

非变性 I 型胶原蛋白对免疫低下大鼠 免疫功能的调节作用

谢金莉¹, 杜丽晶^{2,3}, 王超跃¹, 王乐琪^{2,4}, 叶春婷^{1*}, 严诗楷³, 肖雪⁴, 李莎莎^{2*}

(1. 广州创尔生物技术股份有限公司, 广东广州 510663) (2. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东广州 510006)
(3. 上海交通大学药学院, 上海 200240) (4. 广东药科大学中医药研究院, 广东广州 510006)

摘要: 该研究旨在观察非变性 I 型胶原蛋白 (Non-denatured type-I collagen, NDC-I) 对免疫低下模型大鼠免疫功能的调节作用。动物实验采用腹腔注射环磷酰胺法建立免疫低下大鼠模型, 观察 NDC-I 对大鼠的胸腺指数和脾脏指数, 白细胞计数和分类, 血清中免疫球蛋白 A (IgA)、免疫球蛋白 G (IgG)、白介素-2 (IL-2)、白介素-4 (IL-4)、白介素-10 (IL-10)、干扰素- γ (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 脾脏和胸腺的乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和组织形态学变化。结果显示, 在给予 NDC-I 干预 30 d 后, 与模型组比较, NDC-I 组胸腺指数上升 ($p < 0.05$), 白细胞计数显著提高 ($p < 0.01$), 血清中 IgA、IgG、IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ 和 TNF- α 含量为 43.32 $\mu\text{g/mL}$ 、283.32 $\mu\text{g/mL}$ 、1827.17 ng/L 、135.97 pg/mL 、113.87 ng/L 、2302.44 pg/mL 、469.91 ng/L , 水平显著升高 ($p < 0.01$), 脾脏中 LDH 活性显著上升 ($p < 0.01$), 脾脏和胸腺组织病理学损伤减轻。结果证明, NDC-I 对环磷酰胺致免疫低下大鼠的免疫功能具有一定的调节作用, 也为胶原蛋白等相关功能产品的综合开发与充分利用提供了参考依据。

关键词: 非变性 I 型胶原蛋白; 免疫调节; 环磷酰胺

文章编号: 1673-9078(2022)06-66-73

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.6.0845

Immune-regulatory Effect of Non-denatured type-I Collagen on the Immune Function in Immunocompromised Rats

XIE Jinli¹, DU Lijing^{2,3}, WANG Chaoyue¹, WANG Leqi^{2,4}, YE Chunting^{1*}, YAN Shikai³, XIAO Xue⁴, LI Shasha^{2*}

(1. Guangzhou Trauer Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou 510663, China)

(2. The Second Clinical Collage, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

(3. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(4. Chinese Medicine Research Institute, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: To investigate the regulatory effect of non-denatured type-I collagen (NDC-I) on the immune function in immunocompromised rats, the immunocompromised model was established by intraperitoneal injection of cyclophosphamide in animal experiments. The thymus index, spleen index, white blood cell count and classification, IgA (immunoglobulin A) level, IgG (immunoglobulin G) level, IL-2 (interleukin-2) level, IL-4 (interleukin-4) level, IL-10 (interleukin-10) level, IFN- γ (interferon-gamma) level, TNF- α (tumor necrosis factor- α) level, activity of lactate dehydrogenase (LDH) in spleen and thymus, as well as histomorphological changes of spleen and thymus, were examined. The results showed compared with the model group, a 30-day NDC-I intervention led to significant increases in the thymus index ($p < 0.05$) and white blood cell count ($p < 0.01$) of the NDC-I treated group, causing significant increases ($p < 0.01$) in their levels of serum IgA, IgG, IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ

引文格式:

谢金莉, 杜丽晶, 王超跃, 等. 非变性 I 型胶原蛋白对免疫低下大鼠免疫功能的调节作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(6): 66-73

XIE Jinli, DU Lijing, WANG Chaoyue, et al. Immune-regulatory effect of non-denatured type-I collagen on the immune function in immunocompromised rats [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(6): 66-73

收稿日期: 2021-08-04

基金项目: 广州创尔生物技术股份有限公司科研攻关项目 (RD202006)

作者简介: 谢金莉 (1994-), 女, 硕士, 研究方向: 食品科学, E-mail: xiejinli@trauer.com.cn

通讯作者: 叶春婷 (1968-), 女, 博士, 主任医学检验师, 研究方向: 生物材料与免疫学, E-mail: yechunting@trauer.com.cn; 共同通讯作者: 李莎莎 (1983-),

女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中医药系统生物学, E-mail: happylishasha@163.com

and TNF- α (as 43.32 $\mu\text{g/mL}$, 283.32 $\mu\text{g/mL}$, 1827.17 ng/L , 135.97 pg/mL , 113.87 ng/L , 2302.44 pg/mL and 469.91 ng/L , respectively), and the activity of LDH in spleen. In addition, the histopathological damages of the spleen and thymus werereduced. The obtained results revealed that the NDC-I treatment showed a regulatory effect on the immune function of cyclophosphamide-induced immunocompromised rats. This research also provides a reference for the comprehensive development and full utilization of collagen and other related functional products.

