

希尔艾力·阿不力克木, 德力拜尔·木拉提, 张佳怡, 等. 若羌红枣多糖铜螯合物的制备及生物活性检测 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (11): 63-71.

XIERAILI ABULIKEMU, DELIBAIER MULATI, ZHANG J Y, et al. Preparation and biological activity detection of copper chelate from Ruoqiang red jujube polysaccharides [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (11): 63-71.

若羌红枣多糖铜螯合物的制备及生物活性检测

希尔艾力·阿不力克木^{1#}, 德力拜尔·木拉提^{2#}, 张佳怡¹, 孟研¹, 阿得力江·吾斯曼¹,
刘丹丹¹, 郭庆勇¹, 赛福丁·阿不拉^{1*}

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052;

2. 新疆维吾尔自治区动物疫病预防控制中心, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 采用柠檬酸钠-硫酸铜方法制备若羌红枣多糖铜螯合物 (RJP-Cu), 并对其含量、表征、安全性、补铜效果及免疫增强活性进行综合检测分析, 其中安全性试验选择 36 只 SPF 级昆明 (KM) 小鼠, 随机分为空白对照组 (生理盐水) 和灌胃 2 300、1 150、575、288、144 mg/kg RJP-Cu 试验组。结果显示: RJP-Cu 与若羌红枣多糖 (RJP) 相比, 多糖含量、蛋白含量未发生明显变化, 糖醛酸含量下降, 铜含量从 2 mg/kg 提升至 583 mg/kg, RJP-Cu 电镜结构发生明显变化, RJP-Cu 同时具有多糖和铜螯合吸收峰; 安全性评价结果显示, RJP-Cu 的安全使用浓度为 575 mg/kg, 该浓度下小鼠血常规各项指标与空白对照组无显著性差异 ($P>0.05$), 肝脏、肾脏和肠道无病理变化。RJP-Cu 补铜效果呈浓度依赖性, 随着 RJP-Cu 浓度提高, 血清、肝脏和肌肉中铜浓度提升; RJP-Cu 低剂量 (144 mg/kg) 组相对空白对照组能够显著促进小鼠免疫球蛋白 (Ig) A、IgG、白细胞介素 (IL) -2、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的分泌 ($P<0.05$), 表现出良好的免疫增强活性。结论: RJP-Cu 螯合成功, 144 mg/kg 低剂量的 RJP-Cu 具有良好的免疫增强作用。

关键词: 若羌红枣; 多糖; 铜螯合物; 免疫增强

中图分类号: S826.9

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)11-0063-09

Preparation and biological activity detection of copper chelate from Ruoqiang red jujube polysaccharides

Xieraili Abulikemu^{1#}, Delibaier Mulati^{2#}, ZHANG Jiayi¹, MENG Yan¹, Adelijiang Wusiman¹,
LIU Dandan¹, GUO Qingyong¹, Saifuding Abula^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. Animal Epidemic Disease Prevention and Control Center of Xinjiang Uygur Autonomous Region,
Urumqi 830011, China)

Abstract: This study was to prepare copper chelates of polysaccharides from Ruoqiang red jujube (RJP-Cu) and detect their biological activity. RJP-Cu was prepared using the sodium citrate copper sulfate method, and comprehensive analysis was conducted on various contents, characterization, safety, copper supplementation effect, and immune enhancement activity of the copper chelates. In the safety test, 36 SPF KM mice were selected and randomly divided into blank control group (normal saline) and 2 300, 1 150, 575, 288, 144 mg/kg RJP-Cu experimental groups. The results showed that, compared with RJP, the polysaccharide content and protein content in RJP-Cu did not change, the uronic acid content in it decreased, the Cu content increased from 2 mg/kg to 583 mg/kg, the electron microscope structure of RJP-Cu changed significantly, and RJP-Cu had both polysaccharide and Cu chelating absorption peaks. The safety test results showed that the safe concentration of RJP-Cu was 575 mg/kg. At this concentration, there was no significant difference in blood routine indexes compared with the blank control group of mice ($P>0.05$), and no pathological changes in the liver, kidney and intestine of the rodents. The effect of RJP-Cu supplementation was concentration-dependent. With the increase in RJP-Cu concentration, the Cu concentration in the serum, liver and muscle of the animals increased. The low-dose (144 mg/kg) RJP-Cu group significantly promoted the secretion of IgA, IgG, IL-2,

收稿日期: 2023-11-30; 修回日期: 2024-09-08

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1600702-3); 新疆维吾尔自治区自然科学基金计划 (少数民族特培) 项目 (390000017)

第一作者: 希尔艾力·阿不力克木, 男, 维吾尔族, 硕士研究生, 兽医师; 德力拜尔·木拉提, 女, 哈萨克族, 硕士, 兽医师。*共同第一作者

*通信作者: 赛福丁·阿不拉, 维吾尔族, 教授, 研究方向为临床兽医学, E-mail: 1348793799@qq.com。

IL-6 and TNF- α in the tested mice, compared with the blank control group ($P < 0.05$), which exhibited good immune-enhancing activities. These results indicated that RJP-Cu chelated successfully, and the low dose (144 mg/kg) of RJP-Cu had a good immune enhancement effect.

