

LPS 和 IL-2 对合浦珠母贝血细胞 iNOS 活性的影响

熊训浩, 谢莉萍, 张荣庆

清华大学生物科学与技术系海洋生物技术研究所, 北京 100084

[摘要] 建立了一种合浦珠母贝血细胞原代培养方法, 为贝类免疫学研究提供实验平台。通过台盼兰染色法检测细胞活力, 结果显示: 7 d 内细胞生长状态稳定, 并且培养基中的 FBS 对细胞生长活力没有显著影响。以细胞中 iNOS 活性为检测指标, 详细研究了 LPS 和 IL-2 对合浦珠母贝血细胞的激活作用。结果表明: LPS 和 IL-2 对 iNOS 活性的诱导作用表现出浓度和时间依赖的特征。刺激后 36 h 左右 iNOS 活性达到最大, LPS 和 IL-2 的最佳诱导剂量范围分别为 1~10 $\mu\text{g/mL}$ 和 10~100 ng/mL , 并且 IL-2 对 iNOS 活性的激活作用较 LPS 快。

[关键词] 合浦珠母贝; 诱导型一氧化氮合成酶; 脂多糖; 白细胞介素-2

[中图分类号] Q26

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)13-0045-04

Effects of LPS and IL-2 on Inducible Nitric Oxide Synthase Activity of Pearl Oyster (*Pinctada fucata*) Hemocytes Culture

XIONG Xunhao, XIE Liping, ZHANG Rongqing

Institute of Marine Biotechnology, Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: A useful experimental system for primary hemocytes cultures using pearl oyster (*Pinctada fucata*) is established. Seven days after initiation of the culture, the viability of hemocytes remained constant as measured by the trypan blue exclusion technique. Survival of cells cultured in FBS-supplemented L-15 medium was similar to that of cultured in L-15 medium not containing FBS. The effects of LPS and IL-2 on the pearl oyster hemocytes cultures were examined through determination of the iNOS activities. LPS and IL-2 were found to induce the iNOS activities in a dose and time-dependent manner. The best response in the activity of iNOS was obtained after about 36 hours of stimulation, and the optimized concentrations of LPS and IL-2 were 1~10 $\mu\text{g/mL}$ and 10~100 ng/mL , respectively. The results also indicate that iNOS activity would be induced more rapidly by IL-2 than by LPS.

Key Words: *Pinctada fucata*; inducible nitric oxide synthase; lipopolysaccharide; interleukin-2

CLC Number: Q26

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)13-0045-04

0 引言

合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*), 又称马氏珠母贝, 是世界上用于海水珍珠生产的主要贝类。近年来, 我国养殖的合浦珠母贝等重要经济贝类发生大规模的暴发性死亡, 造成了巨大的经济损失。由于缺乏贝类免疫学方

面的基础研究, 贝类养殖业的发展正遭受严重威胁。对于纷繁复杂的病原和环境因子, 从机体本身入手, 加强对海洋养殖贝类免疫学的基础研究和实际应用研究, 是当前和未来海洋贝类养殖业可持续健康发展的当务之急。

收稿日期: 2007-05-23

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA09Z413, 2006AA09Z441)

作者简介: 熊训浩, 北京海淀区清华大学生物科学与技术系海洋生物技术研究所, 博士研究生, 研究方向为贝类免疫与生物矿化;

E-mail: xxh02@mails.tsinghua.edu.cn

张荣庆(通讯作者), 北京海淀区清华大学生物科学与技术系海洋生物技术研究所, 教授, 研究方向为海洋生物化学与分子生物学; E-mail: rqzhang@mail.tsinghua.edu.cn

一氧化氮合成酶 (Nitric Oxide Synthase, iNOS) 是 NO 合成的关键酶, 在 NO 发挥众多的生理和病理作用过程中, iNOS 起着重要的调节作用。生物体内的 iNOS 一般分为结构型一氧化氮合成酶 (eNOS) 和诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS) 两类。在高等动物中, 与抗病有关的 iNOS 通常存在于吞噬细胞中, 可以被细胞因子、病原体及免疫刺激物 (脂多糖) 等通过 NF- κ B 信号转导通路激活, 激活后的 iNOS 能够催化 L-精氨酸产生 NO, 并通过多种复杂反应产生不同类型的活性氮中间体, 起到防御病原体的作用^[1-3]。目前, 有关 NO 和 NOS 的研究主要集中在医学领域, 对无脊椎动物尤其是双壳贝类的相关研究较少^[4], 对合浦珠母贝 NO 和 NOS 的研究, 国内外均未见报道。

