

[文章编号] 1007-7405(2015)01-0014-09

龙须菜寡糖分离纯化和抗食物过敏功效的研究

时超岚^{1,2}, 曾润颖^{3,4}, 曹敏杰^{1,2}, 刘庆梅^{1,2}, 张凌晶^{1,2}, 苏文金^{1,2}, 刘光明^{1,2}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005; 4. 国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005)

[摘要] 为探究深海细菌 *Flammeovirga pacifica* 降解龙须菜所产生的寡糖抗食物过敏功效, 以龙须菜为原料, 通过发酵、超滤、Superdex Peptide HR 10/300 柱层析等方法获得高纯度寡糖. 离子色谱结果显示: 分离纯化获得的寡糖主要为四糖和六糖, 其质量分数分别为 48.47% 和 25.69%. 小鼠过敏模型实验结果表明, 腹腔注射该寡糖(100 μg /只)能显著降低过敏小鼠血清特异性 IgE 和 IgG₁ 水平, 提高特异性 IgG_{2a} 水平. 通过灌胃(10 mg/只)能显著降低小鼠粪便中组胺的水平, 且能有效缓解空肠组织过敏病理现象. 小鼠脾淋巴细胞实验结果显示, 该寡糖能在转录和转译水平上显著降低 Th₂ 细胞因子(IL-4、IL-5、IL-13)含量, 促进 Th₁ 细胞因子 IFN- γ 分泌. 说明该寡糖能有效调节辅助性 T 细胞的免疫功能向 Th₁ 细胞转换, 从而抑制 Th₂ 细胞主导的食物过敏反应.

[关键词] 龙须菜; 寡糖; 纯化; 抗食物过敏; 原肌球蛋白; 小鼠模型; Th₂ 免疫反应

[中图分类号] R 392.8

[文献标志码] A

Research on the Purification and Anti-food Allergic Activity of *Gracilaria lemaneiformis* Oligosaccharide

SHI Chao-lan^{1,2}, ZENG Run-ying^{3,4}, CAO Min-jie^{1,2}, LIU Qing-mei^{1,2},
ZHANG Ling-jing^{1,2}, SU Wen-jin^{1,2}, LIU Guang-ming^{1,2}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Fujian Province, Xiamen 361021, China; 3. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China; 4. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: In order to investigate the anti-food allergic effect of *Gracilaria lemaneiformis* oligosaccharides which were degraded by the deep sea bacteria *Flammeovirga pacifica*, the oligosaccharides were obtained from *Gracilaria lemaneiformis* through fermentation, ultra-filtration, and purified by Superdex peptide HR 10/300 chromatography column. The oligosaccharides obtained are mainly tetrasaccharide and hexaose, their contents were 48.47% and 25.69% respectively as detected by ion chromatography. The results of the allergic mouse model indicated that intraperitoneal injection of *Gracilaria lemaneiformis* oligosaccharides (100 μg /mouse)

[收稿日期] 2014-05-10

[修回日期] 2014-05-27

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31171660); 厦门市科技计划项目(3502Z20121151); 厦门南方海洋研究中心项目(201405220001; 201505026; 13GZP003NF09); 海洋公益性行业科研专项(201105027-4)

[作者简介] 时超岚(1989—), 女, 硕士生, 从事食品生物学研究. 通讯作者: 刘光明(1972—), 男, 教授, 博士, 主要从事食品生物技术研究, E-mail: gmlu@jmu.edu.cn.

significantly suppressed serum specific IgE, IgG₁ level, and promoted specific IgG_{2a} level in mice. Gavage of *Gracilaria lemaneiformis* oligosaccharides (10 mg/mouse) decreased fecal histamine release and repaired the pathology in the jejunum. The results of the mouse splenic lymphocytes experiment showed that Th₂ cytokine (IL-4, IL-5 and IL-13) contents were reduced, while the Th₁ cytokine (IFN- γ) content was up-regulated by *Gracilaria lemaneiformis* oligosaccharides in the transcription and translation levels. These results suggested that *Gracilaria lemaneiformis* oligosaccharides could cause the immune function of helper T cells to convert to the Th₁, so as to inhibit the food allergies dominated by Th₂ cells.

Key words: *Gracilaria lemaneiformis*; oligosaccharide; purification; anti-food allergy; tropomyosin; mouse model; Th₂ immune response

