

壳聚糖对动物免疫调节作用的研究进展

史彬林

(内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 壳聚糖是一种天然、绿色的环保高分子物质, 具有可生物降解性、可食用性及生物相容性等特点, 且安全无毒, 对环境无公害。许多研究表明, 壳聚糖对动物机体免疫功能具有多方面的调节作用, 既可有效提高非特异性免疫功能, 也可对特异性免疫功能产生调节作用, 并且存在剂量效应。在机理研究方面, 目前的研究报道较少, 且多为体外免疫细胞培养试验。从现有的报道看, 壳聚糖调节免疫功能的机理可能是通过调控免疫细胞一氧化氮和花生四烯酸的生成等途径来实现的。

关键词: 壳聚糖; 免疫功能; 一氧化氮; 花生四烯酸; 调节机理

中图分类号: S852.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-5130(2007)04-0057-03

壳聚糖是由甲壳素脱乙酰基后生成的一种天然来源的碱性多糖, 主要来自海生动物, 如虾、蟹等的外壳。我国内河、湖泊多, 海域大, 甲壳动物资源非常丰富, 每年废弃的虾、蟹壳就有数千万吨, 这是生产甲壳素和壳聚糖的重要来源。壳聚糖不仅来源丰富, 提取工艺也较为简单易行。壳聚糖作为一种天然、绿色的环保高分子物质, 具有可生物降解性、可食用性及生物相容性等特点, 且安全无毒, 对环境无公害。已有研究表明^[1-3], 壳聚糖具有抗菌活性, 并可提高动物的免疫功能, 具有很好的免疫调节作用。因此, 将其开发为一类增强畜禽免疫功能、提高畜禽抗病和抗感染能力的饲料添加剂, 对于防治畜禽疾病, 保证畜产品的安全和我国畜牧业可持续发展, 具有重大意义。目前, 已有较多资料表明壳聚糖具有促进动物机体免疫功能的作用, 但对其免疫调节机理的研究鲜见报道。现就壳聚糖对动物免疫功能的影响及其可能机制综述如下。

1 壳聚糖对动物免疫功能的影响

药理学研究表明, 壳聚糖可用作促进伤口愈合和抑制肿瘤生长的药物。Bianco 等^[4]研究发现, 壳聚糖可使创伤部位的嗜中性白细胞和巨噬细胞活化, 刺激多核和单核细胞迁移, 加速邻近组织再生和血管形成, 从而促进伤口愈合。此外, 壳聚糖还具有抗肿瘤作用。Peluso 等^[5]认为, 壳聚糖可使巨噬细胞活化, 一方面直接吞噬肿瘤细胞, 另一方面也可促进巨噬细胞分泌一氧化氮(NO)、IL-1、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和

活性氧等可扩散的细胞毒分子, 从而间接地溶解肿瘤细胞。

壳聚糖可用作免疫增强剂, 提高机体对传染病的抵抗力。其分子结构中的氨基可被机体免疫系统识别, 在一定程度上激活巨噬细胞, 刺激血液循环中抗体的产生^[6]。Kosaka 等^[7]在狗的皮下埋植壳聚糖, 结果发现, 埋植壳聚糖的试验组在埋植后 24~96 h 内, 其血液中白细胞, 尤其是嗜中性粒细胞的数量增加。对照组手术后 24~120 h 内巨噬细胞活性显著减少, 而埋植壳聚糖的试验组却保持较高的巨噬细胞活性, 说明壳聚糖可以防止外科手术造成的免疫抑制, 是一种有效的免疫增强剂。Jabbal-Gill 等^[8]在给小鼠进行滴鼻免疫时, 疫苗中添加了壳聚糖, 结果提高了血清 IgG 和呼吸道分泌型 IgA (sIgA) 的水平, 但单独滴注壳聚糖没有效果。可见, 在滴鼻免疫时壳聚糖起到免疫佐剂的作用, 既促进体液免疫反应, 也促进黏膜免疫反应。

