

麝香糖蛋白成分对血小板活化因子 激活的大鼠中性白细胞功能的影响[△]

中国医学科学院 药物研究所(北京 100050) 王文杰* 白金叶 周龙恩 程桂芳 朱秀媛
中国协和医科大学

摘要 采用体外温孵系统,观察麝香糖蛋白成分麝香-1 对体外血小板活化因子激活的大鼠中性白细胞某些功能,包括超氧阴离子产生和溶酶体酶释放的影响。结果表明:麝香-1 在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 终浓度下,可使中性白细胞超氧阴离子生成量增加 109%~291%,在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 终浓度下,可使 β -葡萄糖苷酸酶释放量降低 6%~51%,使溶菌酶释放量降低 7%~21%。抑制溶酶体酶释放可能是麝香抗炎作用机制之一。

关键词 麝香 中性白细胞 超氧阴离子 β -葡萄糖苷酸酶 溶菌酶

麝香(musk)是一珍贵中药,由雄性麝香囊中分泌物干燥而得。实验证明:麝香水溶性成分在多种动物模型上有抗炎作用^[1],中性白细胞是宿主防御系统的重要组成部分,又是主要的炎性细胞,在炎症部位释放有害物质造成周围组织损伤,血小板活化因子(platelet-activating-factor, PAF)为可由多种细胞释放的一种磷脂,是重要的炎性介质之一,可刺激中性白细胞,使其发生一系列功能变化,如产生超氧阴离子和其它活性氧代谢物,脱颗粒并释放溶酶体酶等。本研究采用中性白细胞体外温孵系统,观察麝香-1 对 PAF 刺激下白细胞功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物:Wistar 大鼠,体重 250 g~300 g,雌雄兼用,由中国医学科学院动物所繁育场提供。

1.1.2 药物和试剂:麝香由中国药材公司、四川省中药材公司提供。经我所宋万志教授鉴定,为林麝 *Moschus berzovkii* Flerow 香囊分泌物。研磨成粉,经乙醚,乙醇提取后,以水冷渗,提取液冷冻干燥,冻干粉以水复

溶,上 Sephadex G-25 柱,蒸馏水洗脱,收集第 1 色带,冷干备用,称麝香-1^[2]。在小鼠巴豆油耳炎症模型 ID₅₀ 约为 30 mg/kg,故体外用相应 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度。细胞色素 C,超氧化物歧化酶,PAF,细胞松弛素 B, *Micrococcus Lysodeikticus*,酚酞葡萄糖醛酸购自美国 Sigma 公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器:Yamato BT-25 型震荡恒温水浴为日本生产。Soniprep 150 超声细胞破碎仪为英国生产。Forma Scientific 3164 CO₂ 温孵箱, Bio-Rad 450 酶标仪为美国生产。LDZ4-0.8 自动平衡微型离心机为北京医用离心机厂生产。

1.2 方法

1.2.1 中性白细胞悬液的制备:按文献^[3]方法进行。

1.2.2 中性白细胞释放超氧阴离子(O₂⁻)的检测^[4]:中性白细胞以 BSS 溶液悬浮,调节为 2 \times 10⁷ 细胞/mL 用 96 孔酶标板,每孔加 4 \times 10⁻⁴ mol/L 细胞色素 C 25 μL 药物或等体积溶剂,以 BSS 补至 150 μL ,加细胞悬液 25 μL ,对照与给药均设 5 个复孔。置 37 $^{\circ}\text{C}$

* Address: Wang Wenjie, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Chinese Xiehe Medical University, Beijing

[△] 国家自然科学基金资助项目,编号 39370842

CO₂ 温孵箱内, 30 min 后加 8×10^{-6} mol/L PAF 25 μ L, 继续温孵 20 min。在 550 nm 滤光片酶标仪上读数。以消光系数 $21 \times 10^3 / \text{M} \cdot \text{cm}$ 计算 O₂⁻ 的生成量。

