

当归多糖作为潜在佐剂对细胞的免疫激活及机制研究

何沅聪¹, 尤朋涛^{1,2}, 黄雅宁¹, 张剑锋³, 苟君波^{1,4*}, 王建^{1,4*}

(1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065; 2. 湖北中医药大学中药资源与中药化学湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430065; 3. 宣城市食品药品检验中心, 安徽 宣城 242000; 4. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430061)

摘要: 本研究旨在探讨当归多糖 (*Angelica sinensis* polysaccharide, ASP) 作为潜在疫苗佐剂对巨噬细胞 RAW264.7 免疫激活作用及其释放细胞因子的影响, 同时阐明其潜在的信号通路作用机制。采用细胞计数试剂 (cell counting kit-8, CCK-8) 法检测细胞活力, 流式细胞术检测 5 个浓度梯度的 ASP 对 RAW264.7 细胞表面分子白细胞分化抗原 (cluster of differentiation, CD) 80、CD86 和主要组织相容性复合物 II (major histocompatibility complex II, MHC II) 表达的影响, ELISA 法测定细胞上清液中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等细胞因子的含量; quantitative polymerase chain reaction (qPCR) 检测 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)、TNF 受体相关因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6)、核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路的 mRNA 表达水平, Western blot 检测 TRAF6、I κ B 激酶 (I κ B kinase, IKK) 和 p65 蛋白磷酸化水平。结果显示, 不同浓度的 ASP 对 RAW264.7 无细胞毒性。ASP 均能浓度依赖性地促进 RAW264.7 细胞表面分子 CD80、CD86 和 MHC II 的表达上调 ($P < 0.05$)。不同浓度的 ASP 组均使得 IL-6 和 TNF- α 等的分泌水平有显著的提升 ($P < 0.05$), 且在一定范围内存在量-效关系。qPCR 结果显示, 不同浓度的 ASP 均使得 TLR4、MyD88、TRAF6 和 NF- κ B 的 mRNA 表达水平上调。不同浓度的 ASP 均能提高 TRAF6、p-IKK 和 p-p65 的表达水平。TLR4 受体抑制剂 TAK-242 能显著降低 ASP 诱导的细胞因子分泌量 ($P < 0.05$)。本研究揭示了 ASP 可通过 TLR4 等信号通路显著增强共刺激分子和细胞因子的表达, 显示出作为疫苗佐剂的潜力。

关键词: 当归多糖; 佐剂; 免疫活性; TLR4 信号通路; RAW264.7 细胞

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)03-0637-09

Research on immune activation and mechanism of *Angelica sinensis* polysaccharide as potential adjuvant in cells

HE Yuan-cong¹, YOU Peng-tao^{1,2}, HUANG Ya-ning¹, ZHANG Jian-feng³, GOU Jun-bo^{1,4*}, WANG Jian^{1,4*}

(1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Hubei Key Laboratory of Resources and Chemistry of Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 3. Xuancheng Institutes of Food and Drug Control, Xuancheng 242000, China; 4. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430061, China)

Abstract: The purpose of this study is not only to investigate the effects of *Angelica sinensis* polysaccharide (ASP) as a potential vaccine adjuvant on immune activation and cytokine release in RAW264.7 macrophages, but also to elucidate its underlying involved signaling mechanisms. Cell viability was evaluated by the CCK-8 assay.

收稿日期: 2024-07-31; 修回日期: 2024-12-20.

基金项目: 湖北省科技厅自然科学基金青年项目 (2023AFB389); 湖北省药品监督管理局重点实验室开放课题项目 (2023HBKFZ002); 湖北中医药大学重大科技攻关项目 (2023ZDXM007); 湖北中医药大学博士启动项目 (2023ZXB012).

