

人粒细胞吞噬功能与活性氧的关系研究

II. 活性氧清除剂对吞噬发光的影响

李 益 新

董 元 林

(军事医学科学院放射医学研究所) (解放军 304 医院)

粒细胞吞噬并杀灭外来细菌的吞噬作用,在代谢上表现为葡萄糖通过己糖单磷酸支路(HMP Shunt)的氧化代谢和非线粒体系统氧消耗剧增^[1]。近年来的深入研究表明,这种代谢上的变化是由于膜上结合的 NADPH: O_2 氧化还原酶系被激活的结果,酶使得分子氧单价还原,产生一系列活性氧物质,这些物质具有杀灭外来细菌的功能^[2]。所谓活性氧主要是指超氧化物阴离子自由基 O_2^- , 羟自由基 $\cdot OH$, 过氧化氢 H_2O_2 , 另外还有单线态氧 1O_2 。前文^[3]我们已经报道了人粒细胞在静止状态下不发光,一旦受到吞噬细菌或吞噬颗粒的刺激后,伴随着吞噬过程能向外发光。这种极其微弱的发光经 luminol 的放大作用后可用发光仪检测。由此看来,发光现象也与活性氧的作用有关。为了进一步阐明活性氧与吞噬功能的关系,探讨吞噬作用机理,我们考察了不同的活性氧清除剂对粒细胞吞噬发光的影响。

一、材料和方法

牛红细胞铜锌超氧化物歧化酶(简称 SOD)根据 McCord 和 Fridovich 方法从牛血中自制得冰冻干粉,比活力为 3,000 活力单位/毫克蛋白质^[4]。

牛肝过氧化氢酶为 Sigma 公司产品,比活力为 11,000 Sigma 单位/毫克蛋白质。

牛血清白蛋白(BSA)为中国科学院生物物理所生化制剂厂产品,电泳纯。

实验中 SOD、Catalase、BSA 都用 0.05 M pH 7.8 磷酸钾缓冲液配制所需浓度。甲酸

钠为国产试剂, C. P 级。苯甲酸钠为荷兰分装, A. R 级。上述试剂用双蒸水配制成不同浓度。

2,5-二甲基咪唑(DMF)为瑞士 Fluka 产品,实验中用甲醇配制成一定浓度贮存液。

人粒细胞悬液的制备、金黄色葡萄球菌及 Zymosan 颗粒的调理、发光剂 luminol 的配制过程详见前文^[3]。测定各种活性氧清除剂对粒细胞吞噬化学发光的影响时,先在试管中注入不同浓度的清除剂 100 μ l, 然后依次加入粒细胞悬液 0.5ml, 调理细菌(或 Zymosan) 0.2ml, luminol 溶液 0.9ml。发光测定过程同前文^[3]。

二、实验结果

1. 震荡对化学发光的影响

人粒细胞悬液在 37°C 下加入调理颗粒 Zymosan A 后产生发光,见图 1a。在测定过程中间隔取出样品管,经摇晃震荡后再测定,发现每次震荡后,发光出现陡然上升的趋势,如图 1b 所示;箭头处表示震荡位置。震荡可以使更多的空气(氧气)进入粒细胞悬液,从而使发光出现上升的转折,表明吞噬发光确实与氧的利用有关。在一定浓度的 PMN_i 和一定量 Zymosan 存在下,这种震荡引起的发光增强作用并不是无限制的,而是在增强至一定程度后逐渐趋于平缓。用调理的金黄色葡萄球菌作实验,也得到同样的结果(图略)。

2. SOD 对化学发光的影响

图 2 是不同浓度的 SOD 对粒细胞吞噬化学发光的影响,以 100 μ g/ml BSA 作为对照,

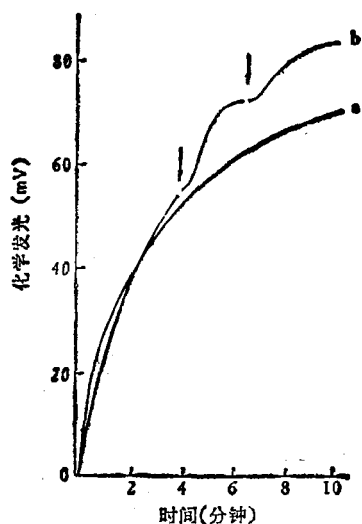


图1 震荡对粒细胞吞噬发光的影响

箭头处表示震荡位置。粒细胞浓度 $2 \times 10^6/\text{ml}$, luminol $1 \times 10^{-5}\text{M}$, Zymosan 为 $2.5\text{mg}/\text{ml}$, 37°C