除非肠道给药方式外, 研究者还通过使动物口服壳聚糖(饲喂或灌胃)的方式研究壳聚糖对动物免疫功能的影响。对小鼠的研究表明, 壳聚糖灌胃处理可使小鼠的胸腺指数和脾脏指数增高, 细胞免疫、体液免疫、单核-巨噬细胞功能和自然杀伤(NK)细胞活性增强^[9]。Lim 等^[10]曾就壳聚糖等四种日粮纤维对大鼠肠道免疫功能指标的影响进行了研究, 结果发现, 饲喂壳聚糖的大鼠与饲喂纤维素的大鼠相比, 其肠系膜淋巴结(MLN)中淋巴细胞的免疫球蛋白 A (IgA)、免疫球蛋白 G (IgG) 和免疫球蛋白 M (IgM) 含量较高, 而免疫球蛋白 E (IgE) 含量较低, 说明日粮中壳聚糖对大鼠肠道免疫系统具有免疫调节作用。研究也表明^[11], 饲喂甲壳素和壳聚糖均可提高绵羊红细胞诱导的小鼠迟发型变态反应能力, 增强小

收稿日期: 2006-03-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(30660130)。

作者简介: 史彬林(1964-), 男, 教授, 博士。

[15] 李余动, 张少恩, 吴志刚, 等. 胶体金免疫层析法快速检测氯霉素残留[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(5): 416-419.

[16] 徐美奕, 孟庆勇. 养殖对虾中氯霉素残留的放射免疫分析[J]. 食品科学, 2003, 24(12): 110-112.

[17] 黄小蓉, 郑晶, 杨方, 等. 放射性受体免疫分析方法快速筛检烤鳗中氯霉素残留[J]. 水产养殖, 2003, 24(4): 16-18.

[18] 潘莹宇, 许茜, 康学军, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定牛奶中氯霉素的残留量[J]. 色谱, 2005, 23(6): 577-580.

[19] Agüi L, Guzmán A, Yáñez-Sedeño P, et al. Voltammetric determination of chloramphenicol in milk at electrochemically activated car-

bon fibre microelectrodes [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 461: 65-73.

[20] Rincken T, Riik H. Determination of antibiotic residues and their interaction in milk with lactate biosensor [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2006, 66: 13-21.

[21] Dumont V, Huét A C, Traynor I, et al. A surface plasmon resonance biosensor assay for the simultaneous determination of thiamphenicol, florefenicol, florefenicol amine and chloramphenicol residues in shrimps [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 567: 179-183.

鼠的血清溶血素抗体反应和巨噬细胞的吞噬反应。

此外,研究还发现,壳聚糖对动物免疫功能的影响与其添加剂量有关。吕中明等^[12]每天分别以0, 33.3, 333.3和1 000 mg/kg体重的剂量给小鼠连续灌胃21 d,发现用中、高剂量壳聚糖处理的小鼠,其迟发型变态反应、血清溶血素反应和单核-巨噬细胞的吞噬功能均显著增强。朱珂等^[13]观察了口服壳聚糖对运动员免疫系统的影响,发现小剂量长期服用壳聚糖可使运动员安静状态下的自然杀伤细胞(NK)活性缓慢增强,有利于提高运动员机体的抗病力,但对血清免疫球蛋白(IgG、IgA和IgM)含量无明显影响。朱立贤等^[14]研究了日粮中添加不同水平壳聚糖(0, 200, 600, 1 000 mg/kg)对1、2周龄肉仔鸡免疫指标的影响。结果发现,壳聚糖能增强肉仔鸡的免疫机能,添加600 mg/kg处理组的法氏囊、脾脏指数显著高于对照组,而新城疫抗体水平以200 mg/kg处理组最高。壳聚糖还可有效降低肉仔鸡感染大肠杆菌的死亡率,其中以添加200 mg/kg效果最明显。史彬林等^[15]的试验结果也表明,壳聚糖对肉仔鸡生长和免疫的影响具有剂量效应。

