

牡蛎肽对免疫抑制小鼠免疫功能的影响

许 丹¹, 林 峰², 朱小语¹, 刘文颖², 陈晓文¹, 冯金秋¹, 范爱琴¹, 蔡木易^{2△}, 许雅君^{1△}

(1. 北京大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 北京 100191; 2. 中国食品发酵工业研究院, 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心, 北京 100015)

[摘要] **目的:**探讨牡蛎肽对免疫抑制小鼠的免疫调节作用及可能机制。**方法:**以环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)致免疫低下雌性 ICR 小鼠为动物模型, 观察不同剂量牡蛎肽(0.5 g/kg 低剂量组、1.0 g/kg 中剂量组、2.0 g/kg 高剂量组)干预 15 d 后对小鼠体重、免疫器官相对重量、免疫器官显微结构、外周血白细胞数目、T 淋巴细胞亚群百分比、血清中的细胞因子浓度以及骨髓有核细胞数和 DNA 含量的影响。**结果:**腹腔注射 CTX 模型组小鼠与对照组相比, 胸腺和脾脏萎缩, 显微结构紊乱, 外周血白细胞数目降低($P=0.04$), 外周血 CD3⁺T 淋巴细胞百分比下降($P=0.003$), CD8⁺T 淋巴细胞百分比下降($P=0.002$), 外周血中 IL-5 浓度显著升高($P<0.01$), 小鼠骨髓有核细胞浓度及骨髓 DNA 含量降低($P=0.04$, $P<0.01$)。牡蛎肽灌胃组小鼠的胸腺和脾脏显微结构恢复正常, 高剂量牡蛎肽灌胃组小鼠的外周血白细胞数目与模型组相比升高($P=0.003$), 中剂量($P=0.04$)和高剂量($P=0.02$)的牡蛎肽灌胃组小鼠外周血 CD3⁺T 淋巴细胞百分比与模型组相比升高, 高剂量的牡蛎肽灌胃组小鼠外周血 CD8⁺T 淋巴细胞百分比与模型组相比升高($P=0.002$), 各剂量牡蛎肽灌胃组的小鼠外周血中 IL-5 浓度与模型组小鼠相比显著降低(P 值均 <0.01), 高剂量牡蛎肽灌胃组的小鼠外周血中 IL-17 浓度与对照组相比明显降低($P=0.03$), 各剂量牡蛎肽灌胃组的小鼠骨髓有核细胞浓度与模型组相比均明显升高(低剂量组 *vs.* 模型组, $P=0.04$; 中剂量组 *vs.* 模型组, $P=0.02$; 高剂量组 *vs.* 模型组, $P=0.01$), 小鼠骨髓 DNA 含量与模型组相比也均明显升高(P 值均 <0.01)。**结论:**牡蛎肽可改善 CTX 所致免疫低下小鼠紊乱的免疫器官结构, 恢复 CTX 造成的小鼠 T 淋巴细胞比例失调及细胞因子紊乱, 升高骨髓有核细胞数及骨髓 DNA 含量, 从而增强机体免疫功能。

[关键词] 肽类; 牡蛎科; 环磷酰胺; 免疫调节; 生物活性肽

[中图分类号] R151.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2016)03-0392-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-167X.2016.03.003

Immunomodulatory effect of oyster peptide on immunosuppressed mice

XU Dan¹, LIN Feng², ZHU Xiao-yu¹, LIU Wen-ying², CHEN Xiao-wen¹, FENG Jin-qiu¹, FAN Ai-qin¹, CAI Mu-yi^{2△}, XU Ya-jun^{1△}

(1. Department of Nutrition and Food Hygiene, Peking University School of Public Health, Beijing 100191, China; 2. Beijing Engineering Research Center of Protein and Functional Peptides, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100015, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the immunomodulating effect of oyster peptide on immunosuppressed mice. **Methods:** ICR mice injected with cyclophosphamide (CTX) were adopted as the module group, with mice without treatment as the control group, and different dosages of oyster peptide (0.5 g/kg, 1.0 g/kg, and 2.0 g/kg) were given to the low, middle, and high groups for 15 days. The body weight, spleen, and thymus weight of the mice, structures under the microscope of the immune organs, numbers of white blood cells, ratios of T lymphocyte subsets, immune cytokines and numbers of nuclear cells, and DNA content in bone marrow were all assessed. **Results:** Compared with the control group, the structures of thymus and spleen of the mice in the CTX group appeared obscure and shrunk when observed under microscope, the number of their white blood cells declined ($P=0.04$), the proportion of their CD3⁺T cells in peripheral blood declined ($P=0.003$), the proportion of their CD8⁺T cells in peripheral blood declined ($P=0.002$), the concentration of their IL-5 in peripheral blood significantly increased ($P<0.01$), the concentration of their nucleated cells and DNA density in bone marrow decreased ($P=0.04$, $P<0.01$). Oyster could improve the structures of thymus and spleen of the immunosuppressed mice. Compared with the CTX group, the number of white blood cells in 2.0 g/kg group increased ($P=0.003$), the proportion of CD3⁺T cells in peripheral blood in 1.0 g/kg group ($P=0.04$)

