

近江牡蛎糖胺聚糖的免疫调节活性研究

胡雪琼, 吴红棉, 范秀萍, 刘倩

(广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东普通高等学校水产品深加工重点实验室, 国家贝类加工技术研发分中心(湛江), 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088)

摘要: 以近江牡蛎全脏器为原料提取近江牡蛎糖胺聚糖, 对其理化性质和免疫调节活性进行研究。采用柱层析法分离纯化近江牡蛎糖胺聚糖得到纯化级分; 用高效液相色谱 (HPLC)、红外光谱 (IR) 分析其理化性质; 采用小鼠体内注射环磷酰胺 (CTX) 法建立免疫抑制动物模型, 测试其对小鼠的非特异性免疫、体液免疫的影响; 采用噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞免疫和自然杀伤细胞 (NK 细胞) 活性; 采用 ELISA 法检测肿瘤坏死因子 TNF- α 、干扰素 IFN- γ 、小鼠白细胞介素 IL-2 的含量; Griess 法测定 NO 含量。结果表明近江牡蛎糖胺聚糖纯化级分 CGIa、CGIIa 是由糖醛酸、氨基葡萄糖按一定比例构成, 含有硫酸基, 相对分子量分别为 5.17×10^5 Da、 2.64×10^5 Da, IR 分析显示, CGIa 和 CGIIa 都具有糖胺聚糖的特征吸收。牡蛎糖胺聚糖对正常小鼠免疫器官指数、抗体生成数和血清溶血素、细胞免疫、单核巨噬细胞、NK 细胞杀伤活性的影响均为阳性, 表明其具有免疫增强功能。CGIa 和 CGIIa 能促进正常小鼠免疫细胞分泌 TNF- α 、IFN- γ 、IL-2 和 NO 细胞因子。免疫功能的增强可能是通过促进细胞因子的分泌实现的。

关键词: 近江牡蛎; 糖胺聚糖; 理化性质; 细胞因子; 免疫调节作用

文章编号: 1673-9078(2014)12-16-24

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.12.004

Immunomodulatory Activity of Glycosaminoglycans from Jinjiang Oyster

Crassostrea rivularis

HU Xue-qiong, WU Hong-mian, FAN Xiu-ping, LIU Qian

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing (Zhanjiang), College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Glycosaminoglycans were extracted from the jinjiang oyster, *Crassostrea rivularis*, and their physicochemical properties and immunomodulatory activities were studied. Column chromatography was used to obtain a purified fraction of glycosaminoglycans, while high-performance liquid chromatography (HPLC) and infrared spectroscopy (IR) were used to study their physicochemical properties. An immunosuppressed animal model was established by injecting cyclophosphamide (CTX) in mice and the effects of Jinjiang oyster *Crassostrea rivularis*-derived glycosaminoglycans on the nonspecific immunity and humoral immunity of mice were studied. The activity of immune cells and natural killer (NK) cells was evaluated by the MTT assay. Tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , and interleukin (IL)-2 levels in mice were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The level of nitric oxide (NO) was determined by Griess assay. The results showed that CGIa and CGIIa from the purified fraction of glycosaminoglycans consisted of uronic acid and glucosamine in a certain proportion, with relative molecular weights of 5.17×10^5 and 2.64×10^5 Da, respectively, in addition to sulfate groups. IR analysis showed that CGIa and CGIIa showed characteristic IR absorption profiles of glycosaminoglycans. The results of tests for glycosaminoglycans effects on the immune organ index, antibody production number, serum hemolysis level, cellular immunity, mononuclear macrophage, killing activity of NK cells in normal mice, were all positive, indicating that Jinjiang oyster *Crassostrea rivularis* glycosaminoglycans enhances immune function. CGIa and CGIIa also stimulated immune cells in normal mice to secrete cytokines including TNF- α , IFN- γ , IL-2, and NO. Enhanced immune function may be achieved by promoting the secretion of cytokines.

Key words: jinjiang oyster *Crassostrea rivularis*; glycosaminoglycan; physicochemical properties; cytokine; immunomodulatory effect

收稿日期: 2014-04-28

项目来源: 广东省海洋渔业科技推广专项 (A201008102)

作者简介: 胡雪琼 (1970-), 女, 高级实验师, 研究方向为农海产品深加工; 通讯作者: 吴红棉 (1953-), 男, 硕士, 教授, 研究方向为海洋生物活性物质

糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG), 又称酸性粘多糖或氨基多糖, 是动物体内存在的特征性多糖类化合物, 是体内蛋白聚糖的糖链组成部分^[1]。糖胺聚糖在抗癌、增强免疫功能、抗氧化、抗血栓形成等方面都呈现出了较强的生物活性^[2-5]。Shibeta 等^[6]发现墨角藻糖胺聚糖(Fucoidans)能激活 TNF- α 的分泌和增加巨噬细胞、多形核白细胞过氧化物酶的含量从而可以拮抗胃癌。Umezawa 等研究表明一种海洋微生物 *Flovobacterium w. lig. inosum* 能产生一种胞外多糖, 称为 Marinactan, 也具有增强免疫活性, 促进体液免疫和细胞免疫, 能抑制多种动物移植肿瘤, 已用于临床^[7]。

近江牡蛎 (*Crassostrea rivularis*), 牡蛎科或燕蛤科双壳类软体动物, 分布于温带和热带各大洋沿岸水域, 是我国四大养殖贝类之一, 在广东、广西、福建、浙江、台湾等沿海地区都有大量人工养殖。其肉味鲜美, 营养丰富, 有“海中牛奶”之称, 是我国首批列为药食同源的保健疗效食品之一。近年来人们越来越注重其精、深加工的同时, 发现近江牡蛎脏器利用率不高, 国内近江牡蛎主要以鲜食和制成干肉制品为主, 少量加工成蚝油, 或其它调味品。牡蛎除食用外, 作为治病强身的海洋药物正以其独特的高效作用, 越来越令人刮目相看。本研究团队以近江牡蛎全脏器为原料, 从中提取纯化出糖胺聚糖 (以下简称牡蛎糖胺聚糖), 实验证明牡蛎糖胺聚糖具有抗肿瘤活性^[8-9], 其抗肿瘤机理可能与增强免疫功能有关。因此本文为了进一步探讨其作用, 对粗提物提取纯化出糖胺聚糖 (以下简称牡蛎糖胺聚糖), 在对其理化性质进行测定的基础上, 进一步对其免疫调节活性进行研究, 为牡蛎的开发利用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

