

尖海龙提取物对淋巴细胞的作用

李春香 (唐山师范学院生命科学系, 河北唐山 063000)

摘要 [目的] 研究尖海龙提取物的免疫调节活性。[方法] 制备尖海龙提取物,用密度梯度离心法分离人外周血淋巴细胞(PBMC),将海龙提取物作用于PBMC,观察PBMC的形态、细胞增殖率,同时检测经尖海龙提取物诱导后细胞因子的生成。[结果] 结果表明,尖海龙提取物作用后PBMC圆形、发亮,正常生长并有增殖,随着时间的延长,细胞出现多形的活化状态;经尖海龙提取物诱导的效应细胞中可检测出IL-2和TNF- α 细胞因子。[结论] 尖海龙提取物具有免疫调节活性,在癌症的治疗与预防方面具有应用价值。

关键词 尖海龙提取物;淋巴细胞;细胞因子;免疫调节

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)03-01096-02

Study on Effects of *Syngnathus acus Linnaeus* Extracts on Human Lymphocytes in Vitro

LI Chun-xiang (Tangshan Teachers College, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract [Objective] The purpose was to study whether *S. acus Linnaeus* has immunomodulating activity on human lymphocytes in vitro. [Methods] *S. acus Linnaeus* was chosen, and human PBL proliferation blood was separated by density gradient centrifugation, which they were regarded as experimental material. Experiments were made to observe human PBL proliferation and whether cytokine was produced in response to *S. acus Linnaeus* stimulation which could indicate the immunomodulating activity of *S. acus Linnaeus* extract. [Result] The results indicated that after *S. acus Linnaeus* extract stimulated, the PBMC could grow normally. The cells were bright, round and could reproduce. With the passage of time, multiform PBMC was observed. Some interferon such as IL-2 and TNF- α could be examined. [Conclusion] From above it can be concluded that *S. acus Linnaeus* has immunomodulating activity on human lymphocytes in vitro and will have a perfect future in the fields of treatment and prevention of cancer.

Key words *S. acus Linnaeus* extracts; Lymphocytes; Cytokine; Immunomodulating activity

陆地生物大多可生癌,但未见海洋生物致癌的报道。人们推测海洋生物体内存在抗癌机制或可产生抗癌物质^[1-2]。研究海洋生物的抗癌作用,提取分离纯化海洋生物抗癌的有效成分,成为目前研究的热点。

尖海龙(*S. acus Linnaeus*)属脊索动物门硬骨鱼纲(Steichthyes)、海龙目(Syngnathiformes)、海龙科(Syngnathidae)和海龙属(*Syngnathus Linnaeus*)^[3]。尖海龙为重要的海洋中药,具有性激素作用^[4-5]、抗疲劳作用^[6]和提高心肌细胞的收缩力^[7]等生理功能。施锐等已证实海龙提取物对肿瘤细胞有明显的抑制作用^[8-11]。尖海龙的免疫调节作用尚未见报道。因此,笔者以尖海龙为试材,将其提取物作用于淋巴细胞,并将尖海龙提取物刺激后的淋巴细胞作用于肿瘤细胞,研究尖海龙提取物的免疫调节活性,以为癌症的预防和治疗提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 尖海龙采自渤海唐山海域,其水提物自制。Hela细胞系由北京肿瘤研究所提供。RPM1640(GIBCO公司)、MIT、胰蛋白酶(SIGMA公司)IL-2检测试剂盒、IFN- α 检测试剂盒(美国ZYMED公司)、考马斯亮蓝、TNF标准品和IFN- α 标准品(北京邦定生物医学公司),人AB血清、胎牛血清(中国医学科学院天津血液学研究所),其他试剂均为分析纯或生化试剂。

1.2 方 法

1.2.1 用密度梯度离心法分离淋巴细胞^[12]。取新鲜外周血10 ml,加肝素抗凝,用细胞分离液Ficoll-Hypaque(比重1.077)分离单个核细胞(淋巴细胞PBMC),台盼蓝染色计数,用含10%人AB型血清的RPM-1640培养基调细胞浓度为 1×10^6 /ml。

