



## 家蝇蛹凝集素对免疫低下小鼠免疫功能的影响

曹小红, 许程剑, 曾斌, 王春玲

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 将家蝇蛹凝集素(MPL)分别按 400  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 、800  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 、1 200  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 连续给小鼠灌胃 10 d,于第 8 d 和第 9 d 给阴性对照组和 3 个剂量组小鼠腹腔注射环磷酰胺,造成小鼠免疫功能低下. 观察家蝇蛹凝集素对免疫低下小鼠免疫器官指数、巨噬细胞的吞噬能力、脾脏淋巴细胞增殖和血清溶血值  $\text{HC}_{50}$  的影响. 结果表明,家蝇蛹凝集素能显著拮抗环磷酰胺所致免疫功能低下小鼠的免疫器官指数下降,提高巨噬细胞的吞噬能力,明显促进脾脏淋巴细胞增殖,且能使血清溶血素含量显著增加. 说明家蝇蛹凝集素对环磷酰胺所致小鼠免疫功能低下有较好的预防作用.

**关键词:** 家蝇蛹; 凝集素; 免疫低下

中图分类号: R979.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2009)06-0001-04

## Effect of Lectin Isolated from *Musca Domestica* Pupae Immune Function on Immunocompromised Mice

CAO Xiao-hong, XU Cheng-jian, ZENG Bin, WANG Chun-ling

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Mice were given MPL at three different doses 400  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ , 800  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ , 1 200  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  by gavage for ten days. At the 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> days, cyclophosphamide was injected by intraperitoneal injection to mice of negative group and three dose groups to induce immunocompromised. The effect of MPL on immunocompromised mice of immune organ index, macrophage phagocytosis of mice, index of splenic lymphocytes proliferation and serum hemolysin  $\text{HC}_{50}$  were determined. The results show that the MPL can antagonize decrease of immune organ indexes, and enhance the macrophage phagocytosis, index of splenic lymphocytes proliferation and serum hemolysin  $\text{HC}_{50}$ . In conclusion, the MPL can perform prevent function to the immunocompromised mice induced by cyclophosphamide.

**Keywords:** *Musca domestica* pupae; lectin; immunomodulation activity

家蝇生活在充满多种微生物的环境中,携带 40 多种病原微生物,是传播各种致病菌的主要害虫,而家蝇自身却很少感染,其独特的免疫防御机制引起了众多学者的兴趣. 在家蝇体内有众多的活性物质,如:多酚氧化酶<sup>[1]</sup>、抗菌肽<sup>[2]</sup>、溶菌酶和凝集素<sup>[3]</sup>等,其中凝集素的活性一直是研究的重点. 有研究表明,凝集素有免疫调节<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>、抑菌<sup>[6]</sup>等生物活性,可从微生物、植物和动物分离得到多种凝集素. 然而家蝇蛹凝集素(MPL)对于免疫低下小鼠的作用未见报

道. 本文通过腹腔注射环磷酰胺(cyclophosphamide, Cy)建立小鼠免疫功能低下模型,旨在研究家蝇蛹对免疫低下小鼠的调节作用.

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

清洁级昆明小鼠,6~12 周龄,体重(20 $\pm$ 2)g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,合

收稿日期: 2009-06-23; 修回日期: 2009-09-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20676103); 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2007AA10Z319)

作者简介: 曹小红(1961—),女(回族),天津人,教授,博士生导师, caoxh@tust.edu.cn.

格证号:SCXK-2007-004;家蝇由天津市卫生疾病防治中心赠送。

## 1.2 试剂与仪器

环磷酰胺,江苏恒瑞医药股份有限公司,生产批号:07032221;苯基硫脲,Sigma 公司;其他药品均为国产分析纯.722 型分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;酶标仪、CO<sub>2</sub> 培养箱,Thermo 公司;SW-CJ 标准型超净台,苏净集团;倒置显微镜,日本 OLYMPUS.

