

# 海蜇糖蛋白 JGP-III<sub>2</sub> 的结构及其免疫活性研究

任国艳, 邵征, 郭金英, 曹力, 樊金玲, 崔国庭, 肖枫, 张凡, 刘志龙, 梁旺春  
(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南洛阳 471023)

**摘要:** 从海蜇中获得一种新的糖蛋白 JGP-III<sub>2</sub>, 其糖含量为 11.87%, 蛋白含量为 87.74%, 分子量为 39.5 kDa。JGP-III<sub>2</sub> 中含有 8 种单糖分别为甘露糖、2-氨基-D-葡萄糖、氨基半乳糖、乳糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖, 含量比例为: 6.88:5.13:5.19:70.78:1.47:2.09:6.59:1.85; 氨基酸含量为 85.95%, 甘氨酸、缬氨酸和谷氨酸所占比例较高; JGP-III<sub>2</sub> 含有 O-糖苷键和 N-糖苷键, 与海蜇体内获得的蛋白(gi156215071)具有同源性。通过建立免疫低下小鼠模型, 对 JGP-III<sub>2</sub> 的免疫活性及免疫机理进行研究, 结果表明: 与模型对照组比, JGP-III<sub>2</sub> 能显著提高免疫低下小鼠的脾脏指数, 胸腺指数, 巨噬细胞吞噬能力, 迟发性变态反应, 血清溶血素水平及抗体生成细胞数, 增强机体免疫能力。JGP-III<sub>2</sub> 能促进 Th1 类细胞因子 mRNA 的表达, 抑制 Th2 类细胞因子的 mRNA 的表达, 对模型组中的“Th1/Th2 漂移”现象有恢复作用。推测 JGP-III<sub>2</sub> 可能是通过调节机体 Th1/Th2 的平衡来提高机体免疫活性。

**关键词:** 海蜇; 糖蛋白; 免疫; 细胞因子; 结构特点

文章编号: 1673-9078(2015)9-7-13

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.002

## Structural Characteristics and Mechanisms Involved in the Immune Activity of Jellyfish Glycoprotein JGP-III<sub>2</sub>

REN Guo-yan, SHAO Zhen, GUO Jin-ying, CAO Li, FAN Jin-ling, CUI Guo-ting, XIAO Feng, ZHANG Fan, LIU Zhi-long, LIANG Wang-chun

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

**Abstract:** A new glycoprotein JGP-III<sub>2</sub> was obtained from jellyfish. JGP-III<sub>2</sub> is composed of 11.87% carbohydrate and 87.74% protein, which presents a molecular weight of 39.5 kDa. JGP-III<sub>2</sub> is composed of eight types of monosaccharides: mannose, 2-amino-D-glucose, galactosamine, lactose, glucose, galactose, xylose, and fucose in a ratio of 6.88:5.13:5.19:70.78:1.47:2.09:6.59:1.85. The total amino acid content in JGP-III<sub>2</sub> is 85.95%. Glycine is the major amino acid, followed by valine and glutamic acid. JGP-III<sub>2</sub> presents N- and O-glycosidic bonds and is homologous to protein (gi156215071) from *Nematostella vectensis*. The immune activity and immune mechanism of JGP-III<sub>2</sub> were investigated using an immunocompromised mouse model. Compared with the control group, JGP-III<sub>2</sub> significantly improved the spleen index, the thymus index, the phagocytic ability of the macrophages, serum hemolysin levels, and the number of antibody producing cells and delayed the allergic reaction in immunocompromised mice. The results showed that JGP-III<sub>2</sub> could enhance the immune ability of these mice. Furthermore, JGP-III<sub>2</sub> could promote the mRNA expression of Th1-type cytokines, inhibit the mRNA expression of Th2-type cytokines, and restore the “Th1/Th2 shift” found in the control group. JGP-III<sub>2</sub> is considered to enhance the immune activity by regulating the Th1/Th2 balance.

**Key words:** jellyfish, glycoprotein, immune, cytokine, structural characteristics

糖蛋白是由寡糖链与蛋白质共价相连构成的分子,广泛存在于生命体中并发挥着重要的生物学功能。由于糖蛋白的生物学功能众多,且其功能活性也被越来越多的人认可,因此吸引了众多学科的工作者从事这一领域的研究。现在很多研究表明,从天然产物中获得的糖蛋白具有显著的药用功效和保健功能,其中提高机体免疫是糖蛋白重要的生物活性之一。如楝树

收稿日期: 2014-11-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31000765)

作者简介: 任国艳(1976-),女,博士,副教授,研究方向:生物活性物质及其功能制品;食品深加工技术

叶(Neem leaf)糖蛋白通过提高机体免疫力抑制小鼠体内肿瘤的生长<sup>[1]</sup>;麦麸(rice bran)糖蛋白(GFRB),通过增加免疫细胞中某些细胞因子的 mRNA 表达量发挥其免疫调节功能,这种免疫活性与糖蛋白分子上的糖链有关<sup>[2]</sup>。海洋生物中提取的糖蛋白,如栉孔扇贝糖蛋白、文蛤糖蛋白和鲑鱼内脏糖蛋白<sup>[3]</sup>均具有提高机体免疫力的活性,这些研究为天然糖蛋白的开发奠定了理论基础。但不同来源的糖蛋白或同一来源但组成成分不同的糖蛋白表现的免疫活性并不相同。

