

# 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

张庆<sup>1</sup>, 雷林生<sup>2</sup>, 杨淑琴<sup>2</sup>, 孙莉莎<sup>2</sup> (第一军医大学<sup>1</sup>南方医院药理学部, <sup>2</sup>药理学教研室, 广东广州 510515)

**摘要:**目的 研究大枣中性多糖 (JDP-N)对小鼠腹腔巨噬细胞 (M)分泌肿瘤坏死因子 (TNF)及其 mRNA表达水平的影响。方法 MTT法测定细胞增殖,半定量 RT-PCR测定 TNF- mRNA的表达。结果 JDP-N能诱导 M 分泌 TNF,诱导 TNF达峰时间约为 6h,与脂多糖相比,时效关系相仿;蛋白激酶 C 激活在 JDP-N诱导 M 分泌 TNF过程中具有关键性作用;JDP-N能促进 M TNF- mRNA的表达。结论 JDP-N增强小鼠免疫功能的机制之一是促进 M 分泌 TNF。

**关键词:** 大枣;肿瘤坏死因子;蛋白激酶 C;巨噬细胞;RNA,信使

中图分类号:R967;R979.5 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2001)08-0592-03

Effects of jujube date polysaccharide on tumor necrosis factor production and its mRNA expression in peritoneal macrophages in mice

ZHANG Qing<sup>1</sup>, LEI Lin-sheng<sup>2</sup>, YANG Shu-qin<sup>2</sup>, SUN Li-sha<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, <sup>2</sup>Department of Pharmacology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract** Objective To understand whether jujube date polysaccharide (JDP-N) affects tumor necrosis factor (TNF) secretion and its mRNA expression in mouse peritoneal macrophages M. Methods Cell proliferation was determined by MTT method and TNF- mRNA by semiquantified RT-PCR. Results JDP-N stimulated TNF production that reached the maximum at around 6h, demonstrating similar effect to that of lipopolysaccharide on TNF production. Protein kinase C played a key role in mediating TNF production of M induced by JDP-N, in the process of which enhancement of TNF- mRNA expression in M was also observed. Conclusion Promotion of TNF production might be one of the mechanisms by which JDP-N enhances the immune function.

**Key words** ziziphus jujubae; tumor necrosis factor; protein kinase C; macrophages; RNA, messenger

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<sup>[1]</sup>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<sup>[2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。本文研究 JDP-N 对小鼠腹腔巨噬细胞 (M)分泌 TNF 及 TNF- 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±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 β-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 23000,由华南理工大学林勤保博士提供<sup>[4]</sup>。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。ThiazolyBlue (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-异喹啉磺酰基)-2-甲基咪唑 (H-7)为 Sigma 产品。根据文献<sup>[5]</sup>,由加拿大真达公司合成 TNF- 引物:5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'(upper);5'-TTG-ACCTCAGCGCTGAGTTG-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<sup>[6]</sup>进行。终止培养前 4h 加入 0.5% MTT 20 μl,然后 1500r/min 离心 10min,小心吸去上清。每孔加入 100 μl DMSO-乙醇 (1:1)溶液,在微型振荡器上振荡 5min。用酶标仪测 D<sub>570</sub> 值。

### 1.4 M 的培养

按文献<sup>[7]</sup>的方法,无菌取小鼠腹腔 M,锥虫篮染色计数,活率大于 90%。调细胞浓度为 1×10<sup>6</sup>~1×10<sup>7</sup>/ml,接种于多孔培养板中,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2h。以 PBS 或 Hepes 缓冲液冲洗两遍,冲洗

收稿日期:2001-01-08

作者简介:张庆 (1973-),女,江苏南通人,1999 年毕业于第一军医大学,硕士,电话:020-85141114-87235

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<sub>1</sub> 细胞,细胞浓度可保持在 1×10<sup>5</sup>~1×10<sup>6</sup>/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- $\alpha$  的诱生

上述制备的 M<sub>1</sub>, 加入不同浓度的 JDP-N 或 / 和 LPS, 在 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 下孵育 6 h 后, 取上清, -30 °C 保存, 供测 TNF- $\alpha$  活性时使用。

1.6 TNF- $\alpha$  生物活性测定

用 L929 细胞株细胞毒法测定<sup>[8]</sup>。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 3×10<sup>5</sup>/ml, 于 96 孔板中每孔加 100  $\mu$ l, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜。加入待测样品、放线菌素 D (终浓度为 1  $\mu$ g/ml), 继续培养 16 h, 再加入 0.5% MTT 20  $\mu$ l。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  $\mu$ l PCR 产物与 2  $\mu$ l 加样缓冲液混匀, 加入加样槽中, 接通电源, 按电压降 5V/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 M<sub>1</sub> 分泌 TNF 的影响

JDP-N 与 M<sub>1</sub> 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  $\mu$ g/ml 为最佳诱导浓度。JDP-N 对 LPS 诱导 M<sub>1</sub> 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 M<sub>1</sub> 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 $\pm$ SD)

Group	D <sub>570</sub>
Control	0.258 $\pm$ 0.005
JDP-N	
25 $\mu$ g/ml	0.229 $\pm$ 0.011*
50 $\mu$ g/ml	0.216 $\pm$ 0.009**
100 $\mu$ g/ml	0.195 $\pm$ 0.014**
200 $\mu$ g/ml	0.209 $\pm$ 0.013**
LPS (10 $\mu$ g/ml)	0.173 $\pm$ 0.010**
JDP-N+LPS (50 $\mu$ g/ml+10 $\mu$ g/ml)	0.169 $\pm$ 0.010**

