

霞水母胶原蛋白活性肽对小鼠免疫功能的影响

邓超, 汤鲁宏, 陈伟, 王琪, 林丹 (江南大学医药学院, 江苏无锡 214122)

摘要 [目的]为霞水母胶原蛋白活性肽的临床应用提供理论依据。[方法]在探明霞水母胶原蛋白肽急性毒性反应的基础上, 分别以 25、50、100 mg/kg 的剂量给小鼠连续灌胃 30 d, 然后进行小鼠吞噬细胞吞噬功能、迟发型超敏反应、血清溶血素的测定。[结果]霞水母胶原蛋白肽为实际无毒性或低毒性物质; 试验组的 3 项免疫指标与空白对照组相比有显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 差异。[结论]霞水母胶原蛋白活性肽具有一定的免疫增强作用。

关键词 霞水母; 胶原蛋白活性肽; 免疫增强

中图分类号 S865.1⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)08-03557-02

Effects of Collagen Peptide from *Cyanea nozakii* on Mice Immune Function

DENG Chao et al (School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122)

Abstract [Objective] The study aimed to provide a theoretical basis for the clinical application of collagen peptide from *Cyanea nozakii*. [Method] After acute toxicity test on mice, collagen peptide from *C. nozakii* were given to mice by continuous intragastric administration for 30 d at the doses of 25, 50, 100 mg/kg, and then the phagocytosis of macrophage, delayed type hypersensitivity (DTH) and serum hemolysin level were determined. [Result] Collagen peptide from *C. nozakii* was atoxic or low toxic, and the three immune indices of experimental groups were significantly higher than those of the control group (treated with the same volume of normal saline) at 0.05 or 0.01 level. [Conclusion] Collagen peptide from *C. nozakii* has a certain immunopotential.

Key words *Cyanea nozakii*; Collagen peptide; Immunopotential

霞水母 (*Cyanea nozakii*) 俗称麻蜇, 是一种大型海洋浮游生物, 其海洋生殖腺发达、繁殖能力强、生长速度极快, 在繁殖、生长过程中分泌大量毒素, 造成大片海域海水严重污染, 致使大量的海洋生物、微生物死亡。因此, 霞水母暴发与赤潮并列海洋史上两大有害现象, 成为近十年来我国东南沿海海域一个十分突出的海洋生态问题^[1]。

从海洋生物中可分离得到许多化学结构独特、生理活性特异的天然产物, 可归为甾醇、萜类、皂甙、聚醚、大环内酯、脂肪酸、胶原蛋白肽等类型。其中不少海洋天然产物具有显著的抗肿瘤、抗心脑血管疾病、抗艾滋病毒或抗衰老等活性, 可望开发成新药或保健品。如 1964 年 Schmeer 首先从文蛤中提取出胶原蛋白肽类化合物蛤素, 具有抗癌活性; 1973 年, Dehme 等人从 *Anisodoris nobilis* 中分离的核苷类化合物 dorisidine 具有持续的降压作用; 传统补肾壮阳药海龙、海马、海狗肾、海虾等也均有较好的抗衰老作用^[2], 而关于以霞水母为原料, 从中分离提取所含的各种成分并就其生物活性进行系统的筛选和评价的研究, 目前未见任何报道。该研究对从霞水母中分离提取得到的胶原蛋白活性肽的免疫功能进行探讨, 以期为其临床应用提供理论依据, 并为进一步研究其免疫增强作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 霞水母胶原蛋白活性肽。由霞水母酶解提取、经冷冻干燥得到, 为淡棕色粉末。由江南大学医药学院药物化学与药物分析实验室制备 (具体方法参见已向国家申请的专利 200710171188.6)。

1.1.2 试验动物。健康雄性 ICR 小白鼠, 4 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 由扬州大学比较医学中心提供 [许可证号: SCXK (苏

2007-0001)]。购回后先饲养 3 d 使之应环境, 再开始试验。分笼饲养于空调室内, 室温 (25 ± 1) °C, 相对湿度 50% ~ 60%, 光照时数 12 h (7:00 ~ 19:00)。自由采食和饮水。

