

·基础研究·

本文引用:林检生,杨奔,陈安,吴丹,胡兆勇,喻嵘,谭劲.聚酰胺-胺对大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响[J].湖南中医药大学学报, 2017,37(7):726-729.

聚酰胺-胺对大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

林检生¹,杨奔¹,陈安¹,吴丹²,胡兆勇¹,喻嵘^{1*},谭劲^{2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学附属第一医院,湖南长沙 410007)

〔摘要〕目的 研究聚酰胺-胺(poly-amidoamine, PAMAM)对大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响。方法 采用CCK-8试剂盒检测PAMAM对巨噬细胞的细胞毒性。通过巨噬细胞吞噬印度墨汁实验和吞噬鸡红细胞实验,观察PAMAM对巨噬细胞吞噬功能的影响。采用扫描电子显微镜(SEM)观察巨噬细胞吞噬鸡红细胞的形貌。结果 0.1-10 mg/mL的G5 PAMAM-NH₂和10 mg/mL的G4.5 PAMAM-COOH对巨噬细胞有毒性($P<0.05$)。0.01 mg/mL的G5 PAMAM-NH₂、G4.5 PAMAM-COOH、G5 PAMAM-OH对巨噬细胞均无毒性($P>0.05$)。0.01 mg/mL的PAMAM对巨噬细胞吞噬鸡红细胞形貌、吞噬率和吞噬指数均无影响($P>0.05$)。结论 PAMAM的浓度在0.01 mg/mL范围内,未观察到其对大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能有影响。

〔关键词〕聚酰胺-胺;巨噬细胞;吞噬功能

〔中图分类号〕R446.6;R965.3

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.07.008

Effect of Poly(amidoamine) on the Phagocytosis of Peritoneal Macrophages in Rats

LIN Jiansheng¹, YANG Ben¹, CHEN An¹, WU Dan², HU Zhaoyong¹, YU Rong^{1*}, TAN Jin^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

〔Abstract〕Objective To investigate the effect of poly(amidoamine), or PAMAM on the phagocytosis of peritoneal macrophage in rats. Methods The cytotoxicity of the PAMAM to the macrophage was detected by CCK-8 kit. The effect of PAMAM on the phagocytosis of the peritoneal macrophage was observed by the experiments of macrophages swallowing the India ink and chicken erythrocytes. The scanning electron microscope (SEM) was used to observe the morphology of the macrophage phagocytosis of chicken erythrocytes. Results There was toxicity to the macrophages with the concentrations of 0.1-10 mg/mL G5 PAMAM-NH₂ and the concentration of 10 mg/mL G4.5 PAMAM-COOH ($P<0.05$). At the concentration of 0.01 mg/mL, all of the three kinds of the PAMAMs had no toxicity to the macrophages and had no effect on the morphology of the macrophage phagocytosis of chicken erythrocytes, the phagocytosis rate and index ($P>0.05$). Conclusion In the 0.01 mg/mL concentrations range, the PAMAMs have no effect on the phagocytosis of peritoneal macrophages in rats.

〔Keywords〕PAMAM; macrophages; phagocytosis

聚酰胺-胺(poly-amidoamine, PAMAM),是一种具有高度支化、对称、呈辐射状的经典生物医用高分子材料^[1]。由于它独特的结构和功能,被广泛的应用到生物医药研究领域,如在口腔医学领域,用于牙

体硬组织仿生矿化的模板^[2];作为蛋白载体,形成聚合物PAMAM-RGD,研究它对骨髓细胞的矿化能力和成牙潜能^[3]。

然而,PAMAM作为一种医用材料,进入机体

〔收稿日期〕2016-12-25

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81373701);湖南中医药大学青年教师科研基金项目(99820001-199)。

〔作者简介〕林检生,男,硕士,助教,研究方向:生物材料与组织工程学。

〔通讯作者〕*谭劲,男,教授,博士研究生导师,E-mail:tanjinhn@aliyun.com;*喻嵘,女,教授,博士研究生导师,E-mail:1208466238@qq.com。

后,不可避免的会与宿主接触,产生各种反应。因此,PAMAM的生物相容性值得我们了解。有研究报道PAMAM对血液中红细胞形貌、血小板的凝血功能以及纤维蛋白结构和构象的影响^[4]。此外,PAMAM表面所带的官能团不同,它的细胞毒性也不一样^[5]。有研究报道,口腔黏膜下纤维化与虚癆痰毒有关^[6]。