近江牡蛎 (全脏器), 湛江市东风市场, 全脏器冷冻备用; 标准葡聚糖 Dextran、盐酸氨基半乳糖、RPMI1640 培养液、噻唑蓝 (MTT), Sigma 公司; 葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸, 国药集团化学试剂有限公司; DEAE-52 纤维素、Sephadex G-200、阿利新蓝 8GX, Whatman 进口分装; 吡唑、小牛血清、刀豆蛋白 A (ConA), 二甲基亚砷 (DMSO), 上海化学试剂公司; L-半胱氨酸盐酸盐、肝素钠、台盼蓝, 上海化学试剂公司; 考马斯亮蓝 G-250 购于上海华舜生物工程有限公司; 注射用环磷酰胺 (CTX), 江苏恒瑞医药股份有限公司; 小鼠 IL-2(小鼠白细胞介素-2)试剂

盒、小鼠 IFN- γ (小鼠干扰素- γ)试剂盒、小鼠 TNF- α (小鼠肿瘤坏死因子- α)试剂盒, 博士德生物工程有限公司; 绵羊红细胞 (SRBC), 广州南方医院;

补体制备: 采集豚鼠血, 分离出血清 (5只豚鼠血清混合), 将1 mL压积SRBC加入到5 mL豚鼠血清中, 放4 °C冰箱30 min, 经常振荡, 离心取上清, 分装, -70 °C保存, 用时以生理盐水按1:10稀释;

K562 肿瘤细胞, 广东海洋大学海洋药物研究所提供; SPF 级 KM 小鼠 (合格证号: SCXK(湘)2009-0012), 湖南省长沙市天勤生物技术有限公司提供。

MK-C300N 型高速组织捣碎机, 飞利浦公司; AUW-120 型电子分析天平, 日本 SHIMADZU 公司; MiniPellicon 超滤系统, 美国 MiniPellicon 科技有限公司; UV-8000 型紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪, 日本 SHIMADZU 公司; FTS-175C 红外光谱仪, Bio-Rad Win 公司; ELx800 型全波段酶标仪, 美国伯爵仪器有限公司; RCO3000T-5-VBC 型二氧化碳培养箱, Thermo Electron Corporation; CKX41 型倒置显微镜, 奥林巴斯 OPTICAL 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 近江牡蛎糖胺聚糖样品制备

牡蛎全脏器经双酶酶解^[9]、醇沉、脱色和等电点除蛋白和超滤脱盐浓缩, 得到精制品 CG, 经 DEAE-52 纤维素柱以流速 10 mL/h、进样量 5.0 mL、进样浓度 20 mg/mL、洗脱液为 pH 6.0 的 0.5 M NaAc 缓冲液和 1.5 M NaCl 的条件进行层析得级分 CGI、CGII, 再经 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶层析得级分 CGIa、CGIIa。

1.2.2 牡蛎糖胺聚糖理化性质分析

总糖含量的测定采用苯酚-硫酸法; 总糖胺聚糖含量的测定采用阿利新蓝比色法; 蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝; 糖醛酸含量的测定采用硫酸-吡唑法; 硫酸基含量的测定采用明胶-氯化钡沉淀法; 氨基己糖和氨基半乳糖含量测定采用 Wanger 比色法; 近江牡蛎糖胺聚糖采用两个极分红外光谱检测采用-KBr 压片法; 糖胺聚糖的纯度及相对分子质量采用高效液相色谱法。

1.2.3 牡蛎糖胺聚糖对正常小鼠和免疫抑制小鼠免疫器官指数及廓清指数影响的测试

1.2.3.1 小鼠免疫器官指数的测定

参考文献^[10]。取 16~18 g KM 小鼠随机分组, 每组 8 只, 雌雄各半。实验设空白对照组 (生理盐水), CG 剂量组 (25、50、100 mg/kg), CTX 免疫抑制组 (30 mg/kg), CG 治疗组 (CG+CTX) (25、50、100

mg/kg)。

CTX 通过腹腔注射方式给药, CG 经灌胃给予, 周期 7 d, 停药 24 h 后小鼠颈椎脱臼处死, 解剖取肝脏、胸腺和脾脏并称量, 其中小鼠胸腺指数和脾指数的计算:

$$\text{胸腺指数} = \text{胸腺重} \times 1000 / \text{体重} \quad (1)$$

$$\text{脾指数} = \text{脾脏重} \times 1000 / \text{体重} \quad (2)$$

1.2.3.2 碳粒廓清试验

参考文献^[11], 小鼠免疫模型同免疫器官指数实验。停药 24 h 后, 于小鼠尾静脉注射印度墨汁 (0.1 mL/10 g 体重), 注入墨汁 2 min、10 min 后, 分别从眼内眦静脉从取血 20 μ L, 立即加入到 2 mL 0.1% Na_2CO_3 溶液中。以 0.1% Na_2CO_3 作空白, 于在波长 600 nm 处测 OD 值, 计算小鼠碳粒廓清指数。

$$\text{廓清指数} = (\log OD_1 - \log OD_2) / (T_2 - T_1) \quad (3)$$

注: $OD_1=2$ min 时的吸光度值, $T_1=2$ min; $OD_2=10$ min 时的吸光度值, $T_2=10$ min。

1.2.4 牡蛎糖胺聚糖对小鼠脾细胞增值影响的测定

1.2.4.1 脾细胞悬液的制备

根据参考文献^[12]的方法制备。

1.2.4.2 牡蛎糖胺聚糖对小鼠脾细胞增值影响的测定

将脾细胞悬液加 96 孔培养板中, 每孔 100 μ L。同时加入 CG、CGIa、CGIIa 各 20 μ L, 使其终浓度分别为 10、25、50、100 μ g/mL, 并设 PBS 对照组 (即每孔加入 20 μ L PBS)。对照组和每个浓度的样品组均设 4 复孔。37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养 44 h 后, 加入 MTT 20 μ L (5 mg/mL), 培养 4 h 后每孔吸出 100 μ L 上清液, 加入 100 μ L DMSO, 振荡 30 min, 在波长 570 nm 处测 OD 值, 由公式 (4) 计算刺激指数。

