

不同来源 Lfcin 对小鼠脾淋巴细胞增殖及分泌细胞因子影响的对比研究

赵宁¹, 许晓曦¹, 张艳杰², 张书义³

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030) (2. 上海晨冠乳业有限公司, 上海 201401)

(3. 全国畜牧总站, 北京 100125)

摘要: 本文以牛乳铁蛋白 LfcinB 和人乳铁蛋白 LfcinH 为研究对象, 研究其对小鼠脾淋巴细胞增殖及分泌细胞因子的影响并比较两者的差异及相关性。采用 CCK-8 法检测不同浓度的 Lfcin 单独作用对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响及不同质量浓度 Lfcin 与丝裂原共同作用对小鼠 T、B 淋巴细胞增殖作用的影响; ELISA 法测定 IL-2、IL-4 和 TNF- α 的含量。结果显示: LfcinB 和 LfcinH 能显著促进脾淋巴细胞增殖及增强 Con A 诱导的 T 淋巴细胞的增殖和 LPS 诱导的 B 淋巴细胞的增殖, 并且能显著促进脾淋巴细胞分泌 IL-2、IL-4、TNF- α ($P < 0.01$)。研究结果表明: Lfcin 能有效的促进脾淋巴细胞的增殖, 并与 Con A、LPS 对 T、B 淋巴细胞的增殖有协同刺激作用, 其机制可能是通过促进细胞因子的分泌发挥免疫增强作用。

关键词: 人乳铁蛋白; 牛乳铁蛋白; 脾淋巴细胞; 增殖; 细胞因子

文章编号: 1673-9078(2015)10-7-12

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.002

Comparative Study on the Effects of Lactoferricins from Different Sources on Proliferation and Cytokine Secretion of Spleen Lymphocytes in Mice

ZHAO Ning¹, XU Xiao-xi¹, ZHANG Yan-jie², ZHANG Shu-yi³

(1. College of Food Science Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China) (2. Shanghai Chengguan Dairy Co, Ltd, Shanghai 201401, China) (3. National Animal Husbandry Service, Beijing 100125, China)

Abstract: The effects of human lactoferricin (LfcinH) and bovine lactoferricin (LfcinB) on the proliferation and cytokine secretion of spleen lymphocytes in mice were studied, and the differences and correlation between LfcinH and LfcinB were compared and analyzed, respectively. The cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to measure the effects of different concentrations of LfcinH or LfcinB alone on the proliferation of mouse spleen lymphocytes and of different concentrations of LfcinH or LfcinB combined with a mitogen on the proliferation of mouse T and B lymphocytes. The IL-2, IL-4, TNF- α content was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that LfcinH and LfcinB could significantly promote the proliferation of spleen lymphocytes and enhance the T lymphocyte proliferation induced by concanavalin A (ConA) and B lymphocyte proliferation induced by lipopolysaccharide (LPS). Moreover, Lfcin could significantly increase the secretions of IL-2, IL-4, TNF- α in spleen lymphocytes. The results also showed that Lfcin has a synergistic effect on the proliferation of T and B spleen lymphocytes with Con A or LPS; the mechanism may be related to the immune enhancement achieved by promoting cytokine secretion.

Key words: bovine lactoferricin; human lactoferricin; spleen lymphocyte; proliferation; cytokines

乳铁蛋白(Lactoferrin, 简称为 Lfcin)是乳铁蛋白在胃蛋白酶酸性环境下水解产生的一段多肽^[1], Lfcin 具备乳铁蛋白的抗菌、抗癌、及参与免疫反应^[2]等所有生物学活性。可用于婴儿配方奶粉、保健食品、药品中, 作为营养强化剂并能提高人体免疫力^[3], 其

收稿日期: 2015-02-02

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目 (2013BAD18B00)

作者简介: 赵宁 (1988-), 女, 硕士, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 许晓曦 (1968-), 女, 教授, 研究方向: 乳品科学与技术

中牛乳铁蛋白 (LfcinB) 和人乳铁蛋白 (LfcinH) 来源主要是牛乳和母乳中提取的一种天然物质, 毒副作用小, 安全可靠, 它们的一级结构已确定^[4], 均是由二硫键连接成为一个分子, 呈相似的环状结构。Takakura N 等人研究发现口服乳铁蛋白能够提高脾脏和外周血淋巴细胞数量^[5], Sekine K 研究表明乳铁蛋白能提高腹腔巨噬细胞和脾脏 NK 细胞活性^[6], Wakabaya shi H 在此基础上进一步研究表明 Lfcin 能促进脾细胞和颈淋巴结细胞因子 IL-12 和 IFN- γ

