

# 抗菌肽 Sublancin 与黄芪多糖对免疫抑制小鼠免疫功能调节作用的比较分析

尚丽君<sup>1,2</sup>, 杨天任<sup>1,2</sup>, 于海涛<sup>1,2</sup>, 黄 烁<sup>1,2</sup>, 曾祥芳<sup>1,2</sup>, 谯仕彦<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100193; 2. 生物饲料添加剂北京市重点实验室, 北京 100193)

**摘 要:** 旨在比较研究抗菌肽 sublancin 与黄芪多糖对环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)诱导的免疫抑制小鼠的免疫功能的调节作用。试验选取 60 只 4~6 周龄健康雌性 BALB/c 小鼠, 随机分为 6 个处理组。正常对照组: 第 1—3 天, 腹腔注射生理盐水; 第 4—10 天, 灌胃生理盐水。其余五个处理组: 第 1—3 天, 腹腔注射 CTX(80 mg · kg<sup>-1</sup>); 第 4—10 天, 阴性对照组: 灌胃生理盐水; 低浓度抗菌肽组: 灌胃 4.0 mg · kg<sup>-1</sup> 抗菌肽 sublancin; 高浓度抗菌肽组: 灌胃 8.0 mg · kg<sup>-1</sup> 抗菌肽 sublancin; 黄芪多糖组: 灌胃 200.0 mg · kg<sup>-1</sup> 黄芪多糖; 阳性对照组: 灌胃 10.0 mg · kg<sup>-1</sup> 左旋咪唑。所有处理均为每天一次, 每次 0.2 mL。于试验第 1 天小鼠腹腔注射 CTX 前、第 4 天灌胃前和第 11 天对小鼠进行称重。第 11 天称重结束后, 采集全部小鼠的外周血及脾, 检测外周血生理生化指标、CD4<sup>+</sup> 与 CD8<sup>+</sup> 数量和脾细胞的细胞因子 mRNA 表达等指标。结果表明, 与正常对照组相比, 阴性对照组中小鼠体重、外周血的红细胞、血红蛋白和白细胞含量显著降低( $P < 0.05$ ), 脾 IL-2、IL-4 和 IL-6 的基因表达显著降低( $P < 0.05$ )。灌胃后, 与阴性对照组相比, 黄芪多糖组和高浓度 sublancin 组体重无差异但有升高趋势, 说明高浓度 sublancin 与黄芪多糖对小鼠体重有积极影响; 低、高浓度 sublancin、黄芪多糖组和阳性对照组中小鼠外周血的白细胞含量显著升高( $P < 0.05$ ); 高剂量 sublancin 组中小鼠外周血的红细胞和血红蛋白显著升高; 低、高浓度 sublancin 和黄芪多糖组中小鼠外周血的 CD4<sup>+</sup> 显著升高( $P < 0.05$ ); 低、高浓度 sublancin、黄芪多糖组和阳性对照组中小鼠外周血的 CD8<sup>+</sup> 显著降低( $P < 0.05$ ); 低、高浓度 sublancin 组中小鼠外周血的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞显著升高( $P < 0.05$ ); 低、高浓度 sublancin、黄芪多糖组和阳性对照组中小鼠脾 IL-4 的表达均显著升高( $P < 0.05$ ); 高浓度 sublancin、黄芪多糖组和阳性对照组中小鼠脾 IL-2、IL-6 的表达显著升高( $P < 0.05$ )。综合上述结果, 适宜剂量的抗菌肽 sublancin 和黄芪多糖均可缓解环磷酰胺造成的免疫抑制。与 200.0 mg · kg<sup>-1</sup> 黄芪多糖相比, 8.0 mg · kg<sup>-1</sup> 抗菌肽 sublancin 对缓解环磷酰胺免疫抑制造成的细胞因子降低的效果更好。

**关键词:** 抗菌肽; sublancin; 免疫调节; 环磷酰胺; 黄芪多糖

中图分类号: S852.4

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2019)02-0406-09

## Immunomodulation Effect of Antimicrobial Peptide Sublancin and Astragalus Polysaccharides on Immunosuppressed Mice: A Comparative Study

SHANG Lijun<sup>1,2</sup>, YANG Tianren<sup>1,2</sup>, YU Haitao<sup>1,2</sup>,  
HUANG Shuo<sup>1,2</sup>, ZENG Xiangfang<sup>1,2</sup>, QIAO Shiyan<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Beijing Key Laboratory of Biological Feed Additive, Beijing 100193, China)

**Abstract:** The purpose of this study was to evaluate the immunomodulatory effects of antimicrobial peptide sublancin and astragalus polysaccharides (APS) on immunosuppressive mice induced by cyclophosphamide (CTX). Sixty healthy female BALB/c mice aged 4-6 weeks were randomly di-

