

螺旋藻蛋白水解物对小鼠血清中细胞因子的影响

王连芬, 庞广昌, 米小媛

(天津市食品生物技术重点实验室, 天津商业大学 生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

摘要:为了探索螺旋藻(*Spirulina*)蛋白及其水解物对 Balb/c 小鼠血清中 IL-10, TGF- α , IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 细胞因子的影响, 采用盐析法从螺旋藻中提取可溶性螺旋藻蛋白, 以胰蛋白酶水解得到螺旋藻蛋白水解物溶液。将所得水解物对 4 组 Balb/c 小鼠分别进行灌胃(两个灌胃组, 其中一组灌胃螺旋藻干粉)、腹腔注射、尾静脉注射, 用 ELISA 试剂盒测定了各组小鼠血清中 IL-10, TGF- α , IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 细胞因子变化情况。结果表明, 与相应空白组相比, 每组中绝大部分细胞因子水平均有所提高, 仅有个别给药方式的部分细胞因子有所降低(尾静脉注射的 IL-10, 腹腔注射的 IL-4, 灌胃组的 TNF- α 和 IL-1 β); 螺旋藻干粉灌胃组与螺旋藻蛋白水解物灌胃组结果显示, 细胞因子浓度都很低, 且两组间相差也不大; 3 种给药方式中, 腹腔注射的作用效果最为明显, 尤以该注射下的 IL-6 浓度变化极为显著; 腹腔注射的 IL-10, 以及尾静脉注射下的 IL-6, IL-1 β 和 IFN- γ 也相当显著, 说明螺旋藻蛋白水解物通过对细胞因子水平的调节, 进而对机体免疫功能发挥重要的调节作用。从给药途径角度, 腹腔注射效果最为突出, 说明螺旋藻蛋白主要是通过肠黏膜发挥作用, 设法直接通过肠黏膜途径给药可能是一种最有效的给药方式。

关键词: 螺旋藻蛋白; 细胞因子; 免疫调节

中图分类号: Q178.535

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)10-0051-05

螺旋藻素有“微型绿色功能性营养宝库”的美誉, 它的营养价值首先在于其富含大量的优质可溶性蛋白。随着人类基因组序列分析和功能蛋白组学工作的进一步展开, 越来越多的科学研究表明, 在生命活动中(如分子识别、信号转导、细胞分化及个体发育等)起决定作用的并非是那些分子量大、结构复杂的蛋白质, 而是那些结构相对简单的中、小分子物质——生物活性多肽^[1]。这些生物活性多肽可以通过选择适当的蛋白酶, 控制一定的水解度, 水解某些蛋白质得到。它们极易被人体快速和多途径地吸收, 营养并无损失, 而且产生特定的生理功效^[2], 那么这种多肽是通过吸收进入机体内部起作用, 还是通过肠黏膜应答起作用呢? 关于这一问题目前国内外从细胞因子的角度来研究的相关报道很少, 本文将对此作一初步解释。作者通过对提取出的螺旋藻蛋白选择适当的蛋白酶进行水解, 将其水解物用 Balb/c 小鼠通过灌胃、腹腔注射、尾静脉注射 3 种给药方式, 观察其血清中 IL-10, TGF- α , IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 各自的浓度变化情况, 探索螺旋藻蛋白水解物对细胞因子可能发挥的调节作用和作用途径, 从而推测螺旋藻蛋白水解物对机体产生的免疫功能。

1 材料和方法

1.1 材料

螺旋藻(*Spirulina*)粉产自内蒙古鄂托克旗乌兰

镇; 牛血清白蛋白 BSA, 电泳纯 98%, 中国医学科学院血研所产品; 胰蛋白酶(酶比活力为 250 U/mg), 购自天津华生生物科技有限公司; 小鼠血清 ELISA IL-10, TGF- α , IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ 和 IL-1 β 试剂盒, 均购自尚柏生物医学技术(北京)有限公司; Balb/c 小鼠, 雌性, 清洁级, 质量 18~27 g, 由天津津南区实验动物养殖场提供。

1.2 仪器

DL-6000B 低速离心机, 上海安亭科学仪器厂; JB-2A 型恒温磁力搅拌器, 上海雷磁新泾仪器有限公司; 752 型紫外可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 3K15 高速冷冻离心机, Sigma-Laborzentrifugen GmbH 公司; FD-1 型冷冻干燥机, 郑州长城科工贸有限公司; Mutiskan MK3 酶标仪, 上海雷勃分析仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 螺旋藻蛋白水解物的制备

