

# 龟甲粉对小鼠免疫功能的作用研究

侯喜龙<sup>1</sup>, 冯明明<sup>2</sup>, 杜珂璠<sup>2</sup>, 佟长青<sup>2</sup>, 曲敏<sup>2</sup>, 李伟<sup>2\*</sup>

(1. 大连市第二人民医院麻醉科, 大连 116001; 2. 大连海洋大学食品科学与工程学院, 大连 116023)

**摘要:** **目的** 研究龟甲粉对昆明种小鼠免疫功能的作用。**方法** 利用 40 只昆明种小鼠进行龟甲粉抗体生成细胞测定、对昆明种小鼠 HC<sub>50</sub> 的影响、碳廓清能力以及鸡红细胞吞噬率及吞噬指数的影响实验。实验设 4 组, 灌胃的龟甲超微细粉分别为生理盐水组与不同剂量组, 连续灌胃 30 d 后测定各项指标。**结果** 0.3 g/(kg-bw)及 0.45 g/(kg-bw)组龟甲超粉可以显著促进小鼠 B 细胞分泌抗体的能力( $P<0.05$ ), 0.45 g/(kg-bw)组龟甲粉能显著增加小鼠半数溶血值(HC<sub>50</sub>)( $P<0.01$ ), 0.15 g/(kg-bw)及 0.45 g/(kg-bw)组龟甲粉可以显著提高小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能力及小鼠腹腔巨噬细胞鸡红细胞吞噬率及吞噬指数( $P<0.01$ )。**结论** 龟甲粉可以增强小鼠体液免疫功能和单核-巨噬细胞功能的作用。

**关键词:** 龟甲粉; 小鼠; 免疫作用

## Effects of tortoise shell powder of *Chinemys reevesii* (Gray) on immune function in mice

HOU Xi-Long<sup>1</sup>, FENG Ming-Ming<sup>2</sup>, DU Ke-Fan<sup>2</sup>, TONG Chang-Qing<sup>2</sup>, QU Min<sup>2</sup>, LI Wei<sup>2\*</sup>

(1. Anesthesia Department, the Second People's Hospital of Dalian, Dalian 116001, China; 2. College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**ABSTRACT: Objective** To evaluate the regulation of tortoise shell powder of *Chinemys reevesii* (Gray) on immune function in mice. **Methods** Forty mice were used to conduct antibody-producing cell of spleen, total hemolytic complement assay (HC<sub>50</sub> assay), clearance of carbon particles, and chicken red blood cell phagocytic rate and phagocytic index assay. The 40 mice were randomly divided into 4 groups ( $n=10$ ): 0, 0.15, 0.3 and 0.45 g/(kg-bw) superfine tortoise shell powder of *C. reevesii* (Gray) were orally administered once daily for 30 days. **Results** In comparison with the control group, 0.3 g/(kg-bw) and 0.45 g/(kg-bw) superfine tortoise shell powder of *C. reevesii* (Gray) could significantly increase the ability of mice B cells secreting antibodies ( $P<0.05$ ), 0.45 g/(kg-bw) superfine tortoise shell powder of *C. reevesii* (Gray) could significantly increase HC<sub>50</sub> value ( $P<0.01$ ), 0.15 g/(kg-bw) and 0.45 g/(kg-bw) superfine tortoise shell powder of *C. reevesii* (Gray) could significantly increase the ability of carbon particles clearance by mice macrophages and the phagocytic rate and phagocytic index of chicken red blood cells in mouse peritoneal macrophages ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The tortoise shell powder of *C. reevesii* (Gray) can enhance the functions of humoral immune and monocyte macrophage in mice.

**KEY WORDS:** tortoise shell powder; mice; immune function

基金项目: 大连海洋大学引进人才及在职培养博士启动项目(100914262)

**Fund:** Supported by Doctoral Project of Dalian Ocean University (100914262)

\*通讯作者: 李伟, 教授, 主要研究方向为食品科学。E-mail: aisingioro@hotmail.com

\*Corresponding author: LI Wei, Professor, College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, No.52, Heishijiao Street, Shahekou District, Dalian 116023, China. E-mail: aisingioro@hotmail.com

