

米糠多糖的免疫增强作用

刘梁¹,孙维矿¹,赵玲¹,李赫宇²,陈新^{1,*}

(1. 武汉轻工大学生物与制药工程学院,湖北 武汉 430023;2. 天津市益倍建生物技术有限公司,天津 300457)

摘要:从脱脂米糠中提取的粗多糖SPK-1以及纯化精制多糖SPK-2、SPK-3、SPK-4具有显著生物活性,具有增强免疫调节的功能。从细胞因子的层次考察了米糠多糖SPK-1,2,3,4对小鼠脾脏淋巴细胞活性、ConA和LPS丝裂原诱导的脾脏淋巴细胞活化增殖以及LPS、ConA诱导脾脏淋巴细胞分泌IFN- γ 、IL-2、IL-10、IL-12、IL-17等细胞因子的影响。研究发现,SPK-1,2,3,4在体外都有显著增强小鼠脾脏淋巴细胞活性,而且均有促进小鼠脾脏淋巴细胞分泌IFN- γ 、IL-2以及抑制IL-10、IL-12、IL-17因子分泌的作用。

关键词:米糠多糖;免疫增强;细胞活性

The Effect of Immune Enhancement of Rice Bran Polysaccharide

LIU Liang¹, SUN Wei-kuang¹, ZHAO Ling¹, LI He-yu², CHEN Xin^{1,*}

(1. School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, Hubei, China; 2. Tianjin Ubasic health Nutrition Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: Crude polysaccharide SPK-1 and purification of polysaccharide SPK-2, SPK-3, SPK-4 were extracted from defatted rice bran. These polysaccharides have significant biological activity of enhancing immune regulation. The experiments on a cellular level investigated SPK-1,2,3,4 the influence on the mouse spleen lymphocyte activity, the mitogen and proliferation of spleen lymphocyte induced by ConA and LPS, and the levels of spleen lymphocyte secreting IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12, IL-17 cell factor induced by ConA and LPS. The study found that SPK-1, 2, 3, 4 have significantly effects of enhancing the activity of mouse spleen lymphocytes in vitro. They also can promote the secretion level of IFN- γ , IL-2 and inhibition of IL-10, IL-12, IL-17 in murine spleen lymphocytes.

Key words: rice bran polysaccharide; immune enhancement; cell activity

米糠是一种具有很大潜力的优质食品原料,国内外都非常重视米糠的开发利用^[1]。米糠多糖有着很好的生理功能,较强的抗肿瘤和降血清胆固醇功能,对提高免疫力和降低血糖水平等也有一定功效,可用于药品、保健营养品及化妆品的原料或添加剂,有着较广阔的应用领域^[2-8]。近20年来,对多糖免疫活性的研究是免疫药理学领域的研究热点之一^[9-10]。前期工作中,我们通过提取、膜分离、醇沉、酶解、冷冻干燥等手段从米糠中提取分离得到不同纯度和分子量的米糠多糖SPK-1、SPK-2、SPK-3、SPK-4。本文主要通过研

究以上4种米糠多糖样品对体外小鼠脾脏淋巴细胞活性的影响,以及样品对细胞因子IFN- γ 、IL-2、IL-10、IL-12、IL-17分泌的影响,考察米糠多糖的免疫增强作用,为进一步揭示SPK-1、SPK-2、SPK-3、SPK-4免疫增强作用的机理提供支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

由本实验室从米糠中分离得到的米糠多糖SPK-1、SPK-2、SPK-3、SPK-4。CCK-8试剂盒:日本同仁化学;二甲基亚砜(DMSO,分析纯)、胎牛血清:FBS,上海玉博生物科技公司;RPMI-1640培养液:青岛海博生物技术有限公司;细菌脂多糖:LPS,Sigma公司;刀豆

作者简介:刘梁(1981—),男(汉),讲师,博士,研究方向:食品功能因子研究与开发。

* 通信作者

蛋白-A:ConA,Sigma公司。

1.2 仪器和设备

SpectraMax M2e 酶标仪:美国 Molecular Devices 公司;细胞计数板:上海市求精生化试剂仪器有限公司;24、96 孔细胞培养板:美国 Corning 公司;XS204 型 Mettler Toledo 分析天平:瑞士 Mettler Toledo 公司;HH-2 型数显恒温水浴锅:常州国华电器有限公司;CO₂ 培养箱:美国 Revco 公司;HITACHI-CR22G 高速冷冻离心机:日本日立电器公司;UV-5800PC 型紫外-可见分光光度计:上海元析仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 米糠多糖样品溶液的配制及小鼠脾脏淋巴细胞的制备