*通讯作者 Tel: 13618656486, E-mail: 1249519827@qq.com;

Tel: 13476298773, E-mail: Junbogou@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0739

Flow cytometry was used to analyze the influence of ASP at five distinct concentration gradients on the expression of cluster of differentiation (CD) 80, CD86, and major histocompatibility complex II (MHC II) on RAW264.7 cell surfaces. The levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in cell culture supernatant were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. Molecular techniques, including quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were utilized to assess the mRNA expression levels of Toll-like receptor 4 (TLR4)-myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-TNF receptor associated factor 6 (TRAF6)-nuclear factor kappa-B (NF- κ B) signaling pathway. The levels of TRAF6, and the phosphorylation levels of I κ B kinase (IKK) and p65 proteins were detected by Western blot. The results show that ASP at varying concentrations promote the proliferation of RAW264.7 cells without cytotoxicity. Surface molecules CD80, CD86, and MHC II on RAW264.7 cells showed statistically significant up-regulation in response to ASP compared to the blank control ($P < 0.05$), with a dose-dependent effect within an optimal range. Furthermore, ASP also elevated cytokines IL-6 and TNF- α secretion levels by RAW264.7 cells compared to the normal control ($P < 0.05$), exhibiting a dose-response relationship within a specific concentration span. The qPCR results indicated that ASP groups at different concentrations all led to upregulation of mRNA expression levels of TLR4, MyD88, TRAF6, and NF- κ B signaling pathway. The expression levels of TRAF6, p-IKK and p-p65 were increased by different concentrations of ASP. The TLR4 inhibitor TAK-242 significantly reduced the secretion of cytokines induced by APS ($P < 0.05$). This study highlights the immunostimulatory properties of ASP, emphasizing its potential as a vaccine adjuvant. By significantly enhancing the expression of co-stimulatory molecules and cytokines via the TLR4-MyD88-TRAF6-NF- κ B signaling pathway, ASP offers a promising approach for modulating immune responses.

Key words: *Angelica sinensis* polysaccharide; adjuvant; immune activity; TLR4 signaling pathway; RAW264.7 cell

当归 [*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels] 是常用的重要传统中药材之一, 性温, 味甘、辛。在传统医学中, 当归被认为能够归入心、脾、肝经, 具有补血活血、调经止痛、润肠通便等功效^[1,2]。现代研究证实当归中含有多种活性成分, 如当归多糖 (*Angelica sinensis* polysaccharide, ASP)、挥发油、阿魏酸、氨基酸、黄酮等^[3]; 其中, ASP 被确定为主要活性成分之一^[4], 具有抗肿瘤^[5,6]、改善贫血^[7]、免疫调节^[4,8]等多种药理作用。

抗原递呈细胞 (antigen presenting cells, APC) 是机体重要的免疫细胞, 其激活后会表达上调共刺激分子 B7 (CD80 和 CD86) 和主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 的表达, 同时释放肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL) 等活性因子^[9]。而 RAW264.7 细胞是 APC 细胞的一种, 且该细胞是研究中药多糖作用的主要靶细胞^[10,11], 其细胞膜上富含 Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs), 使得其成为研究 TLR 信号通路的理想模型^[12,13]。

近年来, 中药多糖因其免疫调节潜力而成为疫苗佐剂研究的热点^[14,15]。然而, 关于 ASP 作为佐剂在免疫调节中的作用及其与 TLR4 的关系, 研究较少。本研究利用 RAW264.7 细胞模型, 深入考察 ASP 的体外免疫调节功能。测定 ASP 刺激后 RAW264.7 细胞的存活率、共刺激分子 (CD80、CD86) 和 MHC II 的表达水

平, 以及细胞因子 (如 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 等) 的释放水平。采用 qPCR 技术和 Western blot 检测 TLR4 等相关信号通路的 mRNA 和蛋白的表达, 并通过 TLR4 抑制剂实验, 进一步验证 ASP 激活 RAW264.7 细胞是否通过 TLR4 信号通路。该研究揭示了 ASP 的免疫调节作用, 为其在疫苗佐剂开发中的应用提供了分子机制依据, 有助于 ASP 的物质基础开发和临床应用。

材料与方法

仪器与设备 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司, Synergy H1), CO₂ 细胞培养箱 (新加坡 Esco 公司, Celsafe), 流式细胞仪 (美国贝克曼公司, CytoFLEX LX), 荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, ABI OneStepPlus), 化学发光成像仪 (美国 FluorChem 公司, proteinsimple)。

