DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.11.004
第26卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 11
946 2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)11-946-03

β葡聚糖对小鼠抗体产生的影响

郭 波,李 华,郑 萍,杨 菲,谢佩蓉,吴玉章,邹 强 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察β葡聚糖是否可以促进抗体产生并探讨其作用是否依赖补体。方法 用β葡聚糖与抗原OVA联合免疫C57BL/6小鼠和补体C3基因缺陷小鼠,ELISA实验检测总IgG、IgG2a、IgG1抗体的产生。结果 β葡聚糖与OVA联合免疫的C57BL/6小鼠,其OVA特异性IgG、IgG2a、IgG1抗体应答均显著高于单独用OVA免疫的小鼠,低于完全弗氏佐剂与OVA免疫的小鼠;补体C3基因缺陷小鼠IgG、IgG2a、IgG1抗体滴度均显著低于野生型C57BL/6小鼠。结论 β葡聚糖可以促进抗体产生;补体C3缺损显著影响β葡聚糖介导的抗体应答。

关键词:β葡聚糖;抗体;补体;C3基因缺陷小鼠
中图法分类号:R392.11;R977.7 文献标识码:A

Effects of β glucan on antibody production in mice

GUO Bo, LI Hua, ZHENG Ping, YANG Fei, XIE Pei-rong, WU Yu-zhang, ZOU Qiang (Department of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe whether β glucan can enhance the production of antibody and explore the roles of complement system in this effect. **Methods** C57BL/6 and C3-deficient mice were immunized with β glucan and antigen OVA complexes. The production of IgG, IgG2a, and IgG1 was determined by ELISA. **Results** OVA-specific IgG, IgG2a, and IgG1 antibody responses in mice immunized with β glucan and antigen OVA were significantly increased than those in the mice immunized with OVA alone, and were slightly lower than those in mice immunized with an emulsion of complete Freund's adjuvant containing OVA. The titers of IgG, IgG2a, and IgG1 in C3-deficient mice were significantly lower than those in wild type mice. **Conclusion** β glucan can enhance the antigen response and deficiency of complement C3 can significantly impair the antigen response mediated by β glucan.

Key words: beta-glucan; antibody; complement; C3-deficient mice

β葡聚糖具有广泛的生物学活性,包括抗肿瘤、抗辐射、抗真菌、抗感染性疾病等,被认为是一种具有极大应用潜力的免疫调节剂[1~3]。它是由β(1→3)糖苷键连接α-D-葡萄糖形成的葡萄糖聚合物,在自然界分布广泛,主要存在于真菌、酵母及多种细菌的菌体成分中。虽然β葡聚糖有很好的应用前景,但其免疫调节作用机制至今还不清楚。

当前,天然免疫与获得性免疫的关系是免疫学研究的热点。已经知道,补体作为天然免疫系统的重要成员,在调节特异性B细胞应答方面起重要作用[4~6]。既往研究表明,β葡聚糖能够通过替代途径活化补体[7]。那么β葡聚糖能否通过活化补体系统,促进B细胞应答,提高抗体产生呢?为了解β葡聚糖对B细胞应答的影响,本研究用β葡聚糖与模式抗原OVA联合免疫,观察了OVA特异性抗体的产生情况。同时,为了解其作用机制是否依赖于补体,我们利用补体C3基因缺陷小鼠,观察β葡聚糖免疫后,补体C3对抗体产生的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 C57BL/6小鼠雌雄各半共3对,为C3基因缺陷小鼠(C3-/+)购自美国JAX实验室。纯合子C3基因缺陷小鼠(C3-/-)和野生型C57BL/6小鼠(C3+/+)均通过雌雄C3-/+杂交产生。用于免疫的动物为6~8周龄,雌性。

1.1.2 试剂 β葡聚糖、完全弗氏佐剂(CFA)、非完全弗氏佐剂(IFA)、卵清蛋白(OVA)、购自Sigma公司。抗OVA IgG、IgG2a、IgG1抗体购自Santa Cruz生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫与分组 为了解β葡聚糖(β-Glucan)是否能促进B细胞应答及补体C3的作用,我们选择模式抗原OVA

