

牡蛎低分子肽 LOPs 对短期免疫抑制小鼠的免疫调节作用

李晋祯^{1,2}, 郑惠娜^{1,2,3,4*}, 任鼎鼎^{1,2}, 杨文^{1,2}, 曹文红^{1,2,3,4}, 林海生^{1,2,3,4}, 秦小明^{1,2,3,4}, 章超桦^{1,2,3,4}

(¹ 广东海洋大学深圳研究院 广东深圳 518108

² 广东海洋大学食品科技学院 广东湛江 524088

³ 国家贝类加工技术研发分中心(湛江) 广东省水产品加工与安全重点实验室

广东省海洋生物制品工程实验室 广东湛江 524088

⁴ 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 大连工业大学 辽宁大连 116034)

摘要 目的:研究牡蛎低分子肽(LOPs)对短期免疫抑制小鼠的免疫调节作用。方法:120 只雄性 KM 小鼠按照体质量随机分为空白组、环磷酸胺模型组、乳清蛋白对照组及 LOPs 低、中、高剂量组。实验开始 1~3 d,空白组每天腹腔注射生理盐水 10 mL/kg bw,其余组每天腹腔注射等体积环磷酸胺 80 mg/kg bw,建立短期免疫抑制小鼠模型。第 4 天起,乳清蛋白组经口灌胃给予 0.4 g/kg bw 乳清蛋白,LOPs 低、中、高剂量组分别经口灌胃给予 0.2,0.4,0.8 g/kg bw 的 LOPs。空白对照组和模型组经口灌胃等体积蒸馏水。连续灌胃 27 d 后,测定小鼠体质量、免疫脏器质量及其组织形态、血清溶血素、细胞因子和免疫球蛋白。结果:与模型组相比,LOPs 组有助于修复小鼠脾脏和胸腺组织形态学结构的损伤,增强血清溶血素水平,提高白细胞介素-2、 γ -干扰素、免疫球蛋白质量浓度。结论:LOPs 对环磷酸胺短期免疫抑制小鼠具有一定的免疫调节作用,具有作为特殊医学用途配方食品基料的潜在应用价值。

关键词 牡蛎低分子肽; 环磷酸胺; 免疫抑制; 免疫调节

文章编号 1009-7848(2022)10-0143-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.10.016

免疫系统是机体的一种防御系统,可清除细菌、真菌、病毒等有害物质,并预防癌细胞的生长发育^[1]。免疫系统主要分为两大类:非特异性免疫和特异性免疫。非特异性免疫通过皮肤、黏膜、巨噬细胞、NK 细胞、炎症因子等提供机体免疫的第 1 道防线^[2]。特异性免疫中最重要的细胞是 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞,其中 B 淋巴细胞与抗原相互作用后产生特异性抗体,T 淋巴细胞与病原体结合后产生免疫调节因子。Th 细胞作为 T 淋巴细胞的 1 个亚群,主要分泌干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素(IL-2)等细胞因子,激活免疫细胞参与免疫反应^[3]。

临床上,用于免疫疗法的免疫调节剂是通过改变免疫系统的非特异性和特异性免疫来治疗疾病。目前,匹多莫德^[4]、左旋咪唑^[5]、环孢素^[6]等药物被成功应用于调节人体免疫反应,然而,大多数免疫调节药物具有毒性和副作用,并不适合慢性或预防性使用^[7]。此外,许多肿瘤患者化疗后易出现营养不良、免疫力低下等现象,患者通过改善食谱难以达到恢复效果,降低了治疗的有效性。营养干预是一种具有吸引力的治疗策略,可通过营养和功能性食品的摄入以改善机体的免疫功能^[8]。在马氏珠母贝^[9]、青蛤^[10]、扇贝^[11]、牡蛎^[12]等经济贝类中,存在具有免疫调节功能的海洋源多肽,没有副作用且成本较低,可作为特殊医学用途食品营养基料进行营养干预。

牡蛎是世界上养殖最多的经济海水贝类,必需氨基酸占其总氨基酸的 40%,是优质的蛋白质来源^[13]。牡蛎肽是将酶解、微生物发酵、化学合成、重组等多肽生物分子技术应用于牡蛎加工的产物,且容易被机体消化吸收^[14]。研究表明,牡蛎肽具有多种潜在的生物活性,如抗氧化^[15]、抗菌^[16]、降血压^[17]、促性功能^[18]、抗炎^[19]等。本课题组前期研究

收稿日期: 2021-10-31

基金项目: 广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(2021KJ146); 现代农业产业技术体系专项(CARS-49); 深圳市大鹏新区科技创新和产业发展专项(KJYF202101-07); 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2020YFD091102)

作者简介: 李晋祯(1996—),男,硕士生

通信作者: 郑惠娜 E-mail: zhenghn@gdou.edu.cn

发现,牡蛎酶解产物可促进脾淋巴细胞增值,腹腔巨噬细胞吞噬中性红和生成 NO^[2],然而,对具有免疫调节功能的物质是多肽,还是多糖,仍未知。本研究在前期体外研究基础上,通过建立环磷酰胺诱导的短期免疫抑制小鼠模型,从小鼠的体质量、免疫脏器指数、免疫组织形态学结构、免疫球蛋白、细胞因子、体液免疫等方面探究牡蛎低分子肽(Low-molecular-weight oyster peptides, LOPs)对短期免疫抑制小鼠的免疫调节作用,为开发以海洋蛋白肽为基料的特殊医学用途配方食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物 健康 SPF 级雄性 KM 小鼠,4 周龄,体质量 18~20 g,购自珠海百试通生物科技有限公司。许可证号:SCXK(粤)2020-0051。动物实验的开展由广东海洋大学实验动物伦理委员会批准许可。实验垫料、饮用水经高压灭菌处理,饲料经辐照杀菌处理。