Keywords: Ruoqiang red jujube; polysaccharides; copper chelation; immune enhancement

若羌红枣种植在新疆若羌县,因该县昼夜温差大、日照充足、年降水量较少、境内光热资源丰富等原因,使得若羌红枣皮薄肉厚、果实饱满、含糖量高,具有丰富的营养价值,是一种具有良好补益效果的药材^[1]。根据《本草纲目》记载,红枣营养丰富,有多种保健功能,如健脾和胃、养血安神、补虚益气等,因此被国家卫健委批准为药食同源食品^[2]。若羌红枣多糖(RJP)具有抗氧化^[3]、增强免疫^[4]和保肝活性等多种生物活性^[5]。铜是生物体必须的微量元素之一。大量研究表明,铜具有多种重要的生物学功能,是动物体内一些重要酶的组成成分并与酶的活性有关^[6]。动物体内铜的缺乏会导致抗体效价降低和抗体合成障碍,也会影响其免疫器官的发育等。现代药理学研究发现金属离子可以通过共价键和离子键等方式与多糖及其衍生物结合,从而形成络合物或螯合物。壳聚糖铜^[7]、壳聚糖锌^[8]和壳聚糖铁^[9]等多糖金属络合物,可以显著改善动物的生产性能、免疫性能、肠道健康与肠道菌群平衡,其在替代抗生素方面具有一定的作用。研究发现,在肉鸡和蛋鸡的饲料中添加铜蛋白盐可显著提高其代谢率、生长性能及免疫器官指数^[10-11];曹猛猛等^[12]研究发现山药粗多糖铜络合物可提高肉鸡的生长性能,小肠中淀粉酶和胰蛋白酶的活性,十二指肠的绒毛高度以及绒毛高度与隐窝深度的比值。

铜缺乏症属于地方性代谢病,在世界各地均有发生,尤其是土壤中缺乏铜元素的地区。哺乳期羔羊的发生比较频繁,2—7月是发病时期,其中5月是高峰期。铜缺乏症对动物的发育及成长具有较为严重的影响,在一定程度上减缓了羊的发育速度,降低了养殖经济效益,影响羊养殖的经济发展^[13]。现有常规的补铜方法是使用硫酸铜液^[14]和一些西药,这些方法虽然快速有效,但有副作用。日粮中添加高水平的铜会使其在组织器官中大量蓄积,而使许多重要酶的活性受到抑制,导致肝功能障碍,甚至发生肝坏死,使谷草转氨酶、乳酸脱氢酶、血浆精氨酸酶及血浆胆红素含量升高^[15]。因此兽医临床上迫切需要一种作用方式较为温和、安全性高且具有良好效果的药物,对该病进行治疗与预防。

本试验以RJP为材料,通过和CuSO₄化学螯合的方法制备同时具有补充铜离子和协同免疫增强作用的若羌红枣多糖-铜螯合物(RJP-Cu),分别进行总多

糖含量、蛋白含量、糖醛酸含量、血常规、小鼠免疫球蛋白和细胞因子含量测定及组织HE染色观察,评价补铜效果和免疫增强作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

36只SPF级昆明(KM)小鼠(20~24g),购自新疆医科大学实验动物中心。本试验经新疆农业大学实验动物福利伦理委员会批准(批准号:2022016),生产许可证号:SCXK(新)2019-0001。

1.2 主要药物及试剂

若羌红枣,购自乌鲁木齐华菱市场;柠檬酸铵,购自天津市盛奥化学试剂有限公司;葡萄糖醛酸,购自北京索莱宝科技有限公司;4%多聚甲醛通用型组织固定液,购自白鲨生物科技-上海桥星贸易有限公司;铜比色法试剂盒,购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;免疫球蛋白(Ig)A、IgG、白细胞介素(IL)-2、IL-6、IL-10、IL-17和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA试剂盒,均购自成都正能生物技术有限责任公司。

1.3 RJP的提取

称取去核若羌红枣100g,按药材和石油醚体积比为1:3在65℃的水浴锅中回流2h,过滤药渣挥发石油醚,按药渣和乙醇体积比为1:3在80℃水浴锅中回流2h,提取3次,过滤将药渣挥发乙醇,按药渣和水体积比为1:10在90℃水浴锅中回流2h,提取2次,过滤、浓缩至1g/mL。浓缩液与Sevag试剂(氯仿:正丁醇=4:1)按2:5的体积比进行混合,充分振荡后静置30min,离心10min(4000r/min),取水相,重复上述操作3次。之后加入无水乙醇,使乙醇浓度达到80%,放4℃冰箱静置过夜,沉淀物用无水乙醇搅拌荡洗、烘干,得到RJP干燥物^[16]。

1.4 RJP-Cu的制备及含量检测

将10gRJP和2.5g柠檬酸钠放到300mL水中,然后在60℃水浴锅中加热并不断搅拌溶解,加入20%NaOH溶液至碱性,缓慢加硫酸铜出现不溶物时立即停止。然后在60℃水浴锅中加热并不断搅拌1h。停止搅拌趁热离心1min(4000r/min)取上清液,上清液倒入1000kDa的透析袋中透析24h,除去游离杂质,收集透析袋内液体浓缩到一定体积,冷

却后加入无水乙醇,使乙醇浓度达到80%,收集沉淀、烘干后得到精制的RJP-Cu^[17]。RJP和RJP-Cu采用苯酚-硫酸法测定总多糖含量^[18],BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白含量,硫酸咔唑法测定糖醛酸含量^[19],依据标准GB 5009.13—2017《食品安全国家标准 食品中铜的测定》测定铜含量。

1.5 电镜观察

RJP和制备好的RJP-Cu采用离子溅射(离子溅射仪E-1045,日本日立公司)镀膜法观察样品表面的形态^[17]。将RJP和RJP-Cu制备成电镜样品,采用场发射扫描电子显微镜(SUPRA-55 vp,德国蔡司公司)开始扫描分析,并调节加速电压(2.00 kV),放大100~1 000倍,观察样品形状和表征。

1.6 红外光谱分析

采用DTGS KBr压片法制备样品^[20],将RJP及RJP-Cu压入KBr试管中(每200 mg KBr样品2 mg)。32次扫描,光阑为100,分辨率为 4.000 cm^{-1} ,动镜速度为0.474 7,采样增益为1,一张空白的KBr磁盘被用作背景。采用火焰原子吸收分光光度计(SP-3520AA,上海屹利科学仪器有限公司)进行测量。

