地鳖虫对小鼠免疫功能的调节作用*

唐庆峰[1**] 戴 银[2] 刘雪兰[3]

(1. 安徽农业大学植物保护学院 合肥 230036;2. 安徽省农业科学院畜牧兽医研究所 合肥 230031;
3. 安徽农业大学人畜共患病安徽省重点实验室 合肥 230036)

摘 要 研究中华真地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker 免疫调节作用。经口给予小鼠 1.89、3.78、7.56 g/kg/d 地鳖虫水煎萃取物,观察其对 4 周喂养小鼠免疫调节作用。地鳖虫水煎萃取物对小鼠廓清指数和吞噬指数明显增高;血清溶血素抗体滴度水平增加,小鼠脾细胞抗体生成有促进作用;中、高剂量组 NO 含量极显著高于空白对照组,碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性只有高剂量组高于对照。试验结果表明地鳖虫对机体免疫有提高的作用,说明地鳖虫具有免疫调节功能,具有较高的资源开发利用价值。

关键词 地鳖虫,小鼠,免疫调节,免疫功能

Regulatory effects of *Eupolyphaga sinensis* on immunological function in mice

TANG Qing-Feng[1**] DAI Yin[2] LIU Xue-Lan[3]

(1. School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;
2. Institute of Animal Husbandry & Veterinary Science, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China;
3. Key Laboratory of Zoonoses of Anhui Province, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract This paper describes the results of experiments to test the effect of *Eupolyphaga sinensis* Walker on the immune systems of mice. Mice were given a decoction of *E. sinensis* in water at doses of 1.89 g/kg/d, 3.78 g/kg/d, 7.56 g/kg/d for 4 weeks, after which their immune function was studied. The results indicate that *E. sinensis* observably enhanced the carbon expurgatory index and phagocytic index. The half of hemolysis values in serum of treated mice increased compared to the control group. Furthermore, serum NO content in all treatment groups was higher than that of the control group whereas acid phosphatase and alkalinity phosphatase activity was only significantly higher in the high dose group relative to the control group. We conclude that *E. sinensis* can enhance the immune function of mice and therefore that this insect has potential as a health food supplement.

Key words *Eupolyphaga sinensis*, mice, immunoregulation, immunological function

地鳖虫是鳖蠊科昆虫中华真地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker 和冀地鳖 *Polyphaga plancyi* Bolivar 的雌体,为《中华人民共和国药典》记载的正品药材(中华人民共和国卫生部药典委员会编,1990)。其药用最早记载于秦汉时代的《神农本草经》,具有破血淤、散结石、解凝治血、消肿止痛的功效(李长福等,2003)。近来人们对地鳖虫的药理作用又有了新的认识,发现该虫对白血病细胞和肿瘤具有抑制作用(唐庆峰等,2004;2005)。地鳖虫虫体营养丰富,含有丰富的蛋白质、脂肪、维生素和无机元素,有作为新的资源昆虫食品或保健食品加以研究开发的前景(周彦钢等,1998)。药食两用的特性使得对地鳖虫的研究愈来愈引起人们的普遍关注。但是,长期以来受技术条件和传统中药制药思想的限制,地鳖虫在调节机体免疫功能方面相关的实验研究还未见报道。本研究通过观察地鳖虫对小鼠免疫功能的影响,探讨和分析地鳖虫的免疫调节作用,为其开发成为免疫调节保健食品、饲料添加剂的价值提供参考,同时也为地鳖虫的药理

* 资助项目:安徽农业大学校青年科学基金面上项目(2009ZR16)。

** E-mail:tangqf55@163.com

收稿日期:2010-02-02,**接受日期**:2010-08-19

研究和临床应用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

(1)中华真地鳖:由安徽农业大学植物保护学院养虫室提供,沸水烫死后,低温烘干,待用。

(2)健康昆明种雌性小白鼠:体重(20 ± 2) g,由安徽省医学科学研究所实验动物中心提供。

(3)地鳖虫水煎萃取物:取 250 g 生药材剪碎,水浸 30 min,常法水煎 2 次,每次 2 h,合并两次上清液,纱布过滤,用旋转蒸发器减压浓缩至 400 mL,所得终产物浓度为 0.625 g/mL(1 mL 药液相当于 0.625 g 生药),临用时用蒸馏水配成所需浓度混悬液供灌胃使用。

