

论著

牛初乳对免疫抑制小鼠免疫功能影响的研究

万忠晓 张 锋 耿 倩 张玉梅

(北京大学医学部营养与食品卫生学系,北京 100191)

摘 要:目的 探讨牛初乳对免疫抑制小鼠免疫功能的影响。方法 将 ICR 雌性小鼠随机分为五组:正常对照组,模型对照组和牛初乳低、中、高剂量组。观察不同剂量牛初乳对免疫抑制小鼠脾指数、胸腺指数、细胞免疫、体液免疫、单核-巨噬细胞吞噬功能及脾脏 T 淋巴细胞亚群的影响。结果 三个剂量组的脾指数和胸腺指数显著低于正常对照组($P < 0.01$)。中、高剂量组脾脏 T 淋巴细胞增殖能力显著高于模型对照组($P < 0.01$)。三个剂量组溶血空斑数均显著高于模型对照组但低、高剂量组低于正常对照组($P < 0.01$)。三个剂量组校正后吞噬系数明显高于模型对照组及正常对照组($P < 0.01$)。中剂量组脾脏 T 淋巴细胞中 CD4+ 百分比显著高于模型对照组及正常对照组($P < 0.01$)。结论 牛初乳能够有效提高免疫抑制小鼠细胞免疫、体液免疫、单核-巨噬细胞吞噬功能和脾脏 CD4+ 百分比。

关键词:环磷酰胺;免疫;T 淋巴细胞;淋巴细胞亚群;初乳

Study of the Effect on The Immunological Function of Bovine Colostrum in Immunosuppressive Mice

WAN Zhong-xiao, ZHANG Feng, GENG Qian, ZHANG Yu-mei

(Department of Nutrition and Food Hygiene, Health Science Center, Peking University, Beijing 100191, P. R. China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of bovine colostrum (BC) on the immunological function in immunosuppressive mice. **Methods** Female ICR mice were randomly assigned into five groups: normal control group (NC), model control group (MC), low, medium, and high dosage BC groups (BL, BM, BH). Four weeks later, spleen and thymus were weighted, cell-mediated immune function, humoral immune function, phagocytic function of mononuclear phagocyte and the T cell subpopulation in spleen were assayed. **Results** The spleen and thymus index in BL, BM and BH were drastically decreased in comparison with NC ($P < 0.01$). The capacities of lymphocyte proliferation induced by ConA in BM and BH were obviously higher than those of MC ($P < 0.01$). The numbers of hemolytic plaques in all three BC groups were larger than those of MC ($P < 0.01$), yet the values in BL and BH were much smaller than NC ($P < 0.01$). All the BC groups' corrected phagocytic coefficient were drastically higher than MC and NC ($P < 0.01$). Lastly, the CD4+ T cell of spleen in BM were greatly higher than MC and NC ($P < 0.01$). **Conclusion** Bovine colostrum was efficaciously increase cellular immune level, antibody forming level and phagocytic function of mononuclear phagocyte and the decrease of CD4+ T cell in spleen inhibited by cyclophosphamide.

Key words: Cyclophosphamide; Immunity; T Lymphocytes; Lymphocyte Subsets; Colostrum

TI 可被有效灭活。因此,如何合理判断转基因食品 TI 活性的差异,需在统一分析方法基础上完善亲本食品或非转基因食品的基线调查,通过建立恰当的评估方法和程序,解决转基因食品“质”、“量”评价的技术问题。

参考文献

[1] 王锐,杨晓光. 国际组织和世界各国对转基因食品的管理[J].

卫生研究,2007,36(2):245-247.

[2] Approved methods of the american association of cereal chemists, 10th Edition. AACC Inc., MN, USA. 2003: Measurement of Trypsin Inhibitor Activity of Soy.

[3] 黄惠华,梁汉华,郭乾初,等. 两种大豆胰蛋白酶抑制剂的抑制活性及二级结构分析比较[J]. 食品科学,2005,26(3):46-49.

[4] NY/T1103.2-2006 转基因植物及其产品食用安全检测,抗营养因素第 2 部分:胰蛋白酶抑制剂的测定.

