

金钗石斛多糖对脂多糖诱导的小鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF- α ·NO 的影响

李小琼, 金徽, 葛晓军, 唐彦萍* (遵义医学院生物化学教研室, 贵州遵义 563003)

摘要 [目的] 研究金钗石斛多糖对脂多糖(LPS)诱导的小鼠腹腔巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、一氧化氮(NO)的影响。[方法] 用不同浓度金钗石斛多糖作用于小鼠腹腔巨噬细胞, LPS作为诱导剂, 采用放射免疫法检测细胞培养液中 TNF- α 的含量, 硝酸酶还原法测定细胞培养液中 NO 的含量, 荧光法测定细胞内诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的活性, 实时 PCR(real-time PCR)法测定 TNF- α mRNA、iNOS mRNA 的表达。[结果] 与 LPS 组比较, 金钗石斛多糖在 50~400 mg/L 范围内可干预 LPS 对小鼠巨噬细胞的作用, 使小鼠腹腔巨噬细胞 TNF- α 、NO 合成减少, iNOS 活性降低, TNF- α mRNA、iNOS mRNA 的表达降低。[结论] 金钗石斛多糖可改善 LPS 对小鼠腹腔巨噬细胞的作用, 使 TNF- α mRNA、iNOS mRNA 的表达降低, TNF- α 、NO 合成减少, 从而起到抗炎的作用。

关键词 金钗石斛多糖; 脂多糖; 巨噬细胞; 肿瘤坏死因子- α ; 一氧化氮

中图分类号 Q949.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)28-13634-02

Effects of Polysaccharides from *Dendrobium nobile* on TNF- α and NO Secretion in Peritoneal Macrophages of Mice Induced by LPS

LI Xiao-qiong et al (Biochemical Staff Room, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003)

Abstract [Objective] Study on the effects of *Dendrobium nobile* polysaccharide on tumor necrosis factor- α (TNF- α) and nitric oxide (NO) release by mouse peritoneal macrophage induced Lipopolysaccharide (LPS) *in vitro*. [Method] The peritoneal macrophages of mice were conducted with LPS in the presence of *Dendrobium nobile* polysaccharide at various concentration. TNF- α was detected by radioimmunoassay, NO content of cell culture fluid was determined by nitrate reductase method, the activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS) was measured by fluorimetry assay. The expression of TNF- α and iNOS mRNA were observed by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). [Result] Compared with the control group, Polysaccharides of *Dendrobium nobile* could markedly inhibit the secretion of TNF- α and NO and decrease the activity of iNOS and down-regulate the expression of TNF- α mRNA and iNOS mRNA in a dose dependent manner. [Conclusion] *Dendrobium nobile* polysaccharide can improve TNF- α mRNA, iNOS mRNA and its protein expression induced by Lipopolysaccharide in mouse peritoneal macrophage that may play a very important role in the prevention of inflammation.

Key words Polysaccharide from *Dendrobium nobile*; LPS; Macrophage; TNF- α ; NO

金钗石斛(*Dendrobium nobile*)为兰科石斛属多年生附生草本植物^[1],是我国传统名贵中药,因其特殊的生存环境和卓越的滋补功效而名列“中华九大仙草”之首,具有较高的药用价值,其中抗炎作用是其重要生物活性之一。目前非甾体类抗炎药(NSAIDs)和肾上腺皮质激素类药物在临床上的应用极为广泛,但是两者都有诸多的不良反应。临床及试验证实中药具有很好的抗炎作用,且毒副作用小,中药抗炎的药理研究成为当今世界上新药开发的热点。前期研究表明,金钗石斛多糖具有抑制毛细血管通透性、渗出及水肿抑制肉芽组织增生及血小板的聚集等抗炎作用,但目前对金钗石斛多糖抗炎的作用机制尚未见国内外文献报道。该研究观察不同浓度的金钗石斛多糖对脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)活化的巨噬细胞产生肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、一氧化氮(nitric oxide, NO)的影响,探讨金钗石斛多糖抗炎机制。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料。金钗石斛购于赤水长期镇金钗石斛基地,由贵阳中医院生药学教研室王世清教授鉴定。金钗石斛多糖由遵义医学院生化教研室提取。

