

蕈状芽孢杆菌代谢产物增强小鼠免疫力活性物质的分离、鉴定

王高学* 高鸿涛 付维法 崔 婧 袁 明

(西北农林科技大学动物科技学院 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 本文的目的是对蕈状芽孢杆菌代谢产物中增强小鼠免疫力的物质进行分离、鉴定和免疫增强作用测定。在生物活性追踪的指导下,本文通过大孔吸附树脂吸附、硅胶柱分离和葡聚糖凝胶柱纯化,对蕈状芽孢杆菌代谢产物中增强小鼠免疫力的活性成分进行了分离,得到了具有较强免疫增强作用的化合物(标记为M),并对化合物M进行了波谱测定,确定化合物M为环(脯氨酸-甘氨酸)二肽($C_7H_{10}O_2N_2$)。以生理盐水为对照,通过腹腔注射,对小鼠进行了SOD活性、白细胞吞噬活性、白细胞杀菌活性3个指标测定。结果显示,在第14天时,SOD活性和白细胞吞噬活性达到了最高值,且同对照组相比有显著提高;在第21天时,白细胞杀菌活性达到了最高值,且同对照组相比有显著提高。以上结果表明,蕈状芽孢杆菌代谢产物中的环(脯氨酸-甘氨酸)二肽能够显著增强小鼠免疫力。

关键词: 环(脯氨酸-甘氨酸)二肽,免疫增强剂,蕈状芽孢杆菌,分离纯化,鉴定

Isolation and Identification of the Immunopotentiating Compound Prepared from the Metabolites of *Bacillus Mycoides*

WANG Gao-Xue* GAO Hong-Tao FU Wei-Fa CUI Jing YUAN Ming

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: An immunopotentiating compound has been isolated from the metabolites of *Bacillus mycoides* under the bioassay-guided isolation and identification for its immunopotentiating effect and chemical structure. The isolation and purification of the compound were consisted of macroporous adsorptive resins, silica-gel chromatographic column and Sephadex G-200 chromatographic column. The immunopotentiating effect was assayed in every step isolation. At last, the only substance having the strongest immunopotentiating effect had been isolated and purified. Through the procedure consisting of Ultra-Violet spectroscopy (UV), IR (Infrared Radiation), Time of Flight Mass Spectrum (TOF-MS), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Element analysis, the possible structure of compound M had been identified as cyclic (Pro-Gly) dipeptide ($C_7H_{10}O_2N_2$) (Diketopiperazine). To be determined the immunopotentiating effect, the mice were treated

by intraperitoneal injection of cyclic (Pro-Gly) dipeptide in the treatment group and physiologic saline in the control group. At the 14th day after the injection, the SOD activity and the phagocytosis activities reached the peak value and were significantly higher than those in control group. At the 21st day, the bactericidal activity reached peak value and was significantly higher than that in the control group. From the above results, we concluded that the main active component enhancing the immunity of mice was cyclic (Pro-Gly) dipeptide in the metabolism of *Bacillus mycoides*.

Keywords: Cyclic (Pro-Gly) Dipeptide, Immunopotentiator, *Bacillus mycoides*, Isolation & Purification, Identification

免疫增强剂是一类单独使用或与抗原同时使用的通过非特异性途径增强机体免疫应答的物质, 它可增强机体的免疫系统功能, 缓解由环境造成的免疫功能紊乱, 有利于预防和治疗传染性疾病, 所以, 用免疫增强剂来增强免疫力从而提高机体抗微生物感染的能力是一种较为有效的方法。免疫增强剂来源包括植物、动物和微生物, 其中微生物来源的免疫增强剂包括: 多糖类, 如香菇多糖(Lentinan)^[1]、分支杆菌多糖(Mycobacterial polysaccharides)^[2]以及酵母多糖(Zymosan)^[3]; 肽类, 胞壁酰二肽(muramyl-dipeptide)^[4]。蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*)又称为腊状芽孢杆菌蕈状变种, 属于芽孢杆菌属蜡状芽孢杆菌亚种^[5]。前期研究发现, 蕈状芽孢杆菌代谢产物能够增强小鼠、鲫鱼的免疫功能^[6,7]。为了确定其代谢产物中的免疫增强活性成分, 本文以小鼠为检测动物模型, 结合活性跟踪指导下的分离技术, 对发酵液进行离心、大孔树脂吸附浓缩、硅胶柱层析、Sephadex 柱层析及重结晶, 获得代谢产物中免疫增强活性成分, 并通过波谱分析进行了化学结构鉴定, 为进一步利用该菌提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及试验动物: 蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*), 由西北农林科技大学资源与环境学院来航线教授提供; 人源型金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由本试验室保存。昆明系小白鼠购于第四军医大学实验动物中心, 平均体重(18.7±0.6) g。微生物培养基: 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, KH₂PO₄ 0.5 g, 蒸馏水 1 L。

