

5'-核苷酸对小鼠获得性免疫调节作用研究

赵明¹, 杨睿悦^{1,2}, 张召锋¹, 梁江¹, 李琼¹, 王军波¹, 李勇¹

1. 北京大学医学部公共卫生学院营养与食品卫生学系, 北京 100191
2. 卫生部北京医院/卫生部北京老年医学研究所; 卫生部老年医学重点实验室, 北京 100730

摘要 为了评价 5'-核苷酸对小鼠获得性免疫功能的影响, 将健康雌性 BALB/c 小鼠以普通饲料、无核苷酸饲料(NF)及不同剂量 5'-核苷酸的饲料(0.0025%, 0.01%, 0.04%, 0.16%)喂养 4 周后, 观察小鼠细胞免疫功能、体液免疫功能、血清免疫球蛋白水平以及脾脏淋巴细胞亚群的变化。结果显示无核苷酸饮食可以显著减弱淋巴细胞增殖能力 (OD 差值 0.06 ± 0.03) 和足跖肿胀度 (0.12 ± 0.06)mm; $CD4^+/CD8^+$ (1.90 ± 0.12) 显著下降, T 调节细胞比例 (5.56 ± 0.11)% 显著升高; 溶血空斑数 (1.48 ± 0.21) 有减弱趋势。饲料中添加 5'-核苷酸后, 免疫水平有所回升。当添加到 0.04% 时, 小鼠的各项免疫水平平均比 NF 组有显著提高, 达到正常对照组水平。总之, 无核苷酸饲料喂养小鼠免疫功能降低。在无核苷酸饲料中添加 5'-核苷酸能恢复小鼠免疫功能, 当饲料中核苷酸含量为 0.04% 时小鼠免疫功能恢复到最佳水平。

关键词 核苷酸; 免疫调节; 免疫球蛋白; T 细胞亚群; 小鼠

中图分类号 Q352

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)06-0046-04

Effects of 5'-nucleotides on Modulation of Adaptive Immunity of Mice

ZHAO Ming¹, YANG Ruiyue^{1,2}, ZHANG Zhaofeng¹, LIANG Jiang¹, LI Qiong¹, WANG Junbo¹, LI Yong¹

1. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China
2. Key Laboratory of Geriatrics; Beijing Hospital & Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing 100730, China

Abstract To study the effects of 5'-nucleotides on modulation of adaptive immunity of mice and to determine the best dosage, female BALB/c mice were administered with common control diet, Nucleotides-Free (NF) diet and NF diet with 0.0025%, 0.01%, 0.04%, 0.16% 5'-nucleotides for 4 weeks. Cellular immune functions, humoral immune functions, the level of immunoglobulin in serum and splenic T cell subpopulations of the spleen tissue by the flow cytometer were examined. The results show that with the NF diet, the capacity of lymphocyte proliferation induced by ConA (0.06 ± 0.03) and DTH response (0.12 ± 0.06)mm are significantly reduced; the ratio of $CD4^+/CD8^+$ is decreased (1.90 ± 0.12) while Tr percentage is increased (5.56 ± 0.11). A decrease trend of B lymphocytes antibody response was observed. The NF diet with 5'-nucleotides can prevent these decreases. At the dose of 0.04%, the immunological functions are increased significantly as compared with those of NF group, reaching normal values. The results indicate that the NF diet can impair the immunological function of mice, while the NF diet with 5'-nucleotides can prevent the decrease, and 0.04% is the best dose.

Keywords nucleotides; immunomodulate; immunoglobulin; T subset; mice

0 引言

不同食物中核酸的含量有很大差别, 动物内脏和豆类中核酸含量丰富, 而牛奶和蛋类中的核酸含量较低^[1]。近年来, 关于口服核酸类物质是否具有免疫调节功能问题争论不断。

通过综述文献, 发现目前对核酸类物质调节免疫的研究主要集中在获得性免疫部分(T、B 细胞)。然而在不同的研究中, 受试物包括了 RNA、DNA 以及核苷酸, 并且受试物的剂量也有很大的不同^[1]。本研究认为这些不同可能是造成现在结果有

收稿日期: 2009-12-30

作者简介: 赵明, 硕士研究生, 研究方向为营养与食品卫生学, 电子信箱: zhm-826@sohu.com; 王军波 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: M100109299M, M180200752M), 副教授, 研究方向为营养与疾病, 电子信箱: bmuwjby@bjmu.edu.cn

