

大豆凝集素对不同种属动物 T、B 淋巴细胞增殖功能影响的比较研究

王利民,于吉,杨树宝,孙青松,秦贵信

(吉林农业大学 动物科学技术学院,吉林 长春 130118)

摘要:用纯品大豆凝集素(SBA)分别对来自猪、狗、羊、兔和鸡等不同种属动物血液中的 T、B 淋巴细胞进行刺激,通过 MTT(四甲基偶氮唑盐)比色法检测其增殖功能,同时用常规的有丝分裂源刀豆素(ConA)和脂多糖(LPS)分别刺激 T 和 B 淋巴细胞作为对比,从而研究 SBA 对不同种属动物免疫功能的影响。结果表明:SBA 对狗、鸡和兔 T 和 B 淋巴细胞的刺激指数(SI)显著低于 ConA 和 LPS 对照组($P < 0.05$),对猪的 SI 虽低于对照组,但差异不显著($P > 0.05$),对羊的 SI 略高于对照组,差异也不显著($P > 0.05$)。SBA 对不同动物之间 T、B 淋巴细胞 SI 的影响也有差异,其中都以鸡的最高、羊的最低为显著特征;SBA 对同一种动物 T 和 B 淋巴细胞增殖功能的影响存在差异,SBA 对兔、狗和猪 T 淋巴细胞的 SI 高于 B 淋巴细胞,而羊和鸡恰好相反。SBA 对不同种属动物 T、B 淋巴细胞的增殖功能均有影响,尤其是对狗、兔和鸡的影响较大,而且除羊之外,其它种属动物 T、B 淋巴细胞的增殖功能都受到不同程度的抑制,揭示出不同种属动物免疫细胞的糖基化模式、细胞分化过程及信号传导机制不同。

关键词:大豆凝集素(SBA);T 淋巴细胞;B 淋巴细胞;增殖功能

中图分类号:S815.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2010)03-0490-04

Effect of Soybean Agglutinin (SBA) on Proliferation Function of T and B lymphocytes in Different Species of Animals

WANG Li-min, YU Ji, YANG Shu-bao, SUN Qing-song, QIN Gui-xin

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

Abstract: T and B lymphocytes from blood of different species of animals were stimulated by purified soybean agglutinin (SBA), and detected through MTT method, while compared with ConA and LPS groups, so the effect of SBA on immune function of different species of animals could be compared. The results showed that the SI of T and B lymphocytes in dog, chicken and rabbit were significantly lower than corresponding ConA and LPS groups ($P < 0.05$). It was lower in pig and higher in sheep than in control group, but both had no significant difference ($P > 0.05$). The SI of T and B lymphocytes stimulated by SBA in different species of animals were different, and the dominant feature was that chicken were the highest and sheep were the lowest. In the same species of animals, the effects of proliferation function of T and B lymphocytes were different, the SI of T lymphocytes were higher than that of B lymphocytes in rabbit, dog, and pig, but it was just against in sheep and chicken. These results indicated that the effects of proliferation function of T and B lymphocytes stimulated by SBA in different species of animals exist, especially in dog, rabbit and chicken. Except sheep, the proliferation function of T and B lymphocytes from other species of animals were more or less inhibited. It showed that the immunocytes from different species of animals have different glycosylation mode, cytodifferentiation process and signal transmission mechanism.

Key words: Soybean agglutinin (SBA); T lymphocyte; B lymphocyte; Proliferation function

大豆凝集素(Soybean agglutinin, SBA)是指大豆中对 N-乙酰基 D-半乳糖胺/D-半乳糖有结合特异性、分子量约为 120 kD 的一类糖蛋白。以往的研究证明, SBA 作为大豆中最主要的抗营养因子之一, 不仅抑制动物的生长, 而且对动物的内脏器官、肠道免疫系统、肠道菌群及刷状缘酶活性等产生一定的影响^[1,2], 尤其是对动物免疫系统的作用越来越受到重视。SBA 在免疫学中的重要性和它与淋巴细胞的相互作用有关^[3], 它与淋巴细胞相互作用可促发许多重要的免疫学反应, 如淋巴细胞的母细胞化及其分裂、细胞凝集、细胞膜上受体流动性改变、T 抑制细胞活化以及淋巴因子的分泌等。Andreas Gebert 等研究^[4]发现, 在兔盲肠拱形结构的顶膜上 M 细胞表达高水平的 N-乙酰基 D-半乳糖胺, 说明在淋巴组织

