

文章编号: 1000-0615(2000)05-0476-04

鳖组织浆对鼠免疫功能的影响

钱国英¹, 朱秋华¹, 钱莹莹²

(1. 浙江万里学院生命科学系, 浙江 宁波 315101; 2. 宁波妇女儿童医院保健部, 浙江 宁波 315010)

摘要: 从体内抑制试验和体外培养巨噬细胞的杀瘤试验对甲鱼组织浆的抑瘤作用进行了研究。体内抑瘤试验采用组织浆灌胃方式, 计算抑瘤率和生命延长率。体外试验将巨噬细胞与肿瘤细胞共培养, 测定 NO 浓度与细胞毒效应。培养上清液中一氧化氮(NO)浓度采用 NO 试剂盒检测, 细胞毒效应通过 MTT 比色法检测。用黄嘌呤氧化酶法测定服用鳖组织浆大鼠脑、肝、血中的超氧化物歧化酶(SOD)含量。结果表明, 不同来源鳖的效果有区别, 野生鳖和仿生养殖鳖 2 龄与 4 龄对 S₁₈₀ 小鼠肿瘤生长有明显的抑制作用($P < 0.01$), 其抑瘤率分别达 70.69% 和 63.17%, 荷瘤小鼠的生命延长率均显著高于空白对照组($P < 0.01$), 分别为 40.59% 和 39.95%; 1 龄与 2 龄温室鳖的抑瘤效果也显著($P < 0.05$)。不同来源和不同年龄的鳖抑瘤效果有差异, 野生鳖、仿生鳖和温室鳖组织浆能有效地增强巨噬细胞的细胞毒活性和 NO 水平($P < 0.05 \sim 0.01$), 且随年龄增长, 效果增加。说明, 鳖组织浆可活化巨噬细胞, 诱导 NO 的产生, 增加杀瘤效应。鳖的组织浆能提高大鼠脑、肝、血中的 SOD 活性, 这种增强机体的抗衰老能力, 随鳖的生活环境而有变化。

关键词: 鳖组织浆; 抑瘤率; 巨噬细胞; 一氧化氮; 细胞毒; 超氧化物歧化酶

中图分类号: S966.5 文献标识码: A

Effects of turtle plasmasol on immune function in mice

QIAN Guo-ying¹, ZHU Qiu-hua¹, QIAN Ying-ying²

(1. Life Science Department, Zhejiang Wanli College, Ningbo 315101, China;

2. Health Care Department, Ningbo Women and Children Hospital, Ningbo 315010, China)

Abstract: An experiment was conducted to study the turtle plasmasol on tumor immunization, by feeding the turtle plasmasol to observe the inhibiting tumor trial and using MTT to assay the cytotoxicity of macrophages. The activities of SOD were observed to determine the effect of antiaging. The results showed that wild turtle and biomimetic turtle had shown marked inhibiting effect on S₁₈₀ tumor growth ($P < 0.01$). The inhibiting tumor rates were 70.69% and 63.17% respectively. Significant increase ($P < 0.01$) was observed at the longevity rate on them, 40.59% and 39.95% respectively. The intrusion of nitric oxide in murine macrophages and macrophage-mediated cytotoxicity in wild turtle group and biomimetic turtle group were significantly higher than those of control group ($P < 0.05 \sim 0.01$). These observations suggest that turtle plasmasol could be susceptible macrophage to increase NO production and improve the efficiency of killing tumor cells. Significant increase ($P < 0.01 \sim 0.05$) was also observed at the SOD activities between treatments and control, which indicated that turtle plasmasol could increase humoral immunity.

