

鱼皮胶原蛋白肽复方制品对小鼠免疫功能的影响

石举然¹,李丽杰^{1*},张曾亮²,王敏¹,卢赛¹,杨迪¹,王鲁慧¹,邹圣灿¹

¹颐海产业控股有限公司,青岛 266100;²内蒙古医科大学中医学院,呼和浩特 010110

摘要:本试验旨在研究鱼皮胶原蛋白肽与壳寡糖、人参提取物、黄芪提取物、当归提取物的药物组合物(鱼皮胶原蛋白肽复方制品)对免疫功能的影响。将336只SPF级健康ICR雌性小鼠随机分为四批($N = 84$),分别进行细胞免疫功能、脏器/体重比值及体液免疫功能、单核-巨噬细胞功能及NK细胞活性检测。每批随机分为7组($n = 12$),阴性对照组、高(3.0 g/kg)、中(1.0 g/kg)、低(0.5 g/kg)剂量复方制品组和鱼皮胶原蛋白肽组,连续灌胃30天后,测定各项功能指标。结果发现,与阴性对照组相比,各剂量组小鼠的迟发变态反应、脏器/体重比值、抗体生成细胞数无显著差异($P > 0.05$);复方制品各剂量组小鼠的淋巴细胞增殖能力、血清溶血素水平以及单核-巨噬细胞碳廓清吞噬指数明显增强,且效果优于鱼皮胶原蛋白肽组。由此得出,鱼皮胶原蛋白肽复方制品具有较好的增强小鼠免疫力的作用。

关键词:鱼皮胶原蛋白肽;复方制品;小鼠;免疫功能

中图分类号:R965

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)2-0224-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.2.006

Effect of compound product of fish skin collagen on mouse immunity

SHI Ju-ran¹, LI Li-jie^{1*}, ZHANG Zeng-liang², WANG Min¹, LU Sai¹, YANG Di¹, WANG Lu-hui¹, ZOU Sheng-can¹

¹Yihai Industry Holding Co., Ltd., Qingdao 266100, China;

²College of Traditional Chinese Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China

Abstract: In order to study the effect of a compound, which comprises fish skin collagen peptide, chitosan oligosaccharide (COS), *Panax ginseng* extract, Astragalus extract and Angelica extract, on the mice immunity, we divided the 336 SPF healthy ICR female mice into four batches ($N = 84$) randomly. And the cellular immune function, organ/body weight ratio and humoral immune, monocyte-macrophage function and NK cell activity of mice were studied respectively. Each batch was divided into seven groups ($n = 12$), including negative control group, low-dose (0.5 g/kg), medium-dose (1.0 g/kg) and high-dose compound products group (3.0 g/kg), low-dose (0.5 g/kg), medium-dose (1.0 g/kg) and high-dose fish skin collagen peptide group (3.0 g/kg). Functional indexes were measured according to the daily continuous oral gavage for 30 days. As a result, compared with the negative control group, there were no significant differences in delayed allergy (DTH), organ/body weight ratio, and the number of antibody-producing cells between the experimental groups ($P > 0.05$). The proliferation ability of lymphocyte, serum hemolysin level and carbon clearance index of monocyte-macrophage were significantly enhanced in compound products group, and the effect of compound on mice immunity was better than that in the fish skin collagen peptide group. In a nutshell, the compound product of fish skin collagen peptide in this study has a better effect on enhancing the mouse immunity than fish skin collagen peptide group.

Key words: fish skin collagen peptide; compound products; mice; immune function

机体免疫功能是一个与衰老有密切关系的因素,一般在30岁左右开始减退,这种变化是悄然、缓慢、持续进行的,生活节奏加快与竞争压力增大加剧

了这个变化趋势。因此,增强免疫功能产品的开发显得尤为重要。增强免疫功能的产品原料来源广泛,其中海洋资源及天然植物提取物效果良好但开发利用程度较低,如鱼皮胶原蛋白肽^[1]、壳寡糖^[2]、人参^[3]、黄芪^[4]、当归^[5]等均具有一定的增强免疫作用,且已在相关领域内有所应用。

鱼皮胶原蛋白肽是鱼皮胶原蛋白经分子链解

收稿日期:2019-08-30 接受日期:2019-12-31

基金项目:科技部国家重点研发计划(2018YFC0311203)