的生成及血液 IL-18 的含量^[7]。因此, Lfcin 的抗癌、抗炎和抗微生物感染作用被认为是通过其免疫调节效应介导的,从而达到抗癌和抗炎的效果。

目前国内外均将牛乳铁蛋白作为功效因子应用于婴儿配方奶粉中,以增强婴儿的抵抗力。第3代婴儿配方奶粉均使用牛乳组分模拟母乳,使其营养与母乳接近,促进婴儿生长发育,改善婴儿的肠道菌群、减少疾病、提高免疫力等,但牛乳铁蛋白是否能够替代人乳铁蛋白,以及替代后的功效性尚无人探讨,国内外的研究并未将两者的免疫调节作用进行比较,而 Lfcin 对脾淋巴细胞增殖及分泌细胞因子的免疫调节作用的影响,至今国内外未见报道,因此,本研究通过体外分离培养 BALB/c 小鼠的脾淋巴细胞作为体外模型,以此来探讨 LfcinB 和 LfcinH 对脾淋巴细胞的增殖及与丝裂原协同刺激对 T、B 淋巴细胞增殖的影响,采用酶联免疫吸附实验(ELISA)法检测两种来源乳铁蛋白素发挥免疫作用中 IL-2、IL-4 和 TNF- α 含量的变化,并比较两者的差异和相关性,本研究对 LfcinB 和 LfcinH 的免疫调节作用进行初步比较,为牛乳组分生产婴儿配方奶粉以替代母乳提供科学依据,也为婴儿配方奶粉的研制提供新方向和新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

BALB/c 小鼠,等级 SPF 级购自北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证号:SCXK 京 2012-0001)。LfcinB(氨基酸序列 FKCRR WQWRM KKLGA PSITC VRRAF)和 LfcinH(氨基酸序列 GRRRR SVQWC AVSQP EATKC FQWQR NMRKV RGPPV SCIKR DSPIQ CIQA)购自上海楚肽生物有限公司,RPMI-1640 完全培养基购自 Solarbio 科技有限公司,胎牛血清购自杭州四季清,刀豆蛋白(ConA)、脂多糖(LPS)购自 Sigma 公司,小鼠 IL-2、IL-4、TNF- α ELISA 检测试剂盒购自 R & D system, CCK-8 试剂盒、红细胞裂解液购自 Beyotime 生物研究所,其余化学试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞制备与培养

小鼠脾脏淋巴细胞制备:用 75%酒精擦拭双手及超净无菌台面,在超净无菌台上将消毒后的器具依次摆好。以颈椎脱臼法处死小鼠,用 75%乙醇浸泡消毒小鼠 15 min,转入超净工作台内的解剖盘中细胞培养室,用镊子将小鼠取出,用酒精棉擦拭小鼠腹部,用

解剖剪刀沿腹腔中线剪开小鼠胸腔,取出脾脏置于培养皿中,并用 PBS 液冲洗 3~5 次,放入含有 10 mL 10% 胎牛血清 RPMI-1640 完全培养基的培养皿中,使用 1 mL 无菌注射器装入含血清的 RPMI-1640 培养基,不断冲洗并挤压小鼠脾脏,不要刺穿脾脏,将收集分离的脾细胞悬液装到离心管中,1500 r/min 离心 5 min 后,去上清,加入红细胞裂解液静置 5 min,除去血红细胞,离心后所得为白色沉淀上方只有一层红色膜为最佳状态,在此离心管中放入 5 mL RPMI-1640 培养液,1000 r/min 离心 10 min 洗涤细胞 2~3 次,将上述收集到的脾细胞置于培养瓶中,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 4 h,以除去贴壁细胞,收集未贴壁的细胞悬液即为脾淋巴细胞。计数接种培养。台盼蓝染色计数,活细胞数大于 95%。将上述收集到的脾脏细胞置于平皿中,用血球计数板测细胞数量,并用含 10% 的完全 RPMI-1640 培养基调节脾细胞数为 1×10^6 cell/mL 备用。

1.2.2 倒置显微镜观察脾淋巴细胞的形态

脾淋巴细胞培养在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基中,待细胞数量达到实验要求时,更换无血清的 RPMI-1640 完全培养基培养 24 h,使用含有不同浓度 Lfcin 的完全培养基培养脾淋巴细胞 24 h 后观察其细胞形态。

