

大豆多糖对S₁₈₀荷瘤小鼠 抗肿瘤作用的免疫机制研究

张秀娟, 刘 斌, 孙宇婷, 季宇彬

(哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心生物安全评价研究所,
国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江哈尔滨 150076)

摘 要:从免疫学角度出发探讨大豆多糖的抗肿瘤作用。采用动物移植性肿瘤实验观察大豆多糖对小鼠体内肿瘤细胞生长和免疫器官胸腺、脾脏的影响; MTT法测定T淋巴细胞增殖功能; 流式细胞仪检测大豆多糖对S₁₈₀荷瘤小鼠T淋巴细胞亚群的影响; ELISA法检测荷瘤小鼠血清中细胞因子IL-2含量。结果表明大豆多糖对S₁₈₀肉瘤生长有抑制作用, 且以高剂量最佳; 各剂量组对脾脏指数均有显著性提高, 但中、高剂量给药组对胸腺有抑制作用; 能提高小鼠脾淋巴细胞的增殖活性, 与阴性对照组相比, 中、高剂量组差异显著。大豆多糖明显增强ConA刺激的淋巴细胞增殖, 与阴性对照组比较, 中、高剂量组差异显著; 能够不同程度地提高S₁₈₀荷瘤小鼠脾细胞CD₄⁺细胞数, 增加CD₄⁺/CD₈⁺细胞比值; 能提高S₁₈₀荷瘤小鼠外周血血清中IL-2的含量。大豆多糖通过提高T淋巴细胞的增殖活性, 并促进IL-2等细胞因子的分泌, 由此发挥抗肿瘤作用。

关键词:大豆多糖, 抗肿瘤, T淋巴细胞, CD分子, IL-2

Effects of soybean polysaccharide on antitumor and immunological mechanism of mice bearing S₁₈₀

ZHANG Xiu-juan, LIU Bin, SUN Yu-ting, JI Yu-bin

(Institute of Biosafety evaluation, Research Center on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China)

Abstract: To study the effect of soybean polysaccharides (SSPS) on antitumor and immune regulation of mice bearing S₁₈₀. The effect of SSPS on antitumor and spleen index and thymus index were observed by tumor transplant experiment of animal; MTT examines T-lymphoid cell proliferation of the mice of tumor cell with S₁₈₀; Adopting flow cytometry to determine T cell faciation; Use the ELISA method to examine the serum level of IL-2 in tumor mice. SSPS can inhibit the growth of S₁₈₀ and the effect of high dose group was best. The spleen index was influenced by every dose group but thymus index was inhibited by middle and high dose; it can enhance the T cell proliferation after the ConA provok and has significantly difference. SSPS can enhance the CD₄⁺ T cell number in different extent, increase the CD₄⁺/CD₈⁺ cell ratio; SSPS can obviously enhance the serum level of IL-2, have significantly difference. SSPS had the notable anti-tumor, increased T-lymphoid cell proliferation, and promoted IL-2 secreting thus played its anti-tumor role.

Key words: soybean polysaccharides; antitumor; T-lymphocytes; CD molecule; IL-2

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)02-0389-04

据《本草纲目》记载, 大豆有除痈肿、逐水胀、长肌肤、填骨髓等作用。从豆渣中提取的可溶性大豆多糖(SSPS)具有多种生物学功能, 主要表现在膳食纤维上, 可以有效预防肥胖症、结肠癌、高血压、心脏病和动脉硬化, 可以增强人体的免疫能力^[1-2]。目前

主要用于食品行业的研究与应用, 而对大豆多糖的生物学活性的药物研究还很少, 因此本文以纯度为95%的大豆多糖为研究对象, 探讨大豆多糖的抗肿瘤作用和其免疫调节机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

昆明种小鼠 18~22g, 雌雄兼用, 普通级, 购于哈尔滨医科大学附属肿瘤医院动物养殖中心, 动物合格证号: SCXX(黑)2006-008; 肉瘤 S₁₈₀ 购于哈

