

Chlorella vulgaris Kulturüberstand (CVS) verringert die psychische, durch Stress induzierte Apoptose in den Thymozyten von Mäusen.

Takashi Hasegawa^{1*}, Kiyoshi Noda¹, Shoichiro Kumamoto¹, Yotaro Ando¹,
Akira Yamada², Yasunobu Yoshikai³

¹ Research Laboratories, Chlorella Industry Co. Ltd. 1343 Hisatomi Chikugo City, Fukuoka 833-0056, Japan

² Department of Immunology, Kurume University School of Medicine, Kurume City, Fukuoka 830-0011, Japan

³ Laboratory of Host Defense and Germfree Life, Research Institute for Disease, Mechanism and Control, Nagoya University School of Medicine, Nagoya 466-0064, Japan

Eingelangt am 17. Februar 2000, überarbeiteter Text eingelangt am 5. Juni 2000; anerkannt am 13. Juni 2000

Zusammenfassung

Ein Glykoprotein, das aus *Chlorella vulgaris* Kulturüberstand (CVS) hergestellt wird, verändert das biologische Antwortverhalten (BRM), und zeigt schützende Aktivitäten gegen Tumor-Metastasen und 5-Flourouracil-induzierte Immunsuppression. Wir zeigen hier, dass die orale Gabe von CVS die Apoptose von Thymozyten bei Mäusen, die einem psychischen Stress in der Kommunikationsbox ausgesetzt sind, signifikant unterbindet. Für 14 Tage wurden Mäuse einem emotionalen Stress ausgesetzt, indem sie anderen Mäusen zuschauen mussten, wie diese einem Fuß-Schock ausgesetzt wurden. Die Anzahl der Thymozyten, speziell die CD4⁺CD8⁺ Population, nahm signifikant ab, und der programmierte Zelltod, der anhand der Annexin V Expression bemessen wurde, nahm reziprok zu nachdem die Mäuse dem psychischen Stress ausgesetzt waren. Die Verabreichung von *C. vulgaris* Kulturüberstand (CVS) unterdrückte signifikant die Zunahme im Serum Corticosteron Spiegel bei den psychisch gestressten Mäusen. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass CVS psychischem Stress vorbeugend entgegenwirkt und die Homöostase angesichts äußerer Umwelteinflüsse aufrechterhält. © 2000 International Society for Immunopharmacology. Veröffentlicht im Elsevier. Ltd. Alle Rechte vorbehalten.

Schlüsselwörter: *Chlorella vulgaris* Kulturüberstand; Psychischer Stress; Apoptose

1. Einführung

Chlorella ist eine einzellige grüne Alge, die sich alle 16 bis 20 Stunden in 4 Zellen teilen kann, indem sie Sonnenlicht zur Photosynthese nützt. *Chlorellazellen* bestehen aus 55-67% Proteinen, 1-4% Chlorophyll, 9-18% Ballaststoffen und einer großen Menge an Mineralstoffen und Vitaminen. Zurzeit wird *Chlorella* weit verbreitet als Nahrungsergänzungsmittel in Japan, den USA und anderen Ländern verkauft. Kürzlich haben wir berichtet, dass eine glykoproteinreiche Substanz aus Zellen des *Chlorella vulgaris* Stammes CK-22 in den Nährboden freigesetzt wurde [1]. Die Substanzen, die als *C. vulgaris* Kulturüberstand (CVS) bezeichnet werden, sind ein Glykoprotein mit einem geschätzten molekularen Gewicht von 63100 amu und beinhalten 6-verkettete β -(1-6) Galaktopyranose-reiche Kohlenhydrate (66,9%) und Proteine (35,2%). Es wurde berichtet, dass eine Intra-

* Korrespondierender Autor. Tel.: +81-942-522191, Nebenstelle 26; Fax: +81-942-511266.

E-Mail Adresse: hasegawa@chlorella.co.jp (T. Hasegawa).

tumorgabe von CVS einen Anti-Tumor Effekt aufweist, sowohl bei spontanen, als auch bei experimentell induzierten Metastasen bei Mäusen [2].

