

1467

扇贝多肽对小鼠非特异性免疫功能的调节作用[△]

张彩梅¹, 刘晓萍², 张红梅³, 于业军⁴, 程桂芹¹

(1. 山东省青岛卫生学校, 山东 青岛 266071; 2. 青岛大学医学院组织胚胎学教研室, 山东 青岛 266003; 3. 延安市中医院药剂科, 陕西 延安 716000; 4. 青岛大学医学院附属医院皮肤科, 山东 青岛 266021)

摘要:目的 探讨扇贝多肽(PCF)对免疫低下小鼠非特异性免疫功能的调节作用。方法 应用地塞米松(DEX)建立小鼠免疫抑制模型,采用乳酸脱氢酶(LDH)法和吞噬鸡红细胞法分别检测 PCF 腹腔注射对小鼠 NK 细胞杀伤活性和巨噬细胞吞噬功能的影响。结果 实验证明 PCF 腹腔注射能够明显提高小鼠 NK 细胞杀伤活性($P < 0.05$),增强腹腔巨噬细胞吞噬功能($P < 0.05$)。结论 PCF 腹腔注射对 DEX 所致的免疫低下小鼠的非特异性免疫功能具有明显的保护作用。

关键词:扇贝多肽; 地塞米松; NK 细胞; 巨噬细胞

中图分类号:R931.74, R979.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-3461(2006)05-0038-03

Effect of PCF on the nonspecific immunity in mice

ZHANG Cai-mei¹, LIU Xiao-ping^{2*}, ZHANG Hong-mei³, YU Ye-jun⁴, Cheng Gui-qin¹

(1. Shandong Qingdao Medical School, Qingdao 266071, China; 2. Department of Histology and Embryology, Medical College, Qingdao University, Qingdao 266021, China; 3. Yanan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yanan 716000, China; 4. Department of Dermatology, Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of PCF on the nonspecific immunity of immunosuppressed mice. **Methods** The immunosuppressed mice were established by injection of dexamethasone (DEX) intraperitoneally. Effects of PCF on the nonspecific immunity were studied by the LDH assay and the phagocytizing CRBC method. **Results** The NK cells cytotoxicity and the phagocytosis of macrophages were enhanced ($P < 0.05$; $P < 0.05$) in the DEX plus PCF treated mice compared to those in the DEX treated mice. **Conclusion** The experiment results indicated that PCF can obviously enhance the nonspecific immunity in immunosuppressed mice induced by DEX.

Key words: polypeptides from *chlamys farreri*; dexamethasone; NK cells; macrophages

扇贝多肽(polypeptides from *chlamys farreri*, PCF)系从栉孔扇贝中提取的小分子、水溶性多肽。研究表明 PCF 具有较强的抗氧化活性,能减轻辐射对淋巴细胞的氧化损伤^[1]。我们的前期研究表明 PCF 体外孵育能够明显刺激淋巴细胞增殖,增强 NK 细胞杀伤活性和腹腔巨噬细胞吞噬功能^[2]; PCF 腹腔注射能够明显改善 DEX 对小鼠胸腺和脾脏免疫器官的损伤,提高 DEX 处理小

鼠外周血 T 淋巴细胞数量和脾淋巴细胞对 ConA 诱导的转化能力^[3],本实验进一步探讨 PCF 腹腔注射对免疫低下小鼠非特异性免疫功能的调节作用。

1 实验材料

1.1 实验动物和细胞

6~8W 清洁级 C57BL/6 小鼠,购自上海中科院实验动物中心;K₅₆₂ 细胞由中国海

[△]基金项目:山东省教委资助项目(NJ01H09)

*通讯作者:Tel:13583272636 E-mail:caimeizhang@yahoo.com

洋大学药理研究所友情提供; 鸡红细胞 (CRBC) 公鸡翼下静脉枸橼酸钠抗凝取血, 4℃ 冰箱保存。使用前用 D-HanKs 离心洗涤 3 次后, 用 D-HanKs 调 CRBC 浓度为 5% (V/V)。

