

蝉拟青霉总多糖对免疫抑制大鼠巨噬细胞激活作用的实验研究

金丽琴¹, 吕建新^{2*}, 杨介钻², 李东², 李安乐³

(1. 温州医学院基础医学院 生物化学教研室, 浙江 温州 325035; 2. 温州医学院检验医学院, 浙江 温州 325035; 3. 温州医学院 实验动物中心, 浙江 温州 325035)

蝉拟青霉 *Paecilomyces cicadidae* (Miquel.) Samson 即我国传统中药蝉花^[1,2], 与冬虫夏草的无性型——中国拟青霉为同属真菌^[2], 两者的化学成分十分相似。虫草及其多糖的研究报道很多, 但蝉拟青霉及其多糖对正常及免疫抑制机体非特异性免疫调节作用的研究国内外未见报道。本实验通过观察蝉拟青霉总多糖 (*Paecilomyces cicadidae* polysaccharides, PCPS) 对正常及环磷酰胺 (cytotoxin, CTX) 所致免疫抑制大鼠腹腔巨噬细胞 (peritoneal macrophages, PM Φ)、肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophages, AM Φ) 的吞噬功能、细胞转化功能及其胞内和细胞培养液内酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP, EC 3, 1, 3, 2) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH, EC 1, 1, 1, 27) 活力的调节作用以及对脾脏巨噬细胞形态结构的影响, 阐明 PCPS 对正常及 CTX 所致免疫抑制大鼠非特异性免疫调节作用及其机制。

1 材料

1.1 蝉拟青霉菌丝体: 由浙江省科学院亚热带作物研究所陈祝安研究员提供。

1.2 PCPS: 制备见文献方法^[3]。制备的总多糖用生理盐水配制成 50 mg/mL 溶液, 用巴氏法消毒后分装于 10 mL 抗生素瓶冷冻 (-20 °C) 保存备用。

1.3 主要试剂: 噻唑蓝 (MTT) Amresco 分装; 十二烷基硫酸钠 (SDS) Sigma 公司产品; 对硝基苯酚磷酸酯, 德国 Merck 公司; RPMI-1640 美国 Gircobrl 公司; 植物血凝素 (PHA) 为上海伊华临床医学科技公司产品。LDH 试剂盒由宁波慈城生化试剂厂生产, 批号为 010415; ACP 测试试剂为本室自行配制; 注射用 CTX 粉剂, 上海华联制药有限公司 (批号为 001206, 200 mg/瓶), 使用时以无菌注射用水配成 10 mg/mL。其余试剂均为国产分析纯。

1.4 主要仪器: Hitach 7170 全自动生化分析仪; 低

温离心机 (Universal 32 R 德国); 酶标仪 Σ 960 (Metertech ING), LGJ0.5 冷冻干燥器 (北京四环科学仪器厂); H-600 型透射电镜。

2 方法

2.1 实验动物分组及处理: 清洁级 (I 级) SD 大鼠由温州医学院实验动物中心提供。雄性 SD 大鼠 (6~7 周龄, 体重 184~230 g) 24 只, 随机均分为 4 组, 每组 6 只, 分笼饲养。NS 对照组 (sc 2 mL/kg); CTX 组, sc 给药 20 mg/kg, 第 15 天起改为 sc NS; CTX+PCPS 组, 后背部左侧 sc CTX 20 mg/kg, 第 8 天起同时在后背部右侧 sc PCPS (100 mg/kg), 于第 15 天起停用 CTX, 连续 sc PCPS 至用药结束; PCPS 组 (100 mg/kg)。各组大鼠于同等条件下持续给药 3 周。

2.2 AM Φ 、PM Φ 细胞灌洗与培养: 方法及分装参考文献方法^[4]。但 AM Φ 、PM Φ 浓度为 2×10^6 /mL。

2.3 AM Φ 、PM Φ 吞噬中性红试验: 见参考文献方法^[4]。以 A 值表示 M Φ 摄取中性红的能力。

2.4 MTT 比色法测定细胞转化率: 方法见文献方法^[5]。在 96 孔细胞培养板上, 每组 M Φ 加 10 个复孔 (100 μ L/孔), 其中 8 孔每孔再加含 PHA 10 μ g/mL 的 RPMI-1640 培养液 100 μ L 为实验孔, 剩余的两孔加不含 PHA 的 RPMI-1640 培养液为对照孔。混匀后置 37 °C、5% CO₂, 孵育 68 h, 取出培养板, 吸取每孔上清液 100 μ L 于 EP 管, 然后加无菌的 MTT 10 μ L/孔 (MTT, 5 mg/mL, 用 0.01 mol/L、pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 PBS 配制), 混匀后继续培养 4 h, 培养结束时每孔加 10% SDS 100 μ L, 充分溶解静置 10 min 后置酶标仪分别在波长 570 nm 和 630 nm 下测定吸光度 (A) 值。以刺激指数 (stimulate index, SI) 判断细胞转化程度。