药品与试剂 ASP (纯度 > 90%) 购于四川省维克奇生物科技有限公司 (批号: WP23111007); 脂多糖 (LPS, 货号: BS904, 纯度 98%) 购于白鲨生物科技有限公司; 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 (货号: CL-0190) 购于武汉普诺赛生命科技有限公司; TAK-242, 纯度 98% (货号: 243984-11-4) 购于上海毕得医药科技股份有限公司; PE-CD86 流式荧光抗体、APC-CD80 流式荧光抗体、PerCP/cyanine5.5-MHC II 流式荧光抗体、APC-CD206 流式荧光抗体、TNF 受体相关因子 6

(TNF receptor associated factor 6, TRAF6) 一抗、p65 一抗、 β -actin 一抗、二抗 (货号: E-AB-F0994D、E-AB-F0992E、E-AB-F0990J、E-AB-F1135E、E-AB-18251、E-AB-32233、E-AB-40338、E-AB-1003) 均购于武汉 Elabscience 公司; 小鼠的 IL-6 和 TNF- α ELISA 试剂盒 (货号: abs552203、abs552204) 均购于爱必信 (上海) 生物科技有限公司; 小鼠的 IL-1 β ELISA 试剂盒 (货号: 1210122) 购于达科为生物技术股份有限公司; CCK-8 试剂盒、细胞总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、SYBR Green (货号: A311、RC112、R312、Q712) 均购于南京诺维赞生物科技股份有限公司; I κ B 激酶 (I κ B kinase, IKK) 一抗、p-IKK 一抗、p-p65 一抗 (货号: 8943T、2078T、3033T) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

药物与 LPS 配制 将当归多糖和 LPS 分别溶解于 PBS 中, 制备浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 母液, 再将母液稀释至实验所需的最终给药浓度。

细胞培养 RAW264.7 和 DC2.4 细胞分别采用 DMEM 高糖培养基和 RPMI-1640 培养基 (含 10% FBS 和 1% 双抗) 在 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中培养, 并以 1:4 的比例进行传代。

CCK-8 法检测细胞活性 将 RAW264.7 细胞培养铺板 24 h 后, 弃去孔内的培养基, 并加入 $100 \mu\text{L}$ 不同浓度的药物处理细胞。再培养 24 或 48 h 后, 加入 CCK-8 溶液, 孵育 1 h, 然后在 450 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。细胞活力按照以下公式计算: 细胞活力 = [(实验孔 A 值 - 空白孔 A 值) / (对照孔 A 值 - 空白孔 A 值)] $\times 100\%$ 。

ASP 对 RAW264.7 和 DC2.4 细胞表面分子表达的影响 分别用不同浓度的 ASP 或 LPS 与 RAW264.7 或 DC2.4 共孵育 24 h, 然后收集处理后的细胞, 使用荧光抗体 PE-CD86、APC-CD80 和 PerCP/cyanine5.5-MHC II 对细胞表面分子进行染色; 或在固定破膜后, 再使用荧光抗体 APC-CD206 对 RAW264.7 进行染色。通过流式细胞仪检测 RAW264.7 或 DC2.4 细胞表面分子 CD86、CD80、MHC II 或 CD206 的表达情况。

ELISA 法测定 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 接种 RAW264.7 细胞在 24 孔细胞培养板中, 用 ASP 或 LPS ($100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 孵育 24 h 后, 收集细胞上清液。使用 ELISA 法对各组细胞上清液中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 含量进行检测, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

荧光定量 PCR 根据总 RNA 提取试剂盒的指南提取总 RNA, 使用琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 的完整性。然后, 通过逆转录试剂盒将 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA 反转录为 cDNA 模板, 使用 SYBR Green 和 ABI OneStepPlus 以

$10 \mu\text{L}$ 的反应体积进行荧光定量 PCR (qPCR)。反应条件设置为: 95°C 预变性 30 s, 循环反应: 95°C 10 s, 60°C 30 s, 共 40 个循环; 融解曲线: 95°C 15 s, 60°C 60 s, 95°C 15 s。以 β -actin 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目标基因的相对表达水平。具体的引物设计序列见表 1。