[收稿日期:2009-01-24]

中图分类号:R15;R151;Q55;Q78;TS201.4

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2009)03-0232-04

基金项目:国家自然科学基金(30471449)

作者简介:万忠晓 女 硕士生

通讯作者:张玉梅 女 副教授

牛初乳 (Bovine colostrum, BC) 是母牛分娩后 3 天^[1]或 7 天^[2]以内的乳汁。牛初乳中含有大量免疫因子和生长因子,如免疫球蛋白、乳铁蛋白、溶菌酶、胰岛素样生长因子、表皮生长因子等,具有免疫调节,改善胃肠道,促进生长发育,抗衰老,抑制病原微生物等一系列生理功能^[3]。有证据表明人体补充牛初乳对于预防和治疗感染性疾病、增强体质、抵抗疾病,改善免疫抑制导致的腹泻及艾滋病引起的胃肠道功能紊乱都有作用,且服用牛初乳可以改善手术病人的急性期症状及非甾体类抗炎药诱导的胃肠道损伤^[4,5]。然而目前国内外就牛初乳发挥免疫调节作用的资料是有限的,牛初乳的很多秘密还有待我们去探索。因此我们以 ICR 健康雌性小鼠为研究对象,通过腹腔注射环磷酰胺对小鼠进行免疫抑制,观察了牛初乳对免疫抑制小鼠的免疫调节作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 受试物 牛初乳粉(美国 Food Plus Plus 公司)。

1.1.2 实验动物 北京大学医学部实验动物中心提供 ICR 雌性小鼠(清洁级,合格证号:SCXK-2008-0008),6~8 周龄,18~22 g。共 200 只,分为四批进行实验,每批随机分为 5 组,每组 10 只。分别进行小鼠脏/体比值测定、迟发型变态反应和抗体生成细胞数测定;刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 诱导的脾淋巴细胞转化实验;碳粒廓清实验及小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群测定。实验动物饲养于北京大学医学部实验动物中心二级动物室(合格证号:SYXK(京)2007-0008),室温(22±2),湿度 60%~80%,动物自由饮用自来水和摄取配方饲料(北京大学医学部实验动物中心提供)。

1.1.3 主要仪器与试剂 Bio-Rad model550 酶标仪(美国),SANYOCO₂ 培养箱(日本),FACSCalibur 型流式细胞仪(BD 公司)。

ConA、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、琼脂糖购自 Sigma 公司;注射用环磷酰胺(cyclophosphamide, Cy)购自江苏恒瑞医药股份有限公司;RPMI1640 培养液购自 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;印度墨汁购自北京市西中化工厂;绵羊红细胞(sheep red blood cell, SRBC)由北京大学医学部实验动物中心提供;抗小鼠 FITC-CD4 (Fluorescein isothiocyanate-CD4) 单抗、PE-CD8 (Phycoerythrin-CD8) 单抗和 PE-Cy5-CD3 (Phycoerythrin-Cy5-CD3) 单抗购自杭州联科生物技术有限公司,其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 剂量分组给予受试物及造模方法 牛初乳人体推荐剂量为 2.0 g/(60 kg BW),相当于 0.035 g/kg BW。实验设人体推荐剂量的 10 倍、20 倍、30 倍,即每日 0.35 g/kg BW、0.70 g/kg BW 和 1.05 g/kg BW,分别为牛初乳低剂量组(bovine colostrum low dose group, BL)、中剂量组(bovine colostrum medium dose group, BM)、高剂量组(bovine colostrum high dose group, BH)。受试物用蒸馏水配制,灌胃 4 周后测定各项指标。同时设定正常对照组(normal control group, NC)和模型对照组(model control group, MC),NC 及 MC 组均灌胃同体积蒸馏水,小鼠灌胃体积为 0.2 ml/10 g BW。

免疫抑制小鼠的处理:除 NC 组外,其他各组小鼠均于第 20 天起隔日腹腔注射环磷酰胺,剂量 40 mg/kg BW,共 5 次。

1.2.2 脏器体重比值测定 颈椎脱臼处死小鼠,取脾脏和胸腺,去除筋膜,用滤纸吸干脏器表面血污,称重,计算脾脏指数(脾脏重量/体重)和胸腺指数(胸腺重量/体重)。