收稿日期:2010-04-13
基金项目:国家自然科学基金项目资助项目(30471251)。
第一作者简介:王利民(1966-),男,博士,副教授,现主要从事营养免疫研究。E-mail:wangliminold@yahoo.com.cn。
通讯作者:秦贵信,教授,博士生导师。E-mail:guixin@public.cc.jl.cn。

M 细胞表面含有和 SBA 结合的位点。

近年来有学者报道了混合大豆抗营养因子对动物免疫功能的影响,如:日粮大豆蛋白能降低红鲱鱼的非特异性免疫功能^[5],也能显著降低大鼠血浆中免疫球蛋白含量^[6]。目前只有汤树生等^[1]报道了纯化 SBA 对大鼠免疫功能的影响,发现日粮 SBA 不但具有降低大鼠的日增重和促进小肠增生的作用,同时还有抑制大鼠细胞免疫功能和体液免疫功能的作用。然而, SBA 对不同种属动物免疫功能影响的系统研究较少,现针对不同食性的 5 类动物(畜禽),通过分离淋巴细胞、SBA 刺激和 MTT(四甲基偶氮唑盐)比色,检测 T、B 淋巴细胞的增殖功能,从而系统、全面地比较 SBA 对不同种属动物免疫功能(主要是细胞免疫)的影响,进而丰富 SBA 的抗营养理论和分子免疫学理论。

1 材料与方法

1.1 试验动物及试剂

1.1.1 试验动物 供试动物选择猪、羊、狗、兔和鸡 5 种动物,均为雄性半性成熟年龄(相近的发育阶段)。猪 70 日龄(长白,长春市农业科学院种猪场),代表杂食兽;羊 60 日龄(小尾寒羊,长春市优质肉养繁育改良中心),代表反刍(复胃)兽;狗 80 日龄(比格犬,长春市医学实验动物中心),代表肉食兽;兔 75 日龄(日本大耳白,解放军 208 医院实验动物中心),代表草食(单胃)兽;鸡 75 日龄(爱拔益加,吉林德惠正大种鸡场),代表杂食禽。

1.1.2 主要试剂 SBA 购自 Sigma 公司(L1395),采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对其进行分子量和纯度鉴定^[8],采用兔红细胞凝集法对其进行生物活性鉴定^[8]。鉴定结果分子量为 120 kD,纯度 100%(电泳没有杂带),生物活性完好(稀释 256 倍时仍能使兔红细胞强凝集)。

1.2 试验方法

1.2.1 血液采集 每种动物 6 只(头),无菌取血 4 mL,肝素抗凝(每毫升 0.2 mg),其中取血部位猪、羊为前腔静脉,狗为前颈静脉,鸡为心脏,兔为耳缘静脉。

1.2.2 血液淋巴细胞制备 参照幺乃全^[7]的方法。

1.2.3 MTT 法检测淋巴细胞增殖反应最优条件的确定 根据正交试验设计温度(37℃和 40℃)、培养时间(48、60 和 72 h)、淋巴细胞浓度(1、2、3、4 和 5

$\times 10^6$ 个 \cdot mL⁻¹)和 SBA 浓度(根据最高浓度不超过其与淋巴细胞凝集的临界浓度设定为 1.25、2.5 和 5 μ g \cdot mL⁻¹)。在 96 孔细胞培养板上进行淋巴细胞转化增殖试验。试验设 2 个组别,1 个试验组(淋巴细胞 + SBA),1 个对照组(淋巴细胞),每个样品设 3 个重复孔。淋巴细胞和 SBA 加入量分别为 100 μ L,每孔总量为 200 μ L,不足的用完全 RPM I - 1640 补足。培养时间结束前 4 h,向各孔加入 20 μ L MTT 溶液,继续培养 4 h。取出后小心吸净上清液,每孔加入二甲基亚砷 100 μ L 溶解细胞,微型振荡器震荡混匀,避光放置 10 min,测 570 nm 波长的 OD 值。由 OD 值计算出刺激指数(stimulate index, SI),选出各因素最佳值。SI 的计算公式为:SI = (试验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)^[7]。最后根据正交表计算出淋巴细胞体外转化增殖的最优条件。