Key words: turtle plasmasol; inhibiting tumor rate; macrophage; NO; cytotoxicity, superoxidase

收稿日期: 1999-09-20

资助项目: 浙江省重点攻关项目(99102253)

作者简介: 钱国英(1961-), 女, 浙江宁波人, 副教授, 主要从事水产动物营养与免疫学研究。E-mail: qgy8@yeah.net

甲鱼素有滋阴清热、平肝益肾、破结化淤等功效之美称。将甲鱼作为滋补品和药品已有悠久的历史。为了探索甲鱼对机体免疫作用的影响,本试验对三种不同来源甲鱼对肿瘤细胞的抑制与杀伤作用和抗衰老效果等进行了研究,以期对甲鱼的全面开发利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

野生鳖取自绍兴外荡的地笼内,4周龄,体重519g。仿生鳖取自模仿自然生态环境养殖的嘉善六塔鳖业有限公司,2周龄和4周龄,体重分别为621g和1509g。温室鳖取自鱼用饲料厂养殖场,1周龄和2周龄,体重分别为498g和762g。三类鳖均为雄性。取裙边和肌肉组织块用玻璃匀浆器匀浆,用蒸馏水稀释成浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的组织浆液, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15min,取上清液分装于安培瓶中,置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱保存备用。

体内试验:一级ICR小鼠150只,体重 $23\pm 2\text{ g}$;一级wistar大鼠36只,雄性,体重 $220\pm 20\text{ g}$;瘤源动物为传代10d的 S_{180} 实体瘤小鼠。

体外培养试验:效应细胞为大鼠腹腔巨噬细胞($M\Phi$),用3%硫乙醇酸钠注射于BALB/C小鼠腹腔,4d后收集腹腔渗出液,按常规配成 $4\times 10^6\text{ mL}^{-1}$ 悬液,加于96孔细胞培养板,每孔 $100\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贴壁2h后去除非粘附细胞,洗涤后,取沉淀悬浮于10 mL含10%小牛血清的DMEM中即成。靶细胞为宫颈癌细胞株(HL),一氧化氮(NO)试剂盒购自晶美公司,MTT及DMSO购自华美公司。

1.2 方 法

体内抑瘤试验:将 S_{180} 实体瘤块匀浆,用生理盐水稀释成1:3的瘤细胞悬液,以0.2mL的用量接种于每只小鼠右前肢腋窝皮下。次日将接种小鼠随机分为6组,分别用野生鳖、仿生鳖2龄与4龄、温室鳖1龄与2龄和蒸馏水对各组小鼠进行灌胃,每23g体重0.5 mL。每天1次,连续15d。试验结束后,分别测定抑瘤率和生命延长率。

细胞杀伤效应采用MTT比色法^[1]。试验分设6组,分别为 $M\Phi$ 细胞悬液 $100\mu\text{L}$,加野生鳖液 $100\mu\text{L}$,或仿生鳖液2龄 $100\mu\text{L}$,或仿生鳖液4龄 $100\mu\text{L}$,或温室鳖液1龄 $100\mu\text{L}$,或温室鳖液2龄 $100\mu\text{L}$,对照组为 $200\mu\text{L}$ 细胞悬液。以效靶细胞比为10:1,20:1,30:1,40:1,50:1,60:1分别加入靶细胞。每一处理设3个复孔。72h后测A490nm值。

NO检测也分为6组。(1) $M\Phi$ +HL,(2) $M\Phi$ +HL+ $100\mu\text{L}$ 野生鳖液,(3) $M\Phi$ +HL+ $100\mu\text{L}$ 仿生鳖液2龄,(4) $M\Phi$ +HL+ $100\mu\text{L}$ 仿生鳖液4龄,(5) $M\Phi$ +HL+ $100\mu\text{L}$ 温室鳖液1龄,(6) $M\Phi$ +HL+ $100\mu\text{L}$ 温室鳖液2龄。效靶比40:1。每组设3个复孔,72h后收集上清液,按试剂盒说明测A500nm值。

抗衰老试验:取大鼠36只,随机分成6组,每组6只。分别用野生鳖、仿生鳖、温室鳖和蒸馏水灌胃。每天1次,每100g体重1mL,连续10d,从眼眶静脉丛采血,同时取脑和肝脏,用黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性^[2]。