海蜇(*Rhopilema esculentum*)是一种医食同源的大型水母,在我国资源广泛,具有较高的营养价值和药

用价值,是人们公认的高蛋白、低脂肪、低热量的“功能性食品”<sup>[4]</sup>。由于海蜇资源的分布和各国饮食习惯的不同,以及海产品自身的特点(含水量高,易自溶等),曾经限制了对海蜇体内活性物质的研究。随着科技的进步,国内外对海蜇体内的一些活性物质结构及其活性研究已取得一定的进展,如海蜇触手蛋白粗提液的抗氧化活性<sup>[5]</sup>、胶原蛋白及其多肽的免疫活性<sup>[6]</sup>、护肤活性<sup>[7]</sup>、抗氧化、抗疲劳活性<sup>[8]</sup>、海蜇粘液糖蛋白的结构分析<sup>[9]</sup>、海蜇头糖蛋白的结构和免疫活性的研究<sup>[10]</sup>等,这些研究为海蜇资源的开发奠定了一定的理论基础。本实验是在前期研究的基础上,采用不同的提取方法,获得一种新的海蜇糖蛋白(命名为JGP-III<sub>2</sub>),对其结构特点和免疫活性进行系统研究,旨在为海蜇作为功能性食品的进一步开发利用提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与仪器

主要实验材料和试剂:海蜇,购于青岛;Sp Sephadex C-25、Sephacryl S-300HR, Amersham BioscienceAB公司;聚丙烯酰胺凝胶电泳标准品,洛阳爱普科生化试剂公司;单糖标准品、氨基酸标准品, Sigma公司;绵羊红细胞(Sheep red blood cell, SRBC),广州蕊特生物科技有限公司;氢化可的松,江苏金利制药有限公司;盐酸左旋咪唑,浙江沈亚化工有限公司;胎牛血清:北京白百生物有限公司;RNAiso Plus(Total RNA提取试剂)、Primscrip RT reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>. (Tli RNaseH Plus)、DL 2000 DNA Marker、6× Loading Buffer(核酸专用)、DEPC处理水等,宝生物工程(大连)有限公司。

主要仪器设备:气相色谱,美国安捷伦科技公司;日立 835-50 氨基酸分析仪,天美科技有限公司;UV1100 紫外扫描仪,日本岛津公司;ultrafleXtreme 液相色谱串联质谱,美国布鲁克道尔顿公司;LXJ-802 型台式低速离心机,金坛市恒来仪器制造有限公司;SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司;Mx3000P 荧光定量 PCR 仪,美国 Stratagene 公司;Eppendorf AG 核酸蛋白测定仪,德国 Eppendorf 公司。

实验动物:动物4~6周龄 Balb/c 小鼠,18~22 g SPF 级,购自河南科技大学医学院实验动物中心。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 海蜇糖蛋白 JGP-III<sub>2</sub> 理化性质及结构鉴定

##### (1) 海蜇糖蛋白 JGP-III<sub>2</sub> 分离纯化:

海蜇→自然解冻→粉碎→超声细胞破碎→加入 NaCl 溶液 4 °C 条件下浸提→4000 r/min 离心取上清液→冰浴条件下醇沉→取沉淀加入蒸馏水溶解后流水透析 24 h→蒸馏水中 4 °C 透析 24 h (每 4h 换一次蒸馏水)→真空冷冻干燥→海蜇糖蛋白粗品

取海蜇糖蛋白粗品分别经过 SP Sepharose FF 阴离子柱和 Sephacryl S-300 HR 凝胶柱层析纯化,冷冻干燥,最后得到海蜇糖蛋白纯品(JGP-III<sub>2</sub>),纯度大约为 98.25%,密封于 EP 管内,于干燥器中放置保存,以备后用。

(2) 海蜇糖蛋白 JGP-III<sub>2</sub> 理化性质:通过气相色谱测定单糖组成<sup>[11]</sup>;通过氨基酸分析仪测定氨基酸组成及酶解后氨基酸的变化<sup>[11]</sup>。

(3) 海蜇糖蛋白 JGP-III<sub>2</sub> 结构特点:通过紫外扫描确定糖和蛋白的连接方式<sup>[11]</sup>;通过液质连用的方法对蛋白进行鉴定。

#### 1.2.2 海蜇糖蛋白 JGP-III<sub>2</sub> 体内免疫活性的测定

(1) 免疫低下小鼠模型的建立<sup>[12]</sup>:筛选健康 Balb/c 小鼠,随机分为 18 组,组间平均体重相近,每组 10 只。设正常对照组、模型对照组、阳性对照组、海蜇糖蛋白 JGP-III<sub>2</sub> 低、中、高剂量组,分组后,正常对照组和模型对照组灌胃生理盐水,阳性对照组灌胃盐酸左旋咪唑(25 mg/kg),各剂量组分别灌胃不同剂量的海蜇糖蛋白(浓度分别为 25 mg/kg, 50 mg/kg 和 100 mg/kg),灌胃体积为 0.01 mL/(g bw d)。

(2) 体内免疫指标的检测<sup>[12]</sup>:对小鼠的脏器指数,腹腔巨噬细胞吞噬的能力,迟发性变态反应试验,血清溶血素水平及抗体生成细胞数 5 个指标进行测定。

