

扇贝多肽在体外对免疫细胞活性的影响 及其抗紫外线的氧化损伤作用^{*}

刘晓萍 王玉贞 韩彦弢 于业军 王跃军[†] 王春波

(青岛大学医学院 青岛 266021)

[†](中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

提要 采用噻唑盐(MTT)比色方法研究在紫外线辐射损伤条件下扇贝多肽对免疫细胞的保护作用,并探讨扇贝多肽对胸腺细胞和脾细胞活性的影响。结果表明,扇贝多肽具有抗紫外线氧化损伤的作用,可减轻或抑制紫外线对胸腺细胞和脾细胞的氧化损伤,并且呈剂量依赖性。扇贝多肽在 0.5%—10.0% 的浓度范围内,其抗氧化能力随浓度的增高而增强;在正常条件下可显著增强免疫细胞的活性,并且可拮抗雌激素对免疫细胞的抑制作用。提示扇贝多肽不仅具有抗氧化损伤作用,而且具有免疫增强作用。

关键词 扇贝多肽,免疫细胞,紫外线损伤

中图分类号 R392

海洋生物中蕴藏着巨大的生物活性物质资源,其中有些生物活性物质具有重要的药用价值,已成为人类治愈疾病的重要药物资源,因此,开发海洋生物中的活性物质是国内外的热门研究课题(张克凌等,2000;张新宇等,2000)。近几年,国外已开发出的海洋肽类活性物质有活性毒肽、抗菌肽、抗癌肽等(Pettit *et al*, 1989; Pettit *et al*, 1995)。目前,由于臭氧层的破坏,照射到地球上的射线过多,对机体造成损伤,甚至导致肿瘤的发生(Clement *et al*, 1996),因此,寻找天然抗氧化剂、阻止紫外线的氧化损伤是国际上的重要研究课题。扇贝多肽是近年来从栉孔扇贝中提取出的一种具有生物活性的小分子、水溶性多肽,分子量为 800—1000。初步研究表明该多肽具有抗氧化活性,能清除羟自由基和超氧阴离子(王春波等,1998a),有延缓自然衰老动物皮肤的老化的作用(王春波等,1998b)。但扇贝多肽是否对免疫细胞的功能有影响?对免疫细胞有无抗紫外线氧化损伤的保护作用?目前尚未见报道。本文探讨在紫外线辐射损伤条件下扇贝多肽对免疫细胞的保护作用,并探讨扇贝多肽对胸腺细胞和脾细胞活性的影响,以期扇贝多肽的进一步开发应用提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料

6 周龄健康雄性 Wistar 大鼠 10 只,购于青岛药物研究所实验动物中心,在无特殊病原菌的条件下喂养。扇贝多肽由中国水产科学研究院黄海水产研究所提供。RPMI-1640、

^{*} 国家自然科学基金资助项目,39970638 号。刘晓萍,女,出生于 1957 年 3 月,硕士,副教授,Fax:0086-0532-3801449

收稿日期:2000-04-25,收修改稿日期:2000-10-23

噻唑盐(MTT)均为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 紫外线对免疫细胞损伤强度和扇贝多肽有效保护剂量的筛选 采用噻唑盐(MTT)比色法(司徒镇强等,1996)。首先无菌取大鼠胸腺和脾,按常规方法分别制备胸腺细胞(Thymocyte, T)和脾细胞(Splenocyte, S),调其细胞浓度为 $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ cell/ml,经台盼蓝染色检查细胞活性大于 95%。分 6 组,接种于 24 孔板,每孔 1ml,每组 3 个复孔,有两组分别加入含 8% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液(完全培养液),作为对照组(C_1 和 C_2)。另外 4 组分别加入不同浓度的扇贝多肽,使其终浓度为 1.0%、2.5%、5.0% 和 10.0%。孵育 12h。其中对照组 1(C_1)的细胞不经紫外线损伤;对照组 2(C_2)与加入不同浓度扇贝多肽的实验组在紫外线下分别照射 20s 和 40s,其辐射强度分别为 6×10^{-4} J/cm² 和 1.2×10^{-3} J/cm²。然后向各组每孔加入 MTT 溶液 100 μ l,37℃ 继续孵育 4h,终止培养。离心弃去孔内营养液,收集细胞,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砜(DMSO),振荡 10min,选择 490nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,记录结果(OD 值),以完全培养液孔作空白对照。