$$SI = (\text{实验组 } A_{570} - A_{630}) / (\text{对照组 } A_{570} - A_{630})$$

2.5 AM Φ 和 PM Φ 的破碎: 参考文献方法^[4]。制成

收稿日期: 2006-11-23

基金项目: 浙江省教育厅科研基金资助项目 (20020471); 温州市“551”人才基金资助项目

作者简介: 金丽琴 (1963—), 女, 浙江温州人, 教授, 硕士生导师, 从事生化免疫药理学研究。

Tel: (0577) 86689889 E-mail: liqinjin@126.com

* 通讯作者 吕建新 Tel/Fax: (0577) 86689805 E-mail: lijx@wzmc.net

破碎的 AMΦ 和 PMΦ 悬液,待测 ACP、LDH 活力。
2.6 ACP 活力测定:参照文献方法^[6],酶活力单位采用国际单位 (U)。MΦ 悬液 (含 2×10^9 /L) 或细胞培养上清液中 ACP 活力单位定义为:每升破碎的 MΦ 悬液或细胞培养上清液在 37 ℃、pH 5.0 条件下每分钟水解 1 μmol 对硝基苯酚磷酸酯为对硝基酚所需的酶量为 1 U。

2.7 LDH 活力测定:按试剂盒说明书操作。MΦ 悬液或细胞培养上清液中 LDH 活力单位规定为:每升破碎的 MΦ 悬液 (含 2×10^9 个细胞)或细胞培养上清液在 37 ℃、每分钟使 1 μmol 乳酸转化为丙酮酸所需的酶量为 1 U。

2.8 细胞电镜检查:大鼠股动脉放血处死,取脾脏组织,于 2.5% 戊二醛固定液中固定 (0~4 ℃),电镜检测脾脏巨噬细胞。

2.9 统计学处理:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 的方差分析 (One-Way ANOVA) 作总体差异显著性分析,各组间两两比较采用方差分析下的 LSD 法;两组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 PCPS 对免疫抑制大鼠 AMΦ 和 PMΦ 吞噬功能的影响:各组大鼠 AMΦ、PMΦ 的吞噬功能用摄取中性红的吸光度 (A) 值表示,见表 1。CTX 组大鼠 AMΦ、PMΦ 的 A 值均显著低于对照组 ($P < 0.01$);PCPS 组大鼠 AMΦ、PMΦ 的 A 值均显示高于对照组 ($P < 0.05, 0.01$);CTX+PCPS 组大鼠 AMΦ、PMΦ 的 A 值显著高于 CTX 组 ($P < 0.01$),与对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。提示 PCPS 具有增强正常及 CTX 所致免疫抑制大鼠 AMΦ 和 PMΦ 吞噬功能的作用。

表 1 PCPS 对正常及免疫抑制大鼠 AMΦ 和 PMΦ 吞噬功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of PCPS on phagocytosis of AMΦ and PMΦ in normal and immune-depressed rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	A (540 nm)	
		AMΦ	PMΦ
对照	—	0.233±0.008	0.168±0.007
CTX	20	0.164±0.016**	0.123±0.014**
CTX+PCPS	20+100	0.236±0.020△△	0.191±0.022△△
PCPS	100	0.269±0.033*	0.306±0.036**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与 CTX 组比较: △△ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

△△ $P < 0.01$ vs CTX group

3.2 PCPS 对免疫抑制大鼠细胞转化率的影响:以

SI 为指标,判断 AMΦ、PMΦ 转化程度,各组大鼠 AMΦ、PMΦ 的 SI 变化见表 2。CTX 组大鼠 AMΦ、PMΦ 的 SI 均显著小于对照组 ($P < 0.01$);PCPS 组大鼠 AMΦ、PMΦ 的 SI 值均显著大于对照组 ($P < 0.01$);CTX+PCPS 组大鼠 AMΦ、PMΦ 的 SI 值均显著高于 CTX 组 ($P < 0.01$),与对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。提示 PCPS 具有增强正常及 CTX 所致免疫抑制大鼠 AMΦ 和 PMΦ 的转化程度的作用。

