

富硒乳酸菌对镉暴露机体自然杀伤细胞活性调节*

曹萌, 陈龙, 许龙兵, 周娟

摘要:目的 探讨镉暴露机体脾脏自然杀伤(NK)细胞活性变化及富硒乳酸菌对其的调节作用。方法 72 只健康成年雌性 SD 大鼠,随机分成 4 组,即对照组(C 组)、低剂量镉染毒组(L-Cd 组)、中剂量镉染毒组(M-Cd 组)、高剂量镉染毒组(H-Cd 组),C、L-Cd、M-Cd、H-Cd 组分别饲喂含镉 0.2、5、10 mg/kg 饲料的全价饲料进行镉暴露实验,连续 9 周。另选择 48 只健康成年雄性小鼠,随机分成 C 组、Cd 组、镉染毒 + 中剂量富硒乳酸菌制剂保护组(Cd+MSe 组)、镉染毒 + 高剂量富硒乳酸菌制剂保护组(Cd+HSe 组),Cd、Cd+MSe、Cd+HSe 组小鼠每天分别按含镉 0.5 mg/kg 体重腹腔注射 CdCl₂ 溶液进行镉暴露,C 组注射与 Cd 组同等剂量的生理盐水。连续 12 d。结果 在整个实验期内,慢性镉暴露各组大鼠脾脏 NK 细胞活性均下降,且呈明显剂量-时间-反应关系;急性镉暴露小鼠 NK 细胞活性明显低于 C 组,而 Cd+MSe 组高于或显著高于 Cd 组,与 C 组接近,Cd+HSe 组虽高于 Cd 组但低于 C 组和 Cd+MSe 组。结论 急、慢性镉暴露均引起 NK 细胞活性下调,富硒乳酸菌能有效地对镉造成的机体损伤有保护作用,调节和改善 NK 细胞活性。

关键词: 富硒乳酸菌;镉;脾脏;NK 细胞

Effect of Se-enriched lactobacillus on NK cell activity in cadmium poisoned rats CAO Meng, CHEN Long, XU Longbing, et al. College of Life Science, Nanjing Normal University(Nanjing 210097, China)

Abstract: Objective To study the effect of Se-enriched lactobacillus on spleen NK cell activity in cadmium-poisoned rats. **Methods** Seventy-two healthy Sprague-Dawley female rats were chosen and divided into a control group (group C), a cadmium exposure group of low dose (group L-Cd), a cadmium exposure group of medium dose (group M-Cd) and a cadmium exposure group of high dose (group H-Cd). group C, L-Cd, M-Cd, H-Cd were orally dosed daily with 0.2, 5, 10 mg/(kg bw) cadmium for 9 weeks, respectively. Forty-eight healthy ICR male mice were chosen and divided randomly into a control group (group C), a cadmium exposure group (group Cd), a cadmium plus medium dose Se-enriched lactobacillus group (group Cd+MSe) and a cadmium plus high dose Se-enriched lactobacillus group (group Cd+HSe). Groups Cd, Cd+MSe and Cd+HSe were injected in the abdominal cavity with 0.5 mg/(kg bw) cadmium and group C with saline of the same dosage in group Cd for 12 days. **Results** During the entire experimental period, spleen NK cell activity of all groups with chronic cadmium exposure decreased, and displayed a relationship which intensified obviously with dosage increases and time elongation of cadmium exposure. The spleen NK cell activity of group Cd with acute cadmium exposure decreased significantly as compared with group C. The activity of group Cd+MSe was close to group C and superior of significantly higher than that of group Cd. The activity of group Cd+HSe was higher than that of group Cd, but lower than that of group C and Cd+MSe. **Conclusion** Acute and chronic cadmium exposure induced downregulation of NK cell activity. Se-enriched lactobacillus could protect effectively the injury induced by cadmium, and adjusted and ameliorated NK cell activity.

Key words: Se-enriched lactobacillus; cadmium; spleen; NK cell

自然杀伤(natural killer, NK)细胞是机体抵抗肿瘤和病毒感染的第一道防线。镉是一种极其重要的工业和环境污染物质。研究证实,镉具有免疫毒性,能不同程度地抑制机体的体液免疫和细胞免疫功能^[1,2]。硒是机体必需的微量元素之一,有提高机体免疫功能,增强机体抗肿瘤的能力^[3];缺硒机体的抗病力明显降低^[4]。富硒乳酸菌制剂是一种借助乳酸菌将无机硒转变成有机硒富集并生产有机硒的功能性调节剂^[5]。本文观察急、慢性镉暴露对机体脾脏 NK 细胞活性的影响及富硒乳酸菌制剂对其调节作用,探讨镉的免疫毒性及富硒乳酸菌制剂的保护效应。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择 72 只健康雌性 SD 大鼠(179.62 ± 0.97)g,由南京医科大学实验动物中心提供,经 3 d 适应性饲养