1.2.3 细胞免疫、体液免疫功能和单核巨噬细胞功能的测定 根据中华人民共和国卫生部 2003 年的保健食品检验与评价技术规范分别进行 ConA 诱导脾脏 T 淋巴细胞转化实验、迟发型变态反应(足跖增厚法)、抗体生成细胞检测(采用 Jerne 改良玻片法)和碳粒廓清实验。

1.2.4 小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的测定 制备 1×10^6 个/ml 脾细胞悬液,分别加入各种荧光标记抗体,室温避光孵育 15 min PBS 洗涤后用流式细胞仪检测 CD3+T、CD4+T 及 CD8+T 细胞亚群。

1.3 统计方法

采用 SPSS13.0 软件包进行单因素方差分析,结果以平均值±标准差的形式表示。

2 结果

2.1 牛初乳对免疫抑制小鼠体重及免疫器官相对重量的影响(表 1)

由表 1 可见,小鼠的初始及终期体重组间差异无显著性($P > 0.05$)。与正常对照组相比,模型对照组的胸腺指数和脾指数明显降低($P < 0.01$);各剂量组的胸腺指数和脾指数与模型对照组差异无显著性($P > 0.05$),但明显低于正常对照组($P < 0.01$)。

2.2 牛初乳对免疫抑制小鼠细胞免疫、体液免疫及单核巨噬细胞吞噬功能的影响(表 2)

由表 2 可见,与正常对照组相比,模型对照组脾

表1 牛初乳对免疫抑制小鼠体重及免疫器官相对重量的影响

($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	初始体重(g)	终期体重(g)	脾脏指数(mg/g)	胸腺指数(mg/g)
NC	10	20.1 ±0.63	35.5 ±3.65	3.70 ±1.79	3.46 ±0.49
BL	10	20.7 ±0.41	32.5 ±2.36	2.59 ±0.75 ^a	1.60 ±0.21 ^a
BM	10	20.5 ±0.27	31.6 ±2.58	2.45 ±0.64 ^a	1.71 ±0.23 ^a
BH	10	20.1 ±0.92	33.3 ±3.08	2.05 ±0.51 ^a	1.75 ±0.31 ^a
MC	10	20.3 ±0.78	32.5 ±1.47	2.04 ±0.51 ^a	1.57 ±0.24 ^a

注:a 为与 NC 组相比, $P < 0.01$ 表2 牛初乳对免疫抑制小鼠细胞免疫、体液免疫及单核巨噬细胞吞噬功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖能力 (光密度差值)	溶血空斑数/ 5×10^6 个脾细胞	校正后吞噬指数
NC	10	0.26 ±0.10	2644 ±294	5.631 ±0.970
BL	10	0.17 ±0.04	1856 ±246 ^{ab}	6.997 ±0.601 ^{abb}
BM	10	0.26 ±0.11 ^{bb}	2234 ±297 ^{bb}	7.336 ±0.871 ^{abb}
BH	10	0.22 ±0.05 ^{bb}	1666 ±207 ^{ab}	6.622 ±0.675 ^{abb}
MC	10	0.08 ±0.01 ^a	1230 ±239 ^a	4.564 ±0.772 ^a

注:a 为与 NC 组相比 $P < 0.01$; b 为与 MC 组相比 $P < 0.05$, bb 为与 MC 组相比 $P < 0.01$

脏 T 淋巴细胞增殖能力,溶血空斑数及单核巨噬细胞吞噬功能明显降低 ($P < 0.01$)。其中,中、高剂量组脾脏 T 淋巴细胞增殖能力显著高于模型对照组 ($P < 0.01$);三个牛初乳剂量组溶血空斑数均显著高于模型对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),但低、高剂量组显著低于正常对照组 ($P < 0.01$)。三个牛初乳剂量组校正后吞噬指数均显著高于模型对照组及正常对照组 ($P < 0.01$)。

2.3 牛初乳对免疫抑制小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的影响(表 3)

表3 牛初乳对免疫抑制小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	CD3+ (%)	CD4+ (%)	CD8+ (%)
NC	10	42.35 ±10.34	28.37 ±4.16	9.70 ±5.31
BL	10	44.37 ±8.70	33.48 ±11.39	5.55 ±1.66
BM	10	47.48 ±10.50	38.32 ±5.59 ^{ab}	3.90 ±1.34
BH	10	38.52 ±9.81	26.17 ±5.19	9.03 ±3.30
MC	10	25.57 ±6.07	19.09 ±8.86 ^a	5.90 ±2.89