Table 1 PCR primer sequences. TLR4: Toll-like receptor 4; MyD88: Myeloid differentiation factor 88; TRAF6: TNF receptor associated factor 6; NF- κ B: Nuclear factor kappa-B

| Primer name | Sequence (5' to 3') | Length/bp |
|------------------|------------------------|-----------|
| TLR4-F | CACTGTTCTCTCCTGCCTGAC | 149 |
| TLR4-R | CCTGGGGAAAACTCTGGATAG | 149 |
| MYD88-F | GATGACCCCTAGGACAAACG | 70 |
| MYD88-R | ACTCGATATCGTTGGGGCAG | 70 |
| TRAF6-F | CAGTGCAAACACCATGTGGC | 73 |
| TRAF6-R | TTGTGCCCTGCATCCCTTAT | 73 |
| NF- κ B-F | CTCTGGCACAGAAGTTGGGT | 102 |
| NF- κ B-R | TCCCGGAGTTCATCTCATAGT | 102 |
| β -actin-F | CCAGCCTTCCTCTTGGGTAT | 103 |
| β -actin-R | GTTGGCATAGAGGTCTTTACGG | 103 |

蛋白免疫印迹实验 将 RAW264.7 细胞铺到 6 孔板内, 24 h 后分别给予 25、50、100、200、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ASP 刺激, 阴性对照组给予等量的 PBS, 阳性对照组给予 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 进行刺激, 24 h 后弃去上清液并提取蛋白。用凝胶电泳依据蛋白分子量大小分离蛋白, 再将蛋白转印到硝酸纤维素膜中。使用封闭液封闭后分别用 TARF6、p-IKK、p-p65、 β -actin 一抗和对应的二抗进行孵育, 然后显影。磷酸化蛋白显影之后使用抗体剥离液孵育 10 min, 室温下孵育 IKK、p65 一抗和对应的二抗后, 再显影。使用 ImageJ 软件对 TARF6、IKK、p-IKK、p65、p-p65 进行归一化处理后进行数据统计。

TAK-242 预孵育后 ELISA 法测定 IL-6、TNF- α RAW264.7 细胞先用 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TAK-242 预培养 1 h, 然后用 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ASP 或 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 孵育 12 h。使用 ELISA 法对各组细胞上清液中 IL-6、TNF- α 含量进行检测。

统计学方法 采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行数据统计分析, 实验数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组数据比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Dunn 多重比较检验确定统计学意义, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 当归多糖对 RAW264.7 细胞存活率的影响

本实验利用 CCK-8 法检测 ASP 对巨噬细胞

RAW264.7作用24和48 h的存活率。一般认为细胞存活率为90%以上时,为非细胞毒性浓度。在查阅文献的基础上,选择25~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为ASP的工作浓度^[16]。从图1A可看出,RAW264.7细胞在ASP作用24 h后,其细胞存活率均大于100%;且采用400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASP处理细胞24 h后,细胞存活率达到111.2%,与阴性对照组相比无显著性差异,说明细胞处于正常的生长水平;从图1B可看出,RAW264.7细胞在ASP作用48 h后,其细胞存活率均大于90%。该实验结果显示,在25~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内,ASP对RAW264.7细胞无细胞毒性,且存活率均高于90%。

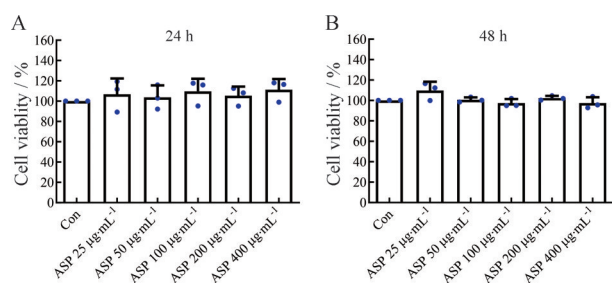


Figure 1 Effect of ASP on macrophage RAW264.7 proliferation. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ASP: *Angelica sinensis* polysaccharide

