

糖萜素对小鼠腹腔巨噬细胞产生一氧化氮的影响

沈建根 鲍建芳 邵传森 詹勇¹ (杭州 310031 浙江大学医学院;¹ 杭州 310016 浙江大学动物科学院)

摘要 目的:探讨糖萜素对小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 的影响。方法:在饲料中添加不同剂量糖萜素喂养 NIH 小鼠,以基础饲料为对照,检测环磷酸胺免疫抑制组与非抑制组不同时间段小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 的含量。结果:含糖萜素饲料组于不同时间测得 NO 含量均较基础饲料组显著增高($P < 0.05$)。免疫抑制状态下,含糖萜素饲料组 NO 含量也较基础饲料组高($P < 0.05$)。体外糖萜素不能直接影响 NO 的生成。结论:糖萜素能显著提高小鼠体内巨噬细胞产生 NO。体外则不能直接影响 NO 的生成。

关键词 糖萜素;巨噬细胞;一氧化氮

The effects of sacchariterpenin on the production of NO by mice peritoneal macrophages

Shen jiangen, Bao Jianfang, Shao Chuansen¹, et al (Department of Immunology, Medical college, Zhejiang University,
¹ Animals Science Institute, Zhejiang University Zhan Yong)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** In order to study the effects of sacchariterpenin on the production of NO by mice peritoneal macrophages. **METHOD:** NIH mice were fed on the food containing different doses of sacchariterpenin. NO produced by the macrophages from cyclophosphamide immunosuppressive group and non-immunosuppressive group were measured at different times. **RESULTS:** The levels of NO in mice fed on sacchariterpenin (group B) were significantly different from that in common food group

基金资助:浙江省科委资助项目。

作者简介:沈建根(1952-),男,副研究员,硕士生导师,主要从事抗感染免疫和肿瘤免疫研究

(group A) at different time. After immunosuppression the levels of NO in mice fed on sacchariterpenin were higher than that fed on common food ($P < 0.05$). Sacchariterpenin did not influence the production of NO directly in vitro. **CONCLUSION:** Sacchariterpenin can activate the mice macrophages to produce NO in vivo, but not influence the production of NO directly in vitro.

KEY WORDS Sacchariterpenin, Macrophages, Nitrogen Oxides(NO)

糖萜素(Sacchariterpenin)是从我国丰富植物资源茶饼中提取的纯天然活性物质,其主要有效成分为茶科三萜类化合物和多糖。詹勇等曾报道^[1-4]:糖萜素具有抗氧化,清除自由基,促进动物生长,提高畜禽成活率和增加蛋禽产蛋性能的作用。展示了良好的应用前景。然而迄今尚未见有关糖萜素对哺乳类动物免疫功能的研究报道。本研究旨在通过观察小鼠腹腔巨噬细胞 NO 的生成来探讨糖萜素对机体免疫调节的作用机理,为研制以糖萜素为主体的新型免疫增强剂提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

糖萜素(浙江大学动物科学院生物活性物质研究开发中心提供,专利国际:PCT/CN 96-00070;国内:96101151.3),棕黄色粉末状,有效成分 $\geq 60\%$ 。N-萘基乙二胺,对氨基苯磺酰胺,噻唑蓝(MTT),内毒素脂多糖(LPS Ecoli O2biB6)均购自 Sigma 公司。DMEM(GIBCO),超级小牛血清(杭州四季青生物材料研究所),环磷酰胺(上海华联制药有限公司,批号 991104)。

1.1.2 实验动物

NIH 小鼠:8 周龄,体重 18-20g,浙江大学医学院实验动物中心提供。

1.1.3 主要仪器

3110 型二氧化碳培养箱(FORMA 公司),318 MC 型全自动酶联免疫检测仪(上海三科仪器有限公司),移液器(GILSON),96 孔细胞培养板(Denmark)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

(1)体内试验

动物分组:将 315 只 8 周龄 NIH 小鼠随机分成免疫抑制(环磷酰胺抑制)和非免疫抑制两大组,前者 135 只,后者 180 只。

将非免疫抑制小鼠随机分成 A、B 两组,每组 90 只,雌雄各半(分开饲养)。A 组以普通饲料喂养,B 组以每公斤含 500 mg 糖萜素的普通饲料喂养。饲养至 20、40、60 和 80 d 时,每组随机取 20 只(雌雄各半)进行小鼠腹腔巨噬细胞 NO 含量测定。

