

香菇多糖对巨噬细胞一氧化氮生成和细胞内还原型谷胱甘肽的影响

侯 敢, 黄迪南, 祝其锋*

(广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023)

摘要: 目的 为探讨香菇多糖 (lentinan, LTN) 激活小鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮 (NO) 生成的作用机制。方法 观察 LTN 对小鼠腹腔巨噬细胞 NO 生成与细胞内还原型谷胱甘肽 (GSH) 的影响及其关系。结果 (1) LTN 对小鼠腹腔巨噬细胞 NO 生成具有明显的促进作用, 同时细胞内 GSH 浓度随 NO 生成增加而减少; (2) NO 生成抑制剂能抑制 LTN 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞 NO 生成和细胞内 GSH 水平降低; (3) GSH 去除剂能抑制巨噬细胞 NO 生成。结论 研究表明 LTN 促进小鼠腹腔巨噬细胞 NO 生成并同时消耗细胞内 GSH, 细胞内 GSH 水平可能与 NO 的生成有密切关系。提示细胞内 GSH 可能起到调节巨噬细胞 NO 生成和保护宿主细胞免受 NO 介导的细胞毒作用。

关键词: 香菇多糖; 巨噬细胞; 一氧化氮; 还原型谷胱甘肽

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)03-0245-03

Effects of lentinan on nitric oxide production and intracellular glutathione in mouse peritoneal macrophages

HOU Gan, HUANG Di-nan, ZHU Qi-feng

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang Guangdong 524023, China)

Abstract **Object** To investigate the mechanisms of action of lentinan (LTN) activated mouse peritoneal macrophages to produce nitric oxide (NO). **Methods** The effects of LTN on NO output and intracellular glutathione (GSH) in mouse peritoneal macrophages and the correlation of them were studied. **Results** (1) LTN can significantly increase production of NO in mouse peritoneal macrophages, decrease level of intracellular GSH followed increase of NO production. (2) The above effect can be blocked efficiently by the NO production inhibitors. (3) NO production can be inhibited by GSH-lowering drugs. **Conclusion** LTN increase NO production with depletion of intracellular GSH in the activated mouse peritoneal macrophages. It suggested that intracellular GSH plays an important role in regulation of NO production and protection of host cells from cytotoxic attack induced by NO.

Key words lentinan (LTN); macrophages; nitric oxide (NO); glutathione (GSH)

香菇多糖 (lentinan, LTN) 为免疫调节剂, 能提高机体免疫防御能力, 具有宿主介导性抗肿瘤、抗病毒等作用^[1]。我们曾报道 LTN 能促进小鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮 (NO) 生成^[2]。为进一步探讨 LTN 的免疫调节作用及其机制, 观察了 LTN 对小鼠腹腔巨噬细胞 NO 生成和细胞内还原型谷胱甘肽 (GSH) 的影响及其机制。

1 材料和方法

1.1 药品及试剂: 香菇多糖粉针剂 (1 mg/瓶, 日本森下制药株式会社产品), RPMI-1640 培养基 (Gibco 产品), 小牛血清 (超级, 杭州四季青生物工程材料研究所产品), 无酚红 RPMI-1640 培养基, 内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 1-bromo-o-

tane (BrO), ethacrynic acid (ETA), 5', 5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸) (DTNB) (Sigma 产品), buthionine sulfoximine (BSO, Aldrich 产品), N^G-mono-methyl-L-arginine (L-NMA, Calbiochem-Behring Corp. 产品), 放线菌素 D (actinomycin D, Sino-American biotec 产品), 放线菌酮 (actidione, Fluka 产品), 其余为国产分析纯试剂。

1.2 动物: 昆明种小鼠, 雌性, 7~8 周龄, 体重 20~25 g, 由本院动物中心提供。

1.3 小鼠腹腔巨噬细胞制备: 小鼠 ip 无血清 RPMI-1640 培养液 2 mL, 颈椎脱臼处死, 75% 酒精浸泡 15 min, 收集腹腔内液, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 用含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640

* 收稿日期: 2001-05-09

基金项目: 广东省重点学科基金资助 (9708)