## 1.3 动物分组与给药

50 只小鼠随机分成 5 组:正常对照组、阴性对照组、MPL-1 组、MPL-2 组和 MPL-3 组,每组 10 只.动物实验期间,正常对照组和阴性对照组小鼠每天灌胃蒸馏水,MPL-1 组、MPL-2 组和 MPL-3 组小鼠分别以 400 μg/(kg·d)、800 μg/(kg·d) 和 1 200 μg/(kg·d) 的剂量灌胃 MPL. 第 8 d 和第 9 d 给阴性对照组和 3 个剂量组小鼠腹腔注射环磷酰胺 50 mg/kg. 小鼠于第 10 d 实验结束后处死并进行免疫指标检测.

## 1.4 脾脏指数和胸腺指数测定

末次实验 24 h 后,将小鼠处死,取出脾脏和胸腺,用生理盐水漂洗,滤纸吸干表面血污,称量脾脏和胸腺的质量,分别计算脾脏指数和胸腺指数.

## 1.5 碳粒廓清实验

实验分组同 1.3,最后 1 次实验 24 h 后,从小鼠尾静脉注入稀释的印度墨水,待墨汁注入,立即计时.在注入墨汁 2 min ( $t_1$ ) 后,眼眶取血 20 μL,并立即将其加到 2 mL 0.1% 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液中;在注入墨汁 10 min ( $t_2$ ) 后,眼眶取血 20 μL,并立即将其加到 2 mL 0.1% 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液中,各自混匀后测定 600 nm 处吸光度,以 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液作空白对照.廓清指数  $K$  按公式(1)计算.

$$K = \frac{\lg A_1 - \lg A_2}{t_1 - t_2} \quad (1)$$

式中: $A_1$  为 2 min 时的吸光度; $A_2$  为 10 min 时的吸光度.

## 1.6 血清溶血值 HC<sub>50</sub> 的测定

实验分组同 1.3,在给药第 6 d,取 2% 的绵羊红细胞(SRBC)悬液,每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 进行免疫,4 d 后摘除小鼠眼球取血于离心管内.HC<sub>50</sub> 值按照公式(2)计算.

$$HC_{50} = \frac{A_0}{A} \times \text{稀释倍数} \quad (2)$$

式中: $A_0$  为样品吸光度; $A$  为 SRBC 半数溶血时的吸光度.

## 1.7 淋巴细胞增殖实验

实验分组同 1.3,将小鼠处死,在 75% 的酒精中浸泡 5 min,取出脾脏置于盛有适量完全培养液的平皿中,冲洗脾脏至脾脏发白,收集处理液,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液重悬细胞,加入红细胞裂解液,室温静置 10 min,1 500 r/min 离心 10 min 2 次,弃上清液重悬细胞,制成单细胞悬液,调整细胞浓度为  $3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ,将脾脏细胞悬液加入 96 孔培养板,用 MMT 方法检测增殖指数.

## 1.8 统计学处理

使用 SPSS 10.0 软件统计分析所得结果,各组数据均以平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示.进行方差分析和  $t$  检验.

## 2 结 果

### 2.1 家蝇蛹凝集素对免疫低下小鼠免疫器官及体重的影响

脾脏指数和胸腺指数是反映机体免疫功能的最基本和最常规的指标,已被广泛用于评价机体的整体免疫状态<sup>[7]</sup>.脾脏指数与胸腺指数的增高,在一定程度上预示着机体免疫水平的提高或改善.MPL 对 Cy 致免疫低下小鼠免疫器官的影响结果见表 1.