本文建立了一种合浦珠母贝血细胞原代培养方法, 详细研究了 LPS 和 IL-2 对血细胞中 iNOS 相对活性的影响, 以期为深入研究合浦珠母贝天然免疫应答及防御机理提供理论基础, 为贝类生产养殖提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 合浦珠母贝血细胞原代培养

合浦珠母贝取自广西壮族自治区北海市珍珠养殖场, 然后在本实验室人工海水中饲养备用。合浦珠母贝血细胞原代培养参考 Cao 和 Lacoste 的方法^[5-6]并作适当调整。具体过程如下: 从合浦珠母贝闭壳肌抽取血淋巴, 用平衡盐溶液 MMBSS^[7]稀释至 10^6 cell/mL; 将 2 mL 血细胞混合液于 35 mm 培养皿中静置 1 h; 然后移除培养皿中的溶液, 并用 MMBSS 清洗贴壁细胞; 向培养皿中加 2 mL 培养基, 于 25 °C 恒温箱中培养。培养基成分为 Gibco L-15 培养基, 并且每升培养基中加入 20.2 g NaCl, 0.54 g KCl, 0.6 g CaCl_2 , 1 g MgSO_4 , 3.9 g MgCl_2 , 20.8 g 葡萄糖和 20 万单位青霉素, 200 mg 链霉素, 40 mg 庆大霉素, 100 mL FBS (Hyclone), pH 7.0。

1.2 台盼兰染色法测细胞活力

无血清培养基稀释细胞悬液至 200~2 000 个/mL, 在 0.1 mL 的细胞中加入 0.1 mL 的 0.4% 台盼兰溶液。轻轻混匀, 数分钟后, 用血球计数板计数细胞。活细胞排斥台盼兰, 因而染成蓝色的细胞是死细胞。每个实验设 3 个重复。

1.3 iNOS 活性测定

在细胞生长状态稳定时, 向细胞培养液中加入不同剂量的 LPS 或 IL-2, 在 25 °C 恒温箱中培养若干小时, 然后测定细胞中 iNOS 的相对活性, 以相同培养条件下未经刺激的细胞为对照。iNOS 活性利用北京天来生物医学科技有限公司的 NOS 检测试剂盒完成。具体步骤为: 移出细胞培养液并收集细胞, 加入 50 μL 检测缓冲液 (含 eNOS 抑制剂) 混匀, 然后加入 100 μL 检测

反应液和 800 μL 去离子水, 轻轻混匀; 37 °C 细胞培养箱内孵育 60 min 后检测 540 nm 波长吸光度值 (OD)。样品中 iNOS 相对活力为 $(\text{OD}_{\text{刺激}} - \text{OD}_{\text{空白}}) / (\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}})$ 。每个实验设 3 个重复。

1.4 统计分析

数据统计分析用 SPSS 11.5 软件进行。文中数据用“平均值 $\pm$ 方差”表示。

2 结果

2.1 细胞生长状况

用平衡盐溶液 MMBSS 稀释后的合浦珠母贝血淋巴细胞在培养皿中静置, 大部分细胞可在 1 h 之内贴壁。经相差显微镜观察, 贴壁细胞主要为成纤维样细胞 (见图 1)。用台盼兰染色法检测细胞活力, 结果显示: 7 d 内细胞生长状态稳定, 活细胞数量保持在 70% 以上, 第 8 d 之后细胞开始快速死亡, 第 9 d 时活细胞比例不足 20%。当培养基中不含有胎牛血清时, 细胞活力有所降低, 但是变化不显著 (见图 2)。因此, 本文选用第 2~4 d 的含血清原代培养细胞作为对象, 进一步研究 LPS 和 IL-2 对 iNOS 相对活性的影响。