1.2.2 在紫外线损伤过程中扇贝多肽对胸腺细胞和脾细胞的保护作用 按上述方法取胸腺和脾细胞,调细胞悬液浓度为 1×10^6 cell/ml 分组备用。细胞悬液分为 4 组,接种于 24 孔板,每孔 1ml,每组 3 个复孔,分别加入 RPMI-1640 作为对照(C)和按筛选后的浓度分别加入扇贝多肽,扇贝多肽的终浓度分别为 0.5%、1.0% 和 2.0%,孵育 12h。在强度分别为 3.0×10^{-5} J/cm²、 1.2×10^{-3} J/cm²、 1.26×10^{-2} J/cm² 的紫外线照射后,以同上方法检测扇贝多肽对胸腺和脾细胞的保护作用。

1.2.3 扇贝多肽对胸腺和脾细胞的影响 分离胸腺和脾细胞,调细胞悬液浓度为 1×10^6 cell/ml。一部分细胞悬液不加刀豆素蛋白 A(ConA)(T_0 或 S_0 组),分为 6 组,每组 3 个复孔,每孔 1ml,一组加入 RPMI-1640 液作为对照(C),另三组分别加入终浓度为 0.5%、1.0% 和 2.0% 的扇贝多肽;第 5 组加入 1.0% 的雌二醇(Estradiol, E_2),第 6 组加入终浓度皆为 1.0% 的 E_2 和扇贝多肽。另一部分胸腺和脾细胞悬液分别加入 2ng/ml 和 6ng/ml 的 ConA 后(T_c 或 S_c 组),再按上述分组分别加入同样试剂。以 MTT 方法检测扇贝多肽对有丝分裂原和无有丝分裂原刺激时的免疫细胞活性的影响。

2 结果

2.1 扇贝多肽最佳保护剂量的选择

实验中,肉眼即可观察到胸腺细胞较脾细胞更易受到紫外线的氧化损伤,照射后马上出现细胞凝集,脾细胞出现凝集较晚。与不经紫外线照射的 C_1 组相比, C_2 组的细胞经紫外线照射后胸腺细胞和脾细胞的代谢活性均降低;但是照射 40s(1.2×10^{-3} J/cm²)较照射 20s(6.0×10^{-4} J/cm²)的代谢活性降低的程度要轻。加入扇贝多肽组的两种细胞的活性均较不加扇贝多肽组的细胞活性强;但是对脾细胞,浓度为 1.0% 的扇贝多肽保护作用较 2.5% 的为强;而对胸腺细胞,浓度为 2.5% 的扇贝多肽保护作用最佳(表 1)。

2.2 紫外线氧化损伤条件下扇贝多肽对免疫细胞的保护作用

根据筛选的结果,选择 2.0% 和 1.0% 及其 0.5% 三个浓度作为最佳保护浓度,在

紫外线辐射强度较低时加以上 3 个浓度扇贝多肽组的细胞活性均较不加扇贝多肽的活性强;但是紫外线辐射的强度增加到 $5.4 \times 10^{-2} \text{J/cm}^2$ 时,仅 2.0% 浓度的扇贝多肽对胸腺细胞具有保护作用,而 1.0%、2.0% 浓度的扇贝多肽对脾细胞均有保护作用(表 2)。

表 1 紫外线损伤过程中扇贝多肽对免疫细胞有效保护剂量的筛选

Tab.1 Choice of protective effect dose of polypeptides from *Chlamys farreri* on immune cells during the process of UV oxidative damage

免疫细胞 活性(OD)	组别	辐照强度(J/cm ²)	
		6.0×10^{-4}	1.2×10^{-3}
脾细胞	C ₁ (未照)	0.685 ± 0.006 ^{**}	
	C ₂	0.390 ± 0.005 ¹⁾	0.663 ± 0.011 ¹⁾
	1.0%	0.814 ± 0.010 ^{**1)}	1.041 ± 0.043 ^{**1)}
	2.5%	0.703 ± 0.008 ^{**1)}	0.842 ± 0.009 ^{**1)}
	5.0%	0.976 ± 0.014 ^{**1)}	1.237 ± 0.027 ^{**1)}
	10.0%	1.796 ± 0.013 ^{**1)}	2.161 ± 0.051 ^{**1)}
胸腺细胞	C ₁ (未照)	0.726 ± 0.013 [*]	
	C ₂	0.437 ± 0.010 ¹⁾	0.628 ± 0.008 ¹⁾
	1.0%	1.704 ± 0.019 ^{**1)}	2.661 ± 0.022 ^{**1)}
	2.5%	2.659 ± 0.037 ^{**1)}	3.018 ± 0.011 ^{**1)}
	5.0%	1.684 ± 0.030 ^{**1)}	2.067 ± 0.011 ^{**}
	10.0%	2.206 ± 0.015 ^{**1)}	2.582 ± 0.071 ^{**1)}