*通信作者 Tel:86-18561514103; E-mail: lilijielinxi@126.com

体、断裂得到的一种产物,分子量较小,易于吸收,是一种新型来源的胶原蛋白肽,因其具有安全性好等特点,已经成为研究热点,但是目前其抗氧化功能研究较多,而免疫功能研究相对较少。Si等^[6]研究了不同途径给予胶原蛋白肽对小鼠免疫功能的影响,结果发现腹腔注射和灌胃给予小鼠胶原蛋白肽都对小鼠免疫功能指标有显著影响,且腹腔注射效果更加显著。壳寡糖(COS)是壳聚糖经酶促反应或者化学降解得到的低聚物,聚合度2~20,是唯一带正电荷的碱性氨基寡糖,近年来发现其具有免疫调节、抗炎、抗肿瘤等多种活性^[7],聚合度为3~8的COS在体外可显著增强原代264.7巨噬细胞的增殖活性和对中性红细胞的吞噬能力,小鼠口服COS后脾脏指数和血清免疫球蛋白IgG含量增加^[8]。Singh等^[9]通过实验研究表明,人参具有增强小鼠免疫力的作用,在特异性抗体形成、淋巴细胞增殖及巨噬细胞吞噬能力增强等多方面均有所体现。黄芪多糖(APS)是黄芪发挥效应的主要成分,经体内代谢后分解为单糖或低聚糖,生物学功能呈现多样性,具有增强机体免疫、提高抗氧化能力、抗炎症等多种药理学作用,APS已被广泛应用于临床医药领域^[10]。Zhou等^[4]研究表明,黄芪多糖能通过促进机体免疫器官发育和增强T细胞、B细胞及自然杀伤细胞等免疫细胞的功能来提高动物细胞免疫和体液免疫水平。当归为甘肃道地药材,现代药理研究表明,当归具有补血活血、调节机体免疫、抗衰老、改善肝功能等生理作用^[11]。文献报道百分之五的当归多糖可显著增强小鼠腹腔细胞对鸡红细胞(CRBC)的吞噬功能对小鼠腹腔细胞吞噬功能的抑制作用^[12]。

现代免疫理论认为,人体的免疫力是免疫器官、免疫细胞及细胞因子共同作用的结果,而不同生物活性物质的作用机理也各不相同,鱼皮胶原蛋白肽能够调节免疫相关活性指标^[6],壳寡糖^[8]、当归^[12]可以增强巨噬细胞吞噬能力,人参多糖能够促进特异性抗体形成^[9],而黄芪能够促进免疫器官发育^[10],不同原料作用于不同靶点,在提高免疫方面起到协同作用,因此调节机体免疫力也应该从多种方面考虑。目前关于调节机体免疫方面的研究多集中在植物提取物的复配上,未见海洋活性物质与植物提取物配伍并应用在调节动物免疫方面的研究,本研究自制了分子量为2 000~3 000 Da的鱼皮胶原蛋白肽,同时与壳寡糖、人参提取物、黄芪提取物和当归提取物进行复配,研究复方制品对免疫调节

的效果,为海洋生物资源与天然植物提取物配伍开发产品,并应用在免疫调节方面提供一定的理论支持。

1 仪器与试剂

SPECTRAMAX plus 酶标仪(北京龙跃生物科技有限公司)、PL203型电子天平(上海速展机电有限公司)、CO₂-80A-IR CO₂培养箱(上海丙林电子科技有限公司)、HHS-21-8振荡水浴槽(上海添时科学仪器有限公司)、TDL-4高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)、XSP-2CA显微镜(上海光学仪器一厂)、24孔和96孔细胞培养板(上海古朵生物科技有限公司)等。

SRBC(北京博尔西科技有限公司)、补体(豚鼠血清)(北京博尔西科技有限公司)、Hanks液(武汉卡诺斯科技有限公司)、SA缓冲液(上海晶抗生物工程技术有限公司)、印度墨汁(南京杜莱生物技术有限公司)、都氏试剂(上海羽朵生物科技)、YAC-1细胞(南京科佰生物科技有限公司)、RPMI1640完全培养液(上海圻明生物科技有限公司)、Giemsa染色液(上海哥凡生物科技有限公司)等。

2 受试药物

壳寡糖购自山东卫康生物医药有限公司;人参提取物(10:1,人参皂苷5%,批号NW17052201)、黄芪提取物(10:1,黄芪甲苷0.8%,批号NW17040503)、当归提取物(10:1,阿魏酸0.08%,批号NW17051801)购自威海松龄诺可佳中药饮片有限公司;清洁级全价鼠颗粒饲料购自北京科澳协力饲料有限公司。

鱼皮胶原蛋白肽:自制,以鳕鱼皮为材料,选用胰蛋白酶和木瓜蛋白酶同步酶解,获得分子量为2 000~3 000 Da的肽段产品,其溶解性好,易吸收。

鱼皮胶原蛋白肽复方制品:将自制的鱼皮胶原蛋白肽与壳寡糖、人参提取物、黄芪提取物、当归提取物按照230:5:12:30:42比例复配而成。

3 动物分组与饲养

3.1 实验动物与饲养环境

SPF级健康ICR雌性小鼠,体重18~22 g,共336只,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司。饲养环境为屏障环境,实验环境温度20~22℃,相对湿度45%~65%。

