

· 论 著 ·

一株来源于红树林的淡紫色拟青霉免疫增强活性分析

饶朗毓 裴华 牛莉娜 林英姿

摘要:目的 评价一株来源于海南岛红树林土壤中的淡紫色拟青霉菌株 PH0016 的免疫学活性,探讨红树林真菌在免疫调节方面的应用价值。方法 提取菌株 PH0016 的活性代谢产物,通过动物体内实验对免疫增强活性进行评价,检测项目包括小鼠免疫器官指数、溶血素测定、溶血空斑形成试验、迟发型变态反应(DTH)、巨噬细胞吞噬功能。结果 该菌株提取物能显著增强小鼠 DTH 反应程度($t=2.995$ $P=0.048$)。与对照组比较,实验组小鼠的 HC50 差异具有显著性($t=5.632$ $P=0.000$),其 PFC 水平显著性增高($t=2.854$ $P=0.008$),实验组的吞噬指数显著高于对照组($t=3.268$ $P=0.003$)。结论 这一株来源于红树林的淡紫色拟青霉菌株 PH0016 具有免疫增强活性,值得进一步开发利用。

关键词: 真菌;免疫增强;MIT;淡紫色拟青霉

中图分类号 R379.9 文献标识码 A 文章编号:1009-9727(2012)6-668-03

Immunoenhancement of activity of *Paecilomyces lilacinus* strain. RAO Lang-yu, PEI Hua, NIU Li-na et al. (Department of Pathogenic Biology, Hainan Medical College, Haikou 571101, Hainan P. R. China)

Abstract Objective To evaluate the immunoenhancement of *Paecilomyces lilacinus* strain PH0016 from mangrove soil collected from the sea area in Hainan. Methods The extracts from fermental supernatant of strain PH0016 were measured by using MIT method. Animal experiment were used to evaluate the immunologic functions of the extracts, including detection methods like immune organ index, serum hemolysin HC50, hemolytic pique-forming, delayed-type hypersensitivity (DTH), macrophage phagocytosis. Results Evaluation of the immunologic functions showed that the extract of PH0016 promoted the activities of T, B lymphocyte and macrophage. Conclusions The *Paecilomyces lilacinus* PH0016 possesses immunoenhancement function.

Key words: Fungi; Immunoenhancement; MIT; rDNA ITS; *Paecilomyces lilacinus*

海南岛红树林是生长在热带亚热带海岸以红树植物为主体的潮滩湿地木本生物群落,其特殊的生态环境造就了独特而丰富的微生物类群,同时也可产生大量具有多样化生物学活性的代谢产物。大量研究发现,红树林微生物类群的生物活性包括抗肿瘤、抗菌、抗病毒、降压、酶抑制剂或激活剂等,在医药业、工农业和环境科学的生物防治方面都显示出重要的应用价值,具有长远的开发前景。本课题组自海南岛红树林土壤中筛选出一株淡紫色拟青霉,经 MIT 法检测,其培养上清可在体外促进淋巴细胞的增殖^[1]。在此基础上,对此株淡紫色拟青霉进行了进一步的研究。本文以葡聚糖凝胶层析法提取其代谢产物,并通过动物体内试验进行免疫增强作用的评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株样本 分离自红树林表土下 5~20cm 的土层中的淡紫拟青霉菌株 PH0016^[1]。

1.1.2 试剂及仪器 四氮唑蓝(MIT)、RPM I 1640 培养基、淋巴细胞分离液、二甲基亚砷(DMSO)为

solarbio 公司产品;胎牛血清为杭州四季青生物有限公司产品;葡聚糖凝胶 G-25(TIANGEN 公司);绵羊红细胞(SRBC)、鸡红细胞、补体(豚鼠血清)为本室自配;其他试剂均为进口或国产分析纯;人外周血单核细胞(PBMC)(从健康成人中随机抽取 2mL EDTA-K2 抗凝静脉血液进行分离提取);KM 小鼠(SPF 级)5w 龄,14~17g(购自广东省实验动物中心),购得后饲养 1w 进行免疫学实验;超净工作台(海尔 HRCJ-2D),二氧化碳培养箱(海尔 HRCJ-2D),恒温摇床(美国 NBS Innova44R),恒温培养箱(上海申贤恒温 DHP-240),酶标仪(美国 Thermo MK3),低速台式离心机(TDL-40B-),倒置相差显微镜(日本奥林巴斯 CKX41),PCR 扩增仪(杭州博日 TC-96/T/H)。

