



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.2014.04.004

人工悬浮培养发菜胞外多糖对小鼠免疫功能的影响

侯茂霞, 戴玉杰, 符宏磊, 岳利芳, 满淑丽
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 研究人工悬浮培养的发菜胞外多糖对小鼠非特异性及特异性免疫能力的影响. 体内实验表明: 50~100 mg/(kg·d)的发菜胞外多糖能够显著提高小鼠单核巨噬细胞吞噬碳粒的能力和NK细胞的自然杀伤活性($P < 0.05$), 并呈现剂量依赖性, 同时, 发菜胞外多糖能在一定程度上提高腹腔巨噬细胞的吞噬能力, 起到提高机体非特异性免疫水平的作用. 与空白组相比, 高、低剂量的发菜胞外多糖对小鼠脏器指数、二硝基氟苯诱导的迟发型超敏反应(DTH)、脾淋巴细胞的增殖均无显著性影响, 表明人工培养发菜胞外多糖对小鼠特异性免疫系统无显著性效果.

关键词: 发菜; 胞外多糖; NK细胞; DTH; 非特异性免疫; 脾淋巴细胞

中图分类号: R979.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2014)04-0016-05

Effect of Extracellular Polysaccharide from Liquid-cultured *Nostoc flagelliforme* on the Immune Abilities of Mice

HOU Maoxia, DAI Yujie, FU Honglei, YUE Lifang, MAN Shuli
(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The effect of extracellular polysaccharides (EPS) from liquid-cultured *Nostoc flagelliforme* on the specific and non-specific immune abilities of mice has been investigated. It was found that the phagocytic index of carbon granular clearance and the activity of NK cells increased significantly ($P < 0.05$) in a dosage dependent manner in the range of 50-100 mg/(kg·d). The phagocytic ability of the peritoneal macrophages was also improved to some extent. All this indicated EPS could promote the non-specific immunity effectively. The organism indexes in mice, the delayed-type hypersensitivity (DTH) induced by dinitrofluorobenzene and the proliferation of lymphocytes in the low and high doses of EPS showed no significant difference compared with those of the control group, which suggested that EPS from liquid-cultured *Nostoc flagelliforme* has a little effect on the specific immune abilities of mice.

Key words: *Nostoc flagelliforme*; EPS; NK cell; DTH; non-specific immunity; splenic lymphocytes

发菜(又称发状念珠藻)为生长于干旱半干旱地区的珍稀陆生蓝藻,在我国主要产于西北部的宁夏、甘肃和内蒙古等地区,它能分泌一种黏性物质于胞外形成胶质鞘将细胞包裹起来,胶质鞘主要成分为胞外多糖,起到保水和防紫外线等作用.研究发现发菜多糖具有抗单纯性疱疹病毒、人巨细胞病毒和甲型流感病毒等包膜病毒的活性^[1-2],同时发菜胞外多糖能清除多种自由基,其中对羟自由基具有很强的清除作用^[3-4].但由于野生发菜为国家一级保护植物,使发菜及其多糖应用受到限制.

近年来研究发现,可通过人工液体悬浮培养方法培养发菜细胞,人工培养的发菜细胞会将胞外多糖分泌到培养液中^[1],因此,发菜细胞人工液体培养过程中可从培养液获得胞外多糖. Jia 等^[5]研究发现人工培养发菜多糖具有与野生发菜多糖相近的结构和组成,人工培养发菜胞外多糖的相对分子质量可达 2.7×10^5 ,其单糖组成主要为葡萄糖(43.2%)、木糖(20.6%)、半乳糖(29.9%)、甘露糖(6.3%). Han 等^[6]证实人工培养发菜多糖具有较好的乳化性、絮凝性和较高的黏度,并且具有更复杂的单糖组成.对于人工培

收稿日期: 2013-12-01; 修回日期: 2014-03-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31271809)

作者简介: 侯茂霞(1989—),女,四川人,硕士研究生;通信作者: 戴玉杰,教授, yjdai@126.com.

