

酵母多糖对小鼠免疫功能影响的体外实验研究

朱延军, 刘洪梅, 边洪荣, 史相国, 李树义, 张庆波*, 马志红 (华北煤炭医学院生物科学系, 河北唐山 063000)

摘要 [目的] 研究酵母多糖对小鼠免疫功能的影响, 为酵母多糖相关产品的开发利用提供可靠的实验依据。[方法] 分离提取小鼠的脾细胞, 分为添加酵母多糖组和不加酵母多糖的对照组, 检测小鼠脾细胞的增殖活性; 留取细胞上清液, 测定白细胞介素 2(IL-2)、 γ 干扰素(IFN- γ)含量; 用流式细胞术检测 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的数量, 观察酵母多糖对 T、B 细胞增殖的影响。[结果] 酵母多糖组增殖活性明显高于对照组($P < 0.01$); 在一定剂量范围内, 该组 IL-2、IFN- γ 的含量与酵母多糖呈剂量依赖关系, 另外酵母多糖对 T、B 细胞均有明显的增殖效果。[结论] 酵母多糖可显著提高小鼠免疫系统的功能。

关键词 酵母多糖; 淋巴细胞; IFN- γ ; IL-2

中图分类号 S865.1⁺3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)28-13636-02

Study on the Effect of Yeast Polysaccharides on Immune Function of Mice in Vitro

ZHU Yan-jun et al (Department of Biological Sciences, North China Coal Medical University, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract [Objective] Effects of yeast polysaccharides (YPS) on mice immune function were researched in order to provide a basis for its development and utilization. [Method] Extracted the spleen cells of mice and divided them into two groups, one was YPS group, another was negative control group, detected their proliferation activity; got cell supernatant to detect IL-2, IFN- γ ; using flow cytometry to check cell subtypes, observed effects of YPS on proliferation of T and B cells. [Result] Compared with the control group, YPS group proliferation activity increased significantly ($P < 0.01$). In some dose range, the level of secreting IL-2, IFN- γ from immune cell has a dose-dependent relationship with YPS, moreover, YPS could enhance T and B cell's proliferation. [Conclusion] YPS can significantly improve the immune function of mice.

Key words Yeast polysaccharides; Lymphocytes; IFN- γ ; IL-2

酵母多糖(Yeast polysaccharide, YPS)广泛存在于酵母和真菌的细胞壁中, 是其重要的组成部分^[1], 占酵母细胞壁干重的 40%^[2-3], 是由大分子的甘露聚糖及糖蛋白所组成的复合物, 具有较高的营养价值和多种生理活性。笔者通过体外实验就酵母多糖对小鼠免疫细胞功能的影响进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料 酵母多糖: 实验室提供纯化^[4]。WST-1: 江苏碧云天生物科技公司产品(批号 07091121)。

1.2 实验动物 昆明种小鼠: SPF 级, 雌雄不限, 体重(20 ± 2)g, 5~6 周龄, 购自北京军事医学科学院。

1.3 小鼠脾细胞增殖活性的测定 检测小鼠脾细胞增殖: 取 5 周龄小鼠 1 只, 颈椎脱臼处死, 无菌取脾脏, 制成脾淋巴细胞悬液, 于倒置显微镜下计数, 调节细胞浓度使细胞数达 2.0×10^6 个/ml。96 孔板中每孔加 100 μ l 细胞悬液, 100 μ l 不同浓度的酵母多糖溶液(0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mg/ml), 同时设不加酵母多糖的对照组。每组设 3 个复孔, 置 CO₂ 培养箱中分别培养 3、6、9 d, 用 WST-1 测 OD 值。

1.4 小鼠 IFN- γ 、IL-2 的测定 检测细胞因子的含量, 取小鼠脾淋巴细胞悬液, 以 2×10^6 /ml 的浓度接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μ l, 给药组分别加入 0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mg/ml 的酵母多糖溶液 100 μ l, 阴性对照组加入 100 μ l RPMI-1640 培养液, 每组设 3 个复孔。在细胞培养箱内孵育 3、6、9 d 后, 取各组上清液 50 μ l, 置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存备用。收集完毕后按酶联免疫试剂盒说明书的操作流程分别检测 IFN- γ 、IL-2 的含量。

1.5 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的检测 检测小鼠脾细胞中细胞亚群 CD3、CD19, 取小鼠脾淋巴细胞悬液, 以 $6 \times$

10^6 /ml 的浓度接种于 24 孔培养板中, 每孔 0.5 ml, 实验组加入 2.00 mg/ml 的酵母多糖溶液 0.5 ml, 对照组加入 0.5 ml RPMI-1640 培养液, 取培养 6 d 的小鼠脾淋巴细胞悬液 0.4 ml (实验组与对照组各 1 份), 1 500 r/min, 离心 5 min; PBS 洗涤; 再直接加入 FITC 进行免疫标记反应(100 μ l 细胞悬液: 100 μ l 抗体), 避光孵育 30 min; PBS 洗 2 次, 每管加入 200 μ l 1% 多聚甲醛固定, 流式细胞仪检测。

