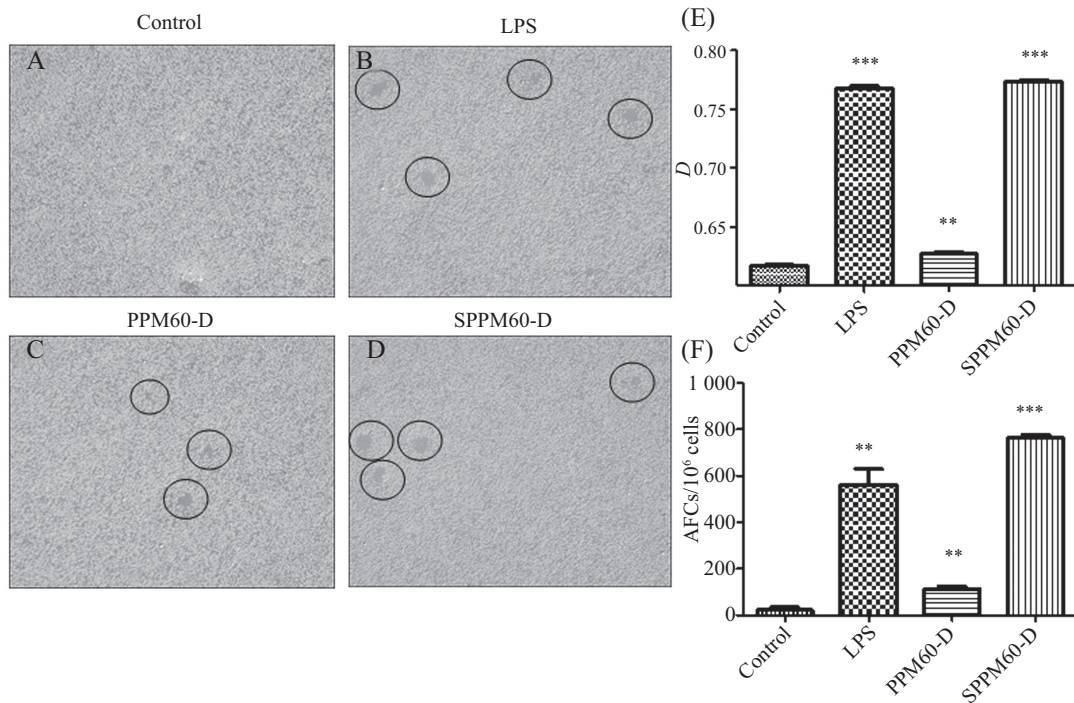


A~F: 分别在TAK-242、LY294002、U73122、低分子肝素、维拉帕米和2-APB作用下PPM60-D和SPPM60-D对B淋巴细胞[Ca²⁺]_i升高的结果; G: 6种抑制剂的作用结果比较。 **P<0.01, ***P<0.001, 与空白对照组比较; #P<0.05, ##P<0.01, 与实验组比较。

A-F: the results of [Ca²⁺]_i in B lymphocytes with PPM60-D and SPPM60-D under TAK-242, LY294002, U73122, LMWH, Verapamil or 2-APB; G: the comparison of effects of the 6 inhibitors. **P<0.01, ***P<0.001 compared with control group; #P<0.05, ##P<0.01 compared with experimental group.

图3 6种抑制剂对PPM60-D和SPPM60-D升高B淋巴细胞[Ca²⁺]_i的抑制作用

Fig.3 The inhibitory effect of 6 inhibitors on [Ca²⁺]_i level increment in B cells induced by PPM60-D and SPPM60-D

