

文章编号:1673-1689(2008)01-0076-04

甘草多糖对小鼠腹腔巨噬细胞化学成分 及胞内酶的影响

程安玮¹, 金征宇^{*1}, 万发春², 徐学明¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 山东农业科学院 畜牧兽医研究所, 山东 济南 250100)

摘 要: 体外培养巨噬细胞, 测定不同剂量的甘草多糖(GP)对巨噬细胞中细胞化学成分及胞内超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LSZ)的活性影响, 初探对巨噬细胞的作用机理。试验显示, GP 能活化巨噬细胞, 使其体积明显增大, 细胞内的糖原、酸性磷酸酶、酸性 ATP 酶、酸性酯酶、琥珀酸脱氢酶颗粒的颜色明显加深, 酶的活性显著增强。用显微分光光度计进行单个细胞化学成分定量测定, 药物添加组明显高于空白对照组。GP 能显著增强 SOD、LSZ 活性, 提高了机体的抗氧化能力。

关键词: 甘草多糖; 巨噬细胞; 细胞化学; 超氧化物歧化酶; 溶菌酶

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Effects of Glycyrrhiza Polysaccharide on Cytochemistry and Intracellular Endoenzyme of Mice Peritoneal Macrophages

CHENG An-wei¹, JIN Zheng-yu^{*1}, WAN Fa-chun², XU Xue-ming¹

(1 School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Institute the animal science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agriculture Science, Jinan 250100, China)

Abstract: The influence of glycyrrhiza polysaccharid (GP) dose on cytochemistry and superoxide dismutase (SOD)、lysozyme (LSZ) were detected by mice peritoneal macrophages *in vitro*. The results showed that the volume of macrophages were significantly increased ($P < 0.01$). The activities of intracellular polysaccharide, acid phosphatase, adenosinetriphosphase, anaphthyl acctic eaterase and succinatedehydrogenase were markedly strengthened. Moreover, microspectrophotometer was used for quantitative analysis of above mentioned individual macrophage and the results that there was obvious difference between the APS group and control group. And the activities of superoxide dismutase (SOD) and lysozyme (LSZ) were improved, the result demon stracted that oxidation resistance were enhanced.

Key words: glycyrrhiza polysaccharid; macrophage; cytochemistry; SOD; LSZ

收稿日期: 2007-03-15.

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA102333).

作者简介: 程安玮(1975-), 女, 山东临沂人, 碳水化合物与工程博士研究生.

* 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的研究与应用.

Email: zjin@jiangnan.edu.cn

巨噬细胞是一种多潜能细胞,不仅参与机体的特异性免疫反应和非特异性免疫反应,而且是两种免疫反应联系的“桥梁细胞”,并作为效应细胞。在体内或者某些外源性因素的作用,其形态和功能受到影响。近几十年来人们发现从植物中提取的多糖及糖的缀合物(如糖蛋白、糖脂等)不仅参与了细胞的各种生命现象的调节,而且还参与了细胞的转化、分裂、再生等各种生理过程的调节。越来越多的药理和临床研究表明,多糖作为药物,其细胞毒性较小,并且可激活巨噬细胞的免疫反应。甘草多糖(glycyrrhiza polysaccharid, GP)是甘草的重要成分之一,GP具有增强免疫、降血压、降血脂、抗病毒等作用,作者旨在细胞水平上通过添加药物来研究GP对巨噬细胞化学成分的影响,主要探讨其定位、定性和定量变化及对细胞内酶SOD和LSZ的影响。初步探讨GP对巨噬细胞的激活机理。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要仪器 TIDAS-MSP型显微分光光度计:德国J&M公司生产;DBS-100自动部分收集器:上海沪西分析仪器厂生产;WJ-12F型二氧化碳培养箱:日本平汉制作所生产;büchi R-521旋转蒸发仪:Switzerland生产;77530-30LAB冷冻干燥机:照生有限公司生产;UV-755B型分光光度计:上海分析仪器总厂生产;TGL-16G台式高速离心机:上海安亭科学仪器厂生产。

