

胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物对小鼠的免疫调节作用

刘安军, 张旭, 张国蓉, 刘丹

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 研究了四氧嘧啶对小鼠免疫功能的影响, 并通过测定小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能、抗体形成细胞数、E 花环形成率等, 检测胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物对小鼠免疫力的调节作用。结果表明, 胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物能增强巨噬细胞吞噬能力, 增加抗体形成细胞数, 增加 E 花环形成率, 对四氧嘧啶造成的免疫损伤有一定的调节作用。

关键词: 胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物; 四氧嘧啶; 免疫功能

中图分类号: R392.1; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2008)05-0401-05

Regulation of the Mice Immunity by Collagen Peptide-Chromium(III) Complex

LIU An-jun, ZHANG Xu, ZHANG Guo-rong, LIU Dan

(College of Food Engineering & Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The influence of alloxan on the immunologic function in mice was studied and the regulation of mice immunity by collagen peptide-Chromium(III) complex was also investigated by measuring the cytophagocytosis of macrophage in abdominal cavity, antibody formation cell and T-lymphocyte. It was found that collagen peptide-Chromium(III) complex could enhance the cytophagocytosis of macrophage, antibody producing cell count and E-rosette concentration, showing regulation effect on the immunologic damage induced by alloxan.

Key words: collagen peptide-chromium(III) complex; alloxan; immunologic function

铬是人和动物所必需的微量元素, 铬(III)通过 GTF 协同和增强胰岛素的作用来影响糖类、脂类、蛋白质及核酸代谢^[1~3]。因此, 铬是维持正常的葡萄糖耐量、生长和寿命不可缺少的微量元素或“维生素”。铬的生理功能主要是三价铬。研究表明, 有机铬对各类糖尿病均有治疗作用, 且疗效具有剂量依赖性^[4~7], 其疗效远远大于无机铬^[8]。

1 实验材料

1.1 胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物(CPCC): (本实验室自行制备)

取新鲜猪皮除毛、洗净, 用氯仿脱脂 2 h, 洗净, -60 °C 冷冻, 用切片机制成薄片, 取切细猪皮与盐酸按 1:1 质量体积比混合, 置于 85 °C 水浴中加热 3 h, 其间不断搅拌并一直保持 pH=2 的条件下水解, 得到胶原蛋白消化液。将猪皮胶原蛋白消化液与 CrCl₃·6H₂O 反应, 50~60 °C 预热, 喷雾干燥后制得胶原蛋白多肽-铬

(III) 螯合物^[9]。

1.2 四氧嘧啶

购自 Sigma 公司。

1.3 昆明种小鼠, 雌, 以及豚鼠均由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供。

1.4 主要仪器

XSZ-H 型生物显微镜(重庆光电仪器总公司); LD4-40 台式离心机(北京医用离心机厂); 酶标仪(Bio-Rad)等等。

2 实验方法

2.1 实验动物分组及处理

将 30 只小鼠(25±2) g, 雌, 按体重分成 3 组, 分别为正常组, 四氧嘧啶对照组, CPCC 给药组。将 CPCC 溶于蒸馏水, 按铬剂量为 40 μg/kg·d 灌胃给药, 每天 1 次, 正常组和对照组均予相同体积的蒸馏水灌胃。将各组小鼠按所需的受试物和剂量灌胃 28 d 后, 禁食 16 h, 再以 200 mg/kg·bw 的剂量给对照组和给药组腹腔注射四氧嘧啶, 给正常组小鼠腹腔注射等体积的生理盐水, 1 h 后恢复正常饮食和给受试物, 3 d 后

收稿日期: 2007-11-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(20776113)

作者简介: 刘安军(1963-), 男, 教授, 研究方向: 食品科学

尾静脉取血测定空腹血糖, 血糖值大于 11.1 mmol/L 者造模成功, 处死各组小鼠进行实验。

2.2 腹腔巨噬细胞吞噬功能实验

2.2.1 吞噬羊红细胞^[9]

