

牡蛎活性肽的分离及其免疫抑制作用的实验研究

李超柱¹, 陈艳华², 陈艳辉¹, 张艳秋¹, 方怀义¹

(1. 钦州学院, 广西 钦州 535000; 2. 广西医科大学 附属肿瘤医院, 广西 南宁 530021)

摘要: 采用动物蛋白酶对牡蛎蛋白质进行酶解, 获得牡蛎活性肽, 将分子质量小于 3 kD 的活性肽分别采用 MTT 法、体外抑制小鼠脾淋巴细胞增殖试验和小鼠体外脾混合淋巴细胞增殖活性实验, 并通过 ELISA 法检测牡蛎活性肽作用后小鼠脾脏淋巴细胞上清中分泌的细胞因子 IL-2、IFN- γ 的变化。试验结果表明, 牡蛎活性肽对小鼠脾淋巴细胞增殖具有一定的免疫抑制作用, 经牡蛎活性肽作用后的小鼠脾脏淋巴细胞上清中细胞因子 IL-2、IFN- γ 分泌减少。

关键词: 牡蛎活性肽; 免疫抑制作用; 淋巴细胞增殖

中图分类号: Q514⁺.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)04-0052-05

牡蛎(Oyster)俗称大蚝、蛎黄、蛎子、海蛎等, 不仅是一种肉嫩、味鲜营养价值极高的海产食品, 也是一种很有药用价值的海洋生物, 近些年来受到了国内外学者的重视。不少学者报道了牡蛎提取物具有抗肿瘤作用、抗氧化、对肿瘤细胞的放射增敏、清除氧自由基以及对动物机体的免疫调节作用等^[1-7], 但对于牡蛎活性肽是否具有免疫调节作用, 尤其是免疫抑制作用仍鲜见报道。

蛋白质是一类最重要的大分子物质, 具有重要的生理功能, 天然蛋白质不完全水解产生的长短不一的一些肽段称为小分子多肽, 小分子多肽中具有生物活性的肽称为活性肽。生物来源于海洋的活性物质由于特殊生长环境, 因而具有许多独特的性质, 如结构特异、活性强、含量低微、毒副作用小等特点^[8-9]。本研究利用动物蛋白水解酶水解牡蛎肉, 并对最佳水解产物进行柱层析和超滤分离获得一种低分子质量(约为 3 kD)活性肽, 并以小鼠脾淋巴细胞为实验模型, 通过淋巴细胞增殖实验和混合淋巴细胞实验, 从细胞、分子水平研究牡蛎活性肽对小鼠脾淋巴细胞的免疫抑制活性及作用机制。

1 材料、试剂与仪器

1.1 材料、试剂

新鲜牡蛎, 采自广西北部湾茅尾海海域, 去壳、清洗并匀浆, 置-20℃储存备用, 动物蛋白酶购自广西庞博生物有限公司(≥ 200 u/mg)。

SPF 级 BALB/c 小鼠和昆明小鼠由广西医科大学实验动物中心提供, 雄性, 体重 22~24 g, 周龄

6~8 周。

RPMI 1640 培养基(赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司); 小牛血清(杭州四季青生物材料研究所); 磷酸盐缓冲液(PBS); 淋巴细胞分离液; 丝裂霉素(惠州鸿雨科技有限公司); MTT(sigma 公司); 刀豆蛋白 A(ConA)(Sigma 公司, 用双蒸水配成 2mg/mL 的溶液, 过滤除菌)。

1.2 主要仪器

低速离心机(北京医用离心机厂); 低温孔板离心机(sigma 公司); CO₂ 培养箱(Thermo 公司), 酶联免疫检测仪(Thermo(上海)仪器有限公司); 倒置光学显微镜(Nikon 中国有限公司); 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

2 方法

2.1 牡蛎蛋白活性肽的制备

原料蛋白—预处理—选择最佳酶解条件水解—高温灭酶—活性炭脱苦味去色—柱层析—超滤膜分离—冷冻干燥—组成与结构鉴定^[10]。

将水解产物分子质量小于 3 kD 的活性肽配置成 250、125、62.5、31.6、15.6、7.8 mg/L 的浓度梯度。

收稿日期: 2012-04-08; 修回日期: 2012-07-29

基金项目: 广西自然科学基金资助(2010GXNSFA013062); 广西教育厅面上项目资助(200911MS241)