表 1 MPL 对 Cy 致免疫低下小鼠免疫器官的影响 ( $n=10$ )  
Tab.1 Effect of MPL on immunity organize of the immunocompromised mice induced by Cy ( $n=10$ )

组别	脾脏指数	胸腺指数	小鼠体重/g
正常对照组	3.21 ± 0.24	1.15 ± 0.17	32.00 ± 1.54
阴性对照组	1.73 ± 0.38 <sup>▲▲</sup>	0.63 ± 0.15 <sup>▲▲</sup>	31.98 ± 1.80
MPL-1	2.21 ± 0.31 <sup>*</sup>	0.70 ± 0.21 <sup>*</sup>	32.96 ± 1.29
MPL-2	2.56 ± 0.12 <sup>*</sup>	0.72 ± 0.18 <sup>*</sup>	33.76 ± 0.76
MPL-3	2.82 ± 0.18 <sup>*</sup>	0.73 ± 0.16 <sup>*</sup>	33.43 ± 1.12

注:与正常对照组比较,▲▲ $P < 0.01$ ;与阴性对照组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ .

由表 1 可见,MPL 可以提高免疫低下小鼠的胸腺指数和脾脏指数,与阴性对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );阴性对照组与正常对照组比较有显著差异 ( $P < 0.05$ ).实验各组中小鼠的体重变化无明显差异.这说明 MPL 对环磷酰胺所致的免疫器官损伤有很好的拮抗作用,随着灌胃剂量增加,脾脏指数和胸腺指数同阴性对照组比较有显著差别.实验结束时,给药组小鼠体重略有增加,但各组之间没有显著性差异.

### 2.2 家蝇蛹凝集素对免疫低下小鼠非特异性免疫水平的影响

小鼠碳粒廓清实验可反映网状内皮系统的吞噬

功能,吞噬指数反映单核巨噬细胞的吞噬能力.单核巨噬细胞的吞噬功能是衡量机体非特异性免疫功能的指标之一<sup>[8]</sup>.MPL对Cy致免疫低下小鼠非特异性免疫功能的影响见表2.

表2 MPL对Cy致免疫低下小鼠非特异性免疫功能的影响( $n=10$ )

Tab.2 Effect of MPL on non-specific immune function of the immunocompromised mice induced by Cy ( $n=10$ )

组别	剂量/ $(\mu\text{g}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1})$	廓清指数
正常对照组	0	$3.83 \pm 0.21$
阴性对照组	0	$1.59 \pm 0.12^{\Delta\Delta}$
MPL-1	400	$1.83 \pm 0.24^*$
MPL-2	800	$2.34 \pm 0.27^{**}$
MPL-3	1 200	$2.47 \pm 0.17^{**}$

注:与正常对照组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ ;与阴性对照组比较, $*P<0.05$ , $**P<0.01$ .

结果表明,阴性对照组与正常对照组比较有显著差异( $P<0.01$ ),说明处于免疫力低下模型小鼠的巨噬细胞吞噬活性显著降低,当灌胃高剂量的MPL时,小鼠的吞噬指数与阴性对照组比较有显著差异( $P<0.01$ ),说明灌胃一定剂量的MPL可以改善巨噬细胞的吞噬活性.

### 2.3 家蝇蛹凝集素对免疫低下小鼠体液免疫水平的影响

血清中溶血素含量的高低,反映机体合成抗体的能力.血清中抗体IgM或IgG的测定是检测体液免疫功能的重要指标<sup>[9]</sup>.对免疫低下小鼠体液免疫水平的血清溶血值( $\text{HC}_{50}$ )进行测定,结果见表3.

表3 MPL对Cy致免疫低下小鼠体液免疫功能的影响( $n=10$ )

Tab.3 Effect of MPL on humoral immune function of the immunocompromised mice induced by Cy ( $n=10$ )

组别	剂量/ $(\mu\text{g}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1})$	$\text{HC}_{50}$
正常对照组	0	$71.36 \pm 4.17$
阴性对照组	0	$41.51 \pm 2.13^{\Delta\Delta}$
MPL-1	400	$42.35 \pm 3.29$
MPL-2	800	$48.10 \pm 2.84^*$
MPL-3	1 200	$52.85 \pm 4.76^{**}$

注:与正常对照组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ ;与阴性对照组比较, $*P<0.05$ , $**P<0.01$ .