1.7 RJP-Cu 安全性测定

1.7.1 小鼠安全性试验

36只KM小鼠(体重20~24 g左右,雌雄对半)于新疆农业大学动物医学学院实验动物中心进行饲养。小鼠适应性饲养1周后,随机分为6组,空白对照组和5个浓度(2 300、1 150、575、288和144 mg/kg)RJP-Cu试验组。给药前6 h禁食,不禁水。给药前小鼠称重,药物溶于生理盐水并按照每克体重0.02 mL剂量进行灌胃方式给药,空白对照组小鼠相同剂量灌胃生理盐水。给药结束2 h后添加饲料并观察小鼠的采食情况。对于给药后死亡的小鼠进行解剖,观察其内脏。

1.7.2 血常规检测

给药第7天,眼球采血法收集小鼠血液,用血常规仪(VetScan HM5, ABAXIS 欧洲有限公司)检测小鼠白细胞、红细胞、单核细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、血小板等血常规各项指标^[21]。

1.8 RJP-Cu 免疫增强作用检测

1.8.1 小鼠分组及处理

36只KM小鼠经过1周适应性喂养后,随机分成空白对照组、RJP-Cu低剂量组(144 mg/kg)、RJP-Cu中剂量组(288 mg/kg)和RJP-Cu高剂量组(575 mg/kg)。空白对照组小鼠每天口服生理盐水,

其余试验组每天给药1次,连续灌胃14 d。

1.8.2 组织学检查

给药第14天收集小鼠的肝脏、肾脏,第28天收集小鼠结肠,固定在4%多聚甲醛中,经脱水、包埋、切片等步骤制作石蜡切片并进行HE染色,观察各组织病理变化^[22]。

1.8.3 体内铜含量测定

试验开始后第14、21和28天通过摘眼球采血方式采血0.5 mL,解剖采集肌肉和肝脏。采血后室温放置1 h,将凝固血与管壁剥离,使血清充分析出,然后以2 000 r/min离心10 min,收集血清进行检测。血清、肌肉和肝脏按照铜含量检测试剂盒说明书方法进行。

1.8.4 免疫球蛋白及细胞因子含量测定

试验开始后第14、21和28天采血分离血清(方法同1.8.3),解剖收集肠液。ELISA方法测定血清IgG、肠液IgA和细胞因子(IL-2、IL-6、IL-10、IL-17和TNF- α)含量,操作步骤详见试剂盒说明书。

1.9 统计分析

采用统计软件SPSS 24.0对数据进行单因素方差(One-way ANOVA)分析并进行差异显著性分析,结果用“平均数 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 RJP及RJP-Cu各项指标含量测定

采用苯酚-硫酸法分别测定RJP和RJP-Cu中的多糖含量,回归方程为 $Y=7.3275X+0.0999$, $R^2=0.9976$ 。采用BCA试剂盒测定RJP和RJP-Cu中的蛋白含量,回归方程为 $Y=3.455X+0.1263$, $R^2=0.9978$ 。采用硫酸-咔唑法测定RJP和RJP-Cu中的糖醛酸含量,回归方程为 $Y=2.8529X+0.0471$, $R^2=0.9995$ 。RJP和RJP-Cu中的铜含量分别为2.0和583 mg/kg。RJP-Cu和RJP相比,多糖含量、蛋白含量未发生明显变化,糖醛酸含量下降,铜元素含量提升明显,具体结果见表1。

2.2 扫描电镜观察

在电镜下观察RJP呈不规则块状结构,表面光滑、多孔,质地紧实(图1A);放大后观察,RJP表面凹凸不平,孔洞大小及深浅不一(图1B)。电镜下观察RJP-Cu的结构疏松,边缘粗糙,结构不规则,表面存在裂纹与孔洞(图1C);放大后发现RJP-Cu由片层结构堆叠而成,中央存在大口径孔洞,边缘粗糙(图1D)。

表 1 RJP 和 RJP-Cu 不同指标含量比较

药品	指标			
	多糖/%	蛋白/%	糖醛酸/%	铜/(mg·kg ⁻¹)
RJP	72.40±0.12	2.80±0.10	14.20±0.13	2.00
RJP-Cu	73.50±0.16	2.50±0.18	5.00±0.11	583.00

