

褐藻糖胶的免疫调节作用

杨晓林 孙菊云 许汉年 刘晓慧 张翼伸 张绍伦

(白求恩医科大学 长春 130021)

摘要: 观察了从海带中提取的褐藻糖胶对小鼠免疫功能的影响。褐藻糖胶在体外可诱导白细胞介素-1 (IL-1) 和丙型肝炎病毒(IFN- γ)产生;体内给药可增强 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞(Me)和自然杀伤细胞(NK 细胞)功能,促进对绵羊红细胞(SRBC)的初次抗体应答。

关键词: 褐藻糖胶;免疫调节

文献报道,褐藻门(Phaeophyte)一些藻类的多糖成分有明显的抗肿瘤作用^[1-3],但有关其免疫效应的研究则报道甚少,本研究初步观察了从海带中提取的褐藻糖胶对小鼠免疫功能的影响,对其作用机制进行探讨,为褐藻多糖类免疫调节剂的深入研究和海藻资源的综合利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57 BL/6 近交系小鼠,18~22g,雌雄不限;Swiss小鼠,18~25g,雌雄各半。均由本校实验动物部提供。

1.2 褐藻糖胶 (Fucoidan, FCD)

FCD是从产于渤海湾海带(*Laminaria japonica* Aresh)中提取的一种水溶性多糖^[4]粉末,体内用药时用生理盐水配制,体外实验用药时用IMDM培养液配成所需浓度。采用加热(60℃~80℃ 2h)或微孔滤膜(0.22~0.45 μ m)除菌后备用。

1.3 主要试剂

IMDM培养基;GIBCO产品;Con A: Sigma产品;植物血凝素(PHA),上海医学化验所;细菌脂多糖(LPS):本室自制;³H-TdR:中科院北京原子能研究所。

1.4 病毒和细胞株

滤泡性口炎病毒(VSV):本校第一临床学院传染科提供;YAC-1 细胞株:医科院基础所免疫室惠赠;L₉₂₉细胞株:军科院流研所惠赠。

1.5 实验方法

1.5.1 IL-1和IL-2 的诱生及活性测定 参照文献^[5,6]方法进行。

1.5.2 IFN的诱生及活性测定 参照文献^[7],采用L₉₂₉(VSV)系统测定其活性,按直接插入法计算效价。

1.5.3 脾细胞介导的SRBC溶血分光光度定量测定法(QHS) 参照文献^[8]。}

1.5.4 NK细胞活性检测^[9]

1.5.4.1 效应细胞 无菌制备小鼠脾细胞悬液,低渗法破坏红细胞后,用培养液调细胞数为 1×10^7 /mL或 2×10^7 /mL。

1.5.4.2 靶细胞标记 取连续传代3d以上生长状态良好的YAC-1 细胞配成 1×10^6 /mL,加入³H-TdR 25 μ Ci/mL,经37℃温育4h,每30min振荡一次,标记后细胞用培养液洗3次,调细胞数为 1×10^5 /mL。靶细胞标记率一般可达0.3~0.6cpm/细胞。

1.5.4.3 活性测定 采用96孔培养板,效靶比100:1。体外实验时实验孔加入不同浓度的FCD₅₀ μL(2.40~3.75 μg/mL),设Con A、LPS和阴性对照孔,每孔加入标记细胞1×10⁴/100 μL,再加效应细胞1×10⁶/50 μL。体内给药实验时,每孔加标记细胞后,再加效应细胞1×10⁶/100 μL,体内、外实验均设靶细胞对照,以培养液代替效应细胞。置CO₂孵箱培养24h,收获细胞测定cpm值,结果以百分率表示,按下列公式计算:

$$\text{自然释放率} = (1 - \text{自然释放孔cpm} / \text{总释放孔cpm}) \times 100\%$$

$$\text{特异性释放率} = (1 - \text{实验孔cpm} / \text{自然释放孔cpm}) \times 100\%$$

2 结果

2.1 诱导和促进IL-1产生

2.1.1 Me在体外经不同浓度FCD作用48h,IL-1样活性物质的分泌明显增强(表1)。30 μg/mL以上浓度的FCD与LPS10 μg/mL的作用相近。

表1 FCD在体外诱导小鼠腹腔Me产生IL-1

培养条件 μ g/mL	IL-1 活性	³ H-TdR 掺入 (cpm, x ± s)	
	培养液稀释浓度		
	1:20	1:40	1:80
IMDM	5892 ± 1332	9374 ± 1854	8067 ± 1620
LPS(10)	12207 ± 2063	11014 ± 2207	13263 ± 1784
FCD(240)	10614 ± 1784	12342 ± 5724	15793 ± 2877
(60)		13992 ± 1595	13900 ± 212
(30)	13350 ± 1536	12289 ± 2896	10430 ± 2805
(15)	10630 ± 513	12262 ± 2406	6128 ± 3252
(7.5)	10714 ± 2715	11084 ± 2401	5998 ± 1252