1.2 试剂

PCF 课题组提取的水溶性八肽, M_r879, 纯度 ≥96%。地塞米松磷酸钠 (DEX) (济南利民制药有限公司); RPMI-1640 培养液粉剂为 Hyclone 产品; 新生小牛血清 (杭州江宾生物技术有限公司); 淋巴细胞分层液 (北京欣经科生物技术有限公司)。

2 实验方法

2.1 小鼠分组及给药处理

小鼠 40 只, ♀♂ 各半, 随机分为 4 组:

- (1) 对照组 ip 同体积生理盐水;
- (2) DEX 组 参考文献^[4,5]并加以改良, DEX 7.5mg · kg⁻¹, ip, 隔日 1 次, 共 5 次;
- (3) PCF 组 PCF 2500mg · kg⁻¹^[3], ip, 隔日 1 次, 共 5 次;
- (4) DEX + PCF 组 同时注射同剂量 DEX 和 PCF。

2.2 腹腔巨噬细胞吞噬功能的测定

参考文献^[6]用吞噬 CRBC 测定 Mφ 的吞噬功能。于末次给药的前一天, 各实验组小鼠腹腔注射 2% 无菌淀粉 1mL, 48h 后小鼠腹腔注射 5% 鸡红细胞 1mL, 30min 后, 乙醚麻醉小鼠, 腹腔注射 D-HanKs 1mL, 轻轻按揉腹壁 1min, 吸出腹腔液滴片, 置 37℃ 湿盒孵育 30min 后, 用 PBS 冲洗, 去除未贴壁 Mφ 和游离 CRBC, 然后置入 1:1 丙酮-甲醇固定 7~8min, 自然凉干, 用姬母萨-瑞士染液进行染色, 油镜下计数 Mφ 和 Mφ 吞噬

CRBC 数, 用下列公式计算吞噬百分率和吞噬指数:

吞噬百分率 (%) = 吞噬 CRBC 的 Mφ / 200 个 Mφ (吞和未吞) × 100%

吞噬指数 = 被吞噬的 CRBC 总数 / 200 个 Mφ

2.3 用 LDH 释放法测定 NK 细胞活性

2.3.1 效应细胞制备

无菌取出上述小鼠脾脏, 常规分离脾细胞。单细胞悬液经淋巴细胞分层液分离获得单个核细胞, 用 D-HanKs 液离心洗涤 3 次, 将细胞重悬于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液, 细胞密度为 2 × 10⁶ 个 · mL⁻¹, 经台盼蓝染色细胞活性大于 95%。

2.3.2 靶细胞制备:

取对数生长期的 K₅₆₂ 细胞, 用 D-HanKs 液离心洗涤 3 次后, 重悬于 RPMI-1640 培养液中, 细胞密度为 1 × 10⁶ 个 · mL⁻¹, 经台盼蓝染色细胞活性大于 95%

2.3.3 参照文献^[7]用 LDH 法测定 NK 活性

细胞杀伤率 (%) = (实验组 A 值 - 自然释放组 A 值) / (最大释放组 A 值 - 自然释放组 A 值) × 100%

所有数据均采用单因素方差分析法进行统计学分析, 并采用 t 检验法进一步检验。

3 结果

3.1 PCF 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

实验结果显示, PCF 组的 Mφ 吞噬百分率和吞噬指数与对照组比较均无明显差别 (P > 0.05; P > 0.05); DEX + PCF 组 Mφ 的吞噬百分率和吞噬指数比 DEX 组均有显著提高 (P < 0.05; P < 0.05) (图 1, 表 1)。

表 1 PCF 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 (n = 10, x̄ ± s)

Table 1 Effects of PCF on the phagocytosis in mice peritoneal macrophages

Group	Percentage of phagocytosis (%)	Phagocytic index
Control	84.0 ± 5.6	3.9 ± 0.3
DEX	35.7 ± 3.1*	1.21 ± 0.1*
DEX + PCF	88.7 ± 5.8 [△]	3.6 ± 0.1 [△]
PCF	85.8 ± 7.1	4.0 ± 0.5