2 壳聚糖的免疫调控机制

目前,关于壳聚糖促进免疫功能的确切作用机制尚不清楚,相关的研究报道也甚少。从现有极为鲜见的研究报道看,可能通过以下途径对免疫细胞产生影响。

2.1 通过调控诱导型NO合成酶(iNOS)的活性,影响免疫细胞NO的生成,进而调节免疫功能

NO是新发现的一种重要的信使分子,广泛存在于动物机体的组织细胞中,具有重要的生理活性作用。NO由细胞内的NO合成酶(NOS,包括组成型一氧化氮合成酶cNOS和诱导型一氧化氮合成酶iNOS)催化L-精氨酸进行氧化脱氨基作用而生成。过去十余年的研究发现,巨噬细胞的许多作用如细胞毒作用、抗菌作用和肿瘤杀伤作用等均与其合成的NO有关。某些细胞因子、微生物及微生物代谢产物可促进iNOS的表达,进而使巨噬细胞的NO产生量增加。通过与DNA、蛋白质和脂类发生反应,NO破坏细胞的正常功能,从而发挥其细胞毒作用。由于NO的细胞毒作用是非特异性的,其过量产生也可能对机体有害。对哺乳动物的研究发现^[16],NO的大量产生会抑制淋巴细胞增殖,而降低iNOS的活性可缓解这种抑制作用。然而,Takahashi等^[17]以肉仔鸡为对象研究发现,NO产生量的增加并不一定会导致脾淋巴细胞转化率的下降。Liew^[18]认为,NO既可增强也可抑制T淋巴细胞的功能,其作用与NO浓度有关。之后,Badovinac等^[19]也研究发现NO对淋巴细胞增殖的作用与浓度有关,低浓度能刺激淋巴细胞增殖,而高浓度则抑制增殖。此外,NO还是可溶性鸟苷酸环化酶的激动物,后者催化cGMP的生成,并继而活化蛋白激酶G^[20]。目前大多数研究集中在iNOS的表达对NO释放的调控方面,但是由于L-精氨酸是iNOS和精氨酸酶的共同底物,前者催化L-精氨酸转化为L-瓜氨酸和NO,而后者催化L-精氨酸转化为L-鸟氨酸和尿素,因此,除iNOS之外,精氨酸酶对于NO的产生也具有一定的调节作用,抑制精氨酸酶的活性可以促进LPS活化的巨噬细胞NO的产生。NO与cGMP二者之间有着较密

切的关系。NO激活可溶性鸟苷酸环化酶(sGC),升高细胞内cGMP水平,这是NO多种生物效应的主要信号传导机制。在试验中,组织cGMP水平有时作为反映组织NO浓度的一个间接指标,前者是作为细胞内信使,而后者主要是作为一个细胞间信使^[21]。

迄今为止,已有许多关于多糖影响淋巴细胞尤其是巨噬细胞中NO含量的报道。Nose等^[22]报道,甘草多糖能促进体外培养的巨噬细胞分泌NO。侯敢等^[23]观察了猪苓多糖对小鼠腹腔巨噬细胞NO生成和诱导型NO合成酶(iNOS)的影响,发现猪苓多糖对小鼠腹腔巨噬细胞NO生成具有明显的促进作用,认为猪苓多糖可能诱导巨噬细胞iNOS从头合成,促进巨噬细胞NO生成。王瑾雯等^[24]研究了云芝多糖促进巨噬细胞分泌NO的机制,发现云芝多糖能促进NO合成酶基因的表达,使mRNA转录和蛋白质合成增加。Porporatto等^[25]研究了壳聚糖对大鼠巨噬细胞NO及诱导型NOS(iNOS)的影响,结果发现,0.05%~0.1%壳聚糖体外处理巨噬细胞可显著增加培养液中的NO含量,尤以0.1%处理组含量最高。同时发现,壳聚糖处理使iNOS的表达略有提高。因此,壳聚糖促进NO合成的机制可能是通过促进诱导型NO合成酶的基因表达,使其合成增加,进而促进NO的合成与分泌。此外,Peluso等^[5]也发现,壳聚糖可刺激大鼠巨噬细胞,增加NO的分泌量。史彬林^[26]在体外条件下研究发现,壳聚糖对肉仔鸡脾淋巴细胞诱导型NO合成酶(iNOS)及NO的生成具有影响,呈现剂量依赖效应,但确切的分子机理尚待研究。

