

Cell Biol, 1982, **93** (6): 981~ 986

3 Zeng Fanjie, Yang Zixuan, Liu Huiping *et al.* The studies of phycoerythrin in *porphyraezoensis* I, The physical and immunochemical properties of R-phycoerythrin. Scientia Sinica (series B), 1986, **29** (8): 824~ 831

4 蒋丽金, 马金石, 何慧珠等. R-藻红蛋白的某些特征研究. 海洋与湖沼, 1983, **14** (4): 315~ 323

5 Xia A D, Zhu J C, Jiang L J. Energy transfer kinetics in C-phycoerythrin from cyanobacterium *Westiellopsis prolifica* by pump-probe techniques. Biochem Biophys Res Commun, 1991, **179** (1): 558~ 564

6 Glazer A N, Stryer L. Fluorescent tandem phycobiliprotein conjugates. Emission wavelength Shifting by energy transfer. Biophys J, 1983, **43** (9): 383~ 386

7 喻玲华, 曾繁杰, 蒋丽金等. 海洋多管藻的 R-藻红蛋白的亚基组成和发色团含量. 生物化学与生物物理学报, 1990, **22** (3): 221~ 227

8 MacColl R, Guard-Friar D. Phycobiliproteins. Boca Raton, Florida: CRC press, 1987. 64~ 67

9 Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York: Plenum Press, 1983. 305~ 337

10 何新安, 蒋丽金. 光动力复合藻胆蛋白及其分子内能量传递现象. 生物物理学报, 1995, **11** (3): 439~ 445

11 Canaani O, Lipschultz C A, Gantt E. Reassembly of phycobilisomes from allophycocyanin and a phycocyanin-phycoerythrin complex. FEBS Letters, 1980, **115** (2): 225~ 229

12 MacColl R, Guard-Friar D. Phycobiliproteins. Boca Raton, Florida: CRC press, 1987. 23~ 24

13 Turro N J 著, 姚绍明等译. 现代分子光化学. 北京: 科学出版社, 1987. 340~ 345

The Synthesis of Phycobiliprotein Conjugates

and Their Intramolecular Energy Transfer Phenomena. ZHAO Jiquan, ZHAO Jingquan, YANG Zixuan, ZHANG Jianping, JIANG Lijin (*Institute of Photographic Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract Two conjugates of R-phycoerythrin (R-PE) and C-phycoerythrin (C-PC) were synthesized through a coupling agent, N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionate and the alternation of the ratio of R-PE to C-PC. Their ratio of R-PE to C-PC were determined by absorption spectra. One is 6: 1, the other is 2: 1. The phenomena of intramolecular energy transfer were characterized. The calculated results showed that the efficiency of energy transfer from R-PE to C-PC was 63% and 88% respectively. The efficiency of energy transfer is better. When the disulfide bridge between R-PE and C-PC was reduced by DTT, the energy transfer was stopped. The phenomena further verified the intramolecular energy transfer from R-PE to C-PC.

Key words phycobiliproteins, R-phycoerythrin, C-phycoerythrin, intramolecular energy transfer, protein conjugate

硝基精氨酸抑制巨噬细胞内一氧化氮合成的研究

牛宇欣 储 毅 杨典洱¹⁾ 李慧珠²⁾
(首都医科大学细胞遗传教研室, 北京 100054)

摘要 运用体外分离培养方法, 研究硝基精氨酸 (N^ω-nitro-L-arginine, L-NNA) 抑制巨噬细胞内诱生性一氧化氮合成. 发现 L-NNA 能抑制一氧化氮的合成, 而且在一定的范围内, 其抑制作用随 L-NNA 作用剂量的增大而增强; 在培养体系中加入 L-精氨酸能够逆转这种抑制作用. 说明 L-NNA 可能通过竞争性地与诱生型一氧化氮合成酶 (iNOS) 活性位点结合, 抑制巨噬细胞内的一氧化氮合成.

¹⁾首都医科大学生物化学教研室. ²⁾首都医科大学寄生虫学教研室.
收稿日期: 1996-07-22, 修回日期: 1996-11-28

关键词 巨噬细胞, 一氧化氮, γ 干扰素, 硝基精氨酸

细胞因子及细胞因子介导的细胞免疫在机体的获得性免疫中起重要作用. 在细胞免疫反应中, 细胞因子激活的巨噬细胞能够通过 L-精氨酸途径合成细胞毒性的一氧化氮 (nitric oxide, NO), 杀伤多种病原菌及肿瘤细胞^[1,2], 因此而产生的大量一氧化氮同时也能杀伤邻近的正常组织细胞, 从而造成免疫病理损伤^[3], 所以研究对巨噬细胞内的一氧化氮合成的抑制作用有重要意义.