JDP-N: Jujubedate polysaccharide; LPS: Lipopolysaccharide; TNF: Tumornecrosis 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, Mean $\pm$ SD)

Group	D <sub>570</sub>
Control	0.258 $\pm$ 0.005
JDP-N	
25 $\mu$ g/ml	0.261 $\pm$ 0.009
50 $\mu$ g/ml	0.258 $\pm$ 0.012
100 $\mu$ g/ml	0.263 $\pm$ 0.014
200 $\mu$ g/ml	0.259 $\pm$ 0.007
LPS (10 $\mu$ g/ml)	0.257 $\pm$ 0.012

2.2 JDP-N 影响腹腔 M<sub>1</sub> 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  $\mu$ g/ml) 和 JDP-N (100  $\mu$ g/ml) 分别与 M<sub>1</sub> 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)。

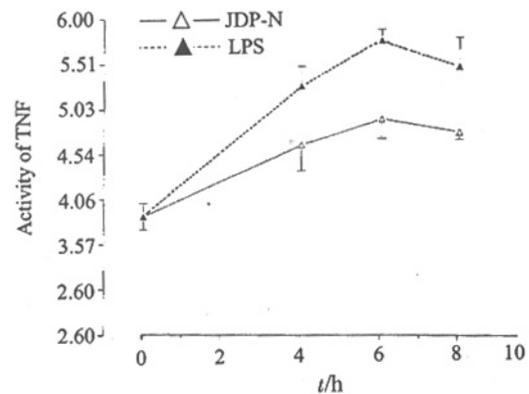


图 1 JDP-N 和 LPS 影响腹腔 M<sub>1</sub> 分泌 TNF 的时效关系  
Fig.1 Time-efficiency relation of JDP-N and LPS affecting TNF secretion by peritoneal macrophage in vitro

2.3 PKC 在 JDP-N 诱导 M<sub>1</sub> 分泌 TNF 中的作用

为探讨 JDP-N 诱导 M<sub>1</sub> 分泌 TNF 是否与 PKC 有关, 我们用不同浓度的 H-7 与 100  $\mu$ 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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> 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 <sub>570</sub>
JDP-N (100 $\mu$ g/ml)	0.196 $\pm$ 0.010
JDP-N+H-7	
100 $\mu$ g/ml+5 $\mu$ g/ml	0.216 $\pm$ 0.009
100 $\mu$ g/ml+10 $\mu$ g/ml	0.220 $\pm$ 0.012*
100 $\mu$ g/ml+15 $\mu$ g/ml	0.229 $\pm$ 0.007*
100 $\mu$ g/ml+20 $\mu$ 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 中 TNF- mRNA 表达的影响 (图 2)

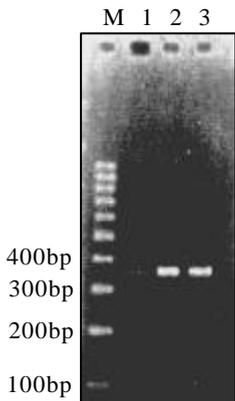


图 2 JDP-N 对腹腔 M TNF- mRNA 表达的影响  
 Fig.2 Effects of JDP-N on TNF- mRNA expression in murine peritoneal macrophages  
 Lane1:Control; Lane2:JDP-N(50 µg/ml); Lane3:JDP-N(100 µg/ml)  
 M:Marker

在 JDP-N 刺激下, TNF- 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 µg/ml) 刺激下, TNF- mRNA 的 PCR 产物无明显差别。对照组有 TNF- mRNA 表达, 但比 JDP-N 刺激组表达量少。

### 3 讨论

M 激活后, 可释放 TNF IL-1、NO 等细胞因子和炎症介质。Giovine 等<sup>[11]</sup>证实 IL-1 不影响 TNF 对 L929 细胞的杀伤作用。活化 M 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<sub>2</sub> 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 杀伤肿瘤细胞效应。

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 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 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 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 可能是多糖调节免疫、抑制肿瘤的靶细胞之一。

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

### 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 [J]. 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伤活性的影响 [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.

(责任编辑: 黄开颜)

## 射频治疗机功率和电极处理的原则和方法

王传斌, 丁雪梅, 廖旺军 (第一军医大学南方医院肿瘤科, 广东 广州 510515)

摘要: 射频 (聚能刀) 治疗实体瘤作为肿瘤综合治疗的一种手段, 已被愈来愈多地用于临床。在射频仪使用中, 合理地调整功率、正确地使用电极, 不仅能提高疗效, 同时可以减轻病人的痛苦。

关键词: 射频; 功率; 电极; 聚能刀

中图分类号: R730 文献标识码: B 文章编号: 1000-2588(2001)08-0594-02

收稿日期: 2001-02-21

作者简介: 王传斌 (1966-), 男, 湖北武汉人, 1997 年毕业于第一军医大学, 大专, 技师, 电话 020-85141656

随着科技的发展, 治疗肿瘤的方法愈来愈多。20 世纪 90 年代后期射频治疗实体瘤在技术上有了根本性的突破。计算机技术的应用, 使射频治疗实体瘤进入了更为安全有效的实