3.2 动物分组

实验前小鼠在动物房适应性喂养2天后开始正式实验。小鼠随机分为4批(N=84),第一批进行脏器/体重比值、迟发型变态反应、抗体生成细胞检

测及血清溶血素测定;第二批进行碳廓清实验;第三批进行小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验;第四批进行 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。将每批的 84 只小鼠随机分为 7 组,每组 12 只,其中 1 组作为阴性对照组,3 组为复方制品低、中、高剂量组,另外 3 组为鱼皮胶原蛋白肽低、中、高剂量组。

3.3 受试物剂量选择与给予方式

复方制品和鱼皮胶原蛋白肽设置的 3 个剂量组分别为低(0.5 g/kg)、中(1.0 g/kg)、高(3.0 g/kg)剂量组,分别相当于人体推荐摄入量的 5、10、30 倍。以纯化水为溶剂将受试物分别配至所需浓度,即分别称取 1、2、6 g 受试物用纯化水定容至 40 mL,同时设立阴性对照组灌胃纯化水,按每天 0.2 mL/10 g 连续灌胃 30 天,测试各项功能指标。

4 实验方法

4.1 小鼠体重及脏器/体重比值测定

小鼠在初始(给药前)、中期(给药 15 天)、末期(给药 30 天)分别称重,记录各组体重的平均值。腹腔注射 SRBC 5 天后处死动物,取胸腺、脾脏称重,计算脏器/体重比值。

4.2 迟发型变态反应(DTH)-足跖增厚法^[13]

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 μ L,注射后 24 h 测量左后足跖部厚度,同一部位测量三次,取平均值。以攻击前后足跖厚度差值来表示 DTH 的程度。

4.3 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验(MTT 法)^[14]

无菌取脾,制备脾细胞悬液,用 Hanks 液洗 2 次,每次离心 10 min(1 000 rpm),将细胞悬浮于 1 mL RPMI1640 完全培养液中,调整细胞浓度为 3×10^6 个/mL。细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中,每孔 1 mL,一孔加入 75 μ L ConA 液,另一孔作为对照,置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ 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 不含小牛血清的 RPMI1640 完全培养液,同时加入 MTT 50 μ L,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,在 570 nm 波长处测定 OD 值,以加 Con A 孔的 OD 值减去不加 ConA 的 OD 值表示淋巴细胞增殖能力。

4.4 血清溶血素测定^[15]

小鼠腹腔注射 SRBC 5 天后,摘眼球取血,离心

取血清稀释 100 倍,进行半数溶血值测定。同时制备脾细胞悬液,进行抗体生成细胞测定。

4.5 抗体生成细胞检测(Jerne 改良玻片法)^[16]

取脾制成细胞悬液。将表层培养基加热溶解后与等量双倍 Hanks 液混合,分装小试管,每管 0.5 mL,再向管内加 50 μ L 10% (V/V) SRBC(使用 SA 液配制)、25 μ L 脾细胞悬液,迅速混匀后,倾倒在已刷琼脂糖薄层的玻片上,待琼脂凝固后,将玻片水平扣放在玻片架上,放入 CO₂ 培养箱温育 1.5 h,然后用 SA 液稀释的补体(1:8)加入到玻片架凹槽内,继续温育 1.5 h 后,计数溶血空斑数。

4.6 小鼠碳廓清试验^[17]

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 和 10 min,分别从内眦静脉丛取血 20 μ L,并将其加到 2 mL NaCO₃ 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。

4.7 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验^[17]

小鼠腹腔注射 20% (V/V) 鸡红细胞悬液 1 mL,间隔 0.5 h 处死,固定于鼠板上,剪开腹壁皮肤,注射生理盐水 2 mL,转动鼠板 1 min,吸出腹腔液 1 mL,分滴于 2 片玻片上,37 $^{\circ}$ C 温育 30 min,用生理盐水漂洗,晾干,以 1:1 丙酮甲醇溶液固定,Giemsa 染液染色 10 min,用纯化水漂洗晾干,用油镜镜检,计算吞噬率和吞噬指数。

