

· 论 著 ·

# 电化学微传感器实时检测大肠埃希菌激活的 RAW264.7 细胞释放 NO 的研究\*

吴汪泽<sup>1</sup>, 汤纪路<sup>2</sup>, 甘 甜<sup>3</sup>, 卢忠心<sup>1△</sup>, 乔 治<sup>2▲</sup>

(1. 湖北省武汉市中心医院检验科 430014; 2. 武汉大学医学院微生物教研室 430071;

3. 信阳师范学院化学化工学院, 河南信阳 464000)

**摘 要:**目的 探讨 NO 电化学微传感器在抗细菌感染免疫研究中的应用价值。方法 应用前期制备的基于纳米金(nano-Au)修饰玻璃纤维的新型 NO 电化学微传感器实时检测大肠埃希菌(E. coli)不同浓度刺激组、不同时间刺激组的小鼠巨噬细胞(RAW264.7 细胞)NO 的释放水平。结果 与对照组相比, RAW264.7 细胞受到 E. coli 刺激后, NO 的释放水平明显上调( $P < 0.01$ ), 且对 E. coli 的刺激具有浓度依耐性。随着 E. coli 作用时间的延续, RAW264.7 细胞的 NO 释放水平逐渐上升, 作用 12 h 时达到高峰, 然后开始下降。结论 NO 电化学微传感器成功应用于 E. coli 激活的巨噬细胞释放 NO 过程的实时检测。

**关键词:**一氧化氮; 巨噬细胞; 大肠杆菌; 电化学微传感器

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.15.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)15-1843-03

## Study on application of electrochemical microsensor detecting NO released from macrophage stimulated by Escherichia coli\*

Wu Wangze<sup>1</sup>, Tang Jilu<sup>2</sup>, Gan Tian<sup>3</sup>, Lu Zhongxin<sup>1△</sup>, Qiao Zhi<sup>2▲</sup>

(1. Department of Medical Laboratory, Wuhan Central Hospital, Wuhan, Hubei 430014, China;

2. Department of Microbiology, Medical School of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China;

3. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Xinyang Normal University, Xinyang, Henan 464000, China)

**Abstract: Objective** To apply nitric oxide(NO) electrochemical microsensor in the real time detection of NO released from RAW 264.3 cells infected by E. coli, and to explore the application value of this NO microsensor in the research area of infection immunity against bacterium. **Methods** Taking NO microsensor to detect NO released from RAW 264.3 cells respectively stimulated by E. coli of different densities and of  $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  for different time. **Results** The level of NO released from RAW 264.3 cells was enhanced obviously when incubated with E. coli as compared with that of normal cells and the extent of incersase depended on the density of E. coli ( $P < 0.01$ ). The released level of NO increased gradually from the beginning and reached its peal at the time of 12 h then decreased slowly when incubated with E. coli of  $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ . **Conclusion** The electrochemical microsensor was applied in the real time detection of NO released from macrophages activated by E. coli successfully.

**Key words:** nitric oxide; macrophage; escherichia coli; electrochemical microsensor

NO 是一种重要的生物信息分子和效应分子<sup>[1]</sup>, 它在舒张血管平滑肌中发挥着重要的作用<sup>[2]</sup>, 同时也是免疫系统杀伤抑制细菌、病毒和寄生虫等病原体有效武器<sup>[3]</sup>。过去研究者做了大量关于 NO 抗感染作用的研究, 几乎均是采用重氮反应法, 仅有不到 10% 的报道涉及电化学方法。目前, 尚未有将 NO 电化学传感器应用于抗细菌感染的相关报道。本实验选用大肠埃希菌(E. coli)作为试验菌株, 来探索 NO 电化学微传感器应用于实时检测细菌激活 RAW264.7 细胞释放 NO 的过程, 探讨巨噬细胞在吞噬、杀灭细菌过程中 NO 的作用机制, 为抗感染免疫研究提供新的理论和实验依据。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** E. coli 标准株(ATCC 25922)为本室保藏菌株, RAW264.7 小鼠巨噬细胞购自武汉大学典型培养物保藏中心。MonoStat 电化学工作站(美国 DTI 公司), 基于纳米金修饰玻璃纤维柱状电极的 NO 电化学微传感器(Teflon-Au-GFE)为前期工作所制备<sup>[4]</sup>。RPMI 1640 和胎牛血清均为