实验前 4~6 d, 将已灭菌的 3% 淀粉溶液 1 mL 注射于小白鼠腹腔, 4~6 d 后, 注射 1% 羊红细胞悬液 1 mL 于小白鼠腹腔内, 20~30 min 后, 无菌吸出腹腔液, 离心洗涤 2 次, 用 Hanks 液 (或生理盐水) 调节腹腔液细胞浓度至 1.0×10^6 cfu/mL, 于载玻片上制成推片, 自然干燥, 甲醇固定 10 min, 姬姆萨染液染色 6~10 min 后, 蒸馏水冲洗, 自然干燥或用吹风机吹干后镜检。计算吞噬百分比, 即每 100 个吞噬细胞中吞噬有羊红细胞的吞噬细胞数。

2.2.2 吞噬中性红^[10]

无菌抽取腹腔液, 离心洗涤 2 次, 用含小牛血清 RPMI1640 培养液调整巨噬细胞数为 1.0×10^6 cfu/mL, 吸取 100 μ L 细胞悬液加至 96 孔细胞培养板中, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育培养 2 h 后 (富集巨噬细胞), 去除培养液, 加入 0.072% 中性红溶液, 100 μ L/孔, 60 min 后弃去孔内中性红, 用预温的 37 $^{\circ}$ C 生理盐水充分洗涤 2 次, 加入细胞溶解液 (无水乙醇:0.1 mol/L 冰醋酸, 比例 1:1) 200 μ L, 室温混匀 30 min, 酶标仪检测波长为 570 nm 处的吸光值。

2.3 抗体形成细胞的测定^[11]

本法用体外 B 细胞分泌的抗体裂解红细胞所释放的血红蛋白量 (A 值) 表示, 其结果可反映机体体液免疫功能。造模第 4 d 分别将 5% 的绵羊红细胞 0.2 mL 注入各组小鼠腹腔内, 6 d 后眼球放血, 颈椎脱臼处死小鼠, 常规取脾脏, 然后进行脾细胞计数。调细胞浓度至 1.0×10^9 cfu/mL, 取脾细胞 1 mL、1:10 新鲜豚鼠血清 (补体) 1 mL 和 0.2% 绵羊红细胞 (SRBC) 1 mL 混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 1500 r/min 离心 10 min, 以上清液于全自动酶标仪 450 nm 波长处测 A 值。

2.4 E 花环形成实验^[12]

取 0.1 mL 淋巴细胞悬液 (约含细胞 1.0×10^5 cfu/mL ~ 2.0×10^5 cfu/mL) 加 0.1 mL 1% SRBC 悬液 (约含细胞 2×10^7 cfu/mL), 混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 低速 (500 r/min) 离心 5 min, 然后置 4 $^{\circ}$ C 冰箱 2 h 或过夜。取出试管, 吸去部分上清液, 轻轻使沉淀的细胞重悬浮, 沿管壁缓慢滴加 0.8% 戊二醛 0.2 mL, 置 4 $^{\circ}$ C 固定 20~30 min。取细胞悬液涂片, 自然干燥, 用瑞士一姬姆萨染液染 10 min, 水洗, 干燥后高倍镜或油镜观察

