

海藻多糖抑制白细胞呼吸爆发作用研究*

李妍¹⁾ 田晓华²⁾ 丛建波 滕霞 孙存普 顾景范²⁾

(军事医学科学院放射医学研究所, 国家生物医学分析中心自由基与顺磁实验室, 北京 100850)

摘要 采用 ESR、自旋捕集及自旋氧探针技术, 研究了海藻硫酸多糖 (SPS) 对豆蔻酰佛波醇乙酯 (PMA) 刺激的多形核白细胞 (PMN) 呼吸爆发的影响。结果表明, SPS 能显著抑制 PMN 呼吸爆发, 10 g/L 和 5 g/L SPS 几乎完全清除 PMN 呼吸爆发产生的自由基, 1 g/L SPS 可清除 53.2%; 10 g/L SPS 对 PMN 的耗氧量也有较明显的抑制作用。

关键词 海藻硫酸多糖, 多形核白细胞, 呼吸爆发, 超氧自由基 O_2^-

学科分类号 Q691

活性氧自由基涉及多种疾病与损伤, 如缺血-再灌注损伤、辐射损伤、动脉硬化、突变、癌症和衰老等。近来研究表明 HIV 感染者处于活性氧导致的慢性氧化应激状态^[1,2], 如血浆脂质过氧化产物水平升高, 中性粒细胞生成自由基增加等。活性氧自由基还能通过激活 NF- κ B 转录因子来诱导 HIV-1 的表达与复制^[3]。吞噬细胞呼吸爆发是机体内自由基的重要来源, 过多的活性氧自由基, 会对吞噬细胞本身及其周围环境的其他细胞、组织及生物大分子造成损伤^[4,5], 与肿瘤及 HIV 疾病的发生、发展密切相关^[6]。

海藻硫酸多糖 (sulfated polysaccharide from seaweed, SPS) 具有增强免疫、抗突变、抗肿瘤及抗 HIV 等多种药物作用^[7,8], 但人们对其作用机制了解甚少。我们曾采用 ESR 和自旋捕集技术证实了 SPS 对化学模拟体系产生的自由基有明显清除作用^[9]。本文在此基础上, 采用 PMA 刺激多形核白细胞 (PMN) 呼吸爆发模型, 进一步观察 SPS 对 PMN 呼吸爆发的影响。这些研究可能为探讨 SPS 抗肿瘤和抗 HIV 机制提供一条新途径。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

二甲基吡咯啉氮氧化物 (5, 5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide, DMPO)、豆蔻酰佛波醇乙酯 (phorbol myristate acetate, PMA)、自旋氧探针 (3-氨基-2, 2, 5, 5-四甲基-3-吡咯啉氮氧化物, 3-carbamoyl-2, 2, 5, 5-tetramethyl-3-pyrroline-1-yloxy, CTPO)、二乙烯三胺乙酸 (diethylenetri-

amin epentaacetic acid, DTPA) 购自 Sigma 公司, 葡聚糖 T70 (Dextran T70) 为 Pharmacia 产品, 其他试剂均为国产 AR 级。

海藻多糖由褐藻热水提取, 乙醇沉淀, 经中空纤维柱过滤获得, 相对分子质量小于 10 000。

ESR 波谱测量用德国 Bruker-ESR 300 顺磁共振波谱仪。

1.2 多形核白细胞 (PMN) 分离提取

经抗凝的健康人血 9 ml, 加入 4.5 ml 6% 的葡聚糖 T70, 室温下静置约 1 h, 取含 PMN 的上清液, 1 500 r/min 离心 5 min, 沉淀用少许生理盐水溶解, 加入 3 ml 冷双蒸水悬浮, 准确计时 30 s 振荡, 加 1 ml 0.6 mol/L KCl, 1 500 r/min 离心 5 min, 重复 2~3 次, 直至残余的红细胞洗净, 沉淀加生理盐水配制成约 1×10^8 个/ml 浓度的溶液^[10]。

1.3 PMA 刺激 PMN 呼吸爆发产生的自由基测定

取上述 PMN 5 μ l 与 1 mmol/L DTPA 5 μ l, 3.2 μ mol/L PMA 5 μ l 及 PBS 25 μ l (pH 7.4) 混匀 (实验组加入不同浓度 SPS 5 μ l, PBS 20 μ l), 37 $^{\circ}$ C 温育 2 min, 加入 0.8 mol/L DMPO 10 μ l 混匀, 立即吸入石英毛细管, 1 min 内于 ESR 波谱仪测自由基信号。测试条件: 功率 10 mW, 调频 25 kHz, 调幅 1 G, 时间常数 10.24 ms, 扫描时间 41.94 s, 中心磁场 3470 G, 扫宽 100 G。

* 国家自然科学基金资助项目 (39470190)。

¹⁾ 军事医学科学院放射医学研究所进修生 (工作单位: 北京军区药检所, 北京 100071)。

²⁾ 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050。

收稿日期: 1997-12-05, 修回日期: 1998-04-26

1.4 PMN耗氧量测定

取上述PMN 10 μ l 与氧探针CTPO 5 μ l, PMA 10 μ l 及PBS (pH 7.4) 25 μ l 混匀 (实验组加不同浓度的SPS 5 μ l, PBS 20 μ l), 吸入石英毛细管, 计时, 24 $^{\circ}$ C 恒温, 在ESR波谱仪上测定1 min、3 min、5 min 和7 min 时PMN耗氧量. 测试条件: 功率1 mW, 其余同1.3.

