

gene product BglS in *E. coli* is affected by various hosts, different vectors and orientation of the gene fragment.

By protein localization analysis and zymogram analysis of active enzyme molecules, we have found that the enzyme has two active molecules (32 kD and 27 kD) in *E. coli* and the amount of the enzyme in the periplasmic space is very small. The presence of different active products and the specificity of secretion pattern in *E. coli* may be due to the difference between *E. coli* and *B. subtilis* in the protein processing and translocation.

Key words β -1,3-1,4-glucanase, foreign protein, translocation, processing

活性氧对巨噬细胞呼吸爆发影响及云芝多糖的保护作用*

李 军 周 玫 陈 媛

(第一军医大学脂质过氧化损伤研究组, 广州 510515)

提 要

用化学发光法观察到叔丁基氢过氧化物对培养的小鼠腹腔巨噬细胞呼吸爆发有强烈的抑制作用。云芝多糖经腹腔注射后,能增强巨噬细胞呼吸爆发功能对叔丁基氢过氧化物损伤的抵抗力。云芝多糖处理的巨噬细胞谷胱甘肽过氧化物酶基础活力显著提高,在叔丁基氢过氧化物作用下,云芝多糖处理的巨噬细胞仍有较高的谷胱甘肽过氧化物酶活力。说明巨噬细胞的免疫功能与谷胱甘肽过氧化物酶活力有关,非特异性免疫多糖可提高细胞抗氧化能力,减轻活性氧损伤作用。

关键词 呼吸爆发,叔丁基氢过氧化物,谷胱甘肽过氧化物酶

免疫刺激剂云芝多糖 (polysaccharide, PSK) 是从云芝菌丝体 (*Coriolus versicolor*) 里提取的一种蛋白多糖。能提高巨噬细胞的免疫功能及恢复带瘤宿主的免疫功能^[1]。但活性氧介导的脂质过氧化对巨噬细胞免疫功能损伤与 PSK 抗脂质过氧化保护作用尚未见报道。因此,为阐明活性氧及巨噬细胞免疫功能损伤及探讨 PSK 的抗损伤作用,我们以叔丁基氢过氧化物 (tert-butylhydroperoxide) 作为膜脂质过氧化损伤的引发剂,采用化学发光 (chemiluminescence, CL) 法研究了活性氧对巨噬细胞呼吸爆发功能的影响和 PSK 的保护作用。

1 材 料 与 方 法

1.1 试剂 luminol 购自 Merck 公司;

tert-butylhydroperoxide (tbOOH), PMA, glutathione reductase (type III), NADPH (type I) 均购自 Sigma 公司; reduced glutathione 购自 B. D. H 公司; PSK 由本校营养研究室惠赠。

1.2 腹腔巨噬细胞分离及培养 选取五周龄 NIH 雄性小鼠,每日腹腔注射 1.5% PSK 0.2ml, 连续 1 天、3 天或 9 天,对照组给予等量生理盐水,于停止注射第 3 天乙醚麻醉小鼠,用 RPMI-1640 液冲洗腹腔收集巨噬细胞。细胞用 RPMI-1640 10% 灭活牛血清培养,于 37℃ 孵育第 12h 更换含一定浓度的 tbOOH 全培养基。各指标以蛋白质含量或显微镜下细胞数表示,蛋白质含量按 Lowry^[2] 等方法测定。

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1991-07-31 修回日期: 1991-10-31。

1.3 巨噬细胞呼吸爆发功能测定 巨噬细胞悬浮于含 0.6mmol/L luminol 的 RPMI-1640 600 μ l 中, 37℃ 水浴并暗适应 5min 后移入聚苯乙烯测定管, 注入 0.6 μ l PMA 后, 立即启动化学发光仪 (1251 luminometer, LKB Wallac) 以每分钟脉冲数 (cpm) 表示发光值, 在测定时限内 1 min 最大积分值作为 CL 的峰值。

1.4 巨噬细胞的抗氧化能力 将收集的巨噬细胞用温生理盐水洗二次, 悬浮于 pH 9.9 的 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液中冰浴超声粉碎。参照 Rokutan 等^[3] 方法使用岛津 UV-240 型紫外分光光度计测定细胞内谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力。