Generell wird akzeptiert, dass das Immun-, das Nerven- und das endokrine System biochemisch und funktionell verbunden sind. Interaktionen zwischen dem Neuroendokrinen und dem Immunsystem zielen angesichts äußerer Umwelteinflüsse auf die Aufrechterhaltung der Homöostase ab. Es gibt zahlreiche Studien hinsichtlich der Auswirkungen von Stress auf das Immunsystem. Stress beeinflusst die Anzahl und die Funktionen bei den Monozyten, Lymphozyten und dem CD4/CD8 Verhältnis und den beeinträchtigten Immunantworten, einschließlich der Abwehrstoffproduktion, der natürlichen Killerzellen-Aktivität und der Lymphozytantworten auf die Mitogenstimulierung [3,4]. Die Auswirkungen von Stress auf die Immunantworten wurden hauptsächlich den Adrenokortikaldhormonen, den Glucocorticoiden zugeschrieben, die eine Apoptose in den Immunzellen, den Thymozyten und den peripheren T- Lymphozyten verursachen [5]. Eine unterdrückte Immunität, die dem Tod eines Ehepartners folgt, implizierte früher eine gesteigerte Morbidität und Mortalität, die mit dem Verlust verbunden sind. Nicht nur physischer sondern auch psychischer Stress, kann daher die Immunabwehr gegen externe Krankheitserreger und Reize und interne Tumorentwicklungen schwächen.

Hara und Ohta haben die Kommunikationsbox-Methode eingeführt, als ein Experimentierwerkzeug, um psychischen Stress zu untersuchen [6]. Mit der Kommunikationsbox bewiesen sie, dass Tiere, die mit ansehen müssen, wie anderen Tieren ein Fuß-Schock versetzt wird, Magenläsionen entwickelten und ihren Appetit verloren [7]. In der vorliegenden Studie haben wir die Fähigkeit von CVS getestet, psychischen Stressantworten bei Mäusen vorzubeugen, wobei wir die Kommunikationsbox verwendeten. Orale Gaben von CVS beugten signifikant dem Zelltod durch eine Apoptose in den Thymozyten und Splenozyten, begleitet von einem unterdrückten Glucocorticoidspiegel in der Folge von psychischem Stress, vor. Die Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen ist, dass die prophylaktische und therapeutische Anwendung von CVS die Homöostase angesichts äußerer Umwelteinflüsse während eines psychischen Stresses aufrecht erhält.

2. Materialien und Methoden

2.1. Tiere

8-Wochen alte weibliche Mäuse C57BL/6 wurden von Charles River, Japan, angekauft und in einer Tierhaltungseinrichtung gehalten. Die Mäuse wurden in einer Behausungsanlage mit einer konstanten Temperatur und Feuchtigkeit gezüchtet, und einem 12/12 Stunden hell/dunkel Zyklus ausgesetzt. Futter und Wasser wurden nach Belieben zur Verfügung gestellt.

2.2. Ausrüstung

Die Mäuse wurden mittels der Kommunikationsbox unter psychischen Stress versetzt. Der Boden der Kommunikationsbox wurde mit einem Gitter zur Elektrisierung ausgestattet. Der Innenbereich wurde in 36 Kammern (10 x 10 cm) aufgeteilt, bestehend aus Fuß-Schock Abteilungen mit Gitterboden, und Nicht-Fuß-Schock Abteilungen mit Gitterboden der mit Dämmplatten bedeckt war. Die Nicht-Fuß-Schock Abteilungen wurden so angelegt, dass sie die Fuß-Schock Abteilungen umgaben. Die Mäuse in den Fuß-Schock Abteilungen erhielten jeweils einen Fuß-Schock für 5 Sek., im Intervall von 15 Sek., täglich eine Stunde lang. Der elektrische Strom für den Schock betrug 1-2 mA. Die psychisch gestressten Mäuse (Antwortermäuse) wurden den emotionalen Erwidern der Fuß-Schock Mäuse (Sendermäuse) 14 Tage lang täglich ausgesetzt. Die Sendermäuse wurden an wechselnden

Tagen ausgetauscht, um eine verminderte emotionale Antwort, basierend auf Adaption oder einer erlernten Geistlosigkeit aufgrund der wiederholten elektrischen Stimulierung, zu verhindern.

