龙须菜多糖的提取及其免疫调节活性研究

任颖朗，季德胜，张云林，温玲蓉，游丽君

（华南理工大学食品科学与工程学院，广东广州 510640）

摘要：本文采用水提法、酸提法和酶提法提取龙须菜多糖，比较了不同方法对提取率的影响，并测定了酸提法制备的龙须菜多糖的化学组成及免疫活性。结果发现：采用柠檬酸提取龙须菜多糖的提取率最高，为 27.66±0.49%，为水提法的 1.86 倍；其产物多糖的总糖含量、蛋白质含量、糖醛酸含量以及硫酸基含量分别为 62.24±1.09%、1.54±0.15%、6.25±0.72%和 16.74±0.11%，未检出多酚类物质。此外，龙须菜多糖对 RAW 264.7 细胞具有显著的促增殖作用，并且能够显著地提高 RAW 264.7 细胞吞噬中性红的能力；且龙须菜多糖不仅能够提高光老化小鼠的胸腺指数和脾脏指数，还能降低小鼠血清白介素-10 的含量，提高小鼠血清肿瘤坏死因子-α 的含量，这些研究表明龙须菜多糖具有较强的提高小鼠免疫功能的能力，能够缓解光老化过程中的免疫抑制现象。

关键词：龙须菜；多糖；提取；免疫

文章篇号：1673-9078(2017)10-45-51 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.10.007

Extraction of Polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* and Their Immunoregulatory Activity

REN Ying-lang, JI De-sheng, ZHANG Yun-lin, WEN Ling-rong, YOU Li-jun

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* were exacted using hot water, different acids, and enzymes. The effects of different methods on the extraction rate were compared, and the chemical composition and immunoregulatory activity of polysaccharides extracted using acids were evaluated. The results showed that the yield of the polysaccharides extracted using citric acid was the highest (27.66 ± 0.49%), which was 1.86 times those extracted using hot water. The amounts of total sugar, proteins, uronic acids, and sulfates of the polysaccharides exacted using citric acid were 62.24 ± 1.09%, 1.54 ± 0.15%, 6.25 ± 0.72%, and 16.74 ± 0.11%, respectively. No polyphenols were detected. In addition, the polysaccharides extracted using citric acid significantly promoted the proliferation of RAW 264.7 cells, and enhanced their pinocytic capability. *G. lemaneiformis* polysaccharide improved the thymus and spleen indices in photoaged mice, as well as reduced the concentration of interleukin-10 and increased tumor necrosis factor-α content in mouse serum. These findings suggest that *G. lemaneiformis* polysaccharides have a relatively high capacity to enhance the immune functions of mice and can alleviate immunosuppression during the photoaging process.

Key words: *Gracilaria lemaneiformis*; polysaccharides; extraction; immunoregulatory activity

龙须菜（*Gracilaria lemaneiformis*），又名线菜，是红藻门、杉藻目、江蓠科、江蓠属的一种海藻，广泛地分布于中国东部地区，在中国具有长期的食用历史[1]。作为中国传统食物来源，龙须菜的药用功能在 16 世纪就已得到开发，传统中医认为龙须菜具有“利便、治瘿结热气”的功效；而现代研究表明，龙须菜中氨基酸种类多达 18 种，包括 8 种人体必需氨基酸，是人体良好的蛋白来源；龙须菜中粗纤维含量为 9.2%，而脂肪含量仅为 0.8%，这对心血管疾病具有一定的预防作用[2]。龙须菜还具有一些生理活性，据研究表明，龙须菜中的多糖类物质具有降血糖、抗氧化和抗肿瘤活性[3,4]。

多糖的传统提取方法为热水提取，也有采用酸提法、超声波辅助提取法、水解法和酶提法等方法对细胞壁进行破碎，促进多糖的溶出，从而提高多糖的提取率。目前，多数研究着眼于在传统水提法的基础上进行工艺优化的研究，而研究不同破壁提取方法对提取率的影响则较少。本文采用水提法、酸提法和酶解法研究各种方法对多糖提取率的影响。

收稿日期：2017-02-02

基金项目：广东省自然科学基金项目（2014A030313242）；中央高校基本科研业务费项目（2015ZZ110）；广东省特支计划青年拔尖人才项目（2015TQ01N670）；广州市珠江科技新星项目（201610010096）

作者简介：任颖朗（1992-），男，硕士研究生，研究方向：食品营养与健康

通讯作者：游丽君（1982-），女，博士，副研究员，研究方向：食品营养与健康

皮肤光老化是日光长时间照射皮肤导致皮肤损伤的结果，而日光中的紫外线（ultraviolet radiation，UVR）是造成皮肤光老化的主要原因。皮肤光老化能够导致以下几种效应：皮肤炎症[5]、DNA 损伤[6]、皮肤癌症[7]、细胞外基质分解[8]和免疫抑制作用[9]。其中，紫外线导致的免疫抑制具有系统性，不仅能够使照射区域产生免疫抑制，也能使整个免疫系统产生抑制作用[10]。多糖属于生物大分子，具有多种生理活性，其免疫调节活性是目前研究的热点，研究龙须菜多糖在光老化过程中的免疫调节作用具有较好的可行性，同时也能为龙须菜的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