2 结 果

2.1 PMA 诱发的小鼠腹腔巨噬细胞呼吸爆发

小鼠腹腔巨噬细胞体外培养 12 h 后, 在 luminol 存在下其 CL 值为 2000—4000 cpm。经 PMA 刺激后引起巨噬细胞强烈的呼吸爆

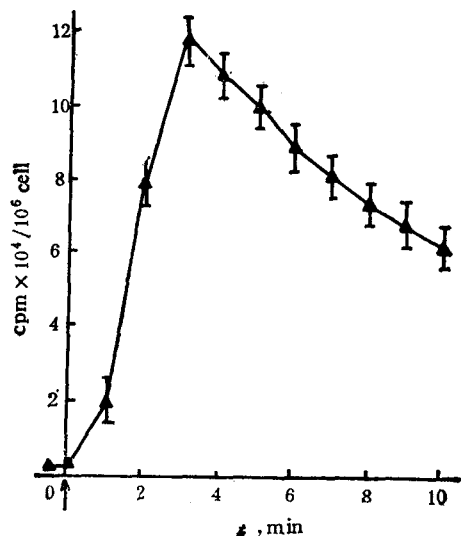


图1 正常小鼠腹腔巨噬细胞 PMA 激发的呼吸爆发

Fig. 1 Respiratory burst of the mouse peritoneal macrophage triggered by phorbol myristate acetate

↑ PMA 刺激
↑ PMA stimulated

发。图 1 显示 CL 值快速上升, 并于测定第 3 min 达到峰值。

2.2 tbOOH 对巨噬细胞呼吸爆发峰值的影响及与 PSK 预处理的巨噬细胞比较

在培养过程中加入 tbOOH, 37℃ 温育 12h

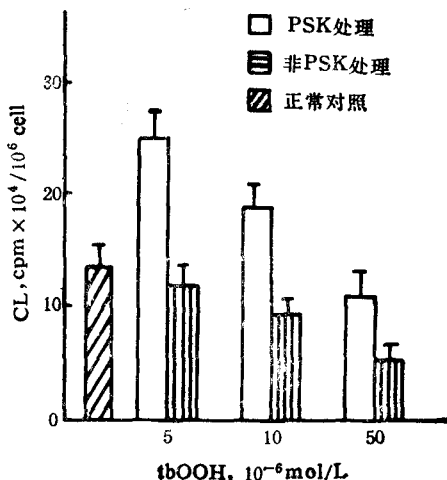


图2 不同浓度叔丁基氢过氧化物对非 PSK 处理及 PSK 处理的腹腔巨噬细胞化学发光峰值影响的比较

Fig. 2 Comparison of the effect of different concentrations of tert-butylhydroperoxide on the peak of CL activity of the

▨: non-PSK-treated and □: PSK-treated peritoneal macrophages

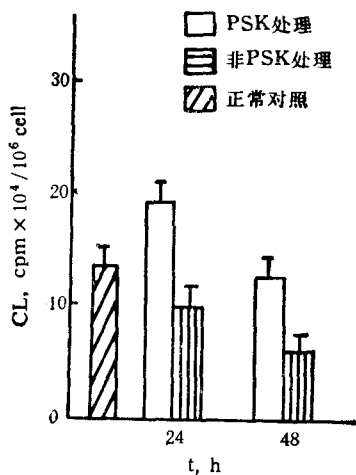


图3 非 PSK 处理及 PSK 处理的腹腔巨噬细胞与 5×10^{-6} mol/L 叔丁基氢过氧化物温育 24, 48h 的化学发光强度

Fig. 3 Peak of CL activity of non-PSK-treated and PSK-treated peritoneal macrophages incubated with 5×10^{-6} mol/L tert-butylhydroperoxide for 24 and 48h

