

4 讨论

SA 是细胞膜上糖蛋白和糖脂链末端的残基,广泛分布于哺乳动物细胞(包括红细胞)膜表面,为细胞负电荷的主要来源,亦为细胞膜受体的重要成分^[3,4],参与细胞分化,癌细胞的转移,细胞的识别、黏附和接触抑制等生理过程。因此,细胞膜上 SA 含量的改变将导致细胞内一系列生物学变化。同时 SA 也是红细胞 C3b 受体(CR1)的重要成分,除红细胞外,机体的其他组织细胞膜上也存在一定水平的 SA。研究发现随着肿瘤的生长,腹水和血清中 SA 水平增加,并与肿瘤的生长和类型呈相关性,细胞膜表面 SA 水平与肿瘤的恶性程度有关。肿瘤细胞比正常细胞更易产生 SA^[5]。研究表明 SA 在肿瘤的病理过程中具有“抗识别作用”,许多癌化的细胞的表面富含 SA 黏蛋白^[6,7],其水平高达膜上蛋白总水平的 0.5%,而在正常细胞表面,这类成分没有或很少,因此认为这是癌细胞逃避免疫攻击的机制,并且和癌细胞的转移有关^[8]。将癌细胞分离出来,用唾液酸苷酶除去细胞表面的 SA,再注入体内,结果导致体内原有的癌细胞解体或消失^[9]。本实验结果表明龙葵碱使荷瘤小鼠肿瘤细胞膜上 SA 水平明显降低。由此推测龙葵碱可能属抗肿瘤药物中的代谢药,主要影响 DNA 的合成,文献报道可与 DNA 结合的药物和一些抗代谢药可抑制肿瘤产生 SA^[9]。其机制是直接和 DNA 结合而影响 DNA 合成酶,进而影响 SA 的合成。

细胞膜 SA 水平与细胞膜活性密切相关,因此进一步研究对肿瘤细胞膜活性的影响就显得非常重要。细胞膜在等渗溶液中能重新封闭起来,恢复对大

分子和阳离子的通透屏障,形成封闭影泡。测定红细胞膜重新封闭能力的指标即封闭度。实验结果表明:龙葵碱与环磷酰胺均可明显降低 H₂₂小鼠肿瘤细胞膜封闭度,提示细胞膜活性降低,其结果有可能导致肿瘤细胞的解体和死亡。

References:

- [1] Han R. *Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques* (抗癌药物研究与实验技术) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Press, 1997.
- [2] Zamudio I, Cellino M, Canessa F M. The relation between membrane structure and NADH: (acceptor) oxidoreductase activity of erythrocyte ghosts [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1969, 129(1): 336-345.
- [3] Stevenson R A, Huang J A, Studdert M J, et al. Sialic acid acts as a receptor for equine rhinitis A virus binding and infection [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(9): 2535-2543.
- [4] Ji Y B, Zou X, Ji C F, et al. Effect of aloe polysaccharide on erythrocyte membrane function of S₁₈₀ mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(8): 898-901.
- [5] Feijoo C C, Rodriguez B F J, Paez de la C M, et al. Clinical significance of preoperative serum sialic acid levels in colorectal cancer: utility in the detection of patients at high risk of tumor recurrence [J]. *Int J Biol Markers*, 2004, 19(1): 38-45.
- [6] Bektemur G, Ozer F, Kanat F, et al. Diagnostic efficiency of serum lipid-bound sialic acid level in malignant pleural effusions [J]. *Tuberk Toraks*, 2003, 51(3): 265-270.
- [7] Albuquerque G R P, Nakamura C V, Souza W, et al. Differential expression of sialic acid and N-acetylgalactosamine residues on the cell surface of intestinal epithelial cells according to normal or metastatic potential [J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(5): 629-640.
- [8] Marquez M, Nilsson S, Lennartsson L, et al. Charge-dependent targeting: results in six tumor cell lines [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(3a): 1347-1351.
- [9] Li S S. Biological progress of sialic acid and its derivatives [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 1997, 21(2): 71.

