

文章编号:1673-1689(2008)06-0073-04

甘草多糖对腹腔巨噬细胞分泌 TNF- α 及 mRNA 表达的影响

程安玮, 金征宇*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究了甘草多糖(GP)对巨噬细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的分泌及 mRNA 表达的影响。结果表明:GP 能剂量依赖性增加活化的巨噬细胞 TNF- α 的分泌量,当 GP 的添加量为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, TNF- α 的分泌量和 TNF- α mRNA 表达达到峰值。在 GP 添加量为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 培养时间为 12 h 时, TNF- α 的分泌量和 TNF- α mRNA 表达量最大。

关键词: 甘草多糖;巨噬细胞;肿瘤坏死因子

中图分类号: Q 539; Q 819; R 730.52

文献标识码: A

Effects of Glycyrrhiza Polysaccharid on Tumor Necrosis Factor- α and mRNA in Peritoneal Macrophages

CHENG An-wei, JIN Zheng-yu

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Effects of Glycyrrhiza Polysaccharide on the production of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and the expression of TNF- α mRNA were investigated. The results showed that TNF- α production was increased in a dose-dependent manner. The maximal productions of TNF- α and TNF- α mRNA were achieved with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GP presented. The maximum value of TNF- α production and TNF- α mRNA expression achieved at around 12 h with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GP.

Key words: Glycyrrhiza Polysaccharide; Macrophage; Tumor necrosis factor- α

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* F.)作为传统中药具有补脾、润肺、解毒、和药等功效,近年来各国学者对甘草化学成分提取研究十分青睐,但多数只注重于三萜类和黄酮类化合物的提取,而对甘草多糖(Glycyrrhiza Polysaccharid, GP)的研究较少。GP 是甘草重要的活性成分之一,具有免疫调节作

用,还具有抗肿瘤、抗病毒等作用^[1]。肿瘤坏死因子(TNF- α)是迄今为止发现的抗肿瘤活性最强的细胞因子,对体内外多种肿瘤细胞具有明显的细胞毒作用。活性多糖能诱导激活巨噬细胞 TNF- α 合成并分泌到细胞外,与其靶细胞上的 TNF- α 受体结合,对众多的组织器官产生生物学效应。作者研究

收稿日期:2007-09-19.

基金项目:国家自然科学基金重点项目(20436020).

作者简介:程安玮(1975-),女,山东临沂人,食品科学与工程博士研究生。

* 通讯作者:金征宇:(1960-),男,江苏扬州人,工学博士,教授,博士生导师,主要从事碳水化合物开发与利用研究. Email: zjin@jiangnan.edu.cn

了GP对巨噬细胞TNF- α 及mRNA表达的影响,进一步从基因表达水平揭示GP的免疫调节作用及其抗肿瘤活性的作用机理。

1 材料与方 法

1.1 器材和试剂

1.1.1 主要仪器 数显恒温水浴锅, büchi R-521型旋转蒸发仪, 索氏回流装置, UV-721型分光光度计, BSA-100型自动部分收集器, FD-40H冷冻干燥机, WJ-12F型二氧化碳培养箱, 550型酶标仪, HB-PX-200型PCR仪, GDS-7600G型凝胶成像仪。

1.1.2 试剂 小牛血清(Hyclone); 脂多糖(LPS, Sigma); RPMI-1640(Gibco)培养液(含体积分数10%的小牛血清, 青、链霉素各100 U/mL)。RNAiso和TaKaRa RNA PCR kit (AMV) ver. 3.0, 大连宝生物公司提供。标准DNA Marker(100-2000 bp)和Goldviewna II™, 北京博大泰克生物公司提供。TNF- α 引物序列(374 bp)由上海生工生物技术有限公司合成: 正链5'-CCTGTAGC-CCACGTCGTAGC-3'; 负链5'-TTGACCT-CAGCGCTGAGTTG-3'。其余常规试剂均为分析纯。

