

# 甲鱼肽粉对小鼠免疫功能影响的研究

刘臻, 刘冬英, 来伟旗, 傅颖, 陈建国, 梅松, 张岭, 么春艳, 王茵\*

(浙江省医学科学院, 杭州 310013)

**摘要:** **目的** 研究甲鱼肽粉对小鼠免疫力的影响。**方法** 将200只雌性健康小鼠随机分为5个实验组, 每组分为低、中、高和阴性对照组, 连续灌胃给药30 d后对不同剂量组进行细胞免疫功能(Con A诱导小鼠脾淋巴细胞转化实验、迟发型变态反应)、体液免疫功能(抗体生成细胞检测、血清溶血素的测定)、单核-巨噬细胞功能(碳廓清实验、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验)和NK细胞活性检测。**结果** 甲鱼肽粉有促进小鼠迟发型变态反应的作用, 能提高小鼠抗体生成细胞数和血清溶血素水平, 增强小鼠NK细胞的活性。**结论** 在本实验条件下, 甲鱼肽粉对小鼠具有一定的免疫增强作用。

**关键词:** 甲鱼肽粉; 增强免疫力; 小鼠

## The effect of turtle peptide powder on immune function in mice

LIU Zhen, LIU Dong-Ying, LAI Wei-Qi, FU Ying, CHEN Jian-Guo, MEI Song, ZHANG Lin,  
YAO Chun-Yan, WANG Yin\*

(Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

**ABSTRACT: Objective** To study the effects of turtle peptide powder on immune function in mice. **Methods** A total of 200 female mice were divided into five groups randomly and fed with the powder at the dosage of 0, 0.25, 0.5, and 1.5 g/(kg · bw) respectively for 30 d and then 7 indexes of immune function were tested to judge the effects of the turtle peptide powder on immune system. **Results** In comparison with the control group, the delayed hypersensitivity was accelerated, and the quantity of the antibody-producing cell and the sheep erythrocyte antibody levels in serum were raised and the activity of NK cell was improved. **Conclusion** Turtle peptide powder could enhance immune function of mice.

**KEY WORDS:** turtle peptide powder; enhancement of immune function; mice

甲鱼以其优良的生物学品质、极高的营养价值和药用价值以及独特风味而享誉海内外。近年来, 国内外市场对甲鱼的需求日益增长, 极大地促进了甲鱼养殖业和加工业的发展。国内目前已有厂家以甲鱼为

原料制成口服液、冻干粉、胶囊等剂型的保健品; 更有中华鳖精、鳖膏等加工产品风靡一时。甲鱼加工尚大有潜力可挖掘, 前景广阔。

从蛋白质酶解过程中可以获得许多功能多肽,

基金项目: 浙江省科技计划项目(2009F20035、2009R50028、2011F20038)、浙江省卫生高层次创新人才培养项目、浙江省医学支撑学科营养学(11-zc03)

**Fund:** Supported by the Science and Technology Program of Zhejiang Province(2009F20035, 2009R50028, 2011F20038), Funding Program for Cultivating High-level Innovative Talents of Health in Zhejiang Province and Medical Supporting Disciplines of Nutrition in Zhejiang Province(11-zc03)

\*通讯作者: 王茵, 研究员, 主要研究方向为微量营养素与人体健康关系及生物活性成分与人体健康。E-mail: wy3333@163.com

\*Corresponding author: WANG Yin, Researcher, Zhejiang Academy of Medical Sciences, No. 182, Tianmushan Road, Xihu District, Hangzhou 310013, China. E-mail: wy3333@163.com

从而增加原食品蛋白质中没有的生物学功能。而现代营养学研究发现, 人体摄入的蛋白质大多是以寡肽的形式被消化吸收的, 多肽的生物效价比游离氨基酸要高<sup>[1]</sup>。目前已有多种活性多肽的研究和产品, 如胶原蛋白肽、乳铁蛋白活性多肽、鹿茸活性多肽、大豆肽等。它们具有多种生理功能, 如抗氧化、降血压和免疫调节等<sup>[2,3]</sup>。本研究从体液免疫、细胞免疫、单核-巨噬细胞功能和 NK 细胞活性等方面研究了甲鱼肽粉对小鼠免疫功能的影响, 旨在为该产品的开发利用和安全应用提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 受试物

甲鱼肽粉由杭州中得保健食品有限公司提供, 为米色粉末, 低聚肽含量 $\geq 65\%$ 。人体推荐量为每人 3.0 g/d, 成人按体重 60 kg 计算, 折合剂量为 0.05 g/(kg·bw)。