1.2　仪器

Agilent 8453 紫外可见分光光度计,美国安捷伦科技有限公司; R2002K-L 旋转蒸发器,上海申胜生物技术有限公司;694 型电子天平,上海第二天平仪器厂;SW-CJ-2D 双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司。

1.3　试剂

绵羊红细胞(SRBC)悬液,自行制备(生理盐水洗涤 3 次,2 000 r/min,5 min);印度墨汁,上海欧韦达仪器科技有限公司;酸性磷酸酶(ACP)试剂盒与碱性磷酸酶(AKP)试剂盒,南京建成生物工程研究所;其他试剂均为国产分析纯。

1.4　方法

检验方法依据:《保健食品检验与评价技术规范》中"增强免疫力功能检验方法"(中华人民共和国卫生部,2003)。

1.4.1　剂量与分组　每个实验各选 40 只昆明种雌性小白鼠,随机分成 4 组,每组 10 只,每日灌胃给予受试药液。设溶剂对照组(蒸馏水灌胃)和地鳖虫水煎萃取物低、中、高 3 个剂量组(剂量为 1.89、3.78 和 7.56 g/kg/d,所有给药组剂量相当于临床等效剂量的 4 倍)(唐庆峰等,2006)。每克小鼠灌胃量为 0.025 mL,实验时间为 4 周。每周称 1 次体重,调整灌胃体积。

1.4.2　小鼠碳粒廓清试验　连续灌胃 4 周后,给小鼠尾静脉注射印度墨汁 0.1 mL/10 g,注射后 2 min和 10 min 分别由眼眶静脉丛取血 20 μL,溶于 0.1% Na_2CO_3 溶液 2 mL 中,以 Na_2CO_3 溶液作空白,600 nm 比色测光密度 OD 值。最后,将小鼠颈椎脱臼处死,分别称取肝、脾重量。计算廓清指数(K)及单核吞噬细胞的吞噬指数(a)。

$$\text{廓清指数}(K) = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{t_2 - t_1},$$

$$\text{吞噬指数}(a) = \frac{\text{小鼠重量}}{\text{肝重} + \text{脾重}} \times \sqrt[3]{K}$$

OD_1 为 2 min 时取血样所测的光密度值,OD_2 为 10 min 时取血样所测的光密度值,t_2-t_1 为取两血样的时间差。

1.4.3　体液免疫指标检测　本指标采用血凝法测定小鼠血清溶血素滴度以检测体液免疫指标。灌胃至 24 d 时,腹腔注射 20 % 的绵羊红细胞 0.2 mL 免疫每只小鼠,5 d 后眼眶静脉丛采血,并分离血清备用。按常规方法试验操作,540 nm 波长处测 OD 值,计算 HC_{50}。

$$HC_{50} = \frac{\text{样品吸光度值}}{\text{SRBC 半数溶血时的吸光度值}} \times \text{小鼠血清稀释倍数}$$

1.4.4　酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活性测定　连续灌胃 4 周后,眼眶静脉丛采血,将装有血液的离心管在室温下静置 10 min 使血液凝固,置 4 ℃冰箱冷藏过夜,使血清析出,按照试剂盒提供的测定方法,测定血清中 ACP 和 AKP 活性。

1.4.5　血清 NO 含量测定　连续灌胃 4 周后,眼眶静脉丛采血,将装有血液的离心管在室温下静置 10 min 使血液凝固,置 4 ℃冰箱冷藏过夜,使血清析出,按照试剂盒提供的测定方法,测定血清中 NO 浓度。

1.5　数据处理

用 SPSS 10.0 软件包进行统计分析,采用单因素方差分析(one-way analysis of variance),$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　地鳖虫水煎萃取物对小鼠的碳粒廓清能力的影响

从表 1 看出,地鳖虫水煎萃取物各组剂量廓清指数和吞噬指数均高于空白对照组,并有明显的剂量反应关系;中、高剂量组廓清指数较空白组有所提高,差异有显著性意义($P < 0.05$);高剂量组较空白对照组可显著地提高小鼠的吞噬指数($P < 0.05$)。实验结果表明地鳖虫水煎萃取物对小

鼠的非特异性吞噬功能具有增强和促进作用。

表 1 地鳖虫水煎萃取物对小鼠碳粒廓清的影响($n=10, \bar{X} \pm SD$)