1.2.3 CCK-8 法检测 LfcinB 和 LfcinH 对脾淋巴细胞增殖的影响

同 1.2.1 节方法制备小鼠脾淋巴细胞悬液。实验设空白组:只含有 RPMI-1640 培养液,无细胞悬液,实验组:分别经终质量浓度为(25、50、100、150、200 μ g/mL)的 Lfcin 处理的细胞悬液,对照组:未经 Lfcin 处理的细胞悬液,阳性对照组:经终质量浓度为 5 μ g/mL Con A 处理的细胞悬液,每一浓度设 3 个复孔,置于 37 °C、含 5% 的 CO₂ 条件下分别培养 24、48、72 h 后每孔加 CCK-8 20 μ L (5 g/L)继续孵育 4 h,摇床震荡 1 min 混匀,用酶标仪在 450 nm 波长(以 650 nm 为参考波长)测定 OD 值。确定 LfcinB 和 LfcinH 最佳浓度及最佳时间。计算公式如下:

细胞增殖率(%)=[(实验组-空白组)]/(对照组-空白组) \times 100%-1

1.2.4 CCK-8 法检测 Lfcin 和丝裂原共同作用对脾淋巴细胞增殖的影响

同 1.2.1 方法制备小鼠脾淋巴细胞悬液,检测 Lfcin 对小鼠 T、B 淋巴细胞的增殖作用。实验设空白组:只含有 RPMI-1640 培养液,无细胞悬液;Lfcin+Con A 组:分别经终质量浓度为(0、25、50、100、150、200 μ g/mL)的 Lfcin 与终质量浓度为 5 μ g/mL 的 Con A

共同处理的细胞悬液,其中 0 $\mu\text{g/mL}$ 的 Lfcin 作为对照组; Lfcin+LPS 组: 分别经终质量浓度为 (0、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/mL}$) 的 Lfcin 与终质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 共同处理的细胞悬液,其中 0 $\mu\text{g/mL}$ 的 Lfcin 作为对照组; 每一质量浓度设 3 个复孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% 的 CO_2 条件下培养 48 h 后每孔加 CCK-8 溶液 20 μL (5 g/L) 继续孵育 4 h, 摇床震荡 1 min 混匀,用酶标仪在 450 nm 波长(以 650 nm 为参考波长)测定 OD 值。计算公式及数据处理参照 1.2.3 进行。

1.2.5 ELISA 法检测 Lfcin 对脾细胞分泌的主要细胞因子分泌量的影响

同 1.2.1 方法制备小鼠脾淋巴细胞悬液。实验设空白对照组: 未经 Lfcin 处理的细胞悬液, 阳性对照组: 经终质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 处理的细胞悬液, 实验组: Lfcin 的终质量浓度为 (25、50、100、150、200 $\mu\text{g/mL}$) 处理的细胞悬液, 每一质量浓度 3 个复孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% 的 CO_2 条件下培养 48 h, 收集上清液测定细胞因子 IL-2、IL-4、TNF- α 的含量。按照 ELISA 试剂盒操作步骤。

1.2.6 统计方法

实验重复 3 次, 每次设置 3 个平行样。实验的数据均以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 应用 SigmaPlot 10.0 软件进行数据统计及作图, 采用 SPSS 13.0 软件分析各实验组数据与对照组是否存在差异显著性, $P<0.01$ 表示差异极显著, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 倒置显微镜观察脾淋巴细胞的形态

图 1 为不同浓度的 Lfcin 处理脾淋巴细胞 24 h 后倒置显微镜观察到的细胞形态变化。脾淋巴细胞随着 Lfcin 浓度的增加细胞呈现增大、饱满、聚堆、数量增加等现象, 呈剂量依赖性, 而未经 Lfcin 处理的空白对照组细胞数量则较少, 但 LfcinB 和 LfcinH 浓度分别大于 150 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞数量开始减少, 所以 LfcinB 和 LfcinH 浓度分别在 150 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞数达到最大。显微镜观察结果表明 LfcinB 和 LfcinH 能促进脾淋巴细胞增殖。

2.2 Lfcin 对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

由图 2 可以看出, 各浓度 LfcinB 和 LfcinH 处理淋巴细胞的增殖率与对照组相比差异性显著 ($P<0.05$), 其中 LfcinB 在终质量浓度 25~150 $\mu\text{g/mL}$ 范围内可促进小鼠脾淋巴细胞的增殖, 促进作用呈上升趋势, 呈现量效关系, 而 LfcinB 在终质量浓度 150~200