作者简介: 李超柱(1962-), 男, 广西贵港人, 教授, 主要从事天然产物化学研究, E-mail: lcz1657@13.com. 陈艳辉, 通信作者, E-mail: cyh8187@163.com

2.2 小鼠淋巴细胞增殖实验

小鼠脾淋巴细胞悬液的制备及原代培养方法, 颈椎脱臼处死 BALB/c 小鼠 75%酒精消毒小鼠皮肤, 着重腹部消毒, 取出脾脏, 置有 PBS 缓冲液培养皿中撕脾, 经 200 目滤网过滤, 制备脾淋巴细胞悬液(冰上进行), 离心(2 000 r/min, 5 min), 弃上清液, 将脾细胞悬液体积按 1 : 1 的比例加入预装有等量淋巴细胞分离液的离心管中, 离心 30 min(2 000 r/min)。离心完毕吸取界面层单个核细胞(白细胞层), 再次用 PBS 缓冲液冲洗离心 5 min(500 r/min), 弃上清液, 用含 10%FCS 的 PRMI-1640 培养基重悬细胞, 调整细胞浓度至 1×10^6 个/mL。

将细胞调好浓度后, 加入 96 孔板, 每孔 100 μ L, 用含 10%胎牛血清的 PRMI-1640 培养基将 ConA 浓度配制为 20 mg/L(终浓度为 10 mg/L), 加入干预活性肽的终浓度分别为 250、125、62.5、31.6、15.6、7.8 mg/L, 每孔 100 μ L; 每组平行做 3 个复孔, 并设淋巴细胞+ConA 空白对照 3 个复孔。

96 孔板置于 CO₂ 培养箱培养 48 h, 加入 5 g/LMTT, 每孔 20 μ L。4 h 后低温孔板离心机(3 000 r/min, 4℃)离心, 10 min; 弃上清液, 加 0.4 mol/L 的盐酸化异丙醇, 每孔 100 μ L; 待结晶物溶解后, 用酶标仪于 492nm 处测定吸光度。

2.3 混合淋巴细胞实验

取 BALB/c 鼠脾淋巴细胞悬液称为反应细胞(A)。取适量 50 mg/L 丝裂霉素加入昆明鼠脾淋巴细胞悬液内至终浓度 25 mg/L, 37℃保温 30 min, PBS 液洗两遍, 用含小牛血清 10%的 RPMI-1640 悬液细胞, 计数, 配成一定浓度细胞, 称为丝裂霉素处理的刺激细胞(B)。将上述制备好的两种淋巴细胞按 1 : 1 的体积加入培养皿混合加 96 孔板, 对照组为 100 μ L 培养基+100 μ L 混合脾淋巴细胞, 加药组为 100 μ L

不同浓度的干预活性肽 + 100 μ L 混和脾淋巴细胞。在 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 48 h, 于培养结束前 4 h 加入 5 g/L MTT, 每孔 20 μ L, 培养结束显微镜下观察其 MTT 结晶情况。然后用低温孔板离心机(3000 r/min, 4℃)离心, 10 min; 弃上清, 加 0.4 mol/L 的盐酸化异丙醇, 每孔 100 μ L; 待结晶物溶解后, 用酶标仪于 492 nm 处测定吸光度。

2.4 ELISA 方法对体外培养的细胞进行细胞因子产生能力检测

刀豆蛋白(ConA)激活的小鼠脾脏淋巴细胞, 经过活性肽作用后, 以 ELISA 方法检测细胞培养上清液中细胞因子所分泌的细胞因子 IL-2 和 IFN- γ 的变化。首先, 原代培养小鼠脾淋巴细胞, 调节细胞悬液(2×10^6 个/mL)。加入 24 孔培养板中, 1 mL/孔, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 4 h, 加入 0.5 mL ConA(终浓度 5 mg/L)以及不同浓度的牡蛎活性肽, 牡蛎活性肽的浓度分别为低剂量 15.6 mg/L, 中剂量 62.5 mg/L, 高剂量 125 mg/L 各 0.5 mL, 置 37℃, 5%CO₂ 培养 48 h, 收集上清, -20℃保存待测。随后进行 IL-2 和 IFN- γ 的 ELISA 检测。