0 引言

食物过敏是由免疫机制介导的食物不良反应, 常伴随一系列速发症状^[1], 包括胃肠道、皮肤、呼吸道甚至全身过敏反应, 有时会致命^[2]. 流行病学调查显示, 全世界约有 1%~2% 的成年人和 5%~7% 的儿童对食物产生过敏反应, 主要的过敏食物分为牛奶、花生和甲壳类动物等八大类^[3]. 在中国, 对水产品过敏的人数占到总人数的 49%^[4]. 食物过敏大多为 IgE 介导的 I 型超敏反应, 当过敏原进入机体后, 会激活 Th₂ 细胞, 使其分泌 IL-4、IL-5 和 IL-13 等细胞因子, 这些因子诱导 B 细胞产生 IgE 抗体, 接着 IgE 会与肥大细胞、嗜碱性粒细胞表面的受体 Fc ϵ RI 结合, 使细胞脱颗粒, 释放贮存的炎症介质如组胺、白细胞介素等物质, 从而使机体产生过敏反应^[3,5]. 龙须菜 (*Gracilariopsis lemaneiformis*) 是我国重要的经济海藻, 在我国已成为继海带和紫菜之后的第三大栽培海藻^[6]. 近年来, 在山东、浙江、福建、广东和海南等省的沿海进行大规模栽培^[7]. 目前龙须菜主要作为提炼琼胶的原料, 仍处于低值化的初级利用阶段, 所以需要探索能更加充分开发和利用龙须菜资源的途径. 龙须菜富含多种生物活性物质, 如活性多糖和藻胆蛋白等, 其多糖含量高达 30% 左右^[8]. 研究证实, 龙须菜多糖具有抗突变、抗氧化、抗肿瘤等生物活性^[8-9]. 但许多天然多糖是高分子化合物, 无法通过机体屏障到达细胞而影响其生物学功能. 对多糖进行降解, 得到适宜分子质量的多糖片断或寡糖, 可以提高多糖的生物活性^[10]. 龙须菜寡糖是一类海藻寡糖, 已有研究表明, 海藻寡糖具有抗过敏、抗肿瘤和调节免疫的作用^[11-12]. 但有关龙须菜寡糖抗过敏活性的研究尚未见报道. 本文利用从西太平洋深海沉积物中筛选到的一株可直接降解龙须菜生产寡糖的菌株 *Flammeovirga pacifica*, 将菌株与龙须菜共培养制备寡糖^[13], 并采用超滤、柱层析等方法从龙须菜降解产物中纯化获得高纯度龙须菜寡糖. 同时, 利用甲壳类水产品主要过敏原原肌球蛋白 (Tropomyosin, TM) 建立小鼠过敏模型, 通过动物实验和细胞实验评价龙须菜寡糖的抗食物过敏功效.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

龙须菜粉末和菌株 *Flammeovirga pacifica* 均取自于国家海洋局第三海洋研究所; 拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 原肌球蛋白由本实验室制备; SPF 级雌性 BALB/c 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司; 凝胶法鲎试剂内毒素检测试剂盒购自美国科德角公司; 蛋白质测定试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司; 明矾佐剂购自美国 Thermo 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgE 抗体购自美国 Southern Biotech 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG₁、IgG_{2a} 抗体购自英国 Abcam 公司; 小鼠淋巴细胞分离液购自深圳达科为生物

技术有限公司；Trizol 试剂购自瑞士 Roche 公司；细胞因子检测试剂盒购自美国 Peprotech 公司；荧光定量 PCR 试剂盒购自天根生化科技有限公司；苏木伊红染色试剂盒购自碧云天公司；其他试剂均为国产化学纯或分析纯。

1.2 龙须菜寡糖的纯化

菌株与龙须菜共培养制备寡糖的方法参照文献 [13]。向锥形瓶中加入 2.5 g 龙须菜粉末、0.5 g NaCl 和 50 mL 蒸馏水，摇匀，高温高压灭菌后冷却至室温，接种 2.5 mL 菌株 *Flammeovirga pacifica*，置于恒温摇床 48 h (37 °C, 200 r/min)。48 h 后离心 (7500 r/min, 15 min, 25 °C)，将上清液通过 3 kD 超滤装置过滤，除去多糖、蛋白质等大分子物质，将滤液冷冻干燥，获得龙须菜寡糖粗样粉末。将粉末复溶于超纯水使其质量浓度为 20 mg/mL，上样于 Superdex Peptide HR 10/300 (10 mm × 300 mm) 凝胶层析柱和制备型液相色谱蛋白分析仪，超水洗脱，流速为 0.3 mL/min，采用蒽酮硫酸法检测洗脱液含糖量，收集含糖洗脱峰。采用薄层层析法检测洗脱峰是否含有寡糖，即取一块硅胶板，在离板边缘 1.5 cm 处分别用移液枪点上 0.5 μL 新琼二、四、六、八糖混合标准品和龙须菜寡糖样品，晾干后重复点样 3 次。将展层剂 ($V(\text{正丁醇}):V(\text{冰乙酸}):V(\text{蒸馏水})=1:2:1$) 倒入层析缸中，将硅胶板放于层析缸中进行展层，待展层剂延伸至离板上端 1 cm 时取出硅胶板结束展层。待硅胶板完全风干后均匀地喷上显色剂 ($V(\text{浓硫酸}):V(\text{无水乙醇})=1:9$)，置于 90 °C 烘箱中显色 10 min，显色完毕用凝胶成像仪拍照，收集含有寡糖的洗脱峰。将含有寡糖的洗脱液上样于 Detoxi-Gel 内毒素去除柱 (10 mm × 70 mm)，以除去样品中的内毒素。根据内毒素去除柱说明书所示，弃去上样后首先流出的 90% 柱体积的流洗液 (其中不含样品)，然后开始收集直至 5 倍柱体积的流洗液 (含样品)，并将其冷冻干燥，从而得到高纯度龙须菜寡糖。

1.3 龙须菜寡糖的成分分析

通过蒽酮硫酸法测定龙须菜寡糖中总糖的含量^[14]；通过 DNS 法测定龙须菜寡糖中还原糖的含量^[15]；通过 Lowry 法测定龙须菜寡糖中蛋白质的含量^[16]；通过凝胶法鲎试剂盒检测龙须菜寡糖中内毒素的含量。

用超纯水将纯化的龙须菜寡糖粉末配制成 100 μg/mL 的溶液。将新琼四糖、六糖标准品分别用超纯水配制成 10、20、50、100、200 μg/mL 的溶液。将标准品和样品上样于离子色谱仪测定寡糖的组成。离子色谱分析参数：色谱柱为 Dionex CarboPac PA-100 阴离子交换柱 (4 mm × 250 mm)；淋洗液为 0.1 mol NaOH 和 0.15 mmol/L NaAc；流速为 0.25 mL/min；进样体积为 25 μL；柱温为 25 °C；检测器为脉冲安培检测器，金电极。