#### 1.2.3 海蜇糖蛋白 JGP-III<sub>2</sub> 对脾脏淋巴细胞因子 mRNA 表达的影响

(1) 脾淋巴细胞的制备:处死小鼠,无菌取脾脏,研磨,过 200 目细胞过滤筛,加入小鼠淋巴细胞分离液,2000 r/min 离心 15 min,吸出淋巴细胞层,加入 5 倍的 Hanks 液洗涤两次,再用 2 mL 的 Hanks 重悬,得到小鼠脾淋巴细胞悬液。未用完的脾脏,在液氮中速冻,并保存于 -80 °C 冰箱中待用。参考文献<sup>[10]</sup>中的方法。

(2) 细胞总 RNA 的提取:按试剂盒 RNAiso Plus 说明书上的操作步骤提取小鼠脾脏淋巴细胞中总 RNA。

(3) 反转录反应:按照 Primscrip<sup>®</sup> RT reagent kit

with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒说明书操作, 将 RNA 逆转录为 cDNA。

(4) 实时荧光定量 PCR 反应: 按照 SYBR® Premix Ex Taq™. (Tli RNaseH Plus)试剂盒说明书中针对 Stratagene Mx3000P™ 荧光定量 PCR 仪设计的方案, 构建荧光定量 PCR 反应体系。根据引物的退火温度、引物扩增片段的长度以及其他相关因素, 选用荧光定量 PCR 反应条件为: 预变性, 95 °C 2min; 变性, 95 °C 30 s; 退火, 55 °C 1 min; 延伸, 72 °C 30s; 终延, 72 °C 2 min。从变性到延伸, 40 个循环。溶解曲线制备: 72 °C 10 min。反应结束后, 软件将自动进行数据分析, 调整基线, 计算循环 Ct 值。按照荧光定量 PCR 反应的反应体系, 配制反应液, 加样后, 短暂离心, 按照上述荧光定量 PCR 反应条件, 进行荧光定量 PCR 反应, 检测各组细胞细胞因子 mRNA 的表达量。

(5) 荧光定量 RT-PCR 引物设计与合成: 应用 Primer5.0 软件设计引物。由宝生物工程(大连)有限公司合成, 其引物序列见表 1。

### 1.3 数据处理

表 1 细胞因子的引物序列

Table 1 Cytokine primer sequences for RT-PCR

细胞因子		序列(5'-3')
β-Actin	F	CAT CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C
	R	ATG GAG CCA CCG ATC CAC A
IL-4	F	AGC ACC TTG GAA GCC CTA CAG A
	R	CCA CTT CAC AAG TCG GAG GCT TA
IL-17a	F	CTG ATC AGG ACG CGC AAA C
	R	TCG CTG CTG CCT TCA CTG TA
IL-21	F	CTT CGT CAC CTT ATT GAC ATT GTT G
	R	CCA GGG TTT GAT GGC TTG A
IL-5	F	TGA GGC TTC CTG TCC CTA CTC ATA A
	R	TTG GAA TAG CAT TTC CAC AGT ACC C
IL-13	F	CGG CAG CAT GGT ATG GAG TG
	R	ATT GCA ATT GGA GAT GTT GGT CAG
IL-6	F	CCA GTT TGG TAG CAT CCA TCA TTT C
	R	GTT TAA CCA GAA CGT TGA ATT GCA G
IL-2	F	CCC AGG ATG CTC ACC TTC A
	R	CCG CAG AGG TCC AAG TTC A
IL-10	F	GCC AGA GCC ACA TGC TCC TA
	R	GAT AAG GCT TGG CAA CCC AAG TAA
IL-12	F	CCG GTC CAG CAT GTG TCAA
	R	CAG GTT TCG GGA CTG GCT AAG A
INF-γ	F	CGG CAC AGT CAT TGA AAG CCT A
	R	GTT GCT GAT GGC CTG ATT GTC

实验数据以平均值 ±s 表示, 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。组间差异进行单方差分析, P<0.05 表示有差异具有显著性意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 海蜇糖蛋白 JGP-III<sub>2</sub> 理化性质及结构鉴定