收稿日期: 2018-07-18

基金项目: 农业产业技术体系北京市生猪创新团队项目; 北京市科技计划项目

作者简介: 尚丽君(1996-), 女, 辽宁铁岭人, 硕士生, 主要从事动物营养与饲料科学研究, E-mail: shanglj1996@163.com

\* 通信作者: 谯仕彦, 主要从事动物营养与饲料科学研究, E-mail: qiaoshi@mafic.ac.cn

vided into 6 groups of 10 each. Normal control group: d 1 to d 3, intraperitoneally injected with 0.9% physiological saline, d 4 to d 10, gavage 0.9% physiological saline. The other 5 groups: d 1 to d 3, injected with CTX (80 mg · kg<sup>-1</sup>). On the d 4 to d 10, the negative control group: gavage 0.9% physiological saline; low or high concentration sublancin treatment group: sublancin solution was administered at a dose of 4.0 and 8.0 mg · kg<sup>-1</sup>; the APS-treated group: gavage APS (200 mg · kg<sup>-1</sup>); positive control group: gavage levamisole (10 mg · kg<sup>-1</sup>, BW). All treatments were performed once a day and 0.2 mL each time. The mice were weighed before the mice were intraperitoneally injected with CTX on the first day of the experiment, on the d 4 before gavage and on the d 11. After weighing the body weight on the d 11, peripheral blood and spleen were collected. Compared with the normal control group, the peripheral blood red blood cell, hemoglobin, and white blood cell counts in the negative control group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ); the gene expression of IL-2, IL-4, and IL-6 in the spleen was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Compared with the negative control group, there was no difference in body weight between the APS group and the high concentration Sublancin group after intragastric administration but there is an upward trend, indicating that high concentration Sublancin and APS had a positive effect on body weight of mice; the leukocyte content in peripheral blood of low and high concentration Sublancin, APS, and positive control groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ); in the high concentration Sublancin-treated group, red blood cells and hemoglobin were significantly increased ( $P < 0.05$ ); CD4<sup>+</sup> levels in peripheral blood of mice treated with low or high concentration Sublancin and APS were significantly increased ( $P < 0.05$ ); in both low and high concentration Sublancin, APS and positive control groups, CD8<sup>+</sup> was significantly decreased ( $P < 0.05$ ); in low and high concentration sublancin groups, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> was significantly increased ( $P < 0.05$ ); in low and high concentration sublancin, APS and positive control groups, mouse spleen IL-4 were significantly increased ( $P < 0.05$ ); in high concentration sublancin, APS and positive control groups, the expressions of IL-2 and IL-6 in the spleen of mice were significantly increased ( $P < 0.05$ ). In summary, it can be concluded that appropriate doses of the antimicrobial peptides sublancin and APS can all alleviate the immunosuppression caused by cyclophosphamide. Compared with APS, the role of antimicrobial peptide sublancin in the effect on alleviating the immunosuppression of CTX is more comprehensive.

**Key words:** antimicrobial peptide; sublancin; immunomodulation; cyclophosphamide; astragalus polysaccharide

用作补充或替代药物的免疫调节剂已经成为治疗免疫疾病的常用手段。抗菌肽是生物进化史上最古老的抗微生物感染多肽<sup>[1]</sup>,不仅具有广谱抗菌活性,而且具有调节炎症反应、免疫细胞趋化、促进细胞分化和激活先天性免疫等多种免疫调节功能<sup>[2-3]</sup>,因此具有作为新型免疫调节剂的潜力。抗菌肽 sublancin 的多种抗菌活性已被证实,对革兰阳性菌具有强力的广谱抗菌活性<sup>[4]</sup>。Sublancin 是从枯草芽孢杆菌发酵产物中分离鉴定到一种抗菌肽<sup>[4]</sup>,可耐受高低 pH<sup>[5]</sup>。王帅<sup>[6]</sup>的研究表明,抗菌肽 sublancin 可提高免疫抑制小鼠外周血红细胞、血小板

和白细胞的含量以及显著上调脾中细胞因子的基因表达。黄芪多糖是中国农业农村部批准使用的免疫增强剂<sup>[7]</sup>,具有多重免疫调节功能,包括调节细胞因子的不平衡以及影响 T 细胞的生长等<sup>[8]</sup>,从而增强机体免疫能力。环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 可以对机体骨髓、胃肠道及免疫系统产生明显的抑制作用<sup>[9]</sup>,常用来制备免疫抑制模型<sup>[10-11]</sup>。为比较口服抗菌肽 sublancin 和黄芪多糖对机体的免疫调节能力,建立 CTX 诱导的小鼠免疫抑制模型,继而比较二者对模型动物免疫抑制的缓解作用,从而探讨 sublancin 在动物免疫抑制中的免疫增强作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

黄芪多糖:由北京爱迪森生物科技有限公司生产提供,生产批号 1703241, 1 g 粉末含黄芪多糖不少于 450 mg;抗菌肽 sublancin:由国家饲料工程技术研究中心提供,纯度为 99.6%;左旋咪唑和 CTX:美国 Sigma 公司。

4~6 周龄健康雌性 BALB/c 小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司。本试验在农业部饲料效价和安全评价监督检验测试中心(北京)鼠营养代谢室进行。电脑控制鼠房温度为 18~22 ℃,相对湿度为 35%~55%,昼夜光照交替时间为 12 h:12 h。小鼠自由采食和饮水,小鼠饲料购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