1.1.2 实验材料 LOPs,海南盛美诺生物技术有限公司,浅褐色固体粉末,主要成分为分子质量<5 ku 的多肽,蛋白质含量 68.7 g/100 g(以干基计),低聚肽含量 41.6 g/100 g(以干基计)。参考李婉等^[2]方法,使用氨基酸自动分析仪测定 LOPs 中 16 种氨基酸含量(表 1)。

表 1 LOPs 氨基酸组成及其含量

Table 1 Amino acid composition and content of LOPs			
氨基酸种类	含量/%	氨基酸种类	含量/%
天冬氨酸(Asp)	10.61	异亮氨酸(Ile)	4.75
苏氨酸(Thr)	4.95	亮氨酸(Leu)	7.32
丝氨酸(Ser)	5.05	酪氨酸(Tyr)	2.50
谷氨酸(Glu)	16.45	苯丙氨酸(Phe)	3.82
甘氨酸(Gly)	7.28	赖氨酸(Lys)	8.64
丙氨酸(Ala)	6.52	组氨酸(His)	1.89
缬氨酸(Val)	5.48	精氨酸(Arg)	7.60
蛋氨酸(Met)	2.14	脯氨酸(Pro)	4.99

1.1.3 实验试剂 乳清蛋白粉,浙江一诺生物科技有限公司;环磷酰胺(Cyclophosphamide,CTX),德国 Baxter Oncology GmbH 公司; γ -干扰素(In-

terferon- γ ,IFN- γ)、白细胞介素(Interleukin,IL)-2、免疫球蛋白(Immunoglobulin)A、IgM、IgG 酶联免疫吸附测定试剂盒、绵羊红细胞(Sheep red blood cells,SRBC)、豚鼠血清(补体),南京森贝伽生物科技有限公司;SA 缓冲液(pH 7.4),上海源叶生物科技有限公司;都氏试剂,河南云子羽生物有限公司;苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin,HE)染色液,上海碧云天生物技术有限公司;其它试剂均为国产分析纯级。

1.2 仪器与设备

BSA224S-CW 电子分析天平,德国 Sartorius 公司;3-30KS 台式高速冷冻离心机,美国 Sigma 公司;Varioskan Flash 全波长扫描式多功能酶标仪,美国 Thermo 公司;脱水机、冷冻石蜡包埋机,湖北贝诺医疗科技有限公司;KD-P 组织摊片机,浙江金华科迪仪器设备有限公司;Eclipse E100 显微镜,上海尼康仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 实验分组与处理 120 只 SPF 级雄性 KM 健康小鼠饲养于动物房屏障区,温度保持(22±2)℃,相对湿度为 50%~60%,昼夜照明时间为 12 h/12 h,实验期间动物自由饮水和进食。适应性饲养 7 d 后,按照体质量随机分为 6 组($n=20$),每组分为 A、B 亚组,分别为空白(Control)组、环磷酰胺(CTX)模型组、乳清蛋白对照(WP)组及 LOPs 低(LOPs-L)、中(LOPs-M)、高(LOPs-H)剂量组。分组后,记录小鼠初始体质量,实验过程中每 3 d 测量 1 次小鼠体质量,记录每只小鼠体质量的变化。实验第 1~3 天于早上 9:30 开始腹腔注射,空白对照组每天腹腔注射生理盐水 10 mL/kg bw,其余组每天腹腔注射等体积 CTX 80 mg/kg bw,建立短期免疫抑制小鼠模型^[20]。第 4 天起,于早上 9:30 开始灌胃,乳清蛋白组经口灌胃给予 0.4 g/kg bw 乳清蛋白,LOPs 低、中、高剂量组分别经口灌胃给予 0.2、0.4、0.8 g/kg bw 的 LOPs,同时,空白对照组和模型组经口灌胃等体积蒸馏水。

1.3.2 免疫脏器指数计算 A 亚组小鼠共 60 只,采用颈椎脱臼法处死小鼠,解剖分离脾脏和胸腺,并置于生理盐水中洗净血,用滤纸吸干器官表面水分后,称量脏器质量。免疫脏器指数根据公式(1)计算^[21]。

$$\text{免疫脏器指数}(\text{mg/g}) = \frac{\text{免疫脏器质量}(\text{mg})}{\text{小鼠处死前体质量}(\text{g})} \quad (1)$$

1.3.3 脾脏和胸腺组织形态学观察 无菌取脾脏和胸腺,按照 0.05 g/mL 在 4%多聚甲醛固定液中充分固定,石蜡包埋,冰冻切片将脾脏、胸腺组织切片,HE 染色,脱水封片。最后在光学显微镜下观察脾脏和胸腺组织的形态学变化并获取相应的图像。

1.3.4 血清溶血素水平测定 参考 Yang 等^[22]的方法,稍作修改。B 亚组小鼠摘除眼球取血于离心管内,室温自然凝固 1 h,4 ℃ 2 000 r/min 离心 10 min,收集血清。取血清用 SA 缓冲液稀释 200 倍。将稀释后的血清 50 μL 置 96 孔板样品孔中,依次加入体积分数 10%的 SRBC 25 μL,补体 50 μL (用 SA 按 1:8 稀释,V/V)。另设不加血清的对照孔(以 SA 缓冲液代替)。置于 37 ℃恒温水浴中保温 30 min 后,冰浴终止反应。1 500 r/min 离心 10 min。取上清液 50 μL 加入另一个 96 孔板中,加都氏试剂 150 μL。设半数溶血孔,加体积分数 10%的 SRBC 12.5 μL,再加都氏试剂 187.5 μL,充分混匀,放置 10 min 后,用酶标仪于 540 nm 波长处测定各孔光密度值,溶血素的量以半数溶血值 HC₅₀ 表示,根据公式(2)计算。

$$\text{HC}_{50} = \frac{\text{样品光密度值}}{\text{SRBC 半数溶血时的光密度值}} \times \text{稀释倍数} \quad (2)$$

