

胡萝卜素降解物诱导小鼠肝癌细胞 H₂₂ 产生免疫活性的研究

刘安军, 张倩云, 郑国强, 董慧, 方菁菁, 滕安国, 郑捷, 王稳航
(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 本文研究了以胡萝卜素降解物作为免疫诱导剂的 H₂₂ 全细胞免疫物对小鼠 H₂₂ 肝癌的抑制作用, 通过用胡萝卜素降解物与 H₂₂ 细胞共培养后对小鼠进行免疫, 同时设立模型组和空白组, 试验期间, 测定小鼠生长曲线、脏器指数、抑瘤率、巨噬细胞吞噬能力、NK 细胞杀伤活性、免疫器官 HE 染色等。结果表明: 胡萝卜素降解物对小鼠没有毒性作用, 免疫组小鼠抑瘤率为 93%、巨噬细胞吞噬指数和廓清指数分别为 5.42±0.19、0.39±0.002, NK 细胞杀伤活性为 0.93, 总体各个指标均与模型组小鼠呈显著性差异, 说明 H₂₂ 全细胞免疫物能够增强小鼠的免疫能力, 有效保护免疫器官。

关键词: 胡萝卜素降解物; 免疫诱导剂; 免疫能力

文章编号: 1673-9078(2012)5-483-485

Immune-activation Effects of Carotene Degradants on H₂₂ Tumor Cells

LIU An-jun, ZHANG Qian-yun, ZHENG Guo-qiang, DONG Hui
FANG Jing-jing, TENG An-guo, ZHEN Jie, WANG Wen-hang

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

Abstract: The effects of H₂₂ cells vaccine treated with carotene degradants as immunoadjuvant on the mice were studied in this paper. By immunising the mice with the coculture of H₂₂ cells and carotene degradants, setting the model and the control, it was found that the carotene degradants had no toxic effects on the mice and the cancer inhibition rate of immune mice was 93%. Carbon particle clearance and the phagocytosis index of macrophages were 0.39±0.002 and 5.42±0.19, respectively. Cytotoxicity of NK cells was 0.93. All of the parameters had significant difference compared with those of the model. The research proved that H₂₂ cells vaccine treated with carotene degradants can effectively protect immune organs.

Key words: carotene degradants; immunoadjuvant; immunopotency

类胡萝卜素广泛分布于大自然中, 其主要功能是对单线态氧的有效淬灭, 能消除羟自由基, 是脂类过氧化反应的断链抗氧化剂, 在细胞和细胞膜中能与脂类结合而有效抑制脂质的氧化, 对于人体疾病的预防, 发挥着重要作用^[1]。类胡萝卜素的性质十分活泼, 对空气、热、光等非常敏感, 很容易被氧化和异构化, 但胡萝卜素降解是一个非常复杂的过程, 许多中间产物在生成的同时又马上与其他物质发生反应, 所以目前国内外对于胡萝卜素降解物的研究还不透彻^[2], 本文研究了胡萝卜素降解物作为免疫诱导物与 H₂₂ 小鼠肝癌细胞共培养后免疫小鼠后的抑瘤效果, 此方法抑瘤效率高、安全无毒, 不仅为治疗肝癌提供了方法和依据也为胡

收稿日期: 2011-10-12

项目基金: 国家自然科学基金 (31000755); 科技部科技型中小企业技术创新基金 (10C26211200196)

作者简介: 刘安军 (1963-) 男, 教授, 博士生导师, 主要从事水产品、畜产(副产)品高附加值的开发利用及功能性食品研究等

萝卜素降解物的研究开辟了新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

肿瘤细胞株, 小鼠肝癌细胞株 H₂₂ 购自天津医科大学; 胡萝卜素降解物为本实验室研制; 实验动物 50 只 20±2 g BALB/c 小鼠, 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。

1.1.2 试剂

HyQ®改良型 RPMI1640 培养基, 购自海克隆生物化学制品(北京)有限公司; 优级新生牛血清, 购自中美合资兰州民海生物工程有限公司; 印度墨汁, 购自上海沪宇生物科技有限公司; MTT(BR), 上海源叶生物科技有限公司。

1.1.3 仪器

ESJ205-4 型电子天平(沈阳龙腾电子称量仪器有

有限公司); 2123TC 水套式 CO₂ 培养箱 (美国 Shellab); B600B 型医用低速离心机 (白洋离心机厂); 酶标仪 (Thermo Electron U.S.A); SP-2102 UV 型紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司)。