### 1.2 实验动物

清洁级 ICR 雌性小鼠 200 只, 由浙江省实验动物中心提供。按体重随机分为五大组, 每组 40 只。I 组进行碳廓清实验, II 组进行 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验、NK 细胞活性测定, III 组进行脏器比值测定、半数溶血值(HC<sub>50</sub>)测定和抗体生成细胞数测定, IV 组进行迟发型变态反应实验, V 组进行小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验。实验动物生产许可证号为 SCXK(浙)2008-0033, 实验动物使用许可证号为 SYXK(浙)2005-0074。饲养温度在 20~25 °C, 相对湿度为 40%~70%。实验前在动物房环境中适应 3 d。

### 1.3 剂量选择与受试物给予方式

根据人体口服推荐量, 每组设甲鱼肽粉低、中、高剂量组分别为 0.25、0.5、1.5 g/(kg·bw)(分别相当于人体推荐剂量的 5、10、30 倍)。分别取甲鱼肽粉 2.5、5.0、15.0 g, 加蒸馏水定容至 200 mL, 对照组予以等体积的溶剂, 分别给相应组别动物灌胃, 每天灌胃一次, 灌胃体积为 0.2 mL/(10 g·bw), 连续进行 30 d。

### 1.4 实验方法<sup>[4]</sup>

#### 1.4.1 细胞免疫功能检测

##### 1.4.1.1 Con A 诱导小鼠脾淋巴细胞转化实验

采用 MTT 法。无菌取脾, 置于盛有适量无菌 Hank's 液的小平皿中, 制成细胞悬液, 经 200 目筛网

过滤。用 Hank's 液洗 2 次, 每次离心 10 min (1000 r/min)。将细胞悬浮于 1 mL 完全培养液中, 计数活细胞数, 用 RPMI 1640 培养液调整其细胞浓度至  $3 \times 10^6$  个/mL。再将细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 在其中一孔加入 75  $\mu$ L Con A 液(相当于 7.5  $\mu$ g/mL), 另一孔不加作为对照, 培养板置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养 72 h。培养结束前 4 h, 每孔轻轻吸去上清液 0.7 mL, 加入不含小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 同时加入 MTT(5 mg/mL)50  $\mu$ L/孔, 继续培养 4 h。培养结束后, 每孔加入 1 mL 酸性异丙醇, 吹打均匀, 使紫色结晶完全溶解。然后分装到 96 孔培养板中, 每个孔作 3 个平行孔, 使用酶标仪以 570 nm 波长测定光密度值。淋巴细胞的增殖能力=OD<sub>Con A</sub>-OD<sub>无 Con A</sub>。

#### 1.4.1.2 迟发型变态反应(DTH)

采用足跖增厚法。小鼠腹腔注射 2%(v/v) SRBC(0.2 mL/鼠)致敏后 4 d, 测量左后足跖厚度, 然后在测量部位皮下注射 20%(v/v)SRBC(20  $\mu$ L/鼠), 于注射后 24 h 测定左后足跖部厚度, 同一部位测量 3 次, 取平均值。以攻击前后足跖厚度差值(足跖肿胀度)来表示 DTH 的程度。

#### 1.4.2 体液免疫功能检测

##### 1.4.2.1 抗体生成细胞检测

采用 Jerne 改良玻片法。取羊血, 用生理盐水洗涤 3 次, 每次离心 10 min(2000 r/min), 将压积 SRBC 用生理盐水配成 2%(v/v)的细胞悬液, 每鼠腹腔注射 0.2 mL。将免疫后 4 d 的小鼠处死, 取脾, 轻轻磨碎, 用 Hank's 液制成细胞悬液, 200 目筛网过滤, 洗涤、离心 2 次, 最后将细胞悬浮在 8 mL Hank's 液中, 计数细胞, 并将细胞浓度调整为  $5 \times 10^6$  个/mL。将表层培养基加热溶解后与等量的 pH 7.4、2 倍浓度的 Hank's 液混合, 分装于小试管, 每管 0.5 mL, 再向管内加入用 SA 液配制的 10% SRBC 50  $\mu$ L(v/v)、20  $\mu$ L 脾细胞悬液( $5 \times 10^6$  个/mL), 迅速混匀后倾倒在已刷薄层琼脂糖的玻片上, 待琼脂糖凝固后将玻片平扣在玻片架上, 放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中温育 1.5 h, 将用 SA 液稀释的补体(1: 10)加入到玻片凹槽内继续温育 1.5 h 后计数溶血空斑数。

