

· 药理实验与临床观察 ·

灵芝多糖对小鼠腹腔巨噬细胞蛋白激酶 A 活性的影响[△]

中国人民解放军 401 医院药剂科 (青岛 266071) 李明春* 梁东升 许自明
第一军医大学药理教研室 雷林生 杨淑琴 孙莉莎

摘要 为观察灵芝多糖 (GLB₇) 体外对小鼠腹腔巨噬细胞 (MΦ) 蛋白激酶 A (PKA) 活性的影响, 采用反相离子对高效液相色谱法测定 MΦ 中 PKA 活力。结果表明 GLB₇ (40 mg/L) 能引起小鼠腹腔 MΦ 中 PKA 活性明显升高, 10 min 达峰值, 30 min 恢复到基础水平。提示灵芝多糖的免疫增强作用与其增强 MΦ 中 PKA 活性有关。

关键词 灵芝 灵芝多糖 巨噬细胞 蛋白激酶 A

Effects of *Ganoderma (Ganoderma lucidum)* Polysaccharide on PKA Activity of Murine Peritoneal Macrophages

Department of Pharmacy, No. 401 Hospital of PLA (Qingdao 266071) Li Mingchun, Liang Dongsheng and Xu Ziming

Department of Pharmacology, the First Military Medical University Lei Linsheng, Yang Shuqin and Sun Lisha

Abstract To investigate the effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLB₇) on protein kinase A (PKA) activity of murine peritoneal macrophages. A new ionpair RP-HPLC method was used to determine the activity of PKA in cells. The results showed that GLB₇ (40 mg/L) activated the PKA of murine peritoneal macrophages, to a peak value within 10 min, and then recovered to its basic level after 30 min. This result indicated that GLB₇ may act as an immunopotentiator of PKA in murine peritoneal macrophages.

Key words *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst *Ganoderma lucidum* polysaccharide macrophage protein kinase A (PKA)

灵芝多糖是灵芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst 的主要活性成分。以往实验证明灵芝多糖具有免疫增强和抗肿瘤作用, 它能增强小鼠腹腔巨噬细胞 (MΦ) 的吞噬功能, 促进混合淋巴细胞培养反应, 促进未经纯化的脾细胞在体外的增殖, 增强 DNA 多聚酶 α 的活性以及促进白细胞介素 2 的分泌等^[1~4]。但灵芝多糖的免疫作用机制尤其是对免疫细胞的信号转导过程有何影响尚不清楚。本文利用反相离子对高效液相色谱测定技术, 观察灵芝多糖对小鼠腹腔 MΦ 中蛋白激酶 A (PKA) 的影响, 以探讨灵芝多糖的免疫调节作用机制。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂: 灵芝多糖 (GLB₇), 按文献方法提取^[5,6], 化学组成是以葡萄糖、半乳糖为主的杂多糖, 糖苷键连接方式以 β(1→4) 为主, 稍多 α(1→6), 分子量 9 000 RPMI-1640 培养基, 为 Gibco 产品。胎牛血清 (FCS): 杭州四季青生物工程材料研究所产

品。Sucrose DTT Leupetin Histone (III-s), PM-SF ATR ADR AMP cAMP 均为 Sigma 产品。甲醇 HCA, 皆为国产色谱纯。

1.2 动物: BALB/c 纯系小鼠, ♂ ♀ 不限, 8 周龄, 体重 18~22 g, 由第一军医大学实验动物中心提供。

1.3 巨噬细胞的培养: 按文献方法^[7] 无菌取小鼠腹腔 MΦ, 经苔盼蓝染色细胞活率 95% 以上, 调整细胞浓度为 10⁹~10¹⁰ /L, 接种于多孔培养板中, 置于含 5% CO₂ 95% 空气孵箱中, 37℃ 孵育 24 h。对照组皆以 RPMI-1640 完全培养基替代, 实验组中加测试药物等处理因素皆以 RPMI-1640 完全培养基溶解和稀释。