1.1.2 试剂及器材: SOD 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所), MEM 培养基(Gibco), MTT(Sigma), 淋巴细胞分离液(上海华精生物高科技有限公司),

0.4%台盼蓝溶液(Sino-American Biotec), Hanks 液自己配制。

TU-1800 紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), Sephadex G-200(Pharmacia Co., Ltd. Swedish), 飞行时间质谱仪(American HP), Nicolet AVATAR 360 FT-IR 型红外光谱仪(American Nicolet), Varian Mercury 300 BB 型核磁共振仪(American VARIAN), Bruker AM 400 超导核磁共振仪(American Bruker), Perkin Elmer 240C 元素分析仪(American, Innov-X), 其它均为常用仪器和分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 蕈状芽孢杆菌代谢产物的分离纯化: 将蕈状芽孢杆菌种子液接种于 20 L 发酵罐发酵 5 d, 发酵液于 4°C、6000 r/min 离心 10 min, 取上清液过滤, 滤液经大孔吸附树脂 LSA-10 吸附, 甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液, 减压蒸馏, 浓缩, 获得浸膏。浸膏经过一级硅胶柱层析梯度洗脱, 流动相为乙酸乙酯-甲醇(1: 0、4: 1、3: 2、1: 2 和 0: 1)和水, 各流分经硅胶薄层层析(TLC)分析, 合并流分为 A、B、C、D、E、F 六个流分组。各流分组以小鼠为试验动物进行免疫增强活性各指标测定。活性跟踪分析显示, 流分 B 免疫增强活性最高。

对 B 流分进一步进行二级硅胶柱层析分离, 以乙酸乙酯-甲醇(10: 1、8: 1、6: 1、3: 2)作为洗脱系统进行梯度洗脱, 通过 TLC 分析, 合并流分后得 B1、B2、B3、B4、B5、B6 6 个流分组。活性跟踪测定显示, B3 流分组免疫增强活性最高; 进一步对 B3 流分组进行 Sephadex LH20 柱三级分离, 用(pH 6.0) 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液预先平衡, 并用此缓冲液洗脱, 获得晶体物质 M, 进一步重结晶, 纯化后进行免疫增强活性测定和结构鉴定。

1.2.2 试验动物分组及处理: 将昆明系的小白鼠随

机分组, 每组 12 只, 同等条件下饲养管理。活性跟踪分离过程中, 注射剂量为 0.5 mg/kg 体重。测定 M 组的免疫增强活性时, 根据预试验结果, 共分为 5 个梯度(以小鼠体重计): M_1 0.125 mg/kg、 M_2 0.25 mg/kg、 M_3 0.5 mg/kg、 M_4 1 mg/kg 和 M_5 2 mg/kg。采用腹腔注射, 对照组注射同剂量的生理盐水。以注射前 1 天为第 0 天, 在第 0、7、14、21、28 天, 对小鼠进行采血, 测定各免疫指标。

1.2.3 白细胞悬液制备: 小鼠摘眼球采血, 参照朱立平等^[8]的方法, 取 0.5 mL 肝素抗凝血缓慢沿管壁平铺于含 0.8 mL 白细胞分离液的离心管中, 2500 r/min 离心 15 min, 缓慢吸取 0.5 mL 的白细胞层移入另一离心管, 加入 4 倍体积(2 mL)的 Hanks 液与其混匀, 于 2000 r/min 离心 10 min, 弃上清液 1 mL, 补加 1 mL Hanks 混匀, 重复 1 次, 混匀(细胞浓度约为 1×10^7 CFU/mL), 并利用台盼蓝拒染试验, 检测白细胞活率, 活细胞不少于 90% 方可进行试验。

