

褐藻胶的酶法降解及其产物的体外免疫活性

章倩, 戚慧敏, 卞斌, 马俊美, 赖晨欢, 黄曹兴, 凌喆, 勇强*
(南京林业大学 江苏省林业资源高效加工利用协同创新中心, 江苏 南京 210037)

摘要: 本研究以褐藻胶为底物, 探究其在褐藻胶酶法降解过程中的分子质量变化以及酶法降解制备褐藻胶低聚糖的工艺参数, 并在此基础上, 评价了不同分子质量褐藻胶酶解产物的体外免疫活性。结果表明, 褐藻胶经褐藻胶裂解酶降解后分子质量显著下降, 通过乙醇分级分离可获得3种不同分子质量的降解产物, 其重均分子质量分别为13.4、5.73 kDa和3.85 kDa。单因素试验优化获得酶法制备褐藻胶低聚糖的最适工艺参数为pH 7.0、褐藻胶裂解酶用量15 U/g (底物质量计)、酶解时间24 h, 此时, 褐藻胶低聚糖得率为28.05%。利用小鼠巨噬细胞模型对褐藻胶及其3种分子质量降解产物的体外免疫活性进行评价, 发现褐藻胶及其酶解产物均具有一定的免疫增强活性, 且重均分子质量为5.73 kDa的酶解组分免疫增强活性最好, 优于褐藻胶低聚糖。同时, 通过添加巨噬细胞受体蛋白Toll样受体4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 的阻断剂 (TAK-242), 验证了褐藻胶酶解产物通过诱导巨噬细胞TLR4的分泌, 引起级联反应, 增加NO、肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素6的分泌, 从而调节巨噬细胞免疫活性。研究结果可为褐藻胶高值化利用提供理论依据。

关键词: 褐藻胶低聚糖; 免疫活性; 分子质量; 褐藻胶酶解产物; 细胞因子

Enzymatic Degradation of Alginate and *in Vitro* Immunological Activity of Its Degraded Products

ZHANG Qian, QI Huimin, BIAN Bin, MA Junmei, LAI Chenhuan, HUANG Caoxing, LING Zhe, YONG Qiang*
(Jiangsu Co-innovation Center of Efficient Processing and Utilization of Forest Resources,
Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: In this study, changes in the molecular mass of alginate were investigated during its enzymatic degradation and the processing parameters for the enzymatic preparation of alginate oligosaccharides were explored. Furthermore, the *in vitro* immunological activity of degraded products with different molecular mass was evaluated. The results showed that the molecular mass of alginate decreased significantly after degradation by alginate lyase, and three degradation products with different molecular mass were obtained through gradient ethanol fractionation. Their weight-average molecular masses were 13.4, 5.73 and 3.85 kDa, respectively. Using single factor experiments, the optimal processing parameters were determined as pH 7.0, alginate lyase dosage 15 U/g substrate, and hydrolysis time 24 h, giving a yield of 28.05%. All alginate and its degraded products had immunoenhancing activity in mouse macrophages, and among them, the effect of the product with a weight-average molecular mass of 5.73 kDa was most pronounced and more pronounced than that of alginate oligosaccharides. By adding TAK-242, a blocker of macrophage Toll-like receptor 4 (TLR4), it was verified that the degraded products of alginate regulated macrophage immune activity by inducing the secretion of TLR4 and consequently causing cascade reactions to increase the secretion of NO, TNF- α and IL-6. These results can provide a theoretical basis for the high-value utilization of alginate.

Keywords: alginate oligosaccharides; immunological activity; molecular mass; enzymatic hydrolysis products of alginate; cytokines

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230430-290

中图分类号: TS201.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0089-08

引文格式:

章倩, 戚慧敏, 卞斌, 等. 褐藻胶的酶法降解及其产物的体外免疫活性[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 89-96. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230430-290. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-04-30

基金项目: “十四五”国家重点研发计划重点专项 (2022YFD2200804)

第一作者简介: 章倩 (1998—) (ORCID: 0009-0001-1248-5637), 女, 硕士, 研究方向为生物化工。E-mail: zq0424@njfu.edu.cn

*通信作者简介: 勇强 (1968—) (ORCID: 0000-0001-8527-2205), 男, 教授, 博士, 研究方向为木质纤维生物炼制。

E-mail: swhx@njfu.com.cn

ZHANG Qian, QI Huiming, BIAN Bin, et al. Enzymatic degradation of alginate and *in vitro* immunological activity of its degraded products[J]. Food Science, 2024, 45(2): 89-96. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230430-290. <http://www.spkx.net.cn>

褐藻胶低聚糖 (alginate oligosaccharides, AOS) 是由 α -L-古罗糖醛酸与 β -D-甘露糖醛酸通过 β -1,4糖苷键连接而成的聚合度为2~20的嵌段化合物^[1]。AOS由于具有安全无毒、分子质量小和水溶性好等优点^[2], 越来越受到人们的关注。AOS的制备方法主要有氧化降解法、酸降解法和褐藻胶裂解酶降解法等, 其中酶法降解因条件温和、产物聚合度可控性较强和褐藻胶降解效率高等优点, 逐渐成为制备AOS的主要方法^[3]。目前, 酶法制备AOS是利用褐藻胶裂解酶的 β -(1,4)-消除反应对褐藻胶进行降解^[4], 并在非还原端产生不饱和双键^[5]; 同时, 不饱和褐藻胶降解产物在非酶作用下继续转化为4-脱氧-L-赤-5-己酮糖糖醛酸^[6]。由于褐藻胶裂解酶对褐藻胶主链的降解作用是随机的, 因而同时产生分子质量不等的褐藻胶降解产物, 但酶法降解过程中不同分子质量降解产物的得率变化目前鲜有文献报道。

