

塞隆骨提取物对 CFA 诱导活化的小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响

赵晓辉^{1,2}, 岳会兰^{1,2}, 梅丽娟¹, 邵 贇¹, 陶燕铎^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所,青海 西宁 810008; 2 中国科学院研究生院,北京 100039)

关键词:巨噬细胞; 酶联免疫法; 弗氏完全佐剂

摘要:目的:研究塞隆骨提取物对弗氏完全佐剂诱导活化的腹腔巨噬细胞的免疫抑制作用。方法:小鼠腹腔注射弗氏完全佐剂诱导腹腔巨噬细胞活化并回收,体外加入 LPS及 IFN- 刺激培养巨噬细胞,利用酶联免疫法测定培养上清中细胞因子(L-1、L-6、L-12p40、TNF-)水平。结果:塞隆骨水提物及 90%醇沉部分体内给药均能够显著抑制弗氏完全佐剂诱导的巨噬细胞向腹腔的浸润,能抑制巨噬细胞在 LPS及 IFN- 刺激下生成细胞因子(L-12p40、L-1、L-6、TNF-)。结论:塞隆骨提取物对巨噬细胞功能有一定程度的影响,能够抑制其产生炎症因子,可能是其治疗类风湿性关节炎的作用机理之一。

中图分类号:R285.6

文献标识码:A

文章编号:1001-1528(2008)03-0330-03

Effect of *M yospalax fontanieri* bone extracts on the function of CFA induced mice

ZHAO Xiao-hui^{1,2}, YUE Hui-lan^{1,2}, MEI Li-juan¹, SHAO Yun¹, TAO Yan-duo^{1*}

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

KEY WORDS: macrophages; ELISA; complete Freund's adjuvant

ABSTRACT: A M: To investigate the mechanisms of *M yospalax fontanieri* bone extracts for macrophages activation. METHODS: Complete Freund's adjuvant was used to induce mouse celiac macrophage activation by ip, then peritoneal exudate cells were cultured in vitro in the present of LPS and IFN-, concentrations of L-1, L-6, L-12p40, and TNF- were by ELISA measurement and the MAC-1 cell proportion was determined by FACS Calibur. RESULTS: *M yospalax fontanieri* bone had immunosuppressive effect on mouse celiac macrophages, and markedly decreased production of inflammatory cytokine. CONCLUSION: Inhibition of inflammatory factor may be the mechanism of action for rheumatoid arthritis.

塞隆 (*M yospalax fontanieri*)骨,是高原特有动物高原鼯鼠的全骨风干品。是我国建国以来第一个国家级一类动物药材,其性微温、味辛咸,入肝肾经,主要功能为驱风除湿、散寒、舒筋活络、强筋健骨及增强机体抗力等。据报道^[1,2],塞隆骨具有抗炎镇痛作用并能 1:1 替代虎骨,塞隆风湿酒试验和细胞染色体畸变试验结果均呈阴性。塞隆骨的药用价值已经受到了众多医药工作者的关注,尤其是对于风湿、类风湿性关节炎的治疗作用成为研究者关注的焦点。前期的药效学实验已经充分证明塞隆骨对类风湿性关节炎有非常好的治疗预防效果,且具有镇痛、

抗凝血等作用。为了进一步研究塞隆骨,为其深层次开发利用提供理论依据,本实验室对塞隆骨的作用机制进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 受试药物 塞隆骨水提物(SLG)及 90%醇沉部分(SLG90)。

制备方法:高原鼯鼠捕于青海省海北州。塞隆骨提取物由本实验室提取,先分离全骨,阴干,粉碎,混合取样,去离子水煎煮提取,减压浓缩,得干粉,冰箱保存备用。提取物主要成分为骨胶蛋白,蛋白含量大于 75%。所得干粉溶于 10 倍量的水中超声溶

收稿日期:2007-03-12

基金项目:重大基础研究前期研究专项(061Z041B01)

作者简介:赵晓辉(1979~),男,硕士研究生。研究方向:药用植物化学,电话:0971-6117264。

*通讯作者:陶燕铎, E-mail: hizhaoh@163.com

解、离心、取上清。所得上清加无水乙醇至终浓度为 50% ,静置、待沉淀完全、离心,沉淀 80 烘干得 50%部分。离心所得上清加无水乙醇至终浓度为 90% ,静置、离心,沉淀部分烘干即得 90%醇沉部分。

1.2 试验动物及实验材料 SPF级 BALB/c小鼠,性,6~8周龄,购自中国科学院上海实验动物中心。胎牛血清(FBS): Invitrogen公司产品, CFA(弗氏完全佐剂): Sigma公司产品, ELISA 用抗体 L-12p40、L-1、L-6、TNF- : BD PhaMingen 公司产品。酶标仪: 美国 Thermo, 产品型号: Multiskan MK3;二氧化碳培养箱;高速冷冻离心机; MicroBeta 多功能液闪/发光分析仪: PerkinElmer, 产品型号: 1450。