在研钵中加入螺旋藻干粉及石英砂, 充分研磨

收稿日期: 2008-03-24; 修回日期: 2008-05-30

基金项目: 天津市重点自然科学基金项目(06YFGZNC04200)

作者简介: 王连芬(1983-), 女, 江苏大丰市人, 硕士研究生, 研究方向为生物活性物质的分离纯化, 电话: 13702044531, E-mail: wlf9260804@yahoo.cn; 庞广昌, 通讯作者, 022-81720699

1.5 h,观察到螺旋藻干粉颜色略有加深。将所得干粉用生理盐水溶解,置于4℃冰柜抽提2 h,所得的细胞悬液在低速离心机离心,取上清液。将上清液加入饱和硫酸氨溶液,充分搅拌^[3]。冷冻离心,弃去上清液。重复多次。沉淀加入少量生理盐水溶解,调节pH为8,进行透析,得到螺旋藻蛋白,Folin-酚法测定蛋白质量浓度^[4]为6 000 mg/L,即6.6 g。再加入适量的水,配成质量分数为1%的蛋白溶液,再在其中加入胰蛋白酶^[5,6]。调节恒温水浴温度为40℃,pH为7.5~8之间,不断加入1 mol/L NaOH以维持pH值,2 h后,升温至80℃对酶进行灭活5 min,迅速冷却至室温,再离心15 min,弃沉淀,上清液即为蛋白水解液。

1.3.2 实验动物分组及处理

实验样品用上述方法制得的螺旋藻蛋白水解物溶液(质量分数为3.5%)和螺旋藻蛋白干粉溶液(质量分数为10%)。将小鼠进行随机分组,将每个大笼中的小鼠分别进行分组。每组10只,共4组,分别为螺旋藻蛋白干粉灌胃组、螺旋藻水解物灌胃组、螺旋藻蛋白水解物腹腔注射组、螺旋藻蛋白水解物尾静脉注射组,给药量分别为:1.5,1.5,0.6,0.3 g/kg^[7];空白组3组,每组8只,分别为生理盐水灌胃对照组、生理盐水腹腔注射对照组、生理盐水尾静脉注射对照组,给药量分别为1.5,0.6,0.3 g/kg B.W.,实验前一天给小鼠禁食。3种给药方式分别在给药4,3,3 h后从小鼠眶动脉或眶静脉取血,尽快使用3K 15高速冷冻离心机4 000 r/min,离心20 min,得到血清。在一天内测完,将采集的血清于2~8℃的冰箱内保存备用。

1.3.3 Balb/c小鼠血清中细胞因子浓度的测定

采用ELISA双抗夹心法严格按试剂盒说明操作,检测小鼠血清IL-10,TGF- α ,IL-4,IL-6,TNF- α ,IFN- γ 和IL-1 β 水平。

1.4 数据处理

应用Graphpad Prism统计软件进行数据分析处理,结果以mean $\pm$ SEM表示,组间差异用双尾 t 检验, $P<0.05$ 为差异有显著意义。

2 实验结果

2.1 3种给药方式对IL-10的影响

如图1所示,用螺旋藻蛋白水解物和干粉给小鼠灌胃后,和相应生理盐水对照组相比,其IL-10水平均有少许提高,并且水解物灌胃效果比干粉灌胃

效果好,但变化不很明显;尾静脉注射水解物,和相应生理盐水对照组相比,IL-10浓度有轻微的下降,但变化也很不明显;腹腔注射时其水平极其显著高于对照组。

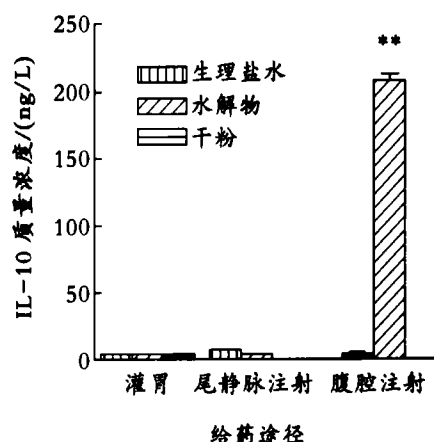


图1 3种给药方式对IL-10的影响

Fig. 1 The effect of three drug deliveries on IL-10,

与生理盐水组相比: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Compared with controlled group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ the same as below groups