将免疫抑制组小鼠随机分成 C、D、E 三组,每组 45 只,雌雄各半(分开饲养),每只小鼠皮下注射环磷酰胺 100 mg/Kg。C 组以普通饲料喂养;D 组以每公斤含 500 mg 糖萜素的普通饲料喂养;E 组以每公斤含 1000 mg 糖萜素的普通饲料喂养。饲养至 7 和 14 d 时,每组随机取 20 只(雌雄各半)收集腹腔巨噬细胞测定 NO 含量。

(2)体外试验

1)不同浓度糖萜素体外对小鼠腹腔巨噬细胞生长代谢的影响

收集未经糖萜素饲料喂养的 NIH 小鼠腹腔巨噬细胞,并用 10% DMEM 制成 2×10^6 /ml 的细胞悬液,100 μ l/孔,然后加入 100 μ l/孔不同浓度糖萜素,使其最终浓度成为 320、160、80、40、20、10、5、2.5、1.25、0.625 μ g,同时设阴性对照(无糖萜素),置 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养 20 h,加入 MTT 10 μ l/孔(5 mg/ml),继续培养 4 h,轻轻吸弃上清,加入 150 μ l 二甲亚砜,充分混匀,在 570 nm 测吸光度。

2)体外 NO 含量测定

选取合适的糖萜素浓度 80、40、20、10、5、2.5、1.25、0.625 μ g,按上述方法培养后测 NO 含量。

1.2.2 小鼠腹腔巨噬细胞的制备

将小鼠拉颈处死,75%酒精浸泡 5 min,用 Hank's 腹腔灌注法收集腹腔巨噬细胞,1000 r/min 离心 7 min 弃上清,加入 10%小牛血清 DMEM 培养液调整细胞浓度至 2×10^6 /ml,每孔 100 μ l 接种到 96 孔培养板,置 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 孵箱内 4 h 后,加含 1 μ g/ml LPS 10%小牛血清 DMEM 100 μ l/孔,在同样条件下孵育 20 h,测定 NO 含量。

1.2.3 巨噬细胞 NO 生成量的测定

NO 释放到上清液中迅速转变成 NO₂⁻,NO₂⁻ 性质稳定,可通过测定 NO₂⁻ 间接反映 NO 的生成量。在酸性环境下,NO₂⁻ 与对氨基苯磺酰胺起加成反应,其加合产物与 N-萘基乙二胺发生 Griess 重氮化反应,反应产物呈红色。Griess 试剂 A:0.1% N-萘基乙二胺;Griess 试剂 B:5% H₃PO₄,1% 对氨基苯磺酰胺。使用前等体积混合试剂 A 和试剂 B,冰箱保存。吸取待测培养液 150 μ l,加入等体积的 Griess 试剂,室温反应 10 min,在酶联检测仪上测定 550 nm 的吸光度。

1.2.4 统计学分析

实验数据经 SPSS 7.0 for windows 95 软件处理,统计数

据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。并用 ANOVA 和 t 检验分析。

2 结果

2.1 糖萜素对小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 的影响

将测得标本 OD 值代入回归方程中,即得到相关的 NO 浓度。所得结果见图 1。结果表明,B 组不同时间段测得的 NO 含量均较 A 组显著增高($P < 0.05$),同组小鼠不同时间之间,巨噬细胞产生 NO 水平无统计学差异($P > 0.05$)。

2.2 糖萜素对免疫抑制小鼠巨噬细胞产生 NO 的影响

经环磷酰胺注射后第 7 天、14 天测得巨噬细胞 NO 结果见表 1,以 500 mg/kg、1000 mg/kg 糖萜素饲养的 D 组和 E 组,测得 NO 含量均高于 C 组($P < 0.05$),E 组较 D 组有显著性