但是,关于PAMAM对免疫细胞的研究极少,这可能与免疫系统的复杂性有关。PAMAM应用于中医基础研究和临床的研究甚少。在本研究中,选用了大鼠腹腔巨噬细胞作为研究对象,末端分别带有氨基(-NH₂)、羧基(-COOH)、和羟基(-OH)的第5代PAMAM作为研究材料。探索PAMAM在安全浓度范围内,对大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响。为PAMAM安全应用于口腔医学领域提供重要数据。为牙科仿生材料的优化设计打下基础。为PAMAM在中医基础研究和临床研究提供新思路。

1 材料

1.1 动物

健康雄性SD大鼠20只,体质量200~250 g,由湖南中医药大学动物实验中心提供,动物许可证号:SYXK(湘)2013-0005。健康鸡购自长沙市菜市场。

1.2 药物

PAMAM (Weihai CY Dendrimer Technology Co., Ltd 中国)用无血清的RPMI1640培养基溶解。G5 PAMAM-NH₂ (编号:CYD-150A)、G4.5 PAMAM-COOH (编号:CYD-145C)、G5 PAMAM-OH (编号:CYD-150H)。

1.3 试剂

RPMI1640培养液(HyClone 美国),胎牛血清(HyClone 美国),胰酶(HyClone 美国)。CCK-8检测试剂盒(同仁化学所日本),墨汁(Sigma-Aldrich 美国)。

1.4 仪器设备

酶标仪(Thermo Fisher 芬兰),CO₂培养箱(Heraeus 德国),扫描电子显微镜(Philips XL-30,Holand)。

2 方法

2.1 大鼠腹腔巨噬细胞的分离、培养

取健康雄性SD大鼠20只,脱颈处死,75%酒精浸泡5 min后,在大鼠腹部注入无血清RPMI1640培养液10 mL,轻揉腹部5 min后,无菌条件下吸取腹腔液于离心管中,以1 000 r/min离心5 min,弃上清,重悬、洗涤3次。用含10%胎牛血清RPMI1640完全培养液重悬巨噬细胞接种于培养瓶中,置于

37 ℃,5% CO₂培养箱中。培养3 h后换液,去掉未贴壁的细胞,胰酶消化贴壁的细胞,收集细胞,用RPMI1640完全培养液重悬细胞。根据需要调整细胞密度($1 \times 10^4/\text{cm}^2$),分别接种于96孔板(0.2 mL/孔)和24孔板(1 mL/孔)细胞培养板中培养24 h。

2.2 PAMAM对大鼠腹腔巨噬细胞的毒性检测及分组

采用CCK-8检测试剂盒(同仁化学所 日本)检测PAMAM对巨噬细胞的细胞毒性。实验中PAMAM用无血清的RPMI1640培养基溶解。实验组为G5 PAMAM-NH₂、G4.5 PAMAM-COOH、G5 PAMAM-OH处理组,往96孔板中加入PAMAM溶液(100 μL/孔),浓度依次为0.01 mg/mL、0.1 mg/mL、1.0 mg/mL、10 mg/mL。空白对照组加入无血清RPMI1640培养基(无细胞),对照组加入无血清RPMI1640培养基(有细胞)。每组平行重复8个孔。在培养箱内孵育24 h后,按照CCK-8检测试剂盒中步骤操作,用酶标仪检测450 nm处的OD值,统计分析细胞毒性。所得数据转换成细胞存活率,其计算公式如下:细胞存活率= $(\text{OD}_{\text{处理}} - \text{OD}_{\text{空白}}) / (\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

2.3 巨噬细胞吞噬功能观察

2.3.1 巨噬细胞吞噬墨汁 取接种到24孔板上的巨噬细胞,实验组分别加入浓度均为0.01 mg/mL(此浓度对巨噬细胞未见毒性)的PAMAM溶液。对照组加入无血清RPMI1640培养基,每组平行重复8个孔。在培养箱内孵育24 h后,将墨汁用RPMI1640按1:500稀释后加入各孔中,每孔加2 μL,37 ℃孵育1 h。用PBS洗去未被吞噬的墨汁,在显微镜下观察、记录。