### 1.2 试验设计

将 60 只小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,试验期 10 天。正常对照组前 3 d 腹腔注射生理盐水,而后灌胃生理盐水 7 d;其余各组先腹腔注射 80.0 mg·kg<sup>-1</sup> 的 CTX 连续 3 d,而后分别灌胃 7 d 不同物质:阴性对照组灌胃生理盐水;低、高剂量抗菌肽组分别灌胃 4.0 和 8.0 mg·kg<sup>-1</sup> 的 sublancin;黄芪多糖组灌胃 200.0 mg·kg<sup>-1</sup> 的黄芪多糖;阳性对照组选取传统的免疫调节剂左旋咪唑(10.0 mg·kg<sup>-1</sup>)灌胃。试验中各处理均为每天一次,每次 0.2 mL。在试验第 1 天注射 CTX 前、试验第 4、11 天记录小鼠体重,最后一次记录体重后采集全部小鼠的外周血及脾,检测血清中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞数量及比例、血常规和脾细胞细胞因子 mRNA 表达情况等指标(如图 1)。

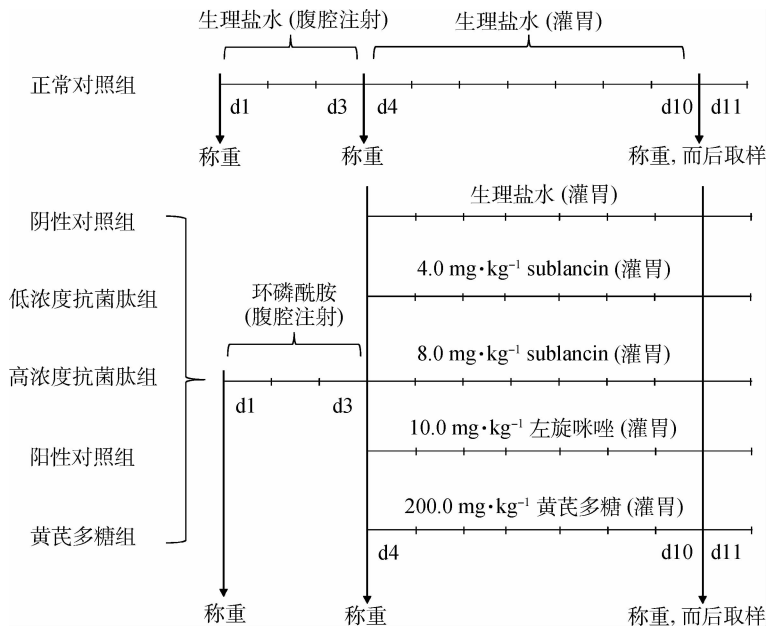


图 1 试验设计

Fig. 1 Experiment design

### 1.3 样品采集

小鼠眼球采血,注入 EDTA-K2 抗凝管。采血完成后,将小鼠脱臼处死,无菌取脾。

### 1.4 检测指标

1.4.1 体重 于试验第 1 天小鼠腹腔注射环磷酸胺前、第 4 天灌胃前和最后一次灌胃结束后 24 h 对小鼠进行称重。

1.4.2 血液指标的测定 小鼠眼球采血,注入 EDTA-K2 抗凝管中,采用 Coulter LH 755 全自动

血细胞分析仪测定外周血常规指标,包括白细胞(white blood cell, WBC)、红细胞(red blood cell, RBC)、血红蛋白(hemoglobin, HGB)和血小板(platelets, PLT)。

1.4.3 细胞因子的测定 RNA 提取按美基生物通用型 RNA 小量提取试剂盒(上海伯易生物科技有限公司)操作说明进行,并使用 NanoDrop 2000 分光光度计(Termo Fisher Scientific, MA, USA)测定 RNA 量和质量。随后反转录为 cDNA。使用

Primer 3.0 设计引物,引物序列见表 1。采用 SYBR Green I 染料法在 ABI StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 扩增仪上进行扩增。

表 1 引物序列

Table 1 Primers for gene expression test by using real-time PCR

| 基因<br>Gene | 基因序列(5'→3')<br>Gene consequence(5'→3') | 碱基数<br>Number of bases | 产物长度/ bp<br>Product length |
|------------|--|------------------------|----------------------------|
| GAPDH      | F:GAGCCAAAAGGGTCATCATCT                | 21                     | 231                        |
|            | R:AGGGGCCATCCACAGTCTTC                 | 20                     |                            |
| IL-2       | F:TGGACCTCTGCGGCATGTTCT                | 21                     | 161                        |
|            | R:CCACCACAGTTGCTGACTCATCAT             | 24                     |                            |
| IL-4       | F:CACGGATGCGACAAAAATCAC                | 21                     | 251                        |
|            | R:CGAAAAGCCCGAAAGAGTCTCT               | 22                     |                            |
| IL-6       | F:CAGAAGGAGTGGCTAAGGA                  | 19                     | 192                        |
|            | R:CGTAGAGAACAACATAAGTCAG               | 22                     |                            |

1.4.4 外周血 T 淋巴细胞亚群的测定 将采集的外周血用 EDTA-K2 抗凝后通过流式细胞术 (FCM) 检测 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞水平。PE Anti-mouse CD8 与 PE-Cy5 Anti-mouse CD4 由北京四正柏生物科技有限公司提供,流式细胞仪采用 BD(Becton, Dickinson and Company) 公司 FACS Canto II 型流式细胞仪。