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD33B04-02)和国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2013AA102205-02)资助
Supported by the National Science & Technology Pillar Program During the 12th Five-Year Plan (2012BAD33B04-02) and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2013AA102205-02)

△ Corresponding author's e-mail, caimuyi@139.com, xuyajun@bjmu.edu.cn

网络出版时间:2016-1-6 10:13:56 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20160106.1013.004.html>

and 2.0 g/kg group ($P=0.02$) increased, the proportion of $CD8^+$ T cells in peripheral blood in 2.0 g/kg group increased ($P=0.002$), the concentration of IL-5 in peripheral blood in all the oyster treated groups increased ($P<0.01$ in 0.5 g/kg, 1.0 g/kg, and 2.0 g/kg groups), the concentration of IL-17 in peripheral blood in 2.0 g/kg group decreased ($P=0.03$), the concentration of nucleated cells in bone marrow of all the oyster treated groups increased (0.5 g/kg vs. CTX, $P=0.04$; 1.0 g/kg vs. CTX, $P=0.02$; 2.0 g/kg vs. CTX $P=0.01$), the DNA content in bone marrow of all the oyster treated groups increased ($P<0.01$ in the 0.5 g/kg, 1.0 g/kg, and 2.0 g/kg groups). **Conclusion:** Oyster peptide could improve the structures of immune organs of the CTX-induced immunosuppressed mice, recover the imbalances of T lymphocyte subsets, improve the immune cytokines and increase numbers of nucleated cells and DNA content in bone marrow, thus improving the immunologic function.

KEY WORDS Peptide; Ostreidae; Cyclophosphamid; Immunoregulation; Bioactive peptides

生物活性肽是一类来源于蛋白质的、对生物体的生命活动具有调节作用的肽类化合物。近年来的研究发现,生物活性肽具有促进免疫、激素调节、降血压、降血脂、抗菌、抗病毒等多种生理调节功能^[1-2]。生物活性肽不仅具有良好的吸收性,可以直接从肠道吸收进入血液,而且活性很高,很小的量就能发挥生理作用,此外,自然界中生物活性肽的来源十分广泛,目前已从许多动、植物以及微生物中分离出了多种生物活性肽^[3]。开发和研究生物活性肽类食品已成为目前食品行业中的一个热点。

在众多生物活性肽中,源自海洋的肽类数量十分庞大。已有许多研究证明,从海洋鱼类、贝类、藻类等提取的肽类物质具有抗氧化、抗高血压、抑制血小板凝集等生理活性^[4]。牡蛎(oyster)是海产贝壳的一种,因其含有丰富的微量元素、功能性多肽、氨基酸等营养成分,具有较高的营养价值^[5],但牡蛎中生物活性肽的功效还有待研究。本研究以环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)诱导免疫力低下的小鼠为模型,研究了牡蛎肽对免疫抑制小鼠免疫功能的影响,并初步探讨了其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

牡蛎肽由中国食品工业发酵研究院提供,为淡黄色粉末。牡蛎肽是以牡蛎为原料,通过木瓜蛋白酶和风味蛋白酶两步酶解后,再经过分离、纯化、喷雾干燥等制成的寡肽混合物。牡蛎肽中相对分子质量在 1×10^3 以下的肽段占90%以上,主要是8肽以下的小肽。牡蛎肽中各氨基酸组成为:天冬氨酸和天冬酰胺8.37%,苏氨酸3.97%,丝氨酸4.19%,谷氨酸和谷氨酰胺10.98%,甘氨酸4.55%,丙氨酸4.80%,缬氨酸0.70%,甲硫氨酸2.17%,异亮氨酸3.69%,亮氨酸6.09%,酪氨酸3.03%,苯丙氨酸3.38%,赖氨酸7.22%,组氨酸0.99%,精氨酸6.32%,脯氨酸2.09%,半胱氨酸8.62%。

