

活性氧清除剂和钙离子通道阻断剂对人淋巴细胞化学发光的效应

张学军 刘 璿 司传平

(安徽医科大学微生物学教研室,合肥 230032)

提 要

本文报道了活性氧 (ROS) 清除剂——苯甲酸钠、维生素 C、甘露醇、L-组氨酸、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶对 Con A 诱导的人外周血淋巴细胞化学发光 (Ly-CL) 均有抑制效应,提示人 Ly-CL 与 ROS 的生成有关,参与人 Ly-CL 的 ROS 类型有 $\cdot\text{OH}$ 、 $^1\text{O}_2$ 、 H_2O_2 和 O_2^- 。钙通道阻断剂——Verapamil 对人 Ly-CL 也有抑制效应,表明人 Ly-CL 依赖于人淋巴细胞内钙离子浓度的增加。

关键词 淋巴细胞,化学发光,活性氧清除剂,钙离子通道阻断剂

小鼠胸腺细胞、脾淋巴细胞受抗原或有丝分裂原刺激后,能产生化学发光 (CL) 反应^[1,2]。我们实验证实,人外周血淋巴细胞受 Con A 或 PHA 刺激后,也产生短暂的、Luminol 依赖的 CL 反应^[3]。

淋巴细胞化学发光 (Ly-CL) 的产生机理尚不清楚。Mookerjee 等^[4]发现,某些活性氧 (ROS) 清除剂可以抑制小鼠胸腺细胞 CL,提示 CL 与小鼠胸腺细胞受刺激后 ROS 的增加有关。最近研究报道指出,单核细胞受刺激后的 ROS 产生依赖于细胞内钙离子的增加^[5]。人 Ly-CL 是否与 ROS 产生,并依赖于细胞内钙离子浓度变化有关尚不了解。为此,我们观察 ROS 清除剂和钙离子通道阻断剂对 Con A 诱导的人 Ly-CL 的效应,试图探讨人 Ly-CL 产生机制。

材 料 与 方 法

1. ROS 清除剂 苯甲酸钠 (武汉有机合成化工厂)。维生素 C (上海东风试剂厂)。甘露醇 (上海试剂二厂)。L-组氨酸 (上海生化所)。超氧化物歧化酶 (SOD, 牛红细胞中提取,上

海生化所,批号 8607230, 100000U/mg)。过氧化氢酶 (CAT, 牛肝中提取, Sigma 公司产品,批号 37F-7035, 14100U/mg)。上述试剂均用双蒸水配成所需浓度, CAT 在临用前置 37℃ 水浴孵育 15min 后使用。

2. 钙离子通道阻断剂 Verapamil (芬兰产品), 双蒸水配成所需浓度。

3. 有丝分裂原 Con A (Sigma 公司产品), 用无钙镁 Hanks 液配成 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

4. luminol 溶液配制 0.01mol/L pH8.4 PBS 10ml, 加三乙胺 (上海试剂二厂) 0.08ml, luminol (Sigma 公司产品) 20mg, 混匀, 4℃ 保存。临用前用含 2% 小牛血清的 Hanks 液作 1:10 稀释, 即为 luminol 工作液。

5. 淋巴细胞分离 取肝素抗凝血, 按常规方法分离淋巴细胞^[6], 用含 2% 小牛血清的 Hanks 液配成 $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞悬液。台盼蓝检查, 存活率 $\geq 98\%$, May-Grünwald-Giemsa 染色检查纯度, 淋巴细胞 $\geq 94\%$ 。

6. CL 测定 用 FT-632 型生物-化学光度计 (北京核仪器厂) 测定 CL 反应。37℃ 循环水使样品室温度为 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。取淋巴细胞

悬液 1ml, 加 luminol 0.2ml, 37℃ 水浴孵育 10min, 测淋巴细胞自发性 CL 1min。加不同浓度 ROS 清除剂或 Verapamil 0.1ml, 对照加双蒸水 0.1ml, 连续测定 CL 强度 5min。立即加入 500 μ g/ml Con A 0.2ml, 再连续测定 5—7 min。测定结果由生物-化学光度计 10s 积分自动记录。

7. 结果处理 CL 强度以 mV 表示。以淋巴细胞自发性 CL 为本底, 加 Con A 后出现的 CL 最高值为峰值。实验结果以峰值减去本底后的纯峰值表示。每份标本检测均做复管, 统计数据取自 3 份以上标本的实验结果。ROS 清除剂或 Verapamil 影响人 Ly-CL 程度以抑制率表示。