$\mu\text{g/mL}$ 范围内促进作用下降, LfcinH 浓度在 25~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内促进作用上升, 在 100~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内促进作用下降, 并且浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 的 LfcinB 与浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 LfcinH 对小鼠脾淋巴细胞的增殖影响差异不大, 从而表明 LfcinB 和 LfcinH 对其增殖作用的最佳浓度分别是 150 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$, 随着培养时间的延长, 各浓度 LfcinB 和 LfcinH 处理淋巴细胞的增殖率均为先升高在降低, 在 24~48 h 时间范围内呈时间依赖关系, 在 24 h 时即表现出促进作用, 在 48 h 时该促进增殖能力最强, 各组增殖率均达到最大值, 72 h 时增殖能力下降, 所以 48 h 是促进细胞增殖的最佳时间。

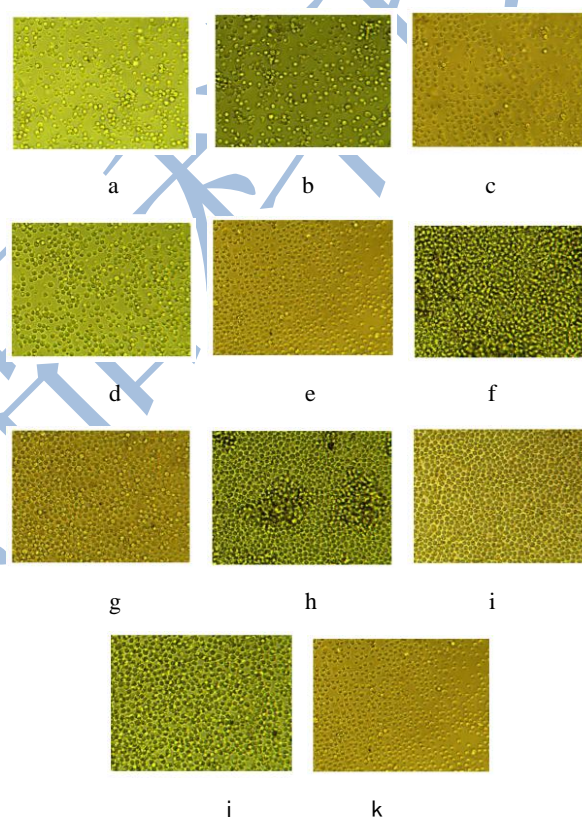


图 1 倒置显微镜观察脾淋巴细胞的形态($\times 20$)

Fig.1 Morphological features of spleen lymphocytes as observed using an inverted phase microscope ($\times 20$)

注: a: Lfcin (0 $\mu\text{g/mL}$), b: LfcinH (25 $\mu\text{g/mL}$), c: LfcinB (25 $\mu\text{g/mL}$), d: LfcinH (50 $\mu\text{g/mL}$), e: LfcinB (50 $\mu\text{g/mL}$), f: LfcinH (100 $\mu\text{g/mL}$); g: LfcinB (100 $\mu\text{g/mL}$), h: LfcinH (150 $\mu\text{g/mL}$), i: LfcinB (150 $\mu\text{g/mL}$), j: LfcinH (200 $\mu\text{g/mL}$), k: LfcinB (200 $\mu\text{g/mL}$).

实验结果表明, Lfcin 单独作用于脾淋巴细胞, 能直接增强淋巴细胞增殖, 并不是 Lfcin 的质量浓度越高和作用时间越长, 其对细胞增殖率也越大, 当 Lfcin 浓度和时间达到一定时, 有一个峰值, 随后浓度升高、

作用时间增长, 增殖率反而下降, 这一点恰好与人体乳铁蛋白需求相一致。LfcinB 与 LfcinH 浓度分别在 150 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$, 作用时间 48 h 时增殖效果达到最大, 与倒置显微镜观察的结果相一致。也间接证明 Lfcin 对脾淋巴细胞不具有细胞毒性, Lfcin 本身具有有丝分裂原样作用。