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200251,30128019)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200251, 30128019)
作者简介:郭 波(1972-),男,湖南省株洲市人,博士,讲师,主要从事补体分子免疫学方面的研究。电话:(023)68752234-613
通信作者:邹 强,电话:(023)68752234-611,E-mail:Qiangzou2k@yahoo.com
收稿日期:2004-04-01;修回日期:2004-05-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

与β 葡聚糖一起免疫 C57BL/6 小鼠或者补体 C3 缺陷 C57BL/6 小鼠。同时, 以抗原 OVA 直接免疫作为阴性对照, 以 OVA 联合完全弗氏佐剂(CFA)免疫作为阳性对照, 每组 8 只小鼠。尾根部皮下免疫野生型 C57BL/6 小鼠或补体 C3 缺陷 C57BL/6 小鼠。免疫剂量为每只小鼠 50μl, 其中含有 100μg OVA、100μg OVA+100μgβ 葡聚糖、100μg OVA+佐剂(CFA 或 IFA, 充分混匀)。2 周后以相同剂量加强免疫 1 次。

1.2.2　小鼠血清采取　　从小鼠尾部采血 2μl 到 18μl 阿氏保存液(570μl 阿氏液+30μl 5%小牛血清)混合, 离心, 取上清液, 即为免疫血清。

1.2.3　OVA 特异性抗体的检测　　抗原特异性 IgG、IgG2a、IgG1 用常规间接 ELISA 检测。简要如下: 10μg/ml 的 OVA 溶液包被酶联板, 洗涤液(PBS-吐温 20)漂洗后, 加入血清稀释液, 50μl/孔。每只小鼠血清, 做 1∶3 倍比稀释。漂洗后, 加入酶标抗体, 50μl/孔。漂洗, 显色 20 min。酶联仪 490 nm 检测。

1.3　统计学处理

数据采用 SPSS11.0 统计软件进行 two-way ANOVA 分析。

2　结果

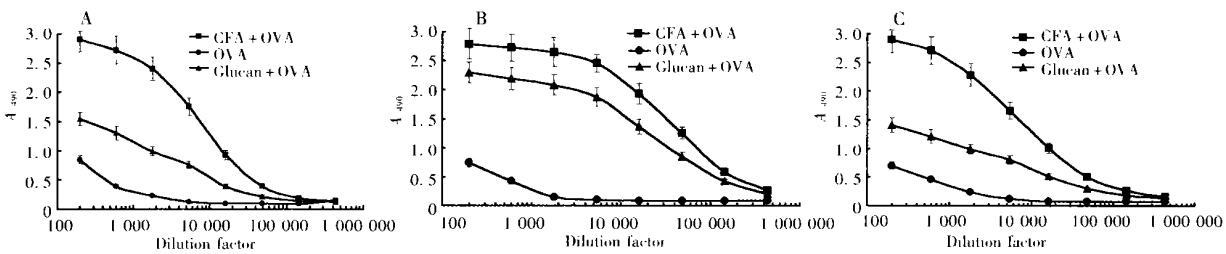
2.1　β 葡聚糖对抗原特异性 IgG、IgG2a、IgG1 产生的影响

我们首先免疫野生型 C57BL/6 小鼠, 观察了β 葡聚糖对抗原 OVA 特异性 IgG 产生的影响, 结果如图 1 所示。抗原 OVA 与β 葡聚糖免疫组抗体的滴度明显高于直接用 OVA 免疫组($P<0.05$), 表明β 葡聚糖能显著提高 OVA 特异性 IgG 抗体的产生。OVA+Glucan 免疫组低于 OVA+CFA 组($P<0.05$)。

OVA 是胸腺依赖抗原, 针对其抗体的产生需要 Th 细胞的辅助。Th1、Th2 细胞分泌的细胞因子不同, 其辅助 B 细胞产生的抗体亚型也不同。为进一步了解β 葡聚糖是否能同时促进 Th1、Th2 型抗体产生, 或者单独促进某型抗体的产生, 我们检测了 Th2 型抗体-IgG1、Th1 型抗体-IgG2a(图 1)。结果表明β 葡聚糖免疫组 IgG1($P<0.01$)、IgG2a($P<0.05$)抗体的产生显著高于单纯 OVA 对照组。