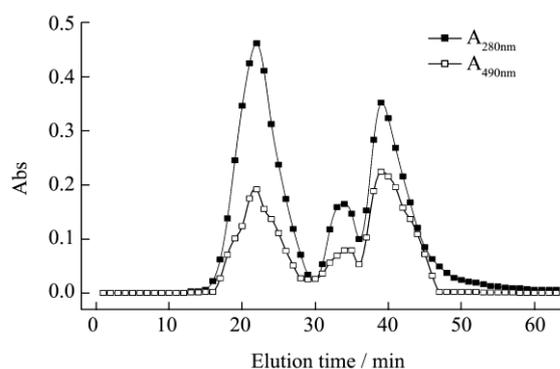


图 1 粗糖蛋白 SP Sepharose FF 分离图谱

Fig.1 SP Sepharose FF separation spectrum of crude glycoprotein

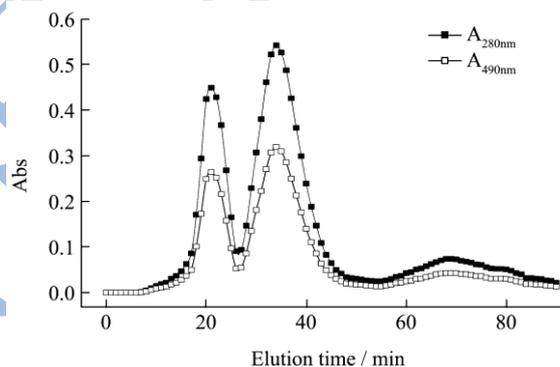


图 2 JGP-III Sephacryl S-300 HR 纯化图谱

Fig.2 Sephacryl S-300 HR purification spectrum of JGP-III

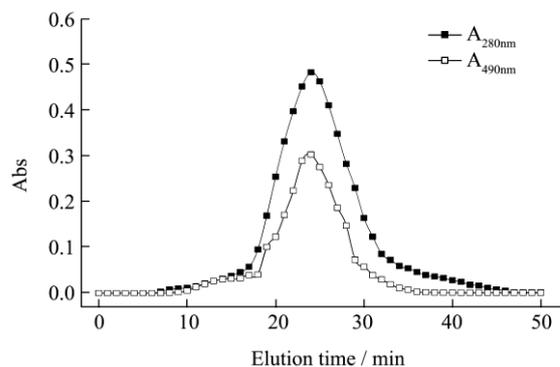


图 3 JGP-III2 Sephacryl S-300 HR 图谱

Fig.3 Sephacryl S-300 HR spectrum of JGP-III2

海蜇经过盐提醇沉得到粗糖蛋白, 先经过 SP Sepharose FF 阴离子凝胶分离得到三个组分, 分别命名为 JGP-I、JGP-II 和 JGP-III, 三个组分峰面积所占比例: 49.76%、8.65%、41.59%; 分别测定它们的总蛋白质含量和总糖含量, 蛋白含量占比例 (干燥后总

蛋白所占百分比)分别为: 88.76%、90.43%、86.64%, 糖含量占比例(干燥后总糖所占百分比)为: 8.37%、2.55%、12.82%; 根据本研究的研究内容选取 JGP-III 峰作为目标进行下一步纯化, JGP-III 经过 Sephacryl S-300 HR 凝胶柱层析纯化得到三个组分, 分别是 JGP-III<sub>1</sub>、JGP-III<sub>2</sub> 和 JGP-III<sub>3</sub>, 其中峰面积分别占: 22.37%、73.24%、4.39%; 蛋白质分别占: 89.52%、87.74%、65.35%; 糖分别占: 9.98%、11.87%、33.72%; 综合收集到的蛋白、糖的量以及比例, 选择 JGP-III<sub>2</sub> 峰作为目标糖蛋白的主要成分进一步纯化。

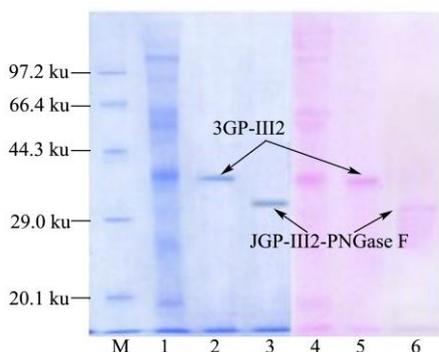


图4 JGP-III<sub>2</sub> 电泳图谱(考染和 PAS 染色)

Fig.4 JGP-III<sub>2</sub> SDS-PAGE electrophoresis results

SDS-PAGE 实验检测, JGP-III<sub>2</sub> 在液相色谱图上, 经紫外检测和示差检测, 均得到单一对称的峰, 且保留时间相同; 经 SDS-PAGE 检测, 通过两种染色方法, 在对应的位置均出现了单一的条带, 证明 JGP-III<sub>2</sub> 是达到电泳纯的糖蛋白。对 JGP-III<sub>2</sub> 进行氨基酸分析, 检测到 16 种氨基酸, 其中含有 7 种人体必需氨基酸, 甘氨酸、缬氨酸和谷氨酸为主要成分; JGP-III<sub>2</sub> 单糖成分为甘露糖、2-氨基-D-葡萄糖、氨基半乳糖、乳糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖, 含量比例为: 6.88:5.13:5.19:70.78:1.47:2.09: 6.59:1.85。

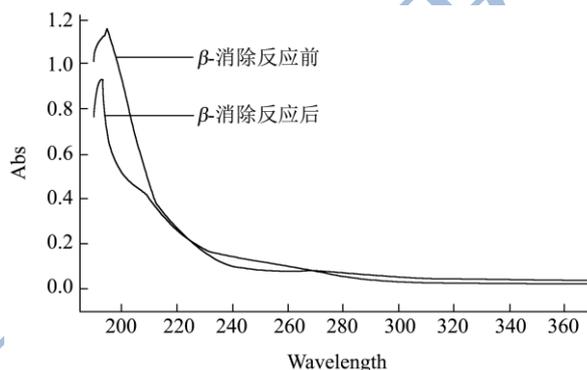


图6 JGP-III<sub>2</sub>  $\beta$ -消除反应处理前后紫外吸收光谱图

Fig.6 Ultraviolet absorption spectra of JGP-III<sub>2</sub> before and after  $\beta$ -elimination reaction processing