1.2.4 淋巴细胞的培养及检测 根据计算出的淋巴细胞体外增殖条件进行 MTT 比色试验。其中 T 淋巴细胞同时做 ConA 做对比组,B 淋巴细胞加 LPS 做对比组。每组做 3 个样品取平均值。计算 SI 值进行比较。

1.3 数据分析

采用 SPSS14.0 进行单因素方差分析和 *t* 检验统计分析,采用均数 \pm 标准差表示,数据的比较采用方差分析。

2 结果与分析

2.1 SBA 刺激淋巴细胞体外转化增殖的最优条件

经过大量试验摸索,结果显示,在 10% 的犊牛血清条件下,几种动物的淋巴细胞体外转化增殖最优条件各不相同(表 1),最适条件时对淋巴细胞有明显促进增殖的作用。

表 1 SBA 刺激淋巴细胞体外转化增殖的最优条件
Table 1 Optimization of lymphocytes transformation *in vitro*

动物 Animal	温度 Temperature /℃	SBA 浓度 SBA concn. / μ g \cdot mL	时间 Time/h	细胞浓度 Cell concn. / $\times 10^6$ 个 \cdot mL ⁻¹
猪 Pig	37	2.5	48	5
羊 Sheep	37	5.0	48	1
狗 Dog	37	2.5	60	5
鸡 Chicken	40	5.0	60	4
兔 Rabbit	37	1.25	72	3

2.2 SBA 对不同动物同种淋巴细胞(T 或 B)增殖功能影响的比较

由表 2 可知,SBA 对狗、鸡和兔 T 淋巴细胞刺激指数 SI 显著低于 ConA 对照组 ($P < 0.05$),对猪的刺激指数低于对照组,但差异不显著 ($P > 0.05$),对

羊的刺激指数略高于对照组,差异也不显著 ($P > 0.05$);SBA 对不同动物之间 T 淋巴细胞刺激指数 SI 也有差异;SBA 对鸡的 SI 最高,显著高于其它动物组 ($P < 0.05$),然后由高到低分别为兔、狗、猪和羊,各动物组之间比较差异均显著 ($P < 0.05$)。

表 2 大豆凝集素对不同种属动物 T、B 淋巴细胞刺激指数($\bar{x} \pm s, n = 6$) (A₅₉₀)

Table 2 Stimulation indexes of soybean agglutinin to T and B lymphocytes in different species of animals					
	猪 Pig	羊 Sheep	狗 Dog	鸡 Chicken	兔 Rabbit
ConA 刺激指数(SI) SI of ConA to Tc	1.392 ± 0.015 a	0.996 ± 0.039 b	1.793 ± 0.605 a	2.292 ± 0.286 a	1.956 ± 0.016 a
SBA 刺激 T 细胞指数(SI) SI of SBA to Tc	1.331 ± 0.004aC	1.037 ± 0.012bD	1.592 ± 0.025 bB	2.213 ± 0.004 bA	1.891 ± 0.009 bA
LPS 刺激指数(SI) SI of LPS to Bc	1.346 ± 0.003 a	1.225 ± 0.002a	1.573 ± 0.015 b	2.326 ± 0.003 a	1.212 ± 0.015 c
SBA 刺激 B 细胞指数(SI) SI of SBA to Bc	1.319 ± 0.004aB	1.228 ± 0.002 aC	1.249 ± 0.067 cB	2.239 ± 0.004bA	0.962 ± 0.016 dC

同一列数据不同小写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$),相同小写字母者表示差异不显著 ($P > 0.05$);同一行数据不同大写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$),相同大写字母者表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Different lowercase showed in the ordinate indicate the differences are significant at 0.05 levels, while the same letters indicate the differences aren't significant at 0.05 levels; Different majuscule showed in the row indicate the differences are significant at 0.05 levels, while the same letters indicate the differences aren't significant at 0.05 levels.