1.1.3 仪器。CR22G 高速冷冻离心机 (日本日立公司)、电热恒温鼓风干燥箱 (上海跃进医疗器械厂)、电子精密天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]、Unico 2000 可见分光光度计 [尤尼柯 (上海) 仪器有限公司]、注射器 (苏州林华塑料制品有限公司)、HH-6 数显恒温水浴锅 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)、PHS-3TC 数显 pH 计 (上海天达仪器有限公司)、AB104-N 电子天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司)、TGL-16G 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂)、GNP-9270 隔水式恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司)、YLS-Q4 耳肿打耳器 (山东省医学科学院设备站)、显微镜、微量注射器 (50 μl)、小白鼠灌胃器及灌胃针头、无菌手术器械等。

1.1.4 试剂。75% 酒精、Alsever 液 (葡萄糖 2.05 g, 氯化钠 0.42 g, 柠檬酸钠 0.80 g, 蒸馏水 100 ml)、鸡红细胞悬液、1:1 (V/V) 丙酮-甲醇溶液 (固定液)、4% (V/V) Giemsa-磷酸缓冲液 (染色液)、DNFB 溶液 (DNFB 50 mg 溶于 5 ml 丙酮-麻油溶液, 密封, 现用现配)、无菌生理盐水、无菌水等。

1.2 霞水母胶原蛋白肽急性毒性试验 取 20 只小白鼠, 随机分为 2 个组: 空白对照组、霞水母胶原蛋白肽试验组, 每组 10 只。根据食品安全性评价中的急性毒性分级标准, 试验组每只小白鼠按 7 500 mg/kg 剂量一次性灌胃给予 0.5 ml 霞水母胶原蛋白肽溶液, 空白对照组每只小鼠一次性灌胃给予 0.5 ml 生理盐水。给药后, 观察小白鼠 72 h 内是否死亡, 以及未来 7 d 内的进食情况和体重变化。7 d 后, 将存活小鼠脱颈椎处死, 剖解后观察主要脏器病变。

1.3 霞水母胶原蛋白肽对小鼠免疫功能的影响 分 3 个试验进行, 每个试验均取 40 只小白鼠, 随机分为 4 组, 每组 10 只。其中 3 组为霞水母胶原蛋白肽的低、中、高剂量组, 第 4 组为空白对照。按人体日食推荐量 7 g/人 (成人按每人 70

基金项目 国家农业科技成果转化资金项目 (2007GB2C100105)。

作者简介 邓超 (1972 -), 男, 江苏无锡人, 硕士, 讲师, 从事微生物学、食用菌学及天然产物制备技术的研究。

收稿日期 2008-12-22

kg 体重计)来设计动物试验剂量,分别为 25、50、100 mg/kg (相当于人体日食推荐量的 0.25、0.50、1.00 倍)。采用灌胃法,试验组小鼠每天给予 0.5 ml/只的胶原蛋白肽溶液,对照组给予等量生理盐水,每天 1 次,连续 30 d。然后进行下列各项指标的测定。

1.3.1 靛水母胶原蛋白肽对小白鼠吞噬细胞吞噬功能的影响。①鸡红细胞悬液的配制:成年公鸡,颈静脉取血于 Alsever 液中(体积比为 1:5),置于有玻璃珠的三角瓶中,朝一个方向充分摇匀 10 min,以去除纤维蛋白,置于 4℃ 冰箱保存。临用前将保存的鸡红细胞用生理盐水洗涤数次后,配制成 20% 的鸡红细胞悬液。②小白鼠吞噬细胞吞噬功能的测定方法:每鼠腹腔注射 20% 鸡红细胞悬液 1 ml。末次灌胃胶原蛋白肽液 30 min 后,颈椎脱臼处死动物,将其仰位固定于鼠板上,正中剪开腹壁皮肤,经腹腔注入生理盐水 2 ml,转动鼠板 1 min。然后吸出腹腔洗液 0.2 ml,平均分滴于 2 片载玻片上,放入湿盒内,置于 37℃ 孵箱温育 30 min。孵毕,于生理盐水中漂洗,以除去未贴片细胞。晾干,以 1:1 丙酮-甲醇溶液固定 7 min,4% (V/V) Giemsa-磷酸缓冲液染色 3 min,再用蒸馏水漂洗晾干。40× 显微镜下观察,按下述公式计算吞噬百分率和吞噬指数。

$$\text{吞噬百分率}(\%) = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \quad (2)$$