养发菜多糖与野生发菜多糖生物活性的比较也有一些报道^[7].但发菜多糖免疫调节活性的研究及报道不多.本文通过研究发菜胞外多糖对小鼠巨噬细胞、NK细胞和脾淋巴细胞增殖以及迟发型超敏反应(DHT)的影响,探讨人工培养发菜胞外多糖对小鼠非特异性免疫和特异性免疫系统的调节作用.

1 材料与方法

1.1 实验试剂

印度墨汁,天津市轩昂科工贸有限公司试剂分公司;二硝基氟苯(DNFB)、刀豆蛋白(ConA)、脂多糖(LPS),北京索来宝公司;CCK-8,日本同仁化学研究所;其他试剂均为分析纯.

1.2 实验动物及分组情况

BALB/c小鼠,SPF级,雄性,体质量为18~20g,购自中国食品药品检定研究院,许可证号SCXK(京)2009-0017.将小鼠随机分为3组,每组12只,分别为空白组、发菜多糖50mg/(kg·d)剂量组即低剂量组、发菜多糖100mg/(kg·d)剂量组即高剂量组,饲养于天津科技大学食品学院动物房(温度20~25℃、相对湿度(50±5)%).

1.3 发菜胞外多糖的制备

发菜细胞人工培养20d后,培养液使用截流相对分子质量为10000的超滤膜浓缩.浓缩液在4000r/min离心10min后得上清液.向上清液中加入4倍体积的无水乙醇,使乙醇体积分数为80%,4℃过夜,使用sevag法^[8]反复除蛋白7次后,将多糖冷冻干燥,最后得到发菜胞外多糖(使用苯酚-硫酸法测得其多糖含量为73%).

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠单核巨噬细胞吞噬能力的测定

小鼠灌胃14d后,以0.01mL/g(相对于体质量)的剂量尾静脉注射稀释后的印度墨汁($V(\text{生理盐水}):V(\text{印度墨汁})=4:1$),分别在2min和10min时于内眦静脉丛取血20μL,立即将其加入到2mL质量分数为0.1%的 Na_2CO_3 溶液中并将其混匀,于600nm下测定其吸光度^[9].最后将小鼠断颈处死,取肝脏、胸腺和脾脏用0℃生理盐水漂洗,滤纸吸干,称质量,根据式(1)计算小鼠脏器指数.

$$\text{脏器指数} = \frac{\text{脏器质量 (mg)}}{\text{体质量 (g)}} \quad (1)$$

单核巨噬细胞的吞噬指数 K 及廓清指数 α (校正吞噬指数)分别按式(2)和式(3)进行计算.

$$K = \frac{\lg A_1 - \lg A_2}{\Delta t} \quad (2)$$

$$\alpha = \frac{m_1 \times 3\sqrt{K}}{m_2 + m_3} \quad (3)$$

式中: A_1 、 A_2 分别为在时间 t_1 、 t_2 时刻所取血样对应的吸光度; Δt 为两次取血样的时间差; m_1 为体质量,g; m_2 、 m_3 分别为肝质量和脾质量,g.

1.4.2 腹腔巨噬细胞吞噬中性红的测定

实验前,连续3d向每只小鼠腹腔内无菌注射5%可溶性淀粉1mL.第4天断颈处死,每只注入5mL37℃预温的PBS,轻揉小鼠腹部5min后收集腹腔液.用RPMI1640不完全培养基洗涤从腹腔液中获得细胞2次(1000r/min离心10min)^[10].用RPMI1640完全培养基调整细胞浓度至 $6 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,于96孔板内接入巨噬细胞悬液每孔100μL,置于体积分数为5% CO_2 培养箱内37℃培养3h.显微镜观察细胞贴壁后,倾去培养液,用37℃预温的PBS洗涤2次除去未贴壁细胞.每孔加入0.73mg/mL中性红培养液200μL,继续培养1h.弃去培养液,用37℃预温的PBS洗涤3~4次,将过量的中性红洗干净.加细胞裂解液($V(\text{乙醇}):V(\text{冰乙酸})=1:1$)每孔100μL,混匀后4℃过夜,使用酶标仪测定540nm处的吸光度,腹腔巨噬细胞吞噬指数为实验组与空白组在540nm处吸光度的比值.