1.1.3 动物 BALB/C小鼠, 雄性, 6~8周龄, 体重(18.2±0.3) g, 北京大学实验动物中心提供。

1.1.4 甘草多糖的提取与纯化 水提醇析法: 甘草根茎产自内蒙古, 晒干粉碎过30目筛, 用无水乙醇回流脱脂6 h, 滤去母液, 残渣阴干后, 加质量分数95%的乙醇回流4 h, 残渣阴干。脱脂后的干品按每克加浸提液10 mL, 90℃水浴浸提3次, 每次3~4 h, 合并滤液, 旋转蒸发仪浓缩到合适体积, 加质量分数15%的三氯乙酸脱蛋白, 离心除去沉淀, 清液加入1 mol/L NaOH中和至中性。透析袋对流水透析3 d, 袋内溶液浓缩到适当体积。加4倍体积的无水乙醇4℃沉淀过夜, 离心收集沉淀, 用乙醚和无水丙酮依次洗涤3次, 真空冷冻干燥得到灰白色的粗多糖。称取一定量的粗多糖, 加适量蒸馏水溶解, 离心, 上清液DEAE-52柱层析, 收集洗脱液, 用苯酚-硫酸法检测多糖, 合并洗脱液多糖高峰部分浓缩, 然后用Sephadex G-200柱层析, 收集合并大峰部分, 透析浓缩, 冷冻干燥得到纯化的白色絮状甘草多糖。GP溶液的配制: 准确称取纯化GP 250 mg于50 mL容量瓶中, 用pH 7.2的磷酸缓冲液(PBS)溶解定容配成5 mg/mL, 20 μ m滤膜过滤除菌, 4℃贮存, 使用时加入培养液稀释至合适

浓度。

1.2 试验方法

1.2.1 巨噬细胞的分离与纯化 小鼠颈椎脱臼处死, 放入体积分数75%的酒精中浸泡30 s, 腹腔注入10 mL PBS缓冲液, 用棉球轻揉腹部1~2 min后吸取腹腔液于离心管中, 以1 000 r/min离心5 min, 弃上清液收集巨噬细胞, 苔盼蓝染色证实细胞活率在95%以上, 用RPMI-1640培养液调整细胞浓度至 5×10^5 /mL。将巨噬细胞悬液接种于6孔细胞培养板中, 每孔培养液3 000 μ L, 置二氧化碳培养箱(质量分数5%的CO₂, 37℃)培养3 h后轻轻吸弃培养液, 用PBS洗去未贴壁细胞, 重复洗涤3次, 即得到纯化的腹腔巨噬细胞。

1.2.2 TNF- α 的诱导 上述制备的巨噬细胞, 加入不同浓度的GP或/和LPS, 在质量分数5%的CO₂、37℃条件下孵育48 h; 或者固定GP的添加量为100 μ g/mL, 培养不同时间后, 收集巨噬细胞用于mRNA的提取, 取上清液, -70℃保存, 供测定TNF- α 活性时使用。

1.2.3 TNF- α 生物活性测定 用L929细胞株细胞毒法测定^[2], 收集对数生长期L929细胞, 用RPMI-1640调细胞浓度为 5×10^5 /mL, 于96孔板中每孔加100 μ L, 加上清液50 μ L共培养48 h, 用酶标仪检测其492 nm处的吸光度。

1.3 mRNA的提取与RT-PCR

1) mRNA提取、RNA逆转录及cDNA的PCR扩增, 按试剂盒说明书进行。PCR扩增条件: 先95℃预变性5 min, 然后95℃×50 s, 60℃×30 s, 72℃×90 s, 做35个循环, 最后一个循环72℃×5 min。

2) 电泳用1×TBE配制质量分数1.5%的琼脂糖, 内含质量分数1%的Goldviewna II™。取5 μ L PCR产物与1 μ L的Loading Buffer缓冲液混匀点样, 电压48 V条件下电泳80 min, 于凝胶成像仪下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 GP添加量对TNF- α 及mRNA表达的影响

GP添加量对TNF- α 分泌量的影响见图1。TNF- α 的分泌量与A₄₉₂值成反比关系, GP与巨噬细胞共同培养48 h, 能明显促进TNF- α 的分泌, 随着添加量的增加, GP的诱导作用呈上升趋势, 但是当添加量大于200 μ g/mL, 诱导作用呈稳定趋势, 这表明GP的添加量并不是越大越好。