1.2.4 SOD 活性测定: 参照 SOD 试剂盒说明, 紫外分光光度计测定 OD 值, 测量重复 3 次, 结果取 3 次测量值的平均值, 计算 SOD 活性。

1.2.5 白细胞吞噬活性的测定: 取上述制备的白细胞悬液, 参照文献^[9]的方法加以修改, 进行白细胞吞噬活性的测定。取 3 支离心管, 分别加入 150 μ L 上述制备的白细胞液, 再加入 0.5 mL Hanks 液和 80 μ L 金黄色葡萄球菌液(10^8 CFU), 根据预试验结果, 37°C 温箱中孵育 45 min, 2000 r/min 离心 10 min, 弃 300 μ L 上清液, 补加 300 μ L Hanks 液, 重复 1 次。加入 0.8 mL Tween-20, 静置 2 min, 加入 1 mL MEM, 37°C 水浴摇床孵育 14 h。每管加入 80 μ L MTT, 继续振荡孵育 2 h, 2000 r/min 离心, 弃上清, 加入二甲基亚砷 1 mL, 摇匀, 570 nm 测定 OD 值, 重复 3 次, 取 3 次测量值的平均值。

1.2.6 吞噬细胞杀菌活性的测定: 取上述制备的白细胞悬液, 参照文献^[13]的方法加以修改, 进行杀菌活性的测定。取 4 组离心管, 每组 3 只, 每管加入 100 μ L 上述白细胞液和 80 μ L 金黄色葡萄球菌液(10^8 CFU), 于 37°C 水浴分别孵育 0、30 min、60 min、90 min 后, 分别加入 0.8 mL Tween-20, 静置 2 min 后, 再加入 1.5 mL MEM, 混匀, 置 4°C 冰箱 30 min 后, 再置 37°C 水浴摇床中孵育 14 h, 每管加入 180 μ L MTT, 继续振荡孵育 2 h, 2000 r/min 离心, 弃上清, 加入二甲基亚砷 1 mL, 摇匀, 570 nm 测定 OD 值, 并

选择最佳孵育时间来计算杀菌指数。每支管测定 3 次, 取平均值。

杀菌指数(KI)=Tx 时间还原的 MTT 的 OD 值/ T_0 时间还原的 MTT 的 OD 值

KI < 1.0 为具有杀菌能力; KI > 1.0, 则无杀菌能力; KI 值升高, 杀菌能力降低。

1.2.7 数据处理与分析: SOD 活性、离体白细胞吞噬活性和吞噬细胞杀菌活性等数据使用 SPSS 软件分析。

1.2.8 化合物 M 的化学结构鉴定: 化合物 M 的结构主要通过物理化学性质、元素分析、紫外光谱 UV (Ultra-Violet spectroscopy)、红外光谱 IR (Infrared Radiation)、飞行时间质谱 TOF-MS (Time of Flight Mass Spectrum)、核磁共振谱(^{13}C 和 ^1H)和 DEPT 谱分析。

2 结果

2.1 代谢产物的分离纯化及活性追踪

2.1.1 一级柱分离: 共得到 6 个流分, 分别为 A (0.3 g), B (1.8 g), C (0.4 g), D (1.46 g), E (6.0 g), F (2.2 g)。活性测定结果: 由图 1 可知, D 流分 SOD 活性在第 7 天达到峰值, A、B、C、E、F 流分组的 SOD 活性在第 14 天达到峰值, 其中以 B 流分组 SOD 活性最高, 且其第 7 和 14 天的 SOD 活性与对照组和第 0 天相比分别存在显著差异($P < 0.05$)。由图 2 可知, A、E 流分吞噬活性在第 7 天达到峰值, B 流分组的吞噬活性在第 14 天达到峰值, C、D、F 流分吞噬活

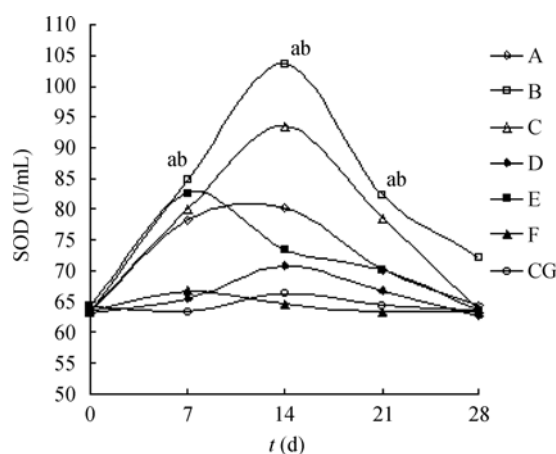


图 1 第 1 次分离 SOD 活性

Fig. 1 The SOD activity in the 1st isolation

注: a: 与对照组相比差异显著; b: 与 0 d 相比差异显著, 下同。

Note: a: There were significant deviation compared with that of control group b: There were significant deviation compared with that of 0 day's. The same below.