1.3.5 外周血免疫球蛋白含量测定 A 亚组小鼠摘取眼球取血于离心管内,室温自然凝固 15 min,1 200×g 离心 20 min^[23]。仔细收集上清液

于 -80 ℃保存备用。取 120 μL 血清,外周血免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 质量浓度的测定严格按照酶联免疫吸附测定试剂盒说明书进行。

1.3.6 血清细胞因子质量浓度测定 另取 A 亚组小鼠血清 80 μL,血清中 IFN-γ、IL-2 质量浓度的测定严格按照酶联免疫吸附测定试剂盒说明书进行。

1.4 统计分析

用 IBM SPSS Statistics 26 软件对数据进行分析,实验结果以“平均值±标准差”表示。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 LSD 法比较组间差异, $P < 0.05$ 被认为具有统计学上的差异。数据不符合正态分布或方差不齐时,可进行变量转换后再分析;变量转换仍不满足要求,进行秩和检验。

2 结果与分析

2.1 体质量和免疫脏器指数的变化

如表 2 所示,各组小鼠初始体质量无统计学差异($P > 0.05$),环磷酸腺苷造模 3 d 后,5 个造模组小鼠体质量与空白组相比极显著降低($P < 0.01$),连续给药 27 d 后的终末体质量各组间无显著差异($P > 0.05$)。各组小鼠胸腺指数之间无显著差异($P > 0.05$);与空白组相比,模型组、乳清蛋白组、LOPs 低、中、高剂量组脾脏指数增大($P < 0.01$);与模型组相比,乳清蛋白组的脾脏指数有所降低,LOPs 低、中、高剂量组脾脏指数随 LOPs 剂量增加而降低,然而无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 LOPs 对短期免疫抑制小鼠体质量和免疫脏器指数的影响($n = 10$)

Table 2 Effect of LOPs on body mass and immune organ indices of short-term immunosuppressed mice ($n = 10$)

组别	初始体质量/g	建模后体质量/g	终末体质量/g	脾脏指数/mg·g ⁻¹	胸腺指数/mg·g ⁻¹
空白组	29.66 ± 1.73	34.34 ± 1.33	39.51 ± 1.58	2.61 ± 0.47	2.05 ± 0.57
模型组	29.46 ± 1.17	30.66 ± 1.96**	36.83 ± 2.39	3.91 ± 0.87**	2.38 ± 0.52
乳清蛋白组	29.26 ± 1.89	30.88 ± 2.07**	36.01 ± 2.48	3.85 ± 1.02**	2.20 ± 0.32
LOPs 低剂量组	29.58 ± 1.70	30.99 ± 1.56**	36.07 ± 1.99	3.89 ± 0.41**	2.24 ± 0.47
LOPs 中剂量组	29.60 ± 1.81	30.33 ± 2.44**	36.59 ± 2.85	3.83 ± 0.80**	2.15 ± 0.68
LOPs 高剂量组	29.36 ± 1.75	30.53 ± 1.76**	36.19 ± 2.61	3.78 ± 0.68**	2.13 ± 0.46

注:*. 与空白组相比,差异显著($P < 0.05$);**. 与空白组相比,差异极显著($P < 0.01$)。下同。

2.2 脾脏和胸腺组织形态学观察结果

空白组的红髓和白髓之间有明显的分界线,

脾小结近似圆形且发育良好,脾脏组织结构清晰(图 1a)。与空白组相比,模型组的白髓和红髓边界

模糊,脾小结不完整(图 1b);乳清蛋白组可见完整的脾小结(图 1c);LOPs 低剂量组可见脾小结的大体结构,而红髓与白髓边界仍不明显(图 1d);LOPs 中、高剂量组可见多个完整的脾小结,可见明显的红白相间的髓质,白髓边缘增宽(图 1e、1f)。

空白组皮质和髓质结构清晰,髓质内可见明

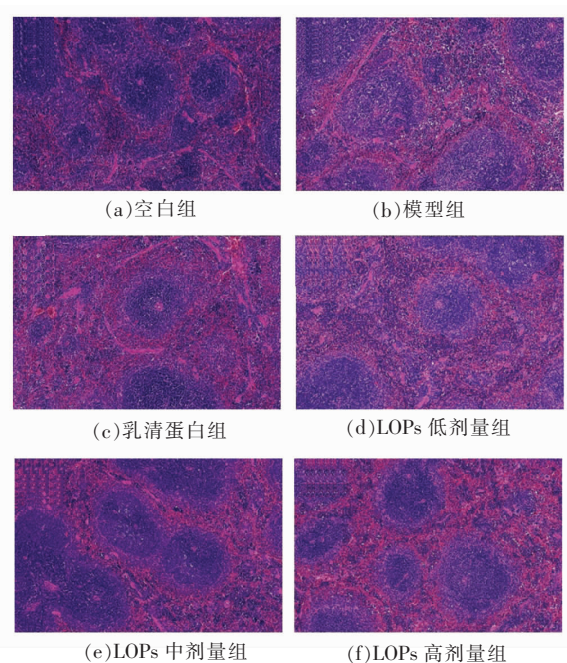


图 1 LOPs 对短期免疫抑制小鼠脾脏组织的影响($\times 200$)