2.3.2 巨噬细胞吞噬鸡红细胞 取健康鸡红细胞,制成0.2%的鸡红细胞悬液。实验组分别加入浓度均为0.01 mg/mL的PAMAM溶液。放入5% CO₂、37 ℃的恒温培养箱孵育24 h后。去除PAMAM溶液,向每孔中加入0.2%的鸡红细胞悬液2 mL,孵育1 h。用PBS洗3次去除未结合的鸡红细胞,于倒置显微镜下观察计数巨噬细胞吞噬指数。计数后,用5 mmol/L的磷酸缓冲液处理细胞1 min,裂解与巨噬细胞结合的鸡红细胞,加入甲醇固定巨噬细胞,观察、计数吞噬率。每个样本计数200个巨噬细胞,计算公式^[7]:吞噬指数=被吞噬的鸡红细胞/200个巨噬细胞;吞噬率=吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数/200个巨噬细胞 $\times 100\%$ 。

2.3.3 巨噬细胞吞噬鸡红细胞的形态学变化 取出巨噬细胞吞噬鸡红细胞的培养板后,常规扫描电镜样品制作,用4%的多聚甲醛固定4 h,再梯度脱水70%、85%、95%、100%、100%后,喷金,使用SEM观

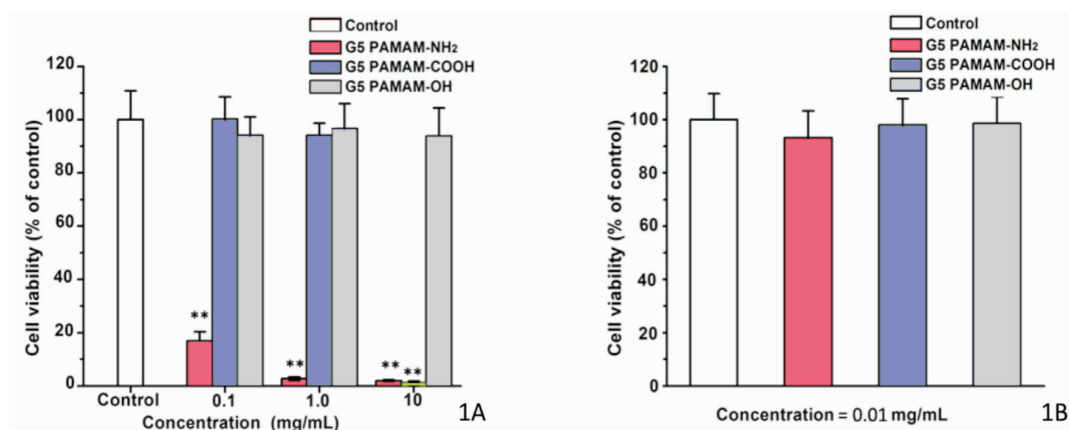
察,照片记录。

2.4 统计学分析

所得数据用 SPSS 20.0 统计学软件和 Origin 8.0 软件进行处理。多组计量资料的统计分析采用 one-way ANOVA 分析方法,数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,以 $P < 0.05$ 为差异,有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 PAMAM 对大鼠腹腔巨噬细胞的毒性检测



注:1A.0.1~10 mg/mL 的 G5 PAMAM-NH₂、G4.5 PAMAM-COOH、G5 PAMAM-OH 处理巨噬细胞 24 h。
1B.0.01 mg/mL 的 G5 PAMAM-NH₂、G4.5 PAMAM-COOH、G5 PAMAM-OH 处理巨噬细胞 24 h。与对照组比较 * $P < 0.05$;与对照组比较 ** $P < 0.01$ 。

图 1 细胞毒性分析柱形图

3.2 PAMAM 对巨噬细胞吞噬功能观察

3.2.1 吞噬墨汁实验 吞噬印度墨汁的观察显示(图2):对照组(图 2A)中,部分巨噬细胞吞噬墨汁多,部分吞噬的少,有的甚至在显微镜下不易观察;实验组(图 2B/2C/2D)中,巨噬细胞的吞噬墨汁情况与对照组中相当。