1.4 小鼠体内食物过敏模型的建立

小鼠的免疫方案参照 Costa 等的方法^[17]。以 6~8 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠为研究对象，采用拟穴青蟹原肌球蛋白 TM 为过敏原敏化小鼠，建立小鼠食物过敏模型。将小鼠分为 PBS 组、TM 组和龙须菜寡糖组，每组 6 只小鼠。在 0、14 d 向 TM 组和龙须菜寡糖组小鼠注射 TM 和明矾佐剂混合液 (TM 100 μg/只)，PBS 组小鼠注射 PBS (8.00 g NaCl, 0.20 g KCl, 2.9 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.20 g KH₂PO₄，超纯水定容至 1 L, pH = 7.4) 和明矾佐剂混合液作为阴性对照。龙须菜寡糖组从致敏前一周开始每周注射 3 次龙须菜寡糖 (100 μg/只)，小鼠在 15 d 进行尾静脉采血，血液离心 (7000 r/min, 10 min, 4 °C)，收集上层血清。从 28 d 开始，对 PBS 组、TM 组和龙须菜寡糖组 3 组小鼠进行灌胃实验，TM 组和龙须菜寡糖组小鼠每隔 2~3 d 灌胃 TM (10 mg/只)，共灌胃 10 次，PBS 组小鼠灌胃 200 μL PBS 作为阴性对照，灌胃 TM 前 1 h 向龙须菜寡糖组小鼠灌胃龙须菜寡糖 (5 mg/只)。在 49 d 灌胃结束后 1 h 收集粪便。在 50 d 将小鼠处死获得空肠组织用于组织切片的制作。

1.5 小鼠血清 TM 特异性 IgE、IgG₁ 和 IgG_{2a} 水平的检测

小鼠血清中 TM 特异性免疫球蛋白的含量通过间接性 ELISA 测定，参照 Li 等的方法^[18]。将纯化的 TM 用包被液 (50 mmol/L Na₂CO₃, 130 mmol/L NaHCO₃, 3 mmol/L NaN₃, pH = 9.6) 稀释为

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 加入 96 孔酶标板中, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 16 h. 用 TBST (20 mmol/L Tris - HCl buffer, pH = 7.5, 包含 145 mmol/L NaCl) 清洗 5 次, 加入质量分数为 5% 的脱脂奶 300 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h. TBST 清洗后加入血清样品 (用质量分数为 1% 的脱脂奶 1:5 稀释) 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h. TBST 清洗后加入二抗 (IgE 按 1:1000 稀释, IgG₁ 按 1:5000 稀释, IgG_{2a} 按 1:1000 稀释, 用质量分数为 1% 的脱脂奶稀释), 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h. TBST 清洗后加入 TMB 显色, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 20 min. 取出板加入 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止显色反应, 用酶标仪于波长 450 nm 处检测吸光度值. 小鼠血清中 TM 特异性 IgE 水平同时通过蛋白质印迹 (Western - blotting) 的方法进行测定, 参照 Towbin 等的方法进行^[19].

1.6 小鼠粪便中组胺含量的测定

小鼠粪便中组胺的提取参考 Hwang 等的方法^[20]. 将 0.8 g 粪便与 2 mL 质量分数为 5% 的三氯乙酸混合, 用组织捣碎机捣碎, 离心 (9500 r/min, 20 min, 25 $^{\circ}\text{C}$), 过滤获得上清液. 调节上清液 pH 值至 9.5, 将 300 μL 上清与 600 μL 丹磺酰氯溶液混合均匀, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min. 向混合液中加入 100 μL 氨水以除去多余的丹磺酰氯, 混匀, 避光静置 30 min, 用乙腈定容至 1.5 mL, 上样于高效液相色谱仪 (HPLC).

HPLC 分析参数如下: 色谱柱为 Agilent ZORBAX Extend - C18 色谱柱 (50 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 V(乙腈): V(水) = 70:30; 流速为 1 mL/min; 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 20 μL ; 紫外检测波长为 254 nm.

1.7 小鼠空肠组织的病理分析

小鼠空肠组织切片参照 Yehia 等^[21]的方法. 在 50 d 将小鼠处死, 取出空肠组织, 使用中性甲醛溶液固定 1 h. 将固定好的空肠组织按横轴切断, 长度为 5 mm 左右, 石蜡包埋组织, 使用切片机进行石蜡切片. 使用乙醇梯度溶液使组织复水, 用苏木精和伊红溶液分别进行染色, 再将组织经过乙醇梯度脱水和二甲苯透明后, 置于光学显微镜下进行镜检.

1.8 小鼠脾脏淋巴细胞过敏模型的建立

使用 6~8 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠建立细胞过敏模型. 在 0、14 d 向小鼠注射 TM 和明矾佐剂混合液 (TM 100 $\mu\text{g}/\text{只}$), 在 17 d 处死小鼠, 分离纯化出脾脏淋巴细胞. 实验分为 PBS 组、TM 组和龙须菜寡糖组. 在 24 孔细胞培养板中分别加入 940 μL 含脾脏淋巴细胞的培养液. PBS 组再加入 60 μL PBS 溶液; TM 组再加入 10 μL 1 mg/mL TM 溶液, 50 μL PBS 溶液; 龙须菜寡糖组再加入 10 μL 的 1 mg/mL TM 溶液, 50 μL 的 2 mg/mL 龙须菜寡糖溶液. 置于细胞培养箱 (37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数 5% CO₂) 培养 72 h, 离心 (7000 r/min, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 上清液用于细胞因子蛋白转译水平的检测, 细胞沉淀用于 RNA 提取及细胞因子基因转录水平的检测.