GIBCO 公司的产品, L-精氨酸为上海试剂公司的产品, 其他试剂均为国产分析纯, 实验用水为双蒸水。

### 1.2 方 法

**1.2.1 NO 标准溶液的制备**如文献[5]所述。

**1.2.2 细胞培养** RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下进行培养, 待细胞生长进入对数增殖期时收获培养细胞。将其转入到 96 孔板中, 用含 2% 胎牛血清的 RPMI 1640 细胞维持液将其浓度调为  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ , 每孔 200 μL 备用。

**1.2.3 细菌培养** E. coli 用 LB 液体培养基在 37 °C 振荡过夜培养, 离心后弃上清液, 用生理盐水将其浓度调为  $1 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ 。用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释细菌浓度至  $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。

**1.2.4 微传感器实时检测 RAW264.7 细胞 NO 的释放** 根据预实验结果进行实验分组, (1)不同浓度 E. coli 刺激组: 分别加入  $0.1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  的 E. coli 作用 12 h; (2)不

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(61201091)。 作者简介: 吴汪泽(1982-), 主管技师, 硕士, 主要从事电化学传感器在实验室诊断中应用研究。 △ 通讯作者, Tel: (027)82211527; E-mail: lzx71@yahoo.com; ▲ 通讯作者, Tel: (027)87331681; Email: zq60ll@163.com。

同时时间 E. coli 刺激组:加入  $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  的 E. coli 分别作用 0、6、12、24 h。上述每组细胞均设定 4 复孔,在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度条件下孵育相应时间。采用三电极系统:Ag/AgCl 为参比电极,铂丝为对电极和 Teflon-Au-GFE 为工作电极,将三电极系统插入 96 孔板中,保证 3 个电极均与细胞培养液接触,待安培响应达到稳定后,用微量进样器加入 3 mmol/L 的 L-Arg 刺激 RAW 264.7 细胞释放 NO,随时记录安培响应电流(图 1)。

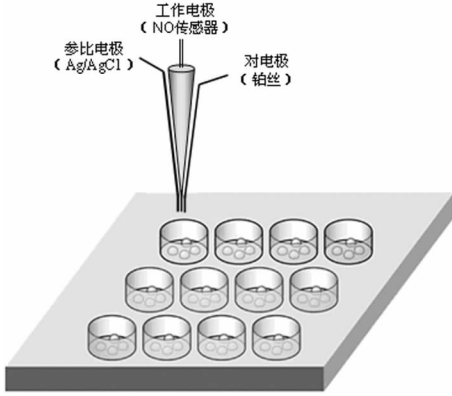


图 1 RAW 264.7 细胞释放 NO 的实时检测示意图

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析与单侧 Dunnett-t 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 对 NO 电化学微传感器进行定标** 在 10 mL 半密闭电解池中以 5 mL PBS(pH 7.2)作为底液,插入三电极,通氮除氧 30 min。在氮气保护下,加入一定体积的 NO 标准溶液到底液中,利用安培响应法对 NO 进行检测。结果显示,NO 电化学传感器的线性范围为  $7.20 \sim 11.72 \mu\text{mol/L}$ ,线性方程是  $I/nA=15.028+0.036 C_{\text{NO}}$ ,相关系数  $r=0.998$ (图 2)。

**2.2 不同浓度 E. coli 及不同作用时间对 RAW 264.7 细胞 NO 释放的影响** 与对照组相比,RAW264.7 细胞受到不同浓

度的 E. coli 刺激 12 h 后,其释放的 NO 均明显增加,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),并对 E. coli 具有浓度依赖性(图 3A,表 1)。RAW264.7 细胞被 E. coli 刺激 12 h 后,其 NO 释放量显著增加,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),到 24 h 仍维持较高水平,但其 NO 释放量略低于刺激 12 h 后 NO 释放量(图 3B,表 2)。