后,随机分成 4 组,即对照组(C 组)、低剂量镉染毒组(L-Cd 组)、中剂量镉染毒组(M-Cd 组)、高剂量镉染毒组(H-Cd 组),每天分别给 C 组、L-Cd 组、M-Cd 组、H-Cd 组饲喂含镉 0.2、5、10 mg/kg 饲料的全价饲料,进行慢性镉暴露实验,观察 9 周。

1.2 实验分组 48 只健康 ICR 雄性小鼠(38.71 ± 0.49)g,随机分成 4 组,即对照组(C 组)、镉染毒组(Cd 组)、镉染毒 + 中剂量富硒乳酸菌制剂保护组(Cd+MSe 组)、镉染毒 + 高剂量富硒乳酸菌制剂保护组(Cd+HSe 组),每组 12 只。整个实验期为 19 d(镉暴露前 7 d 和暴露期 12 d),C 组和 Cd 组均饲喂普通全价饲料,Cd+MSe 和 Cd+HSe 组分别饲喂含硒 2 和 4 mg/kg 饲料的富硒乳酸菌制剂全价饲料。镉暴露期内,Cd、Cd+MSe 和 Cd+HSe 组小鼠每天分别按含镉 0.5 mg/(kg bw)腹腔注射 CdCl₂(分析纯,上海亭新化工试剂厂提供,批号 970201)生理盐水注射液,C 组注射生理盐水。连续 12 d。整个实验期内,动物均自由采食、饮水,饲料过程中,每天换水,隔日换 1 次笼中的木屑垫料以保持清洁。环境温度 20~25℃。

1.3 NK 细胞悬液制备 大鼠在实验后第 6、9 周,小鼠在镉暴露实验后的第 6、12 d,分别从各组取 6 只,称重,脱颈椎处

*基金项目:江苏省重点实验室开放基金(KJS00033)

作者单位:南京师范大学生命科学院江苏省生物医药功能材料工程研究中心,南京 210097

作者简介:曹萌(1979-),男,江苏南京人,硕士在读,研究方向:免疫生理学。

通讯作者:陈龙

死,无菌取脾脏,制成悬液,除去红细胞后重悬于含 10% 小牛血清的 1640 培养液中(台盼蓝染色测成活率 > 95%)显微镜下记数,将细胞浓度调至 1×10^7 /ml,此即为备用的 NK 细胞悬液。

1.4 靶细胞的制备 传代培养的 SP₂₀瘤细胞重悬于含 5% 小牛血清 1640 培养液中,调细胞浓度至 1×10^5 /ml,即为备用的靶细胞。

1.5 NK 细胞活性测定 将 NK 细胞和靶细胞悬液各 0.1 ml 加入 96 孔细胞培养板中,每份样本设 3 个重复孔,同时设靶细胞自然释放对照组和最大释放对照组,利用乳酸脱氢酶释放法配合 ELx800 型酶联免疫检测仪测定 A₅₇₀ 值,并计算脾脏 NK 细胞活性。结果计算: NK 细胞活性(%) = (实验组 A 值 - 自然释放对照组 A 值) / (最大释放对照组 A 值 - 自然释放对照组 A 值) × 100^[6]。

1.6 数据处理 以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示,用计算机统计软件 Statistica 对数据作方差分析和 Student ' t 检验,确定差异有统计学意义。

2 结果

2.1 镉暴露动物的表现 整个实验期内,慢性镉暴露大鼠各组进食、活动、外观特征均比较正常,除第 9 周剖检时, H-Cd 组 1 只大鼠肝脏色泽发黑外,其余未发现其它病理变化,各組体重均随周龄增加而上升,与对照组差异无统计学意义。急性镉暴露小鼠 5 d 后, Cd 组表现明显的临床症状:精神抑郁,减食,毛色暗淡,紊乱; C 组、Cd+MSe 和 Cd+HSe 未见明显异常表现。在暴露第 6 d 和 12 d 剖检均见 Cd 组小鼠胃与肝脏有粘度,脾脏肿大, Cd+MSe 和 Cd+HSe 无明显异常表现。小鼠注射 CdCl₂ 后的整个实验期内,各组间体重差异无统计学意义。

2.2 慢性镉暴露大鼠脾脏 NK 细胞活性的变化(表 1) 由表 1 可见,在整个实验期内,镉暴露各组大鼠脾脏 NK 细胞活性均下降,并且随剂量增加和时间的延长而下降明显, H-Cd 组明显低于对照组。

表 1 慢性 CdCl₂ 暴露大鼠脾脏 NK 细胞活性(%)变化(n = 6, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

