

蒜氨酸 + 蒜酶对环磷酰胺处理 小鼠细胞免疫功能的影响

□ 陈 锋¹ 顾丹今² 许 晏² 陈 坚³ 王亚男¹ 刘素辉¹

(1. 新疆医科大学病原学教研室 新疆 乌鲁木齐 830054

2. 新疆医科大学免疫学教研室 新疆 乌鲁木齐 830054

3. 新疆医科大学药学院 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘 要 目的: 探讨蒜氨酸 + 蒜酶对环磷酰胺所致免疫功能低下小鼠细胞免疫功能的调节作用。方法: 各给药组小鼠用不同剂量的蒜氨酸 + 蒜酶灌胃, 共 10 天; 第 7 天开始同时腹腔注射环磷酰胺, 共 4 天。第 11 天测定小鼠腹腔巨噬细胞吞噬率, ConA 和 LPS 刺激的小鼠脾淋巴细胞增殖功能及小鼠血清 IL-2 和 TNF- α 含量。结果: 对环磷酰胺所致免疫低下小鼠, 蒜氨酸 + 蒜酶可明显提高腹腔巨噬细胞吞噬功能 ($P < 0.05$), 也可促进脾淋巴细胞的增殖 ($P < 0.05$), 并且可提高血清 IL-2 含量 ($P < 0.05$)。结论: 蒜氨酸 + 蒜酶对环磷酰胺所致细胞免疫功能低下有保护作用。

关键词 蒜氨酸 + 蒜酶 环磷酰胺 细胞免疫 动物实验

大蒜 (*Allium sativum* L.) 是百合科葱属植物大蒜的干燥鳞茎, 由于具有卓越的抗菌消炎^[1]、抗肿瘤^[2]、免疫增强^[3]等多方面药理作用而成为各国研究的热点。目前认为大蒜中主要的生物活性物质是有机含硫化合物^[4], 蒜氨酸 (S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砷) 是大蒜中主要的含硫化合物, 也是大蒜活性成分的主要前体物质。大蒜主要的活性成分是蒜氨酸在蒜酶的催化作用下产生的大蒜辣素 (二烯丙基硫代磷酸酯, 本文称蒜氨酸 + 蒜酶)^[5]。新疆是大蒜的原产地, 新疆大蒜由于气候适宜, 活性成分含量高而被誉为“高

蒜氨酸”大蒜。本研究组采用新疆地产大蒜提取并纯化的蒜氨酸及蒜酶单体, 并发现蒜氨酸 + 蒜酶生成的大蒜辣素 13 小时维持在较高水平, 这为研究大蒜辣素提供了一种新的尝试。本文首次研究了蒜氨酸 + 蒜酶对环磷酰胺所致免疫功能低下小鼠的细胞免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 NIH 小鼠, 20 ± 2 g, 雌雄兼用, 购

自新疆医科大学动物实验中心。

1.2 主要药品与试剂

1.2.1 实验药物 蒜氨酸及蒜酶单体由新疆医科大学药学院采用新疆地产大蒜提取并纯化。蒜氨酸与蒜酶以 2:1 比例经双蒸水混合, 35℃ 水浴反应 30 分钟, 形成纯品大蒜辣素 (称做蒜氨酸 + 蒜酶)。

1.2.2 主要试剂 环磷酰胺 (CP): 上海华联制药有限公司 (批号: 010802); 小鼠 IL-2 和 TNF-α 酶标试剂盒均购自晶美生物工程有限公司 (批号: 20021201, 20020905)。刀豆蛋白 (ConA)、脂多糖 (LPS) 和四甲基偶氮唑盐 (MTT): 购自 Sigma 公司。

1.3 方法 随机将 50 只 NIH 小鼠分成蒜氨酸 + 蒜酶 (低、中、高) 及正常对照组和抑制对照组, 共 5 组, 每组 10 只。正常对照组每日用生理盐水 (20 mg/kg) 灌胃, 共 10 天; 抑制对照组每日用生理盐水 (20 mg/kg) 灌胃, 共 10 天, 并在第 7 天开始同时腹腔注射环磷酰胺 (17.5 mg/kg), 共 4 天; 各给药组分别用不同剂量的蒜氨酸 + 蒜酶给相应各组小鼠灌胃, 持续 10 天, 并在第 7 天开始同时腹腔注射环磷酰胺 (17.5 mg/kg), 共计 4 天。第 11 天测定各项免疫指标。