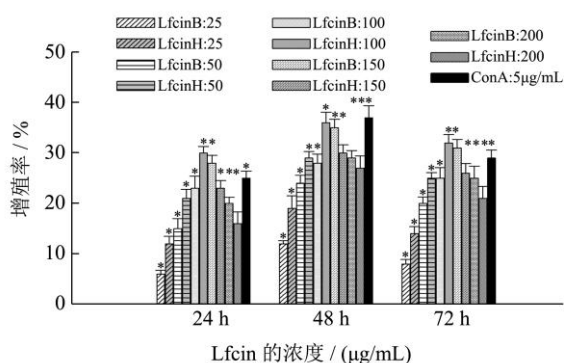


图2 Lfcin 浓度与培养时间对脾淋巴细胞增殖的影响

Fig.2 Effects of Lfcin concentration and culture time on the proliferation of spleen lymphocytes

注: n=3; 实验组与对照组 (0) 比较, * $P < 0.05$ 。

2.3 Lfcin 和丝裂原共同作用对脾淋巴细胞增殖的影响

为了研究 Lfcin 对 T、B 淋巴细胞激活作用, 本实验成功地建立了小鼠脾淋巴细胞 Con A 和 LPS 诱导模型, Con A 作为 T 淋巴细胞有丝分裂原, 主要促进 T 淋巴细胞增殖^[8], LPS 作为 B 淋巴细胞有丝分裂原, LPS 主要促进 B 淋巴细胞增殖^[9]。采用 CCK-8 法检测不同质量浓度的 Lfcin 在 ConA 和 LPS 的刺激下, 对脾淋巴细胞增殖率的影响。由图 3 可以看出, Lfcin 与 ConA 共同培养细胞 48 h 后, 实验组的增殖率与对照组相比具有显著性差异($P < 0.05$), 随着 Lfcin 浓度的逐渐增高, 小鼠脾淋巴细胞的增殖率呈现先上升后下降的趋势, 当 Lfcin 的质量浓度在 25~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 增殖率均随着 Lfcin 质量浓度的增加而增大, 具有剂量依赖性; 当 Lfcin 质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, LfcinB 与 LfcinH 的协同效果均趋于最佳, 此时两者对脾淋巴细胞的协同效果差异不大。当 Lfcin 质量浓度 $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ 时, 对细胞协同效果趋于下降。所以协同效果达到最佳的浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, 同理, Lfcin 也能够协同 LPS 促进脾淋巴细胞的增殖, 协同效果与 ConA 类似。

实验结果表明, 分别在 ConA 和 LPS 的刺激下 LfcinB 和 LfcinH 对细胞增殖的最适浓度均是 100 $\mu\text{g/mL}$, Lfcin 对 ConA 诱导的 T 淋巴细胞及 LPS 诱导

的 B 淋巴细胞的增殖均有协同刺激作用, 由此推断 Lfcin 可能是淋巴细胞的致有丝分裂原, 通过促进淋巴细胞增殖, 达到了增强机体免疫力的效果, 从而对增强机体的免疫功能有着重要作用。

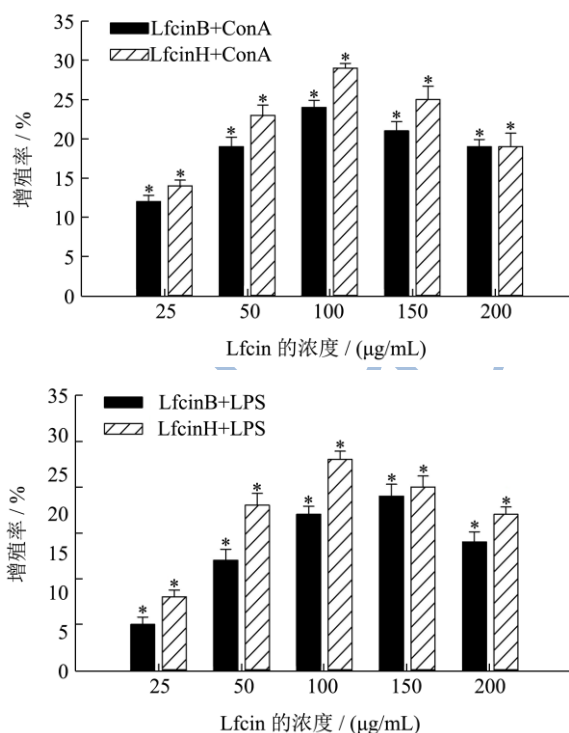


图3 Lfcin 与 Con A 及 LPS 共同作用 48 h 对小鼠脾淋巴细胞增殖作用的影响

Fig.3 Effects of Lfcin with Con A or LPS on the proliferation of spleen lymphocyte after 48 h of culture

