

抗氧化营养素对小鼠免疫功能的调节作用

蔡美琴¹ 王少墨¹ 程五凤¹ 张冬青²

(1. 上海第二医科大学医学营养教研室, 2. 上海第二医科大学免疫学教研室, 上海 200025)

摘要:为研究不同剂量的抗氧化营养素联用对免疫功能正常小鼠的细胞免疫调节作用, 每天给小鼠补充硒 1 μg β -胡萝卜素 0.1 mg、VE 0.24 mg、VC 1.2 mg。结果显示, 小鼠的淋巴细胞转化功能显著增强, 脾细胞对 IL-2 的反应活性增强以及提高了 NK 细胞活性。但超过一定的剂量范围(硒 5 μg β -胡萝卜素 0.5 mg、VE 1.2 mg、VC 6.0 mg) 则表现出明显的免疫抑制作用 ($P < 0.01$), 表明抗氧化营养素有双向的免疫调节作用。研究还发现硒 β -胡萝卜素、VE、VC 联用在一定剂量范围内具有抗免疫抑制剂(环磷酰胺)的作用, 刺激免疫功能低下的小鼠脾细胞产生 IL-2, 增强淋巴细胞的转化功能, 提高 NK 细胞活性, 恢复受抑制的淋巴细胞产生 IL-2 的能力。

关键词:营养保健品 免疫系统 小鼠

中图分类号: R15; TS218 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 8456(2001)02 - 0013 - 03

目前认为许多疾病现象均与脂质过氧化及免疫功能低下有关。抗氧化营养素如 β -胡萝卜素、VC、VE、硒对机体有多方面的作用,^[1] 对免疫功能的调节也有报道,^[2,3] 补充上述营养素可以纠正和提高机体的免疫反应。^[4] 同时, 某些抗氧化营养素之间存在着协同作用, 如 VC 可使氧化型的 VE 生成还原型 VE, 从而恢复 VE 的抗氧化活性。我们在以往研究单一营养素作用的基础上, 将上述 4 种主要抗氧化营养素配伍制成合剂, 以观察其对正常小鼠的免疫调节作用, 包括增强其免疫功能和拮抗环磷酰胺引起的免疫功能低下, 为相应的保健食品开发和实际应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雌性 Balb-c 纯系小鼠 50 只, 6~8 周龄, 平均体重 20 g, 购自中科院上海实验动物中心。

1.1.2 动物模型的建立 将 Balb-c 小鼠随机分成 5 组, 每组 10 只。分别为: 1) 对照组(C 组), 每只小鼠每天胃饲生理盐水 0.2 mL; 2) 低剂量组(A 组), 每只小鼠每天胃饲 A 液 0.2 mL; 3) 高剂量组(B 组), 每只小鼠每天胃饲 B 液 0.2 mL; 4) 环磷酰胺组(Cy), 每只小鼠每 5 天腹腔注射环磷酰胺 0.6 mg (即 30 mg/kg BW), 共 4 次; 5) 环磷酰胺 + A 液组(Cy + A), 环磷酰胺同上给药, 同时每只小鼠每天胃饲 A 液 0.2 mL。前 3 组为免疫功能正常组, 后 2 组为免疫功能低下组。所有小鼠自由进食和饮水, 连续灌胃

20 d 后, 停止试验记录体重, 无菌条件下取血, 并处死动物, 取其脾脏、肝脏及肌肉冰冻保存, 待测。

1.1.3 试剂 水溶性 VE、VC 和 β -胡萝卜素均购自瑞士罗氏制药公司; 硒酵母购自上海酵母厂; 环磷酰胺由上海第 12 制药厂生产; 有丝分裂原刀豆蛋白 A (ConA) 是 Sigma 公司产品。³H-甲基胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-TdR, 1 mCi/mL) 购自上海原子核研究所; 人重组白细胞介素-2 (rIL-2) 由上海生化所提供。