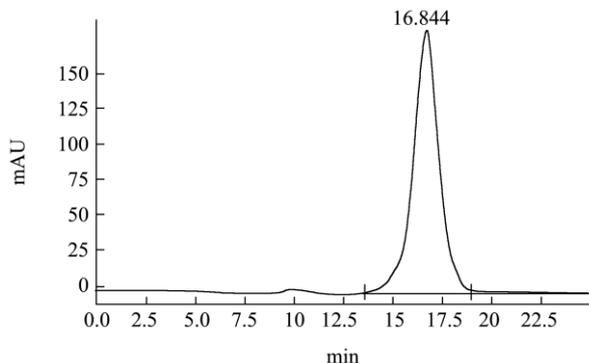
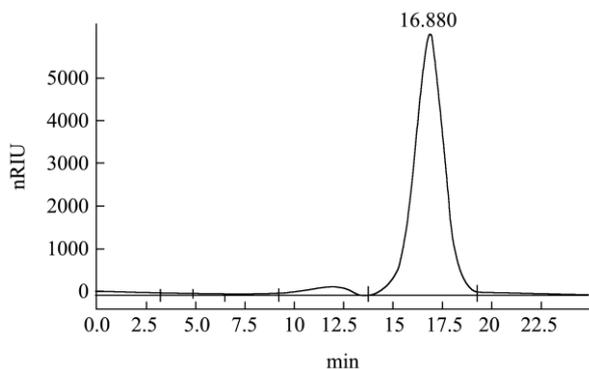


图5 JGP-III<sub>2</sub> HPLC 图谱

Fig.5 HPLC chromatograms of JGP-III<sub>2</sub>

将 JGP-III<sub>2</sub> 冻干粉末溶解后再次经过 Sephacryl S-300 HR 凝胶柱, 改变洗脱条件, 得到单一对称的洗脱峰, 说明 JGP-III<sub>2</sub> 组分比较均一。为了鉴定 JGP-III<sub>2</sub> 是组分均一的糖蛋白, 分别进行了液相色谱和

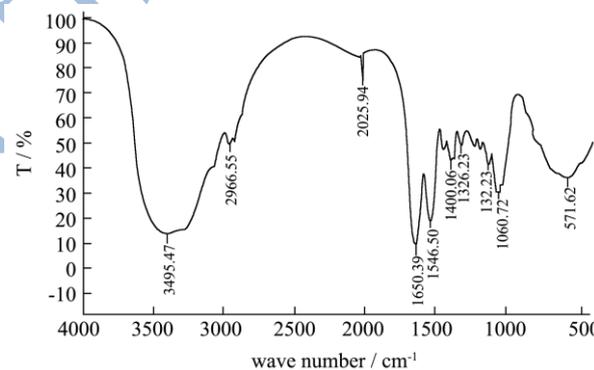


图7 JGP-III<sub>2</sub> 红外吸收光谱图

Fig.7 Infrared absorption spectrum of JGP-III<sub>2</sub>

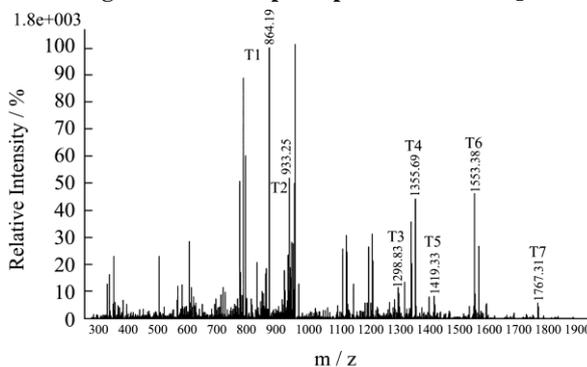


图8 JGP-III<sub>2</sub> 中肽段(K.EIIDLVLDR.I)质谱图

Fig.8 JGP-III<sub>2</sub> peptide (K.EIIDLVLDR.I) electrospray profile

$\beta$ -消除反应后通过紫外扫描发现 240 nm 处有吸

收峰变化,说明 JGP-III<sub>2</sub> 中存在 O-糖苷键; JGP-III<sub>2</sub> 经 PNGase F 酶酶解反应后,在 SDS-PAGE 电泳图谱上,有明显的分子量降低变化,表明 JGP-III<sub>2</sub> 中含有 N-糖苷键。JGP-III<sub>2</sub> 的红外图谱显示, JGP-III<sub>2</sub> 分子具有明显的糖吸收峰 (3405.47 cm<sup>-1</sup>) 和蛋白吸收峰 (1650.39 cm<sup>-1</sup> 和 1546.50 cm<sup>-1</sup>), 分子二级结构主要以 α-螺旋结构为主,糖苷键属于吡喃型。MS/MS 质谱分

析表明 JGP-III<sub>2</sub> 与从海蜇中提取的蛋白(gi|156215071) 具有同源性,质谱检测 JGP-III<sub>2</sub> 的分子量为 39.5 kDa。从以上获得的关于 JGP-III<sub>2</sub> 的结构信息与实验室前期从海蜇体内获得的糖蛋白 (JGP-III) 和日本学者从海蜇体内获得的粘液糖蛋白具有很大的差异,由此可以推断 JGP-III<sub>2</sub> 是从海蜇体内获得的一种新的糖蛋白。