注: n=3; 实验组与对照组 (0) 比较, * $P < 0.05$ 。

2.4 Lfcin 对小鼠脾淋巴细胞分泌细胞因子 IL-2、IL-10 和 TNF- α 的影响

IL-2 是 T 细胞辅助细胞分泌产生的, 它能够促进 T 细胞增殖, 提高机体免疫功能, 还可刺激 NK 细胞, 诱导 CTL、LAK 等杀伤细胞的分化和效应功能, 在抗肿瘤及调节机体免疫方面具有重要的作用^[10]。在本研究中选用脂多糖 (LPS) 作为阳性对照来比较 Lfcin 对促炎症因子的影响程度, 由于脂多糖 (LPS) 是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分, 是一种公认的细胞内毒素, 能引起急性炎症, 从而激发强烈的免疫应答反应^[9]。

将不同浓度的 Lfcin 与淋巴细胞共培养 48 h 后, 如图 4 可知实验组 Lfcin 处理细胞后上清中 IL-2 含量均增加, 与空白对照组相比具有极显著差异($P < 0.01$), 当 LfcinB 浓度在 25~150 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, IL-2 含量均随着 Lfcin 质量浓度的增加而增大, 呈剂量依赖性,

并且当 LfcinB 质量浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 时, 上清液中 IL-2 的含量达到最大值。当 LfcinB 浓度 $\geq 150 \mu\text{g/mL}$ 时, IL-2 含量开始下降, 所以 150 $\mu\text{g/mL}$ 是 LfcinB 促进脾淋巴细胞分泌 IL-2 的最佳作用浓度。同理, LfcinH 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, IL-2 含量达到最大值, 并且两者对脾淋巴细胞分泌 IL-2 的效果差异不大, 只是剂量上稍有差异。实验结果表明, LfcinB 和 LfcinH 均能够促进脾淋巴细胞分泌 IL-2, 从而推断 Lfcin 是通过促进细胞因子的分泌和促进细胞的增殖, 从而发挥免疫增强作用。

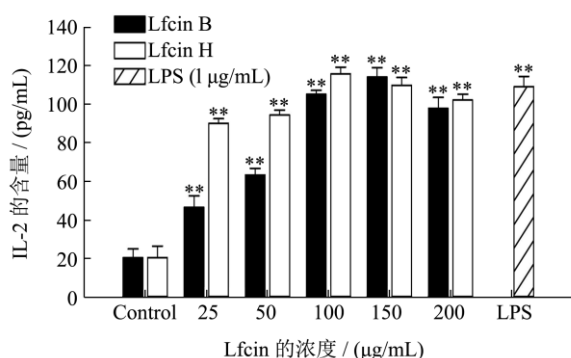


图 4 LfcinB 和 LfcinH 对脾淋巴细胞分泌 IL-2 的影响

Fig.4 Effects of LfcinB and LfcinH on IL-2 secretion by spleen lymphocytes

注: ** $P < 0.01$, vs control.

IL-4 是一种小分子类的多肽, 属于抗炎因子, 能够参与机体炎症、免疫反应等一系列病理生理过程、机体应激和防御的重要活性介质, 抑制促炎症因子的过度分泌, 阻止疾病的发生与发展, 有利于维持机体免疫平衡^[10]。

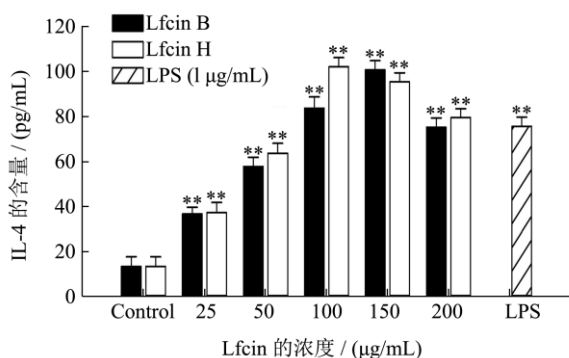


图 5 LfcinB 和 LfcinH 对脾淋巴细胞分泌 IL-4 的影响

Fig.5 Effects of LfcinB and LfcinH on IL-4 secretion by spleen lymphocytes

注: ** $P < 0.01$, vs control.