1.4 RK A 活性测定^[8]

1.4.1 PKA 的制备: 于培养的细胞体系中加入 200 μL PKA 提取液, 内含: Tris-HCl (pH 7.4) 20 mmol/L, DTT 2 mmol/L, Leupetin 5 mg/L, PMSF 1 mmol/L, Sucrose 200 mmol/L, CaCl₂ 1

* Address: Li Mingchun, Department of Pharmacy, No. 401 Hospital of PLA, Qingdao

李明春 男, 副主任药师。1987 年毕业于第二军医大学药理学系, 获学士学位; 1998 年毕业于第一军医大学, 获药理学硕士学位, 研究方向为免疫药理。近年来在国内外期刊上发表论文 10 余篇, 获军队科技成果奖 6 项。现主要从事临床药理学研究工作。

△国家自然科学基金资助项目 No/39400165

mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L。冰浴下超声粉碎 900×g 离心 5 min, 去除碎片和胞核, 得上清即为胞浆组分和膜性组分, 以此用于测定 PKA 总活力。以上操作皆于 4℃ 以下进行。

1.4.2 PKA 活性测定: 用反相离子对高效液相色谱法测定^[8]。色谱条件: C₁₈柱; 流动相: 甲醇-磷酸盐缓冲液 (20: 80, pH 7.0, 内含 5 mmol/L PICAC); 流速: 1 mL/min; 检测波长: 259 nm; 柱温: 室温; 0.01 AUFS 进样量 20 μL。PKA 反应体系中包含 PKA 反应液, 内含: Tris-HCl (pH 7.4) 20 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L, 组蛋白 (Histone, III- γ) 1 g/L, DTT 2 mmol/L, ATP 0.5 mmol/L, cAMP 2 μmol/L 和适量酶液 (按蛋白含量计), 反应总体积为 1 mL。先将除酶液以外的其它溶液混匀, 30℃ 预热 5 min, 再加入酶液起始反应。反应开始后于 30℃ 水浴摇床中准确保温 10 min, 立即置于沸水浴中 1 min 终止反应; 冷却后离心除去蛋白沉淀, 上清液中加入 1 mL 氯仿-甲醇 (2: 1) 混合物, 振荡 1 min, 抽提脂溶性物质, 200×g 离心 5 min; 小心吸出水层, 其中含 ATP、ADP 和 AMP。重复前步骤处理 1 次, 合并提取液, 低温冻存待测。

1.4.3 蛋白含量测定: 按 Lowry 法测定。

1.4.4 PKA 活力定义: 一个酶活力单位相当于每分钟使 Histone (III- γ) 磷酸化而消耗 1 nmol ATP 所需的酶量。

2 结果

2.1 反相离子对 HPLC 法测定 PKA 在上述色谱条件下, ATP、ADP 和 AMP 三种物质可呈现良好的分离, 在样品测定中, 杂质峰不影响 ATP 的测定 (图 1)。

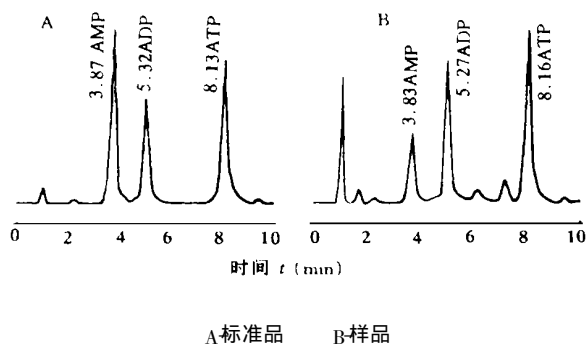
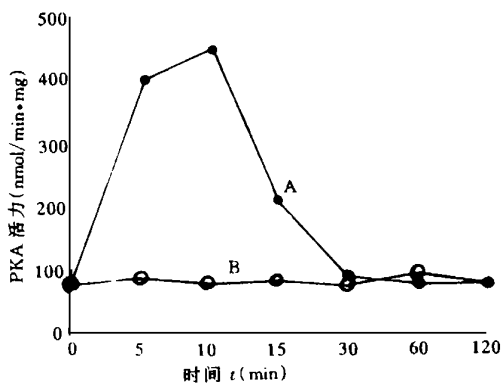