分别称取 25 mg 米糠多糖 SPK-1、SPK-2、SPK-3、SPK-4, 用含 10 %FBS 的 RPMI-1640 培养液溶解并定容到 100 mL, 过滤除菌后, 用含 10 %FBS 的 RPMI-1640 培养液稀释至所需浓度, 备用。

将 C57BL/6 小鼠用颈椎脱臼的方法处死, 75 % 酒精浸泡消毒, 在无菌条件下取其脾脏, 剔除结缔组织, 先用生理盐水清洗 3 次, 然后放入含 10 %FBS 的 RPMI-1640 培养液的培养皿中, 用剪刀将脾脏剪成碎片后, 用毛玻片轻柔研磨, 过 200 目不锈钢细胞筛, 用含 10 %FBS 的 RPMI-1640 培养液冲洗网筛, 收集滤过的细胞悬液, 离心(2 000 r/min)10 min, 弃上清液, 用适量含 10 %FBS 的 RPMI-1640 培养液重悬细胞, 台盼蓝染色计数, 用含 10 %FBS 的 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度至所需浓度(细胞活率 95 % 以上), 备用。

1.3.2 活性测定

1.3.2.1 CCK-8 法检测细胞活力

CCK-8 法是用于测定细胞增殖或细胞毒性试验中活细胞数目的一种高灵敏度, 无放射性的比色检测法。CCK-8 被细胞内脱氧酶生物还原后生成的橙色甲瓒染料能够溶解于组织培养基中, 生成的甲瓒量与活细胞数量成正比。不同浓度的多糖样品与小鼠脾脏淋巴细胞体外共培养 48 h, 考察样品对淋巴细胞活力的影响作用, 观察样品是否有细胞毒性或促进细胞的活化及增殖活性。具体操作: 小鼠脾脏淋巴细胞(8×10^5 个/孔)接种于 96 孔板, 同时加入不同浓度 250、50、10、2、0.4、0.08、0.016 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品, 对照组样品浓度为 0, 并以含 10 %FBS 的 1640 培养液补至相同体积受试样品, 对照组样品浓度为 0, 并以含 10 %FBS 的 1640 培养液补至相同体积。将培养板放在培养箱中(37 °C, 5 % CO₂)培养 24 或 48 h。培养结束前 8 h 向每孔加入 20 μL CCK-8 溶液。培养结束时, 用酶标仪测定 450 nm

处 OD 值。

1.3.2.2 丝裂原 ConA、LPS 诱导脾脏淋巴细胞增殖实验

常规制备 5×10^6 个/mL 脾脏淋巴细胞悬液, 于 96 孔板中每孔加 100 μL 不同浓度受试样品, 加入 50 μL 不同浓度受试样品, 同时加入 ConA(终浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)50 μL 诱导 T 淋巴细胞活化增殖, 或者 LPS(终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)50 μL 诱导 B 淋巴细胞活化增殖, 另设相应的阳性对照及无刺激本底对照。37 °C, 5 % CO₂ 培养箱中培养 48 h。培养结束前 8 小时掺入 0.25 μCi 3H-thymidine。培养结束后, 将培养板冻存于-20 °C 冰箱, 待测。用 ³H 掺入法测定细胞增殖。

1.3.2.3 丝裂原 ConA、LPS 诱导脾脏淋巴细胞分泌细胞因子

24 孔培养板中小鼠脾细胞 5×10^6 个/孔, 同时加入受试药物及 ConA(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)或 LPS(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 另设相应刺激对照(仅加入细胞和刺激剂)和无刺激对照(只有细胞, 无刺激剂), 并加入相应体积含 10 %FBS 的 RPMI-1640 培养液, 终体积 2 mL。细胞于 37 °C 培养箱中培养 48 h, 收集上清液, 采用 ELISA 法检测上清液中细胞因子浓度。