1.2 方法

1.2.1 SephadexG-25 层析 取葡聚糖凝胶 G-25 10g 纯水 4℃ 浸泡过夜充分溶胀后装柱(1.6×50cm)。取菌株的发酵上清液 10ml 上样,以双蒸水为洗脱液,洗脱液 140ml,弃去前 10ml 滴液,之后每管收集 7ml,

基金项目 海南省高等学校科学研究项目(No.Hjkj2012-32)

作者单位 海南医学院热带医学与检验医学院病原生物学教研室 海南 海口 571101

作者简介 饶朗毓(1979~)女,硕士,讲师,主要从事热带病原生物学研究。

共 20 管, 分别进行冷冻干燥。冷冻干燥成份再以 MTT 法测定活性。活性最强的一组用于灌胃免疫小鼠进行体内实验。

1.2.2 免疫增强活性评价 随机将小鼠分为正常对照组和实验组, 每组 50 只。实验组按 20mg/kg 以活性成份冻干剂灌胃, 正常对照组灌胃生理盐水, 灌胃体积 0.5mL, 1 次/d, 连续灌胃 10d。

1) 小鼠生长状况和体重及脏器比值的测定 在随机分组后适应性喂养阶段, 对每组小鼠初始体重进行测量, 并观察其进食、活动及精神状态各方面的表现。末次给药后小鼠称重, 断颈处死, 取脾脏用预冷的生理盐水漂洗, 滤纸吸干水分, 称重并计算脾指数^[2]。

$$\text{免疫器官指数} = \frac{\text{免疫器官质量}(mg)}{\text{体质量}(mg)} \times 100$$

2) 诱导迟发型变态反应(DTH) 采用足跖增厚法^[3]。

3) 半数溶血值(HC50)测定 取 2%SRBC 按文献方法进行免疫并测定其 HC50^[4]。

$$\text{样品半数溶血值(HC50)} = \frac{\text{样品的 A 值}}{\text{SRBC 半数溶血的 A 值}} \times \text{稀释倍数}$$

4) 溶血空斑形成试验 采用玻片法^[4]。

5) 巨噬细胞吞噬功能测定 采用鸡红细胞吞噬试验, 按以下公式计算吞噬指数^[5]。

$$\text{吞噬指数} = \frac{100 \text{ 个巨噬细胞吞噬的鸡红细胞总数}}{100}$$

1.3 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。所有数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。不同组别的测试结果进行单因素方差分析和组间的两两比较(SNK 法), 小鼠灌胃前后的体重采用重复测量资料的方差分析, 组间比较采用两样本的 t 检验, 上述分析均采用双侧检验, 以 $\alpha = 0.05$ 为显著性水准。

2 结果

2.1 菌株发酵上清液柱层析 收集 20 管发酵上清进行冷冻干燥后, 以 MTT 法进行活性测定, 实验重复 3 次。20 组的实验数据中, 第 4、5、6 管数值较高, 其余管的数值与阴性对照接近, 取此 3 管结果与阴性、阳性对照结果进行比较。结果显示, 第 6 管与阴性对照组的差异有统计学意义($P=0.000$), 与阳性对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。见图 1。

2.2 PH0016 提取物对小鼠生长状态、体重和脏器指

数的影响 在随机分组后适应性喂养阶段, 观察到各组小鼠进食良好, 活动正常, 精神状态正常。经灌胃 10d 后, 各组小鼠在实验期间进食量、进水量正常, 毛皮光泽、活动良好, 反应敏捷, 精神状态正常, 说明灌胃发酵上清冻干剂对小鼠生长状况无不良影响。灌胃前后实验组小鼠的体重分别为 (15.194 ± 0.997) g 和 (25.598 ± 1.536) g, 与对照组的 (15.642 ± 0.962) g 和 (26.190 ± 1.041) g 比较, 差异无统计学意义($F=0.034$, $P=0.855$); 实验组小鼠的脾脏/体重比值为 0.0060 ± 0.0004 , 与对照组 0.0057 ± 0.0001 比较差异无统计学意义($t=1.878$, $P=0.078$), 说明发酵上清冻干剂对小鼠体重增长和脾脏/体重比值均无影响。