$$\text{刺激指数 (SI)} = \text{实验孔平均 OD 值} / \text{对照孔平均 OD 值} \quad (4)$$

1.2.4.3 牡蛎糖胺聚糖协同 ConA 对小鼠脾细胞增值影响的测试

每孔同时加入 ConA 溶液 10 μ L 使终浓度达到 5 μ g/mL, 其他步骤按 1.2.4.2。

1.2.5 体液免疫功能测试

1.2.5.1 血清溶血素含量的测定

血清溶血素的分光光度法^[13]测定。选取 16~18 g KM 小鼠随机分为 8 组, 每组 8 只, 雌雄各半。实验设空白对照组 (生理盐水), CG 剂量组 (25、50、100 mg/kg), CTX 免疫抑制组 (30 mg/kg), CG 治疗组 (CG+CTX) (25、50、100 mg/kg)。CG、CTX 均灌胃给予。小鼠致敏后 6 d 摘眼球取血, 室温中待血液凝固分离出血清后, 对分离的血清做 800 倍稀释。取无菌试管一次加入稀释后的血清、0.4% SRBC、补

体、生理盐水各 0.5 mL, 空白对照管用生理盐水代替血清的, 混匀后置于饱和湿度、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养 1 h, 3000 r/min 离心 5 min, 取上清液在波长 570 nm 处测 OD 值。

$$\text{HC}_{\text{IgM}} = \text{样品 OD 值} \times \text{稀释倍数} \quad (5)$$

1.2.5.2 抗体生成细胞数测定

SRBC 定量溶血测定法 (QHs)^[13], 小鼠免疫方法同 1.2.5.1。免疫后 6 d 无菌取脾, 操作方法同 1.2.4.1。用生理盐水把脾细胞制成 5×10^6 个/mL 脾细胞悬液。取无菌试管若干, 依次加入脾细胞悬液、0.2% SRBC、10% 豚鼠血清各 0.5 mL, 混合均匀。设置不加补体空白对照组。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 1 h, 3000 r/min 离心 5 min。取上清液在波长 413 nm 处测 OD 值。

1.2.6 MTT 法检测细胞免疫和 NK 细胞活性

1.2.6.1 牡蛎糖胺聚糖对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能影响的测定

(1) 小鼠腹腔巨噬细胞的制备

根据参考文献^[11]的方法进行制备。

(2) 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红实验

根据参考文献^[14]稍加改进: 将 96 孔培养板中制得的巨噬细胞单层每孔加入 100 μ L 的 RPMI 1640 培养液, 分别加入 CG、CGIa、CGIIa 样品各 20 μ L, 使样品的终浓度分别达到 10 μ g/mL、25 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL。PBS 作空白对照。在饱和湿度、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中连续培养 22 h, 每孔加入中性红生理盐水溶液, 使终浓度达到 1 mg/mL, 再继续培养 30 min, 吸取上清液, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 每孔加入细胞溶解液 (乙酸:无水乙醇=1:1) 100 μ L, 室温 2 h 后测其在波长 540 nm 处的 OD 值。各组比较时将光密度值按下式转化为吞噬率:

$$\text{吞噬率} / \% = OD_{\text{样品}} / OD_{\text{对照}} \times 100\% \quad (6)$$

1.2.6.2 牡蛎糖胺聚糖对 NK 细胞活性影响的检测

参考文献^[15-17], 靶细胞的制备: 复苏和培养 K562 肿瘤细胞, 实验前 24 h 将细胞传代, 用 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL, 用台盼兰计数活细胞比例在 95% 以上。效应细胞的制备: 参照 1.2.4.1 制备的小鼠脾淋巴细胞, 用 RPMI 1640 培养液调整为 5×10^6 个/mL, 用台盼兰计数活细胞比例在 95% 以上。细胞毒试验: 在 96 孔细胞培养板上分别设置: 效应细胞孔、靶细胞孔、效靶细胞孔三组, 每孔分别加入 100 μ L 相应的细胞悬液, 效靶细胞比例为 50:1, 每孔总体积为 200 μ L。在实验孔中加入受试样品 CG、CGIa、CGIIa 各 10 μ L, 各样品均设定 4 个剂量 (10 μ g/mL、

25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL), 每个剂量做 4 个复孔, 将培养板置于饱和湿度、37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h, 按照 MTT 比色法测定 570 nm 波长下各孔的 OD 值, 计算 NK 细胞杀伤活性。

$$\text{NK细胞杀伤活性} = [1 - (\text{OD效靶细胞} - \text{OD效应细胞}) / \text{OD靶细胞}] \times 100\% \quad (7)$$

1.2.7 牡蛎糖胺聚糖对正常小鼠免疫细胞分泌细胞因子影响的测定

参考文献^[15-17]用 RPMI1640 培养液将 CGIa、CGIIa 分别配置成高中低三个浓度, 无菌过滤后在 96 孔板中每孔加入 100 μL, 使终浓度分别为 100 μg/mL、50 μg/mL、25 μg/mL; 正常对照组每孔加入 RPMI1640 培养液 100 μL; LPS 阳性对照组每孔加入 RPMI1640 培养液配置的 LPS 100 μL, 终浓度为 10 μg/mL; ConA 阳性对照组每孔加入 RPMI1640 培养液配置的 ConA 100 μL, 终浓度为 4 μg/mL。在此基础上, 按照 1.2.6.1 或者 1.2.4.1 准备的细胞, 每孔加入小鼠腹腔巨噬细胞或者小鼠脾淋巴细胞悬液 100 μL。测定小鼠分泌 IL-2 时, 用 ConA 做阳性对照; 测定小鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF-α 时, 以及测定小鼠脾淋巴细胞分泌 TNF-α、IFN-γ 时, 用 LPS 做阳性对照, 每组设置 4 个复孔, 将培养板置于饱和湿度、37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中, 根据需要培养相应的时间。测定脾细胞分泌 TNF-α、IFN-γ、IL-2 时, 培养 48 h 后吸取上清液 50 μL 用于相应的测定; 测腹腔巨噬细胞分泌 TNF-α 时, 培养 10 h 后吸取上清液 50 μL 用于测定, TNF-α、IFN-γ 和 IL-2 的测定步骤严格按照试剂盒说明书操作。测定腹腔巨噬细胞分泌 NO 时, 培养 22 h 后吸取上清液 50 μL 加入等体积的 Griess 试剂, 室温下反应 10 min 后在波长 540 nm 处测 OD 值。