表 2 JGP-III<sub>2</sub>的氨基酸组成分析

Table 2 Amino acid composition analysis of JGP-III<sub>2</sub>

氨基酸	JGP-III <sub>2</sub> /%		氨基酸	JGP-III <sub>2</sub> /%	
	β-消除反应前	β-消除反应后		β-消除反应前	β-消除反应后
甘氨酸 (Gly)	11.597	11.596	亮氨酸 (Leu)	4.174	4.054
缬氨酸 (Val)	11.438	11.457	精氨酸 (Arg)	4.244	3.826
谷氨酸 (Glu)	10.873	11.137	苯丙氨酸 (Phe)	4.812	5.160
丙氨酸 (Ala)	8.832	10.447	赖氨酸 (Lys)	3.797	3.971
脯氨酸 (Pro)	7.559	7.509	酪氨酸 (Tyr)	3.354	3.464
蛋氨酸 (Met)	7.317	7.304	异亮氨酸 (Ile)	2.045	1.995
天门冬氨酸 (Asp)	7.267	7.388	胱氨酸 (Cys)	2.170	2.190
丝氨酸 (Ser)	5.103	3.815	组氨酸 (His)	-	-
苏氨酸 (Thr)	5.416	4.687	色氨酸 (Trp)	-	-
必需氨基酸	39.000	38.629			
总氨基酸	100.000	100.000			

表 3 JGP-III<sub>2</sub> 的单糖组成分析

Table 3 Monosaccharide composition analysis of JGP-III<sub>2</sub>

单糖种类	含量/%	单糖种类	含量/%
甘露糖	6.88	葡萄糖	1.47
2-氨基-D-葡萄糖	5.13	半乳糖	2.09
氨基半乳糖	5.19	木糖	6.59
乳糖	70.78	岩藻糖	1.85

## 2.2 海蜇糖蛋白 JGP-III<sub>2</sub> 体内免疫活性的测定

免疫系统分为固有免疫 (又称非特异性免疫) 和适应免疫 (又称特异性免疫), 其中适应免疫又分为体液免疫和细胞免疫。巨噬细胞属机体的非特异性免疫

细胞, 在有异物侵入的时候, 从血液中释放出巨噬细胞吞噬异物, 这是衡量机体非特异性免疫功能的主要指标。胸腺、脾脏是机体的主要免疫器官, 参与机体的体液免疫和细胞免疫。胸腺、脾脏的发育状态及其机能强弱决定着机体的免疫水平。脾脏指数和胸腺指数是反映动物机体免疫功能的最基本和最常规的指标, 已被广泛用于评价机体的整体免疫状态。血清溶血素的含量和抗体生成细胞数是反映机体体液免疫水平的可靠指标, 它们的值的大小与机体的体液免疫能力的高低呈正相关。迟发型变态反应是评价细胞免疫功能的重要指标<sup>[13]</sup>。

表 4 JGP-III<sub>2</sub>的体内免疫活性指标

Table 4 Index of JGP-III<sub>2</sub> immune activity

组别	胸腺指数 /体重/(mg/g)	胸腺	脾脏指数 /体重/(mg/g)	脾脏	巨噬细胞吞噬率/%	迟发性变态反应足趾增厚度/mm	半数溶血值 HC <sub>50</sub>	抗体形成细胞数 450 nm 吸光值	
正常对照组	2.33±0.41		4.56±0.66		30.32±2.46	0.49±0.11	284.93±39.59	0.55±0.06	
模型对照组	1.36±0.29 <sup>#</sup>		3.21±0.43 <sup>#</sup>		20.34±3.18 <sup>#</sup>	0.37±0.07 <sup>#</sup>	163.85±40.21 <sup>#</sup>	0.37±0.01 <sup>#</sup>	
阳性对照组	1.88±0.16 <sup>*</sup>		4.18±0.71 <sup>*</sup>		28.21±3.19 <sup>*</sup>	0.53±0.10 <sup>*</sup>	260.55±38.55 <sup>*</sup>	0.50±0.07 <sup>*</sup>	
低剂量组	1.38±0.21 <sup>#</sup>		3.49±0.33 <sup>#</sup>		20.26±3.73 <sup>#</sup>	0.39±0.13 <sup>#</sup>	182.06±36.23 <sup>#</sup>	0.38±0.03	
糖蛋白组	中剂量组	1.65±0.53 <sup>#</sup>		3.63±0.75 <sup>#</sup>		24.38±3.62 <sup>#</sup>	0.46±0.11 <sup>*</sup>	213.62±39.41 <sup>*</sup>	0.42±0.04 <sup>*</sup>
高剂量组	1.78±0.83		3.85±0.29 <sup>*</sup>		27.15±4.18 <sup>*</sup>	0.53±0.10 <sup>*</sup>	237.38±36.63 <sup>*</sup>	0.42±0.03 <sup>*</sup>	

注: <sup>#</sup>, 与正常对照组比较 p<0.05; <sup>\*</sup>, 与模型对照组比较 p<0.05。

本实验通过建立免疫低下小鼠模型,对 JGP-III<sub>2</sub> 体内免疫活性上述指标进行检测,结果显示:与模型对照组比较, JGP-III<sub>2</sub> 组能增强小鼠免疫器官指数、改善小鼠迟发型变态反应、提高小鼠巨噬细胞吞噬能力、增强半数溶血值和促进小鼠抗体生成细胞数,这一结果表明 JGP-III<sub>2</sub> 可能是通过增强免疫低下小鼠的非特异性免疫能力、体液免疫和细胞免疫来增强小鼠整体免疫能力的,且随着剂量的增加,免疫增强效果越明显。