## 1 引言

龟甲为龟科动物乌龟(*Chinemys reevesii* (Gray))的背甲及腹甲<sup>[1]</sup>。《神农本草经》中记载了龟甲的药用价值。《中华人民共和国药典》从 1990 年版开始收录龟甲, 认为其咸、甘、微寒, 归肝、肾、心经, 具有滋阴潜阳、益肾强骨、养血补心、固经止崩的作用<sup>[2]</sup>。近来研究发现, 龟甲中含有矿物质元素、多酚类物质、甾体类、氨基酸以及脂肪酸等<sup>[3,4]</sup>。顾迎寒等<sup>[2]</sup>利用龟甲水提液观察了甲状腺片和利血平溶液导致的阴虚小鼠的免疫器官变化, 发现龟甲水提液具有抑制甲状腺片和利血平溶液导致的小鼠免疫器官萎缩的作用。陈炳芝等<sup>[5]</sup>发现龟甲胶含药血清通过调控豚鼠丝裂原活化蛋白激酶基因来促进其膝关节软骨细胞增殖。目前, 对于龟甲粉具有提高免疫力的研究还未见报道。本研究考察了龟甲粉对小鼠免疫功能的影响, 以期为龟甲保健食品的开发提供具体的基础数据。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

龟甲粉制备, 腹甲和背甲置于蒸锅内沸水蒸 45 min, 取出, 放入 40~50 °C 热水中, 除尽皮肉, 洗净晒干, 粉碎, 过筛 100 目获得, 由深圳市凯联养殖有限公司提供。绵羊红细胞(SRBC)、补体、鸡红细胞以及 Hank's 液购于北京索莱宝科技有限公司。RPMI1640 购于美国 Gibco 公司。都氏试剂购于 Sigma 公司; 印度墨汁购于上海远慕生物科技有限公司。

6~7 周清洁级昆明种小鼠, 体质量为 18~22 g, 雌性, 购自大连医科大学实验动物研究中心。于 12 h 黑暗、12 h 光亮的塑料饲养箱内饲养, 室温(23±2) °C, 湿度 40%~60%, 自由采食和饮水。

### 2.2 抗体生成细胞测定

采用 Jerne 改良玻片法进行抗体生成细胞测定<sup>[6]</sup>。40 只昆明种小鼠随机分为 4 组: 对照组以及低、中、高 3 个剂量组。龟甲粉悬溶于生理盐水中, 每天定时等体积灌胃 1 次, 灌胃的龟甲粉分别为生理盐水组与各剂量组(0.015、0.30、0.45 g/(kg·bw)), 连续灌胃 30 d 后, 每只小鼠腹腔注射 2 mL 2%(V:V)绵羊红细胞(SRBC)悬液进行免疫 4 d。4 d 后小鼠颈椎脱臼处死, 取出脾脏, 于无菌 Hank's 液研磨, 并清洗 2 次, 用 RPMI1640 培养液中制成  $5 \times 10^6$  个/mL 小鼠脾细胞悬液。在试管中加入与等量 Hank's 液混合的培养液 0.5 mL、10% 的 SRBC 50  $\mu$ L 以及 20  $\mu$ L 小鼠脾细胞悬液 ( $5 \times 10^6$  个/mL), 迅速混匀后倾倒入于玻璃板上的琼脂糖薄层上, 每只小鼠铺 2 个玻璃板, 在 37 °C、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1.5 h 后, 加入稀释好的补体溶液于玻璃片架凹槽中, 再孵育 1.5 h 后弃去补体, 计空斑数<sup>[6]</sup>。

### 2.3 半数溶血值(HC<sub>50</sub>)测试

按 2.2 方法对昆明种小鼠连续灌胃 30 d 后, 每只小鼠腹腔注射 2 mL 2%(V:V)绵羊红细胞(SRBC)悬液进行免疫 4 d<sup>[7]</sup>。4 d 后摘眼球取血将采集的全血于 37 °C 恒温 30 min, 然后于 4 °C 冰箱中 1 h, 在 2000 r/min 下离心 3 min, 分离血清。用生理盐水稀释血清 200 倍。取稀释血清 1 mL 置于试管内, 加入 0.5 mL 10% SRBC 及 1 mL 补体, 以生理盐水作为对照, 置 37 °C 恒温 30 min, 冰浴终止反应。在 2000 r/min 下离心 3 min, 取上清 1 mL, 加都氏试剂 3 mL, 于 540 nm 处测各管的吸光度, 同时取 0.25 mL 10% SRBC 及 4 mL 都氏试剂于另一试管, 混匀放置 10 min 后于 540 nm 处作为空白对照<sup>[7]</sup>。半数溶血值(HC<sub>50</sub>)计算如下:

$$\text{样品 HC}_{50} = \text{样品吸光度值} / \text{SRBC 半数溶血时的吸光度值} \times \text{稀释倍数}$$

