

鲑鱼降钙素对小鼠腹腔巨噬细胞 释放一氧化氮的影响

嵇扬 陆红 吴敏

【摘要】 目的 研究鲑鱼降钙素对小鼠腹腔巨噬细胞释放一氧化氮的影响。方法 NO以 Griess 试剂测定。结果 效价为 1~8 U/ml 的鲑鱼降钙素能显著抑制小鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮释放, 呈现剂量依赖性, 抑制率为 7.75%~71.44%。结论 鲑鱼降钙素对小鼠腹腔巨噬细胞释放一氧化氮的抑制作用可能是其骨质疏松治疗作用的机理之一。

【关键词】 鲑鱼降钙素; 一氧化氮; 巨噬细胞

Effect of Salcatonin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide from mouse peritoneal macrophage in vitro. Ji Yang, LU Hong, WU Min. Institute for Drug and Instrument Control General Rear-service Department of PLA, Beijing 100071, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Salcatonin on LPS-induced release of NO from mouse peritoneal macrophage *in vitro*. **Methods** NO was detected by Griess method. **Results** Salcatonin 1-8 U/ml significantly reduced NO synthesis and secretion from mouse peritoneal macrophage *in vitro*. **Conclusion** The effects of Salcatonin on LPS-induced release of NO from mouse peritoneal macrophage *in vitro* may be one of anti-osteoporosis mechanism of Salcatonin.

【Key words】 Salcatonin; Nitric oxide; Macrophages

鲑鱼降钙素(Salcatonin)是肽类血钙调节激素。目前,临床主要将其用于治疗骨质疏松症^[1]。近年来的研究发现:一氧化氮(NO)-一氧化氮合酶(NOS)系统在骨代谢中起重要作用^[2]。腹腔巨噬细胞可用来研究药物对NO释放的影响^[3,4]。为阐明鲑鱼降钙素的作用机理,笔者探讨其对小鼠腹腔巨噬细胞释放一氧化氮的影响。现报道如下。

材料和方法

1. 实验动物: BALB/C 小鼠, 雄性, 体重(20±2)g 购自军事医学科学院实验动物中心, 动物许可证号: 军医动字 95012。

2. 药品与试剂: 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS) Sigma 产品; RPMI 1640 培养基(Gibco 产品); N-1-萘乙二胺盐酸盐(分析纯), 磺胺(分析纯), 北京芳草医药化工研制公司; 其他均为分析纯试剂。鲑鱼降钙素注射液: 河北八一制药厂批号为 990909; 规格为 40~60 效价单位/ml; 以 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液将该注射液稀释至实验用浓度。

3. 仪器: Σ 960 型酶标仪(Metertech Inc)中国台湾

4. 标准曲线的制备: 精密称取 NaNO₂ 6.9 mg, 加水至 100.0 ml (1 mmol/L), 分别精密吸取 1 mmol/L NaNO₂ 液 0.5、1.0、1.5、2.0 ml, 加水至 10.0 ml (50、100、150、200 nmol/L); 50、100、150、200 nmol/L NaNO₂ 液各 100 μ l, 加 Griess 试剂(含 1% 磺胺、0.1% N-1-萘乙二胺盐酸盐、2.5% 磷酸) 100 μ l, 室温放置 10 min, 在 Σ 960 型酶标仪上 490 nm 处测定各孔吸收度值; 以浓度值(C)为横坐标、相应的吸收度值(A)为纵坐标绘制标准曲线。结果为:

$$C(\text{nmol/L}) = 210.2293A + 1.0240 \quad r = 0.9999$$

5. 腹腔巨噬细胞的制备: BALB/C 小鼠拉颈处死后, 在 75% 酒精中浸 2~3 s, ip 含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液 3.5 ml/只, 轻揉 1 min 后抽出腹腔液, 离心(1 000 r/min, 5 min, 4℃), 弃上清, 巨噬细胞(M ϕ)以 D-Hanks 液洗 2 次, 以含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液悬浮 M ϕ , 计数, 调整 M ϕ 细胞数为 1×10⁶/ml; 铺板(96 孔板: 0.2 ml/孔; 24 孔板: 1.0 ml/孔); 置 37℃ 5% CO₂ 培养箱内培养, 2 h 后以 D-Hank's 液洗去未贴壁细胞, 重新加入含 10% 小牛血