1.3.1 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响^[6~8] 小鼠腹腔注射 1% 鸡红细胞, 1 ml/只; 30 min 后, 再腹腔注射生理盐水 1 ml/只, 断颈处死小鼠, 吸取腹腔液, 涂片, 1:1 丙酮甲醇固定 5 min, Gimesa 染色, 油镜观察, 每份标本油镜下观察 200 个巨噬细胞, 计算吞噬鸡红细胞的巨噬细胞百分率。吞噬率 = (吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数/200 个巨噬细胞) × 100%。

1.3.2 对小鼠淋巴细胞增殖的影响 MTT 法^[9,10]。处死小鼠用 75% 酒精浸泡 5 min, 无菌操作取脾, 置 hank's 液中于 200 目网中研磨, 用完全 1640 培养液配成 5 × 10⁶/ml 细胞悬液。每份标本设 3 个平行孔, 每孔加 100 μl 细胞悬液和 100 μl ConA/LPS, 并设细胞对照。37℃, 5% CO₂ 孵育 68 h, 加 MTT (5 mg/ml) 20 μl/孔。继续培养 3 h, 离心, 1500 rpm/min, 5 min, 弃上清, 每孔加 100 μl 二甲基亚砷 (DMSO), 震荡 15 min, 于酶标仪 570 nm 处测 OD 值。

1.3.3 对小鼠血清 IL-2 和 TNF-α 含量的影响 小鼠眼眶取血, 离心 2000 rpm/min, 10 min, 分离血清待

测。采用酶标免疫试剂盒检测。

1.3.4 统计分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。利用 PEM 2.1 软件进行单因素多组方差分析和 *q* 检验。

2 结 果

2.1 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 表 1 结果显示模型组吞噬百分率明显降低, 与正常对照组比较差异有显著意义 (*P* < 0.05), 说明免疫受抑小鼠模型成立。中、高剂量的蒜氨酸 + 蒜酶可明显提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬百分率, 与模型组相比有显著差异 (*P* < 0.05)。

表 1 蒜氨酸 + 蒜酶对 CP 处理小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	剂量 (mg/kg)	吞噬百分率 (%)
正常对照组	10		48.9 ± 6.35 *
免疫抑制组	8		30.4 ± 4.99
蒜氨酸 + 蒜酶			
低 剂 量	10	125 ± 62.5	29.1 ± 5.24
中 剂 量	10	250 ± 125	40.8 ± 7.11 *
高 剂 量	10	500 ± 250	43.0 ± 19.7 *

注: 与免疫抑制组相比, * *P* < 0.05

2.2 对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响 表 2 结果显示模型组淋巴细胞增殖程度明显降低, 与正常对照组比较差异有显著意义 (*P* < 0.05), 说明免疫受抑小鼠模型成立。中、高剂量的蒜氨酸 + 蒜酶可明显促进淋巴细胞增殖, 与模型组相比有显著差异 (*P* < 0.05)。

表 2 蒜氨酸 + 蒜酶对 CP 处理小鼠脾淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	剂量 (mg/kg)	ConA (OD)	LPS (OD)
正常对照组	8		0.40 ± 0.10 *	0.40 ± 0.08 *
免疫抑制组	6		0.15 ± 0.05	0.14 ± 0.03
蒜氨酸 + 蒜酶				
低 剂 量	8	125 ± 62.5	0.17 ± 0.04	0.16 ± 0.03
中 剂 量	8	250 ± 125	0.22 ± 0.02 *	0.22 ± 0.05 *
高 剂 量	8	500 ± 250	0.34 ± 0.06 *	0.34 ± 0.10 *

注: 与免疫抑制组相比, * *P* < 0.05

2.3 对小鼠血清 IL-2 和 TNF-α 的影响 表 3 结果显

示模型组 IL-2 和 TNF-α 含量明显降低，与正常对照组比较差异有显著意义 ($P < 0.05$)，说明免疫受抑小鼠模型成立。高剂量组可促进血清 IL-2 含量，与模

型组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。与模型组相比各给药组 TNF-α 含量无显著提高。