1.1.2 试剂与仪器。一氧化氮试剂盒(南京建成生物工程研究所);肿瘤坏死因子放射免疫分析药盒(北京北方生物技术研究所);一氧化氮合成酶检测试剂盒, L-Canavanine(iNOS抑制剂)(碧云天生物技术研究所);总RNA提取试剂, cDNA

合成试剂盒, SYBR Green I 试剂盒(北京天根生化科技有限公司);其他试剂均为分析纯。Varian 1000 傅立叶转红外光谱仪(美国 VARIAN 公司); GAMADYP DYP γ 型计数器(DPC 公司);全自动荧光酶标仪(德国 Humareader 公司产品);实时定量 PCR 仪(美国通用生物有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 小鼠腹腔巨噬细胞的培养。小鼠颈椎脱臼处死,用灌注法收集巨噬细胞,台盼蓝染色计数活细胞 > 95%, 用含 10% 小牛血清 RPMI 培养液调整细胞密度至 2×10^6 个/ml, 以每孔 100 μ l 接种于 96 孔板内,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱 2~3 h, 洗去未贴壁细胞,即为所需的巨噬细胞。

1.2.2 设计及分组。取生长状态良好的细胞,进行分组处理。①正常对照组(CK_N):培养基中仅加入含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基;②LPS 对照组(CK_L):培养基中加入终浓度 10 μ g/ml LPS;③D1 组:50 mg/L 金钗石斛多糖 + 10 μ g/ml LPS;④D2 组:100 mg/L 金钗石斛多糖 + 10 μ g/ml LPS;⑤D3 组:200 mg/L 金钗石斛多糖 + 10 μ g/ml LPS;⑥D4 组:400 mg/L 金钗石斛多糖 + 10 μ g/ml LPS。

1.2.3 细胞培养液中 TNF- α 、NO 含量以及巨噬细胞 iNOS 活性检测。收集各组上清液,采用放射免疫法检测 TNF- α 含量,硝酸酶还原法检测上清液中 NO 含量,采用荧光法测定巨噬细胞内 iNOS 活力,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.2.4 巨噬细胞中 TNF- α 、iNOS mRNA 水平检测。用 TRIzol 试剂盒分别提取各组细胞总 RNA(按说明书操作),接着以 mRNA 为模板,合成 cDNA(按说明书操作),进行后续试验或 -80 $^{\circ}$ C 保存。Real-time PCR 检测 TNF- α 、iNOS mRNA 表达。目的基因 TNF- α 、iNOS 引物和内参基因 β -actin 引物由北京天根生化科技有限公司合成,引物序列如下:iNOS

基金项目 贵州省中医管理局立项项目。

作者简介 李小琼(1974-),女,贵州遵义人,硕士,讲师,从事药物分子生物学技术研究。*通讯作者,教授, E-mail: yanping_193@yahoo.com.cn。

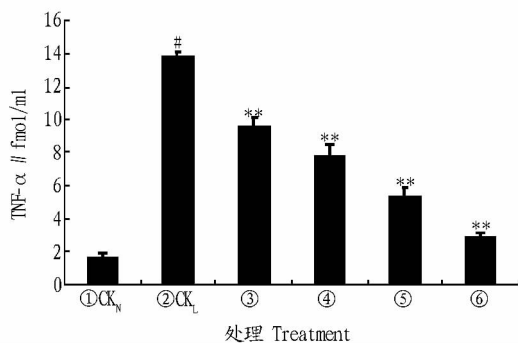
收稿日期 2009-06-22

正向引物,AGA TCA ATG TGG CTG TGC TC; iNOS 反向引物,GGT CTT CCA GGG CTC GAT CT; TNF- α 正向引物,GAA CTT CGG GGT GAT CGG TC; TNF- α 反向引物,TGT CTT TGA GAT CCA TGC CG; β -actin 正向引物,CGC TCG TTG CCA ATA GTG AT; β -actin 反向引物,CCA CAG GCA TTG TGA TGG。实时定量 PCR 反应条件:2 \times Sybr Green mix 20 μ l; 正向引物(10 μ mol/L)1 μ l; 反向引物(10 μ mol/L)1 μ l DNA 模板 1 μ l; 用 ddH₂O 补充体积至 40.0 μ l。条件:94 $^{\circ}$ C, 15 s; 60 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 40 cycles, 每组 cDNA 管家基因、目的基因各 3 管, 同批次扩增。处理组样本基因相对于对照组样本基因的量通过公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算得到。