脾脏淋巴细胞上清细胞因子的检测按照 IL-4、IL-13 和 IFN- γ 试剂盒说明书操作. 细胞沉淀通过 Trizol 试剂提取出 RNA, 将 RNA 反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 管家基因 HPRT 作为 IL-4、IL-13 和 IFN- γ 的内参, β -actin 作为 IL-5 的内参, 利用荧光定量 PCR 检测 Th₁ 细胞因子 (IFN- γ) 和 Th₂ 细胞因子 (IL-4、IL-5、IL-13) 的基因表达量. 所用引物的序列参考 Capobianco 等的方法^[22].

1.9 数理统计

实验中所有数据均采用 SPSS 16.0 软件分析, 用 ANOVA 进行方差分析, 显著性检验方法为 Duncan 多重检验法, 检验限为 0.05, 实验数据平行测定 3 次.

2 结果

2.1 龙须菜寡糖的纯化

龙须菜通过发酵, 超滤后上样于 Superdex Peptide HR 10/300 层析柱, 通过蒽酮硫酸法检测洗脱

液，洗脱曲线如图 1 所示，将获得的两个洗脱峰分别收集进行薄层层析，薄层层析结果显示，第一个洗脱峰含有四糖和六糖，将第二个洗脱峰的收集液进行薄层层析，在层析板上无任何显色反应，说明不含寡糖，所以将第一个峰的洗脱液进行冷冻干燥，从而得到纯化的龙须菜寡糖粉末。

2.2 龙须菜寡糖的成分分析

纯化的龙须菜寡糖中总糖的含量占龙须菜寡糖粉末干重的 78.58%，还原糖含量占干重的 17.80%，通过蛋白质测定试剂盒检测蛋白质的含量占干重的 0.2%，通过凝胶法鲎试剂内毒素检测试剂盒检测内毒素的含量 <0.03 EU/mg。

如图 2 所示，通过离子色谱法将纯化的龙须菜寡糖与新琼四、六糖混和标准品比对，可以看出龙须菜寡糖中主要含有四糖和六糖，通过新琼寡糖浓度 - 出峰面积的标准曲线得出纯化的龙须菜寡糖中含有四糖 48.47%，六糖 25.69%。

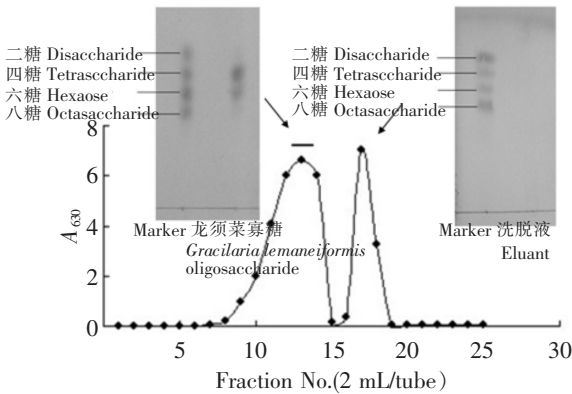


图 1 龙须菜寡糖的 Superdex Peptide HR 10/300 柱层析纯化和薄层层析分析

Fig.1 Superdex Peptide HR 10/300 chromatographic purification and thin-layer chromatography analysis of *Gracilaria lemaneiformis* oligosaccharides

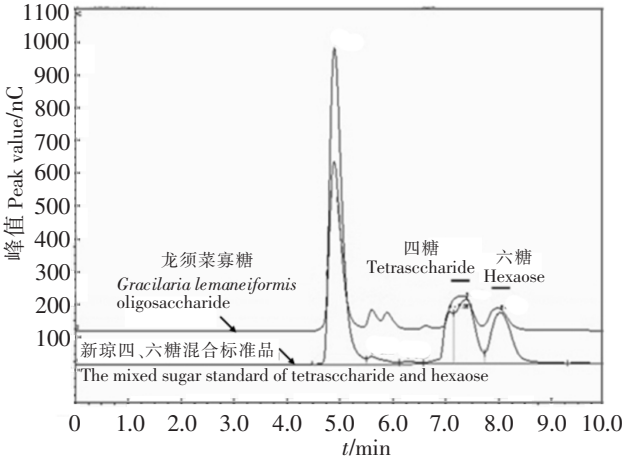


图 2 龙须菜寡糖的离子色谱图

Fig.2 Ion chromatography diagram of *Gracilaria lemaneiformis* oligosaccharides

2.3 龙须菜寡糖对小鼠血清 IgE、IgG₁ 和 IgG_{2a} 的影响

第二次注射 TM 24 h 后采血，通过 ELISA 检验血清中 TM 特异性 IgE、IgG₁ 和 IgG_{2a} 的水平，结果如图 3 所示。由图 3 可见，从第一次注射 TM 前开始注射龙须菜寡糖的小鼠血清中 IgE 水平较 TM 组有显著的下降，而血清中 IgG₁ 水平与 TM 组相比显著下降，IgG_{2a} 水平显著上升。Western - blotting 对 IgE 的检测结果与 ELISA 结果相同。