表 2 各组大鼠 AMΦ 和 PMΦ 的 SI ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 SI of AMΦ and PMΦ of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	SI	
		AMΦ	PMΦ
对照	—	1.76±0.01	1.00±0.02
CTX	20	0.97±0.01**	0.32±0.09**
CTX+PCPS	20+100	1.49±0.36△△	0.98±0.02△△
PCPS	100	1.91±0.01**	1.18±0.11**

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 CTX 组比较: △△ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; △△ $P < 0.01$ vs CTX group

3.3 PCPS 对免疫抑制大鼠巨噬细胞胞内酶活力的影响:各组大鼠 AMΦ、PMΦ 中的 ACP、LDH 活力,见表 3。无论是 AMΦ 还是 PMΦ,CTX 组 ACP 和 LDH 活力均显著低于对照组 ($P < 0.01, 0.05, 0.01, 0.01$);PCPS 组 ACP 和 LDH 活力均显著高于对照组 ($P < 0.01, 0.01, 0.01, 0.05$);CTX+PCPS 组 ACP 和 LDH 活力均高于 CTX 组 ($P < 0.01, 0.05, 0.01, 0.01$);与对照组比较,CTX+PCPS 组 ACP 活力显著增高 ($P < 0.01$),LDH 活力没有显著改变 ($P > 0.05$)。提示 PCPS 具有增强正常及 CTX 所致免疫抑制大鼠 AMΦ、PMΦ 内的 ACP、LDH 活力的作用。

3.4 PCPS 对免疫抑制大鼠巨噬细胞培养液中酶活力的影响:各组大鼠的 AMΦ、PMΦ 在培养 68 h 后,细胞培养液上清液中 ACP、LDH 活力的变化见表 4。CTX 组大鼠 AMΦ、PMΦ 的细胞培养液中 ACP、LDH 的活力均显著低于对照组 ($P < 0.01$);PCPS 组 AMΦ、PMΦ 的细胞培养液中 ACP、LDH 的活力均显著高于对照组 ($P < 0.01$);CTX+PCPS 组大鼠 AMΦ、PMΦ 细胞培养液中 ACP、LDH 活力均显著高于 CTX 组 ($P < 0.01$);同时,与对照组比较,显著高于对照组 ($P < 0.01$) 或差异无显著性。提示 PCPS 具有增强正常及 CTX 所致免疫抑制大鼠 AMΦ、PMΦ 细胞培养上清液中的 ACP、LDH 活力的作用。

3.5 PCPS 对免疫抑制大鼠脾脏巨噬细胞形态结

表 3 各组大鼠 AMΦ 和 PMΦ 内 ACP、LDH 的活性 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 ACP and LDH activities in AMΦ and PMΦ of rats in every groups ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	AMΦ		PMΦ	
		ACP/U	LDH/U	ACP/U	LDH/U
对照	—	93.3 ± 1.90	4.4 ± 1.30	93.4 ± 2.26	12.2 ± 2.62
CTX	20	75.3 ± 1.42**	3.0 ± 1.20*	75.6 ± 1.47**	6.0 ± 1.65**
CTX+PCPS	20+100	113.9 ± 2.89**△△	4.3 ± 1.04△	106.4 ± 2.85**△△	10.0 ± 2.22△△
PCPS	100	150.7 ± 3.32**	6.6 ± 1.41**	123.8 ± 3.8**	16.8 ± 5.01*

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01; 与 CTX 组比较: △P<0.05 △△P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs control group; △P<0.05 △△P<0.01 vs CTX group

表 4 各组大鼠 AMΦ、PMΦ 培养液中 ACP、LDH 的活性 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 ACP and LDH activities in AMΦ and PMΦ cultural fluid of rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	AMΦ		PMΦ	
		ACP/U	LDH/U	ACP/U	LDH/U
对照	—	100.6 ± 3.29	230.0 ± 31.04	97.1 ± 2.02	242.5 ± 10.89
CTX	20	80.7 ± 1.44**	115.6 ± 30.69**	77.7 ± 1.77**	99.5 ± 11.17**
CTX+PCPS	20+100	118.1 ± 4.77**△△	239.1 ± 4.35△△	107.9 ± 2.28**△△	402.6 ± 27.33**△△
PCPS	100	154.4 ± 7.04**	632.5 ± 47.16**	125.4 ± 2.66**	450.1 ± 26.51**

