

大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠免疫调节作用的研究

张秀娟^{1,2,3}, 孙向菊³, 严松⁴, 李其成³, 刘思含^{1,2}, 张鑫^{1,2}

1. 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, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物教育部工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

3. 哈尔滨商业大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

4. 黑龙江省农业科学院 食品加工研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086

摘要: **目的** 从免疫学角度探讨大豆多糖对荷瘤小鼠抗肿瘤作用的机制。**方法** 采用分光光度计测定大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠巨噬细胞一氧化氮生成量的影响, 利用酶标仪测定大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响, 定量溶血分光光度法检测 B 细胞功能。**结果** 与对照组比较, 大豆多糖各组均能显著提高小鼠巨噬细胞的吞噬活性, 同时能明显提高荷瘤小鼠巨噬细胞产生一氧化氮的能力, 并能使体内 B 淋巴细胞数量增加而提高抗体生成量。**结论** 大豆多糖通过调节荷瘤小鼠免疫功能发挥抗肿瘤作用。

关键词: 大豆多糖; 抗肿瘤; 免疫调节

中图分类号: R979.1 R979.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2012)06-0420-03

Immunomodulation of soybean polysaccharide on S₁₈₀-bearing mice

ZHANG Xiu-juan^{1,2,3}, SUN Xiang-ju³, YAN Song⁴, LI Qi-cheng³, LIU Si-han^{1,2}, ZHANG Xin^{1,2}

1. Institute of Bio-safety Evaluation, Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Engineering Research of Natural Anticancer Drugs, Ministry of Education, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

3. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

4. Food Processing Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China

Abstract: Objective To study the antitumor effects of soybean polysaccharide (SPS) on S₁₈₀ bearing mice and the mechanism from the point of immunological view. **Methods** The effect of SPS on the nitric oxide (NO) generation by macrophage in S₁₈₀ bearing mice was detected by spectrophotometer; ELISA was used to determine the effect of SPS on phagocytosis of macrophage; The function of B-lymphocytes was detected by quantitative haemolysis spectrophotometric method. **Results** Compared with the control group, SPS could significantly enhance the phagocytosis of macrophage and increase the NO generation of macrophage as well as the content of B-lymphocytes in S₁₈₀ bearing mice, so as to increase the generation of antibodies. **Conclusion** SPS could play its antitumor role by regulating the immune function of mice.

Key words: soybean polysaccharides (SPS); antitumor; immunomodulation

《本草纲目》记载大豆有除痈肿、逐水胀、长肌肤、填骨髓等作用。大豆多糖 (SPS) 是大豆中的有效成分之一, 为酸性多糖, 以鼠李半乳糖醛酸和高聚半乳糖酸为主链, 主要含半乳糖、阿拉伯糖、半乳糖醛酸、鼠李糖、海藻糖、木糖以及葡萄糖等多种成分。与其他生物多糖相比大豆多糖具有黏性较低的特点, 其溶液的黏度几乎不受盐类影响, 热稳定性也优于其他糖类, 具有稳定性、分散性、乳

化性和黏着性等功能, 可用作强化食品的膳食纤维素; 具有调节胃肠道中微生物营养平衡和类胆固醇代谢, 抑制血清中脂质过氧化的特性; 作为膳食纤维和双歧因子, 大豆多糖还具有生理保健功能^[1-2]。目前可溶性大豆多糖作为食品添加剂得到广泛的研究与应用, 但其生物学活性的研究还很少, 前期研究表明大豆多糖能提高荷瘤动物的免疫功能^[3], 本实验以荷瘤小鼠为研究对象, 进一步探讨其对荷瘤

收稿日期: 2012-10-04

基金项目: 黑龙江省教育厅项目 (12521133)

作者简介: 张秀娟, 女, 教授。E-mail: zxj1717@yahoo.com.cn

机体免疫调节作用的特点。

1 材料

1.1 实验动物和瘤株

昆明种小鼠, 18~22 g, 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); 肉瘤细胞 S₁₈₀ (购于哈尔滨医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究所)。

1.2 实验仪器

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); LD4-2A 型台式低速离心机(北京医用离心机厂)。

1.3 实验药品和试剂

大豆多糖(总多糖为 95%, 上海百奥特植物蛋白科技有限公司, 批号 2009071723); RPMI 1640 培养粉(Gibco 公司); NO 试剂盒(南京建成生物有限公司); 刀豆蛋白 A (Sigma 公司); 优级胎牛血清(FBS)(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司); 台盼蓝(Sigma 公司)。

