

卵转铁蛋白对免疫低下小鼠 Th1/Th2 细胞平衡的影响

林日新, 徐明生*, 杜华英, 涂勇刚, 汤 群

(江西农业大学 江西省天然产物开发与利用高校重点实验室, 江西 南昌 330045)

摘 要: 目的: 研究卵转铁蛋白(OVT)对免疫低下模型小鼠的免疫平衡恢复作用。方法: 将健康小鼠随机分为正常对照组、模型对照组及 OVT 高剂量组、中剂量组和低剂量组, 每组 10 只。OVT 高、中、低剂量组分别以 10、1、0.1mg/mL 的 OVT 溶液每天灌胃, 灌胃量为 20mL/(kg·d) (以体质量计)。模型对照组和正常对照组灌胃生理盐水 20mL/(kg·d)。连续灌胃 15d, 于第 15 天灌胃后注射环磷酰胺(正常对照组除外), 继续灌胃至第 19 天(由模型决定)进行检测。测定血清中 IFN- γ 和 IL-4 含量、IFN- γ /IL-4 比值以及脾脏和胸腺指数。结果: 模型对照组小鼠血清 IFN- γ 的浓度和 IFN- γ /IL-4 比值与正常对照组相比明显降低($P < 0.01$); 高剂量组小鼠血清 IFN- γ 的浓度和 IFN- γ /IL-4 比值显著高于模型对照组($P < 0.01$), 与正常对照组比较, 无显著性差异; 高剂量组的脾脏指数和胸腺指数与模型对照组相比明显提高($P < 0.01$)。结论: OVT 能修复由环磷酰胺所致免疫低下模型小鼠的体液和细胞免疫失衡, 增强免疫低下小鼠的免疫功能。

关键词: 卵转铁蛋白; 环磷酰胺; Th1/Th2 细胞平衡

Effects of Ovotransferrin on Th1/Th2 Cells Balance in Immunosuppressed Mice

LIN Ri-xin, XU Ming-sheng*, DU Hua-ying, TU Yong-guan, TANG Qun

(Key Laboratory for Natural Product Utilization and Development of Jiangxi Provincial High School,
Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Objective: To investigate the repairing effects of ovotransferrin (OVT) on immune imbalance of mice induced by cyclophosphamide. Methods: Fifty mice were randomly divided into five groups (ten animals per group): normal control group, model control group, and high dosage (10 mg/mL), middle dosage (1 mg/mL) and low dosage (0.1 mg/mL) OVT groups. Normal and model control groups were administered with normal saline. Each mouse in the OVT groups was administered with OVT of different concentrations at a dosage of 20 mL/(kg·d) for 15 successive days. On the 15th day, all the mice except the normal group were injected with cyclophosphamide after OVT or saline administration and then administered for four more days (determined by the model group). At the end of the administration process, all the mice were sacrificed to measure serum IFN- γ , serum IL-4 ratio, their ratio, spleen index and thymus index. Results: Serum IFN- γ and IFN- γ /IL-4 ratio of the model control group were significantly lower than those of the normal control group ($P < 0.01$), while IFN- γ concentration and IFN- γ /IL-4 ratio in the serum of the high-dose OVT group were significantly higher than those of the model control group ($P < 0.01$), but no significant difference was observed compared to the normal control group. Meanwhile, spleen and thymus indexes of the high-dose OVT group were higher than those of the model control group ($P < 0.01$). Conclusion: OVT can repair mouse humoral and cellular immune damage induced by cyclophosphamide and improve the immune function of immunosuppressed mice.

Key words: ovotransferrin; cyclophosphamide; Th1/Th2 cells balance

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0243-04

收稿日期: 2011-09-26

基金项目: 江西省教育厅应用研究项目(gjj98134)

作者简介: 林日新(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为禽蛋科学。E-mail: 446748805@qq.com

* 通信作者: 徐明生(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为动物资源开发利用。E-mail: xmsjy@sina.com

1986年, Mosmann等^[1]发现CD4⁺T细胞(Th)具有两种功能不同的亚群, 根据细胞因子产生模式和功能的不同分为Th1和Th2两种类型。正常机体Th1和Th2细胞功能维持相对的平衡, Th1/Th2的异常或失衡表现为平衡偏向其中一方, 即发生“Th1/Th2平衡漂移”, 引起多种免疫性疾病的发生^[2]。Th1/Th2细胞因子反映机体复杂的细胞因子调控网络, 对细胞免疫调节和体液免疫调节有重要的影响, 可以从整体上对机体免疫状态和免疫能力进行评价分析。