2.2 3种给药方式对转化生长因子- α (TGF- α)的影响

3种给药方式下均未检测到TGF- α 。

2.3 3种给药方式对IL-4的影响

如图2所示,尾静脉注射及灌胃方式下,IL-4浓度均有所提高,尤其是尾静脉注射效果较明显,干粉灌胃较水解物灌胃效果稍差一些;腹腔注射时IL-4浓度较相应生理盐水组有所下降。

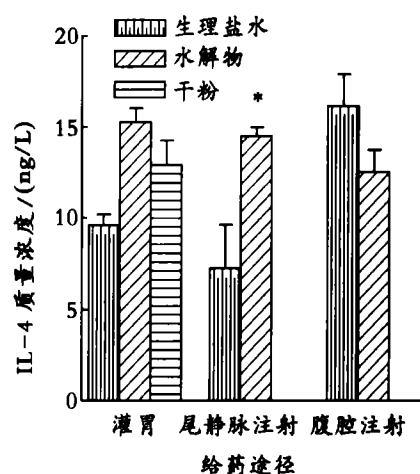


图2 3种给药方式对IL-4的影响

Fig. 2 The effect of three drug deliveries on IL-4

2.4 3种给药方式对IL-6的影响

如图3所示,两种注射方式下,IL-6水平都极显著高于对照组水平,尤其是腹腔注射效果极其显著,但灌胃效果较正常生理盐水组变化不明显。

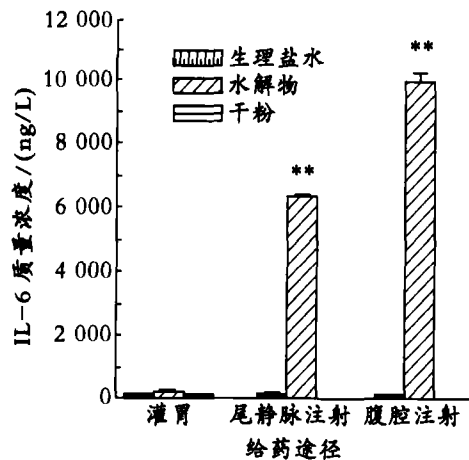
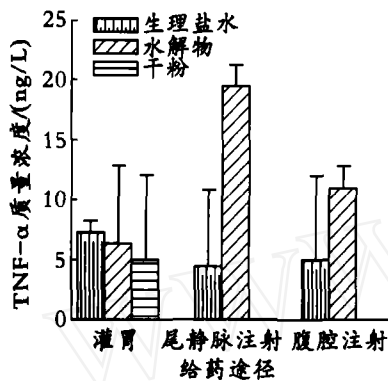


图3 3种给药方式对IL-6的影响

Fig. 3 The effect of three drug deliveries on IL-6

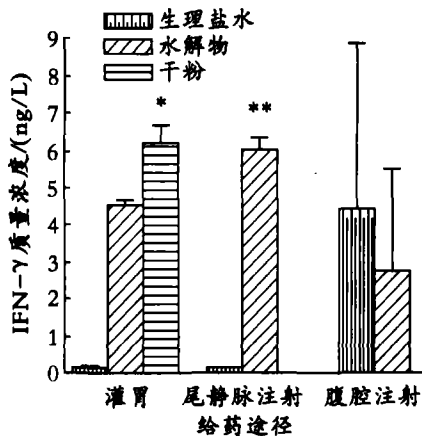
2.5 3种给药方式对TNF- α 的影响

如图4所示,两种注射方式下的TNF- α 质量浓度都有一定程度的提高;水解物和干粉灌胃相对空白组浓度均有某种程度的下降。

图4 3种给药方式对TNF- α 的影响Fig. 4 The effect of three drug deliveries on TNF- α

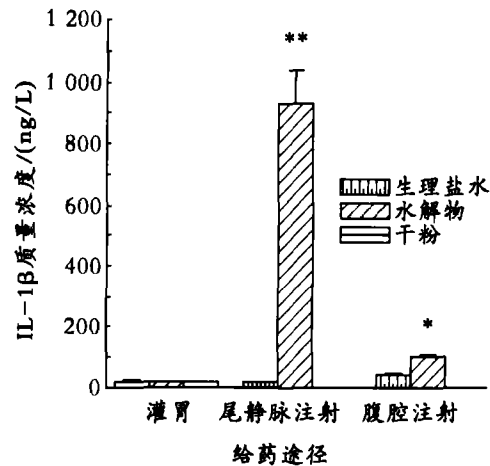
2.6 3种给药方式对IFN- γ 的影响

如图5所示,灌胃和尾静脉注射两种给药方式均显示血清中IFN- γ 浓度的升高,尤其是尾静脉注射效果相当显著,其中灌胃方式下,螺旋藻干粉灌胃效果比其水解物灌胃效果好;腹腔注射显示IFN- γ 的水平较对照组有所下降。