### 2.3 海蜇糖蛋白 JGP-III<sub>2</sub> 对脾脏淋巴细胞因子 mRNA 表达的影响

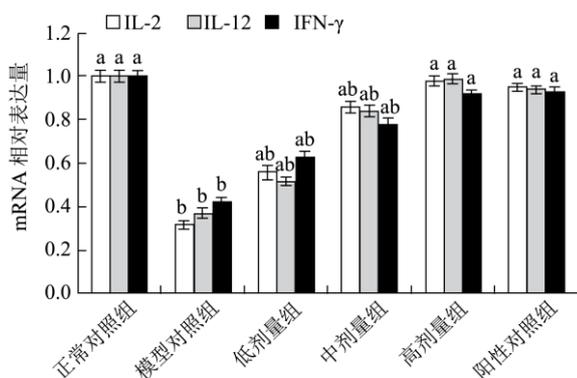


图9 JGP-III<sub>2</sub> 对小鼠脾淋巴细胞 Th1 类细胞因子的 mRNA 表达的影响

Fig.9 Effect of JGP-III<sub>2</sub> on Th1 cytokine mRNA expression in the lymphocytes of mouse spleen

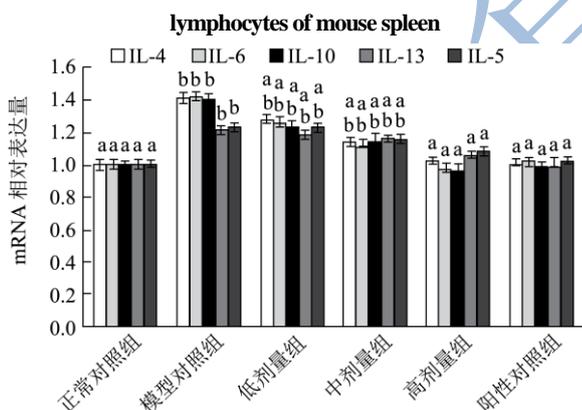


图10 JGP-III<sub>2</sub> 对小鼠脾淋巴细胞 Th2 类细胞因子的 mRNA 表达的影响

Fig.10 Effect of JGP-III<sub>2</sub> on Th2 cytokine mRNA expression in the lymphocytes of mouse spleen

为了进一步探讨 JGP-III<sub>2</sub> 体内免疫活性机理,采用 RT-PCR 方法对小鼠脾脏细胞因子 mRNA 表达水平进行检测,结果如图 9、图 10 所示。图 9 显示 JGP-III<sub>2</sub> 对小鼠脾脏 Th1 类细胞因子 (IL-2、IL-12、IFN-γ) mRNA 表达量的影响,模型对照组中小鼠的 Th1 类细胞因子 (IL-2、IL-12、IFN-γ) mRNA 表达量与正常

对照组相比,显著降低;阳性对照组中小鼠的 IL-2、IL-12、IFN-γ mRNA 表达量比正常对照组略低,但差异不显著; JGP-III<sub>2</sub> 给药组小鼠的 IL-2、IL-12、IFN-γ mRNA 表达量均高于模型对照组,差异显著,且随着剂量的增加而呈上升趋势; JGP-III<sub>2</sub> 高剂量组小鼠的 IL-2、IL-12、IFN-γ mRNA 表达量与正常对照组和阳性对照组相比,无显著差异。实验结果表明,氢化可的松可显著抑制脾淋巴细胞细胞因子 IL-2、IL-12、IFN-γ mRNA 的表达量,而左旋咪唑能拮抗这种抑制作用, JGP-III<sub>2</sub> 对氢化可的松抑制脾淋巴细胞细胞因子 IL-2、IL-12、IFN-γ mRNA 表达有逆转作用,且逆转程度与给药剂量呈正相关。图 10 显示 JGP-III<sub>2</sub> 对小鼠脾脏 Th2 类细胞因子 (IL-4、IL-6、IL-10、IL-13 和 IL-5) mRNA 表达量的影响:模型对照组小鼠 IL-4、IL-6、IL-10、IL-13 和 IL-5 的 mRNA 表达量与正常对照组相比,显著升高;阳性对照组的 5 种细胞因子的 mRNA 表达量比正常对照组略高,但差异不显著; JGP-III<sub>2</sub> 给药组的 5 种细胞因子的 mRNA 表达量随着给药剂量的增加呈现下降趋势, JGP-III<sub>2</sub> 低剂量、中剂量和高剂量给药组的 5 种的 mRNA 表达量均低于模型对照组; JGP-III<sub>2</sub> 低剂量给药组和中剂量给药组的 5 种细胞因子的 mRNA 表达量显著高于正常对照组,而 JGP-III<sub>2</sub> 高剂量给药组的 5 种细胞因子的 mRNA 表达量与正常对照组无显著差异。结果表明,氢化可的松可以使 Th2 类细胞因子的 mRNA 表达量升高,而 JGP-III<sub>2</sub> 对这种高表达现象有逆转的功效, JGP-III<sub>2</sub> 的抑制能力与给药剂量具有剂量依赖关系。细胞因子在细胞免疫系统中发挥关键的细胞通讯作用,在细胞内和细胞间形成互通信息的细胞因子网络。细胞因子网络是复杂的,不同的细胞因子,经常一起行动,影响其他细胞因子的合成。T 细胞根据功能可分为 Th、CTL 和调节性 T 细胞 (Tr 细胞), Th 细胞可分化为 Th1、Th2、Th3 三类细胞,分别分泌不同的细胞因子, Th1 和 Th2 在细胞和体液免疫中发挥重要的作用,正常的机体 Th1/Th2 细胞因子的 mRNA 表达量是处于动态平衡状态,当机体受到不良环境 (如病菌、化学试剂等) 的刺激后, Th1/Th2 细胞因子的 mRNA 表达量动态平衡会遭到破坏,发生“Th1/Th2 偏移”,使机体的免疫力下降<sup>[14]</sup>。在本实验中,免疫抑制剂氢化可的松使小鼠脾脏 Th1/Th2 细胞因子的 mRNA 表达量动态平衡发生 Th2 偏移,使小鼠的免疫力下降,但 JGP-III<sub>2</sub> 对这种偏移起到恢复的作用,特别是高剂量组, Th1/Th2 mRNA 表达水平与正常对照组没有显著性差异。推测 JGP-III<sub>2</sub> 增强小鼠体液免疫和细胞免疫能力的是通过调节 Th1/Th2 mRNA 表达水平来实现的,但这种推测