2.4 小鼠粪便中组胺的水平

通过 HPLC 检测粪便中组胺含量，组胺的保留时间为 5.6 min（见图 4a）。于 49 d 最后一次灌胃小鼠，1 h 后收集小鼠粪便，通过 HPLC 检测粪便中组胺的含量，如图 4b 所示，PBS 组小鼠粪便中组胺含量为 90.68 μg/mg，TM 组组胺含量上升至 187.48 μg/mg，而灌胃了龙须菜寡糖的小鼠粪便中组胺含量降低为 133.52 μg/mg。

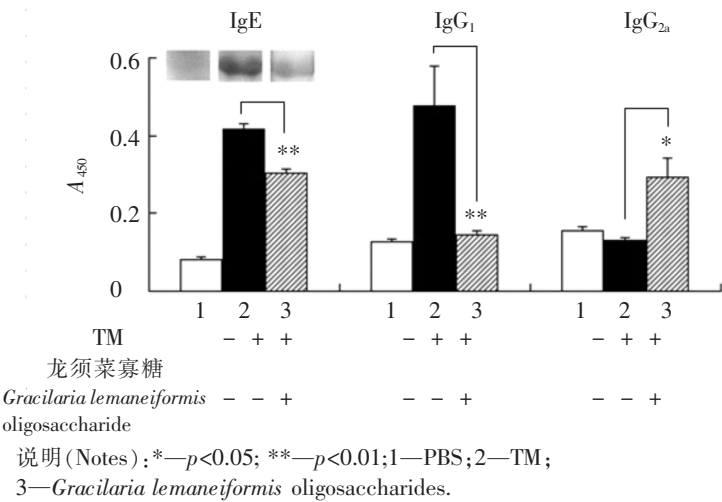


图 3 龙须菜寡糖对小鼠血清特异性 IgE、IgG₁ 和 IgG_{2a} 的影响

Fig.3 Effect of *Gracilaria lemaneiformis* oligosaccharide on the TM-specific IgE, IgG₁ and IgG_{2a}

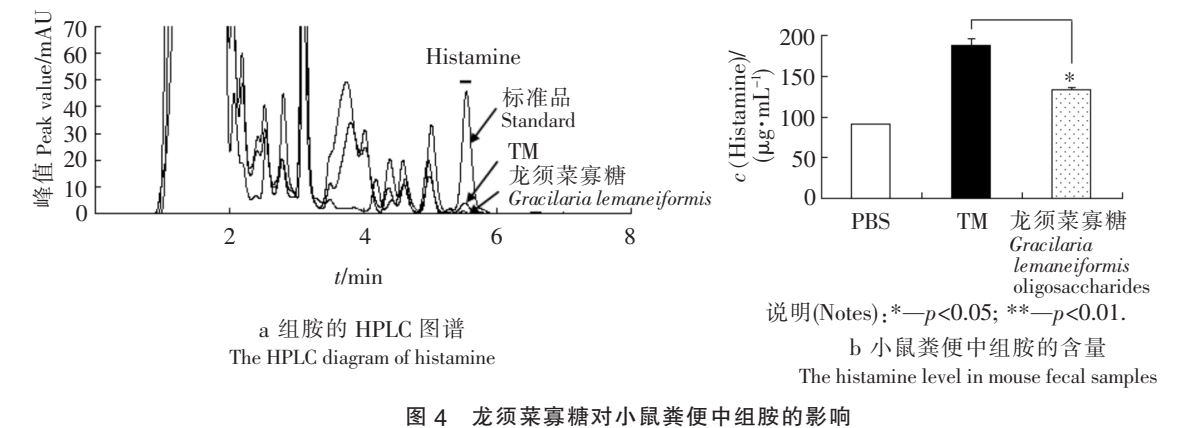


图 4 龙须菜寡糖对小鼠粪便中组胺的影响

Fig.4 Effect of *Gracilaria lemaneiformis* oligosaccharides on the mouse fecal histamine level

2.5 小鼠空肠组织切片

在 50 d 将小鼠处死, 取出空肠组织进行组织切片, 再通过苏木精 - 伊红染色观察组织病理. 从图 5 可以看出, PBS 组小鼠的空肠组织正常, 没有病理现象; TM 组的空肠组织可以看到明显的水肿 (实线箭头) 以及淋巴细胞浸润 (虚线箭头) 的病理现象; 而龙须菜寡糖组的小鼠空肠组织没有明显的病理现象.

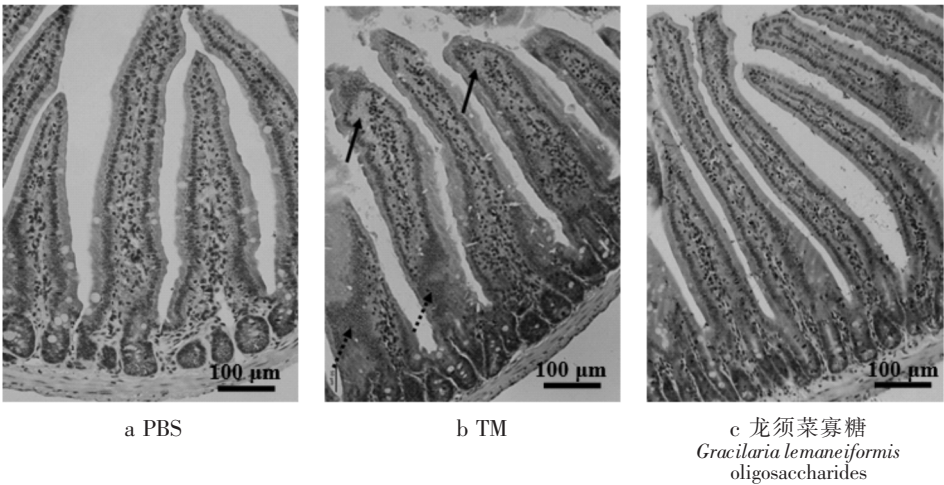


图 5 龙须菜寡糖对空肠组织的影响

Fig.5 Effect of *Gracilaria lemaneiformis* oligosaccharides on the jejunum tissue