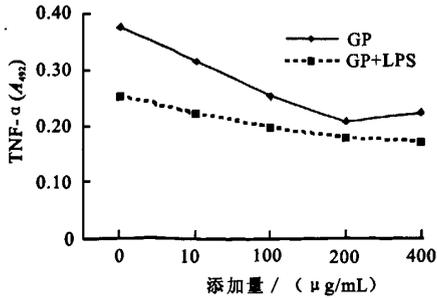
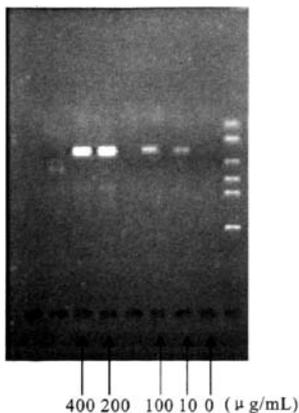


图 1 GP 添加量对 TNF- α 的影响

Fig. 1 Effects of GP concentration on the production of TNF- α

LPS(2 $\mu\text{g/mL}$) 和 GP(0~400 $\mu\text{g/mL}$) 的协同试验表明,添加 LPS 各组分泌 TNF- α 的量明显高于对应的单独添加 GP 的组,并且变化趋势与单独添加 GP 的变化趋势基本相同;但当 GP 的添加量较高时(>100 $\mu\text{g/mL}$),LPS 对 TNF- α 的诱导分泌量增加幅度变小。这表明,在 GP 添加量较低的情况下,LPS 对巨噬细胞的 TNF- α 诱导分泌作用比较明显,当 GP 的添加量增大后,诱导作用增加不明显。这一结果通过检测 GP 的添加量对 TNF- α mRNA 表达的影响得到进一步证实。图 2 表明,GP 对巨噬细胞 mRNA 表达存在着量效关系,巨噬细胞在静止状态下,也就是没有添加 GP 时,TNF- α mRNA 基本上没有表达;添加低质量浓度的 GP(10 $\mu\text{g/mL}$),mRNA 表达非常微弱;当 GP 添加量较高(>100 $\mu\text{g/mL}$)时,TNF- α mRNA 表达明显加强;但当剂量超过 200 $\mu\text{g/mL}$,mRNA 表达增加不明显。这与 GP 添加量对 TNF- α 的分泌量影响的变化趋势基本一致。



注:标准 marker 分离出的片段从下到上依次为 2 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp,扩增的目的基因片段为 374 bp

图 2 GP 添加量对 TNF- α mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effects of GP concentration on the expression of TNF- α mRNA

2.2 培养时间对 TNF- α 及 mRNA 表达的影响

培养时间对 TNF- α 分泌量的影响见图 3。细胞培养液固定 GP 的添加量为 100 $\mu\text{g/mL}$,培养 0~48 h。结果表明:随着培养时间的延长,TNF- α 的分泌量增加,当培养时间超过 12 h 后,TNF- α 的分泌量增加不明显,基本趋于稳定,这表明 GP 诱导 TNF- α 的分泌量存在最佳的时效关系,即 TNF- α 达到峰值的时间在 12 h。

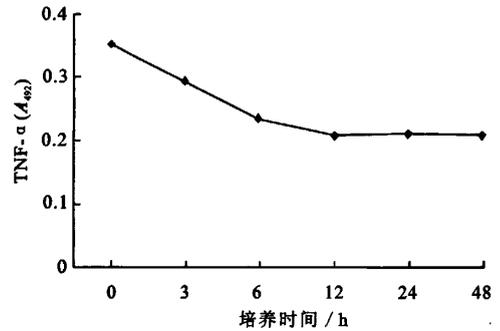
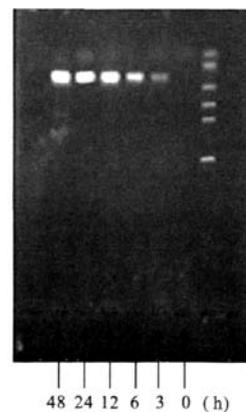


图 3 培养时间对 TNF- α 的影响

Fig. 3 Effects of culture time on the production of TNF- α

图 4 表明,在 GP 添加量为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时培养时间对 TNF- α mRNA 表达的影响。当培养时间到 3 h,TNF- α mRNA 就有明显的表达,随着培养时间的延长,mRNA 的表达逐渐增加,但是当培养时间延长到 12 h,mRNA 的表达基本趋于平衡。这与培养时间对 TNF- α 的分泌量影响的变化趋势也是基本一致的。



注:标准 marker 分离出的片段从下到上依次为 2 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp,扩增的目的基因片段为 374 bp