计数。

E 花环形成率 (%) = 形成花环细胞数 / (形成花环细胞数 + 未形成花环细胞数) \times 100%

3 结果和讨论

3.1 小鼠免疫器官解剖图

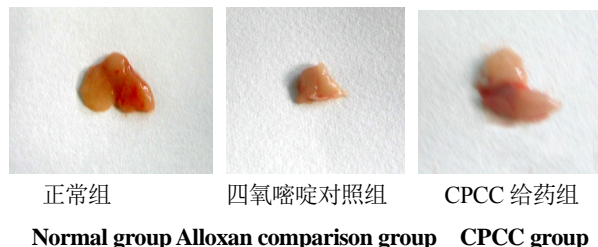


图 1 小鼠胸腺解剖图

Fig.1 Mouse chest gland dissection chart



图 2 小鼠脾脏解剖图

Fig.2 Mouse spleen dissection chart

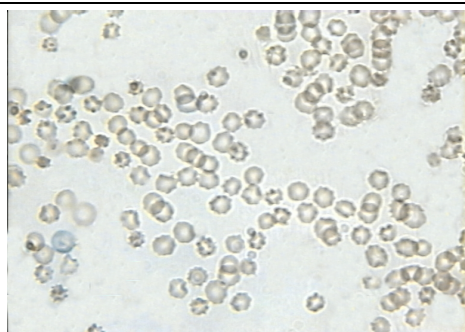
如图 1 所示, 正常组胸腺左右两叶片分界清晰。四氧嘧啶对照组明显萎缩, 叶片粘连, 分界不清晰, 发白, 无血色。说明四氧嘧啶对胸腺造成了一定的损伤。而 CPCC 给药组, 损伤明显减轻, 外观形态好转, 基本分清左右两叶片, 可见毛细血管。表明胶原蛋白多肽-铬 (III) 螯合物对小鼠胸腺具有一定的保护作用。

如图 2 所示, 正常组小鼠脾脏表面平整光滑, 色泽亮呈鲜红色、质软, 毛细血管清晰。四氧嘧啶对照组小鼠脾脏明显肿大, 色泽暗淡且发黑红色, 毛细血管模糊, 几乎不可见。说明四氧嘧啶对脾脏造成了一定的损伤。CPCC 给药组小鼠脾脏肿大现象好转, 特别是色泽明显比模型组鲜红, 接近正常组, 可见毛细血管。表明胶原蛋白多肽-铬 (III) 螯合物对小鼠脾脏具有一定的保护作用。

综上, 胶原蛋白多肽-铬 (III) 螯合物对小鼠免疫器官具有一定的保护作用。

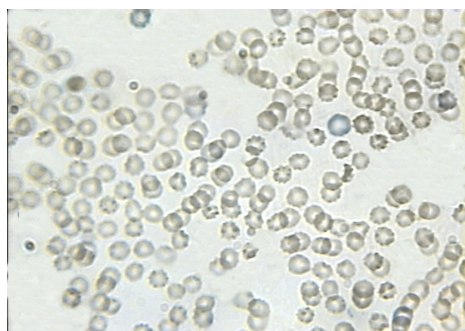
3.2 胶原蛋白多肽-铬 (III) 螯合物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

3.2.1 对吞噬羊红细胞的影响



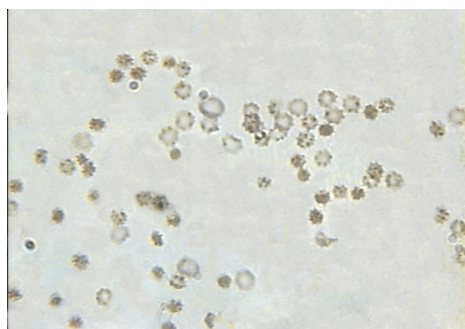
正常组

Normal group



四氧嘧啶对照组

Alloxan comparison group



CPCC 给药组

CPCC group

图3 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬羊红细胞油镜图

Fig.3 Abdominal cavity macrophage swallows the sheep red blood cell by oil lens

如图3所示,有伪足,马蹄状单核,即为腹腔巨噬细胞,无核,细胞形体大的为羊红细胞。四氧嘧啶对照组红细胞较多,巨噬细胞少;而CPCC给药组,有大量的巨噬细胞,仅有少量的红细胞,巨噬细胞吞噬了较多的红细胞。表明胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物增强了小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力。

如图4所示,正常组吞噬率为26.71%±3.19%;四氧嘧啶对照组的吞噬率减小至15.88%±2.40%;CPCC给药组的吞噬率较四氧嘧啶对照组有明显的回升,为29.58±2.33,有显著性差异($p<0.01$)。表明胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物能增强巨噬细胞吞噬羊红细胞的

