

微囊藻毒素-LR 对小鼠巨噬细胞吞噬功能及活性氧水平的影响

梁 艳, 卢 彦, 沈萍萍*

(南京大学医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要: 目的 观察微囊藻毒素 LR (MC-LR) 对原代和传代巨噬细胞功能的影响。方法 取 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞, 体外培养液中分别加入终浓度为 1, 10, 100 和 1000 nmol·L⁻¹ 的 MC-LR, 同时以巨噬细胞株 RAW264.7 为对照, 分别采用中性红吞噬实验和二氢罗丹明 123 探针检测实验, 测定细胞吞噬活性和细胞内活性氧 (ROS) 水平。结果 MC-LR 对小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能有浓度依赖的抑制作用。当 MC-LR 浓度高于 10 nmol·L⁻¹ 时, 小鼠腹腔巨噬细胞的胞内 ROS 水平也明显降低。但 MC-LR 对小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞的吞噬功能和细胞内 ROS 水平均无明显影响。结论 MC-LR 可抑制小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能和 ROS 水平, 原代巨噬细胞对 MC-LR 的敏感性高于传代细胞 RAW264.7。

关键词: 微囊藻毒素; 巨噬细胞; 吞噬作用; 活性氧

中图分类号: R994.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2007)01-0055-04

微囊藻毒素 (microcystin, MC) 为有毒淡水蓝藻在生物代谢过程中产生的次生代谢物质, 可对动物及人类产生多方面的毒性作用, 并且具有肿瘤促进剂的功能。研究表明, MC 类分子是一组性质、结构极为相似的环状七肽分子, 由于结构中存在两种可变的 L-氨基酸, 因而产生多种异构体。存在最普遍、含量相对较多且毒性较大的是 MC-LR, MC-RR

和 MC-YR, 其中 L, R 和 Y 分别代表亮氨酸、精氨酸和酪氨酸。MC 侵染动物机体主要是通过侵蚀小肠粘膜上皮细胞和粘膜固有层进入血浆, 然后转运到肝、肾、肺和心脏等器官, 最后分布至全身。有关 MC 肝毒性的研究报道最多, 已发现的致毒机制除与蛋白磷酸酶抑制相关外, 还与 DNA 突变、细胞凋亡和氧化损伤有关。近期报道^[1] MC 还具有较强的肾毒性, 可使肾脏出现炎症反应。此外, MC 还能诱发机体多脏器损伤, 一些 MC 的异构体可引起心脏输出量下降、血管扩张、血压降低、心率下降、多巴胺和异丙肾上腺素分泌等血液动力学改变及激素分泌紊乱^[2]。

近年来的研究表明, MC 对免疫功能有一定的干扰作用, 如诱导人淋巴细胞凋亡或坏死^[3]; 降低白细胞介素 2 (IL-2) mRNA 的稳定性而抑制淋巴细胞的免疫活性^[4]; 还可诱导染色体发生断裂^[5-6], 并改变人外周血多形核白细胞的粘附特性等^[7]。我们的前期工作也发现, MC 可引起小鼠肝、脾肿大, 抑制小鼠的 T 淋巴细胞增殖及 B 淋巴细胞产生抗体的能力^[8]。在细胞实验中, MC 表现出对免疫细胞功能的抑制作用, 如下调小鼠巨噬细胞产生诱导型一氧化氮合酶的量, 降低 IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α 、粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子和干扰素 γ 的 mRNA 水平^[9]。为了进一步研究 MC-LR 对免疫功能的影响, 本研究以吞噬活性及细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平为指标, 检测了 MC-LR 对巨噬细胞功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器

健康 BALB/c 纯系小鼠, δ , 18 ~ 22 g, 由南京军区总医院动物中心提供, 动物合格证号: 苏动(质)95047。小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。MC-LR 购自美国 A. G. Scientific, 纯度 >

收稿日期: 2006-07-03 接受日期: 2006-11-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571538)

作者简介: 梁 艳 (1981 -), 女, 江苏省南京人, 理学硕士; 卢 彦 (1978 -), 江苏省南京人, 理学硕士; 沈萍萍 (1963 -), 江苏省如东人, 教授, 博士生导师, 理学博士, 主要从事细胞信号转导机制研究。

* 联系作者 E-mail: ppshe@nju.edu.cn Tel: (025) 83686635 Fax: (025) 83324605

98.0%。MC-LR 先溶于少量甲醇,然后用水稀释至 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 根据所需浓度加入细胞培养液中。抗生素 ($100 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素混合液) 为美国 Sigma 公司产品。RPMI 1640 细胞培养液购自美国 Gibco 公司。胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。二氢罗丹明 123 (dihydrorhodamine 123, DHR) 购自美国 Maker Gene Technologies 公司。中性红为上海三爱思试剂有限公司产品。96 孔平底细胞培养板购于美国 Corning Coster 公司。96 孔酶标板购自丹麦 NUNC 公司。酶标仪为 Bio-RAD 13550 型微量读板仪。