Key words: non-denatured type I collagen; immunoregulation; cyclophosphamide

胶原蛋白是动物体内含量最丰富的蛋白质, 约占动物机体总蛋白含量的 30%^[1], 它是所有结缔组织(即皮肤、骨骼、韧带、肌腱和软骨)和实质器官的间质组织的细胞外基质的主要蛋白之一, 为组织提供机械强度和生理功能^[2]。目前, 胶原蛋白主要分类有 28 种, 其中 I 型胶原蛋白在哺乳动物和人体内的含量最高, 约占胶原总量的 70%^[3,4]。非变性 I 型胶原蛋白(non-denatured type-I collagen, NDC-I) 是保留有独特的三螺旋结构的胶原蛋白, 由 3 条肽链组成, 每条肽链约含 1050 个氨基酸残基, 其中三螺旋区由 (Gly-x-y)_n 重复序列组成, x 常为脯氨酸, y 常为羟脯氨酸或羟赖氨酸^[5]。NDC-I 多采用酸-酶结合法进行提取, 来源主要有牛、猪和鱼等^[6-8]。不同物种来源的 NDC-I 三螺旋区的氨基酸序列具有较高的同源性, 非螺旋部分有所差异^[9,10]。目前, NDC-I 多应用于医疗和化妆品领域, 具有止血、修复、保湿、促进细胞黏附和增殖等功效^[11-13]。

免疫能力低下是一种由于免疫系统遭到攻击和破坏, 机体出现的暂时性或永久性免疫功能障碍的状态, 极大地危害人类身体健康。因此, 通过一些有效的预防或治疗措施, 提高机体免疫力, 增强机体的免疫功能, 是目前相关科研人员和医务工作者面临的重大课题。研究发现, 胶原蛋白能够调节机体免疫活性^[14,15]、促进伤口愈合^[16]、改善关节炎^[17]、缓解骨质疏松^[18]等。其中 NDC-I 作为胶原蛋白的重要类型之一, 对机体免疫调节具有一定的作用, 但是关于 NDC-I 对机体免疫功能的调控作用缺乏系统研究, 且相关报道较少。

环磷酰胺是临床上常用的一种化疗药物, 用于抑制肿瘤细胞的生长。但其对正常细胞有一些毒副作用, 能通过杀伤免疫细胞从而影响免疫的各个阶段。因此, 在免疫毒理学的研究中, 环磷酰胺被广泛应用于制备动物免疫抑制模型^[19,20]。本实验采用环磷酰胺诱导的免疫低下大鼠模型, 通过多个免疫学指标评估 NDC-I 对大鼠免疫功能的调节作用, 探究其增强免疫力的作用。为今后 NDC-I 的免疫活性研究提供参考, 对充分利用胶原蛋白开发相关保健食品或功能性食品具有重要意义。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只, 体质量 180~200 g, 由广东省医学实验动物中心提供, 实验单位使用许可证编号: SYXK(粤)2017-0125, 许可证号: SCXK(粤)2018-0002。实验动物均于 SPF 级屏障环境动物房饲养, 温度: 20~25 $^{\circ}\text{C}$, 湿度: 50%~70%。

1.1.2 药品与试剂

脾氨肽口服冻干粉(Spleen Aminopeptide Oral Lyophilized Powder, SA), 购于大连百利天华制药有限公司。注射用环磷酰胺, 购于 Baxter Oncology GmbH。异氟烷, 购于瑞沃德生命科技有限公司。生理盐水购于广东科伦药业有限公司。免疫球蛋白 A (Immunoglobulin A, IgA)、免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG)、白介素-2 (Interleukin-2, IL-2)、白介素-4 (Interleukin-4, IL-4)、白介素-10 (Interleukin-10, IL-10)、干扰素- γ (Interferon-gamma, IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 含量测定试剂盒购于上海酶联生物科技有限公司。NDC-I (平均分子量 300 ku, 纯度 \geq 90%) 从牛筋腱中提取制备, 具有完整三股螺旋结构, 由广州创尔生物技术股份有限公司提供。

1.1.3 仪器与设备

ZCS 电子天平, 东莞市怡雪电子有限公司; SC3610 型低速离心机, 科大创新股份有限公司中佳分公司; RT-6100 型酶标分析仪, 美国伯腾仪器有限公司; R620IP 型麻醉机, 瑞沃德生命科技有限公司; Sysmex XN-1000V[B]全自动血液分析仪, 日本希森美康公司。

1.2 方法

1.2.1 给药方法和免疫低下造模的构建

SPF 级大鼠 36 只, 实验环境下适应性喂养 7 d。按体质量随机分为 4 组, 每组 9 只, 分别为: NDC-I 组[灌胃 10.0 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 非变性大分子胶原]、SA 组[阳性对照组, 灌胃 0.42 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 脾氨肽, 人用量等效剂量 6.3 倍]、MC 组(模型对照组, 灌胃等体积蒸馏水)、

NC 组（正常对照组，灌胃等体积蒸馏水）。连续灌胃 30 d，每天 1 次。

在实验的第 24 天和第 25 天，除 NC 组，给予等量生理盐水腹腔注射外，其它各组给予环磷酰胺[40 mg/(kg·d)]腹腔注射，共 2 次。实验第 30 天取材，进行指标检测。实验期间大鼠自由饮水摄食。