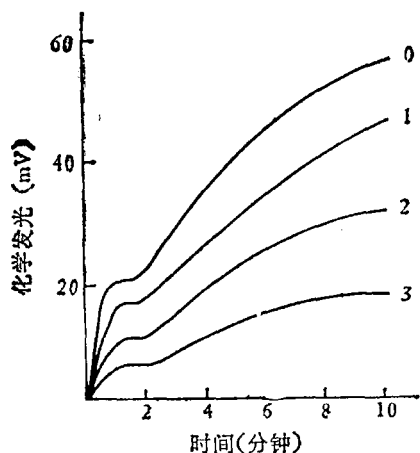


图2 SOD 对粒细胞吞噬发光的影响

0 为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA 对照, 1, 2, 3 分别表示 SOD 浓度为 10, 50, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 。粒细胞浓度 $1 \times 10^6/\text{ml}$, luminol $1 \times 10^{-5}\text{M}$, 用调制的金黄色葡萄球菌, 37°C

10 分钟未发光的 mV 数计算相对抑制程度, 对应于 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ SOD, 抑制程度分别为 20%、43% 和 68%。

3. 过氧化氢酶对化学发光的影响

不同浓度的过氧化氢酶对粒细胞吞噬化学发光的抑制作用见图 3 所示。同样以 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA 作为对照, 对应于 10、50、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 过氧化氢酶, 其抑制发光程度为 14、29 和 32%

4. 苯甲酸钠对化学发光的影响

对应于 5mM 、 10mM 和 30mM 的苯甲酸钠, 其抑制程度分别为 22%、47% 和 70%。另一种 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除剂甲酸钠对吞噬发光的抑制作用略低于苯甲酸钠(图略)。

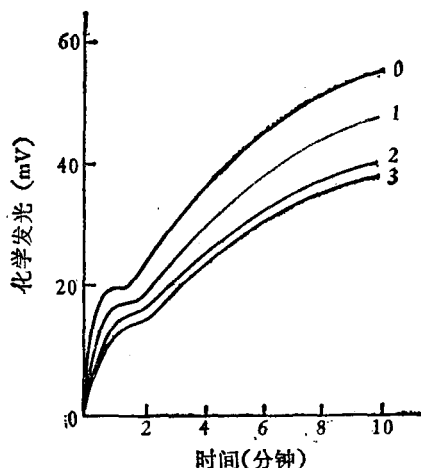


图3 过氧化氢酶对粒细胞吞噬发光的抑制作用

0 表示 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA, 1, 2, 3 表示过氧化氢酶浓度为 10, 50 和 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 。其余实验条件同图 2

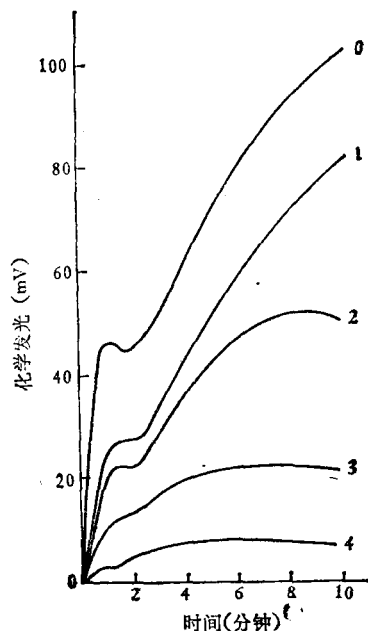


图4 苯甲酸钠对粒细胞吞噬发光的抑制作用

0, 1, 2, 3 分别表示苯甲酸钠浓度为 0, 5, 10, 30mM 。粒细胞 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 。其余条件同图 2