## 1.5 统计方法

用 SAS 9.4 中的一般线性模型 (GLM) 程序对数据进行单因素方差分析,方差分析差异显著者,以 Duncan 法比较平均数间的差异显著性。统计结果

以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 体重

各组小鼠的体重变化见表 2。在注射 CTX 前,各组间小鼠体重无显著差异 ( $P > 0.05$ );连续注射 CTX 3 d 构建免疫抑制模型后,与正常对照组相比,腹腔注射环磷酰胺的小鼠体重显著下降 ( $P < 0.05$ )。试验结束后,除对照组外,各试验组之间无显著差异,但是治疗组小鼠体重比模型组高,尤其是黄芪多糖组和高浓度 sublancin 组,说明对小鼠体重有积极影响。

表 2 各组小鼠体重变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of body weight in CTX treated mice ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 Group  | D1           | D4                        | D11                       |
|---|--------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常对照组 Normal control group (NoC)                | 17.12 ± 0.98 | 17.69 ± 2.01 <sup>a</sup> | 18.77 ± 0.93 <sup>a</sup> |
| 阴性对照组 Negative control group (NeC)              | 17.31 ± 1.79 | 15.33 ± 1.49 <sup>b</sup> | 15.62 ± 1.91 <sup>b</sup> |
| 低浓度抗菌肽组 Low concentration sublancin group (LS)  | 17.09 ± 1.88 | 15.50 ± 0.96 <sup>b</sup> | 15.92 ± 1.30 <sup>b</sup> |
| 高浓度抗菌肽组 High concentration sublancin group (HS) | 17.01 ± 1.82 | 16.03 ± 1.40 <sup>b</sup> | 16.11 ± 1.41 <sup>b</sup> |
| 阳性对照组 Positive control group (PC)               | 17.07 ± 1.47 | 15.72 ± 1.05 <sup>b</sup> | 15.83 ± 1.67 <sup>b</sup> |
| 黄芪多糖组 Astragalus polysaccharide group (AP)      | 17.18 ± 2.31 | 16.30 ± 1.66 <sup>b</sup> | 16.03 ± 1.88 <sup>b</sup> |

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ),无字母或相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。下表同

Different letters in the same column means significant difference between the treatments ( $P < 0.05$ ), same letter or no letter in the same column means not significant difference between treatments ( $P > 0.05$ ). The same as below

## 2.2 血常规

与正常对照组比较,阴性对照组小鼠外周血中 RBC、HGB 和 WBC 含量显著下降( $P < 0.05$ )。高浓度抗菌肽组小鼠外周血中 RBC、HGB 含量均显

著高于模型组( $P < 0.05$ );低、高浓度抗菌肽、黄芪多糖和阳性对照组中,小鼠外周血中 WBC 含量显著高于阴性对照组( $P < 0.05$ );各组间血小板无明显差异(表 3)。

表 3 对小鼠血液指标的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effects on blood routine index in CTX treated mice ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 Group   | RBC/( $10^{12} \cdot L^{-1}$ ) | HGB/( $g \cdot L^{-1}$ )         | WBC/( $10^9 \cdot L^{-1}$ )   | PLT/( $10^{11} \cdot L^{-1}$ ) |
|------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 正常对照组 NoC  | 8.08 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup>  | 139.00 $\pm$ 4.32 <sup>ab</sup>  | 7.80 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup>  | 2 894.2                        |
| 阴性对照组 NeC  | 7.59 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>   | 120.50 $\pm$ 4.32 <sup>c</sup>   | 5.17 $\pm$ 0.71 <sup>c</sup>  | 3 039.6                        |
| 低浓度抗菌肽组 LS | 7.80 $\pm$ 0.17 <sup>abc</sup> | 130.60 $\pm$ 6.11 <sup>abc</sup> | 9.24 $\pm$ 0.80 <sup>ab</sup> | 3 363.8                        |
| 高浓度抗菌肽组 HS | 8.20 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>   | 145.43 $\pm$ 5.17 <sup>a</sup>   | 8.40 $\pm$ 0.71 <sup>ab</sup> | 3 278.1                        |
| 阳性对照组 PC   | 7.67 $\pm$ 0.16 <sup>bc</sup>  | 124.71 $\pm$ 5.17 <sup>bc</sup>  | 8.34 $\pm$ 0.75 <sup>ab</sup> | 3 115.8                        |
| 黄芪多糖组 AP   | 7.47 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>   | 127.50 $\pm$ 4.32 <sup>bc</sup>  | 10.15 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup> | 3 273.0                        |

## 2.3 脾 IL-2、IL-4 和 IL-6 的转录

对 CTX 诱导免疫抑制小鼠的脾细胞因子基因转录的影响见表 4。阴性对照组小鼠脾 IL-2、IL-4 和 IL-6 相应基因转录显著低于正常对照组( $P < 0.05$ )。高浓度抗菌肽、黄芪多糖和阳性对照组中小鼠脾 IL-2

和 IL-6 相应基因转录显著高于阴性对照组( $P < 0.05$ ),并且与正常对照组差异不显著性( $P > 0.05$ );此外,低、高浓度抗菌肽、黄芪多糖和阳性对照组中小鼠脾 IL-4 的转录均显著高于阴性对照组( $P < 0.05$ )。