1.2 免疫物制备

在 1 mL 含 10% 已灭活胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 接种 4×10⁷ 个 H₂₂ 细胞, 加入 200 μg/mL 浓度的胡萝卜素降解物共培养 72 h 后, 离心(1000 r/min, 5 min)弃上清, 悬浮于 1 mL 生理盐水中, 随后用液氮反复冻融 6 次, 制备成所需免疫物^[3]。

1.3 H₂₂ 系小鼠免疫模型的建立

将 30 只小鼠随机分成 3 组, 即空白组、模型组、免疫组, 每组 10 只小鼠。免疫组给予每只小鼠 0.2 mL 按 1.2 方法制备的免疫物, 模型组每只给予 0.2 mL 的生理盐水, 背部皮下注射, 每周一次, 共免疫四次^[4]。在最后一次免疫完 7 d 后, 给模型组和免疫组分别腋下接种处于对数期生长期的 H₂₂ 细胞, 2×10⁶ 个细胞/只^[5]。

1.4 测定指标

1.4.1 免疫小鼠存活情况

各组小鼠自免疫开始, 测量其体重变化。

1.4.2 免疫小鼠体指数

试验结束后, 最后一次称量小鼠体重, 随后眼球取血处死各组小鼠, 解剖并取出脾、胸腺, 计算脾指数、胸腺指数^[6], 小心完整地分割小鼠的实体瘤, 称重并计算抑瘤率。

$$\text{脾指数} = \frac{\text{脾脏重 (mg)}}{\text{体重 (g)}}$$

$$\text{胸腺指数} = \frac{\text{胸腺重 (mg)}}{\text{体重 (g)}}$$

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{模型组平均瘤重 (g)} - \text{免疫组平均瘤重 (g)}}{\text{模型组平均瘤重 (g)}}$$

1.5 NK 细胞杀伤活性的检测

取实验小鼠 9 只, 分三组, 每组三只, 分空白、模型、免疫 3 个组, 按上述方法免疫造模后, 断颈处死小鼠, 无菌条件下取出各组小鼠的脾脏, 剪成小块, 然后将脾组织放入 200 目的不锈钢细胞筛网中, 研磨。研磨过程中用生理盐水将单细胞洗入无菌培养皿中形成细胞悬液, 用注射器将细胞悬液吸入离心管中, 洗涤 2 遍, 去除红细胞, 然后用 10% FCS-RPMI-1640 培养液将细胞浓度调至 2×10⁶ 个/mL; 同时将传代良好的 H₂₂ 细胞数调至 1×10⁵ 个/mL。往 96 孔板中加 H₂₂ 细胞和效应细胞, 将效靶比调整为 50:1, 对照孔加同量的效应细胞或靶细胞, 用培养液将总体积调至 200 μL, 每孔内加 MTT (5 mg/mL) 10 μL, 37 °C, 5% CO₂

孵育箱内培养 4 h, 离心(1500 r/min, 15 min)弃上清。在每孔内加入二甲基亚砷 150 μL, 溶解 MTT 还原产物, 微型振荡 5 min, 酶标仪测定各管 OD_{570nm} 值, 求出各组平均值的杀伤百分率(%)表示 NK 细胞活性^[7]。

$$\text{NK 细胞杀伤百分率} = \frac{(\text{靶细胞} + \text{效应细胞})\overline{D}_{570} - \text{效应细胞}\overline{D}_{570}}{\text{靶细胞}\overline{D}_{570} - \text{空白调零孔}\overline{D}_{570}} \times 100\%$$

1.6 巨噬细胞吞噬能力检测^[8]

根据 1.3 的方法将小鼠免疫后, 按 0.01 mL/g 的量, 从尾部静脉注入印度墨汁, 并且分别在 2 min, 10 min 时取血 20 μL 加入 0.1% Na₂CO₃ 溶液中。600 nm 检测, 用 0.1% Na₂CO₃ 溶液校正零点。

$$\text{碳廓清指数} K = \frac{\lg A_1 - \lg A_2}{t_2 - t_1}$$

注: A 为吸光度值, 1、2 分别对应 2 min, 10 min。

$$\text{吞噬指数} a = \frac{K^{\frac{1}{3}} \times \text{体重}}{(\text{肝重} + \text{脾重})}$$

1.7 组织的 HE 染色

将建模试验之后小鼠的脾和胸腺取出切成 2 mm 左右的块状, 固定, 石蜡包埋, 切片, 用 HE 染色, 中性树脂封片, 待片干后拿到尼康显微镜下拍照, 观察组织结构的变化^[9]。