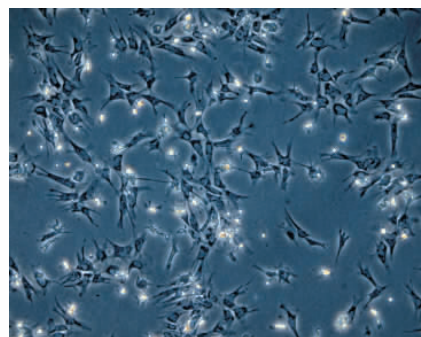


图 1 合浦珠母贝血细胞原代培养 (100 $\times$)

Fig. 1 Primary cultures of hemocytes using pearl oyster, *Pinctada fucata* (100 $\times$)

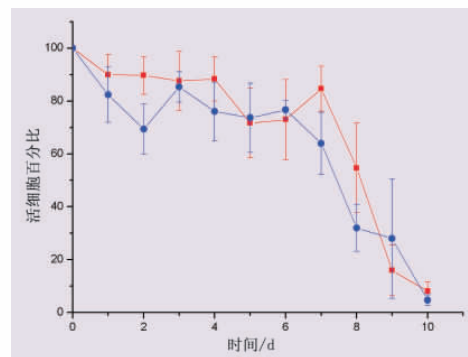


图 2 胎牛血清对细胞活力的影响

注: 红色曲线为 10% FBS; 蓝色曲线为不含 FBS

Fig. 2 Effect of FBS on the hemocytes viability.

Note: The cells were incubated with 10% of FBS (red) or without FBS (blue)

2.2 LPS 对血细胞 iNOS 活性的影响

向稳定生长的细胞培养液中加入不同浓度的 LPS, 培养 36 h 后检测细胞中 iNOS 的相对活性。结果显示: 0.1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 对 iNOS 活性的影响不明显; 当 LPS 浓度为 1~10 $\mu\text{g/mL}$ 时, iNOS 活性比未经刺激的对照组高 8 倍左右; 而高浓度的 LPS (100 $\mu\text{g/mL}$) 毒性较大, 刺激 36 h 后大量细胞死亡 (见图 3)。此外, LPS 对 iNOS 活性的影响随时间发生变化。用 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 处理血细胞, 24 h 内 iNOS 活性缓慢增加, 在 36 h 左右达到最大值, 但此后呈下降趋势 (见图 4)。

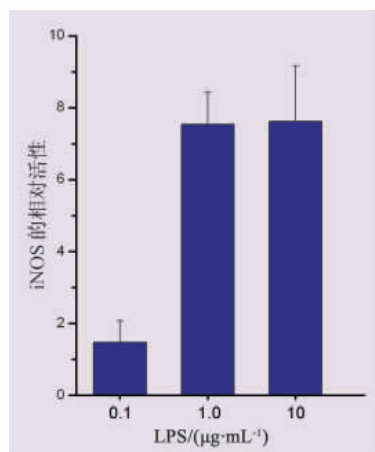


图 3 不同浓度 LPS 对血细胞 iNOS 活性的影响 (36 h)

Fig. 3 Dose-response effect of LPS on the iNOS activity in hemocytes cultures (36 h)

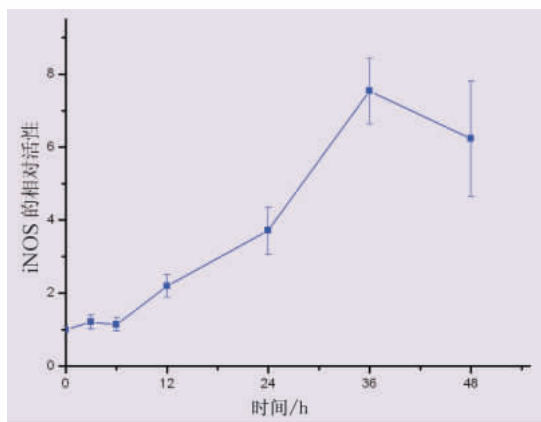


图 4 不同时间 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 对血细胞 iNOS 活性的影响

Fig. 4 Time-response effect of 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS on the iNOS activity in hemocytes cultures

2.3 IL-2 对血细胞 iNOS 活性的影响

采取同样的方法详细研究了不同浓度 IL-2 对血细胞中 iNOS 相对活性的影响。结果显示: 刺激 36 h 后, 1 ng/mL IL-2 对 iNOS 活性没有显著影响; 当 IL-2 浓度为 10~100 ng/mL 时, iNOS 活性比未经刺激的对照组高 4 倍左右; 而高浓度的 IL-2 (1 000 ng/mL) 显示出较强