收稿日期: 2011-01-04

作者简介: 张秀娟(1962-), 女, 教授, 博士, 从事肿瘤药理研究工作。

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(D201043)。

尔滨医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究所;大豆多糖 纯度 95%,上海百奥特植物蛋白科技有限公司;刀豆蛋白 A Sigma 公司;RPMI1640 培养粉 Gibco 公司;四氮唑蓝 MTT Sigma 公司;DMSO 天津市光复精细化工研究所,批号 20080723;Anti-mouse-PE-CD8 单克隆抗体、Anti-mouse-FITC-CD4 单克隆抗体 Multisciences Biotech Co.,Ltd.;小鼠白介素-2 (IL-2)试剂盒 美国 RND 公司进口分装。

Sartorius BS110S 型万分之一电子天平 德国 BSS;SANYO MC0175 型 CO₂ 培养箱 日本三洋公司;CKX-41-32 倒置显微镜 Olympus 公司;JJT-900/1300超净工作台 苏净集团;SUNRISE 酶标仪 瑞士 TECAN 公司;CLOUTER EPICS-XL 流式细胞仪 美国 Beckman-Coulter 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠瘤重的影响

1.2.1.1 建立小鼠肿瘤模型 S₁₈₀ 肉瘤腹水接种 10d 的种鼠,取少量腹水,加生理盐水稀释成 1:3 的瘤细胞悬液,按 0.2mL/只接种 S₁₈₀ 肉瘤于小鼠右前肢腋下。

1.2.1.2 实验动物分组和给药 50 只昆明小鼠,随机分成 5 组,每组 10 只,雌雄各半。小鼠荷瘤接种后 24h 给各组 S₁₈₀ 荷瘤小鼠分别腹腔注射给药,分为阴性对照组:生理盐水;大豆多糖给药组:高剂量组 (150mg/kg·d)、中剂量组 (100mg/kg·d)、低剂量组 (50mg/kg·d);阳性对照组:环磷酰胺 CTX (25mg/kg·d),给药剂量为 0.2mL/只·d,连续给药 10d,停药次日处死动物。

1.2.1.3 测定抑瘤率 停药次日处死,分别称取小鼠体重、瘤块重,计算肿瘤抑制率^[4]。

抑瘤率 (%) = (对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 × 100%

1.2.2 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠胸腺指数和脾指数的影响 小鼠肿瘤模型的建立、实验动物分组及给药同 1.2.1,连续给药 10d,停药次日处死动物。分别剥取小鼠胸腺和脾脏,由下式计算:

胸腺指数 = 平均胸腺重 (mg) / 平均体重 (g);脾指数 = 平均脾重 (mg) / 平均体重 (g)。

1.2.3 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠细胞免疫功能的影响

1.2.3.1 实验动物模型制造方法及给药剂量与途径同 1.2.1。

1.2.3.2 脾淋巴细胞的制备 停止给药 24h 后,处死动物,收集脾细胞于离心管中,以 1500r/min 离心 10min,弃上清液。脾细胞悬液用 10 倍体积的 Tris-NH₄Cl 溶液重悬,37℃ 预温,静置 4min,裂解红细胞,1000r/min 离心 5min 得白细胞液。再次用 Hanks 液洗涤 2 次,RPMI-1640 培养液 (10% 胎牛血清) 稀释细胞成 2 × 10⁶/mL,置 4℃ 冰箱备用。

1.2.3.3 每只小鼠的细胞悬液均分为对照孔和 ConA 孔,各设三个复孔。于 96 孔板每孔加入细胞悬液 100μL,对照孔加 100μL RPMI-1640,ConA 孔加 100μL ConA (终浓度为 10μg/mL),37℃,5% CO₂ 培养箱孵育培养 48h,取出培养板,每孔加入 MTT (5mg/mL) 10μL,继续培养 4h,取出上清,每孔加