龙须菜购于山东青岛，采用泰斯特 FW135 中药粉碎机粉碎，过 40 目筛，藻粉于干燥处存放，备用。

无水乙醇、柠檬酸、苹果酸、中性红、氢氧化钠、浓硫酸、苯酚、明胶、硫酸钾、氯化钡和甲醛均为分析纯；Dulbecco's Modified Eagle 培养基(DMEM 培养基)、甲基蓝、胰酶、胎牛血清、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、胰岛素和Hanks平衡盐溶液均购置于美国Gibco公司，为生化试剂；果胶酶(14000 U/g)、复合植物水解酶(10000 U/g)和纤维素酶(7000 U/g)均购于丹麦诺维信公司，为食品级；白介素-10（IL-10）ELISA 试剂盒、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)ELISA 试剂盒均购置于深圳 Neobioscience 公司。

1.2 主要设备与仪器

FW135 中药粉碎机，中国泰斯特仪器有限公司；Hei-VAP Value Digital 旋转蒸发仪，德国 Heidoph 公司；DU730 核酸蛋白分析仪，X-15R 型离心机，美国贝克曼库尔特公司；FE20 pH 计，瑞士梅特勒托尔多公司；FilterMax F5 酶标仪，美国美谷分子仪器公司；5424 台式离心机，德国艾本德公司；KQ-800KDE 超声波清洗仪，中国昆山超声仪器有限公司；HOPE-MED 8140 皮肤光老化实验仪，中国合普科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 原料预处理与脱色

取龙须菜藻粉与无水乙醇以 1:4(m/V)的比例混合，于 80 ℃的条件下回流脱色 120 min，过滤，弃滤液，回收残渣并与新的无水乙醇混合，于 80 ℃的条件下继续回流 60 min，过滤，弃滤液，残渣回收后于 60 ℃烘箱中烘干，备用。

1.3.2 龙须菜多糖制备

1.3.2.1 传统水提法制备龙须菜多糖

称取 10 g 龙须菜粉末，加入 500 mL 去离子水，在 100 ℃下提取 3 h，取出，待冷却至室温后以 3500 r/min 转速离心 10 min，过滤，弃滤渣，滤液在 60 ℃下减压浓缩至 1/5 体积。向浓缩液缓慢加入 4 倍体积的无水乙醇，混匀，放置于 4 ℃冰箱中，过夜。提取物经醇沉后以 3500 r/min 转速离心 10 min，过滤，收集滤渣，用少量水将滤渣复溶，真空冷冻干燥后得多糖样品。

1.3.2.2 酸提法制备龙须菜多糖

根据前期实验，称取 10 g 龙须菜藻粉，加入 500 mL pH 2.0 的柠檬酸、苹果酸、柠檬酸和苹果酸混合水溶液（摩尔比为 1:1），分别在 100 ℃下提取 3 h，取出，待冷却至室温后以 3500 r/min 转速离心 10 min，过滤，弃滤渣，滤液用 NaOH 调节 pH 至 7.0，随后在 60 ℃下减压浓缩至 1/5 体积。其余步骤同 1.3.2.1。

1.3.2.3 酶提法制备龙须菜多糖

称取 10 g 龙须菜粉末，加入 500 mL 去离子水，分别再加入 1%(m/V)的果胶酶、复合植物水解酶、纤维素酶、中性蛋白酶，用盐酸分别调节 pH 至 3.5、4.0、5.0 和 7.0，随后分别在 50、50、55 和 50 ℃下提取 4 h，提取完后于沸水浴中灭酶 15 min，取出，待冷却至室温后以 3500 r/min 转速离心 10 min，过滤，弃滤渣，随后在 60 ℃下减压浓缩至 1/5 体积。其余步骤同 1.3.2.1。

1.3.3 多糖含量的测定

经冷冻干燥后多糖样品的总糖含量采用苯酚硫酸法测定，以葡萄糖作为糖当量绘制标准曲线，葡萄糖质量浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标。多糖提取率采用下列公式计算：

$$\text{多糖提取率}(\%)=m_1\times w/m_2\times 100\%$$

其中，m_1 表示真空冷冻干燥后多糖样品的质量，w 表示真空冷冻干燥后多糖样品的总糖含量，m_2 表示龙须菜原料质量（10.0 g）。

1.3.4 龙须菜多糖各组成成分测定

蛋白质含量的测定采用 lowry 法[11]，多酚含量的测定采用福林酚法[12]，硫酸基含量和糖醛酸含量的测定采用硫酸钡比浊法和咔唑法[13]。

1.3.5 龙须菜多糖免疫调节活性的测定

1.3.5.1 小鼠 RAW 264.7 细胞的培养

采用 DMEM 培养基培养 RAW 264.7 细胞，青霉素浓度为 100 单位/mL，链霉素浓度为 100 μg/mL，胎牛血清浓度为 10%(m/V)，培养温度为 37 ℃，CO_2 浓度为 5%，利用胰酶收集对数期的 RAW 264.7 细胞进