的细胞毒性, 大量细胞死亡 (见图 5)。与 LPS 类似, IL-2 对 iNOS 相对活性的影响也表现出时间依赖的特征。经 10 ng/mL IL-2 刺激后, 6 h 内血细胞中 iNOS 活性基本保持不变, 12 h 左右 iNOS 活性迅速增加, 24 h 小时后接近峰值, 此后 24~48 h iNOS 活性保持在较高水平 (见图 6)。

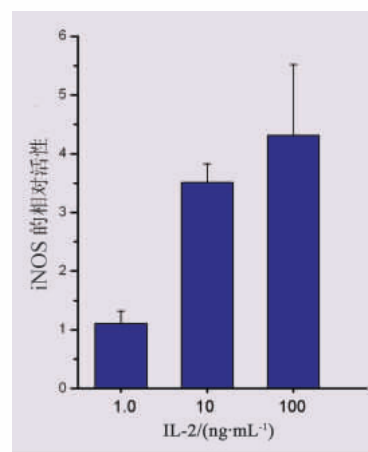


图 5 不同浓度 IL-2 对血细胞 iNOS 活性的影响 (36 h)

Fig. 5 Dose-response effect of IL-2 on the iNOS activity in hemocytes cultures (36 h)

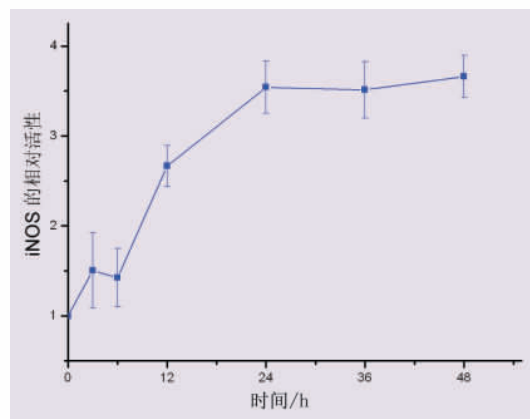


图 6 不同时间 10 ng/mL IL-2 对血细胞 iNOS 活性的影响

Fig. 6 Time-response effect of 10 ng/mL IL-2 on the iNOS activity in hemocytes cultures

3 讨论及结论

细胞培养是软体动物细胞生物研究的瓶颈之一, 所面临的主要困难是尚未筛选出合适的培养基, 并且软体动物细胞体外生长必须的生长因子尚不清楚。本研究结合 Lacoste 和 Cao 等人的培养方法^[5-6]并作适当调整, 建立了一种合浦珠母贝血细胞原代培养方法。在无血清条件下细胞能够稳定生长 1 周左右, 表明所用基本培养基是有效的。FBS 对细胞生长活力没有显著影响, 在培养过程中也没有观察到明显的细胞增殖现象, 暗示所用血清中的细胞生长因子并不能满足合浦

珠母贝血细胞的生长需要。因此,以后将通过添加细胞因子的方式优化细胞培养条件,进而研究其增殖作用。

在哺乳动物细胞中,LPS 和 IL-2 能够激活 NF- κ B 信号转导通路,并调控 iNOS 等基因的表达,进而诱导免疫应答等生物效应^[8-10]。早在 1991 年 Hughes 等就指出,LPS 能够诱导软体动物血细胞产生 TNF- α 和 IL-1 等细胞因子^[11]。近期的一些研究表明,LPS 对软体动物血细胞的诱导作用是通过激活 PKA、PKC 信号通路实现的^[12-14]。Barcia 等的研究显示,贻贝的血细胞中含有 IL-2 受体^[5,15],并且 IL-2 对贻贝血细胞的激活作用受 PKA 和 PKC 信号通路调控^[13]。在高等动物中,PKC 和 PKA 等蛋白的活化能够激活一系列下游信号通路,如 NF- κ B 信号通路等^[16],然而在软体动物中未见相关研究报道。本文结果表明:LPS 和 IL-2 能够诱导合浦珠母贝血细胞 iNOS 的活性。鉴于在高等动物免疫细胞中,iNOS 的表达受 NF- κ B 信号通路调控,故推测 LPS 和 IL-2 对合浦珠母贝血细胞 iNOS 活性的诱导作用可能是通过激活 PKA、PKC、NF- κ B 等信号通路实现的,其具体机制尚需要进一步研究探讨。