1.3.2 对小白鼠迟发型超敏反应(DTH)的影响。将小白鼠腹部皮肤用电动剃毛刀进行脱毛处理,范围约 3 cm × 3 cm,用 DNFB 溶液 50 μl 均匀涂抹致敏,致敏后第 5 天,将

1% DNFB 溶液 10 μl 均匀涂抹于小白鼠右耳(两面)进行攻击,空白对照组同样涂耳但未致敏。药物作用 24 h 后,颈椎脱臼处死小白鼠,剪下左右耳壳,用打孔器取下直径 8 mm 的耳片,称重。观察各组的差别,以左右耳重量之差表示 DTH 的程度^[3]。

1.3.3 对小白鼠血清溶血素的影响。①鸡红细胞悬液的配制:取 4℃ 保存的鸡红细胞(如“1.3.1”所述),用生理盐水洗涤 3 次,经 3 000 r/min 离心 5 min,得压积鸡红细胞,临用时用生理盐水稀释到 3%。②小白鼠血清的制备:摘除眼球取血于离心管内,放置约 1 h,将凝固血与管壁剥离,使血清充分析出,2 000 r/min 离心 10 min,收集血清。③血清溶血素的测定:取 2.5 ml 鸡红细胞悬液,加 0.1 ml 小白鼠血清,25℃ 保温 1 h 后 1 000 r/min 离心 2 min,于 540 nm 处测吸光度值^[4]。溶血素的含量按下式计算:

$$\text{溶血素含量} = \text{吸光度值} \times \text{稀释倍数} \quad (3)$$

1.4 数据处理 试验数据用 SPSS 11.0 进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 靛水母胶原蛋白肽急性毒性试验结果 通过观察,给药后 1 h 内小鼠活动均减少,4 h 后逐渐恢复正常活动。试验组小鼠 7 d 内进食量逐渐增加,且精神、毛色均正常;7 d 后,脱颈处死,肉眼尸检未见心、肝、脾、肺、肾等主要脏器病变和中毒现象。观察期内每天称重,试验组小鼠的体重不断增加,7 d 内增重 3.299 g,与对照组(3.374 g)无明显差别(表 1)。研究表明,在供试样品大剂量灌胃的情况下,未出现小鼠死亡,也未有明显毒性反应。说明靛水母胶原蛋白肽无毒性或毒性很小,其最大安全剂量在 7 500 mg/kg 以上。

表 1 靛水母胶原蛋白肽对小白鼠体重的影响

Table 1 Effects of collagen peptide from *Cyanea nozakii* on the weight of mice

g/只

组别 Group	天数//d Days						
	1	2	3	4	5	6	7
空白对照组 Control group	22.806	22.985	24.300	24.688	25.146	26.084	26.180
试验组 Experimental group	22.667	23.075	23.635	23.766	24.566	25.066	25.966

2.2 靛水母胶原蛋白肽对小白鼠吞噬细胞吞噬功能的影响 吞噬细胞吞噬功能是反映非特异性免疫功能状况的一个指标。由表 2 可知,中(50 mg/kg)、高(100 mg/kg)剂量组与对照

表 2 靛水母胶原蛋白肽对小白鼠吞噬细胞吞噬功能的影响

Table 2 Effects of collagen peptide from *Cyanea nozakii* on the phagocytosis of mice macrophage

剂量//mg/kg Dose	小鼠数量 Mouse quantity	吞噬百分率//% Phagocytic percentage	吞噬指数 Phagocytic index
0	10	33.83 ± 1.05	2.23 ± 0.17
25	10	35.69 ± 1.56	2.25 ± 1.00
50	10	57.42 ± 2.18*	5.52 ± 0.56**
100	10	65.36 ± 2.96*	6.30 ± 1.06**

注:表中数据为 $\bar{x} \pm s$; * 表示与对照组差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)。下同。

Note: Data in the table were shown by $\bar{x} \pm s$. Comparing with the control group, * means significant differences ($P < 0.05$), and ** means extremely significant differences ($P < 0.01$). The same as below.