Note: * P < 0.01 vs control, [△] P < 0.01 vs DEX

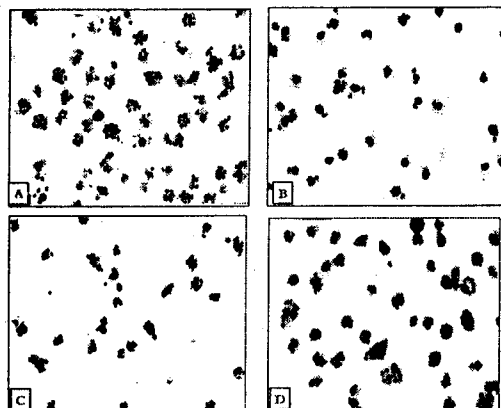


图 1 PCF 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 400×

Fig. 1 The effect of PCF on the phagocytosis of the peritoneal macrophages in mice. 400×

A, control group; B, DEX group; C, DEX + PCF group; D, PCF group

3.2 PCF 对小鼠 NK 细胞杀伤活性的影响

PCF 注射组 NK 细胞杀伤活性与对照组比较无明显提高 ($P > 0.05$); DEX + PCF 组 NK 细胞杀伤活性与 DEX 组比较有明显提高 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 PCF 对小鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Group	N	NK killing rate (%)
Control	10	17.2 ± 1.1
DEX	10	7.3 ± 0.8*
DEX+PCF	10	16.5 ± 1.4 [△]
PCF	6	18.5 ± 2.1

Note: * $P < 0.01$ vs control; [△] $P < 0.01$ vs DEX

4 讨论

NK 细胞和巨噬细胞是机体天然免疫防御系统中重要的效应细胞,在机体防御感染和杀伤肿瘤细胞中发挥重要的作用。NK 细

胞的天然细胞毒效应是不需要抗原预先致敏就可以杀伤包括肿瘤细胞和病毒感染的靶细胞,我们以 K_{562} 细胞为靶细胞,采用 LDH 释放法研究各实验组小鼠 NK 细胞杀伤活性。巨噬细胞作为效应细胞可直接吞噬各种异物,包括病原微生物、自身损伤或死亡的组织碎片或细胞(如红细胞),杀伤细胞内寄存的病原体和肿瘤细胞。本实验采用吞噬鸡红细胞的方法研究小鼠腹腔巨噬细胞的功能。结果表明 PCF 对正常小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能无明显影响,但能显著增强免疫低下小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能,提示 PCF 可提高机体的天然免疫防御能力和增强机体的抗肿瘤和抗感染能力,对肿瘤和感染性疾病可能具有辅助治疗作用。

参考文献:

- [1] 王玉贞,刘晓萍,姚如水,等. 扇贝多肽对⁶⁰Co 辐射损伤的胸腺细胞影响作用的研究[J]. 中国海洋药物, 2001, 20(6): 20.
- [2] Zhang CM, Zhang HM, Yu YJ, et al. Immunomodulation of polypeptides from *Chlamys farreri* in vitro[J]. 中华微生物学和免疫学杂志(英文版), 2005, 3(2): 105.
- [3] 张彩梅,张红梅,于业军,等. 扇贝多肽免疫调节的体内研究[J]. 中国海洋药物, 2005, 24(3): 18.
- [4] Kathleen R, Rasmussen, Mark CH. Experimental cryptosporidium parvum infections in immunosuppressed adult mice[J]. *Infection and Immunity*, 1992; 60(4): 1648.
- [5] 陈季强,谢强敏,方理本,等. 硒酵母对小鼠免疫功能和应激能力的影响[J]. 微量元素与健康研究, 1997, 14(1): 15.
- [6] 李应全,盛少虎,侯琦,等. 甘糖酯对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国海洋药物, 1995, 14(3): 14.
- [7] 王甫厚,陈绍先,郭彩云,等. LDH 释放法测细胞毒的方法学研究[J]. 中国免疫学杂志, 1990, 6(2): 115.

(收稿日期: 2006-03-03)