1.2 单层小鼠腹腔巨噬细胞的制备

小鼠断颈处死后,无菌条件下腹腔内注射 4 mL 预冷的 PBS,用消毒拇指轻揉腹部数次后,用无菌吸液管吸回腹腔液体,离心,用 PBS 洗涤收集到的细胞并用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗液 ($100 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素) 的 RPMI 1640 培养液调整细胞密度为 $1.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。细胞悬液加入 96 孔培养板,每孔 200 μL ,置于 37°C , 5% CO_2 培养箱培养 2 h, 倾去上清液,用 RPMI 1640 培养液洗去未贴壁细胞,制得腹腔单层细胞。

1.3 细胞培养及毒素处理

正常生长的 RAW264.7 细胞培养于含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗液的 RPMI 1640 培养基中,培养条件为 37°C , 5% CO_2 。细胞培养于 96 孔板上,每孔约 2×10^5 个细胞,贴壁 12 h 后倾去上清液,用 RPMI 1640 培养液洗去未贴壁细胞后开始毒素处理。

对于已制得的单层细胞,镜检。每孔加入 100 μL 培养液,各处理组中加入 100 μL 不同浓度的 MC-LR,使终浓度分别达到 1, 10, 100 和 1000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,空白对照孔加 100 μL 培养液, 37°C , 5% CO_2 培养。细胞内 ROS 水平测定实验中,同时设定不加 DHR 的空白对照组以及含有 DHR 的对照组。

1.4 巨噬细胞吞噬活性检测

MC-LR 处理 4 h 后,弃去上清,用 PBS 洗涤细胞。参考相关文献^[10],测定对中性红的吞噬活性。每孔加入 100 μL 0.1% 中性红溶液,培养 30 min。弃去上清,用 PBS 洗涤细胞,除去细胞外未被吞噬的中性红,排除干扰。加入 200 μL 裂解液 (100% 乙醇:100% 乙酸 = 1:1),混匀 10 min。在酶标仪上测 550 nm 处的吸光度 ($A_{550 \text{ nm}}$) 值。

1.5 巨噬细胞内活性氧测定

采用 DHR 作为指示细胞内 ROS 水平的荧光探

针,研究 MC-LR 对小鼠巨噬细胞 ROS 释放量的影响。DHR 本身不发光,脂溶性 DHR 进入细胞后,被细胞内的 ROS 氧化后发出荧光,从而指示细胞内的 ROS 水平。MC-LR 处理 4 h 后,弃去上清,用 PBS 洗涤细胞。每孔加入含有 DHR ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 探针的 RPMI 1640 培养液继续培养 30 min。弃去上清,用 PBS 洗去未进入细胞的探针,每孔中再加入 200 μL PBS,在酶标仪上读取荧光值 (激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm)。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行显著性分析, $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 微囊藻毒素-LR 对巨噬细胞吞噬活性的影响

巨噬细胞吞噬中性红实验结果表明,MC-LR 对腹腔巨噬细胞的吞噬活性有明显的抑制作用。细胞培养液中加入 MC-LR 处理 4 h 后,与对照组相比,巨噬细胞吞噬活性显著降低 (表 1)。MC-LR 处理浓度为 1, 10, 100 和 1000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对腹腔巨噬细胞吞噬活性的抑制率分别为 42%, 61%, 68% 和 70%,抑制作用随 MC-LR 浓度的增加而增大 ($r^2 = 0.8413$)。而细胞株 RAW264.7 吞噬活性检测结果表明,MC-LR 对 RAW264.7 细胞的吞噬活性无明显影响 (表 1)。

2.2 微囊藻毒素-LR 对巨噬细胞活性氧水平的影响

表 2 结果表明,MC-LR 可降低腹腔巨噬细胞内

Tab 1. Effect of microcystin-LR (MC-LR) on phagocytosis of peritoneal macrophages of mice and RAW264.7 cells

MC-LR / $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Phagocytic activity ($A_{550 \text{ nm}}$)	
	Peritoneal macrophages	RAW264.7 cells
0	0.960 ± 0.082	2.24 ± 0.34
1	$0.553 \pm 0.087^{**}$	2.23 ± 0.36
10	$0.378 \pm 0.054^{**}$	2.20 ± 0.29
100	$0.300 \pm 0.052^{**}$	2.27 ± 0.32
1000	$0.292 \pm 0.013^{**}$	2.23 ± 0.40

