维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0356－03

羊胎盘免疫调节因子对小鼠体液免疫的影响

方廖琼[1], 钟英英[2], 张 华[3], 牛 荣[1], 魏 泓[1]

(1.第三军医大学实验动物教研室,重庆 400038,2.西南师范大学生命科学院,重庆 400716,
3.新疆农业大学动物医学院,乌鲁木齐 830052)

【摘 要】目的:探讨羊胎盘免疫调节因子对机体的体液免疫调节作用。方法:BALB/c 小鼠为实验对象,MTT 法测定脾 B 淋巴细胞的增殖,溶血空斑实验(PFC)测定 IgM,酶联免疫吸附法(ELISA)测定体外培养 B 淋巴细胞培养上清 IgG、体内血清抗体 IgG。结果:羊胎盘免疫调节因子对免疫抑制小鼠分泌抗体能力具有显著改善($P<0.01$),并具有剂量效应($P<0.01$);直接作用于脾淋巴细胞,可显著促进细菌脂多糖诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖,显著提高脾 B 淋巴细胞产生抗体的能力($P<0.01$),剂量效应不显著。结论:羊胎盘免疫调节因子能增强小鼠体液免疫功能,可促进免疫抑制小鼠的体液免疫能力恢复。

【关键词】羊胎盘免疫调节因子;体液免疫;B 淋巴细胞

【中国图书分类法分类号】R286.95 【文献标识码】A 【收稿日期】2005－04－14

Influence on humoral immunity in mice by goat placenta immunoregulatory factor

FANG Liaoqiong, et al

(*Department of Laboratory Animals, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the humoral immunity effect of goat placenta immunoregulatory factor(GPIF). *Methods*: Basing on BALB/c mice, the study was carried out by determining the proliferation of B lymphocyte in mice spleen with MTT method, the level of IgM with PFC test, and the level of IgG secreted by mice B cell in vivo and in vitro with ELISA test. *Results*: GPIF could effecientlly increase the level of antibody in vivo. Direct experiment on splenic B lymphocyte, GPIF could also improve the level of antibody in vitro and enable mice lymphocyte induced by LPS to proliferate efficiently. *Conclusion*: GPIF conld enhance humoral immunity function and recover the ability of humoral immunity in mice with immunodeficiency.

【Key words】Goat placenta immunoregulatory factor(GPIF); Humoral immunity; B lymphocyte

羊胎盘与人胎盘相似,含有丰富的氨基酸、多肽及表皮细胞生长因子、透明质酸刺激因子等生物活性物质[1,2]。因而引起了人们进一步研究的兴趣。我们通过超滤技术,从足月山羊胎盘冻融过滤液中超滤截取分子量在 10KD 以下组分,高效液相色谱分析有 17 个成分峰,分子量主要集中在 3000Da,光谱分析 251±2nm 为最大吸收波长,主要成分为小分子多肽和核酸[3]。因发现其具有免疫活性特性,现被本研究室命名为羊胎盘免疫调节因子(goat plancenta immunoregulatory facter, GPIF)。本文作者从体外、体内两方面研究了羊胎盘免疫调节因子对正常和免疫抑制小鼠体液免疫的影响,旨在系统揭示羊胎盘免疫调节因子对机体的免疫调节功能。

作者介绍:方廖琼(1965－),女,副教授,博士,
主要研究方向:生化制药及免疫药效学。

基金项目:重庆市重点技术创新项目(企业合作项目)(No. 147)。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 BALB/c 小鼠,雄性,4～6 周龄,体重 18～20g。健康绵羊、豚鼠均由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 羊胎盘免疫调节因子 采用研究室常规方法,将经检疫合格的健康山羊的新鲜剥离胎盘超微粉碎,反复冻融后,以超滤技术制备的分子量在 3000Da,pH7.0～7.2 主要成分为小分子多肽和核酸的透明液体,经真空冷冻干燥后 40℃冰箱保存。临用前生理盐水(体内)或含 RPMI1640 培养液(体外)配制所需浓度。

1.1.3 主要试剂及器材 细菌脂多糖(Lipopolysacharide, LPS):美国 Sigma 公司;MTT(3,4,5－dimethylthiazo－2－yl－2,5－diphenyltetrazolium bromide),美国 Sigma 公司;ELISA 小鼠－IgG 检测试剂盒及小鼠 IgG 标准品:Pierce 公司;抗小鼠 CD3、CD4、CD8 单抗:eBioscience 公司;羊抗兔

维普资讯 http://www.cqvip.com

IgG；博士德生物工程公司；自制绵羊红细胞（sheep red blood cell，SRBC），于 4℃ 冰箱保存备用；豚鼠血清：分离至少 3 只豚鼠血清，混合经 SRBC 饱和吸收后，分装，于 −20℃ 保存备用。Himac CR21G 型高速离心机，日本；酶标仪：Bio − RAD550 型，日本；$^{60}C_0$ − γ 射线源由第三军医大学防原系钴源室提供。