行研究。

1.3.5.2 龙须菜多糖对小鼠 RAW 264.7 细胞细胞活力的影响

采用甲基蓝法分析龙须菜多糖对 RAW264.7 细胞细胞活力的影响[14]。用胰酶收集对数期的 RAW 264.7 细胞，将细胞以 1.7×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板并培养 24 h，然后弃去培养基，向各孔添加含不同浓度的龙须菜多糖(0、20、40、60、80、100、120、240 和 480 μg/mL)的培养基，继续在培养箱内培养 24 h。弃去培养基，以 100 μL PBS 清洗两遍，加入 100 μL 甲基蓝溶液（Hank's 平衡盐溶液+1.25%戊二醛+0.6%甲基蓝，*V/V*），孵育 60 min，弃上层液体，清洗 96 孔板并加入 100 μL 洗液（50%乙醇+49% PBS+1%乙酸，*V/V*），于微板振荡器（MH-1，中国其林贝尔仪器制造有限公司）上振荡 20 min，采用 FilterMax F5 酶标仪测定各孔在 570 nm 处的吸光度。

1.3.5.3 龙须菜多糖对小鼠 RAW 264.7 细胞吞噬中性红能力的影响

龙须菜多糖对小鼠RAW 264.7细胞吞噬中性红能力的影响根据 Zhao 等[15]的方法测定并略作修改。用胰酶收集对数期的 RAW 264.7 细胞，以 1.7×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板并培养 24 h，然后弃去培养基，向各孔加入含不同浓度龙须菜多糖（120，240 和 480 μg/mL）的培养基，孵育 24 h，弃培养基，加入 100 μL 中性红的 PBS 溶液（中性红浓度为 0.1%，*m/V*），孵育 30 min。用 PBS 清洗各孔各三次，之后加入 100 μL 细胞裂解液（乙醇:乙酸=1:1，*V/V*），在 540 nm 下测定空白对照组的吸光度值为 A_1，龙须菜多糖处理组的吸光度值为 A_2。中性红吞噬率按下列公式计算：

$$吞噬率(\%)=A_2/A_1\times100\%$$

1.3.6 龙须菜多糖拮抗光老化小鼠免疫抑制实验

1.3.6.1 光老化小鼠模型的建立

采用体重为 20±2 g 的昆明小鼠作为实验动物，适应性喂养一周后，将小鼠随机分为 5 组：正常对照组，模型对照组（给予紫外线照射但不作任何处理），龙须菜多糖低剂量组（给药量为 300 mg/kg），龙须菜多糖中剂量组（给药量为 600 mg/kg），龙须菜多糖高剂量组（给药量为 900 mg/kg）。采用剃须刀对各组小鼠背部进行剃毛，剃毛面积为 2×3 cm^2，使剃毛区皮肤完全露出。龙须菜多糖灌胃组的小鼠采用灌胃给药，模型对照组和正常对照组灌喂生理盐水。从第一周开始，每天对各实验组灌胃，第二、三周的每周一、三、五采用皮肤光老化实验仪进行辐照，辐照前利用剃须刀对背部剃毛区进行剃毛，辐照源为中波紫外线（313 nm，UVB），辐照剂量为 100 mJ/cm^2，辐照后立即给药。从第四周开始，辐照剂量更改为 80 mJ/cm^2，辐照后立即给药，直至第九周。若小鼠皮肤出现炎症则隔天进行辐照，第九周后颈椎脱臼处死各组实验小鼠，解剖取内脏，血液离心后，取上层血清，置于-80 ℃冰箱备用。

1.3.6.2 小鼠胸腺和脾脏指数的测定

小鼠处死后取其胸腺和脾脏，用吸水纸将脏器表面的水分吸干，称量其质量为 m_1，小鼠体重为 m_2，胸腺指数和脾脏指数按照下列公式计算：

$$胸腺(脾脏)指数(g/100\ g\ 体重)=m_1/m_2\times100$$

1.3.6.3 小鼠血清中 IL-10 和 TNF-*α* 浓度的测定

采用 Neobioscience 公司的 ELISA 试剂盒进行测定，测定方法为双抗体夹心法，以 IL-10 和 TNF-*α* 标准品绘制标准曲线，IL-10 和 TNF-*α* 浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标。