银耳多糖对小鼠脾脏淋巴细胞蛋白激酶 C 活性的影响

胡庭俊, 梁纪兰, 程富胜, 陈灵然*

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所 农业部新兽药工程重点开放实验室, 甘肃 兰州 730050)

摘要:目的 观察银耳多糖(TPS)体外对小鼠脾脏淋巴细胞蛋白激酶 C(PKC)活性的影响,探讨 TPS 对免疫细胞信息传递系统的效应。方法 应用反向离子对高效液相色谱法测定小鼠脾脏淋巴细胞 PKC 活性。结果 TPS 能促进体外培养的小鼠脾脏淋巴细胞 PKC 活性。结论 TPS 的免疫调节作用与淋巴细胞的信号传导系统密切相关。

关键词: 银耳多糖; 淋巴细胞; 蛋白激酶 C

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)01-0081-04

* 收稿日期: 2004-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970556)

作者简介: 胡庭俊(1965—),男,博士,研究员,主要从事中药免疫药理研究工作。

Tel: (0931) 2651548 E-mail: hutingjun@ivdc.gov.cn

Effect of *Tremella polysaccharides* on protein kinase C activity in murine spleen lymphocytes

HU Ting-jun, LIANG Ji-lan, CHENG Fu-sheng, CHEN Jiong-ran

(Key Laboratory of New Animal Medicine Project, Lanzhou Institute of Animal Science and Veterinary Pharmaceutics, Chinese Agriculture Academy of Sciences, Ministry of Agriculture, Lanzhou 730050, China)

Key words: *Tremella polysaccharides* (TPS); lymphocytes; protein kinase C (PKC)

银耳 *Tremella fuciformis* Berk. 为多隔担子菌纲的高等真菌, 作为高级补品已有悠久历史, 能益气滋阴、润肺生津。银耳多糖 (TPS) 是银耳的主要活性成分。近年来发现其具有抑瘤、抗放、升白等作用, 并能提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力^[1], 增强刀豆素 A (ConA) 诱导的正常小鼠和老年小鼠脾细胞增殖反应, 促进小鼠脾脏淋巴细胞产生白细胞介素-2 (IL-2)^[2]。TPS 在一定的剂量范围内可以剂量依赖性增加脾细胞内游离钙离子的浓度, 并与 ConA 有协同作用^[3]。为了进一步探讨 TPS 对免疫细胞信息传递系统的效应和免疫调节作用机制, 本实验用反向离子对高效液相色谱 (RP-HPLC) 法, 观察 TPS 对小鼠脾脏淋巴细胞 PKC 活性的影响。

1 材料与方法

1.1 动物: 昆明种小鼠, 购于中牧股份有限公司兰州生物药厂实验动物室, 8 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 雌雄兼用。

1.2 药品: TPS 从固体培养的银耳孢子中分离获得, 由甘露糖、岩藻糖、葡萄糖、木糖和少量的糖醛酸组成, 摩尔比为 3.93 : 1.0 : 1.77 : 1.5, 以 α -(1-3) 连接的甘露糖为主链, 与岩藻糖、葡萄糖、木糖和糖醛酸侧链相连接而成, 相对分子质量为 5.6×10^5 。配成 0.1% 水溶液, 9.80665×10^5 Pa 灭菌 15 min 备用。

1.3 仪器及试剂: 800 高效液相色谱仪, Waters 公司。RPMI-1640 培养基, Dioclein, ATP, 组蛋白 (Histone), Tris, PMSF, Tritone X100, DTT, Aprotinin, TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) 均购自 Sigma 公司。Surose, CaCl₂, KH₂PO₄, MgCl₂ 均为国产分析纯, 甲醇 (光谱纯), 购自上海生物工程有限公司, IPR-A 离子对试剂 (四丁基磷酸铵), 天津化学试剂有限公司出品。

1.4 小鼠脾淋巴细胞的体外培养及药物处理: 无菌取小鼠脾脏, 置 100 目尼龙网上, 加 Hank[®] 液研磨, 冲洗, 收集细胞悬液, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 用 0.15 mol/L NH₄Cl-Tris 溶解红细胞后, 加 Hank[®] 液洗涤 3 次至悬液澄清。经台盼蓝染色, 细胞存活率 95% 以上, 调整细胞浓度为 $8 \times$

10^6 /mL。接种细胞悬液 1.0 mL 于 24 孔培养板, 于 37[°], 5% CO₂ 培养 24 h。各实验组每孔分别加入 0.1% TPS, 使其终浓度分别为 25, 50, 100, 200 mg/L。阳性对照组加入 TPA, 使其终浓度为 100 ng/mL。空白对照组为 RPMI-1640 培养液, 继续培养 24 h 收集细胞。各组均设 6 个平行孔, 实验重复 3 次。