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 与 C₂ 组相比(Compared with C₂ group);1) $P < 0.05$, 与 C₁ 组相比(Compared with C₁ group)

表 2 不同紫外线损伤强度下扇贝多肽对免疫细胞的保护作用

Tab.2 The anti-UV oxidative effects of polypeptides from *Chlamys farreri* on immune cells

免疫细胞 活性(OD)	组别	辐照强度(J/cm ²)		
		2.1×10^{-4}	1.2×10^{-3}	5.4×10^{-2}
胸腺细胞	C	0.171 ± 0.010	0.380 ± 0.007	0.356 ± 0.037
	0.5%	0.334 ± 0.001 ^{**}	0.451 ± 0.014 ^{**}	0.373 ± 0.018
	1.0%	0.540 ± 0.010 ^{**}	0.472 ± 0.011 [*]	0.358 ± 0.027
	2.0%	0.701 ± 0.015 ^{**}	0.578 ± 0.021 ^{**}	0.551 ± 0.030 ^{**}
脾细胞	C	0.540 ± 0.023	0.355 ± 0.004	0.306 ± 0.014
	0.5%	0.672 ± 0.015 ^{**}	0.395 ± 0.002 ^{**}	0.302 ± 0.009
	1.0%	0.774 ± 0.024 [*]	0.419 ± 0.012 ^{**}	0.384 ± 0.011 [*]
	2.0%	0.912 ± 0.021 ^{**}	0.526 ± 0.014 ^{**}	0.467 ± 0.016 ^{**}

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 与 C 组相比(Compared with C group)

2.3 扇贝多肽对免疫细胞的影响

扇贝多肽在无紫外线损伤的条件下对胸腺细胞和脾细胞也有影响,可显著增强两种细胞的活性,而且扇贝多肽的浓度越大其增强效应越明显。在加入 ConA 条件下,同一浓度扇贝多肽增强胸腺细胞活性的作用较不加 ConA 时显著。而对脾细胞而言,加 ConA 后,虽然扇贝多肽可以增强脾细胞的活性,但是与不加 ConA 同一浓度组相比,仅 0.5% 浓度的扇贝多肽较不加扇贝多肽组的细胞活性增强,而 1.0% 和 2.0% 浓度的扇贝多肽并未见更强的增加细胞活性的效应。E₂ 可降低免疫细胞的活性,加入扇贝多肽不仅可拮抗

E_2 的作用,而且还可提高免疫细胞的活性(表 3)。

表 3 扇贝多肽对免疫细胞活性的影响

Tab. 3 The effect of polypeptides from *Chlamys farreri* on activities of immune cells

组别	胸腺细胞活性(OD)		脾细胞活性(OD)	
	T_0	T_c	S_0	S_c
C	0.266 ± 0.017	0.382 ± 0.029 ¹⁾	0.272 ± 0.025	0.345 ± 0.014 ¹⁾
0.5%	0.406 ± 0.011**	0.461 ± 0.025** ¹⁾	0.297 ± 0.029**	0.398 ± 0.006** ¹⁾
1.0%	0.466 ± 0.008**	0.504 ± 0.020** ¹⁾	0.394 ± 0.018**	0.397 ± 0.006*
2.0%	0.586 ± 0.013**	0.617 ± 0.018** ¹⁾	0.523 ± 0.042**	0.513 ± 0.015**
E_2	0.202 ± 0.005**		0.219 ± 0.002**	
$E_2 + 1.0\%$	0.458 ± 0.010**		0.415 ± 0.009**	

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 与 C 组相比 (Compared with C group); 1) $P < 0.05$, 与 T_0 组或 S_0 组相比 (Compared with T_0 or S_0 group)