2.6 龙须菜寡糖对 IL-4、IL-13、IFN- γ 转译水平的调节作用

小鼠在第二次注射 TM 72 h 后处死, 获得脾脏淋巴细胞, 分别加入 PBS、TM、TM + 龙须菜寡糖刺激培养 72 h, 使用 IL-4、IL-13、IFN- γ 细胞因子检测试剂盒测定细胞上清中细胞因子的含量, 结果如图 6 所示. 由图 6 可见, PBS 组 IL-4 质量浓度为 100.83 pg/mL, 经过 TM 刺激后 IL-4 质量浓度上升为 133.36 pg/mL, 而加入龙须菜寡糖组的细胞 IL-4 恢复到了正常水平 (70.57 pg/mL). PBS 组 IL-13 质量浓度为 361.82 pg/mL, 经过 TM 刺激后 IL-13 质量浓度上升为 980.74 pg/mL, 向 TM 刺激后的细胞中加入龙须菜寡糖其 IL-13 含量显著下降 (813.72 pg/mL). PBS 组细胞 IFN- γ 的质量浓度为 281.33 pg/mL, TM 组细胞 IFN- γ 质量浓度为 327.903 pg/mL, 加入龙须菜寡糖的细胞 IFN- γ 质量浓度显著上升为 857.36 pg/mL.

2.7 龙须菜寡糖对 IL-4、IL-13、IL-5 和 IFN- γ 转录水平的调节作用

第二次注射 TM 72 h 后处死小鼠, 获得脾脏淋巴细胞, 分别加入 PBS、TM、TM + 龙须菜寡糖刺激培养 72 h, 离心获得细胞沉淀, 提取细胞 RNA 并反转录成 cDNA, 从而检测 IL-4、IL-5、IL-

13、IFN- γ 的表达量，结果如图 7 所示. 由图 7 可见，与 TM 组相比，龙须菜寡糖能够显著抑制 IL-4、IL-5、IL-13 的 mRNA 表达水平，且显著促进 IFN- γ 的 mRNA 表达水平.

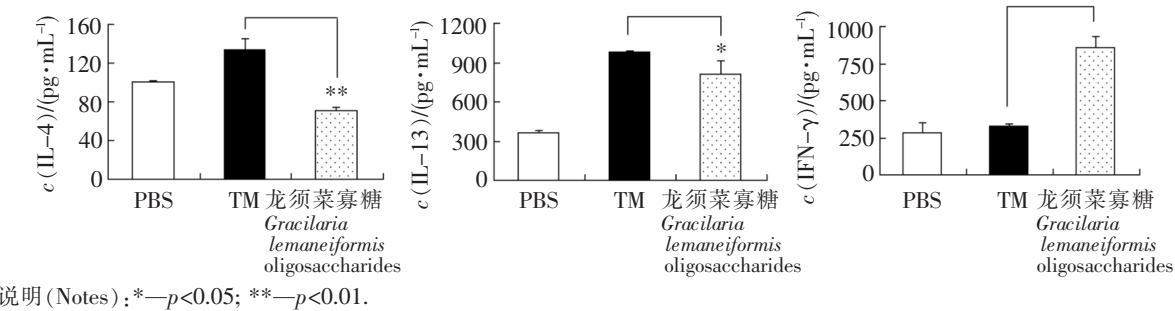


图 6 龙须菜寡糖对 IL-4、IL-13 和 IFN- γ 转译水平的调节作用

Fig.6 The regulation of *Gracilaria lemaneiformis* oligosaccharides on IL-4, IL-13 and IFN- γ in the translation level

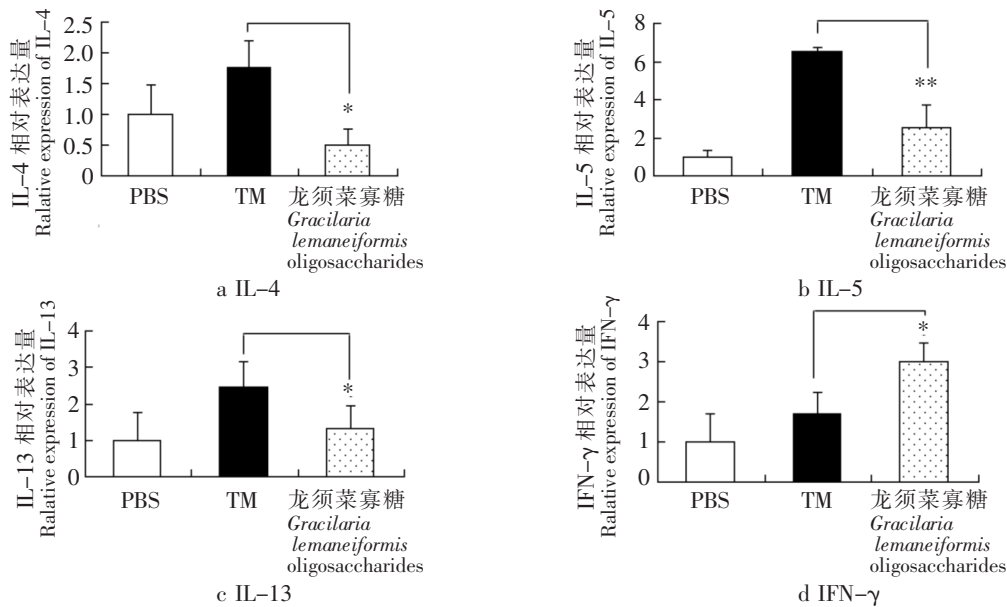


图 7 龙须菜寡糖对 IL-4、IL-5、IL-13 和 IFN- γ 转录水平的调节作用

Fig.7 The regulation of *Gracilaria lemaneiformis* oligosaccharides on IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- γ in the transcription level