1.3.7 数据处理

实验数据以均值±标准偏差表示，组间显著性差异分析采用软件 IBM SPSS Statistics 21 进行分析，其中 $p<0.05$ 表示具有显著性差异，$p<0.01$ 表示具有极显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 不同提取方法中龙须菜多糖的提取率

2.1.1 传统水提法和酸提法所得龙须菜多糖的提取率

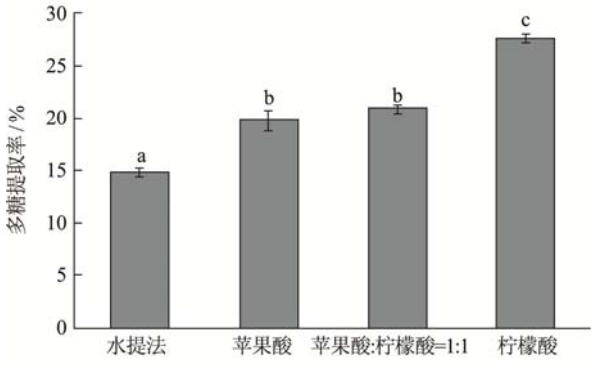


图 1 水提法及酸提法提取龙须菜多糖的提取率

Fig.1 Extraction yield of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* using water and different acids

传统水提法提取的龙须菜多糖以及在不同的条件下酸提法提取的龙须菜多糖提取率如图 1 所示。采用苹果酸、苹果酸和柠檬酸混合水溶液（摩尔比为 1:1）、柠檬酸水溶液提取的的龙须菜多糖的提取率分别为 20.18±0.72%、20.95±0.38%和 27.66±0.49%，而传统水提法的提取率仅为 14.87±0.18%。酸提法的龙须菜多

糖提取率均显著高于传统水提法，是传统水提法所得多糖提取率的 1.86 倍，且柠檬酸提取的龙须菜多糖的提取率远高于苹果酸提取的龙须菜多糖，这表明酸提法能够显著提高龙须菜多糖的提取率，而不同的酸在同样的提取条件下对植物细胞的作用效果不同。植物细胞细胞壁存在木质素和纤维素，两者之间还存在一定的交联结构，导致细胞壁不容易被破坏和降解，多糖的析出率降低[16]。柠檬酸即 3-羟基-3-羧基戊二酸，属于三元酸，苹果酸又名羟基琥珀酸、羟基丁二酸，属于二元酸，两者在结构上有一定的相似性，但柠檬酸比苹果酸多连接了一个羧甲基（-CH_2COOH），这可能是导致柠檬酸和苹果酸在降解龙须菜细胞壁的过程中出现作用效果不同的原因。

2.1.2 酶提法所得龙须菜多糖的提取率

不同种酶提取龙须菜多糖的提取率如图 2 所示。采用果胶酶、复合植物水解酶和纤维素酶提取的龙须菜多糖提取率分别为 19.58±0.98%、14.38±1.30%和 25.36±0.19%，采用果胶酶和纤维素酶制备的龙须菜多糖提取率均显著高于传统水提法制备的龙须菜多糖，其中采用纤维素酶提取的龙须菜多糖提取率最高，复合植物水解酶提取的龙须菜多糖提取率最低。复合植物水解酶属于非淀粉水解酶，对细胞壁中的纤维素、半纤维素有一定的降解作用，除此之外还能降解木聚糖和阿拉伯聚糖等糖类；果胶酶和纤维素酶常作为复合体系应用于植物成分的提取，因为细胞壁和细胞间层存在果胶，而纤维素则是细胞壁的重要组成部分，果胶酶和纤维素酶能够很好地破坏细胞壁[17]。实验结果表明采用纤维素酶提取龙须菜多糖的提取率最高，可能有以下两个原因：其一，由于细胞壁中纤维素含量较高，所以胞壁的水解程度较高，导致多糖易于析出；其二，提取的多糖中有一部分来自于纤维素的水解产物。

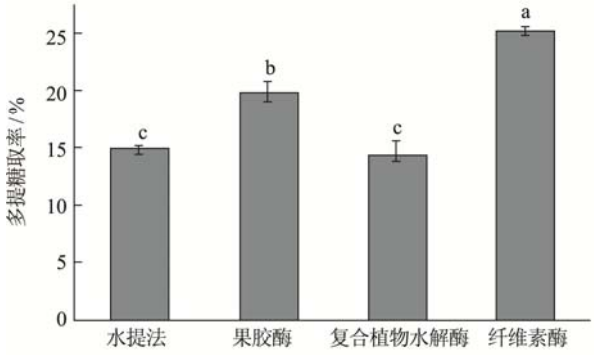


图 2 水提法和采用不同酶提取龙须菜多糖的提取率

Fig.2 Extraction yield of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* using water and different enzymes