SBA 对狗、鸡和兔 B 淋巴细胞刺激指数 SI 显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.05$),而对猪的刺激指数虽然也低于对照组,但差异不显著 ($P > 0.05$);对羊的刺激指数略高于对照组,差异也不显著 ($P > 0.05$);与 T 淋巴细胞相似,SBA 对不同动物之间 B 淋巴细胞刺激指数 SI 也有差异,由高到低顺序分别为:鸡、猪、狗、羊和兔,其中对鸡的 SI 显著高于其它动物组。

2.3 SBA 对同一种动物 T 和 B 淋巴细胞增殖功能影响的比较

SBA 对同一种属动物 T 和 B 淋巴细胞增殖功能的影响有差异(表 2):其中 SBA 对兔 T 淋巴细胞的 SI 高于 B 淋巴细胞近 2 倍,差异极显著;狗和猪 T 淋巴细胞的 SI 都高于 B 淋巴细胞,但狗的差异显著 ($P < 0.05$),而猪差异不显著 ($P > 0.05$);与上述相反,羊和鸡 T 淋巴细胞的 SI 都低于 B 淋巴细胞,但羊的差异显著 ($P < 0.05$),而鸡差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

SBA 在生物学研究中获得广泛利用与它的糖结合专一性有关,在免疫学中的重要性则和它与淋巴细胞的相互作用有关。其与淋巴细胞相互作用可促发诸如细胞凝集、淋巴细胞的母细胞化及分裂、T 抑

制细胞活化、细胞膜上受体流动性改变及淋巴因子的分泌等许多重要的免疫学反应。花生凝集素能激活神经氨酸酶处理过的人和大鼠淋巴细胞,但不能激活小鼠淋巴细胞。每种凝集素都有其促分裂的最适浓度,超过此浓度刺激反而下降。一般当凝集素浓度超过 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时无刺激效果^[9]。凝集素首先与细胞表面的糖复合物迅速结合,进而触发细胞膜的通透性及磷脂代谢的变化,并传递信号引发细胞内 pH 和 Ca^{2+} 浓度的改变,从而激活细胞的代谢。植物凝集素主要刺激 T 淋巴细胞分化,但是某些凝集素还可刺激 B 淋巴细胞的分化^[10]。数个凝集素单体经化学铰链或物理聚合后,对神经氨酸酶处理过的人和鼠淋巴细胞的促分化效应有明显提高^[11]。

大豆中含有许多抗营养因子(如大豆抗原、SBA、单宁等),这些抗营养因子对动物免疫功能影响的研究已有报道,高浓度大豆蛋白能够使鲑鱼的生长性能受到抑制,破坏其肠道的完整性,而且抑制免疫功能^[5]。大豆蛋白能够降低大鼠血浆中 IgG、IgE 和 IgA 的浓度水平^[6]。为了避免其它抗营养因子的干扰,该研究采用纯化的 SBA 来研究其对不同种属动物免疫功能的影响,结果表明 SBA 对不同动

物淋巴细胞的增殖功能均有影响,其中对狗、兔和鸡影响较大,而对猪和羊影响较小,而且除了羊之外,SBA都明显抑制了T、B淋巴细胞的增殖功能,也就是降低了其免疫功能。同时发现SBA对兔、猪和狗B淋巴细胞增殖功能的抑制作用要强于T淋巴细胞,也就是SBA降低这三种动物体液免疫功能的作用强于细胞免疫功能。与上述相反,羊和鸡T淋巴细胞的SI都低于B淋巴细胞,说明SBA降低这3种动物细胞免疫功能的作用强于体液免疫功能。