组(0 mg/kg)相比吞噬百分率差异显著 ($P < 0.05$),吞噬指数差异极显著 ($P < 0.01$),低剂量组(25 mg/kg)与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$),表明靛水母胶原蛋白肽能提高吞噬细胞的吞噬活性,增强单核吞噬细胞系统的吞噬功能。

2.3 靛水母胶原蛋白肽对小白鼠迟发型超敏反应的影响

迟发型超敏反应是反映细胞免疫功能状况的一项指标。由表 3 可知,低剂量组和高剂量组的小白鼠左右耳廓片重量之

表 3 靛水母胶原蛋白肽对小白鼠迟发型超敏反应的影响

Table 3 Effects of collagen peptide from *Cyanea nozakii* on the delayed type hypersensitivity of mice

剂量//mg/kg Dose	小鼠数量 Mouse quantity	左右耳廓片重量之差//mg Double auricle weight difference
0	10	3.40 ± 1.01
25	10	6.55 ± 1.62
50	10	11.05 ± 5.35**
100	10	4.00 ± 2.12

(下转第 3563 页)

- (66):62-66.
- [4] BONIOTTO M, TOSSIA, DELPERO M, et al. Evolution of the beta defensin 2 gene in primates [J]. *Genes and Immunity*,2003 (4):251-257.
- [5] ENNO KLÜVER, KNUT ADERMANN, AXEL SCHULZ. Synthesis and structure-activity relationship of β -defensin 3, multi-functional peptides of the immune system [J]. *Journal of Peptide Science*,2006,122:243-357.
- [6] KRISHNAKUMARI V, SHARADADEVI A, SINGH S, et al. Single disulfide and linear analogues corresponding to the carboxyterminal segment of bovine β -defensin-2: Effects of introducing the β -hairpin nucleating sequence D-pro-gly on antibacterial activity and biophysical properties [J]. *Biochemistry*,2003, 42:9307-9315.
- [7] SELSTED M E, HARWIG S S, GAM T, et al. Primary structures of three human neutrophil defensins [J]. *Clin Invest*,1985,76 (4):1436-1439.
- [8] 方向明. β -防御素-2 研究进展 [J]. *浙江大学学报*,2006,35 (6):581-584.
- [9] THOUZEAU C, LE MAHO Y, FROGET G. Sphenicins, avian β -defensins in preserved stomach contents of the king penguin, *Aptenodytes patagonicus* [J]. *Journal of Biological Chemistry*,2003,278 (5):1053-1058.
- [10] TAKAHIDE KOUNO, NAOKI FUJITANI, MINEYUKI MIZUGUCHI, et al. A novel β -Defensin structure: A potential strategy of big defensin for overcoming resistance by gram-positive bacteria [J]. *Biochemistry*,2008, 47:10611-10619.
- [11] 谷津津,方彩凤. β -防御素及其在耳鼻喉科中的研究 [J]. *医学综述*,2008,14 (2):255-257.
- [12] 赵凤立,朱连勤,乔彦良. β -防御素的研究进展 [J]. *饲料工业*,2007,28 (10):6-8.
- [13] ENNO KLUVER, SANDRA SCHULZ. Structure-activity relation of β -defensin 3:Influence of disulfide bonds and cysteine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity [J]. *Biochemistry*,2005,44:9804-9816.
- [14] ISAO NAGAOKA, FRANCOIS NIYONSABA, YUKO TSUTSUMI-IISHII, et al. Evaluation of the effect of human β -defensins on neutrophil apoptosis [J]. *International Immunology*,2008,4:543-553.
- [15] 魏大军,盖晓东,徐鸿洁,等. 哺乳动物防御素的研究及应用 [J]. *北华大学*,2007,8 (2):124-127.
- [16] LINDSEY C PINGEL, KARL G KOHLGRAF, CHRISTOPHER J HANSEN, et al. Human β -defensin-3 bind to hemagglutinin B (rHagB), a nan-fimbrial adhesion from *Porphyromonas gingivalis*, and attenuates a pro-inflammatory [J]. *Immunology and Cell Biology*,2008,86:643-649.
- [17] 曾雄,祝红霞,陈永慧,等. 抗菌肽的研究进展 [J]. *畜牧业*,2008 (2):31-33.
- [18] HANCOCK R E, DIAMOND G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defensins [J]. *Microbiology*,2000,9 (8):402-410.
- [19] HARDER J, BARTELS J, CHRISTOPHERS E, et al. Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic [J]. *Biol Chem*, 2001,276 (8):5707-5713.
- [20] 王海英,祁克宗,彭开松,等. 鸡 β -防御素-2 基因的克隆及原核表达载体的构建 [J]. *家禽科学*,2008 (3):6-9.
- [21] 石建州,康相涛,孙桂荣,等. 鸡 β -防御素及其基因工程研究进展 [J]. *江西师范大学学报*,2007,31 (1):103-106.
- [22] 王静,杨玉荣,梁宏德,等. 禽类防御素作用机理及基因工程研究进展 [J]. *动物医学进展*,2007,28 (10):81-84.
- [23] 石卓,舒强,赵正言,等. β -防御素-2 基因腺病毒表达载体的构建与真核表达 [J]. *浙江大学学报*,2006,35 (6):590-595.
- [24] 李娟,唐玲珊,刘娟,等. 人 β -防御素-2 基因表达及其抗菌活性 [J]. *中国公共卫生*,2007,23 (9):1082-1084.
- [25] 曹玉红,张国成,张光运,等. 人 β -防御素-4 基因的合成及其真核表达载体的构建 [J]. *医学研究生报*,2007,20 (10):1115-1118.
- [26] MARCIUS S ALMEIDA, KATIA S CABRAL. cDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein Psdl in the yeast *Pichia pastoris* [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*,2001, 395 (2):199-207.
- [27] 王艾平,王军平,粟永萍. 防御素基因工程制备研究进展 [J]. *微生物学通报*,2008,35 (3):436-442.
- [28] KRYLOV A V, KISSLEVA E P ALESHINA G M, et al. Effects defensin and lactoferrin on functional activity of endothelial cell *in vitro* [J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*,2007,144 (3):331-334.