2 结 果

2.1 抑瘤率

灌注野生鳖、仿生鳖2龄与4龄和温室鳖1龄与2龄组织液的小鼠平均瘤重分别为0.498g、0.626g、0.537g、0.913g和1.187g,比对照组的1.700g,抑瘤率分别达70.69%、63.17%、68.41%、30.18%和46.29%。野生鳖和仿生鳖的平均瘤重两者之间差异不显著($P>0.05$),但都极显著地低于对照组($P<0.01$),也显著地低于温室鳖($P<0.05$);抑瘤效果显著地高于温室鳖和对照组。温室鳖的平均瘤重也显著地低于对照组($P<0.05$)。其中2龄温室鳖的瘤重与1龄鳖相比显著降低($P<$

0.05)。说明野生鳖和仿生鳖均有极显著的抑瘤效果。温室鳖的抑瘤效果要低于野生鳖和仿生鳖,但也有显著的抑瘤效果;不同年龄之间抑瘤效果有差异,生长年龄越大,抑瘤效果越好。

2.2 生命延长率

野生鳖、仿生鳖2龄与4龄、温室鳖1龄与2龄组小鼠的平均生存期分别为35.12d、34.96d、34.85d、31.04d和31.56d,均极显著的高于蒸馏水对照组(24.98d, $P < 0.01$),其生命延长率分别达40.59%、39.95%、39.51%、24.26%和26.34%。野生鳖、仿生鳖和温室鳖各组之间的差异不显著($P > 0.05$)。

2.3 巨噬细胞的杀瘤效应

不同处理的M Φ 活化作用见表1。由表1可见,各组的最佳效靶细胞比为40:1。添加野生鳖液的A值极显著地低于对照组($P < 0.01$),添加仿生鳖液2龄和4龄的A值显著地低于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$);2龄温室鳖与对照组差异显著($P < 0.05$),但1龄温室鳖与对照组差异不显著($P > 0.05$)。4龄野生鳖的A值显著地低于2龄仿生鳖和1、2龄温室鳖($P < 0.05$)与4龄仿生鳖差异不显著($P > 0.05$);4龄仿生鳖与2龄仿生鳖差异不显著($P > 0.05$),但却显著地低于1、2龄温室鳖($P < 0.05$)。

表1 不同处理对A值的影响

Tab. 1 Effects of different treatments on A value

| 组别 | 效靶细胞比 | | | | | |
|-----------------------|------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|------------------|
| | 10:1 | 20:1 | 30:1 | 40:1 | 50:1 | 60:1 |
| 1.M Φ +HL | 0.561 \pm 0.03 | 0.579 \pm 0.02 | 0.591 \pm 0.10 | 0.513 \pm 0.02 | 0.529 \pm 0.03 | 0.541 \pm 0.06 |
| 2.M Φ +HL+野生鳖液 | 0.532 \pm 0.01 | 0.516 \pm 0.06* | 0.510 \pm 0.05* | 0.416 \pm 0.03** | 0.436 \pm 0.01* | 0.509 \pm 0.01 |
| 3.M Φ +HL+仿生鳖液2龄 | 0.539 \pm 0.05 | 0.551 \pm 0.05 | 0.531 \pm 0.01 | 0.461 \pm 0.02*a | 0.487 \pm 0.03 | 0.511 \pm 0.03 |
| 4.M Φ +HL+仿生鳖液4龄 | 0.539 \pm 0.08 | 0.543 \pm 0.03 | 0.525 \pm 0.06* | 0.436 \pm 0.04** | 0.466 \pm 0.02 | 0.510 \pm 0.02 |
| 5.M Φ +HL+温室鳖液1龄 | 0.538 \pm 0.04 | 0.555 \pm 0.01 | 0.569 \pm 0.02 | 0.483 \pm 0.04ac | 0.496 \pm 0.01 | 0.507 \pm 0.05 |
| 6.M Φ +HL+温室鳖液2龄 | 0.537 \pm 0.03 | 0.553 \pm 0.02 | 0.563 \pm 0.02 | 0.471 \pm 0.03*ac | 0.491 \pm 0.02 | 0.511 \pm 0.05 |