入 DMSO 150μL,吹打混匀,孵育 10min,酶标仪测定 570nm 处 OD 值。

T 淋巴细胞刺激指数 SI = ConA 刺激孔平均 OD 值 / 对照孔平均 OD 值

1.2.4 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠 T 淋巴细胞亚群 CD₄⁺、CD₈⁺ 的影响 实验动物模型制造方法及给药剂量与途径按 1.2.1 进行;停止给药后 24h 处死小鼠,制备脾淋巴细胞。采用直接免疫荧光标记法染色,按浓度取 1.0 × 10⁶ 个细胞 200μL 至 1.5mL EP 管,2000r/min 离心 5min,去上清液,分别加入稀释好的荧光标记抗小鼠 CD₄、CD₈ 的单克隆抗体各 100μL 混匀,同时设空白对照组和单加 CD₄、CD₈ 抗体的对照组,便于仪器调零处理。4℃ 避光 30min,加入 1mL PBS 缓冲液洗涤,2000r/min 离心 5min,去上清液,加入 PBS 重悬细胞,加入 1% 多聚甲醛 0.4mL 固定 30min,混匀,流式细胞仪检测。

1.2.5 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠外周血清中 IL-2 含量的影响 实验动物模型制造方法及给药剂量与途径按 1.2.1 进行;停药 24h 后,眼球采血,室温凝固 30min,2000r/min 离心 10min,收集血清,ELISA 酶联免疫检测法测定。

1.2.6 统计学分析 用 SPSS15.0 软件处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本比较采用方差检验。

2 结果与分析

2.1 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠瘤重的影响

大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠肿瘤抑制效果如表 1 所示,与生理盐水比较,大豆多糖三个剂量组对肿瘤细胞生长均有抑制作用,且各组差异显著,与阳性药环磷酰胺相比,大豆多糖低、中剂量组差异显著,高剂量组有差异。

表 1 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠肿瘤重量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 The effect of SSPS on tumor weight of mice with RBC S₁₈₀ ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量 (mg/kg·d)	瘤重 (g)	抑制率 (%)
阴性对照组	-	1.0036 ± 0.0788	-
CTX	25	0.2464 ± 0.0308	75.45
低剂量组	50	0.6666 ± 0.0363 ** *	33.58
中剂量组	100	0.5983 ± 0.0416 ** *	40.38
高剂量组	150	0.4171 ± 0.0481 ** *	58.44

注:与阴性对照组比较,*P < 0.05; **P < 0.01,表 2~表 4 同;与阳性对照组比较*P < 0.05; **P < 0.01。

2.2 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠胸腺指数和脾指数的影响

大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠胸腺指数和脾指数的影响如表 2 所示,与阴性对照组比较,大豆多糖各给药组胸腺指数都显著提高,且各剂量组差异显著,低剂量组高于中、高剂量组,可能随着给药量的增加,对胸腺的增长起抑制作用。

2.3 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠细胞免疫功能的影响

大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠淋巴细胞增殖的影响如表 3 所示,与阴性对照组比较,大豆多糖各给药组能

表2 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 The effect of SSPS on thymus index of mice with RBC S₁₈₀ ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量 (mg/kg · d)	胸腺指数 (mg/g)	脾指数 (mg/g)
阴性对照组	-	1.2925 ± 0.1341	4.9302 ± 0.6368
低剂量组	50	3.1498 ± 0.3619 **	6.6749 ± 0.4345 *
中剂量组	100	2.6559 ± 0.2210 **	7.7092 ± 0.5309 **
高剂量组	150	2.2194 ± 0.1609 **	8.7322 ± 0.4991 **