分歧的原因。

与核酸相比,5'-核苷酸在肠道中不需要被胰核酸酶降解,可能更容易被人体吸收,因此本研究采用5'-核苷酸作为受试物,无核苷酸饲料(Nucleotide-Free diet, NF diet)和普通饲料作为对照,探讨不同膳食5'-核苷酸水平对获得性免疫的影响,以探讨口服核苷酸调节免疫水平的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/c 健康雌性小鼠(北京大学医学部实验动物中心),120只,6~8周龄,体重18~22g,清洁级,合格证号:医动字SCXK(京)-2006-0008。将小鼠分为两批进行实验,每批随机分为6组,每组10只。第1批小鼠进行脏器/体重比值测定、迟发型变态反应实验、半数溶血值(HC₅₀)的测定和抗体生成细胞数的测定;第2批小鼠进行ConA诱导的小鼠淋巴细胞转化实验、脾脏T淋巴细胞百分比和血清免疫球蛋白水平测定。

1.2 主要仪器和试剂

核苷酸(5'-AMP:5'-CMP:5'-GMPNa₂:5'-UMPNa₂=22.8:26.6:30.2:20.4)(大连珍奥集团股份有限公司)。酶标仪(美国Bio-Rad公司),二氧化碳培养箱(日本Sanyo公司),FACSCalibur型流式细胞仪(美国BD公司)。ConA、MTT、琼脂糖、SDS(美国Sigma公司);藻红蛋白(PE)标记的抗小鼠CD4单抗、别藻蓝蛋白(APC)标记的抗小鼠CD8单抗、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗小鼠CD3单抗(美国Invitrogen公司)、胎牛血清、RPMI1640培养液(美国Hyclone公司);绵羊红细胞(SRBC)(北京大学医学部实验动物中心)。其余试剂均为分析纯。

1.3 剂量分组

设正常对照组、NF对照组以及4个5'-核苷酸剂量组,每组20只小鼠。正常对照组喂普通饲料,普通饲料主要由大小麦、碎米、豆饼、玉米、骨粉等组成,含核苷酸约为0.05%。NF对照组喂无核苷酸饲料。4个5'-核苷酸剂量组分别喂含有0.0025%、0.01%、0.04%、0.16%的5'-核苷酸的饲料,分别为0.0025、0.01、0.04、0.16g/kg体重(g/kg(BW))。实验期间动物自由进食、饮水。每周记录体重和进食量,4周后检测各项免疫指标。

1.4 免疫指标检测

1.4.1 细胞免疫和体液免疫

参照文献[2]方法进行检测。细胞免疫水平通过ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖能力和迟发型变态反应(DTH)反映;体液免疫水平通过溶血空斑数检测及血清溶血素(HC₅₀)反映。ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖能力测定采用MTT法,DTH采用足跖肿胀法。溶血空斑数检测:以2%(V/V)羊红细胞(SRBC)免疫小鼠,4d后,按前述方法制备浓度为5×10⁶/mL的脾细胞悬液,采用Jerne改良玻片法,计数溶血空斑数,以空斑数/5×10⁶脾细胞表示。血清溶血素测定:以2%(V/V)

SRBC免疫小鼠,4d后,摘眼球取血,分离血清,进行溶血反应,测定光密度值。溶血素的量以HC₅₀表示,HC₅₀=样品光密度值/SRBC半数溶血时光密度值×稀释倍数。

1.4.2 流式细胞仪检测小鼠脾脏T细胞亚群百分比

实验4周后,小鼠颈椎脱臼处死,取脾脏,磨碎,过滤(200目),洗涤,裂解红细胞,悬浮,制备成细胞浓度为1×10⁶/mL脾细胞悬液。每份样品编3支试管,每管加上述脾单细胞悬液1mL,离心弃上清,加1mL PBS缓冲液(pH=7.0)洗涤2次,再按组分别加入荧光标记的抗小鼠的各种CD单克隆抗体(按试剂说明书操作),室温(18~25℃)避光孵育15min进行染色。然后再用PBS洗2次,加入300μL PBS待上机,按使用说明书用流式细胞仪检测各细胞群百分比^[3-4]。

1.4.3 血清免疫球蛋白水平测定

采用免疫比浊法琼脂内单向免疫扩散法测定血清中免疫球蛋白IgG、IgM的值,试剂盒由北京德易生物医学技术有限公司提供。

1.5 统计方法

所有结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 11.0统计软件进行单因素方差分析。并用LSD法比较各实验组与对照组的差异。