图 1 反相离子对 HPLC 法测定 MΦ 中 PKA 色谱图

2.2 GLB₇ 对小鼠 MΦ 中 PKA 活性的影响: 以 40 mg/L GLB₇ 与 MΦ 一起孵育不同时间后, 测定 PKA 总活力。结果显示: GLB₇ 可明显增强小鼠腹腔 MΦ 中 PKA 总活力, 10 min 达到峰值, 至 30 min 恢

复到基础水平 (图 2)。在 10 min 时 GLB₇ 与 PKA 的量效关系具有一定浓度依赖性 ($r = 0.8789$, 表 1), 实验测得 PKA 的基础总活力为 (80.93 ± 4.52) nmol/(min·mg) ($n = 6, \bar{x} \pm s$)。



A-实验组; B-对照组; GLB₇ 浓度为 40 mg/L

图 2 GLB₇ 对小鼠腹腔 MΦ PKA 活性的影响时程

表 1 GLB₇ 对小鼠 MΦ PKA 活性的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

GLB ₇ (mg/L)	PKA 总活性 (nmol/min·mg)	
	实验组	对照组
10	288.14 ± 11.81 [*]	81.32 ± 7.45
20	377.19 ± 13.38 [*]	80.07 ± 5.47
40	442.71 ± 13.45 [*]	80.84 ± 9.41
80	489.25 ± 19.28 [*]	79.89 ± 11.26
160	537.74 ± 21.25 [*]	87.04 ± 10.37

与对照组比较: * $P < 0.01$

3 讨论

关于蛋白激酶的测定方法, 目前国内外一般采用 ³²P-γ-ATP 磷酸化组蛋白法测定 PKA 活力。虽然同位素法灵敏度高, 但存在放射性污染, 加之条件要求高, 不易进行。以 HPLC 法测定 PKA 的活性, 不仅避免了同位素污染, 而且方法简便、重现性好 ($RSD = 0.18\%$)。准确性及灵敏度高 (回收率 99.63%)。其测定原理是: ATP 在 PKA 反应体系中作为提供磷酸的物质, 使底物磷酸化, 同时降解为 ADP 和 (或) AMP, 其中 ATP 的消耗量与 PKA 之活力成正比。

蛋白激酶是催化体内蛋白磷酸化的酶类, 而蛋白磷酸化则是体内各种生物反应最终起作用的通路。PKA 是一类 cAMP 依赖性蛋白激酶, 是整个 cAMP 作用的分子基础, 在真核细胞内几乎所有 cAMP 的作用都是通过活化 PKA, 从而使底物蛋白发生磷酸化而实现。本实验证明灵芝多糖可引起小鼠腹腔巨噬细胞 PKA 活性明显升高, 提示其免疫增强作用可能与活化 PKA 有关。但其活化途径仍需进一步研究。

参 考 文 献

- 林志彬. 北京医科大学学报, 1992, 24(4): 271
- 雷林生, 等. 基础与临床, 1992, 12(2): 59
- Lei L S, et al. Acta Pharmaceutical Sinica, 1992, 27(5): 331
- Lei L S, et al. J Beijing Med Univ, 1991, 23(4): 329
- 李荣芷, 等. 北京医科大学学报, 1991, 23(6): 473
- 何庆云, 等. 北京医科大学学报, 1989, 21(3): 225
- 鄂征主编. 组织培养技术. 北京: 人民卫生出版社, 1993 185
- 李明春, 等. 中国生化药物杂志, 1999, 20(5): 233

(1999-09-20收稿)

无花果多糖对小鼠细胞免疫功能的影响[△]

山东济宁医学院药理教研室 (272113) 戴伟娟* 司端远 辛 勒 王 清

摘 要 为观察无花果多糖 (FCPS) 对小鼠细胞免疫功能影响. 给环磷酰胺抑制小鼠及应激小鼠 ig FCPS, 检测小鼠的迟发型超敏反应 (DTH). FCPS 能增强环磷酰胺、应激所致免疫功能低下小鼠的迟发型超敏反应. 证明 FCPS 能增强细胞介导的免疫反应.

