文章编号:1000-5404(2009)19-1869-03

论著

N-乙酰氨基葡萄糖对应激小鼠巨噬细胞吞噬功能的调节作用

裴轶劲[1],吴小兰[1],毛方圆[2],陈婉燕[2],刘俊康[1] (第三军医大学:[1] 医学检验系暨药学院生物波研究室,[2] 学员旅 13 队,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨 N-乙酰氨基葡萄糖(N-Acetyl-D-glucosamine, GlcNAc)对应激小鼠模型腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophage, PMφ)吞噬功能的调节作用。**方法** 以足底电刺激法复制应激小鼠模型,将 50 只小鼠分为正常对照组、应激模型组、低剂量 GlcNAc 治疗组、中剂量 GlcNAc 治疗组和高剂量 GlcNAc 治疗组,每组 10 只。采用酵母吞噬法检测 PMφ 吞噬功能,MTT 法检测 PMφ 能量代谢水平,使用原子力显微镜观察 PMφ 吞噬酵母的情况。**结果** 与正常对照组相比,应激模型组 PMφ 吞噬功能明显下降($P<0.01$),能量代谢水平明显下降($P<0.01$),而中剂量和高剂量 GlcNAc 能有效提高巨噬细胞吞噬功能和调节细胞活性。**结论** GlcNAc 可促进应激小鼠 PMφ 的吞噬而改善免疫功能。

关键词: 应激;GlcNAc;巨噬细胞; 吞噬;免疫
中图法分类号: R-332; R392.12; R977.6 **文献标识码:** A

Regulation of N-Acetyl-D-glucosamine on macrophages function of stressed mice

PEI Yi-jin[1], WU Xiao-lan[1], MAO Fang-yuan[2], CHEN Wan-yan[2], LIU Jun-kang[1] ([1]Bio-wave Research Center, College of Laboratory Medicine, [2]13rd Student Team, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the regulative role of N-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) on the stressed mice macrophages function. **Methods** The stressed mice model was established by electric footshock method. The mice were divided into 5 groups: normal control group, stressed mice model group, low dose GlcNAc treatment group (0.25 ml 15% GlcNAc), medium-dose GlcNAc treatment group (0.5 ml 15% GlcNAc) and high-dose GlcNAc treatment group (1 ml 15% GlcNAc). GlcNAc was intragastrically injected to corresponding mice 2 h before the electrical stimulation. Peritoneal macrophage (PMφ) phagocytosis capability was detected by phagocytosis saccharomycete assay, and PMφ energy metabolism was detected by MTT assay. **Results** Compared with normal control group, stressed mice PMφ phagocytosis capability was significantly lower ($P<0.01$), and energy metabolism significantly reduced ($P<0.01$). High-dose GlcNAc and medium-dose GlcNAc enhanced effectively PMφ phagocytosis capability and improved the energy metabolism. **Conclusion** GlcNAc has regulative role on the dysfunction of stressed mice PMφ.

Key words: stress; N-Acetyl-D-glucosamine; macrophages; phagocytosis; immune

应激是机体对不良刺激或应激情景的心理和生理反应。研究表明,各种类型应激均可以导致免疫功能的障碍[1,2]。电击作为一种应激源,应用领域广泛,已被研究证实电击可影响机体免疫功能 ,例如使大鼠 $CD4^+/CD8^+$ T 淋巴细胞比例下降[3],可致小鼠(peritoneal macrophage, PMφ)吞噬功能降低,抑制 PMφ 生成 H_2O_2[4],抑制自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)细胞活性等[5]。作为肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的治疗药物缓激常泰,其化学本质为 N-乙酰氨基葡萄糖(N-Acetyl-D-glucosamine, GlcNAc),是一种特殊单糖,也是消炎、抗肿瘤、抗氧化作用及治疗骨关节炎、风湿性关节炎的有效药物[6]。但 GlcNAc 对电应激后免疫功能的作用报道甚少。本研究采用电刺激法诱导小鼠应激模型,研究 GlcNAc 对电应激小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响。

基金项目:重庆市自然科学基金(CSTC2006BB5068068)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB5068068)
作者简介:裴轶劲,女,重庆市人,博士,副研究员,主要从事干细胞生物学及生殖发育生物学方面的研究,发表论文 20 余篇。E-mail: peiyj@hotmail.com
通信作者:刘俊康, 电话:(023)68752191, E-mail:liujunkang@163.com
收稿日期:2009-01-14;修回日期:2009-03-17

