

大枣中性多糖对小鼠腹腔巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子及其mRNA表达的影响

大枣具有补中益气、养血安神、镇静收敛、滋补强壮之功效。郎杏彩等[1]从酸枣(与大枣同属不同种)仁及果肉中提取粗多糖,发现其具有增强小鼠免疫功能和抗放射损伤的药理作用。大枣粗多糖具有抗补体活性和促进小鼠脾细胞增殖作用[2]。大枣中性多糖(纯化多糖, JDP-N)具有活化巨噬细胞,增强其细胞毒功能并促进其分泌白细胞介素1、肿瘤坏死因子(TNF)、一氧化氮(NO)的作用[3]。本文研究JDP-N对小鼠腹腔巨噬细胞(M ϕ)分泌TNF及TNF- α mRNA表达的影响、蛋白激酶C(PKC)在JDP-N诱导分泌TNF中的作用。

1 材料与方 法

1.1 动物

BALB/c纯系小鼠,雌雄不拘,8~10周龄,体质量(19.4 \pm 1.3)g,由第一军医大学实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂

JDP-N为易溶于水的白色粉末,以 α -呋喃糖的形式存在,单糖组成为L-阿拉伯糖、D-半乳糖和D-葡萄糖,平均相对分子质量为23 000,由华南理工大学林勤保博士提供[4]。将JDP-N溶于RPMI-1640培养基中,配制成所需浓度。RPMI-1640培养基购自GIBCO生命技术公司。Thiazolyl Blue(MTT)购自Sigma公司,用PBS配成0.5%的溶液。放线菌素D、脂多糖(LPS)、1-(5-异噁啉磺酰基)-2-甲基哌嗪(H-7)为Sigma产品。根据文献[5],由加拿大真达公司合成TNF- α 引物:5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'(upper);5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3'(lower)。DNA Marker为GIBCO/BRL公司产品。mRNA提取试剂盒及cDNA逆转录试剂盒为Boehringer Mannheim产品。

1.3 MTT法测定细胞增殖

按文献[6]进行。终止培养前4 h加入0.5% MTT 20 μ l,然后1 500 r/min离心10 min,小心吸去上清。每孔加入100 μ l DMSO-乙醇(1:1)溶液,在微型振荡器上振荡5 min。用酶标仪测D₅₇₀值。

1.4 M ϕ 的培养

按文献[7]的方法,无菌取小鼠腹腔M ϕ ,锥虫篮染色计数,活率大于90%。调细胞浓度为1 \times 10⁶~1 \times 10⁷/ml,接种于多孔培养板中,置37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养2 h。以PBS或Hepes缓冲液冲洗两遍,冲洗掉未贴壁细胞,加入RPMI-1640完全培养基继续培养到所需时间。经此方法处理后可获得活率在95%以上的M ϕ ,细胞浓度可保持在1 \times 10⁵~1 \times 10⁶/ml。实验组加测试药物与处理因素,对照组以RPMI-1640替代。

1.5 TNF- α 的诱生

上述制备的M ϕ ,加入不同浓度的JDP-N或/和LPS,在5% CO₂、37 $^{\circ}$ C下孵育6 h后,取上清,-30 $^{\circ}$ C保存,供测TNF- α 活性时使用。

1.6 TNF- α 生物活性测定

用L929细胞株细胞毒法测定[8]。0.25%胰蛋白酶消化对数生长期的L929细胞2 min后,加入RPMI-1640终止消化,收集细胞。用RPMI-1640培养基洗两次,调细胞浓度为3 \times 10⁵/ml,于96孔板中每孔加100 μ l,在

37 °C、5% CO₂培养箱中培养过夜。加入待测样品、放线菌素D(终浓度为1 μg/ml)，继续培养16 h，再加入0.5% MTT 20 μl。4 h后测定细胞增殖。

1.7 mRNA的提取与RT-PCR

1.7.1 mRNA提取、RNA逆转录及cDNA的PCR扩增 方法按试剂盒说明书进行。

1.7.2 电泳 用0.5×TBE配制2%琼脂糖，内含1%的溴化乙锭。加热融化后，倒入模具，插入梳子，待冷却凝固后拔去梳子，置于电泳槽中，加适量0.5×TBE电泳缓冲液，使其刚好没过凝胶面。取10 μl PCR产物与2 μl加样缓冲液混匀，加入加样槽中，接通电源，按电压降5 V/cm调整电压。电泳至溴酚蓝迁移至适当距离。