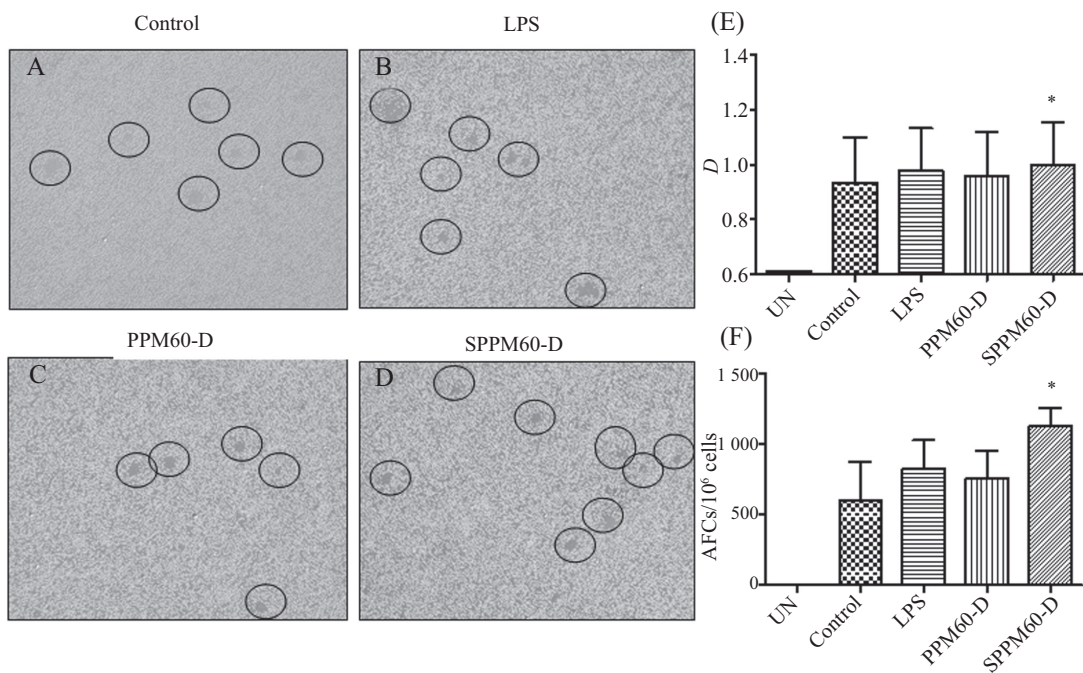


A~D: 不同条件下B细胞产生的溶血空斑情况(100×); E: QHS检测结果; F: 抗体形成细胞数, 以每百万个脾细胞中抗体生成细胞数表示。
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较。

A, B, C and D were hemolytic plaque forming of B cells in different conditions respectively (100×); E: the result of QHS assay; F: the number of antibody forming cells per million spleen cells. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group.

图4 PPM60-D和SPPM60-D体外对B细胞抗体生成的影响

Fig.4 The influence of PPM60-D and SPPM60-D on IgM antibody production of B cells *in vitro*



A~D: 不同条件下B细胞产生的溶血空斑情况(100×); E: 抗体形成细胞数; F: QHS检测结果, * $P < 0.05$, 与对照组比较。

A, B, C and D were hemolytic plaque forming of immunized B cells in different conditions respectively (100×); E: the number of antibody forming cells per million spleen cells; F: the result of QHS assay, * $P < 0.05$ compared with control group.

图5 PPM60-D和SPPM60-D体外对已经免疫的B细胞抗体生成的影响

Fig.5 The influence of PPM60-D and SPPM60-D on IgM antibody production of immunized B cells *in vitro*

PPM60-D(图1B), 因此后续实验都采用200 mg/L的浓度进行。

2.3 SPPM60-D对B淋巴细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

小鼠B淋巴细胞在未受刺激状态下 $[Ca^{2+}]_i$ 为 (93.54 ± 3.54) nmol/L, 加入PPM60-D作用5 min后 $[Ca^{2+}]_i$ 为 (132.10 ± 3.79) nmol/L($P < 0.01$); 而SPPM60-D作用后 $[Ca^{2+}]_i$ 为 (308.90 ± 9.24) nmol/L($P < 0.001$), 对B细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 有极显著升高作用, 与空白组相比 $[Ca^{2+}]_i$ 上升了230.23%, 与PPM60-D组相比上升了133.84% ($P < 0.01$), 如图2所示。

2.4 钙离子信号通路抑制剂对SPPM60-D作用的小鼠B细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

