

ESR 检测大鼠肺巨噬细胞释放的活性氧自由基

胡连平 孙存普 丛建波 龚治芬 吴 可 吴德昌

(军事医学科学院放射医学研究所,北京)

提 要

用 ESR 捕捉技术检测大鼠 AM 释放的活性氧自由基的性质表明: 1. PMA 和 BCG 均能刺激 AM 产生较强的 $\text{OH}\cdot$; 能刺激人末梢血白细胞释放活性氧自由基的 Con A 和顺铂在本实验条件下未能使 AM 产生活性氧自由基信号。2. 经膜活性剂 PMA 刺激的 AM 所释放活性氧自由基的高峰在刺激后 2 min, 而经颗粒性物质 BCG 刺激, AM 释放自由基的高峰时间明显后移。3. 测试体系中的 AM 数过多或过少都不适合捕捉 ESR 信号。在本实验条件下, 捕捉到最高自由基信号的 AM 终浓度为 5×10^7 AM/ml。4. 测试体系中存在 DETAPAC 或 EDTA, 可使捕捉到的自由基信号明显增强。

关键词 巨噬细胞, 自由基

巨噬细胞 (macrophage, $\text{M}\phi$) 是机体的重要免疫活性细胞之一。它在清除异物, 消灭微生物以及肿瘤免疫中起着重要的作用^[1-3]。然而有关其功能的物质基础尚不十分清楚。实验表明, $\text{M}\phi$ 发挥生物效应时, 如吞噬等, 消耗大量的氧, 产生呼吸爆发^[4], 因此推测活性氧自由基可能是 $\text{M}\phi$ 发挥效应的重要机制之一。但由于自由基寿命极短, 无法用通常的方法检测。尽管有学者用细胞色素 c 的还原法间接检测到了活性氧自由基信号, 但不易与其它类自由基信号相区别^[5]。近年来由于电子顺磁共振 (ESR) 技术的发展和自由基捕捉剂的出现, 可使不稳定的自由基转变成较稳定的自由基^[6], 用 ESR 进行直接测量。从而发展了一种研究自由基生物学的必要手段, 尤其是对活细胞分泌的活性氧自由基的检测提供了有效的方法。目前已有许多实验室对人末梢血白细胞释放自由基作了较详细的研究^[7,8]。但尚缺少利用 ESR 捕捉技术对 $\text{M}\phi$ 释放自由基的研究。为此, 本文以 Wistar 大鼠肺巨噬细胞 (alveolar macrophage, AM) 为实验对象, 较为系统地摸索了其释放自由基的性质和规律。

材 料 和 方 法

1. 动物 Wistar 雌性大鼠, 日龄 50--70 天, 本单位动物场繁殖。

2. 试剂 刺激剂: ① PMA (phorbol myristate acetate) 是 Sigma 公司产品, 丙酮溶解后, 置 -20°C 冰箱保存, 用时用 PBS 液 (pH 7.4) 配成所需浓度; ②卡介苗 (BCG) 卫生部生物药品鉴定所提供, 用生理盐水配成 50 mg/ml, 用时现配; ③顺铂 (锦州制药厂) 用生理盐水配成 250 mg/ml, 4°C 冰箱保存备用; ④ConA (Sigma 公司) 用生理盐水配成 0.5 mg/ml, -20°C 冰箱保存。络合剂: DETAPAC 和 EDTA 均为北京化学试剂厂的分析纯试剂, 分别用 PBS 配成 1 mmol/L 和 0.5 mmol/L。自由基捕捉剂: DMPO (5, 5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide) 为 Sigma 公司产品, 活性炭提纯后^[9], 在 ESR 波谱中未出现杂质信号。用双蒸水配成 0.8 mol/L, -20°C 冰箱保存备用。产生标准 $\text{OH}\cdot$ 波谱的试剂: 30% H_2O_2 和 FeSO_4 为北京化工厂的 analysis 纯试剂。测量时用 PBS 配成终浓度分别为 1% 和 100 $\mu\text{mol/L}$, 加