2 结 果

2.1 SPS对PMA刺激PMN呼吸爆发产生的 O_2^- 的清除作用

图1e是PMA刺激PMN产生 O_2^- 的典型波谱, 图1a、b、c、d是分别加入10、5、1、0.5 g/L SPS对体系产生的 O_2^- 清除作用, 以ESR波谱的第1峰高值(mm)表示信号的相对强度, 用下列公式计算清除率.

$$\text{清除率} = \frac{\text{对照组峰值} - \text{加SPS组峰值}}{\text{对照组峰值}} \times 100\%$$

由图1可见SPS能显著清除该体系产生的 O_2^- , 且呈明显量效关系, 以10 g/L清除效果最佳, 几乎完全清除, 5 g/L、1 g/L与0.5 g/L SPS清除 O_2^- 的清除率分别为96.6%、53.2%、23.4%.



图1 SPS对PMN呼吸爆发产生的 O_2^- 的清除作用

a: 10 g/L SPS; b: 5 g/L SPS; c: 1 g/L SPS;
d: 0.5 g/L SPS; e: 对照.

2.2 SPS对PMN耗氧量的影响

为了弄清SPS是清除PMN产生的 O_2^- , 还是通过抑制PMN呼吸爆发, 不产生 O_2^- , 我们观察了SPS对PMN耗氧量的影响. 在测定耗氧时, 引入自旋氧探针CTPO, CTPO中的4个甲基质子产生的ESR波谱超精细结构的线宽正比于溶液中的氧浓度, 当氧浓度高时, 由于线宽非常宽, 显示

不出超精细分裂结构, PMN受PMA刺激呼吸爆发过程中产生的 O_2^- 消耗了介质中的氧气, 减少了氧对CTPO的加宽作用, 使其超精细结构表现出来.

图2a是PMA刺激PMN后, PMN发生呼吸爆发, 随着时间的延续, 耗氧量不断增加, 图2a中A、B、C、D分别是ESR记录的1 min、3 min、5 min、7 min时的耗氧情况.

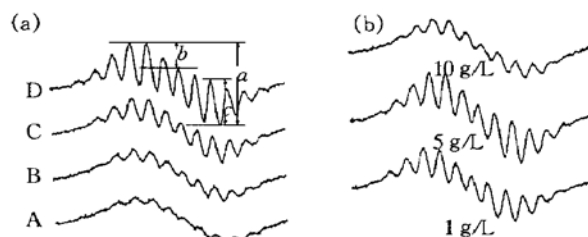


图2 CTPO标记的PMN呼吸爆发耗氧的ESR波谱及SPS的影响

为了表示SPS对PMN耗氧影响的程度, 引用经验参数K,

$$K = \frac{b+c}{2a}$$

a、b、c分别如图2a所示, 当溶液中氧浓度高时, CTPO无超精细分裂结构, $K=0$, 随环境中氧浓度降低, b、c增大, K也随之增大.

图2b和图3分别是加入1 g/L、5 g/L、10 g/L SPS ESR记录的7 min时PMN的耗氧情况, 可见10 g/L SPS对PMN的耗氧量有一定抑制作用, 而1 g/L和5 g/L则没有, 以上为6次实验的平均值 ($P < 0.05$).

图4是不加SPS与加入5 g/L和10 g/L SPS后PMN耗氧率K值随时间变化关系, 从图4可见, 10 g/L的SPS对PMN耗氧有较明显的抑制作用, 而5 g/L没有影响, 以上为6次实验的平均值 ($P < 0.01$).

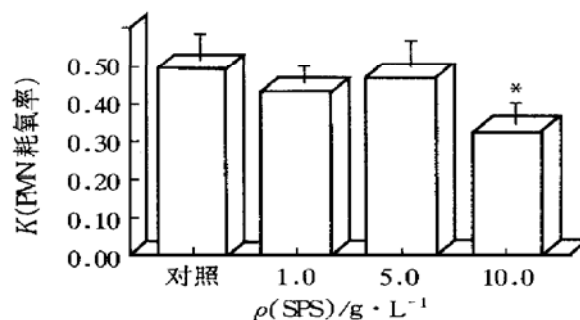


图3 不同浓度SPS对PMN呼吸爆发7 min时耗氧率的影响

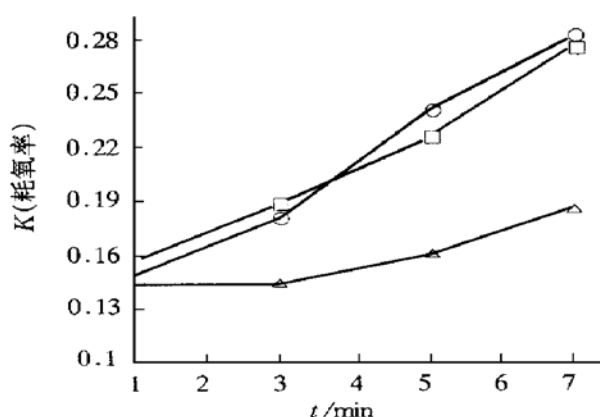


图4 SPS对PMN呼吸爆发耗氧率动态变化的影响

○ — ○: 对照; □ — □: 5 g/L SPS;
△ — △: 10 g/L SPS.

