

腹腔注射云芝多糖对小鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮产生的影响

庞战军 陈 媛 周 玫

第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

主题词 云芝多糖; 一氧化氮; γ -干扰素; 巨噬细胞; 巨噬细胞活化; 脂多糖; 小鼠; 动脉粥样硬化

摘 要 为探讨云芝多糖对巨噬细胞一氧化氮产生的影响, 采用 Griess 试剂法对小鼠腹腔巨噬细胞培养上清液中一氧化氮的含量进行测定, 并用结晶紫染核法测定细胞数目。结果发现, 在不受任何刺激的情况下, 云芝多糖活化的巨噬细胞一氧化氮的释放并不增加; 而在脂多糖作用下, 其一氧化氮产量明显增加; 云芝多糖活化的巨噬细胞与 γ -干扰素共孵, 并未见一氧化氮产量增加。提示云芝多糖对巨噬细胞的激活采用的方式与 γ -干扰素类似, 其抗动脉粥样硬化的效应可能部分源自于其对巨噬细胞一氧化氮生成的调节。

Nitric Oxide Production in Mouse Peritoneal Macrophages Primed by Polysaccharide Krestin Injected Peritoneally

PANG Zhan-Jun, CHEN Yuan and ZHOU Mei

Research Laboratory of Free Radical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

MeSH Polysaccharide Krestin; Nitric Oxide; Interferon- γ ; Macrophages; Macrophage, Activation; Lipopolysaccharide; Mice; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** In order to find out the effect of polysaccharide krestin (PSK) on nitric oxide (NO) production in mouse peritoneal macrophages. **Methods** The content of NO in cell cultures was analyzed by a method using Griess reagent, and the cell number was determined by staining with crystal violet. **Results** Without any stimulation, there was no alteration of NO production in mouse peritoneal macrophages by PSK-primed, but when the cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS), NO production increased greatly ($P < 0.01$); furthermore, NO production didn't change when the PSK-primed macrophages were incubated with interferon- γ (IFN- γ). **Conclusion**

PSK could regulate NO production in macrophages; and the effect of PSK was somewhat like that of IFN- γ . The relationship between the effects of PSK and IFN- γ needs to be further uncovered.

云芝多糖 (polysaccharide Krestin, PSK) 是从云芝子实体提取的一种蛋白结合多糖, 平均相对分子量约为 1.2×10^6 。我室的研究表明, 云芝多糖可以有效地预防实验性动脉粥样硬化家兔动脉粥样硬化斑块的形成^[1], 并具有一定的治疗效应^[2]。鉴于单核巨噬细胞在动脉粥样硬化斑块形成过程中所起的重要作用, 现将云芝多糖对巨噬细胞一氧化氮 (nitric oxide, NO) 产生的影响进行探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

雄性昆明鼠 4~5 周龄, 20 ± 2.0 g) 购自本校实验动物中心; DMEM 培养基、脂多糖 (E. coli 0111:4B 酚提取物)、对氨基苯磺酸和 N-萘基二乙胺均购自 Sigma 公司; 云芝多糖是由我室从云芝子实体提取的水提取物, 用生理盐水配成 1.5% 的溶液, 其脂多糖含量在 5×10^{-5} g/L 以下; 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 购自德国宝灵曼公司; 结晶紫为上海试剂厂产品。

所用其它试剂均为分析纯。比色测定在 $\Sigma 960$ 型 ELISA 酶标测定仪上进行。

1.2 腹腔巨噬细胞提取与处理

将小鼠随机分为云芝多糖处理组 (简称 PSK 组) 与对照组。PSK 组注射 PSK 0.2 mL/d, 连续注射三天, 对照组注射等量生理盐水。停止注射两天后, 将小鼠拉颈处死, 用磷酸盐缓冲液腹腔灌洗法采集腹腔巨噬细胞, 1 000 g 离心 7 min, 将细胞沉淀用不含血清的 DMEM 培养基吹成悬液, 接种于 96 孔细胞培养板。体外培养 24 h, 测定培养上清液中的 NO_2^- 含量; 或将接种培养的小鼠腹腔巨噬细胞接受不同浓度 0、1、10、100、1 000、10 000 $\mu\text{g/L}$ 的脂多糖作用 24 h, 然后测定细胞培养上清液中的 NO_2^- ; 在另外一些实验中, 细胞受不同浓度 0、25、50、75、100、125 ku/L 的 γ 干扰素作用 24 h, 然后测定细胞 NO_2^- 的产量。