4.8 NK 细胞活性测定^[15]

实验前 24 h 将靶细胞传代培养,应用前以 Hanks 液洗 3 次,用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL。小鼠颈椎脱臼处死,无菌取脾,制备脾细胞悬液,用 Hanks 液洗 2 次,每次离心 10 min(1 000 rpm)。弃上清将细胞浆弹起,加入 0.5 mL 灭菌水裂解红细胞,20 s 后再加入 0.5 mL 2 倍 Hanks 液及 8 mL Hanks 液,离心 10 min(1 000 rpm),用 1 mL 含 10% (V/V) 小牛血清的 RPMI1640 完全培养液重悬,用 1% 冰醋酸稀释后计数,调整细胞浓度为 2×10^7 个/mL,将靶细胞加入 96 孔培养板,每孔 100 μ L,试验孔加入 100 μ L 脾细胞(效靶比 50:1),自然释放孔加入 100 μ L 培养液,最大释放孔加入 100 μ L 1% (V/V) NP40,37 $^{\circ}$ C 培养 4 h。离心,取上清 100 μ L 置于 96 孔酶标板中,加入 LDH 基质液 100 μ L,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。

5 数据统计与分析

以 Excel 软件建立数据库,用 SPSS 软件进行统

计分析,采用方差分析,先进行方差齐性检验,方差齐,计算 F 值, F 值 $< F_{0.05}$, $P > 0.05$, 结论:各组均数间差异无显著性; F 值 $\geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法 (Dunnett 检验法) 进行统计分析; 对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换, 待满足正态或方差齐性要求后, 用转换后的数据进行统计, 若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的, 改用秩和检验进行统计。

6 结果

6.1 受试物对小鼠体重的影响

分别测定各组实验小鼠的初始体重、中期体重和末期体重, 并计算小鼠增重, 由表 1 可知, 在 30 天喂养试验过程中, 鱼皮胶原蛋白肽和复方制品各剂量组小鼠各个阶段的体重及最终的体重增加值与阴性对照组相比均无显著差异 ($P > 0.05$), 说明受试物喂养对小鼠增重没有影响。

表 1 受试物对小鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effects of the sample on body weight of mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

批次 Batch	组别 Group	初始体重 Initial weight (g)	中期体重 Mid weight (g)	末期体重 Final weight (g)	增加值 Added value (g)
第一批 First batch	阴性对照 Negative control group	19.9 ± 0.5	26.7 ± 0.9	30.3 ± 0.8	10.5 ± 0.6
	复方制剂低剂量 Compound products-L	19.8 ± 0.9	26.9 ± 1.2	30.8 ± 1.4	11.0 ± 0.7
	复方制剂中剂量 Compound products-M	19.9 ± 0.9	27.0 ± 0.9	30.8 ± 1.4	10.9 ± 0.7
	复方制剂高剂量 Compound products-H	19.8 ± 0.7	27.0 ± 1.0	30.9 ± 1.1	11.0 ± 0.5
	胶原蛋白肽低剂量 Collagen peptide-L	19.6 ± 0.6	26.8 ± 0.6	30.8 ± 1.3	11.0 ± 0.6
	胶原蛋白肽中剂量 Collagen peptide-M	19.8 ± 0.7	27.1 ± 0.9	30.7 ± 1.2	10.9 ± 0.7
第二批 Second batch	胶原蛋白肽高剂量 Collagen peptide-H	19.8 ± 0.9	27.3 ± 1.2	30.6 ± 1.1	11.1 ± 0.6
	阴性对照 Negative control group	19.8 ± 0.8	27.1 ± 1.7	30.7 ± 1.4	10.9 ± 0.6
	复方制剂低剂量 Compound products-L	19.8 ± 0.9	27.5 ± 1.6	30.9 ± 1.5	11.1 ± 0.8
	复方制剂中剂量 Compound products-M	20.0 ± 1.1	27.4 ± 1.3	31.1 ± 1.7	11.0 ± 0.6
	复方制剂高剂量 Compound products-H	20.0 ± 0.8	27.4 ± 0.6	31.1 ± 1.1	11.1 ± 0.5
	胶原蛋白肽低剂量 Collagen peptide-L	19.9 ± 0.9	27.5 ± 1.2	30.8 ± 1.4	11.0 ± 0.7
第三批 Third batch	胶原蛋白肽中剂量 Collagen peptide-M	20.1 ± 1.0	27.4 ± 1.5	31.0 ± 1.7	11.2 ± 0.6
	胶原蛋白肽高剂量 Collagen peptide-H	20.1 ± 0.7	27.4 ± 0.7	31.2 ± 1.0	11.0 ± 0.5
	阴性对照 Negative control group	20.0 ± 0.7	26.9 ± 1.2	30.5 ± 1.4	10.5 ± 0.8
	复方制剂低剂量 Compound products-L	20.0 ± 0.6	27.3 ± 0.7	31.2 ± 1.0	11.2 ± 0.4
	复方制剂中剂量 Compound products-M	20.0 ± 0.9	27.4 ± 1.2	31.0 ± 1.1	11.0 ± 0.4
	复方制剂高剂量 Compound products-H	19.9 ± 0.7	26.8 ± 1.0	31.0 ± 1.0	11.0 ± 0.6
第四批 Fourth batch	胶原蛋白肽低剂量 Collagen peptide-L	20.1 ± 0.7	27.5 ± 0.7	30.9 ± 1.2	11.2 ± 0.5
	胶原蛋白肽中剂量 Collagen peptide-M	20.0 ± 0.9	27.3 ± 1.1	31.0 ± 1.0	11.0 ± 0.3
	胶原蛋白肽高剂量 Collagen peptide-H	19.9 ± 1.2	26.9 ± 1.0	31.1 ± 1.0	11.1 ± 0.6
	阴性对照 Negative control group	20.0 ± 0.6	27.0 ± 1.0	30.3 ± 1.4	10.3 ± 0.8
	复方制剂低剂量 Compound products-L	20.0 ± 1.0	27.2 ± 1.3	30.5 ± 1.5	10.5 ± 0.6
	复方制剂中剂量 Compound products-M	19.7 ± 0.8	27.2 ± 1.0	30.4 ± 0.7	10.8 ± 0.5
	复方制剂高剂量 Compound products-H	19.8 ± 0.8	27.4 ± 1.1	30.7 ± 1.0	10.9 ± 0.4
	胶原蛋白肽低剂量 Collagen peptide-L	20.1 ± 1.2	27.2 ± 1.3	30.5 ± 1.5	10.7 ± 0.6
	胶原蛋白肽中剂量 Collagen peptide-M	19.9 ± 0.7	27.1 ± 0.9	30.4 ± 0.7	10.9 ± 0.7
	胶原蛋白肽高剂量 Collagen peptide-H	19.8 ± 0.8	27.3 ± 1.0	30.7 ± 1.0	11.0 ± 0.4