3 讨论

噻唑盐(MTT)比色实验是检测细胞存活和生长的方法。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原成为难溶性的蓝紫色结晶物(Formazan)并沉积在细胞中,线粒体膜损伤时,MTT 被还原量明显减少,而死细胞则无此功能。二甲亚砜能溶解细胞中的紫色结晶物,用酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定其光吸收值,可直接反映细胞的代谢活性,间接反映活细胞数量。它的特点是灵敏度高、重复性好、操作简便、经济快速、无放射性污染,与其他检测细胞活力的方法(如³H-TdR 掺入实验等)有良好的相关性,因而广泛应用于检测细胞活性、抗癌药物对肿瘤增殖活性的效应和抗癌药物筛选等研究。本实验采用 MTT 方法,观察了紫外线氧化损伤条件下扇贝多肽对离体免疫细胞的活性的影响。结果表明,在紫外线氧化损伤过程中,中枢淋巴器官的细胞(胸腺细胞)较周围淋巴器官的细胞(脾细胞)对紫外线损伤更敏感,经紫外线照射后胸腺细胞即可发生聚集,而脾细胞发生聚集较晚。结果还发现,在紫外线强度一定的条件下,照射 40s 组反而较 20s 组的免疫细胞的代谢活性强;当辐射损伤的时间增至 3min 时,细胞的代谢和增殖活性显著降低。但是辐射组与未辐射组的两个未加扇贝多肽的对照组的细胞活性相比,辐射组淋巴细胞的活性仍较未辐射组的活性低。南新升等(1992)以³H-TdR 掺入法研究在紫外线损伤条件下脾细胞的修复能力的变化,发现在 5min 之内脾细胞的 DNA 的修复能力随紫外线辐射时间的延长而增强,但辐射时间超过 5min 之后脾细胞的 DNA 的修复能力随辐射时间的延长而降低,本实验结果从细胞的酶代谢的角度也证实了这一点。但本文结果表明紫外线辐射 3min 后细胞的活性就显著降低,这可能由于实验所选择的紫外线的辐射强度不同所致,辐射强度越大,造成的损伤越强,细胞损伤后的修复能力越小。

有研究表明,紫外线的辐射损伤主要是产生超氧阴离子引起细胞膜及酶蛋白氢硫基氧化分解,而造成细胞损伤,尤其是 DNA 的断裂、损伤(Kripke *et al*, 1996)。辐射不仅造成皮肤过早老化、光敏性皮肤病,而且可抑制 T 辅助细胞(Ts)的活性及其介导的免疫反应,致使肿瘤细胞生长(Collins *et al*, 1997; Stewart *et al*, 1996; Shreedhar *et al*, 1998)。扇贝多肽的发现填补了从海洋天然活性物质中提取抗氧化剂的空白。作者前期的研究表明,扇贝多肽对皮肤的紫外线氧化损伤有保护作用(王春波等, 1998a, b)。本实验建立了

体外淋巴细胞的紫外线氧化损伤模型,并首次研究发现在紫外线氧化损伤过程中扇贝多肽对免疫细胞也具有保护作用,其保护作用有明显的剂量依赖性。本实验筛选出了扇贝多肽在体外紫外线损伤条件下对淋巴细胞的最佳保护浓度,对胸腺细胞和脾细胞进行比较而言,其应用剂量小、而且保护效果好的最佳浓度分别为 2.0% 和 1.0%。因此,在本实验中选择浓度为 0.5%、1.0% 和 2.0% 的扇贝多肽作为实验中的保护剂量。但是随着紫外线辐射强度的增大,其保护作用能力下降,并且还可见在紫外线氧化损伤条件下加扇贝多肽组的免疫细胞的活性较无紫外线损伤组的未加扇贝多肽的细胞的活性还强,提示扇贝多肽不仅是一种良好的抗氧化剂,而且也是一种良好的免疫细胞调节剂,可以显著增强免疫细胞的代谢和增殖。

胸腺是中枢淋巴器官,是培育 T 淋巴细胞的场所。脾脏是周围淋巴器官,内有大量的 T、B 淋巴细胞,是产生细胞和体液免疫应答的部位。T 淋巴细胞是淋巴细胞再循环的主要细胞,在血液中约占 60%—70%,在淋巴结中约占 65%—85%,在机体免疫功能活动中居于主导地位。为证实扇贝多肽有无免疫调节作用,本实验又探讨了在无紫外线损伤条件下,扇贝多肽对免疫细胞的影响。扇贝多肽对胸腺细胞和脾细胞的代谢和增殖的均具有增强效应,这也提示其对免疫机能的影响是广泛的。ConA 为有丝分裂原,可以刺激 T 淋巴细胞的增殖。本研究结果表明,无论有、无 ConA 的存在,扇贝多肽均可显著增强免疫细胞的活性;提示扇贝多肽可以促进免疫细胞增殖、提高细胞活性,并与剂量呈正相关。加 ConA 组与不加 ConA 组相比,同一浓度的扇贝多肽对胸腺细胞在 ConA 作用下,其促进细胞增殖的作用均较无 ConA 刺激时的作用强;而对脾细胞,仅浓度为 0.5% 的扇贝多肽促细胞活性作用有 ConA 组较无 ConA 组作用强;提示扇贝多肽可能对 T 淋巴细胞的影响更显著,但尚需进一步研究加以证实。

