

缂丝水浓缩液对小鼠免疫功能影响的实验研究

傅伟忠¹, 覃辉艳¹, 覃光球², 张洁宏¹, 李彬¹, 高玉秋¹, 姚思宇¹, 温平镜¹, 王彦武¹, 赵鹏¹

1. 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西 南宁 530028;

2. 广西中医药大学卫生毒理学与卫生化学教研室, 广西 南宁 530200

摘要: **目的** 探讨缂丝水浓缩液对小鼠免疫功能的影响。 **方法** 分别以 1 000、500、250 mg/kg · BW 剂量的缂丝水浓缩液给小鼠连续灌胃 30 d 后, 检测小鼠的脾淋巴细胞增殖转化能力、迟发型变态反应、小鼠溶血素水平 (抗体积数) 和抗体生成细胞数 (溶血空斑数)、吞噬系统的碳廓清能力和吞噬鸡红细胞功能。 **结果** ①缂丝水浓缩液高、中、低剂量组小鼠迟发型变态反应左右耳片重量差值分别为 (16.0±2.4)、(15.9±3.0)、(14.3±2.6), 高于阴性对照组的 (12.2±4.0), 高、中剂量组与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); ②高、中、低剂量组小鼠血清抗体积数分别为 (163.4±12.0)、(150.4±13.4)、(148.4±14.2), 高于阴性对照组的 (141.6±11.5), 高剂量组与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。高、中、低剂量组小鼠溶血空斑数分别为 (217.4±26.4)、(178.2±41.5)、(169.6±32.5), 高于阴性对照组的 (162.4±38.2), 高剂量组与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); ③高、中、低剂量组小鼠腹腔巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬率 (%) 分别为 (28.2±4.57)、(26.6±2.50)、(24.7±2.36), 高于阴性对照组的 (23.3±3.40), 高、中剂量组与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。高、中、低剂量组吞噬鸡红细胞指数分别为 (0.625±0.134)、(0.584±0.059)、(0.529±0.068), 高于阴性对照组 (0.490±0.086), 高、中剂量组与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。 **结论** 缂丝水浓缩液在本实验条件下具有增强小鼠免疫功能的作用。

关键词: 缂丝水; 浓缩液; 免疫功能

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2019)06-0672-03 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.06.009

Experimental study on the effect of silkworm cocoon water extracts on immunomodulatory activity in mice

FU Wei-zhong¹, QIN Hui-yan¹, QIN Guang-qiu², ZHANG Jie-hong¹, LI Bin¹,
GAO Yu-qiu¹, YAO Si-yu¹, WEN Ping-jing¹, WANG Yan-wu¹, ZHAO Peng¹

1. Guangxi Zhuang Autonomous Regional Center for Disease Control and Prevention, Nanning, Guangxi 530028, China;

2. Department of Toxicology and Sanitary Chemistry, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530200, China

Corresponding authors: ZHAO Peng, E-mail: 1426081399@qq.com; QIN Guang-qiu, E-mail: qinguangqiu@sina.com

Abstract: **Objective** To explore the effect of silkworm cocoon water extracts (SCWEs) on immunomodulatory activity in mice.

Methods Mice were treated with SCWEs by gastric intubation for 30 successive days at daily dosages of 1,000, 500 and 250 mg/kg.BW respectively, and their proliferation ability, delayed-type-hypersensitivity reaction, the level of serum hemolysin and number of hemolytic plaque, the abilities of carbon particle clearance and phagocytizing chicken red blood cells were detected.

Results It was found that SCWE induced delayed-type-hypersensitivity in ears of mice. The differences in the average weight of ears in 1,000, 500 and 250 mg/kg treatment groups were (16.0±2.4), (15.9±3.0) and (14.3±2.6) respectively, which were higher than that of the negative control group (12.2±4.0). There were statistically significant differences in the average weight of ears between the negative control group and 1,000 and 500 mg/kg treatment groups ($P<0.05$). The average serum antibody counting in 1,000, 500 and 250 mg/kg treatment groups was (163.4±12.0), (150.4±13.4) and (148.4±14.2) respectively, which was higher than that of the negative control group ((141.6±11.5), $P<0.01$), with a statistically significant difference between 1,000 mg/kg treatment group and the negative control group ($P<0.05$). The average number of hemolytic plaque in 1,000, 500 and 250 mg/kg treatment groups was (217.4±26.4), (178.2±41.5) and (169.6±32.5) respectively, which was higher than that of the negative control group (162.4±38.2), with a statistically significant difference between 1,000 mg/kg treatment group and the negative control group ($P<0.05$). The ratios of peritoneal macrophage phagocytizing chicken red blood cells in 1,000, 500 and 250 mg/kg treatment groups were (28.2±4.57), (26.6±2.50) and (24.7±2.36) respectively, which were higher than that of the negative control group (23.3±3.40), with a statistically significant difference between the negative control group and 1,000 and 500 mg/kg treatment groups ($P<0.05$). The indexes of phagocytizing chicken red blood cells in 1,000, 500 and 250 mg/kg treatment groups were (0.625±0.134), (0.584±0.059) and (0.529±0.068) respectively, which were higher than that of the negative control group (0.490±0.086), with a statistically significant difference between the negative control group and 1,000 and 500 mg/kg treatment groups ($P<0.05$). **Conclusions** The results of this study suggest that SCWE has beneficial effects on immune function in mice under the conditions of the present study.