##### 1.4.2.2 血清溶血素的测定

采用半数溶血值(HC<sub>50</sub>)的测定。取羊血, 用生理盐水洗涤 3 次, 每只小鼠经腹腔注射 2%(v/v, 用生理盐水配制)压积 SRBC 0.2 mL 进行免疫。4 d 后, 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,2000 r/min离心10 min,收集血清。用SA缓冲液将血清稀释为200倍,取1 mL置于试管内,依次加入10%(v/v,用SA缓冲液配制)压积SRBC 0.5 mL、补体1 mL(SA缓冲液按1:8稀释)。另设不加血清的对照管(以SA缓冲液代替)。置于37℃恒温水浴中保温30 min后,冰浴终止反应。2000 r/min离心10 min,取上清1 mL,加都氏试剂3 mL。同时取10%(v/v,用SA缓冲液配制)压积SRBC 0.25 mL,加都氏试剂至4 mL于另一试管中,充分混匀,放置10 min后,于540 nm处以对照管作空白,分别测定各管光密度值。溶血素的量以半数溶血值(HC<sub>50</sub>)表示,按下式计算:

半数溶血值(HC<sub>50</sub>)=样品光密度值/SRBC 半数溶血时的光密度值×稀释倍数

#### 1.4.3 单核-巨噬细胞功能检测

##### 1.4.3.1 小鼠碳廓清实验

于小鼠尾静脉注射用生理盐水稀释4倍的印度墨汁,每10 g体重注射0.1 mL,墨汁注入后立即计时,于注入墨汁后第2、10 min,分别从内眦静脉丛取血20 μL,加入到2 mL 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液中,摇匀。以0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液作空白对照,用722型分光光度计在600 nm波长处比色测定光密度值(OD)。将小鼠处死,取肝、脾,称重,计算吞噬指数 $a$ 。

##### 1.4.3.2 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验

采用半体内法。小鼠腹腔注射20%(v/v,用生理盐水配制)的压积鸡红细胞(2000 r/min,10 min)悬液1 mL,间隔30 min,颈椎脱臼处死,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。取腹腔巨噬细胞洗液1 mL,滴于载玻片上,放入垫有湿纱布的搪瓷盒内,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,以甲醇:丙酮(1:1)固定,4%(v/v)Giemsa-磷酸缓冲液染色,用蒸馏水漂洗晾干。油镜下每片计数100个巨噬细胞,按下式计算吞噬率和吞噬指数:

吞噬率(%)=吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数/计数的巨噬细胞数×100

吞噬指数=被吞噬的鸡红细胞总数/计数的巨噬细胞数

#### 1.4.4 NK细胞活性测定

采用乳酸脱氢酶(LDH)测定法。受试小鼠颈椎脱臼处死,无菌取脾,制成脾细胞悬液,用Hank's液洗

3次,弃上清,将细胞浆弹起,加入0.5 mL灭菌水20 s,裂解红细胞后再加入0.5 mL 2倍Hank's液及8 mL Hank's液,1000 r/min离心10 min,用1 mL含10%小牛血清的RPMI 1640完全培养液重悬,用1%冰醋酸稀释后,台酚兰染色计数(活细胞数应在95%以上),调整细胞浓度至 $2 \times 10^7$ 个/mL,此为效应细胞。取传代后24 h生长良好的YAC-1细胞,用RPMI 1640完全培养液调整细胞浓度至 $4 \times 10^5$ 个/mL,此为靶细胞。取靶细胞和效应细胞各100 μL(效靶比50:1),加入U型96孔培养板中。靶细胞自然释放孔加入靶细胞和培养液各100 μL,靶细胞最大释放孔加入靶细胞和2.5% Triton各100 μL。上述各项均设3个平行孔,于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养4 h,然后将96孔培养板以1500 r/min离心5 min,每孔吸取上清100 μL置于平底96孔培养板中,同时加入LDH基质液100 μL,根据室温反应3~10 min,每孔加入1 mol/L的HCl 30 μL,在酶标仪490 nm处测定光密度值(OD)。

NK细胞活性=(反应孔OD-自然释放孔OD)/(最大释放孔OD-自然释放孔OD)×100%。

#### 1.5 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件对数据进行分析。先对数据进行方差齐性检验,若方差齐,采用单因素方差分析进行总体比较,发现差异再用Dunnett法进行多个剂量组与一个对照组均数间的两两比较。若方差不齐,则对原始数据进行适当的变量转换满足齐性要求后,用转换后的数据进行统计;若变量转换后仍方差不齐,改用秩和检验进行统计,发现总体比较有差异,则采用不要求方差齐性的Tamhane's T2检验进行两两比较。