1.4.3 NK细胞自然杀伤活性的测定

末次给药24h后,将小鼠断颈处死,按照Ye等的方法^[11]并稍加改进后制备脾细胞悬液.方法如下:无菌取脾,用注射器的活塞将脾脏制成单个细胞过100目筛网,再加入红细胞裂解液Tris- NH_4Cl (0.15mol/L NH_4Cl ,pH为7.4)裂解红细胞5~10min,待红细胞完全裂解后,用RPMI1640培养基洗涤细胞(1500r/min离心5min),弃去上清液.将离心后得到的细胞用RPMI1640不完全培养液洗2~3次(1500r/min离心5min).用完全培养基将细胞调至适当的浓度.

实验前24h将靶细胞YAC-1进行传代培养,应用前以Hank's液洗3次,用完全培养液调整细胞浓度为 $1.5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,脾细胞的浓度为 $7.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$,使效靶比为50:1.反应孔分别加入靶细胞和效应细胞悬浮液各100μL,自然释放孔分别加入靶细胞悬浮液和培养液各100μL,最大释放孔分别加入靶细胞悬浮液和1%NP-40各100μL,每组设3个复孔,培养4h后离心(1500r/min离心5min),取上清液100μL,同时加入LDH基质液100μL,反应3min后

每孔加入 1 mol/L 的 HCl 溶液 30 μL, 用酶标仪于 490 nm 测定吸光度^[12]. NK 细胞杀伤百分比按式(4)进行计算.

$$\text{杀伤百分比} = \frac{A_{\text{反应孔}} - A_{\text{自然释放孔}}}{A_{\text{最大释放孔}} - A_{\text{自然释放孔}}} \times 100\% \quad (4)$$

1.4.4 脾细胞增殖的测定

脾细胞悬浮液的制备参照 1.4.3, 调整每只老鼠的脾细胞悬液, 使细胞浓度为 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 每个孔加入 180 μL 脾细胞悬液和 20 μL 的刺激物 (50 μg/mL 的 ConA 溶液或 100 μg/mL 的 LPS 溶液), 每个实验设 3 个复孔, 培养 72 h 后加入 CCK-8 试剂 20 μL, 显色 4 h 后, 用酶标仪在 490 nm 下测定其吸光度^[13]. 刺激指数为实验组与空白组在 490 nm 处吸光度的比值.

1.4.5 DNFB 诱导小鼠迟发型超敏反应的测定

小鼠灌胃第 9 天, 用硫化钡脱去腹部的毛 (范围约为 3 cm × 3 cm), 再用 50 μL 10 g/L DNFB 溶液 (溶剂为丙酮麻油) 均匀涂抹致敏. 5 d 后, 用 DNFB 溶液 10 μL 均匀涂抹于小鼠右耳 (两面) 进行攻击. 攻击

24 h 后断颈处死, 剪下左右耳壳. 用打孔器取下直径 7 mm 的耳片, 称量后计算左右耳质量差^[14], 以此表示小鼠耳肿胀程度.

1.5 数据处理

数据以“平均值 ± 标准差”的形式表示, 采用 SPSS 19 软件对数据进行显著性分析.