2.5 统计分析方法

采用 SPSS17.0 统计软件包中多个样本率比较的方法进行统计学分析, 计量数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与讨论

3.1 对小鼠脾淋巴细胞增殖和混合淋巴细胞生长的影响

从表 1 可以看出, 牡蛎活性肽对小鼠脾淋巴细胞的生长抑制率出现明显的量效关系, 即在一定浓度范围内, 随着浓度的升高, 抑制率增大。其 IC₅₀ 为 125 mg/L。

表 1 牡蛎活性肽对淋巴细胞的生长抑制率($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Inhibition of lymphocyte proliferation by oyster peptides ($n=3, \bar{x} \pm s$)

浓度(mg/L)	小鼠脾淋巴细胞增殖抑制率(%)	混合淋巴细胞增殖抑制率(%)
7.81	7.53 $\pm$ 0.33	16.51 $\pm$ 5.19
15.62	14.88 $\pm$ 2.35	20.91 $\pm$ 2.23
31.25	26.74 $\pm$ 1.31	21.38 $\pm$ 1.18
62.5	25.98 $\pm$ 0.56	23.74 $\pm$ 1.44
125	52.18 $\pm$ 0.65	45.38 $\pm$ 5.34
250	62.39 $\pm$ 1.25	60.12 $\pm$ 1.35

免疫抑制剂通过抑制免疫细胞(T 细胞和 B 细胞等巨噬细胞)的增殖和功能,降低抗体免疫反应。在特异性抗原刺激下可以使相应的淋巴细胞克隆发生增殖。如刀豆蛋白 ConA 是 T 淋巴细胞有丝分裂原,能在体外激活 T 细胞增殖,并促进 T 细胞和单核细胞产生细胞因子^[11];而脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)则刺激 B 细胞发生增殖。因此,本研究采用混合淋巴细胞的增殖模型研究牡蛎蛋白活性肽的免疫活性。

3.2 对小鼠脾淋巴细胞因子 IFN- γ 和 IL-2 分泌的影响

采用双夹心 ELISA 方法分别检测小鼠脾淋巴细胞培养液上清中的细胞因子,实验结果表明,牡蛎活性肽对 ConA 激活的小鼠脾脏淋巴细胞上清中分泌的细胞因子 IL-2, IFN- γ 有显著的抑制作用,呈现一定的剂量依赖性,见图 2、图 3。