6.2 受试物对小鼠迟发型变态反应 (DHT) 的影响

由表 2 可知, 鱼皮胶原蛋白肽和复方制品各剂量组小鼠的足跖肿胀度与对照组相比无显著差异

($P > 0.05$), 说明这两种受试物不会引起小鼠迟发型变态反应。

表 2 受试物对小鼠迟发型变态反应(DHT)的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 2 Effects of the sample on delayed allergy (DHT) in mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Group	剂量 Does (g/kg)	足跖肿胀度 Degree of foot swelling (mm)	P
阴性对照组 Negative control group	-	0.30 ± 0.05	
复方制剂低剂量 Compound products-L	0.5	0.32 ± 0.04	>0.05
复方制剂中剂量 Compound products-M	1.0	0.33 ± 0.09	>0.05
复方制剂高剂量 Compound products-H	3.0	0.35 ± 0.05	>0.05
胶原蛋白肽低剂量 Collagen peptide-L	0.5	0.33 ± 0.04	>0.05
胶原蛋白肽中剂量 Collagen peptide-M	1.0	0.33 ± 0.09	>0.05
胶原蛋白肽高剂量 Collagen peptide-H	3.0	0.36 ± 0.05	>0.05

6.3 受试物对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验的影响

由表 3 可知,与阴性对照组比较,复方制品组和鱼皮胶原蛋白肽组的低、中、高剂量组小鼠的脾淋巴细胞增殖能力存在极显著性差异($P < 0.01$),说明

复方制品和鱼皮胶原蛋白肽在低、中、高剂量下都有增加脾细胞增殖的能力,复方制品组小鼠淋巴细胞增殖能力更强,说明鱼皮胶原蛋白肽与其他生物活性成分按照合适比例复配之后效果更佳。

表 3 受试物对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 3 Effects of the sample on cona-induced spleen lymphocyte transformation in mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Group	淋巴细胞增殖能力(OD 差值) Lymphocyte proliferation (OD)	P
阴性对照组 Negative control group	0.247 ± 0.059	
复方制剂低剂量 Compound products-L	0.374 ± 0.047	<0.01
复方制剂中剂量 Compound products-M	0.320 ± 0.059	<0.01
复方制剂高剂量 Compound products-H	0.369 ± 0.034	<0.01
胶原蛋白肽低剂量 Collagen peptide-L	0.343 ± 0.044	<0.01
胶原蛋白肽中剂量 Collagen peptide-M	0.325 ± 0.069	<0.01
胶原蛋白肽高剂量 Collagen peptide-H	0.337 ± 0.038	<0.01