1.8 统计分析

统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计分析。

2 结果

2.1 免疫小鼠生长情况

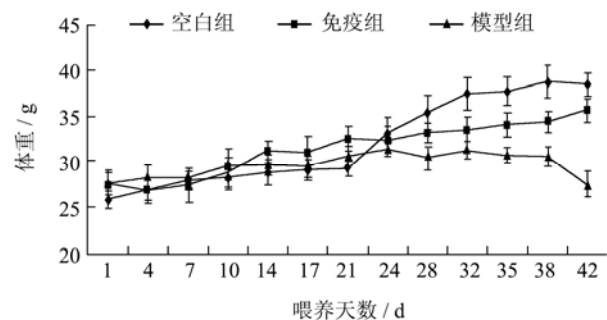


图 1 各实验组小鼠体重变化图

Fig.1 Time course of the body weight of the mice in different groups

从图 1 可以看出, 免疫及空白组的小鼠体重变化趋于一致, 模型组小鼠前阶段与前两组的变化趋势一致, 在腋下接种 H₂₂ 小鼠肝癌细胞后, 由于小鼠身体成病态, 瘤不断长大, 使得小鼠日渐消瘦, 随着瘤体的长大小鼠体重反而成下降趋势。

2.2 试验小鼠免疫指标测定结果

表 1 胸腺指数和脾指数

Table 1 Splenic index and thymus index of the mice in different groups

| 组别 | 胸腺指数 | 脾指数 |
|-----|-------------|-------------|
| 空白组 | 2.66±0.12** | 4.60±0.30** |
| 模型组 | 1.96±0.80 | 8.02±0.43 |
| 免疫组 | 3.06±0.99** | 5.54±0.49** |

注：与模型组相比，*p<0.01，显著性差异，**p<0.01，极显著。

免疫器官的脏器指数是衡量小鼠机体免疫功能的初步观察指标，而胸腺和脾脏分别是重要的中枢免疫器官和外周免疫器官。根据表 1 的结果，免疫组、模型组分别与空白组比较，模型组胸腺严重萎缩而脾脏却大幅肿大，有极显著性差异；免疫组的胸腺指数及脾指数与空白组基本一致，没有显著性差异，说明以胡萝卜素降解物为免疫诱导剂的全细胞免疫物可以在一定程度上保护小鼠的免疫器官。

2.3 免疫物对小鼠巨噬细胞吞噬能力的影响

表 2 巨噬细胞吞噬能力

Table 2 The result of carbon expurgation

| 组别 | 廓清指数(K) | 吞噬指数(a) |
|-----|--------------|------------|
| 免疫组 | 0.39±0.002** | 5.42±0.19* |
| 模型组 | 0.22±0.000 | 4.33±0.06 |
| 空白组 | 0.39±0.047** | 5.62±0.26* |

注：与模型组相比，*p<0.01，显著性差异，**p<0.01，极显著。

单核巨噬细胞系统（网状内皮系统，RES）是机体最重要的防御系统，它具有强大而迅速吞噬廓清异物颗粒或某些可溶性异物的能力，并能迅速清除体内自身产生的某些有害物质。当在尾部静脉注入特定大小的惰性碳之后，它即可被肝脾内的巨噬细胞及机体单核巨噬细胞系统的其他巨噬细胞迅速吞噬从而从血液中廓清，从表 2 可以看出，模型组，免疫组，空白组两两之间的廓清指数和吞噬指数皆有显著性差异，且可以得知模型组的吞噬能力和廓清能力较低，免疫组和空白组的免疫能力较强，由此也可以推出，此免疫物在一定程度上恢复了巨噬细胞的吞噬能力。

2.4 免疫物对小鼠 NK 细胞活性的影响

表 3 NK 细胞杀伤活性检测和抑瘤率

Table 3 Cytotoxicity of NK cells and rate of inhibition

| 组别 | NK 细胞活性 | 抑瘤率 |
|-----|---------|------|
| 空白组 | 0.74 | - |
| 模型组 | 0.24 | 0 |
| 免疫组 | 0.93 | 0.93 |

NK 细胞是固有免疫的重要组成细胞，是一种天

然杀伤细胞，NK 细胞与靶细胞的反应是建立在 NK 细胞表面受体和靶细胞表面配体相互识别的基础上，这些受体和配体分子有生殖细胞遗传编码，直接表达在细胞表面或受应激后被诱导表达，NK 细胞表面有两种性质不同的信号，一种是抑制性受体，一种是激发性受体，从表中可以看出，免疫组的 NK 细胞杀伤活性高，模型组的低，说明此疫苗能有效激发 NK 细胞活性，从而增强小鼠的免疫功能。