Ly-CL 抑制率(%)

$$= \left[1 - \frac{\text{实验组纯峰值均数}}{\text{对照组纯峰值均数}} \right] \times 100\%$$

结 果

1. ROS 清除剂对人 Ly-CL 的效应 苯甲酸钠、维生素 C、甘露醇、L-组氨酸、CAT

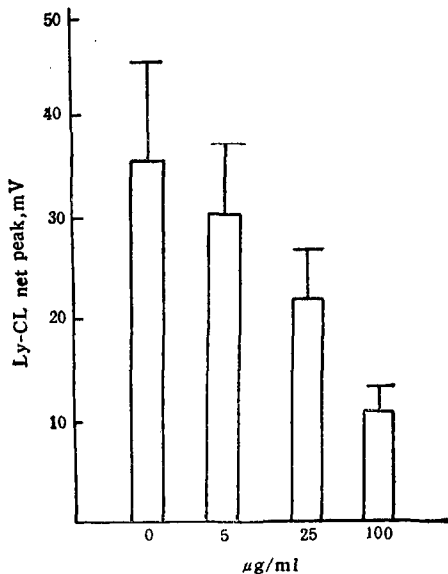


图 1 钙离子通道阻断剂 (Verapamil) 对人 Ly-CL 的效应

Fig. 1 Effect of Ca²⁺-channel blocker (Verapamil) on chemiluminescence of human peripheral blood lymphocytes

表 1 活性氧清除剂对人 Ly-CL 的效应

Table 1 Effect of scavengers of reactive oxygen species on chemiluminescence of human peripheral blood lymphocytes

Reagents	Conc.	Ly-CL net peak (mV)	Inhibition rate (%)
Vitamin C	0 (μ g/ml)	41.4 $\pm$ 9.6	
	12 (μ g/ml)	38.5 $\pm$ 11.3	7
	60 (μ g/ml)	20.7 $\pm$ 8.6	47
	300 (μ g/ml)	12.4 $\pm$ 5.5	70
Sodium benzoate	0 (mmol/ml)	89.7 $\pm$ 14.6	
	1 (mmol/ml)	60.5 $\pm$ 12.5	33
	10 (mmol/ml)	34.3 $\pm$ 11.8	62
	100 (mmol/ml)	19.4 $\pm$ 9.2	78
Mannitol	0 (mmol/ml)	90.4 $\pm$ 23.3	
	1 (mmol/ml)	50.3 $\pm$ 14.5	45
	10 (mmol/ml)	29.5 $\pm$ 12.9	67
	100 (mmol/ml)	17.6 $\pm$ 9.1	81
L-Histidine	0 (mmol/ml)	90.4 $\pm$ 23.3	
	1 (mmol/ml)	58.4 $\pm$ 16.6	36
	10 (mmol/ml)	37.3 $\pm$ 11.5	59
	100 (mmol/ml)	28.5 $\pm$ 10.2	69
SOD	0 (μ g/ml)	50.7 $\pm$ 14.4	
	0.6 (μ g/ml)	40.0 $\pm$ 19.4	21
	6 (μ g/ml)	30.3 $\pm$ 10.8	40
	60 (μ g/ml)	23.7 $\pm$ 9.5	53
Catalase	0 (μ g/ml)	88.7 $\pm$ 29.5	
	6 (μ g/ml)	81.2 $\pm$ 23.8	8.5
	30 (μ g/ml)	74.4 $\pm$ 21.6	16
	150 (μ g/ml)	53.8 $\pm$ 17.5	40

和 SOD 作用于人 Ly-CL 测定系统, 结果表明, 随加入这些 ROS 清除剂剂量的增加, Ly-CL 逐渐被抑制, ROS 清除剂的剂量与 Ly-CL 抑制率之间基本呈平行关系(表 1)。

2. 钙离子通道阻断剂对人 Ly-CL 的效应

将不同浓度的 Verapamil 加入人 Ly-CL 测定系统, 结果见图 1, 随钙离子通道阻断剂——Verapamil 浓度的增加, Ly-CL 强度逐渐减弱, 表现为抑制效应。

讨 论

已观察到动物和人淋巴细胞受抗原或有丝分裂原刺激后产生 CL 现象, 然而, 对 Ly-CL 的机理了解不多。Wong 等^[7]推测, 刺激物与

淋巴细胞受体结合,导致 NADPH 氧化酶活化,葡萄糖消耗增加,己糖单磷酸支路活性增强,驱动产生 ROS,如 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 和 1O_2 等。

动物实验证明了 ROS 清除剂对 Ly-CL 有抑制作用,提示 Ly-CL 与 ROS 的产生有关。但由于实验动物不同,某些 ROS 清除剂,如 CAT 和 SOD,对 Ly-CL 效应也不一样。Wrogemann 等^[1]最早发现,CAT 能抑制 65% 的小鼠胸腺细胞 CL,而 Ekejiindu 等^[8]则观察到 CAT 增强狗外周血 Ly-CL 强度,SOD 不能抑制 Ly-CL。因此,目前对与 Ly-CL 有关的 ROS 具体类型尚无定论。

我们的实验结果表明,苯甲酸钠、维生素 C、甘露醇、L-组氨酸、CAT 和 SOD 等 ROS 清除剂作用于人 Ly-CL 测定系统后,均有抑制人 Ly-CL 作用,其抑制率与剂量的增加相平行。因此表明,人 Ly-CL 也与 ROS 的产生有关。由于甘露醇、L-组氨酸、CAT 和 SOD 常被分别用于清除 $\cdot OH$ 、 1O_2 、 H_2O_2 和 O_2^- ^[9,10],它们抑制人 Ly-CL 的结果提示,人 Ly-CL 的出现可能与淋巴细胞受 Con A 刺激后急骤产生 $\cdot OH$ 、 1O_2 、 H_2O_2 和 O_2^- 等 ROS 有关。