作者简介: 侯 敢 (1963-), 女, 湖南湘西人, 讲师, 硕士, 1988年毕业于湖南医科大学临床医学专业, 从事衰老生物化学研究。

Tel 0759-2388895

培养液调整细胞浓度至 $\times 10^6 / \text{mL}$, 取 6 孔细胞培养板, 每孔加细胞悬液 5 mL, 置 5% CO_2 37℃ 培养 5 h, 倾去培养液后, 再用无酚红 RPMI-1640 培养液洗去未贴壁细胞, 即为所需的巨噬细胞。每孔加 5 mL 含 10% 小牛血清的无酚红 RPMI-1640 培养液, 按所需剂量加入药物进行培养。

1.4 巨噬细胞 NO 生成量的测定: 根据 Griess 反应测定细胞培养上清液的 NO_2^- 量, 间接反映巨噬细胞的 NO 生成量^[3]。

1.5 细胞内 GSH 测定: 采用 DTNB 比色法。参照 Chigo 等^[4]的方法裂解细胞, 并进行比色测定。

1.6 统计分析: 采用 SYSTAT 统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 LTN 对巨噬细胞 NO 生成和细胞内 GSH 的影响: 分别以 1.0, 10, 100 mg/L 终浓度 LTN 进行实验, 以 PBS 为空白对照, 20 $\mu\text{g/L}$ LPS 阳性对照于培养 24 h 取细胞培养液测定 NO_2^- 浓度, 并收集各孔细胞测定 GSH, 结果见表 1 可见 LTN 能刺激小鼠腹腔巨噬细胞的 NO 生成, 且细胞内 GSH 随 NO 生成量增加而减少。

表 1 LTN 对巨噬细胞 NO 生成和细胞内 GSH 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量 (mg/L)	$\text{NO}_2^- (\mu\text{mol/L})$	GSH ($\mu\text{mol/L}$)
PBS	-	3.80 ± 0.57	5.93 ± 0.51
LTN	1.0	5.98 ± 0.65 [*]	5.44 ± 0.58
LTN	10	10.51 ± 0.84 [*]	4.51 ± 0.49 [*]
LTN	100	18.42 ± 0.79 [*]	4.07 ± 0.58 [*]
LPS	0.02	22.40 ± 0.88 [*]	3.76 ± 0.43 [*]

与 PBS 组比较: * $P < 0.01$

2.2 NO 合成抑制剂对巨噬细胞 NO 生成和细胞内 GSH 的影响: 用终浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ LTN 处理小鼠腹腔巨噬细胞, 同时分别加入放线菌素 D 放线菌酮和 L-NMA 共同培养。24 h 后取细胞培养液测定 NO_2^- 浓度, 并收集各孔细胞测定细胞内 GSH, 结果见表 2 可见 NO 合成抑制剂能抑制 LTN 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞 NO 生成和细胞内 GSH 含量减少。

表 2 NO 合成抑制剂对 LTN 作用的巨噬细胞 NO 生成和细胞内 GSH 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	$\text{NO}_2^- (\mu\text{mol/L})$	GSH ($\mu\text{mol/L}$)
LTN	18.28 ± 0.72	4.05 ± 0.44
LTN+ 放线菌素 D	5.78 ± 0.65 [*]	5.54 ± 0.37 [*]
LTN+ 放线菌酮	6.53 ± 0.51 [*]	5.75 ± 0.56 [*]
LTN+ L-NMA	5.42 ± 0.48 [*]	5.45 ± 0.50 [*]

与 LTN 组比较: * $P < 0.01$

2.3 GSH 去除剂对巨噬细胞 NO 生成和细胞内 GSH 的影响: 用终浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ LTN 处理小鼠腹腔巨噬细胞, 同时分别加入 BSO (200 $\mu\text{mol/L}$)、BrO (60 $\mu\text{mol/L}$) 及 ETA (60 $\mu\text{mol/L}$) 共同培养。24 h 后取细胞培养液测定 NO_2^- 浓度, 结果见图 1 可见 GSH 去除剂能抑制 LTN 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞 NO 生成。