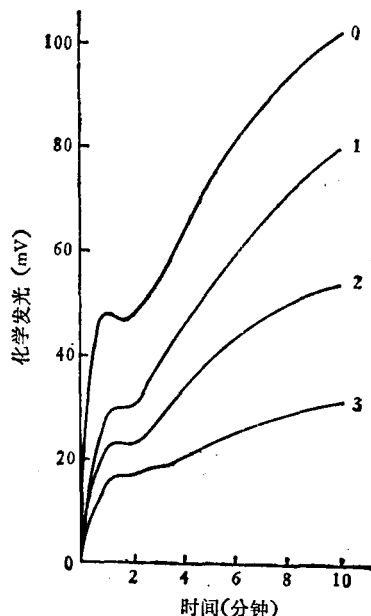


图5 DMF 对粒细胞吞噬发光的抑制作用
0): 未加任何清除剂; 1): 300mM 甲醇; 2): 2.5mM DMF + 150mM 甲醇; 3): 3.75 mM DMF + 225mM 甲醇; 4): 5mM DMF + 300mM 甲醇。 粒细胞浓度 $2 \times 10^6/\text{ml}$

表1 活性氧清除剂对粒细胞吞噬发光的影响

清除剂	抑制发光程度(%)
牛肝过氧化氢酶 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	32
铜锌超氧化物歧化酶 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	68
甲酸钠 (5mM)	20
苯甲酸钠 (5mM)	22
2, 5-二甲基咪唑 (5mM)	93

5. 二甲基咪唑 (DMF) 对化学发光的影响

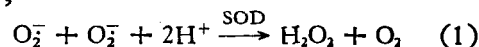
图5是 DMF 加甲醇对粒细胞吞噬发光的抑制作用,以单独加入甲醇 (300mM) 作为对照。从图中可以看出,DMF 对化学发光的抑制作用十分显著,对应于 2.5mM、3.75mM 和

5mM 的 DMF,其抑制程度分别为 38%、75% 和 93%。表1比较了几种活性氧清除剂对吞噬发光的抑制作用。

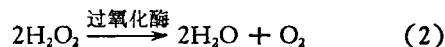
三、讨 论

对粒细胞吞噬功能的研究最初是由 Agner 从 PMN, 中提取髓过氧化物酶 (MPO) 开始的,后来研究表明杀灭细菌的作用可能与 H_2O_2 和次卤酸 (HOCl) 有关^[7]。Allen 等^[6]首先确认了吞噬与化学发光的关系,并提出这一现象是由电子激发态——单线态氧 $^1\text{O}_2$ 所介导的。至今,深入的研究表明吞噬作用是由于激发了膜上结合的 $\text{NADPH}:\text{O}_2$ 氧化还原酶系,从而使氧单价还原产生一系列活性氧物质所造成的。粒细胞吞噬时向外发光经 luminol 放大后,可用发光仪监测,但是 luminol 的加入并不干扰吞噬发光的机理,整个过程见图6。

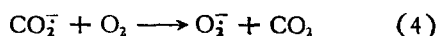
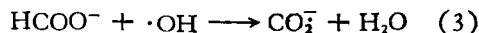
SOD 能够催化 O_2^- 发生歧化反应从而清除 O_2^- ,



过氧化氢酶催化 H_2O_2 的分解:



甲酸钠或苯甲酸钠可通过下列反应清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基^[7]:



2, 5-二甲基咪唑(DMF)是典型的单线态氧 $^1\text{O}_2$ 的猝灭剂^[8]。选择性应用上述活性氧清除剂,可以看出, SOD 与 Catalase 相比,抑制作用较强,说明在吞噬过程中有 O_2^- 产生。但 SOD