后收集细胞,测定 PMA 激发的 CL 峰值(图 2)。与未经 PSK 作用的正常巨噬细胞比较,随培养基中 tbOOH 浓度增大,巨噬细胞 CL 峰值逐渐下降;而经 PSK 预先连续 9 次(每日每次 3mg)处理的受 tbOOH 作用的巨噬细胞 CL 峰值显著高于非 PSK 处理组 ($P < 0.001$);在 5×10^{-6} , 1×10^{-5} mol/L 的 tbOOH 存在下,PSK 处理的巨噬细胞 CL 峰值仍显著高于非 PSK 处理的正常巨噬细胞值。进一步比较 tbOOH 温育时间因素对上述不同处理的巨噬细胞呼吸爆发强度的影响(图 3)。其结果显示随 tbOOH 温育时间延长,尽管两组巨噬细胞 CL 峰值均有下降,但经 PSK 预处理的巨噬细胞仍保持较高的 CL 状态,并且在与 tbOOH 温育 24 h 后,PSK 处理的巨噬细胞 CL 峰值还显著高于未经 PSK 处理的正常巨噬细胞 ($P < 0.001$)。

2.3 tbOOH 对巨噬细胞抗氧化酶 GSH-Px 活力的影响及在 tbOOH 作用下 PSK 处理和非 PSK 处理的巨噬细胞酶活力的变化

腹腔连续 9 次注射 PSK 后第 3 天,细胞内 GSH-Px 基础酶活力(用每毫克蛋白每分钟被氧化的 NADPH 毫微摩尔数表示)明显提高(表 1)。以均值计算,经 PSK 处理的巨噬细胞 GSH-Px 活力提高为对照组的 1.35 倍;同时,对 PSK 三次注射及单次注射的观察结果亦显

表 1 腹腔注射 PSK 对腹腔巨噬细胞内 GSH-Px 基础活力的影响 ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

Table 1 The effect of intraperitoneal injection of PSK on GSH-Px activity in peritoneal macrophages ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

注射次数 Times of injection	GSH-Px 活力 ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) GSH-Px activities	
	生理盐水处理 physiological saline-treated (non-PSK-treated)	PSK 处理 PSK-treated
1	38.13 ± 1.65	$56.71 \pm 7.68^{1)}$
3	40.25 ± 2.01	$55.39 \pm 6.91^{1)}$
9	38.09 ± 2.14	$51.53 \pm 1.83^{1)}$

1) $P < 0.001$ (PSK 处理与生理盐水处理比较:compared with physiological saline-treated)

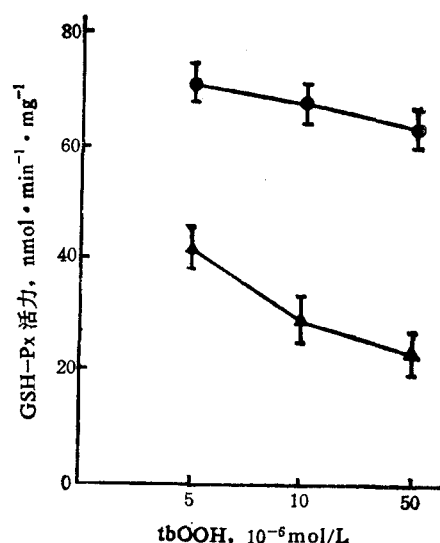


图 4 非 PSK 处理(Δ — Δ)及 PSK 处理($\bullet$ — $\bullet$)的腹腔巨噬细胞与不同浓度叔丁基氢过氧化物温育后 GSH-Px 活力变化

Fig. 4 Changes of GSH-Px activity in non-PSK-treated (Δ — Δ) and PSK-treated ($\bullet$ — $\bullet$) peritoneal macrophages incubated with different concentrations of tert-butylhydroperoxide

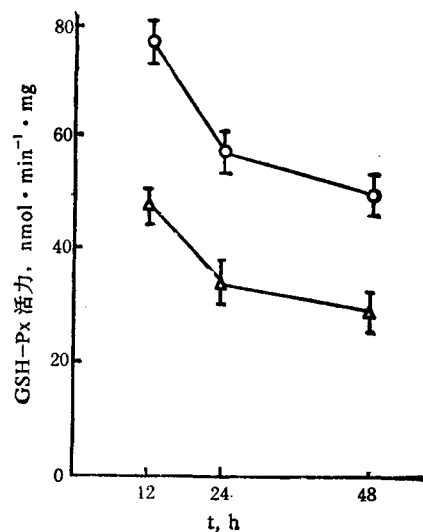


图 5 非 PSK 处理(Δ — Δ)及 PSK 处理($\circ$ — $\circ$)的腹腔巨噬细胞与 5×10^{-6} mol/L 叔丁基氢过氧化物温育 12, 24, 48h 后 GSH-Px 活力变化