参考文献 (References)

- [1] KLEINERT H, SCHWARZ P M, FORSTERMANN U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase [J]. Biol Chem, 2003, 384(10-11): 1343-1364.
- [2] CHAKRAVORTY D, HENSEL M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens [J]. Microbes Infect, 2003, 5(7): 621-627.
- [3] ZAMORA R, VODOVOTZ Y, BILLIAR T R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases [J]. Mol Med, 2000, 6(5): 347-373.
- [4] CONTE A, OTTAVIANI E. Nitric-oxide synthase activity in molluscan hemocytes [J]. FEBS Lett, 1995, 365 (2-3): 120-124.
- [5] CAO A, MERCADO L, RAMOS-MARTINEZ J I, et al. Primary cultures of hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk: expression of IL-2R α subunit [J]. Aquaculture, 2003, 216: 1-8.
- [6] LACOSTE A, DE CIAN M C, CUEFF A, et al. Noradrenaline and α -adrenergic signaling induce the hsp70 gene promoter in mollusc immune cells [J]. J Cell Sci, 2001, 114: 3557-3564.
- [7] MITSUHASHI J. Invertebrate tissue culture methods [M]. Tokyo; New York: Springer, 2002.
- [8] LAHDE M, KORHONEN R, MOILANEN E. Regulation of nitric oxide production in cultured human T84 intestinal epithelial cells by nuclear factor- κ B-dependent induction of inducible nitric oxide synthase after exposure to bacterial endotoxin[J]. Aliment Pharm Therap, 2000, 14 (7): 945-954.
- [9] SHIN H M, KIM B H, CHUNG E Y, et al. Suppressive effect of novel aromatic diamine compound on nuclear factor- κ B-dependent expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages [J]. Eur J Pharmacol, 2005, 521(1-3): 1-8.
- [10] ORUCEVIC A, HEARN S, LALA P K. The role of active inducible nitric oxide synthase expression in the pathogenesis of capillary leak syndrome resulting from interleukin-2 therapy in mice[J]. Lab Invest, 1997, 76(1): 53-65.
- [11] HUGHES T K, SMITH E M, BARNEET, et al. LPS stimulated invertebrate hemocytes: A role for immunoreactive TNF and IL-1 [J]. Dev Comp Immunol, 1991, 15: 117-122.
- [12] WALKER A J, PLOWS L D. Bacterial lipopolysaccharide modulates protein kinase C signalling in *Lymnaea stagnalis* haemocytes[J]. Biol Cell, 2003, 95(8): 527-533.
- [13] CAO A, IGNACIO J, MARTINEZ R, et al. Implication of PKA and PKC in the activation of the haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk by LPS and IL-2 [J]. Mol Immunol, 2004, 41(1): 45-52.
- [14] CAO A, RAMOS-MARTINEZ J I, BARCIA R. *in vitro* effects of LPS, IL-2, PDGF and CRF on haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk [J]. Fish Shellfish Immun, 2004, 16(2): 215-225.
- [15] BARCIA R, CAO A, ARBETETA J, et al. The IL-2 receptor in hemocytes of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk[J]. IUBMB Life, 1999, 48(4): 419-423.
- [16] GHOSH S, MAY M J, KOPP E B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses[J]. Annu Rev Immunol, 1998, 16: 225-260.

(责任编辑 李慧政)

· 会讯 ·

2007 中国科技期刊发展论坛 10 月在杭州召开

2007 中国科技期刊发展论坛(以下简称论坛)定于 2007 年 10 月 25-26 日在浙江省杭州市召开。本届论坛由中国科协主办,浙江省科协承办,主题是“科技期刊发展与国家创新体系建设”。组织者围绕论坛

主题设立了 5 个专题分会场:精品科技期刊建设与发展策略,科技期刊信息化与数字出版,科技期刊国际化及实现途径,科技期刊的经营、管理与体制机制创新,科学道德规范与期刊编辑出版。参会人员必须提

交论文,经专家审定通过后,即获得参会资格。会议规模约 300 人。详细信息请浏览中国科协网页 (<http://www.cast.org.cn>)“学会与学术”栏目。