1 材料与方法

1.1 动物及分组

昆明种小鼠50只，雌雄各半，体质量(20±5)g，由第三军医大学实验动物中心提供。常规饲养，分为5组，每组10只。分别为正常对照组；小鼠应激模型；低剂量组，小鼠电刺激前2 h灌胃0.25 ml 15% GlcNAc；中剂量组，小鼠电刺激前2 h灌胃0.5 ml 15% GlcNAc；高剂量组，小鼠电刺激前2 h灌胃1 ml 15% GlcNAc。

1.2 试剂仪器

MTT反应试剂(美国Sigma公司)；GlcNAc，批号20061225，江苏江山制药有限公司提供，用生理盐水配制成15%浓度；RPMI1640干粉(美国Gibco公司)；电击箱，自制，25 cm×24 cm×25 cm，可调电压0~220 V；LD4-2D型低速离心机(北京医用离心机厂)；CO_2培养箱(美国Format公司)；酶标仪550型(美国Bio-Rad公司)；XSZ-4G型光学显微镜(重庆光学仪器厂)；SPA400型原子力显微镜(日本精工公司)。

1.3 动物模型制作

根据文献[7]造模，以电刺激法诱导小鼠应激模型。将受试动物放入电击箱底部金属条上，四爪直接与金属条接触进行电刺激。刺激参数设置：电压强度25 V，刺激时间2~5 s，间隔30 s 1次，每日持续15 min。

1.4 小鼠PMφ吞噬功能测定

采用酵母菌吞噬法[8]检测PMφ吞噬功能。取酵母菌培养物混悬于含10%小牛血清的RPMI1640培养液，调整细菌浓度为4×10^6/ml，备用。用含10%小牛血清RPMI1640培养液调整小鼠PMφ细胞数为2×10^6/ml，于37 ℃，5% CO_2孵箱中培养2 h后，贴壁生长细胞即为巨噬细胞，备用。PMφ和酵母菌液等量混合，于37 ℃，5% CO_2孵箱中培养1 h后，甲醇固定，瑞氏染色，镜检，计算100个巨噬细胞里吞噬酵母的巨噬细胞数和其吞噬的酵母总数。按照公式计算巨噬细胞吞噬百分率。巨噬细胞吞噬百分率(%)=(100个巨噬细胞里吞噬酵母的巨噬细胞数/100个巨噬细胞)×100%；巨噬细胞吞噬指数=100个巨噬细胞里吞噬的酵母总数/100个巨噬细胞。

1.5 MTT法[9]检测小鼠PMφ能量代谢水平

各组制备好的PMφ，接种于96孔板中，计2×10^5个细胞，每孔200 μl培养液，5% CO_2孵箱中连续培养24 h后，每孔加入20 μl MTT，继续培养4 h；然后弃上清，每孔加入150 μl DMSO，室温下作用20 min，使结晶物完全溶解，Bio-Rad 550型酶标仪于570 nm处测吸光度值，结果以$D(570)$值表示PMφ能量代谢水平的高低。

1.6 原子力显微镜观察巨噬细胞吞噬酵母

PMφ和酵母菌液等量混合，立即吸0.2 ml到有蜡封圈的玻片内，于37 ℃，5% CO_2孵箱中培养1 h。然后弃去未黏附的多余悬液，自然干燥。甲醇固定片刻，每次用蒸馏水漂洗10 min，共2次。自然干燥后，按原子力显微镜扫描操作规程观察。

2 结果

2.1 PMφ吞噬酵母菌的形态观察

在原子力显微镜下，酵母菌呈椭球状(图1A)。对照组PMφ周围可以可吞噬多个酵母菌，PMφ摄取酵母菌时，细胞的表面形成凹陷(图1B)，低剂量组PMφ周围吸附的酵母菌相对少一些(图1C)，图中可见酵母菌被吞噬部分的形态，中高剂量组情况与对照组相似(图1D)，高剂量组PMφ周围吸附的酵母菌较多(图1E)，细胞的吞噬活性更强。

2.2 GlcNAc对PMφ吞噬功能的影响

与正常对照组相比，电刺激后应激模型组小鼠PMφ吞噬百分率和吞噬指数均显著下降($P<0.01$)，说明应激后PMφ吞噬功能显著改变。GlcNAc对PMφ吞噬功能的影响表现为量效关系，随着剂量的升高，吞噬百分率和吞噬指数升高，高中GlcNAc剂量治疗组小鼠吞噬百分率和吞噬指数，与应激模型组相比，有显著的上升($P<0.01$)，与正常对照组相比，GlcNAc高剂量治疗组小鼠吞噬百分率和吞噬指数均未有显著差异($P>0.05$)，说明高剂量GlcNAc为佳。见表1。