2 结果与讨论

2.1 米糠多糖对小鼠脾脏细胞体外活性的影响

不同浓度的多糖样品与小鼠脾脏淋巴细胞体外共培养 48 h, 对淋巴细胞活性的影响如图 1 中所示。

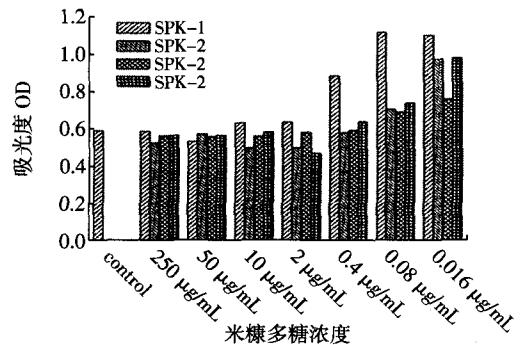


图 1 米糠多糖对体外正常小鼠脾脏淋巴细胞活性的影响

Fig.1 The influence of rice bran polysaccharide on the activity of spleen lymphocytes of normal mice in vitro

细胞活力 = (加药组 OD 值 - 培养液本底对照组 OD 值) / (溶媒对照组 OD 值 - 培养液本底对照组 OD 值) $\times 100\%$, 细胞活力: >100 % 显示样品没有直接的细胞毒性, 细胞有活化增殖的现象; <75 % 显示样品具有细胞毒性作用, 影响细胞的存活; control 组, 溶媒对照; OD 值均为酶标仪中自动减去培养液本底对照组 OD 值后的结果。

实验运用了 CCK-8 法检测了米糠多糖样品对小鼠脾脏细胞活力影响,实验结果表明,在未加丝裂原刺激条件下,米糠多糖 SPK-1 在浓度为 250、50、10、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均对小鼠淋巴细胞有显著促进增殖作用,SPK-2 在浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对小鼠淋巴细胞有显著促进增殖作用,SPK-3 在浓度为 250、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对小鼠淋巴细胞有显著促进增殖作用;SPK-4 在浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对小鼠淋巴细胞有显著促进增殖作用。米糠多糖 4 个样品与小鼠淋巴细胞共培养均未见明显的细胞毒性。

2.2 受试米糠多糖样品在 ConA/LPS 分别诱导的脾脏 T/B 淋巴细胞活化增殖中的影响作用

受试米糠多糖样品在 ConA/LPS 分别诱导的脾脏 T/B 淋巴细胞活化增殖中的影响作用见图 2。

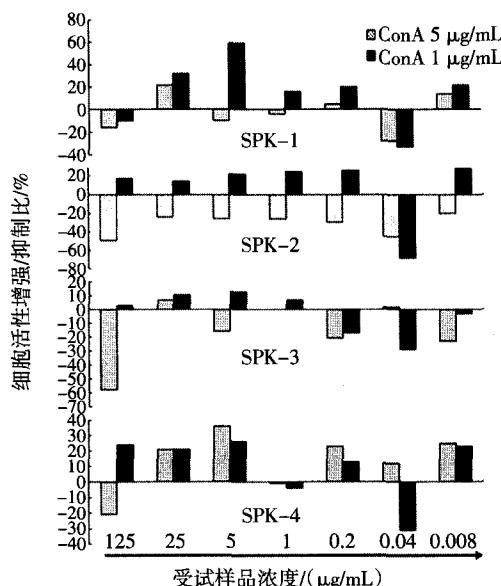


图 2 米糠多糖对 ConA 诱导的脾脏 T 淋巴细胞增殖中的影响作用

Fig.2 The influence of Rice bran polysaccharide on T lymphocytes

proliferationspleen induced by ConA

增强/抑制百分比=(受试样品组 CPM 值-刺激对照组 CPM 值)/(刺激对照组 CPM 值-细胞对照组 CPM 值), 数值 > 0 , 说明样品促进细胞增殖, 数值 < 0 , 说明样品抑制细胞增殖。

在本试验中, 分别检测了受试样品在 ConA 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ConA 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (低浓度, 低水平诱导剂量), LPS 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (低浓度, 低水平诱导剂量)丝裂原诱导的脾脏淋巴细胞活化增殖中的影响作用。试验结果显示, 受试样品分别在正常剂量和低剂量的 ConA/LPS 诱导的小鼠脾脏淋巴细胞活化增殖反应中, 分别有轻度的增强或抑制作用, 但就每个样品来看没有明确的趋向性, 即浓度梯度依赖性的影响作用。