将不同浓度的 Lfcin 与淋巴细胞共培养 48 h 后, 由图 5 可知, 实验组 Lfcin 处理细胞后上清液中 IL-4 含量均增加, 与空白对照组相比具有极显著差异 ($P < 0.01$), 而当 Lfcin 浓度 $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ 时, IL-4 含量

均高于 LPS 阳性对照组 (1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS), 当 LfcinB 浓度在 25~150 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, IL-4 含量均随着 Lfcin 质量浓度的增加而增大, 呈剂量依赖性, 并且当 LfcinB 质量浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 时, 上清液中 IL-4 的含量达到最大值。当 LfcinB 浓度 $\geq 150 \mu\text{g/mL}$ 时, IL-4 含量开始下降, 所以 150 $\mu\text{g/mL}$ 是 LfcinB 促进脾淋巴细胞分泌 IL-4 的最佳作用浓度。同理, LfcinH 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, IL-4 含量达到最大值, 并且两者对脾淋巴细胞分泌 IL-4 的效果差异不大, 只是剂量上稍有差异。实验结果表明, LfcinB 和 LfcinH 均能够促进脾淋巴细胞分泌 IL-4, 其能力高于 LPS 阳性对照组, 说明 Lfcin 均能够下调免疫应答反应的强度, 进而减轻炎症反应。

TNF- α 是由巨噬细胞和淋巴细胞分泌, 属于促炎症调节因子, 在宿主防御机制中发挥重要作用, 还能够直接的抑制或杀伤肿瘤细胞, 发挥重要的免疫调节作用^[11]。

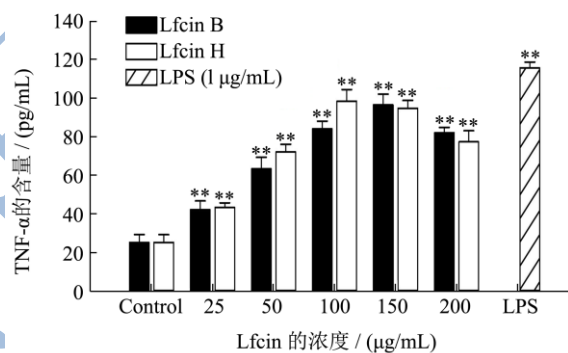


图 6 LfcinB 和 LfcinH 对脾淋巴细胞分泌 TNF- α 的影响

Fig.6 Effects of LfcinB and LfcinH on TNF- α secretion by spleen lymphocytes

注: ** $P < 0.01$, vs control.

将不同浓度的 Lfcin 与淋巴细胞共培养 48 h 后, 由图 6 可知实验组 Lfcin 处理细胞后上清液中 TNF- α 含量均增加, 与空白对照组相比具有极显著差异 ($P < 0.01$), 但实验组均低于 LPS 阳性对照组 (1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS), 当 LfcinB 浓度在 25~150 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, TNF- α 含量均随着 Lfcin 质量浓度的增加而增大, 呈剂量依赖性, 并且当 LfcinB 质量浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 时上清液中 TNF- α 的含量达到最大值。当 LfcinB 浓度 $\geq 150 \mu\text{g/mL}$ 时, TNF- α 含量呈降低趋势, 所以 150 $\mu\text{g/mL}$ 是 LfcinB 促进脾淋巴细胞分泌 TNF- α 的最佳作用浓度。同理, LfcinH 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, TNF- α 含量达到最大值, 并且两者对脾淋巴细胞分泌 TNF- α 的效果相差不大, 只是剂量上稍有差异。实验结果表明, LfcinB 和 LfcinH 均能够促进脾淋巴细胞分泌 TNF- α , 进而提高了机体对抗原的免疫应答水平, 能

在短时间内调动免疫应激能力, 但此应答水平低于 LPS 阳性对照组, 属于较温和反应, 因而不会引起机体炎症损伤。由此推断 Lfcin 可能是通过提高促炎症调节因子的分泌从而达到了抗肿瘤的效果。这一结论与 Takakura N 研究乳铁蛋白能促进促炎症细胞因子 TNF- α 分泌的结果相一致^[5]。

3 结论

3.1 脾脏是人体最大的免疫器官, 是 T、B 淋巴细胞聚集的部位, 而 T、B 淋巴细胞是机体重要的免疫活性细胞, 其增殖是反映细胞免疫最直接的指标^[12]。它具有自主增殖的能力, 也能分泌多种细胞因子, 其中具有代表性细胞因子有 IL-2、IL-4 和 TNF- α 等。