注:(1) $X \pm S$ (2)* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$,表示2-6组分别与1组比较的差异显著程度。a $P < 0.05$ aa $P < 0.01$,表示3-6组分别与2组比较的差异显著程度。b $P < 0.05$ bb $P < 0.01$,表示4-6组分别与3组比较的差异显著程度。c、d依次类推下同。(3)表2均同此。

2.4 对NO合成的影响

由图1可见,添加鳖组织的5个组,培养上清液的NO浓度均高于对照组。其中,野生鳖液组NO浓度极显著地高于对照组($P < 0.01$);仿生鳖液2龄组NO浓度显著地高于对照组($P < 0.05$),仿生鳖液4龄组则极显著地高于对照组($P < 0.01$);1龄温室鳖液组与对照组差异不显著($P > 0.05$),而2龄温室鳖NO合成显著地高于对照组($P < 0.05$)。4龄仿生鳖与4龄野生鳖之间差异不显著($P > 0.05$),但均显著高于1、2龄的仿生鳖与温室鳖;2龄仿生鳖极显著地高于1龄温室鳖($P < 0.01$),但与2龄温室鳖差异不显著($P > 0.05$)。

2.5 对SOD活性的影响

野生鳖、仿生鳖及温室鳖脑、肝脏、血液中的SOD的均高于空白对照组,差异显著($P < 0.05 \sim 0.01$)。脑中的SOD活性,野生鳖和仿生鳖均显著地高于温室鳖组,肝脏中的SOD活性,野生鳖比温室鳖显著增高($P < 0.01 \sim 0.05$),野生鳖与仿生鳖间差异均不显著($P > 0.05$)。血液中的SOD活性野生鳖、仿生鳖及温室鳖间差异不显著($P > 0.05$,见表2)。可见,SOD受生活环境的影响较明显,而年龄的影响不明显。

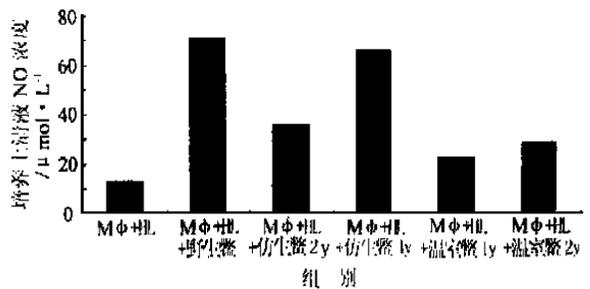


图1 不同处理对NO合成的影响

Fig. 1 Effects of different treatments on synthesis of NO

表 2 鳖组织浆对大鼠 SOD 活性的影响

Tab. 2 Effect of turtle plasmasol on SOD activities in rats

| 组 别 | SOD 活性(Nu [*] mL ⁻¹) | | |
|------------|---|-----------------------------|---------------------------|
| | 脑 | 肝脏 | 血液 |
| 1. 蒸馏水 | 56.13±9.76 | 178.69±5.14 | 408.86±20.01 |
| 2. 野生鳖 | 168.68±12.61 ^{**} | 199.15±6.94 ^{**} | 456.00±21.58 [*] |
| 3. 仿生鳖 2 龄 | 154.18±11.56 ^{**} | 192.33±5.91 ^{**} | 430.79±19.63 [*] |
| 4. 仿生鳖 4 龄 | 158.73±13.19 ^{**} | 193.56±7.34 ^{**} | 441.16±20.15 [*] |
| 5. 温室鳖 1 龄 | 124.96±11.78 ^{* aabbcc} | 186.47±4.65 ^{*aa} | 429.34±20.29 [*] |
| 6. 温室鳖 2 龄 | 136.28±10.67 ^{** aabbcc} | 190.19±5.68 ^{** a} | 433.76±19.19 [*] |