2 方法

2.1 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 24 h 给各组 S₁₈₀ 荷瘤小鼠分别 ip 给药, 分为阴性对照组, 大豆多糖高、中、低剂量组, 给药量分别为 150、100、50 mg/(kg·d), 阳性对照组给予黄芪多糖(APS) 100 mg/(kg·d), 给药剂量为 0.2 mL/(只·d), 连续给药 10 d, 停药次日处死动物。

2.2 S₁₈₀ 荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能测定

给药第 8 天同时 ip 6% 淀粉溶液, 每只小鼠 1 mL, 诱生巨噬细胞。3 d 后处死小鼠, 浸于 75% 乙醇中消毒, 向腹腔内注入 2 mL 无菌 PBS 液, 吸管吸出腹腔液, 注入无菌 PBS 液 2 mL, 吸出腹腔液合并, 1 000 r/min 离心 10 min, 去上清液, PBS 液洗涤 2 次。用预冷的 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度至 1×10⁶/mL。将巨噬细胞悬液置于无菌 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μL, 设 3 个复孔, 并设空白对照孔, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 3 h, 吸弃培养液, 用 37 °C 预温的 PBS 液冲洗 2 次, 每次 5 min, 再加入 RPMI-1640 培养液 100 μL。

将收集的不同处理组纯化后的小鼠腹腔巨噬细

胞置 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养 48 h。每孔吸出 100 μL 培养液后, 加入 0.1% 中性红生理盐水溶液 100 μL, 继续培养 1 h, 弃上清, PBS 反复洗 2 次。每孔加入 200 μL 细胞裂解液(乙醇-醋酸 1:1), 4 °C 放置 2~3 h (或室温过夜), 待细胞溶解后用酶标测定仪在 492 nm 波长下测定吸光度(A) 值。

细胞活力 = 给药孔 A 值 / 阴性对照孔 A 值

2.3 S₁₈₀ 荷瘤小鼠巨噬细胞一氧化氮生成量的测定

按照试剂盒说明书进行, 根据下列公式计算 NO 含量。

NO 含量 (μmol/L) = [(测定管 A 值 - 空白管 A 值) / (标准管 A 值 - 空白管 A 值)] × 标准品浓度 (100 μmol/L)

2.4 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠 B 细胞功能的影响

给药第 7 天起取每组中 5 只另分一组, 每鼠 ip 5% SRBC 0.2 mL 致敏, 连续注射 4 d。停止给药 24 h 后, 用冷 Hanks 液清洗脾脏, 剪碎, 滤过, 收集脾细胞, 以 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清。脾细胞悬液用 10 倍体积的 Tris-NH₄Cl 溶液重悬, 37 °C 预温, 静置 4 min, 裂解红细胞, 1 000 r/min 离心 5 min 得白细胞液。再次用 Hanks 液洗涤 2 次, RPMI-1640 培养液(10% 胎牛血清) 稀释成细胞数为 2×10⁶/mL, 置 4 °C 冰箱备用。

离心管中加入 5×10⁶/mL 脾细胞悬液 1 mL, 2% SRBC 悬液 1 mL, 及 1:10 补体稀释液 1 mL, 摇匀后置 37 °C 水浴 60 min。2 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 413 nm 处读取 A 值。

2.5 数据处理

所有数据用 SPSS15.0 进行方差分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本比较采用方差检验。

3 结果

3.1 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能影响

大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠巨噬细胞吞噬活性的影响见表 1。与对照组比较, 大豆多糖各给药组吞噬活性都有显著提高 ($P < 0.01$)。由实验结果可知, 大豆多糖能提高巨噬细胞的吞噬活性, 从而影响小鼠的非特异性免疫功能。

3.2 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮生成的影响

大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠巨噬细胞 NO 生成量的影响见表 2。与对照组比较, 大豆多糖能提高巨噬细胞的 NO 生成量, 其中高剂量组较为明显。

表1 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠巨噬细胞吞噬活性的影响Table 1 Effect of SPS on phagocytosis of macrophages in S₁₈₀-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	A ₄₉₀	细胞活力 /%
对照	—	0.048 4±0.001 7	100.00
黄芪多糖	100	0.050 8±0.001 2**	112.50
大豆多糖	50	0.057 8±0.001 5**	120.83
	100	0.065 2±0.002 4**	135.42
	150	0.069 2±0.001 3**	145.83