Key words: silkworm cocoon water; extract; immune function

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划 (桂科能 1598025-24); 广西中医药大学博士科研启动基金 (2018BS031)

作者简介: 傅伟忠 (1969-), 男, 主管技师, 研究方向: 保健食品毒理和功能检测。

通信作者: 赵鹏, E-mail: 1426081399@qq.com; 覃光球, E-mail: qinguangqiu@sina.com。

蚕茧是蚕蛾科昆虫家蚕蛾的茧壳,性甘、温,无毒,具有止血、止渴、解毒的功效。有研究发现对蚕茧进行水解处理后,其水解物具有抗氧化^[1]、抗肿瘤^[2]、降血糖等功效^[3]。本文旨在探讨模拟传统缫丝工艺用蚕茧制备的缫丝水浓缩液对小鼠免疫功能有无影响,为其开发利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及预处理 试验用蚕茧原料为商业干蚕茧。试验前模拟缫丝水产生过程进行样品处理:手工去除蚕蛹后,取 100 g 加水至 3 L,浸泡 0.5 h 后小火煮沸 1 h,用纱布过滤得滤液。以同样方法重复提取一次,最后将两次的液体合并,旋转蒸发仪减压浓缩至 1 000 ml,得到 0.1 g/ml 浓缩液。浓缩液置-20 ℃冰箱保存,临用前再用纯水配制。根据需要,在实验前和实验过程中,按此方法进行多次样品提取处理,以保证提取液的新鲜度。

1.2 实验动物及饲料 SPF 级健康昆明种雌性小鼠 200 只,体重为 18~22 g,由广东省医学实验动物中心繁殖,实验动物生产许可证号:SCXK 粤 2013-0002,实验动物质量合格证号:4400720004192。动物饲料由广东医学实验动物生产,生产许可证号:SCXK(粤)2013-0002,合格证编号:44200300014110。

1.3 实验动物房环境条件 动物实验在广西壮族自治区疾病预防控制中心清洁动物房进行。动物房为屏障系统,使用许可证号:SYXK(桂)2016-0002。动物实验室温度:22 ℃~25 ℃,相对湿度:55%~70%。动物试验经过广西疾病预防控制中心伦理审查委员会认可。

1.4 剂量选择与受试物给予方式 实验设 1 000、500、250 mg/kg·BW 三个剂量组和一个阴性对照组,

每组 10 只动物。分别量取蚕茧提取浓缩液 50.0、25.0、12.5 ml,各加纯水至 100 ml,配成 50.0%、25.0%、12.5%浓度混悬液,分别给予相应剂量组动物灌胃,灌胃体积为 0.2 ml/10 g·BW,阴性对照组予以等体积的纯水,每天灌胃一次,连续灌胃 30 d。

1.5 主要仪器与试剂 实验仪器主要有半自动生化分析仪、酶标仪等。实验试剂主要包括 RPMI1640 培养液、小牛血清、青霉素、链霉素、ConA、MTT、Hank's 液、PBS 缓冲液、DNFB、丙酮、补体(豚鼠血清)、SA 缓冲液、琼脂糖、绵羊红细胞(SRBC)、印度墨汁、鸡红细胞、Gimsa 染液等。

1.6 实验方法 实验主要参照《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)中增强免疫力功能的检验方法^[4]。将受试小鼠随机分为 5 大组,每大组分为 4 个小组,每组 10 只,进行如下实验:I 组,进行 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验;II 组,进行迟发型变态反应实验;III 组,进行脏/体比值测定、血清溶血素测定和抗体生成细胞数测定;IV 组,进行碳廓清实验;V 组,进行小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验。