1.1.2 试剂 胎牛血清;Sephadex G-200;DEAE-52;RPMI-1640培养液(含10%的胎牛血清,青、链霉素各100 U/mL);其它试剂均为分析纯。

1.1.3 实验用动物 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 采用水提醇析法:甘草根茎产自内蒙古,晒干粉碎过30目筛,用无水乙醚回流脱脂6 h,滤去母液,残渣阴干后,加体积分数95%的乙醇回流4 h,残渣阴干。脱脂后的干品按料液比1:8(g:mL)85℃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15%的三氯乙酸脱蛋白,离心除去沉淀,清液加入1mol/L的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倍于糖溶液体积的无水乙醇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,然后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,上清液用DEAE-52柱层析,分部收集洗脱液,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 μm滤膜过滤除菌,4℃贮存,使用时溶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%酒精中浸泡10 min,腹腔注入10 mL PBS缓冲液,用棉球轻柔腹部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,苔盼兰染色证实细胞活率在95%以上,用RPMI-1640培养液调整细胞密度至 5×10^5 /mL。将巨噬细胞悬液接种于96孔细胞培养板中,置二氧化碳培养箱(5% 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 试验分组及处理 将纯化的巨噬细胞用RPMI-1640培养液调整细胞密度为 5×10^5 /mL,并设空白对照组(PBS)、阳性对照组(LPS)以及低中高3个剂量的给药组接种于96孔培养板中,每组设4个重复孔。每孔培养液总体积150 μL,低、中、高3个剂量给药组添加GP的最终质量浓度分别为10, 100, 500 μg/mL,阳性对照组含LPS终浓度为10 μg/mL的RPMI-1640培养液,因为试验添加药物GP是用PBS进行配制的,所以用PBS作为空白对照组。将各试验组均置于二氧化碳培养箱(5% CO₂, 37℃)中孵育48 h后。取出巨噬细胞爬片,分别做各种细胞化学染色,进行细胞化学成分的测定和观察。

1.2.3 细胞化学成分的显示和测定 糖原的显示与测定方法:采用PAS法;DNA及RNA的显示方法:采用吖啶橙染色;酸性磷酸酶(ACPase)的测定方法:采用Gomori法;酸性ATP酶(ATPase)的测定方法:采用Glick法;酸性酯酶(ANAE)的测定方法:采用α-醋酸萘酯法;琥珀酸脱氢酶(SDH)的测定方法:采用硝基兰四氮盐法^[1]。

1.2.4 巨噬细胞的破碎方法 试验各组细胞培养48 h后,收集巨噬细胞,以PBS调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL,超声破碎,用于检测细胞内酶的活性。

1.2.5 溶菌酶(LSZ)活力的测定 采用微球菌琼脂平板法,参考赵玉萍的方法^[2]。

1.2.6 超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定 使用黄嘌呤氧化酶试剂盒,试剂盒购自南京建成生物工程研究所,严格按照说明书操作。

1.3 统计分析

采用软件 SAS9.0 处理数据,结果以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 巨噬细胞外部形态的变化

在显微镜下,观察巨噬细胞的外部形态,发现添加药物组细胞体积明显增大,呈圆形、椭圆、菱形、梭形或者不规则形,还可见较长的伪足。对照组细胞一般呈圆形、椭圆形,很少见有突起。

2.2 GP 对巨噬细胞化学成分的影响

2.2.1 核酸 添加药物组细胞体积增大,突起粗而长,核内 DNA 荧光呈淡黄绿色,胞质内 RNA 荧光呈桔红色,DNA 和 RNA 荧光强度比空白对照组明显增强。但是各添加药物组之间的荧光强度用肉眼看不出差异。

2.2.2 糖类 添加药物组细胞内紫红色颗粒增多,多呈团块状,染色反应加深,对照组颗粒分布稀少,多集中在细胞的一侧。从表中的单个细胞定量测定数据看,添加药物组明显高于空白对照组($p<0.01$),表明小鼠巨噬细胞在 GP 的激活下,细胞中糖原颗粒数量明显增多,但添加效果不如阳性对照组(LPS)($p<0.01$),低剂量的添加效果明显低于其余两个添加剂量($p>0.01$),但中高添加剂量之间差异不明显($p>0.01$),这表明,添加 GP 的添加量并不是越大越好。从测定的数值来看,以中剂量的添加效果最好。