Fig.1 Effect of LOPs on spleen tissues of short-term phase immunosuppressed mice ($\times 200$)

2.3 血清溶血素水平的变化

如图 3 所示,与空白组相比,模型组、LOPs 低、中剂量组的血清溶血素水平有所提高($P > 0.05$),乳清蛋白组的血清溶血素水平极显著提高($P < 0.01$),LOPs 高剂量组的血清溶血素水平显著提高($P < 0.05$);与模型组相比,乳清蛋白组的血清溶血素水平显著提高($P < 0.05$),LOPs 各剂量组的血清溶血素水平有所提高,然而无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 外周血免疫球蛋白含量的变化

如图 4 所示,与空白组相比,模型组的外周血 IgA、IgG 质量浓度均增加,而 IgM 质量浓度有所

降低($P > 0.05$),乳清蛋白组的外周血 IgA 质量浓度极显著增加($P < 0.01$),IgG、IgM 无明显变化($P > 0.05$);LOPs 低、中、高剂量组的外周血 IgG、IgM 质量浓度和 LOPs 高剂量组的外周血 IgA 质量浓度极显著增加($P < 0.01$),LOPs 低剂量组的外周血 IgA 质量浓度无明显变化($P > 0.05$),LOPs 中剂量组的外周血 IgA 质量浓度显著增加($P < 0.05$);与模型组相比,乳清蛋白组和 LOPs 高剂量组的外周血 IgA 质量浓度极显著增加($P < 0.01$),LOPs 低、中、高剂量组的 IgG、IgM 质量浓度极显著增加($P < 0.01$)。

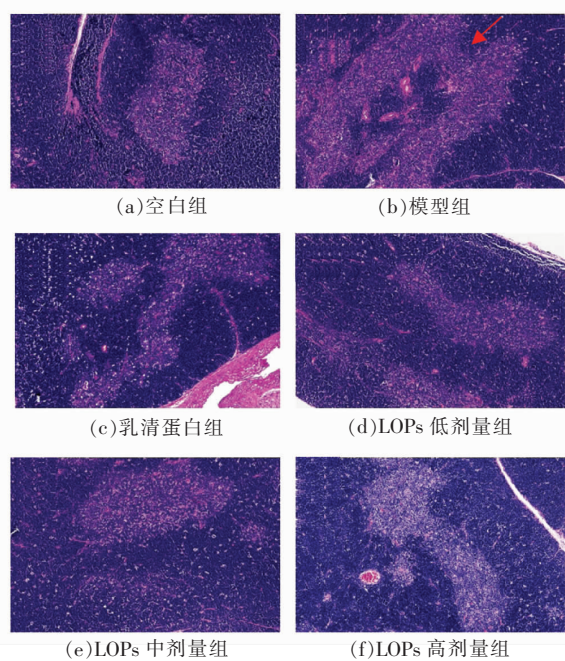
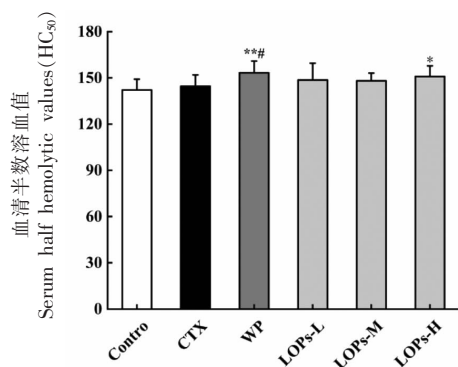


图 2 LOPs 对短期免疫抑制小鼠胸腺组织的影响($\times 200$)

Fig.2 Effect of LOPs on thymus tissue of short-term phase immunosuppressed mice ($\times 200$)



注: #. 与模型组比较,差异显著($P<0.05$);##. 与空白组相比,差异极显著($P<0.01$)。下同。

图 3 LOPs 对短期免疫抑制小鼠血清半数溶血值的影响 ($n = 10$)

Fig.3 Effect of LOPs on serum half hemolytic values in short-term immunosuppressed mice ($n = 10$)

2.5 血清中细胞因子水平的变化

如图 5 所示,与空白组和模型组相比,乳清蛋白组小鼠血清中 IL-2 质量浓度无明显变化 ($P>0.05$),LOPs 低、中、高剂量组小鼠血清中 IL-2 质量浓度均极显著提高 ($P<0.01$)。与空白组相比,模型组和 LOPs 中剂量组小鼠血清中 IFN- γ 质量浓度虽有所增加,但无统计学意义 ($P>0.05$),乳清蛋白组、LOPs 低、高剂量组小鼠血清中 IFN- γ 质量浓度均极显著增加 ($P<0.01$);与模型组相比,LOPs 低、高剂量组小鼠血清中 IFN- γ 质量浓度均极显著增加 ($P<0.01$),乳清蛋白和 LOPs 中剂量组小鼠血清中 IFN- γ 质量浓度虽有所增加,但无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

目前,多种食品源开发的免疫活性肽已成为研究热点,而酶解技术是从蛋白质中提取活性肽的重要方法之一^[24]。研究表明,多种海洋源贝类多肽具有增强免疫力的作用。青蛤酶解多肽能够明显提高巨噬细胞的吞噬能力、NO 分泌能力和细胞因子分泌能力^[25]。等边浅蛤酶解产物对免疫功能具有一定的调节作用^[26]。文蛤寡肽对 CTX 诱导的免疫抑制小鼠的免疫功能具有改善作用^[27]。