能力。

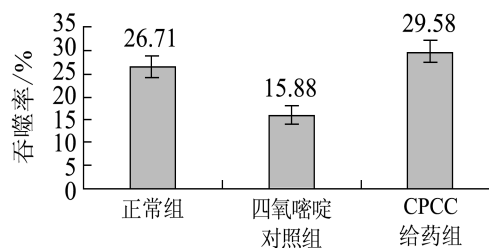


图4 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬羊红细胞吞噬率(n=10, x±s)

Fig.4 Swallowing rate of abdominal cavity macrophage swallows sheep red blood cell (n=10, x±s)

3.2.2 对吞噬中性红的影响

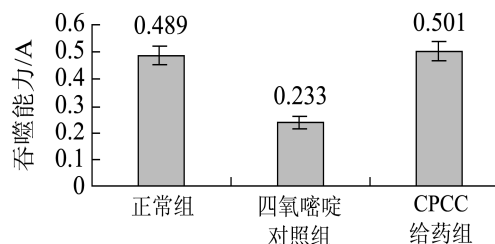


图5 腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力(A)值(n=10, x±s)

Fig.5 The ability of abdominal cavity macrophage swallows neutral red (A) (n=10, x±s)

如图5所示,四氧嘧啶对照组A值为0.233±0.030,与正常组A值0.489±0.039相比明显降低,有显著差异($p<0.01$);CPCC给药组A值0.501±0.045较四氧嘧啶对照组明显回升,有显著差异($p<0.01$)。表明胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物能增强巨噬细胞吞噬中性红的能力。

3.3 胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物对抗体形成细胞数的影响

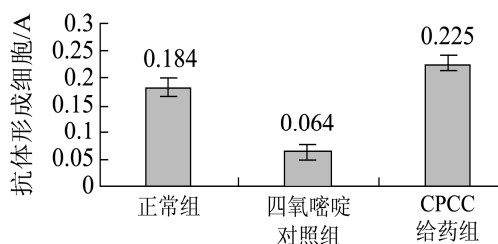
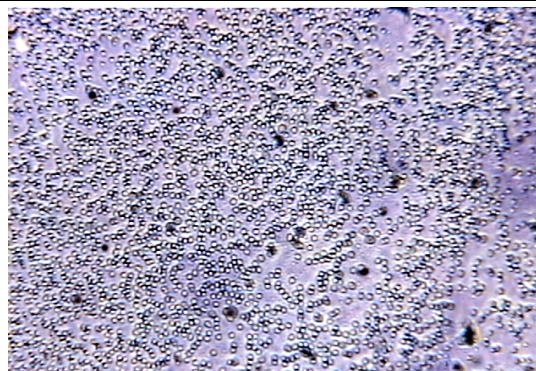


图6 抗体形成细胞(A)值(n=10, x±s)

Fig.6 Antibody-forming cell (A) (n=10, x±s)

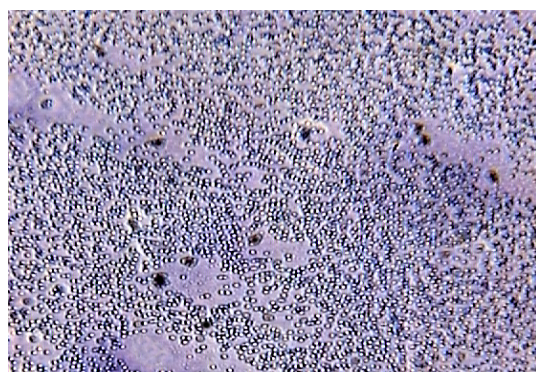
如图6所示,四氧嘧啶对照组A值为0.064±0.011,与正常组A值0.184±0.021相比明显降低,有显著差异($p<0.01$);CPCC给药组A值0.225±0.017较四氧嘧啶对照组明显回升,有显著差异($p<0.01$)。表明胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物能增加抗体形成细胞数。

