

# 慢性紫外线暴露下丁羟甲苯对小鼠部分免疫功能的保护作用

王家骏<sup>1</sup>, 刘扬<sup>2</sup>, 孙炜<sup>2</sup>, 于佳明<sup>3</sup>, 谢妮<sup>2</sup>, 李晶<sup>2</sup>, 王秉贤<sup>2</sup>

(1. 沈阳医学院, 辽宁 沈阳 110034; 2. 中国医科大学, 辽宁 沈阳 110001; 3. 沈阳市疾病预防控制中心, 辽宁 沈阳 110031)

**摘要:**目的 探讨抗氧化剂丁羟甲苯在紫外线慢性暴露下对小鼠免疫系统的保护作用。方法 用单克隆抗体免疫法、中性红比色法、MTT 法检测郎格罕细胞、腹腔巨噬细胞吞噬功能及脾脏 T 细胞增殖功能。结果 无毛鼠耳部和背部皮肤在紫外线慢性暴露下, 表皮组织中免疫递呈细胞——郎格罕细胞数显著减少, 脾脏 T 细胞增殖功能明显下降, 提示紫外线可抑制细胞免疫。饮食中加入丁羟甲苯(BHT)可以减轻小鼠郎格罕细胞数的下降, 差异有显著性( $P < 0.01$ ), 表明丁羟甲苯能拮抗紫外线对郎格罕细胞的免疫毒性。但丁羟甲苯对腹腔巨噬细胞吞噬功能、脾脏 T 细胞作用不显著。结论 丁羟甲苯在紫外线慢性暴露条件下, 具有拮抗紫外线诱导的细胞免疫抑制的作用。

**关键词:** 丁羟甲苯; 紫外线 细胞免疫抑制

中图分类号: R994. 6; R392-33 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)05-0282-03

## The protection of bytylated hydroxytoluene against immunotoxicity by chronic UV exposure

WANG Jia-jun<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>2</sup>, SUN Wei<sup>2</sup>, YU Jia-ming<sup>3</sup>, XIE Ni<sup>2</sup>, LI Jing<sup>2</sup>, WANG Bing-xian<sup>2</sup>

(1. Department of Environmental Health, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China; 2. China Medical University, Shenyang 110001, China; 3. Shenyang Center for Disease Control and Prevention, Shenyang 110031, China)

**Abstract: Objective** To explore protective action of bytylated hydroxytoluene (BHT) on immune system under chronic UV exposure.

**Method** Monoclonal antibody immune analysis, neutral red colonimetry and MTT method were used to measure the number of Langerhans cells (LC), phagocytosis of peritoneal macrophages (PM) and proliferating function of spleen T cell, respectively. **Result** After exposure to UV the number of immune presentation cell—LC in epidemis and proliferating function of spleen T cell of the hairless mouse were all declined significantly, UV could inhibit cellular immunity. Adding BHT into diet could significantly reduce the decline of LC number ( $P < 0.01$ ), suggesting that BHT could antagonize the immunotoxicity of UV. However, obvious effect on phagocytosis of PM and proliferation of spleen T cell could be seen. **Conclusion** BHT may partially antagonize cellular immunity toxicity induced by chronic UV exposure.

**Key words:** Bytylated hydroxytoluene (BHT); UV; Cellular immunity suppression

众所周知, 过量紫外线可使机体免疫受到抑制; 角朊细胞在紫外线 (UV) 照射下, 可产生单线态氧、 $H_2O_2$ 、羟自由基等, 是 UV 免疫毒性的分子机制; 丁羟甲苯 (bytylated hydroxytoluene, BHT) 是一种广泛应用的食品抗氧化剂, 但有关其在 UV 慢性暴露下对免疫系统的保护作用在我国尚未见报道。本实验是在 UV 慢性暴露下, 以与肿瘤免疫监视机制有直接关联的、参与细胞免疫反应的郎格罕细胞 (Langerhans cell, LC) 数量、脾脏 T 细胞、腹腔巨噬细胞 (peritoneal macrophage, PM) 功能为指标, 观察 BHT 在 UV 暴露中的作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物与分组

用北京医科大学实验动物中心提供的昆明种无毛

小鼠<sup>[1]</sup>, 体重 18~22 g, 共 72 只, 雌雄各半, 正式实验前观察 2 周, 按体重随机分为 3 组。

表 1 实验动物分组

| 分组    | UV 照射 | 抗氧化剂 |
|-------|-------|------|
| 阴性对照组 | -     | -    |
| BHT 组 | +     | +    |
| 阳性对照组 | +     | -    |