2.2.3 ACPase 酶颗粒呈黑色,添加药物组细胞中酶颗粒分布密集,多成团块,充满整个胞质,且细胞突起中也分布明显。空白对照组中酶颗粒分布比较稀疏。表 1 结果表明,GP 添加组和 LPS 阳性

对照组明显高于空白对照组($p<0.01$),低剂量添加效果明显低于中、高剂量的添加效果($p<0.01$),但当添加剂量超过 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,测定结果没有统计学差异,但从数值上看添加效果达到阳性对照水平。

2.2.4 ATPase 添加药物组的细胞中 ATPase 酶颗粒呈黑褐色,密集分布于细胞的胞质和边缘的突起中,与空白对照组相比,颜色明显加深,且颗粒增大,多呈团状聚集。表 1 结果表明,添加药物组明显高于空白对照组($p<0.01$),表明 GP 能明显激活小鼠巨噬细胞的活性,表现在细胞中酶活性的明显增强。GP 添加效果明显低于阳性对照组($p<0.01$),低剂量添加效果明显低于其余两个添加剂量,以中剂量的添加效果最好,超过该添加剂量,从测定的数值看呈下降的趋势。

2.2.5 ANAE 添加药物组的细胞中 ANAE 酶为红褐色颗粒呈团块状且量增多,染色明显加深。表 1 的结果表明,添加药物组明显高于空白对照组($p<0.01$),表明 GP 活化了巨噬细胞中酶活性,GP 各剂量组之间差异不明显($p>0.01$),且均低于阳性对照组($p<0.01$)。

2.2.6 SDH 酶颗粒为紫黑色,添加药物组的细胞酶颗粒颜色深且颗粒粗大,聚集成团块,充满胞质和突起。表 1 结果显示,GP 的对酶的激活作用明显高于空白对照组($p<0.01$),但添加效果不如阳性对照组($p<0.01$),低剂量添加效果明显低于其余两个添加剂量($p<0.01$),但当添加剂量超过 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,不存在统计学上的差异($p>0.01$)。

2.3 GP 对巨噬细胞内 LSZ 和 SOD 活力的影响

表 2 的结果表明:添加 GP 能活化巨噬细胞,使细胞内 LSZ 和 SOD 活性明显升高($p<0.01$),且随着添加浓度的增加,胞内 LSZ 和 SOD 活性增加,但当添加浓度超过 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,增加效果不明显($p>0.01$),但明显低于阳性对照组($p<0.01$)。

表 1 GP 对巨噬细胞化学成分定量的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Tab. 1 Effects of GP on cytochemistry of mice peritoneal macrophages($\bar{x}\pm s, n=4$)

处理	糖原	酸性磷酸酶	酸性 ATP 酶	酸性酯酶	琥珀酸脱氢酶
空白对照组	30.46±9.65 ^A	46.44±11.65 ^A	52.26±13.32 ^A	33.28±12.65 ^A	27.78±6.48 ^A
LPS 对照组	123.34±22.45 ^D	134.39±26.65 ^C	152.25±22.57 ^D	85.69±18.34 ^C	90.09±15.57 ^D
低剂量(10)	95.12±11.21 ^B	113.16±20.28 ^B	122.32±21.11 ^B	74.97±16.53 ^B	75.60±12.16 ^B
GP ($\mu\text{g/mL}$) 中剂量(100)	110.46±13.49 ^C	131.05±27.18 ^C	142.18±24.15 ^C	78.81±17.21 ^B	82.00±15.31 ^C
高剂量(500)	108.67±9.65 ^C	130.26±26.22 ^C	138.29±28.47 ^C	78.76±16.51 ^B	83.74±14.38 ^C

注:同行肩注有相同大写字母者表示差异不显著($p>0.01$),字母完全不同者表示差异极显著($p<0.01$),下表同。

表 2 GP 对巨噬细胞内 LSZ 和 SOD 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)Tab. 2 Effects of GP on the activity of LSZ and SOD($\bar{x} \pm s, n=4$)