Fig. 5 Changes of GSH-Px activity in non-PSK-treated (Δ — Δ) and PSK-treated ($\circ$ — $\circ$) peritoneal macrophages incubated with tert-butylhydroperoxide for 12, 24 and 48h

示类似的酶活力增强效应。将巨噬细胞与

tbOOH 温育后, 两组细胞 GSH-Px 酶活力差异进一步增大。如图 4, 在培养基中加入不同浓度的 tbOOH 温育 12h, 随 tbOOH 浓度渐增, 虽两组细胞内 GSH-Px 活力均有下降, 但 PSK 处理组的下降远不及非 PSK 处理组明显, tbOOH 浓度为 5×10^{-5} mol/L 时, PSK 处理的巨噬细胞内 GSH-Px 活力可达对照组的 2.82 倍。同时, 比较 tbOOH 作用的时间因素在对上述两组细胞 GSH-Px 酶活力的影响中亦有类似的改变 (图 4, 5)。

3 讨 论

3.1 tbOOH 对巨噬细胞呼吸爆发强度的影响及 PSK 的保护作用

正常巨噬细胞吞噬时伴随着 H_2O_2 、 O_2^- 及 $\cdot OH$ 的释放。本实验以膜受体刺激剂 PMA 刺激 NIH 小鼠腹腔巨噬细胞, 观察到呼吸爆发的 CL 峰值每 10^6 个细胞每分钟计数为 119312 ± 1006 ($X \pm SD$)。其过程与巨噬细胞膜结合的 NADPH 氧化酶受激活有关^[4]。

我们对 tbOOH 与 U 937 单核细胞共同温育的实验研究^[5]已表明一定浓度 tbOOH 能引起细胞膜 TBA 反应物质增加及膜流动性降低。本文将 tbOOH 与培养的巨噬细胞温育, 结果显示与巨噬细胞膜相关的呼吸爆发强度降低, 其抑制程度呈现明显的浓度及时间依赖关系。其机制可能是 tbOOH 引起的过氧化反应导致巨噬细胞膜流动性改变及膜结合 NADPH 氧化酶活力下降, 从而影响细胞呼吸爆发强度。

PSK 预处理的巨噬细胞与 tbOOH 温育后呼吸爆发强度虽有下降, 但仍保持较高呼吸爆发强度。说明 PSK 作为免疫刺激剂还能提高巨噬细胞抗活性氧损伤能力。

3.2 PSK 抗活性氧损伤的作用机制

细胞抗活性氧损伤是通过其抗氧化防御系

统特别是抗氧化酶。Rokutan^[6] 的实验显示有自身免疫倾向的 NIH 小鼠 PMA 诱导的组织巨噬细胞 O_2^- 释放增加, 同时伴随细胞内 GSH-Px 活力增加, 但超氧化物歧化酶 (SOD) 及过氧化氢酶 catalase 活力均无变化。提示 GSH-Px 活力在抗活性氧损伤中起着关键作用。本实验经腹腔连续九次注射 PSK 后, 细胞内 GSH-Px 基础活力明显提高, 三次注射及单次注射亦有同样效应。在 tbOOH 作用下未经 PSK 处理的巨噬细胞 GSH-Px 活力显著降低, 而经 PSK 处理的巨噬细胞则仍有较高的 GSH-Px 活力, 与呼吸爆发改变趋势一致。该结果表明 PSK 腹腔注射诱导的巨噬细胞内 GSH-Px 基础活力提高及在 PSK 作用下的高 GSH-Px 活性状态有助于延缓和降低 tbOOH 对生物膜的脂质过氧化损伤作用及保护呼吸爆发功能。

本研究以活性氧对细胞呼吸爆发功能的影响以及 PSK 的抗活性氧损伤作用说明巨噬细胞的免疫吞噬功能与活性氧及介导的脂质过氧化作用有关; 并且非特异性免疫刺激剂 PSK 能提高抗氧化酶 GSH-Px 活力, 保护巨噬细胞抵抗活性氧损伤。这为我们进一步对活性氧与免疫和巨噬细胞及其有关疾病的机理和防治研究提供了新的线索, 并为 PSK 作用机理研究开辟了新的途径。