AOS具有丰富的生理活性, 如免疫调节、抗肿瘤^[7]和抗氧化^[8]等, 将海藻多糖转化为高活性的海藻低聚糖是海藻资源精深加工的重要研究方向之一。有研究表明, AOS的生理活性与其制备方式、 β -D-甘露糖醛酸与 α -L-古罗糖醛酸比例^[9]等相关, 且AOS分子质量可能是影响其活性的重要因素。AOS被证实可通过促进RAW264.7巨噬细胞中诱导型一氧化氮合酶的表达从而诱导NO的生成, 并促进多种免疫细胞因子的分泌, 进而提高宿主免疫水平^[10]。研究证明AOS分子构象和分子质量可能是影响其诱导细胞因子活性的重要因素, 然而, 关于不同分子质量褐藻胶降解产物的免疫活性鲜见系统研究^[11]。

本研究采用商品褐藻胶裂解酶对褐藻胶进行降解, 利用乙醇沉淀法对其不同分子质量的酶解产物进行分级分离, 并通过单因素试验优化酶法制备AOS的工艺参数。同时, 分析酶解过程中不同分子质量降解产物得率的变化情况。最后, 在巨噬细胞体外模型上进行不同分子质量酶降解产物的免疫活性评价, 以期酶法降解褐藻胶的工艺研究以及褐藻胶降解产物的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

商品褐藻胶、商品褐藻胶裂解酶 (酶活力10 000 units/g) 上海麦克林生化科技有限公司。

小鼠巨噬细胞RAW264.7 中国科学院上海生物科学研究所; DMEM培养基、胎牛血清、磷酸

盐缓冲液、胰酶 美国Hyclone公司; 细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、链霉素、青霉素、二甲基亚砜 美国Sigma-Aldrich公司; 细胞计数试剂盒 (CCK-8)、一氧化氮检测试剂盒 上海碧云天生物公司; 小鼠白介素6 (interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒浙江联科生物公司; 小鼠Toll样受体4 (Toll-like receptor 4, TLR4) ELISA试剂盒 江苏酶标生物科技有限公司; TAK-242 美国MedChemExpress LLC公司; 乙酸铵、氢氧化钠、盐酸、四硼酸钠、唑啉等其他常规试剂 (均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司。

DMEM完全培养基: 向基础培养基中添加胎牛血清 (10%, *V/V*)、链霉素 (100 units/mL) 和青霉素 (100 units/mL), 配成完全培养基; DMEM基础培养基: 将褐藻胶酶解产物固体粉末溶解于DMEM基础培养基中, 配制成40 g/L的母液, 并利用0.22 μ m孔径的无菌滤膜过滤除菌, 保存于无菌离心管。并在开始实验前用完全培养基将40 mg/mL的母液稀释至所需质量浓度。

1.2 仪器与设备

ICS 5000高效液相离子交换色谱 美国Dionex公司; 1100凝胶渗透色谱 美国沃特世公司; UV-1800紫外分光光度计 德国Agilent公司; 多功能酶标仪 美国BioTek公司。

1.3 方法

1.3.1 褐藻胶酶解

于100 mL酶解瓶中, 采用0.05 mol/L醋酸铵缓冲液配制50 mL 10 g/L褐藻胶分散液, 并加入适量固体的褐藻胶裂解酶粉末后, 置于45 $^{\circ}$ C、150 r/min摇床中酶解。分别研究pH值 (5.0、6.0、7.0、8.0和9.0)、酶用量 (10、15、20、25 U/g和30 U/g (以底物质量计)) 和酶解时间 (3、6、12、24 h和48 h) 对AOS得率的影响。

1.3.2 褐藻胶酶解产物的分级分离

对褐藻胶酶解液采用分级醇沉法进行处理, 其操作如下: 将无水乙醇添加至商品褐藻胶酶解液中直至其终体积分数为50%, 均匀混合后静置10 000 r/min离心5 min, 得到的沉淀标记为SA50组分; 向上清液中继续添加无水乙醇直至其终体积分数为75%, 均匀混合后静置离心, 得到的沉淀标记为SA75组分。AOS仍溶解于上清液中, 采用真空蒸发除去乙醇, 冷冻干燥后称质量, 得到AOS组分。将上述所得的褐藻胶酶解产物 (SA50、SA75和AOS) 用去离子水复溶, 并进行透析处理 (截留

分子质量为200 Da), 每4 h更换新鲜的去离子水。透析后所得样品溶液于冷冻干燥后密封保存。

1.3.3 细胞培养与传代

细胞复苏: 将冻存有细胞的冻存管置于37 °C下轻轻摇晃使其迅速融化, 于无菌环境将细胞悬液转移至15 mL离心管中, 加入10 mL DMEM基础培养基使其混匀后于1 000 r/min离心5 min, 去除上清液, 并于离心管中加入2 mL DMEM完全培养基将细胞沉淀复悬, 最终将其转移至含有8 mL完全培养基的细胞培养皿中, 于饱和湿度、5% CO₂、37 °C的培养箱中静置培养。第2天更换新配制的完全培养基继续培养。