2.2　补体 C3 缺损对抗体应答的影响

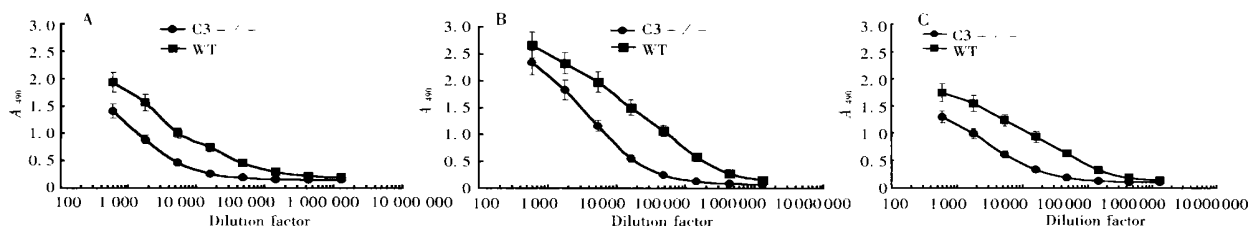
以往研究已经证实, 补体活化能促进抗体的产生, 而β 葡聚糖能够活化补体[7]。既然β 葡聚糖能显著促进抗原特异性抗体的产生。那么这种促进作用是否依赖于补体呢? 基于此, 我们用β 葡聚糖和 OVA 一起分别免疫 C3-/- 小鼠, 以野生型(WT) C57BL/6 小鼠作为对照, 检测是否缺损补体 C3 后影响抗原特异性的抗体应答, 结果如图 2 所示。无论是 OVA 特异性总 IgG, 还是亚型 IgG1、IgG2a, C3-/- 小鼠的抗体滴度均显著低于野生型小鼠($P<0.05$)。表明补体 C3 的缺损影响了抗原特异性的抗体应答。说明β 葡聚糖促进抗体应答与补体的活化相关。



A: Anti-OVA total IgG; B: Anti-OVA IgG1; C: Anti-OVA IgG2a

图 1　β 葡聚糖对 OVA 特异性抗体产生的影响

Fig 1　Effects of β glucan on OVA-specific antibody production



A: Anti-OVA total IgG; B: Anti-OVA IgG1; C: Anti-OVA IgG2a

图 2　补体 C3 缺损对抗体应答的影响

Fig 2　Effects of complement C3 deficiency on antibody response

3　讨论

多糖尤其是中药多糖因具有增强机体免疫功能及抗肿瘤等药理作用, 而且几乎没有毒性, 愈来愈引起国内外药理学家、生物学家和化学家们的兴趣, 成为当前的研究热点。已经知道, 中药多糖的主要有效成分为β 葡聚糖。虽然β 葡聚糖有很好的应用前景, 部分已经应用于临床, 比如, 猪苓多糖已经被我国批准用于肿

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

瘤等的辅助治疗，但一般均认为其只是一种非特异性免疫激活剂[8]。关于多糖是否能促进特异性免疫应答，目前仍知之甚少。为了解多糖对特异性 B 细胞应答的影响，我们将β葡聚糖与模式抗原 OVA 联合免疫，观察了其对抗体产生的影响。结果表明β葡聚糖能促进特异性 B 细胞应答，提高抗原特异性抗体的产生。而且，β葡聚糖不但可促进 Th1 亚型的抗体应答，也可以促进 Th2 型抗体应答。由于β葡聚糖几乎没有毒性，安全性好。提示β葡聚糖可以作为一种安全高效的佐剂，与特异性抗原一起发挥免疫预防和治疗效应。

既往研究表明，β葡聚糖能够通过替代途径活化补体[7]。已经知道，补体作为天然免疫系统的重要成员，在调节特异性 B 细胞应答方面起重要作用[4~6]。那么，β葡聚糖促进抗体应答是否与其活化补体有关呢？为了解β葡聚糖对 B 细胞应答的影响是否需要补体，本研究利用补体 C3 基因缺陷小鼠，比较观察了β葡聚糖对抗体产生的影响。结果显示，C3 缺陷小鼠的 OVA 特异性抗体应答显著受到抑制，表明β葡聚糖对 B 细胞应答的促进作用与补体密切相关。

总之，本研究的结果证实了β葡聚糖可促进特异性抗体应答，且该促进作用与补体密切相关。

参考文献：

[1] Williams D L, Pretus H A, McNamee R B, *et al*. Development, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of a water soluble glucan sulfate derived from Saccharomyces cerevisiae[J]. Immunopharmacology, 1991, 22(3): 139－155.