结果表明,与阴性对照组比较,中剂量的MPL能明显改善免疫低下小鼠的特异性体液免疫能力,随着给药剂量的提高, $\text{HC}_{50}$ 的数值也相应提高,说明MPL可以改善免疫低下小鼠的体液水平,而低剂量组的效果并不明显.

### 2.4 家蝇蛹凝集素对免疫低下小鼠脾脏淋巴细胞增殖指数的影响

淋巴细胞增殖和分化是机体免疫应答过程中非常重要的阶段.检测淋巴细胞增殖水平是研究细胞免疫的一种常用方法.淋巴细胞增殖指数表明,随着给药剂量的增加,淋巴细胞增殖率提高,与阴性对照组比较,各给药组MPL能明显改善免疫低下小鼠的细胞免疫水平(表4),说明MPL对机体的细胞免疫水平调节显著,这种调节作用要优于对体液免疫水平的调节.

表4 MPL对Cy致免疫低下小鼠脾脏淋巴细胞增殖指数的影响( $n=10$ )

Tab.4 Effect of MPL on spleen lymphocyte proliferation ability of the immunocompromised mice induced by Cy ( $n=10$ )

组别	剂量/ $(\mu\text{g}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1})$	增殖指数
正常对照组	0	$2.71 \pm 0.21$
阴性对照组	0	$1.52 \pm 0.12^{\Delta\Delta}$
MPL-1	400	$2.13 \pm 0.20^{**}$
MPL-2	800	$2.24 \pm 0.13^{**}$
MPL-3	1 200	$2.43 \pm 0.23^*$

注:与正常对照组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ ;与阴性对照组比较, $*P<0.05$ , $**P<0.01$ .

## 3 讨论

环磷酰胺是临床常用的化疗用药之一,其不良反应可使血小板和白细胞数减少,抑制淋巴细胞的增殖能力,也给免疫器官如脾脏带来损伤,使机体免疫力下降.环磷酰胺所致免疫低下小鼠是研究药物免疫调节作用的动物模型<sup>[10]</sup>.

机体的免疫系统是由非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫共同构成的防御系统.脾脏内B淋巴细胞约占淋巴细胞总数的55%,脾脏还拥有全身循环T淋巴细胞的25%,直接参与细胞免疫与体液免疫,脾脏是重要的免疫器官.胸腺是T淋巴细胞分化成熟的场所<sup>[9,11]</sup>.MPL可提高免疫低下小鼠脾脏指数和胸腺指数,而对小鼠的体重影响不明显.单核吞噬细胞,包括骨髓中的前单核细胞、外周血中的单核细胞以及组织内的巨噬细胞,参与机体非特异性免疫和特异性免疫<sup>[12]</sup>.同时单核吞噬细胞也是机体防御系统的第一道防线,外来的致病因子或体内突变的细胞最先受到单核吞噬细胞的抵御.在非特异性免疫中主要通过吞噬作用杀灭和清除病原体和异物,并介导炎症反应;在特异性免疫中,巨噬细胞作为抗原递呈细胞与T淋巴细胞相互作用,从而调节机体特异性免疫应答反应<sup>[13]</sup>.