1.2 实验动物

由北京大学医学部实验动物中心提供 ICR 健康雌性小鼠(SPF级,合格证号:SCXK11-00-0004),6~8周龄,体重18~22 g,共60只,随机分成5组,每组12只。实验动物饲养于屏障环境,温度(24 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,湿度50%~60%,昼夜交替12 h:12 h。本动物实验方案通过北京大学生物医学伦理委员会审核批准。

1.3 实验动物分组及处理

60只健康小鼠适应环境3 d后,按体重随机分为对照组,模型组以及牡蛎肽低、中、高剂量组,每组12只,基础饲料喂养。实验第1~3天,除对照组外,其余各组每天腹腔注射80 mg/kg CTX,对照组每天腹腔注射生理盐水0.2 mL。第4天起,牡蛎肽低、中、高剂量组分别经口灌胃给予0.5 g/kg、1.0 g/kg、2.0 g/kg牡蛎肽,对照组和模型组给予2.0 g/kg酪蛋白,灌胃体积为0.1 mL/10 g体重。牡蛎肽和酪蛋白均用双蒸水配制,每周称量动物体重调整灌胃量。实验期间动物自由进食、进水。灌胃15 d后动物前夜禁食,第2天晨起进行各项指标测定。

1.4 观察指标及检测方法

胸腺、脾脏指数:称量动物体重,处死动物后剥取胸腺和脾脏,用电子天平称重,结果以胸腺和脾脏的重量指数(mg/g)表示。

胸腺、脾脏形态学观察:胸腺、脾脏称重后,放入4%(体积分数)甲醛溶液中固定,石蜡包埋,苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE染色),于显微镜下观察胸腺和脾脏的组织形态学变化并拍照。

血液白细胞计数:摘取动物眼球取全血于抗凝采血管中,立即震荡混匀,用全自动血细胞分析仪(日本光电工业株式会社,MEK-7222K)计数白细胞数目。

血液T淋巴细胞亚群测定:加100 μL 混匀的抗凝全血于试管中,再分别加入荧光标记的各种抗小鼠的CD单克隆抗体各10 μL ,室温避光孵育15 min进行染色。加入溶血素2 mL溶解红细胞,在振荡器

上混匀后室温避光放置 10 min, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 加入适量 PBS 缓冲液清洗细胞, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 加入固定液 300 μ L 重悬细胞, 用流式细胞仪 (美国, BD-FACS Calibur) 检测 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞以及 CD8⁺T 细胞亚群百分比。

血清中白细胞介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-5 (IL-5)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-10 (IL-10)、白细胞介素-17 (IL-17)、 γ -干扰素 (interferon γ , IFN- γ)、粒-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 等细胞因子水平的测定: 采用流式微球阵列 (cytometric bead array, CBA) 液相多重蛋白定量技术, 将 Bender Medsystems 试剂盒中的细胞因子标准品稀释成 7 种梯度浓度, 制备细胞因子标准曲线, 吸取待测血清 25 μ L 置于待检管中, 同时加入 25 μ L 捕获微球、50 μ L biotin 结合抗体, 室温避光孵育 2 h 后, 清洗 2 次, 弃去上清液, 加入 50 μ L 藻红素 (phycoerythrin, PE), 再避光孵育 1 h 后, 清洗 2 次, 弃去上清液, 加入 300 μ L 洗液后上流式细胞仪检测 (美国, BD-FACS Calibur)。

表 1 牡蛎肽对小鼠体重及免疫器官相对重量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of oyster peptide on body weight and relative weights of immune organs ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

| Group | Initial body weight/g | Final body weight/g | Thymus index/(mg/g) | Spleen index/(mg/g) |
|----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Control | 18.63 \pm 0.52 | 24.13 \pm 1.62 | 2.44 \pm 0.48 | 5.31 \pm 0.91 |
| CTX | 19.65 \pm 1.81 | 24.45 \pm 1.36 | 2.43 \pm 0.74 | 5.65 \pm 0.87 |
| CTX + oyster peptide | | | | |
| Low dose | 19.70 \pm 1.32 | 23.97 \pm 1.44 | 2.71 \pm 0.43 | 5.75 \pm 0.60 |
| Middle dose | 19.77 \pm 1.49 | 23.89 \pm 1.68 | 2.55 \pm 0.53 | 5.41 \pm 0.65 |
| High dose | 19.69 \pm 1.29 | 24.25 \pm 1.63 | 2.93 \pm 1.10 | 6.21 \pm 0.81 |
| F value | 1.89 | 0.25 | 1.02 | 2.45 |
| P value | 0.13 | 0.91 | 0.40 | 0.06 |

CTX, cyclophosphamide.