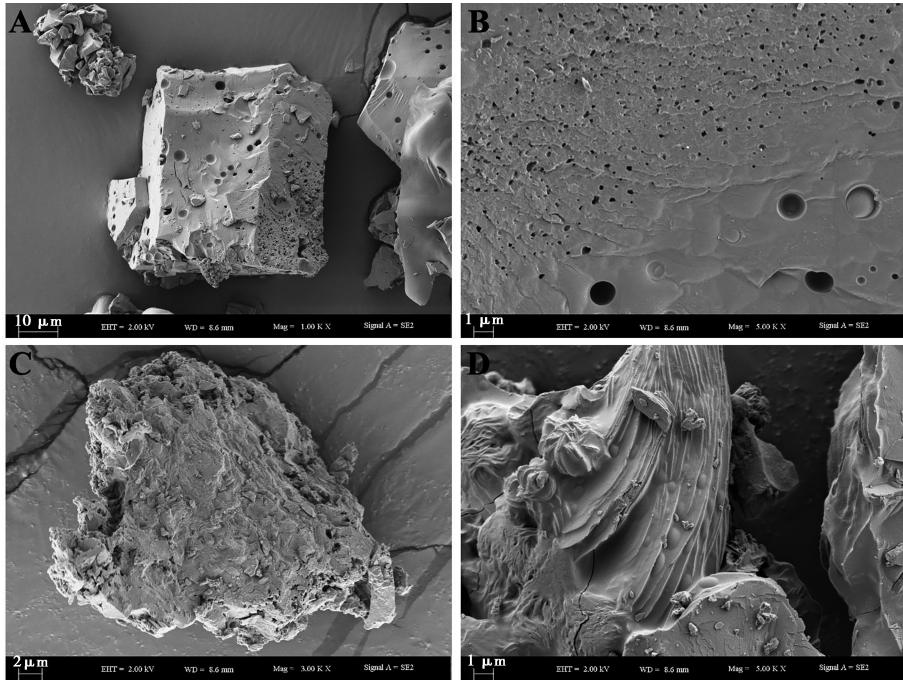


图 1 RJP (A、B) 和 RJP-Cu (C、D) 扫描电镜观察

2.3 红外光谱分析

由图 2 示, RJP 和 RJP-Cu 在 3 600~2 500 cm⁻¹ 之间出峰的位置、峰形、峰强的相似度都很高, 说明它们碳链的骨架是基本一致的, 但其相对分子质量、单糖组成及被取代的情况可能不同。RJP 在 3 400~3 200 cm⁻¹ 处有强吸收峰, 这是分子内羟基 (-OH) 伸缩振动吸收峰; 在 3 000~2 800 cm⁻¹ 处有中强吸收峰, 这是 (-CH₂-) C-H 键的伸缩振动吸收峰, 这 2 个吸收峰是糖类的特征峰; 在 1 700~1 500 cm⁻¹ 之

间的吸收峰为 -COOH 的 C=O 非对称伸缩振动吸收峰; 波数在 1 041 cm⁻¹ 之间的吸收峰为吡喃糖苷吸收峰。由此可判断提取物是多糖类物质。由图 2B 可见, RJP 在 3 288 cm⁻¹ 处的吸收峰整合后明显变宽, RJP 在 918 cm⁻¹ 处的吸收峰整合后明显减弱, 在 400~900 cm⁻¹ 处的吸收峰整合后有明显变化, RJP-Cu 中波数在 1 594 cm⁻¹ 峰有明显的变化, 这些部位可能是铜络合部位。结果表明, RJP 具有典型的多糖吸收峰, RJP 和铜离子整合成功。

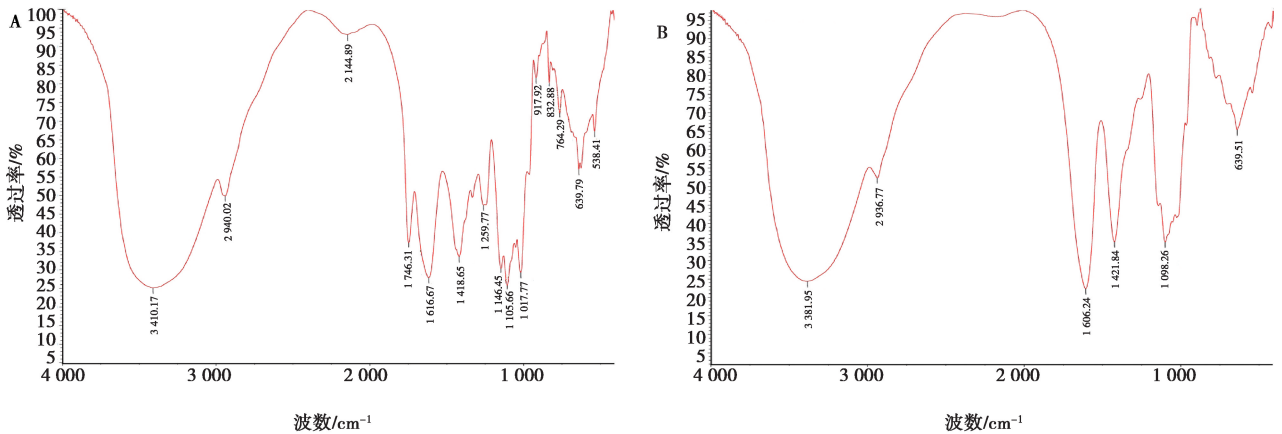


图 2 RJP (A) 和 RJP-Cu (B) 红外光谱分析

2.4 安全性评价

不同剂量 RJP-Cu 灌胃小鼠, 6 d 内小鼠死亡情况见表 2。给药后观察发现, 相比空白对照组, 2 300、1 150 mg/kg 剂量组小鼠均出现活动量下降, 抱堆。给药 2 h 后添加饲料, 2 300、1 150 mg/kg 剂量组小鼠表现为不采食也不饮水等异常行为; 575、288、144 mg/kg 剂量组小鼠进食、进水, 相对空白对照组无异常表现。给药后第 1 天 2 300 mg/kg 剂量组死亡 2 只, 解剖发现胃内容物呈绿色, 各脏器无明显病变; 给药后第 2 天 2 300 mg/kg 剂量组和 1 150 mg/kg 剂量组各死亡 2 只, 解剖发现肠道和胃内容物呈红色, 推测可能是消化道出血, 肝脏药物作用颜色变黑, 其他脏器无明显病变。根据小鼠试验结果, 575 mg/kg 以下为安全剂量浓度。

2.5 血常规检测

如表 3 所示, 与空白对照组相比, 2 300 mg/kg

剂量组白细胞、单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、红细胞的数量显著升高 ($P < 0.05$); 1 150 mg/kg 剂量组与空白对照组相比红细胞数显著降低 ($P < 0.05$); 575、288 和 144 mg/kg 剂量组与空白对照组相比, 白细胞、单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、红细胞和血小板数量之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 2 小鼠死亡数量情况统计

给药浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
2 300	2	2	0	0	0	0
1 150	0	2	0	0	0	0
575	0	0	0	0	0	0
288	0	0	0	0	0	0
144	0	0	0	0	0	0