实验结果表明, MPL 对免疫低下小鼠的非特异性免疫功能有提高的作用. 机体的非特异性免疫增强有利于对异物的清除, 提高机体的免疫防御能力. 当病原微生物侵入机体后, 巨噬细胞可迅速将其吞噬和清除, 当巨噬细胞活性增强会释放各种细胞因子, 如一氧化氮(NO)是免疫系统应对细菌、病毒、肿瘤细胞等病原体的有效物质. 溶血素测定不仅反映抗体形成细胞的数量, 也反映合成抗体的能力. 血清溶血实验是体液中抗体、补体等免疫因子参与的免疫反应, 在免疫反应中发挥重要作用. 由于抗体 IgM 和 IgG 能够与周围相应的可溶性抗原结合成抗原抗体复合物, 当补体存在时, 可通过经典途径激活补体, 发挥溶解细胞的作用. 用绵羊红细胞(SRBC)免疫动物后, B 淋巴细胞受抗原刺激, 分化为浆细胞, 浆细胞产生抗体(免疫球蛋白)——血清溶血素, 其含量反映了被 SRBC 免疫后的小鼠特异性体液免疫的功能. 当给小鼠灌胃凝集素时, 凝集素能够提高机体抗体水平, 同阴性对照组比较, 高剂量的 MPL 对机体的体液免疫水平促进作用最为明显.

关于家蝇凝集素的免疫调节功能, 本文从小鼠免疫器官指数、单核吞噬细胞活力、抗体产生水平以及淋巴细胞增殖方面进行研究的结果表明, MPL 能够拮抗环磷酸胺所致的免疫低下小鼠的免疫器官指数下降, 调节机体抗体的产生, 提高淋巴细胞增殖活性, 活化巨噬细胞, 增强其吞噬能力. MPL 对小鼠淋巴细胞增殖作用最为明显, 低剂量组同阴性对照组比较有显著性差异, 而 MPL 对体液免疫、免疫器官和单核吞噬细胞吞噬活性相对较弱, 此结果可能与脾脏与胸腺中淋巴细胞的比例不同有关. 胸腺组织 T 淋巴细胞分化成熟的场所, 脾脏中的免疫细胞以成熟 B 细胞为主, 脾脏内 B 淋巴细胞约占淋巴细胞总数的 55%, MPL 可能对于 B 淋巴细胞的作用效果更明显.

#### 参考文献:

- [1] 王妮, 冯江, 王振堂, 等. 对虾暴发性流行病的群体感染及投饲蝇幼的抗病机制研究[J]. 应用生态学报, 2006, 13(6): 728-730.
- [2] Meylaers K, Clynen E, Daloze D, et al. Identification of 1-lysophosphatidylethanolamine ( $C_{16:1}$ ) as an antimicrobial compound in the housefly, *Musca domestica*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 34(1): 43-49.
- [3] 曹小红, 毛德志, 许程剑, 等. 一种新型家蝇凝集素结构的初步探讨[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(4): 93-97.
- [4] Ngai P H, Ng T B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes and antiproliferative activity toward tumor cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 314(4): 988-993.
- [5] Andrade C A, Correia M T, Coelho L C, et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2004, 278(2): 433-435.
- [6] Gowda N M, Goswami U, Khan M I. T-antigen binding lectin with antibacterial activity from marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*): Possible involvement in differential recognition of bacteria[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 99(2): 141-145.
- [7] YANG Rui-yue, ZHANG Zhao-feng, PEI Xin-yong, et al. Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice [J]. Food Chemistry, 2009, 113(2): 454-470.
- [8] YUAN Cheng-fu, HUANG Xiu-ning, CHENG Li, et al. Evaluation of antioxidant and immune activity of *Phellinus ribis* glucan in mice[J]. Food Chemistry, 2009, 115(2): 581-584.
- [9] 康文红, 王庆伟, 高翔, 等. 早莲草乙酸乙酯总提物对小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群影响[J]. 安徽中医学院学报, 2000, 19(6): 52-53.
- [10] 张李峰, 马兴铭, 刘燕玲, 等. 醋酸舍莫瑞林拮抗环磷酸胺免疫抑制作用的实验研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(1): 98-99.
- [11] 张涛, 柳朝阳, 陈光. 八珍汤对小鼠免疫功能的影响[J]. 黑龙江医药科学, 2003, 26(4): 53.
- [12] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 120-123.
- [13] 刘杰麟, 费樱. 戴氏虫草和粉被虫草多糖对巨噬细胞等活性的影响[J]. 免疫学杂志, 17(3): 189-191.