处理	溶菌酶/ ($\mu\text{g}/5 \times 10^5 \text{ cell/mL}$)	超氧化物歧化酶($\text{NU}/5 \times 10^5 \text{ cell/mL}$)
空白对照组	20.46 ± 7.65^A	18.44 ± 6.65^A
LPS 对照组	55.34 ± 13.45^C	27.39 ± 9.65^C
低剂量(10)	44.12 ± 11.21^B	23.16 ± 8.28^B
GP($\mu\text{g/mL}$) 中剂量(100)	52.46 ± 13.49^C	26.05 ± 9.18^C
高剂量(500)	53.67 ± 9.65^C	26.26 ± 8.22^C

3 结 语

1) GP 可激活巨噬细胞的活性,表现在酶活性增强。药物添加组细胞体积明显增大,呈圆形、椭圆、菱形、梭形或者不规则形,还可见较长的伪足。细胞中酶颗粒密集分布于细胞的胞质和边缘的突起中,且颗粒增大,多呈团状聚集。

巨噬细胞内酶的活性影响到巨噬细胞的吞噬、抗原活性及活性物质的分泌。细胞内 DNA 及 RNA 荧光强度的增加均表明核酸代谢的增强,糖原含量升高为合成 ATP 提供了充足的原料。ACPase 和 ANAE 存在于巨噬细胞溶酶体内,参入巨噬细胞的多种溶酶体消化功能,其前者是巨噬细胞活化的标志酶^[3],ATPase 和 SDH 均存在于线粒体,后者是线粒体的标志酶,在能量代谢、物质的吸收及运输等生理功能上具有重大意义^[4]。巨噬细胞中酶活性强弱为巨噬细胞活化的一个主要标志。

GP 可显著的增强巨噬细胞的 ACPase、ANAE、ATPase 和 SDH 活性,表明巨噬细胞活化性能得到明显的提高,增加了巨噬细胞能量代谢水平,从而增强了巨噬细胞的免疫调节作用。但是在实际的应用中需要考虑药物剂量的大小、用药时间的长短、机体自身的免疫水平以及机体中的调节平衡状态对药效发挥的相互影响。

2) LSZ 和 SOD 在机体免疫防御过程中起十分重要的作用,SOD 是重要的抗氧化酶,在清除自由基,防止生物分子损伤方面有十分重要的作用,对巨噬细胞的吞噬能力和整个机体的免疫功能方面起重要的作用。溶菌酶作为一种存在于机体体液及组织中的非特异性免疫因素,具有多种药理学作用,具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等作用。该试验结果表明,细胞中添加 GP 能明显增强这两种酶的活性,与周娅通过小鼠灌胃和腹腔注射枸杞多糖,对巨噬细胞内 LSZ 和 SOD 的活性影响结果是一致的^[5]。

参考文献(References):

- [1] 谢锦玉. 细胞化学方法, 鄂征主编. 组织培养. 第 2 版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988.
- [2] 赵玉萍, 张灏, 杨严俊. 溶菌酶测定方法的改进[J]. 食品科学, 2002, 23(3): 116—119.
ZHAO Yu-ping, ZHANG Hao, YANG Yan-jun. Improvement of lysozyme measurement[J]. Food Science, 2002, 23(3): 116—119. (in Chinese)
- [3] 郭仁强. 巨噬细胞细胞的发生分化功能. 临床免疫学基础[M]. 南京: 江苏科学出版社, 1982: 72—86.
- [4] 陈华. 生物化学. 第二版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988.
- [5] 周娅, 佟书娟, 王宁萍, 等. 枸杞多糖对小鼠巨噬细胞内酶活性及 NO 诱生的影响[J]. 山东中医杂志, 2000, 19(6): 361—362.
ZHOU Ya, TONG Shu-juan, WANG Ning-ping, et al. Effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on intracellular endoenzyme and NO of mice peritoneal macrophages[J]. Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine, 2000, 19(6): 361—362. (in Chinese)

(责任编辑: 杨 萌)