3.4 胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物对E花环形成率的影响



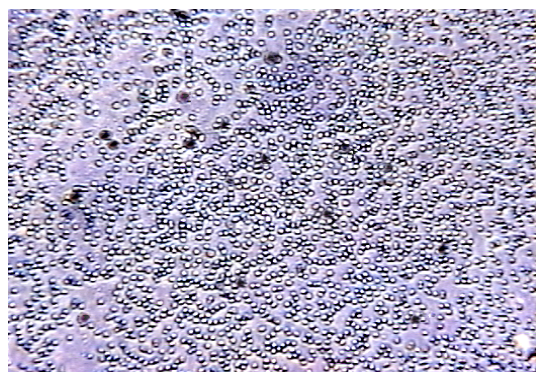
正常组

Normal group



四氧嘧啶对照组

Alloxan comparison group



CPCC 给药组

CPCC group

图 7 E 花环形成油镜图

Fig.7 E-rosette by oil lens

如图 7 所示, 被染成蓝紫色的颜色较深的细胞即为淋巴细胞, 不着色的为羊红细胞。从图中可以看出, 四氧嘧啶对照组的淋巴细胞数量较少, 而且形成花环的数量不多; CPCC 给药组淋巴细胞增多, 所形成的花环数也相应的增多, 接近正常组。说明胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物能使 E 花环形成数量增加。

如图 8 所示, 四氧嘧啶对照组的 E 花环形成率为 24.55%±3.55%, 与正常组 41.41%±3.89%相比明显下降, 有显著的差异 ($p<0.01$); 给药组 E 花环形成率为

36.44%±2.76%有明显的回升, 较四氧嘧啶对照组有显著差异 ($p<0.01$), 接近正常组。表明, 胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物能提高 E 花环形成率。

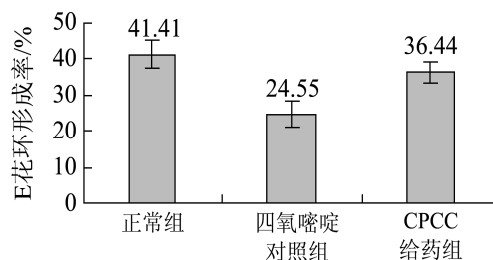


图 8 E 花环形成率 (n=10, x±s)

Fig.8 E-rosette concentration (n=10, x±s)

3.5 讨论

本实验室已经证实胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物能够降低小鼠血糖^[13], 与此同时, 在用四氧嘧啶造糖尿病模型时, 发现四氧嘧啶对小鼠的免疫器官有一定的损伤。由此, 本实验就这一现象, 探讨胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物的免疫调节功能。

从脾脏、胸腺等免疫器官的外观上直接看出胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物有明显的保护免疫器官的效果。在高等生物中, 单核吞噬细胞系统和嗜中性粒细胞专司吞噬功能, 在细胞的非特异免疫功能中发挥重要作用。单核吞噬细胞系统包括血液中的单核细胞和组织中固定和游走的巨噬细胞。而胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物能提高腹腔巨噬细胞的吞噬能力。B 细胞是抗体形成细胞前体, 在胞膜表面具有以单一特异性抗体作为抗原受体, 一旦与抗原结合就直接或借助 T 细胞进行增殖分化, 结果成为高速度合成和分泌具有与受体同样特异性抗体的细胞, 即抗体形成细胞。胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物能增加抗体形成细胞数量, 间接反映了其能增加 B 细胞的数量, 增强 B 细胞的免疫功能。T 淋巴细胞表面具有绵羊红细胞(SRBC)受体, 称为 E 受体 (CD2 分子), 是 T 细胞表面标志之一。胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物能增加 E 花环形成数量, 说明其能增加 T 细胞的数量, 增强 T 细胞的免疫功能。

4 结论

胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物能有效的保护免疫器官并调节其功能, 通过提高和改善免疫细胞的免疫功能, 提高机体的免疫力, 一定程度地消除四氧嘧啶对机体的损伤。作为一种功能性食品, 胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物具有良好的开发前景。

(下转第 408 页)