DMPO 捕捉后测 ESR 信号。

3. 依 Brain^[10] 方法获取 AM。 苔芬蓝排斥试剂证明 94% 以上为活细胞。 形态学证明洗出的肺游离细胞中 95% 以上为 AM。

4. 氧自由基的测定 用无 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的 d-Hanks 液将 AM 配成 2×10^7 个/ml。 将一定量的 AM、刺激剂、DETAPAC 或 EDTA 混合,置 37°C 温育一定时间,加入 DMPO (终浓度为 0.16 mol/L) 捕捉一定时间,或 DMPO 直接混入测试体系,37°C 温育一定时间,吸入毛细管,在 Bruker ESP 300 仪测 ESR 信号。测试条件为: 功率 10 mW, 25 KHz 高频调制,调制幅度 1G。中心磁场 3470G,扫描密度 100 G,扫描速度 84 G/min,时间常数 20 msec,温度 25°C。

实验结果

人血白细胞经膜活性剂刺激后,消耗氧,产生呼吸爆发,用自由基捕捉剂 DMPO 可捕捉到自由基信号^[11]。因此本文根据检测人血白细胞释放的自由基实验,从以下几个方面探讨了大鼠肺巨噬细胞产生活性氧自由基的特点和有关的实验条件。

1. 用不同的刺激剂刺激 AM 所产生的自由基信号的比较

本文选用了四种不同性质的刺激剂,观察刺激后立即加入 DMPO,置 37°C 温育 10 min 的 ESR 信号,结果见图 1。

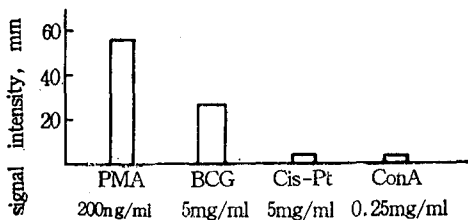


图 1 不同刺激剂作用下的 AM 产生的自由基
Fig 1. Free radicals released by AM treated with different stimulating agents

由图 1 可见,在此实验条件下,ConA 和顺铂几乎不能刺激 AM 产生自由基信号;PMA 刺激的信号明显地高于 BCG 刺激的信号。

2. 不同的刺激时间对 AM 自由基信号的影响

为了观察 AM 经刺激后,其释放自由基的动态变化,我们观察了 PMA 和 BCG 刺激后置 37°C 温育不同时间再加入 DMPO,捕捉 2 min 的信号(图 2)。

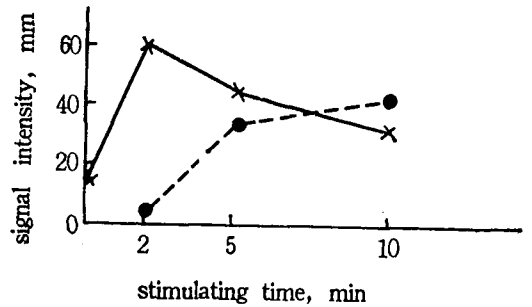


图 2 经不同刺激剂刺激的 AM 所释放自由基的动态过程
Fig 2. Dynamic changes of releasing of free radicals from AM treated with different stimulating agents

---- stimulation with BCG — stimulation with PMA

由图 2 可见,BCG 刺激后 2min 只能测到很微弱的信号,随刺激时间的延长,信号增强。而经 PMA 刺激后,立即就可测到自由基信号,2 min 达高峰,随后逐渐下降。这说明 AM 分泌自由基高峰出现的时间与刺激剂的性质有关。

3. AM 浓度对 DMPO 捕捉自由基信号的影响

AM 经刺激后所产生的自由基的量应该和 AM 浓度呈正比,然而本实验结果(图 3)表明,AM 浓度过高或过低都不利于 DMPO 捕捉 AM

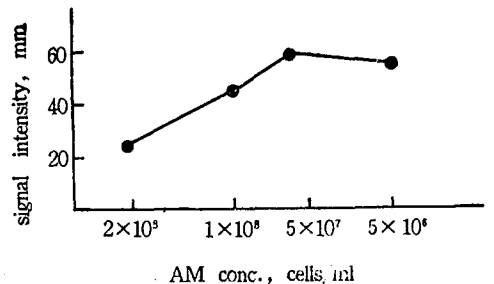


图 3 经 BCG 刺激的 AM 浓度和 DMPO 捕捉的信号高度关系

Fig 3. Relationship between concentrations of BCG-treated AM and amount of free radicals released by them

trapping time, 10min

释放的自由基信号。

4. 络合剂对 AM 释放自由基信号的影响

当测定 AM 释放自由基的体系中不存在络合剂时,检测不到 ESR 信号。加入某种络合剂就可测到很强的自由基信号(图 4)。这说明某些络合剂有增强或稳定自由基信号的作用。