细胞传代: 当细胞生长约占培养皿底面积80%时进行传代培养。首先去除旧培养液, 用磷酸盐缓冲液冲洗细胞表面2次; 然后加入1 mL的胰酶消化液, 并摇晃使其完全浸润贴壁细胞, 在培养箱中消化1 min; 随后加入5 mL新配制的DMEM基础培养基终止消化, 并轻轻敲打培养皿底部的贴壁细胞, 使其混匀成细胞悬液。将其转移至离心管中1 000 r/min离心5 min, 弃去上清液, 并轻轻拍打离心沉淀后加入3 mL新鲜的DMEM完全培养基, 并使其形成细胞悬液, 然后取1 mL至含有9 mL新鲜的DMEM完全培养基的细胞培养皿中, 置于培养箱中培养。

1.3.4 褐藻胶酶解产物处理后RAW264.7细胞增殖能力测定

采用CCK-8试剂盒测定^[12]。首先通过血球计数器计算细胞液的细胞密度, 并调节细胞液的细胞密度为1×10⁵个/mL, 并以100 μL/孔添加到96孔板中, 培养24 h后吸去细胞液, 并加入100 μL用新鲜培养基配成不同质量浓度(25、50、100、200、400、800 μg/mL)待测样品继续培养24 h, 同时设置1 μg/mL LPS作为阳性对照, 以完全培养基培养的细胞为阴性对照。最后, 吸取培养基后在每个孔中添加100 μL稀释10倍的CCK-8试剂, 并在37 °C和5% CO₂环境下孵育1 h。用酶标仪检测在450 nm波长处的吸光度(A), 用以定量细胞存活的程度。细胞活力按式(1)计算:

$$\text{细胞活力}/\% = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.5 褐藻胶酶解产物处理后RAW264.7细胞NO分泌量测定

根据Griess反应中亚硝酸盐的含量^[13], 研究褐藻胶酶解产物对RAW264.7细胞分泌NO的影响。首先, 将100 μL对数生长期的RAW264.7细胞(1×10⁵个/mL)接种至96孔板并培养24 h。移去培养液后加入含有不同质量浓度(25~800 μg/mL)样品的新鲜培养基100 μL, 同时设置1 μg/mL的LPS作为阳性对照, 以完全培养基培养的细胞为阴性对照。继续培养24 h后, 取培养上清液50 μL至新96孔板, 并于避光条件下加入100 μL Griess混

合溶液(Griess I试剂与Griess II试剂体积比1:1混合), 反应15 min后用酶标仪测定540 nm波长处的吸光度。NO标准曲线: 先用DMEM培养基配制浓度为0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μmol/L的NaNO₂标准品溶液, 按上述操作测定吸光度并绘制标准曲线, 根据标准曲线方程计算细胞上清液中NO浓度。

1.3.6 褐藻胶酶解产物处理后RAW264.7细胞细胞因子分泌量测定

使用ELISA试剂盒研究褐藻胶酶解产物对RAW264.7细胞分泌TNF-α、IL-6和TLR4含量的影响。首先, 将100 μL对数生长期的RAW264.7细胞(1×10⁵个/mL)接种至96孔板培养24 h。吸去细胞液后加入含有不同质量浓度(200、400、800 μg/mL)样品的新鲜培养基100 μL, 以1 μg/mL的LPS和完全培养基培养的细胞作为阳性对照和阴性对照。培养箱培养24 h后, 培养液离心收集上清液, 按照ELISA试剂盒说明书测定细胞因子TNF-α、IL-6和TLR4的含量。

1.3.7 TAK-242处理后RAW264.7细胞活力测定

将100 μL对数生长期的RAW264.7细胞(1×10⁵个/mL)接种至96孔板, 培养24 h。除去培养液后, 加入100 μL含有不同浓度TAK-242(0.5~64 μmol/L)的新鲜基础培养基。并用无TAK-242的基础培养基作为对照。培养4 h后使用CCK-8试剂盒分析细胞存活率以确定不同浓度TAK-242对细胞的毒性, 所有实验均为3个平行。

1.3.8 TAK-242处理后褐藻胶酶解产物刺激RAW264.7细胞分泌NO和细胞因子水平测定

将100 μL对数生长期的RAW264.7细胞(1×10⁵个/mL)接种至96孔板, 培养24 h。除去培养基后, 将添加和不添加TAK-242(8 μmol/L)的新鲜完全培养基添加至孔板中, 培养4 h; 再用褐藻胶酶解产物不同组分(800 μg/mL)和阳性对照LPS(1 μg/mL)培养24 h。根据1.3.5节和1.3.6节方法测定NO、TNF-α、IL-6和TLR4的含量。

1.3.9 理化指标分析

1.3.9.1 单糖的定量分析

β-D-甘露糖醛酸与α-L-古罗糖醛酸采用DINOX ICS-5000型高效液相阴离子交换色谱分析, 外标法测定。色谱条件: Carbo Pac PA10色谱柱(孔径×长=2 mm×250 mm), 进样量10 μL, 以100 mmol/L氢氧化钠(A)和500 mmol/L醋酸钠(B)为流动相进行梯度洗脱, 柱温为30 °C, 流速为0.3 mL/min, 脉冲安培检测器检测^[14]。