1.6 数据统计处理方法 采用 SAS 软件, 进行方差分析与卡方检验。

2 结果与分析

2.1 酵母多糖对小鼠脾淋巴细胞的刺激增殖作用 表 1 显示, 培养 3 d 时, 2.00 mg/ml 的酵母多糖组对小鼠的脾淋巴细胞刺激增殖最为显著; 6 d 时, 1.00 mg/ml 的酵母多糖组对小鼠的脾淋巴细胞刺激增殖最为显著。

表 1 酵母多糖对小鼠免疫细胞增殖活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The effect of YPS on proliferation activity of mice immune cells ($\bar{x} \pm s$)

酵母多糖 YPS mg/ml	3 d	6 d	9 d
0	0.005 0 ± 0.001 0	0.009 0 ± 0.002 0	0.012 0 ± 0.005 2
0.25	0.123 3 ± 0.007 8	0.023 0 ± 0.006 1*	0.025 7 ± 0.008 0
0.50	0.196 7 ± 0.003 2*	0.031 7 ± 0.003 8*	0.041 3 ± 0.002 1**
1.00	0.333 3 ± 0.006 7*	0.049 0 ± 0.003 5*	0.055 0 ± 0.008 5**
2.00	0.047 3 ± 0.002 1*	0.046 7 ± 0.003 1*	0.039 3 ± 0.014 2**
4.00	0.021 3 ± 0.007 5*	0.041 3 ± 0.004 0*	0.029 7 ± 0.001 5**

注: 与对照组比较 * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ 。

2.2 小鼠 IFN- γ 含量的测定 表 2 显示, 酵母多糖组的 IFN- γ 含量显著高于对照组。培养 3 d, 以 4.00 mg/ml 的酵母多糖组效果最明显; 培养 6 d, 以 2.00 mg/ml 的酵母多糖组效果最明显。

基金项目 唐山市科学技术研究与发展计划(07120203A-4)。

作者简介 朱延军(1976-), 男, 河北唐山人, 硕士研究生, 研究方向: 病原微生物与代谢产物。* 通讯作者, 博士后, 教授, E-mail: zqb1955@yahoo.com。

收稿日期 2009-05-26

表 2 小鼠 IFN- γ 含量的测定

Table 2 Mice IFN- γ determination pg/ml

酵母多糖//mg/ml	3 d	6 d
YPS		
0(CK)	6.12 \pm 0.40	4.89 \pm 0.37
0.25	9.17 \pm 0.52 *	4.28 \pm 0.43
0.50	13.46 \pm 0.43 *	7.34 \pm 0.34 *
1.00	15.29 \pm 0.43 *	9.18 \pm 0.79 *
2.00	21.34 \pm 0.56 *	15.29 \pm 0.51 *
4.00	23.25 \pm 0.58 *	14.68 \pm 0.63 *

注:与对照组比较 * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$.

2.3 小鼠 IL-2 含量的测定 图 1 显示,IL-2 含量与一定浓度范围内的酵母多糖呈剂量依赖关系。培养 9 d,以 2.00 mg/ml 的酵母多糖组 IL-2 含量最高($P < 0.05$)。

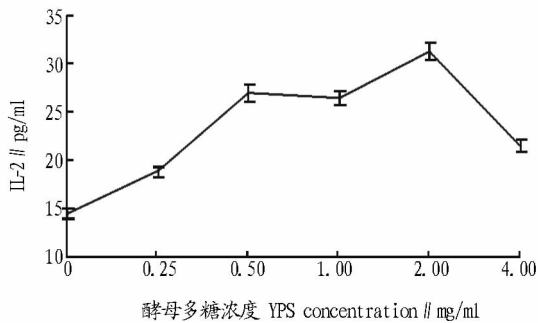


图 1 IL-2 含量的测定

Fig. 1 Determination of IL-2 content

2.4 流式细胞术检测细胞亚群 表 3、4 显示,未添加酵母多糖组 CD3⁺ 细胞占细胞总数的 5.01%,添加酵母多糖组 CD3⁺ 细胞占细胞总数的 9.14%;未添加酵母多糖组 CD19⁺ 细胞占细胞总数的 2.73%,添加酵母多糖组 CD19⁺ 细胞占细胞总数的 4.47%。

表 3 CD3 亚群的检测

Table 3 Determination of CD3 subsets

处理 Treatment	细胞总数 Total number of cell	标记细胞 Labeled cell	未标记细胞 Unlabeled cell	CD3 ⁺ 细胞占细胞总数的百分比//% Proportion of CD3 ⁺ cells in the total
对照组 Control group	10 000	501	9 499	5.01
实验组 Test group	10 000	914 *	9 086	9.14

注:与对照组比较 * $P < 0.001$ 。下表同。

Note: Compared with control group, * $P < 0.001$. The same as follows.