[2] Brown G D, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity[J]. Immunity, 2003, 19(3): 311－315.

[3] 郑 萍, 李 华, 郭 波, 等. 微粒型及可溶性β葡聚糖的制备及活性鉴定[J]. 免疫学杂志, 2004, 20(3): 276－278.

[4] DaCosta X J, Brockman M A, Alicot E. *et al*. Humoral response to herpes simplex virus is complement-dependent[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(22): 12708－12712.

[5] Molina H, Holers V M, Li B, *et al*. Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(8): 3357－3361.

[6] Dempsey P W, Allison M E, Akkaraju S, *et al*. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity[J]. Science, 1996, 271(5247): 348－350.

[7] Czop J K, Austen K F. Properties of glycans that activate the human alternative complement pathway and interact with the human monocyte beta-glucan receptor[J]. J Immunol, 1985, 135(5): 3388－3393.

[8] 杜肖娜, 王润田, 刘殿武, 等. 中药猪苓多糖抑瘤作用机理的初探[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(3): 296－297.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)11-0948-02

哮喘患儿外周血单个核细胞中 CD86 和 CD30 分子表达的初步研究

Expressions of CD86 and CD30 in PBMCs of children with asthma

王莉佳[1]，朱晓萍[2]，符 州[1]，杨锡强[1]（[1] 重庆医科大学儿童医院免疫室，重庆 400014；[2] 贵阳医学院附属医院儿科，贵阳 550004）

哮喘是一种以气道高反应性和慢性气道炎症为特征的变态反应性疾病。病因和发病机制十分复杂。本研究探讨了 B 细胞上协同刺激分子 CD86 及 T 细胞上 CD30 在哮喘发病中的作用，报告如下。

1 材料与方法

研究对象：根据儿童哮喘防治常规中诊断标准[1]确诊的我院 2003 年 1 月至 3 月呼吸系统专科门诊哮喘患儿，哮喘急性期病人 39 例，男 22 例，女 17 例，年龄 1~9 岁，平均(4.05±2.15)岁，在采集标本前两周未使用过激素或免疫调节剂。健康对照组 31 例，男孩 18 例，女孩 13 例，年龄在 11 个月至 11 岁，平均(5.25±2.05)岁，无心、肺、肝或肾疾患，近期无感染史，无个人及家族过敏性疾患及其他变态反应性疾患史。

研究方法：①外周血单个核细胞(peripheral boud mononuclear cell, PBMC)分离：密度梯度离心法从肝素抗凝外周血中分离 PBMC，用 10%灭活小牛血清 RPMI 1640 重悬并调整细胞浓度为 10^6/ml，备用。②$CD19^+$ 细胞表达 CD86 百分率的检测：取 1×10^6/ml 的 PBMC 2 ml 分装于两管，阳性管加鼠抗人 CD19-PE 和 CD86-FITC，阴性管加鼠抗人 IgG1-PE 和鼠抗人 IgG1-FITC，FACS 检测 $CD19^+$ 细胞百分率及 $CD19^+$ $CD86^+$ 细胞百分率。③$CD4^+$ 细胞表达 CD30 百分率的检测：取 1×10^6/ml 的 PBMC 3 ml 分装于 3 管，分别加鼠抗人 IgG1-FITC 和鼠抗人 IgG1-PE，鼠抗人 CD4-FITC 和鼠抗人 IgG1-PE 及鼠抗人 CD4-FITC 和鼠抗人 CD30-PE。FACS 及 Cellquest 软件分析 $CD4^+$ 细胞表达 CD30 分子的百

（下转 952 页）

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30271380)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30271380)
作者简介：王莉佳(1956－)，女，重庆市人，主管检验师，主要从事儿童免疫 T、B 细胞功能失调与免疫缺陷病方面的研究。电话：(023)63632756－3415
收稿日期：2003-11-18；修回日期：2004-03-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net