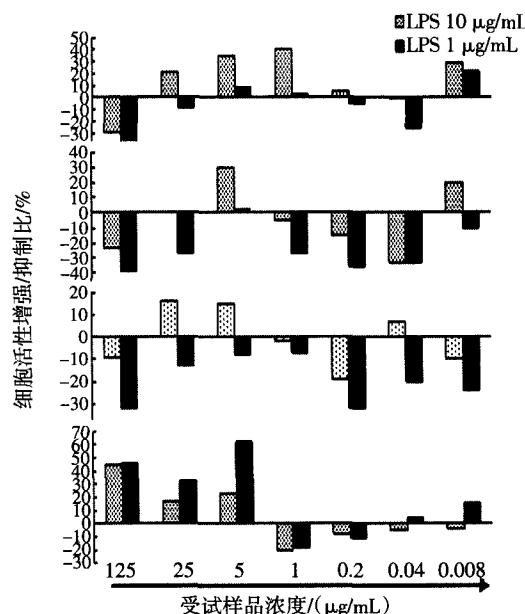


图 3 米糠多糖对 LPS 诱导的脾脏 B 淋巴细胞增殖中的影响

Fig.3 The influence of Rice bran polysaccharide on Spleen B lymphocyte proliferationspleen induced by LPS

2.3 受试样品对 ConA、LPS 诱导脾脏淋巴细胞活化分泌细胞因子的影响作用

运用 ELISA 方法检测受试米糠多糖样品对 LPS、ConA 诱导脾脏淋巴细胞活化分泌 IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12, IL-17 等细胞因子的影响作用, 结果见图 4~7。

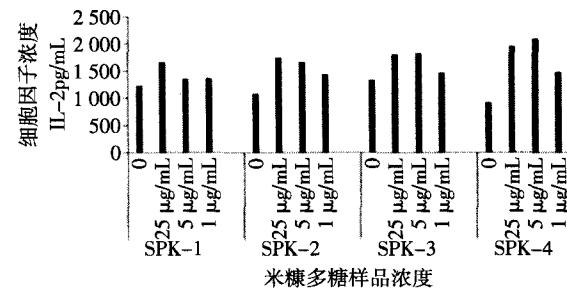


图 4 米糠多糖对 ConA 诱导脾脏淋巴细胞分泌 IL-2 的影响

Fig.4 Effects of rice bran polysaccharide on ConA induced IL-2 secretion of spleen lymphocytes

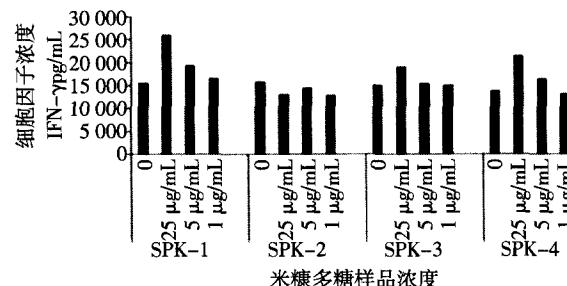


图 5 米糠多糖对 ConA 诱导脾脏淋巴细胞分泌 IFN- γ 的影响

Fig.5 Effects of rice bran polysaccharide on ConA induced IFN- γ secretion of spleen lymphocytes

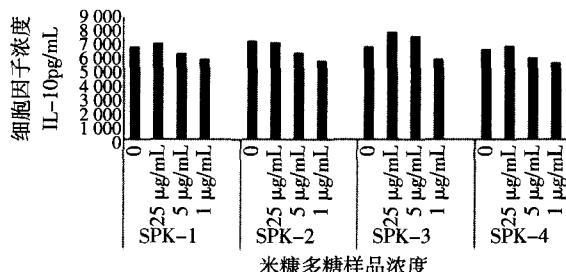


图 6 米糠多糖对 LPS 诱导脾脏淋巴细胞分泌 IL-10 的影响

Fig.6 Effects of rice bran polysaccharide on LPS induced IL-10 secretion of spleen lymphocytes