1.3 亚硝酸盐测定

按文献 [3] 报道的方法略加修改。将细胞悬液

按 3×10^5 /孔接种于 96 孔细胞培养板中,贴壁 2 h 后洗去不贴壁细胞,分别加入不同量的脂多糖或 IFN- γ 使各处理组的上清液中脂多糖或 IFN- γ 达到不同的浓度,于 37℃、5% CO₂ 的孵箱中继续培养一定时间。吸取上清 100 μ L,加入等量的 Griess 试剂 (1% 对氨基苯磺酸,0.1% N-萘基二乙胺,2.5% 磷酸),室温下反应 10 min 以上,于 550 nm 比色,以 NaNO₂ 作标准曲线。

1.4 细胞数目定量

采用结晶紫染核的方法 [4]。结晶紫溶解于 0.2 mol/L 的硼酸溶液中制成 0.1% 的染液。在去除培养上清后,每孔加入 100 μ L 新鲜的培养基。再按 10 μ L/孔加入 11% 戊二醛溶液,并不断振荡 15 min 以固定细胞。将 96 孔细胞培养板浸入双蒸水中洗涤三次,室温下干燥。每孔加入 100 μ L 结晶紫染液,于室温下不断振荡 20 min。用双蒸水充分洗涤以洗去多余的染料,干燥,然后加入 100 μ L 10% 乙酸溶解与细胞核结合的染料,并于 590 nm 下比色。OD 值作为反映细胞数目的指标。

1.5 统计学分析

数据表示为均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$),采用两样本均数比较的 t 检验 (Student's t test)。

2 结果

2.1 云芝多糖活化的巨噬细胞一氧化氮产量

表 1 (Table 1) 显示,云芝多糖处理组与对照组细胞产生的 NO 含量相比稍有增加,但无统计差异 ($P > 0.05$)。

表 1. 云芝多糖组与对照组细胞产生一氧化氮的比较

Table 1. Effect of PSK on NO (μ mol/OD) production in mouse peritoneal macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Groups	Nitric Oxide
Control	26.19 \pm 7.25
PSK-treated	30.45 \pm 3.28 ^a

a: $P > 0.05$, compared with the control group

2.2 云芝多糖增强脂多糖对巨噬细胞一氧化氮的诱导

表 2 (Table 2) 显示,脂多糖对处理组及对照组细胞 NO 的产生均能形成诱导,且 PSK 组的小鼠腹腔巨噬细胞对脂多糖的剂量反应关系与对照组一致,两组均在 100 μ g/L 浓度的脂多糖作用下 NO 释放达到顶峰;但处理组细胞比对照组细胞表现出对脂多糖更高的反应性,即受脂多糖作用后处理组细胞 NO

释放增加幅度较大 ($P < 0.01$)。

表 2. 不同浓度脂多糖对云芝多糖组及对照组细胞产生一氧化氮的比较

Table 2. Effect of LPS (μ g/L) on NO production in PSK-primed mouse peritoneal macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Concentration of LPS	Control group	PSK-treated group
0	26.2 \pm 7.4	30.5 \pm 7.3
1	25.2 \pm 3.3	89.9 \pm 7.6 ^a
10	38.0 \pm 11.9	232.3 \pm 0.5 ^a
100	52.7 \pm 26.7	288.7 \pm 8.0 ^a
1000	46.7 \pm 31.4	220.4 \pm 13 ^a
10000	54.2 \pm 39.6	279.6 \pm 7.4 ^a

a: $P < 0.01$, compared with the control group

2.3 云芝多糖抑制 γ 干扰素对细胞一氧化氮的诱导

γ -干扰素可以诱导正常的小鼠腹腔巨噬细胞 NO 的产生,并在作用浓度为 50 ku/L 时达到峰值;而对于已被云芝多糖活化的小鼠腹腔巨噬细胞则无明显诱导作用 (表 3, Table 3)。

表 3. 不同浓度 INF- γ 对云芝多糖组及对照组细胞产生一氧化氮的比较

Table 3. Effect of INF- γ (ku/L) on NO production in PSK-primed mouse peritoneal macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Concentration of IFN- γ	Control group	PSK-treated group
0	85.1 \pm 6.1	89.1 \pm 4.8
25	107.3 \pm 12.3	76.6 \pm 3.0 ^a
50	105.2 \pm 7.2	74.7 \pm 4.3 ^a
75	174.2 \pm 17.8	72.7 \pm 4.2 ^a
100	158.2 \pm 18.3	74.5 \pm 4.2 ^a
125	167.1 \pm 15.6	69.0 \pm 2.3 ^a

a: $P < 0.01$, compared with the control group

3 讨论

合成 NO 是被激活的巨噬细胞的共同特征和重要标志,也是巨噬细胞产生病理和免疫效应的重要步骤。在酸性环境中,如巨噬细胞的溶酶体、肿瘤或感染病灶,NO₂⁻ 及 NO₃⁻ 可被酸化为具有细胞毒性的 NO 物质,在局部发挥杀菌和杀伤肿瘤细胞的作用 [5]。已知 NO 的产生为巨噬细胞抗真菌、细胞内原虫、细菌和蠕虫所必需,这类病原微生物还包括麻风杆菌 [6]、弓形虫 [7] 等。可见,NO 具有抗炎抗菌的作用。在炎性疾病时,虽然内皮细胞也可释放 NO,