### 2.4 小鼠碳廓清实验

按 2.2 方法对小鼠连续灌胃 30 d 后, 按 0.1 mL/10 (g·bw) 体重尾静脉注射 4 倍稀释的印度墨汁, 墨汁注入后立即计时<sup>[7]</sup>。注入墨汁后 2 及 10 min 分别从眼内取血 20  $\mu$ L, 加入到 2 mL 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液中, 于 600 nm 处测吸光值。取肝、脾称重, 校正廓清指数  $\alpha$  计算如下<sup>[7]</sup>:

$$K = (\lg OD_{2 \text{ min}} - \lg OD_{10 \text{ min}}) / (10 \text{ min} - 2 \text{ min})$$

$$\alpha = \text{体重} / (\text{肝重} + \text{脾重}) \times K^{1/3}$$

式中:  $K$ —未经校正的廓清指数;

$\alpha$ —校正廓清指数。

### 2.5 吞噬功能测定

小鼠分组及给药方法如 2.2。小鼠腹腔注入生理盐水配制鸡红细胞悬液(20%, V:V)1 mL。30 min 后, 颈椎脱臼处死, 经腹腔注射生理盐水 2 mL, 取腹腔液 1 mL 涂片, 置 37 °C 恒温 30 min, 然后漂洗, 晾干, 以 1:1 丙酮甲醇溶液固定, 4%(V:V)Ciemsa-磷酸缓冲液染色 3 min, 光镜下观察<sup>[7]</sup>。吞噬百分率(%)=(吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数/计数的巨噬细胞数)×100

$$\text{吞噬指数} = \text{被吞噬鸡红细胞总数} / \text{计数的巨噬细胞数}$$

### 2.6 统计学处理

用 SPSS 统计软件对实验数据进行处理, 数值以( $\bar{x} \pm s$ )表示。P<0.05 为差异显著。

## 3 结果与分析

### 3.1 龟甲粉对昆明种小鼠体液免疫功能的影响

对小鼠按 2.2 方法对小鼠连续灌胃 30 d 后, 用 Jerne 改良玻片法进行抗体生成细胞测定, 计算溶血空斑数, 龟甲粉对小鼠溶血空斑数影响的结果如表 1。由表 1 可知, 0.3 g/(kg·bw) 及 0.45 g/(kg·bw) 组溶血空斑数高于 0 g/(kg·bw) 组 (P<0.05)。溶血空斑数的多少代表着 B 细胞抗体产生的能

力强弱<sup>[8]</sup>。实验结果表明 0.3 g/(kg·bw)及 0.45 g/(kg·bw)剂量组, 龟甲粉可以显著促进小鼠 B 细胞分泌抗体的能力 ( $P < 0.05$ )。

表 1 龟甲粉对小鼠溶血空斑数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
Table 1 Effect of tortoise shell powder of *Chinemys reevesii* (Gray) on hemolytic plaque in mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

剂量(g·(kg·bw) <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	动物数(只)	溶血空斑数(个/10 <sup>6</sup> 脾细胞)
0	10	206±48
0.15	10	247±50
0.30	10	265±62*
0.45	10	285±57**

注: 与空白对照组比较, \*表示差异显著( $P < 0.05$ ); \*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ )

抗体生成细胞数和半数溶血值(HC<sub>50</sub>)体现了体液免疫功能的强度<sup>[8]</sup>, 龟甲粉对小鼠 HC<sub>50</sub>的影响结果如表 2。表 2 表明, 0.45 g/(kg·bw)组龟甲粉具有极显著增加小鼠半数溶血值(HC<sub>50</sub>)( $P < 0.01$ )。表 1 及表 2 都表明了龟甲粉对小鼠体液免疫功能具有增强作用。

表 2 龟甲粉对小鼠 HC<sub>50</sub>的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
Table 2 Effect of tortoise shell powder of *Chinemys reevesii* (Gray) on HC<sub>50</sub> in mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

剂量(g·(kg·bw) <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	动物数(只)	HC <sub>50</sub>
0	10	127±28
0.15	10	141±31
0.30	10	152±26
0.45	10	174±37**

注: 与空白对照组比较, \*表示差异显著( $P < 0.05$ ); \*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ )

### 3.2 龟甲粉对小鼠单核-巨噬细胞功能的影响

单核-巨噬细胞在调节淋巴细胞和免疫应答上起着重要作用<sup>[9]</sup>。龟甲粉对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能力以及鸡红细胞吞噬率及吞噬指数的影响实验结果如表 3 和表 4。0.15 g/(kg·bw)及 0.45 g/(kg·bw)组可以极显著提高小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能力( $P < 0.01$ )。0.15 g/(kg·bw)和 0.45 g/(kg·bw)组可以极显著提高小鼠腹腔巨噬细胞鸡红细胞吞噬率及吞噬指数( $P < 0.01$ )。单核-巨噬细胞在发挥细胞免疫作用中起着重要作用。实验结果表明, 0.15 g/(kg·bw)组龟甲粉对小鼠单核-巨噬细胞具有极显著影响( $P < 0.01$ )。

表 3 龟甲粉对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能力的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
Table 3 Effect of tortoise shell powder of *Chinemys reevesii* (Gray) on the ability of carbon particles clearance by mice macrophages ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

剂量(g·(kg·bw) <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	动物数(只)	校正廓清指数 $\alpha$
0	10	4.46±0.70
0.15	10	5.50±0.80**
0.30	10	5.23±0.72
0.45	10	5.73±0.65**

注: 与空白对照组比较, \*表示差异显著( $P < 0.05$ ); \*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ )

表 4 龟甲粉对小鼠腹腔巨噬细胞鸡红细胞吞噬率及吞噬指数的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
Table 4 Effect of tortoise shell powder of *Chinemys reevesii* (Gray) on phagocytic rate and phagocytic index of chicken red blood cells in mice peritoneal macrophages ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

剂量(g·(kg·bw) <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	动物数(只)	吞噬百分率 (%)	吞噬指数
0	10	25.4±2.0	0.29±0.02
0.15	10	28.4±2.5**	0.32±0.02**
0.30	10	27.3±2.2	0.3±0.02
0.45	10	29.3±2.1**	0.33±0.03**

注: 与空白对照组比较, \*表示差异显著( $P < 0.05$ ); \*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ )

## 4 讨论

近年来, 在湖北、广东、广西等地区, 龟鳖养殖成为了一个新的养殖热点<sup>[10]</sup>。乌龟的龟甲是既有药用价值, 又具有保健食品价值的乌龟养殖副产品。相关学者对龟甲具有药理作用也进行了大量研究。龟甲的滋阴作用, 已经进行了大量的研究和报道<sup>[11,12]</sup>。谢学明等<sup>[13]</sup>研究了龟甲的石油醚、乙酸乙酯、95%乙醇提取物的抗氧化活性。李熙灿等<sup>[14]</sup>发现龟甲醇提取物具有修复骨髓间充质干细胞氧化损伤作用。陈东风等<sup>[15]</sup>研究发现龟甲能促进神经干细胞的增殖, 具有促进生长发育的作用。这些研究结果表明, 龟甲是一种具有多种多样的生理活性物质。但目前为止, 龟甲粉对小鼠免疫功能影响的研究还未见报道。本研究进行了龟甲粉对小鼠抗体生成细胞测定、对小鼠 HC<sub>50</sub>的影响、碳廓清能力以及鸡红细胞吞噬率及吞噬指数的影响实验, 获得的实验结果表明了龟甲粉具有增强小鼠体液免疫功能和单核-巨噬细胞功能的作用。因此, 龟甲粉是一种可以被开发成具有提高免疫作用的保健食品潜在原料。