结果如图3所示, 经TLR4抑制剂TAK-242处理后, PPM60-D和SPPM60-D所致的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高率分别由41.22%和230.23%下降为15.49%和64.72%, 分别被抑制了18.22%和50.12%(与PPM60-D和SPPM60-D单独处理相比, 下同), 说明PPM60-D和SPPM60-D都主要通过TLR4来发挥对B细胞的刺激作用, 同时也通过其他B细胞表面受体来发挥作用; 经PI3K抑制剂LY294002处理后, $[Ca^{2+}]_i$ 升高率降为24.29%和108.78%, 分别被抑制了11.99%和36.78%, 说明PI3K部分参与了B细胞内 Ca^{2+} 信号通路; 经PLC抑制剂U73122处理后, $[Ca^{2+}]_i$ 升高率降为17.39%和77.63%, 分别被抑制了16.02%和46.21%, 说明PLC主要参与了B细胞内 Ca^{2+} 信号通路; 经 IP_3R 抑制剂LMWH处理后, 使得B细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 不升反降, 与空白组比分别下降了51.83%和39.61%, 说明 IP_3R 是 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的关键位点, $[Ca^{2+}]_i$ 的大幅升高可能是由内质网钙库中 Ca^{2+} 的释放引起的; 经L-型钙离子通道抑制剂维拉帕米处理后, $[Ca^{2+}]_i$ 升高率降为13.09%和128.19%, 分别被抑制了19.92%和30.90%, 说明B细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高部分上是由细胞外的 Ca^{2+} 通过L-型钙离子通道内流到细胞内造成的, 但不是主要的钙离子通道; 而经CRAC通道抑制剂2-APB处理后, $[Ca^{2+}]_i$ 升高率降为18.50%和63.61%, 分别被抑制了16.09%和50.46%, 说明B细胞中钙离子的大量内流主要是通过CRAC通道引起的。

2.5 SPPM60-D对B细胞抗体生成的影响

经PFC和QHS检测发现, SPPM60-D能在体外显著激活B细胞成为分泌抗体的浆细胞并且促进IgM抗体水平的升高, 而PPM60-D的作用较弱(结果见图4)。

体内免疫体外刺激试验可见, B细胞在体外经

SPPM60-D作用5 min后, $[Ca^{2+}]_i$ 便会有显著地升高, 说明SPPM60-D可能对B淋巴细胞有较快的激活作用。因此, 用已在体内免疫的脾脏细胞, 通过在体外与SRBC反应时加入PPM60-D和SPPM60-D共同孵育, 检测PPM60-D和SPPM60-D是否可以快速地刺激浆细胞促进抗体的分泌水平。结果如图5所示, SPPM60-D可以在体外快速激活浆细胞, 促进其抗体的分泌。

3 讨论

近年来, 很多研究已经发现多糖经过硫酸酯化分子修饰以后, 可以提高其活性, 或使其具有新的功能。本实验室前期已经证实, 马尾松花粉多糖(PPM)经过硫酸酯化后, 其活性相对于PPM明显增强, 能显著促进体外脾脏混悬淋巴细胞的增殖、 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高以及IL-2和IL-4的分泌^[8-11]。本实验发现, 经硫酸酯化后得到的SPPM60-D的活性要显著高于PPM60-D, 能明显激活B淋巴细胞, 同时存在最适的作用浓度。分析其可能的原因为天然多糖的相对分子质量大, 离子性差, 而经硫酸化修饰后, 游离羟基引入硫酸基团, 支链带上负电荷, 从而使多糖具有了聚阴离子的特性。另外, 硫酸基团也造成了空间非共价键的重新分布, 带来的静电排斥效应改变了多糖的构象, 使多糖更易与细胞表面的受体结合, 从而能更好地发挥其生物活性。然而, 本实验也发现, PPM60-D对B淋巴细胞也有一定的激活作用, 可能的原因在于B淋巴细胞表面受体的多样性, 使PPM60-D能够与B淋巴细胞表面的某些受体结合, 从而对活化B淋巴细胞也能发挥一定的作用。