表3 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠 T 淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 The effect of SSPS on T lymphocyte proliferation of mice with RBC S₁₈₀ ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	给药剂量 (mg/kg · d)	OD ₅₇₀ 值	+ ConA 值	增值指数
阴性对照组	-	0.2408 ± 0.0237	0.3148 ± 0.0374	1.3073
低剂量组	50	0.2453 ± 0.0261	0.3283 ± 0.0301	1.3384
中剂量组	100	0.4448 ± 0.0271 **	0.6610 ± 0.0457 **	1.4861
高剂量组	150	0.4790 ± 0.0579 **	0.7160 ± 0.0743 **	1.4948

表4 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠外周血清中 IL-2 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 The effect of SSPS on IL-2 in serum of mice with RBC S₁₈₀ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	给药剂量 (mg/kg · d)	IL-2 含量 (pg/mL)
阴性对照组	-	24.4625 ± 4.1170
低剂量组	50	39.5386 ± 4.9840
中剂量组	100	152.9533 ± 28.8488 **
高剂量组	150	190.9379 ± 43.9723 **

提高淋巴细胞的增殖活性,其中,中、高剂量组差异显著,大豆多糖给药组也能明显增强 ConA 刺激的淋巴细胞增殖的效果,与阴性对照组比较,中、高剂量组差异显著。另外,低剂量组分别与中、高剂量组比较,差异显著。

2.4 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠 T 淋巴细胞亚群数量影响

由图 1 可见,当肿瘤发生时,与阴性对照组相比,CD₄⁺ 水平降低,CD₄⁺/CD₈⁺ 比值明显降低,机体以负调节占优势。与阴性对照组相比,大豆多糖各给药组均能提高 CD₄⁺ 水平,中、高剂量组能提高 CD₄⁺/CD₈⁺ 比值,说明大豆多糖能提高其细胞免疫功能,具有免疫增强作用,另外给药组还能一定程度的提高 CD₈⁺ 水平,其表达水平超过正常组水平。

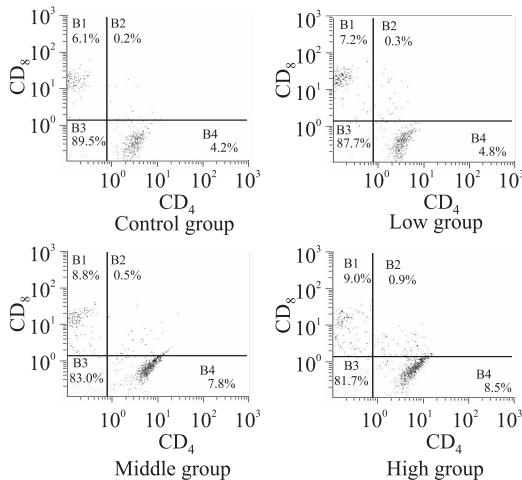


图1 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠 T 淋巴细胞亚群 CD₄⁺ 和 CD₈⁺ 影响

Fig.1 SSPS to the effect of CD₄⁺ and CD₈⁺

on mice with RBC S₁₈₀ for the T lymphocyte subsets

2.5 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠外周血清中 IL-2 含量的影响

由表 4 可见,与阴性对照组比较,大豆多糖各给药组均能提高 S₁₈₀ 荷瘤小鼠外周血清中 IL-2 的含量,且中、高两个剂量组与对照组相比差异极显著。

3 讨论与结论

移植性肿瘤实验是体内常用的抗肿瘤药物筛选方法^[3],通过 S₁₈₀ 肿瘤细胞腋下移植实验,采用腹腔注射给药方法,测定大豆多糖体内抗肿瘤作用效果。结果表明:大豆多糖高、中、低各剂量组小鼠腋下肿瘤重量均明显低于阴性对照组,且各组均呈现显著性差异,说明大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠肿瘤细胞有一定的抑制作用。