1.2.5 统计学分析。所有数据用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两独立样本比较采用 t 检验; 组间两两比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 金钗石斛多糖对 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF- α 的影响 LPS 引起小鼠腹腔巨噬细胞 TNF- α 分泌增加, 金钗石斛多糖干预后 TNF- α 含量降低, 呈剂量-效应关系(图 1)。



注:#表示与正常对照组差异极显著($P < 0.01$); *表示与 LPS 组差异显著($P < 0.05$); **表示与 LPS 组差异极显著($P < 0.01$)。下同。

Note:# stands for difference extremely significant compared with normal control group ($P < 0.01$); * stands for difference significant compared with LPS group ($P < 0.05$); ** stands for difference extremely significant compared with LPS group ($P < 0.01$). The same as follows.

图 1 不同浓度金钗石斛多糖与 LPS 组巨噬细胞 TNF- α 含量比较

Fig. 1 Comparison of different dose *Dendrobium nobile* polysaccharides and TNF- α secretion in macrophages

2.2 金钗石斛多糖对 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞分泌 NO 的影响 LPS 引起小鼠腹腔巨噬细胞 NO 分泌增加, 金钗石斛多糖干预后 NO 含量降低, 呈剂量-效应关系(图 2)。

2.3 金钗石斛多糖对 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞 iNOS 活力的影响 培养 24 h 时, 设定正常对照组细胞内 iNOS 活力为 1, LPS 组 iNOS 活力就为 6.250 ± 0.477 , 差异具有统计学意义($P < 0.01$), 4 组不同浓度(50 ~ 400 mg/L)金钗石斛多糖试验组与 LPS 比较, iNOS 活力明显下降($P < 0.01$), 金钗石斛多糖浓度越高, iNOS 活性下降越明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 3)。

2.4 Real-time PCR 检测金钗石斛多糖对 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞 TNF- α , iNOS mRNA 表达的影响 采用 real-

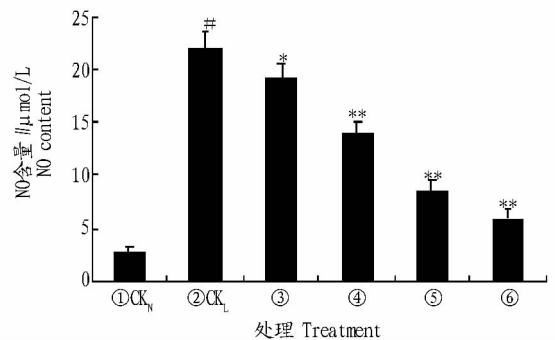


图 2 不同浓度金钗石斛多糖与 LPS 组巨噬细胞 NO 含量比较

Fig. 2 Comparison of different dose *Dendrobium nobile* polysaccharides of NO secretion in macrophages

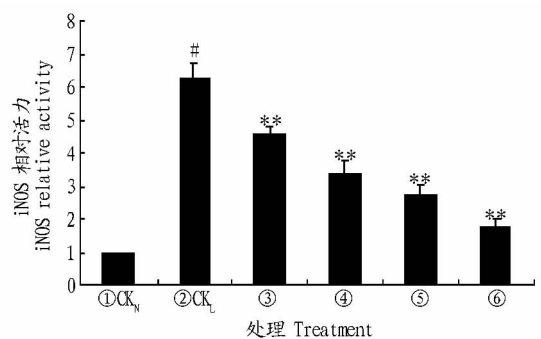


图 3 不同浓度金钗石斛多糖与 LPS 组巨噬细胞 iNOS 活力比较

Fig. 3 Comparison of different dose *Dendrobium nobile* polysaccharides and iNOS activity in macrophages

time PCR 检测 TNF- α , iNOS 的 mRNA 表达, 结果显示: LPS 引起小鼠腹腔巨噬细胞 TNF- α , iNOS 的 mRNA 表达增强, 金钗石斛多糖干预后 TNF- α , iNOS 的 mRNA 表达下降, 且和多糖浓度相关(表 1)。