1.2.2 白细胞计数、分类和血清中免疫活性物质测定

异氟烷麻醉后，SD 大鼠经腹主动脉取血，EDTA 管收集血液，使用血细胞分析仪检测白细胞计数和白细胞分类。促凝管收集血液，静置 2 h 后，3000 r/min 离心 10 min，取上清液测定血清中 IgA、IgG、IL-2、IL-4、IL-10、 γ -IFN、TNF- α 含量，具体操作按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.2.3 胸腺和脾脏指数、LDH 活性和组织形态观察

大鼠处理前称体质量，解剖后取脾脏和胸腺，迅速用 PBS 缓冲液多次漂洗干净，滤纸吸干，分别称脏器质量。脏器指数为脏器质量与大鼠体质量的比值^[21]。称取 200 mg 组织，匀浆后取上清，按照 ELISA 试剂盒说明书方法进行 LDH 活性检测。剩余脾脏和胸腺组织切块，置于 4% 多聚甲醛溶液常温固定后进行石蜡包埋、切片和苏木精-伊红染色，镜下观察组织病理变化。

1.2.4 统计学分析

实验数据采用 IBM SPSS Statistics 25.0 进行数据处理，计量数据资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示；两组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用 ANOVA 方差分析， $p < 0.05$ 表示具有统计学差异， $p < 0.01$ 表示具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 NDC-I 对体重和免疫器官指数的影响

脾脏和胸腺是机体重要的免疫器官。胸腺是 T 淋巴细胞分化和成熟的中枢免疫器官，可接受抗原刺激，产生免疫应答。脾脏是机体最大的免疫器官，含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞，是机体细胞免疫和体液免疫的中心。当机体接受抗原刺激后，T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞数目增多，相应细胞区体积扩大，免疫器官的体积和重量也随之增大^[22-24]。由表 1 和表 2 可知，NDC-I 干预前（实验第 0 天）至造模前（实验第 24 天）各组之间体重无显著性差异（ $p > 0.05$ ）。腹腔注射环磷酰胺后（实验第 30 d），模型组体重显著降低（ $p < 0.05$ ），并且胸腺指数和脾脏指数也显著下降（ $p < 0.01$ ）；与模型组比较，阳性对照组和 NDC-I 组大鼠的体重无显著差异，阳性对照组的胸腺指数和脾脏指数略有升高，差异不显著（ $p > 0.05$ ），NDC-I 组胸腺指数上升（ $p < 0.05$ ），脾脏指数具有升高趋势（ $p > 0.05$ ）。结果表明，经环磷酰胺诱导的免疫低下模型大鼠体重、胸腺指数和脾脏指数显著降低，NDC-I 对大鼠胸腺损伤具有一定的修护作用。

2.2 NDC-I 对白细胞计数和分类的影响

白细胞计数也可以在一定程度上反映机体非特异性免疫水平。腹腔注射环磷酰胺后，模型组白细胞计数、淋巴细胞绝对值、单核细胞绝对值、嗜酸粒细胞绝对值、嗜酸粒细胞百分数、嗜碱粒细胞绝对值和嗜碱粒细胞百分数显著下降（ $p < 0.01$ ），中性粒细胞绝对值和单核细胞百分数下降（ $p < 0.05$ ），说明环磷酰胺破坏了免疫系统，引起了机体免疫功能低下。与模型组比较，NDC-I 组在预防性干预后白细胞计数显著上升（ $p < 0.01$ ），且效果优于阳性对照组。

表 1 NDC-I 对免疫低下大鼠体重变化的影响（ $\bar{x} \pm s$, n=9）

Table 1 Effect of NDC-I on weight change of immunocompromised rats

组别	体重/g		
	干预前（第 0 d）	造模前（第 24 d）	干预后（第 30 d）
对照组	197.73±9.56	365.68±38.38	358.60±28.65
模型组	200.14±10.37	344.72±30.07	318.99±30.61 [#]
阳性对照组	197.28±6.97	368.50±29.08	341.11±28.67
非变性 I 型胶原组	194.63±7.63	368.54±17.48	339.29±23.01

注：与对照组比较，[#] $p < 0.05$ ，^{##} $p < 0.01$ ；与模型组比较，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ；下同。

表 2 NDC-I 对大鼠免疫器官指数的影响（ $\bar{x} \pm s$, n=9）

Table 2 Effects of NDC-I on immune organic index of rats

脏器	对照组	模型组	阳性对照组	非变性 I 型胶原组
脾脏	23.05±2.58	13.45±1.69 ^{##}	14.46±2.57 ^{##}	12.23±1.28 ^{##}
胸腺	16.73±3.54	4.08±0.69 ^{##}	4.57±1.01 ^{##}	5.24±0.89 ^{##*}

表3 NDC-I 对大鼠白细胞计数和分类的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$, $10^9/L$)