Peritoneal macrophages and RAW264.7 cells were seeded, respectively, into 96-well microplates at the density of 20 000 cells per well. The cells were incubated with MC-LR for 4 h. And then incubated with neutral red for 0.5 h to test the phagocytic activity. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. $^{**} P < 0.01$, compared with medium control ($0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Tab 2. Effect of microcystin-LR on reactive oxygen species level of peritoneal macrophages and RAW264.7 cells

Group	Fluorescence intensity	
	Peritoneal macrophages	RAW264.7 cells
Medium control	93 ± 3 **	90 ± 13 **
DHR control	613 ± 42	704 ± 145
DHR + MC-LR 1	529 ± 34	729 ± 58
10	457 ± 30 *	691 ± 63
100	407 ± 6 **	727 ± 100
1000	389 ± 15 **	706 ± 132

Peritoneal macrophages and RAW264.7 cells were seeded, respectively, into 96-well microplates at the density of 20 000 cells per well. The cells were incubated with MC-LR 1, 10, 100 and 1000 nmol·L⁻¹, respectively, for 4 h. And then incubated with dihydrorhodamine 123 (DHR) for 0.5 h to test the reactive oxygen species level indicated by fluorescence intensity. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with DHR control.

ROS 水平,随着 MC-LR 浓度的加大,MC-LR 对巨噬细胞内 ROS 水平的抑制作用逐渐增强 ($r^2 = 0.9304$),当 MC-LR 浓度达到 1000 nmol·L⁻¹时,细胞内 ROS 降至基础水平的 64%。MC-LR 对 RAW264.7 细胞的 ROS 水平无明显影响。

3 讨论

MC 对动物及人类的毒理作用是多方面的,如肝肾毒性、神经毒性和胃肠道组织病理学改变等。已有研究表明,MC 可干扰机体免疫系统的正常功能,导致机体清除异物、损伤细胞及癌变细胞的能力下降。巨噬细胞是一种多功能免疫细胞,其活性和功能降低,会导致机体免疫功能整体失衡。Hernandez 等^[7]的工作已表明 MC 可影响巨噬细胞发挥正常生物学功能。

为了研究 MC-LR 对巨噬细胞功能的影响,本研究对巨噬细胞吞噬活性和细胞内 ROS 水平进行了初步检测。结果显示,MC-LR 可显著降低小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬活性,且呈一定的剂量-效应关系。巨噬细胞的吞噬活性是反映非特异性免疫防护机制的一个重要指标,MC-LR 降低原代巨噬细胞的吞噬能力,表明该毒素可影响巨噬细胞的免疫防御功能,从而对机体的天然免疫能力产生抑制作用。此外,由于巨噬细胞还担负着抗原提呈作用,所以推测 MC-LR 对巨噬细胞吞噬处理抗原的能力也可能产

生一定的抑制作用,并可能对随后的特异性体液免疫应答造成影响,这与我们前期的实验结果相符合^[8]。

细胞内 ROS 水平也是反映巨噬细胞功能的指标之一^[11]。在机体免疫防御过程中,巨噬细胞通过产生一定量的 ROS,破坏细菌的细胞膜和病毒的蛋白质,从而消灭外来病原微生物。本实验发现,MC-LR 处理原代腹腔巨噬细胞后,细胞内 ROS 水平受到了一定的抑制,随着 MC-LR 浓度的增大,细胞内 ROS 水平下降愈加明显。

目前,有关原代巨噬细胞及传代细胞对 MC-LR 的敏感性差异方面的研究尚未见报道。因此,本实验选取了细胞株 RAW264.7 进行了同步实验,试图比较 MC-LR 对小鼠原代腹腔巨噬细胞和细胞株 RAW264.7 的不同作用。在巨噬细胞吞噬活性检测实验中发现,在与原代细胞相同的处理条件下,MC-LR 对细胞株 RAW264.7 吞噬功能无明显影响,初步表明细胞株 RAW264.7 对 MC-LR 不敏感。在细胞内 ROS 水平检测实验中,MC-LR 未能引起细胞内 ROS 水平的降低,进一步验证 RAW264.7 对 MC-LR 不敏感。

本实验一方面观察了 MC-LR 对原代腹腔巨噬细胞功能的抑制作用,同时也发现 RAW264.7 对 MC-LR 的敏感性远低于原代巨噬细胞。在 MC 对传代细胞的毒性研究方面,谷康定等^[12]的研究表明,MC 对传代细胞如 HepG2 细胞、HeLa 细胞等的毒性不明显,本研究也发现类似现象。已有研究表明 MC 在动物体内是以胆汁酸转运系统进入肝脏,而 MC 是否可通过一定的转运体系进入巨噬细胞还有待进一步研究。