Table 1 Effect of *E. sinensis* on the carbon particles clearance of mice

组别 Group	剂量 (g/kg/d) Dosage	廓清指数(K) Expurgatory index	吞噬指数(a) Phagocytic index
空白对照组 Negative control	0	0.018 ± 0.007	4.71 ± 1.01
低剂量组 Low-dosage group	1.89	0.021 ± 0.006	4.86 ± 1.29
中剂量组 Moderate-dosage group	3.78	0.028 ± 0.009*	5.32 ± 1.31
高剂量组 High-dosage group	7.56	0.035 ± 0.007*	5.84 ± 1.24*

注:同列数据后标注* 表示与蒸馏水空白对照组比较差异显著($P<0.05$),表 2 - 3 同。

Values in the same column followed by one asterisk meas significant difference at 0.05 level compared to the control group. The same for Table 2,3.

2.2 地鳖虫水煎萃取物对小鼠的体液免疫功能的影响

如表 2 所示,血清溶血素试验各剂量组小鼠血清半数溶血值(HC_{50})均高于对照组,高剂量组差异显著($P<0.05$),并有明显的剂量反应关系。实验结果表明地鳖虫水煎萃取物能明显的增加血清溶血素抗体滴度水平,能够提高小鼠的体液免疫功能。

表 2 地鳖虫水煎萃取物对小鼠溶血素的影响($n=10, \bar{X} \pm SD$)

Table 2 Effect of *E. sinensis* on the hemolysin of mice

组别 Group	剂量(g/kg/d) Dosage	半数溶血值(HC_{50}) Half of hemolysis values
空白对照组 Negative control	0	99.26 ± 6.12
低剂量组 Low-dosage group	1.89	102.24 ± 5.24
中剂量组 Moderate-dosage group	3.78	104.51 ± 6.09
高剂量组 High-dosage group	7.56	108.95 ± 5.41*

2.3 地鳖虫水煎萃取物对小鼠血清中酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性的影响

如表 3 所示,低、中剂量组小鼠血清中酸性磷酸酶及碱性磷酸酶含量与空白对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);高剂量组血清酸性磷酸酶和碱性磷酸酶含量较空白组有所提高,差异有显著性意义($P<0.05$)。实验结果表明高剂量地鳖虫水煎萃取物对 4 周灌胃小鼠血清酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性有增强作用。

表 3 地鳖虫水煎萃取物对小鼠血清酸性磷酸酶和碱性磷酸酶含量的影响($n=10, \bar{X} \pm SD$)

Table 3 Effect of *E. sinensis* on the acid phosphatase and alkalinity phosphatase activity of mice

组别 Group	剂量(g/kg/d) Dosage	酸性磷酸酶活性 (U/100mL) Acid phosphatase activity	碱性磷酸酶活性 (金氏单位/100mL) Alkalinity phosphatase activity
空白对照组 Negative control	0	5.41 ± 1.23	9.65 ± 2.21
低剂量组 Low-dosage group	1.89	5.51 ± 2.10	8.14 ± 2.95
中剂量组 Moderate-dosage group	3.78	5.98 ± 1.61	10.12 ± 1.84
高剂量组 High-dosage group	7.56	7.75 ± 1.91*	13.24 ± 2.18*

2.4 地鳖虫水煎萃取物对小鼠血清 NO 含量的影响

如表 4 所示,地鳖虫水煎萃取物各组剂量血清 NO 含量均高于空白对照组,即地鳖虫能提高血清 NO 含量水平,并有明显的剂量反应关系。其中,中、高剂量组 NO 含量极显著高于空白对照组($P<0.01$)。

3 讨论

免疫是机体对自身和非自身的识别,并清除大分子物质,从而保持机体内环境平衡的一种生理反应。免疫功能是机体的重要功能,与机体健康息息相关,在机体预防疾病、抗肿瘤、抗衰老和促进患者机体康复等方面具有十分重要的作用。

小鼠碳粒廓清试验是检验单核—巨噬细胞对颗粒状异物吞噬能力的方法之一,血液中碳颗粒的清除率可反映单核吞噬细胞的吞噬功能,因此可间接的反映实验对象的非特异性免疫功能的变

化,吞噬指数越高,单核—巨噬细胞的吞噬功能越强(司传平,1999;冯颖等,2006)。从实验结果可以看出,地鳖虫水煎萃取物对小鼠的非特异性免疫功能具有增强和促进作用。