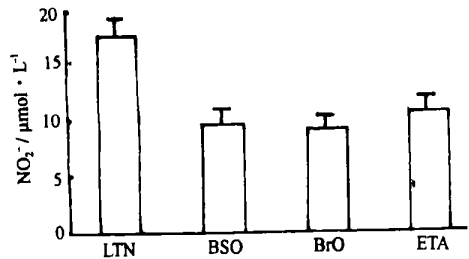


图 1 GSH 去除剂对 LTN 作用的巨噬细胞 NO 生成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3 讨论

巨噬细胞是机体免疫系统中的重要成分之一, 作为免疫效应细胞起作用, 参与免疫系统的调节。许多淋巴因子, 如干扰素 γ 、白介素、肿瘤坏死因子及内毒素脂多糖 (LPS) 等均能活化巨噬细胞, 活化后的巨噬细胞分泌近百种生物活性物质, 如 NO、白介素-1、肿瘤坏死因子、活性氧等, 其中许多与免疫应答及炎症有关, 并通过 L-精氨酸途径合成 NO, 起到杀伤多种病原体及肿瘤细胞的作用^[5]。

GSH 是细胞内最丰富的低分子巯基化合物, 并起到保护细胞免受氧化攻击的作用。细胞内 GSH 还广泛参与膜转运、蛋白质合成、核酸合成、基因表达和信息传递等重要过程。NO 能与巯基 (-SH) 反应, 与 GSH 反应可生成 S-亚硝基谷胱甘肽 (GSNO)。近年的研究表明, 细胞内 GSH 的氧化还原状态和浓度起到调节巨噬细胞 NO 合成和对抗 NO 介导的对宿主的细胞毒的作用。在 LPS 和干扰素 γ 激活的鼠巨噬细胞中, NO 生成增加而细胞内 GSH 减少^[6]。巯基 (-SH) 在鼠巨噬细胞中起到对抗 NO 介导的细胞毒作用^[7]。去除 GSH 的巨噬细胞在 LPS 和干扰素 γ 激活时 NO 生成量仅为未去除 GSH 的巨噬细胞的 60%。本研究结果显示, LTN 能刺激小鼠腹腔巨噬细胞活化并释放大量的 NO, 同时细胞内 GSH 含量随 NO 生成增加而减少, 具有一定的相关性。与上述观点相符。

目前已知, 巨噬细胞主要由诱生型一氧化氮合酶 (inducible-type NO synthase, iNOS) 通过 L-精氨酸途径合成 NO, 干扰素 γ 及 LPS 等多种因素

能诱导巨噬细胞从头合成 NO^[9]。本研究结果显示, RNA 转录抑制剂放线菌素 D 蛋白质合成抑制剂放线菌酮和 NOS 竞争性抑制剂 L-NM A, 均能有效抑制 LTN 所诱导的巨噬细胞 NO 生成和细胞内 GSH 的减少。另一方面, 使用 GSH 去除剂 BSO BrO 和 ETA 亦能减少 LTN 所诱导的巨噬细胞 NO 生成。提示在 LTN 激活巨噬细胞过程中, 细胞内 GSH 可能起到调节巨噬细胞 NO 合成及保护宿主细胞免受 NO 介导的细胞毒作用。

参考文献:

- [1] Irimoda K, Masihi K N, Chhara G. Stimulation of microbicidal host defence mechanism against aerosol influenza virus infection by Lentinan [J]. Int J Immunopharmacol, 1992, 14: 971-977.
- [2] 黄迪南, 侯 敢, 祝其锋. 香菇多糖对小鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮生成的影响及其机理 [J]. 基础医学与临床, 1999, 19(3): 260-262.
- [3] Ding A H, Nathan C F, Stuehr D J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages [J]. J Immunol, 1988, 141(7): 2407-2412.