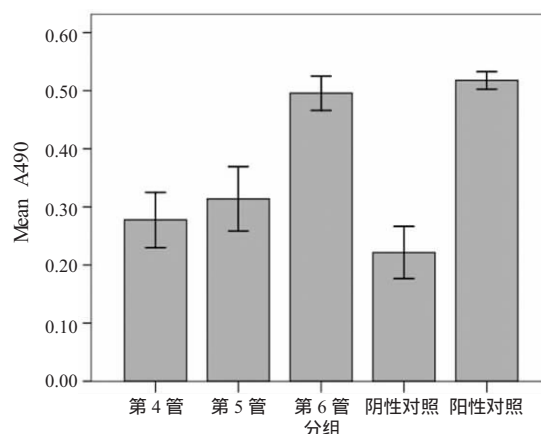


图 1 菌株 PH0016 发酵上清对 PBMC 增殖的影响

Fig 1 Effect of strain PH0016 on proliferation of PBMC

2.3 PH0016 提取物对小鼠免疫应答的影响 经灌胃发酵上清冻干剂的小鼠足跖肿胀度明显高于对照组, 差异具有显著性 ($t=2.995$, $P=0.048$); 实验组小鼠 HC50 与对照组比较差异具有显著性 ($t=5.632$, $P=0.000$); 其 PFC 水平与与对照组比较差异也具有显著性 ($t=2.854$, $P=0.008$), 镜下观察计数吞噬细胞吞噬情况时可见实验组巨噬细胞内的鸡红细胞较多, 经统计学分析显示, 实验组的吞噬指数显著高于对照组 ($t=3.268$, $P=0.003$)。见表 1。

3 讨论

本文选择用葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 来对菌株 PH0016 的发酵上清进行层析, 所获得的提取物再次进行 MTT 法测定对 PBMC 的增殖刺激作用, 经测定发现第 6 管提取物的作用最强($P=0.000$)。可以认

表 1 PH0016 提取物对小鼠免疫功能的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The effect of PH0016 extract on immune function of mice($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	小鼠数 n	足跖肿胀度 Swelling(mm)	HC50	PFC	吞噬指数 Phagocytosis index
实验组 Experimental	15	0.362± 0.036	171.268± 11.669	15.328± 1.617	1.374± 0.073
对照组 Control	15	0.321± 0.020	148.762± 10.166	13.541± 1.808	1.116± 0.298

为,菌株 PH0016 的免疫增强活性代谢产物主要存在于第 6 管中。因此,在此后的动物体内试验中,均采用第 6 管提取物作为样品对 KM 小鼠进行灌胃饲服,以生理盐水作为阴性对照,所选择的试验方法基本上按卫生部《保健食品检验与评价技术规范》增强免疫力功能检验方法进行。本文主要选择研究样品对 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和巨噬细胞是否具有功能增强效应来进行,检测项目包括小鼠体重和脏器指数变化、小鼠迟发型变态反应、半数溶血值(HC50)测定、溶血空斑形成试验、巨噬细胞吞噬功能,以上检测项目基本包括了特异性免疫应答和非特异性免疫应答的代表性检测指标^[6,7]。

实验结果显示,灌胃前实验组小鼠的体重与对照组间比较,差异无统计学意义($P=0.332$),灌胃后两组小鼠的体重比较差,差异亦无统计学意义($P=0.324$),灌胃后实验组和对对照组小鼠的脾脏指数比较差异无统计学意义($P=0.078$),而对于几种 T、B 淋巴细胞和巨噬细胞都可产生明显的增强效应,DTH 诱导实验显示实验组小鼠足跖肿胀度显著大于对照组($P=0.001$),HC50 和 PFC 形成试验也证明 PH0016 提取物可显著增加 B 淋巴细胞的功能($P=0.000$),经样品灌胃后的小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能亦比对照组显著增强($P=0.008$)。可以初步判定,菌株 PH0016 的提取物具有免疫增强功能。