4 参考文献:

- [1] Fischer WJ, Dietrich DR. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, **164**(1):73-81.
- [2] Kwon YG, Huang HB, Desdoutis F, Girault JA, Greengard P, Nairn AC. Characterization of the interaction between DARPP-32 and protein phosphatase 1 (PP-1): DARPP-32 peptides antagonize the interaction of PP-1 with binding proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(8):3536-3541.
- [3] Mankiewicz J, Tarczyska M, Fladmark KE, Doskeland

- SO, Walter Z, Zalewski M. Apoptotic effect of cyanobacterial extract on rat hepatocytes and human lymphocytes [J]. *Environ Toxicol*, 2001, **16**(3):225–233.
- [4] Yea SS, Kim HM, Oh HM, Paik KH, Yang KH. Microcystin-induced down-regulation of lymphocyte functions through reduced IL-2 mRNA stability[J]. *Toxicol Lett*, 2001, **122**(1):21–31.
- [5] Mankiewicz J, Walter Z, Tarczyska M, Palyvoda O, Wojtysiak-Staniaszczyk M, Zalewski M. Genotoxicity of cyanobacterial extracts containing microcystins from Polish water reservoirs as determined by SOS chromotest and comet assay[J]. *Environ Toxicol*, 2002, **17**(4):341–350.
- [6] Song RX, Liu ZT, Shen PP. Injury effect of microcystins extracted from Taihu lake on chromosome and DNA[J]. *Chin J Public Health* (中国公共卫生), 2004, **20**(12):1466–1467.
- [7] Hernandez M, Macia M, Padilla C, Del Campo FF. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte adherence by cyanopeptide toxins[J]. *Environ Res*, 2000, **84**(1):64–68.
- [8] Sun L, Shen PP, Zhou Y, Hua ZC. Effects of Tai lake bloom microcystins on immune function of mice [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2002, **16**(3):226–230.
- [9] Chen T, Zhao X, Liu Y, Shi Q, Hua Z, Shen P. Analysis of immunomodulating nitric oxide, iNOS and cytokines mRNA in mouse macrophages induced by microcystin-LR[J]. *Toxicology*, 2004, **197**(1):67–77.
- [10] Yao JF, Wu L, Wu XZ, Han F, Gao XD. Immuno-enhancing effect of YCP obtained from a marine filamentous fungus *Keissleriella* sp. YS 4108 on mice peritoneal macrophage[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2004, **35**(6):573–575.
- [11] Yang XB, Mei QB, Zhou SY, Teng ZH, Wang HF. The role of Angelica polysaccharides in inducing effector molecule release by peritoneal macrophages[J]. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2004, **20**(6):747–749.
- [12] Gu KD, Lin QX. Cytotoxicity of microcystin-LR on cultured cells[J]. *Chin J Public Health* (中国公共卫生), 2004, **20**(4):411–412.

Effect of microcystin-LR on phagocytic function and reactive oxygen species level of mouse macrophages

LIANG Yan, LU Yan, SHEN Ping-Ping*

(National Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: **AIM** To investigate the effect of microcystin-LR (MC-LR) on the phagocytic function of mouse peritoneal macrophages and RAW264.7 cells. **METHODS** Macrophages were isolated from the peritoneal cavity of BALB/c mice and primary culture was performed. The macrophages were incubated with MC-LR 1, 10, 100 and 1000 nmol·L⁻¹, respectively, for 4 h. Then, the phagocyte ability of peritoneal macrophages to the dye neutral red was measured. The level of reactive oxygen species (ROS) in macrophages was analyzed with dihydrohodamin 123 staining assay. The mouse RAW264.7 cells were treated with MC-LR and the phagocyte ability and ROS level were measured, too. **RESULTS** MC-LR significantly decreased phagocytic function in a

concentration-depended manner, meanwhile the level of ROS in macrophages was notably suppressed when the MC-LR concentration was higher than 10 nmol·L⁻¹. However, MC-LR didn't exhibit any obvious effect on mouse RAW264.7 cells. **CONCLUSION** MC-LR suppresses the phagocytic function and ROS generation of peritoneal macrophages. And the peritoneal macrophages are more sensitive to MC-LR than RAW264.7 cells.

Key words: microcystin-LR; macrophages; phagocytosis; reactive oxygen species

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(30571538)

* Corresponding author.

(本文编辑 齐春会)