注: 第 4 天至试验结束无小鼠死亡。

表 3 各组小鼠血常规指标水平比较

给药浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	白细胞/ ($10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	单核细胞/ ($10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	中性粒细胞/ ($10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	淋巴细胞/ ($10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	红细胞/ ($10^{12} \cdot \text{L}^{-1}$)	血小板/ ($10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)
0	3.20±0.10 ^b	0.30±0.10 ^b	0.70±0.10 ^b	2.20±0.10 ^b	9.09±0.02 ^b	878.33±2.08
2 300	6.90±0.36 ^a	0.47±0.06 ^a	1.93±0.40 ^a	4.60±0.20 ^a	9.99±0.33 ^a	1 077.67±64.38
1 150	4.90±0.45 ^{ab}	0.30±0.00 ^{ab}	1.20±0.10 ^{ab}	3.40±0.56 ^{ab}	8.11±0.20 ^c	783.67±239.59
575	4.50±0.78 ^{ab}	0.27±0.06 ^{ab}	1.60±0.10 ^{ab}	2.73±0.60 ^b	8.55±0.67 ^{bc}	846.67±218.91
288	4.40±0.87 ^{ab}	0.40±0.10 ^{ab}	1.20±0.46 ^{ab}	2.70±0.36 ^b	9.13±0.16 ^b	859.33±114.42
144	3.60±3.03 ^b	0.23±0.23 ^b	1.07±1.16 ^{ab}	2.3±1.65 ^b	8.42±0.33 ^c	1 088.00±242.89

注: 同列数据肩标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

2.6 小鼠肝脏、肾脏和肠道组织学检查

组织学检查如图 3。肝脏切片显示, 空白对照组和低、中、高剂量组小鼠肝脏结构清晰、正常, 可见桥粒, 肝细胞呈辐射状排列于中央静脉周围, 肝细胞和肝小叶结构均完整, 细胞间分布紧密有序, 无病变。肾脏切片显示, 空白对照组和低、中、高剂量组小鼠肾单位结构清晰, 肾小球及各级肾小管组织结构完整, 无病变。肠道切片显示, 空白对照组和低、中、高剂量组黏膜层、黏膜下层、肌层、浆膜层组织结构正常, 肠腺丰富排列规则, 绒毛排列整齐、密度较高, 肠绒毛、隐窝结构形态正常。

2.7 小鼠体内铜含量测定

由表 4 可见, 血清铜含量第 14 天及 28 天低、

中、高剂量组均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$); 第 21 天高剂量组显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。肝脏铜含量显示, 第 14 天中、高剂量组显著高于空白对照组 ($P < 0.05$); 第 21 天及 28 天高剂量组显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 低、中剂量组和空白对照组无显著性差异 ($P > 0.05$)。肌肉铜含量显示, 第 14 天低、中、高剂量组均与空白对照组无显著性差异 ($P > 0.05$); 第 21 天及 28 天高剂量组显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 低、中剂量组和空白对照组无显著性差异 ($P > 0.05$)。随着 RJP-Cu 饲喂浓度升高, 血清、肝脏和肌肉铜含量逐渐升高, 均呈剂量依赖性。

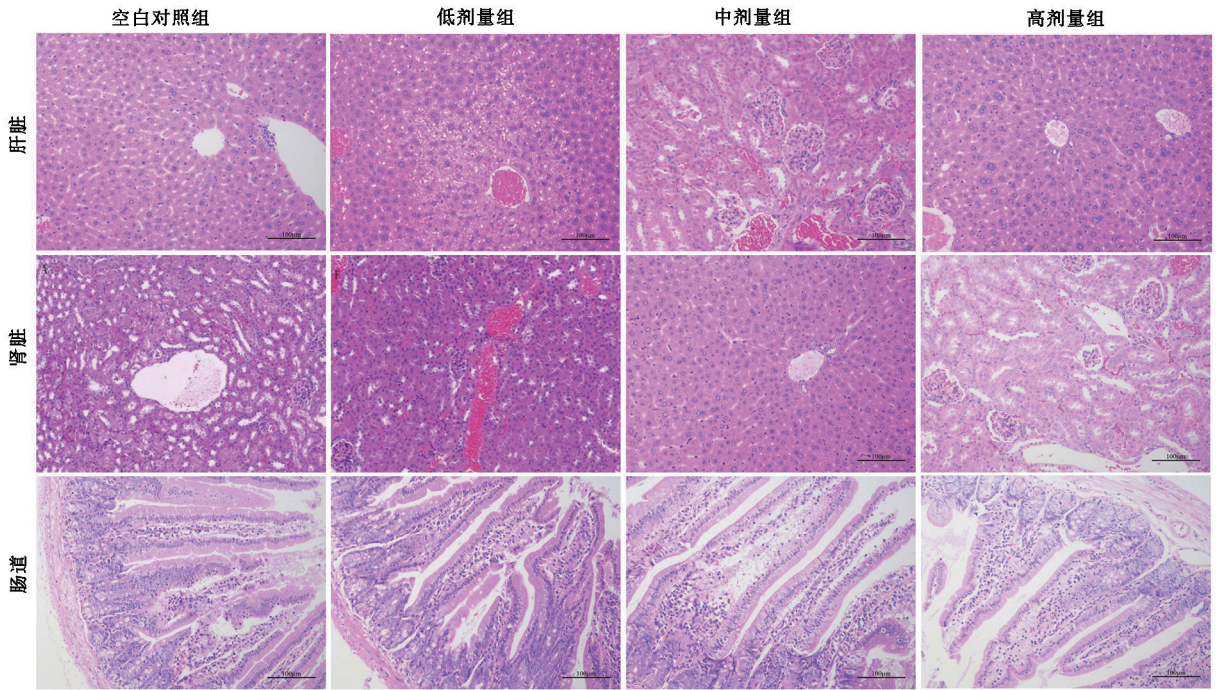


图3 小鼠肝脏、肾脏和结肠 HE 染色切片图 (标尺=100 µm)