细胞因子(cytokine)是一类由抗原、有丝分裂原或其他刺激物活化的细胞分泌的、相对分子质量为

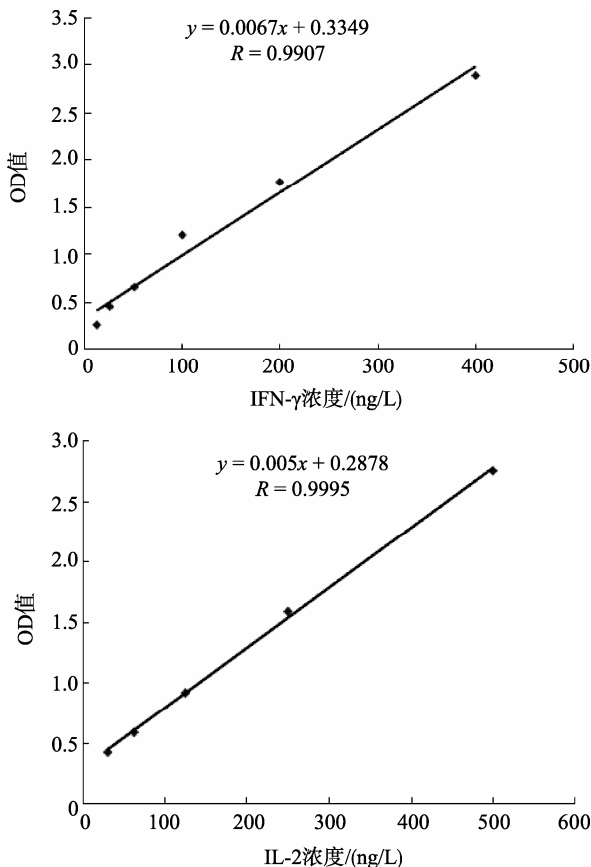


图 1 细胞因子 IFN- γ 和 IL-2 标准曲线

Fig. 1 The standard curves of cytokines IFN- γ and IL-2

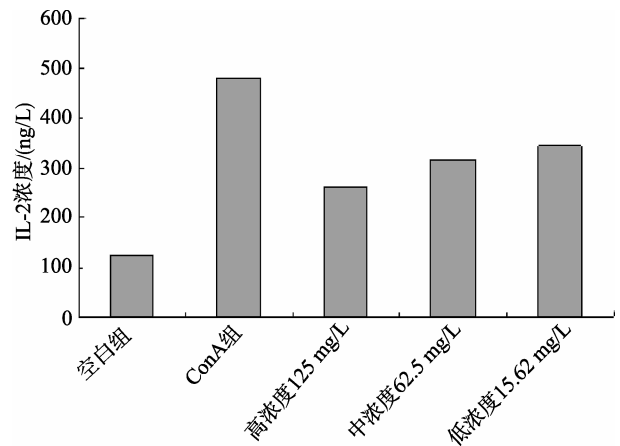


图 2 ELISA 检测牡蛎活性肽作用后对细胞上清中 IL-2 的影响

Fig. 2 The detection of IL-2 in supernatant influenced by oyster bioactive peptides using ELISA method

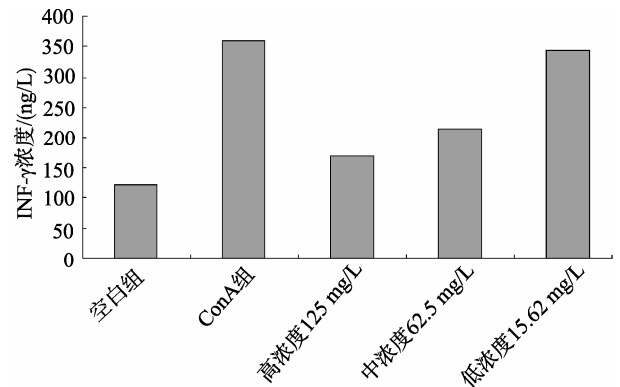


图 3 ELISA 检测牡蛎活性肽作用后对细胞上清中 IFN- γ 的影响

Fig. 3 The detection of IFN- γ in supernatant influenced by oyster bioactive peptides using ELISA method

15~30 kD 的糖蛋白。包括淋巴细胞因子、单核细胞因子及其他细胞产生的细胞因子^[12]。这些因子在体内主要发挥抗感染、抗肿瘤作用、调节免疫、刺激造血细胞增殖分化以及参与和调节炎症反应等生物学功能。白细胞介素-2(IL-2), 主要由活化的 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞产生, 是所有 T 细胞亚群的生长因子, 为调控免疫应答的重要因子, 免疫抑制剂可以抑制其活性和生成。已有大量文献报道, 在器官移植后的排斥反应和自身免疫病如类风湿性关节炎、红斑狼疮、膜肾球肾炎、炎性肠病和免疫性溶血贫血等患者的血清或淋巴细胞培养上清液中, 炎症性细胞因子 IL-2 的水平明显升高^[13]。IFN- γ 可增强靶器官中抗原递呈细胞或非抗原递呈

细胞异常表达组织相容性复合物分子,促进对自身抗原的识别和提呈功能,激活自身反应性T细胞,从而诱发自身免疫性疾病。在自身免疫性肝炎、自身免疫性甲状腺炎患者血清中IFN- γ 明显升高。本研究结果表明牡蛎蛋白活性肽可以抑制小鼠脾淋巴细胞分泌IL-2和TNF- γ ,由此推测牡蛎蛋白活性肽可能是通过抑制细胞因子的分泌来产生免疫抑制作用。