1.8 统计学处理

采用成组资料t检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 JDP-N对腹腔Mφ分泌TNF的影响

JDP-N与Mφ培养6 h时，能明显促进TNF的分泌。随着浓度增大，诱导作用呈先上升后下降趋势，100 μg/ml为最佳诱导浓度。JDP-N对LPS诱导Mφ分泌TNF无协同作用(表1)。JDP-N和LPS对L929细胞株增殖无影响(表2)。

表1 JDP-N和LPS对Mφ分泌TNF的影响(n=6, $\bar{x}\pm s$)
Tab.1 Effects of JDP-N and LPS on the TNF secretion by peritoneal macrophage in vitro (n=6, Mean±SD)

Group	D ₅₇₀
Control	0.258±0.005
JDP-N	
25 μg/ml	0.229±0.011*
50 μg/ml	0.216±0.009**
100 μg/ml	0.195±0.014**
200 μg/ml	0.209±0.013**
LPS (10 μg/ml)	0.173±0.010**
JDP-N+LPS (50 μg/ml+10 μg/ml)	0.169±0.010**

JDP-N: Jujube date polysaccharide; LPS: Lipopolysaccharide;
TNF: Tumor necrosis factor. *P<0.05, **P<0.01 vs control

表 2 JDP-N 和 LPS 对 L929 细胞增殖的影响 ($n=6, \bar{x}\pm s$)

Tab.2 Effects of JDP-N and LPS on the proliferation of L929 *in vitro* ($n=6, \text{Mean}\pm\text{SD}$)

Group	D_{570}
Control	0.258 ± 0.005
JDP-N	
25 $\mu\text{g/ml}$	0.261 ± 0.009
50 $\mu\text{g/ml}$	0.258 ± 0.012
100 $\mu\text{g/ml}$	0.263 ± 0.014
200 $\mu\text{g/ml}$	0.259 ± 0.007
LPS (10 $\mu\text{g/ml}$)	0.257 ± 0.012

2.2 JDP-N影响腹腔M ϕ 分泌TNF的时效关系

为探讨多糖影响TNF分泌的动态变化, 将LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) 和JDP-N (100 $\mu\text{g/ml}$) 分别与M ϕ 培养4、6、8 h, 测定TNF的活性。发现JDP-N诱生TNF达峰时间为6 h, 与LPS 相比, 时效关系相仿(图1)。

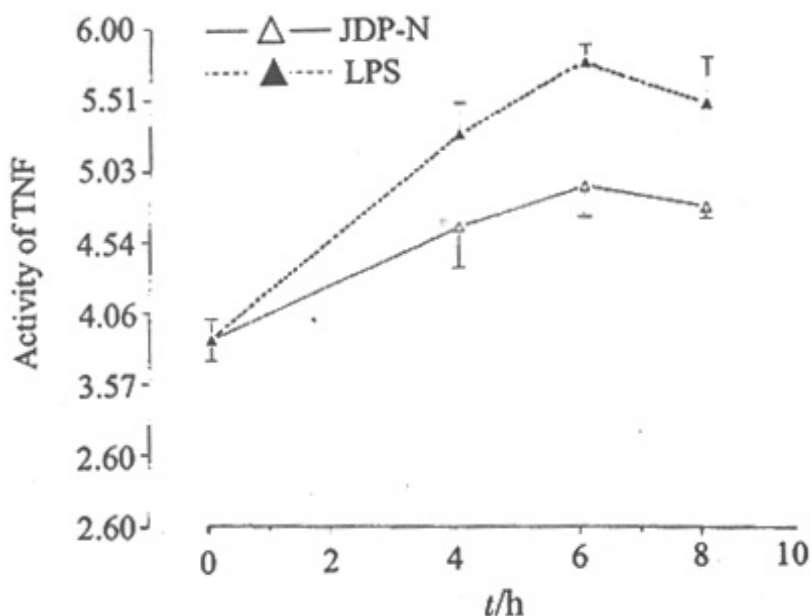


图1 JDP-N和LPS影响腹腔M ϕ 分泌TNF的时效关系

Fig.1 Time-efficiency relations of JDP-N and LPS affecting TNF secretion by peritoneal macrophage *in vitro*