1.5 脾细胞 PKC 制备: 收集各组细胞, 1 500 r/min 离心 10 min, 沉淀中加入 PKC 提取液, 每孔 0.5 mL, 于冰浴下超声粉碎, 离心去除碎片和胞核, 得上清液即为胞浆和膜性组份, 测定 PKC 总活力。PKC 提取液内含 Tris-HCl (pH 7.4) 20 mmol/L, DTT 2 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, Aprotinin 50 μ g/mL, PMSF 1 mmol/L, Surose 200 mmol/L。

1.6 PKC 的活性测定

1.6.1 酶蛋白水平测定: 用紫外分光光度法测定酶蛋白的水平。

1.6.2 PKC 反应体系: PKC 反应体系中包括 PKC 反应液和酶液 (按蛋白水平计), 反应总体积为 1 mL。PKC 反应液内含: Tris-HCl (pH 7.4) 20 mmol/L, DTT 1 mmol/L, PS 100 μ g/mL, DG 10 μ g/mL, MgCl₂ 10 mmol/L, CaCl₂ 1 mmol/L, Histone mg/mL, ATP 1 mmol/L。

1.6.3 PKC 酶促反应: 将 PKC 反应液混匀, 30 预热 5 min, 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) 混合液, 振荡 1 min, 以抽提脂溶性物质, 再 2 000 r/min 离心 10 min, 吸取水层, 其中含有 ATP、ADP 和 AMP。重复前步骤处理 1 次, 合并提取液, 用于 PKC 活性测定。

1.6.4 PKC 活性测定: 用 RP-HPLC 法测定。色谱条件: C₁₈ 柱; 流动相: 甲醇-0.04 mol/L 磷酸二氢钾 (20 : 80, 内含 5 mmol/L IPR-A, pH 7.0); 检测波长 259 nm, 流速 0.8 mL/min, 柱温: 27[°], 进样量 20 μ L。以底物 ATP 消耗量反映 PKC 的活性。

1.6.5 PKC 酶活力定义: 一个酶活力单位相当于每分钟使 Histone 磷酸化而消耗 ATP 1 nmol 所需

的酶量。

1.6.6 ATP 标准曲线: 准确称取 ATP 标准品, 用双蒸水配成 1 mg/mL 的标准储备液, 测定时用 Tris-HCl (pH 7.4) 代替酶液, 稀释成不同浓度的标准工作液。以标准品的进样量 (X) 对峰面积积分值 (Y) 进行线性回归, 其回归方程为 $Y = 80\,312 +$

$355\,954 X, r = 0.9846$ 。

2 结果

2.1 RP-HPLC 法测定 ATP 标准品及样品的色谱图: 见图 1。

2.2 TPS 对小鼠脾脏淋巴细胞 PKC 活性的影响: 见图 2。

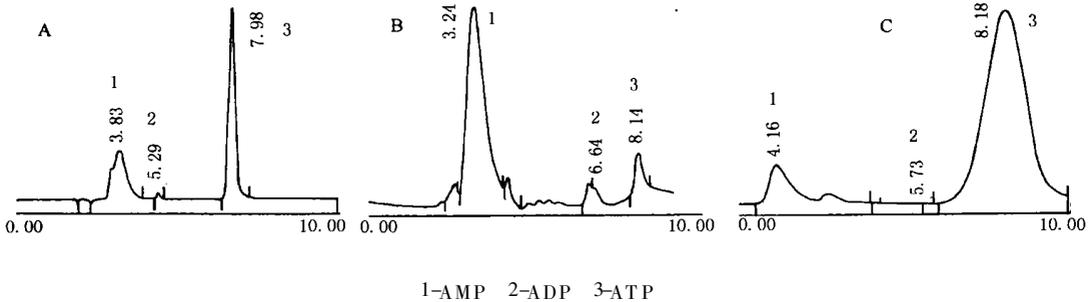
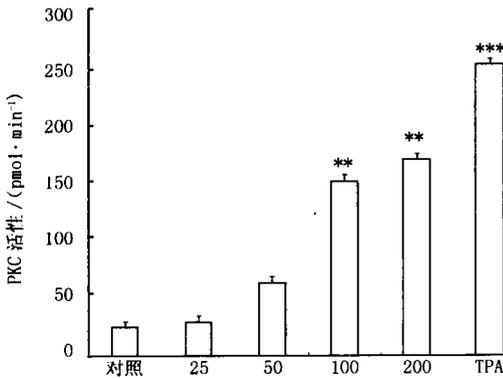