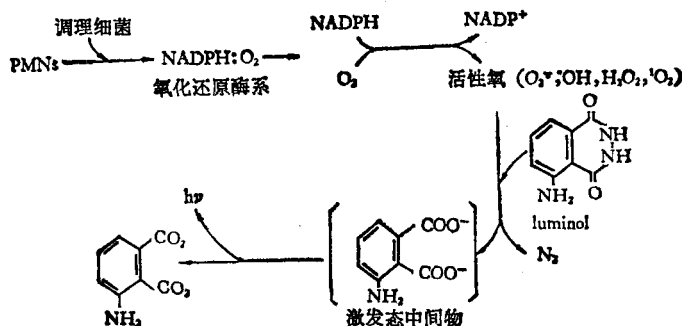


图 6

双丁酰 cAMP 对人胃腺癌细胞 (SGC-7901) 周期的影响

赵孟莲 牛敏英 方家椿

(北京市肿瘤防治研究所细胞生物室)

薛绍白 宋平根 汪堃仁

(北京师范大学生物系细胞生物室)

近年来有关外源性 cAMP 及其衍生物对于培养正常细胞与恶性细胞增殖的抑制,进行了大量的工作。cAMP 及其衍生物将正常细胞生长周期阻断在 G₁ 期,而对恶性细胞,有的是作用于 G₁ 期^[1-3],有的作用于 S 期^[4-6]、或 G₂ 期^[5,7,8]。因而可使用 cAMP 及其衍生物来探索培养人肿瘤细胞增殖失调的机理,对于深入探讨人肿瘤的发生、发展以及细胞增殖的抑制。从已有资料来看,双丁酰 cAMP 对人恶性肿瘤

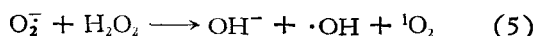
上皮细胞影响的研究报道不多。我们在过去工作^[9]的基础上,采用流式细胞光度术 (FCM) 测定技术以及其它有关参数相结合的方法,探索双丁酰 cAMP 对人体胃腺癌细胞周期进程的影响进行了比较研究。

材料及方法

一、材料及试剂

人体胃腺癌细胞 (SGC-7901) 的单层培养

催化 O₂⁻ 发生歧化反应速度很快,在产生 O₂⁻ 的系统——黄嘌呤氧化酶 (XO)、黄嘌呤 (X) 或次黄嘌呤 (HX) 系统中,10ng/ml SOD 抑制程度可达 90% 以上^[4],而这里所用的 SOD 浓度比 XO-HX 系统中所用的要高 10⁴ 倍,这说明就单独 O₂⁻ 而言,并不能说明吞噬发光作用。同等浓度的甲酸钠或苯甲酸钠与 DMF 相比,DMF 的抑制作用十分显著,这说明在粒细胞吞噬发光中,单线态氧 ¹O₂ 的作用是主要的。单线态氧是分子氧(基态)中两个未偶电子的自旋方向颠倒后产生的激发态产物,反应活性很高。已有实验证明,¹O₂ 可以由 O₂⁻ 的自发歧化产生,也可以由 O₂⁻ 和 H₂O₂ 反应生成:



反应(5)称为 Haber-Weiss 反应。反应中还生成了活性很高的 $\cdot\text{OH}$ 自由基,这可以解释甲酸钠或苯甲酸钠以及单独甲醇所具有的抑制作用。但是单独的 O₂⁻ 或 H₂O₂ 似乎对吞噬发光作用都不重要。¹O₂ 除了上述的产生途径外,

是否还有别的途径,DMF 本身对粒细胞吞噬作用是否有影响等问题尚待深入研究。

本文承吴蔚教授审阅,特此致谢。

参考文献

- [1] Allen, R. C.: *Photochem. Photobiol.*, **30**, 157, 1979.
- [2] Gabig, T. G. et al.: *Superoxide Dismutase*, Vol. II, 1—3, 1979, Ed. L. W. Oberley, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- [3] 李益新等:《上海免疫学杂志》5(1): 25, 1985.
- [4] 李益新等:《生物化学与生物物理进展》, **2**, 59, 1983.
- [5] Trush, M. A. et al.: *Methods in Enzymology*, Vol LVII, 462—494, 1978, Ed. M. A. Deluca, Academic Press, New York.
- [6] Allen, R. C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 679—684, 1972.
- [7] 李益新等:《生物化学与生物物理进展》, **3**, 38—41, 1983.
- [8] Bodaness, R. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 8554—8560, 1977.

[本文于 1984 年 8 月 18 日收到]