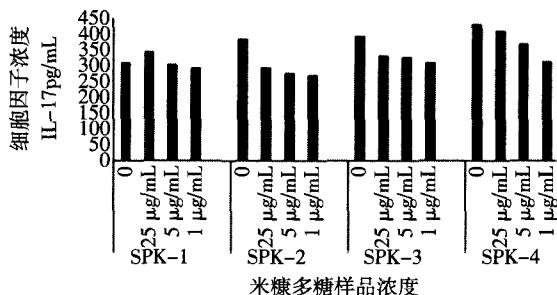


图 7 米糠多糖对 LPS 诱导脾脏淋巴细胞分泌 IL-17 的影响

Fig.7 Effects of rice bran polysaccharide on LPS induced IL-17 secretion of spleen lymphocytes

实验选取了 25、5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个浓度的样品, 检测相应浓度下样品对 ConA、LPS 诱导脾脏淋巴细胞活化分泌细胞因子的影响。

白细胞介素-2(IL-2)主要是 T 淋巴细胞分泌的一种淋巴因子, 在机体免疫方面具有重要作用, 是一种免疫增强剂, 具有抗病毒、抗肿瘤和提高免疫力的作用, 我们在实验中发现 SPK-2(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、SPK-3(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)SPK-4(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)都能够显著促进 IL-2 的分泌。

干扰素- γ (IFN- γ)主要是由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生, 称为 II 型干扰素, 通常由抗原与有丝分裂原诱导产生。干扰素具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用。SPK-1(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、SPK-4(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)均能促进 ConA 诱导小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IFN- γ ; 而 SPK-4 在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的米糠多糖样品却显著抑制了 IFN- γ 的分泌。

白细胞介素-10(IL-10)是一种多功能负性调节因子, 主要是由 Th2 细胞、活化的 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞产生, 它参与免疫细胞、炎症细胞、肿瘤细胞等多种细胞的生物调节。IL-10 具有很强免疫抑制及免疫调控作用, IL-10 还是某些肿瘤细胞的生长因子, 在本试验中, SPK-3 在 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下对 LPS 诱导的小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IL-10 有显著的促进作用; 而

SPK-4 在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下对 IL-10 分泌表现出显著地抑制作用。

白细胞介素-17(IL-17)是一种前炎症细胞因子, 能够促进多种细胞释放炎性因子, 与多种炎症及自身免疫疾病有关。在本试验中 SPK-2(25、5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、SPK-3(5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、SPK-4(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)均能显著抑制 ConA 诱导小鼠脾脏细胞分泌 IL-17 的作用。

3 结论

SPK-1: 我们采用 CCK-8 法检测米糠多糖样品体外对小鼠脾脏淋巴细胞活性作用影响, 发现在 250、50、10、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时, SPK-1 能显著促进小鼠脾脏淋巴细胞增殖, 且在试验浓度范围内没有表现出显著地毒性作用。我们用 ELISA 法检测该样品对细胞因子分泌的影响, 观察到样品在 25、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两个浓度下, 能够显著促进 ConA 诱导的小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IFN- γ 。

SPK-2: 采用同样的方法, 我们观察到 SPK-2 在 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时能够显著促进小鼠脾脏淋巴细胞增殖; 并且 SPK-2 在 25、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时能够促进 ConA 诱导的小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IL-2, 且在 25、5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三个浓度下都能明显抑制 ConA 诱导的小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IL-17。

SPK-3: 采用同样的方法, 我们观察到 SPK-3 在 250、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时能够显著促进小鼠脾脏淋巴细胞增殖; 并且 SPK-3 在 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时能够促进 ConA 诱导的小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IL-2 以及 LPS 诱导小鼠细胞分泌 IL-10; SPK-3 在 5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下能够显著抑制 ConA 诱导的小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IL-17。

SPK-4: 采用同样的方法, 我们观察到 SPK-4 在 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时能显著促进小鼠脾脏淋巴细胞增殖, SPK-4 在 5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 能够显著促进 IL-2 的分泌; 在 25、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时能显著促进 IFN- γ 的分泌; 在 5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时能够抑制 IL-10 的分泌; 在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可明显抑制 IL-17 分泌。