1.2.2 淋巴细胞增殖的测定^[13]。取96孔培养板,试验组按倍比稀释法加入由RPM-1640培养基稀释的尖海龙水提取物

100 μ l;空白对照组加入100 μ l培养基;阳性对照组加入IL-2。每孔再加100 μ l分离的淋巴细胞。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱培养,每3 d换液1次。第7天用MTT法^[14]测定各组细胞的增殖情况。酶联免疫检测仪测定各孔在570 nm波长的光吸收值(OD值),计算加药后的细胞增殖率。

$$\text{增殖指数(Proliferation index, PI)} = \frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

1.2.3 细胞因子的检测^[15]。对照组LAK细胞的诱导:将PBMC调成 1×10^6 /ml,按500 u/ml加入重组白细胞介素2(rhIL-2)于24孔培养板,每孔2 ml,置5% CO₂培养箱内37 $^{\circ}$ C培养,每4 d换液1次。试验组:将PBMC用RPM-1640调成 1×10^6 /ml,取24孔培养板,每孔加2 ml细胞和0.2 ml尖海龙水提取物,置5% CO₂培养箱内37 $^{\circ}$ C培养,每4 d换液1次。8 d收获细胞和上清,按照试剂盒要求操作,分别进行IL-2和IFN- α 检测。

2 结果与分析

2.1 淋巴细胞的增殖 倒置显微镜观察,尖海龙提取物作用于淋巴细胞后,对人体淋巴细胞有明显的增殖作用,细胞圆形、透明(图1a),随着时间的延长,细胞出现多形的活化状态(图1b)。

用MTT法检测尖海龙水提取物,IL-2诱导淋巴细胞增殖情况见图2。

由图2可知,尖海龙可使淋巴细胞增殖,经²检验,试验组与对照组比,差异不显著($P > 0.05$)。淋巴细胞增殖的最佳药物作用量为6.25~25.00 μ l,药物量太低,增殖作用不明显,而加药量太高淋巴细胞的增殖作用受到抑制。

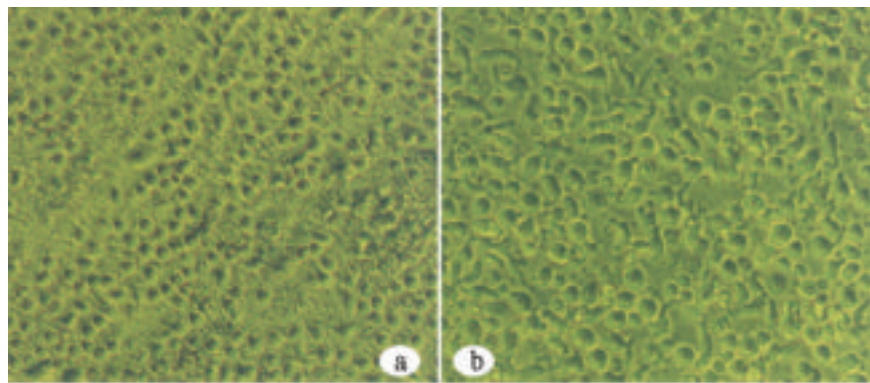
2.2 IL-2的检测 利用ELISA法检测细胞上清液中IL-2,结果显示,PBMC在受尖海龙提取物作用后生成IL-2,在不同的作用时间,IL-2的生成量有所不同,其中作用后第8天IL-2含量较高,但与IL-2刺激的对照组LAK细胞相比差异极显著($P < 0.01$)(图3)。

2.3 TNF活性检测 PBMC在受尖海龙提取物作用后可生

基金项目 河北省教育厅基金(2001263);唐山师范学院科研基金(03CC02)资助。

作者简介 李春香(1968-),女,河北乐亭人,硕士,副教授,从事应用生物化学的教学与研究。

收稿日期 2008-11-13



注: a 尖海龙提取物作用 3 d 后的淋巴细胞, 细胞透亮, 生长状态好; b 尖海龙提取物作用 7 d 后的淋巴细胞, 细胞生长旺盛, 出现很多分化细胞。

Note: a. PBMC 3 d after *S. acus Linnaeus* stimulation, with bright and normal cell; b. PBMC 7 d after *S. acus Linnaeus* stimulation, with vigorous growth of cell and many differentiated cells.