表 4 CD19 亚群的检测

Table 4 Determination of CD19 subsets

处理 Treatment	细胞总数 Total number of cell	标记细胞 Labeled cell	未标记细胞 Unlabeled cell	CD19 ⁺ 细胞占细胞总数的百分比//% Proportion of CD19 ⁺ cells in the total
对照组 Control group	5 460	149	5 311	2.73
实验组 Test group	10 000	447 *	9 553	4.47

3 讨论

采用检测细胞增殖活性、细胞因子与细胞亚群的方法研究酵母多糖对小鼠脾淋巴细胞免疫功能的影响,结果表明,酵母多糖对小鼠脾淋巴细胞的增殖、细胞因子的分泌均有显著的促进作用,在一定范围内,随着酵母多糖浓度的增加,细胞增殖效果也越显著,IFN- γ 、IL-2 的分泌量也随之增加,存在着明显的量效关系。相关研究表明,多糖对 B 细胞有促进增殖的效果^[5],但对 T 细胞的作用则取决于多糖种类^[6]。该实验在检测细胞亚群时发现 T、B 细胞均有大幅增长,表明酵母多糖对小鼠细胞免疫、体液免疫均有显著的促进作用。

目前,啤酒酵母的价值主要体现在其中的蛋白质、核酸、维生素、微量元素和酶等方面,对其细胞壁中多糖的开发应用研究不多。每年我国 500 多家大型啤酒生产企业废弃的废酵母泥多达几十万^[7],因此从废酵母泥中提取酵母多糖可以变废为宝,而该实验则为酵母多糖工业化生产的可行性提供了具有说服力的实验依据。

参考文献

- [1] LIPKEP N, OVALLE R. CeU wall architecture in yeast; new structure and new challenges[J]. Bacterial, 1998, 180(15): 3735-3740.
- [2] NAKANISHI-SHINDO Y, NAKAYAMA K, TANAKA A, et al. Structure of the N-linked oligosaccharides that show the complete loss of alpha-1,6-polymannose outer chain from och1, och1 mnn1 and och1 mnn1 alg3 mutants of Saccharomyces cerevisiae[J]. Bio Chem, 1993, 268: 26-33.
- [3] SOKOLOV S S, KALEBINA T S, AGATONOV M O, et al. Comparative analysis of the structural role of and in proteins and polysaccharides in ceU walls of the Hansenula and yeast polymorphomyces cerevisiae[J]. Dokl Biochem Biophys, 2002, 384: 172-175.
- [4] 边洪荣, 朱延军, 张庆波. 超声提取酵母多糖方法的实验研究[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2008, 11(8): 1152.
- [5] 杨晓林, 孙菊云, 张绍伦. 褐藻糖胶的有丝分裂原效应[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1991, 11(5): 282-284.
- [6] 庄茂辛, 吴耀生, 李曼玲, 黄茂, 党参, 人参多糖对豚鼠免疫功能的影响[J]. 中国药学杂志, 1992, 27(11): 653-655.
- [7] 周晓兰, 施碧红, 吴松刚. 啤酒酵母胞外多糖发酵条件的研究[J]. 工业微生物, 2003, 32(1): 34-36.

(上接第 13633 页)

- [14] 赵向上. 复方鹿花盘胶囊对实验性乳腺增生的治疗研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2008.
- [15] 张维滋, 王振玉. 鹿花盘治疗乳腺增生 86 例[J]. 上海中医药杂志, 1980(3): 31.
- [16] 张维滋, 王振玉. 鹿花盘注射液治疗乳腺增生 146 例临床观察[J]. 中国生化药物杂志, 1987(7): 16-18.
- [17] 韩泉. 试用鹿角盘治疗胃癌一例[J]. 特产研究, 1987(12): 33.
- [18] 张金宝. 使用鹿角盘治疗胃癌一例[J]. 畜牧兽医科技信息, 2006(4):

- 21.
- [19] 王志兵, 邱芳萍, 解竹林, 等. 鹿角盘水溶性成分提取方法的研究和提取工艺的优化[J]. 食品科技, 2007(9): 129-131.
- [20] 刘洋, 赵文静, 孙敏. 鹿鞭的药理研究与临床应用展望[J]. 中医药信息, 2007, 24(1): 24-25.
- [21] 蒋蕾, 赵文静, 常惟智. 鹿血的药理作用与临床应用概况[J]. 中医药信息, 2006, 23(6): 12-13.
- [22] 赵向上, 赵文静, 汪建伟. 鹿角的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中医药信息, 2008, 25(2): 23-25.