参 考 文 献

- 1 Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fujimi G *et al.* *Cancer Treatment Review*, 1984; 11: 131
- 2 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* *J biol chem*, 1951; 193: 265
- 3 Rokutan K, Kawai K, Asada K *et al.* *J Biochem* (Tokyo), 1987; 101: 415
- 4 Jugi T W, Peterhans E *et al.* *Blut*, 1988; 56(5): 213
- 5 李 军, 周 玫, 陈 媛. 基础医学与临床, 1991; 11(2): 104
- 6 Rokutan K, Hosokawa T, Nakamura K *et al.* *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1988; 87: 113

INHIBITION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES ON RESPIRATORY BURST OF MACROPHAGE AND PROTECTION OF POLYSACCHARIDE FROM CORIOLUS VERSICOLOR

Li Jun Zhou Mei Chen Yuan

(Department of Biochemistry, First Medical College of PLA, Guang Zhou 510515)

ABSTRACT

Using a luminol-dependent chemiluminescence assay we found tert-butylhydroperoxide to be a strong inhibitor of respiratory burst of the mouse peritoneal macrophage. However, the protection against the inhibition of respiratory burst induced by tert-butylhydroperoxide was enhanced after the intraperitoneal injection of polysaccharide from Coriolus versicolor. Further investigation exhibited that glutathione peroxidase activity was markedly elevated in PSK-treated macrophages. Meanwhile, higher activity of glutathione peroxidase was maintained in PSK-treated macrophages incubated with tert-butylhydroperoxide. These results suggested that the immunological function of macrophage was related to the activity of glutathione peroxidase. Non-specific immunopolysaccharide might prevent macrophage from damage induced by reactive oxygen species by enhancing antioxidation capacity.

Key words Respiratory burst, tert-butylhydroperoxide, Glutathione peroxidase

欢迎订阅《生物物理学报》

《生物物理学报》是中国生物物理学会主办的、国内外公开发行的、涉及生物物理学各领域的学术刊物。

刊号: $\frac{\text{ISSN}1000-6737}{\text{CN}11-1992/Q}$, 季刊, 每期 144 页, 单价 5.00 元。

本刊以发表研究论文为主, 同时发表研究简报、通讯、综述、动态、国内外学术会议消息、书刊评介等方面的稿件。读者对象是从事生物物理学科研和教学的工作者及从事生物学、医学、物理学、化学等与之交叉学科的科研人员、医务工作者和大专院校师生、研究生。

《生物物理学报》自办发行, 现在开始办理 1993 年订阅手续。欲订阅者, 请来函发行组, 随即将征订通知寄去。

1. 全年出四期, 每期定价 5 元, 全年共收人民币 20 元, 平邮邮费由发行组统付, 若要求挂号, 订购一份者, 全年需邮寄挂号费 2 元, 订购两份者, 全年邮寄挂号费 4 元, 依此类推。

2. 信汇: 《生物物理学报》编辑部 (开户银行: 中国工商银行北京市海淀区办事处, 帐号: 144192-27)。

3. 邮汇: 北京市朝阳区大屯路 15 号《生物物理学报》发行组。请在邮汇单内写明单位全称、详细地址、收件人姓名, 在汇款人简短附言栏内写明邮政编码和订阅份数。

编辑部地址: 北京市朝阳区大屯路 15 号

《生物物理学报》编辑部, 邮政编码: 100101

电话: 2020077-291

欢迎订阅《国外医学》分子生物学分册

《国外医学》分子生物学分册系自然科学类医学分子生物学情报性综合性刊物。办刊宗旨是及时地向国内同行提供国外医学分子生物学领域的新进展、新理论、新技术、新成就, 主要读者对象是从事分子生物学及相关学科研究的科研、教学人员, 以及研究生、本科

生等。

本刊为国内公开发行, 全国各地邮局均可订阅, 邮发代号: 38-35, 双月刊, 48 页, 单价 1.20 元。编辑部地址: 武汉市航空路 13 号 (同济医科大学校内)。邮政编码: 430030。电话: 565811-325。