1.3.9.2 褐藻胶酶解产物的定量分析

在褐藻胶酶解产物分级分离的基础上, 将上述所得的褐藻胶酶解产物(SA50、SA75和AOS)配成5 g/L溶

液, 利用吡啶-硫酸法^[15]测定其中糖醛酸含量。在冰浴条件下先后向具塞试管中加入0.5 mL样品溶液和2.5 mL四硼酸钠-硫酸溶液, 充分混匀后, 煮沸15 min。冰浴冷却后, 加入100 μ L吡啶煮沸15 min。反应结束后, 用紫外分光光度计检测530 nm波长处的吸光度。标准曲线绘制: 准确配制不同质量浓度(0、0.02、0.04、0.06、0.08 g/L和0.10 g/L)的标准甘露糖醛酸和古罗糖醛酸溶液0.5 mL, 冰浴条件下按上述操作测量吸光度, 以醛酸质量浓度(g/L)为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。并根据1.3.9.1节方法测定样品中单糖含量。褐藻胶降解产物得率和单糖得率(游离的糖醛酸)按式(2)计算:

$$\text{褐藻胶降解产物得率/\%} = \frac{\rho_a - \rho_b}{\rho_g} \times 100 \quad (2)$$

式中: ρ_a 为褐藻胶酶解产物的糖醛酸质量浓度/(g/L); ρ_b 为褐藻胶酶解产物的单糖质量浓度/(g/L); ρ_g 为商品SA中的糖醛酸质量浓度/(g/L)。

1.3.9.3 重均分子质量和聚合度分析

采用高效凝胶渗透色谱法检测并分析3个褐藻胶酶解产物组分的平均分子质量。其操作条件如下: Agilent 1200型色谱仪(配有示差检测器); Ultrahydrogel 120和Ultrahydrogel 250串联; 柱温55 $^{\circ}$ C; 流动相NaNO₃; 进样量10 μ L; 流速0.6 mL/min。采用Chemstation色谱工作站和GPC软件计算分子质量; 在此基础上, 采用数均分子质量除以褐藻胶单糖组成的摩尔质量, 用于计算其平均聚合度。

1.4 数据分析

使用SPSS(2008)统计软件(适用于Windows 16.0版本)通过方差分析(ANOVA)分析数据。使用Tukey多范围检验区分各组之间的差异显著性。 $P < 0.05$, 数据具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 褐藻胶酶解产物的分子质量分析

为分析经裂解酶处理后褐藻胶降解产物的分子质量变化情况, 以10 g/L褐藻胶为底物, 45 $^{\circ}$ C、pH 7.0、酶用量10 U/g条件下反应24 h, 并采用乙醇分级分离方法对酶解液进行处理, 获得3个褐藻胶降解产物组分(SA50、SA75和AOS)。商品褐藻胶和3种褐藻胶酶解产物组分的凝胶排阻色谱图、重均分子质量和平均聚合度如图1所示。褐藻胶原料以及3种褐藻胶酶解产物组分的信号峰都呈现典型的正态分布, 说明褐藻胶和分级醇沉得到的3种组分的分子质量相对均一且纯度较高。根据各个组分的出峰时间可推断, 3种组分的相对分子质量均远小于商品褐藻胶。其中, 褐藻胶的重均分子质量为292 kDa, 与文献[16]报道相似(219~343 kDa)。SA50、SA75和AOS 3种组分重均分子质量分别为13.4、5.73 kDa和

3.85 kDa; 且乙醇体积分数越高, 其所分离的组分分子质量越低, 这和同为酸性多糖的聚半乳糖醛酸酶解产物的分级醇沉规律相同^[17]。此外, 根据各组分的数均分子质量折算其平均聚合度可知, 酶解处理前褐藻胶的平均聚合度为1 032, 经酶解处理后, 其平均聚合度显著降低至16~54。其中, AOS组分的平均聚合度为16, 属于低聚糖。

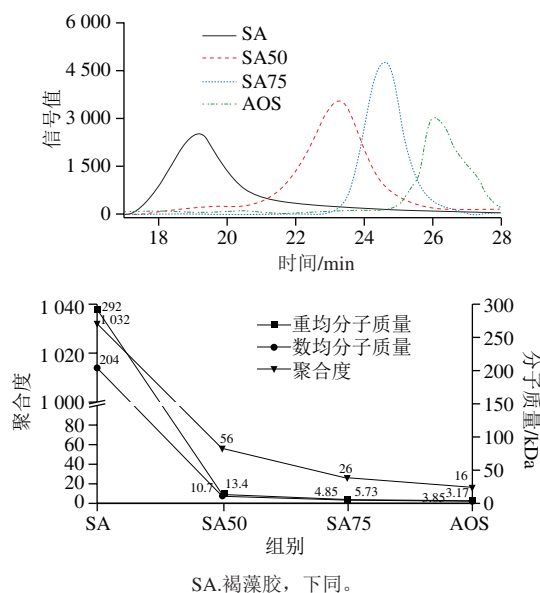


图1 褐藻胶及其酶解产物的凝胶排阻色谱图和平均聚合度
Fig. 1 Gel exclusion chromatograms and average polymerization degrees of alginate and its enzymatic digestion products