1.3 统计分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 JMP7.0 统计软件进行方差分析, $p < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 牡蛎糖胺聚糖柱层析纯化结果

牡蛎糖胺聚糖经酶解、醇沉后得级分 CG, CG 再经 DEAE-52 纤维素柱和 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶柱层析, 所得结果如图 1、图 2 和图 3 所示。

由图 1 可以看出, CG 经过 DEAE-52 离子交换柱后得到两个重要的峰, 分别为 CGI 和 CGII。两个峰相对较为狭窄且对称, 说明纯化条件选择适当, 纯化效果较好。由图 2 和 3 可以看出, CGI 和 CGII 过 Sephadex G-200 柱后均得到了单一、对称的洗脱峰

CGIa 和 CGIIa。

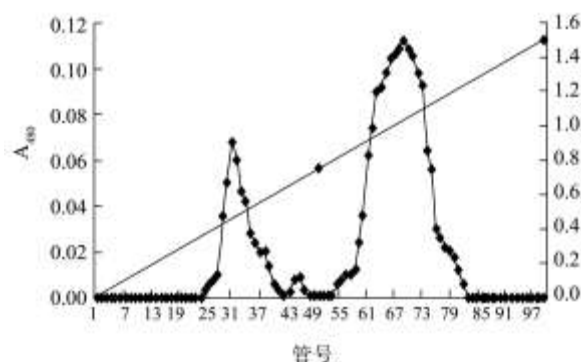


图 1 牡蛎糖胺聚糖 DEAE-52 纤维素离子交换柱层析分离色谱图

Fig.1 Chromatogram of DEAE-52-cellulose ion exchange chromatography of CG

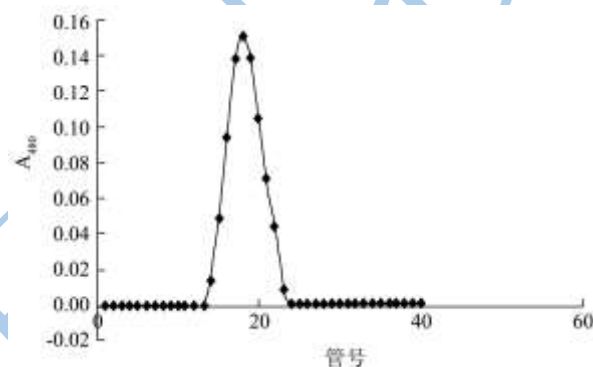


图 2 牡蛎糖胺聚糖 CGI Sephadex G-200 柱层析纯化结果

Fig.2 Results of CGI purification using Sephadex G-200 column chromatography

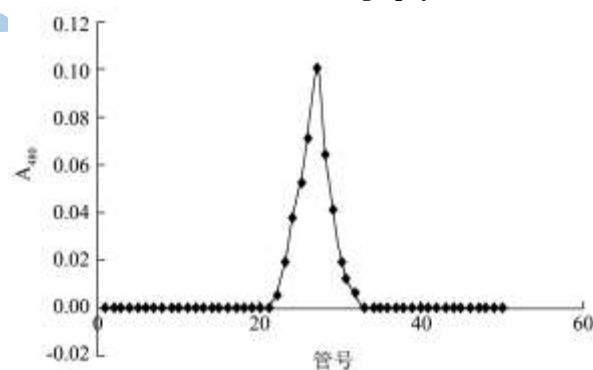


图 3 牡蛎糖胺聚糖 CGII Sephadex G-200 柱层析纯化结果

Fig.3 Results of CGII purification using Sephadex G-200 column chromatography

2.2 牡蛎糖胺聚糖组成分析结果

牡蛎糖胺聚糖分离纯化后所得级分 CG、CGIa 和 CGIIa 的化学组成分析结构如表 1 所示。从表 1 中可以看出, 分离纯化后的两级分单糖组成差别不大, CGIa 是由糖醛酸:氨基葡萄糖=1:1.38 的比例构成, 硫酸基含量为 20.62%; CGIIa 是由糖醛酸:氨基葡萄糖=1:1.58 的比例构成, 硫酸基含量为 18.49%。

表 1 牡蛎糖胺聚糖化学组成 (%)

Table 1 Chemical composition of the purified polysaccharide

样品	总糖	糖胺聚糖	总蛋白	硫酸基	糖醛酸	氨基半乳糖	氨基葡萄糖	氨基己糖
CG	31.35	43.17	21.87	8.53	7.86	6.22	17.98	30.13
CGIa	51.23	65.76	8.11	20.62	20.04	7.31	27.65	36.36
CGIIa	47.64	68.78	9.66	18.49	16.78	9.34	26.47	38.58

2.3 牡蛎糖胺聚糖结构分析

牡蛎糖胺聚糖经 DEAE-52 纤维素柱和 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶柱层析后所得级分 CGIa 和 CGIIa 的红外光谱分析结果如图 4 所示。