- [4] Ghigo D, Alessio P, Foco A. *et al.* Nitric oxide synthesis is impaired in glutathione-depleted human umbilical vein endothelial cells [J]. Am J Physiol, 1993, 265(3pt1): C728-732.
- [5] Loshach R B, Russel S W. A specific sequence of stimulation is required to induce synthesis of the antimicrobial molecule nitric oxide by mouse macrophage [J]. Infect Immunol, 1992, 60(5): 2133-2135.
- [6] John S H, Fernando Q C, Guy H N, *et al.* Induction of nitric oxide synthesis in J774 cells lowers intracellular glutathione: effect of modulated glutathione redox status on nitric oxide synthase induction [J]. Biochem J, 1997, 322: 477-481.
- [7] Zamora R, Matthys K E, Herman A G. The protective role of thiols against nitric oxide-mediated cytotoxicity in murine macrophage J774 cells [J]. Eur J Pharmacol, 1997, 321(1): 87-96.
- [8] Romao P R, Fonseca S G, Hothersall J S, *et al.* Glutathione protects macrophages and leishmania major against nitric oxide-mediated cytotoxicity [J]. Parasitology, 1999, 118(pt6): 559-566.
- [9] Weisz A, Oquchi S, Cicatillo L, *et al.* Dual mechanism for the control of inducible-type NO synthase gene expression in macrophages during activation by interferon- γ and lipopolysaccharide [J]. J Biol Chem, 1994, 269(11): 8324-8333.

小儿抗痫胶囊中 α -细辛醚的药物动力学研究

张德芹¹, 马 融², 刘昌孝³, 戚爱棣^{1*}

(1. 天津中医学院 中药系, 天津 300193; 2 天津中医学院第一附属医院, 天津 300193; 3. 天津药物研究院, 天津 300193)

摘要: 目的 测定小儿抗痫胶囊中主要有效成分 α -细辛醚在大鼠体内的血药浓度, 并根据血药浓度-时间配对资料测算其体内药代动力学参数。方法 采用 HPLC 测定 ig 给药 1. 25, 2. 5, 5 g/kg 不同剂量小儿抗痫胶囊后, 大鼠体内 α -细辛醚的血药浓度。血药浓度数据采用 3P97 药代动力学软件进行参数模拟。结果 小儿抗痫胶囊中有效成分 α -细辛醚在大鼠体内的药代动力学过程可用一级动力学过程的一室开放型模型来描述。低、中、高 3 个不同剂量组高峰血药浓度 (C_{max}) 分别为 0. 46, 0. 83, 1. 33 μ g/mL, 达峰时间 (T_{peak}) 分别为 81. 94, 88. 85 和 96. 12 min, 血药浓度-时间曲线下面积 (AUC) 分别为 152. 75, 225. 16 和 393. 21 μ g $\cdot$ min/mL。结论 本研究建立的 HPLC 测定大鼠 ig 不同剂量小儿抗痫胶囊后 α -细辛醚血药浓度的实验方法简便、快速、灵敏, 血浆中内源性物质及复方各组分药物不干扰测定。该研究可为小儿抗痫胶囊在临床和量化研究提供可靠的依据。

关键词: HPLC; 小儿抗痫胶囊; α -细辛醚; 药代动力学

中图分类号: R285. 61 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)03-0247-04

Pharmacokinetics study of α -asarone in XIAOER KANGXIAN CAPSULE*

ZHANG De-qin¹, MA Rong², LIU Chang-xiao³, QI Ai-di¹

(1. Department of Chinese Materia Medica, Tianjin College of TCM, Tianjin 300193, China; 2. First Affiliated Hospital of Tianjin College of TCM, Tianjin 300193, China; 3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Key words HPLC; XIAOER KANGXIAN CAPSULE; α -asarone; pharmacokinetics

* XIAOER KANGXIAN CAPSULE is a Chinese herbal preparation with *Rhizoma Acori Tatarinowii*, *Rhizoma Gastrodiae*, etc.. It is used against epilepsy and convulsion of children.

收稿日期: 2001-07-17

基金项目: 天津市卫生局中医、中西医结合科研基金资助课题 (200042)

作者简介: 张德芹 (1963-), 女 (满族), 硕士, 天津中医学院中药系副教授, 主要从事中药学教学及中草药药代动力学研究工作, 参编医著 4 部, 在国内公开刊物发表论文 12 篇