图5 3种给药方式对IFN- γ 的影响Fig. 5 The effect of three drug deliveries on IFN- γ

2.7 3种给药方式对IL-1 β 的影响

如图6所示,两种注射方式,IL-1 β 浓度均有提高,特别是尾静脉注射效果相当显著,其次是腹腔注射方式,灌胃效果不明显。

图6 3种给药方式对IL-1 β 的影响Fig. 6 The effect of three drug deliveries on IL-1 β

3 讨论

3.1 螺旋藻蛋白水解物对细胞因子的影响

总体来看,3种给药方式下的各细胞因子水平均有所提高,仅有个别给药方式下的部分细胞因子有所降低(尾静脉注射下的IL-10,腹腔注射下的IL-4和IFN- γ ,灌胃组下的TNF- α 和IL-1 β)。

通过3种给药方式使体内细胞因子水平增加,充分发挥细胞因子的生物学作用,从而抵御和治疗疾病。本文研究的7种细胞因子中,细胞因子水平提高都比较显著。其中腹腔注射下的IL-6极为突出,腹腔注射的IL-10,以及尾静脉注射下的IL-6、IL-1 β 和IFN- γ 也相当显著。如IL-6作为一种在致炎和抗炎间平衡的多功能循环细胞因子,对饮食和免疫调节有着重要的作用。值得一提的是,最近研究表明,IL-6不仅对免疫调节具有重要的作用(刺激细胞生长、促进细胞分化等),对脂肪酸代谢也起重要的调节功能^[8]。给予小鼠IL-6可以诱导高脂血症、高血糖和胰岛素抵抗。可见,细胞因子不仅调节着免疫系统,同时对于代谢网络也起到重要的作用。本研究显示,尾静脉注射与腹腔注射下的IL-6水平都很高,说明螺旋藻蛋白水解物可以用在高血脂、高血糖症以及肥胖症的治疗上。

IL-10是一种由多种细胞产生,具有抑制多种促炎细胞因子(TNF- α , IL-1 β , IL-8, IFN- γ)的抗炎细胞因子,对饮食调节和许多致炎性细胞因子引发的疾病方面具有重要的调节作用。大量的证据表明,IL-10能抑制IFN- γ , TNF- α 等促炎细胞因子的分泌。研究发现,IL-10缺陷小鼠可发生由肠道中抗原引起

的严重慢性炎症性肠病, Th1 应答亢进, IFN- γ 水平升高^[9,10]。这就说明螺旋藻蛋白水解物有抗炎的功效。

IL-1 β 在尾静脉注射下效果也很显著, 它有激活获得性免疫的作用, 可知螺旋藻蛋白水解物对于提高机体免疫力, 可能起着很重要的作用, 有可能开发为新的免疫佐剂。

IFN- γ 具有抗肿瘤作用, 还能促进其他细胞因子的抗肿瘤作用, 并且具有广泛的免疫调节作用, 抑制细胞生长和控制细胞的凋亡。可见, 螺旋藻蛋白水解物对抗肿瘤有着一定的作用^[11]。

另外, 值得一提的是, 本实验过程中, TGF- α 未被检测到, 这并不能说明水解物没对它产生作用。它是一种促炎细胞因子, 主要由肿瘤细胞产生, 是一种小肽分子, 它通过与细胞的表皮生长因子受体 (EGFR) 结合而实现其生理作用, 以自分泌和旁分泌的形式参与调节细胞的增殖和分化。在正常组织中一般难以检测到 TGF- α , 但在许多肿瘤和肿瘤细胞株里却有 TGF- α 的过量合成。因此, TGF- α 在肿瘤的诊断和预后、临床外伤的治疗等许多方面有应用价值。