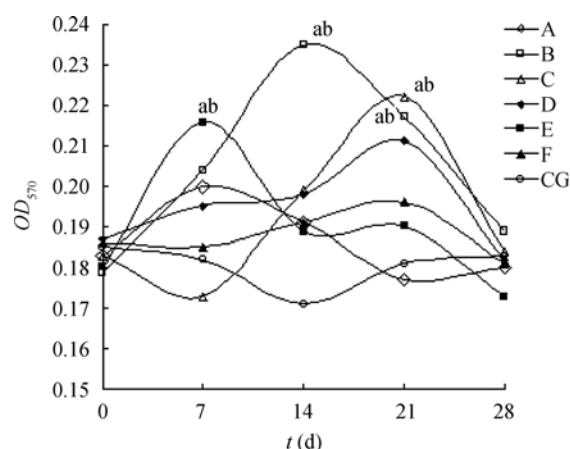


图2 第1次分离吞噬活性

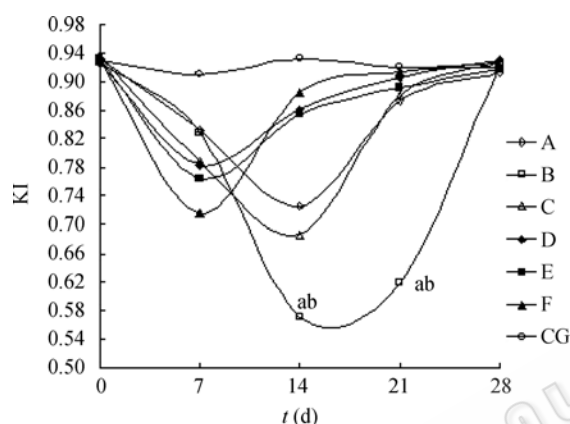
Fig. 2 The Phagocytic activity in the 1st isolation

图3 第1次分离杀菌活性

Fig. 3 The Bactericidal activity in the 1st isolation

性在第21天达到峰值,其中以B流分组吞噬活性最高,且其第14和21天的吞噬活性与对照组和第0天相比分别存在显著差异($P<0.05$);由图3可知,D、E、F流分组杀菌活性在第7天达到峰值,A、B、C流分组吞噬活性在第14天达到峰值,其中以B流分组杀菌活性最高,且第14、21天的杀菌活性与对照组和第0天相比差异显著($P<0.05$)。综合以上结果,B流分具有最高的免疫增强活性。

2.1.2 二级柱分离: 分离获得6个流分,分别为B1(0.3 g), B2(0.2 g), B3(0.4 g), B4(0.1 g), B5(0.2 g), B6(0.02 g)。活性测定结果: 由图4可知,B2、B3、B4、B5、B6流分组的SOD活性在第14天达到峰值,B1组无明显峰值,其中以B3流分组SOD活性最高,其第14、21天的SOD活性与对照组和第0天相比差异显著($P<0.05$)。由图5可知,B2、B4组流分吞噬活性在第7天达到峰值,B5组在第7天到第14天之间达到峰值,B1、B3流分组的吞噬活性

在第14天达到峰值,B6组无明显峰值,其中以B3流分组吞噬活性最高,且其第14、21天的吞噬活性与对照组和第0天相比存在显著差异($P<0.05$);由图6可知,B6流分组杀菌活性在第7天达到峰值,B1、

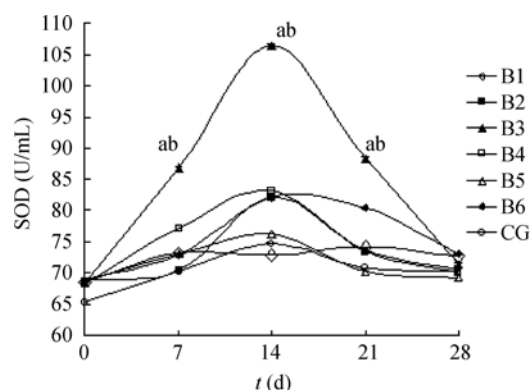


图4 第2次分离SOD活性

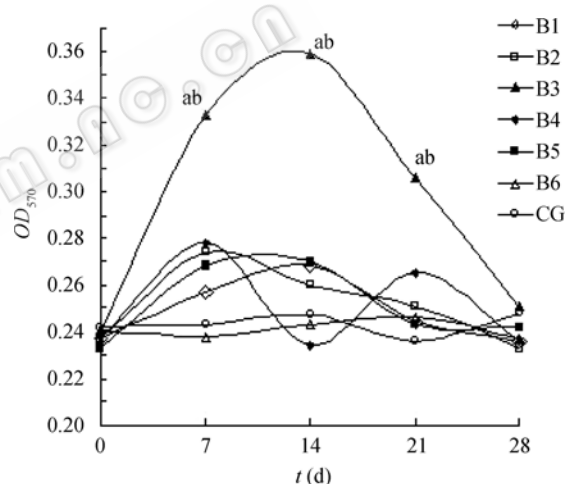
Fig. 4 The SOD activity in the 2nd isolation