目前主要关注于国内外关于淡紫拟青霉的研究主要关注于其在生物防治中的作用,大量文献报道,淡紫拟青霉对大豆孢囊线虫、多种植物上的根结线虫、蛔虫卵、荔枝蝽象成虫等具有毒杀作用,已经开始应用于农业和医学的寄生虫防治过程^[8]。而拟青霉属的其他菌种也已被研究证实具有多样化的生物学作用,如羽拟青霉对 G^+ 菌具有抗性,古尼拟青霉菌丝提取物具有镇痛、增强睡眠、保护心脑血管、改善记忆等功能,爪哇拟青霉具有抗衰老、抗氧化、免疫刺激等多种生理功能,蝉拟青霉是传统的主要中药,具有镇静、镇痛、抗肿瘤、抗辐射、抗惊厥、解热和改善脂类物质代谢及保护脏器组织等作用^[9,10]。通过本文的研究,已经初步证实从海南演丰红树林土壤中分离出来的这一株淡紫色拟青霉菌具有增强免疫活性的功能。但是,本研究仅以葡聚糖凝胶层析粗提的菌株代谢产物来进行检测,究竟这其中是什么物质在发挥效应,又是通过那一种途径或机制来增强以上免疫细胞的功能,都未完全阐明。本课题组今后将继续对菌株 PH0016 的活性代谢产物进一步的进行纯化,通过薄层层析、质谱分析等手段明确其组分和结构,并更详细地研究

其对于免疫系统的作用机制,以进一步开发拟青霉菌在免疫调节、生物防治等方面的应用价值。

参考文献:

- [1] Rao LY, Chen ZL, Pei H et al. Screening and identification of a mangrove fungus possessing immunoenhancement activity [J]. China tropical medicine 2011, 11(6): 683-685. (In Chinese)
(饶朗毓, 陈政良, 裴华, 等. 一株具免疫增强活性红树林真菌的筛选及鉴定[J]. 中国热带医学 2011, 11(6): 683-685.)
- [2] Yi JE, Yuan LY, Wen LX et al. Effects of Betulinic Acid on Lymphocyte and Macrophage in Mice [J]. Chin J Animal and Veterinary Sciences 2011, 42(1): 124-130. (In Chinese)
(易金娥, 袁莉芸, 文利新, 等. 桦木酸对小鼠淋巴细胞及巨噬细胞的影响分析[J]. 畜牧兽医学报. 2011, 42(1): 124-130.)
- [3] Ministry of Health of the People's Republic of China. Technical standards for testing & assessment of health food (2003)[S]. 2003: 22-28. (In Chinese)
(卫生部卫生法制与监督司. 保健食品检验与评价技术规范(2003 年版)[S]. 2003: 22-28.)
- [4] Zheng PY, Yi AC, Hu YH. Effect of Songhuang granules on delayed allergy and serum HC (50) in mice [J]. Central South Pharmacy, 2009, 7(8): 586-589. (In Chinese)
(郑平原, 易爱纯, 胡咏华. 松黄颗粒对小鼠迟发型变态反应及血清半数溶血值影响的实验研究[J]. 中南药学 2009, 7(8): 586-589.)
- [5] Si CP. Experiment Guidelines of Medical Immunology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House 2006: 71-72. (In Chinese)
(司传平. 医学免疫学实验[M]. 北京: 人民卫生出版社. 2006: 71-72.)
- [6] Chen WF. Medical Immunology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House 2006: 152. (In Chinese)
(陈慰峰. 医学免疫学(第 4 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社. 2006: 247-251.)
- [7] He ZY, Hu GX, Wang CF. Animal Immune experiment technology [M]. Changchun: Jilin. Science and Technology Publishing House, 2002. (In Chinese)
(何昭阳, 胡桂学, 王春风. 动物免疫学试验技术[M]. 长春: 吉林. 科学技术出版社. 2002.)
- [8] Han YF. Studies on the systematics of the genus Paecilomyces Bainier in China and the Pathogenicity of some isolates [D]. Ph. D dissertation in Guizhou University. 2007. (In Chinese)
(韩燕峰. 中国拟青霉属的系统学及部分菌株的致病性研究[D]. 贵州大学博士研究生学位论文. 2007.)
- [9] Huang JJ, Wang JK. Discovery, development and expectation of Paecilomyces Gunni[J]. Guizhou medical J 2002, 26(5): 477-479. (In Chinese)
(黄家君, 王建科. 古尼拟青霉的发现、发展现状及展望[J]. 贵州医药. 2002, 26(5): 477-479.)
- [10] Yang JZ, Zhuo J, Chen BK. Regulating effects of Paecilomyces cicae polysaccharides on immunity of aged rats[J]. China Journal of Chinese Materia Medica 2008, 33(3): 292-295. (In Chinese)
(杨介钻, 卓佳, 陈柏坤, 等. 蝉拟青霉多糖对老年大鼠免疫功能的调节作用[J]. 中国中药杂志 2008, 33(3): 292-295.)

收稿日期 2012-03-15 编辑 符式刚