牡蛎经粉碎、脱脂酶解、过滤、浓缩、喷雾干燥后得到的 LOPs 是一种蛋白质含量高,氨基酸齐全的产物,其小分子多肽被酶切割后可释放出特有

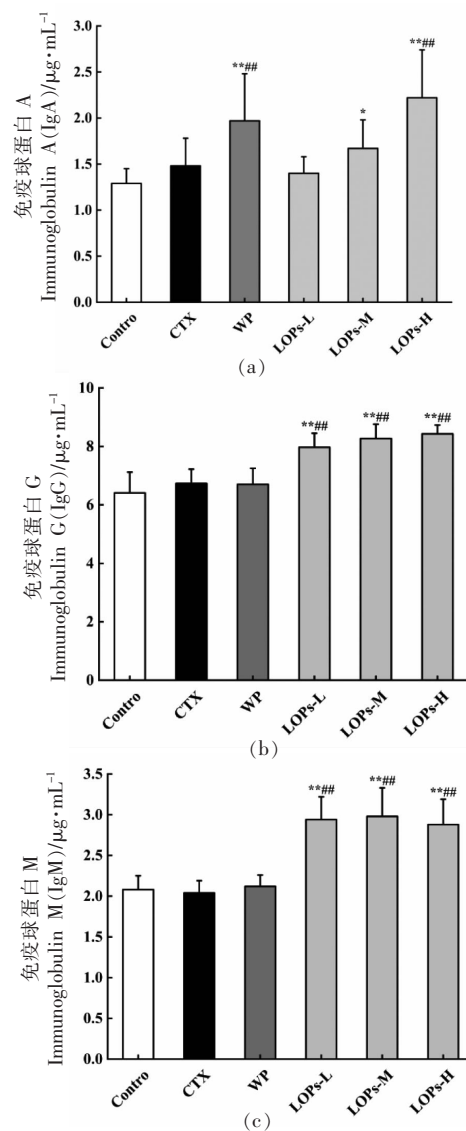


图 4 LOPs 对短期免疫抑制小鼠外周血免疫球蛋白 IgA(a)、IgG(b)、IgM(c)质量浓度的影响 ($n = 10$)

Fig.4 Effect of LOPs on peripheral blood immunoglobulin IgA (a), IgG (b), and IgM (c) mass concentrations in short-term immunosuppressed mice ($n = 10$)

的活性肽序列。因此检测 LOPs 的免疫活性,可为特殊医学用途配方食品的应用提供理论基础。具有免疫调节作用的食源性蛋白肽常见的残基是疏水性氨基酸,如 Ala、Val、Met、Ile、Leu、Tyr、Phe、Pro 等^[28]。本研究中所用 LOPs 富含 16 种氨基酸(表 1),必需氨基酸占总氨基酸含量的 37.10%,其中 Ala、Val、Met、Ile、Leu、Tyr、Phe、Pro 等疏水性氨基酸含量为 37.53%。也有研究进一步表明,带正电

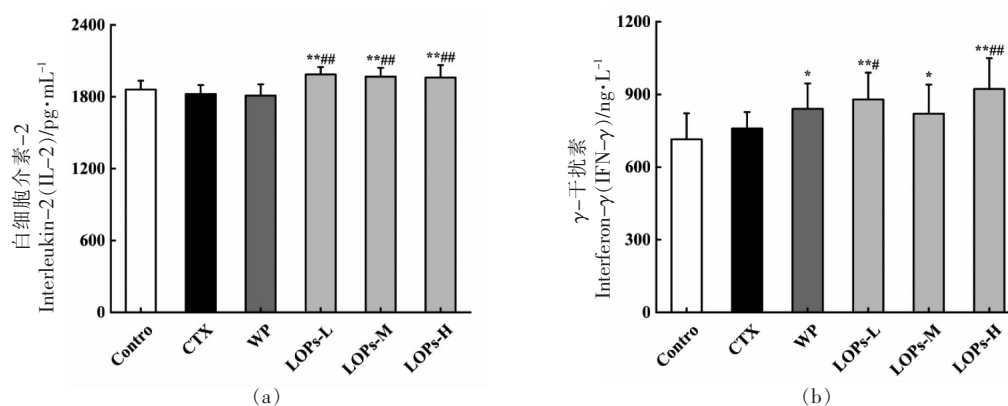


图5 LOPs对短期免疫抑制小鼠血清细胞因子(a)IL-2、(b)IFN- γ 浓度的影响($n=10$)

Fig.5 Effect of LOPs on serum cytokine (a) IL-2, (b) IFN- γ concentrations in short-term immunosuppressed mice ($n=10$)

荷的氨基酸含量与多肽免疫调节功能呈正相关^[29],本研究中的Lys、His和Arg等带正电荷的氨基酸含量为18.13%。因此,本研究中LOPs的免疫活性可能与这些疏水性氨基酸和带正电荷的氨基酸组成及其含量有关。

环磷酰胺作为一种具有广谱抗肿瘤的化疗药物,其介导的细胞毒性作用是化学反应代谢产物通过产生交联来烷基化并损伤DNA^[30]。在动物模型中,短期内给予一定剂量的CTX可显著降低小鼠的体质量,抑制免疫器官功能,引起血清免疫球蛋白和细胞因子的失衡^[31]。本研究通过连续3d腹腔注射CTX,建立短期免疫抑制小鼠模型,给予LOPs灌胃干预27d,从细胞免疫、体液免疫、非特异性免疫3个方面评价LOPs的免疫调节作用。考虑到KM小鼠自身具有一定的免疫调节能力,故设模型组以消除可能由于CTX对小鼠自身免疫力造成的影响。