表 3 蒜氨酸 + 蒜酶对 CP 处理小鼠血清 IL-2 及 TNF-α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	剂量 (mg/kg)	IL-2 (pg/ml)	例数	TNF-α (pg/ml)
正常对照组	6		30.4 ± 1.8 *	6	146.8 ± 27.3 *
免疫抑制组	7		18.4 ± 3.1	6	119.9 ± 10.0
蒜氨酸 + 蒜酶					
低剂量	4	125 + 62.5	17.5 ± 0.2	5	119.2 ± 8.5
中剂量	5	250 + 125	21.2 ± 3.5	5	136.9 ± 7.9
高剂量	6	500 + 250	37.6 ± 1 *	5	135.9 ± 14.2

注:与免疫抑制组相比, * $P < 0.05$

3 讨 论

大蒜及其含硫化合物的抗癌活性已为大量实验所证实^[11]，其抗癌机理复杂，但大蒜对免疫系统的调节作用也是其抗癌重要机理之一。有文献报道，大蒜含硫化合物具有免疫刺激和免疫调节的功效；可增强巨噬细胞功能，还可增加 T 细胞的活性^[12~13]。蒜酶催化蒜氨酸产生的大蒜辣素是其主要活性成分。有文献报道蒜氨酸 + 蒜酶体外具有抗肿瘤活性^[14]。当肿瘤发生后，机体可通过免疫效应机制发挥抗肿瘤作用。在体内宿主对肿瘤的免疫应答效应是细胞免疫和体液免疫对肿瘤作用的综合结果。一般认为细胞免疫是抗肿瘤免疫的主力。在特异性细胞免疫应答中，细胞因子的辅助是必不可少的，不可或缺的。IL-2 是在机体复杂的免疫网络中起调节作用的重要细胞因子。主要由 CD₄⁺ 的 TH 细胞合成和分泌，可促进多种 T 细胞亚类的增殖和分化，促进多种细胞因子或其受体的表达^[15]。TNF-α 是一种单核因子，主要由单核细胞和巨噬细胞产生。此因子可杀伤或抑制肿瘤细胞，可促进 T 细胞、B 细胞的增殖，诱导 T 细胞 MHC I 类分子的表达和 IL-2、TNF-α 等细胞因子的产生，促进高亲和力 IL-2 受体的表达^[16]。实验结果表明，高剂量的蒜氨酸 + 蒜酶可提高血清 IL-2，这与文献报道一致^[17]；TNF-α 含量与模型组比较无统计学意义，但有增高趋势，需加大样本量进一步研究。

在机体中，存在着单核/巨噬细胞系统。单核/巨噬细胞在全身组织分布广泛，可以在第一时间接触、识别从任何部位进入机体的抗原，立即发挥先天免疫作用，随后也能通过其特有的高效抗原呈递能力启动 T 细胞和 B 细胞介导的获得性免疫。巨噬细胞在抗肿瘤免疫中的作用不仅是作为提呈抗原的抗原提呈细胞 (APC)，而且是溶解肿瘤细胞的效应细胞^[18~19]。实验结果表明中、高剂量的蒜氨酸 + 蒜酶可使环磷酰胺所致免疫受抑小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬率明显升高。

大蒜辣素具有较强的抗肿瘤作用已被大量药理实验证实^[20]，本实验结果表明蒜氨酸 + 蒜酶即大蒜辣素对环磷酰胺所致细胞免疫功能低下有保护作用，说明大蒜辣素的免疫增强作用与其抗肿瘤作用是分不开的。增强巨噬细胞功能，促进细胞因子的合成和分泌可能是其免疫增强作用的主要机制。

参考文献

[1] 李素民, 杨文昌, 田彩锁, 等. 大蒜的现代研究进展. 中医药学报, 1997, 6: 30 - 32.

[2] Siegers CP, Steffen B, Robke A, et al. The effects of garlic preparations against human tumor cell proliferation. Phytomedicine, 1999, 6 (1): 7 - 11.

[3] Eikai Kyo, Naoto Uda. Immunomodulatory effected of age garlic extract. J Nutr, 2001, 131: 1075 - 1079.

[4] 杨艳梅, 高彦辉. 大蒜抗癌作用研究进展. 国外医学中医中药分册, 2000, 2 (22): 67 - 69.

[5] Amagase H, Petesch BL, Matsura H, et al. Intake of Garlic and Its

Bioactive Components. J Ntr, 2001, 131: 955.

[6] 李仪奎. 中药药理实验方法学. 上海: 上海科技出版社, 1991. 157.

[7] 陈奇主编. 中药药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 315-317.

[8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 936.

[9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1221-1222.