2.5 组织的 HE 染色

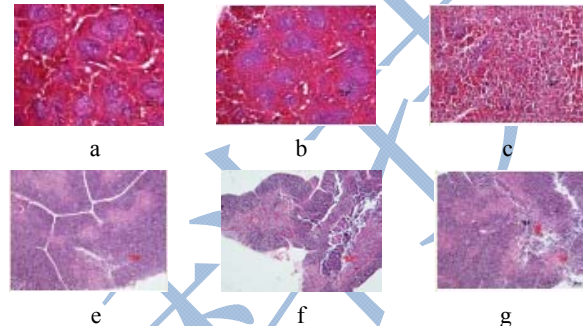


图 2 免疫组织 HE 染色 (×40)

Fig.2 HE staining of spleen and thymus

注：a: control spleen; b: immune spleen; c: model spleen; e: control thymus; f: immune thymus; g: model thymus.

从图 2 可以看出，免疫组与空白组小鼠的脾和胸腺细胞排列紧密，有规则，染色边界清晰，而模型组小鼠的脾组织 HE 染色图片疏松，杂乱无章，胸腺细胞排列无规则，中间髓质部分萎缩，免疫组的髓质明显增大。

3 讨论

3.1 目前由于对于胡萝卜素降解物的成分尚未探讨清楚^[10]，所以本试验采取了与以往相反的试验流程，先验证了以胡萝卜素降解物作为诱导剂的全细胞免疫物的免疫作用，而胡萝卜素降解物与细胞共培养后对细胞有什么影响，以及共培养物给机体免疫之后，在机体内部，是如何激发和促进免疫分子的抗肿瘤能力，都还得需要进一步研究。

3.2 模型组的小鼠，因为肿瘤的侵袭，胸腺受攻击而萎缩，但是脾却比空白组的大，颜色要亮，切片中的模型组脾疏松无规则，我们初步猜想其可能是因为脾水肿，但具体原因还有待更进一步深究。

3.3 NK 细胞杀伤活性的检测很多文献当中都是采用 K562 细胞，在本文中却采用 H₂₂，因为考虑到模型组小鼠原本接种的瘤细胞是 H₂₂，在测 NK 细胞活性的时候同样采用 H₂₂ 应更加具有对比意义。

免疫组的脾指数、胸腺指数、巨噬细胞吞噬能力、NK 细胞的杀伤活性等都明显优于模型组，有的甚至

优于空白组,说明这种免疫佐剂对小鼠的免疫功能确实有增强的作用,并且从生长曲线不难得出,此物质对小鼠基本没毒性,不影响小鼠的正常生长。

参考文献

- [1] 王娟娟,马爱国,韩磊. β -胡萝卜素对大鼠急性放射性损伤的保护作用[J].青岛大学学院学报,2009,45(5):416-418
- [2] Zepkal L Q, Borsarelli C D, Azevedo M A, et al. Thermal degradation kinetics of carotenoids in a cashew apple juice model and its impact on the system color [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(17): 7841-7845
- [3] 韩雪,刘安军,赵喜花,等.猪软骨多糖作为免疫佐剂的肝癌疫苗激发抗肿瘤细胞免疫[J].现代食品科技,2009,25(7): 722-724
- [4] 刘安军,马姗姗,郑国强,等.乳腺癌疫苗对荷瘤小鼠的免疫保护作用[J].免疫学杂志,2010,26(11):938-941
- [5] Liu A J, Han X, Zhang G R, et al. Effects of Cartilage Polysaccharide on Apoptosis and Immune of Human Hepatoma BEL-7402 cells and Murine H22 Hepatocarcinoma [J]. International Journal of Food Science and Nutrition, 2009, 60(s6): 47-58
- [6] 刘安军,赵喜花,张国蓉,等.软骨多糖与灭活 S180 对荷瘤小鼠的免疫保护作用研究[J].现代食品科技,2008,24(11): 1087-1089
- [7] 王秀菊,尹松梅,马丽萍,等.NK细胞对骨髓瘤RPMI 8226细胞的体外杀伤活性[J].实用医学杂志,2010,26(19):3469-3471
- [8] 富校轶,姚磊,李佳栋,等.大豆乳清蛋白抗肿瘤作用研究[J].食品工业科技,2010,4:339-341
- [9] 陈宣世,刘俊才,陈勇,等.HE染色两次分化法在病理制片技术中的应用与探索[J].重庆医学,2010,39(22):3109-3110