表 1 不同浓度金钗石斛多糖对巨噬细胞 TNF- α , iNOS mRNA 表达的影响

Table 1 The effect of *Dendrobium nobile* polysaccharides on TNF- α , iNOS mRNA expression in macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

处理 Treatment	TNF- α /actin	iNOS/actin
①(CK _N)	1.004 \pm 0.112	1.006 \pm 0.135
②(CK _L)	1.980 \pm 0.139#	2.876 \pm 0.135#
③	1.734 \pm 0.084*	2.139 \pm 0.067**
④	1.682 \pm 0.114**	1.933 \pm 0.096**
⑤	1.430 \pm 0.114**	1.682 \pm 0.146**
⑥	1.203 \pm 0.096**	1.360 \pm 0.114**

3 讨论

巨噬细胞是机体免疫系统的一种重要免疫细胞, 也是 TNF- α , NO 等促炎细胞因子产生释放的主要来源, LPS 刺激巨噬细胞能诱导其产生和释放炎症细胞因子^[2], 以此单一的细胞系进行研究更能明确药物作用的机制。该试验采用的巨噬细胞来自小鼠腹腔中丰富的游离巨噬细胞, 含其他细胞较少, 经过贴壁和洗涤处理后, 细胞活力、数量和纯度较容易达到试验要求。试验结果表明, 所获得的小鼠腹腔巨噬细胞对 10 μ g/ml LPS 的刺激具有良好的反应性。

TNF- α 和 NO 是活化巨噬细胞、杀灭病原微生物、炎症

(下转第 13672 页)

与理论鲜重防效(%)的差($E - E_0$)值可以看出,两者混用后作用效果表现为相加作用,其 $E - E_0$ 值为0.10~3.43。

表1 三氟啶磺隆钠盐与莠灭净混用对稗草和胜红蓟的鲜重防效及理论防效

Table 1 Fresh weight and theoretical effects of trifloxysulfuron sodium and ametryn against Barnyard grass and Ageratum conyzoides		%					
三氟啶磺隆 g/hm ² Trifloxysulfuron sodium	莠灭净 g/hm ² Ametryn	稗草 Barnyard grass			胜红蓟 Ageratum conyzoides		
		实测值/ E Actual value	理论值/ E_0 Theoretical value	抑制率($E - E_0$) Inhibition rate	实测值/ E Actual value	理论值/ E_0 Theoretical value	抑制率($E - E_0$) Inhibition rate
0	0	0	0	-	0	00	-
	400	40.70	40.70	-	51.70	40.70	-
	600	53.80	57.80	-	65.10	57.80	-
	800	70.40	70.40	-	78.20	70.40	-
5	0	48.70	48.70	-	57.80	48.70	-
	400	75.60	69.58	6.02	80.30	79.62	0.68
	600	85.70	76.30	9.40	88.70	85.27	3.43
	800	89.90	84.82	5.08	90.90	90.80	0.10
10	0	60.70	60.70	-	67.40	67.40	-
	400	85.60	76.70	8.90	85.40	84.25	1.15
	600	88.40	81.84	6.56	90.40	88.62	1.78
	800	93.70	88.37	5.33	94.70	92.89	1.81
15	0	78.10	78.10	-	78.90	78.90	-
	400	90.40	87.01	3.39	89.90	89.81	0.09
	600	96.80	89.88	6.92	95.70	92.64	3.06
	800	98.80	93.52	5.28	97.80	95.40	2.40