2 结果

2.1 5'-核苷酸对小鼠免疫功能的影响

给予小鼠无核苷酸饲料4周后,与正常对照组比较,ConA诱导的淋巴细胞增殖能力和足跖肿胀度降低有统计学意义($P < 0.05$);溶血空斑数有所降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。而在饲料中添加不同剂量的5'-核苷酸后,小鼠各项免疫功能有所恢复。0.04%组的淋巴细胞增殖能力、足跖肿胀度以及溶血空斑数与NF对照组比较有提高,有统计学意义($P < 0.05$),并达到正常对照组水平($P > 0.05$)(表1)。

2.2 5'-核苷酸对小鼠血清免疫球蛋白分泌的影响

由表2可见,与正常对照组比较,NF对照组的小鼠血清免疫球蛋白IgG、IgM水平均有所下降,但差异无显著性。与NF对照组比较,各剂量组的免疫球蛋白水平均有所提高,其中0.04g/kg(BW)组的IgG、IgM水平的增加具有显著性($P < 0.05$)。即补充核苷酸可提高小鼠血清中免疫球蛋白水平,从而提高体液免疫功能。

2.3 5'-核苷酸对小鼠脾脏淋巴细胞亚群百分比的影响

由表3可见,给予小鼠无核苷酸饲料4周后,与正常对照组比较,NF对照组的小鼠脾脏CD4⁺/CD8⁺的比值显著降低($P < 0.05$),CD4⁺CD25⁺细胞(T调节细胞)百分比显著提高($P < 0.05$);CD3⁺T细胞百分比、CD4⁺T细胞亚群百分比均有所降低,但差异无显著性。与NF对照组相比,0.04g/kg(BW)组的CD4⁺T细胞亚群百分比以及CD4⁺/CD8⁺比值均显著提高($P < 0.05$),CD4⁺CD25⁺细胞(T调节细胞)百分比显著降低($P < 0.05$)。而在各剂量组,CD8⁺细胞的比例未见明显变化。

表 1 5'-核苷酸对小鼠免疫功能影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Effects of 5'-nucleotides on T/B cells' immune response ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	淋巴细胞增殖能力 (OD 差值)	足跖肿胀度 /mm	溶血空斑数(5×10^6 个细 胞)的对数转换值	样品半数溶血值(HC_{50})
正常对照组	0.19±0.11 ^b	0.27±0.18 ^b	1.52±0.24	141.37±11.60
NF 对照组	0.06±0.03 ^a	0.12±0.06 ^a	1.48±0.21	141.75±10.80
0.0025%组	0.04±0.04 ^a	0.14±0.04 ^a	1.60±0.16	145.87±8.82
0.01%组	0.12±0.11	0.23±0.11 ^b	1.59±0.22	153.05±11.77
0.04%组	0.17±0.13 ^b	0.31±0.12 ^b	1.73±0.25 ^b	165.47±19.05 ^{ab}
0.16%组	0.08±0.05 ^a	0.22±0.06	1.61±0.17	139.25±14.19

注:a 为与正常对照组比较, $P<0.05$; b 为与 NF 对照组比较, $P<0.05$ 。

Notes: a, compared with control group, $P<0.05$; b, compared with nucleotides-free group, $P<0.05$.

表 2 5'-核苷酸对小鼠血清免疫球蛋白 IgG、IgM 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Effects of 5'-nucleotides on serum IgG and IgM ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	IgG/($g\cdot L^{-1}$)	IgM/($g\cdot L^{-1}$)
正常对照组	0.620±0.225	0.364±0.043
NF 对照组	0.586±0.122	0.343±0.034
0.0025%组	0.707±0.224	0.346±0.054
0.01%组	0.662±0.164	0.385±0.055
0.04%组	0.830±0.156 ^{ab}	0.390±0.082 ^b
0.16%组	61.93±16.40	37.58±5.82

注:a 为与正常对照组比较, $P<0.05$; b 为与 NF 对照组比较, $P<0.05$ 。

Notes: a, compared with control group, $P<0.05$; b, compared with nucleotides-free group, $P<0.05$.