图5 第2次分离吞噬活性

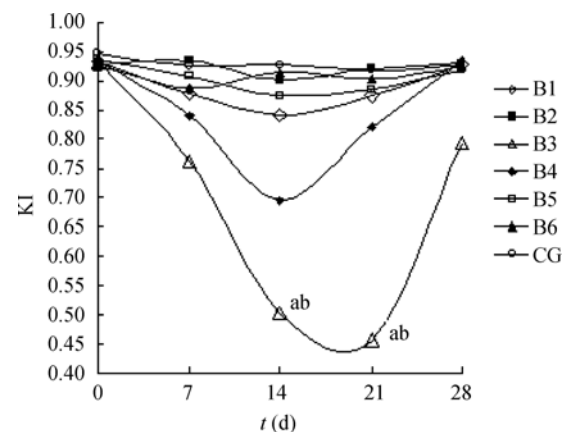
Fig. 5 The Phagocytic activity in the 2nd isolation

图6 第2次分离杀菌活性

Fig. 6 The Bactericidal activity in the 2nd isolation

B2、B5、B4 流分吞噬活性在第 14 天达到峰值, B3 组在第 21 天时达到峰值, 其中以 B3 流分组杀菌活性最高, 且其第 14、21 天的杀菌活性与对照组和第 0 天相比差异显著($P<0.05$)。综合以上结果, B3 流分具有最高的免疫增强活性。

2.1.3 三级柱分离与纯化: B3 经 Sephadex 柱分离纯化, 获得的晶体 M, 经过重结晶纯化获得晶体状物质(0.3243 g), 经 3 种展开剂(乙酸乙酯: 甲醇, 氯仿: 甲醇, 乙酸乙酯: 异丙醇)对 M 进行 TLC 分析, 均为单一圆点, 达到波谱分析的纯度。

2.2 化合物 M 的免疫增强活性测定

化合物 M 的免疫增强活性测定结果显示: 在 M3, M4, M5 组中, 第 7、14 和 21 天的 SOD 活性以及第 14 和 21 天的白细胞吞噬活性和白细胞杀菌活性同对照组和第 0 天的数据相比, 存在显著性差异($P<0.05$)。在各试验组中, SOD 活性和白细胞吞噬活性均在第 14 天达到峰值, 白细胞杀菌活性在第 21 天达到峰值。第 28 天的 SOD 活性、白细胞吞噬活性、白细胞杀菌活性均优于第 0 天对应的结果。(见表 1)