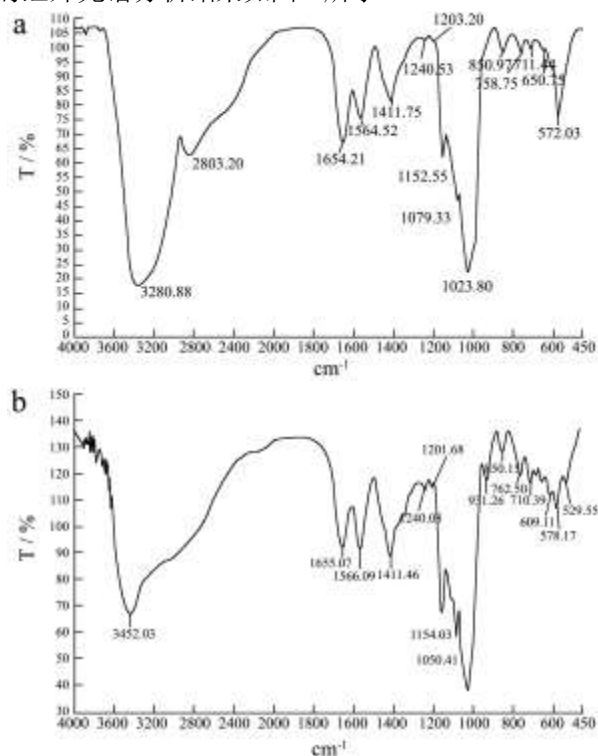


图4 CGIa、CGIIa的红外光谱图

Fig.4 IR spectra of CGIa and CGIIa

注：a：CGIa；b：CGIIa。

CGIa的红外吸收光谱如图4，谱图分析^[18-19]如下：在3280.88 cm⁻¹左右处具有强宽吸收峰，说明有糖类-OH；2803.20 cm⁻¹左右有吸收峰，说明有糖类饱和C-H键。在1654.21 cm⁻¹和1564.52 cm⁻¹处有吸收，说明有乙酰氨基(-NH₂COCH₃)存在；在1411.75 cm⁻¹、1240.53 cm⁻¹、850.97 cm⁻¹处有吸收，说明有-COO⁻、-O-SO₃⁻和C-O-S存在，且在氨基己糖上的C₄有硫酸酯键。1152.85 cm⁻¹、1079.33 cm⁻¹、1023.80 cm⁻¹处为吡喃糖环的醚键C-O-C和-OH的特征吸收；在950-1250 cm⁻¹的强吸收，说明多糖的单糖组成是吡喃单体。综上，C-H键、-NH₂COCH₃、-COO⁻、-O-SO₃⁻、C-O-S、C-O-C和-OH是糖的特征基团，因此CGIa是糖胺聚糖。同理，CGIIa也是糖胺聚糖，且50.19 cm⁻¹处的吸收峰说明存在α糖苷

键。

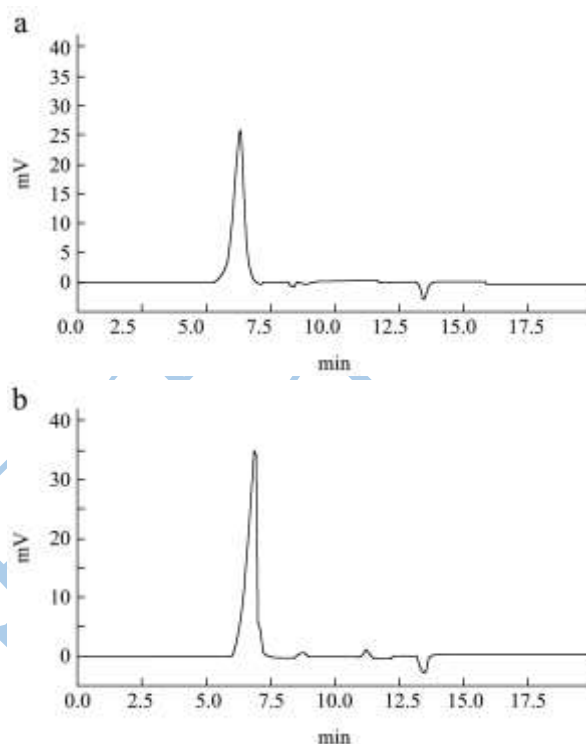


图5 CGIa、CGIIa的HPLC图谱

Fig.5 HPLC chromatograms of CGIa and CGIIa

注：a：CGIa；b：CGIIa。

从图 5 可以看出，经过 DEAE-52 纤维素柱和 Sephadex G-200 凝胶柱纯化后的多糖组分 CGIa、CGIIa，分别经高效液相色谱分离得到单一对称峰且峰型较窄，说明实验所得级分 CGI 和 CGII 纯度较高。标准曲线求得 CGIa 和 CGIIa 的相对分子质量为 5.17×10⁵ Da 和 2.64×10⁵ Da。

2.4 牡蛎糖胺聚糖对小鼠免疫器官指数和廓清指数的影响

牡蛎糖胺聚糖对小鼠的脾指数、胸腺指数、廓清指数的影响结果如表 2 所示。

由表 2 可见，与对照组 (Control) 相比，CG 组的脾指数、胸腺指数和廓清指数显著提高，说明 CG 能够增强正常小鼠的免疫器官指数及廓清指数；环磷酰胺组 (CTX 组) 的脾指数、胸腺指数和廓清指数降低，说明 CTX 对正常小鼠的免疫器官有一定程度的

损伤,能抑制正常小鼠腹腔巨噬细胞的廓清指数增加。与 CTX 组相比, CG+CTX 组的脾指数和胸腺指数显著增高,说明 CG 对 CTX 引起器官免疫损伤有一定的

修复作用; CG+CTX 组的廓清指数均有所降低,说明 CG 对 CTX 引起的抑制作用不明显。

表 2 CG 对小鼠脾指数、胸腺指数、廓清指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Table 2 Effect of CG on spleen, thymus and clearance indexes in mice induced by CTX *in vivo* ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	剂量/(mg/kg)	脾指数	胸腺指数	廓清指数
Control		2.73±0.69	1.23±0.04	0.019±0.011
CG	25	2.75±0.58	1.41±0.18**	0.027±0.016*
	50	3.01±0.31*	1.46±0.07**	0.029±0.008*
	100	3.04±0.47*	1.53±0.35**	0.020±0.002
CTX	30	2.27±0.23**	0.99±0.39*	0.017±0.002
	25+30	2.31±0.18**	1.05±0.27*	0.014±0.003
CG+CTX	50+30	2.36±0.23** [△]	1.17±0.36 ^{△△}	0.014±0.002
	100+30	2.42±0.45** ^{△△}	1.16±0.44 ^{△△}	0.015±0.001