图 4 培养时间对 TNF- α mRNA 表达的影响

Fig. 4 Effects of culture time on the expression of TNF- α mRNA

3 结 语

TNF- α 由产生它的细胞如巨噬细胞等合成后,分泌到细胞外,与其靶细胞上的 TNF- α 受体结合,对众多的组织器官产生生物学效应,是细胞因子网络中一个重要的多功能成员,具有维持内部自稳、抵御各种致病因子的重要作用。TNF- α 抗肿瘤作用主要是由于:TNF- α 为激发性细胞因子,可启动广泛的免疫炎症反应,介导天然细胞毒细胞、单核细胞和巨噬细胞,对癌细胞有杀伤和溶瘤作用^[3];TNF- α 可作用于血管内皮细胞,使肿瘤的血管变形受损或形成血栓,导致肿瘤发生出血性坏死或因营养缺乏而消退^[4];TNF- α 可通过诱导某些肿瘤细胞凋亡来抑制癌细胞增生。

Takada K 等的研究表明:从甘草匍匐茎中分离出的一种多糖具有明显的抗补体活性,该多糖包含一个活性核心,以 1,3-D-半乳糖组成一个主链,在主链半乳糖某单元的 6 位带有一个由 1,6-半乳

糖残基组成的侧链分支,这种结构对抗补体活性是非常重要的^[5]。Nose M 等研究证明,从 *Glycyrrhiza sp.* 提取的甘草粗多糖能诱导增强小鼠腹腔巨噬细胞 NO 的分泌量^[6]。Yang G 等也研究报道 GP 能增强巨噬细胞的吞噬能力,并能增加巨噬细胞 IL-1 的释放量^[7]。

本实验研究结果表明:GP 能剂量依赖性增加活化的巨噬细胞 TNF- α 的分泌量,随着其添加量的增加,TNF- α 分泌量增加,当添加量较高时(>200 $\mu\text{g}/\text{mL}$),TNF- α 分泌量不再增加并趋于稳定。时效关系试验表明:巨噬细胞培养液中添加 GP,培养在比较短的时间就能增加 TNF- α 分泌量,当培养时间达到 12 h 时,分泌量达到最大,随着时间的延长,分泌量不再增加。通过 RT-PCR 试验,结果基本一致。巨噬细胞在静息状态下,基本没有 TNF- α mRNA 表达;加入 GP 刺激后,TNF- α mRNA 的表达增多。提示 GP 诱导巨噬细胞分泌 TNF- α 的机制之一是提高 mRNA 的表达水平。

参考文献(References):

- [1] 汲晨锋,姜薇,王晓晶. 甘草多糖的化学与药理研究[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2004,20(5):515-518.
JI Chen-feng, JIANG Wei, WANG Xiao-jing. Study on chemistry and pharmacology of glycyrrhiza polysaccharide [J]. *Journal of Harbin University of Commerce: Natural Sciences Edition*, 2004, 20(5): 515-518. (in Chinese)
- [2] Ferrari M, Forasiero M C, Isetta A M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro [J]. *J Immunol Methods*, 1990, 131:165-172.
- [3] Logan T F, Gooding W E, Whiteside T L, et al. Biological response modulation by tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in a phase Ib trial in cancer patients[J]. *J Immunol*, 1997, 20(5):387-398.
- [4] Nooijen P T G A, Mnusama E R, Eggermont A M M, et al. Synergistic effects of TNF- α and melphalan in an isolated limb perfusion model of rat sarcoma: a histopathological immunohistochemical and electron microscopical study[J]. *Br J Cancer*, 1996, 74(12):1908-1915.
- [5] Takada K, Tomoda M, Shimizu N. Core structure of glycyrrhizan GA, the main polysaccharide from the stolon of *Glycyrrhiza glabra* var. *ghndulifera*; anti-complementary and alkaline phosphatase-inducing activities of the polysaccharide and its degradation products [J]. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40(9):2487-2490.
- [6] Nose M, Terawaki K, Oguri K, et al. Activation of macrophages by crude polysaccharide fractions obtained from shoots of *Glycyrrhiza glabra* and hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis* in vitro [J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21: 1110-1111.
- [7] Yang G, Yu Y. Immunopotentiating effect of traditional Chinese drugs-ginsenoside and glycyrrhiza polysaccharide[J]. *Proc Chin Acad Med Sci Peking Union Med Coll*, 1990(5): 188-193.

(责任编辑:秦和平,李春丽)