比较了各种方法对龙须菜多糖提取率的影响，柠檬酸提取法的提取率最高，因此采用该法提取多糖所得产物进行后续研究。

2.2 柠檬酸提取的龙须菜多糖部分化学组成

表 1 柠檬酸辅助提取的龙须菜多糖部分化学组成

Table 1 Partial chemical composition of the polysaccharides extracted from *Gracilaria lemaneiformis* using citric acid

	总糖	蛋白质	多酚	硫酸基	糖醛酸
含量（*m/m*，%）	62.24±1.09	1.54±0.15	未检出	16.74±0.11	6.25±0.72

如表 1 所示，柠檬酸提取的龙须菜多糖总糖含量、蛋白质含量、糖醛酸含量以及硫酸基含量分别为 62.24±1.09%、1.54±0.15%、6.25±0.72%、16.74±0.11%，而多酚含量未检出，其它尚未检测出的成分可能是水分和提取过程中掺入的灰分以及原料本身所含有的灰分物质，糖醛酸的检出说明柠檬酸提取的龙须菜多糖属于弱酸性多糖，这可能与提取液是柠檬酸溶液有关。多酚是一类具有良好生物活性的物质，为避免对后期的活性测定的影响，在多糖的提取中应当避免提取该类物质，由于柠檬酸辅助提取法的提取温度为 100 ℃，且醇沉过程中除去了醇溶性酚类，所以多糖中几乎不含多酚。蛋白质与多酚类物质类似，也具有较好的生物活性，而且蛋白质也具有一定的水溶性，所以在多糖的提取过程中容易提取到蛋白质类杂质，所以多糖的提取一般包括除蛋白，由于柠檬酸提取的多糖中蛋白质含量较低，所以无需除蛋白。多糖中的硫酸基与多糖的抗肿瘤和免疫调节活性具有一定相关性，有研究表明[18]，岩藻多糖经化学法去硫酸基之后，其免疫调节活性显著性降低，这表明硫酸基在多糖免疫调节活性中具有重要作用。

2.3 柠檬酸提取的龙须菜多糖免疫调节活性

2.3.1 龙须菜多糖对 RAW 264.7 细胞的促增殖作用

如图 3A 所示，在测定浓度下，龙须菜多糖对 RAW 264.7 细胞不具有毒性并且能够促进 RAW 264.7 细胞的增殖：在龙须菜多糖浓度为 120 μg/mL 时，RAW 264.7 细胞的细胞活力为 165.45±6.93%，与空白对照组具有显著性差异，同时这种促增殖作用与龙须菜多糖浓度呈现剂量效应。据报道，多糖能够激活有丝分裂原活化蛋白激酶（MAPKs），而此类激酶在细胞增殖过程中具有非常重要的作用[19]，龙须菜多糖对 RAW

264.7 细胞促增殖作用可能与 MAPKs 有关。

RAW 264.7 细胞属于小鼠巨噬细胞，在免疫系统中具有重要作用。当机体被病原体侵入时，巨噬细胞是首先识别这些病原体的细胞，随后立即被激活。激活后的巨噬细胞不仅能够直接吞噬病原体，还能够分泌多种细胞因子（肿瘤坏死因子、白介素和干扰素等）介导特异性免疫，进一步激活 T 细胞[20]。龙须菜多糖能够促进 RAW 264.7 细胞的增殖，说明其具有免疫增强作用。

2.3.2 龙须菜多糖增强 RAW 264.7 细胞胞饮能力

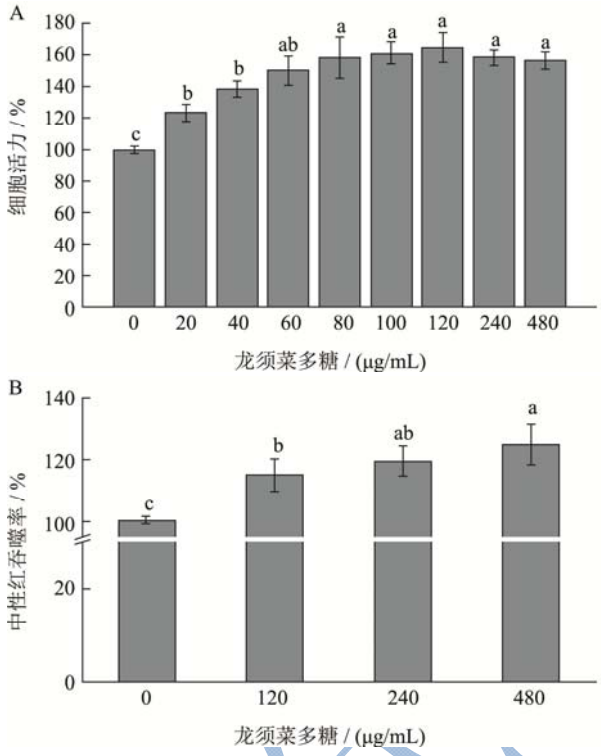


图 3 龙须菜多糖对 RAW 264.7 细胞的免疫调节作用

Fig.3 Effects of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* on the immune function of RAW 264.7 cells