图1 尖海龙提取物对人体淋巴细胞的增殖

Fig.1 Proliferation of human lymphocytes by *S. acus Linnaeus* extract

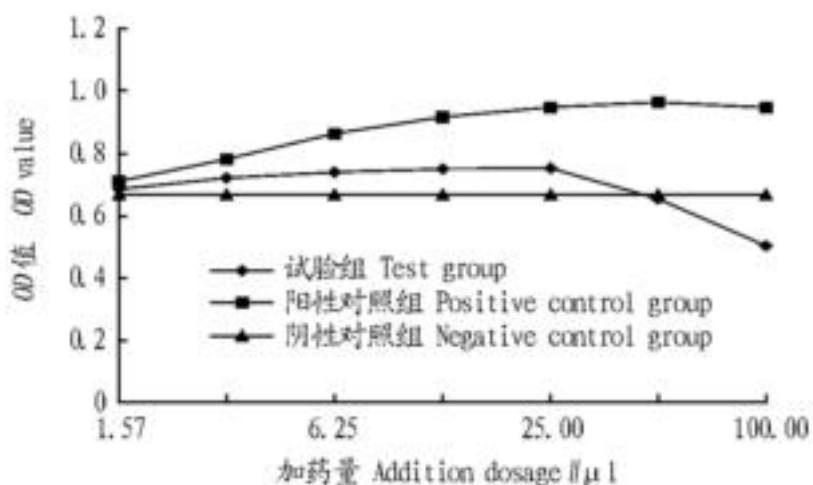


图2 尖海龙提取物对淋巴细胞增殖作用的影响

Fig.2 Effects of *S. acus Linnaeus* extract on the lymphoproliferation

成 TNF, 在不同的作用时间, TNF 的生成量有所不同, 与 IL-2 刺激的对照组 LAK 细胞相比, $P > 0.05$, 差异不显著(图 4)。

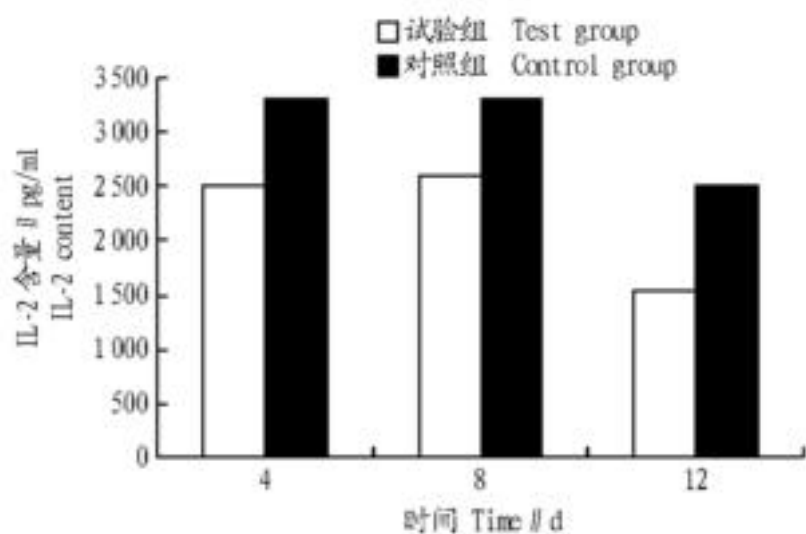


图3 培养细胞上清液 IL-2 含量测定曲线

Fig.3 Detection curve of IL-2 content in cultured cells supernatants

3 结论与讨论

癌症是严重危害人类健康的疾病之一, 癌症死亡率占各类疾病死亡之首。肿瘤的发生、发展与带瘤机体的免疫状态密切相关^[16]。免疫缺陷和免疫力低下对肿瘤的发生、发展和转移有巨大的影响, 以免疫治疗为基础的生物治疗成为目前研究的热点。