1.3 方法

1.3.1 造模及给药 BALB/c小鼠腹腔内注射乳白化后的 CFA 0.2 mL(含结核杆菌 1 mg/mL)诱导活化小鼠腹腔巨噬细胞,第 2天开始给药, SLG和醇沉 90%部分分两个剂量组,剂量分别为 0.72 g/kg及 0.36 g/kg,连续给药两周。

1.3.2 腹腔巨噬细胞计数 实验当天断头处死小鼠,用 10 mL PBS(含 2% FBS)分 3次洗出腹腔渗出液,收集洗出液各 8 mL,常规细胞计数。

1.3.3 流式细胞检测 将 PBS(含 2% FBS)洗出腹腔渗出液离心,用含 2% FBS的 PBS洗一遍后,重悬在含 10% FBS的 RPM I-1640培养液,计数,调细胞浓度。细胞表面黏附分子(Mac-1)荧光标记检测腹腔回收细胞中巨噬细胞表面分子 Mac-1的比例。用 CELLQuest软件进行分析。

1.3.4 腹腔巨噬细胞分离及细胞因子测定 另取

腹腔渗出液,用含 2% FBS的 PBS洗一遍后,重悬在含 10% FBS的 RPM I-1640培养液。以 2×10^5 cells/well加入 96孔平板,加入 LPS及 IFN- 刺激,培养过夜,收集上清,用细胞因子 ELISA 检测试剂盒(Pharmingen产品)测定培养上清中细胞因子 L-12p40、L-1、L-6、TNF- 的含量。实验方法参照试剂盒说明进行。酶标仪 450/570 nm处读 OD值,根据标准品所制得标准曲线得到样品中细胞因子的含量。试验重复 3次。测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间差异的比较。

2 结果

2.1 SLG对腹腔巨噬细胞数的影响 腹腔巨噬细胞计数发现各给药组腹腔巨噬细胞数与模型组比较都显著降低,说明塞隆骨提取物能够显著抑制巨噬细胞向腹腔的浸润趋化。结果见表 1。

Tab 1 Effect of SLG on peritoneal macrophages cell number(n = 8)

group	Cell $\times 10^7$ /mL ($\bar{x} \pm s$)
Normal	1.86 $\times 10^7 \pm 0.11$
Model	3.12 $\times 10^7 \pm 0.21^{##}$
SLG/0.36 g/kg	2.20 $\times 10^7 \pm 0.22^{**}$
SLG/0.18 g/kg	2.50 $\times 10^7 \pm 0.15^*$
90% /0.36 g/kg	1.96 $\times 10^7 \pm 0.21^{**}$
90% /0.18 g/kg	2.10 $\times 10^7 \pm 0.12^{**}$

Tab 1. All of the SLG treated groups peritoneal macrophages cell number was markedly decreased vs model * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ## $P < 0.01$ compared with normal

2.2 流式细胞检测 通过 FACS检测发现塞隆骨提取以 MAC-1表达强阳性的巨噬细胞为主。其抑制作用呈现良好的量效关系,且 90%醇沉部分效果优于水提物部分。结果见图 1。

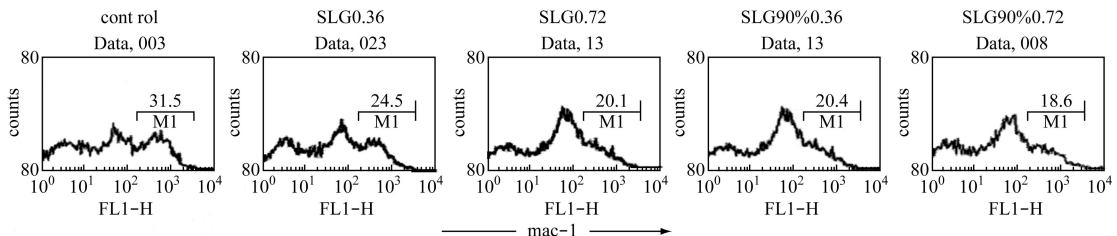


Fig 1 After SLG administered ip 14 days, peritoneal macrophages were collected and stained with mac-1, and the cells Mac-1⁺ proportion were determined by FACSCalibur

2.3 SLG对腹腔巨噬细胞产生细胞因子的影响 与正常组比较模型组细胞因子水平显著升高。SLG和醇沉 90%部分各剂量组显著抑制了腹腔巨噬细胞培养上清中细胞因子 L-12p40、L-1、L-6、TNF- 的产量。与模型组比较其抑制作用都有显著性,