注:a 为与 NC 组相比 $P < 0.01$; b 为与 MC 组相比 $P < 0.01$ 。

由表 3 可见,与正常对照组相比,模型对照组 CD4+ T 细胞比例明显降低 ($P < 0.01$),而模型对照组的 CD3+ T 细胞比例和 CD8+ T 细胞比例与正常对照组差异无显著性 ($P > 0.05$),中剂量牛初乳组的 CD4+ T 细胞显著高于模型对照及正常对照组 ($P < 0.01$)。

3 讨论

机体免疫系统是由免疫器官、免疫细胞和免疫分子构成的网络体系,其中任何一部分的缺损或异常都会导致免疫功能的不全或紊乱,从而降低或丧失免疫功能。机体免疫应答分为特异性免疫应答和非特异性免疫应答,特异性免疫又分为细胞免疫和体液免疫。巨噬细胞是一类几乎参与一切免疫反应的细胞,其主要功能包括分解各种异物并与之相互作用、刺激和增进淋巴细胞的免疫活性,作为破坏肿瘤细胞和某些微生物的效应细胞,及作为免疫应答的调节者。国内外均有实验表明牛初乳能够增强机体细胞免疫和体液免疫及巨噬细胞吞噬功能。如在国外,Guillen C^[6]的研究认为,牛初乳中的乳铁蛋白能促进小鼠肠上皮内淋巴细胞(i-IEL, intestinal intraepithelial lymphocytes)中 I 型辅助性 T 淋巴细胞(Th1, T helper 1)细胞分化。Yasuko Yoshioka^[7]研究显示牛初乳能够使 i-IEL 中 T 细胞朝 Th1 极化,而 Th1 主要参与细胞免疫反应。芬兰的 He, F.^[8]等研究了牛初乳补充对服用沙门氏菌 typhi Ty21 疫苗志愿者的影响。结果发现:较之对照组,口服牛初乳组体内抗-沙门氏菌 Typhi Ty21 特异性 IgA 有明显上升趋势,说明牛初乳具有潜在增强人体特异性免疫应答的作用。Sugisawa^[9]的实验结果表明牛初乳可增强小鼠外周血中白细胞的吞噬活性。Crooks, C. V^[10]等的研究显示牛初乳能够增加运动员唾液中分泌型 IgA (secretary IgA, sIgA) 分泌。在国内,黄志彪^[11]等的研究结果提示牛初乳能够增强正常小鼠细胞和体液免疫功能及单核-巨噬细胞的吞噬能力。肖辉^[11]等的研究认为牛初乳能明显提高免疫抑制大鼠血液白细胞数、淋巴细胞增殖能力、抗体细胞分泌功能。本次实验中 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖实验反应了细胞免疫水平,溶血空斑实验反应了抗体分泌细胞的分泌功能即体液免疫水平,而碳粒廓清实验则反应了单核巨噬细胞的吞噬能力。我们的实验结果提示牛初乳具有提高免疫抑制小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖能力、抗体分泌细胞分泌功能及单核巨噬细胞吞噬活性。

胸腺是 T 淋巴细胞分化成熟的中枢免疫器官,脾脏则是体内最重要的外周免疫器官,也是 T、B 淋

巴细胞定居和接受抗原刺激后产生免疫应答的重要场所,它们与机体的细胞免疫和体液免疫密切相关。本次实验中牛初乳并不能够回复受环磷酰胺抑制的小鼠免疫器官质量的下降。我们推测存在如下两种可能:1)牛初乳补充时间过短,受到环磷酰胺抑制的免疫器官还未得以回复;2)环磷酰胺对胸腺和脾脏免疫抑制较深造成不可逆性回复。因此需要进一步进行探讨。

脾脏 T 淋巴细胞亚群水平,尤其是 CD4 + T 细胞亚群和 CD4 + /CD8 + 是反映机体免疫系统内环境稳定状况的重要指标,也是疾病严重程度和预后的重要标志之一^[12,13]。我们实验结果表明牛初乳能够提高免疫抑制小鼠 CD4 + T 细胞百分比,提示牛初乳可能通过增强 CD4 + T 细胞功能而实验其增强免疫功能的作用。

