

# 小分子阿胶纯粉片对小鼠免疫调节功能的影响

卢连华<sup>1</sup>,周雯<sup>1\*</sup>,张建岭<sup>2</sup>,郭晓飞<sup>2</sup>,范轶欧<sup>1</sup>,张静<sup>1</sup>,唐慧<sup>1</sup>,李慧<sup>1</sup>,陈萌<sup>1</sup>

<sup>1</sup>山东省疾病预防控制中心,济南 250014;<sup>2</sup>东阿阿胶股份有限公司 国家胶类中药工程技术研究中心,聊城 252201

**摘要:**研究小分子阿胶纯粉片对 ICR 正常小鼠的免疫调节作用。分别以 0.18、0.35、1.05 g/kg 小分子阿胶纯粉片经口给予小鼠,连续 30 天,通过足趾增厚法、小鼠脾淋巴细胞转化实验检测小鼠细胞免疫调节能力,通过血清溶血素实验、抗体生成细胞实验检测小鼠体液免疫调节能力,通过巨噬细胞吞噬实验、自然杀伤细胞(NK)活力实验测定小鼠非特异性免疫调节能力。结果显示,小分子阿胶纯粉片中剂量组能增加小鼠的抗体生成细胞数( $P < 0.05$ );高剂量组能明显促进小鼠淋巴细胞转化率( $P < 0.01$ ),提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬指数( $P < 0.05$ )和 NK 细胞活性( $P < 0.05$ );中、高剂量组能增强小鼠的迟发型变态反应能力( $P < 0.01$ );低、中、高中剂量组能提高小鼠的血清溶血素水平( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。因此,小分子阿胶纯粉片能明显增强 ICR 小鼠的免疫功能。

**关键词:**小分子阿胶纯粉片;低聚肽;ICR 小鼠;免疫调节

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0121-04

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.021

## Effect of the small molecular Donkey-hide gelatin on immune function of mice

LU Lian-hua<sup>1</sup>,ZHOU Wen<sup>1\*</sup>,ZHANG Jian-ling<sup>2</sup>,GUO Xiao-fei<sup>2</sup>,  
FAN Yi-ou<sup>1</sup>,ZHANG Jing<sup>1</sup>,TANG Hui<sup>1</sup>,LI Hui<sup>1</sup>,CHEN Meng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Shandong Center for Disease Control and Prevention,Jinan 250014,China;

<sup>2</sup>National Engineering Research Center for Gelatin-based Traditional Chinese Medicine,Dong-E-E-Jiao Co. Ltd.,Liaocheng 252201,China

**Abstract:**To study the effects of the small molecular Donkey-hide gelatin (SDG) on immune function of mice. Methods:Adult female ICR mice were orally administrated with the SDG at doses of 0.18,0.35 and 1.05 g/kg for 30 days consecutively. The cellular immunoregulation of the mice was verified with delay-type hypersensitivity (DTH) test and proliferation and transformation of spleen lymphocyte. The humoral immunoregulation was assessed with antibody-producing cell and serum hemolysin level test. Nonspecific immune regulation was monitored with carbon clearance,macrophage phagocytosis test and activity of natural killer (NK) cells. Spleen index and thymus index of the mice were also determined. The result is that the middle dose group increased the number of antibody producing cells ( $P < 0.05$ ),the high dose group promoted lymphocyte transformation rate ( $P < 0.01$ ) and the macrophage phagocytosis index( $P < 0.05$ )and NK cell activity ( $P < 0.05$ ),the delayed type hypersensitivity ability of the middle and high dose groups increased( $P < 0.01$ ),the level of serum hemolysin were increased in all dose groups ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). So the small molecular Donkey-hide gelatin can enhance the immune function of ICR mice.

**Key words:**small molecular donkey-hide gelatin;oligopeptide;ICR mouse;immune regulation

阿胶(*Colla Corii Asini*)为马科动物驴的干皮或鲜皮经煎煮、浓缩而成的胶块,与人参、鹿茸并称为“滋补三宝”<sup>[1]</sup>。阿胶作为药食同源的中药,具有补血滋阴、润燥、止血之功效,被称为补血“圣药”<sup>[2]</sup>。近些年的研究也表明阿胶对机体免疫功能有正向调

节作用<sup>[3-5]</sup>。

阿胶中蛋白质及多肽的相对分子质量主要集中在  $6 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ <sup>[6]</sup>,小分子阿胶纯粉片由阿胶经过化胶、蛋白酶酶解、浓缩、真空干燥等工艺加工而成,所含蛋白质及多肽中 85% 的相对分子质量低于 1 000,酶解后的小分子阿胶纯粉片易被人体吸收,吸收率远高于普通阿胶。本实验对小分子阿胶纯粉片的免疫调节作用进行研究。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物