表 4　地鳖虫水煎萃取物对小鼠血清 NO 含量的影响($n=10$, $\bar{X} \pm SD$)

Table 4　Effect of *E. sinensis* on the serum NO content of mice

组别 Group	剂量(g/kg/d) Dosage	NO 含量(μmol/L) NO content
空白对照组 Negative control	0	10.12 ± 2.63
低剂量组 Low-dosage group	1.89	12.35 ± 2.15
中剂量组 Moderate-dosage group	3.78	15.65 ± 1.51**
高剂量组 High-dosage group	7.56	19.25 ± 2.61**

注:同列数据后标注**表示与蒸馏水空白对照组比较差异极显著($P<0.01$)。

Values in the same column followed by double asterisks means significantly difference at 0.01 level compared to the control group.

体液免疫主要指通过浆细胞分泌的免疫球蛋白凝集沉淀和破坏抗原的作用。通过测定小鼠血清溶血素的含量,可了解是否产生免疫应答及其强弱(郑建仙,1995;司传平,1999;金宗濂,2001)。本研究通过体液免疫试验,发现地鳖虫水煎萃取物具有明显的增加小鼠血清溶血素滴度水平和促进小鼠脾细胞抗体生成的作用。试验结果表明地鳖虫水煎萃取物能够增强小鼠的体液免疫功能,对小鼠的免疫功能有调节作用。

巨噬细胞具有吞噬、杀伤、递呈抗原、分泌生物活性物质、调控局部组织微环境以及抑制肿瘤等多种免疫功能,是机体非特异免疫的重要组成部分。磷酸酶是生物体内重要的解毒酶系,其活性的高低反映了巨噬细胞被激活的程度。NO 是巨噬细胞发挥细胞功能的重要介质和始动因子,参与一系列免疫调节作用(He and Sun,1992;定天明等,2005)。地鳖虫水煎萃取物对小鼠 NO 含量、血清酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性有提高作用,提示地鳖虫能有效保护生物免疫体系,对小鼠的非特异性免疫功能有明显增强作用。

通过本试验的研究,表明地鳖虫具有免疫增强的作用,因而本实验结果为其在功能性食品、医药或其它领域的应用奠定了一定理论基础,同时也为地鳖虫发挥免疫调节作用的分子机制提供了实验依据。

致谢:本研究中部分免疫学试验,在人畜共患病安徽省重点实验室免疫学研究室完成。该重点实验室研究人员提供了非常便利的试验条件,并给予了细致的指导,作者在此表示感谢。

参考文献(References)

定天明,陈坚,张正行,2005. 生物体内一氧化氮的检测方法及其应用. 药学进展,29 (5): 221—226.

冯颖,陈晓鸣,马艳,何钊,2006. 白蜡虫免疫调节作用试验研究. 林业科学研究,19 (2): 221—224.

He HQ, Sun F, 1992. Study on the characteristics of acid and alkaline phosphatases in Chinese shrimp, *Penaeus chinensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 23 (5): 555—560.

金宗濂,2001. 保健食品的功能评价与开发. 北京: 中国轻工业出版社. 102.

李长福,唐庆峰,张瑞昌,吴振廷,吴尚澧,2003. 中华真地鳖生物学特性初步研究. 昆虫知识,40 (3): 258—261.

司传平,1999. 医学免疫学实验. 北京: 人民卫生出版社. 58.

唐庆峰,金涛,吴振廷,王学林,吴尚澧,2004. 中华真地鳖低龄若虫消化道结构及取食习性. 昆虫知识,41 (6): 575—577.

唐庆峰,吴振廷,金涛,王学林,吴尚澧,2006. 地鳖虫活性物质的超临界 CO_2 萃取及其药效. 昆虫知识,43 (3): 375—381.

唐庆峰,吴振廷,王学林,吴尚澧,2005. 地鳖虫人工饲养和食用、药用研究进展. 经济动物学报,9 (1): 57—62.

郑建仙,1995. 功能性食品. 北京: 中国轻工业出版社. 145.

中华人民共和国卫生部,2003. 保健食品检验与评价技术规范. 02—14.

中华人民共和国卫生部药典委员会编,1990. 中华人民共和国药典 (一部). 北京: 人民卫生出版社. 13.

周彦钢,任玉翠,江月仙,1998. 地鳖虫的营养成分分析. 食品研究与开发,19 (2): 51—53.