1.7 实验数据统计 应用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析统计处理,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,多组间样本均数比较采用方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 样品对小鼠体重、胸腺、脾脏重量的影响 实验期间各剂量组小鼠的体重、增重、胸腺体重比和脾脏体重比与阴性对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),表明该样品对小鼠的体重和免疫器官无明显影响,见表 1。

表 1 缫丝水浓缩液对小鼠体重、脏器/体重比值的影响($n=10,\bar{x}\pm s$)

剂量组(mg/kg·BW)	初始体重(g)	末期体重(g)	增重(g)	胸腺/体重(%)	脾脏/体重(%)
1 000	19.8±0.9	37.1±1.2	17.3±0.7	0.209±0.025	0.402±0.030
500	19.7±1.1	36.8±2.5	17.1±1.6	0.218±0.026	0.419±0.015
250	19.8±0.9	36.2±1.8	16.4±1.3	0.212±0.022	0.403±0.049
阴性对照组	19.6±0.8	36.7±1.7	17.0±1.3	0.215±0.025	0.414±0.024
<i>F</i> 值	0.043	0.383	0.827	0.225	0.651
<i>P</i> 值	0.988	0.766	0.488	0.878	0.588

表 2 小鼠细胞免疫的实验结果($n=10,\bar{x}\pm s$)

剂量组(mg/kg·BW)	左右耳片重量差值(mg)	脾淋巴细胞增殖能力(OD 值)
1 000	16.0±2.4 *	0.266±0.078
500	15.9±3.0 *	0.234±0.065
250	14.3±2.6	0.232±0.067
阴性对照	12.2±4.0	0.217±0.070
<i>F</i> 值	3.407	0.850
<i>P</i> 值	0.028	0.476

注: * 与阴性对照组比较, $P<0.05$ 。

2.2 样品对小鼠细胞免疫的影响 各剂量组脾淋巴细胞转化能力(OD)值与阴性对照组比较均无统计学意义($P>0.05$);但高、中剂量组的左右耳片重量差值均高于阴性对照组($P<0.05$),表明缫丝水浓缩液具有促进小鼠的迟发型变态反应作用,见表 2。

2.3 样品对小鼠体液免疫的影响 高剂量组的溶血空斑数和抗体积数均高于阴性对照组($P<0.01$),表明

缬丝水浓缩液具有促进小鼠抗体生成细胞增殖及提高小鼠血清溶血素水平的作用,见表 3。

表 3 小鼠体液免疫的实验结果 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

剂量组 (mg/kg · BW)	抗体积数	溶血空斑数 (1×10 ⁶ 脾细胞)
1 000	163. 4±12. 0 [#]	217. 4±26. 4 [#]
500	150. 4±13. 4	178. 2±41. 5
250	148. 4±14. 2	169. 6±32. 5
阴性对照	141. 6±11. 5	162. 4±38. 2
F 值	5. 054	4. 874
P 值	0.005	0. 006

注: #与阴性对照组比较, $P<0. 01$ 。

2. 4 样品对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响

各剂量组的碳廓清吞噬指数与阴性对照组比较均无统计学意义 ($P>0. 05$); 但高、中剂量组小鼠腹腔巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬率及吞噬指数均高于阴性对照组 ($P<0. 05$ 或 $P<0. 01$), 表明样品具有提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬作用, 见表 4。

表 4 小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能实验结果 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

剂量组 (mg/kg · BW)	吞噬率 (%)	吞噬指数	碳廓清指数
1 000	28. 2±4. 57 [#]	0. 625±0. 134 [#]	8. 54±2. 09
500	26. 6±2. 50 [*]	0. 584±0. 059 [*]	8. 16±1. 60
250	24. 7±2. 36	0. 529±0. 068	7. 60±1. 52
阴性对照	23. 3±3. 40	0. 490±0. 086	7. 86±1. 92
F 值	4. 165	4. 165	1. 244
P 值	0. 012	0. 012	0. 308

注: * 与阴性对照组比较, $P<0. 05$; #与阴性对照组比较, $P<0. 01$ 。

3 讨 论

机体免疫系统是由非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫共同构成的防御系统。免疫调节指免疫系统中的免疫细胞和免疫分子之间, 以及与其它系统之间的相互作用, 使得免疫应答以最恰当的形式使机体维持在最适当的水平。针对病原微生物侵袭和体内细胞变异, 体液免疫和细胞免疫通过形成抗体或产生细胞因子等方式产生各种生物学效应^[5]。单核-巨噬细胞的吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的重要指标之^[6]。本次动物实验研究结果显示, 缬丝水浓缩液能增强小鼠迟发型变态反应, 促进抗体生成细胞增殖, 提高血清溶血素水平, 促进小鼠的腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力, 表明缬丝水浓缩液能提高小鼠的细胞免疫、体液免疫, 增强巨噬细胞的吞噬能力, 提示缬丝水浓缩液具有提高小鼠免疫力的作用。