2.2 牡蛎肽对小鼠胸腺和脾脏组织结构的影响

如图 1 所示, 对照组胸腺组织皮质和髓质分界清晰, 皮质着色较深, 且淋巴细胞排列紧密, 而髓质着色较浅。模型组胸腺组织皮质和髓质分界不清, 皮质区淋巴细胞减少, 细胞间隙增宽, 胸腺组织明显萎缩。与模型组相比, 低剂量和中剂量牡蛎肽组的胸腺组织皮质和髓质分界模糊的状况有所改善, 皮质有所增厚, 细胞排列变得更加密集; 高剂量组的胸腺皮质区显著增厚, 皮、髓质分界明显, 与对照组几乎无差异。

骨髓有核细胞计数及骨髓 DNA 含量测定^[6]: 取小鼠股骨, 去除附着的肌肉及结缔组织后, 用 1 mL Hank's 液将骨髓液冲洗至小试管内, 吸取 0.38 mL 盐酸溶液 (0.1 mol/L) 于另一小试管, 加入混匀后的骨髓液 20 μ L 混匀, 待红细胞溶解后, 冲入血细胞计数池, 在显微镜下计数, 剩余骨髓液在 260 nm 测量光密度 (D)。

1.5 统计学分析

使用 SPSS 13.0 软件对各项检测结果进行单因素方差分析, 结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 若数据满足方差齐性, 采用最小显著差异检测法 (least significant difference test, LSD 法) 进行分析; 若数据不满足方差齐性, 则采用 Tamhane's T2 test 法进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牡蛎肽对小鼠体重及免疫器官相对重量的影响

如表 1 所示, 各剂量组小鼠的初始体重、实验终末期体重以及胸腺和脾脏指数与对照组相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

如图 2 所示, 对照组的脾脏结构分明, 脾小结、红髓、白髓及边缘区清晰可见。模型组脾小结结构不明显, 红髓与边缘区界线也不明显, 脾脏萎缩。与模型组相比, 低剂量和中剂量牡蛎肽组脾小结结构有所恢复, 高剂量组脾脏结构清晰, 脾小结增大, 脾窦扩大, 红、白髓界限明显。

2.3 牡蛎肽对小鼠外周血白细胞数量的影响

如表 2 所示, 腹腔注射 CTX 模型组小鼠外周血白细胞数目与对照组相比明显降低 ($P = 0.04$), 而经高剂量的牡蛎肽干预后, 小鼠外周血白细胞数

目与模型组相比明显升高($P = 0.003$),与对照组相比差异无统计学意义($P = 0.34$)。

2.4 牡蛎肽对小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响

如图 3 所示,腹腔注射 CTX 组小鼠外周血中 $CD3^+$ T 淋巴细胞百分比和 $CD8^+$ T 淋巴细胞百分比与对照组相比显著下降($P = 0.003, P = 0.002$)。中剂量和高剂量的牡蛎肽干预组小鼠外周血 $CD3^+$ T 淋巴细胞百分比与模型组相比明显升高($P = 0.04, P = 0.02$);高剂量组小鼠外周血 $CD8^+$ T 淋巴细胞百分比与模型组相比明显升高($P = 0.002$),与对照组相比差异无统计学意义($P = 0.06$); $CD4^+$ T 淋巴细胞百分比以及 $CD4^+/CD8^+$ 的比值在各组之间差异均无统计学意义($F = 1.91, P = 0.14; F = 0.81, P = 0.53$)。

表 2 牡蛎肽对小鼠外周血白细胞数量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of oyster peptide on number of white blood cell ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| Group | Number of white blood cell/($\times 10^9/L$) |
|----------------------|--|
| Control | 2.98 \pm 0.83 [#] |
| CTX | 1.86 \pm 0.99 [*] |
| CTX + oyster peptide | |
| Low dose | 2.30 \pm 0.25 |
| Middle dose | 2.60 \pm 0.57 |
| High dose | 3.45 \pm 1.05 [#] |
| F value | 3.17 |
| P value | 0.03 |

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. CTX group. CTX, cyclophosphamide.