如图 3B 所示，在龙须菜多糖浓度为 480 μg/mL 时，RAW 264.7 细胞吞噬中性红的吞噬率为 124.79±6.55%，显著高于未加龙须菜多糖处理的空白对照组，且吞噬率的增长与龙须菜多糖的浓度呈剂量效应。这说明龙须菜多糖能够促进 RAW 264.7 吞噬异物的能力，促进其免疫功能的发挥。巨噬细胞吞噬中性红的功能属于胞饮功能，是巨噬细胞的功能之一，有研究表明胞饮作用与磷脂酰肌醇-3-激酶（PI3k）有关[21]。

2.4 柠檬酸提取的龙须菜多糖拮抗光老化小鼠免疫抑制效果

2.4.1 龙须菜多糖对光老化小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响

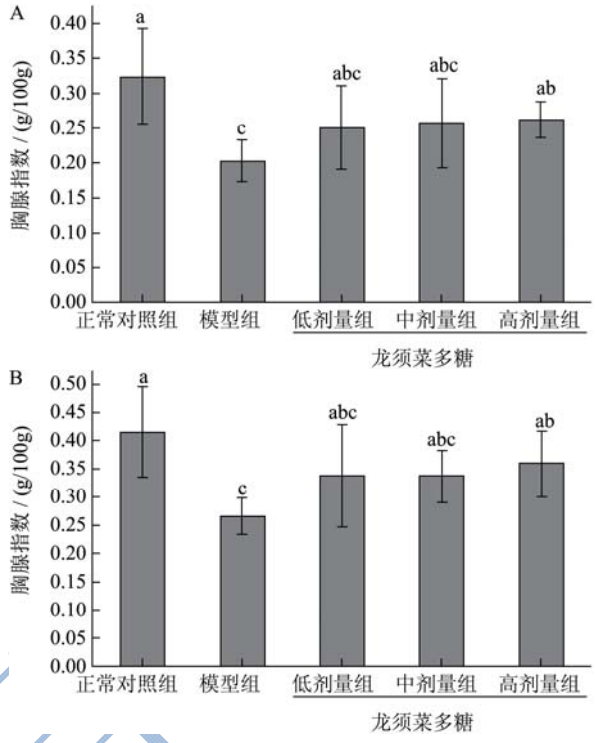


图 4 龙须菜多糖对光老化小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响

Fig.4 Effects of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* on the thymus and spleen indices in photoaged mice

胸腺和脾脏是人体重要的免疫器官，胸腺细胞对于 T 淋巴细胞极其重要，T 淋巴细胞的成熟发育就在胸腺中进行，而脾脏则是 B 淋巴细胞的成熟发育场所，因此胸腺和脾脏的功能对人体免疫系统都非常重要[23]。如图 4A 所示，光老化小鼠（模型组小鼠）的胸腺指数显著下降，其胸腺指数约为正常对照组的 70%，显示紫外照射可造成小鼠的胸腺损伤。而龙须菜多糖高剂量灌胃组的小鼠胸腺指数与模型组具有显著性差异，其胸腺指数约为模型组的 125%。多糖各剂量组小鼠的胸腺指数与正常对照组无显著性差异，说明龙须菜多糖可减轻紫外照射对小鼠胸腺的影响。如图 4B 所示，模型组小鼠的脾脏指数约为正常对照组的 60%，显示紫外辐射可造成小鼠的脾腺损伤。而高剂量龙须菜多糖灌胃组的小鼠脾脏指数与模型组也具有显著性差异，这说明龙须菜多糖可减轻紫外辐射对小鼠脾脏的影响。

2.4.2 龙须菜多糖对光老化小鼠血清 IL-10 和 TNF-α 含量的影响

IL-10 是由 160 个氨基酸组成的单链糖蛋白，多种免疫细胞均能分泌 IL-10。传统观点认为 IL-10 是一种免疫抑制因子，它在炎症和机体受感染时的免疫应答中具有重要作用[24]，然而也有研究表明 IL-10 具有