#### 1.6 结果判定<sup>[4]</sup>

在细胞免疫功能、体液免疫功能、单核-巨噬细胞功能、NK细胞活性四个方面,任两个方面结果阳性,则可判定该受试样品具有增强免疫力功能的作用。其中细胞免疫功能测定项目中的两个实验结果均为阳性,或任一个实验的两个剂量组结果为阳性,可判定细胞免疫功能结果阳性。体液免疫功能测定项目中的两个实验结果均为阳性,或任一个实验的两个剂量组结果为阳性,可判定体液免疫功能结果阳性。单核-巨噬细胞功能测定项目中的两个实验结果均为阳性,或任一个实验的两个剂量组结果为阳性,可判定单核-巨噬细胞功能结果为阳性。NK细胞活性测定实

验的一个以上剂量组结果阳性, 可判定 NK 细胞活性结果为阳性。

## 2 结果与分析

### 2.1 甲鱼肽粉对小鼠细胞免疫功能的影响

#### 2.1.1 甲鱼肽粉对 Con A 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化的影响

由表 1 可见, 各剂量组对小鼠淋巴细胞转化能力无显著影响( $P>0.05$ )。

#### 2.1.2 甲鱼肽粉对 SRBC 诱导的小鼠 DTH 的影响

由表 1 可见, 中、高剂量组小鼠注射后 24 h 足跖肿胀度与对照组相比有显著提高( $P<0.05$ ), 这表明甲鱼肽粉具有促进小鼠的迟发型变态反应的作用, 该项实验结果呈阳性。

### 2.2 甲鱼肽粉对小鼠体液免疫功能的影响

#### 2.2.1 甲鱼肽粉对小鼠抗体生成细胞(溶血空斑数)的影响

由表 1 可见, 高剂量组小鼠抗体生成细胞数与对照组相比有显著提高( $P<0.05$ )。

#### 2.2.2 甲鱼肽粉对小鼠血清 HC50 的影响

由表 1 可见, 高剂量组小鼠 HC<sub>50</sub> 与对照组相比有显著提高( $P<0.05$ )。

### 2.3 甲鱼肽粉对小鼠单核-巨噬细胞功能的影响

#### 2.3.1 甲鱼肽粉对小鼠碳廓清能力的影响

由表 2 可见, 各剂量组对小鼠碳廓清无显著影响( $P>0.05$ )。

#### 2.3.2 甲鱼肽粉对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的影响

由表 2 可见, 各剂量组对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力无显著影响( $P>0.05$ )。

### 2.4 甲鱼肽粉对小鼠 NK 细胞活性的影响

结果见表 3, 中、高剂量组小鼠 NK 细胞活性显著高于对照组( $P<0.05$ ), 这表明甲鱼肽粉能提高 NK 细胞活性。

## 3 讨论

《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)中规定, 受试样品的 3 个剂量组中, 其中一个剂量应

表 1 甲鱼肽粉对小鼠细胞免疫和体液免疫的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of turtle peptide powder on humoral immunity and cellular immunity on mice

组别 g/(kg · bw)	淋巴细胞增殖能力(OD 差值)	注射后 24 h 足跖肿胀度(mm)	溶血空斑数(个/10 <sup>6</sup> 个脾细胞)	HC <sub>50</sub>
0	0.026±0.016	0.29±0.08	119±62	161.53±33.53
0.25	0.030±0.015	0.36±0.11	134±57	178.07±27.96
0.50	0.037±0.014	0.42±0.11*	170±54	195.26±49.79
1.50	0.041±0.018	0.43±0.10*	205±89*	207.71±29.54*

注: \* $P<0.05$ , 与对照组相比

表 2 甲鱼肽粉对小鼠单核-巨噬细胞功能的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of turtle peptide powder on mononuclear macrophage ability on mice

组别(g/(kg · bw))	脾脏/体重(%)	胸腺/体重(%)	碳廓清吞噬指数(a)	吞噬率(%)	吞噬指数
0	0.507±0.066	0.314±0.065	4.30±0.70	19.0±7.5	1.07±0.35
0.25	0.517±0.085	0.327±0.062	4.61±1.01	20.5±7.2	1.16±0.26
0.50	0.534±0.067	0.352±0.081	4.87±0.65	22.6±11.2	1.19±0.40
1.50	0.560±0.046	0.364±0.061	4.93±0.54	23.6±7.9	1.21±0.31