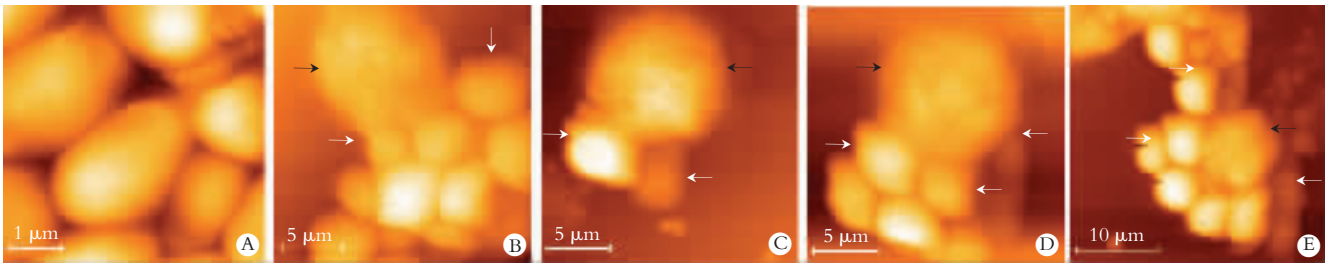
表1 GlcNAc对应激小鼠PMφ吞噬酵母功能的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	吞噬百分率(%)	吞噬指数
正常对照组	29.86±3.79	0.37±0.09
应激模型组	10.65±2.44[a]	0.13±0.04[a]
GlcNAc低剂量治疗组	11.67±2.36[a]	0.15±0.02[a]
GlcNAc中剂量治疗组	21.40±3.45[b]	0.27±0.09[b]
GlcNAc高剂量治疗组	26.55±2.76[b]	0.34±0.07[b]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与应激模型组比较

2.3 GlcNAc对PMφ能量代谢的影响

与正常对照组小鼠PMφ $D(570)$值(0.73±0.04)相比，电刺激后应激模型组小鼠PMφ $D(570)$值显著下降为(0.46±0.02)($P<0.01$)，说明应激后PMφ能量代谢显著改变。低、中、高GlcNAc剂量治疗组小鼠$D(570)$值提高，分别为(0.53±0.03)、(0.64±0.02)、(0.70±0.06)，与应激模型组相比，中、高GlcNAc剂量有显著的上升($P<0.01$)，说明中、高剂量GlcNAc作用为佳。



A：酵母菌形态；B：对照组；C：低剂量GlcNAc组；D：中剂量GlcNAc组；E：高剂量GlcNAc组　　黑色箭头指向PMφ，白色箭头指向酵母菌

图1 原子力显微镜下观察各组PMφ摄取酵母菌

3　讨论

巨噬细胞是机体免疫系统中重要的免疫效应细胞,具有非特异免疫功能,其吞噬功能是机体免疫功能的一个重要指标,吞噬功能强弱反应了机体免疫功能的高低。本研究结果发现,足底电刺激应激后小鼠 PMφ 吞噬功能显著下降,明显低于对照组,与文献[4]报道一致。而灌胃 GlcNAc 中高剂量都能提高应激小鼠吞噬百分率和吞噬指数,吞噬百分率和吞噬指数具有一致趋性,并且高剂量 GlcNAc 灌胃使应激小鼠吞噬百分率和吞噬指数提高更多,说明 GlcNAc 对改善 PMφ 吞噬功能具有一定的剂量效应。灌胃高剂量 GlcNAc PMφ 吞噬功能明显加强,这一结果与原子力显微镜的形态观察一致,高剂量 GlcNAc 组巨噬细胞表面凹陷,可吸附较多的酵母。另一方面,细胞内琥珀脱氢酶位于线粒体的嵴内膜上,参与三羧酸循环以及细胞氧化呼吸过程,可反映出细胞活性状态。电刺激应激小鼠 PMφMTT 反应吸光度值降低,显示能量代谢降低,细胞活性降低。高中剂量 GlcNAc 治疗组不仅促进细胞吞噬功能而且使 PMφ 代谢 MTT 形成 MTT-甲臜复合物的能力越高,能量代谢明显增加。综上所述,GlcNAc 可以通过调节免疫功能,提高 PMφ 能量代谢而对应激小鼠达到促进作用。本研究证实了 GlcNAc 能增强调节应激小鼠的免疫功能,可为拓宽 GlcNAc 的临床应用奠定一定的理论依据。