差异($P < 0.05$), D 组和 E 组 14 天较同组第 7 天有显著性差异($P < 0.05$)。

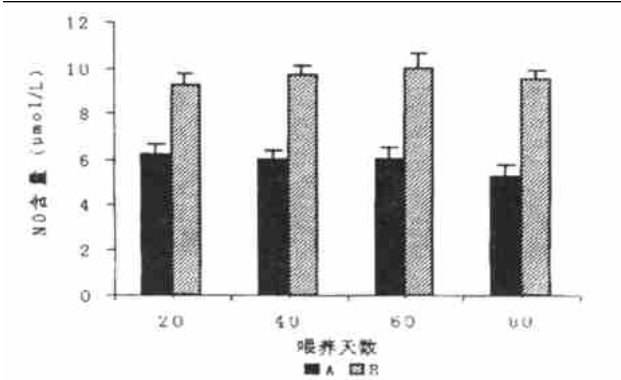


图 1 糖萼素对正常小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 的影响

表 1 糖萼素对免疫抑制组小鼠巨噬细胞 NO 分泌的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组 别	NO 含量($\mu\text{mol/L}$)	
	7d	14d
C 组	5.22 $\pm$ 1.35	5.46 $\pm$ 1.31
D 组	7.61 $\pm$ 1.26 [*]	9.56 $\pm$ 0.87 ^{* #}
E 组	10.75 $\pm$ 2.45 ^{**}	12.62 $\pm$ 2.48 ^{** #}

^{*} 较 C 组有显著性差异($P < 0.05$)。

^{**} 较 C、D 组有显著性差异($P < 0.05$)。

[#] 较同组第 7 天有显著性差异($P < 0.05$)。

2.3 糖萼素对体外小鼠腹腔巨噬细胞生长代谢的影响

在培养液中加入不同浓度糖萼素,培养 24h 后用 MTT 法测得结果见图 2。从图中生长曲线可以看出糖萼素在 0.625 ~ 80 $\mu\text{g/ml}$ 剂量段对小鼠腹腔巨噬细胞生长无明显影响。当糖萼素浓度 > 80 $\mu\text{g/ml}$ 时,巨噬细胞生长即出现不同程度抑制作用, $\geq 320 \mu\text{g/ml}$ 时,抑制率为 100 %。

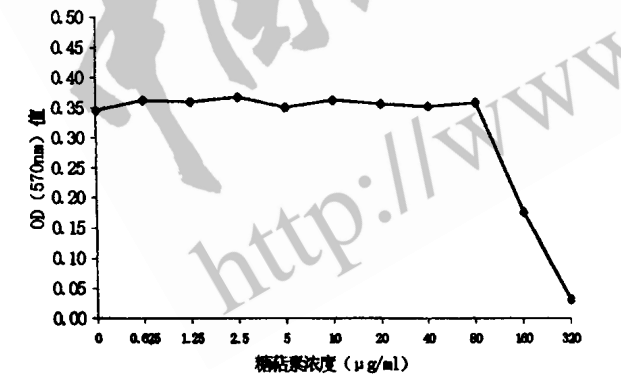


图 2 巨噬细胞生长曲线

2.4 糖萼素对体外受 LPS 刺激的巨噬细胞产生 NO 的影响

用 1 $\mu\text{g/ml}$ 的 LPS 刺激巨噬细胞,同时在培养液中添加 0.625 ~ 80 $\mu\text{g/ml}$ 糖萼素,24h 后检测培养液中 NO 含量。结果如图 3 所示,糖萼素在 10 μg ~ 80 $\mu\text{g/ml}$ 对巨噬细胞产生 NO 表现了明显抑制,糖萼素的浓度越大则 NO 的下降程度越大;而小于 10 $\mu\text{g/ml}$ 时则不影响巨噬细胞产生 NO。无 LPS 刺激的情况下,糖萼素不能直接影响巨噬细胞产生 NO。