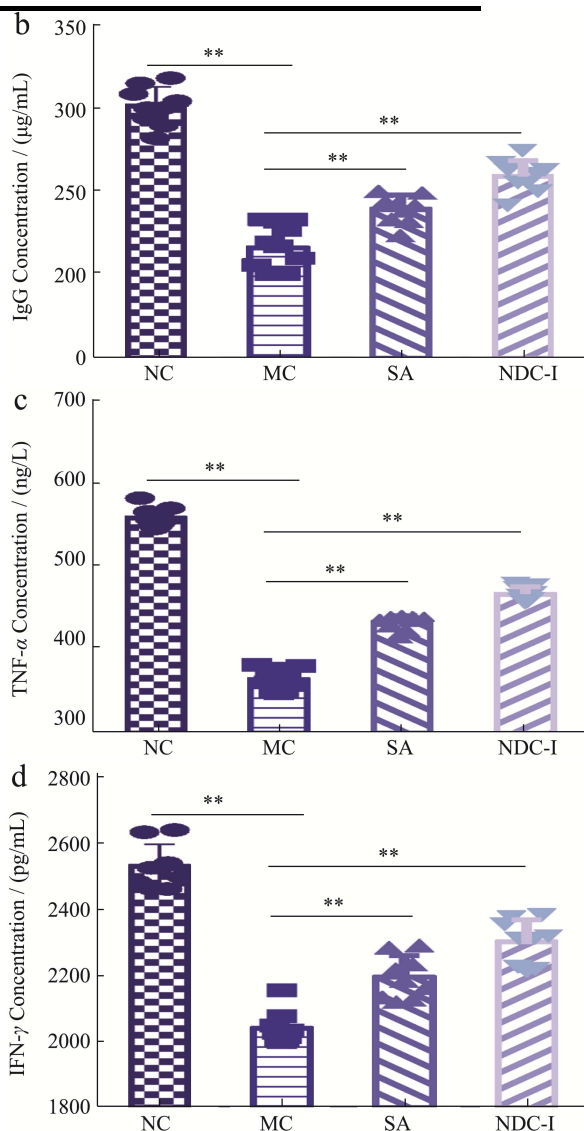
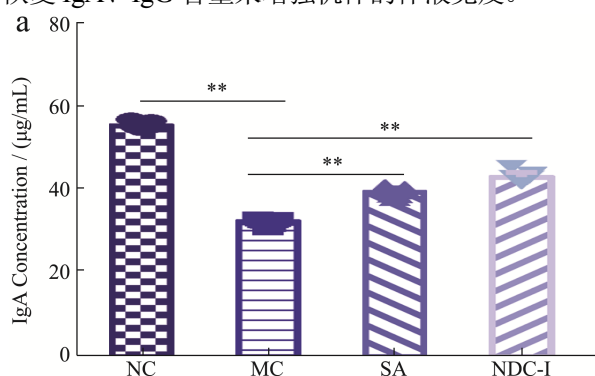
Table 3 Effects of NDC-I on white blood cell count and classification of rats

项目	对照组	模型组	阳性对照组	非变性 I 型胶原组
白细胞计数	6.44±1.92	0.19±0.04 ^{##}	0.35±0.18 ^{##*}	0.45±0.20 ^{##**}
淋巴细胞绝对值	6.43±3.16	0.21±0.17 ^{##}	0.29±0.15 ^{##}	0.32±0.20 ^{##}
单核细胞绝对值	0.59±0.36	0.08±0.08 ^{##}	0.07±0.09 ^{##}	0.08±0.07 ^{##}
中性粒细胞绝对值	2.21±2.11	0.07±0.11 [#]	0.06±0.07 ^{##}	0.12±0.09 ^{##}
嗜酸粒细胞绝对值	0.12±0.07	0.00±0.00 ^{##}	0.00±0.00 ^{##}	0.00±0.01 ^{##}
嗜碱粒细胞绝对值	0.03±0.02	0.00±0.00 ^{##}	0.00±0.00 ^{##}	0.00±0.01 ^{##}
淋巴细胞百分数/%	70.41±8.10	62.64±20.52	72.54±15.64	63.71±17.99
单核细胞百分数/%	6.38±1.91	22.47±17.89 [#]	15.13±8.77 [#]	15.07±11.15 [#]
中性粒细胞百分数/%	21.62±8.19	14.66±11.51	11.29±8.56 [#]	20.28±9.08
嗜酸粒细胞百分数/%	1.31±0.44	0.23±0.46 ^{##}	0.36±0.75 ^{##}	0.44±0.70 ^{##}
嗜碱粒细胞百分数/%	0.28±0.11	0.00±0.00 ^{##}	0.68±1.66	0.50±0.79

2.3 NDC-I 对血清中免疫活性物质的影响

血清中的免疫球蛋白的含量和辅助性 T 细胞 (Th 细胞) 分泌的细胞因子水平可以反映机体的体液免疫功能状态^[25,26], 因此在本次实验中, 选取血清中的 IgA、IgG、IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 和 IFN- γ 等 7 种免疫活性物质, 作为反映机体免疫状态的指标。

IgG 是人血清中含量最丰富的蛋白质之一, 是体液免疫的主要抗体, 约占血清免疫球蛋白总量的 80%; 而 IgA 源于肠系膜淋巴组织中的浆细胞, 它主要进行局部免疫, 其含量仅次于 IgG, 约占血清免疫球蛋白总量的 10~20%^[27]。模型组 IgA、IgG 的含量显著低于对照组 ($p<0.01$); 经过 NDC-I 预防性干预后, NDC-I 组 IgA、IgG 的含量接近对照组且显著高于模型组 ($p<0.01$), 效果优于阳性对照组 (图 1a、图 1b)。本研究中, 模型组大鼠血清 IgA、IgG 含量降低, 并在 NDC-I 预防性干预后得到恢复。提示 NDC-I 可能通过恢复 IgA、IgG 含量来增强机体的体液免疫。