作者单位: 100071 北京, 解放军总后勤部卫生部药品仪器检验所(嵇扬、吴敏); 空军四六三医院(陆红)

清的 RPMI 1640 培养液。

6. 统计学处理:采用 Origin 5.0 软件, *t* 检验。

结 果

1. LPS 对腹腔巨噬细胞释放一氧化氮的影响: 在 24 孔板上 M ϕ 内加入 LPS, 使其终浓度分别为 20 $\mu\text{g/ml}$ 和 40 $\mu\text{g/ml}$; 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱内培养 3、9、12、16、20、24、33、42、58、66 h 后, 每孔取培养上清 100 μl , 加 Griess 试剂 100 μl , 室温放置 10 min, 在酶标仪($\Sigma 960$)上 490 nm 处测定各孔吸收度值, 从标准曲线上找出相应的 NO 浓度值。结果见表 1。

表 1 LPS 对 M ϕ 释放一氧化氮的影响

时间 (h)	NO 浓度 (nmol/L)		
	对照组	LPS20	LPS40
3	9.07 \pm 1.29	8.96 \pm 1.49	9.38 \pm 1.34
9	12.01 \pm 1.98	13.37 \pm 1.38	13.95 \pm 1.80
12	16.58 \pm 1.59	21.89 \pm 2.05*	21.78 \pm 2.14*
16	18.26 \pm 1.21	26.93 \pm 0.60*	28.25 \pm 0.56*
20	23.26 \pm 2.76	38.55 \pm 2.72*	39.97 \pm 2.10*
24	26.15 \pm 4.43	47.38 \pm 3.16*	48.69 \pm 1.82*
33	29.93 \pm 4.93	65.72 \pm 3.42*	66.20 \pm 3.08*
42	32.14 \pm 5.56	77.97 \pm 3.50*	80.28 \pm 3.99*
58	32.35 \pm 6.07	86.38 \pm 3.05*	89.11 \pm 6.38*
66	38.23 \pm 6.89	97.52 \pm 4.39*	96.89 \pm 6.74*

注: $\bar{x} \pm s, n = 4$, 与对照孔比: * $P < 0.05$

由表 1 可见, M ϕ 释放一氧化氮的量与 LPS 终浓度相关, 即: 当 LPS 终浓度增加时, M ϕ 释放一氧化氮的量也有所增加。LPS 终浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 时, 已可使 M ϕ 释放一氧化氮的量显著增加, 满足实验需要。12 h 时 LPS 已显著增加 M ϕ 的一氧化氮释放量, 随着作用时间延长, 该释放量逐步增加。我们选取 24、48 h, 考察药物对 M ϕ 释放一氧化氮的影响。

2. 鲑鱼降钙素对 LPS 致腹腔巨噬细胞一氧化氮释放量增加的影响: 在 96 孔板上 M ϕ 内加入 LPS, 使其终浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$; 随后样品孔加入鲑鱼降钙素, 使其终浓度分别为 1、2、4、8 效价单位/ml; 对照孔加入同体积含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液; 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱内培养 24、48 h 后, 每孔取培养上清 100 μl , 加 Griess 试剂 100 μl , 室温放置 10 min, 在 $\Sigma 960$ 型酶标仪上 490 nm 处测定各孔吸收度值, 从标准曲线上找出相应的 NO 浓度值。结果见表 2。

表 2 鲑鱼降钙素对 LPS 致 M ϕ 一氧化氮释放量增加的影响

项别	NO $^-$ 浓度: nmol/L			
	24 h	抑制率%	48 h	抑制率%
对照孔	28.37 \pm 1.99		36.57 \pm 2.40	
LPS20	46.71 \pm 2.51*		76.41 \pm 2.40*	
鲑鱼降钙素 1	43.09 \pm 1.04*	7.75	73.06 \pm 1.43*	4.38
鲑鱼降钙素 2	44.03 \pm 1.35*	5.74	71.31 \pm 2.51*	6.67
鲑鱼降钙素 4	41.19 \pm 1.67*	11.82	64.21 \pm 1.78*	15.97
鲑鱼降钙素 8	13.34 \pm 4.92*	71.44	31.31 \pm 9.13*	59.02

$$\text{抑制率} \% = \frac{\text{LPS20 NO 浓度 (nmol/L)} - \text{鲑鱼降钙素 NO 浓度 (nmol/L)}}{\text{LPS20 NO 浓度 (nmol/L)}} \times 100\%$$