雌二醇(Estradiol, E_2)是机体中的具有广泛调节作用激素之一,对免疫功能也具有调节作用,可在体内外抑制免疫细胞的活性(刘晓萍等,1995;Grossman *et al*,1982)。本研究结果表明 E_2 可抑制胸腺细胞和脾细胞的活性。扇贝多肽可在体外阻断 E_2 对免疫细胞的抑制作用,这也提示扇贝多肽可能是一种作用广泛的免疫促进剂,具有重要的理论意义。

参 考 文 献

- 王春波,贺梦泉,秦守哲等,1998a. 海洋肽的体外抗氧化作用. 中国海洋药物,17(3):15—17
- 王春波,贺梦泉,秦守哲等,1998b. 海洋肽抗皮肤老化作用的研究. 中华医学美容杂志,4(4):195—197
- 司徒镇强,吴军正,1996. 细胞培养. 北京:世界图书出版社,186
- 刘晓萍,徐 璐,于业军等,1995. 雌激素诱发大鼠免疫器官退化及与 P 物质关系的探讨. 河南医科大学学报,30(4):393—395
- 张克凌,刘晓萍,杜 卫等,2000. 日本鬼鲀蜇伤与 P 物质和生长抑素的关系及其粗毒对免疫细胞活性影响. 海洋与湖沼,31(4):378—383
- 张新宇,王 雷,李光友等,2000. 绿色巴夫藻晒多糖的提取、分离与纯化. 海洋与湖沼,31(6):643—646
- 南新升,张宗玉,黄 莉等,1992. 衰老过程中大鼠脾细胞 DNA 修复能力的变化. 中华老年医学杂志,11(5):301—305
- Clement-Lacroix P, Michel L, Moysan P *et al*, 1996. UVA-induced immune suppression in human skin: protective effect of vitamin E in human epidermal cells in vitro. British Journal of Dermatology, 134:77—84
- Collins A R, Cadet J, Epe B *et al*, 1997. Problems in the measurement of 8-Oxoguanine in human DNA Report of a work-

- shop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19—21 January. *Carcinogenesis*, 18(9):1833—1838
- Grossman C J, Sholiton L J, Roselle G, 1982. Estradiol regulation of thymic lymphocyte function in the rat: Mediation by serum factors. *J Steroid Biochem*, 16:683—686
- Kripke M L, Cox P A, Bucana C *et al*, 1996. Role of DNA damage in local suppression of contact hypersensitivity in mice by UV radiation. *Exp Dermatol*, 5(3):173—180
- Pettit G P, Srirangam J K, Barkoczy J *et al*, 1989. Isolation and structure of the cytostatic linear desipetide dotastatin 15. *J Org Chem*, 54(26):6005—6009
- Pettit G P, Srirangam J K, Barkoczy J *et al*, 1995. Antineoplastic agents 337 Synthesis of dolastatin 10 structural modifications. *Anticancer Drug Des*, 10(7):529—544
- Shreedhar V K, Pride M W, Su Y *et al*, 1998. Origin and characteristics of ultraviolet-B radiation induced suppressor T Lymphocytes. *J Immunol*, 161(3):1327—1335
- Stewart M S, Gameron G S, Pence B C *et al*, 1996. Antioxidant nutrients protect against UVB induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol*, 106(5):1086—1089

EFFECT OF POLYPEPTIDES FROM *CHLAMYS FARRERI* ON THE PROLIFERATION OF IMMUNE CELLS AND ITS PROTECTION AGAINST ULTRAVIOLET *IN VITRO*

LIU Xiao-Ping, WANG Yu-Zhen, HAN Yan-Tao, YU Ye-Jun,
WANG Yue-Jun[†], WANG Chun-Bo

(Medical College of Qingdao University, Qingdao, 266021)

[†](Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract The polypeptides isolated from *Chlamys farreri* (PCF) by modern bioengineering technique were a water soluble small molecular with biological activity. In this paper the effects of PCF on the proliferative activities of thymocytes and splenocytes and the protective effects of PCF on those immune cells under Ultraviolet (UV) oxidative damage were detected by MTT colorimetry. The results showed that PCF could reduce the ultraviolet (UV) damage on the thymocytes and splenocytes with dose dependence. In the 0.5%—10.0% concentration range the higher concentration of PCF the stronger protective effects of it. PCF could also significantly increase the proliferative activities of the thymocytes and splenocytes and could decrease or inhibit the immune suppressive effects of Estradiol on the thymocytes and splenocytes. The results indicate that PCF not only has the effect of antioxidative damage of UV irradiation but also has the effect of increasing immune function.

Key words Polypeptides from *Chlamys farreri* (PCF), Immune cells, Ultraviolet damage