3 讨论

目前对于海藻寡糖的提取，通常都要先对海藻多糖进行提取，再通过强酸或酶将多糖降解为寡糖^[23]. 该操作过程步骤较多且成本高，大大限制了海藻寡糖的应用发展，而过程中又需要用到强酸和有机溶剂，对环境也造成了污染. 本文采用菌株 *Flammeovirga pacifica* 与龙须菜共培养制备龙须菜寡糖的方法，过程简便，有利于大规模生产，且不会对环境造成危害. 龙须菜与菌株共培养后发酵液还原糖质量浓度为 2~3 mg/mL，与万纬等的研究结果相符^[13]. 将发酵液冷冻干燥，通过蒽酮硫酸法测定其总糖质量分数为 50% 左右，纯度还不够理想. 所以，为了得到较高纯度的龙须菜寡糖，本研究还通过发酵、超滤、Superdex Peptide HR 10/300 柱层析等方法进一步纯化发酵液中的龙须菜寡糖，使龙须菜寡糖得到了较好的纯化，纯化后的龙须菜寡糖其总糖质量分数为 78.85%，还原糖质量分数为 17.80%，蛋白质质量分数为 0.2%. 通过离子色谱测定纯化的龙须菜寡糖主要为四糖和六糖，质量分数分别为 48.47% 和 25.69%.

通过对小鼠腹腔注射 TM 建立 Th_2 型动物过敏模型,从而探究龙须菜寡糖对血清中 TM 特异性抗体 IgE、IgG₁ 和 IgG_{2a} 的调节作用。其中, IgE 是评价机体过敏状况的决定性指标。机体过敏时, IgE 会与肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的受体结合,导致炎症介质和 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞因子的释放^[24]。而 Th_1 型特异性指标 IgG_{2a} 与 Th_2 型特异性指标 IgG₁ 的测定,也能够很好地表示 Th_1/Th_2 的极化情况,从而指示机体的过敏情况^[25]。本实验从小鼠致敏前 7 d 开始注射龙须菜寡糖,于第二次免疫后检测小鼠血清中 TM 特异性抗体水平,结果显示,龙须菜寡糖能够显著抑制血清中 IgE 和 IgG₁ 的水平,显著促进小鼠血清中 IgG_{2a} 的水平,说明龙须菜寡糖是一种抗食物过敏预防剂。

最后一次灌胃小鼠后 1 h,收集小鼠粪便,经过处理后上样于 HPLC,从而检测粪便中组胺的含量。结果显示,与 TM 组相比,龙须菜寡糖组的小鼠粪便中组胺含量显著降低。Schiavi 等人的研究中通过灌胃虾的 TM 建立小鼠食物过敏模型,在最后一次灌胃 TM 后收集粪便检测组胺含量,结果显示,所研究的益生菌混合物能够很好地抑制粪便中组胺的含量,且抑制率与本研究的结果相同^[26]。

食物过敏经常会引起胃肠道的炎症病理现象,而空肠是容易产生过敏病理反应的肠道部位之一。本实验中,经过连续 10 次的灌胃后,处死小鼠,取出空肠组织进行组织切片观察。结果显示, PBS 组小鼠的空肠组织正常,没有病理现象; TM 组的空肠组织可以看到明显的水肿以及淋巴细胞浸润的病理现象;而灌胃龙须菜寡糖组的小鼠空肠组织没有明显的病理现象。Birmingham 等人建立小鼠的坚果过敏模型,发现坚果致敏的小鼠空肠会出现水肿、淋巴结充血等症状^[27]。Chen 等人建立了大米过敏的小鼠模型,发现过敏小鼠的空肠组织会出现淋巴细胞浸润、绒毛萎缩、杯状细胞增生等炎症现象^[28]。组织切片结果说明龙须菜寡糖能有效缓解空肠组织的过敏病理现象。

当机体过敏时, Th_2 细胞会产生 IL-4 和 IL-13,从而诱导 B 细胞产生 IgE 等抗体,所以 IL-4 和 IL-13 的含量是评价食物过敏的重要指标^[5]。而 Th_1 型细胞的特征是大量分泌细胞因子 IFN- γ , IFN- γ 能够缓解炎症反应和抵抗病原体的入侵^[29]。本研究通过建立体外的细胞模型进一步研究龙须菜寡糖对食物过敏相关细胞因子的调节作用,并通过转录水平和转译水平两个方向同时验证。通过荧光定量 PCR 测定小鼠脾脏淋巴细胞 RNA 的相对表达量,龙须菜寡糖能在转录水平上显著促进 Th_1 细胞因子 IFN- γ 的含量,且能显著抑制 Th_2 细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-13 的含量。通过 ELISA 对小鼠脾脏淋巴细胞上清液中 IL-4、IL-13 和 IFN- γ 含量在转译水平的检测,也能得到相似的结果。本实验室王有朝等^[30]已通过建立小鼠食物过敏模型研究了坛紫菜中 R-藻蓝蛋白的抗食物过敏活性。而本研究利用建立的食物过敏动物模型,测定了更多的过敏相关指标,如 IgG₁、IgG_{2a}、组胺、空肠切片以及相关的细胞因子,更加全面证实了龙须菜寡糖是作为一种食物过敏预防剂而起到了抗过敏的作用。