2.3 PKC在JDP-N诱导M ϕ 分泌TNF中的作用

为探讨JDP-N诱导M ϕ 分泌TNF是否与PKC有关, 我们用不同浓度的H-7与100 $\mu\text{g/ml}$ JDP-N一起培养6 h, 测其上清TNF生物活性。结果发现, H-7抑制TNF分泌, 随着浓度增大抑制程度增强(表3)。根据文献[9][10]的研究结果, H-7在本研究所用浓度范围内对M ϕ 没有非特异性毒性作用, H-7单独无抑制TNF杀瘤活性作用。

表 3 H-7 对 JDP-N 诱导腹腔M ϕ 分泌 TNF 的影响
($n=6, \bar{x}\pm s$)

Tab.3 Effects of H-7 on induced TNF secretion by
peritoneal macrophage *in vitro* ($n=6, Mean\pm SD$)

Group	D ₅₇₀
JDP-N (100 μ g/ml)	0.196 \pm 0.010
JDP-N+H-7	
100 μ g/ml+5 μ g/ml	0.216 \pm 0.009
100 μ g/ml+10 μ g/ml	0.220 \pm 0.012*
100 μ g/ml+15 μ g/ml	0.229 \pm 0.007*
100 μ g/ml+20 μ g/ml	0.238 \pm 0.014*

H-7: 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine;

* $P<0.05$ vs JDP-N

2.4 JDP-N对小鼠腹腔M ϕ 中TNF- α mRNA表达的影响(图2)

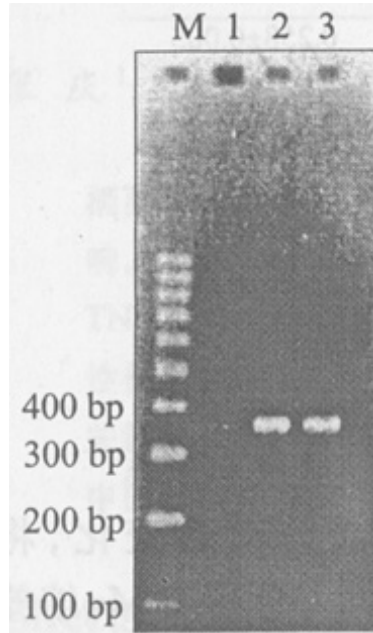


图2 JDP-N对腹腔M ϕ TNF- α mRNA表达的影响

Fig.2 Effects of JDP-N on TNF- α mRNA expression in murine peritoneal macrophages Lane 1: Control; Lane 2: JDP-N (50 μ g/ml); Lane 3: JDP-N (100 μ g/ml)
M: Marker

在JDP-N刺激下, TNF- α mRNA的PCR产物在400 bp下方, 与理论值374 bp相吻合; 不同浓度JDP-N(50和100 μ g/ml)刺激下, TNF- α mRNA的PCR产物无明显差别。对照组有TNF- α mRNA表达, 但比JDP-N刺激组表达量少。

M ϕ 激活后,可释放TNF、IL-1、NO等细胞因子和炎症介质。Giovine等[11]证实IL-1不影响TNF对L929细胞的杀伤作用。活化M ϕ 分泌NO是杀伤肿瘤细胞的一个重要效应分子,由于NO的半衰期只有几秒钟,很快转变为NO $_2^-$ 而失去化学活性,故本研究中先收集上清,再检测其TNF活性,可排除NO杀伤瘤细胞效应。

H-7能抑制多种蛋白激酶催化蛋白磷酸化,主要是选择性抑制钙磷脂依赖的蛋白激酶。H-7在对M ϕ 无非特异性损伤的剂量范围内,可有效抑制JDP-N诱导分泌TNF,说明PKC的激活在JDP-N诱导M ϕ 分泌TNF过程中具有关键作用。