免疫刺激作用：IL-10 不仅能够提高肥大细胞的数量，还能促进内毒素血症患者 TNF 和干扰素-γ(IFN-γ)的表达升高[25,26]，因此 IL-10 对免疫功能的调节是双向的。周琳等[27]认为IL-10的这种双向调节作用取决于IL-10的浓度，在浓度非常高的时表现出免疫抑制作用而浓度较低时则是免疫刺激作用。如图 5A 所示，模型组小鼠的血清 IL-10 的含量为 254.18±9.43 pg/mL，而正常组小鼠的血清 IL-10 的含量为 5.78±4.22 pg/mL，其含量高出正常组约 50 倍，这可能说明模型组小鼠受到了较强的免疫抑制作用，同时也说明紫外线对小鼠的免疫抑制效果具有系统性，并非仅仅影响照射区域。多糖处理组的小鼠血清 IL-10 含量均显著低于模型组的小鼠血清 IL-10 含量，说明龙须菜多糖可拮抗紫外线对小鼠造成的免疫抑制作用。

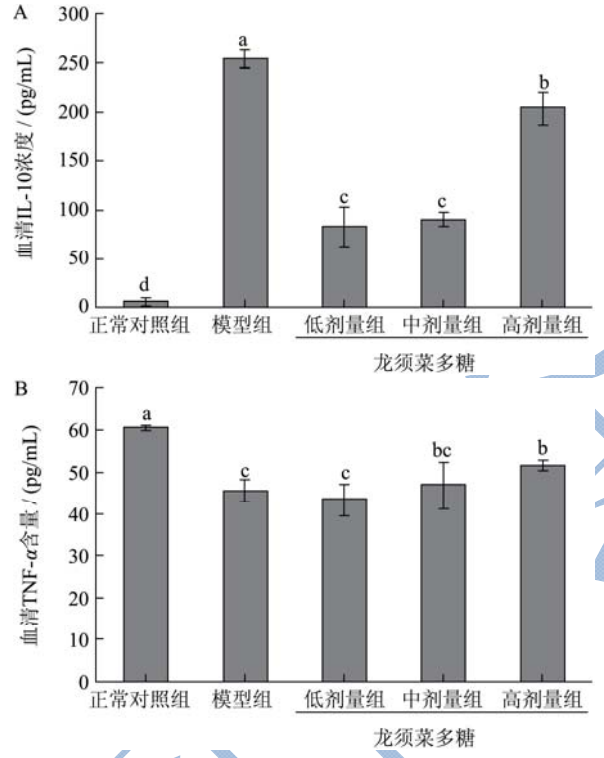


图 5 龙须菜多糖对光老化小鼠血清 IL-10 和 TNF-α 含量的影响的影响

Fig.5 Effects of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* on the contents of L-10 and TNF-α in the serum of photoaged mice

TNF-α 属于促炎因子，产生于巨噬细胞和 T 细胞等多种免疫细胞，它能够通过激活单核细胞调节肿瘤坏死因子相关的自适应免疫实现其免疫调节功能[28]，在炎症反应和病原入侵机体时，血清中的 TNF-α 含量升高，增强机体的免疫功能。如图 5B 所示，模型组小鼠血清 TNF-α 含量为 45.64±2.62 pg/mL，而正常对照组小鼠血清 TNF-α 含量为 60.62±0.63 pg/mL，两者具有显著性差异，表明紫外辐射可降低小鼠体内的免疫功能。而龙须菜多糖高剂量灌胃组的小鼠血清 TNF-α 含量显著高于模型组，为模型组小鼠的 113%，表明龙须菜多糖具有一定的增强免疫的效果。

3 结论

在本研究中，柠檬酸提取的龙须菜多糖具有最高的提取率，且耗时较短，其总糖含量为 62.24±1.09%（*m/m*），蛋白质含量为 1.54±0.15%（*m/m*），硫酸基含量为 16.74±0.11%（*m/m*），糖醛酸含量为 6.25±0.72%，不含多酚类物质。该多糖能够提高光老化小鼠的胸腺和脾脏指数，降低光老化小鼠血清 IL-10 的含量，提高 TNF-α 的含量，具有一定的免疫增强活性。

参考文献

[1] Liu Qing-mei, Yang Yang, Maleki Soheila J, et al. Anti-food allergic activity of sulfated polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* is dependent on immunosuppression and inhibition of p38 MAPK [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(22): 4536-4544

[2] 周峙苗,何清,马晓宇.东海红藻龙须菜的营养成分分析及评价[J].食品科学,2010,31(9):284-287
ZHOU Shi-miao, HE Qing, MA Xiao-yu. Evaluation of nutritional components in *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Food Science, 2010, 31(9): 284-287

[3] 陈美珍,余杰,廖灶辉,等.龙须菜多糖抑瘤活性及对荷瘤小鼠抗氧化作用的研究[J].中国海洋药物,2008,27(2):46-49
CHEN Mei-zhen, YU-Jie, LIAO Zao-hui, et al. Study on the antitumor activity and antioxidation of polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* in Sarcoma$_{180}$ bearing mice [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2008, 27(2): 46-49

[4] Liao Xu-biao, Yang La-wei, Chen Mei-zhen, et al. The hypoglycemic effect of a polysaccharide (GLP) from *Gracilarialemaneiformis* and its degradation products in diabetic mice [J]. Food & Function, 2015, 6(8): 2542-2549