注: *P < 0.05, **P < 0.01 vs Control; 与空白组相比显著差异, 极显著差异; [△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01 vs CTX group; 与 CTX 组相比显著差异, 极显著差异。

2.5 牡蛎糖胺聚糖对小鼠脾细胞增值的影响

牡蛎糖胺聚糖对小鼠淋巴细胞增值的影响的试验结果如表 3 所示。

表 3 牡蛎糖胺聚糖对小鼠脾淋巴细胞增值的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=4)

Table 3 Effect of CG on serum hemolysin level and the number of antibody-producing cells in mice ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	剂量/($\mu\text{g/mL}$)	吸光度值 OD ₅₇₀	刺激指数 (SI)	C 吸光度值 ConA (OD ₅₇₀)	刺激指数 ConA (SI)
Control	5	0.122±0.002	1.00	0.122±0.003	1.00
	10	0.125±0.013	1.02	0.169±0.003**	1.38
CG	25	0.129±0.017	1.04	0.178±0.005**	1.46
	50	0.152±0.009**	1.25	0.189±0.012**	1.55
	100	0.136±0.015*	1.11	0.186±0.001**	1.52
CGIa	10	0.145±0.007*	1.19	0.145±0.006**	1.19
	25	0.176±0.017**	1.44	0.186±0.013**	1.63
	50	0.159±0.011**	1.30	0.178±0.011**	1.46
	100	0.153±0.006**	1.25	0.172±0.009**	1.41
CGIIa	10	0.137±0.002*	1.12	0.138±0.002**	1.12
	25	0.144±0.005*	1.18	0.147±0.003**	1.19
	50	0.152±0.014**	1.25	0.181±0.007**	1.48
	100	0.151±0.007**	1.23	0.157±0.001**	1.29

注: *P < 0.05, **P < 0.01 vs Control; 与空白组相比显著差异, 极显著差异。

由表 3 可知: 与对照组相比, 牡蛎糖胺聚糖直接作用于小鼠淋巴细胞时, 对细胞增值有一定的增强作用, 其中浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 CGIa 刺激系数最高, 达到 1.44; 牡蛎糖胺聚糖协同作用与直接作用具有相同趋势, 且相同浓度下牡蛎糖胺聚糖协同 ConA 的增值能力较强, 当浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 CGIa 刺激指数达到最高, 为 1.63。脾细胞增值是由有丝分裂原诱导的, 因此牡蛎糖胺聚糖具有有丝分裂原样作用。

2.6 牡蛎糖胺聚糖对小鼠体液免疫功能的影

响

牡蛎糖胺聚糖对小鼠的血清溶血素含量和抗体生成数的影响的试验结果如表 4 所示。

血清溶血素含量与抗体生成细胞数是反应体液免疫功能的重要指标。由表 4 可见, 与 Control 组相比, CG 组的血清溶血素含量与抗体生成细胞数显著提高, 说明 CG 能够增强正常小鼠的体液免疫; 环磷酸胺组 (CTX) 组的血清溶血素含量降低, 说明 CTX

对正常小鼠的体液免疫有损伤。与 CTX 组相比，CG+CTX 组的血清溶血素含量显著增高，说明 CG 对

表 4 CG 对小鼠血清溶血素含量及抗体生成细胞数的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=8)

Table 4 Effect of CG on serum hemolysin level and the number of antibody-producing cells in mice ($\bar{X} \pm S$, n=8)

组别	剂量/(mg/kg)	HC _{IgM}	QHS
Control		32.80±1.023	0.031±0.012
CG	25	35.20±1.025	0.054±0.014**
	50	40.80±2.030*	0.065±0.008**
	100	47.20±4.034*	0.073±0.016**
CTX	30	31.20±2.013	0.138±0.013***
	25+30	35.20±1.027 ^Δ	0.104±0.005*** ^{ΔΔ}
CG+CTX	50+30	38.40±2.023 ^{ΔΔ}	0.116±0.007*** ^{ΔΔ}
	100+30	45.60±1.012 ^{***ΔΔ}	0.097±0.001*** ^{ΔΔ}

注: *P < 0.05, **P < 0.01 vs Control; 与空白组相比显著差异, 极显著差异; ^ΔP < 0.05, ^{ΔΔ}P < 0.01 vs CTX group; 与 CTX 组相比显著差异, 极显著差异。

2.7 牡蛎糖胺聚糖对小鼠腹腔巨噬细胞免疫

功能及 NK 细胞活性的影响

牡蛎糖胺聚糖对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力及 NK 细胞杀伤活性的试验结果如图 6、图 7 所示。

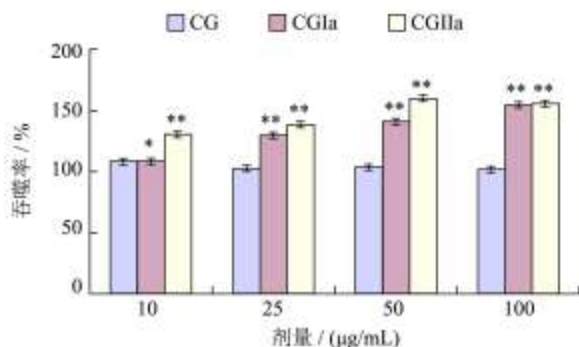


图 6 牡蛎糖胺聚糖对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=4)

Fig.6 Effect of CG, CGIa, and CGIIa on phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages against neutral red *in vitro* ($\bar{X} \pm S$, n=4)

由图 6、图 7 知: 各个剂量组均能增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力, 且具有一定的量效关系。在相同的剂量条件下, CGIIa 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力强于 CGIa, 其中 50 μg/mL 的 CGIIa 作用效果最好。