6.4 受试物对小鼠脏器/体重比值的影响

由表 4 可知,与阴性对照组相比,复方制品和鱼皮胶原蛋白肽的各剂量组小鼠的脾脏/体重比值和

胸腺/体重比值无显著性差异($P > 0.05$),说明两种受试物喂养对于小鼠脏器均没有影响。

表 4 受试物对小鼠脏器/体重比值的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 4 Effects of the sample on organ/body weight ratio in mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Group	脾脏/体重比值 Spleen/body weight ratio (g/100g)	胸腺/体重比值 Thymus/body weight ratio (g/100g)
阴性对照组 Negative control group	0.54 ± 0.08	0.36 ± 0.06
复方制剂低剂量 Compound products-L	0.56 ± 0.09	0.39 ± 0.06
复方制剂中剂量 Compound products-M	0.59 ± 0.09	0.37 ± 0.06
复方制剂高剂量 Compound products-H	0.51 ± 0.09	0.38 ± 0.06
胶原蛋白肽低剂量 Collagen peptide-L	0.55 ± 0.06	0.38 ± 0.06
胶原蛋白肽中剂量 Collagen peptide-M	0.56 ± 0.08	0.37 ± 0.07
胶原蛋白肽高剂量 Collagen peptide-H	0.57 ± 0.09	0.38 ± 0.05

6.5 受试物对小鼠抗体生成细胞数的影响

由表5可知,与阴性对照组相比,复方制品和鱼皮胶原蛋白肽各剂量组小鼠的抗体生成细胞数均无

显著性差异($P > 0.05$),说明两种受试物对于小鼠抗体形成细胞的增殖没有影响。

表5 受试物对小鼠抗体生成细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 5 Effects of the sample on the number of antibody-producing cells in mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Group	溶血空斑数 Hemolytic plaque number (10^3 /total spleen)	<i>P</i>
阴性对照组 Negative control group	44.9 ± 6.4	
复方制剂低剂量 Compound products-L	46.0 ± 7.2	>0.05
复方制剂中剂量 Compound products-M	46.7 ± 8.3	>0.05
复方制剂高剂量 Compound products-H	48.4 ± 8.6	>0.05
胶原蛋白肽低剂量 Collagen peptide-L	46.0 ± 7.2	>0.05
胶原蛋白肽中剂量 Collagen peptide-M	46.7 ± 8.3	>0.05
胶原蛋白肽高剂量 Collagen peptide-H	48.4 ± 8.6	>0.05

6.6 受试物对小鼠血清溶血素的影响

由表6可知,复方制品组的低剂量组小鼠血清溶血素水平与阴性对照组相比,无显著差异($P > 0.05$);中、高剂量组小鼠的血清溶血素水平与阴性对照组相比有极显著性差异($P < 0.01$)。鱼皮胶原蛋白肽组中、低剂量组小鼠血清溶血素水平与阴性对

照组相比,无显著差异($P > 0.05$);高剂量组小鼠的血清溶血素水平与阴性对照组相比有极显著性差异($P < 0.01$)。说明一定剂量的复方制品和鱼皮胶原蛋白肽均可以增加小鼠血清溶血素水平,增强小鼠免疫。相比于鱼皮胶原蛋白肽组,复方制品组达到相同效果所需要的剂量更小。

表6 受试物对小鼠血清溶血素的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 6 Effects of the sample on serum hemolysin in mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Group	半数溶血值 Half hemolytic value (HC_{50})	<i>P</i>
阴性对照组 Negative control group	54.7 ± 6.0	
复方制剂低剂量 Compound products-L	60.7 ± 7.5	>0.05
复方制剂中剂量 Compound products-M	62.8 ± 4.4	<0.01
复方制剂高剂量 Compound products-H	66.1 ± 6.4	<0.01
胶原蛋白肽低剂量 Collagen peptide-L	60.7 ± 7.5	>0.05
胶原蛋白肽中剂量 Collagen peptide-M	61.4 ± 4.8	>0.05
胶原蛋白肽高剂量 Collagen peptide-H	63.5 ± 4.2	<0.01

6.7 受试物对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能力的影响

由表7可知,复方制品组的高剂量组与阴性对照组比较,小鼠的单核-巨噬细胞碳廓清吞噬指数明显增高,有显著性差异($P < 0.05$);而鱼皮胶原蛋白肽各个剂量组与对照组相比,均无显著性差异($P < 0.05$),说明一定剂量的鱼皮胶原蛋白肽复方制品能显著提高小鼠的单核-巨噬细胞碳廓清吞噬指数。

6.8 受试物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的影响

由表8可知,复方制品和鱼皮胶原蛋白肽高剂

量组小鼠的腹腔巨噬细胞吞噬百分率与阴性对照组比较,均有极显著性差异($P < 0.01$),说明两种受试物的各个剂量组对于提高小鼠巨噬细胞吞噬作用均有显著作用,且随着剂量的增强效果增强。从表中数据可以看出,相同剂量的复方制品组效果优于鱼皮胶原蛋白肽组。