2.3. Herstellung der CVS Kost

Der *C. vulgaris* Stamm CK-22 wurde unter keimfreien Bedingungen kultiviert. *C. vulgaris* Kulturüberstand (CVS) wurde aus der Nährflüssigkeit von *Chlorella* mittels Zentrifugation (6200 x g für 30 Min.) und Ultrafiltration (cut-off MW 10 000, Nihon Millipore Co., Tokyo, Japan) hergestellt. Gefriergetrocknetes CVS wurde zur CL-2 Kost (Clea Japan, Tokyo, Japan) mit einer Konzentration von 2% (w/w) hinzugefügt. Festes Futter mit CVS wurde den C57BL/6 Mäusen für 2 Wochen vor der psychischen Stressbelastung, und auch während der 14 tägigen Stressanwendung verabreicht.

2.4. Durchflusszytometrische (FCM) Analyse

Frisch isolierte Thymozyten und Splenozyten wurden mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-konjugierte Anti-Maus Lyt-2 (CD8)-monoklonalen Antikörper (mAb; PharMingen, San Diego, USA), Phycoerythrin (PE)-konjugierte Anti-Maus L3T4 (CD4) monoklonalen Antikörper (Becton-Dickinson, CA, USA) oder Biotin-konjugierte Anti-Maus NK1.1 mAb (PharMingen, San Diego, USA) gefolgt von FITC-konjugierten Streptavidin (Dako, Glostrup, Dänemark) eingefärbt. Die Zellen wurden zweimal mit Hank's ausbalancierter Natriumlösung (HBSS), beinhalten 2,5% Nu-Serum (Collaborative Research Inc., MA, USA) und 0,1% Natriumazid gewaschen, und mit dem FACScan™ Durchflusszytometer (Becton-Dickson, CA, USA) analysiert. Unter Berücksichtigung der Expression von Annexin V wurden frisch isolierte Thymozyten mit Annexin V- FITC Apoptose Detection Kits™ (PharMingen, San Diego, USA) eingefärbt. Der prozentuelle Anteil der Apoptose in den Thymozyten, kultiviert mit RPMI 1640 Medium, gezüchtet mit 10% hitzeinaktiviertem fäkalem Rinderserum (FBS, Equitech Bio, TX, USA), Penizillin (100 mg/l), Kanamycin (200 mg/l), 5 mM HEPES und 4,5 mM 2-Mercaptoethanol wurde mit der FACScan™ und der ModFit LT™ Software (Becton-Dickinson, Ca, USA) analysiert. Im Fall der Blutanalyse wurden 100 µl von dreifach verdünntem Vollblut mit PBS (Natriumperborat) mit FITC-konjugiertem Anti-Maus F4/80 mAb (PharMingen, San Diego, USA) und Biotin-konjugiertem Anti-Maus Mac-1-mAb (PharMingen, San Diego, USA) gefolgt von FITC-konjugiertem Streptavidin (Dako, Glostrup, Dänemark) gefärbt. Danach wurden die roten Blutkörperchen unter Zugabe von 1 ml Immunolyse™ (Coulter, Hialeah, FL, USA) für 60 Sek. lysiert, und die Zellen wurden mit 250 µl Fixative™ (Coulter, Hialeah, FL, USA) fixiert. Dann wurden die Zellen zwei Mal in PBS gewaschen und mit FACScan™ (Becton-Dickson, CA, USA) analysiert.

2.5. Plasma Corticosteron Radioimmunoassay

Das Gesamtcorticosteron im Plasma wurde mittels Radioimmunoassay, unter Verwendung von Kaninchen Antiserum [8] bemessen. Antiserum gegen Corticosteron wurde in Kaninchen erzeugt, immunisiert mit Corticosteron-21-Hemisuccinat und konjugiert mit Rinderserumalbumin. Die Plasmacorticosteron Gesamtspiegel werden in Einheiten von ng Corticosteron pro ml Serum dargestellt.