## 参考文献

- [1] 李毓群, 陆维承. 龟甲炮制工艺沿革及合理性探讨[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(9): 48-49.  
Li YQ, Lu WC. The history and reasonable of process technology for tortoise shell of *Chinemys reevesii* (Gray) [J]. Chin J Inf TCM, 2006, 13(9): 48-49.
- [2] 顾迎寒, 卢先明, 蒋桂华, 等. 不同品种龟甲滋阴作用的对比研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6): 1417-1418.  
Gu YH, Lu XM, Jiang GH, et al. Ziyin effect of different kinds of tortoise shell [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2007, 18(6): 1417-1418.
- [3] 余建清. 龟甲化学、药理研究进展[J]. 中医药信息, 1992, (6): 43-44.  
Yu JQ. Research progress on pharmacology and chemistry of tortoise shell [J]. Inf Tradit Chin Med, 1992, (6): 43-44.
- [4] 杜沛霖, 周雨晴, 朱华. 龟甲的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(32): 11319-11320, 11338.  
Du PL, Zhou YQ, Zhu H. Research progress of the Carapax et Plastrum Testudinis[J]. J Anhui Agric Sci, 2014, 42(32): 11319-11320, 11338.
- [5] 陈炳艺, 陈泽华, 林嘉辉, 等. 龟甲胶、鹿角胶调控 MKK 基因表达促进豚鼠 OA 软骨细胞增殖的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(7): 805-808.  
Chen BY, Chen ZH, Lin JH, et al. The study of tortoise sell glue and deer horn glue regulation of MAPKK gene expression in the promotion of chondrocyte proliferation in guinea pig with osteoarthritis [J]. Chin J Osteoporos, 2016, 22(7): 805-808.
- [6] 李成威, 马淑霞, 王春敏, 等. 胶原蛋白肽增强小鼠免疫力的实验研究[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(4): 387-389.  
Li CW, Ma SX, Wang CM, et al. Collagen peptide enhances immunity in mice [J]. Chin J Microecol, 2013, 25(4): 387-389.
- [7] 付俊鹤, 余宙, 胡居吾, 等. 精制蜂胶对小鼠免疫功能的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 286-290.  
Fu JH, Yu Z, Hu JW, et al. Effects of refined propolis on immune function in mice [J]. Food Sci, 2009, 30(19): 286-290.
- [8] 邱瑾丽, 李引乾, 周广辉, 等. “畜禽用多种微量元素注射液”对小鼠免疫功能的影响[J]. 西北农业学报, 2010, 19(2): 25-28.  
Qiu JL, Li YQ, Zhou GH, et al. Effect of “injection of trace elements for livestock and poultry” on the immune function of the mice [J]. Acta Agric Boreali-Occidentalis Sin, 2010, 19(2): 25-28.
- [9] 赵晓燕, 张超, 马越, 等. 紫玉米花色苷对小鼠免疫功能的影响[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(8): 1933-1936.  
Zhao XY, Zhang C, Ma Y, et al. Effect of purple corn anthocyanins on the immunological function of mice [J]. Hubei Agric Sci, 2010, 49(8): 1933-1936.
- [10] 刘国安. 让湖北龟鳖“爬”向全国-湖北省龟鳖养殖业发展情况[J]. 渔业致富指南, 2007, (23): 11-12.  
Liu GA. Expand market of turtle and soft-shelled turtle in the whole nation-Development of breeding industry of turtle and soft-shelled turtle in Hubei province [J]. Get Rich Guide Fish, 2007, (23): 11-12.
- [11] 徐新建, 陈素红, 吕圭源. 龟甲“滋阴补肾”药效相关研究概况[J]. 当代医学, 2009, 15(10): 15-17.  
Xu JX, Chen SH, Lv GY. The effects of nourish yin and tonifying the kidney of tortoise plastron [J]. Contemp Med, 2009, 15(10): 15-17.
- [12] 郑本端, 吕国桥, 罗自文. 龟甲胶药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(5): 463-464.  
Zhen BR, Lv GQ, Luo ZW. Pharmacological action research on progress of Guijiajiao [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2001, 12(5): 463-464.
- [13] 谢学明, 李熙灿, 钟远声, 等. 龟板体外抗氧化活性的研究[J]. 中国药房, 2006, 17(18): 1368-1370.  
Xie XM, Li XC, Zhong YS, et al. Study of antioxidant activities of *Plastrum testudinis* in vitro [J]. China Pharm, 2006, 17(18): 1368-1370.
- [14] 李熙灿, 谢学明, 黄春花, 等. 龟板醇提物对大鼠骨髓间充质干细胞氧化损伤的修复及其抗脂质过氧化作用[J]. 中草药, 2007, 38(7): 1043-1046.  
Li XC, Xie XM, Huang CH, et al. Repairing of oxidative damage to mesenchymal stem cell in rats and anti-lipidperoxidation by *Plastrum testudinis* ethanolic extract [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2007, 38(7): 1043-1046.
- [15] 陈东风, 杜少辉, 李伊为, 等. 龟板对局灶性脑缺血后神经干细胞的作用[J]. 广州中医药大学学报, 2001, 18(4): 328-331.  
Chen DF, Du SH, Li YW, et al. Effect of *Plastrum testudinis* on neural stem cell after focal cerebral ischemia [J]. J Guangzhou Univ Tradit Med, 2001, 18(4): 328-331.

(责任编辑: 杨翠娜)

## 作者简介



侯喜龙, 在读硕士生, 主要研究方向为生物工程。

E-mail: houxilong@163.com



李伟, 博士, 教授, 主要研究方向为食品科学。

E-mail: aisingioro@hotmail.com