6.6 受试物对小鼠NK细胞活性的影响

由表9可知,复方制品组的中、高剂量组小鼠的NK细胞活性与阴性对照组相比有极显著性差异($P < 0.01$)。鱼皮胶原蛋白肽组的高剂量组与阴性对照组相比,有极显著性差异($P < 0.01$),说明一定剂

表 7 受试物对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 7 Effects of the sample on the carbon clearance ability of mononuclear macrophages in mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Group	吞噬指数 Phagocytic index (a)	P
阴性对照组 Negative control group	4.86 ± 0.64	
复方制剂低剂量 Compound products-L	5.19 ± 0.98	> 0.05
复方制剂中剂量 Compound products-M	5.54 ± 0.74	> 0.05
复方制剂高剂量 Compound products-H	5.83 ± 0.91	< 0.05
胶原蛋白肽低剂量 Collagen peptide-L	5.12 ± 0.78	> 0.05
胶原蛋白肽中剂量 Collagen peptide-M	5.34 ± 0.67	> 0.05
胶原蛋白肽高剂量 Collagen peptide-H	5.43 ± 0.81	> 0.05

表 8 受试物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 8 Effects of the sample on mouse peritoneal macrophage phagocytosis ability of chicken erythrocytes($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Group	吞噬百分率 Phagocytic percentage(%)	P 值 P value	吞噬指数 Devour index (a)	P
阴性对照组 Negative control group	39.0 ± 6.3		0.67 ± 0.09	
复方制剂低剂量 Compound products-L	39.4 ± 6.7	> 0.05	0.68 ± 0.09	> 0.05
复方制剂中剂量 Compound products-M	41.3 ± 8.9	> 0.05	0.68 ± 0.06	> 0.05
复方制剂高剂量 Compound products-H	49.6 ± 8.7	< 0.01	0.70 ± 0.09	> 0.05
胶原蛋白肽低剂量 Collagen peptide-L	39.2 ± 6.9	> 0.05	0.68 ± 0.07	> 0.05
胶原蛋白肽中剂量 Collagen peptide-M	40.3 ± 7.9	> 0.05	0.68 ± 0.06	> 0.05
胶原蛋白肽高剂量 Collagen peptide-H	47.6 ± 7.7	< 0.01	0.69 ± 0.09	> 0.05

量的复方制品和鱼皮胶原蛋白均能够增强小鼠 NK 细胞活性,且复方制品组效果要优于鱼皮胶原蛋白

表 9 受试物对小鼠 NK 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 9 Effects of the sample on the activity of NK cells in mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Group	NK 细胞活性 NK Cell activity (%)	P
阴性对照组 Negative control group	33.5 ± 8.3	
复方制剂低剂量 Compound products-L	38.6 ± 7.4	> 0.05
复方制剂中剂量 Compound products-M	44.1 ± 5.9	< 0.01
复方制剂高剂量 Compound products-H	44.6 ± 6.4	< 0.01
胶原蛋白肽低剂量 Collagen peptide-L	38.6 ± 6.4	> 0.05
胶原蛋白肽中剂量 Collagen peptide-M	39.5 ± 5.7	> 0.05
胶原蛋白肽高剂量 Collagen peptide-H	43.9 ± 7.4	< 0.01

通过灌胃给予小鼠不同剂量的鱼皮胶原蛋白肽和鱼皮胶原蛋白肽复方制品,探究两者是否具有增强免疫功能。结果表明,鱼皮胶原蛋白肽及其复方制品均能提高小鼠脾淋巴细胞转化能力和血清溶

血素水平,具有促进单核-巨噬细胞碳廓清的能力,能够提高腹腔巨噬细胞吞噬百分率和促进 NK 细胞活性,而且,在提高淋巴细胞增殖能力、增强 NK 细胞活性等方面,相同剂量的复方制品较单一的鱼皮胶

原蛋白肽效果更好;两种受试物对小鼠的足距肿胀度、抗体生成细胞数、腹腔巨噬细胞吞噬指数、脾脏/体重比值、胸腺/体重比值无显著影响。因此,鱼皮胶原蛋白肽与壳寡糖、人参提取物、黄芪提取物、当归提取物按照一定比例复配后的复方制品能够提高小鼠免疫力,且效果优于单一的鱼皮胶原蛋白肽。