由此可见, 螺旋藻蛋白水解物通过对细胞因子水平的调节, 诱发机体产生一系列的免疫应答, 从而使机体产生降血糖、降血脂、抗肿瘤、抗炎等方面的免疫调节功能。

3.2 螺旋藻蛋白水解物的作用途径

人体健康是靠免疫系统对病原微生物及其毒性产物的有效防御来维持的, 而对免疫系统的调节很大程度上都是靠细胞因子介导信号传递来实现的, 但这种调节作用往往都不是单个因子独立完成的, 而是通过细胞因子间的相互协同、拮抗、诱导等关系, 构成一个复杂的细胞因子网络对各种生理或病理过程进行调节。已有研究表明, 食品是通过细胞因子网络来调节人类健康的^[12], 例如本实验中尾静脉注射方式下的 IL-10 水平降低, IFN- γ 水平就升高, 证明 IL-10 缺陷小鼠可发生由肠道中抗原引起的严重慢性炎症性肠病, Th1 应答亢进, IFN- γ 水平升高, 等等。这表明, 螺旋藻蛋白水解物可以诱导或抑制发炎和抗炎细胞因子, 从而进一步控制先天或后天获得性免疫活性, 进而影响人体健康, 同时也验证了细胞因子网络的主要调节就是靠发炎和抗炎细胞因子的交互作用与动态平衡。有趣的是, 这恰恰和中国对食品和药品的认识相吻合。我们可以把所有的食品和药品分为阴阳两大类, 这就对应了发炎和抗炎两大类, 例如俗称的热性或称滋补 (发炎) 和凉性、泄火 (退火) 食品, 保持健康的本质就是首先要通过食品调节这种动态平衡。在中国, 就传统的保健观点来讲, 食品属于日常调节, 温和调节, 而中药则是对症调节。如果从细胞因子网络的角度来分析,

可以看出, 食品对细胞因子网络的调节是温和的、长期的, 而药物治疗则是在细胞因子网络失调并出现临床症状时才不得不进行的药物调节^[12]。

细胞因子网络使免疫系统, 特别是肠黏膜系统对复杂的来自各方面的挑战, 包括病毒、真菌、细菌甚至肿瘤所作出的复杂响应的最重要的方式。随着人们对黏膜免疫认识的深入, 研究发现了共同黏膜免疫系统的存在 (common mucosal immunity system, CMIS), 意即一个黏膜部位的免疫反应可以诱发远距离黏膜的免疫应答的出现^[13]。在本研究中作者观察到, 腹腔黏膜途径的免疫诱导了腹腔黏膜细胞因子的升高, 同时也诱发了较为广泛的黏膜细胞因子的分泌, 比如肠黏膜免疫系统。它是人体最大的免疫系统, 食品进入肠道, 除消化吸收外, 还有一个重要功能就是调节机体免疫活性。本实验结果显示, 3 种给药方式中, 腹腔注射效果最为突出, 说明螺旋藻蛋白水解物主要是通过腹腔黏膜免疫系统发挥作用, 进而诱发肠道黏膜的免疫应答; 螺旋藻干粉灌胃组与螺旋藻蛋白水解物灌胃组实验结果相比, 差别并不是很大。干粉与水解物的差别就在于水解物经过了体外消化的过程, 再经过胃酸的消化, 说明体外消化对于螺旋藻蛋白的吸收影响并不是很大。口服螺旋藻蛋白, 对机体细胞因子的水平只起到了微调的作用, 说明螺旋藻蛋白可能有着功能性食品的功效; 我们还可以结合指纹图谱, 找出起主要作用的短肽, 将其制成注射剂用于疾病特别是癌症的治疗。

4 结论

螺旋藻蛋白水解物对机体产生众多的生理功效, 如 IL-6 对于脂肪酸代谢、饮食和免疫调节有着重要的作用, IFN- γ 有着抗病毒的功效, TNF- α 有着促肿瘤坏死的功效等, 这种调节是温和的, 长期的, 通过对细胞因子的调节, 可利用其对细胞因子的作用针对性地治疗某些疾病, 调节人体免疫系统的平衡。

实验结果表明, 腹腔注射方式最突出, 尤其是黏膜分泌的 IL-6 水平最显著, 说明螺旋藻蛋白水解物主要通过细胞因子网络刺激肠黏膜产生应答, 从而调节机体的免疫功能, 因此直接通过肠黏膜途径给药可能是一种最有效的给药方式。可以考虑将此水解物制成胶囊比如肠溶片, 避免经过胃时被胃酸消化, 或是被体内的微生物所利用, 直接进入肠道迅速被吸收, 从而开发出口服药物, 显然该实验结果对于螺旋藻的深入研究和药物开发具有实际价值。