3 讨论

核苷酸是组成 DNA、RNA 的物质, 对维持机体的各项功能具有重要意义。对于免疫细胞, 因为自身合成核苷酸的能力有限, 所以额外补充的意义格外重要。现已有研究表明, 母乳中含有的核苷酸可以促进婴儿的免疫反应, 提高抗病毒的能力^[5-6]。此外, 也有多项试验表明核苷酸能调节成年小鼠的炎性细胞因子、免疫球蛋白的分泌^[7-9]。但是, 现有文献中采用的核苷酸添加剂量差别较大, 从 0.025% 到 0.5%^[7-9]。因此, 本研究设定了 4 个剂量梯度, 并使用正常饲料及 NF 饲料作为对照, 以探讨膳食中核苷酸的最佳剂量。

本实验表明膳食中的核苷酸对机体的细胞免疫和体液免疫功能均有影响。与正常对照组相比, NF 组小鼠多种免疫反应水平降低。在无核苷酸饲料中添加 5'-核苷酸后, 小鼠免

表 3 5'-核苷酸对小鼠脾脏淋巴细胞群百分比的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Effects of 5'-nucleotides on splenic T lymphocyte subpopulations

组别	细胞数量/%				
	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD25 ⁺
正常对照组	42.66±3.87	29.46±2.54	13.20±1.33	2.23±0.03 ^b	5.14±0.28 ^b
NF 对照组	35.50±0.86	23.23±0.04	12.28±0.83	1.90±0.12 ^a	5.56±0.11 ^a
0.0025%组	38.87±0.63	26.64±0.39	12.23±0.24	2.20±0.01 ^b	5.41±0.10
0.01%组	41.70±0.22	28.40±0.90	13.30±0.68	2.14±0.18	5.35±0.17
0.04%组	43.81±4.67	30.63±2.69 ^b	13.18±1.99	2.33±0.15 ^b	4.74±0.15 ^b
0.16%组	42.82±7.57	29.88±5.61	12.94±1.97	2.30±0.08 ^b	5.34±0.12

注:a 为与正常对照组比较有显著性差异, $P<0.05$; b 为与 NF 对照组比较有显著性差异, $P<0.05$ 。

Notes: a, compared with control group, significant difference, $P<0.05$; b, compared with nucleotides-free group, significant difference, $P<0.05$.

疫水平回升。这与以往的研究结果相似^[7-9]。在添加量为 0.04% 时, 小鼠的 T、B 细胞免疫反应水平与 NF 组相比有显著提高, 且各项免疫反应水平达到普通饲料组水平。本研究结果说明在膳食中缺乏核苷酸的情况下, 补充核苷酸可以调节机体的多项免疫力; 而 0.04% 可能是维持正常免疫功能的适宜剂量。

目前研究证实, T 淋巴细胞亚群是反映机体免疫系统内环境稳定状况的重要指标^[10]。在淋巴细胞亚群的分析中, 5'-核苷酸主要影响 Th 细胞(CD4⁺)和 Tr 细胞(CD4⁺CD25⁺), 而对 Tc 细胞(CD8⁺)影响不明显。因此可以推测 5'-核苷酸是通过增加 Th 细胞和减少 Tr 细胞比例增强细胞免疫反应强度的。

Th 细胞是重要的免疫细胞,与抗结核、抗隐孢子虫感染以及自身免疫性疾病的发生、发展有重要关联^[11-12]。因此膳食中的核苷酸含量可能会影响这些疾病的发展。此外,多项指标显示无核苷酸饲料组体液免疫水平的下降没有显著性,而补充 5'-核苷酸可显著增加血清免疫球蛋白的水平。这提示缺乏外源性核苷酸对体液免疫功能的影响不明显,但是补充核苷酸可以通过促进体内抗体生成从而提高机体免疫功能。外源核苷酸对 T、B 细胞免疫功能影响的不同提示核苷酸对两种细胞的影响方式可能不同。

4 结论

本研究提示核苷酸是维持机体正常免疫功能的必要物质,饲料核苷酸水平达到 0.04% 即可满足机体的生理需要。然而,初文峰等^[13-14]的实验表明对于老龄大鼠,正常饲料外每日补充核酸 0.33g/kg(BW)可以提高免疫力。因此,对于异常免疫状态下核苷酸的作用及作用剂量还需要进一步的研究。

参考文献 (References)