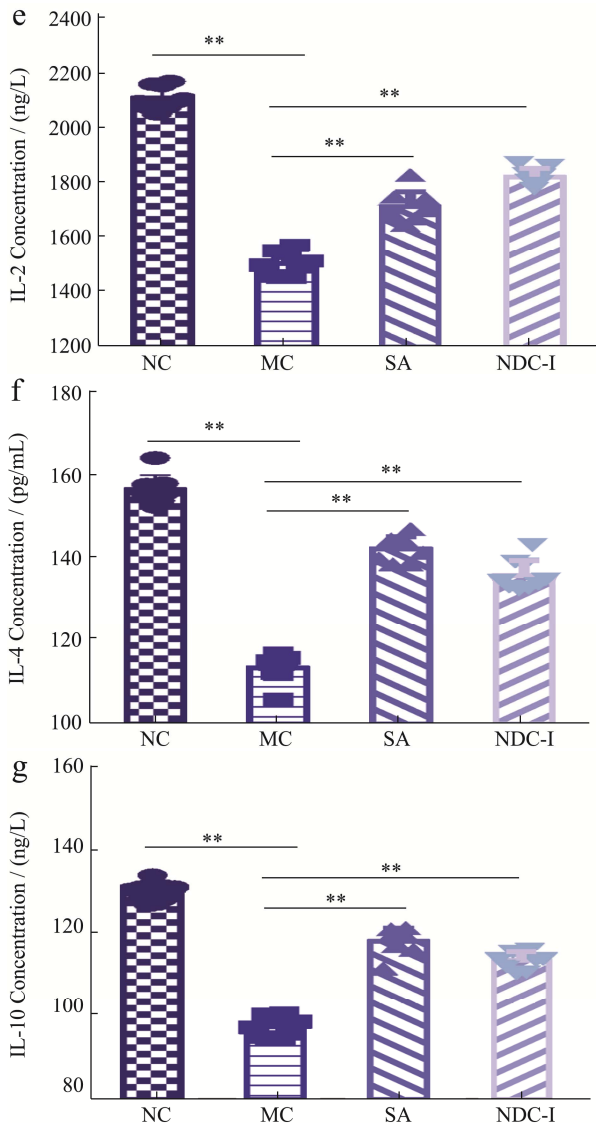


图1 NDC-I 对大鼠免疫活性物质的影响

Fig.1 Effects of NDC-I on immunologic active material of rats

众所周知，环磷酰胺是一种使用广泛的细胞毒性药物，普遍应用于肿瘤的治疗中，可对骨髓的功能产生抑制作用，通过抑制免疫器官的功能并造成体重下降，使白细胞数量降低，其代谢产物通过交联作用使DNA和蛋白质烷基化，从而产生免疫功能的抑制[28,29]。Th细胞是重要的免疫调节细胞，根据细胞因子和功能的不同，分为Th0、Th1、Th2和Th3亚群，而Th1和Th2细胞及其分泌的细胞因子决定了免疫系统的功能。其中，Th1细胞主要分泌IL-2、IFN- γ 等I类细胞因子，参与细胞免疫应答[30,31]，IFN- γ 是特异性免疫的调节剂，能诱导Th0型细胞分化成Th1型细胞，并且能激活巨噬细胞、细胞毒性T细胞和清除胞内病原体[32]。而Th2细胞主要分泌IL-4、IL-10等II类细胞因子，在介导体液免疫应答方面发挥着重要作用[33]。同时，TNF- α 作为主要的免疫调节因子，不仅能够启动免疫调节、促进免疫细胞的活性，还具有抗恶

性肿瘤、抗病毒、凝血和造血等多种重要的生物学作用[34]。结果显示，模型组中TNF- α 、INF- γ 、IL-2、IL-4和IL-10含量均显著低于对照组($p < 0.01$)。经过NDC-I预防性干预后，NDC-I组TNF- α 、INF- γ 、IL-2、IL-4和IL-10的含量显著高于模型组($p < 0.01$) (图1c~1g)。前期文献报道，环磷酰胺可导致大鼠免疫球蛋白和Th细胞分泌的细胞因子水平显著降低，而NDC-I不仅可提高机体内免疫球蛋白的含量，而且可以显著提高免疫低下大鼠血清中细胞因子(TNF- α 、IL-2、INF- γ 、IL-4、IL-10)水平，推测NDC-I可能通过影响细胞因子的分泌，维持Th1/Th2的平衡，进而达到改善机体的免疫功能的作用。