表 1 化合物 M 的免疫增强活性测定结果

Table 1 Immunological activities on different days post-injection of Compound M

| 样品测定指标 Mensuration index | 0 d 0 d | 第 7 天 7 th d | 第 14 天 14 th d | 第 21 天 21 st d | 第 28 天 28 th d |
|-----------------------------------|-------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| M ₁ (SOD, U/mL) | 67.26±0.36 | 73.32±0.41 | 84.39±1.01 | 72.89±0.58 | 70.27±0.56 |
| M ₁ (Phagocytic, OD) | 0.245±0.022 | 0.262±0.045 | 0.318±0.033 | 0.269±0.054 | 0.246±0.027 |
| M ₁ (Bactericidal, KI) | 0.964±0.024 | 0.755±0.019 | 0.603±0.027 | 0.522±0.025 | 0.783±0.034 |
| M ₂ (SOD, U/mL) | 66.38±0.24 | 75.62±0.30 | 96.39±1.01 ^a | 73.56±0.62 | 69.27±0.76 |
| M ₂ (Phagocytic, OD) | 0.239±0.026 | 0.264±0.031 | 0.320±0.029 ^a | 0.272±0.031 | 0.241±0.027 |
| M ₂ (Bactericidal, KI) | 0.939±0.031 | 0.746±0.025 | 0.591±0.019 | 0.503±0.034 ^a | 0.768±0.027 |
| M ₃ (SOD, U/mL) | 68.16±0.19 | 93.38±0.18 ^a | 112.03±0.26 ^a | 92.55±0.24 ^a | 72.38±0.11 |
| M ₃ (Phagocytic, OD) | 0.234±0.016 | 0.313±0.012 ^a | 0.376±0.006 ^a | 0.290±0.007 ^a | 0.243±0.027 |
| M ₃ (Bactericidal, KI) | 0.931±0.019 | 0.734±0.006 | 0.526±0.009 ^a | 0.433±0.011 ^a | 0.778±0.026 |
| M ₄ (SOD, U/mL) | 67.26±0.85 | 96.68±0.96 ^a | 124.24±0.95 ^a | 99.50±0.68 ^a | 75.63±0.64 |
| M ₄ (Phagocytic, OD) | 0.240±0.014 | 0.336±0.015 ^a | 0.388±0.021 ^a | 0.314±0.022 ^a | 0.267±0.028 |
| M ₄ (Bactericidal, KI) | 0.941±0.004 | 0.729±0.007 | 0.459±0.013 ^a | 0.403±0.011 ^a | 0.782±0.019 |
| M ₅ (SOD, U/mL) | 66.53±0.96 | 98.47±0.88 ^a | 128.24±0.72 ^a | 102.50±0.65 ^a | 80.63±0.83 |
| M ₅ (Phagocytic, OD) | 0.246±0.022 | 0.363±0.024 ^a | 0.401±0.025 ^a | 0.344±0.036 ^a | 0.289±0.038 |
| M ₅ (Bactericidal, KI) | 0.941±0.014 | 0.722±0.011 | 0.449±0.009 ^a | 0.402±0.015 ^a | 0.775±0.016 |
| CG(SOD, U/mL) | 68.30±0.28 | 71.30±0.18 | 72.61±0.10 | 71.59±0.22 | 72.34±0.15 |
| CG(Phagocytic, OD) | 0.238±0.008 | 0.239±0.018 | 0.252±0.013 | 0.246±0.014 | 0.239±0.018 |
| CG(Bactericidal, KI) | 0.935±0.009 | 0.928±0.020 | 0.924±0.027 | 0.920±0.030 | 0.931±0.019 |

注: a: 同一天的测定中, 和对照组相比存在显著差异($P<0.05$), 表中数据为对应样品测定数据平均值。

Note: a: There were significant deviation compared with the data of control group ($P<0.05$), all the data in the table were the mean value.

2.3 化合物 M 的结构鉴定

2.3.1 化合物 M 的物理性质及元素分析: 化合物 M, 外观为白色粉末, 易溶于水、二甲基亚砜(DMSO), 难溶于甲醇、乙酸乙酯、石油醚、氯仿。熔点为 161.7°C-162.1°C。薄层层析直接展开, 茚三酮显色阴性; 酸水解后茚三酮显色阳性, 表示为环肽类化合物。元素分析结果为: C 53.59%, H 6.457%, N 17.93%, O 22.023%。

2.3.2 波谱数据及分析: UV(紫外扫描): 240 nm 为吸收峰, 吸收值为 2.375。IR[红外光谱, V/cm-1(KBr)]: 3204, 3164, 3112, 2998, 2951, 2876,

1677, 1645, 1458, 1409, 1335, 1296, 1268, 1227, 1197, 1112, 1003, 905, 782。可知在 3112.58 cm^{-1} ~2987.87 cm^{-1} 和 1458.12 cm^{-1} ~1334.99 cm^{-1} 分别为碳链中的 C-N 和 C-H 伸缩振动, 1677.45 cm^{-1} 和 1645.11 cm^{-1} 的强吸收为 C=O 键的吸收谱带, 显示此物质中有 2 个 C=O 键, 而在 3000 cm^{-1} 以上的吸收峰符合—NH₂ 或相关—NH—等类似结构存在。TOF-MS(飞行时间质谱)(70eV) m/z: 154.2。¹H NMR (核磁共振氢谱, D₂O, 400 MHz) δ : 4.32 (m, 1H), 4.196 (m, 1H), 4.157 (d, 1H), 3.901 (m, 1H), 3.858 (dd, 1H), 3.348 (m, 2H), 2.348 (m, 1H), 2.072 (m, 1H), 1.946 (m, 2H)。¹³C

NMR (核磁共振碳谱, D_2O , 100 MHz) δ : 171.652 (C7), 165.732 (C1), 58.440 (C6), 45.267 (C3), 45.185 (C9), 27.6 (C5), 21.5 (C4)。由 166.7 和 171.7 ppm 的 2 个碳吸收峰可知, 其结构中不存在苯环和 C=C 双键结构, 符合 C=O 键的吸收峰。DEPT: 57.918 (6CH), -45.841 (5CH₂), -44.565 (4CH₂), -27.786 (3CH₂), -21.980 (9CH₂)。共 1 个甲基, 4 个亚甲基。