2.5 牡蛎肽对小鼠血清中细胞因子的影响

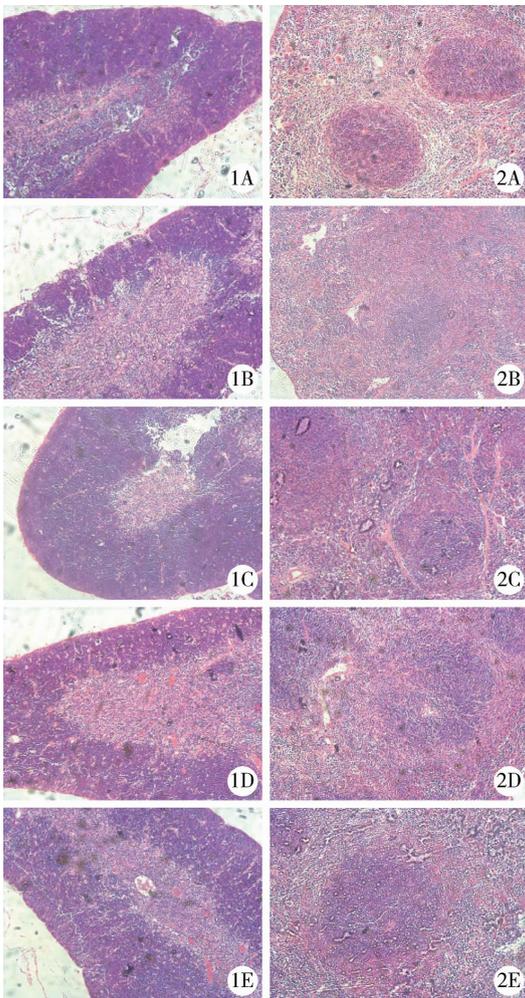
如表 3 所示,注射 CTX 组小鼠外周血中 IL-5 的浓度与对照组相比显著升高($P < 0.01$),而牡蛎肽各剂量组 IL-5 的浓度与 CTX 模型组相比均显著降低(P 值均 < 0.01),与对照组相比差异无统计学意义(低剂量组 vs. 对照组, $P = 0.18$;中剂量组 vs. 对照组, $P = 0.09$;高剂量组 vs. 对照组, $P = 0.06$)。另外,高剂量牡蛎肽组的小鼠外周血中 IL-17 的浓度与对照组相比明显降低($P = 0.03$),其他各细胞因子(IL-4、IL-6、IL-10、IL-1 α 、IL-2、IFN- γ 、GM-CSF)的浓度在各组之间差异无统计学意义。

2.6 牡蛎肽对小鼠骨髓的影响

如表 4 所示,腹腔注射 CTX 模型组小鼠骨髓有核细胞浓度及骨髓 DNA 含量与对照组相比明显降低($P = 0.04, P < 0.01$)。采用各个剂量的牡蛎肽干预后,小鼠骨髓有核细胞浓度与模型组相比明显升高(低剂量组 vs. 模型组, $P = 0.04$;中剂量组 vs. 模型组, $P = 0.02$;高剂量组 vs. 模型组, $P = 0.01$),与对照组相比差异无统计学意义(低剂量组 vs. 对照组, $P = 0.85$;中剂量组 vs. 对照组, $P = 0.89$;高剂量组 vs. 对照组, $P = 0.43$)。小鼠骨髓 DNA 含量与模型组相比明显升高(P 值均 < 0.01),与对照组相比差异无统计学意义(低剂量组 vs. 对照组, $P = 0.05$;中剂量组 vs. 对照组, $P = 0.18$;高剂量组 vs. 对照组, $P = 0.59$)。

3 讨论

海洋占地球面积的 71%,海洋生物的多样性和特殊性使得海洋成为人类赖以生存的资源宝库。海洋生物活性肽作为一种新兴的海洋生物资源,其抗肿瘤、抗病毒、降血压、抗氧化、免疫调节等诸多功能已表现出了巨大的市场潜力^[7-9]。近些年来,随着相关研究的不断深入,海洋活性肽的药理作用越来越