图 1 ATP 标准品 (A)、样品 (B) 及对照品 (C) 色谱图

Fig. 1 Chromatogram of ATP standard substance (A), sample (B), and reference substance (C)



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.005$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.005$ vs control group

图 2 TPS 在体外对小鼠脾脏淋巴细胞 PKC 活性的影响

Fig. 2 Effect of TPS on PKC activity in murine spleen lymphocytes in vitro

3 讨论

胞外信号分子如激素、神经递质、细胞因子、一些药物分子等通过与膜特异受体或配体结合, 活化蛋白激酶^[4]。PKC 是一种 Ca^{2+} 和磷脂依赖性激酶, 被激活后, 广泛参与由肌醇磷脂信使系统介导的生理生化效应, 是多种细胞反应 (如增殖或分化等) 的早期变化之一^[5], 因此通过测定细胞内 PKC 活性的变化, 可反映药物对细胞内信息传递的影响。

ATP 在 PKC 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 PKC 的活力成正比, 由此可通过测定体系中 ATP 的消耗量来确定 PKC 的活力。TPA 为一种蛋白激酶激活剂, 本实验选择该药作为阳性对照。本研究证明 TPS 能引起小鼠脾脏淋

巴细胞 PKC 活性明显升高, 揭示其免疫增强作用与活化 PKC 有关。

在多糖对动物免疫细胞的信号转导方面, 李明春等就灵芝多糖 (GLB₇) 对小鼠腹腔巨噬细胞信号转导过程的影响进行了深入研究, 证实 GLB₇ 能增强小鼠巨噬细胞的吞噬功能, 引起小鼠巨噬细胞 $[Ca^{2+}]$ 和 pH 升高, 增加巨噬细胞内三磷酸肌醇 (IP₃) 和二酰基甘油 (DAG) 以及 cAMP 和 cGMP 的生成, 在转录水平促进小鼠巨噬细胞分泌细胞因子并影响其蛋白激酶活性^[6,7]。枸杞多糖可剂量依赖性升高淋巴细胞内 cAMP 和 cGMP 水平, 并增加 ConA 活化的小鼠脾淋巴细胞膜 PKC 活性^[8]。TPS 是银耳的重要有效成分, 具有激活人单核细胞产生 IL-1、IL-6 和肿瘤坏死因子 (TNF) 的作用^[9], 能显著抑制肿瘤生长^[10], 可促进 ConA 诱导的脾淋巴细胞产生 IL-2^[11]。本研究中, 体外培养的小鼠脾淋巴细胞在加入 TPS 后的色谱图显示 AMP 峰值升高, ATP 峰值下降。而空白对照组与标准品组的色谱图基本一致。结果表明, TPS 作为外源性信号分子, 与脾淋巴细胞表面的特异性受体结合, 活化细胞膜 PKC, 并引起级联反应, 使细胞内一系列蛋白质级联磷酸化, 最后将胞外信号传递到细胞核, 活化核内转录因子, 引起基因表达, 调节免疫细胞的功能。

References:

- [1] Lin Z B. Effects of *Tremella fuciformis* polysaccharides on the activity of macrophages, hemogenic function of bone marrow and synthesis of protein and nucleic acid [J]. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 1982, 23(5): 69-72.
- [2] Xia D, Lin Z B. Effects of *Tremella* polysaccharides on immune function in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学杂志)

学报), 1989, 20(10): 453-455.

[3] Cui J Y, Lin Z B. Effects of *Tremella fuciformis* polysaccharides on intracellular free calcium in murine spleen lymphocytes [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1987, 32(8): 561-564.

[4] Le Z P. Molecular base of cellular signal metabolism [J]. *Nat J* (自然杂志), 1999, 21(5): 258-263.

[5] Sun D Y, Guo Y L, Ma L G. *Cell Signal Transduction* (细胞信号转导) [M]. Beijing: Science Press, 1998.

[6] Li M C, Lei L S, Liang D S, et al. Effect of *Ganoderma* polysaccharide on intracellular IP₃ and DAG in murine peritoneal macrophages [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1999, 15(5): 20-22.

[7] Li M C, Lei L S, Liang D S, et al. Effect of *Ganoderma* polysaccharide on PKC activity in murine peritoneal macrophages [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2000, 16(1): 36-38.

[8] Zhang X, Xiang S L, Cui X Y, et al. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) on the lymphocyte signal transduction system in mice [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 1997, 13(5): 289-291.