#### 1.2 紫外光源、最小红斑剂量确定及照射方式

实验所用光源为 200 W 高压汞灯。经辽宁省计量测试技术研究所检定, 其光谱能量集中于 297、313 和 365 nm 处, 为 UVA、UVB 混合光源。该光源经我们对 10 只健康小鼠背部测定, 一个最小红斑剂量 (MED) 相当于在光源正下方 94 cm 处照射 5 min。照射前使紫外灯预热 15 min, 待辐射强度稳定并经测定后, 将小鼠放置于法琅盘内进行照射。

#### 1.3 处理因素施加方式、观察指标及检测方法

1.3.1 处理因素施加方式 动物饲料由中国医科大学动物实验中心配制, 为 BHT 组提供足量全程 0.5%

收稿日期: 2003-01-20; 修回日期: 2003-04-14

作者简介: 王家骏 (1960-), 女, 山西平顺县人, 博士研究生, 副教授, 主要从事环境毒理研究工作。

BHT 的饲料<sup>[2]</sup>, 其他各组饲以正常饲料。照射按照 Hansen 等提出的并为国外常用的 UV 诱发皮肤癌的剂量递增照射法。5 d 为 1 个周期, 间隔 2 d 继续照射。第 1~5 周, 每天为 1 MED, 第 6 周开始, 照射剂量每周递增 0.2 MED, 至 15 周时照射剂量达到 3 MED。保持此剂量继续照射 2 周, 第 17 周照射结束。观察 15 周后处死, 检测耳、背部 LC 数, 脾脏 T 细胞增殖功能, PM 吞噬功能。

### 1.3.2 观察指标及检测方法

1.3.2.1 LC 检测 取小鼠背部、耳部皮肤, 刮除皮下组织, 切成约 1 cm<sup>2</sup> 小块, 置于 pH 7.2 的 EDTA 缓冲液中, 37 °C 孵育 2 h, 在解剖显微镜下分离表皮与真皮, 把表皮立即放入 pH 7.3 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 于室温下洗涤 20 min, 在纯丙酮内固定 20 min。用 PBS 再洗涤 1 h, 置于小鼠 IgG 单克隆抗体 OX<sub>4</sub> 内, 37 °C 孵育 2 h, 用 PBS 洗涤 90 min, 与 FITC-山羊 IgG 的 F(ab')<sub>2</sub> 片段在 37 °C 孵育 60 min, 用 PBS 洗涤 60 min, 置表皮于载片上, 真皮侧朝上, 滴甘油:PBS = 9:1, 加盖片后用落射式荧光显微镜计数<sup>[3,4]</sup>。

1.3.2.2 脾脏 T 细胞增殖功能测定 采用刀豆球蛋白 A (ConA) 刺激淋巴细胞转化实验 (MTT 法)。无菌解剖小鼠, 取脾脏研磨成单个细胞悬液, 1 500 r/min, 离心 10 min 后洗涤细胞 2 次, 以含质量分数 10% 胎牛血清 (FCS) 的 RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度为 5 × 10<sup>6</sup> 个/ml, 分 2 孔加入 24 孔培养板中, 每孔 1 ml, 其中 1 孔加 50 μl ConA (5 μg/ml), 另 1 孔不加 ConA 作为对照。放入 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 温箱孵育 68 h, 取出培养板加入四甲基偶氮唑蓝 (MTT) (5 mg/ml) 50 μl/孔, 在温箱孵育中继续培养 4 h 取出, 每孔加入 0.4 mol/L SDS 1 ml, 吹打混匀, 比色定量活 T 细胞还原 MTT 的量 (570 nm 处吸光度), 以加入 ConA 孔的吸光度 (A) 与不加 ConA 孔的吸光度 (A) 之差代表脾脏 T 细胞的增殖功能<sup>[5,9]</sup>。

1.3.2.3 小鼠 PM 吞噬功能测定 颈椎脱臼处死小鼠, 腹腔内注入 5 ml 冷 Hank's 液, 轻揉腹部数分钟, 小心吸取腹腔液, 装入离心管中, 计数细胞数, 调整细胞浓度为 2 × 10<sup>6</sup> 个/ml, 于 24 孔培养板中, 每孔加入 1 ml, 在 37 °C、CO<sub>2</sub> 温箱中孵育 4 h, 使其贴壁, 用含 10% FCS 的 RPMI 1640 完全培养液洗涤 3 次, 每孔加入 0.1% 中性红 1 ml, 放置 37 °C、CO<sub>2</sub> 温箱中孵育 20 min 后, 用 PBS 洗 3 遍, 每孔加入 1 ml 细胞溶解液 (无水乙醇:冰乙酸=1:1), 置室温 1 h 后混匀, 比色定量 PM 吞噬中性红的量 (540 nm 处吸光度)<sup>[5]</sup>。