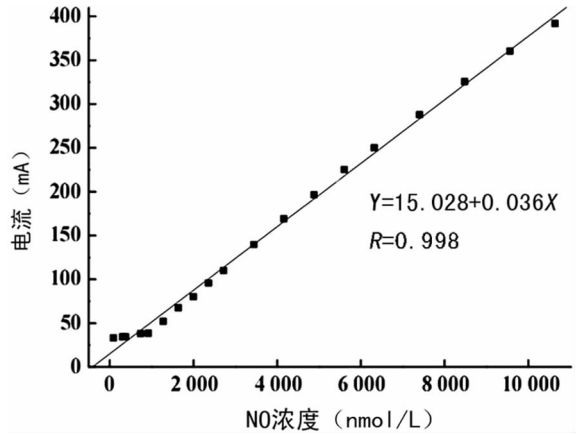


图 2 NO 电化学微传感器定标的结果

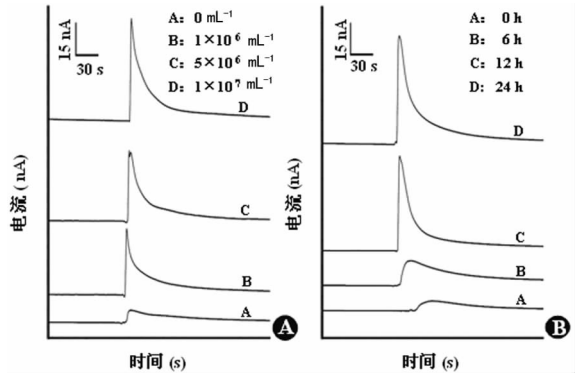


图 3 微传感器实时检测 E. coli 激活的 RAW264.7 细胞释放 NO 过程

表 1 不同浓度的 E. coli 对 RAW264.7 细胞 NO 释放的影响

E. coli 刺激浓度( $\text{mL}^{-1}$ )	0	$1 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$1 \times 10^7$
作用时间(h)	12	12	12	12
氧化峰电流(nA, $\bar{x} \pm s$ )	$5.71 \pm 0.84$	$27.58 \pm 1.39^*$	$33.80 \pm 1.43^*$	$52.52 \pm 5.37^*$
NO 浓度(nmol/L, $\bar{x} \pm s$ )	$158.11 \pm 23.33$	$766.11 \pm 38.61^*$	$938.89 \pm 39.72^*$	$1458.89 \pm 149.17^*$

\*:  $P<0.01$ ,与 0 浓度比较。

表 2 不同作用时间的 E. coli 对 RAW264.7 细胞 NO 释放的影响

作用时间(h)	0	6	12	24
E. coli 刺激浓度( $\text{mL}^{-1}$ )	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^7$
氧化峰电流(nA, $\bar{x} \pm s$ )	$2.69 \pm 0.48$	$12.12 \pm 1.38$	$52.52 \pm 5.37^*$	$46.94 \pm 2.36^*$
NO 浓度(nmol/L, $\bar{x} \pm s$ )	$74.72 \pm 13.33$	$336.67 \pm 38.33$	$1458.89 \pm 149.17^*$	$1303.89 \pm 65.56^*$

\*:  $P<0.01$ ,与 0 浓度比较。

**3 讨 论**

机体在抗感染过程中巨噬细胞作为非特异性防御的第一道防线<sup>[6]</sup>,巨噬细胞通过吞噬作用直接杀灭和清除病原体,并

释放大量的前炎症因子如 NO、IL-1、IL-6、IL-12 等,参与免疫调节<sup>[7]</sup>。准确地分析 NO 在生物机体中的浓度变化,成为揭示其作用机制的必要手段。NO 在机体内的浓度通常处于纳摩

尔级水平,且 NO 半衰期为 5 s,直接检测难度极大<sup>[8]</sup>。重氮反应法是通过检测 NO 的代谢终产物  $\text{NO}^{2-}$  和  $\text{NO}^{3-}$  来间接推算出 NO 的浓度,是目前最被广泛应用的方法<sup>[9]</sup>。但机体中  $\text{NO}^{2-}$  和  $\text{NO}^{3-}$  不完全来源于 NO 代谢,这就造成该方法存在较大误差<sup>[10]</sup>。电化学方法能够直接实时连续检测生物体内释放的 NO,其特点是灵敏度高、反应快、操作简单、选择性好、仪器设备成本低<sup>[11]</sup>。

研究发现,RAW264.7 细胞被细菌刺激后,胞内上调 iNOS 的合成表达,当加入过量的外源性 L-Arg 后,iNOS 可以催化 L-Arg 释放大量的  $\text{NO}^{12}$ 。这个反应类型是零级反应,NO 释放量与胞内 iNOS 蛋白量成正相关。本研究采用 E. coli 刺激 RAW264.7 细胞,不同时间点加入过量的外源性 L-Arg 后,用 NO 电化学微传感器检测 RAW264.7 细胞释放 NO 的量。RAW264.7 细胞被 E. coli 刺激 6 h 后,其释放的 NO 水平高于对照组,12 h 时 NO 释放量达高峰,并维持较高水平至 24 h。巨噬细胞激活 24 h 后其 NO 释放量略低于激活 12 h 后释放量,可能是由于 NO 具有溶度依赖双重性<sup>[13]</sup>,NO 能够自身调节其表达量。本研究表明,在 E. coli 感染初期巨噬细胞就参与免疫防御,诱导胞内 iNOS 蛋白的合成表达,并持续释放大量的 NO,发挥杀伤抑制细菌的作用。因此,机体在感染细菌后,NO 在天然免疫反应发挥着举足轻重的作用。