1.2.3 中性白细胞酶液的制备^[5]: 中性白细胞以 Dulbecco's 液悬浮, 调节为 2.5×10^4 细胞/mL, 用 10 mL 试管, 加药物或等体积溶剂, 细胞悬液 250 μ L, 均设 4 个复管, 置 37°C 水浴, 震荡温孵 15 min, 加 1×10^{-3} mol/L 细胞松弛素 B 2.5 μ L, 温孵 5 min 再加 1×10^{-3} mol/L PAF 2.5 μ L 温孵 5 min, 将试管移入冰浴, 终止反应。4 000 r/min 离心 5 min, 取上清作为释放酶液, 另取细胞悬液 3 mL 在冰浴下用 Soniprep150 细胞破碎仪超声 1 min (强度 20 Am), 4 000 r/min 离心 15 min, 上清作为总酶液。取总酶液 1 mL, 于 80°C 水浴中灭活 15 min, 作为灭活酶液。

1.2.4 β -葡糖苷酸酶的检测^[5]: 依文献原理改为微量法。采用 96 孔酶标板, 每孔加释放酶液, 或总酶液, 灭活酶液 25 μ L, 2.5 mmol/L 酚酞葡萄糖醛酸 25 μ L, 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH4.6) 100 μ L。置 37°C CO₂ 温孵箱内 18 h。每孔加 0.2 mol/L NaOH 200 μ L, 终止反应并显色。在 550 nm 滤光片的酶标仪上读数。计算酶释放量占总酶的百分数。

1.2.5 溶菌酶的检测^[6]: 采用 96 孔酶标板, 每孔加释放酶液, 或总酶液, 灭活酶液 50 μ L, 0.24 mg/mL micrococcus Lysodeikticus (悬浮于 0.1 mol/L NaH₂PO₄, pH6.5) 200 μ L, 置 37°C CO₂ 温孵箱内 15 min。在 450 nm 滤光片酶标仪上读数。计算酶释放量占总酶的百分数。

2 实验和结果

2.1 麝香-1 对中性白细胞产生 O₂⁻ 的影响: 中性白细胞分别与终浓度为 1、10、100 μ g/mL 的麝香-1 或对照溶剂温孵后, 给药组 O₂⁻ 生成量分别比对照组增加 109%、210% 和 291% (见图 1)。表明麝香-1 可明显增加中性白细胞 O₂⁻ 的产生。

2.2 麝香-1 对中性白细胞释放 β -葡糖苷酸

酶的影响: 中性白细胞分别与终浓度为 10、33、100 μ g/mL 的麝香-1 或对照溶剂温孵后, 给药组 β -葡糖苷酸酶的释放量分别比对照组降低 6%、16% 和 51% (见图 2)。表明麝香-1 可明显抑制中性白细胞 β -葡糖苷酸酶的释放。

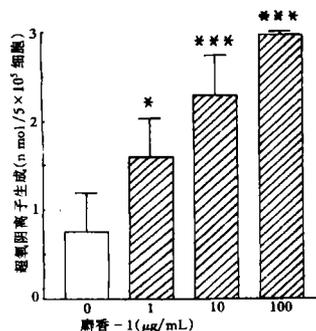


图 1 麝香-1 对 PAF 激活的大鼠中性白细胞超氧阴离子生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ (下同)

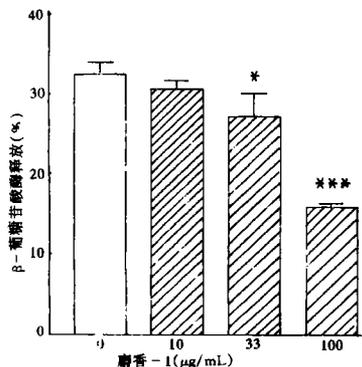


图 2 麝香-1 对 PAF 激活的大鼠中性白细胞 β -葡糖苷酸酶释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

2.3 麝香-1 对中性白细胞释放溶菌酶的影响: 中性白细胞分别与终浓度为 10、33、100 μ g/mL 的麝香-1 或对照溶剂温孵后, 给药组溶菌酶的释放量分别比对照组降低 7%、14% 和 21% (见图 3)。表明麝香-1 可明显抑制中性白细胞溶菌酶的释放。