3 讨论

从本试验的结果看,不同来源和不同年龄的鳖均对机体肿瘤具有不同程度的抑制作用,且能有效地增强机体对肿瘤的抵抗性,延长生命期。从细胞毒效应来看,野生鳖、仿生鳖和温室鳖也具有不同程度的促进巨噬细胞对肿瘤细胞的杀伤作用,但这种促 MΦ 的细胞毒作用随鳖的生长年龄和生活环境的变化呈现一定的变化,野生鳖要好于仿生鳖,仿生鳖要好于温室鳖,高龄鳖要好于低龄鳖,但不同来源的同龄鳖比较差异不显著。这是否提示鳖对机体免疫系统的影响因素是复杂的,既与生长年龄密切相关,又与生长环境有一定关系。从作用的方式看,可能是多因子的综合作用的结果,不仅可通过促进细胞毒作用,而且有可能通过其他形式的免疫因子而起作用的。

NO 作为 MΦ 细胞毒效应的生物信使,在抗肿瘤免疫及促肿瘤生长、转移等方面起着重要的作用^[3,6]。单核巨噬细胞与肿瘤细胞共同培养时,诱导型 NO 合成酶(iNOS)被激活,使 NO 合成增多^[7],NO 又可使 MΦ 分泌 IL-1、TNF-2 增多,从而使抗肿瘤作用得到进一步加强。本研究表明,野生鳖、仿生鳖与 2 龄温室鳖能明显促使 MΦ 的活化,从而激发 NO 合成显著增高,细胞毒效应增强。因此,可用作抗肿瘤免疫辅佐剂。在不同的年龄组别中,同样观察到了 NO 的合成随年龄的增长而增加的趋势,与 MΦ 的活化规律相吻合。其作用原理以及不同年龄鳖的作用差异原因尚待进一步研究。

有氧代谢过程以及感染、衰老等生理原因,都将使细胞内产生大量的活性氧自由基^[8]。若这些自由基得不到及时清除,则可启动细胞自杀程序而发生细胞凋亡^[9]。SOD 作为抗氧化酶,在自由基的清除中起着关键性的作用,从而提高机体的解毒免疫功能和防病的能力。从本实验的结果看,三种来源鳖均可显著地提高 SOD 的活性,提示鳖液的滋补和增加机体免疫作用可能与其具有清除活性氧的能力有关。在脑部观察到了不同来源鳖对 SOD 活性影响的差异,野生鳖与仿生鳖的 SOD 活性显著地高于温室鳖 ($P < 0.05 \sim 0.01$),其中 2 龄的仿生鳖也显著地高于 2 龄温室鳖,显示出不同生活环境的鳖对 SOD 活性的影响有区别,这种环境影响超过了年龄的影响。综上所述,鳖的生长年龄与生活环境对机体整体的免疫效应都有一定的影响。

参考文献:

- [1] 张志强,田志刚,崔正言,等. MIT 法检测人胎脾巨噬细胞毒效应的建立[J]. 上海免疫学杂志, 1994, 14(1): 48.
- [2] 季健平,吴再彬. 超氧化歧化酶超微量快速测定法[J]. 南京铁道医学院学报, 1991, 10(1): 27-29.
- [3] Jenkins D C, Charles I G, Thomsen L L et al. Roles of nitric oxide in tumor growth[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 4392.
- [4] Hibbs J B, Vavrin Z, Taintor R R et al. L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells[J]. J Immunol. 1987; 138: 550.
- [5] Keller R, Geiges M, Keist R, et al. L-Arginine dependent reactive nitrogen intermediates as mediators of tumor killing by activated macrophage[J]. Cancer Res 1990, 50: 1421.
- [6] 于学军,郝静,衣翠华,等. 恶性肿瘤者 NO、TNF-α 测定及其临床意义[J]. 上海免疫学杂志, 1999, 19(2): 109-110.
- [7] Moncada S, Palmer R M T, Higgs E A. Nitric oxide, physiology, pathology and Pharmacology[J]. pharmacol Rev, 1991, 43: 109.
- [8] Bowler C, Van Montapu M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1992, 43: 83.
- [9] Tompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science. 1995, 267: 1456.