卵转铁蛋白是一种易溶的非结晶白蛋白, 分子质量约78000~80000D, 约占蛋清蛋白质总量的12%, 属于转铁蛋白簇中的一员, 与乳铁蛋白和血清转铁蛋白的氨基酸序列、活性中心的三级结构及生物活性都很相似, 具有增强机体免疫力的生理功能^[3-4]。目前对转铁蛋白簇免疫活性的研究, 主要集中在乳铁蛋白。Iigo等^[5]通过对小鼠喂食牛乳铁蛋白, 发现在乳铁蛋白的作用下使得Th1型细胞的细胞免疫应答有所提高。Zuccotti等^[6]研究发现患有先天感染人类免疫缺陷病毒(HIV)患儿口服乳铁蛋白后增强Th2型细胞免疫功能。Togawa等^[7]对由葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导而患肠炎的小鼠喂食乳铁蛋白, 结果发现乳铁蛋白对Th1/Th2的平衡起到了改善作用。卵转铁蛋白与乳铁蛋白约有50%的同源性^[8], 而卵转铁蛋白对Th1/Th2细胞免疫平衡状态的影响未见报道。本实验旨在研究卵转铁蛋白对环磷酰胺所致免疫低下模型小鼠Th1和Th2型细胞因子(IFN- γ 、IL-4)水平、IFN- γ /IL-4比值以及对胸腺、脾脏指数的影响, 为研究卵转铁蛋白的免疫活性提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

健康雌性昆明种小白鼠(约6~8周龄), 体质量(20 $\pm$ 2)g, 购自南昌大学医学部实验动物中心(合格证号: 96021); 卵转铁蛋白(实验室制备, 纯度约为80%); 小鼠IFN- γ 、IL-4定量ELISA检测试剂盒 上海森雄科技实业有限公司; 环磷酰胺 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

Multiscan MK3酶标仪 美国Thermo公司; 高速离心机 上海安亭科学仪器厂; 动物手术设备等。

1.3 方法

1.3.1 建立小鼠免疫低下模型

参考胡志和等^[9]的方法, 将45只健康小鼠, 随机分3组, 每组15只。对各组小鼠分别以0(对照组)、40、80mg/kg(以体质量计)的环磷酰胺一次性腹腔注射, 注射量为10mL/kg。在第2、3、4、5、6天测定脾脏指数和胸腺指数。数据采用DPS软件处理, 根据显著程度判断造模结果, 确定环磷酰胺注射浓度及注射后最佳实验时间。

1.3.2 实验动物分组及指标测定

将健康小鼠随机分为正常对照组、模型对照组及OVT高剂量组、中剂量组和低剂量组, 每组10只。OVT高、中、低剂量组分别以10、1、0.1mg/mL的OVT溶液每天灌胃, 灌胃量为20mL/(kg $\cdot$ d)。模型组对照组和正常对照组灌胃生理盐水20mL/(kg $\cdot$ d)。连续灌胃15d, 于第15天灌胃后注射环磷酰胺(正常对照组除外), 继续灌胃至第19天(由模型决定)进行检测。小鼠摘眼球采血, 测定血清中IFN- γ 和IL-4的含量。小鼠处死后迅速取脾及胸腺, 置电子天平称质量, 以脏器湿质量(mg/g)表示脾脏指数和胸腺指数。

1.3.3 血清中IFN- γ 和IL-4含量的测定

摘眼球取血0.6~1mL左右, 室温凝固30min, 1000 $\times$ g离心15min, 吸取上清, 放入EP管中, 严格参照ELISA试剂盒方法分别检测血清IFN- γ 和IL-4含量。

1.3.4 统计学分析

采用DPS数据处理系统Duncan's新复极差多重比较法进行数据统计分析, 各项指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 免疫低下模型的建立

由表1可见, 小鼠经40、80mg/kg的环磷酰胺腹腔注射后, 第3、4、5天的脾脏指数与正常对照组比较, 均有显著性差异($P < 0.05$), 且有剂量关系, 即小鼠的脾脏处于免疫低下状态。尤其在第3天和第4天, 所有模型组与正常对照组比较, 均有极显著差异($P < 0.01$), 在第6天开始脾脏指数恢复正常。小鼠经80mg/kg的环磷酰胺腹腔注射后的第4天为脾脏免疫最低下状态。