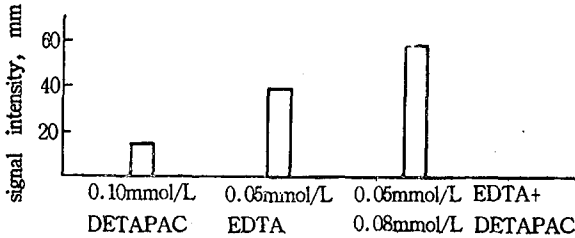


图 4 DETAPAC 和 EDTA 对 AM 释放自由基信号的影响

Fig 4. Effects of DETAPAC and EDTA on amount of free radicals released by AM

5. AM 释放自由基的性质

为了确定上述实验所获得的自由基性质,利用 H_2O_2 和 $FeSO_4$ 产生 $OH\cdot$,用 DMPO 捕捉得标准 $OH\cdot$ 的 ESR 波谱(图 5)。此信号在本实验的条件下可维持 10 min,随后信号逐渐减弱。AM 经 PMA 和 BCG 刺激后,DMPO 捕捉的 ESR 波谱如图 5b 和图 5c。可见 AM 的自由基波谱和标准的 $OH\cdot$ 波谱完全一样,说明 AM 经 PMA 和 BCG 刺激后,DMPO 捕捉到的信号是 AM 所释放的 $OH\cdot$ 信号。

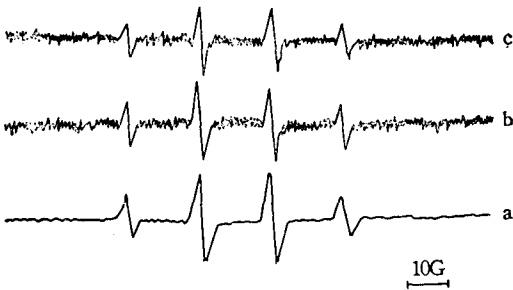


图 5 标准 $OH\cdot$ 和经 PMA 和 BCG 刺激的 AM 所释放的自由基的 ESR 波谱

Fig 5. ESR spectra of standard hydroxyl and free radicals released by AM treated with PMA and BCG

讨 论

在本实验体系,只捕捉到了经刺激的 AM 所释放活性氧自由基的 $OH\cdot$ 信号,既使将 PMA 的浓度提高到 1000 ng/ml (人血白细胞经 100 ng/ml 的 PMA 刺激,就可检测到 $O_2\cdot^-$ 信号),也未捕捉到 $O_2\cdot^-$ 信号。Buettner^[6] 认为 DMPO 和 $O_2\cdot^-$ 的加合物在 pH 为 7.0 的液体中,只能稳定存在几十秒钟,因此我们曾在经活性剂刺激的 AM 的测试体系中,加入 DMPO 后立刻检测 ESR 信号,结果也未获得 $O_2\cdot^-$ 信号波谱。至于是 AM 本身性质所决定,还是实验条件的缘故尚需进一步研究。

用同样方法检测人血白细胞 (WBC) 的活性氧自由基信号,和 AM 产生的信号比较,二者有三点不同(表 1)。

表 1 大鼠 AM 和人 WBC 释放活性氧自由基的比较

Table 1 Comparison of active oxygen signals released by rat AM and human white blood cells

	信 号 Signals	ConA 刺激 Stimulation with ConA	PMA 和 BCG 刺激 Stimulation with PMA and BCG
大鼠 UAM Rat AM	弱 Weak	无信号 No signal	只产生 $OH\cdot$ 信号 $OH\cdot$ signal
人 WBC Human white blood cells	强 Strong	有信号 $OH\cdot$ and $O_2\cdot^-$ signals	产生 $OH\cdot$ 和 $O_2\cdot^-$ 信号 $OH\cdot$ and $O_2\cdot^-$ signals

用同样方法检测大鼠 WBC 释放的活性氧自由基,对比人 WBC 产生的信号,结果表明,大鼠 WBC 信号远小于人 WBC 信号,略高于大鼠 AM 产生的信号。这说明了种属不同,产生活性氧自由基的能力也不同。