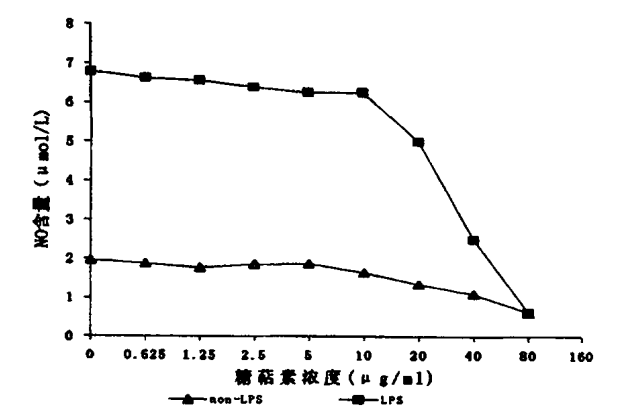


图 3 糖萼素体外对巨噬细胞产生 NO 的影响

3 讨论

巨噬细胞产生的 NO 与其抗微生物活性和肿瘤杀伤活性密切相关,即 NO 的细胞毒作用在宿主防御中起着重要作用。并认为它是一种免疫调节因子,从而更广泛地影响着机体的免疫功能^[5-8]。本研究结果表明,口服糖萼素能显著提高正常小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO,并能持续在较高水平,有助于机体更有效地发挥免疫防御功能。对免疫抑制状态下的小鼠,糖萼素也有明显提高巨噬细胞产生 NO 作用。实验发现,以含 500 mg/kg 糖萼素的饲料喂养免疫抑制小鼠 14d 时,能使 NO 的含量达到 B 组水平,而用 1000 mg/kg 糖萼素的饲料喂养只需 7d,就能调节到 B 组水平,证明 NO 的生成与糖萼素剂量有关。体外试验结果显示,(一)糖萼素在 0.625 ~ 80 $\mu\text{g/ml}$ 剂量段对小鼠腹腔巨噬细胞的生长无明显影响,当糖萼素浓度 > 80 $\mu\text{g/ml}$ 时,细胞生长即出现不同程度抑制作用,说明高浓度糖萼素对细胞有毒性作用。(二)对受 LPS 刺激的巨噬细胞,糖萼素 < 10 $\mu\text{g/ml}$ 对 NO 的产生无影响,但 > 10 $\mu\text{g/ml}$ 时,巨噬细胞分泌的 NO 呈现梯度下降,推测该剂量段虽然对细胞生长无明显影响,但对 NO 合成功能已产生不同程度损伤,即与糖萼素毒性有关。(三)在无 LPS 刺激的情况下,糖萼素不能在体外直接影响巨噬细胞 NO 的生成。

上述研究结果从一个方面反映了糖萼素的作用,同时我们还发现糖萼素能显著提高 NK 活性和 IFN- γ 的产生^[9]。其免疫调节的分子基础有待进一步深入研究。

参考文献

- 詹勇,胡彩虹,洪奇华等. 801 生物活性添加剂抗氧化作用. 浙江农业大学学报, 1995, 21(4):379.
- Zhan Yong, Shi Fangxiang, Men Xueduo *et al.* Functions of 801 Bioactive Additive on the immune responses and Performance of broilers proceedings of the International Academic Symposium and Exhibition of Feed Additive Beijing China 1992.
- 胡井岗,沈大鹏,詹勇等. 801 生物活性添加剂对蛋鸡生产性能和降低死亡率的作用. 浙江农业大学学报 1994,20(3):297.
- 詹勇,孟学多,季常青等. 抗菌素替代物 - 801 生物活性添加剂. 饲料研究 1994(1):5.
- Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, *et al.* Calmodulin Is a Subunit of

- Nitric Oxide Synthase from Macrophages. J. Exp Med. 1992, 176 : 599 .
- 6 Wei XQ, Charles IG, Smith A, *et al*, Altered Immune Responses in Mice Lacking Inducible Nitric Oxide Synthase. Nature 1995, 375 : 408 .
- 7 Macmicking JD, Nathan C, Hohl G, *et al*, Altered Responses to Bacterial Infection and Endotoxic Shock in Mice Lacking Inducible Nitric Oxide Synthase. Cell 1995, 81 : 641 .
- 8 Corbett JA, Kwon G, Turk J, *et al*, IL-1 β Induces the Coexpression of Both Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase by Islets of Langerhans: Activation of Cyclooxygenase by Nitric Oxide. Biochemistry 1993, 32 : 13767 .
- 9 鲍建芳,邵传森,沈建根等.糖萜素对小鼠 NK 细胞活性影响的研究.浙江大学学报(医学版),2001,30(6):261 .

收稿日期:2001 - 05 - 09