凝集素促细胞分裂的机理还不清楚。已知的是:(1)凝集素必须与细胞表面的相应受体(糖分子)结合。因为凝集素的专一性糖可消除其分裂作用。用相应的糖苷酶可以去除淋巴细胞上与凝集素呈专一结合的糖也能抑制凝集素的丝裂原作用。而SBA只对经神经氨酸酶处理过的小鼠淋巴细胞有丝裂原作用,经处理后,细胞表面的专一性糖基才能暴露^[12];(2)T细胞活化需要协同细胞参与,如抗原提呈细胞,单纯ConA与细胞膜结合不能导致细胞分裂,但已证明,加入ConA后淋巴细胞对生长因子的受体表达增加,对生长因子敏感性升高,说明刀豆素促发与同种抗原促发有许多类似之处^[9];(3)凝集素的结合价对其促细胞分裂作用有影响,如四价的利马豆素(PLA)是强丝裂原,而二价的则只有很弱的促细胞分裂作用^[10]。细胞增殖是细胞生命活动重要特征之一,是生物繁殖和生长发育的基础,而细胞周期即是细胞生命活动的全过程。影响细胞周期的外在因素主要包括营养供给和相关激素刺激等,而凝集素刺激淋巴细胞分裂的作用既取决于凝集素本身,也取决于淋巴细胞的特性^[10]。SBA对N-乙酰基D-半乳糖胺和D-半乳糖这2种糖基具有结合特异性。这2种糖基在T淋巴细胞表面是暴露的,但在B淋巴细胞上却被唾液酸遮盖^[12]。由于不同种属动物淋巴细胞表面的糖复合物不同,从而大豆凝集素引起不同种属动物T、B淋巴细胞膜的通透性及磷脂代谢变化存在差异,从而导致对其增殖功能影响不同。这说明大豆凝集素对同一类型的细胞敏感强度具有种属差异性,也暗示出不同种属动物的免疫细胞存在着不同的糖基化模式、不同的细胞分化过程和不同的信号传导机制。

参考文献

- [1] 汤树生, 譙仕彦, 臧建军, 等. 纯化的大豆凝集素对大鼠内脏器官发育与免疫功能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2007, 43(7): 7-10. (Tang S S, Qiao S Y, Zang J J, et al. Effects of purified soybean agglutinin on immune function in rats[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2007, 43(7): 7-10.)
- [2] 李德发. 大豆抗营养因子[M]. 北京: 科学技术出版社, 2003. (Li D F. Anti-nutritional factors of Soybean[M]. Beijing: Chinese Science and Technology Press, 2003.)
- [3] Greer F, Pusztai A. Toxicity of kidney bean (*phaseolus vulgaris*) in rats: Changes in intestinal permeability[J]. Digestion, 1985, 32: 42-46.
- [4] Gebert A, Posselt W. Glycoconjugate expression defines the origin and differentiation pathway of intestinal M-cells[J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1997, 40(10): 1341-1350.
- [5] Burrells C, Williams P D, Southgate P J, et al. Immunological, physiological and pathological responses of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1999, 72(3-4): 277-288.
- [6] Minehira K, Inoue S, Nonaka M, et al. Effects of dietary protein type on oxidized cholesterol-induced alteration in age-related modulation of lipid metabolism and indices of immune function in rats[J]. Biochimica Biophysica Acta, 2000, 1483: 141-153.
- [7] 么乃全. 猪瘟超前免疫的细胞免疫检测[D]. 长春: 吉林农业大学, 2007. (YAO N Q. Cell Immunodetection of Advanced Immunity of Swine Plague [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2007.)
- [8] 王利民, 秦贵信, 刘林娜, 等. 三种亲和层析体系纯化大豆凝集素的比较研究[J]. 大豆科学, 2007, 26(1): 52-54. (Wang L M, Qin G X, Liu L N, et al. Comparison study of three affinity chromatography systems on soybean agglutinin purification [J]. Soybean Science, 2007, 26(1): 52-54.)
- [9] 祝希媛. 凝集素与免疫[J]. 基础医学与临床, 1987, 7(4): 252-258. (ZHU Xi-yuan. Agglutinin and Immunity[J]. Preclinical Medicine and Clinic, 1987, 7(4): 252-258.)
- [10] Pusztai A, William W B, Steward J C. A comprehensive scheme for the isolation of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean seeds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(5): 862-866.
- [11] Rao V S, Lam K, Oaste P K. Three dimensional structure of the soybean agglutinin Gal/GalNac complex by homology modeling[J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 1998, 15(5): 853-860.
- [12] 李振田. 大豆凝集素的检测、纯化和对大鼠抗营养机理的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2003. (LI Z T. Detection, purification and anti-nutritional mechanism of soybean agglutinin in rats [D]. Beijing: China Agricultural University, 2003.)