注:胸腺细胞对照 cpm = 270 ± 53

Con A 对照 (胸腺细胞+Con A) cpm = 5768 ± 1856

2.1.2 小鼠皮下注射FCD[10mg/(kg·d)]9d后,腹腔Me产生IL-1样活性物质的能力增强,给药组动物腹腔Me培养48h,培养上清液在1:80稀释时可使胸腺细胞³H-TdR掺入值提高39%(P<0.05)。

2.2 增强NK细胞活性

2.2.1 在FCD对靶细胞(YAC-1)无明显毒性的浓度范围内,体外观察其对小鼠脾脏NK细胞的作用,FCD3.75~240 μg/mL均表现为激活NK细胞的效应,特异性释放率增加7%~16%,最佳浓度为

30 μ g/mL, 480 μ g/mL浓度时则表现为抑制作用。

2.2.2 小鼠皮下注射FCD 9d后, 检测其脾脏NK细胞活性, 在2.5、5、10mg/(kg·d)剂量时NK细胞活性显著增强($P<0.05$), 在20mg/(kg·d)剂量时NK活性受抑制($P<0.01$)。

2.3 增强丝裂原诱导的增殖反应

给小鼠连续皮下注射FCD 9d后, 观察脾细胞对丝裂原(Con A、PHA、LPS)的反应性, 结果如表2所示, FCD在0.25~10mg/(kg·d)剂量范围内均表现有增强作用, 以5mg/kg为最佳剂量, 20mg/kg剂量时无明显作用。

表2 FCD在体内给药对有丝分裂原诱导增殖反应的影响

组别 (mg/kg)	No	$^3\text{H-TdR}$ 掺入 (cpm, $\bar{x} \pm s$)			
		有丝分裂原			
		—	Con A	PHA 2.5	LPS 15
Control	4	1739 \pm 311	15189 \pm 5082	7255 \pm 889	10223 \pm 3847
0.25	4	2409 \pm 785	17602 \pm 6462	14046 \pm 3583 ^a	13335 \pm 6449
2.5	3	3260 \pm 841	21140 \pm 2945	11503 \pm 3878	12942 \pm 3592
5	4	2398 \pm 477	28562 \pm 5242 ^a	17260 \pm 3505 ^b	16361 \pm 2947 ^a
10	3	2704 \pm 493	23179 \pm 3472	12779 \pm 3234 ^a	14407 \pm 4805
20	3	1917 \pm 425	17998 \pm 1090	6219 \pm 1773	10016 \pm 2588

注: 与对照组比较 a: $P<0.05$; b: $P<0.01$

2.4 体内促进 IL-2 产生

给小鼠皮下注射FCD[5mg及10mg/(kg·d)]9d后, 脾细胞产生IL-2的能力明显增强(表3), 以5mg/kg为最佳剂量。

表3 FCD在体内对小鼠脾细胞产生IL-2的影响

组别 (mg/kg)	No	IL-2 活性	$^3\text{H-TdR}$ 掺入 (cpm, $\bar{x} \pm s$)	
		1:2	1:4	1:8
Control	3	2957 \pm 2002	1860 \pm 7434	1576 \pm 695
FCD 5	4	9311 \pm 2790 ^a	5063 \pm 1178 ^a	2504 \pm 1102
FCD 10	4	5534 \pm 2353	3294 \pm 1732	2217 \pm 1084

注: 反应细胞对照 cpm = 238 \pm 63

Con A 对照 (反应细胞+Con A) cpm = 889 \pm 121

与FCD 10 mg/kg 组比较 a: $P<0.05$

FCD在体外无诱生IL-2作用(数据省略)。

2.5 体外诱导 IFN 产生

在脾细胞培养液中加入不同浓度的FCD, 观察培养(48h)后IFN产生情况, FCD在15~120 μ g/mL浓度范围内均可诱生IFN, 以60 μ g/mL诱生作用最强。在与LPS相同浓度时诱生IFN效应相似。此IFN经酸(pH2.0, 4 $^{\circ}$ C 24h)、加热(56 $^{\circ}$ C, 1h)处理后活性消失, 属IFN- γ 。