1.2 方法

1.2.1 动物模型

辐射所致免疫抑制动物模型：BALB/c 小鼠经 $^{60}C_0$ − γ 射线一次性全身辐射，辐射剂量 5Gry。

1.2.2 实验分组及给药

体外实验分组：分 GPIF 4mg/ml、2mg/ml、1mg/ml 等高、中、低剂量组；对照组：含 10% 新生小牛血清 RPMI1640 培养液。

体内实验分组：实验小鼠随机分组，每组 20 只：设 GPIF 40mg/kg 体重、20mg/kg 体重、10mg/kg 体重等高、中、低剂量组。腹腔注射给药，每天 1 次，每次 0.2ml，连续 14 天。正常组、模型对照组注射等量生理盐水。

1.2.3 脾淋巴细胞增殖反应：采用 MTT 法[4,5]。96 孔培养板每孔加入 100μl 脾细胞悬液（3×10^6 个/ml），50μlLPS（100ug/ml），100ulGPIF。每组 5 个复孔，置 5% CO_2 培养箱中孵育 72h，于培养结束前 6h 每孔加入 30μlMTT（5mg/ml），离心去上清，加 100μlDMSO 充分溶解沉淀，于酶标仪 550nm 米测定 OD 值。对照组以 RPMI1640 培养液代替 GPIF。

1.2.4 体外脾 B 淋巴细胞培养上清 IgG 抗体的测定

制备脾细胞悬液，采用 Wakalsuki Y 、沈关心等方法分离小鼠脾 B 淋巴细胞[6,7]。调节 B 淋巴细胞浓度至 1×10^6，96 孔培养板每孔加入 100μl 细胞悬液，50μlLPS（100μg/ml），100μlFIP，每组五个复孔，37℃ 、5% CO_2 培养箱中培养 7 天。4℃，以 2000r/min 离心 10min，取上清液，以 PBS 稀释 10 倍。IgG 测定采用 ELISA 法[8]。抗体含量测定按试剂盒说明进行，以小鼠 IgG 标准品制定标准曲线，将 OD_{450} 换算为相应 IgG 含量。

1.2.5 血清抗体 IgG 的测定

在实验第 1 天、第 7 天分别腹腔注射 10% SRBC 0.2ml 免疫小鼠。第 14 天小鼠摘眼球取血分离血清，以 PBS 稀释 10^3 倍。IgG 含量测定同 1.2.4。

1.2.6 溶血空斑形成细胞的测定

实验结束前 4 天，每只小鼠腹腔注射 20% SRBC 0.2ml。4 天后断颈处死小鼠，取脾制细胞悬液，并调整细胞浓度为 1×10^7/ml。溶血空斑形成细胞测定采用平皿法[5]，稍有改进。每组 5 只小鼠，每只小鼠脾细胞悬液作 3 个平皿。

1.2.7 数据处理 SPSS.10 统计软件进行方差齐性检验和卡方检验。结果以平均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。

2 结 果

羊胎盘免疫调节因子对 LPS 诱导小鼠脾淋巴细胞体外增殖及 B 淋巴细胞分泌 IgG 的影响（表 1）。

羊胎盘免疫调节因子对小鼠血清 IgG 生成水平及溶血空斑形成细胞的影响（表 2）。

3 讨 论

胎盘作为我国传统的滋补中药，在《本草纲目》中早有记载，羊胎盘免疫调节因子是在羊胎盘活性成分中分离获得的具有免疫活性的多肽和核苷酸混合成分。本研究动物体内外实验结果表明，腹腔注射羊胎盘免疫调节因子，对免疫抑制小鼠分泌抗体能力具有显著改善（$P<0.01$），并具有剂量效应（P

表 1 GPIF 对 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞体外增殖及 B 淋巴细胞产生 IgG 抗体的影响

组别	剂量（mg/ml）	动物（n）	IgG（μg/ml）（$\bar{x}\pm s$）	OD_{550}（$\bar{x}\pm s$）
高剂量组	4	5	0.1014 ± 0.0014*	1.0492 ± 0.0457*,**
中剂量组	2	5	0.0920 ± 0.0022*	1.0468 ± 0.0087*,**
低剂量组	1	5	0.0958 ± 0.0101*	0.9654 ± 0.0413*
对照组	0	5	0.0516 ± 0.0062	0.7080 ± 0.0295

* 与对照组比较，$P<0.01$　　** 与低剂量组比较，$P<0.01$

表 2 GPIF 对 BALB/c 小鼠血清 IgG 抗体水平及溶血空斑形成细胞的影响

组别	剂量（mg/kg. weight）	n	PFC（PFC/10^6）（$\bar{x}\pm s$）	IgG（mg/ml）（$\bar{x}\pm s$）
高剂量组	40	5	459.83 ± 63.50*,#	6.74 ± 0.19*,**
中剂量组	20	5	417.16 ± 70.56*,**	6.66 ± 0.13*,**
低剂量组	10	5	327.52 ± 98.17*	5.70 ± 0.20*
模型对照组	0	5	300.50 ± 52.50	2.61 ± 0.51
正常组	0	5	556.33 ± 44.83*	12.40 ± 0.21*