100%

注: $\bar{x} \pm s, n = 4$ 与对照孔比: * $P < 0.05$, 与 LPS20 孔比: * $P < 0.05$

可见, 浓度为 1 ~ 8 效价单位/ml 鲑鱼降钙素对 LPS 致 M ϕ 一氧化氮释放量增加有抑制作用, 并呈现剂量依赖性。

讨 论

NO 是一氧化氮合酶(NOS)催化 L-精氨酸的产物, 参与多种体内生理病理过程。现已有 3 种不同亚型的 NOS 被识别。其中诱导形式的 NOS(i NOS) 由巨噬细胞分得, 存在于巨噬细胞、中性粒细胞和血管内皮细胞内。i NOS 是由内毒素脂多糖和/或细胞因子如 TNF- α 、IL-2、IFN- γ 等诱导产生的。i NOS - 经诱导生成, 活性可维持数小时到数天, 并催化产生大量 NO。NO 是一种不稳定的自由基, 合成后很快被氧化成 NO $_2$, 以硝酸根(NO $_3^-$)和亚硝酸根(NO $_2^-$)的形式存在于细胞外液中, 可以 Griess 试剂测定其浓度。目前认为: NO 的体内作用具有双重性既有保护作用, 又有损伤作用。在离体培养的细胞中, 则主要表现为其细胞毒作用^[5-7]。

近年来的研究表明, NO-NOS 系统在骨代谢中起重要作用。NO 对骨细胞活性的影响具有双重性: 适量的 NO 增强细胞因子诱导的骨吸收, 对维持成骨细胞的生长及破骨细胞的正常功能必不可少; 而高浓度的 NO 通过抑制破骨细胞形成和抑制成熟破骨细胞的吸收功能而抑制骨吸收, 同时对成骨细胞产生抑制甚至毒性作用^[2]。因而, 提示 NO 可能参与与细胞因子活化有关的疾病中骨丢失的发病机理。

降钙素作为骨和钙代谢的主要调节因子, 抑制破骨细胞的骨吸收作用, 减少破骨细胞数目, 使骨钙含量和骨强度增加。人工合成的鲑鱼是除雌激素外

治疗骨质疏松症的较为肯定有效的药物,尤其适用于雌激素禁忌和男性骨质疏松患者。现已被批准为国家新药。本实验表明:鲑鱼降钙素能显著抑制LPS诱导的NO产生。提示:这可能是鲑鱼降钙素治疗骨质疏松的机理之一。

参 考 文 献

- 1 Editorials. Salmon calcitonin in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ann Inter Med*, 1987, 107:923.
- 2 郭影,马秀敏.一氧化氮—一氧化氮合酶系统对绝经后骨质疏松的影响. *中国老年学杂志*, 2000, 20:253-256.
- 3 丁传林,胡晓玲,马恩才,等.小鼠腹腔巨噬细胞诱生一氧化氮的实验研究. *上海免疫学杂志*, 1998, 18:28-293.
- 4 洪敏,韩兴酶,朱荃,等.茵陈蒿汤保肝作用机理Ⅲ.对小鼠腹腔巨噬细胞释放一氧化氮的影响. *中药药理与临床*, 1999, 15:5-7.
- 5 张奕华,彭司勋.一氧化氮及其调控剂的研究. *中国药科大学学报*, 2001, 32:321-327.
- 6 蒋莉,李跃华,戚晓红.等.丹参素对内毒性肝损伤的防护作用及其机制研究. *中西医结合肝病杂志*, 1999, 9:30-32.
- 7 杨光.一氧化氮与炎症及免疫调节. *国外医学免疫学分册*, 1995, 18:303.

(收稿日期:2001-11-19)