在 O-GlcNAc 转移酶作用下,细胞内经过六碳糖合成途径合成的 UDP-GlcNAc 作为高能供体将 GlcNAc 以共价键的方式连接到细胞质和细胞核蛋白质的丝氨酸或苏氨酸残基上,进行蛋白 O-GlcNAc 糖基化修饰,O-GlcNAc 糖基化修饰在细胞内具有重要的生理功能[10]。目前公认蛋白的 O-GlcNAc 修饰是细胞响应环境变化,对抗应激的一种重要的应答方式。多种细胞应激类型如乙醇、氧化、紫外照射、渗透压等都伴随 O-GlcNAc 修饰水平的提高[11]。因此应激情况下,要求细胞内有更高的 O-GlcNAc 蛋白修饰水平,对 UDP-GlcNAc 有更多的需求。外源性 GlcNAc 可发挥补充能量供应的作用,保障 UDP-GlcNAc 的充足供应。本研究结果表明外源性的 GlcNAc 对电应激后 PMφ 吞噬功能和能量代谢的调节作用,也有可能是 GlcNAc 直接参与了调节机体的非特异免疫过程。但其确切机制仍需进一步的研究。

文献[12]报道,GlcNAc 可能存在着稳定肥大细胞控制 IBS 患者症状或治疗 IBS 的作用机制。结合本研究结果,我们推测 GlcNAc 对 IBS 患者的治疗机制可能是多渠道综合的结果,治疗机制之一有可能是:IBS 复杂病因引起应激反应而至免疫功能异常[13],GlcNAc 参与了调节机体的免疫过程,相关的实验正研究中。

参考文献:

[1] Larson M R, Ader R, Moynihan J A. Heart rate, neuroendocrine, and immunological reactivity in response to an acute laboratory stressor[J]. Psychosom Med, 2001, 63(3): 493 - 501.

[2] Starkie R L, Hargreaves M, Rolland J, *et al*. Heat stress, cytokines, and the immune response to exercise[J]. Brain Behav Immun, 2005, 19(5): 404 - 412.

[3] Nakata A, Araki S, Tanigawa T, *et al*. Effects of uncontrollable and controllable electric shocks on T lymphocyte subpopulations in the peripheral blood, spleen, and thymus of rats[J]. Neuroimmunomodulation, 1996, 3(6): 336 - 341.

[4] Stanojevic S, Mitic K, Vujic V, *et al*. The influence of stress and methionine-enkephalin on macrophage functions in two inbred rat strains [J]. Life Sci, 2007, 80(10): 901 - 909.

[5] Oishi K, Nishio N, Konishi K, *et al*. Differential effects of physical and psychological stressors on immune functions of rats [J]. Stress, 2003, 6(1): 33 - 40.

[6] 李　慧,曹秀明,季宇彬,等. N-乙酰氨基葡萄糖及 D-氨基葡萄糖盐酸盐研究进展[J]. 黑龙江医药,2007,20(2): 118 - 120.

[7] Persoons J H, Moes N M, Broug-Holub E, *et al*. Acute and long-term effects of stressors on pulmonary immune functions [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17(2): 203 - 208.

[8] 曹永国,邓旭明,曾　胜,等. Caffeoyl Glycoside 对小鼠免疫细胞功能的影响[J]. 中国农学通报,2008,24(8):1 - 5.

[9] 朱正美,刘　辉. 简明免疫学技术[M]. 北京:科学出版社,2002: 206 - 207.

[10] 宋丽娜,王京兰,钱小红,等. O-GLcNAc 修饰蛋白质的生理功能和研究方法[J]. 生命的化学,2007, 27(1): 14 - 17.

[11] 杨新颖,李　静,耿美玉. 蛋白质 O-GLcNAc 糖基化及其细胞生物学功能[J]. 细胞生物学杂志,2007, 29(5): 682 - 686.

[12] 刘俊康,吴小兰,陈　杰,等. 缓激常泰拮抗细菌潜生体对肥大细胞激活作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(7): 579 - 581.

[13] Spiller R C, Jenkins D, Thornley J P, *et al*. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome[J]. Gut, 2000, 47(6): 804 - 811.

(编辑　张　维)