很多中药具有抗癌作用。中药的抗癌作用可表现在对肿瘤细胞的杀伤和抑制作用, 对机体免疫力的提高等^[17]。

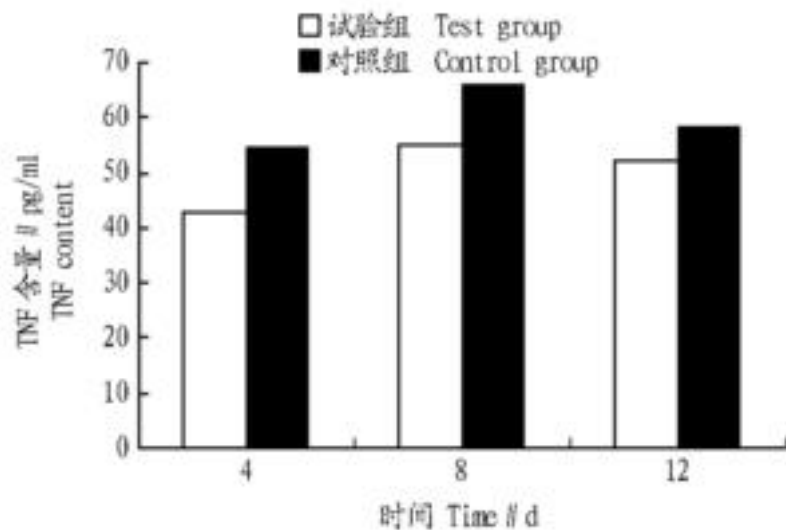


图4 培养细胞上清液 TNF 含量测定曲线

Fig.4 Detection curve of TNF content in cultured cells supernatants

该研究已充分证实尖海龙提取物可刺激 PBMC 的增殖、刺激 IL-2 和 TNF 的生成, 从而提高机体免疫力, 但对正常细胞没有损伤, 所以在抗癌方面将有广阔的前景。

参考文献

- [1] 丁源, 董雪娣. 海洋药物在祖国医学中的地位和作用[J]. 海洋药物, 1982, 2(2): 44-49.
- [2] YAMANOI M, HAWKINS W. Drugs from the sea[J]. Marine Natural Products, 1984, 8(5): 402-421.
- [3] 彭立义, 杜光祖. 胎盘免疫调节肽治疗肿瘤 100 例疗效与免疫功能观察[J]. 实用肿瘤学杂志, 1992, 6(4): 36-37.
- [4] 杨琨, 舒翠玲, 赵宁, 等. 胎盘因子对机体细胞免疫功能的调节作用[J]. 中国中西医结合杂志, 1992, 12(8): 487.
- [5] 丰慧根, 韩金红, 卢光荣, 等. 胎盘免疫调节肽抑瘤效应的研究[J]. 新乡医学院学报, 1996, 3(2): 127.
- [6] 车军, 刘洁生. 蛇毒抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(8): 757.
- [7] 中国科学院动物研究所. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社, 1982: 454.
- [8] 赵学敏. 本草纲目拾遗[M]. 北京: 人民出版社, 1957: 355.
- [9] H. 林德贝格. 世界的鱼类检索表和种的名录[M]. 北京: 农业出版社, 1985: 115.
- [10] 李春香, 边洪荣, 邹国林, 等. 尖海龙提取物抗癌作用的研究[J]. 武汉大学学报: 理学版, 2001, 47(6): 761-765.
- [11] LI C X, ZHU S Y, HAN H R, et al. Inhibiting effects of *S. acus Linnaeus* extracts on GLF82 Tumor cell lines[J]. Wuhan University Journal of Natural Sciences, 2002, 7(4): 502-506.
- [12] MORHEAD P S, NOWELL P C, MELLMAN W J, et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood[J]. Exp Cell Res, 1960, 20: 613-616.
- [13] ROSENBERG S A, LOIZE MT, MULL L Met al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer[J]. New Eng J Med, 1985, 313(23): 1485-1492.
- [14] MOSMONT T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. Immunological Methods, 1983, 65: 55-63.
- [15] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1995.
- [16] 花金宝, 朴炳奎. 肿瘤虚证及扶正培本治疗的现代化免疫机制研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(3): 60-63.
- [17] 朱德志, 郑显明. 中药多糖抗癌研究进展[J]. 中草药, 1999, 20(1): 38-41.
- [18] 聂姬锋, 李冬晨, 刘凯. 尖海龙提取物对肿瘤细胞系 SK-RB3 的杀伤作用研究[J]. 唐山师范学院学报, 2007, 29(2): 43-45.
- [19] ZENG X R, ZENG T, LI L F, et al. Insecticidal activities of extracts from *Brucea javanica* (L.) Merr. Callus[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(4): 141-143.
- [20] 李春香, 袁强, 朱晓梅, 等. 倒置显微镜观察尖海龙提取物对 H₂a 细胞的杀伤作用[J]. 唐山师范学院学报, 2001, 23(5): 4-6.
- [21] YIN L G, WEI Q, ZHANG C, et al. Antifungal activity of extracts from *Crocodendrum bungei* leaves against two species of phytopathogens[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(1): 143-145.