SPF级健康ICR雌性小鼠,共192只,体重18.0~2.0 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2012-0001。动物为4个平行组,每个平行组48只。平行1组进行碳廓清实验;平行2组进行小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验;平行3组进行迟发型变态反应、抗体生成细胞检测及血清溶血素测定;平行4组进行ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验和NK细胞活性测定实验。每个平行组分为4个小组,分为对照组和3个剂量组,每个小组12只动物。

#### 1.1.2 样品

小分子阿胶纯粉片,固体粉末,人体推荐剂量为2.1 g/天,由东阿阿胶股份有限公司提供。

#### 1.1.3 仪器与试剂

SPECTRAMAX plus酶标仪、CO<sub>2</sub>培养箱、SW振荡水浴槽、Thermo高速冷冻离心机、显微镜、数显游标卡尺。Yac-1细胞购于山东省医学科学院。INT、PMS、NAD、Giemsa染液购自美国Sigma公司,RP-MI1640培养液购自美国Gibco公司,SRBC、小牛血清购自杭州四季青生物材料有限公司,其他试剂均为分析纯。

## 1.2 方法<sup>[7]</sup>

### 1.2.1 剂量选择

小分子阿胶纯粉片组设0.18、0.35、1.05 g/kg·bw组3个剂量组,分别为相当于人体推荐摄入量的5倍、10倍、30倍。以纯化水为溶剂将小分子阿胶纯粉片分别配至所需浓度,即称取0.36、0.70、2.10 g小分子阿胶纯粉片以纯化水分别配至40 mL。同时设立溶剂对照组,给予纯化水。各组动物按每日0.2 mL/10 g·bw连续灌胃30 d后,测各项指标。

### 1.2.2 细胞免疫实验

#### 1.2.2.1 ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验(MTT法)

无菌取脾,制备脾细胞悬液,用RPMI1640培养液调整细胞浓度为 $3 \times 10^6$ 个/mL,分两孔加入24孔培养板中,每孔1 mL,一孔加入75 μL ConA液,另一孔作为对照,置5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱中培养72 h。培养结束前4 h,每孔吸取上清液0.7 mL,加入0.7 mL无血清的RPMI1640培养液,同时加入MTT 50 μL,继续培养4 h。培养结束后,每孔加入1 mL

酸性异丙醇,吹打混匀,在570 nm波长处测定光密度值(OD),以加ConA孔的OD值减去不加ConA孔的OD值表示淋巴细胞增殖能力。

#### 1.2.2.2 迟发型变态反应(DTH)

实验结束前4天,小鼠腹腔注射2%(V/V)SRBC,致敏后4天测量左后足跖厚度,然后在测量部位皮下注射20%(V/V)SRBC,每鼠注射20 μL,24 h后测量左后足跖部厚度,同一部位测量三次,取均值。以攻击前后足跖厚度差值来表示DTH的程度。

### 1.2.3 体液免疫实验

#### 1.2.3.1 血清溶血素水平测定

小鼠腹腔注射SRBC 5天后,摘眼球取血,离心取血清,稀释100倍,取稀释血清1 mL与10%(V/V)SRBC 0.5 mL、补体1 mL(用SA液按1:8稀释),混合,在37 °C水浴中保温15~30 min后,冰浴终止反应。离心,取上清液,在540 nm波长处测定OD值。

#### 1.2.3.2 抗体生成细胞检测

取脾,制备细胞悬液。按规范制片,放入CO<sub>2</sub>培养箱温育1.5 h,加补体后继续温育1.5 h后,计数溶血空斑数。

### 1.2.4 巨噬细胞能力测定

#### 1.2.4.1 小鼠碳廓清试验

小鼠尾静脉注射1:3稀释的印度墨汁,待墨汁注入立即计时,注入墨汁后2、10 min,分别从内眦静脉丛取血20 μL,并将其加到2 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液中,在600 nm波长处测OD值。将小鼠处死,取肝和脾脏称重,计算吞噬指数。

#### 1.2.4.2 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验

小鼠腹腔注射20%鸡红细胞悬液1 mL,间隔30 min处死,用生理盐水2 mL冲洗腹腔,取腹腔洗液1 mL,分滴于2片玻片上,37 °C温育30分钟,漂洗,固定,Giemsa染液染色,镜检计数,计算吞噬率和吞噬指数。