已经证明,吞噬细胞的激活和 ROS 的产生依赖于细胞内钙离子浓度的增加^[5,11]。淋巴细胞早期激活也与淋巴细胞受抗原或有丝分裂原刺激后的细胞内钙离子浓度增加有关^[12]。我们最近实验也发现,人 Ly-CL 测定系统中,缺乏钙离子将使 Ly-CL 明显下降^[3]。这就提示,人 Ly-CL 除了与 ROS 的产生有密切关系外,可能也依赖于淋巴细胞受刺激后细胞内钙离子浓度的增加。

我们将不同浓度的钙离子通道阻断剂——Verapamil 加入人 Ly-CL 测定系统,结果证明人 Ly-CL 不同程度地受到抑制,Verapamil 浓

度越高,人 Ly-CL 抑制越明显。由此表明,人 Ly-CL 依赖于淋巴细胞受刺激后细胞内钙离子的增加,其机制可能是 Verapamil 阻止了淋巴细胞受 Con A 刺激后细胞外钙离子进入细胞内,使细胞内钙离子浓度不能迅速增高,导致 ROS 产生不足,表现为人 Ly-CL 强度降低。

Nel 等^[13]证明,钙离子通道阻断剂通过阻止淋巴细胞内钙离子浓度增加而抑制淋巴细胞激活以及增殖反应。我们的实验结果又表明钙离子通道阻断剂抑制 Con A 诱导的人 Ly-CL,由此提示,人 Ly-CL 与淋巴细胞早期激活之间存在一定联系。因此,我们支持 Ly-CL 是淋巴细胞早期激活的一种现象的观点,并且提出,人 Ly-CL 的本质可能与淋巴细胞受抗原或有丝分裂原刺激后急骤产生 ROS 有关。

参 考 文 献

- 1 Wrogemann K, Weidemann M J, Peskar B A et al. *Eur J Immunol*, 1978; 8: 749
- 2 Peterhans E. *Eur J Immunol*, 1980; 10: 477
- 3 张学军,刘 璇. 中华微生物学和免疫学杂志,1990; 10(3): 195
- 4 Mookerjee B K, Ferber E, Ernst M et al. *Immunol Commun*, 1980; 9: 553
- 5 胡士星. 国外医学免疫学分册,1988;11: 173
- 6 陶义训,章谷生,孙萌审编. 临床免疫学检验,上册,上海;上海科学技术出版社,1983;16—19
- 7 Wong L S, Kiel J L. *Immunol Invest*, 1985; 14: 503
- 8 Ekejiindu G O C, Shifrine M, Misra H P. *Vet Immunol Immunopathol*, 1986; 11: 175
- 9 莫简主编. 医用目由基生物学导论,北京: 人民卫生出版社,1989;13—25
- 10 Bishop C J, Rzepczyk C M, Stenzel D et al. *J Cell Sci*, 1987; 87: 473
- 11 Scully S P, Segel G B, Lichtman M A. *J Clin Invest*, 1986; 77: 1349
- 12 夏邦顺. 国外医学免疫学分册,1988;11: 190
- 13 Nel A E, Dirienzo W, Stefanini G F et al. *Scand J Immunol*, 1986; 24: 283

[本文于 1989 年 9 月 22 日收到]

EFFECT OF SCAVENGERS OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND Ca^{2+} -CHANNEL BLOCKER ON THE HUMAN LYMPHOCYTE CHEMILUMINESCENCE

Zhang Xuejun, Liu Lian, Si Chanping

(Department of Microbiology, Anhui Medical University, Hufei 230032)

ABSTRACT

It was reported that Con A-induced, Luminol-dependent chemiluminescence response of human peripheral lymphocytes might be inhibited by scavengers of reactive oxygen species (ROS), ie, vitamin C, sodium benzoate, mannitol, L-histidine, superoxide dismutase (SOD) and catalase. It was suggested that human lymphocyte chemiluminescence (Ly-CL) is related to the generation of ROS after lymphocytes were stimulated with Con A. ROS participating in human Ly-CL contained $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , O_2^- and so on. The higher the concentration of Ca^{2+} -channel blocker—Verapamil presented, the lower the intensity of human Ly-CL observed. Probably, human Ly-CL depended on increased intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ of lymphocyte stimulated with antigens or mitogens. These findings propose that human Ly-CL may be an early events of lymphocyte activation.

Key word lymphocyte chemiluminescence, reactive oxygen species scavenger, Ca^{2+} -channel blocker

(Continued from page 452)

SCREENING OF RAT GENOMIC LIBRARY WITH MINI-PLASMID

Xu Youhai

(Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai 200031)

ABSTRACT

Two androgen related cDNA fragments were re-cloned into mini-plasmid AN7 (885bp) and then integrated into phage chromosome of lambda Charon 4A-rat liver genomic library by reciprocal recombination. The selected lambda DNA clones with the homologous sequence to the cDNAs were identified by genetic test and dot hybridization.

Key words rat genomic library, mini-plasmid π AN7, DNA molecular cloning