3 讨 论

吞噬细胞呼吸爆发产生活性 O_2^- 是保护机体免受外来致病因子侵袭的重要机制, 但同时也对免疫系统本身造成损伤. 通过我们上述实验, 证明了SPS对PMA刺激的呼吸爆发产生的 O_2^- 有明显清除作用, 是有效的自由基清除剂, 同时也说明呼吸爆发产生的活性 O_2^- 是来源于介质中的氧. 实验结果还表明: 低浓度的SPS (1 g/L、5 g/L) 对PMN呼吸爆发产生的 O_2^- 的作用是直接清除, 而高浓度的SPS (10 g/L) 除直接清除PMN呼吸爆发产生的 O_2^- 外, 尚能部分抑制PMN呼吸爆发, 即对PMN的活性有抑制作用, 阻止 O_2^- 的生成, 这可能是SPS保护免疫细胞在慢性炎症反应中免受过多的活性 O_2^- 损伤、增强机体免疫力的机理之一. 高浓度的SPS能够抑制PMN耗氧的机制尚不清楚, 是否象SPS作为电子受体, 建立电子通路, 从而抑制线粒体电子传递链依赖NADH的氧消耗一样, SPS对PMN耗氧的抑制也是通过影响NADH酶系统的电子传递来实现, 还有待于进一步研究, 但SPS作为高效抗氧化剂的作用已是毋庸置疑的了.

参 考 文 献

- 1 Pace G W, Leaf C D. The role of oxidative stress in HIV disease. *Free Radical Biol Med*, 1995, **19** (4): 523~528
- 2 Jarstrand C, Akerlund B. Oxygen radical release by neutrophils of HIV-infected patients. *Chem Biol Interact*, 1994, **91** (2, 3): 141~146
- 3 Schreck R, Rieber P, Baeuerle P A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J*, 1991, **10** (8): 2247~2258
- 4 Tsan M. Phorbol myristate acetate induced neutrophil autotoxicity. *J*

Cell Physiol, 1980, **105** (2): 327~334

- 5 Birnboim H C. DNA strand breakage in human leukocytes exposed to a tumor promoter, phorbol myristate acetate. *Science*, 1982, **215** (4537): 1247~1249
- 6 Staal F J T, Roederer M, Israelski D M, *et al.* Intracellular glutathione levels in T cell subsets decrease in HIV-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1992, **8** (2): 305~311
- 7 Itoh H, Noda H, Amano H, *et al.* Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of phaeophyceae. *Anticancer Res*, 1993, **13** (6): 2045~2052
- 8 Beress A, Wassermann O, Bruhn T, *et al.* A new procedure for the isolation of Anti-HIV compounds (polysaccharides and polyphenols) from the marine alga *Fucus vesiculosus*. *J Natural Products*, 1993, **56** (4): 478~488
- 9 田晓华, 丛建波, 施定基, 等 (Tian X H, Cong J B, Shi D J, *et al.*). 褐藻硫酸多糖清除活性氧自由基作用及动力学的ESR研究. *营养学报 (Acta Nutrimenta Sinica)*, 1997, **19** (1): 32~37
- 10 Markert M, Andrews P C, Babior B M. Measurement of O_2^- production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. In: Lester P ed. *Methods in enzymology*, **12**. New York: Academic Press. 1984. 358~365

Studies on the Inhibitory Effects of Sulfated Polysaccharide from Brown Seaweed on the Respiratory Burst of Polymorphonuclear Neutrophils. LI Yan¹⁾, TIAN Xiao-Hua²⁾, CONG Jian-Bo, TENG Xia, SUN Cun-Pu, GU Jing-Fan²⁾ (*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Free Radical & ESR Laboratory of National Centre of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China;* ¹⁾ *Institute of Drug Control of Beijing Military Region, Beijing 100071, China;* ²⁾ *Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China*).

Abstract The influence of sulfated polysaccharide from brown seaweed *Laminaria Japonica* (SPS) on the respiratory burst of polymorphonuclear neutrophils (PMN) induced by phorbol myristate acetate (PMA) was investigated with the techniques of ESR, spin trap and oxygen spin probe. The results showed that SPS inhibited the respiratory burst of PMN significantly. 10 g/L and 5 g/L SPS almost completely scavenged superoxide anion (O_2^-) from the respiratory burst while 10 g/L SPS inhibited the oxygen consumption of PMN markedly, and 1 g/L SPS scavenged 53.2% O_2^- .

Key words sulfated polysaccharide from brown seaweed (SPS), polymorphonuclear neutrophils (PMN), respiratory burst, superoxide anion (O_2^-)