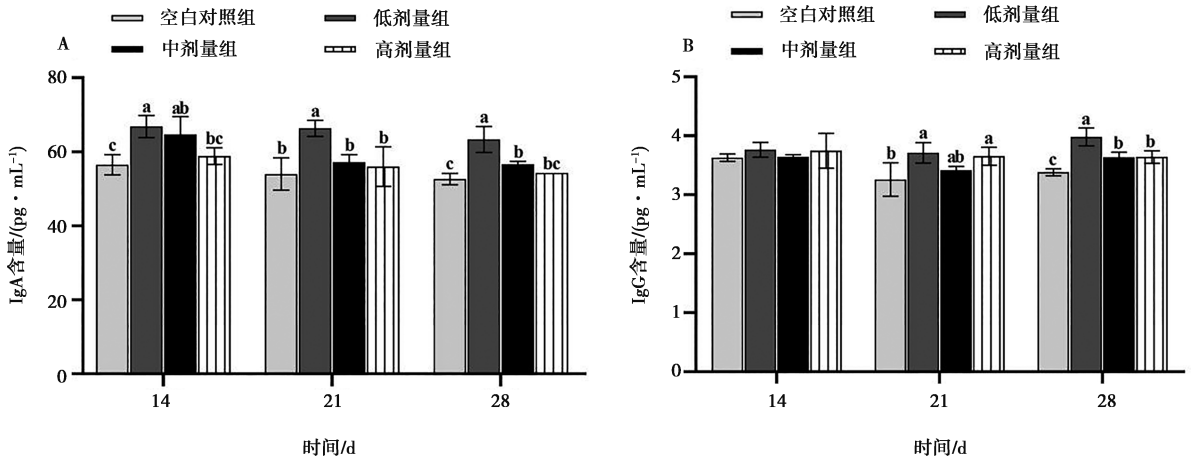
表4 小鼠血清、肝脏及肌肉中铜含量水平比较

样品	组别	给药后时间/d		
		14	21	28
血清	空白对照	14.72±0.23 ^b	15.73±0.36 ^b	15.03±0.48 ^c
	低剂量	15.88±0.47 ^a	16.58±1.40 ^b	17.36±0.94 ^b
	中剂量	16.04±0.67 ^a	17.05±1.61 ^b	19.45±0.59 ^a
	高剂量	16.58±0.47 ^a	22.09±0.97 ^a	20.46±1.28 ^a
肝脏	空白对照	3.63±0.35 ^c	4.01±0.66 ^b	5.60±0.92 ^b
	低剂量	5.60±0.35 ^{bc}	5.07±1.38 ^b	6.51±0.47 ^b
	中剂量	6.89±1.27 ^b	5.52±0.68 ^b	7.34±1.04 ^b
	高剂量	11.96±1.84 ^a	14.08±1.07 ^a	15.67±2.50 ^a
肌肉	空白对照	30.56±0.62	29.86±0.47 ^b	33.35±2.68 ^b
	低剂量	31.18±1.58	30.48±0.54 ^b	34.05±5.85 ^b
	中剂量	31.64±4.14	31.88±3.10 ^b	37.30±1.90 ^b
	高剂量	31.64±4.15	38.00±3.51 ^a	80.02±15.65 ^a

2.8 小鼠免疫球蛋白含量测定

如图4A所示, 试验第14天及第28天时低、中剂量组小鼠IgA含量显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 高剂量组小鼠IgA含量与空白对照组无显著性差异 ($P > 0.05$); 第21天时, 低剂量组小鼠IgA含量显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 中、高剂量组小鼠IgA含量与空白对照组无显著性差异 ($P >$

0.05)。如图4B所示, 试验第14天时低、中、高剂量组小鼠IgG含量与空白对照组无显著性差异 ($P > 0.05$); 第21天时, 低、高剂量组小鼠IgG含量显著高于空白对照组 ($P < 0.05$); 第28天时, 低、中、高剂量组小鼠IgG含量均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。结果表明, RJP-Cu能够促进小鼠IgA和IgG的产生, 并且低剂量组效果最佳。



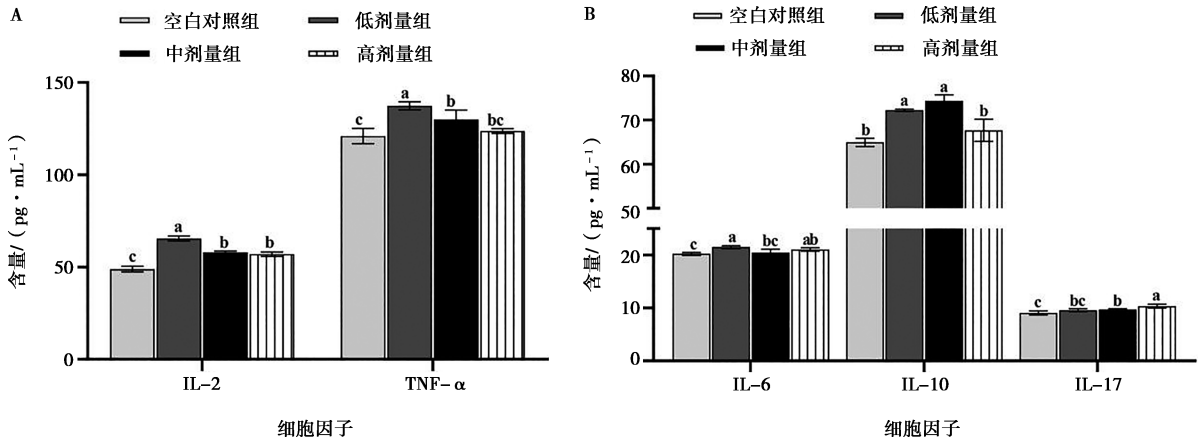
同一时间组间比较, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图4 RJP-Cu对小鼠IgA (A)和IgG (B)含量的影响