3 讨论

3.1 中性白细胞活性氧生成系统是一种 NADPH 氧化酶, 为 4~5 种胞内成分组成的复合物。氧化酶在正常情况下是无活性的, 在某些刺激剂作用下可被激活。激活的信号转导途径被认为由受体、鸟苷酸结合蛋白、磷脂

酶 C 组成。磷脂酶 C 可使磷脂酰肌醇解离成肌醇三磷酸和甘油二酯。前者引起细胞内游离钙增加,与甘油二酯协同导致蛋白激酶 C 的激活。蛋白激酶 C 再激活氧化酶。在细胞释放 O_2^- 期间,氧化酶系统某些蛋白的连续磷酸化维持着氧化酶的安装和活性状态。不同的刺激均可引起 O_2^- 的释放,只是氧化酶系统的变化及与细胞骨架变化间的联系不尽相同。本研究结果显示麝香-1 不抑制 PAF 引起的 O_2^- 生成,而明显增加 O_2^- 生成,并与剂量呈正相关,表明麝香-1 本身可增强 NADPH 氧化酶的活性。

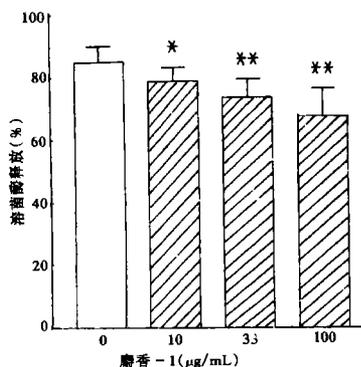


图3 麝香-1 对 PAF 激活的大鼠中性白细胞溶菌酶释放的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.2 一般来说,抗氧化剂或氧自由基清除剂具有抗炎作用。麝香-1 明显增加中性白细胞

O_2^- 生成似乎与其抗炎作用相悖,但另一方面却有利于宿主的防御机能,可能更适用于有感染的炎症。有研究者专门合成抑制 5-脂氧酶同时增加产生 O_2^- 的化合物,以求在抗炎的同时兼有抗微生物的作用^[7]。

3.3 中性白细胞脱颗粒是炎症过程的一种反应,释放一些杀灭微生物的酶类,这些产物又会造成自身组织损伤,是加剧炎症的次级原因。 β -葡糖苷酸酶存在于嗜苯胺蓝颗粒,溶菌酶存在于嗜苯胺蓝颗粒和特殊颗粒。实验证明麝香-1 对 β -葡糖苷酸酶和溶菌酶的释放均有抑制作用,可能是其抗炎作用的机制之一。在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下,对前者释放的抑制率明显高于后者,可能是对 2 种颗粒的抑制作用不完全平行。

参考文献

- 1 朱秀媛,等. 药学学报,1988,23(6):406
- 2 柳雪枚,等. 动物学报,1992,38(3):302
- 3 Yue TL, et al. Biochim Biophys Acta,1983,751:332
- 4 Daniels RH, et al. Immunology,1992,75:157
- 5 Feinmark SJ, et al. FEBS Letters,1981,136:141
- 6 Jacobson PB, et al. J Immunol,1993,151:5639
- 7 Kocan GP, et al. Biochem Pharmacol,1994,47(6):1092

(1996-08-13 收稿
1997-06-12 修回)

Effect of Musk Glucoprotein on Certain Functions of Rat Neutrophil Activated by PAF *in vitro*

Wang Wenjie, Bai Jingyie, Zhou Longen, et al (Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Chinese Xiehe Medical University, Beijing 100050)

Abstract Effect of musk-1, a glucoprotein component isolated from the water extract of musk, on certain functions of rat neutrophil activated by PAF *in vitro* was studied. Yield of superoxide anion and release of β -glucuronidase and lysozyme were quantified. Results showed that musk-1 at final concentrations of 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ can increase the yield of superoxide anion by 109%~291% and at doses of 10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ can decrease the release of β -glucuronidase and lysozyme by 7%~51% and 7%~21%, respectively. It is concluded that musk-1 can significantly affect the functions of rat neutrophil activated by PAF. One of the mechanisms of anti-inflammatory actions of musk is through inhibition of lysosomal enzyme release.

Key words musk neutrophil superoxide anion β -glucuronidase lysozyme