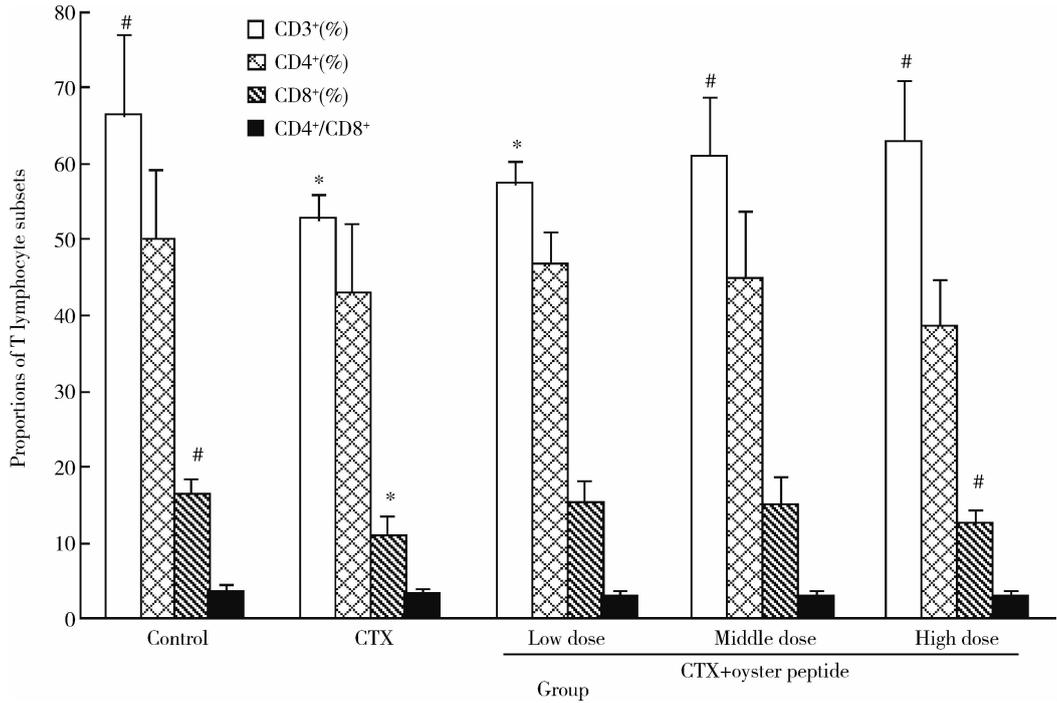
A, control group; B, CTX group; C, CTX + oyster peptide, low dose group; D, CTX + oyster peptide, middle dose group; E, CTX + oyster peptide, high dose group. CTX, cyclophosphamide.

图 1 牡蛎肽对小鼠胸腺组织的影响(HE $\times 40$) 图 2 牡蛎肽对小鼠脾脏组织的影响(HE $\times 40$)

Figure 1 Effect of oyster peptide on thymus structure (HE $\times 40$)
Figure 2 Effect of oyster peptide on spleen structure (HE $\times 40$)

越明确,来源也日益广泛,这些肽类物质不仅可以满足人体对必须氨基酸的需求,也对机体提高抗病能力、延缓衰老具有重要意义^[10]。牡蛎因其味道鲜美、营养丰富而成为人们喜爱的美食。通过现代食品工业的发酵、酶解等技术得到的牡蛎提取物含有大量活性肽类物质,已被广泛应用于食品、医药等领

域^[11],而关于牡蛎肽的免疫调节作用却鲜有报道。本研究中所使用的牡蛎肽含有丰富的氨基酸,尤其是谷氨酸和谷氨酰胺的含量最高,达到10.98%。以往研究显示,谷氨酸和谷氨酰胺具有抗氧化、增强肠道细胞活性、增强免疫等多种功效^[12-13],因此,研究牡蛎肽的免疫调节作用及其机制具有实际意义。



* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. CTX group. CTX, cyclophosphamide.

图 3 牡蛎肽对小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群百分比的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Figure 3 Effect of oyster peptide on proportions of T lymphocyte subsets ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

表 3 牡蛎肽对小鼠外周血中细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Effect of peptide on immune cytokines in blood ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

| Group | Immune cytokines/(ng/L) | | | | | | | | |
|----------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| | IL-17 | IL-4 | IL-6 | IL-5 | IL-10 | IL-1 α | IL-2 | IFN- γ | GM-CSF |
| Control | 12.12 \pm 0.17 | 3.92 \pm 0.88 | 5.02 \pm 1.54 | 1.28 \pm 0.15# | 3.38 \pm 0.10 | 5.30 \pm 2.12 | 17.46 \pm 1.98 | 3.65 \pm 0.40 | 6.69 \pm 0.52 |
| CTX | 12.21 \pm 0.44 | 2.95 \pm 0.51 | 5.43 \pm 0.59 | 2.11 \pm 0.13* | 4.19 \pm 1.25 | 4.10 \pm 1.00 | 21.06 \pm 3.27 | 3.96 \pm 0.21 | 7.63 \pm 0.39 |
| CTX + oyster peptide | | | | | | | | | |
| Low dose | 11.82 \pm 0.01 | 2.87 \pm 0.35 | 4.18 \pm 1.11 | 1.10 \pm 0.40# | 3.77 \pm 0.45 | 4.53 \pm 1.78 | 19.57 \pm 2.01 | 3.12 \pm 0.57 | 6.55 \pm 0.44 |
| Middle dose | 11.61 \pm 0.35 | 2.81 \pm 0.32 | 4.31 \pm 2.04 | 1.06 \pm 0.23# | 3.96 \pm 0.29 | 3.67 \pm 1.52 | 19.56 \pm 2.25 | 3.43 \pm 1.76 | 6.68 \pm 0.79 |
| High dose | 11.50 \pm 0.80# | 2.83 \pm 1.44 | 5.23 \pm 1.93 | 1.02 \pm 0.14# | 4.50 \pm 2.61 | 5.20 \pm 1.95 | 17.11 \pm 3.39 | 4.20 \pm 0.95 | 6.95 \pm 0.72 |
| F value | 2.99 | 0.73 | 0.16 | 24.71 | 0.64 | 0.22 | 2.11 | 1.25 | 2.24 |
| P value | 0.04 | 0.58 | 0.96 | <0.01 | 0.63 | 0.92 | 0.11 | 0.32 | 0.09 |