2.4 NDC-I对脾脏和胸腺中LDH活性的影响

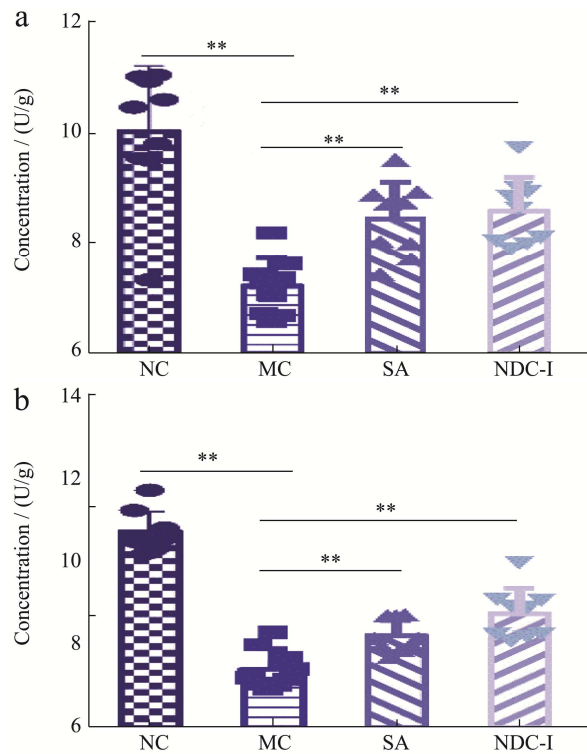


图2 NDC-I 对大鼠LDH活性的影响

Fig.2 Effects of NDC-I on LDH activity of rats

注：a：脾脏中的LDH活性；b：胸腺中的LDH活性。

LDH是巨噬细胞活力的标志酶之一，其活性反映了巨噬细胞的活化能力和非特异性免疫水平[35]。实验结果显示，模型组脾脏和胸腺中LDH的活性均显著低于对照组($p < 0.01$)；经NDC-I干预结束后，NDC-I组脾脏和胸腺中LDH的活性均显著高于模型组($p < 0.01$)。LDH活性不仅直接影响细胞内糖酵解释放能量的速率，而且在催化糖酵解的过程中会产生大量的乳酸，从而引起巨噬细胞胞内pH值下降，有利于巨噬细胞胞内免疫活性物质和免疫功能的应答[36]。环磷酰胺显著降低了胸腺和脾脏中的LDH活性，而

摄入 NDC-I 使得 LDH 活性显著提高,说明 NDC-I 能够减轻环磷酰胺对 LDH 活性的抑制作用,提高巨噬细胞活力。

2.5 NDC-I 对脾脏和胸腺组织形态学的影响

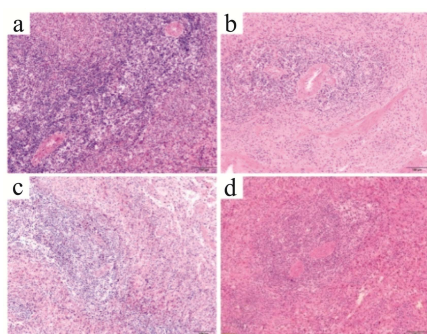


图3 NDC-I 对大鼠脾脏病理损伤的影响(×100)

Fig.3 Effect of NDC-I on pathological injury of spleen tissue in rats

注: a: 对照组; b: 模型组; c: 阳性对照组; d: NDC-I 组。下图同。

脾实质是由白髓、红髓组成。由图3可以看出,对照组(图3a)的脾脏结构完整,红髓、白髓分界清晰,二者比例正常,淋巴小结较大,淋巴细胞排列紧密。模型组(图3b)脾脏白髓面积下降,红髓面积增加,淋巴小结减小,淋巴细胞数量明显下降,说明脾脏发生损伤。SA组(图3c)和NDC-I组(图3d)大鼠脾脏的白髓面积有所提高,红髓和白髓分界更加清晰,淋巴细胞数量明显增加,其病理损伤有所减轻。以上结果说明,NDC-I在一定程度上能够恢复环磷酰胺导致的脾脏损伤,对免疫器官有较为明显的修护作用。

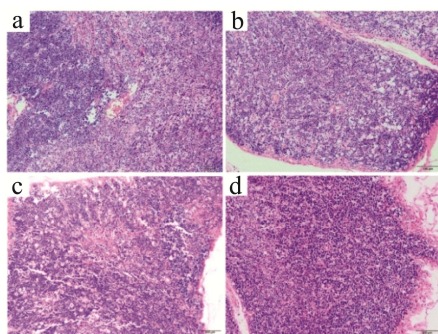


图4 NDC-I 对大鼠胸腺病理损伤的影响(×100)

Fig.4 Effect of NDC-I on pathological injury of thymus tissue in rats

胸腺小叶是由皮质、髓质组成。由图4可以看出,对照组(图4a)胸腺形态清晰,状态良好,淋巴细胞排列紧密。模型组(图4b)胸腺淋巴细胞排列变得疏松,密度下降,说明胸腺免疫功能下降。SA组(图4c)和NDC-I组(图4d)均能提高淋巴细胞数量,淋

巴细胞分布更加紧密,一定程度上改善了病理性损伤。说明 NDC-I 在一定程度上能够恢复环磷酰胺导致的胸腺萎缩,对免疫器官有较为明显的修护作用。

脾脏和胸腺是机体主要的2个免疫器官,脾脏是机体细胞免疫和体液免疫的中心,含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞。胸腺是T淋巴细胞分化和成熟的场所,通过接受抗原刺激产生免疫应答,胸腺和脾脏指数能够反映机体的免疫功能。在本实验中NDC-I使环磷酰胺所致的胸腺及脾脏指数明显升高;同时,组织形态学观察结果表明,NDC-I在一定程度上能够恢复环磷酰胺导致的脾脏和胸腺损伤。上述实验结果表明,摄入NDC-I对环磷酰胺所致免疫低下大鼠的免疫器官均有较显著的改善作用。