表 3 甲鱼肽粉对小鼠 NK 细胞活性的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effects of turtle peptide powder on NK cell activity on mice

组别(g/kg · bw)	NK 细胞活性(%)	NK 细胞活性平方根反正弦转换值
0	14.29±10.11	20.63±9.48
0.25	19.74±8.51	25.83±6.58
0.50	27.26±12.45	30.99±7.99*
1.50	29.37±13.14	32.38±8.24**

注: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组相比

相当于人体推荐摄入量(折算为每千克体重的剂量)的5倍,且最高剂量不得超过人体推荐摄入量的30倍,故本研究采用人体推荐量的5、10、30倍剂量,分别以0.25、0.50、1.50 g/(kg·bw)连续给小鼠以甲鱼肽粉30 d,结果显示:①细胞免疫功能。中、高剂量组注射后24 h小鼠足跖肿胀度显著高于对照组,该项实验结果为阳性。②体液免疫功能。高剂量组小鼠抗体生成细胞数显著高于对照组,高剂量组小鼠 $HC_{50}$ 与对照组相比有显著提高,该项实验结果为阳性。③单核-巨噬细胞功能。该项实验结果为阴性。④NK细胞活性。中、高剂量组小鼠NK细胞活性显著高于对照组,该项实验结果为阳性。因此,判定甲鱼肽粉对小鼠具有一定的免疫增强作用。

机体的免疫作用主要通过激活巨噬细胞、促进T细胞转化、提高B淋巴细胞和NK细胞的活性,同时激活网状内皮系统和补体系统等来完成。郑艺青<sup>[5]</sup>等对甲鱼提取液进行了延缓衰老和提高免疫功能作用的研究,发现它能增加NK细胞活性和促进白细胞介素-2的诱生能力,白细胞介素-2能促进T淋巴细胞转化、B淋巴细胞增殖并激活巨噬细胞,使高龄大鼠免疫力增强。苗明三<sup>[6]</sup>等研究了中华全鳖粉胶囊对正常小鼠免疫功能的影响,结果表明其可显著提高正常小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬百分率和吞噬指数,促进溶血素及溶血空斑形成,促进淋巴细胞转化。本研究的实验结果初步证实了以中华鳖为主要原料制成的甲鱼肽粉具有一定的增强小鼠免疫力的功能。

#### 参考文献

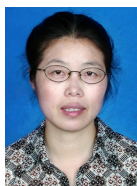
- [1] Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2000, 11(7): 254-262.
- [2] 林霖, 田颖刚, 谢明勇, 等. 乌骨鸡活性肽组成成分及体外抗氧化活性研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(10): 41-45.  
Lin L, Tian YG, Xie MY, *et al.* Research on Antioxidant Activity in vitro and Molecular Weight Distribution of Black-bone Silky Fowl Bioactive Peptides [J]. *Food Sci*, 2007, 28(10): 41-45.
- [3] 李世敏, 刘冬, 孙海燕, 等. 玉米活性多肽降血压作用及其机制的研究[J]. *营养学报*, 2007, 29(2): 186-188.  
Li SM, Liu D, Sun HY, *et al.* Study on the anti-hypertension effect of corn peptide and its mechanism [J]. *Acta Nutr Sin*, 2007, 29(2): 186-188.
- [4] 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)[M]. 北京: 清华同方电子出版社, 2003.  
Ministry of Health P.R.CHINA. Technical Standards for Testing & Assessment of Health Food(2003 ver.) [M]. Beijing: Tsinghua Tongfang Optical Electronic Press, 2003.
- [5] 郑艺青, 孙秀发. 甲鱼提取液延缓衰老和提高免疫功能作用的研究[J]. *食品科学*, 1997, 18(8): 41-43.  
Zheng YQ, Sun XF. Turtle Extract effects on Delaying Aging and Improving Immune Function [J]. *Food Sci*, 1997, 18(8): 41-43.
- [6] 苗明三, 顾丽亚. 中华全鳖粉胶囊对正常小鼠免疫功能的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2004, 11(2): 131-132.  
Miao MS, Gu LY. Effects of Zhonghuaquanbiefen Capsule on Immunologic Functions of Mice [J]. *Chin J Inform TCM*, 2004, 11(2): 131-132.

(责任编辑: 张宏梁)

#### 作者简介



刘臻, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为营养与食品毒理研究。  
E-mail: lilac-001@163.com



王茵, 学士, 研究员, 主要研究方向为微量营养素与人体健康关系及生物活性成分与人体健康。  
E-mail: wy3333@163.com