NO 电化学微传感器具有适于微量分析、微区分析、活体分析和便于集成化等优点<sup>[14]</sup>,能够实现对单细胞水平和微环境中 NO 的动态实时检测,目前 NO 微传感器已成功实现多种生物组织和器官以及细胞水平上检测<sup>[15]</sup>。有理由相信,NO 电化学微传感器在 NO 相关研究领域中的应用必将加深人们对 NO 临床作用的认识。同时,NO 电化学微传感器设计及其研究技术的不断改进将会促进今后 NO 研究地不断深入。

#### 参考文献:

- [1] 赵保路. 一氧化氮自由基[M]. 北京:科学出版社,2008:15-16.
- [2] 罗蒙,陈炜,秦骏等. 一氧化氮降低肝硬化门静脉高压症血管收缩反应性的实验研究[J]. 中华消化外科杂志,2013,12(3):222-227.
- [3] 胡佳,杨涛,王蓓蕾,等. 内毒素预处理促进金黄色葡萄球菌刺激的巨噬细胞生成一氧化氮[J]. 中国病理生理杂志,2010,26(6):1181-1186.
- [4] 吴汪洋,熊涛,甘甜,等. 基于 Teflon/纳米金的新型 NO 微传感器的制备及其性能的分析[J]. 重庆医学,2013,42(25):3002-3003.
- [5] Zheng DY, Hu CG, Peng YF, et al. A carbon nanotube/polyvanillin composite film as an electrocatalyst for the electrochemical oxidation of nitrite and its application as a nitrite sensor [J]. *Electrochim Acta*, 2009, 54(21):4910-4915.
- [6] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京:科学出版社,2009:101-105.
- [7] 王光余,黄晓辉,吴国平,等. 幽门螺杆菌感染对十二指肠球部溃疡患者血清 IL-6、IL-8 及 NO 的影响[J]. 海南医学院学报,2009,15(8):861-863.
- [8] Hall CN, Garthwaite J. What is the real physiological NO concentration in vivo[J]. *Nitric Oxide*, 2009, 21(2):92-103.
- [9] 李新建,朱俊宇,高钰琪,等. NO 检测方法的新进展及其高原医学中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(2):171-173.
- [10] 武宇阳,明钰,姚尚龙. 吸入一氧化氮对内毒素性急性肺损伤大鼠的作用[J]. 华中科技大学学报:医学版,2012,41(1):41-44.
- [11] 彭银波,高丰厚,方勇,等. 一氧化氮光学生物传感器的研究进展[J]. 中华实验外科杂志,2013,30(4):871-173.
- [12] 田卓,张兴平,熊焰,等. 长期低剂量微波辐照对大鼠血小板的 L-精氨酸/NO 系统的影响[J]. 激光杂志,2013,34(3):83-84.
- [13] 黄利,夏鸿,伦玉宁,等. 细菌内毒素体外刺激小鼠腹腔巨噬细胞分泌一氧化氮实验模型的条件优化[J]. 南方医科大学学报,2012,32(11):1646-1650.
- [14] Peng YF, Ji YP, Zheng DY, et al. In situ monitoring of nitric oxide release from rat kidney at poly(eosin b)-ionic liquid composite-based electrochemical sensors [J]. *Sensors Actuators B-chemical*, 2009, 137:656-661.
- [15] Pekarova M, Kralova J, Kubala L, et al. Continuous electrochemical monitoring of nitric oxide production in murine macrophage cell line RAW264.7 [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 394(5):1497-1504.

(收稿日期:2013-11-09 修回日期:2014-01-14)

(上接第 1842 页)

- [13] Adams M, Lipshultz SE, Schwartz C, et al. Radiation associated cardiovascular disease: Manifestations and management[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2003, 13(3):346-356.
- [14] Jin GH, Chen LX, Deng XW, et al. A comparative dosimetric study for treating left-sided breast cancer for small breast size using five different radiotherapy techniques: conventional tangential field, field-in-field, Tangential-IM-

RT, Multi-beam IMRT and VMAT [J]. *Radiat Oncol*, 2013, 8:89.

- [15] Stewart FA, Hoving S, Russell NS. Vascular damage as an underlying mechanism of cardiac and cerebral toxicity in irradiated cancer patients [J]. *Radiat Res*, 2010, 174(6):865-869.

(收稿日期:2013-11-14 修回日期:2013-01-19)