3 结论

本实验探究了NDC-I对环磷酰胺诱导的免疫力低下大鼠的免疫调节作用。实验结果显示通过连续30d给予NDC-I后,大鼠的白细胞计数显著上升,脾脏指数和胸腺指数均增加,脾脏和胸腺组织病理学损伤减轻,表明NDC-I对环磷酰胺引起的免疫器官损伤具有一定的修护作用。同时,NDC-I能显著提高环磷酰胺导致的免疫低下大鼠体内免疫球蛋白和辅助性Th细胞分泌的细胞因子,提高LDH活性,影响机体胞内细胞糖酵解释放能量的速率,进而可能对巨噬细胞内免疫活性物质的释放和免疫功能的应答具有促进作用。综上所述,适量摄入NDC-I对环磷酰胺所致免疫低下大鼠的多项免疫功能均有较显著的改善作用,而关于NDC-I免疫调节的作用机制还需进一步实验探究,以期为NDC-I的综合开发和利用提供新的研究思路。

参考文献

- [1] Mala Nurilmala, Hanifah Husein Hizbullah, Euis Karnia et al. Characterization and antioxidant activity of collagen, gelatin, and the derived peptides from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin [J]. Marine Drugs, 2020, 18(2): 98-105
- [2] Fazli Subhan, Muhammad Ikram, Adeeb Shehzad, et al. Marine collagen: an emerging player in biomedical applications [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(8): 4703-4707
- [3] Anna Sorushanova, Luis M Delgado, WU Zhuning, et al. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development [J]. Advanced Materials, 2019, 31(1): e1801651
- [4] Rahman M A. Collagen of extracellular matrix from marine

- invertebrates and its medical applications [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(2): 118-130
- [5] Andrew Kisling, Robert M Lust, Laxmansa C Katwa. What is the role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease [J]. *Life Sciences*, 2019, 228(7): 30-34
- [6] 刘丽莉,马美湖,杨协力.牛骨I型胶原蛋白提取及结构表征[J].*食品科学*,2010,31(2):87-91
LIU Lili, MA Meihu, YANG Xieli. Extraction and characterization of type I collagen from bovine bone [J]. *Food Science*, 2010, 31(2): 87-91
- [7] 琚海燕,刘新华,但卫华,等.牛跟腱I型胶原纤维的微观结构与理化性能分析[J].*功能材料*,2015,46(15):15031-15034, 15040
JU Haiyan, LIU Xinhua, DAN Weihua, et al. Microstructure and physicochemical properties of type I collagen fibrils from bovine tendon [J]. *Journal of Functional Materials*, 2015, 46(15): 15031-15034, 15040
- [8] 钟朝辉,李春美,顾海峰,等.草鱼鱼鳞酶溶性胶原蛋白的提取及基本特性[J].*水产科学*,2007,26(2):91-94
ZHONG Zhaohui, LI Chunmei, GU Haifeng, et al. Extraction and basic properties of pepsin-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyndogon idellus*) scales [J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(2): 91-94
- [9] 王芳,范雨,叶茂,等.基于生物信息学和质谱技术的阿胶特异性肽段筛选与鉴定[J].*中国现代中药*,2019,21(9):1256-1261
WANG Fang, FAN Yu, YE Mao, et al. Screening and identification of characteristic peptides of donkey-hide gelatin based on bio-informatics technique and mass spectrometry [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2019, 21(9): 1256-1261
- [10] Fazli Subhan, Zohaib Hussain, Isfahan Tauseef, et al. A review on recent advances and applications of fish collagen [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(6): 1027-1037
- [11] YAN Tingsheng, CHENG Feng, WEI Xinjing, et al. Biodegradable collagen sponge reinforced with chitosan/calcium pyrophosphate nanoflowers for rapid hemostasis [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 170(4): 271-280
- [12] Francesca Veronesi, Gianluca Giavaresi, Davide Bellini, et al. Evaluation of a new collagen - based medical device (ElastiCo) for the treatment of acute Achilles tendon injury and prevention of peritendinous adhesions: an *in vitro* biocompatibility and *in vivo* investigation [J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2020, 14(8): 1113-1125
- [13] Chizuru Jinno, Naoki Morimoto, Ran Ito, et al. A comparison of conventional collagen sponge and collagen-gelatin sponge in wound healing [J]. *Biomed Research International*, 2016, 115(10): 1-8
- [14] 石举然,李丽杰,张曾亮,等.鱼皮胶原蛋白肽复方制品对小鼠免疫功能的影响[J].*天然产物研究与开发*,2020,32(2): 224-231,287
SHI Juran, LI Lijie, ZHANG Zengliang, et al. Effect of compound product of fish skin collagen on mouse immunity [J]. *Natural Product Research and Development*, 2020, 32(2): 224-231, 287
- [15] 李承威,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 Chengwei, MA Shuxia, WANG Chunmin, et al. Collagen peptide enhances immunity in mice [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2013, 25(4): 387-389
- [16] CHEN Jingjing, GAO Kaili, LIU Shu, et al. Fish collagen surgical compress repairing characteristics on wound healing process *in vivo* [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(1): 33
- [17] 王海燕,孙君社,刘爱青,等.非变性II型胶原蛋白改善骨关节炎的研究进展[J].*食品工业科技*,2019,15:329-332
WANG Haiyan, SUN Junshe, LIU Aiqing, et al. Research progress of undenatured type II collagen on osteoarthritis [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 15: 329-332
- [18] WANG Jianing, LIU Junli, GUO Yanchuan. Cell growth stimulation, cell cycle alternation, and anti-apoptosis effects of bovine bone collagen hydrolysates derived peptides on mc3t3-e1 cells *ex vivo* [J]. *Molecules*, 2020, 25(10): 2305
- [19] de Jonge M E, Huitema A D, Rodenhuis S, et al. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide [J]. *Clinical Pharmacokinetics*, 2005, 44(11): 1135-1164
- [20] 张兆肖,郑铮,杨丽,等.骆驼初乳对环磷酰胺诱导小鼠免疫功能低下的调节作用[J].*现代食品科技*,2019,35(4):1-8
ZHANG Zhaoxiao, ZHENG Zheng, YANG Li, et al. Effects of camel colostrum on cyclophosphamide-induced immunodeficiency in mice [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(4): 1-8
- [21] 薛然.火麻仁多糖对环磷酰胺致小鼠肠道黏膜损伤的保护作用研究[D].舟山:浙江海洋大学,2019
XUE Ran. Protective effect of hemp seed polysaccharide on intestinal mucosal injury induced by cyclophosphamide in mice [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019
- [22] Miller JFAP. The function of the thymus and its impact on modern medicine [J]. *Science*, 2020, 369(6503): eaba2429