A 液: 每毫升含 Se 5 μg β -胡萝卜素 0.5 mg, VE 1.2 mg, VC 6 mg。

B 液: 每毫升含 Se 25 μg β -胡萝卜素 2.5 mg, VE 6 mg, VC 30 mg。

1.2 实验

1.2.1 淋巴细胞转化试验方法 处死小鼠, 无菌取脾组织, 制成单细胞悬液, 加 200 μL 悬液于 96 孔圆底板中(每孔含 ConA 4 μg), 每组重复 3 孔, 设对照 4 孔。37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养 3 d (72 h), 于终止培养前 16 h 加入 ³H-TdR, 每孔 1 μCi (比活 22 μCi)。培养结束后用多头细胞收集仪收集细胞, 液体闪烁仪 (Rack-beat 1290, Pharmacia) 测定其 CPM 值, 并计算刺激指数 (SI):

$$\text{刺激指数 (SI)} = \frac{\text{试验组 CPM}}{\text{对照组 CPM}} \times 100\%$$

1.2.2 NK 细胞杀伤活性测定方法 采用 LDH 释放法, 小鼠脾细胞悬液用 5% BSA-RPMI1640 培养液调细胞浓度至 $2.5 \times 10^7/\text{mL}$ 。靶细胞采用体外传代的小鼠白血病细胞株 YAC-1 细胞 ($5 \times 10^5/\text{mL}$), 小鼠

细胞及靶细胞 E/T=50:1 加至 96 孔圆底板中,离心 5 min,37℃,5% CO₂ 培养 3 h,加入预冷的 RPMI1640 培养液 50 μL,离心 5 min,吸 100 μL 上清液转移至另一 96 孔平底板中,加入 LDH 底液每孔 100 μL,3 min 后加入 1 mol/L HCl(每孔 50 μL)终止反应,于自动酶标仪上读取波长 490 nm 的 A 值。

$$\text{NK 细胞杀伤活性}(\%) = \frac{\text{试验孔 A 值} - \text{自然释放孔 A 值}}{\text{最大释放孔 A 值}} \times 100\%$$

其中自然释放孔不加效应细胞,最大释放孔用 1% NP-40 处理细胞。

1.2.3 白介素-2(IL-2)的活性测定 制备 IL-2,小鼠的脾脏以 RPMI1640 培养液配制 5×10⁶/mL 细胞悬液,加入 24 孔细胞培养板中,每孔 1 mL,ConA 终浓度为 5 μg/mL。于 37℃,5% CO₂ 孵箱培养 24 h,取上清液,-20℃贮存待测。采用 MTT 法测定 IL-2 的活性浓度。

2 结果

2.1 小鼠一般情况及体重变化

实验进程中,B 组及 CY+A 组各有 1 只小鼠分别在第 15、17 天死去;B 组小鼠体重增加缓慢,并表现出较明显的食欲下降、动作反应迟钝。CY 及 CY+A 组也有上述表现。实验结束时,上述 3 组小鼠平均体重增加值低于 A 组及对照组(P<0.01),而 A 组与对照组的平均体重增加值无显著性差异(P>0.05)。

2.2 抗氧化剂对小鼠淋巴细胞转化功能的影响

2.2.1 抗氧化营养素对小鼠淋巴细胞转化的双向调节作用 在 A 剂量范围内表现为正向调节作用,B 剂量范围内表现为抑制作用。同时,使用免疫抑制剂组(CY 组)小鼠脾细胞 T 淋巴细胞转化功能(ConA)较正常组明显下降,其抑制百分率(100-SI)为 38.7%(表 1)。同时加入抗氧化营养素,则对抗了环磷酸胺引起的免疫抑制,使细胞 CPM 值回升