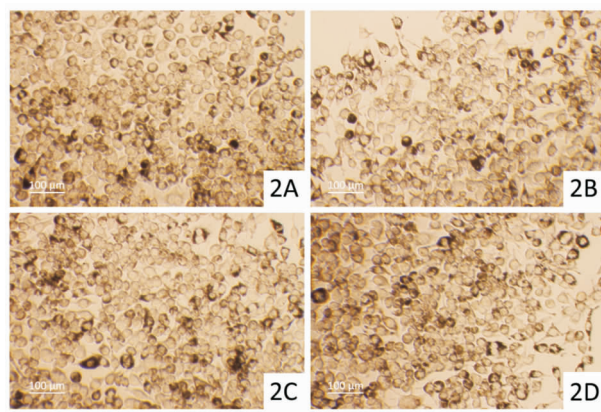
3.2.2 吞噬鸡红细胞实验 吞噬鸡红细胞的结果显示(表 1):与对照组相比较,实验组中的吞噬率和吞噬指数差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3.2.3 扫描电子显微镜(SEM)下观察 经 SEM 观察(图 3)显示:对照组(图 3A)中,鸡红细胞为椭圆形、周围厚中间薄,有的鸡红细胞正在被巨噬细胞吞噬;与对照组相比,实验组(图 3B/3C/3D)中,巨噬细胞周围也出现正在被吞噬的鸡红细胞,未见鸡红细胞聚集在巨噬细胞周围而不被吞噬的现象(图 3B),未见鸡红细胞完全不被吞噬的现象(图 3C/3D)。

4 讨论

PAMAM 因末端所带的官能团不同,所表现的化学性能不同,表现的生物性能可能也有所不同^[8]。

CCK-8 试剂盒检测显示(图 1A): 0.1~10 mg/mL 的 G5 PAMAM-NH₂ 对巨噬细胞具有细胞毒性;0.1~1 mg/mL 的 G4.5 PAMAM-COOH 对巨噬细胞没有毒性,10 mg/mL 时产生细胞毒性;0.1~10 mg/mL 的 G5 PAMAM-OH 对巨噬细胞没有毒性。0.01 mg/mL 的 G5 PAMAM-NH₂、G4.5 PAMAM-COOH、G5 PAMAM-OH, 对巨噬细胞都没有细胞毒性(图 1B)。



注:巨噬细胞分别经 0.01 mg/mL 的 G5 PAMAM-NH₂(2B)、G4.5 PAMAM-COOH(2C)、G5 PAMAM-OH(2D)处理,对照组为 RP-MI1640(2A)。

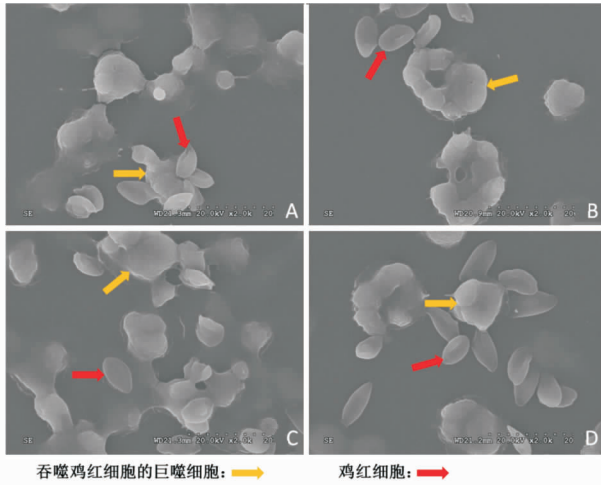
图 2 巨噬细胞吞噬墨汁电子显微镜观察

巨噬细胞作为一种免疫细胞,是研究细胞吞噬、细胞免疫和分子免疫学的重要对象。PAMAM 作为一种生物医用材料,当它们应用与人体时,将会对免疫系统的各种成分发生怎样的影响,这些问题都值得我们研究和探讨。

CCK-8 试剂盒检测 PAMAM 对巨噬细胞的毒

表1 巨噬细胞吞噬鸡红细胞的结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	吞噬率/%		吞噬指数	
		$\bar{x} \pm s$	P	$\bar{x} \pm s$	P
Control	8	60.94±2.81		3.24±0.34	
G5 PAMAM-NH ₂	8	57.60±3.77	0.090	3.04±0.41	0.32
G4.5 PAMAM-COOH	8	58.31±5.06	0.167	2.94±0.45	0.12
G5 PAMAM-OH	8	58.50±3.73	0.198	2.94±0.39	0.15