还需进一步的实验进行验证。

### 3 结论

3.1 从海蜇体内获得一种新的糖蛋白 JGP-III<sub>2</sub>。

3.2 JGP-III<sub>2</sub> 在体内具有提高免疫低下小鼠免疫力的活性。

3.3 JGP-III<sub>2</sub> 能促进免疫低下小鼠脾淋巴细胞 Th1 类细胞因子 mRNA 的表达,抑制 Th2 类细胞因子 mRNA 的表达,推测 JGP-III<sub>2</sub> 可能是通过调节机体 Th1/Th2 的平衡来提高机体免疫活性。

### 参考文献

- [1] Atanu Mallick, Subhasis Barik, Kuntal Kanti Goswami, et al. Neem Leaf Glycoprotein Activates CD8+ T Cells to Promote Therapeutic Anti-Tumor Immunity Inhibiting the Growth of Mouse Sarcoma [J]. PLOS ONE, 2013,8(1):1-14
- [2] PARK Ho-Young, YU A-Reum, CHOI In-Wook, et al. Immunostimulatory Effects and Characterization of a Glycoprotein Fraction from Rice Bran [J]. International Immunopharmacology, 2013, 17(2): 191-197
- [3] 章建设,雷晓凌.鱿鱼内脏糖蛋白提取工艺及其免疫活性初步研究[J].现代食品科技,2008,24(2):167-169  
ZHANG Jian-She, LEI Xiao-Ling. Extraction of Glycoprotein from Squid Viscera and Its Immunomodulation [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(2): 167-169
- [4] YU Hua-Hua, LIU Xi-Guang, DONG Xiang-Li, et al. Insecticidal Activity of Proteinous Venom from Tentacle of Jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005, 15(22):4949-4952
- [5] LI Cui-Ping, LI Peng-Cheng, FENG Jin-Hua, et al. Cytotoxicity of the Venom from the Nematocysts of Jellyfish *Cyanea nozakii* Kishinouye [J]. Toxicology and Industrial Health, 2012, 28(2): 186-192
- [6] Hitoshi Morishige, Takuya Sugahara, Sogo Nishimoto, et al. Immunostimulatory Effects of Collagen from Jellyfish in Vivo [J]. Cytotechnology, 2011, 63 (5):481-492
- [7] FAN Jian, ZHUANG Yong-Liang, LI Ba-Fang. Effects of Collagen and Collagen Hydrolysate from Jellyfish Umbrella on Histological and Immunity Changes of Mice Photoaging [J]. Nutrients, 2013, 5(1): 223-233
- [8] DING Jin-Feng, LI Yan-Yan, XU Jia-Jie, et al. Study on Effect of Jellyfish Collagen Hydrolysate on Anti-fatigue and Anti-oxidation [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 1350-1353
- [9] Akiko Masuda, Takayuki Baba, Naoshi Dohmae, et al. Mucin (Qniumucin), a Glycoprotein from Jellyfish, and Determination of Its Main Chain Structure [J]. Journal of Natural Products, 2007, 70(7):1089-1092
- [10] 任国艳,邵征,曹力,等.海蜇糖蛋白对小鼠脾脏细胞因子 mRNA 表达的影响[J].食品科学,2013, 34(23):305-308  
REN Guo-Yan, SHAO Zheng, CAO Li, et al.. Effects of a Glycoprotein from Jellyfish (*Rhopilema esculentum*) on Cytokine mRNA Expression in BALB/c Mice [J]. Food Science, 2013, 34(23): 305-308
- [11] 任国艳,李八方,侯玉泽,等.海蜇头糖蛋白基本组成及结构分析 [J].食品研究与开发,2009,30(7):121-124  
REN Guo-yan, LI Ba-fang, HOU Yu-ze, et al. Composition and Structure Analysis of Glycoprotein from Jellyfish Oral-Arms [J]. Food Research and Development, 2009, 30(7):121-124
- [12] 刘志龙.海蜇糖蛋白及其糖肽的免疫活性研究[D].洛阳:河南科技大学,2013  
LIU Zhi-long. Effects of Glycoprotein and Glycopeptide from Jellyfish on Immune Function of Mice [D]. Luoyang, Henan University of Science and Technology, 2013
- [13] MEI Yu-Xia, CHEN Hong-Xia, ZHANG Jun, et al. Protective Effect of Chitooligosaccharides Against Cyclophosphamide-induced Immunosuppression in Mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 62: 330-335
- [14] Alexandra Zanin-Zhorov, Guy Tal, Shirley Oren, et al. Heat Shock Protein 60 Inhibits Th1-mediated Hepatitis Model via Innate Regulation of Th1/Th2 Transcription Factors and Cytokines [J]. The Journal of Immunology, 2014, 174(6): 3225-3236