表 1 抗氧化营养素对正常小鼠及环磷酸胺处理小鼠淋巴细胞转化功能的影响($\bar{x} \pm s$) %

组别	小鼠数 <i>n</i>	ConA CPM	SI 刺激指数	抑制率
对照组	10	223667.2 ±36671	100.0	0.0
A 组	10	262939.9 ±51095 ⁽¹⁾	117.6	-
B 组	9	195185 ±46995	87.3	12.7
环磷酸胺组	10	137105 ±53261 ⁽²⁾	61.3	38.7
环磷酸胺+A 组	9	235220 ±34219 ⁽³⁾	105.2	-

注:(1)与对照组相比 P<0.05,(2)与对照组相比 P<0.01,(3)与环磷酸胺组相比 P<0.01。

(P<0.05),略超过正常对照组水平(SI=105.2%),与正常对照组(SI=100%)相比,在统计学上无显著性差别。

2.2.2 抗氧化营养素对小鼠 NK 细胞活性的影响

表 2 实验结果表明,A 剂量的抗氧化营养素合剂分别对小鼠 NK 细胞活性有增殖作用(P<0.01);B 剂量则对小鼠 NK 细胞活性有明显抑制作用(P<0.01);免疫抑制剂-环磷酸胺可使小鼠 NK 细胞活性极度下降,抑制百分率(100-RR)为 50.2%。同时加用抗氧化营养素,NK 细胞活性虽未能达到正常对照组水平,但已有明显上升,有显著性统计学差异(P<0.01)。

表 2 抗氧化营养素对正常小鼠及环磷酸胺处理小鼠 NK 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	小鼠数 <i>n</i>	NK 活性 %	RR
对照组	10	27.5 ±4.57	100.0
A 组	10	43.4 ±1.80 ⁽¹⁾	157.8
B 组	9	17.7 ±6.08 ⁽¹⁾	63.4
环磷酸胺组	10	13.7 ±3.24 ⁽¹⁾	49.8
环磷酸胺+A 组	9	20.0 ±7.4 ^(1,2)	72.7

注:(1)与对照组相比 P<0.01,(2)与环磷酸胺组相比 P<0.01。

2.2.3 抗氧化营养素对 IL-2 生成的影响 表 3 结果表明口服 A 剂量的抗氧化营养素能使小鼠脾细胞产生的 IL-2 明显较对照为高。而 B 剂量则较对照组为低。运用环磷酸胺能抑制小鼠脾细胞产生 IL-2,当加用 A 剂量的抗氧化营养素能使小鼠脾细胞产生 IL-2 增加,对抗由于环磷酸胺而产生的抑制作用。

表 3 抗氧化营养素对正常小鼠及环磷酸胺处理小鼠 IL-2 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	小鼠数 <i>n</i>	IL-2 活性 %
对照组	10	26.30 ±8.03
A 组	10	36.07 ±14.95 ⁽¹⁾
B 组	9	19.80 ±2.46 ⁽²⁾
环磷酸胺组	10	19.15 ±1.56 ⁽²⁾
环磷酸胺+A 组	9	24.76 ±9.64

注:(1)与对照组相比 P<0.01,(2)与对照组相比 P<0.05。

3 结论

近年来有研究报导,VE、VC、β-胡萝卜素以及微量元素硒等抗氧化营养素具有免疫增强作用。^[6,7]我们以往的实验结果也已证实。但是,多个抗氧化营养素联用的效果如何?是拮抗,协同还是两者之和?

本次实验结果显示硒 β -胡萝卜素、VE、VC在一定的剂量范围内联用可以提高正常小鼠的细胞免疫功能,表现为增强淋巴细胞的转化功能,增强脾细胞对IL-2的反应活性以及提高NK细胞活性。但是,当这些物质超过一定的剂量范围反而表现出有免疫抑制作用。由此可见,多种抗氧化营养素对小鼠免疫功能具有双向调节作用。

NK细胞是体内一组具有自发性抗肿瘤、抗病毒的效应细胞群,因为本身可直接杀伤肿瘤而称为肿瘤细胞生长初始阶段的第一道防线,而且可以产生并释放某些可溶性因子,抑制肿瘤细胞的生长和抗病毒作用。NK细胞毒效应可被IFN、IL-2、IL-1、IL-6及TNF等多种细胞因子所增强。