表 4 抗菌肽 sublancin 对环磷酰胺免疫抑制小鼠脾细胞因子基因转录的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effects of sublancin on cytokine transcription in spleen in CTX treated mice ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 Group   | IL-2                           | IL-4                           | IL-6                           |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 正常对照组 NoC  | 31.76 $\pm$ 0.32 <sup>ab</sup> | 30.51 $\pm$ 0.32 <sup>ab</sup> | 28.16 $\pm$ 0.37 <sup>ab</sup> |
| 阴性对照组 NeC  | 29.32 $\pm$ 0.32 <sup>d</sup>  | 28.66 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup>  | 25.72 $\pm$ 0.37 <sup>d</sup>  |
| 低浓度抗菌肽组 LS | 30.16 $\pm$ 0.34 <sup>cd</sup> | 30.16 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup> | 26.74 $\pm$ 0.39 <sup>cd</sup> |
| 高浓度抗菌肽组 HS | 32.32 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>  | 31.08 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>  | 29.05 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>  |
| 阳性对照组 PC   | 30.82 $\pm$ 0.34 <sup>bc</sup> | 30.00 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>  | 27.31 $\pm$ 0.39 <sup>bc</sup> |
| 黄芪多糖组 AP   | 30.95 $\pm$ 0.34 <sup>bc</sup> | 29.75 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>  | 27.24 $\pm$ 0.39 <sup>bc</sup> |

## 2.4 Sublancin 对小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响

如表 5 所示,与阴性对照组相比,低、高浓度的抗菌肽 sublancin 灌胃 7 d 后,均使小鼠 CD4<sup>+</sup> 水平显著升高( $P < 0.05$ ),CD8<sup>+</sup> 水平显著降低( $P < 0.05$ )。两个抗菌肽组 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 显著上升( $P < 0.05$ ),低浓度组与正常对照组相比无显著差异( $P > 0.05$ ),高浓度组显著高于正常对照组( $P < 0.05$ )。黄芪多糖仅使 CD4<sup>+</sup> 显著提升( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

免疫系统通过多层防御机制来保护机体免受疾

病感染<sup>[12]</sup>,它在抵御疾病感染和治疗疾病中起着不可替代的作用<sup>[13]</sup>。因此免疫调节剂与传统治疗法相比具有明显的优势,成为当前研究热点之一<sup>[14]</sup>。抗菌肽的免疫调节作用已被大家熟知<sup>[15]</sup>。之前也有文献报道了 sublancin 在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染期间,通过平衡免疫应答并通过抑制 NF- $\kappa$ B 活化来缓解肠道炎症。由于其具有抗菌和免疫调节活性,因此 sublancin 可能具有治疗抗药性感染和败血症的潜力<sup>[16]</sup>。中草药同样具有免疫调节作用,从中药中分离出的多糖因其低毒性和强免疫增强作用而引起了人们的关注<sup>[17]</sup>。

表 5 对小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 5 The effect on T cell subsets of peripheral blood ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 Group   | CD4 <sup>+</sup>           | CD8 <sup>+</sup>           | CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> |
|------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 正常对照组 NoC  | 13.40 ± 2.11 <sup>c</sup>  | 6.74 ± 1.90 <sup>c</sup>   | 1.95 ± 0.31 <sup>bc</sup>          |
| 阴性对照组 NeC  | 20.36 ± 2.52 <sup>b</sup>  | 22.70 ± 2.01 <sup>a</sup>  | 1.19 ± 0.32 <sup>c</sup>           |
| 低浓度抗菌肽组 LS | 30.29 ± 2.52 <sup>a</sup>  | 12.74 ± 2.01 <sup>bc</sup> | 2.40 ± 0.32 <sup>ab</sup>          |
| 高浓度抗菌肽组 HS | 29.16 ± 2.35 <sup>a</sup>  | 14.94 ± 2.01 <sup>b</sup>  | 2.89 ± 0.31 <sup>a</sup>           |
| 阳性对照组 PC   | 25.56 ± 2.35 <sup>ab</sup> | 18.95 ± 2.46 <sup>ab</sup> | 1.11 ± 0.31 <sup>c</sup>           |
| 黄芪多糖组 AP   | 29.61 ± 2.72 <sup>a</sup>  | 17.14 ± 2.28 <sup>ab</sup> | 1.75 ± 0.32 <sup>bc</sup>          |

为了对比评估口服抗菌肽 sublancin 和黄芪多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节作用,笔者使用 CTX 建立了小鼠的免疫抑制模型。CTX 是一种重要的化疗药物,主要用于治疗癌症,但也可引起机体免疫功能紊乱<sup>[18]</sup>,损伤机体 DNA,杀死免疫细胞,干扰巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞的增殖和分化<sup>[19-21]</sup>。因此,CTX 常用于建立免疫缺陷或免疫抑制模型。之前的研究表明,CTX 对小鼠造成免疫抑制会表现为骨髓抑制以及各细胞因子的变化<sup>[22-23]</sup>。在该试验中,小鼠腹腔内注射 80 mg · kg<sup>-1</sup> 的 CTX 后,各项指标的检测结果表明成功建立免疫抑制模型。然而与之前文献中不一致的是,模型组中血小板的量高于正常对照组。笔者推测可能是由于骨髓造血干细胞中含有高度表达的酶(醛脱氢酶),可以分解 CTX 从而保护自身免受损伤<sup>[24]</sup>。