综上所述, 本研究仅初步阐明了螺旋藻蛋白水解物对机体免疫功能的调节有很重要的作用, 但它对机体的免疫机理的研究还有待进一步探索。

参考文献:

- [1] 裴凌鹏, 吴颖. 多肽研究进展 [J]. 首都师范大学学报 (自然科学版), 2004, 25(3): 55-56.
- [2] 殷文正, 殷鹏, 王玮, 等. 螺旋藻营养保健酸奶的研制 [J]. 中国乳品工业, 2007, 35(1): 41-43.
- [3] 罗磊, 朱雅东, 丁霄霖. 聚丙烯酰胺凝胶电泳研究猪血清蛋白硫酸铵分级盐析 [J]. 食品科学, 2006, 27(2): 218-222.
- [4] 姜玉梅, 杨歌德, 范业鹏. Folin-酚试剂法测定蛋白质含量中两种试剂的配制 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 1997, 32: 155-156.
- [5] 冯志彪, 李冬梅, 张伟. 螺旋藻蛋白的胰蛋白酶促水解 [J]. 食品与机械, 2002, 1: 12-13.
- [6] 冯志彪, 李冬梅. 中性蛋白酶水解螺旋藻蛋白质的研究 [J]. 食品研究与开发, 2001, 2: 22-24.
- [7] 金伯泉. 细胞和分子免疫学 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 2005. 133-183.
- [8] Matsuda S, Wen T C, Morita F, *et al.* Interleukin-6 prevents ischemia-induced learning disability and neuronal and synaptic loss in gerils [J]. *Neurosci Lett*, 1996, 204(122): 109-112.
- [9] Haddada J J. Interleukin-10 and the regulation of mitogen-activated protein kinases; are these signalling modules targets for the anti-inflammatory action of this cytokine? [J]. *Cellular Signalling*, 2003, 15: 255-267.
- [10] Mallat Z, Besnard S, Duriez M, *et al.* Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 1999, 85(8): 17-24.
- [11] 陈军, 房江滨, 宋学章, 等. 血清 IL-4、IFN- γ 与持续性变应性鼻炎的相关性 [M]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2006, 14(4): 245-246.
- [12] 庞广昌, 陈庆森, 胡志和. 食品是如何通过细胞因子网络控制人类健康的 [I] [J]. 食品科学, 2006, 5: 258-264.
- [13] Holmgren J. Mucosal immunity and vaccination [J]. *FEMS Microbiol Immunol*, 1991, 4(1): 1-9.

The effect of *Spirulina* protein hydrolysates on cytokines in the serum of mice

WANG Lian-fen, PANG Gang-chang, MI Xiao-yuan

(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Received: Mar., 24, 2008

Key words: *Spirulina* protein; cytokine; immune regulation

Abstract: In order to explore the effect of *Spirulina* protein and its hydrolysates on IL-10, TGF- α , IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β cytokines which are in the serum of Balb/c mice, *Spirulina* proteins were derived from *Spirulina* with salting out. Then they were hydrolysed with trypsin for protein hydrolysates solution. Hydrolysis was respectively treated for mice with four ways: gavage (two groups of gavage, one group was given by *Spirulina* powder), intraperitoneal injection, intravenous injection, then we measured IL-10, TGF- α , IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β changes with ELISA kits. The results are as follows: compared with relative normal saline group, most of the cytokines have increased, only some of the individual cytokines with injection methods were reduced (IL-10 in the tail vein injection, IL-4 in the intraperitoneal injection, TNF- α and IL-1 β in the gavage group); the affects of the *Spirulina* powder gavage group and *Spirulina* protein gavage group have no much difference; Among three administration methods, the most obvious treatment was intraperitoneal injection, especially which of IL-6 was the most signifiabale, IL-6 in the tail vein injection, IL-10 in the intraperitoneal injection, in addition, IL-6, IL-1 β and IFN- γ in the tail vein injection were more signifiabale. It was suggested that *Spirulina* protein hydrolysates played an important regulatory role for body immune function by regulating cytokines levels. From the point of drug deliveries, the effect of intraperitoneal injection was the most markable, and managing to deliver drug directly by intestinal mucosal is possibly a kind of the most effective drug delivery. So *Spirulina* protein hydrolysates are available to the development of the potential drug.

(本文编辑: 张培新)