本实验结果表明,AM 经刺激后可产生活性氧自由基,但其释放活性氧自由基的动态过程随刺激剂的性质不同而变化(图 2),膜的活性剂使 AM 的呼吸爆发很快达高峰,而 BCG 颗粒刺激,则需较长时间才达高峰。这也许是因为颗粒性物质需要首先被吞噬才能刺激 AM 的呼吸爆发。

AM 释放活性氧自由基的能力与刺激剂的

性质有关。然而捕捉的自由基信号强度还与AM本身的浓度密切相关(图3)。AM浓度过高反而不利于自由基信号的捕捉。人血白细胞也有类似的现象。这可能是由于测试体系中细胞密度过大,从而淬灭了一部分自由基信号的缘故。由此说明实验中选择细胞的最佳测试浓度是十分重要的。

参 考 文 献

1 Gordon S In: Marfred L Karnovsky *et al* eds, *Phagocytosis-past and future*, 1982: 287—293
 2 Campbell PA. *J Leukocyte Biology*, 1984; 36: 293
 3 Rinshert IJ. *J Lab Clin Med*, 1979; 93(3): 361

4 Hume DA, Gordon S. *Life Chem Repts*, 1982; 1: 1
 5 Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. *J Clin Invest*, 1973; 52: 741
 6 Buettner GR, Oberley LW. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1978; 83(1): 69
 7 Rosen H, Klebanoff SJ. *J Clin Invest*, 1979; 64: 1725
 8 Bannister JV, Bellavite P, Serra MC *et al*. *FEBS Letters*, 1982; 145: 323
 9 Coloeick SP, Kaplan NO. *Methods in enzymology*, Orlando San Diego San Francisco New York London Toronto Montreal Sydney Tokyo San Paulo, 1984; 105: 232
 10 Brain JD, Frank R. *J Applied Physiology*, 1973; 34(1): 75
 11 Green MR, Hill HAO, Okolw-Zubkiwska MJ *et al*. *FEBS Letters*, 1979; 100: 23

[本文于1989年5月20日收到]

STUDY OF THE PRODUCTION OF HYDROXYL RADICAL BY STIMULATED ALVEOLAR MACROPHAGES OF RAT WITH ESR SPECTROSCOPY

Hu Lianping Sun Cunpu Cong Jianbo Gong Yifen Wu Ke Wu Dechang
 (Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing)

ABSTRACT

The characterizations of oxygen radicals released from alveolar macrophages (AM) of rats and related measurement conditions were observed with the technique of ESR in this experiment. The results were summarized as follows.

1. Of PMA, BCG, ConA and cis-platinum, the first two stimulated AM to produce hydroxyl radical.
2. AM stimulated by different agents had different kinetics of the release of the hydroxyl radical. The release peak from AM appeared at min. two after stimulating AM with PMA, with BCG the release peak delayed obviously.
3. 5×10^7 AM/ml proved the fit concentration for trapping the signal of the hydroxyl radical from AM in this experiment.
4. There was a great influence of DETAPAC or EDTA on the intension of the signal.

Key words macrophage, free radicles

(上接第280页)

2 Eaton S S, Eaton G R. *J Magn Reson*, 1984; 59: 477
 3 Feldmen A *et al*. *Phys Med Biol*, 1975; 20: 602
 4 Froncisz W, Hyde J S. *J Magn Reson*, 1982; 47: 55
 5 Hardy W N, Whitehead L A. *Rev Sci Instrum*, 1981: 52: 213
 6 Fujii H, Berliner L J. *J Magn Reson*, 1986; 69: 68
 7 Eaton G R, Eaton S S. *J Magn Reson*, 1986; 67: 73
 8 Eaton G R, Eaton S S. *J Magn Reson*, 1987; 71: 271
 9 Eaton G R, Eaton S S. *J Magn Reson*, 1986; 67: 561
 10 Maltempo M M *et al*. *J Magn Reson*, 1987; 72: 449
 11 Berliner L J, Fujii H. *J Magn Reson*, 1986; 69: 68
 12 Cleary D A *et al*. *J Magn Reson*, 1988; 79: 474
 13 Berliner L J *et al*. *J Polymer Sci*, 1986; 24: 587
 14 Zommerfelds W, Hoch M J R. *J Magn Reson*, 1986; 67: 177

[本文于1989年6月16日收到]