注: 巨噬细胞分别经 0.01 mg/mL 的 G5 PAMAM-NH₂ (3B), G4.5 PAMAM-COOH (3C), G5 PAMAM-OH (3D) 处理, 对照组为 RPMI1640 (3A)。

图3 巨噬细胞吞噬鸡红细胞形态学观察
(扫描电子显微镜×2000)

性结果显示(图1): 浓度在 0.1–10 mg/mL 范围内, 对巨噬细胞的毒性依次为 G5 PAMAM-NH₂>G4.5 PAMAM-COOH>G5 PAMAM-OH。PAMAM 对 RAM264.7 细胞的毒性, 与 PAMAM 表面所带的电荷有关, 可能与细胞膜及细胞内外的离子发生相互作用^[9]。研究发现当浓度均为 0.01 mg/mL 时, 三种 PAMAM 对巨噬细胞均无毒性。这为我们研究 PAMAM 对大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响提供了重要数据。

巨噬细胞吞噬功能检测, 结果表明: 在安全浓度范围内, PAMAM 对吞噬墨汁和吞噬鸡红细胞都没有影响。SEM 观察结果表明: PAMAM 对巨噬细胞吞噬鸡红细胞的形貌没有影响。根据我们以前的报道, PAMAM 能够改变 γ -球蛋白的结构和构象^[10]。因此, 我们推测: G5 PAMAM-NH₂ 与巨噬细胞的细胞膜之间产生静电作用、G5 PAMAM-COOH 能够螯合巨噬细胞外面的阳离子、以及 G5 PAMAM-OH 与巨噬细胞间产生疏水作用等。这些相互作用在安全浓度范围内, 不足以改变巨噬细胞上与吞噬相关

蛋白的结构和构象, 从而不会影响巨噬细胞的吞噬功能。

本研究结果显示, PAMAM 表面所带的官能团不同, 对大鼠腹腔巨噬细胞的毒性也不一样, 依次为 G5 PAMAM-NH₂>G4.5 PAMAM-COOH>G5 PAMAM-OH。PAMAM 的浓度在 0.01 mg/mL 范围内, 对大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能没有影响。本研究不仅为 PAMAM 的安全应用提供重要数据, 而且为制备出结构和性能理想的牙科仿生材料打下基础。

参考文献:

- [1] Tomalia DA, Baker H, Dewald J, et al. A New Class of Polymers-Starburst-Dendritic Macromolecules[J]. Polymer Journal, 1985, 17 (1): 117–132.
- [2] Liang K, Weir MD, Xie X, et al. entin remineralization in acid challenge environment via PAMAM and calcium phosphate composite. Dent Mater. 2016, 32(11): 1429–1440.
- [3] Kim JK, Shukla R, Cassgrand L, et al. Differentiating dental pulp cells via RGD-dendrimer conjugates [J]. Dent Res, 2010, 89(12): 1433–1438.
- [4] Fu Y, Hu R, Li C, et al. Effects of poly (amidoamine) dendrimers on the structure and function of key blood components [J]. J Bioact Compat Pol, 2014, 29(2): 165–179.
- [5] Wang B, Navath RS, Menjoge AR, et al. Inhibition of bacterial growth and intramniotic infection in a guinea pig model of chorioamnionitis using PAMAM dendrimers [J]. Int. J. Pharm. 2010, 395(1): 298–308.
- [6] 谭 劲, 吴 丹, 刘 寻, 等. 从虚瘀痰毒探讨口腔黏膜下纤维化的发病机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 36(3): 38–39.
- [7] Giberto RS, Daniel S. Recognition of oxidative damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: Role of membrane phosphatidylserine [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 92: 1396–1400.
- [8] Xu Q, Wang CH, Pack DW. Polymeric carriers for gene delivery: chitosan and poly (amidoamine) dendrimers [J]. Curr Pharm Des, 2010, 16(21): 2350–2368.
- [9] Lombardo D, Calandra P, Bellocco E, et al. Effect of anionic and cationic polyamidoamine (PAMAM) dendrimers on a model lipid membrane[J]. Biochim Biophys Acta. 2016, 1858(11): 2769–2777.
- [10] Lin J, Hua W, Zhang Y, et al. Effect of poly(amidoamine) dendrimers on the structure and activity of immune molecules [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850(2): 419–425.

(本文编辑 杨 瑛)