2.3.3 化合物 M 的化学结构: 由 2.3.2 中的数据和元素分析结果, 经与文献[11]中的数据比对可知, 化合物 M 的分子式为 $C_7H_{10}O_2N_2$, 为环(脯氨酸-甘氨酸)二肽, 结构式见图 7。

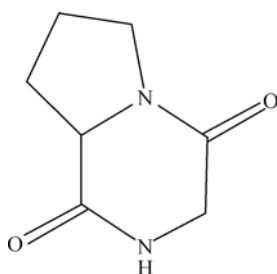


图 7 化合物 M 的结构式

Fig. 7 The structure of M

3 讨论

目前, 关于蕈状芽孢杆菌代谢产物免疫增强活性的研究少有报道, 本文是探索蕈状芽孢杆菌代谢产物免疫增强活性并对其中的活性成分进行分离纯化的先期研究之一。本试验通过基于活性追踪的分离纯化和波谱数据的测定, 确定了蕈状芽孢杆菌代谢产物中具有免疫增强活性的物质主要为环(脯氨酸-甘氨酸)二肽。本试验中所采用的 SOD 活性、白细胞吞噬活性、白细胞杀菌活性 3 个指标是衡量活体动物的非特异性免疫能力较为常用的指标。前人研究表明, SOD 作为抗氧化物质其活性与生物体的免疫水平密切相关, 可以增强小鼠血浆溶血素和 NK 细胞的功能^[12], 对增强巨噬细胞的防御能力和整个机体的免疫功能有重要的作用。白细胞吞噬活性和吞噬细胞杀菌活性则反应机体的细胞免疫的水平^[13]。

本试验中, 按照梯度剂量对小鼠进行腹腔注射化合物环(脯氨酸-甘氨酸)二肽, 并每 7 d 测定各免疫指标, 由此能够反映出该化合物增强动物免疫功能的基本规律。同时, 环(脯氨酸-甘氨酸)二肽试验

所测定的 SOD 活性、白细胞杀菌活性的结果与注射蕈状芽孢杆菌代谢产物粗提物的结果是一致的^[6], 说明由蕈状芽孢杆菌代谢产物分离得到的环(脯氨酸-甘氨酸)二肽可以增强小鼠免疫力; 另外, 本试验所得到的小鼠白细胞吞噬活性明显增强的结果与 β -1,3 glucan sulfate PS3 对小鼠吞噬细胞吞噬活性的影响一致^[14], 由此看来, 环(脯氨酸-甘氨酸)二肽与 β -1,3 glucan sulfate PS3 具有类似的功能, 可以增强小鼠的非特异性免疫力。

试验结果显示, SOD 活性和白细胞吞噬活性增强趋势一致, 均在注射后第 14 天达到峰值, 白细胞杀菌活性的峰值出现在第 21 天, 这表明环(脯氨酸-甘氨酸)二肽提高小鼠 SOD 活性和白细胞吞噬活性先于白细胞杀菌活性; 另一个原因也可能是白细胞在对异物的消除过程中吞噬异物在先, 消除异物在后, 所以白细胞杀菌活性滞后于白细胞吞噬活性(表 1)。各试验组中, SOD 活性和白细胞吞噬活性从出现峰值的第 14 天、白细胞杀菌活性从出现峰值的第 21 天之后到随后的第 28 天之间, 免疫指标开始下降, 但均高于第 0 天和对照组(表 1), 表明环(脯氨酸-甘氨酸)二肽的作用持续时间至少达到 28 d。

在不同剂量的环(脯氨酸-甘氨酸)二肽免疫增强试验中, M3、M4、M5 相对于 M1 组各项指标存在显著性差异($P < 0.05$), 但在 M3、M4、M5 之间无显著差异(表 1), 表明环(脯氨酸-甘氨酸)二肽对小鼠的免疫增强作用为剂量依赖型, 但随着注射剂量的加大, 其剂量依赖关系会减弱。由此可以推断, 环(脯氨酸-甘氨酸)二肽适宜使用剂量初步确定为 0.5 mg/kg 体重。

环二肽是一类重要的肽类化合物, 在生物医学、药学、抗菌物质和抗肿瘤方面多有应用^[15]。环(脯氨酸-甘氨酸)二肽是其中一种, 有人曾从红树林内生真菌^[11]和海洋放线菌的产物^[16]中分离发现过。研究报道, 在 Ca^{2+} 存在的环境下, 环(脯氨酸-甘氨酸)二肽可以降低突触神经小体的膜电位^[17], 还具有保健促记忆的功效^[18]。关于蕈状芽孢杆菌代谢产物主要有碱性蛋白酶^[19]、 α -氨基酸酯酶^[20]等。本试验采用活性跟踪指导下的分离技术, 从蕈状芽孢杆菌代谢产物中获得的环(脯氨酸-甘氨酸)二肽, 具有增强小鼠的免疫功能, 这为其在生产中的应用提供了一些参考。