7 讨论

我国是拥有丰富鱼类资源的海洋国家,近年来,海洋资源的开发与利用成为研究的热点。深海鱼胶原蛋白肽因具有来源广、低抗原性、低过敏性和使用安全等特点^[18]逐渐替代了传统的胶原蛋白,成为一种海洋来源新型胶原蛋白资源。受制备技术的限制,目前的海洋肽类通常是非常复杂的混合物,分子量范围较为宽泛,特定分子段活性肽的制备已成为其工业化生产的瓶颈,影响了活性肽的构效关系和相关活性机制及应用研究^[19]。同时,在应用方面,目前对于单一鱼皮胶原蛋白肽抗氧化等活性的研究较多,而以其为原料复配天然提取物开发增强免疫功能食品的研究很少。

本研究以深海鳕鱼皮为原料,采用复合酶同步水解法高效制备了分子量为2 000~3 000 Da的鱼皮胶原蛋白肽,将其按照一定比例与壳寡糖、人参提取物等复配得到一种增强免疫的复方制品,进行该胶原蛋白肽及其复方制品在增强免疫效果方面的研究,发现其具有显著的提高免疫效果,且与天然提取物原料复配之后效果更加明显,这可能是因为不同分子量的鱼皮胶原蛋白肽特定的活性功能,2 000~3 000 Da显示出较好的增强免疫功能,而且与天然提取物复配之后,其中的有效成分在增强机体免疫方面具有协同作用。特定分子量鱼皮胶原蛋白肽不仅安全性高、具有不同的生物活性^[20],而且解决了海洋渔业资源在利用过程中资源浪费的问题,同时海洋资源与天然植物提取物的组合应用也为其他功能食品的开发提供了一条新的途径。

参考文献

- Zhu DY, Gong WJ, Zhuo XQ. Progress in preparation and application of collagen peptide from fish skin[J]. Farm Prod Process(农产品加工), 2019, 7: 84-86.
- Feng J, Zhao LH, Yu QQ. Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages[J]. Biochem Bioph Res Co, 2004, 317: 414-420.
- Bai YJ, Zheng HS, Wang YP. Advances in immunoregulation of ginseng[J]. Spec Wild Econ Anim Plant Res(特产研

- 究), 2019, 1: 100-103.
- Zhou Z, Meng M H, Ni HF. Chemosensitizing effect of *Astragalus* polysaccharides on nasopharyngeal carcinoma cells by inducing apoptosis and modulating expression of Bax/Bcl-2 ratio and caspases[J]. Sci Monitor, 2017, 23: 462-469.
- Xie SH. Research progress of polysaccharides from *Angelica sinensis*[J]. Anhui Agr Sci Bull(安徽农学通报), 2019, 25(11): 27-34.
- Si SY, Xu BX, Wu YY, et al. Effects of different routes of administration of collagen peptide on immune function in immunosuppressed mice[J]. Chin J Hyg Resc(Elec Edit)(中华卫生应急电子杂志), 2018, 8: 224-228.
- Guan J, Yao SJ, Dong T, et al. Effect of chitooligosaccharide on growth inhibition and apoptosis of K562 cells[J]. World Latest Med Inform(世界最新医学信息文摘), 2019, 19(41): 33-34.
- Zhang GP, Liu WZ, Peng YF, et al. Toll like receptor 4 (TLR4) mediates the stimulating activities of chitosan oligosaccharide on macrophages[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 23: 254-261.
- Singh VK, Agarwal SS, Gupta BM. Immunomodulatory activity of *Panax ginseng* extract[J]. Planta Med, 1984, 50: 462-465.
- Yang TT, He X, Fan ZY, et al. Biological function and feeding prospect of *Astragalus* polysaccharide[J]. Guangdong Feed(广东饲料), 2019, 8: 37-39.
- Cao W, Li XQ, Wang X, et al. A novel polysaccharide, isolated from *Angelica sinensis*(Oliv.) Diels induces the apoptosis of cervical cancer HeLa cells through an intrinsic apoptosis pathway[J]. Phytomedicine, 2010, 17: 598-605.
- Bai RH, Zhang ZL. Effect of angelica on phagocytosis of mouse macrophages[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 1983, 12: 19-19.
- Ding GF. Outline of medical immunology[M]. Beijing: Beijing Medical University, China Union Medical University Joint Press, 1992.
- Li Y, Zhu CP, Zhang Y, et al. Microwave-assisted extraction of pomegranate peel polysaccharide and its immunoregulation[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30: 1015-1020.
- Cai F, Zhang Y, Zang LQ. Immunomodulatory effect of lentinan on immunosuppressive mice[J]. Immunol J(免疫学杂志), 2018, 34: 407-411.
- Yan H, Bhagwat B, Sanden D, et al. Evaluation of a TGN1412 analogue using *in vitro* assays and two immune humanized mouse models[J]. Toxicol Appl Pharm, 2019, 372: 57-69.