[5] Dang Lin, Wang Yan, Xue Ya-dong, et al. Low-dose UVB irradiation prevents MMP2-induced skin hyperplasia by inhibiting inflammation and ROS [J]. Onocology Reports, 2015, 34(3): 1478-1486

[6] Kibitel J, Hejmadi V, Alas L, et al. UV-DNA damage in mouse and human cells induces the expression of tumor necrosis factor alpha [J]. Photochemistry and Photobiology, 1998, 67(5): 541-546

[7] Frank R De Gruijl. Skin cancer and solar UV radiation [J]. European Journal of Cancer, 1999, 35(14): 2003-2009

[8] Herrmann G, Wlaschek M, Lange T S, et al. UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts [J]. Experimental Dermatology, 1993, 2(2): 92-97

[9] Aubin F. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression [J]. European Jouranal of Dermatology, 2003, 13(6): 515-523

[10] Ullrich S E. Mechanisms underlying UV-induced immune suppression [J]. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2005, 571(1-2): 185-205

[11] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275

[12] Zhang Hui, Wang Jun-qiao, Nie Shao-ping, et al. Sulfated modification, characterization and property of a water-insoluble polysaccharide from *Ganoderma Atrum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 79: 248-255

[13] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction [J]. Analytical Biochemistry, 1962, 4(4): 330-334

[14] Felice D L, Sun Jie, Liu, Rui-Hai. A modified methylene blue assay for accurate cell counting [J]. Journal of Functional Foods, 2009, 1(1): 109-118

[15] Zhao Li-yan, Dong Yan-hong, Chen Gui-tang, et al. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from ganoderma lucidum [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 783-789

[16] 吉喆,凌喆,张逊,等.预处理对木质纤维素生物质细胞壁超微结构的影响[J].生物工程学报,2014,30(5):707-715
JI Zhe, LING Zhe, ZHANG Xun, et al. Effect of pretreatment on topochemical and ultrastructural changes of lignocellulose plant cell walls: a review [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(5): 707-715

[17] 薛长湖,张永勤,李兆杰,等.果胶及果胶酶研究进展[J].食品与生物技术学报,2005,24(6):94-99
XUE Chang-hu, ZHANG Yong-qin, LI Zhao-jie, et al. Recent development of pectin and pectolytic enzyme [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2005, 24(6): 94-99

[18] Jiao Guang-ling, Yu Guang-li, Zhang Jun-zeng, et al. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae [J]. Marine Drugs, 2011, 9(2): 196-223

[19] Go Hiroe, Hwang Hye-Jung, Taek-Jeong Nam. Polysaccharides from capsosiphon fulvescens stimulate the growth of IEC-6 cells by activating the mapk signaling pathway [J]. Marine Biotechnology, 2011, 13(3): 433-440

[20] Han Eun-Hee, Choi Jae-Ho, Hwang Yong-Pil, et al. Immunostimulatory activity of aqueous extract isolated from prunella vulgaris [J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(1): 62-69

[21] Araki N, Johnson M T, Swanson J A. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages [J]. The Journal of Cell Biology, 1996, 135(5): 1249-1260

[22] 何嘉,郭建辉,梁栋,等.健脾益肺口服液对慢阻肺"肺脾气虚证"大鼠脾脏指数和胸腺指数的影响[J].海南医学,2014,10:1412-1414
HE Jia, GUO Jian-hui, LIANG Dong, et al. Influence of spleen-strengthening and lung-tonifying liquid on spleen index and thymus index of COPD in rats with Lung and spleen qi deficiency syndrome [J]. Hainan Medical Journal, 2014, 10: 1412-1414

[23] Couper K N, Blount D G, Riley E M. IL-10: The master regulator of immunity to infection [J]. Journal of Immunology, 2008, 180(9): 5771-5777

[24] Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond M W, et al. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors [J]. The Journal of Experimental Medicine, 1991, 173(2): 507-510

[25] Lauw F-N, Pajkrt D, Hack C-E, et al. Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia [J]. Journal of Immunology, 2000, 165(5): 2783-2789

[26] 周琳,周光炎,路丽明.IL-10 的双向免疫调节作用[J].细胞与分子免疫学杂志,2012,28(10):1100-1106
ZHOU Lin, ZHOU Guang-yan, LU Li-ming. Bi-directional effects of IL-10 on immunomodulatory progress [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2012, 28(10): 1100-1106

[27] Iwamoto S, Iwai S, Tsujiyama K, et al. TNF-alpha drives human CD14(+) monocytes to differentiate into CD70(+) dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses [J]. Journal of Immunology, 2007, 179(3): 1449-1457

[28] Cadet J, Wagner J-R. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013, 5(2): 12559-12577