4 结论

近年来,器官移植的手术正以每年5000余例次递增,是器官衰竭治疗的最后有效手段,术后的特殊用药——免疫抑制剂,对器官移植患者存活时间、移植器官功能维持等方面起着举足轻重的作用。而目前临床上使用的免疫抑制剂多为进口药物,价格昂贵,此外临床上常用的免疫抑制剂如糖皮质激素类、环磷酰胺、甲氨喋呤、硫唑嘌呤、环孢菌素、抗淋巴细胞血清、抗白介素-1及2受体抗体等,毒副作用较大。因此寻找开发高效、低毒的免疫抑制剂,是当今器官移植药物研究的热点。

本研究发现在一定浓度范围内牡蛎蛋白活性肽能抑制小鼠脾淋巴细胞和混合淋巴细胞的增殖,具有明显的免疫抑制活性。研究结果显示牡蛎活性肽有望作为一种新的免疫抑制剂进行开发应用研究,在动物皮瓣移植模型上进一步探讨其体内抗排斥功效。

参考文献:

- [1] 尹淑敏,李凤谦. 牡蛎的药用[J]. 中国药学杂志, 2001, 29(12): 751-752.
- [2] 王颖,马安伦,张惠珍,等. 牡蛎提取物抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国海洋药物, 1997, 16(1): 18-22.
- [3] 曹弃元,李永强,陈诚钦,等. 牡蛎提取物体外放射增敏作用[J]. 中国海洋药物, 1993, 12(2): 11-13, 29.
- [4] 陈艳辉,李超柱,吴磊,等. 广西产牡蛎多糖的制备和抗肿瘤活性初步研究[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(7): 1004-1005.
- [5] 桑希生,李庆云,徐强,等. 牡蛎汤对免疫性肝损伤小鼠肝组织NO、IL-和TNF- α 影响[J]. 中医药信息, 2007, 24(5): 68-69.
- [6] 黄大川,李祺福,李鹏,等. 牡蛎低分子活性物质对人肺腺癌A549细胞的生物学效应[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(5): 438-479.
- [7] 吴继卫,何海伦,路敬涛,等. 海洋生物蛋白的酶解及酶解产物的抗氧化活性[J]. 海洋科学, 2005, 29(3): 76-80.
- [8] Yamamoto N, Ejiri M, Mizuno S. Biogenic peptides and their potential use [J]. Curr Pharm Des, 2003, 9(16): 1345-1355.
- [9] Kong Z L, Chiang L C, Fang F. Immune bioactivity in shellfish toward serum free cultured human cell lines [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 2006, 61(1): 24-28.
- [10] 陈艳辉,李超柱,吴磊,等. 动物蛋白酶酶解制备广西产牡蛎肉抗肿瘤活性肽的实验研究[J]. 食品工业科技, 2010, 331(8): 167-169.
- [11] Angela S.Wermerskirchen, Dorian H.LaTocha, Benjamin L.Clarke. Adrenocorticotropid hormone controls Concanavalin A activation of rat lymphocytes by modulating IL-2 production. Life Sciences 2000, 67: 2117-2187.
- [12] 仲人前. 细胞因子与自身免疫性疾病的关系[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23: 4.
- [13] Choy E H S, Panayi G. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. N Engl J Med 2001, 344: 907-915.

Separation and immunosuppressive activity analysis of the bioactive peptides from oyster

LI Chao-zhu¹, CHEN Yan-hua², CHEN Yan-hui¹, ZHANG Yan-qiu¹, FANG Huai-yi¹

(1. Qinzhou College, Qinzhou, Qinzhou 535000, China; 2. Affiliated Tumour Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Received: Apr.,8,2012

Key words: Oyster bioactive peptides; immunosuppressive effects; lymphocyte proliferation

Abstract: The bioactive peptides of oyster were obtained by animal protease enzyme from oyster protein. The bioactive peptides molecular weight less than 3kD were analyzed using MTT assay, in vitro mice spleen lymphocytes proliferation assay and in vitro mixed lymphocyte proliferation assay. The changes of secretory cytokines IL-2 and IFN- γ in supernatant of mouse splenic lymphocyte after bioactive peptides treatment were analyzed using ELISA assay. The results showed that Oyster peptide can suppress the proliferation of spleen lymphocytes in mice and reduce the secretory cytokines IL-2 and IFN- γ in supernatant of mouse splenic lymphocyte.

(本文编辑: 康亦兼)