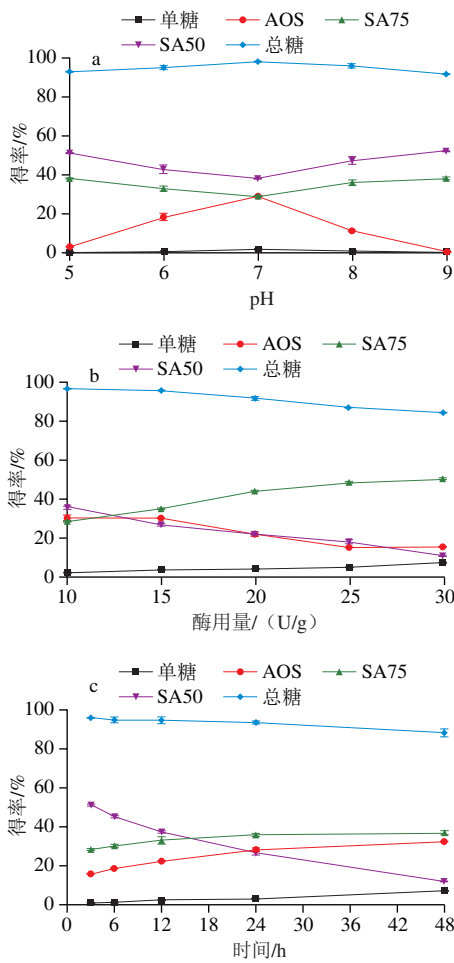
2.2 AOS的酶法制备工艺优化

以10 g/L褐藻胶为底物, 于45 $^{\circ}$ C、酶用量10 U/g条件下经褐藻胶裂解酶酶解24 h, pH值对AOS得率的影响如图2a所示。结果表明, 褐藻胶酶解产物中同时存在3种不同分子质量的褐藻胶不完全降解产物(SA50、SA75和AOS)。当pH值从5.0增加至7.0, AOS组分得率从3.20%增加到最高29.13%; 而进一步酶解pH值至9.0时, AOS得率降低到0.72%。在pH 7.0的条件下, AOS得率最高可达到29.13%; 此时, SA50和SA75得率分别可达38.30%和28.45%。酶解pH值对褐藻胶不完全降解产物各组分得率有显著影响, 这可能与褐藻胶不溶于酸性溶液以及褐藻胶裂解酶的酸碱度耐受性有极大的关系^[18]。因此, 褐藻胶酶法制备AOS的适宜酶解pH值为7.0。

图2b结果表明, 当酶用量从10 U/g增加到30 U/g时, SA50和AOS组分的得率逐渐降低, 而SA75组分的得率逐步增高。在酶用量为15 U/g时, 酶解所得SA50、SA75和AOS组分的得率分别为26.94%、35.08%和30.32%, 此时酶解产物的聚合度低于10 U/g酶用量时酶解产物的聚合度。值得探究的是随着酶用量的增加, AOS得率从最高30.32%逐步下降至15.58%, 总糖得率从96.70%降低至84.48%, 这可能是因为褐藻胶裂解酶处理后会产不饱和和单糖, 并且随着酶用量和酶解程度的增加, 酶解产物

中不饱和单糖含量不断增加。这一现象和Tang Shou等^[19]的研究结果一致：6 U/mL重组褐藻胶裂解酶处理褐藻胶，其不饱和单糖的转化率高达37.6%。因此，褐藻胶酶法制备AOS的适宜酶用量为15 U/g。

如图2c所示，在酶解过程中，SA50组分的得率随着降解时间的延长而逐步降低；SA75和AOS组分的得率随着降解时间的延长而逐渐升高。降解时间为24 h时，SA50、SA75和AOS组分得率分别为27.47%、35.93%和28.05%。3个酶解组分的变化可以说明随着降解时间的延长，AOS的聚合度逐步降低。并且酶解时间24 h相对于48 h可以减少工艺耗时、提高生产效率。因此，褐藻胶酶法制备AOS的适宜酶解时间为24 h。综上所述，以10 g/L褐藻胶为底物、45 °C、pH 7.0、酶用量15 U/g和反应时间24 h是生物酶解法制备AOS的最适条件，此时AOS得率最高为28.05%。黄菊等^[20]利用褐藻胶裂解酶酶解褐藻胶制备“褐藻低聚糖”，产率可高达75%，但是其所得到的“褐藻低聚糖”分子质量高达6~8 kDa，并不是聚合度为2~20的AOS。



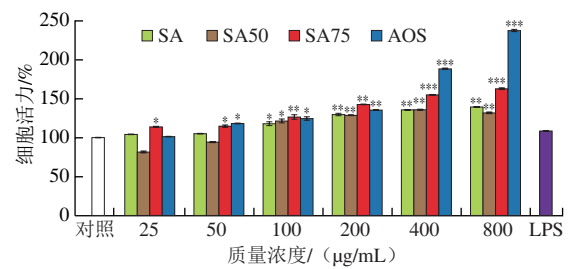
a. pH值; b.酶用量; c.酶解时间。
图2 酶解参数对AOS制备的影响

Fig. 2 Effect of enzymatic hydrolysis parameters on the preparation of alginate oligosaccharides

2.3 褐藻胶酶解产物对巨噬细胞免疫功能的影响

2.3.1 褐藻胶酶解产物对RAW264.7细胞增殖的影响

巨噬细胞可以通过多种信号通路达到免疫调节的目的^[21]，因此，采用巨噬细胞评估褐藻胶酶解产物的体外免疫调节能力；而LPS是公认的巨噬细胞促分裂原，通常用于刺激巨噬细胞释放一氧化氮和细胞因子^[22]，用作阳性对照。如图3所示，褐藻胶及其酶解产物均可以促进小鼠巨噬细胞RAW264.7的增殖，且呈现质量浓度依赖性，当样品质量浓度为100~800 μg/mL时，经褐藻胶及其酶解产物培养的细胞存活率显著高于对照组 ($P < 0.05$)，表明它们是生物安全的，可应用于生物体内。



与未处理对照相比, *. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$, ***. $P < 0.001$ 。下同。

图3 褐藻胶酶解产物对RAW264.7细胞活力的影响

Fig. 3 Effect of enzymatically hydrolyzed alginate on the viability of RAW264.7 cells

2.3.2 褐藻胶酶解产物对RAW264.7细胞释放NO的影响

NO被认为是由巨噬细胞产生的重要分子，其参与调节生理或病理过程，包括宿主对抗病原体和血管舒张^[23]。如图4所示，褐藻胶及其酶解产物均可促进RAW264.7细胞的NO产生 ($P < 0.05$)，并具有质量浓度依赖性。