[9] Gao Q P, Seljelid R, Chen H, et al. Characterisation of cytokines and stimulating active acidic heteroglycan from *Tremella fuciformis* Berk [J]. *Carbohydr Res*, 1996, 288: 135-137.

[10] Ukai S, Hivose K, Kihō T, et al. Antitumor activity on sarcoma 180 of polysaccharide from *Tremella fuciformis* Berk [J]. *Chem Pharm Bull*, 1972, 20: 2293-2295.

[11] Cui J Y, Lin Z B. Effects of *Tremella fuciformis* polysaccharides on the activity of IL-2, IL-6, TNF- α , and expression of their mRNA in mice [J]. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报), 1996, 28(4): 244-248.

重组水蛭素抗大鼠大脑中动脉血栓形成作用

周 琴, 任开环, 韩国柱*, 李卫平

(大连医科大学 药理教研室, 辽宁 大连 116027)

脑血栓的发病率很高, 引起的后果相当严重, 抗脑血栓药物是当前研究的热点。近年, 国内外对重组水蛭素 (recombinant hirudin, rH)——一种由 65 个氨基酸组成的高效、特异的凝血酶抑制剂的研发取得了令人瞩目的进展^[1]。本课题组曾对国产 rH 的药效学和药动学进行了较深入的研究^[2,3], 证明其具有强大的抗凝、抗弥漫性血管内凝血 (DIC) 以及抗动静脉血栓形成作用。但有关其对脑动脉血栓形成的影响, 迄今未见报道。本研究利用化学法建立血栓模型以评价 rH 的抗大鼠中动脉血栓形成作用。

1 材料与方法

1.1 动物: SD 大鼠, 280~300 g, 雄性, 大连医科大学动物中心提供。

1.2 受试药品与试剂: rH, 大连高新生物制药有限公司提供, 批号 010805, 纯度 > 99%, 抗凝效价 16 000 ATU/mg, 相对分子质量 7 000, 经鉴定为 N-Hle¹-Thr²-63-desulfato-hirudin; 肝素, 北京奥博星技术责任有限公司产品, 批号 20010513; 三氯化铁 (FeCl₃), 北京市朝阳区通惠化工厂, 分析纯, 批号 950220; 红四氮唑 (TTC), 北京化工厂, 批号 20020809。

1.3 动物分组: SD 大鼠 78 只, 随机分成两大组。第一大组再分为 6 组, 每组 10 只。大脑中动脉

(MCA) 血栓形成模型组 (iv 生理盐水, 以 FeCl₃造模)、假手术组 (除不用 FeCl₃外, 其余步骤同其他组)、高、中、低剂量给药组 (分别 iv rH 1.0、0.5、0.25 mg/kg, FeCl₃造模) 和阳性药对照组 (iv 肝素 500 U/kg, FeCl₃造模)。第二大组亦再分为 6 组, 每组 3 只, 组别同第一大组, 于术后立即取脑, 作病理检查。

1.4 MCA 血栓形成模型制备: 仿文献方法^[4]。各组均于给药或生理盐水后 10 min 造模。大鼠用 12% 水合氯醛 (250 mg/kg, ip) 麻醉, 按 Tamura 等方法^[5]暴露右侧位于嗅束及大脑下静脉之间的一段 MCA, 置一小片塑料薄膜保护血管周围脑组织, 将吸有 50% FeCl₃溶液 5 μ L 的小片定量滤纸片贴在该段 MCA 上, 持续 30 min 后去掉滤纸片, 生理盐水冲洗局部组织, 逐层缝合, 回笼饲养。

1.5 行为学评分: 于术后 24 h 按文献方法对动物行为学进行评分^[4]。满分为 11 分, 分数越高, 动物的行为学障碍越严重。动物行为学评分采用盲法评分。

1.6 梗死范围测定: 术后 24 h, 将大鼠断头取脑, 去掉嗅球、小脑和低位脑干, 生理盐水冲洗后做冠状切片 5 片, 置 0.2% TTC 溶液中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。正常脑组织被染成红色, 梗死组织成苍白色。将脑平片照相后, 采用 Image-Pro plus 软件分析系

* 收稿日期: 2004-04-12

作者简介: 周 琴 (1957—), 女, 辽宁大连人, 实验师, 主要从事心脑血管药理学研究。

* 通讯作者 Tel: (0411) 84720229 E-mail: hgzhx2236@sina.com