2.2 通过调控磷脂酶A₂(PLA₂)的活性,影响免疫细胞花生四烯酸(AA)的生成,进而调节免疫功能

PLA₂因具有多种生物学作用而受到学者们的广泛关注,除具有消化食物、降解入侵的微生物之外,还被认为在细胞信号传导机制中起核心作用^[27]。细胞膜磷脂在PLA₂催化作用下可以释放花生四烯酸。而机体内的类二十烷酸就是由花生四烯酸在环氧化酶(COX)和脂氧化酶作用下产生的一系列激素类物质。其中,通过环氧化酶途径,AA转化为前列腺素E₂(PGE₂)等,而通过脂氧化酶途径,AA则转化为白细胞三烯B₄(LTB₄)、氢过氧化二十碳四烯酸和脂毒素。这些激素类物质在生物体内起着重要作用,其中PGE₂和LTB₄具有重要的免疫调节作用。PGE₂是免疫细胞功能的重要调节物,能调节炎症反应及免疫反应的强度和持续时间,并对淋巴细胞分化有重要的调节作用,诱导未成熟的胸腺细胞分化为成熟T细胞。此外,PGE₂还能调节T、B淋巴细胞及自然杀伤细胞和巨噬细胞的功能。LTB₄主要由嗜中性细胞和巨噬细胞产生,为目前已知最强的白细胞趋化因子,是I型变态反应中的重要介质^[28]。

Bianco等^[4]研究发现,壳聚糖能通过影响AA的释放来活化巨噬细胞,并以剂量和时间依赖方式促进AA的释放。当壳聚糖水平低于0.01%(w/v)时,鼠巨噬细胞外无AA释放,在0.01%~0.05%范围内,随着壳聚糖水平提高,膜磷脂向细胞外释放AA的量在增加,而在0.05%以上则无显著变化。此外,随着处理时间的延长,AA的释放量在增加。可见,壳聚糖对巨噬细胞AA的释放具有剂量和时间依赖性。研究者还

发现,壳聚糖对经过细菌脂多糖(LPS)刺激的巨噬细胞作用更加明显。另外,Chou等^[2]研究了壳聚糖对LPS处理的RAW264.7巨噬细胞的环氧酶途径和细胞因子产生的影响,结果首次发现壳聚糖可显著抑制PGE₂的过量产生及环氧酶-2(COX-2)蛋白的表达和活性,同时减少促炎症细胞因子如TNF- α 和IL-1 β 等的产生,而促进抗炎因子IL-10的形成。这一研究结果提示,日粮壳聚糖可能对动物的免疫应激反应有缓解作用。史彬林等^[26]以肉仔鸡为试验动物研究了壳聚糖对机体免疫应激的影响,结果发现,日粮中添加适宜剂量的壳聚糖对肉仔鸡的免疫应激反应有一定的缓解作用,但确切的分子机理尚待进一步研究探索。

3 结语

综上所述,壳聚糖对动物机体免疫功能具有多方面的调节作用,既可有效提高非特异性免疫功能,也可对特异性免疫功能产生调节作用,并且存在剂量效应。在机理研究方面,目前的研究报道较少,且多为体外免疫细胞培养试验。从现有的报道看,壳聚糖调节免疫功能的机理可能是通过调控免疫细胞一氧化氮和花生四烯酸的生成等途径来实现的。

参考文献:

- [1] Seferian PG, Martinez ML. Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations [J]. *Vaccine*, 2000, 19: 661-668.
- [2] Chou TC, Fu E, Shen EC. Chitosan inhibits prostaglandin E2 formation and cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 308(2): 403-407.
- [3] 王磊, 万荣峰, 张宗和, 等. N,O-羧甲基壳聚糖对AA肉鸡免疫机能的影响 [J]. *畜牧与兽医*, 2006, 38(5): 11-14.
- [4] Bianco ID, Balsinde J, Beltramo DM, et al. Chitosan-induced phospholipase A₂ activation and arachidonic acid mobilization in P388D₁ macrophages [J]. *FEBS Letters*, 2000, 466: 292-294.
- [5] Peluso G, Petillo O, Ranieri M, et al. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials* [J]. 1994, 15(15): 1215-1220.
- [6] Tokura S, Tamura H, Azuma I. Immunological aspects of chitin and chitin derivatives administered to animals [J]. *EXS*, 1999, 87: 279-292.
- [7] Kosaka T, Kaneko Y, Nakada Y, et al. Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress [J]. *J Vet Med Sci*, 1996, 58(10): 963-967.
- [8] Jabbal-Gill I, Fisher AN, Rappuoli R, Davis SS, et al. Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin and recombinant pertussis toxin after nasal administration with chitosan in mice [J]. *Vaccine*, 1998, 16(20): 2039-2046.
- [9] 雷朝亮, 钟昌珍, 宗良炳, 等. 蝇蛆几丁糖的免疫调节作用研究 [J]. *华中农业大学学报*, 1997, 16(3): 259-262.
- [10] Lim BO, Yamada K, Nonaka M, et al. Dietary fibers modulate indices of intestinal immune function in rats [J]. *J Nutr*, 1997, 127(5): 663-667.
- [11] 黄俊明, 吴丽明, 陈瑞仪. 甲壳素和壳聚糖对小鼠免疫调节的研究 [J]. *广东卫生防疫*, 1999, 25(1): 4-6.
- [12] 吕中明, 石根男, 陈新霞, 等. 壳聚糖免疫调节作用的研究 [J]. *实用预防医学*, 2001, 8(5): 330-332.
- [13] 朱珂, 冯炜权, 武桂新, 等. 服用壳聚糖对运动员免疫系统的影响 [J]. *中国运动医学杂志*, 2002, 21(1): 33-36.
- [14] 朱立贤, 宋志刚, 林海, 等. 壳聚糖对肉仔鸡生长与免疫功能的影响研究 [J]. *中国饲料*, 2003, (4): 15-17.
- [15] 史彬林, 李德发, 朴香淑. 壳聚糖对肉仔鸡生长性能和免疫功能的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2005, 41(1): 9-11.
- [16] Mills CD. Molecular basis of 'suppressor' macrophages: Arginine metabolism via the nitric oxide synthase pathway [J]. *J Immunol*, 1991, 146: 2719-2723.
- [17] Takahashi K, Orihashi M, Akiba Y. Dietary L-arginine level alters plasma nitric oxide and alpha-1 acid glycoprotein concentrations, and splenocyte proliferation in male broiler chickens following *Escherichia coli* lipopolysaccharide injection [J]. *Comp Biochem Physiol Part C*, 1999, 124: 309-314.
- [18] Liew FY. Regulation of lymphocytes function by nitric oxide [J]. *Curr Opin Immunol*, 1995, 7: 396-400.
- [19] Badovinac V, Trajkovic V, Mostarica-Stojkovic M. Nitric oxide promotes growth and major histocompatibility complex-unrestricted cytotoxicity of interleukin-2-activated rat lymphocytes [J]. *Scand J Immunol*, 2000, 52(1): 62-70.
- [20] 张树政. 糖生物学与糖生物工程 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2002.
- [21] 钟慈声, 孙安阳. 一氧化氮的生物医学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1997.
- [22] Nose M, Terawaki K, Oguri K, et al. Activation of macrophages by crude polysaccharide fractions obtained from shoots of *Glycyrrhiza glabra* and hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis* in vitro [J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21(10): 1110-1112.
- [23] 侯敢, 黄迪南, 祝其锋. 猪苓多糖对小鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮生成的影响及其机理 [J]. *中国老年学杂志*, 2000, 20(4): 233-235.
- [24] 王瑾雯, 陈瑗, 周玫, 等. 云芝多糖对巨噬细胞氧化LDL的抑制作用与iNOS基因表达 [J]. *第一军医大学学报*, 1999, 19(4): 25-28.
- [25] Porporatto C, Bianco ID, Riera CM, et al. Chitosan induces different L-arginine metabolic pathways in resting and inflammatory macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 304(2): 266-272.
- [26] 史彬林. 壳聚糖对肉仔鸡生长性能和免疫功能的影响及其机理的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [27] Balsinde J, Barbour SE, Bianco ID, et al. Arachidonic acid mobilization in P388D₁ macrophages is controlled by two distinct Ca²⁺-dependent phospholipase A₂ enzymes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 11060-11064.
- [28] Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function. *Advan Enzyme Regul*, 1997, 37: 197-237.