参 考 文 献

- [1] 李小定, 荣建华, 吴谋成. 真菌多糖生物活性研究进展. 食用菌学报, 2002, **9**(4): 50–58.
- [2] 黄 建. 中国分枝杆菌类免疫调节剂的评述与展望. 微生物学免疫学进展, 2002, **30**(1): 56–60.
- [3] Suzuki K, Torii K, Hida Sh. Differences interleakin1 (IL-1), IL-6, Tumor necrosis factor and IL-1 receptor antagonist production by human monocytes stimulated with muramyl dipeptide (MDP) and its stearyl derivative romurtide. *Immunopharmacology*, 1994, **38**: 28–31.
- [4] Dzierzbicka K, Kołodziejczyk A. Muramyl peptides-synthesis and biological activity. *Pol J Chem*, 2003, **77**: 373–395.
- [5] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984, pp.734–735.
- [6] 王高学, 付维法, 崔 婧, 等. 蕈状芽孢杆菌代谢产物活性成分对小鼠免疫功能的影响. 中国兽医科学, 2006, **36**(12): 983–987.
- [7] 王高学, 白 冰. 九种细菌成分及其代谢产物对鲫鱼免疫功能的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, **34**(2): 39–44.
- [8] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用试验方法. 北京: 人民军医出版社, 2000, pp.151–152.
- [9] Chen Ch F, Li J, Kusuda R. A preliminary study on the adjuvant activity of henbane in oral Vaccination of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Huazhong Agr Uni*, 1996, **15**(2): 157–162.
- [10] 李 静, 陈昌福. 草鱼白细胞对福建爱德华氏菌 (*Edwardsiella fujianensis*) 杀菌活性的研究. 四川大学学报(自然科学版), 1998, **35**(4): 619–623.
- [11] 李厚金, 林永成, 刘晓红, 等. 红树林内源真菌 2524 号的肽类成分(). 中山大学学报(自然科学版), 2002, **1**(41): 110–112.
- [12] Yue WF, Li GL, Liu JM, *et al.* Anti-oxidation and immune responses in mice upon exposure to manganese superoxide dismutase expressed in silkworm larvae, *Bombyx mori* L. *Cell Biol Int*, 2007, **31**, 974–978.
- [13] Divyagnaneswari M, Christyapita D, Dinakaran Michael R. Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in oreochromis mossambicus by solanum trilobatum leaf fractions. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, **23**, 249–259.
- [14] Vetvicka V, Vetvickova J, Frank J, *et al.* Enhancing effects of new biological response modifier β -1, 3 glucan sulfate PS3 on immune reactions. *Biomed Pharmacother*, 2008, **62**(5): 283–288.
- [15] 蒋志龙, 鄢建坤, 刘克良. 生物活性环肽研究进展. 中国药物化学杂志, 2004, **14**(2): 122–128.
- [16] 李 冬, 朱伟明, 顾谦群, 等. 海洋放线菌 H2003 代谢产物中环二肽成分及其抗肿瘤活性的初步研究. 海洋科学, 2007, **31**(5): 45–48.
- [17] Lutsenko VK, Vukolova MN, Gudasheva TA. Cyclopropyl glycine and proline-containing preparation noopept evoke two types of membrane potential responses in synaptoneurosome. *Bull Exp Biol Med*, 2004, **135**(6): 559–562.
- [18] Gudasheva TA, Boyko SS, Ostrovskaya RU, *et al.* The major metabolite of dipeptidopiracetam analogue GVS-111 in rat brain and its similarity to endogenous neuropeptide cyclo-L-propylglycine. *Eur J Drug Metabol Pharmacokin*, 1997, **22**: 245–252.
- [19] Mohamed AAN, Ismail AMS, Ahmed SA, *et al.* Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. *Bioresour Technol*, 1998, **64**: 205–210.
- [20] Akio S, Yuji Sh, Shigeo S, *et al.* A novel α -Amino-Acid esterase from *Bacillus mycoides* capable of forming peptides of DD- and DL-Configurations. *J Bio Chem(Tokyo)*, 2001, **130**: 119–126.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} , 不用大写 X , 也不用 $Mean$ 。标准差用英文小写 s , 不用 SD 。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 SE 。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。