### 1.2.5 NK细胞活性测定

无菌取脾,制备脾细胞悬液,用RPMI1640培养液调整细胞浓度为 $2 \times 10^7$ 个/mL。将YAC-1细胞加入96孔培养板,每孔100 μL,试验孔加入100 μL脾细胞(效靶比50:1),自然释放孔加入100 μL培养液,最大释放孔加入100 μL 1% NP40,37 °C培养4小时,离心,取上清100 μL置96孔酶标板中,加入LDH基质液100 μL,反应3 min,以1 mol/L的HCl终止反应,在酶标仪490 nm处测定OD值。

### 1.3 数据处理:

以 Excel 软件建立数据库,使用 SPSS 软件中 Dunnett 检验方法进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 小分子阿胶纯粉片对小鼠细胞免疫功能的影响

1.05 g/kg·bw 剂量组动物的淋巴细胞增殖能

力(OD 差值)与对照组比较有显著性差异( $P < 0.01$ );0.35 和 1.05 g/kg·bw 剂量组动物的 DTH 与对照组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。实验结果表明小分子阿胶纯粉片对小鼠的脾淋巴细胞转化增殖和迟发型变态有明显的增强和促进作用,能够提高小鼠的细胞免疫功能。

表 1 小分子阿胶纯粉片对小鼠淋巴细胞的影响( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of small molecular donkey-hide gelatin (SDG) on lymphocyte in mice ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Doses (mg/kg)	淋巴细胞增殖能力 Lymphocyte proliferation	DTH (mm)
空白对照 Control	-	0.253 ± 0.082	0.27 ± 0.06
低剂量 SDG-L Low dose SDG-L	0.18	0.280 ± 0.074	0.32 ± 0.07
中剂量 SDG-M Medium dose SDG-L	0.35	0.315 ± 0.067	0.34 ± 0.07*
高剂量 SDG-H High dose SDG-L	1.05	0.344 ± 0.052*	0.35 ± 0.03*

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, \* $P < 0.01$ .

### 2.2 小分子阿胶纯粉片对小鼠体液免疫功能的影响

0.35 g/kg·bw 剂量组动物的溶血空斑数与对照组比较有显著性差异( $P < 0.05$ );0.18、0.35 和 1.05 g/kg·bw 剂量组动物的血清溶血素水平与对

照组的差异均有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),实验结果表明小分子阿胶纯粉片能明显增加血清溶血素水平和促进小鼠脾细胞抗体生成,对小鼠的体液免疫功能有增强作用。

表 2 小分子阿胶纯粉片对小鼠体液免疫的影响( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of small molecular donkey-hide gelatin on humoral immunity in mice ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Doses (mg/kg)	溶血空斑数 Number of hemolytic plaques ( $\times 10^3$ /全脾)	半数溶血值 HC <sub>50</sub>
空白对照 Control	-	10.6 ± 2.8	63.6 ± 5.5
低剂量 SDG-L Low dose SDG-L	0.18	11.0 ± 3.6	69.3 ± 4.1*
中剂量 SDG-M Medium dose SDG-L	0.35	14.5 ± 3.7*	68.6 ± 5.7*
高剂量 SDG-H High dose SDG-L	1.05	12.3 ± 3.0	76.8 ± 4.2**

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, \* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ .

### 2.3 小分子阿胶纯粉片对小鼠巨噬细胞吞噬能力的影响

各剂量组动物的碳廓清吞噬指数和腹腔巨噬细

胞吞噬百分率与对照组比较,差异均无统计学意义;1.05 g/kg·bw 剂量组动物的腹腔巨噬细胞吞噬指数与对照组比较有显著性差异( $P < 0.05$ )。

表 3 小分子阿胶纯粉片对巨噬细胞吞噬能力的影响( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of small molecular donkey-hide gelatin on phagocytic function of macrophage ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Doses (mg/kg)	碳廓清吞噬指数 Carbon clearance and phagocytosis index (a)	吞噬鸡红细胞吞噬率 Phagocytic rate of erythrocytes in chicken (%)	吞噬鸡红细胞吞噬指数 Phagocytic index of red blood cells of phagocytic chicken (a)
空白对照 Control	-	5.94 ± 0.77	29.8 ± 4.6	0.64 ± 0.09
低剂量 SDG-L Low dose SDG-L	0.18	6.05 ± 0.85	28.6 ± 6.4	0.63 ± 0.12
中剂量 SDG-M Medium dose SDG-L	0.35	6.03 ± 0.54	31.4 ± 6.0	0.64 ± 0.09
高剂量 SDG-H High dose SDG-L	1.05	5.91 ± 0.89	34.5 ± 5.8	0.75 ± 0.13*

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, \* $P < 0.05$ .