2 结果与讨论

2.1 发菜胞外多糖对小鼠体质量及脏器指数的影响

发菜胞外多糖对小鼠体质量及脏器指数的影响见表 1. 小鼠灌胃发菜胞外多糖期间体质量稳定增长, 说明发菜胞外多糖对小鼠无毒副作用. 灌胃两周后实验组的脏器指数较空白组均有一定的变化, 其中脾指数和肝脏指数均有一定程度的增加, 高剂量组的发菜胞外多糖能使小鼠胸腺指数有所增加, 但较空白组均无显著性差异. 说明发菜胞外多糖对小鼠组织器官没有毒害作用.

表 1 发菜胞外多糖对小鼠体质量及脏器指数的影响 (n = 6)

Tab. 1 Effect of extracellular polysaccharide of *N. flagelliforme* on the body weight and organ indexes of mice (n = 6)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	体质量/g		脏器指数/(mg·g ⁻¹)		
		0 d	14 d	脾	胸腺	肝脏
空白组	0	22.3 ± 1.32	24.37 ± 2.09	4.63 ± 0.71	1.13 ± 0.26	53.22 ± 4.20
低剂量组	50	22.2 ± 2.15	24.90 ± 1.34	5.46 ± 1.03	0.94 ± 0.09	57.08 ± 4.32
高剂量组	100	22.4 ± 2.18	24.02 ± 2.72	4.91 ± 0.43	1.23 ± 0.13	55.40 ± 4.16

2.2 发菜胞外多糖对小鼠单核巨噬细胞吞噬能力的影响

单核巨噬细胞的廓清指数 α 能够反映它的吞噬能力; 廓清指数 α 值越大, 单核巨噬细胞的吞噬能力越强. 发菜胞外多糖对小鼠单核巨噬细胞吞噬能力的影响见表 2.

表 2 发菜胞外多糖对小鼠单核巨噬细胞吞噬能力的影响 (n = 6)

Tab. 2 Effect of extracellular polysaccharide of *N. flagelliforme* on the phagocytotic ability of mononuclear phagocyte (n = 6)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	廓清指数 α
空白组	0	5.57 ± 0.32
低剂量组	50	6.38 ± 0.60*
高剂量组	100	6.52 ± 0.58**

注: *表示实验组与空白组有显著性差异 (P < 0.05); **表示实验组与空白组有极显著性差异 (P < 0.01).

由表 2 可知: 实验组的廓清指数 α 均比空白组的

高, 低剂量组与空白组有显著性差异 (P < 0.05), 高剂量组与空白组具有极显著性的差异 (P < 0.01). 这说明发菜胞外多糖能极显著增加小鼠单核巨噬细胞的吞噬能力.

2.3 发菜胞外多糖对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力的影响

巨噬细胞是重要的免疫细胞, 具有多种免疫功能, 如吞噬外来的小颗粒物质、呈递抗原、分泌细胞因子等. 一般情况下巨噬细胞处于休眠状态, 其吞噬能力很弱, 当受到一些免疫增强剂激活以后, 巨噬细胞能够抑制肿瘤细胞的生长及转移, 表现出更强的杀菌、溶癌、吞噬及胞饮能力^[15]. 发菜胞外多糖对正常小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力的影响如图 1 所示. 由图 1 可知: 与空白组相比, 高剂量组的发菜胞外多糖使腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力增强了 20% 左右, 低剂量组对巨噬细胞的吞噬能力无显著性影响. 这说明发菜胞外多糖能在一定程度上增强腹腔巨噬细胞的吞噬能力.

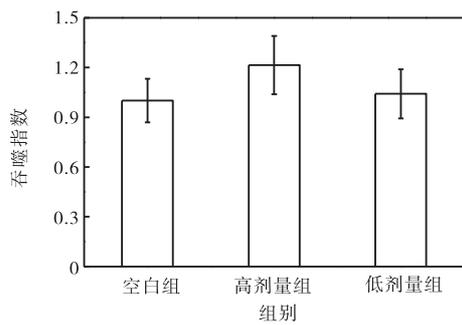
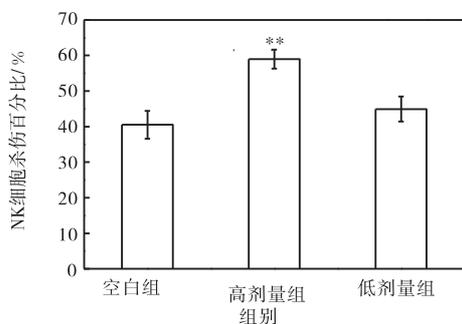