1 材料和方法

1.1 实验动物

BALB/c 小鼠, 雌性, 7~8 周龄, 体重 (20±2) g, 本校实验动物部提供.

1.2 小鼠腹腔渗出液巨噬细胞的制备

实验小鼠, 腹腔内注射 2 ml 2% 的淀粉溶液, 3 d 后缺氧致死, 收集腹腔渗出液, 离心. 细胞用 Hank's 液洗涤两次, 用含 10% 小牛血清的 IMDM 培养液调整细胞浓度为 2×10^7 /ml, 加入 96 孔细胞培养板, 每孔加细胞悬液 100 μ l, 37℃ 5% CO₂ 条件下孵育 30 min, 再加入等量的不同浓度的细胞因子, 相同条件培养 48 h, 取培养上清 50 μ l, -20℃ 保存, 待测 NO₂⁻.

1.3 巨噬细胞产生一氧化氮量的测定

NO 的测定以测定细胞培养上清中的 NO₂⁻ 的量代替, 参照 Ding^[4] 的方法, 用 Gress 反应测定 NO₂⁻ 的量. 取 50 μ l 培养上清, 加入等量的 Gress 反应液 (1% 对氨基苯磺酰胺, 0.1% 盐酸萘二乙胺, 2.5% 磷酸), 暗处静置 10 min, 550 nm 波长测吸光值 (A), NO₂⁻ 的量从 NaNO₂ 所测标准曲线上求得.

1.4 数据处理与统计学检验

实验数值以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据统计采用 SYSTAT 软件包进行两个样本均数的 *t* 检验, 用 $P < 0.01$ 作为显著性差异的标准.

2 实验结果

2.1 IFN- γ 诱导巨噬细胞合成一氧化氮

γ 干扰素 (IFN- γ) 体外条件下诱导小鼠巨噬细胞产生 NO, 且随着 IFN- γ 剂量的增大, 巨噬细胞产生的 NO 越大 (表 1).

表 1 IFN- γ 体外诱导巨噬细胞合成 NO

$c(\text{IFN-}\gamma) / \text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$	$c(\text{NO}_2^-) / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
—	0.66 ± 0.3
10	4.70 ± 1.8
100	12.80 ± 2.7
500	23.30 ± 6.5

2.2 L-NNA 对一氧化氮合成的抑制作用

L-NNA 能够抑制 IFN- γ 对巨噬细胞 NO 的诱导合成. 在一定范围 (10~500 μ mol/L) 内其抑制作用与 L-NNA 的剂量呈依赖关系 (图 1).

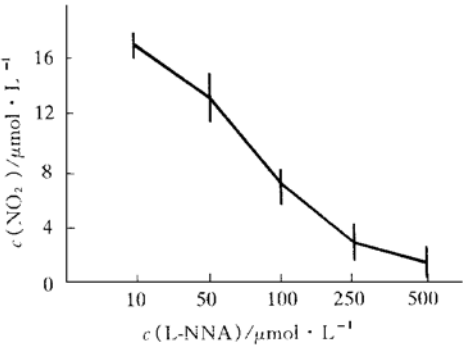


图 1 L-NNA 抑制巨噬细胞合成 NO 作用曲线
IFN- γ 量为 500 U/ml.

2.3 L-精氨酸逆转 L-NNA 的抑制作用

在含 500 μ mol/L L-NNA 的巨噬细胞/IFN- γ 共育体系中加入 10 mmol/L 的 L-精氨酸后, 培养上清中的 NO₂⁻ 显著升高 ($P < 0.01$) (表 2), 表明 L-精氨酸可逆转 L-NNA 对 NO 合成的抑制作用.