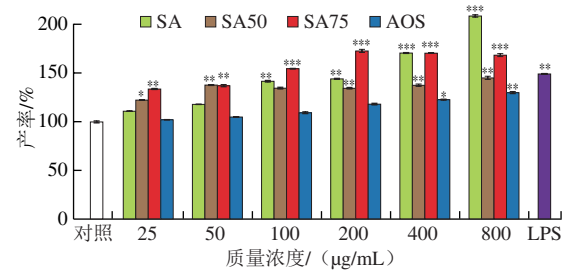


图4 褐藻胶酶解产物对RAW264.7细胞中NO产率的影响

Fig. 4 Effect of enzymatically hydrolyzed alginate on the production of NO in RAW264.7 cells

2.3.3 褐藻胶酶解产物对RAW264.7细胞分泌细胞因子的影响

TLR4是糖类诱导免疫调节中刺激巨噬细胞和糖类识别的主要受体^[24]。并且该受体的级联激活可以引发免疫细胞内信号分子的级联催化反应，从而可以同时促进包括TNF- α 、IL-6等细胞因子的分泌^[25]。这些细胞因子可直

接参与胞间相互作用,从而调节机体免疫反应、抑制肿瘤生长。Mami等^[26]研究酶解褐藻胶获得的不同聚合度褐藻寡糖对巨噬细胞分泌IL-1 α 和IL-1 β 、IL-6的影响,同样发现了AOS可以促进细胞因子的分泌,且AOS聚合度与其细胞因子分泌量未见明显相关性。然而,目前鲜有文献对比AOS和其他不同分子质量范围褐藻胶降解产物的体外免疫活性差异。本研究系统对比了褐藻胶和3种分子质量褐藻胶酶解产物对RAW264.7细胞分泌细胞因子的影响,结果如图5所示。与对照组相比,褐藻胶酶解产物显著促进了TLR4、TNF- α 和IL-6的分泌($P < 0.001$),并具有质量浓度依赖性。SA75组分的免疫调节活性最为显著,TNF- α 和IL-6的分泌量可分别达到16 895.77、69 613.89 pg/mL,甚至高于LPS,这可能是由于随着酶解程度的提高,酶解产物中不饱和单糖含量不断增加,AOS组分中的不饱和单糖较多,导致其免疫活性降低。

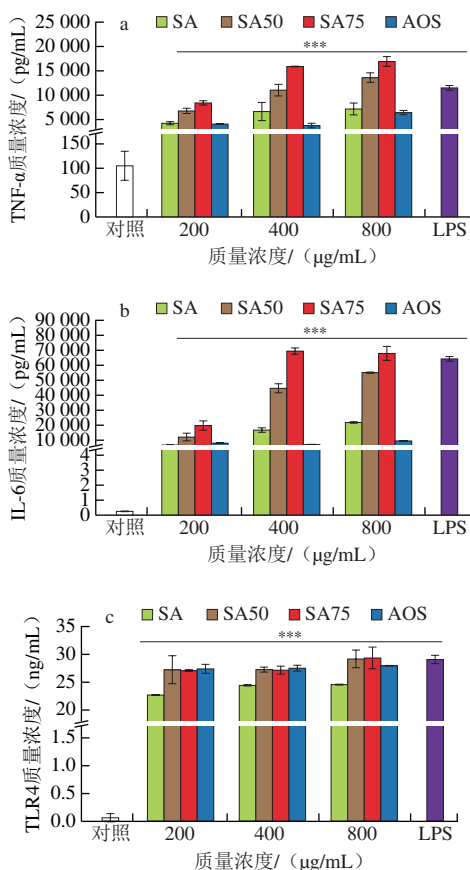


图5 褐藻胶酶解产物对RAW264.7细胞中TNF- α (a)、IL-6 (b)和TLR4 (c)分泌的影响

Fig. 5 Effect of enzymatically hydrolyzed alginate on the secretion of TNF- α (a), IL-6 (b) and TLR4 (c) in RAW264.7 cells

2.3.4 TAK-242对褐藻胶酶解产物体外免疫调节活性的影响

为了验证褐藻胶酶解产物的免疫刺激通路,本研究引入了TLR4的阻断剂TAK-242以探究TAK-242对褐藻

胶酶解产物免疫调节活性的影响。TAK-242是直接选择性和受体TLR4结合并干扰TLR4和衔接分子之间的相互作用^[27]的小分子特异性抑制剂。在研究TLR4和褐藻胶酶解产物介导的免疫调节活性之间的相关性前,先通过CCK-8确定TAK-242对RAW264.7细胞的毒性作用。如图6a所示,随着TAK-242浓度的增加,细胞存活率逐渐降低。具体而言,4 $\mu\text{mol/L}$ TAK-242对RAW264.7细胞的存活无影响,而超过该浓度后,TAK-242对细胞的毒性作用逐渐显现。因此,选择4 $\mu\text{mol/L}$ 的TAK-242培养细胞4 h以测试其是否影响褐藻胶酶解产物诱导NO的产生。图6b与理论预期一致,与未添加抑制物组相比,引入TAK-242显著降低了NO的产生($P < 0.05$)。在所有使用TAK-242的组中,AOS组分诱导的NO生成量从11.38 mol/L降低至4.82 mol/L。这一结果与TAK-242作用于与其他多糖如桑黄多糖和马尾松花粉多糖培养的巨噬细胞的结果一致^[28-29]。这些结果也表明TLR4信号通路与褐藻胶酶解产物诱导NO分泌的过程有关,同时表明其他受体也可能与褐藻胶酶解产物的免疫调节活性有关。

