

· 药理 ·

促肝细胞生长因子对小鼠腹腔巨噬细胞释放一氧化氮的抑制作用

嵇 扬(北京 100071 解放军总后勤部卫生部药品仪器检验所)

摘要 目的:研究促肝细胞生长因子对小鼠腹腔巨噬细胞释放一氧化氮的影响。方法:NO以 Griess 试剂测定。结果:浓度为 41.67~666.6 μg 多肽/ml 的促肝细胞生长因子能显著抑制小鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮释放。结论:促肝细胞生长因子对小鼠腹腔巨噬细胞释放一氧化氮的调节可能是其保肝作用机制之一。

关键词 促肝细胞生长因子;一氧化氮;巨噬细胞

Effect of HGF on LPS induced release of NO from mouse peritoneal microphase in vitro

Ji Yang(Drug and Instrument Inspect Institute of General Rear-service Department PLA, Beijing 100071)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the effects of HGF on LPS-induced release of NO from mouse peritoneal microphase in vitro. **METHODS:** NO was detected by Griess. **RESULTS:** HGF 41-677 $\mu\text{g}/\text{ml}$ significantly reduced NO synthesis and secretion from mouse peritoneal microphase in vitro. **CONCLUSION:** The effects of HGF on LPS-induced release of NO from mouse peritoneal microphase in vitro may be one of the mechanisms of its pharmacological effects.

KEY WORDS Hepatocyte Growth Factor(HGF), NO, M Φ

促肝细胞生长因子(Hepatocyte Growth Factor HGF)是从健康乳牛或猪肝脏中提取的多肽类物质,具有促进肝细胞生长的生理活性。目前,临床主要将其用于肝病的治疗。为进一步了解其药理作用机制,本文探讨促肝细胞生长因子对小鼠腹腔巨噬细胞释放一氧化氮的影响。现报告如下:

1 实验材料

1.1 实验动物: BALB/C 小鼠, δ , 体重 $20 \pm 2 \text{ g}$ 购自军事医学科学院实验动物中心(动物许可证号: 军医动字 95012)。

1.2 药品与试剂: 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS) sigma 产品; RPMI 1640 培养基, GIBCO 产品; N-1-萘乙二胺盐酸盐(分析纯), 磺胺(分析纯), 北京芳草医药化工研制公司; 其它均为分析纯试剂。注射用促肝细胞生长因子: 广东阳江制药厂; 批号为 991207; 规格为 20 mg/支; 以 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液将该药物溶解并稀释至实验用浓度。

1.3 仪器: $\Sigma 960$ 型酶标仪(METERTECHINC)中国台湾

2 实验方法和结果

2.1 标准曲线的制备

精密称取 NaNO_2 6.9 mg, 加水至 100.0 ml (1 mmol/L), 分别精密吸取 1 mmol/L NaNO_2 液 0.5、1.0、1.5、2.0 ml, 加水至 10.0 ml (50、100、150、200 $\mu\text{mol}/\text{L}$); 50、100、150、200 nmol/L NaNO_2 液各 100 μl , 加 Griess 试剂(含 1% 磺胺、0.1% N-1-萘乙二胺盐酸盐、2.5% 磷酸) 100 μl , 室温放置 10 min, 在酶标仪($\Sigma 960$)上 490 nm 处测定各孔吸收度值; 以浓度值(C)为横坐标、相应的吸收度值(A)为纵坐标绘制标准曲线。结果为:

$$C(\mu\text{mol}/\text{L}) = 210.2293 A + 1.0240 \quad r = 0.9999$$

2.2 腹腔巨噬细胞的制备

BALB/C 小鼠拉颈处死后, 在 75% 酒精中浸 2~3 秒, ip 含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液 3.5 ml/只, 轻揉 1 min 后抽出腹腔液, 离心(1000 r/min, 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 弃上清, 巨噬细胞(M Φ)以 D-Hank's 液洗 2 次, 以含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液悬浮 M Φ , 计数, 调整 M Φ 细胞数为 $1 \times 10^6/\text{ml}$; 铺板(96 孔: 0.2 ml/孔; 24 孔板: 1.0 ml/孔); 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱内培养, 2 h 后以 D-Hank's 液洗去未贴壁细胞, 重新加入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液。

2.3 LPS 对腹腔巨噬细胞释放一氧化氮的影响

在上述 M Φ (2.2 项下)内加入 LPS, 使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱内培养 3、9、12、16、20、24、33、42、58、66 h 后, 每孔取培养上清 100 μl , 加 Griess 试剂 100 μl , 室温放置 10 min, 在酶标仪($\Sigma 960$)上 490 nm 处测定各孔吸收度值, 从标准曲线上找出相应的 NO 浓度值。结果见表 1:

由表 1 可见, LPS 终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 已可使 M Φ 释放一氧化氮的量显著增加, 满足实验需要。12 h 时 LPS 已显著增加 M Φ 的一氧化氮释放量, 随着作用时间延长, 该释放量逐步增加。我们选取 24、48 h, 考察药物对 M Φ 释放一氧化氮的影响。

2.4 促肝细胞生长因子对腹腔巨噬细胞释放一氧化氮的影响

在上述 M Φ (2.2 项下)内加入 LPS, 使其终浓度为 20

表 1 LPS 对 MΦ 释放一氧化氮的影响

	对照孔 NO ₂ ⁻ concentration (nM)	LPS20 NO ₂ ⁻ concentration (nM)	LPS40 NO ₂ ⁻ concentration (nM)
3 h	9.07±1.29	8.96±1.49	9.38±1.34
9 h	12.01±1.98	13.37±1.38	13.95±1.80
12 h	16.58±1.59	21.89±2.05*	21.78±2.14
16 h	18.26±1.21	26.93±0.60*	28.25±0.56*
20 h	23.26±2.76	38.55±2.72*	39.97±2.10*
24 h	26.15±4.43	47.38±3.16*	48.69±1.82*
33 h	29.93±4.93	65.72±3.42*	66.20±3.08*
42 h	32.14±5.56	77.97±3.50*	80.28±3.99*
58 h	32.35±6.07	86.38±3.05*	89.11±6.38*
66 h	38.23±6.89	97.52±4.39*	96.89±6.74*

(x±s,n=4) * :与对照孔比,P<0.05

μg/ml;随后样品孔加入促肝细胞生长因子,使其终浓度分别为 666.6、333.3、166.7、41.7 μg 多肽/ml,对照孔加入同体积含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液;置 37℃ 5% CO₂ 培养箱内培养 10、20 h 后,每孔取培养上清 100 μl,加 Griess 试剂 100 μl,室温放置 10 min,在酶标仪(Σ960)上 490 nm 处测

$$\text{抑制率}\% = \frac{\text{LPS20 NO}_2^- \text{ concentration (nM)} - \text{HGF NO}_2^- \text{ concentration (nM)}}{\text{LPS20 NO}_2^- \text{ concentration (nM)}}$$

可见,浓度为 41.67~666.6 μg 多肽/ml HGF 对 LPS 致 MΦ 一氧化氮释放量增加有抑制作用,并呈现剂量依赖性。结果还显示:HGF 与 MΦ 共孵育 24 h 时,即表现出抑制作用;与 MΦ 共孵育 48 h 时,该抑制作用较强。

3 讨论

NO 是一氧化氮合酶催化 L-精氨酸的产物,参与多种体内生理病理过程。巨噬细胞在某些因素刺激下可产生 NO^[1]。目前认为:NO 的体内作用具有双重性,即:既有保护作用,又有损伤作用。在离体培养的细胞中,则主要表现其细胞毒作用^[2]。有研究表明:药物对 NO 生成的抑制与其保肝作用相关^[3]。

HGF 用于肝炎的治疗并取得较好疗效。我们的研究结

定各孔吸收度值,从标准曲线上找出相应的 NO 浓度值。结果见表 2:

表 2 促肝细胞生长因子对腹腔巨噬细胞释放一氧化氮的影响

	24 h NO ₂ ⁻ concentration:nM (抑制率%)	48 h NO ₂ ⁻ concentration:nM (抑制率%)
药物浓度		
对照孔	18.05±2.08	22.68±2.92
LPS20	40.13±3.55#	60.52±6.91#
HGF		
41.67	38.87±1.76 (7.0%)	53.58±3.13* (22.03%)
166.7	33.61±2.92* (19.61%)	45.17±4.07* (34.27%)
333.3	26.04±2.92* (37.72%)	31.30±4.07* (54.45%)
666.6	19.38±3.13* (53.65%)	22.36±3.46* (67.46%)

(x±s,n=4) #:与对照孔比,P<0.05; * :与 LPS20 孔比,P<0.05

果显示:HGF 能够抑制 LPS 诱导的 MΦ 一氧化氮生成。表明:HGF 除能促进肝细胞增殖之外,还具有抗细胞毒活性。因而提示:抑制 NO 生成,可能是保肝作用机制之一。

参考文献

1 丁传林,胡晓玲,马恩才,等.小鼠腹腔巨噬细胞诱生一氧化氮的实验研究.上海免疫学杂志,1998,18(1):28-29.
2 蒋莉,李跃华,戚晓红,等.丹参素对内毒性肝损伤的防护作用及其机制研究.中西医结合肝病杂志,1999,9(2):30-32.
3 洪敏,韩兴梅,朱荃,等.茵陈蒿汤保肝作用机理Ⅱ.对小鼠腹腔巨噬细胞释放 NO 的影响.中药药理与临床,1999,15(3):5-7.