JDP-N对L929细胞无促进增殖作用,亦无杀瘤细胞作用,但JDP-N与M ϕ 培养的上清液具有杀L929细胞作用。由此可见,多糖的肿瘤抑制作用不是直接的,而是通过作用于免疫细胞,间接抑制肿瘤,其中M ϕ 可能是多糖调节免疫、抑制肿瘤的靶细胞之一。

M ϕ 在静息状态下,有少量的TNF- α mRNA表达;JDP-N刺激后,TNF- α mRNA的表达增多,提示JDP-N诱导M ϕ 分泌TNF的机制之一是提高mRNA的表达水平。

(责任编辑:黄开颜)

参考文献:

- [1] 郎杏彩,李明湘,贾秉义. 酸枣仁、肉多糖增强小鼠免疫功能和抗放射损伤的实验研究[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(6):366-8.
- [2] 张庆,雷林声,孙莉莎,等. 大枣粗多糖体外抗补体活性及促小鼠脾淋巴细胞增殖作用[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(5):19-21.
- [3] 张庆,雷林声,孙莉莎,等. 大枣中性多糖体外对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响. 中药药理与临床[J]. 1999, 15(3):21-3.
- [4] 林勤保. 大枣多糖的研究[D]. 广州:华南理工大学, 1998.
- [5] Maraskovsky E, Rogers LA, Troutt AB, et al. Murine cytolytic CD8+ T cell clones generated in a high cloning efficiency, accessory cell-free culture system express a restricted lymphokine profile[J]. Cell Immunol, 1992, 141(1):59-70.
- [6] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1):55-67.
- [7] 鄂征. 组织培养技术[M]. 北京:人民出版社, 1993. 185-7.
- [8] Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro[J]. J Immunol Methods, 1990, 131:165-72.
- [9] 胡振林,钱定华. 蛋白激酶C激活剂和抑制剂对小鼠腹腔巨噬细胞释出肿瘤坏死因子的影响[J]. 中国药理学报, 1993, 7(1):45-8.
- [10] 李广川,田民鸣,胡振林,等. 蛋白激酶C激活剂和抑制剂对肿瘤坏死因子杀瘤活性的影响[J]. 中国药理学与毒理杂志, 1993, 7(1):45-8.
- [11] Di-Giovine FS, Nuki G, Duff GW. Tumor necrosis factor in synovial exudates[J]. Ann Rheum Dis, 1988, 47(9):768-72.

参考文献:

- [1] 郎杏彩,李明湘,贾秉义. 酸枣仁、肉多糖增强小鼠免疫功能和抗放射损伤的实验研究[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(6):366-8.
- [2] 张庆,雷林声,孙莉莎,等. 大枣粗多糖体外抗补体活性及促小鼠脾淋巴细胞增殖作用[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(5):19-21.
- [3] 张庆,雷林声,孙莉莎,等. 大枣中性多糖体外对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响. 中药药理与临床[J]. 1999, 15(3):21-3.
- [4] 林勤保. 大枣多糖的研究[D]. 广州:华南理工大学, 1998.

[5] Maraskovsky E, Rogers LA, Troutt AB, et al. Murine cytolytic CD8+ T cell clones generated in a high cloning efficiency, accessory cell-free culture system express a restricted lymphokine profile[J]. *Cell Immunol*, 1992,141(1):59-70.

[6] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *J Immunol Methods*, 1983,65(1):55-67.

[7] 鄂 征. 组织培养技术[M]. 北京:人民出版社, 1993. 185-7.

[8] Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro[J]. *J Immunol Methods*, 1990,131:165-72.

[9] 胡振林, 钱定华. 蛋白激酶C激活剂和抑制剂对小鼠腹腔巨噬细胞释出肿瘤坏死因子的影响[J]. *中国药理学报*, 1993,7(1):45-8.

[10] 李广川, 田民鸣, 胡振林, 等. 蛋白激酶C激活剂和抑制剂对肿瘤坏死因子杀瘤活性的影响[J]. *中国药理学与毒理杂志*, 1993,7(1):45-8.

[11] Di-Giovine FS, Nuki G, Duff GW. Tumor necrosis factor in synovial exudates[J]. *Ann Rheum Dis*, 1988,47(9):768-72.

[回结果列表](#)