与对照组比较: **P<0.01; 与 CTX 组比较: △△P<0.01

**P<0.01 vs control group; △△P<0.01 vs CTX group

构及功能的影响:电镜下对照组大鼠脾 MΦ 形态结构正常,胞质内溶酶体较少,免疫细胞内粗面型内质网丰富且扩张;CTX 组大鼠脾脏 MΦ 核膜局灶性扩张,且轻度水肿、胞质淡染,细胞处于静息状态;CTX+PCPS 组与 CTX 比较,大鼠脾淋巴细胞内线粒体轻度扩张、数量增多,淋巴细胞胞体增大、核膜完整,可见免疫母细胞增生;PCPS 组大鼠脾免疫细胞增生,免疫母细胞核大、核仁明显,胞质内多数游离核糖体,且数量增多,细胞大多呈激活状态。结果提示 PCPS 能保护免疫抑制状态大鼠脾脏 MΦ 形态结构及细胞器结构的完整性;对正常免疫功能的大鼠脾内免疫细胞具有激活作用。

4 讨论

MΦ 是一种具有多种功能的免疫细胞。正常情况下,MΦ 处于休眠状态。MΦ 的激活是 MΦ 实现其抑制肿瘤、胞内杀菌、胞外溶瘤、吞噬和胞饮等多种功能的基础。细胞转化试验是检测细胞免疫功能最基本的体外试验,细胞转化反应是机体内免疫系统的重要表现。其转化率的高低是反映机体的细胞免疫功能和免疫状态的重要指标之一。本实验显示 PCPS 使正常大鼠 AMΦ、PMΦ 吞噬功能和 SI 显著上升;表明 PCPS 能增强正常大鼠的吞噬与转化功能,激活 AMΦ、PMΦ,提高机体的免疫能力。PCPS 还使 CTX 所致免疫抑制大鼠 AMΦ、PMΦ 吞噬功能和 SI 的降低基本恢复正常水平,表明 PCPS 对 CTX 所致的免疫抑制具有拮抗作用。

ACP 是 MΦ 溶酶体的标志酶,也是 MΦ 激活

的标志酶。ACP 活性随着 MΦ 的激活而升高,又随着 MΦ 的抑制而降低^[7~9]。LDH 是细胞内葡萄糖酵解所必需的酶,LDH 活性增强可促进细胞内葡萄糖的酵解。MΦ 吞噬过程中所需的能量主要来自于糖酵解,同时酵解过程中产生的乳酸使 MΦ 内 pH 值下降,有利于 MΦ 的杀菌。故 LDH 活性与 MΦ 激活的程度相关,被认为是 MΦ 激活的标志之一^[10]。因此 MΦ 内的 ACP、LDH 上调被认为是 MΦ 激活的标志。本研究结果显示,PCPS 使正常大鼠 AMΦ、PMΦ 中的 ACP、LDH 活力显著升高,表明 PCPS 能激活 AMΦ、PMΦ 细胞,具有免疫增强作用。PCPS 还使 CTX 所致免疫抑制大鼠 AMΦ、PMΦ 中的 ACP、LDH 活力的降低显著上升,恢复到正常水平或超过正常水平,再次表明 PCPS 对 CTX 所致的免疫抑制具有拮抗作用。

PCPS 使正常及 CTX 所致免疫抑制大鼠 AMΦ、PMΦ 细胞培养上清液中的 ACP、LDH 活力显著升高,这结果与 AMΦ、PMΦ 胞内 ACP、LDH 活力的变化基本一致。这是由于 AMΦ、PMΦ 胞内升高的 ACP、LDH 向胞外渗透的缘故。

脾是人体最大的外周淋巴组织器官,是机体主要免疫器官。PCPS 使正常大鼠脾免疫细胞增生,表明 PCPS 对大鼠脾内免疫细胞具有激活作用。CTX 使大鼠脾脏 MΦ 核膜局灶性扩张,且轻度水肿、胞质淡染,细胞处于静息状态;而 PCPS 使 CTX 所致免疫抑制大鼠脾脏淋巴细胞内线粒体轻度扩张、数量增多,淋巴细胞胞体增大、核膜完整,免疫母细胞

增生,也表明 PCPS 对 CTX 所致的免疫抑制具有拮抗作用。

PCPS 可拮抗 CTX 所致的免疫抑制,使其免疫功能恢复正常或接近于正常。因此认为,PCPS 可作为一种新的生物反应调节剂,在肿瘤生物治疗中可与 CTX 之类的免疫抑制药物同时使用,以阻遏肿瘤患者在放疗、化疗中免疫功能的进一步下降。这有待于进一步深入研究。