受试样品 CG、CGIa、CGIIa 的四个剂量组均能显著或极显著地增强 NK 细胞的活性, 且存在一定的剂效关系; 其中, 100 μg/mL 的 CGIa 增强效果最高, 达到 39.09%。

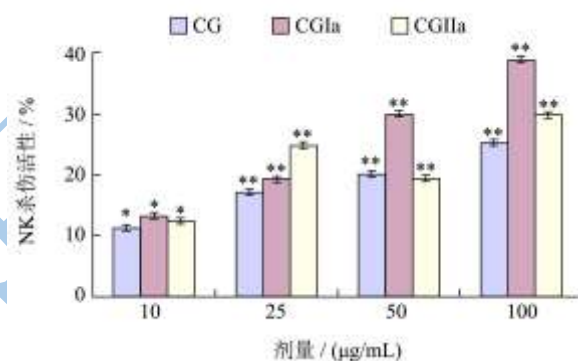


图 7 牡蛎糖胺聚糖对小鼠 NK 细胞活性的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=4)

Fig.7 Effect of CG, CGIa, and CGIIa on the cytotoxicity of NK cells ($\bar{X} \pm S$, n=4)

2.8 牡蛎糖胺聚糖对小鼠免疫细胞分泌细胞

因子的影响

牡蛎糖胺聚糖对小鼠脾脏细胞分泌因子影响的试验结果如表 5、表 6、表 7 所示。

表 5 显示, 与空白组比较, CGIa 和 CGIIa 的低中高浓度均能极显著地促进小鼠脾淋巴细胞分泌细胞因子 TNF-α、IFN-γ, 并且存在一定的量效关系。CGIa 和 CGIIa 的各剂量组促 TNF-α 分泌能力高于阳性对照细菌脂多糖组 (LPS), 而只有 CGIa 和 CGIIa 的高剂量组促 IFN-γ 分泌能力远远高于 LPS 组, 分别达到 586.842±41.749pg/mg 和 651.579±36.585pg/mg。

由表 6 可知, 与空白对照组相比, CGIa 和 CGIIa 的低中高浓度均能显著地促进小鼠脾淋巴细胞分泌细胞因子 IL-2, 且存在量效关系。只有 CGIIa 的高剂量组与阳性对照刀豆蛋白组 (ConA) 的促进效果相近。

表 5 牡蛎糖胺聚糖对正常小鼠脾脏细胞分泌细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 的影响 ($\bar{X} \pm S$, n=4)

Table 5 Effect of CGIa and CGIa on the secretion of TNF- α and IFN- γ by normal mouse spleen cells *in vitro* ($\bar{X} \pm S$, n=4)

组别	剂量/($\mu\text{g/mL}$)	脾脏 TNF- α 水平/(pg/mg)	腹腔巨噬 TNF- α 水平/(pg/mg)	IFN- γ 水平/(pg/mg)
Control		38.235 \pm 5.392	543.529 \pm 26.851	202.633 \pm 35.697
LPS	10	75.294 \pm 11.236**	665.294 \pm 25.996*	412.632 \pm 26.322**
	25	75.882 \pm 7.851**	783.235 \pm 31.354**	344.737 \pm 58.395**
CGIa	50	102.353 \pm 17.198**	884.118 \pm 22.117**	399.474 \pm 35.668**
	100	287.059 \pm 21.753**	903.529 \pm 14.918**	586.842 \pm 41.749**
CGIIa	25	78.824 \pm 6.735**	741.765 \pm 33.229**	360.000 \pm 19.653**
	50	105.882 \pm 9.419**	898.235 \pm 26.771**	428.421 \pm 33.974**
	100	282.941 \pm 15.516**	912.941 \pm 36.842**	651.579 \pm 36.585**

注: *P < 0.05, **P < 0.01 vs Control; 与空白组相比极显著差异, 极显著差异。

表 6 近江牡蛎糖胺聚糖对正常小鼠脾脏细胞分泌细胞因子 IL-2 的影响 ($\bar{X} \pm S$, n=4)

Table 6 Effect of CGIa and CGIa on the secretion of IL-2 by normal mouse spleen cells *in vitro* ($\bar{X} \pm S$, n=4)

组别	剂量/($\mu\text{g/mL}$)	IL-2 水平/(pg/mg)
Control		0.513 \pm 0.097
ConA	10	2.820 \pm 0.237**
	25	0.769 \pm 0.162*
CGIa	50	1.026 \pm 0.173**
	100	2.038 \pm 0.155**
CGIIa	25	0.796 \pm 0.031*
	50	1.282 \pm 0.181**
	100	2.821 \pm 0.226**

注: *P < 0.05, **P < 0.01 vs Control; 与空白组相比显著差异, 极显著差异。

表 7 近江牡蛎糖胺聚糖对正常小鼠脾脏细胞分泌细胞因子 NO 的影响 ($\bar{X} \pm S$, n=4)

Table 7 Effect of CGIa and CGIa on the secretion of NO by normal mouse spleen cells *in vitro* ($\bar{X} \pm S$, n=4)

组别	剂量/($\mu\text{g/mL}$)	NO 含量/($\mu\text{mol/L}$)
Control		0.726 \pm 0.065
CGIa	10	1.118 \pm 0.066*
	25	1.576 \pm 0.073*
	50	2.165 \pm 0.456**
	100	2.623 \pm 0.945**
CGIIa	10	2.099 \pm 0.767**
	25	2.753 \pm 0.234**
	50	3.799 \pm 0.567**
	100	3.604 \pm 0.176**

注: *P < 0.05, **P < 0.01 vs Control; 与空白组相比显著差异, 极显著差异。

由表 7, 与空白对照组相比, CGIa 和 CGIa 的所选剂量组均能在体外促进小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO

的能力, 且存在一定的量效关系。相同剂量条件下, CGIa 的促进效果高于 CGIa, 且 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 CGIa 剂量组促进效果最好。