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. CTX group. IL, interleukin; IFN- γ , interferon γ ; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; CTX, cyclophosphamide.

短期内给予较大剂量的 CTX 注射可使小鼠免疫功能显著降低,是常用的建立免疫抑制模型的药物^[14]。本研究给予小鼠 80 mg/kg CTX 连续 3 d 腹腔注射,CTX 模型组与对照组相比,胸腺和脾脏的

显微机构发生了明显变化,组织出现萎缩,细胞减少,间隙增宽;外周血中白细胞数目减少,CD3⁺T 细胞百分比减少,CD8⁺T 细胞百分比减少,IL-5 浓度升高;骨髓中有核细胞数目及骨髓 DNA 含量均减

少。这些现象表明,CTX 注射后的小鼠处于免疫低下状态^[15],即认为 CTX 致免疫低下小鼠模型成功。本研究给予不同浓度的牡蛎肽干预 15 d 后结果表明,牡蛎肽可以显著提高 CTX 致免疫低下小鼠的细胞及体液免疫功能。

表 4 牡蛎肽对小鼠骨髓细胞计数及骨髓 DNA 含量的影响

($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 4 Effect of oyster peptide on concentration of nucleated cells and DNA density in bone marrow ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

| Group | Concentration of nucleated cells in bone marrow/ ($\times 10^5/\text{mL}$) | DNA content in bone marrow ($D_{260\text{nm}}$) |
|----------------------|---|--|
| Control | 55.47 \pm 7.85 [#] | 3.90 \pm 0.04 [#] |
| CTX | 38.63 \pm 4.80 [*] | 3.46 \pm 0.05 [*] |
| CTX + oyster peptide | | |
| Low dose | 54.20 \pm 11.89 [#] | 3.84 \pm 0.04 [#] |
| Middle dose | 56.33 \pm 6.66 [#] | 3.89 \pm 0.05 [#] |
| High dose | 60.93 \pm 7.86 [#] | 3.88 \pm 0.04 [#] |
| F value | 3.19 | 31.17 |
| P value | 0.04 | <0.01 |

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. CTX group. CTX, cyclophosphamide.

白细胞是机体防御系统的重要组成部分,白细胞计数降低,则机体抵御细菌入侵的能力减弱,易受感染。外周血 T 细胞亚群则是公认的反映细胞免疫状态的较好指标^[16]。T 淋巴细胞(CD3^+)可分为辅助 T 淋巴细胞(CD4^+)和抑制 T 淋巴细胞(CD8^+),它们各自的百分比及 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 比值是反映机体免疫状态和免疫水平的核心指标^[17]。本研究发现,牡蛎肽能使 CTX 致免疫低下小鼠的外周血白细胞数目升高至正常水平, $\text{CD3}^+ \text{T}$ 、 $\text{CD8}^+ \text{T}$ 淋巴细胞百分比恢复正常,表明牡蛎肽能调整免疫低下小鼠 T 淋巴细胞亚群的异常分布,改善机体的细胞免疫状态。

各种细胞因子构成了体液免疫的重要组成部分^[18],如 IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17、GM-CSF、IFN- γ 等,它们协同作用于免疫功能的各个方面,促进 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞增殖、分化与活化,促进各种免疫球蛋白的释放,保证机体正常免疫功能的发挥^[19]。IL-17 由 $\text{CD4}^+ \text{T}$ 细胞分泌,是 Th17 细胞主要的效应因子,可促进 T 细胞的激活以及刺激 IL-6、IL-8 和 GM-CSF 等多种因子的产生。IL-5 也是由 $\text{CD4}^+ \text{T}$ 细胞分泌的,可刺激嗜酸性粒细胞增殖、分化及活化^[20]。本研究显示,高剂量牡蛎肽干预组小鼠外周血的 IL-17 浓度与对照组相比有所降低,而 IL-5 的浓度与 CTX 模型组相比有所升高,与对照组相比无显著差别。由于 $\text{CD4}^+ \text{T}$ 淋巴细胞百分比以及 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 比值在各组之间并无明