表1 环磷酰胺引起小鼠脾脏指数的变化($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 1 Changes of mouse spleen index caused by CTX($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

剂量/(mg/kg)	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天
0	5.372 $\pm$ 0.520 ^{aA}	5.645 $\pm$ 1.065 ^{aA}	5.886 $\pm$ 0.754 ^{aA}	5.129 $\pm$ 0.616 ^{aA}	5.873 $\pm$ 1.049 ^{aA}
40	4.308 $\pm$ 0.985 ^{aA}	2.959 $\pm$ 0.500 ^{bB}	3.311 $\pm$ 0.632 ^{bAB}	4.835 $\pm$ 0.219 ^{aA}	6.138 $\pm$ 0.330 ^{aA}
80	3.932 $\pm$ 0.623 ^{aA}	2.901 $\pm$ 0.581 ^{bB}	2.185 $\pm$ 0.433 ^{bB}	3.815 $\pm$ 0.506 ^{bA}	5.655 $\pm$ 0.323 ^{aA}

注: 同列肩标大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$); 小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

表2 环磷酰胺引起小鼠胸腺指数的变化($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table2 Changes of mouse thymus index caused by CTX ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

剂量/(mg/kg)	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天
0	3.369 $\pm$ 0.884 ^{aA}	2.759 $\pm$ 0.648 ^{aA}	3.247 $\pm$ 0.281 ^{aA}	2.275 $\pm$ 0.280 ^{aA}	2.899 $\pm$ 0.390 ^{aA}
40	2.690 $\pm$ 0.183 ^{aA}	2.020 $\pm$ 0.404 ^{abA}	2.270 $\pm$ 0.531 ^{bAB}	2.575 $\pm$ 0.561 ^{aA}	2.743 $\pm$ 0.304 ^{aA}
80	2.616 $\pm$ 0.502 ^{aA}	1.819 $\pm$ 0.047 ^{bA}	1.650 $\pm$ 0.146 ^{bB}	1.670 $\pm$ 0.163 ^{bA}	2.284 $\pm$ 0.224 ^{aA}

由表2可见,胸腺指数在环磷酰胺腹腔注射后的第2天变化不明显,第3天和第4天出现剂量反应,与正常对照组比较,均有显著性差异($P < 0.05$),即40、80mg/kg环磷酰胺组的小鼠胸腺处于免疫低下状态。尤其在第4天,80mg/kg环磷酰胺组与正常对照比较,有极显著差异($P < 0.01$),第5天40mg/kg环磷酰胺组胸腺指数开始恢复正常,第6天40、80mg/kg环磷酰胺组免疫状态基本恢复正常。小鼠经80mg/kg的环磷酰胺腹腔注射后的第4天为胸腺免疫最低下状态。

综合表1和表2可知,注射80mg/kg环磷酰胺后的第4天的小鼠为下一步实验所需要的免疫低下模型。

2.2 OVT对免疫器官的影响

表3 OVT对小鼠脾脏指数及胸腺指数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 3 Effects of OVT on mouse spleen and thymus indexes ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	脾脏指数	胸腺指数
模型对照组	2.464 $\pm$ 0.456 ^{cB}	1.524 $\pm$ 0.306 ^{bA}
低剂量组	2.564 $\pm$ 0.350 ^{cB}	1.694 $\pm$ 0.198 ^{abcB}
中剂量组	3.086 $\pm$ 0.625 ^{abAB}	1.766 $\pm$ 0.251 ^{abcB}
高剂量组	3.587 $\pm$ 0.543 ^{aA}	1.923 $\pm$ 0.319 ^{ab}

由表3可见,OVT能够明显提高环磷酰胺所致免疫低下小鼠的脾脏指数。随着OVT灌胃剂量的增加,脾脏指数也相应的升高,并呈现剂量依赖关系,高剂量组对环磷酰胺所致免疫低下小鼠的脾脏指数的影响最为显著,与模型对照组比较有极显著差异($P < 0.01$)。中、低剂量组对环磷酰胺所致免疫低下小鼠的胸腺指数影响不显著,高剂量组胸腺指数极显著高于模型对照组($P < 0.01$)。

可见,OVT能够明显提高环磷酰胺所致免疫低下小鼠的脾脏指数和胸腺指数,并呈一定的剂量依赖关系。其中,高剂量的OVT对小鼠的脾脏指数和胸腺指数的影响极显著。由此说明,适量的OVT能一定程度增强由环磷酰胺所致免疫低下小鼠的免疫功能。