## 2.4 小分子阿胶纯粉片对小鼠 NK 细胞活性的影响

1.05 g/kg. bw 剂量组动物的 NK 细胞活性与阴

性对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 表明小分子阿胶纯粉片对小鼠的 NK 细胞活性有明显的提高作用。

表 4 小分子阿胶纯粉片对小鼠 NK 细胞活性的影响 ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effect of small molecular donkey-hide gelatin on NK cell activity in mice ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	NK 细胞活性 NK cell activity (%)
空白对照 Control	-	34.5 ± 8.1
低剂量 SDG-L Low dose SDG-L	0.18	36.3 ± 7.2
中剂量 SDG-M Medium dose SDG-L	0.35	35.6 ± 7.1
高剂量 SDG-H High dose SDG-L	1.05	43.6 ± 8.8*

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, \*  $P < 0.05$ .

## 3 讨论

阿胶为传统经典中药,主要成分包括蛋白质、氨基酸及微量元素等,还含有硫酸皮肤素(DS)和生物酸等。其中蛋白类含量为60%~80%左右,含有18种氨基酸(包括7种人体必需氨基酸)<sup>[2]</sup>。蛋白质需经消化液酶解为低聚肽或氨基酸而被机体吸收,发挥药效。考虑阿胶以胶原蛋白为主成分的属性,推断其蛋白经消化酶解产生的肽类成分是功效的重要因素<sup>[8]</sup>。吴宏忠等发现阿胶酶解成分能促进贫血小鼠外周血白细胞和红细胞升高,促进骨髓和脾造血干/祖细胞集落 BFU-E、CFU-E、CFU-GM 的增加,提高外周血 GM-CSF、IL-6、EPO 的含量,降低负相造血因子 INF- $\gamma$ 、TGF- $\beta$  含量,刺激肝和肾 EPO 和 GMCSF mRNA 表达<sup>[9]</sup>。刘元涛<sup>[10]</sup>等发现阿胶经酶解后所得低聚肽能显著增加胸腺和脾脏指数,表明阿胶经体外仿生酶解后对机体的非特异性免疫有增强作用。小分子阿胶纯粉片是利用酶解技术将阿胶中大分子蛋白质和多肽分解而成的小分子活性小肽,对阿胶的吸收有促进作用。为了探索其免疫调节作用机制,通过细胞免疫、体液免疫、巨噬细胞吞噬能力及 NK 细胞活性等实验,发现小分子阿胶纯粉片具有明显的促进脾淋巴细胞转化增殖,增强小鼠迟发型变态反应能力,增加抗体生成细胞数和腹腔巨噬细胞吞噬指数,提高血清溶血素水平和 NK 细胞活性,以上结果表明小分子阿胶纯粉片对小鼠的免疫功能有正向调节作用。本实验结果对阿胶的开发利用具有一定的参考价值。

## 参考文献

1 Lei ZQ. Chinese Mat Med(中药学)[M]. Shanghai: Shang-

- hai Science and Technology Publishing House, 1999:304.
- Guo J, Sun JM, Zhang ZX, et al. Progress on chemical component and drug action of *Colla corii asini* [J]. Jilin Tradit Chin Med(吉林中医药), 2013, 33:389-391.
  - Li Z, Chen BF, Huang JM, et al. Effects of gelatin anigra on cytoimmunity and humoral immunity function in mice [J]. Chin J Health Lab Tech(中国卫生检验杂志), 2008, 18:1426-1427.
  - Zhang X, Wang JF, Li B, et al. Effect of Ejiao on immune function in mice [J]. Food Ind Sci Tech(食品工业科技), 2011, 32:400-402.
  - Song YM, Mao GN, Kang RR, et al. Effect of *Colla Corri Asini* effervescent granules on immune function in mice [J]. Prog in Veter Med(动物医学进展), 2011, 32(9):73-75.
  - Zhang B, Hu JH, Zhang YQ. Progress on chemical component and Identification of of Ejiao [J]. J Shandong Unive TCM(山东中医药大学学报), 2014, 38:451-453.
  - Inspection and Assessment Standard for Health Food [S]. Beijing: Ministry of Health People's Republic China, 2003.
  - Li XC, Yan LH, Wang ZM, et al. Isolation and mass spectrometric analysis of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of roasted pills of *Asini Corii Colla* [J]. J Chin Mat Med(中国中药杂志), 2013, 38:1021-1025.
  - Wu HZ, Yang F, Cui SY, et al. Fractions prepared from digested *Colla Corri Asini* and its hematopoietic mechanism on the anemic mice [J]. J East China Univ Sci Tech: Nat Sci Ed(华东理工大学学报: 自科版), 2008, 34(1):47-52.
  - Liu YT, Zhang HH, Wang SG, et al. A comparative study on immune enhancement of Ejiao before and after biomimetic enzymatic hydrolysis [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2016, 27:2158-2160.