(上接第 3558 页)

差与空白对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$), 中剂量组与对照组相比有极显著差异 ($P < 0.01$)。表明霞水母胶原蛋白肽剂量太低不能提高小白鼠的细胞免疫功能, 剂量太高又会损伤其细胞免疫力, 在该试验条件下, 50 mg/kg 剂量能显著提高小白鼠细胞免疫功能。

2.4 霞水母胶原蛋白肽对小白鼠血清溶血素的影响 溶血素 (IgM) 的测定是反映体液免疫功能状况的一种方法, 如果用药后溶血素生成增多, 则出现红细胞溶血时的吸光度值增高, 表明用药后机体的体液免疫作用增强。由表4结果可

表 4 霞水母胶原蛋白肽对小白鼠血清溶血素的影响

Table 4 Effects of collagen peptide from *Cyanea nozakii* on the serum hemolysin content of mice

剂量//mg/kg	小鼠数量	溶血素含量 (OD 值)
Dose	Mouse quantity	Serum hemolysin content (OD value)
0	10	0.25 ± 0.03
25	10	0.26 ± 0.04
50	10	0.28 ± 0.05
100	10	0.40 ± 0.11*

知, 低剂量组和中剂量组与空白对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 高剂量组与空白对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$), 说明高剂量霞水母胶原蛋白肽能显著提高小白鼠体液免疫功能。

3 结论

急性毒性试验结果表明霞水母胶原蛋白肽在 7 500 mg/kg 剂量时, 对小鼠无明显毒性反应。免疫试验结果显示霞水母胶原蛋白肽能提高小鼠的单核巨噬细胞功能, 增强细胞免疫功能和体液免疫功能。说明霞水母胶原蛋白肽具有一定的免疫增强作用, 其作用机理有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 葛利君, 何德民. 生态危机的标志性信号 [J]. *中国水产*,2004 (9):23.
- [2] 黄建设, 龙娟娟, 张思. 海洋天然产物及其生理活性的研究进展 [J]. *海洋通报*,2001,20 (4):83-91.
- [3] 江兴林, 蒋乐龙, 胡祥上. 中药白芍对小白鼠体液免疫功能影响的探讨 [J]. *怀化医学学报*,2006,5 (2):54-55.
- [4] 刘春丽, 张凤林, 李明凯, 等. 山楂提取物对免疫功能的调节作用 [J]. *中华中西医杂志*,2005 (21):2810-2811.