组别	CdCl ₂ 暴露后	
	6 周	9 周
C	22.32 ± 1.04	17.61 ± 2.83
L-Cd	19.84 ± 1.52	16.90 ± 2.23
M-Cd	20.60 ± 0.62	13.50 ± 1.95
H-Cd	16.53 ± 0.67 ^a	7.72 ± 0.70 ^a

注:与对照组相比较, a P < 0.01

2.3 富硒乳酸菌对急性镉暴露小鼠脾脏 NK 细胞活性影响(表 2) 表 2 显示,镉暴露第 6 d, Cd 组的 NK 细胞活性明显低于 C 组,而 Cd+MSe 组与 C 组接近,显著高于 Cd 组, Cd+HSe 组虽略高于 Cd 组但明显低于 C 和 Cd+MSe 组,第 12 d, Cd 组低于或明显低于其它 3 组,且与 C 组比较差异有统计学意义。

3 讨论

NK 细胞是一群具有非特异性自然杀伤能力的淋巴样细胞,被认为是机体抗肿瘤和病毒感染的第一道防线^[7]。因此,监视 NK 细胞活性对评价机体免疫功能状态有重要意义^[8]。

化学污染物镉的免疫毒性作用机制目前仍不完全清楚。本研究表明,急、慢性镉暴露引起脾脏 NK 细胞活性低下,且呈明

表 2 富硒乳酸菌对急性 CdCl₂ 暴露小鼠脾脏

NK 细胞活性(%)影响(n = 6, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

组别	CdCl ₂ 暴露后	
	6 d	9 d
C	18.69 ± 0.95 ^{ac}	15.53 ± 0.79 ^a
Cd	15.12 ± 1.00 ^b	12.54 ± 0.95 ^b
Cd+MSe	19.76 ± 1.45 ^a	14.78 ± 0.95
Cd+HSe	15.29 ± 0.29 ^b	13.29 ± 0.82

注:表中同一列以 a, b, c 标记 P < 0.05, 相同字母标记 P > 0.05 显剂量-时间-反应关系。提示随着镉暴露剂量增加和时间的延长,镉在体内积累引起机体 NK 细胞的免疫功能明显下调。有研究表明,镉可导致血中的 T 淋巴细胞(%)和 IL-2 水平的明显下降^[2]。另有资料显示, IL-2 是 NK 细胞重要的激活剂, NK 细胞自然活性的维持,依赖于体内持续存在的少量 IL-2, 如果 IL-2 消除, NK 活性即消失,由此可以认为,镉导致 NK 细胞活性下降,可能通过抑制 T 淋巴细胞的作用及使 IL-2 产生下降影响。

本研究发现, Cd+MSe 和 Cd+HSe 组 NK 细胞活性均高于或显著高于 Cd 组。说明富硒乳酸菌制剂能有效地调节和改善 NK 细胞活性。分析认为可能是其有效成分硒作用的结果。因为硒能够拮抗镉导致的机体氧化损伤、与镉竞争金属硫蛋白,形成硒-蛋白-镉复合物使镉排除体外,减少镉对机体各系统器官的毒害,达到对机体的保护作用^[9]。硒能明显影响免疫系统的功能,补硒后免疫功能低下的小鼠 NK 细胞活性显著提高,血清中 IL-2 的水平显著上升^[10]。

参考文献

- 薛彬,刘湛,雷智明. 镉对小鼠免疫毒性的研究[J]. 中国环境科学, 1995, 15(10): 76-78.
- 蒋英子,陈龙,高伟,等. 镉暴露大鼠血中白细胞介素-2 和皮质醇水平及白细胞免疫功能的变化[J]. 环境与健康杂志, 2002, 19(5): 364-366.
- Look MP, Rockstroh J K, Pao GS, et al. Serum selenium versus lymphocyte subsets and markers of disease progression and inflammatory response in human immunodeficiency virus-1 infection[J]. Biol Trace Elem Res, 1997, 56(1): 31-41.
- 张在香,杨晓光,夏奔明,等. 硒的分子生物学[J]. 国外医学卫生学分册, 1999, 26(2): 88-90.
- 周娟,陈龙,陈林君,等. 富硒乳酸菌对肝损伤小鼠红细胞脂质过氧化和免疫功能影响[J]. 营养学报, 2003, 25(4): 405-408.
- 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 2002. 407-411.
- 田志刚. NK 细胞研究现状的分析[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 6(1): 1-3.
- 张绪利. 检测 NK 细胞活性的意义[J]. 九江医学, 1994, 9(2): 106-108.
- 马吉飞,高洪,马卓. 氯化镉对小鼠的病理损伤和硒的保护效应[J]. 畜牧与兽医, 1998, 1(30): 9-11.
- 俞银姣,张罗修. 硒化卡拉胶对小鼠自然杀伤细胞活动的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 1996, 5(2): 60-63.

收稿日期: 2004-09-14

(宋艳萍编辑 张亚莲校对)