[参 考 文 献]

- [1] BERIN M C, SAMPSON H A. Food allergy: an enigmatic epidemic [J]. Trends in Immunology, 2013, 34(8): 390-397.
- [2] SAMPSON H A. Food anaphylaxis [J]. British Medical Bulletin, 2000, 56(4): 925-935.
- [3] MILLS E N C, BREITENEDER H. Food allergy and its relevance to industrial food proteins [J]. Biotechnology Advances, 2005, 23(6): 409-414.
- [4] 吕相征, 刘秀梅, 杨晓光. 健康人群食物过敏状况的初步调查 [J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 119-121.
- [5] OZDEMIR C, AKDIS M, AKDIS C A. T-cell response to allergens [J]. Chemical Immunology and Allergy, 2010, 95:22.
- [6] 付峰. 龙须菜紫外诱变育种及抗逆速生优良品系的选育 [D]. 青岛: 中国海洋大学海洋生命学院, 2013.
- [7] 余杰, 王欣, 陈美珍, 等. 潮汕沿海龙须菜的营养成分和多糖组成分析 [J]. 食品科学, 2006, 27(1): 93-97.
- [8] 陈美珍, 余杰, 龙梓洁, 等. 龙须菜多糖抗突变和清除自由基作用的研究 [J]. 食品科学, 2005, 26(7): 219-222.

- [9] 邓志峰, 纪明侯. 龙须菜和扁江蓐多糖的组成及其抗肿瘤效果 [J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(6): 575-580.
- [10] 杨文鸽, 谢果凰, 徐大伦, 等. 龙须菜多糖的降解及其降解产物的抗氧化活性 [J]. 水产学报, 2009, 33(2): 342-347.
- [11] YOSHIDA T, HIRANO A, WADA H, et al. Alginic acid oligosaccharide suppresses Th₂ development and IgE production by inducing IL-12 production [J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2004, 133(3): 239-247.
- [12] YUAN H, SONG J, LI X, et al. Immunomodulation and antitumor activity of κ -carrageenan oligosaccharides [J]. Cancer Letters, 2006, 243(2): 228-234.
- [13] 万玮, 高超, 产竹华, 等. 深海细菌 *Flammeovirga pacifica* 降解龙须菜产寡糖反应条件的优化 [J]. 应用海洋学学报, 2013, 32(4): 584-590.
- [14] MORRIS D L. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent [J]. Science, 1948, 107(2775): 254-255.
- [15] BREUIL C, SADDLER J N. Comparison of the 3, 5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1985, 7(7): 327-332.
- [16] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275.
- [17] COSTA H F, LEITE F C, ALVES A F, et al. Managing murine food allergy with *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) and its alkaloids [J]. International Immunopharmacology, 2013, 17(2): 300-308.
- [18] LI X M, SEREBRISKY D, LEE S Y, et al. A murine model of peanut anaphylaxis: T-and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2000, 106(1): 150-158.
- [19] TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979, 76(9): 4350-4354.
- [20] HU Y, HUANG Z, LI J, et al. Concentrations of biogenic amines in fish, squid and octopus and their changes during storage [J]. Food Chemistry, 2012, 135(4): 2604-2611.
- [21] YEHIA MAH, EL-BANNA SG, OKAB AB. Diazinon toxicity affects histophysiological and biochemical parameters in rabbits [J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2007, 59(3/4): 215-225.
- [22] CAPOBIANCO F, BUTTERONI C, BARLETTA B, et al. Oral sensitization with shrimp tropomyosin induces in mice allergen-specific IgE, T cell response and systemic anaphylactic reactions [J]. International Immunology, 2008, 20(8): 1077-1086.
- [23] 齐晓辉. 浒苔多糖的结构及寡糖研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学海洋生命学院, 2012.
- [24] LEE E J, SONG M J, KWON H S, et al. Oral administration of fermented red ginseng suppressed ovalbumin-induced allergic responses in female BALB/c mice [J]. Phytomedicine, 2012, 19(10): 896-903.
- [25] REDECKE V, HÖCKER H, DATTA S K, et al. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th₂ immune response and promotes experimental asthma [J]. The Journal of Immunology, 2004, 172(5): 2739-2743.
- [26] SCHIAVI E, BARLETTA B, BUTTERONI C, et al. Oral therapeutic administration of a probiotic mixture suppresses established Th₂ responses and systemic anaphylaxis in a murine model of food allergy [J]. Allergy, 2011, 66(4): 499-508.
- [27] BIRMINGHAM N P, PARVATANENI S, HASSAN H M A, et al. An adjuvant-free mouse model of tree nut allergy using hazelnut as a model tree nut [J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2007, 144(3): 203-210.
- [28] CHEN X W, LAU K W K, YANG F, et al. An adjuvant free mouse model of oral allergenic sensitization to rice seeds protein [J]. BMC Gastroenterology, 2011, 11(1): 62.
- [29] RUTZ S, JANKE M, KASSNER N, et al. Notch regulates IL-10 production by T helper 1 cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(9): 3497-3502.
- [30] 王有朝, 曹敏杰, 苏文金, 等. R-藻蓝蛋白的分离纯化及抗食物过敏活性研究 [J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2013, 18(4): 253-260.