关键词 无花果多糖 迟发型超敏反应 细胞免疫功能

Effects of Fig (*Ficus carica*) Polysaccharide on Cellular Immune Function in Mice

Department of Pharmacology, Jining Medical College in Shandong Province (Jining 272113) Dai Weijuan, Si Duanyuan, Xin Qin and Wang Qing

Abstract To observe the effects of *Ficus carica* polysaccharide (FCPS) on cellular immune function in mice. FCPS was orally administered to cyclophosphamide intoxicated mice and mice under stress. The delayed-type hypersensitivity (DTH) response of mice ear skin were monitored. Result showed that FCPS can significantly enhance response of DTH in cyclophosphamide intoxicated mice and mice under stress. It could be concluded that FCPS could enhance cellular immune reaction in mice.

Key words *Ficus carica* polysaccharide (FCPS) delayed-type hypersensitivity (DTH) cellular immune function

近年研究证明广泛存在于动物细胞膜、植物和微生物细胞壁中的多糖类物质能提高机体免疫系统的功能, 它不仅能促进 T 细胞、B 细胞、MΦ 细胞等免疫细胞的功能, 还能促进细胞因子的生成^[1]. 本研究初步观察了无花果多糖 (FCPS) 对环磷酰胺、应激所致小鼠迟发型超敏反应低下的恢复作用, 以探讨其对细胞免疫功能的影响.

1 材料与方法

1.1 材料: FCPS 粗提物由济宁医学院中草药研究室司端远博士提供; 二硝基氟苯 (DNFB) 为德国 E. Merck 公司产品; 环磷酰胺 (Cy) 由上海第十二制药厂生产, 批号 941208. 昆明种小鼠, 购自山东鲁抗集团动物中心.

1.2 方法: 取健康小鼠, 按体重分层次随机分为 4 组, 分组及剂量见表 1. 分别 ig 给药, 每天 1 次, 连续

10 d. 对照组 ig 等容量生理盐水. 用药第 4 天, 以脱毛剂在小鼠腹部脱毛处理, 次日用 1% DNFB (用 1:1 丙酮麻油配制) 在脱毛处致敏, 每鼠 25 μL, 涂匀, 24 h 后再用同法加强致敏 1 次. 致敏第 4 天用 1% DNFB 10 μL 均匀涂抹左耳进行攻击, 第 2 天处死小鼠, 剪下左右双耳, 用打孔器在双耳相应部位各打一耳片, 称重, 求出左右耳片重量之差进行组间比较^[1].

1.3 统计学处理: 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用 *t* 检验判断有无显著性.

2 结果

2.1 FCPS 对 Cy 诱导的免疫低下小鼠 DTH 的影响: 结果见表 1. 应用 Cy (动物致敏当天, 连续 3 d ip 60 mg/kg) 组小鼠 DTH 强度与对照组相比明显减弱, 而给药组均能恢复免疫低下小鼠的 DTH. 提示

* Address: Dai Weijuan, Department of Pharmacology, Jining Medical College, Jining

戴伟娟, 女, 研究生, 硕士, 副教授, 一直从事药理学教学与科研工作. 主要研究方向为免疫和神经药理学. 曾完成美国中华医学基金会资助项目, 山东省卫生厅资助项目及济宁医学院多项课题, 现正承担山东省自然科学基金资助项目. 曾获山东省医学科学技术进步奖, 山东济宁科学技术进步奖.

[△]山东省自然科学基金资助项目编号 Y98c 04 033