2.6. Feststellung von Zytokin mRNA mittels Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Nachdem normalen Mäusen 2 Wochen lang festes Futter mit 2 % CVS gegeben worden war, wurden RT-PCR Analysen des Zytokin mRNA im adhären Brustmuskel der Mäuse gemacht. Die Gesamt-RNA wurde aus dem adhären Brustmuskel extrahiert und rück-transkribiert. Die Zytokin mRNA Expresionsmuster von IL-1 α , TNF α , GM-CSF und IL-10 wurden mittels PCR bestimmt, wobei die entsprechenden murinen zytokin-spezifischen Primer verwendet wurden. PCR Primer Paare, speziell für murines β -Aktin, wurden synthetisiert in Takara Shuzo (Tokyo, Japan), gemäß den veröffentlichten Primer-Sequenzen. [9]. PCR Primer Paare, die für murine IL-1 α , TNF α und GM-CSF spezifisch sind, wurden von Stratagene (La Jolla, CA, USA) erworben. Primer Paare speziell für murine IL-10 wurden von Clontech (Palo Alto, CA, USA) erworben. Die Methoden für cDNA Präparationen und PCR- Analysen, gefolgt von der Elektronenwanderung, wurden zuvor beschrieben [10]. Die relative Quantifizierung der Mengen von RT-PCR Produkten wurde unter Zuhilfenahme eines rechnenden Densitometers und einer Master-Scan™ Software ausgeführt.

2.7. Statistische Analyse

Die statistische Signifikanz der Daten wurde anhand des Student *t*-Tests determiniert. Ein P-Wert von weniger als 0,05 wurde als signifikant genommen.

3. Ergebnisse

3.1. Auswirkungen von CVS-Gaben auf die Thymozyten- und Splenozytenzellenanzahl bei psychisch gestressten Mäusen.

Die Anzahl der Thymozyten und Splenozyten wurde am Tag 14 nach dem psychischen Stress unter Verwendung Kommunikationsbox gemessen. Wie in Fig.1 ersichtlich, verringerte sich die Anzahl der Thymozyten signifikant bei den psychisch gestressten Mäusen, während diese stressbedingte Abnahme nicht evident war für jene Mäuse, denen CVS oral gegeben wurde. Ähnliche Ergebnisse erhielt man in den Splenozyten (Fig.1). Demnach beugen CVS-Gaben der durch psychischen Stress induzierten Atrophie von Thymus und Milz signifikant vor.

3.2. Auswirkungen von CVS-Gaben auf die Zellpopulation in Thymus, Milz und Blut bei psychisch gestressten Mäusen

Als nächstes untersuchten wir mittels der FCM-Analyse die Expression der Zelloberflächenantigene auf die Thymozyten, Splenozyten und die Blutleukozyten bei den psychisch gestressten Mäusen. Die absolute Zahl jeder Population wurde berechnet, indem man die Gesamtanzahl mit dem Prozentanteil multiplizierte. Wie in Fig. 2 ersichtlich, verringerte sich die Anzahl der CD4⁺CD8⁺ Zellen im Thymus und der CD4⁺ Zellen in der Milz markant bei den psychisch gestressten Mäusen, wohingegen die Anzahl der CD4⁺CD8⁺ Zellen im Thymus und der CD4⁺ Zellen in der Milz sich bei den Mäusen mit CVS-Gaben nach dem psychischen Stress nicht verringerte. Es ist allgemein bekannt, dass die Anzahl der NK-Zellen und die NK-Zellaktivität bei verschiedenen Stressarten abnimmt. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen, nahm die Zahl der NK1.1⁺ Zellen in der Milz bei psychisch gestressten Mäusen signifikant ab, wobei diese Abnahme bei Mäusen mit CVS-Gaben nur geringfügig war. Um die Veränderung der Granulozyten und Makrophagen als Folge von psychischem Stress zu bestimmen, untersuchten wir die Expression von Mac-1 und F4/80 auf die