免疫活性测试结果表明: 在 CCK-8 试验中, 受试的这 4 种样品在高浓度状况下均没有表现出显著地细胞毒性, 相反, 却表现出显著的促进细胞增殖的作用, 提示我们该系列样品可能存在免疫促进的作用; 另外, 在检测该系列样品对 ConA 或 LPS 诱导的小鼠脾脏淋巴细胞分泌细胞因子时, 我们观察到该系列样品对 IL-2、IFN- γ 等细胞因子的分泌存在显著的促进作用, 也显示相应的样品具有免疫增强作用。

米糠肽抗氧化活性研究

刘梁¹,孙维矿¹,赵玲¹,李赫宇²,陈新^{1,*}

(1. 武汉轻工大学生物与制药工程学院,湖北武汉 430023;
2. 天津市益倍建生物技术有限公司,天津 300457)

摘要:过 α -脱氧核糖氧化法测定了米糠提取物及纯化米糠肽水解前、后对羟基自由基和超氧阴离子的清除能力;结果显示米糠醇总提取物的比单纯米糠肽的清除羟基自由基和超氧阴离子的能力更强,且经水解后二者的抗氧化性均显著增强。

关键词:米糠;抗氧化;羟基自由基;超氧阴离子

Study on the Antioxidant Activity of Rice Bran

LIU Liang¹, SUN Wei-kuang¹, ZHAO Ling¹, LI He-yu², CHEN Xin^{1,*}

(1. School of biological and pharmaceutical engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, Hubei, China; 2. Tianjin Ubasic health Nutrition Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: The scavenging capacity to hydroxyl free radical and superoxide radical by rice bran peptide and the total extract of rice bran were determinated through alpha deoxyribose oxidation method. The results showed that the total extract of rice bran had a more significant capacity to scavenge the hydroxyl free radical and superoxide anion radical, and the antioxidant capacity were significantly enhanced after they been hydrolyzed.

Key words: rice bran; antioxidant; hydroxy radical; superoxide radical

近些年,功能活性肽因其健康安全等特点已成为食品领域研究最为热门的课题之一,而从植物蛋白中提取活性肽更受人们青睐,其中抗氧化肽尤其受到人

作者简介:刘梁(1981—),男(汉),讲师,博士,研究方向:食品功能因子研究。

*通信作者

们的关注^[1-2]。相关研究表明米糠蛋白水解提取物的抗氧化值为 19.9 mg/g,约为 V_c 的 27 倍,约为大豆肽的 1.9 倍^[3]。由 6~30 个氨基酸组成,分子量在 70 u~3 600 u 的米糠肽具有强抗氧化性^[4]。张强等通过酶解米糠蛋白制备得到的米糠抗氧化肽,对常见的自由基如 O₂⁻ 和 ·OH 均具有良好的捕获能力^[5]。梅德军等选

参考文献:

- [1] 胡国华,杨帆,马正智,等.米糠多糖的研究及应用进展[J].中国食品添加剂,2007(5): 80-85
- [2] 王梅,赵凤敏,刘威,等.米糠多糖的提取、分析及应用[J].中国食物与营养,2010(2):40-43
- [3] 姜元荣,姚惠源,王勇,等.米糠多糖 BPR 及 BPR-II 对小鼠体外细胞因子分泌的影响研究[J].粮食科技与经济,2014, 4(39): 61-63
- [4] 姜元荣,姚惠源,陈正行.米糠多糖的生物活性研究进展[J].食品科技,2002(10): 66-68
- [5] 陈明,汪善锋.米糠多糖的提取工艺及其生物活性的研究进展[J].食品研究与开发,2007, 28(6): 173-176
- [6] 赵倩,熊善柏,邵小龙,等.米糠多糖的提取及性质和结构[J].中国粮油学报,2008, 23(3): 4-7
- [7] 汪艳,吴曙光,徐伟,等.米糠多糖抗肿瘤作用及其作用的部分机制[J].中国药理学通报,1999, 15(1): 70-72
- [8] 姜元荣,姚惠源,陈正行.碱溶性米糠多糖的提取及其免疫调节功能研究[J].中国粮油学报,2004, 19(6): 1-7
- [9] 丘玉昌,吴曙光,徐伟.米糠多糖的提取及免疫调节作用[J].中国生化药物杂志,1999, 20(2): 91-93
- [10] 易翠萍,王立,姚惠源.米糠多糖研究进展[J].粮食与油脂,2003(2): 20-22

收稿日期:2014-10-13