但激活的巨噬细胞仍在 NO 的产生中起着主要作用。巨噬细胞自身在释放 NO 的同时,还可以生成 TNF- γ 及 IFN- γ 等细胞因子,并再对其 NO 生成形成诱导。

近年来有人认为动脉粥样硬化实际上也是一种炎症性疾病,其病变形成最初开始于微生物侵入等造成的内皮损伤及功能紊乱^[8],这就意味着 NO 在动脉硬化发生发展过程中扮演重要角色。事实上,NO 可以引起血管扩张和防止低密度脂蛋白被氧化形成具有致动脉硬化效应的氧化型低密度脂蛋白,起到抗动脉硬化发生发展的作用^[9]。给予 NO 合成的底物 L-精氨酸可以缩小动脉粥样硬化动物模型的病变范围^[10],而 NO 合成酶抑制剂可使该动物模型病损加重^[11],均说明 NO 可以抑制动脉粥样硬化的病理过程。

巨噬细胞内的 NO 合成酶需要脂多糖或 IFN- γ 等物质的诱导,并需要四氢生物嘌呤、谷胱甘肽及 Mg^{2+} 离子等存在,不依赖 Ca^{2+} 或钙调蛋白^[12]。长期以来,脂多糖 / + IFN- γ 一直被作为诱导巨噬细胞 NO 生成的经典模式。本研究发现,虽然 PSK 并不能直接诱导小鼠腹腔巨噬细胞 NO 的生成,但在巨噬细胞接受脂多糖刺激的情况下,其 NO 产生则明显增加,有利于在感染等条件下杀伤病原微生物及调节血管张力,避免血管内皮损伤和微血栓形成,对于炎症学说的动脉硬化最初发生阶段具有预防意义。而经 PSK 处理的小鼠腹腔巨噬细胞并不象正常巨噬细胞一样表现为 NO 生成被轻度诱导,说明云芝多糖处理抑制了 IFN- γ 对巨噬细胞 NO 产生的诱导作用,其机制尚待进一步揭示。另外本研究结果显示,正常情况下,给予 PSK 并不引起巨噬细胞大量释放 NO,说明 PSK 用于动脉粥样硬化疾病的预防和治疗具有较为可靠的安全性。

云芝多糖是一种蛋白结合多糖,其在抗肿瘤等方面具有引人注目的效应^[13],我室的研究将其作用推广至动脉硬化的防治领域。本研究进一步说明,PSK 的作用可能与其对巨噬细胞等 NO 生成的调节部分相关。作为一种复合的生物大分子,研究其生

物学效应及相关机理必将为多糖类的药用研究提供有用的理论及应用依据。

参考文献

- 1 Chen Y, Zhou M, Lou N, et al. The polysaccharide Krestin prevents plaque formation of experimentally atherosclerotic rabbits. *Med Sci Res*, 1997, **25**: 297-300
- 2 欧阳谦,周玫,陈瑗,等. 云芝多糖对实验性动脉粥样硬化家兔血浆氧化型低密度脂蛋白含量的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4** (3): 172-175
- 3 Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and ^{15}N nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, **126**: 131-138
- 4 Kueng W, Silber E, Eppenberger U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem*, 1989, **182** (1): 16-19
- 5 Stuehr DJ, Nathan CR. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med*, 1989, **169** (5): 1543-555
- 6 Adams LB, Franzblau SG, Vavrin Z, et al. L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *J Immunol*, 1991, **147** (5): 1642-646
- 7 Langemans JA, Van der Hulst ME, Nibbering PH, et al. IFN- γ induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- γ . *J Immunol*, 1992, **148** (2): 568-574
- 8 Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol*, 1993, **71**: 9B-14B
- 9 Jessup W, Dean RT. Autoinhibition of murine macrophage-mediated oxidation of low density lipoprotein by nitric oxide synthesis. *Atherosclerosis*, 1993, **101**: 145-155
- 10 Cooke JP, Singer AH, Tsao P, et al. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 168-172
- 11 Naruse K, Shimizu K, Muramatsu M, et al. Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 746-752
- 12 Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, et al. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, 1988, **27** (24): 8706-711
- 13 Ng TB. A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae). *Gen Pharmacol*, 1998, **30** (1): 1-4

此文 1998-10-27 收到, 1999-04-28 修回)

此文编辑 朱雯霞)