### 1.4 试剂与仪器

1.4.1 试剂 OX<sub>4</sub>: 小鼠 IgG 单克隆抗体 (能与小鼠 Ia 抗原特异结合), 来自英国 Sera 实验室; FITC-山羊 IgG (抗小鼠 IgM): Cappel Company, USA; BHT 为上海生物化学试剂商店分装日本进口产品; 刀豆 ConA 为 Sigma 公司出口; FCS 由天津市生化制品厂生产。其他试剂均为分析纯, 同一批号, 实验分析用水均为 2 次蒸馏去离子水。

1.4.2 仪器 UVX RADIOMETER; MODEL UVX-31, ULTRA-VIOLET PRODUCTS. INCSAN GABRIEL, CALIFORNIA 91778, USA; 722 分光光度计: 上海第三分析仪器厂; CO<sub>2</sub> 培养箱; 荧光显微镜。

### 1.5 数据处理

实验所得数据输入计算机, 用 SPSS 软件进行 t 检验分析。

## 2 结果

### 2.1 BHT 对 UV 诱导的郎格罕细胞免疫毒性的保护作用

雄性和雌性 BHT 组、阳性对照组的耳部 LC 皆比阴性对照组低, P < 0.01, 且 BHT 组皆高于阳性对照组, P < 0.01。雄性背部 LC 数 BHT 组高于阴性对照组, 但两者差异无显著性。阳性对照组低于阴性对照组, P < 0.01。BHT 组高于阳性对照组, P < 0.01。雌性背部 LC 其 BHT 组和阳性对照组皆低于阴性对照组, P < 0.01。BHT 组高于阳性对照组, P < 0.01。见表 2。

表 2 各处理组耳部、背部 LC 数 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 动物数 | 雄 性         |            | 雌 性         |             |
|-------|-----|-------------|------------|-------------|-------------|
|       |     | 耳 部         | 背 部        | 耳 部         | 背 部         |
| 阴性对照  | 12  | 809 ± 81    | 694 ± 76   | 1 184 ± 144 | 774 ± 88    |
| BHT 组 | 12  | 659 ± 61* # | 746 ± 72 # | 618 ± 76* # | 499 ± 45* # |
| 阳性对照  | 12  | 334 ± 70*   | 372 ± 71*  | 339 ± 76*   | 278 ± 29*   |

\*与阴性对照组比较, P < 0.01; #与阳性对照组比较, P < 0.01。

## 2.2 经 UV 暴露后, BHT 对脾脏 T 细胞、腹腔巨噬细胞的保护作用

经 *t* 检验, 雌、雄性鼠的巨噬细胞吞噬功能、T 细胞增殖功能差异无显著性, 故把两者放在一起比较。由表 3 得知, 巨噬细胞吞噬功能 3 组相比差异无显著性。脾脏 T 细胞增殖功能 BHT 组、阳性对照组均低于阴性对照组,  $P < 0.01$ 。

表 3 各处理组 T 细胞增殖功能 (570 nm, 吸光度)

腹腔巨噬细胞吞噬功能 (540 nm, 吸光度) 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | <i>n</i> | 巨噬细胞吞噬功能      | T 细胞增殖功能       |
|-------|----------|---------------|----------------|
| 阴性对照  | 24       | 0.414 ± 0.029 | 0.378 ± 0.030  |
| BHT 组 | 24       | 0.408 ± 0.019 | 0.284 ± 0.021* |
| 阳性对照  | 24       | 0.398 ± 0.023 | 0.279 ± 0.025* |