* 与模型对照组比较，$P<0.01$，** 与低剂量组比较，$P<0.01$，# 与中剂量组比较，$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

<0.01);直接作用于脾淋巴细胞,可显著促进 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖,显著提高脾 B 淋巴细胞产生抗体的能力($P<0.01$)。

B 淋巴细胞的主要功能是接受外来抗原刺激,增殖、发育为分泌抗体的浆细胞,并继而产生抗体,是体液免疫的基础。IgM 是初次体液免疫应答早期阶段产生的主要抗体,具有较强的抗感染作用。PFC 实验法所显示的溶血空斑,能够准确地反映动物机体产生 IgM 的能力。我们通过测试羊胎盘免疫调节因子对免疫低下小鼠抗体形成细胞形成的影响发现,羊胎盘免疫调节因子能显著提高免疫抑制小鼠 IgM 的分泌能力,改善免疫低下小鼠初次免疫应答能力,提高其抵抗力。IgG 是机体再次体液免疫应答产生的主要抗体,在机体防御机制中发挥抗感染、中和毒素及调理作用。实验结果显示,羊胎盘免疫调节因子可显著促进 LPS 诱导的 B 淋巴细胞的增殖,提高体内外 B 淋巴细胞生成 IgG 的能力。因此,羊胎盘免疫调节因子可提高 B 淋巴细胞介导的体液免疫能力和抗感染能力。Durum[9]、殷建林[10]以及吴玮[11]等研究显示:小剂量 γ 射线辐射即可造成 B 淋巴细胞在细胞和分子水平结构的改变和损伤,因此,B 淋巴细胞是辐射敏感细胞。研究结果也表明,全身一次性辐射 $5Gry^{60}C_0-\gamma$ 射线可造成小鼠 B 淋巴细胞分泌抗体能力的降低($P<0.01$),引起体液免疫的抑制,而羊胎盘免疫调节因子能促进免疫抑制小鼠抗体分泌能力的恢复。

LPS 既是 B 淋巴细胞的有丝分裂原,诱导脾细胞向 B 淋巴细胞转化和增殖,又可作为抗原,刺激 B 淋巴细胞分化为浆细胞,并产生抗体。研究中,我们把 LPS 作为 B 淋巴细胞增殖诱导原和抗原,将 GFIP 直接作用于脾 B 淋巴细胞进行抗体分析。研究结果表明,羊胎盘免疫调节因子具有与 LPS 的协同作用,显著促进 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞的分裂增殖($P<0.01$),提高脾 B 淋巴细胞产生抗体 IgG 的水平。

综上所述,羊胎盘免疫调节因子对机体体液免疫具有正调节作用,可通过提高 B 淋巴细胞的增殖和特异性抗体的分泌能力促进免疫抑制小鼠体液免疫功能的恢复。

(注:作者现单位为西南农业大学蚕学与生物技术学院)

参 考 文 献

[1] 杨桂芹,邹兴淮.胎盘及其提取物的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].沈阳农业大学学报,2003;34(2):150-154.

[2] 陆 晖,闫晓梅,张双全.羊胎盘活细胞素微量元素和氨基酸组成的分析[J].南京师范大学学报(自然科学版),2000;23(4):85-87.

[3] 高利臣,刘 宇,梁 鑫,等.羊胎免疫调节因子生物活性的研究[J].中国生化药物杂志,2004;25(2):72-74.

[4] 朱立平,陈学清,主编.免疫学常用实验方法[M].第 1 版.北京:人民军医出版社,2000;193-194.

[5] Jong Kwon Lee, JungA. Byun, SeungHee Park, et al. Evaluation of the potential immunotoxicity of 3-monochloro-1,2-propanediol in BALB/c mice: I. Effect on antibody forming cell, mitogen-stimulated lymphocyle proliferation, splenic subset, andnatural killer cell activity[J]. Toxicology, 2004;204(1):1-11.

[6] Wakatsuki Y, Neurath MF, Max EE. The B cell specific transcription factor BSAP regulates B cell proliferation[J]. Exp Med, 1994;179:1099-1108.

[7] 沈关心,周汝麟主编.现代免疫学实验技术[M].第 1 版.武汉:湖北科学技术出版社,1998;328-331.

[8] 陈 实,吴仕孝,李成荣,等.新生儿 B 细胞功能和细胞因子[J].重庆医科大学学报,1998;23(3):220-222.

[9] S K Durum. The comparative radiosensitivity of T and B lymphocytes[J]. Int J Radia Biol, 1978;34(1):1-5.

[10] 殷建林,苏燎原,刘克良.$^{60}C_0-\gamma$ 射线照射后小鼠 T、B 淋巴细胞 DNA 合成,单链断裂、修复能力的比较研究[J].辐射研究与辐射工艺学报,1988;6(1):33-37.

[11] 吴 玮,孔宪涛,李 莉.亚致死剂量 γ 射线照射后小鼠脾脏 CD95 阳性淋巴细胞变化规律的研究[J].中华放射医学与防护杂志,1997;17(5):305-308.