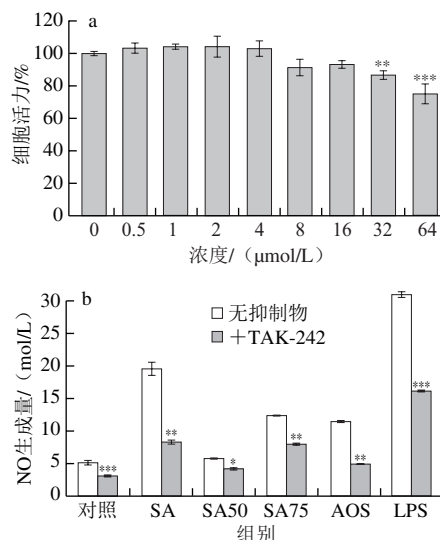


图6 不同浓度TAK-242对细胞存活率的影响(a)和褐藻胶酶解产物对有无TAK-242孵育RAW264.7细胞中NO产生的影响(b)

Fig. 6 Effect of different concentrations of TAK-242 on cell viability (a) and effects of enzymatically hydrolyzed alginate on NO production in RAW264.7 cells incubated with or without TAK-242 (b)

TAK-242对褐藻胶酶解产物免疫调节活性的影响如图7所示,特异性抑制剂的加入严重影响了TNF- α 和IL-6的分泌。与NO的减少量相比,TAK-242的添加将SA75组分的IL-6分泌量从51 794.74 pg/mL降低到284.21 pg/mL。当用TAK-242和LPS培养细胞时,获得了相似的结果。同时TLR4的降低表明褐藻胶酶解产物通过诱导巨噬细胞TLR4的分泌引起级联反应,可以促进NO、TNF- α 和IL-6的分泌,从而调节巨噬细胞免疫活性;但是显著性不高,说明还有其他的免疫刺激通路。

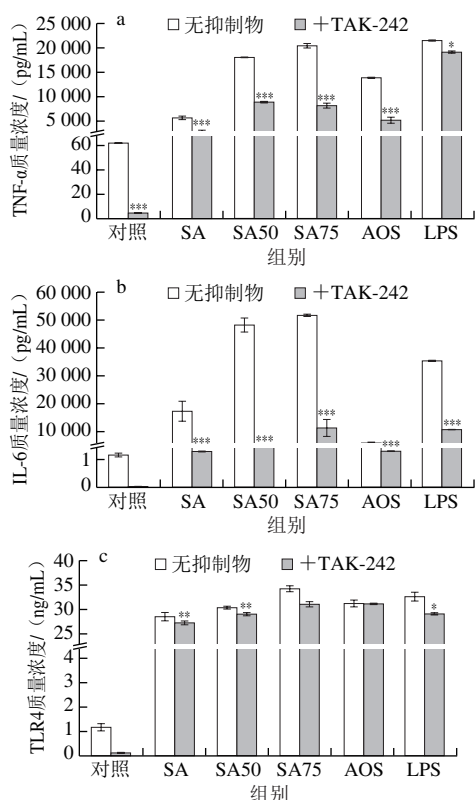


图7 褐藻胶酶解产物对有无TAK-242条件下培养的RAW264.7细胞中TNF- α (a)、IL-6 (b)和TLR4 (c)分泌的影响
Fig.7 Effect of enzymatically hydrolyzed alginate on the secretion of TNF- α (a), IL-6 (b) and TLR4 (c) in RAW264.7 cells cultivated with or without TAK-242

3 结论

通过对褐藻胶酶法降解工艺进行优化,并通过巨噬细胞体外模型系统评价了不同分子量范围的褐藻胶酶解产物组分免疫活性差异,得到以下结论:1)褐藻胶在底物质量浓度10 g/L、45 °C、pH 7.0和酶用量15 U/g最优条件下经褐藻胶裂解酶酶解24 h,此时通过乙醇分级分离获得了3种不同分子量范围的降解产物SA50、SA75和AOS,其重均分子量分别为13.4、5.73 kDa和3.85 kDa;得率分别为27.47%、35.93%和28.05%。2)不同分子量范围褐藻胶酶解产物的体外免疫增强效果不同,本研究中SA75组分(分子质量为5.73 kDa)促进细胞因子分泌的能力高于其他酶解组分。3)通过TLR4阻断剂TAK-242的引入,证实了褐藻胶酶解产物通过诱导TLR4的分泌,促进NO和其他细胞因子的分泌。

参考文献:

[1] GAO S K, YIN R, WANG X C, et al. Structure characteristics, biochemical properties, and pharmaceutical applications of alginate lyases[J]. Marine Drugs, 2021, 19(11): 628. DOI:10.3390/md19110628.

[2] XING M C, CAO Q, WANG Y, et al. Advances in research on the bioactivity of alginate oligosaccharides[J]. Marine Drugs, 2020, 18(3): 144. DOI:10.3390/md18030144.

[3] SHARMA S, HORN S J. Enzymatic saccharification of brown seaweed for production of fermentable sugars[J]. Bioresource Technology, 2016, 213: 155-161. DOI:10.1016/j.biortech.2016.02.090.

[4] HUANG G Y, WEN S H, LIAO S M, et al. Characterization of a bifunctional alginate lyase as a new member of the polysaccharide lyase family 17 from a marine strain BP-2[J]. Biotechnology Letters, 2019, 41(10): 1187-1200. DOI:10.1007/s10529-019-02722-1.