2.6 促进对 SRBC 的初次抗体应答

小鼠随机分为 4 组, FCD 剂量为 5mg/(kg·d)。I 组: 皮下注射生理盐水 9d(对照组); II 组: 连续给药 9d, 给药 4d 后 SRBC 免疫注射, III 组: 先给药 4d, SRBC 免疫后停止给药, 改用生理盐水; IV 组: 先给生理盐水 4d, SRBC 免疫后给药 4d。各组动物皆在实验 9d 后处死, 取脾细胞用 QHS 法测定对 SRBC 的抗体量。结果如表 4 所示, FCD 以 3 种 给药方式均可促进抗体产生($P < 0.05$)。以第 IV 组给药方式作用最为明显($P < 0.01$)。给药动物脾脏和胸腺重量有增加趋势, 但无统计学意义。

表 3 FCD 体内给药促进小鼠对 SRBC 的初次抗体应答

组别 (mg/kg)	No	免疫后反映 ($\bar{x} \pm s$)		
		抗体水平 (OD413)	脾指数	胸腺指数
I	4	0.95±0.12	1.48±0.21	0.39±0.06
II	6	1.16±0.13 ^a	1.52±0.49	0.38±0.07
III	5	1.19±0.10 ^a	1.36±0.19	0.46±0.08
IV	5	1.33±0.17 ^b	1.59±0.35	0.42±0.04

注: 与对照组比较 a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$

3 讨论

FCD 是小鼠 B 细胞多克隆激活剂, 在体外对 T 细胞无明显刺激效应^[10]。在体内, FCD 可增强 T 细胞对 Con A、PHA 的反应性, 促进 Con A 诱导 IL-2 产生, 这可能是 FCD 激活 Me、NK 和 B 细胞, 由这些细胞释放活性物质作用的结果, 也有可能是 FCD 经代谢后对 T 细胞的直接作用。FCD 可直接诱导小鼠脾细胞产生 IFN, 这与刺五加甙或甘草甜素等一些中药的促诱生或协同作用明显不同^[11, 12]。

FCD 在体内外都具有诱导 Me 产生 IL-1 的作用。

FCD 和 LPS 部主要作用于小鼠 B 细胞。文献报道 LPS 在 SRBC 免疫前给与可抑制抗体产生, 如果在 SRBC 免疫后给与, 则表现为促进效应^[13]。为此, 我们选择了 3 种给药方式观察 FCD 对抗体产生的影响。实验结果表明 3 种给药方式均可促进抗体产生, 揭示 FCD 在体内的作用机制可能与 LPS 存在一定差异。

综合本文和我们另文^[10]报道结果以及有关 FCD 抗凝血效应方面的实验资料(张冀伸等, 未发表资料), 我们认为 FCD 可望开发为一种既能增强机体免疫功能, 又能防治血栓病的有效药物。

参考文献

- [1] 关美君、丁源。我国海洋药物科学十年进展及战略设想。中国海洋药物, 1989; 29: 25
- [2] 张尔贤, 等。鼠尾藻多糖对肉瘤 S₁₈₀ 的抑制作用和对超氧化物歧化酶的影响。中国海洋药物, 1989; 29: 64
- [3] 邓槐春, 等。海带多糖的药理作用。中草药, 1987; 18: 63
- [4] 刘晓慧, 张冀伸。海带中褐藻糖胶的分级纯化与结构研究。生物化学生物物理学报, 1992; 24: 297
- [5] 尚虹生, 等。IL-1 测定方法的探讨及中药香菇多糖对 IL-1 产生的作用。中国免疫学杂志, 1986; 2: 270
- [6] 王兴林, 等。IL-1 和比-2 测定方法的某些改进。中国免疫学杂志, 1080; 5: 106

- [7] 杨春芳, 陈景山。医用实验病毒学。北京: 人民军医出版社, 1985; 193
- [8] 杨贵贞主编, 免疫学新进展专题讲座。白求恩医科大学, 1987; 200
- [9] 冯作化, 陈兆聪。用³H-TdR标记的靶细胞检测细胞介导的细胞毒作用。中国免疫学杂志, 1988; 4: 73
- [10] 杨晓林, 等。褐藻糖胶的促有丝分裂原效应。中华微生物学和免疫学杂志, 1991; 11: 282
- [11] 杨吉成, 等。刺五加及其多糖对S₁₈₀白血病细胞系干扰素促进生作用。中国免疫学杂志, 1986, 2: 229
- [12] 冯勇山, 等。甘草甜素对人脾细胞产生的 γ -LFN影响。中华微生物学和免疫学杂志, 1986; 6: 99
- [13] Largrange PH, et al, Effect of bacterial lipopolysaccharide on the induction and expression of cell mediated immunity. J Immunol, 1975, 114:442