总之,近年来,牛初乳的营养保健作用日益受到重视,医学及营养学专家对牛初乳的生理功能进行了大量研究后指出,牛初乳具有极高营养价值,其主要功能组分 IgG 含量丰富,为普通牛乳的 200 倍,为人类初乳的 50 ~ 100 倍,IgG 等免疫因子在被动免疫系统中起重要作用^[14]。但是关于牛初乳免疫调节的详细机制尚有待进一步研究,如应用分子免疫学、细胞生物学等方法测定其对细胞因子分泌、抗体生成及信号转导通路等的影响等,从而为牛初乳行业的进一步发展提供理论依据。

参考文献

[1] 黄志彪,蔡玟,黄雯,等. 牛初乳粉对小鼠免疫功能的影响[J]. 华南预防医学,2004,30(6):57-58.
 [2] 芦传有,夏丽文,柴玮杰. 牛初乳粉增强免疫功能的研究[J].

中国保健杂志-临床研究,2005,13(24):32-33.
 [3] THAPA B. R. Health factors in colostrums [J]. Indian J Pediatr, 2005,72(7):579-582.
 [4] KELLY G S. Bovine colostrums: A review of clinical uses[J]. Altern Med Rev,2003,8(4):378-394.
 [5] BOUDRY C,BULDGEN A,PORTETTELLE D,et al. Effect of bovine colostrum supplementation on cytokine mRNA[J]. Livestock Science, 2007,108: 295-298.
 [6] GUILLEN C,MCINNES I B, VAUGHAN D M,et al. Enhanced Th1 response to staphylococcus aureus infection in human lactoferrin transgenic mice[J]. Journal of Immunology,2002,168(8):3950-3957.
 [7] YOSHIOKA Y,KUDO S,NISHIMURA H,et al. Oral administration of bovine colostrum stimulates intestinal intraepithelial lymphocytes to polarize Th1-type in mice [J]. Int Immunopharmacol,2005,5: 581-590.
 [8] HE F,TUOMOLA E,ARVILOMMI H,SALMINEN S. Modulation of human humoral immune response through orally administered bovine colostrum[J]. FEMS Immunol Med Microbiol 2001,31(2):93-96.
 [9] SUGISAWA H,IIOU T,SAKAI T. Promoting effect of colostrum on the phagocytic activity of bovine polymorphonuclear leukocytes in vitro [J]. Biol Neonate 2001,79(2):140-144.
 [10] CROOKS C V,WALL C R,CROSS M L,et al. The effect of bovine colostrum supplementation on salivary IgA in distance runners[J]. Int J Sport Nutr Exerc Metab, 2006,16(1):47-64.
 [11] 肖辉,张月明,于亚鹭,等. 牛初乳粉对调节免疫低下大鼠免疫功能的研究[J]. 新疆农业科学,2004,41(6):422-426.
 [12] DHUR A,GALAN P,PREZIOSI P,et al. Lymphocyte subpopulations in the thymus, lymph nodes and spleen of iron-deficient and rehabilitated mice [J]. Nutr 1991,121(9):1418-1424.
 [13] AL-AHMAD R S, MAHAFZAH A M, AL-MOUSA E N. Immunological changes in acute myocardial infarction[J]. Saudi Med J 2004,25:923-928.
 [14] 曹劲松,王晓琴. 牛初乳功能食品的开发现状和前景[J]. 食品科学,1999,5:14-17.

[收稿日期:2008 - 12 - 25]

中图分类号:R392;S879.1;Q95 - 3 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2009)03 - 0235 - 04

卫生部文件

卫办监督函〔2009〕185号

卫生部办公厅关于粉条生产加工中不能使用明矾的复函

质检总局办公厅:

你局《关于请予明确粉条生产加工中能否使用明矾的函》(质检办食监函〔2008〕689号)收悉。经研究,现函复如下:

我国《食品添加剂使用卫生标准》(GB2760)规定了食品添加剂品种、使用范围和使用量,食品添加剂的使用应按照《食品添加剂使用卫生标准》执行。硫酸铝钾(钾明矾)或硫酸铝铵(铵明矾)的使用范围不包括粉条,因此不能用于粉条生产加工。

专此函复。

卫生部监督局
二 九年三月十三日