白介素-2(IL-2)是最重要的淋巴因子之一,具有多种生物学功能,不仅可以在试管内使T细胞持续生存,而且在免疫调节网络中也占重要地位。IL-2主要由T辅助细胞产生,脾脏中含有大量的T细胞、NK细胞及LAK细胞等,它们都需要在IL-2作用下增殖分化,IL-2的水平也间接地反映了T细胞的功能。

同时,本次研究也表明,硒 β -胡萝卜素、VE、VC联用在一定剂量范围内能对抗免疫抑制剂(环磷酰胺)的作用,可刺激免疫功能低下小鼠的脾细胞产生IL-2,增强淋巴细胞的转化功能,提高NK细胞的活性,恢复受抑制的淋巴细胞产生IL-2的能力。临床

报道T细胞功能受抑的病人,如晚期肿瘤病人、老年人、原发性或获得性免疫缺陷病人的淋巴细胞产生IL-2的能力低下,如果给这些人以促进IL-2生成的药物或营养补充剂,应该是有益的,但考虑到抗氧化营养素对免疫功能的调节是双向的,故在实际应用时应特别注意其所用剂量。

参考文献:

- [1] 金毅. 补充硒和维生素E对大鼠心肌腺苷酸含量及抗氧化损伤的研究[J]. 营养学报, 1999, 21(2): 168.
- [2] Michelle S, Santos, et al. Natural killer cell activity in elderly men is enhanced by β -carotene supplementation [J]. Am J Clin Nutr, 1996, 64: 772—777.
- [3] John W, Erdman, et al. Beta-carotene and the carotenoids beyond the intervention trials [J]. Nutrition Reviews, 1996, 54(6): 185—188.
- [4] Kee-Ching G, Teng, et al. Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults [J]. Am J Clin Nutr, 1996, 64: 960—965.
- [5] 王海滨. 红细胞产生的NK细胞增强因子及其生物学作用[J]. 国外医学肿瘤学分册, 1996, 26(3): 141—144.
- [6] 张强, 等. 维生素E对烧伤小鼠免疫功能改善及其机制[J]. 营养学报, 1994, 16(1): 34.
- [7] 马晓英. β -胡萝卜素对小鼠肿瘤免疫的影响[J]. 营养学报, 1993, 15(3): 338.

The regulative effect of antioxidative nutrition to immunity of mouse//Cai Meiqin, Wang Shaomo, Cheng Wufeng, et al. //Chinese Journal of Food Hygiene. - 2001, 13(2): 13~15

Abstract: To study the cell immunity regulative effect of different dose antioxidative nutrition on mouse with normal immunity. 50 mice were divided into 5 groups, each groups received different dose of antioxidative nutrition for 20 days. It was found that the immune-normal mice filled-in Se 1 μ g β -carotene 0.1 mg, VE 0.24 mg, VC 1.2 mg (Dose A) showed obviously to enhance the lymphocyte proliferation and the activity of natural killer (NK) cell and the respondent activity of spleen cell to IL-2 ($P < 0.01$). When mice were filled with Se 5 μ g β -carotene 0.5 mg, VE 1.2 mg, VC 6.0 mg, their immunity were significantly lower than the controlled group ($P < 0.01$). It showed that antioxidative nutrition have both positive and negative immunity regulative effects. The model of immune-suppressed mice were made by intra-peritoneal injection of cyclophosphamide. It was found that the immune-suppressed mice filled-in Dose A showed a obviously increase in the lymphocyte proliferation and NK cell activity and spleen cell activity to IL-2.

Author's address: Cai Meiqin, Shanghai Second Medical University, 280 chongqing nan Road, Shanghai 200025, PRC.

Key Words: Dietary Supplements Immue System Mice