现代研究表明, 蚕茧主要是由纤维状蛋白质丝纤蛋白, 外包以另一种蛋白质丝胶蛋白粘结而成。在生丝中, 丝纤蛋白约占 70%, 丝胶蛋白约占 22%。丝纤蛋白是一种角蛋白, 其组成以甘氨酸、丙氨酸为主。而组成丝胶蛋白的 18 种氨基酸中, 丝氨酸、天冬氨酸、苏氨酸等极性氨基酸 (富含羟基、氨基和羧基) 的含量超过 70%, 赋予丝胶蛋白良好的水溶性^[7]。不同的水提

方法对样品的增强免疫力功能试验结果有很大的影响^[8], 本试验采用的是模拟传统缬丝水产生过程进行样品处理并浓缩的水提方式, 我们经过多次理化分析试验证实该方法能够水解提取的多种氨基酸含量较高。氨基酸是构成免疫球蛋白和免疫分子基本单元, 在增强免疫应答和人体抗病毒感染过程中起着重要作用, 缺乏必需氨基酸则减低体液的免疫反应。必需氨基酸在免疫反应中起着重要的作用。例如, 有研究表明色氨酸缺乏的大鼠, 其 IgG 及 IgM 受体抑制, 而当重新加入色氨酸后就能维持正常的抗体生成; 苯丙氨酸和酪氨酸均缺乏则抑制大鼠的免疫细胞对肿瘤细胞作出反应; 蛋氨酸与胱氨酸的缺乏, 可引起抗体的合成障碍^[9-10]。螺旋藻类保健品的增强免疫力功能也被认为以必须氨基酸的补充有关^[11]。刘建亭等^[12]研究发现, 家蚕茧壳水解物能促进正常小鼠的免疫器官质量增加, 对小鼠的细胞免疫和非特异性免疫功能也有明显的促进作用。王晶晶等^[13]研究表明, 家蚕茧壳水解物能够增强小鼠的细胞免疫功能。还有研究发现蚕茧的水解物有抗氧化、抗肿瘤、降血糖、维护肝功能等多种功效, 皆与增强免疫有直接或间接的相互关系^[1-3]。蚕茧提取液中的氨基酸可能在调节小鼠免疫功能的过程中发挥了重要的作用, 其作用机理有待进一步研究。

参考文献

[1] 范金波, 任发政, 孙雁, 等. 丝胶蛋白抗氧化肽的酶法制备及功能评价[J]. 农业工程学报, 2009, 24(11): 279-283.

[2] Chon JW, Lee KG, Yeo JH. Effect of silk fibroin hydrolysate on the apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells [J]. Int J Indust Entomol, 2013, 27(2): 228-236.

[3] Park JH, Jung H, Nam H, et al. Silk fibroin hydrolysate ameliorates diabetic dyslipidemia in type 2 diabetic model mice [J]. Anim Cell Syst, 2013, 17(5): 325-330.

[4] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[Z]. 2003.

[5] 李立, 王宁, 张桂霞, 等. 蛋白质粉对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(3): 54-56.

[6] 龚非力. 医学免疫学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2004: 171-174.

[7] Takasu Y, Yamada H, Tamura T, et al. Identification and characterization of a novel sericin gene expressed in the anterior middle silk gland of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2007, 37: 1234-1240.

[8] 周秀萍, 李争鸣, 刘志杰, 等. 不同方法制备金银花水提液对大鼠免疫功能影响的研究[J]. 实用预防医学, 2011, 18(11): 2052-2054.

[9] Wang X, Qiao SY, Liu M, et al. Effects of graded levels of true ileal digestible threonine on performance, serum parameters and immune function of 10-25 kg pigs [J]. Anim Feed Sci Tech, 2006, 129: 264-278.

[10] 王斌. 食品中的免疫调节功能因子研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2009, 31(1): 70-73.

[11] 周月婵, 胡怡秀, 马征, 等. 螺旋藻干粉制剂辅助降血脂和调节免疫力功能动物实验研究[J]. 实用预防医学, 2006, 13(2): 300-303.

[12] 刘建亭, 王玉霞, 周晓潮, 等. 家蚕茧壳水解物对小鼠免疫功能的影响[J]. 蚕业科学, 2015, 41(1): 145-150.

[13] 王晶晶, 张泽峰, 邓红梅, 等. 家蚕茧壳水解物对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 特产研究, 2016, 38(1): 1-4.