3.2 本研究利用体外分离培养的脾淋巴细胞作为细胞模型, 比较 LfcinB 和 LfcinH 对其免疫调节作用的差异及相关性, 研究发现 LfcinB 和 LfcinH 能有效的促进脾淋巴细胞增殖, 并与 Con A、LPS 对 T、B 淋巴细胞增殖有协同刺激作用, 同时能够促进小鼠脾淋巴细胞体外分泌细胞因子 IL-2、IL-4 和 TNF- α , LfcinB 和 LfcinH 质量浓度分别在为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 三种细胞因子的分泌量均达到最大, 与 CCK-8 结果相一致。由于 TNF- α 是促炎症因子, 而 IL-4 是维持机体免疫系统平衡的抑炎症因子, 因此 Lfcin 对脾淋巴细胞分泌 IL-4、TNF- α 的水平得到了调节与平衡, 避免机体损伤。LfcinB 和 LfcinH 具有双向的免疫调节作用, 能够使细胞异常的免疫状态恢复正常, 而对正常的免疫功能无明显影响, 发挥免疫自身稳定的作用, 这与 Legrand D 的研究结论乳铁蛋白既可以发挥促炎的作用, 也可以发挥抑制炎症的作用相一致^[13]。

3.3 进一步认识到了 LfcinB 和 LfcinH 均是免疫增强剂, 其机制可能是通过促进脾淋巴细胞增殖和诱导脾淋巴细胞分泌细胞因子, 从而增强机体的免疫调节功能。LfcinB 与 LfcinH 在该免疫力增强方面具有同等功效, 只是在剂量上稍有差别。由于本实验只选取体外实验的方法, 一般需要结合体内实验进行。本研究为下一步的体内实验打下了良好的基础, 也为来源广泛的牛乳组分生产婴儿配方奶粉替代母乳提供了实验支撑, 丰富了对婴儿配方奶粉的研究工作, 也为免疫调节食品的开发开辟了新道路。

参考文献

[1] Haney E F, Nazmi K, Bolscher J G M, et al. Structural and biophysical characterization of an antimicrobial peptide chimera comprised of lactoferricin and lactoferrampin [J].

Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2012, 1818(3): 762-775

[2] Legrand D, Mazurier J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity [J]. Biometals, 2010, 23(3): 365-376

[3] 胡志和, 庞广昌, 陈庆森. 牛乳铁蛋白及乳铁素的生产与应用现状[J]. 食品科学, 2006, 27(6): 247-250

HU Zhi-he, PANG Guang-chang, CHEN Qing-sen. Review on Production and Application Status of Lactoferrin and Lactoferricin [J]. Food Science, 2006, 27(6): 247-250

[4] Hunter H N, Demcoe A R, Jenssen H, et al. Human lactoferricin is partially folded in aqueous solution and is better stabilized in a membrane mimetic solvent [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(8): 3387-3395

[5] Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, et al. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model [J]. J. Med. Microbiol, 2004, 53(6): 495-500

[6] Sekine K, Ushida Y, Kuhara T, et al. Inhibition of initiation and early stage development of aberrant crypt foci and enhanced natural killer activity in male rats administered bovine lactoferrin concomitantly with azoxymethane [J]. Cancer Lett., 1997, 121(2): 211-216

[7] Wakabayashi H, Kurokawa M, Shin K, et al. Oral lactoferrin prevents body weight loss and increases cytokine responses during herpes simplex virus type 1 infection of mice [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2004, 68 (3): 537-544

[8] Xiucong Pei, zhiwen Duan, Mingyue Ma, et al. Role of Ca/Ca_N/NFAT signaling in IL-4 expression by splenic lymphocytes exposed to phthalate (2-ethylhexyl) ester in spleen lymphocytes [J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41 (4) :2129-2142

[9] Liang C, Yang Y, Pu L Y, et al. Immunosuppressive effects of a-Type procyanidin oligomers from *Cinnamomum tamala* [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014

[10] Kyu Ho Lee, Hee Jung Kim, Hae Bok Kim, et al. Hizikia fusiformis fractions successfully improve atopic dermatitis indices in anti - CD₃ - stimulated splenocytes and 2,4 - dinitrochlorobenzene - treated BALB /c mice [J]. J. Pharm. Pharmacol., 2014, 66 (3): 466-476

[11] Popovanova B K, Kitamura K, Wu Y, et al. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2008, 118(2): 560-570

- [12] Shaghayegh P D, Shirin F, Saeed D, et al. Clove (*Syzygium aromaticum*) ingredients affect lymphocytes subtypes expansion and cytokine profile responses: An in vitro evaluation [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2014
- [13] Legrand D. Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes [J]. Biochem. Cell Biol., 2011, 90(3): 252-268

现代食品科技