2.9 小鼠血清中细胞因子含量测定

如图5A所示, 低、中、高剂量组IL-2含量均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$); 低剂量组IL-2含量显著高于中、高剂量组 ($P < 0.05$)。低、中剂量组TNF- α 含量显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 低剂量组TNF- α 含量显著高于中、高剂量组 ($P < 0.05$)。如图5B所示, 低、高剂量组IL-6含量显著高于空

白对照组 ($P < 0.05$); 中剂量组IL-6与空白对照组无显著性差异 ($P > 0.05$)。低、中剂量组IL-10含量显著高于高剂量组和空白对照组 ($P < 0.05$)。中、高剂量组IL-17含量显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。结果表明, RJP-Cu低、中剂量组能够有效促进小鼠血清多种细胞因子的分泌。



同一指标组间比较, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图5 RJP-Cu对小鼠细胞因子含量的影响

3 讨论

本试验观察发现RJP整合前后的电镜扫描图有明显的形态变化。RJP红外光谱扫描结果与德力拜尔等^[17]研究结果基本一致, RJP具有典型的多糖吸收峰。整合前后结构有明显差异, RJP和铜离子螯合成

功。通过LD₅₀确定RJP-Cu的安全使用剂量为575 mg/kg。血常规是血液检验中最普遍、最基本的检测方法之一, 它能够反映机体病理变化和健康状况^[23]。本试验结果显示, 剂量为575 mg/kg的RJP-Cu组白细胞、单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、红细胞和血小板与空白对照组之间无显著性差异, 表明该剂量

下 RJP-Cu 对小鼠具有良好的安全性。肝脏作为主要的贮铜器官, 调节机体铜动态平衡, 过量补铜会使铜在肝细胞线粒体及胞浆中积聚, 导致肝细胞变性、坏死, 甚至动物死亡^[24]。肾脏是动物体内新陈代谢过程中代谢终产物和过剩物质的主要排出器官^[25]。肠道是动物体内消化和吸收营养物质的主要组织, 在机体生长和健康中发挥着重要作用^[26]。王梦莹等^[27]发现大剂量肽铁螯合物可对肠道黏膜造成一定损伤。因此口服补铜时检测肝脏、肾脏和肠道结构是安全补铜的重要前提。本试验结果所示, RJP-Cu 灌胃浓度为 575 mg/kg (高剂量)、288 mg/kg (中剂量) 和 144 mg/kg (低剂量) 时, 小鼠肝脏、肾脏和肠道组织未发生损伤, 表现出良好的安全性。

饲料中的铜先从肠腔进入黏膜细胞, 然后从黏膜细胞进入血液, 以红细胞铜蓝蛋白、血浆铜蓝蛋白分布到全身。肝脏作为铜代谢的中心器官, 具有储备铜的作用^[28]。因此, 血清、肝脏和肌肉铜含量能够充分反映动物体内铜元素含量的高低^[29]。本试验结果所示, 高、中、低剂量组 RJP-Cu 均能够提高小鼠血清、肝脏和肌肉内微量元素铜水平, 随着 RJP-Cu 浓度提高, 机体内铜元素浓度提高, 说明 RJP-Cu 补铜效果呈浓度依赖性。上述结果表明 RJP-Cu 能够被肠道吸收并被机体有效利用。

研究发现, 日粮中添加多糖会促进血清免疫球蛋白和细胞因子的分泌, 从而增强机体的免疫能力^[30]。机体内的铜在免疫过程中发挥着重要作用, 铜通过参与机体内免疫球蛋白的合成及免疫相关细胞因子和酶的调节, 提高肠道 IgA、血清 IgG 及细胞因子水平, 从而提高反刍动物的免疫功能^[31-32]。机体内铜缺乏会降低机体免疫球蛋白及细胞因子的分泌, 从而引起体液免疫、细胞免疫及非特异性免疫功能下降^[33]。本试验结果所示, 试验第 14、21 及 28 天, RJP-Cu 低剂量组小鼠 IgA 含量显著高于空白对照组; 第 21 天及 28 天, 低剂量组小鼠 IgG 含量显著高于空白对照组; 低剂量组小鼠细胞因子 IL-2、TNF- α 、IL-6、IL-10 含量均显著高于空白对照组。已知, IL-2 具有增强 T 细胞活性, 提高机体免疫作用; IL-6 具促进 T 细胞增殖和 B 细胞分化作用; IL-10 能够调节细胞的生长分化, 调节免疫反应; TNF- α 有助于清除体内感染和促进组织修复^[34]。因此, 低剂量 RJP-Cu 具有良好的免疫调节作用。

综上所述, 剂量为 575 mg/kg 的 RJP-Cu 灌胃小鼠具有良好的安全性, 高、中、低剂量组 RJP-Cu 均具有良好的补铜效果, 其中低剂量组 RJP-Cu 能够有效促进小鼠 IgA、IgG 抗体以及 IL-2、TNF- α 、IL-6、IL-10 细胞因子的分泌, 表现出了良好的免疫增

强活性, RJP-Cu 因良好的补铜及免疫增强作用有望开发成为安全有效的补铜新制剂。

参考文献:

- [1] 张萍, 史彦江, 宋锋惠, 等. 南疆灰枣主要营养品质性状的变异及相关性研究 [J]. 果树学报, 2011, 28 (1): 77-81.
- [2] 赵非, 牛莉娟, 刘宗哲, 等. 高效液相法测定若羌红枣多糖的单糖组成 [J]. 食品科技, 2019 (11): 321-326.
- [3] TIAN L, YAN Z, CHAO G, et al. A comparative study on the antioxidant activities of an acidic polysaccharide and various solvent extracts derived from herbal *Houttuynia cordata* [J]. Carbohydr Polym, 2011, 83 (2): 537-544.
- [4] DING X, ZHU F, GAO S. Purification, antitumour and immunomodulatory activity of water-extractable and alkali-extractable polysaccharides from *Solanum nigrum* L. [J]. Food Chem, 2012, 131 (2): 677-684.
- [5] MA L, DAN G, WANG M, et al. Optimization of extraction, preliminary characterization and hepatoprotective effects of polysaccharides from *Stachys floridana* Schuttl. ex Benth [J]. Carbohydr Polym, 2012, 87 (2): 1390-1398.
- [6] 王芳. 羔羊缺铜病的诊治 [J]. 湖北畜牧兽医, 2015, 36 (1): 28-29.
- [7] 王卫秦, 袁奎超. 膨化壳聚糖铜对仔猪肠道微生物区系的影响研究 [J]. 现代牧业, 2018, 2 (3): 15-19.
- [8] ZHAI X F, SUN C T, GUAN F, et al. Synthesis and characterization of chitosan-zinc composite electrodeposits with enhanced antibacterial properties [J]. Rsc Adv, 2016, 6 (52): 46081-46088.
- [9] 朱叶萌, 谢正军, 张亚丽, 等. 壳聚糖亚铁对仔猪生长性能和血清相关生化指标的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2011 (5): 35-39.
- [10] DASK K, MONDALM K, BISWAS P, et al. Influence of level of dietary inorganic and organic copper and energy level on the performance and nutrient utilization of broiler chickens [J]. Asian Austr J Anim Sci, 2010, 23 (1): 82-89.
- [11] 张彩英, 曹华斌, 李浩荣, 等. 蛋白质螯合铜对育成蛋鸡肝脏及血液某些生化指标的影响 [J]. 饲料工业, 2010, 31 (2): 1-3.
- [12] 曹猛猛. 山药粗多糖铜络合物对 817 肉鸡生长性能、小肠消化酶活性及其形态结构的影响研究 [D]. 新乡: 河南科技学院, 2022.
- [13] 王伟, 马学芝. 羊铜缺乏症诊断与防治措施 [J]. 畜牧兽医科学 (电子版), 2019 (19): 121-122.
- [14] 张倚剑, 梁天柱, 冯栋梁, 等. 微量元素铜在养殖业中的应用研究 [J]. 广西农学报, 2019, 34 (3): 57-62.
- [15] 徐晨晨, 王珂. 微量元素铜在畜禽营养中的研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学, 2013, 34 (10): 21-24.
- [16] 李翠丽, 王伟, 张英, 等. 中药多糖提取、分离纯化方法的研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 27 (19): 2700-2703.
- [17] 德力拜尔, 阿得力江·吾斯曼, 努尔艾力·麦提尼亚孜, 等. 多糖铜络合物的制备与小鼠口服急性毒试验研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017 (11): 207-210.
- [18] 郜玉欣, 孙立权, 田虹. 实验教学中苯酚硫酸法检测灵芝多糖的探索 [J]. 广州化工, 2022, 50 (6): 160-162.

- [19] 李亚平,周鸿立. 多糖中糖醛酸含量测定方法的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2019, 49 (17): 207-211.
- [20] FANG X B, YIN X X, YUAN G F, et al. Chemical and biological characterization of polysaccharides from the bark of *Avicennia marina* [J]. Eur Food Res Technol, 2015, 241 (1): 17-25.
- [21] 查青,陈燕妮,史海龙,等. 土贝母急性毒性实验研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23 (4): 41-46.
- [22] 李红燕,陈丽莉,李彦,等. 黄芪多糖对免疫抑制小鼠肠道黏膜免疫的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36 (21): 3465-3468.
- [23] 侯明杰,周恩光,付晓悦,等. 饲用甜高粱青贮对绵羊血常规及血清内毒素浓度的影响 [J]. 中国兽医杂志, 2018, 54 (10): 36-39.
- [24] GAETKE L M, CHOW J H S, CHOW C K. Copper: toxicological relevance and mechanisms [J]. ArchToxicol, 2014, 88 (11): 1929-1938.
- [25] 王宏伟,周变华,张樑,等. 高钼低铜对小鼠肾脏结构及其表达 TNF- α 蛋白的影响 [J]. 动物医学进展, 2010, 31 (9): 51-54.
- [26] 管玲娟. 阿胶肽铁螯合物调控缺铁性贫血小鼠肠道炎症的作用及其微胶囊化研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [27] 王梦莹. 食源性低聚肽铁改善大鼠缺铁性贫血的效果研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- [28] 高伟会. 饲料中铜对猪促生长作用机理及在养猪生产中的应用 [J]. 饲料工业, 2008 (17): 7-11.
- [29] CHANG W C, CHUN J H, YOUNG K R, et al. Immunostimulatory effects of polysaccharides isolated from makgeolli [J]. Molecules, 2014, 19 (4): 5266-5277.
- [30] 张志军,冯霞,蒋娟,等. 茯苓多糖对小鼠血清 IgA、IgG 和 IgM 生物合成水平的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29 (11): 1213-1215.
- [31] 付辑光,高艳霞,李妍,等. 饲料铜水平对奶牛生产性能、养分表观消化率及血清生化指标的影响 [J]. 动物营养学报, 2018, 30 (8): 3005-3016.
- [32] 李凤娇,李敬双. 大枣多糖对小鼠淋巴细胞免疫调节作用的研究 [J]. 粮油食品科技, 2021, 29 (1): 141-147.
- [33] 高东微,马孝斌,孙远明. 牛免疫球蛋白 G 的应用及检测研究进展 [J]. 食品工业科技, 2009, 30 (5): 356-359.
- [34] 黄青,李丽媛,王钊. 灵芝多糖和猪苓多糖及其复方的免疫调节研究进展 [J]. 食品科学, 2020, 41 (17): 275-282.