- [1] 林晓明, 李勇. 高级营养学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2004: 63-76.
Lin Xiaoming, Li Yong. Advanced nutrition [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2004: 63-76.
- [2] Yang R Y, Zhang Z F, Pei X R, et al. Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice[J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(2): 464-470.
- [3] Guo T L, McCay J A, Brown R D, et al. Glycidol modulation of the immune responses in female B6C3F1 mice[J]. *Drug Chem Toxicol*, 2000, 23: 433-457.
- [4] Wimolnut A, Benjamart C, Vanessa P, et al. Immunomodulation by Dok Din Daeng (*Aeginetia indica* Roxb.) extracts in female B6C3F1 mice (I): Stimulation of T cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4: 1367-1379.
- [5] Yau K-I T, Huang C-B, Chen Q, et al. Effect of nucleotides on diarrhea and immune responses in healthy term infants in Taiwan[J].

- Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2003, 36: 37-43.
- [6] Martinez-Puig D, Manzanilla E G, Morales J, et al. Dietary nucleotide supplementation reduces occurrence of diarrhoea in early weaned pigs[J]. *Livestock Science*, 2007, 108: 276-279.
- [7] Nagafuchi S, Hachimura S, Totsuka M, et al. Dietary nucleotides can up-regulate antigen-specific Th1 immune responses and suppress antigen-specific IgE responses in mice [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2000, 122 (1): 33-41.
- [8] Jyonouchi H, Sun S, Abiru T, et al. Dietary nucleotides modulate antigen-specific type 1 and type 2 t-cell responses in young c57bl/6 mice[J]. *Nutrition*, 2000, 16(6): 442-446.
- [9] 王兰芳, 乐国伟, 施用晖, 等. 外源核苷酸对小鼠免疫功能的影响[J]. 营养学报, 2003, 25(3): 298-301.
Wang Lanfang, Le Guowei, Shi Yonghui, et al. *Acta Nutramenta Sinica*, 2003, 25(3): 298-301.
- [10] Srijjala H, Surcel H M, Ilonen J. Low CD4/CD8 lymphocyte ratio in acute myocardial infarct[J]. *Clin Exp Immunol*, 1991, 83: 326-328.
- [11] 王霞芳. 耐药药肺结核患者 T 淋巴细胞亚群测定的临床意义 [J]. 苏州医学院学报, 1999, 19(11): 1174-1175.
Wang Xiafang. *Acta Academiae Medicine Suzhou*, 1999, 19(11): 1174-1175.
- [12] 梁俊文, 黄克和, 王海涛. 锌与维生素 A 对隐孢子虫感染小鼠免疫功能的影响[J]. 中国兽医科技, 2005, 35(3): 211-215.
Liang Junwen, Huang Kehe, Wang Haitao. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2005, 35(3): 211-215.
- [13] 初文峰, 杜伯雨, 李蓉, 等. 鲑鱼鱼白 DNA 对老龄小鼠胸腺淋巴细胞构成的影响[J]. 免疫学杂志, 2003, 19(2): 89-92.
Chu Wenfeng, Du boyu, Li Rong, et al. *Immunological Journal*, 2003, 19(2): 89-92.
- [14] 初文峰, 杜伯雨, 陈文华, 等. 鲑鱼鱼白 DNA 对老龄小鼠胸腺细胞 IL-7 mRNA 和 CD127 表达的影响[J]. 免疫学杂志, 2004, 20(1): 13-16.
Chu Wenfeng, Du boyu, Chen Wenhua, et al. *Immunological Journal*, 2004, 20(1): 13-16.

(责任编辑 王芷)

·学术动态·

“2010 年中国药学会大会”征文



由中国药学会主办的“2010 年中国药学会大会暨第十届中国药师周”将于 2010 年 10 月下旬在杭州市举行。大会主题是: 发展生物医药新型产业, 保障人民身体健康。

征文范围如下: 生化与生物技术药物、中药和天然药物、药剂、抗生素、药物分析、药物化学、制药工程、医院药学、老年药学、海洋药物、药事管理、军事药学、药物流行病学、应用药理、药物经济学、药学史、医药知识产权研究、药物安全评价研究、药物临床评价研究以及药物信息研究与利用。全文截稿日期为 2010 年 9 月 10 日。

会议网站: <http://www.cpa.org.cn/Article/xhdt/201003/1289.asp>

联系方式: 北京市朝阳区建外大街四号建外 SOHO 九号楼 18 层 1802 室 (100022), 孙文虹。

电话: 010-58699280-819; 传真: 010-58694812; 电子信箱: sunwenhong2002@163.com。