2.3 OVT对小鼠血清IFN- γ 、IL-4和IFN- γ /IL-4的影响

表4 OVT对小鼠血清IFN- γ 含量和IL-4含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 4 Effects of OVT on serum IFN- γ and IL-4 of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	IFN- γ 含量/(pg/mL)	IL-4含量/(pg/mL)	IFN- γ 含量/IL-4含量
正常对照组	114.466 $\pm$ 14.139 ^{abA}	9.069 $\pm$ 4.347 ^{aA}	15.497 $\pm$ 7.921 ^{aA}
模型对照组	77.640 $\pm$ 7.587 ^{cB}	13.763 $\pm$ 5.126 ^{aA}	6.361 $\pm$ 2.393 ^{bB}
低剂量组	78.647 $\pm$ 11.668 ^{cB}	13.148 $\pm$ 3.892 ^{aA}	6.515 $\pm$ 2.405 ^{bB}
中剂量组	100.823 $\pm$ 18.390 ^{bA}	10.647 $\pm$ 6.428 ^{aA}	11.584 $\pm$ 7.271 ^{abAB}
高剂量组	121.794 $\pm$ 19.633 ^{aA}	9.224 $\pm$ 3.627 ^{aA}	15.782 $\pm$ 7.134 ^{aA}

由表4可见,模型对照组小鼠血清IFN- γ 含量明显降低,与正常对照组比较,有极显著性差异($P < 0.01$)。低剂量OVT对IFN- γ 含量的影响不显著,随着OVT摄入量的增加,IFN- γ 含量明显升高,并呈现剂量依赖关系。其中,高剂量组IFN- γ 含量极显著高于模型对照组($P < 0.01$)。模型对照组小鼠血清IL-4含量有所升高,但与正常对照组比较,无显著性差异;OVT对IL-4含量的影响不显著。

模型对照组小鼠血清IFN- γ /IL-4含量比值极显著低于正常对照组($P < 0.01$);低剂量组OVT对IFN- γ /IL-4含量的比值没有显著性影响,随着OVT灌胃质量浓度的增加,IFN- γ /IL-4比值明显升高,并呈现剂量依赖关系。其中,高剂量组IFN- γ /IL-4的比值与模型对照组比较,有极显著性差异($P < 0.01$),与正常对照组相比,没有显著性差异。由此说明,适量OVT能逆转由环磷酰胺所造成小鼠血清IFN- γ /IL-4含量比值的漂移,增强机体的免疫功能。

3 讨论

脾脏和胸腺是人体重要的免疫器官,在免疫系统中发挥着重要作用,其中脾脏是体内最大的免疫器官,是免疫细胞定居和免疫应答的场所,与体液免疫和细胞免疫有密切关系;胸腺作为首要的中枢免疫器官,是T细胞分化成熟的主要场所,与细胞免疫有关。脾脏和胸腺指数是反映机体脾脏和胸腺免疫功能的重要指标之一^[10]。环磷酰胺是治疗恶性肿瘤的烷化剂代表药物,其毒副作用主要是免疫抑制,是建立免疫低下动物模型较为理想的药物^[11]。实验结果显示,环磷酰胺显著降低实验小鼠的脾脏指数和胸腺指数,说明免疫低下模型小鼠造模成

功,与报道的文献基本一致^[12-13]。OVT显著升高由环磷酰胺所致免疫低下小鼠的脾脏指数和胸腺指数,对免疫器官的损伤有一定修复作用。OVT可能通过修复免疫低下小鼠免疫器官,促进免疫细胞增殖能力而增强机体的免疫水平。