部分抗菌肽作为趋化因子的作用以及诱导趋化因子的产生,导致在感染部位招募白细胞和淋巴细胞,促进伤口愈合和调节适应性免疫。免疫系统受细胞因子网络调节。IL-2 是由 T 细胞产生的一种多效性细胞因子,可驱动 T 细胞生长,增强 NK 细胞溶解活性,诱导调节性 T 细胞分化并介导活化诱导的细胞死亡,在免疫系统中发挥关键作用<sup>[12, 25]</sup>。IL-4 可促进 Th2 细胞的发育。Th2 参与体液免疫,并产生抗炎细胞因子 IL-4。而 IL-4 又可以拮抗 IFN- $\gamma$  并通过转录因子 GATA-3 的作用使 T 细胞极化为 2 型表型<sup>[26]</sup>。IL-6 是由多种免疫细胞产生的急性炎症的重要介质<sup>[27]</sup>,通过刺激骨髓来源的抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MD-SCs)、嗜中性粒细胞、巨噬细胞和 C-反应蛋白的产生在先天免疫应答中起重要作用<sup>[28-30]</sup>。腹腔注射环磷酰胺显著抑制了脾中 IL-2、IL-4 和 IL-6 的表达。Hou 等<sup>[31]</sup>发现提高脾中 IL-2、IL-4 和 IL-6 的

表达,可以缓解 CTX 引起的免疫抑制。高浓度 sublancin 组和黄芪多糖组均能使以上细胞因子的 mRNA 表达量显著上升,而且与空白对照组没有显著差别。这表明抗菌肽 sublancin 和黄芪多糖都可以通过增加上述脾中细胞因子 mRNA 的表达而在免疫抑制小鼠中发挥免疫调节功能,从而缓解免疫抑制。

骨髓抑制是指骨髓中血细胞前体活性的降低,是癌症患者接受化疗时遇到的主要挑战之一。一般来说,CTX 可通过影响造血干细胞的增殖、分化和凋亡来引起骨髓抑制<sup>[32]</sup>。造血干细胞是能够自我更新并转化为成熟血细胞的多能细胞,如 RBC、WBC 和 HGB。之前有研究表明,提升外周血中 WBC 计数可以缓解骨髓抑制<sup>[33]</sup>。之前有研究表明,黄芪多糖可改善 CTX 致小鼠外周血红细胞、白细胞等被抑制的现象<sup>[34]</sup>,提高骨髓细胞增殖<sup>[35]</sup>。此外,在本实验室前期的研究中,sublancin 可以改善环磷酰胺诱导免疫抑制小鼠外周血中红细胞、白细胞、血红蛋白和血小板的数量,从而缓解环磷酰胺对小鼠造成的骨髓抑制<sup>[6]</sup>。本试验中,sublancin 与黄芪多糖均改善了环磷酰胺致免疫抑制小鼠外周血中红细胞、白细胞以及血红蛋白的数量,说明两种药物均对小鼠的骨髓抑制有缓解作用。高浓度抗菌肽 sublancin 效果优于黄芪多糖,使 RBC、WBC 和 HGB 均显著增加。这说明 sublancin 可以有效缓解 CTX 对造血系统和免疫细胞的损伤,调节机体免疫功能,使 CTX 诱导的骨髓抑制被抑制或逆转,并且 sublancin 的免疫调节效果比黄芪多糖更加全面。

正常的免疫反应取决于免疫细胞,特别是 T 细胞亚群之间的相互制约。免疫功能紊乱通常是由 T 细胞亚群之间的不平衡引起的<sup>[36-37]</sup>。根据成熟的 T 淋巴细胞表面分化表达受体 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 分为辅

助性 T 细胞(CD4<sup>+</sup>)和细胞毒性 T 细胞(CD8<sup>+</sup>)两大亚群。调节性 T 细胞(Treg)占外周血 CD4<sup>+</sup> T 细胞群的 5%~10%,许多文献一致地报道了在啮齿动物模型中 CTX 给药后 Treg 细胞的下降以及 Treg 细胞比例的改变,这可能反映了细胞数量以及不同淋巴细胞亚群间平衡的改变<sup>[12, 22, 38-43]</sup>。笔者的试验显示,sublancin 和黄芪多糖均能使 CD4<sup>+</sup> 水平升高。说明二者对于环磷酰胺引起的 T 细胞失衡均有缓解作用。此外,现代免疫学认为,外周血中 T 细胞亚群的数量和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值是评估免疫平衡最重要的参数之一,也是疾病严重程度和预后的重要标志<sup>[36]</sup>。CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的高比例表明免疫系统被高度激活,反之亦然。Sublancin (4.0 或 8.0 mg · kg<sup>-1</sup>) 能使 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的比值显著增加,而黄芪多糖未能发挥这种作用。由此可见,抗菌肽 sublancin 还具有激活机体免疫的能力,在调节 T 细胞亚群平衡、调动机体免疫方面更优于黄芪多糖。