- [23] Mohammed S Chaudhry, Enrico Velardi, Jarrod A Dudakov, et al. Thymus: the next (re)generation [J]. *Immunological Reviews*, 2016, 271(1): 56-71
- [24] Steven M Lewis, Adam Williams, Stephanie C Eisenbarth. Structure and function of the immune system in the spleen [J]. *Science Immunology*, 2019, 4(33): eaau6085
- [25] Harry W Schroeder Jr, Lisa Cavacini. Structure and function of immunoglobulins [J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 125(S2): S41-S52
- [26] Rachel L Clement, Joe Daccache, Mostafa T Mohammed, et al. Follicular regulatory t cells control humoral and allergic immunity by restraining early b cell responses [J]. *Nature Immunology*, 2019, 20(10): 1360-1371
- [27] CHEN Kang, Giuliana Magri, Emilie K Grasset, et al. Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2020, 20(7): 427-441
- [28] 李丹,王文千,李明亮,等.蜂王浆对免疫功能低下小鼠免疫功能的影响[J].*食品与发酵工业*,2022,48(1):139-145
LI Dan, WANG Wenqian, LI Mingliang, et al. Effect of royal jelly on immune function of mice with immunodeficiency [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(1): 139-145
- [29] QI Qiuchen, DONG Zhonghua, SUN Yueyue, et al. Protective effect of bergenin against cyclophosphamide-induced immunosuppression by immunomodulatory effect and antioxidation in Balb/c mice [J]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2668-2682
- [30] LIAO Wei, LIN Jianxin, Warren J Leonard. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy [J]. *Immunity*, 2013, 38(1): 13-25
- [31] HE Jing, ZHANG Xia, WEI Yunbo, et al. Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4(+) T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Nature medicine*, 2016, 22(9): 991-993
- [32] Chi Chiu Mok, Kwok Hungchan, Ling Yinho, et al. Safety and immune response of a live-attenuated herpes zoster vaccine in patients with systemic lupus erythematosus: a randomised placebo-controlled trial [J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2019, 78(12): 1663-1668
- [33] WEN Zhengshun, TANG Zhen, GU Lixia, et al. Immunomodulatory effect of low molecular-weight seleno-aminopolysaccharide on immunosuppressive mice [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 123(1): 1278-1288
- [34] Eugene Varfolomeev, Domagoj Vucic. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease [J]. *Cytokine*, 2018, 101(1): 26-32
- [35] Pankaj Seth, Eva Csizmadia, Andreas Hedblom, et al. Deletion of lactate dehydrogenase-A in myeloid cells triggers antitumor immunity [J]. *Cancer Research*, 2017, 77(13): 3632-3643
- [36] Deepak Kumar Kaushik, Anindita Bhattacharya, Reza Mirzaei, et al. Enhanced glycolytic metabolism supports transmigration of brain-infiltrating macrophages in multiple sclerosis [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2019, 129(8): 3277-3292

(上接第 19 页)

- [22] Mithu Guha, Sanjay Kumar, Vinay Choubey, et al. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway [J]. *The FASEB Journal*, 2006, 20(8): 1224-1226
- [23] Chen Qun, Xu Haishan, Xu Aijun, et al. Inhibition of Bcl-2 sensitizes mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening in ischemia-damaged mitochondria [J]. *PloS One*, 2015, 10(3): e0118834
- [24] 周波,刘启辰,张羿,等.瞬时受体电位香草酸亚型 1 激活通过抑制线粒体通透性转换孔开放保护急性心肌梗死小鼠的心肌细胞抗凋亡[J].*中国生物化学与分子生物学报*,2017, 33(5):514-520
ZHOU Bo, LIU Qichen, ZHANG Yi, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid 1/TRPV1 protects cardiomyocytes against apoptosis in acute myocardial infarct mice by closing mitochondrial permeability transition pore [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 33(5): 514-520
- [25] 冯建芳,章静波.程序性细胞死亡及细胞凋亡[J].*生理科学进展*,1995,4:373-378
FENG Jianfang, ZHANG Jingbo. Programmed cell death and apoptosis [J]. *Progress in Physiological Sciences*, 1995, 4: 373-378
- [26] Xie Q, Shen W W, Zhong J, et al. Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate induces IL-1 β and IL-18 secretion through the NLRP3 inflammasome in RAW264.7 murine macrophage cells [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(1): 341-349