提示塞隆骨提取物对由 CFA 诱导的腹腔巨噬细胞免疫功能亢进有显著抑制作用。且醇沉 90%部分的抑制效果明显优于水提部分,说明塞隆骨抑制免疫亢进的作用部位可能主要在 90%醇沉部分。结果见表 2。

Tab 2 Effect of SLG on Cytokine production of peritoneal macrophages

group	L-12(p40) /ng/mL	L-1 /pg/mL	L-6/pg/mL	TNF- /pg/mL
Normal	0.24 ±0.03	80 ±6.7	560 ±20	1311 ±120
Model	3.24 ±0.20	217 ±10.2	1365 ±87	3620 ±288
SLG/0.18 g/kg	2.60 ±0.23*	142 ±11.3*	710 ±26***	3431 ±131
SLG/0.36 g/kg	2.42 ±0.18*	130 ±8.3*	638 ±13***	3109 ±153*
90% /0.18 g/kg	1.87 ±0.05***	110 ±9.7**	620 ±28***	2818 ±177*
90% /0.36 g/kg	0.86 ±0.23***	98 ±11.1**	532 ±31***	2200 ±132**

Tab 2 SLGW (SLG water extracts) and 90% (SLG ethanol extracts) inhibits the production of L-12p40, L-1, L-6, TNF- from macrophages. Mouse macrophages were cultured with LPS(1 μg/mL) and IFN- (25 μg/mL) for 24 h in the presence of SLG. Culture supernatants were collected, and L-12p40, L-1, L-6, TNF- levels were determined by ELISA. Results are expressed as mean ±S.E.M. three independent experiments were performed with similar results. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 vs model.

3 讨论

通过实验发现 SLG水提部分及 90%醇沉部分均能够显著减少巨噬细胞(M)向腹腔的浸润, M属于一种抗原呈递细胞,它能够加工抗原并呈递给T细胞引起免疫反应,由于类风湿性关节炎(RA)是一种机体免疫亢进反应,所以M的减少就能够从抗原呈递这一过程抑制免疫反应源,降低由T细胞引起的免疫反应,从而抑制RA引起的机体免疫亢进。

RA是免疫介导的炎症性疾病,细胞因子网络失调与RA发病及病程进展密切相关。巨噬细胞等可分泌多种高水平的细胞因子和炎症介质,参与RA关节损伤的病理进程。M在滑膜组织炎症中的主要作用不仅是作为经典的抗原呈递细胞摄取非我抗原,并且能够分泌L-1等细胞因子,在这些细胞因子的参与下使淋巴细胞和M激活,进行免疫应答^[3],在类风湿性关节炎发病机理中起着‘中心犯罪’作用^[4-7]。本实验发现SLG水提物及90%醇沉部分都能够显著抑制CFA诱导的小鼠腹腔M产生促炎性细胞因子L-1、L-6、L-12和TNF-,显著抑制由抗原诱导的小鼠免疫亢进。提示SLG治疗类风湿性关节炎的靶细胞与M有关,主要通过抑制M向腹腔浸润,和降低其分泌促炎性细胞因子来达到调节免疫亢进,从而治疗疾病的目的。实

验中我们对SLG进行粗分发现90%醇沉部分对腹腔巨噬细胞的作用明显优于水提物,提示SLG有效作用部分可能在90%醇沉部分即水提物中的一些小肽类物质中。这为SLG的临床应用及进一步开发利用提供了有利的理论依据。

参考文献:

- [1] 海平. 塞隆骨抗炎作用的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2000, 523-526.
- [2] 魏立新, 张宝琛, 杜玉枝. 塞隆骨和虎骨的羟脯氨酸含量分析比较[J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(3): 9-12.
- [3] Tak P P, Smeets T J, Daha M R, et al. 1997. Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity[J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40: 217-225.
- [4] Arend WF. Interleukin-1 receptor antagonist- new member of the L-1 family[J]. *J Clin Invest*, 1991, 88: 1445-1451.
- [5] Brown FM, Maini RN, Feldmann M. TNF-α pivotal role in rheumatoid arthritis[J]. *Br J Rheumatol*, 1992, 31: 293-295.
- [6] Bathon JM, Hwang JJ, Shin LL, et al. Type VI collagen-specific messenger RNA is expressed constitutively by cultured human synovial fibroblasts and is suppressed by interleukin-1[J]. *Arthritis Rheum*, 1994, 37: 1350-1356.
- [7] Brennan FM, Gibbons DL, Cope AP, et al. TNF inhibitors are produced spontaneously by rheumatoid and osteoarthritic synovial joint cell cultures evidence of feedback control of TNF action[J]. *Scand J Immunol*, 1995, 42: 158-165.