药物对免疫器官的影响可作为研究动物模型免疫调节作用的初步指标^[32],脾脏和胸腺是机体最重要的免疫器官,其形态结构和功能状态在一定程度上反映了机体的免疫情况^[33]。本研究结果显示,连续3d腹腔注射CTX后,与空白组相比,其它组小鼠出现脱毛现象,粪便干涩,精神涣散,小鼠体质量下降显著,说明CTX可短期抑制小鼠的免疫调节功能,具有明显毒性。模型组小鼠的脾脏指数较空白组显著增加,形态学观察结果提示脾脏颜色加深、水肿肥大;与模型组相比,乳清蛋白组和LOPs低、中、高剂量组的脾脏指数降低,且

LOPs组呈剂量依赖性。这些数据表明CTX可导致胸腺和脾脏肿大,这与Shen等^[34]的研究结果一致,提示LOPs可能通过减轻脾脏颜色加深,缓解水肿肥大症状,从而改善异常的免疫脏器指数。

HE染色可用于观察免疫脏器的病理学形态,受到CTX的毒作用损伤后,脾脏的脾小结发育不良且存在破损现象,骨髓、红髓边界模糊不清;胸腺的皮质、髓质边界难以区分,且可观察到皮质面积减小和髓质面积增大^[27]。本研究结果显示,与空白组相比,模型组脾脏和胸腺组织结构损伤严重;与模型组相比,乳清蛋白组的免疫器官组织结构损伤得到修复,LOPs低、中、高剂量组免疫器官组织结构随着质量浓度的增加逐渐恢复到正常水平,且LOPs中、高剂量组的恢复水平高于乳清蛋白组。这些病理学观察结果表明,CTX可对免疫脏器造成一定的损害作用,这与Huang等^[35]的研究结果一致,提示LOPs通过保护并修复CTX对免疫器官的损伤,从而提高机体的免疫调节能力。

体液免疫是机体一种重要的免疫反应,由B淋巴细胞介导,SRBC免疫后小鼠血清中溶血素(SRBC抗体)的形成可以有效反映体液免疫的作用^[36]。本研究中,模型组小鼠血清溶血素水平与空白组无明显差别,乳清蛋白和LOPs高剂量组小鼠血清溶血素水平均显著升高,提示LOPs可能通过改善血清中补体的溶血活性,从而增强体液免疫。

浆细胞分泌的免疫球蛋白是机体在感染方面的重要屏障,分泌型IgA、IgG、IgM作为血清中主要抗体成分^[37],其中IgG是机体血清免疫球蛋白

中含量最高的,是机体主动对抗外来抗原产生的抗体,在体液免疫中发挥着重要作用,而 IgM 是机体血清免疫球蛋白分子质量最大的,是机体初始免疫中发挥抗感染作用的抗体^[33],因此,它们在机体血清中的质量浓度可以反映体液免疫功能。研究结果显示,与空白组和模型组相比,LOPs 干预组小鼠血清中 IgA、IgG、IgM 质量浓度明显升高,提示 LOPs 可能通过增加免疫球蛋白浓度来增强机体的体液免疫,并通过缓解免疫抑制症状来维持稳态。

IL-2 是诱导淋巴细胞分化并发挥免疫调节作用的最重要免疫因子之一^[38]。IFN- γ 可介导细胞免疫功能,通过调节巨噬细胞、NK 细胞的生长,增强免疫调节作用^[22]。本研究中,相比空白组和模型组,LOPs 干预组小鼠的 IL-2、IFN- γ 质量浓度明显升高,而不呈剂量依赖性;提示 LOPs 可能通过上调 IL-2、IFN- γ 等细胞因子的表达而影响其介导的免疫反应,从而改善机体的免疫功能。

4 结论

LOPs 具有一定的免疫调节能力,可显著改善环磷酸胺对小鼠脾脏、胸腺免疫脏器的损伤,提高小鼠血清中溶血素水平,增加免疫球蛋白质量浓度,并通过上调 IL-2、IFN- γ 等细胞因子的表达,提高小鼠免疫功能。此外,由于 LOPs 中含有高比例的低分子肽,具有作为特殊医学用途配方食品高端蛋白基料的潜在价值,在消化吸收方面具有显著优势。