3 小结

在温室条件下,采用盆栽的方法培养得到生长较为均匀一致的稗草、胜红蓟幼苗为试验材料,通过 Gowing 法初步评价了三氟啶磺隆钠盐与莠灭净混用后的联合作用类型。从各个混用组合对稗草、胜红蓟的鲜重防效及实测防效与理论防效的差值($E - E_0$)综合考虑,两者可以混用或加工成混剂。三氟啶磺隆钠盐与莠灭净混用后用于甘蔗田除草,可以优势互补,减少各自的用量,降低三氟啶磺隆钠盐的使用成本和药害,扩大杀草谱,二者混用具有广阔的市场前景。

三氟啶磺隆钠盐与莠灭净混剂具体配方的选择还需根

据总体除草效果,生产成本及加工工艺等综合考虑后确定。

参考文献

- [1] 郑斐能. 我国的农药混剂及其有关问题的讨论[J]. 农药科学与管理, 1995(3):19-21.
- [2] 薛根祥. 混剂农药在生产应用中存在的问题及其对策的探讨[J]. 农药科学与管理, 1995(2):30-31.
- [3] 佚名. 三氟啶磺隆钠盐[J]. 农药科学与管理, 2008, 29(5):58.
- [4] 韦桥现, 廖世纯, 林健乾. 80% 莠灭净防除蔗田杂草药效评价[J]. 广西农业科学, 2006, 37(5):548-550.
- [5] 林长福, 杨玉廷. 除草剂混用、混剂及其药效评价[J]. 农药, 2002, 43(8):5-7.
- [6] 高宗军, 李美, 高兴祥, 等. 烟嘧磺隆与硝磺草酮、氯草津混用的联合作用[J]. 农药, 2007, 46(10):704-706.

(上接第 13635 页)

反应的主要效应分子,然而,过量的 TNF- α 和 NO 则是加重炎症反应的炎症介质。在炎症反应初期,适量的 TNF- α 是机体对抗炎症的积极反应,但若大量 TNF- α 持续不断地释放则会导致炎症不断扩大、加重。在炎症反应中, TNF- α 不但能直接参与炎症反应,还能诱导其他细胞因子释放,共同对组织造成损伤^[3]。故拮抗 TNF- α 的过量释放成为预防和治疗炎症的关键措施之一。研究表明, NO 也是介导炎症反应的因子,在内毒素致机体损伤中起重要作用^[4], iNOS 是巨噬细胞 NO 合成反应的限速酶,其酶活性、功能的变化直接调控 NO 的产生。因此, iNOS 是研究 NO 生成和作用的重要环节。

该研究结果显示,金钗石斛多糖干预 LPS 诱导的巨噬细胞后, TNF- α 和 NO 分泌减少,表明金钗石斛多糖可通过抑制 TNF- α 、NO 的产生发挥抗炎作用,为金钗石斛的临床应用奠定了一定的理论基础。研究还表明,金钗石斛多糖还能够抑

制 TNF- α 、iNOS mRNA 表达,表明金钗石斛多糖减少 LPS 诱导的巨噬细胞 TNF- α 、NO 含量,可能与降低 TNF- α 、iNOS mRNA 表达有关。

参考文献

- [1] 王康正, 高文远. 石斛属药用植物研究进展[J]. 中草药, 1997, 28(10):633-635.
- [2] LI M, LIU G T. Inhibitory effect of bicyclol on iNOS expression and NF- κ B activation degradation in macrophages induced by lipopolysaccharides [J]. Chin Pharmacol Bull, 2006, 22(12):1438-1443.
- [3] HASLETON P S, ROBERTS T E. Adult respiratory distress syndrome: an update [J]. Histopathology, 1999, 34(3):285-294.
- [4] YANG F, CONTOIS A S, FANG L. Nitric oxide derived nitrate anion contributes to endotoxic shock and multiple organ injury [J]. Crit Care Med, 2002, 30(3):650.
- [5] WANG LR, LI J, DONG YJ, et al. Effect of glycyrrhiza polysaccharide on growth performance and immunity function of mice [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2):129-131.
- [6] 周满红, 杜文胜, 龙胜双, 等. 东方蓼染色体的核型分析[J]. 通化师范学院学报, 2009, 30(2):48-49.