表 2 L-NNA 和 L-精氨酸对巨噬细胞 NO 合成的影响

加入试剂	$c(\text{NO}_2^-) / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$P^{1)}$
IFN- γ	11.20 $\pm$ 1.9	< 0.01
IFN- γ + L-NNA	1.10 $\pm$ 0.5	> 0.5
IFN- γ + L-NNA+ L-精氨酸	9.40 $\pm$ 2.7	< 0.01
对照	0.93 $\pm$ 0.6	

注: IFN- γ : 100 U/ml, L-NNA: 500 $\mu\text{mol/L}$, L-精氨酸: 10 mmol/L. ¹⁾与对照比较.

3 讨 论

巨噬细胞内的一氧化氮的合成, 可被多种因素诱导. 多种细胞因子, 如 IFN- γ 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 细菌性免疫刺激因子, 如内毒素脂多糖 (LPS) 等, 均能诱导巨噬细胞合成一氧化氮. 在抗感染免疫反应中, T 淋巴细胞被激活, 其中的 CD4⁺ 分化的 TH1 型淋巴细胞产生 IFN- γ , 进一步激活巨噬细胞, 合成并释放 TNF- α , 这种内源性的 TNF- α 可作为第二信号激活巨噬细胞, 合成一氧化氮. 一氧化氮的合成, 是由诱生型一氧化氮合成酶 (iNOS) 酶促 L-精氨酸氧化合成的. 在正常情况下, iNOS 的基因不表达, 而在 LPS 与某些细胞因子如 TNF、IFN- γ 、IL-1、IL-2 等刺激下, 即可转录与翻译, 产生此类诱生型酶. 一旦诱生型酶开始表达, 就能酶促形成大量的 NO^[5]. 连续不断酶促合成的大量 NO, 可以抑制或杀伤入侵的病原微生物. 但同时合成一氧化氮的细胞及邻近的正常细胞也具有杀伤作用, 造成免疫性病理损伤^[3].

L-精氨酸是 NOS 的酶促底物, NOS 酶促 L-精氨酸氧化反应生成 NO 的过程可被 L-精氨酸的拮抗剂所抑制. N^ω-nitro-L-arginine (L-NNA) 是 L-精氨酸的拮抗剂, 与 L-精氨酸结构相似, 容易与 iNOS 的活性位点结合, 可以竞争性地抑制 L-精氨酸与 iNOS 活性位点的结合, 从而抑制 L-精氨酸氧化途径合成一氧化氮. 实验结果表明, 在 IFN- γ /M ϕ 共育体系中加入 L-NNA 后, 巨噬细胞合成的一氧化氮显著降低, 而且一氧化氮合成的降低与 L-NNA

呈剂量依赖关系, 但加入过量的 L-精氨酸又可逆转这种抑制作用, 说明 L-NNA 对一氧化氮的合成抑制是一种竞争抑制.

参 考 文 献

1 Nathan C F, Hibbs J B Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage's antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol*, 1991, **3**: 65~ 70

2 Liew F Y, Cox F E G. Nonspecific defense mechism: the role of nitric oxide. In: Ash C eds. *Immunoparasitol today*, Elsevier trends journals. UK: Elsevier Science Publishers Ltd, 1991. A17~ A21

3 Aggard E. Nitric oxide: mediator, murder and medicine. *Lancet*, 1994, **343**: 1199~ 1206

4 Ding A H, Nathan C F, Stuehr D J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol*, 1988, **141** (7): 2407~ 2413

5 Lorsbach R B, Russell S W. A specific sequenceof stimulations is required to the induce synthesis of the antimicrobial molecule nitric oxide by mouse macrophages. *Inf Immun*, 1992, **60**: 2133~ 2135

N^ω-nitro-L-arginine Inhibits Synthesis of NO in IFN- γ -activated Macrophages. NIU Yuxin, CHU Yi, YANG Dianer¹⁾, LI Huizhu²⁾ (*Department of Cytobiology and Genetics*, ¹⁾*Department of Biochemistry*, ²⁾*Department of Parasitology, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China*).

Abstract By culturing mouse macrophages *in vitro*, The inhibitory effect of L-NNA on the synthesis nitric oxide (NO) was investigated, which was induced by IFN- γ in macrophages. It was found that L-NNA could inhibit the synthesis of NO, the inhibition was related to L-NNA dose, and L-arginine could reverse the inhibition. The result suggest that L-NNA likely competitively combined with the activate site of inducible nitric oxide synthase (iNOS), that inhibited the synthesis of NO from L-arginine pathway in macrophage.

Key words macrophage, nitric oxide, L-NNA, IFN- γ