钙离子作为细胞内重要的第二信使, 参与调控淋巴细胞的增殖、分化以及效应功能^[6], 因此研究淋巴细胞中钙离子信号通路具有重要的意义。 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高是细胞活化早期的表现之一^[17], 本实验检测经SPPM60-D作用后B淋巴细胞的 $[Ca^{2+}]_i$, 证实了SPPM60-D所致的B淋巴细胞的活化伴随着细胞内钙离子信号通路的激活。与本实验室前期以及同步进行的SPPM60对脾脏混悬淋巴细胞和SPPM60-D对T细胞^[18]的研究进行比较发现, SPPM60-D作用于B淋巴细胞后, 跟T细胞有相似的钙离子信号通路。SPPM60-D与细胞表面受体作用后, 都经过PI3K-PLC- IP_3R 通路激活内质网钙库, 使得内质网中的钙离子释放到细胞质中。当钙库耗竭后, 会刺

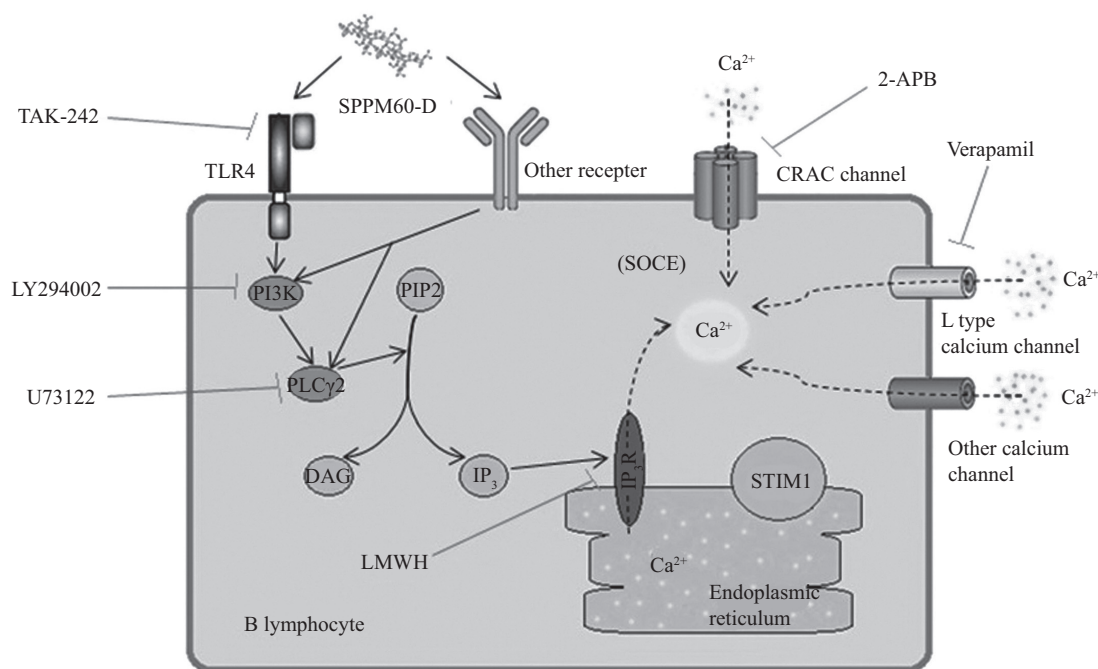


图6 推测的SPPM60-D激活B淋巴细胞的钙离子信号通路

Fig.6 Speculated calcium signaling pathway in B lymphocyte activated by SPPM60-D

激CRAC通道打开,使得细胞外钙离子大量内流,最终造成 $[Ca^{2+}]_i$ 的大幅升高,即钙库操纵的钙离子内流(store-operated Ca^{2+} entry, SOCE)过程。其中经PI3K抑制剂LY294002和PLC抑制剂U73122作用后,SPPM60-D所致的细胞内钙离子浓度升高被抑制了36.78%和46.21%,说明PI3K和PLC在钙离子信号通路中发挥重要作用,而上述抑制剂的处理并没有使B淋巴 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高降到空白水平,说明除了PI3K、PLC这条通路,还有其他的分子及通路参与了B淋巴细胞内钙离子浓度的升高;经IP₃R抑制剂LMWH作用后,SPPM60-D对细胞内钙离子的浓度不升反降,说明IP₃R对于内质网钙库中钙离子的释放发挥着重要作用,同时也说明了内质网钙库对于最终细胞外钙离子的大量流入所造成的 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高发挥了关键的作用;另外,经L-型钙离子通道抑制剂维拉帕米和CRAC通道抑制剂2-APB作用后,SPPM60-D所致的细胞内钙离子浓度升高分别被抑制了30.90%和63.61%,说明L-型钙离子通道和CRAC通道都在细胞外钙离子大量流入中发挥了作用,其中CRAC通道更是发挥了主要作用,其结果与报道相一致^[9]。但上述两种抑制剂并未完全阻断细胞内钙离子浓度的升高。综上,可以推断出SPPM60-D所引起的B淋巴细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的一种可能的信号通路: SPPM60-D作用于TLR4和其他受