图1 发菜胞外多糖对正常小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力的影响 ($n=6$)

Fig. 1 Effect of extracellular polysaccharide of *N. flagelliforme* on the peritoneal macrophage neutral red (NR) ($n=6$)

2.4 发菜胞外多糖对小鼠 NK 细胞自然杀伤活性的影响

NK 细胞为机体非特异性免疫细胞,具有抗感染和抗肿瘤的作用,被激活后可以分泌多种细胞因子.它是通过识别靶细胞上相应活化受体和抑制性受体的配体而区分正常和异常(受到感染或发生恶性转化)的细胞,发挥其免疫监视作用.发菜胞外多糖对正常小鼠NK细胞自然杀伤活性的影响如图2所示.



**表示实验组与空白组有极显著差异 ($P<0.01$)

图2 发菜胞外多糖对正常小鼠 NK 细胞自然杀伤活性的影响 ($n=6$)

Fig. 2 Effect of extracellular polysaccharide of *N. flagelliforme* on NK cell activity ($n=6$)

由图 2 可知:高、低剂量的发菜胞外多糖均能增加小鼠 NK 细胞的自然杀伤活性,其中高剂量组多糖能极显著增加 NK 细胞的自然杀伤活性 ($P<0.01$).这说明发菜胞外多糖能够增强小鼠 NK 细胞的自然杀伤活性,从而提高小鼠非特异性免疫能力.

2.5 发菜胞外多糖对小鼠脾细胞增殖的影响

脾脏是机体最大的免疫器官,脾脏中含 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞,均为机体的特异性免疫细胞,脾细胞增殖情况可以反映 T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞的

免疫能力^[16].发菜胞外多糖对脾细胞增殖的影响如图 3 所示.

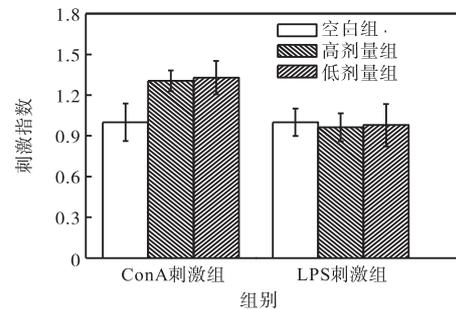


图3 发菜胞外多糖对脾细胞增殖的影响 ($n=6$)

Fig. 3 Effect of *N. flagelliforme* extracellular polysaccharide on the spleen cell proliferation of mice ($n=6$)

由图 3 可知:高、低剂量组的发菜胞外多糖对丝裂原 ConA 刺激的 T 淋巴细胞的增殖均有一定的促进作用,但是效果不显著.对 LPS 刺激的 B 淋巴细胞的增殖无影响.这说明多糖对丝裂原 ConA 的诱导产生了正效应,而对丝裂原 LPS 的诱导基本没有反应.发菜胞外多糖对小鼠的脾质量也有一定的增加,这有可能与多糖能一定程度刺激 T 淋巴细胞的分化有关.

2.6 发菜胞外多糖对 DNFB 诱导的小鼠迟发型超敏反应(DTH)的影响

DTH 是由 T 淋巴细胞介导的超敏反应. DNFB 是一种半抗原,当与皮肤蛋白接触后形成完全抗原,完全抗原能够刺激 T 淋巴细胞的活化.当 DNFB 涂在小鼠右耳时,由迟发型超敏反应(DTH)引起的小鼠耳肿胀会持续 4~7 d,耳肿胀程度可以反映迟发型超敏反应的程度.由表 3 可知,与空白组相比低剂量组的耳肿胀程度无显著变化,高剂量组的多糖能在一定程度上增强小鼠的耳肿胀程度.这说明多糖能在一定程度上增加小鼠免疫能力.