#### 4 结 论

通过对比空白对照组和模型组小鼠体重、血常规、脾细胞因子 mRNA 的表达情况等可知,本试验成功构建了环磷酰胺致小鼠免疫抑制模型。适宜剂量的 sublancin 与黄芪多糖及左旋咪唑相似,可增强小鼠先天性免疫功能,还可缓解环磷酰胺造成的免疫抑制;在缓解骨髓抑制和调节 T 细胞亚群平衡方面效果优于黄芪多糖,为其作为新一代免疫调节剂提供了理论依据。

#### 参考文献(References):

- [ 1 ] ZASLOFF M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms[J]. *Nature*, 2002, 415(6870):389-395.
- [ 2 ] LAI Y P, GALLO R L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense[J]. *Trends Immunol*, 2009, 30(3):131-141.
- [ 3 ] MANSOUR S C, PENA O M, HANCOCK R E W. Host defense peptides: front-line immunomodulators [J]. *Trends Immunol*, 2014, 35(9):443-450.
- [ 4 ] PAIK S H, CHAKICHERLA A, HANSEN J N. Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168 [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(36):23134-23142.
- [ 5 ] KOUWEN T R H M, TRIP E N, DENHAM E L, et al. The large mechanosensitive channel MscL determines bacterial susceptibility to the bacteriocin sublancin 168 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(11):4702-4711.
- [ 6 ] 王 帅. 抗菌肽 Sublancin 对肉鸡坏死性肠炎和小鼠天然免疫的影响[D]. 北京:中国农业大学, 2017. WANG S. Effects of antimicrobial peptide Sublancin on necrotic enteritis of broilers and the innate immunity of mice[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [ 7 ] 张小梅. 黄芪多糖的免疫调节作用及抗肿瘤作用研究进展[J]. 大连大学学报, 2003, 24(6):101-104. ZHANG X M. Advances in the immunomodulatory effects and anti-tumor effects of Astragalus polysaccharides[J]. *Journal of Dalian University*, 2003, 24(6):101-104. (in Chinese)
- [ 8 ] LIU Q Y, YAO Y M, YU Y, et al. Astragalus polysaccharides attenuate postburn sepsis via inhibiting negative immunoregulation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> T cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7):e19811.
- [ 9 ] JIANG R Z, WANG Y, LUO H M, et al. Effect of the molecular mass of tremella polysaccharides on accelerated recovery from cyclophosphamide-induced leucopenia in rats [J]. *Molecules*, 2012, 17(12):3609-3617.
- [10] HATTA H, TSUDA K, AKACHI S, et al. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, 57(3):450-454.
- [11] PICHEL N, VIVARB M. Origin of thyroid dysfunction at the Saharawi refugee camps[J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2018, 48:57.
- [12] LIAO W, LIN J X, LEONARD W J. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation [J]. *Curr Opin Immunol*, 2011, 23(5):598-604.
- [13] PARK H Y, YU A R, CHOI I W, et al. Immunostimulatory effects and characterization of a glycoprotein fraction from rice bran[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(2):191-197.
- [14] TZIANABOS A O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13(4):523-533.
- [15] 李 波, 韩文瑜, 宋智娟, 等. 抗菌肽的免疫调节活性及其在动物生产中的应用[J]. 中国饲料, 2014(4):