参 考 文 献

- [1] CHALAMAIAH M, YU W, WU J. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 205-222.
- [2] PAGE D B, BOURLA A B, DANIYAN A, et al. Tumor immunology and cancer immunotherapy: Summary of the 2014 SITC primer[J]. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2015, 3(1): 25-35.
- [3] 郭明,封桂英,郭亚春,等. Th1 型细胞因子在胶原蛋白诱导性关节炎小鼠血清中的动态变化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(3): 250-253.
- [4] GUO M, FENG G Y, GUO Y C, et al. Dynamic changes of Th1 cytokines in the serum of collagen-induced arthritis in mice[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2014, 30(3): 250-253.
- [5] TRABATTONI D, CLERICI M, CENTANNI S, et al. Immunomodulatory effects of pidotimod in adults with community-acquired pneumonia undergoing standard antibiotic therapy[J]. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, 2017, 44: 24-29.
- [6] GRUPPEN M P, BOUTS A H, JANSEN-VAN DER WEIDE M C, et al. A randomized clinical trial indicates that levamisole increases the time to relapse in children with steroid-sensitive idiopathic nephrotic syndrome[J]. Kidney International, 2018, 93(2): 510-518.
- [7] FLORES C, FOUQUET G, MOURA I C, et al. Lessons to learn from low-dose cyclosporin-a: A new approach for unexpected clinical applications[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 588-595.
- [8] WANG Y K, HE H L, WANG G F, et al. Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice[J]. Marine Drugs, 2010, 8(2): 255-268.
- [9] MARTÍNEZ-SÁNCHEZ S M, GABALDÓN-HERNÁNDEZ J A, MONTORO-GARCÍA S. Unravelling the molecular mechanisms associated with the role of food-derived bioactive peptides in promoting cardiovascular health[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103645.
- [10] 邓志程,张迪,吉宏武,等. 马氏珠母贝免疫活性肽的纯化与鉴定[J]. 广东海洋大学学报, 2017, 37(4): 78-86.
- [11] DENG Z C, ZHANG D, JI H W, et al. Purification and identification of immunomodulating peptides from enzymatic hydrolysates of *Pinctada martensi*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2017, 37(4): 78-86.
- [12] WEI L, SHENGWANG Y, ZHUANGWEI Z, et al. Purification and characterization of a novel pentadecapeptide from protein hydrolysates of *Cyclina sinensis* and its immunomodulatory effects on RAW264.7 cells[J]. Marine drugs, 2019, 17(1): 30.
- [13] 张彩梅,刘晓萍,张红梅,等. 扇贝多肽对小鼠非特异性免疫功能的调节作用[J]. 中国海洋药物,

- 2006(0): 38–40.
- ZHANG C M, LIU X P, ZHANG H M, et al. Effect of PCF on the nonspecific immunity in mice[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2006(5): 38–40.
- [12] 李婉, 曹文红, 章超桦, 等. 牡蛎酶解产物的组成特点及其体外免疫活性[J]. 食品工业科技, 2017, 38(16): 35–42.
- LI W, CAO W H, ZHANG C H, et al. Composition characteristics of oyster enzymatic hydrolysate and its immune activity *in vitro* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(16): 35–42.
- [13] MURATA Y, TOUHATA K, MIWA R. Correlation of extractive components and body index with taste in oyster *Crassostrea gigas* brands[J]. Fisheries Science, 2020, 86(3): 561–572.
- [14] HAO L, WANG X, CAO Y, et al. A comprehensive review of oyster peptides: Preparation, characterisation and bioactivities [J]. Reviews in Aquaculture, 2021, 14(1): 120–138.
- [15] 王力, 肖崑方, 陈弘培, 等. 牡蛎多肽组分 OE-I 抗氧化活性及其对秀丽隐杆线虫抗衰老作用[J]. 食品科学, 2021. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210531.1324.008.html>.
- WANG L, XIAO M F, CHEN H P, et al. Antioxidant activity of oyster peptide component OE-I and its anti-aging effect on *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Science, 2021. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210531.1324.008.html>.
- [16] SEO J K, KIM D G, OH R, et al. Antimicrobial effect of the 60S ribosomal protein L29 (cgRPL29), purified from the gill of pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2017, 67: 675–683.
- [17] ZIXUAN G, FUJUNZHU Z, HUI C, et al. Heat treatments of peptides from oyster (*Crassostrea gigas*) and the impact on their digestibility and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity [J]. Food Science and Biotechnology, 2020, 29 (7): 961–967.
- [18] 方磊, 张瑞雪, 陈亮, 等. 牡蛎肽对 TM3 细胞性功能的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(5): 140–147.
- FANG L, ZHANG R X, CHENG L, et al. Effects of oyster peptide on cellular function of TM3 [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(5): 140–147.
- [19] HWANG D, KANG M J, JO M J, et al. Anti-inflammatory activity of γ -thymosin peptide derived from pacific oyster (*Crassostrea gigas*) on NO and PGE₂ production by down-regulating NF- κ B in LPS-Induced RAW264.7 macrophage Cells [J]. Marine Drugs, 2019, 17(2): 129.
- [20] YU F, HE K, DONG X, et al. Immunomodulatory activity of low molecular-weight peptides from *Nibea japonica* skin in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 68: 103888.
- [21] 杨明, 秦焯, 郝俊宇, 等. 黑蒜粉膳食补充对环磷酰胺诱导 BALB/c 小鼠免疫功能的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(21): 163–170.
- YANG M, QIN Y, HAO J Y, et al. Dietary supplementation with black garlic powder exerts immunostimulatory activity in cyclophosphamide induced BALB/c Mice [J]. Food Science, 2019, 40 (21): 163–170.
- [22] YANG Q, HUANG M, CAI X, et al. Investigation on activation in RAW264.7 macrophage cells and protection in cyclophosphamide-treated mice of *Pseudostellaria heterophylla* protein hydrolysate [J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 134: 110816.
- [23] WU Y, ZHU C P, ZHANG Y, et al. Immunomodulatory and antioxidant effects of pomegranate peel polysaccharides on immunosuppressed mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 137: 504–511.
- [24] HE K, ZENG Y, TIAN H, et al. Macrophage immunomodulatory effects of low molecular weight peptides from *Mytilus coruscus* via NF- κ B/MAPK signaling pathways [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 83: 104562.
- [25] 叶盛旺, 杨最素, 李维, 等. 青蛤酶解多肽对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 食品科学, 2019, 40(7): 185–191.
- YE S W, YANG Z S, LI W, et al. Immunomodulatory effects of peptides from enzymatic hydrolysate of *Cyclina sinensis* on RAW264.7 macrophages [J]. Food Science, 2019, 40(7): 185–191.
- [26] 丁霏希, 章超桦, 高加龙, 等. 等边浅蛤肉酶解产物超滤组分免疫调节作用[J]. 广东海洋大学学报, 2020, 40(3): 114–121.
- DING P X, ZHANG C H, GAO J L, et al. Immunomodulatory effects of the ultrafiltration fractions