体后激活PI3K, PI3K和其他信号分子的活化激活了PLC γ 2, PLC γ 2可以使PIP₂水解成DAG和IP₃两个信号分子,其中IP₃作用于内质网上的IP₃受体使得内质网钙库中的 Ca^{2+} 释放出来,引起 $[Ca^{2+}]_i$ 的小幅上升,内质网钙库的耗竭又导致了CRAC通道的开放,引起细胞外 Ca^{2+} 的大量内流,最终造成了B淋巴细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 的大幅升高。同时, L-型钙离子通道和其他钙离子通道可能也参与到了SPPM60-D所致的B淋巴细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的过程中,如图6所示。

关于B淋巴细胞表面多糖的受体,从目前的报道来看,大都集中在TLR2/4、CD19、CD79b和mIg等^[20]。但由于B淋巴细胞表面受体复杂,多糖结构存在多样性和复杂性,因此,不同多糖所作用的细胞表面受体可能是不同的,或者多糖与几种受体共同结合才能更好地发挥其对细胞的调节激活作用^[21]。本实验结果表明,经TAK-242抑制TLR4以后,SPPM60-D所致的细胞内钙离子浓度升高被抑制了50.12%,说明TLR4作为B淋巴细胞的表面受体确实主要参与了SPPM60-D对B淋巴细胞的活化,并且能够激活下游的钙离子信号通路。但TAK-242并未完全抑制 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高,说明还有其他的受体或表面分子与TLR4共同参与了SPPM60-D对B淋巴细胞的活化过程。本实验室同步对T淋巴细胞上SPPM60-D的受体研究表明,SPPM60-D与脾脏T淋巴细胞的结合不是依赖

于与TLR4之间结合发挥作用的, 推测其原因可能为T细胞表面不表达TLR4, SPPM60-D可能是作用于TCR来激活T淋巴细胞的^[18], 说明SPPM60-D在细胞表面的受体可能具有多样性, 可以与多种受体结合, 从而推测其可以通过多种受体来激活不同细胞或同一细胞。另外, 实验中LPS对B细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高程度不如SPPM60-D, 说明LPS对B细胞的活化可能并非主要通过钙离子信号通路进行, 从现有的报道来看, 可能主要是通过JNK、p38 MAPK、NF- κ B等信号通路来活化细胞^[17,22-23]。而PPM60-D也能使B淋巴细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 有所升高, 但升高的幅度更小, 分析可能的原因为PPM60-D的空间结构与SPPM60-D有差异; 也可能与LPS类似, 并非主要通过细胞内钙离子信号通路来激活B淋巴细胞。因此, 未来的工作应当进一步检测PPM60和SPPM60对其他信号通路的作用, 并在基因水平上检测它们对B淋巴细胞的影响。

本实验还证实了SPPM60-D能在体外促进B淋巴细胞分化为产生抗体的浆细胞, 提高IgM抗体的水平。B细胞在体外经SPPM60-D作用5 min后, $[Ca^{2+}]_i$ 有显著地升高, 说明SPPM60-D可能对B淋巴细胞有较快的激活作用。因此, 用已在体内免疫的脾脏细胞, 在体外与SRBC反应时分别加入LPS、PPM60-D和SPPM60-D孵育, 发现SPPM60-D相对于空白组, 其产生的AFC数量和IgM抗体水平都有显著地提高, 说明其能较快地促进浆细胞IgM抗体的生成。但是, 体外实验并不能完全代替体内的实验结果, 用离体的细胞培养, 脱离了机体内复杂环境, 没有神经激素及体液的调控, 缺乏整体协调^[15]。因此, 未来还应当进一步研究SPPM在体内对小鼠免疫的调节效果, 明确SPPM体内的免疫调节机理, 从而在将来或许能够开发SPPM来改善某些免疫低下人群的免疫力, 提高他们机体的抗肿瘤、抗病毒能力。