免疫器官脏器指数是衡量机体免疫功能的初步观察指标^[4]。研究结果显示,与阴性对照组相比大豆多糖给药组能显著提高小鼠的胸腺和脾脏重量,且组间也具有显著性差异,但随着给药剂量增加,中、高剂量组对胸腺有明显抑制作用。初步说明,增强免疫功能是大豆多糖抗肿瘤的可能途径之一。淋巴细胞的增殖和分化是机体免疫应答过程中的一个重要阶段,淋巴细胞受到抗原或促有丝分裂原刺激时,增殖能力的强弱反映了淋巴细胞功能的高低。利用 MTT 法测定淋巴细胞增殖功能,ConA 作为 T 淋巴细胞有丝分裂原,促进 T 淋巴细胞的增殖。结果证明,大豆多糖能提高淋巴细胞的增殖活性,也能增强 ConA 刺激的淋巴细胞增殖的效果,且各剂量组效果显著。机体抗肿瘤特异性免疫反应以 T 细胞介导的免疫应答为主^[5]。成熟的 T 细胞根据其细胞膜表面表达的抗原性糖蛋白分子分为 CD₄⁺ T 淋巴细胞和 CD₈⁺ T 淋巴细胞两个亚群,二者之间相互影响、相互调节,保持 CD₄⁺/CD₈⁺ 值相对稳定,维持机体正常的免疫功能。淋巴细胞亚群比例上升或下降,反映机体免疫功能发生相应变化,当肿瘤发生时,CD₄⁺/CD₈⁺ T 细胞比值会降低,说明机体的免疫状态失衡,呈负相免疫调节。结果

显示,大豆多糖能够不同程度地提高 S_{180} 荷瘤小鼠脾细胞 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞数,增加 CD_4^+/CD_8^+ 细胞比值,说明大豆多糖具有提高荷瘤小鼠免疫力的功能。IL-2 并不是直接杀灭肿瘤细胞活性,其抗肿瘤机理在于刺激、活化其效应细胞,间接发挥抗肿瘤作用。研究中发现肿瘤的形成可使小鼠体内 IL-2 的产生不同程度的下降,从而干预了免疫系统的抗肿瘤功能,以利于肿瘤的生长。结果显示,大豆多糖各剂量组能提高荷瘤小鼠血清中的 IL-2 含量。综上所述,大豆多糖抗肿瘤机制是通过调节机体免疫功能实现的。

参考文献

[1] 李宏臻,袁利兵,张文波,等.大豆多糖提取工艺优化[J].

江西农业大学学报,2009,31(6):1146-1151.

[2] 郑鸿雁,闵伟红,昌友权,等.玉米须多糖调节免疫功能研究[J].食品科学,2004,25(10):291-293.

[3] 李璘,邱蓉丽,程革,等.女贞子多糖抗肿瘤作用研究[J].中国药理学通报,2008,24(12):1619-1622.

[4] Mengyao Yu, Xiaoyan Xu, Yuan Qing, et al. Isolation of an anti-tumor polysaccharide from auricularia polytricha (jew's ear) and its effects on macrophage activation [J]. Eur Food Res Technol, 2009, 228: 477-485.

[5] 李冰,张学成,高美华,等.钝顶螺旋藻藻蓝蛋白和多糖的抗肿瘤免疫活性研究[J].中国海洋大学学报,2004,34(3):396-402.

(上接第 344 页)