由于多糖类化合物对机体的免疫作用具有双向调节性,且具有剂量效应。不同剂量 PCPS 激活大鼠巨噬细胞的作用有差异,以 100 mg/kg 剂量作用最为明显^[11],因此本实验用 100 mg/kg 剂量的 PCPS 处理大鼠。

实验提取制备的蝉拟青霉活性物质是总多糖,成分复杂,本实验初步研究阐明了总多糖对正常及 CTX 所致免疫抑制大鼠巨噬细胞的免疫调节作用。由于多糖对机体的免疫调节作用具有构效关系,因此对总多糖进一步进行分离、提取、纯化,以获得各种单一的多糖组分,深入研究多糖分子结构和生物活性的关系,从结构与活性两方面论证 PCPS 的药理作用,是本实验组继续研究的工作。

References:

- [1] Liu B. *The Epiphytes as Medicine in China* (中国药用真菌) [M]. Taiyuan: Shanxi People's Publishing House, 1974.

- [2] Xu J T. *The Epiphytes as Medicine in China* (中国药用真菌学) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Publishing House, 1997.
- [3] Jin L Q, Lü J X, Yang J Z, et al. Effects of paecilomyces cicadidae total polysaccharides on non-specificity immune regulation in rats [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2001, 17(12): 1232-1235.
- [4] Chen X F, Jin L Q, Lü J X, et al. The activative effect of *Paecilomyces cicadidae* on peritoneal and alveolar macrophages of rats [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2002, 18(6): 694-697.
- [5] Si C P. *Experiment of Medical Immunity* (医学免疫学实验) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1998.
- [6] Wang X W. *Laboratory Technology of Clinic Biochemistry* (临床生化检验技术) [M]. Nanjing: Nanjing University Press, 1995.
- [7] Lü J X, Jin L Q, Chen G R, et al. The activated effect of *Paecilomyces tenuipes* on peritoneal macrophage of rats [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 1997, 13(3): 139-141.
- [8] Schirmacher V, Bai L, Umansky V, et al. Newcastle disease virus activates macrophages for anti-tumor activity [J]. *Int J Oncol*, 2000, 16(2): 363-373.
- [9] Garcia I, Guler R, Vesin D, et al. Lethal *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin infection in nitric oxide synthase 2-deficient mice; cell-mediated immunity requires nitric oxide synthase 2 [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(9): 1385-1397.
- [10] Cohn Z A. The activation of mononuclear phagocytes: Fact, fancy, and future [J]. *J Immunol*, 1978, 121(3): 813-816.
- [11] Yang J Z, Jin L Q, Lü J X, et al. Immunomodulation of paecilomyces cicadidae polysaccharides on immune function of rats [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2005, 21(3): 588-591.

人工发酵虫草菌丝体干粉在糖尿病大鼠肾脏组织中的抗纤维化作用

王战建,王书畅*

(河北医科大学第三医院 内分泌科,河北 石家庄 050051)

在糖尿病肾病的进展中,转化生长因子- β (TGF- β) 作为关键性的细胞因子,介导糖尿病诱生的系膜区基质沉积^[1];其表达增多与肾小球硬化、肾动脉玻璃样变性、肾小管间质纤维化密切相关。人工发酵虫草菌丝体干粉[冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 的人工发酵制品,后文简称 CS]作为祖国传统中药冬虫夏草代用品,在临床治疗糖尿病肾病中应用较普遍,但其作用机制尚未阐明。本研究拟通过观察 CS 对糖尿病大鼠肾脏 TGF- β 表达的影响,来探讨其对糖尿病肾病的治疗机制。

1 材料

1.1 动物:雄性 SD 大鼠,8 周龄,共 60 只,体重 180~200 g,河北医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物、试剂与仪器:CS (商品名百令胶囊,主要成分为总氨基酸不少于 300 mg/g、甘露醇不少于 70 mg/g、腺苷不少于 0.80 mg/g,杭州中美华东有限公司提供。) TGF- β 抗体、DAB 显色剂、PV9001 均购自 Sigma 公司;尿白蛋白放免分析试剂盒(山东潍坊三维生物工程集团有限公司);链脲佐菌素 (STZ,美国 Sigma 公司);UV-2550 紫外分光光度

收稿日期:2006-11-03

基金项目:河北省中医药管理局科研立项项目 (05172)

作者简介:王战建,女,河北保定人,主任医师,教授,硕士,研究方向为糖尿病及其慢性并发症的研究。Tel: (0311) 87027951-3036

* 通讯作者 王书畅 E-mail: wang-sy2007@163.com