总之, 本实验研究结果证实, SPPM60-D相对于PPM60-D能更有效地激活B淋巴细胞, 显著增强B淋巴细胞的增殖和抗体生成能力, 并能相应提高其 $[Ca^{2+}]_i$ 。SPPM60-D是通过调控 Ca^{2+} 信号通路来激活B淋巴细胞的, 其具体信号通路为TLR4-PI3K-PLC-IP₃R, 然后再通过钙池操纵的钙离子内流(SOCE)途径激活CRAC通道打开, 使得细胞外钙离子大量内流, 从而导致 $[Ca^{2+}]_i$ 的大幅升高。而B淋巴细胞内高浓度的钙离子可能进一步会通过钙调蛋白和钙调磷酸酶或RasGRP等其他信号通路来调控B淋巴细胞相

关基因的表达, 从而最终发挥其对B淋巴细胞的免疫激活作用^[24]。

参考文献(References)

- 1 施松善, 王顺春. 多糖生物活性研究进展. 生命科学(Shi Songshan, Wang Shunchun. Bioactivities of polysaccharides. Chinese Bulletin of Life Sciences) 2011; 23(7): 662-70.
- 2 刘占峰, 孙汉文. 多糖的化学修饰研究进展. 河北大学学报(自然科学版)(Liu Zhanfeng, Sun Hanwen. Progress of the research on chemically modifications of polysaccharide. Journal of Hebei University, Natural Science) 2005; 25(1): 104-8.
- 3 Li J, Ji L, Sun L, Wei N, Zhu J, Chen X, *et al.* Analysis of Herba Asari polysaccharides and their immunological activity. Carbohydr Polym 2012; 87(1): 551-6.
- 4 Borschers AT, Keen LC, Gershwin ME. Mushrooms, tumors and immunity: An update. Exp Biol Med 2004; 229(5): 393-406.
- 5 Han SB, Yoon YD, Ahn HJ, Lee HS, Lee CW, Yoon WK, *et al.* Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus*. Int Immunopharmacol 2003; 3(9): 1301-12.
- 6 苗本春, 耿美玉, 李静, 李福川, 夏威, 管华诗. 海洋硫酸多糖911免疫增强作用的探讨. 中国海洋药物(Miao Benchun, Geng Meiyu, Li Jing, Li Fuchuan, Xia Wei, Guan Huashi. A study on immunopotentiating activity of marine sulfated polysaccharide 911. Chinese Journal of Marine Drugs) 2002; 21(5): 1-4.
- 7 Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. Nat Rev Immunol 2007; 7(9): 690-702.
- 8 毛华. 马尾松花粉多糖及其酯化物对脾细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 及细胞因子调控的研究. 山东师范大学(Mao Hua. Pine (*Pinus Massoniana*) pollen polysaccharides and its esters on the regulation of $[Ca^{2+}]_i$ and cytokine of splenocytes. Shandong Normal University); 2011.
- 9 耿越, 刘辉, 石丽花, 刘志河. 马尾松花粉多糖硫酸酯化前后生物活性的比较研究. 中国生化药物杂志(Geng Yue, Liu Hui, Shi Lihua, Liu Zhihe. Comparative study on bio-activity of polysaccharide from *Pinus massoniana* pollen and its sulfated derivative. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics) 2010; 31(02): 98-102.
- 10 毛华, 楚慧丽, 刘月冉, 刘瑞, 耿越. 马尾松花粉硫酸酯化多糖调控脾细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的研究. 中国药理学通报(Mao Hua, Chu Huili, Liu Yueran, Liu Rui, Geng Yue. Influences of sulfated polysaccharide from pine (*Pinus Massoniana*) pollen on the regulation of $[Ca^{2+}]_i$ in splenocytes. Chinese Pharmacological Bulletin) 2012; 28(10): 1460-4.
- 11 刘媛, 赵红, 蔡云, 夏瑜, 耿越. 马尾松花粉多糖硫酸酯化前后对小鼠脾细胞钙离子浓度的影响. 药物生物技术(Liu Yuan, Zhao Hong, Cai Yun, Xia Yu, Geng Yue. Effects of polysaccharide from masson pine pollen and its sulfated derivative on the cytosolic $[Ca^{2+}]_i$ in mice splenocytes. Pharmaceutical Biotechnology) 2011; 18(5): 396-8.
- 12 Han SB, Park SH, Lee KH, Lee CW, Lee SH, Kim HC, *et al.* Polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* selectively activates B cells and macrophages but not T cells. Int Immunopharmacol 2001; 1(11): 1969-78.
- 13 张儒珍, 严俊, 傅翠梅. 定量溶血分光光度法体外检测B细胞功能. 临床检验杂志(Zhang Ruzhen, Yan Jun, Fu Cuimei. Function test of B cells by quantitative hemolysis spectrophotometry *in vitro*.