- of enzymatic hydrolysates from the edible part of *Gomphina aequilatera*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2020, 40(3): 114–121.
- [27] ZHANG W, YE L, WANG F, et al. Immunomodulatory effects of the *Meretrix meretrix* oligopeptide (QLNWD) on immune-deficient mice[J]. Molecules, 2019, 24(24): 4452.
- [28] 刁静静. 绿豆肽对小鼠巨噬细胞免疫活性的影响及其作用机制[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2019.
- DIAO J J. Immunomodulatory activity and mechanism of mung bean peptides on macrophage[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2019.
- [29] 李富强, 张廷新, 朱丽萍, 等. 食物蛋白源免疫调节肽研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.028607>.
- LI F Q, ZHANG T X, ZHU L P, et al. Advance of immunomodulatory peptides from dietary-protein source[J]. Food and Fermentation Industries, 2021. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.028607>.
- [30] 赵明明, 余强, 王辉, 等. 黑灵芝多糖对免疫抑制小鼠肠道黏膜形态及肠道黏膜免疫的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(1): 137–142.
- ZHAO M M, YU Q, WANG H, et al. Effect of ganoderma atrum polysaccharide on intestinal mucosal morphology and immunity in immunosuppressed mice [J]. Food Science, 2019, 40(1): 137–142.
- [31] YU F, ZHANG Z, YE S, et al. Immunoenhancement effects of pentadecapeptide derived from *Cyclina sinensis* on immune-deficient mice induced by cyclophosphamide [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 60: 103408.
- [32] LI Q, CHEN G, CHEN H, et al. Se-enriched *G-frondosa* polysaccharide protects against immunosuppression in cyclophosphamide-induced mice via MAPKs signal transduction pathway[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 196: 445–56.
- [33] 李睿珺, 秦勇, 周雅琳, 等. 鹰嘴豆肽对免疫低下小鼠免疫功能的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(21): 133–139.
- LI R J, QIN Y, ZHOU Y L, et al. Effect of chickpea peptide on immune function of immunocompromised mice[J]. Food Science, 2020, 41(21): 133–139.
- [34] SHEN M Y, CHEN X X, HUANG L X, et al. Sulfated *Mesona chinensis* Benth polysaccharide enhance the immunomodulatory activities of cyclophosphamide-treated mice [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 76: 104321.
- [35] HUANG J, HUANG J, LI Y, et al. Sodium alginate modulates immunity, intestinal mucosal barrier function, and gut microbiota in cyclophosphamide-induced immunosuppressed BALB/c mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(25): 7064–7073.
- [36] CHEN Y, TANG J, WANG X, et al. An immunostimulatory polysaccharide (SCP-IIa) from the fruit of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 50(3): 844–848.
- [37] GAO S, HONG H, ZHANG C, et al. Immunomodulatory effects of collagen hydrolysates from yak (*Bos grunniens*) bone on cyclophosphamide-induced immunosuppression in BALB/c mice [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 60: 103420.
- [38] HAN L, MENG M, GUO M, et al. Immunomodulatory activity of a water-soluble polysaccharide obtained from highland barley on immunosuppressive mice models[J]. Food & Function, 2019, 10(1): 304–314.

Immunomodulatory Effects of Low Molecular Weight Oyster Peptides in Short-term Immunosuppressed Mice

Li Jinzhen^{1,2}, Zheng Huina^{1,2,3,4*}, Ren Dingding^{1,2}, Yang Wen^{1,2}, Cao Wenhong^{1,2,3,4}, Lin Haisheng^{1,2,3,4}, Qin Xiaoming^{1,2,3,4}, Zhang Chaohua^{1,2,3,4}

¹Shenzhen Institute of Guangdong Ocean University, Shenzhen 518108, Guangdong

²College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong

³National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing (Zhanjiang), Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Guangdong Province Engineering Laboratory for Marine Biological

Products, Zhanjiang 524088, Guangdong

⁴Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning)

Abstract Objective: To explore the immunomodulatory effects of low-molecular-weight oyster peptides (LOPs) on short-term immunosuppressed mice. Method: One hundred and twenty male KM mice were randomly divided into control, cyclophosphamide model, whey protein and low-, medium- and high-dose LOPs groups according to their body mass. In the first three days of the experiment, the control group was injected intraperitoneally with saline 10 mL/kg bw per day, and the rest of the groups were injected intraperitoneally with an equal volume of cyclophosphamide 80 mg/kg bw per day to establish a short-term immunosuppressed mice model. Subsequently, 0.4 g/kg bw of whey protein was given by oral gavage to whey protein group, 0.2, 0.4, and 0.8 g/kg bw of LOPs were given by oral gavage to low, medium and high dose groups, respectively, and an equal volume of distilled water was given by oral gavage to control and model group, and body mass, immune organ mass and its histomorphology, serum lysozyme, cytokines and immunoglobulins were measured after 27 d of gavage. Result: Compared with the model group, the LOPs group helped repair damage to the morphological structures of spleen and thymus tissues, enhanced serum hemolysin levels, and increased interleukin-2, gamma-interferon, and immunoglobulin mass concentrations in mice. Conclusion: LOPs have immunomodulatory effects on cyclophosphamide of short-term immunosuppressed mice and have potential application as a base for special medical use formulae.

Keywords low-molecular-weight oyster peptides; cyclophosphamide; immunosuppression; immunomodulatory