Blutleukozyten bei psychisch gestressten Mäusen. Wie aus Fig.2. hervorgeht, war der Prozentanteil von Mac-1⁺/F4/80⁻ Zellen, die den Granulozyten in den Blutleukozyten entsprechen, bei psychisch gestressten Mäusen verringert, während der Prozentanteil von F4/80⁺ Zellen, typisch für reife Makrophagen, bei den Mäusen nach dem psychischen Stress unverändert blieb (Daten nicht angeführt). Orale CVS-Gaben verhinderten signifikant die Reduktion von Granulozyten im Blut nach dem psychischen Stress der Mäuse (Fig.2).

3.3. Auswirkungen von CVS-Gaben bei der Expression von Annexin V von Thymozyten bei psychisch gestressten Mäusen

Es ist wohlbekannt, dass Stress den Zelltod durch Apoptose in den Thymozyten [11,12] induziert. Als nächstes analysierten wir frühe apoptotische Thymozyten, indem wir sie mit Annexin V einfärbten, welche auf eine nukleare Veränderung wie die der DNA Fragmentierung hindeuten.

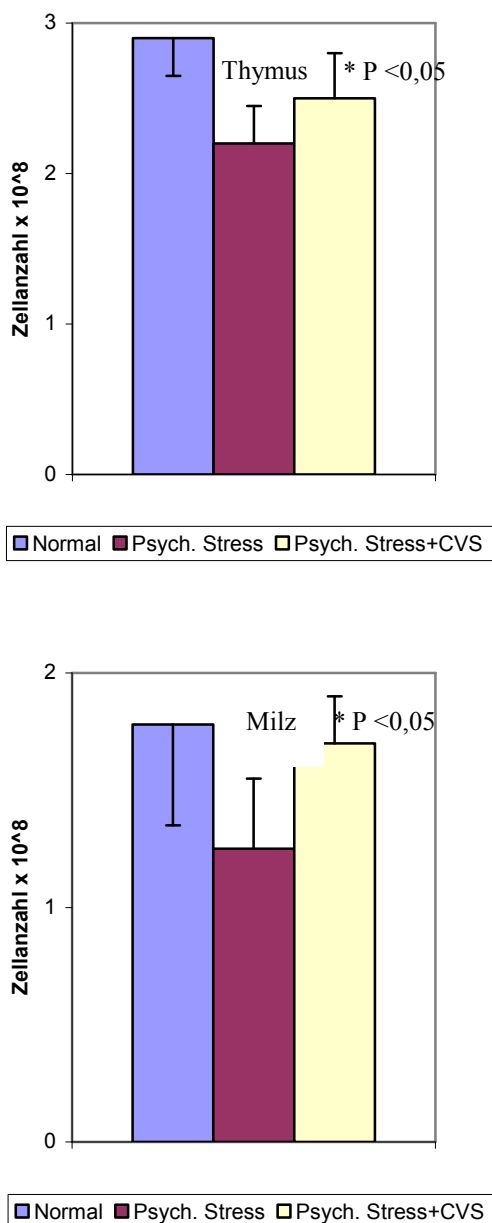


Fig. 1. Auswirkungen von CVS auf die Anzahl der Zellen von Thymozyten und Splenozyten bei psychisch gestressten Mäusen. 8-Wochen alte weibliche Mäuse, C57 BL/6 Mäuse, wurden mittels der Kommunikationsbox einem psychischen Stress ausgesetzt (von Tag 1 bis Tag 14). Die Mäuse wurden am Tag 14 mittels Dekapitation geopfert. Thymozyten und Splenozyten wurden isoliert, und die Zahl der lebensfähigen Zellen gezählt. Festes Futter mit 2% CVS (w/w) wurde den gestressten Mäusen verabreicht (von Tag -14 bis Tag 14). Die angeführten Werte gelten als Mittelwerte \pm der Standardabweichung für sechs Mäuse. Das Sternchen weist auf die statistische Signifikanz hin (* $P < 0,05$), im Vergleich mit dem Wert von psychisch gestressten Mäusen mittels Student T-Test.