- Journal of Clinical Laboratory Science) 1987; 5(04): 182-3.
- 14 王 伟. 桦褐孔菌多糖对小鼠免疫功能的影响. 延边大学(Wang Wei. To investigate the effects of inonotus obliquus polysaccharides on the immune function of normal mice. Yanbian University) 2007; 19(7): 1739.
- 15 孟强骅, 叶天星. 体外诱生抗体系统及溶血空斑技术的研究进展. 上海免疫学杂志(Meng Qianghua, Yie Tianxing. Progress of the research on antibody production system and hemolytic plaque technology *in vitro*. Current Immunology) 1983; 3(1): 51-6.
- 16 Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. Nat Rev Immunol 2007; 7(9): 690-702.
- 17 朱立平, 郭北初, 王文余. 钙与B淋巴细胞活化. 国外医学(免疫学分册) (Zhu Liping, Guo Beichu, Wang Wenyu. Calcium and activation of B lymphocytes. International Journal of Immunology) 1987; 10(3): 138-40.
- 18 李娜娜. 松花粉硫酸酯化多糖对小鼠T淋巴细胞的免疫调节作用. 山东师范大学(Li Nana. Immunomodulatory effects of sulfated polysaccharide and its esters from pine pollen on mice T lymphocytes. Shandong Normal University); 2013.
- 19 Feske S, Skolnik EY, Prakriya M. Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. Nat Rev Immunol 2012; 12(7): 532-47.
- 20 易 阳, 曹 银, 张名位. 多糖调控T/B淋巴细胞免疫应答机制的研究进展. 中国细胞生物学学报(Yi Yang, Cao Yin, Zhang Mingwei. Immunomodulatory activities and mechanisms of polysaccharides on T/B lymphocytes, Chinese Journal of Cell Biology) 2012; 34(1): 72-9.
- 21 毛 华, 楚慧丽, 刘月冉, 耿 越. 免疫细胞多糖受体及其研究方法. 食品与药品(Mao Hua, Chu Huili, Liu Yueran, Geng Yue. Receptors of polysaccharides on immunocytes and their research methods, Food and Drug) 2011; 13(3): 136-8.
- 22 钱 莉, 佟大可, 潘兴元, 田 芳, 龚卫娟, 季明春. 脂多糖对B细胞的活化作用及机制的初步研究. 第二军医大学学报(Qian Li, Dong Dake, Pan Xingyuan, Tian Fang, Gong Weijuan, Ji Mingchun. Lipopolysaccharide activates B cells and the underlying mechanisms. Academic Journal of Second Military Medical University) 2011; 32(11): 1231-4.
- 23 Bekeredjian-Ding I, Jego G. Toll-like receptors--sentinels in the B-cell response. Immunology 2009; 128(3): 311-23.
- 24 Baba Y, Kurosaki T. Impact of Ca²⁺ signaling on B cell function. Trends Immunol 2011; 32(12): 589-94.