[10] 郑永唐, 贾昆龙. 测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立. 免疫学杂志, 1992, 8 (4): 266-269.

[11] Agarwal KC. Therapeutic Actions of Garlic Constituents. Med Res Review, 1996, 16: 111-124.

[12] Kuttan G. Immunomodulatory effect of some naturally occurring sulphur-containing compounds. J Ethnopharmacol 2000, 72: 93-99.

[13] Feng ZH, Zhang GM, Hao TL, et al. Effect of diallyl trisulfide on the activation of T cell and macrophage-mediated cytotoxicity. J Tongji Med

Univ. 1994, 14: 142-147.

[14] 秦永德, 陈坚. 蒜氨酸 + 蒜酶抗肿瘤功效的实验研究. 新疆医科大学学报, 2003, 26 (2): 129-131.

[15] 金伯泉. 细胞和分子免疫学. 第二版. 北京: 科学出版社, 2001. 138-139.

[16] 金伯泉. 细胞和分子免疫学. 第二版. 北京: 科学出版社, 2001. 177-178.

[17] Lamm DL, Riggs DR. The potential application of Allium sativum (garlic) for the treatment of bladder cancer. Urol Clin North Am. 2000, 27: 157-162.

[18] 金伯泉. 细胞和分子免疫学. 第二版. 北京: 科学出版社, 2001. 480-482.

[19] 陈慰峰主编. 医学免疫学. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 230-232.

[20] Kailash CA. Therapeutic Actions of Garlic Constituents. Medicinal Research Reviews, 1996, 16: 111-124.

欢迎订阅 2005 年《福建中医药》、《福建中医学院学报》

《福建中医药》(ISSN1000-338X, CN35-1073/R) 创刊于 1956 年, 为“中国中文核心期刊”, “全国优秀科技期刊”, “中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊”。本刊面向基层, 注重临床实践, 内容丰富实用, 适宜各级中医、中西医结合工作者和中医爱好者阅读。本刊为双月刊, 大 16 开本, 每册定价 4.5 元, 全年 27 元。国内邮发代号 34-10, 国外代号 BM618。

《福建中医学院学报》是国内外公开发行的中医药学术刊物, 标准刊号为 ISSN1004-5627/CN35-1142/R。本刊先后被评为首届全国中医药优秀期刊, 福建省高校学报优秀期刊, 福建省优秀科技期刊。可供广大中医药、中西医结合人员, 中医院校师生及中医爱好者参阅。双月刊, 大 16 开本, 每册定价 5 元, 全年 30 元。国内邮发代号 34-59, 国外代号 BM4471。

《福建中医药》、《福建中医学院学报》编辑部地址: 福州市五四路 282 号, 邮编: 350003, 电话: (0591) 83570396, E-mail: xbbjb@fjtem.edu.cn

《新中医》征订启事

《新中医》(月刊)是由国家中医药管理局主管、广州中医药大学主办的一份国家级中医药学术刊物, 被国家新闻出版总署列入“中国期刊方阵-双效期刊”重点建设的刊物。是“中国生物医学核心期刊”, 2004 年《新中医》再次被确认为“中国中文核心期刊”。从 2005 年第 1 期起,《新中医》由原来每期 80 页增加到 96 页。2005 年定价: 每期 7.8 元, 全年 12 期, 共 93.6 元。国内邮发代号: 46-38, 国外: M186, 漏订者可直接向编辑部发行科订购, 地址: 广州市机场路 12 号大院广州中医药大学内 (510405)。

《中国针灸》杂志 2005 年征订启事

《中国针灸》杂志是综合性针灸学术刊物, 由中国针灸学会和中国中医研究院针灸研究所主办, 2004 年改为彩色国际标准大十六开本。每月 12 日出版, 国内定价: 每册: 8.00 元人民币, 全年 96.00 元人民币。国外定价: 每册 8.00 美元, 全年 96.00 美元。国内读者请到当地邮局订阅, 订阅代号 2-53。国外读者请与中国国际图书贸易总公司 (北京 399 信箱) 联系, 国外发行代号: M497。如错过在邮局订阅时间, 可与本编辑部联系办理邮购。联系地址: 北京东直门内南小街 16 号 (100700)。《中国针灸》编辑部。电话: 010-84014607 010-64014411-2946 (电话/传真) 010-84046331。网址: www.cjacupuncture.com E-mail: webmaster@cjacupuncture.com