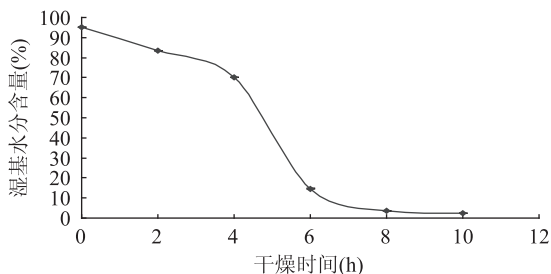


图1 干燥曲线图

Fig.1 Curve diagram of drying

行非线性回归,将数据与式(1)、式(2)、式(3)用 Gauss-Newton 算法拟合,结果见表9,采用残差的平方和(以下简称残方和)、均方根来比较不同模型的优劣。实验测定值与模型预示值之间的离差程度可以通过残方和与均方根的大小来表示,残方和和均方根的数值越小,表明模型预示值越接近实验测得的数据,即该模型与实验的真实模型越接近,相关性越高。从表9看出,经验模型的残方和与均方根数值均较大,表明其与该实验的拟合程度不高。单项扩散模型和 Page 模型的残方和与均方根数据均较小,其二者的均方根数据比较接近,分不出彼此的优劣,但 Page 模型的残方和是单项扩散模型的 7.5 倍,所以认为实验数据与单项扩散模型的相关性最高,低热量型柚皮果糕干燥过程的失水规律可以用单项扩散模型来描述。

表9 三种回归模型比较

Table 9 Comparison of three mathematical regression models

模型	残方和	均方根
单项扩散模型	0.5265	15.5460
Page 模型	3.9366	13.8410
经验模型	27.3693	96.3153

3 结论

影响配方感官评分的因素排列顺序为:三氯蔗糖 > 果胶 > 柠檬酸 > 低聚麦芽糖 > 低聚果糖。低热量型柚皮果糕的优化配方为:以柚皮质量为基准计,添加果胶 10%,三氯蔗糖 0.08%,低聚果糖 6%,低聚麦芽糖 4%,柠檬酸 1%;固定加入苯甲酸钠 0.05%。

由最佳配方做出来的果糕酸甜适中,口感细腻。

影响果糕水分含量的因素排序为:干燥时间 > 铺层厚度 > 干燥温度 > 是否翻面。低热量型柚皮果糕的最佳烘干条件为:干燥时间 4h,铺层厚度 4mm,干燥温度 80℃,不翻面。单项扩散模型能够较好地描述柚皮果糕干燥过程的失水规律。

参考文献

[1] 徐泽敏,殷涌光.柚皮的综合利用[J].食品研究与开发,2007,28(1):176-178.

[2] 李夏.柚皮中多糖的提取及测定[J].价值工程,2010(18):255-256.

[3] 刘宝全,王剑锋,范圣第.柚皮精油的溶剂提取与 GC-MS 分析[J].保鲜与加工,2010,10(4):48-50.

[4] 龚盛昭,陈秋基,杨卓如.从沙田柚皮中提取精油的工艺研究[J].日用化学工业,2003,33(6):400-402.

[5] 陈龙.超临界流体萃取柚子皮香精油的工艺研究[J].实验报告与理论研究,2007,10(7):11-14.

[6] 杨洋,韦小英.柚皮黄酮类化合物提取方法和抗氧化性的研究[J].食品与发酵工业,2002,28(6):9-11.

[7] 贾冬英,姚开,谭敏,等.柚皮中柚皮苷的乙醇提取工艺研究[J].中草药,2002,33(9):801-802.

[8] 赵梅,张晶,刘婧.从柚皮中提取低甲氧基果胶的工艺研究[J].食品与药品,2008,10(7):29-31.

[9] 罗均,李小定,何旭,等.柚皮纤维素的提取工艺研究[J].食品工业科技,2010,31(4):273-276.

[10] 王林果,蒋玲艳,黄国欢,等.柚皮中膳食纤维的提取及其应用[J].安徽农业科学,2008,36(24):10492-10494.

[11] 蒋玲艳,王林果,宾蓉礼,等.沙田柚柚皮提取物的抗菌性能研究[J].安徽农业科学,2008,36(22):9354-9355.

[12] 李春美,杜靖,谢笔钧.柚皮提取物的抑菌作用[J].食品与发酵工业,2004,30(1):38-41.

[13] B H Hameed, D K Mahmoud, A L Ahmad. Sorption of basic dye from aqueous solution by pomelo (Citrus grandis) peel in a batch system [J]. Colloids and Surfaces A, 2008, 316: 78-84.

[14] 王娟,李远志,陈人人,等.带式连续真空干燥香蕉粉的失水特性研究[J].食品与发酵工业,2005,31(6):19-21.