表 3 发菜胞外多糖对小鼠迟发型超敏反应的影响 ($n=6$)

Tab. 3 Effect of extracellular polysaccharide of *N. flagelliforme* on the delay-type hypersensitivity of mice ($n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	耳肿胀程度/g
空白组	0	0.005 9 ± 0.000 9
低剂量组	50	0.005 6 ± 0.003 5
高剂量组	100	0.007 2 ± 0.002 3

3 结 论

人工培养的发菜胞外多糖对小鼠 DTH 和脾细胞

增殖没有显著性的影响,说明发菜胞外多糖不能直接通过作用于机体的特异性免疫系统来增强机体的免疫能力.但它能通过作用于小鼠单核巨噬细胞、腹腔巨噬细胞和NK细胞来提高机体非特异性免疫水平,从而起到增强机体免疫能力的作用.这为发菜胞外多糖作为一种功能性食品的进一步开发利用提供了一定的理论依据.

参考文献:

- [1] Kanekiyo K, Lee J B, Hayashi K, et al. Isolation of an antiviral polysaccharide, nostoflan, from a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*[J]. *Journal of Natural Products*, 2005, 68(7): 1037-1041.
- [2] Kanekiyo K, Hayashi K, Lee J B, et al. Structure and antiviral activity of an acidic polysaccharide from an edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*[J]. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 2008, 128(5): 725-731.
- [3] 陈雪峰, 李一当, 贾士儒. 发菜多糖的提取、纯化鉴定及理化特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(10): 174-177.
- [4] 汤俊, 胡征宇. 3种念珠藻多糖对自由基的清除作用[J]. *武汉植物学研究*, 2006, 24(1): 63-66.
- [5] Jia S, Yu H, Lin Y, et al. Characterization of extracellular polysaccharides from *Nostoc flagelliforme* cells in liquid suspension culture[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2007, 12(3): 271-275.
- [6] Han P, Sun Y, Wu X, et al. Emulsifying, flocculating, and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(1): 36-49.
- [7] 姚瑾, 贾士儒, 岳思君, 等. 发菜及其提取物清除自由基的作用[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(3): 45-48.
- [8] Staub A M. Removal of protein-Sevag method[J]. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1965, 5(2): 5-6.
- [9] Yang X, Guo D, Zhang J, et al. Characterization and anti-tumor activity of pollen polysaccharide[J]. *International Immunopharmacology*, 2007, 7(3): 401-408.
- [10] Weeks B A, Keisler A S, Myrvik Q N, et al. Differential uptake of neutral red by macrophages from three species of estuarine fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1987, 11(1): 117-124.
- [11] Ye L B, Zheng X, Zhang J, et al. Biochemical characterization of a proteoglycan complex from an edible mushroom *Ganoderma lucidum* fruiting bodies and its immunoregulatory activity[J]. *Food Research International*, 2011, 44(1): 367-372.
- [12] 陈成章. 免疫毒理学[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2008: 440-441.
- [13] Li J, Ji L, Sun L, et al. Differential uptake of neutral red by macrophages from three species of estuarine fish[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(1): 551-556.
- [14] Huang S, Ning Z. Extraction of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immune enhancement activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47(3): 336-341.
- [15] Fishman M, Gunther G. Induction of tumor cell resistance to macrophage-mediated lysis by preexposure to non-activated macrophages[J]. *Cellular Immunology*, 1986, 99(1): 241-256.
- [16] Yang T, Jia M, Meng J, et al. Immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from *Angelica sinensis*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2006, 39(4/5): 179-184.

责任编辑: 周建军