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01, 下表同

*P<0.05 **P<0.01 vs control group, same as below

表2 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠吞噬细胞 NO 生成的影响Table 2 Effect of SPS on NO generation of macrophages in S₁₈₀-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	A ₅₅₀	NO/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	0.656 3±0.064 3	192.71
黄芪多糖	100	0.862 3±0.099 4*	276.11
大豆多糖	50	0.743 3±0.020 9	227.94
	100	0.783 3±0.058 0	244.13
	150	0.867 3±0.041 3*	278.14

3.3 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤 B 淋巴细胞功能的影响

大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠 B 淋巴细胞功能的影响见表 3。与阴性对照组比较, 大豆多糖各给药组能提高 B 淋巴细胞 IgM 的溶血功能, 且低、中、高剂量组差异均显著 ($P<0.01$)。

表3 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠 B 淋巴细胞功能的影响Table 3 Effect of SPS on function of B-lymphocyte in S₁₈₀-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	A ₄₁₃
对照	—	0.266 2±0.020 9
黄芪多糖	100	0.537 5±0.052 3**
大豆多糖	50	0.342 2±0.030 8**
	100	0.415 4±0.056 9**
	150	0.506 8±0.026 8**

4 讨论

目前肿瘤治疗主要根据肿瘤细胞和正常细胞不同的代谢特征、生物学特征、基因特征进行, 只强调治疗肿瘤的个性, 忽视共性和整体原则而影响了治疗效果, 导致化疗及放疗药物在杀死肿瘤细胞的同时也损坏机体的免疫功能, 使残存的肿瘤细胞急

剧繁殖, 影响治疗效果。如果机体免疫状态良好, 肿瘤发展慢, 还有可能自发消退, 预后较好。肿瘤发展快且预后不良的病人, 往往表现为免疫功能低下或功能缺乏。因此通过提高机体的免疫功能增强机体抗肿瘤作用的治疗方法受到广泛关注。而免疫调节功能又是植物活性多糖最重要的功能, 与多糖的抗突变、调血脂、抗肿瘤等功能紧密相关^[4-5]。

天然多糖由于本身对机体的毒副作用小, 能增强机体免疫力等优点作为免疫调节剂受到人们的密切关注。目前, 天然多糖已在多方面得到应用, 如抗肿瘤、治疗艾滋病、延缓衰老等^[6-7]。本实验研究对象大豆多糖来源于日常使用豆科植物, 没有不良反应, 能够显著提高机体免疫力, 并能显著抑制肿瘤生长和扩散, 为开发成新型的抗肿瘤增敏剂和免疫增强促进剂奠定基础。因此, 本研究探讨了大豆多糖体内抗肿瘤作用及其机制。研究结果显示, 与对照组比较, 大豆多糖各给药组能明显提高小鼠巨噬细胞的吞噬活性, 均有显著差异 ($P<0.01$), 同时能明显提高荷瘤小鼠巨噬细胞产生 NO 的能力, 与对照组比较, 大豆多糖高剂量组 NO 生成量有差异 ($P<0.05$), 并能使体内 B 淋巴细胞数量增加使其发挥抗肿瘤作用。综上所述, 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠具有确切的抗肿瘤作用, 并且通过调节荷瘤小鼠免疫力发挥抗肿瘤作用。

参考文献

- [1] 李宏璿, 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] 张倩. 可溶性大豆多糖的提取、鉴定 [D]. 合肥工业大学. 2007.
- [3] 张秀娟, 刘思含, 孙宇婷, 等. 大豆多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠抗肿瘤作用的免疫机制研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(2): 389-392.
- [4] 李赞阳, 刘红, 罗燕, 等. 不同组分、不同纯度中药复方多糖对小鼠免疫活性影响的研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(9): 182-184.
- [5] 陶遵威, 郑夺, 邸明磊, 等. 植物多糖的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2012, 33(2): 148-151.
- [6] Zaidman B Z, Yassin M, Mahajna J, et al. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 67: 453-468.
- [7] 苗晶, 东方, 季宇彬, 等. 多糖抗肿瘤研究进展 [J]. 河北科技师范学院学报, 2012, 26(2): 42-44.