- 14-17.
- LI B, HAN W Y, SONG Z J, et al. Immunoregulatory of antimicrobial peptide and its application in animal production[J]. *China Feed*, 2014(4):14-17. (in Chinese)
- [16] WANG S, WANG Q W, ZENG X F, et al. Use of the antimicrobial peptide Sublancin with combined antibacterial and immunomodulatory activities to protect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice[J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(39):8595-8605.
- [17] LIU Y, ZHANG S F, ZHANG F, et al. Adjuvant activity of Chinese herbal polysaccharides in inactivated veterinary rabies vaccines[J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(3):598-602.
- [18] 赵弋清, 罗 霞, 陈东辉, 等. 不同剂量环磷酰胺诱导正常小鼠免疫抑制的对比研究[J]. *免疫学杂志*, 2005, 21(3):122-124, 128.
- ZHAO Y Q, LUO X, CHEN D H, et al. Comparison of immunosuppression induced by different doses of cyclophosphamide in normal mice[J]. *Immunological Journal*, 2005, 21(3):122-124, 128. (in Chinese)
- [19] EL-ABASY M, MOTOBU M, NAKAMURA K, et al. Preventive and therapeutic effects of sugar cane extract on cyclophosphamide-induced immunosuppression in chickens [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4(8):983-990.
- [20] CRUZ-CHAMORRO L, PUERTOLLANO M A, PUERTOLLANO E, et al. Examination of host immune resistance against *Listeria monocytogenes* infection in cyclophosphamide-treated mice after dietary lipid administration[J]. *Clin Nutr*, 2007, 26(5):631-639.
- [21] ATSAMO A D, NGUELEFACK T B, DATTÉ J Y, et al. Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(3):697-702.
- [22] SHEEJA K, KUTTAN G. Ameliorating effects of *Andrographis paniculata* extract against cyclophosphamide-induced toxicity in mice[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2006, 7(4):609-614.
- [23] SHALIT I, KLETTER Y, HALPERIN D, et al. Immunomodulatory effects of moxifloxacin in comparison to ciprofloxacin and G-CSF in a murine model of cyclophosphamide-induced leukopenia [J]. *Eur J Haematol*, 2001, 66(5):287-296.
- [24] BERGER M, LANINO E, CESARO S, et al. Feasibility and outcome of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with post-transplant high-dose cyclophosphamide for children and adolescents with hematologic malignancies; an AIEOP-GITMO retrospective multicenter study[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2016, 22(5):902-909.
- [25] ZHAO L, ASHRAF M A. Influence of silver-hydroxyapatite nanocomposite coating on biofilm formation of joint prosthesis and its mechanism[J]. *West Indian Med J*, 2015, 64(5):506-513.
- [26] TINDEMANS I, SERAFINI N, DI SANTO J P, et al. GATA-3 function in innate and adaptive immunity [J]. *Immunity*, 2014, 41(2):191-206.
- [27] LIU Q, YU S, LI A, et al. Targeting interleukin-6 to relieve immunosuppression in tumor microenvironment [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6):1010428317712445.
- [28] NAKA T, NISHIMOTO N, KISHIMOTO T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine[J]. *Arthritis Res*, 2002, 4(S3):S233-S242.
- [29] TANIGUCHI K, KARIN M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer[J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(1):54-74.
- [30] GUTHRIE G J K, ROXBURGH C S D, RICHARDS C H, et al. Circulating IL-6 concentrations link tumour necrosis and systemic and local inflammatory responses in patients undergoing resection for colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(1):131-137.
- [31] HOU H, FAN Y, WANG S K, et al. Immunomodulatory activity of Alaska pollock hydrolysates obtained by glutamic acid biosensor-Artificial neural network and the identification of its active central fragment [J]. *J Funct Foods*, 2016, 24:37-47.
- [32] 张 琰, 程建峰, 贺建荣, 等. 黄芪多糖对环磷酰胺致小鼠骨髓抑制及毒性的保护作用[J]. *第四军医大学学报*, 2003, 24(5):447-448.
- ZHANG Y, CHENG J F, HE J R, et al. Protection of astragalus polyaaccharides on toxicity and bone marrow inhibition caused by cyclophosphamide [J]. *Journal of the Fourth Military Medical University*, 2003, 24(5):447-448. (in Chinese)
- [33] ZHU Y L, WANG L Y, WANG J X, et al. Protective effects of paeoniflorin and albiflorin on chemotherapy-induced myelosuppression in mice[J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(8):599-606.
- [34] 徐尚福, 杨天华, 吴 芹, 等. 黄芪多糖对环磷酰胺引



- 起小鼠骨髓抑制后造血功能的修复作用[J]. 遵义医学院学报, 2011, 34(5):473-476.
- XU S F, YANG T H, WU Q, et al. Restorative effect of astragalus polysaccharides on hematopoietic function in cyclophosphamide-induced bone marrow depression in mice[J]. *Acta Academiae Medicinae Zunyi*, 2011, 34(5):473-476. (in Chinese)
- [35] 李 秀, 初 杰, 李影迪, 等. 当归/黄芪多糖对腹腔注射环磷酰胺小鼠骨髓造血影响随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2017, 31(5):52-58.
- LI X, CHU J, LI Y D, et al. Angelica sinensis/astragalus polysaccharides on hematopoietic function of bone marrow of mice induced by intraperitoneal injection of cyclophosphamide impact a randomized parallel controlled study[J]. *Journal of Practical Traditional Chinese Internal Medicine*, 2017, 31(5):52-58. (in Chinese)
- [36] SYRJÄLÄ H, SURCEL H M, ILONEN J. Low CD4/CD8 T lymphocyte ratio in acute myocardial infarction[J]. *Clin Exp Immunol*, 1991, 83(2):326-328.
- [37] MCBRIDE J A, STRIKER R. Imbalance in the game of T cells: what can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(11):e1006624.
- [38] TAKEUCHI A, ETO M, YAMADA H, et al. A reduction of recipient regulatory T cells by cyclophosphamide contributes to an anti-tumor effect of nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in mice [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(2):365-376.
- [39] LIU P, JAFFAR J, HELLSTROM I, et al. Administration of cyclophosphamide changes the immune profile of tumor-bearing mice [J]. *J Immunother*, 2010, 33(1):53-59.
- [40] GHIRINGHELLI F, LARMONIER N, SCHMITT E, et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative[J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(2):336-344.
- [41] HONG S H, YOON I H, KIM Y H, et al. High-dose cyclophosphamide-mediated anti-tumor effects by the superior expansion of CD44<sup>high</sup> cells after their selective depletion [J]. *Immunobiology*, 2010, 215(3):182-193.
- [42] BRODE S, RAINE T, ZACCONE P, et al. Cyclophosphamide-induced type-1 diabetes in the NOD mouse is associated with a reduction of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2006, 177(10):6603-6612.
- [43] LUTSIK M E, SEMNANI R T, DE RASCALIS P, et al. Inhibition of CD4<sup>+</sup> 25<sup>+</sup> T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide [J]. *Blood*, 2005, 105(7):2862-2868.

(编辑 白永平)