Th细胞亚群水平是评价机体免疫状态和免疫能力的一个综合指标,机体在正常情况下,Th1/Th2处于动态平衡状态,当Th1/Th2的平衡发生偏移,机体就会出现病变或其他免疫力低下状态^[14-15]。Th1细胞分泌IFN- γ 、IL-2和INF- α 等细胞因子,通过激活效应细胞介导细胞免疫应答;Th2细胞分泌IL-4、IL-5和IL-6等细胞因子,能辅助抗体生成,主要介导体液免疫应答。机体在正常情况下,Th1/Th2处于动态平衡状态,环磷酰胺所致免疫低下小鼠的免疫功能出现紊乱,Th1/Th2平衡受到破坏,免疫应答状态向Th2漂移,这与文献报道基本一致^[16-17]。IFN- γ 和IL-4分别是Th1和Th2细胞分泌的特异性细胞因子,目前研究中较多采用IFN- γ /IL-4的动态比值来代表Th1/Th2免疫平衡状态^[18]。模型对照组小鼠IFN- γ /IL-4含量比值显著低于正常对照组,环磷酰胺抑制Th1细胞亚群的反应,减少IFN- γ 的分泌,导致Th1/Th2失衡,呈现向Th2漂移。随着OVT灌胃浓度的增加,Th1细胞亚群的反应占优,上调IFN- γ 的表达水平,IFN- γ /IL-4含量比值明显升高,Th1/Th2趋于平衡。OVT可能是通过作用于网状树突细胞(DC)后,诱导T细胞的分化,达到调整由多种炎症和抗炎细胞因子所组成的复杂细胞因子网络系统,从而纠正由环磷酰胺所致免疫低下小鼠Th1/Th2的失衡,在一定程度上增强机体的免疫功能。

综上所述,OVT能提高由环磷酰胺所致免疫低下小鼠脾脏和胸腺的指数,纠正Th1/Th2的失衡,从而增强机体的免疫功能。但机体的免疫是个复杂的过程,还有待从更多的体内实验和细胞培养的方法对OVT的免疫活性做综合研究。

参考文献:

- [1] MOSMANN T R, CHERMINSKI H, BOND M W, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins[J]. *Journal of Immunology*, 1986, 136(7): 2348-2357.
- [2] 顾国浩,彭群新. Th1/Th2细胞的免疫功能变化及其意义[J]. *国外医学:临床生物化学与检验学分册*, 2003, 24(6): 333-334.
- [3] KEUNG W M, AZARI P. Structure and Function of ovotransferrin[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257(3): 1184-1188.
- [4] 赵建辉,韩柱,侯小康. 转铁蛋白的研究进展[J]. *河北化工*, 2010, 33(9): 34-36.
- [5] IIGO M, SHIMAMURA M, MATSUDA E, et al. Orally administered bovine lactoferrin induces caspase-1 and interleukin-18 in the mouse intestinal mucosa: a possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis[J]. *Cytokine*, 2004, 25(1): 36-44.
- [6] ZUCCOTTI G V, VIGANO A, BORELLI M, et al. Modulation of innate and adaptive immunity by lactoferrin in human immunodeficiency virus (HIV)-infected, antiretroviral therapy-naïve children[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2007, 29(3): 353-355.
- [7] TOGAWA J, NAGASE H, TANAKA K, et al. Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance[J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2002, 17(12): 1291-1298.
- [8] MAZURIER J, METZE-BOUTIGUE M H, JOLLES J, et al. Human lactotransferrin: molecular, functional and evolutionary comparisons with human serum transferrin and hen ovotransferrin[J]. *Experientia*, 1983, 39(2): 135-141.
- [9] 胡志和,刘传国,庞广昌,等. 乳铁素免疫调节功能评价[J]. *食品科学*, 2009, 30(15): 200-204.
- [10] 刘茜,刘向国,武松. 肺气肿肺气虚证模型大鼠脾脏指数、胸腺指数变化的实验研究[J]. *甘肃中医学院学报*, 2006, 23(1): 20-22.
- [11] MOTOYOSHI Y, KAMINODA K, SAITOH O, et al. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide[J]. *Oncology Reports*, 2006, 16(1): 141-146.
- [12] 李娜. 乳铁蛋白免疫调节作用的研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2008.
- [13] 胡彦武. 东北刺人参茎叶提取物对环磷酰胺致免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(7): 156-158.
- [14] SAKAGUCHI S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance[J]. *Cell*, 2000, 101(5): 455-458.
- [15] 袁颖,金素安,何世民. 中药对Th1/Th2细胞因子平衡调节作用的研究进展[J]. *上海中医药杂志*, 2011, 45(5): 90-93.
- [16] 彭广华. 从Th1/Th2漂移探讨干佛菌对环磷酰胺模型小鼠的免疫调节作用[D]. 西安: 陕西中医学院, 2007.
- [17] 王静凤,李晓林,滕来宾,等. 海参虫草复剂对免疫功能低下小鼠的免疫调节作用[J]. *卫生研究*, 2011, 40(2): 215-218.
- [18] YAMAZAKI K, YANO T, KAMEYAMA T, et al. Clinical significance of serum TH1/TH2 cytokines in patients with pulmonary adenocarcinoma [J]. *Surgery*, 2002, 131(1): S236-S241.