与阴性对照组比较, \* $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

臭氧层破坏是当今重大的环境问题, 其后果是使到达地面的紫外线量增加。过量的 UV 照射可导致皮肤、眼睛和免疫系统的损伤。Kripke 等在研究 UV 照射诱发小鼠皮肤肿瘤的抗原特性时首先观察到 UV 的这种致免疫损伤作用。他们发现将许多具有强抗原性的肿瘤移植到正常的同基因系小鼠的皮肤上时, 会产生强烈的免疫排斥反应; 而将受体的小鼠预先照射 UVB 后, 则不产生这种排斥反应, 继而可引发肿瘤产生。这表明 UVB 照射可抑制小鼠的免疫排斥反应, 这是 UV 致癌的重要原因。后又经进一步研究证实, 此抑制作用可通过 T 细胞被动转移, 故认为 UVB 的抑制作用与机体的细胞免疫有关<sup>[7]</sup>。UVB 照射可诱导局部和系统免疫抑制, 局部免疫抑制效应体现在表皮 LC 形态及活性改变及可抑制对 UVB 诱发的肿瘤产生的免疫反应; UVB 诱导的系统免疫抑制效应在人和鼠中均抑制细胞因子产生, 抑制机体对皮肤和眼肿瘤的免疫反应<sup>[8]</sup>。

近年来, 随着对自由基研究的逐步深入, 人们认识到, 自由基与许多病理生理现象有关。Halliday 等所做的慢性低剂量 UV 混合光源实验表明, 抗氧化剂 VE 有效地防止了 UV 诱导的 LC 数量下降<sup>[9]</sup>。从而提示抗氧化剂在 UV 诱导的免疫抑制中发挥了一定的拮抗作用。

研究证实, 表皮 LC 是 UVB 的靶位点。UVB 暴露能改变 LC 的形态, 使其数量下降、Ia 抗原表达减少, 表面标志丧失。我们所做的 UV 慢性暴露研究结果表明, 与阴性对照组相比, 雄性鼠 BHT 组耳部 LC 数下

降了 19%, 阳性对照组则下降了 59%; 雌性鼠 BHT 组耳部 LC 数下降了 48%, 阳性对照组则下降了 71%。雄性鼠背部 LC 数, BHT 组高于阴性对照组, 与阴性对照组相比, 阳性对照组的 LC 数下降了 46%。雌性 BHT 组背部 LC 数与阴性对照组相比, 下降了 36%, 阳性对照组则下降了 64%。从而得知, 在本实验条件下, BHT 在耳部具有较好的拮抗 LC 减少的作用, 但在背部则显示部分拮抗 UV 暴露所诱发的 LC 数下降的作用。

T 细胞、巨噬细胞通过抗原递呈和产生适量的细胞因子在免疫反应中发挥重要作用, 同时它们也具备免疫调节作用, 既可增强亦可抑制免疫应答, 发挥其正负两方面的调节作用, 在正相调节方面, 可分泌具有不同生物学活性的物质, 增强免疫反应; 在负相调节方面, 当人体受到过度的刺激作用后, 会通过细胞本身或其所分泌的物质来抑制免疫应答。

本次实验结果显示, 在 UV 慢性暴露条件下, BHT 在提高腹腔巨噬细胞吞噬功能及脾脏 T 细胞增殖功能方面的作用不明显。有关 BHT 在 UV 暴露中的作用, 还需今后进一步研究。

(本实验承蒙中国医科大学第一附属医院国家重点皮肤免疫实验室王亚坤老师, 中国医科大学基础医学院微生物免疫研究室杨晓临老师大力协助, 在此一并致谢!)

## 参考文献:

- [1] 周淑佩, 王兆焯, 田枫, 等. 昆明无毛小鼠近交系培育及其生物学特征性的研究 [J]. 中国实验动物杂志, 2001, 11 (2): 90-92.
- [2] Homer S, Rheins IA, Granstein RD, et al. Suppression of ultraviolet light-induced tumor formation by dietary antioxidants [J]. The Journal of Investigative Dermatology, 1975, 65: 412-414.
- [3] 陈洪锋, 马成林, 袁景涛, 等. 来源于脾脏的表皮郎格罕氏细胞 [J]. 中华医学杂志, 1987, 67: 99-101.
- [4] Chen HD, Yuank J, Wang Y, et al. Distribution of ATP ase-positive Langerhans in normal adult human skin [J]. Br J Dermatol, 1985, 113: 707-711.
- [5] 薛彬. 免疫毒理学实验技术 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995. 14-66
- [6] 郑永唐, 贲昆龙. 测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立 [J]. 免疫学杂志, 1992, 8 (4): 266-269.
- [7] Kripke ML. Immunological effects of ultraviolet radiation. J Dermatol, 1991, 18: 429-433.
- [8] Stenn KS, Laura Lawrence, Debby Veis, et al. Expression of the bcl-2 protooncogene in the cycling adult mouse hair follicle [J]. J Invest Dermatol, 1994, 103: 107-111.
- [9] Halliday GM, Bestak R, Yuen KS, et al. UVA induced immunosuppression [J]. Mutat Res, 1998, 422 (1): 139-145.