显差异,本研究认为,牡蛎肽并非作用于 T 淋巴细胞的成熟阶段,是特异性地针对 T 淋巴细胞分泌 IL-5、IL-17 的过程产生作用,即通过调节 IL-5、IL-17 等免疫因子的分泌进而影响其介导的体液免疫。

骨髓有核细胞浓度和骨髓 DNA 含量可以反映骨髓增生情况,从而在一定程度上体现机体的免疫状况。牡蛎肽可缓解由 CTX 造成的骨髓抑制,使骨髓增生程度恢复正常。

综上所述,牡蛎肽能够增强 CTX 致免疫低下小鼠的细胞免疫及体液免疫功能,改善机体的免疫水平,其具体作用机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 李勇. 生物活性肽研究现状和进展[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(1): 3-9.
- [2] 曾晓波, 王海英, 林永成. 食物中的生物活性肽: 生物活性及研究进展[J]. 食品工业科技, 2004, 25(4): 151-155.
- [3] Walther B, Sieber B. Bioactive proteins and peptides in foods [J]. Int J Vitam Nutr Res, 2011, 81(2-3): 181-192.
- [4] Cheung RC, Ng TB, Wong JH. Marine peptides: bioactivities and applications [J]. Mar Drugs, 2015, 13(7): 4006-4043.
- [5] 王丹, 赵元晖, 曾名湧, 等. 牡蛎营养成分的测定及水提工艺的研究[J]. 食品科技, 2011, 36(3): 209-212.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范(2003年版)[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2003.
- [7] 陈栋梁, 饶邦福, 凌海军. 海洋生物活性肽的开发及应用: 亚太多肽学会多肽抗肿瘤国际论坛论文集[C]. 武汉: 中国保健协会, 2004.
- [8] 张贵川, 袁吕江. 食源性生物活性肽的研究进展[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(9): 157-162.
- [9] 周婕慧, 金赢凯, 徐海红, 等. 生物活性肽的抗炎功能及其对氧化应激的调节作用[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(3): 4-14.
- [10] 杨睿悦, 张召峰, 裴新荣, 等. 海洋蛋白肽对小鼠免疫调节作用的实验研究: 营养与食品——健康中国高级论坛 II 论文集[C]. 大连: 中国食品科学技术学会, 中国环境诱变剂学会, 2008.
- [11] 蔡冰娜, 吴园涛, 孙恢礼. 牡蛎肽肠内营养制剂对小鼠免疫功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2816-2818.
- [12] 李振. 谷氨酰胺的作用及应用[J]. 动物保健, 2006(8): 29-31.
- [13] 李宁, 赖万强. 谷氨酰胺对免疫功能的影响[J]. 医学综述, 2010, 16(6): 823-826.
- [14] Sakhivel KM, Guruvayoorappan C. Acacia ferruginea inhibits cyclophosphamide-induced immunosuppression and urotoxicity by modulating cytokines in mice [J]. J Immunotoxicol, 2015, 12(2): 154-163.
- [15] 杨颖, 蔡玫, 黄志彪, 等. 环磷酰胺致小鼠免疫功能低下模型建立与评价[J]. 中国公共卫生, 2008, 28(5): 581-583.
- [16] 周立峰, 邱玉华, 程钢, 等. 圣愈汤对环磷酰胺诱导的免疫低下小鼠 T 细胞亚群和细胞因子的影响[J]. 现代实用医学, 2009, 21(8): 808-810.
- [17] Wang H, Wang M, Chen J, et al. A polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs protects against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(11): 1946-1953.
- [18] Wang J, Tong X, Li P, et al. Immuno-enhancement effects of Shenqi Fuzheng Injection on cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139(3): 788-795.
- [19] 陈湘宏, 童丽, 王津慧, 等. 四味藏木香软胶囊对环磷酰胺致小鼠免疫低下模型的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(30): 18556-18557.
- [20] 张秋云, 丁相海, 刘绍能, 等. 调肝颗粒剂对环磷酰胺所致小鼠免疫功能低下模型免疫功能的影响[J]. 实用中医内科杂志, 2008, 22(9): 3-5.