3 结论

3.1 近江牡蛎全脏器经酶解、醇沉等后得牡蛎糖胺聚糖粗品 (CG), CG 经两次柱层析后得级分 CGIa 与 CGIa, 为单一峰。CGIa 与 CGIa 与糖醛酸和氨基葡萄糖构成, 均含有硫酸基 (20%左右), 相对分子量分别为 5.17×10^5 Da、 2.64×10^5 Da。IR 检测结果表明 CGIa 与 CGIa 为糖胺聚糖。

3.2 牡蛎糖胺聚糖可提高正常小鼠的脾指数和胸腺指数, 并对 CTX 引起的免疫器官损伤有一定的修复作用; 可增强小鼠脾细胞的增殖能力, 协同 ConA 时, 增强效果更为显著, 其中浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 CGIa 协同 ConA 作用时, 刺激指数最高 (1.63); 可提高正常小鼠的血清溶血素含量和抗体生成细胞数, 且对 CTX 引起的体液免疫损伤有一定的修复作用; 可提高正常小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力和廓清指数, 其中 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 CGIa 吞噬中性红能力最强, 可达 160.6%; 可增强正常小鼠 NK 细胞活性, 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 CGIa 增强效果最高, 可达 39.09%; 可促进正常小鼠免疫细胞分泌 TNF- α 、IFN- γ 、IL-2 和 NO 细胞因子。提示牡蛎糖胺聚糖具有免疫增强功能, 并对 CTX 造成的免疫损伤有一定的修复作用。

参考文献

[1] 沈鸣, 陈建伟. 氨基多糖的药理研究进展[J]. 上海医药, 2001, 22(6): 268-270
SHEN Ming, CHEN Jian-wei. Advances in the pharmacological study on aminopolysaccharides [J]. Shanghai Medical and Pharmaceutical Journal, Shanghai Medical and Pharmaceutical Journal, 2001, 22(6): 268-270

- [2] PAN J, QIAN Y, Weiser P, et al. Glycosaminoglycans and activated contact system in cancer patient plasmas [J]. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2010, 93: 473-495
- [3] CUI Q, WANG H, YUAN C. The preliminary study on the antithrombotic mechanism of glycosaminoglycan from *Macrura veneriformis* [J]. Blood Coagulation & Fibrinolysis, 2014, 25(1): 11-18
- [4] Henrotin Y, Lambert C, Richette P. Importance of synovitis in osteoarthritis: evidence for the use of glycosaminoglycans against synovial inflammation review article [J]. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2014, 43(5): 579-587
- [5] Takaya Y, Uchisawa H, Matsue H, et al. An investigation of the antitumor peptidoglycan fraction from squid ink [J]. Biol. Pharm. Bull., 2004, 17(6): 846-849
- [6] Shibata H, Kimura-Takagi I, Nagaoka M. et al. Properties of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus tokida* in gastric mucosal protection [J]. Bio. Factors, 2000, 11(4): 235-245
- [7] Umezawa H, Okami Y, Kurazawa S, et al. Marinactin, antitumor polysaccharide produced by marine bacteria [J]. The Journal of Antibiotics, 1983, 5: 471-477
- [8] 胡雪琼, 吴红棉, 刘芷筠, 等. 近江牡蛎糖胺聚糖的酶解提取及其抗肿瘤活性研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(7): 3-6
HU Xue-qiong, WU Hong-mian, LIU Zhi-jun, et al. Study of enzymatic preparation of glycosaminoglycan with anti-tumor activity from *Crassostrea rivularis* crould [J]. Food Research and Development, 2009, 30(7): 3-6
- [9] 吴红棉, 范秀萍, 胡雪琼, 等. 近江牡蛎糖胺聚糖体内外抗肿瘤活性的研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(6): 18-23
WU Hong-mian, FAN Xiu-ping, HU Xue-qiong, et al. Antitumor activity of glycosaminoglycan from *Crassostrea rivulari* [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(6): 18-23
- [10] 程安玮, 金征宇, 万发春. 甘草多糖对小鼠腹腔巨噬细胞的激活作用[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 431-435
CHENG An-wei, JIN Zheng-yu, WAN Fa-chun. Activation effects of glycyrrhiza polysaccharide on mouse peritoneal macrophages [J]. Food Science, 2007, 28(12): 431-435
- [11] 郑建仙. 功能性食品[M]. 第三版, 北京: 中国轻工业出版社, 1999
ZHENG Jian-xian. Functional foods [M]. Third Edition, Beijing: China Light Industry Press, 1999: 105-106, 126-127
- [12] Shindo T, Ikeda U, Ohkawa F, et al. Nitric oxide synthesis in cardiac myocytes fibroblates by inflammatory CTXtokes [J]. Cardiorasec Res., 1995, 29(6): 813-819
- [13] 徐淑云. 药理学实验方法学(第3版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002
XU Shu-yun. Methodology of pharmacology experiment (Third Edition). Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 1433-1436
- [14] 杨铁红. 当归多糖的分离纯化与免疫条件作用及其机理研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2003
YANG Tie-hong. Purification and immunomodulating activities of polysaccharide from *angeliasinensis* [D]. XiAn: The Fourth Military Medical University, 2003
- [15] 张凤, 杨桂文. 绿茶提取物及表没食子儿茶素没食子酸酯对免疫细胞的作用研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1094-1095
ZHANG Feng, YANG Gui-wen. Study on the effects of green tea extract and egcg on immune cells [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2009, 20(5): 1094-1095
- [16] 高慧灵. 木蹄层孔菌多糖免疫调节作用的实验研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2009
GAO Hui-lin. Experimental study of the immunomodulatory effects of *Fomes fomentarius* polysaccharides [D]. GuangZhou: Southern Medical University, 2009
- [17] ZHOU G F, SHENG W X, YAO W H, et al. Effect of low molecular λ -carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu [J]. Pharmacological Research, 2006, 53(2): 129-134
- [18] Rieppo L, Saarakkala S, Närhi T, et al. Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage [J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2012, 20(5): 451-459
- [19] Maria OL, Karl O. Sulfate composition of glycosaminoglycans determined by infrared spectroscopy [J]. 1991, 192(1): 193-196