[5] ZHU B W, YIN H. Alginate lyase: review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications[J]. Bioengineered, 2015: 125-131. DOI:10.1080/21655979.2015.1030543.

[6] SHIGEYUKI K, WATARU H. 4-Deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate (DEH) and DEH reductase: key molecule and enzyme for the metabolism and utilization of alginate[J]. Molecules, 2022, 27(2): 338. DOI:10.3390/molecules27020338.

[7] JANG Y J, JUNG H Y V, MYEONG J Y, et al. Effects of alginate oligosaccharide on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in orchietomized rats[J]. Nutrients, 2023, 15(3): 682. DOI:10.3390/nu15030682.

[8] LI Z M, DUAN S P, LU B S, et al. Spraying alginate oligosaccharide improves photosynthetic performance and sugar accumulation in citrus by regulating antioxidant system and related gene expression[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 13: 1108848. DOI:10.3389/fpls.2022.1108848.

[9] TANG J C, ZHOU Q X, CHU H R, et al. Characterization of alginate and elicitor-active oligosaccharides from *Gracilbacillus* A7 in alleviating salt stress for *Brassica campestris* L.[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(14): 7896-7901.

[10] SUZUKI H, OOMIZU S, YANASE Y, et al. Hydrolyzed konjac glucomannan suppresses IgE production in mice B cells[J]. International Archives of Allergy & Immunology, 2010, 152(2): 122-130. DOI:10.1159/000265533.

[11] 阿拉腾珠拉, 胡永飞. 褐藻寡糖的制备方法及生物活性研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 104-118.

[12] 李锦弘, 郑慧珍, 陈慧, 等. 牡蛎肽对RAW264.7巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(22): 49-56. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033101.

[13] GRANGER D L, TAINTOR R R, BOOCKVAR K S, et al. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction[J]. Methods in Enzymology, 1996, 268: 142-151.

[14] 朱科学. 苦丁茶冬青粗多糖的分离表征及其抗氧化活性研究[J]. 热带作物学报, 2016, 37(10): 2014-2019. DOI:10.3969/j.issn.1000-2561.

[15] 王伟旭. 基于麦麸阿拉伯木聚糖碱酶法联用制备低聚木糖的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.

[16] 马萍, 孙淑英, 刘东春, 等. 海藻酸钠理化参数的测定[J]. 中国海洋药物, 2000(3): 54-56.

[17] WANG T, TAO Y H, LAI C H, et al. A method for quantitative characterization of incomplete degradation products of polygalacturonic acid[J]. Biological Macromolecules, 2021, 188: 343-349. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.08.048.

[18] ZHENG Y T, WANG Y J, DAN M L, et al. Characterization of degradation patterns and enzymatic properties of a novel alkali-resistant alginate lyase AlyRm1 from *Rubrivirga marina*[J]. Current Research in Food Science, 2023, 6: 100414. DOI:10.1016/J.CRFS.2022.100414.

- [19] TANG L Y, WANG Y, GAO S, et al. Biochemical characteristics and molecular mechanism of an exo-type alginate lyase VxAlly7D and its use for the preparation of unsaturated monosaccharides[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 99. DOI:10.1186/s13068-020-01738-4.
- [20] 黄菊, 丁晨, 谢超, 等. 海藻胶低聚寡糖的酶法制备纯化技术及保水理化性质分析[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(3): 595-602. DOI:10.11693/hyhz20150200054.
- [21] TANG S, WANG T, HUANG C X, et al. Arabinogalactans from *Larix principis-rupprechtii*: an investigation into the structure-function contribution of side-chain structures[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 227: 115354. DOI:10.1016/j.carbpol.2019.115354.
- [22] QIN T, REN Z, LIN D D, et al. Effects of selenizing *Codonopsis pilosula* polysaccharide on macrophage modulatory activities[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(8): 1358-1366. DOI:10.4014/jmb.1601.01094.
- [23] CALABRESE V, MANCUSO C, CALVANI M, et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2007, 8(10): 766-775. DOI:10.1038/nrn2214.
- [24] ZHANG X R, QI C H, GUO Y, et al. Toll-like receptor 4-related immunostimulatory polysaccharides: primary structure, activity relationships, and possible interaction models[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 149: 186-206. DOI:10.1016/j.carbpol.2016.04.097.
- [25] WANG W J, DENG Z H, WU H Y, et al. A small secreted protein triggers a TLR2/4-dependent inflammatory response during invasive *Candida albicans* infection[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1-14. DOI:10.1038/s41467-019-08950-3.
- [26] MAMI I, MAKI K, TAKUJI N, et al. Structure activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264.7 cells[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(20): 4423-4429. DOI:10.1016/j.febslet.2005.07.007.
- [27] SALAMA M, ELGAMAL M, ABDELAZIZ A, et al. Toll-like receptor 4 blocker as potential therapy for acetaminophen-induced organ failure in mice[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2015, 10: 241-246. DOI:10.3892/etm.2015.2442.
- [28] SUN M M, SU F C, YANG J X, et al. Fluorescent labeling of polysaccharides from masson pine pollen and its effect on RAW264.7 macrophages[J]. *Polymers*, 2018, 10(4): 1-11. DOI:10.3390/polym10040372.
- [29] WANG Y Q, MAO J B, ZHOU M Q, et al. Polysaccharide from *Phellinus igniarius* activates TLR4-mediated signaling pathways in macrophages and shows immune adjuvant activity in mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 123: 157-166. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.066.