2 当归多糖诱导RAW264.7和DC2.4细胞表面分子表达的影响

如图2所示,与阴性对照组相比,5种不同浓度的ASP均可显著提高RAW264.7细胞表面分子CD80、CD86和MHC II的表达。随着给药浓度从25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 增加至400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,CD80⁺、CD86⁺和MHC II⁺细胞比例逐渐升高,且在400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASP组时,这些阳性细胞比例最高。在低浓度(25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)时,ASP显著提高了RAW264.7细胞CD80(图2A、B)和CD86(图2C、D)的表达($P < 0.001$);然而,相同浓度下的ASP对RAW264.7细胞MHC II的表达无显著影响($P > 0.05$),而100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASP组则显著提高了细胞表面MHC II的表达量($P < 0.05$,图2E、F)。在图2G、H中,与阴性对照组相比,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASP组能够显著增加RAW264.7细胞中CD80⁺和CD86⁺双阳性细胞比例($P < 0.001$),增加了11.9倍。与阳性对照组相比,400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASP组均能显著增强RAW264.7细胞表面分子表达。这些数据表明,ASP对RAW264.7细胞具有显著的免疫刺激作用。

CD206的高表达通常被作为RAW264.7细胞朝M2方向极化的指标,因此,本研究进一步探究了不同浓度的ASP对RAW264.7细胞表面CD206表达水平的影响。如图3所示,与阴性对照组相比,不同浓度的ASP处理后,RAW264.7细胞在CD206表达上并未显

示出统计学上的显著性差异。因此,本实验结果表明在所给的浓度范围内,ASP对RAW264.7细胞的CD206表达无显著影响,且不会促进RAW264.7细胞向M2型巨噬细胞方向发生极化。

本研究同时测定了ASP对DC2.4细胞的激活情况。从图4中可以看出,与未处理的阴性对照组相比,使用不同浓度的APS处理后,DC2.4表面的CD80、CD86和MHC II分子表达量均上升;且随着给药浓度从25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 增加至400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,CD80⁺、CD86⁺和MHC II⁺阳性细胞比例逐渐升高。与阴性对照组相比,使用400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASP处理后,DC2.4细胞表面的CD80占比从18.2%提高至59.7%,CD86的占比从1.77%提高至42.7%,MHC II的占比从0.46%提高至37.0%,且其效果比阳性对照组的更好。因此,本实验说明ASP能有效激活DC2.4细胞,提高DC2.4细胞的CD80、CD86和MHC II表达,促进DC2.4细胞的抗原提呈作用。

3 当归多糖诱导RAW264.7细胞产生细胞因子的影响

如图5所示,不同浓度的ASP对RAW264.7细胞分泌的IL-6、TNF- α 和IL-1 β 显示出显著的促进作用。随着给药浓度的增加,ASP对RAW264.7细胞分泌这3种细胞因子的促进作用逐渐增强,且呈现出良好的浓度依赖性。在图5A中,相比于200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASP组,400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASP组使RAW264.7细胞分泌IL-6水平增加了1.16倍;而相比于LPS组,400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASP组使IL-6的分泌水平增加了6.20倍($P < 0.05$)。在图5B中,相比于阴性对照组,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASP组使RAW264.7细胞分泌的TNF- α 水平增加了9 934.12倍,表现出显著性差异;而相比于200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASP组,400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASP组使TNF- α 的分泌水平增加了1.20倍。与LPS组相比,400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASP组使TNF- α 的分泌水平增加了4.51倍($P < 0.000 1$)。在图5C中,与阴性对照组相比,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASP组使RAW264.7细胞分泌IL-1 β 水平增加了约125倍,呈现出显著性差异,且随着给药浓度的增加,IL-1 β 的含量也在逐渐地升高。体外细胞实验结果证实,ASP能够浓度依赖性地激活RAW264.7细胞,使其释放IL-6、TNF- α 和IL-1 β 等细胞因子。

4 当归多糖对RAW264.7细胞TLR4-MyD88-TRAF6-NF- κ B的mRNA含量的影响

为了探究ASP的免疫调控机制,本研究采用qPCR技术检测了不同浓度的ASP刺激RAW264.7细胞24 h后对TLR4-MyD88-TRAF6-NF- κ B信号通路mRNA表达水平的影响。实验结果如图6A~D所示,与空白对照组相比,不同浓度的ASP刺激后,TLR4-MyD88-TRAF6-NF- κ B信号通路的mRNA表达水平均

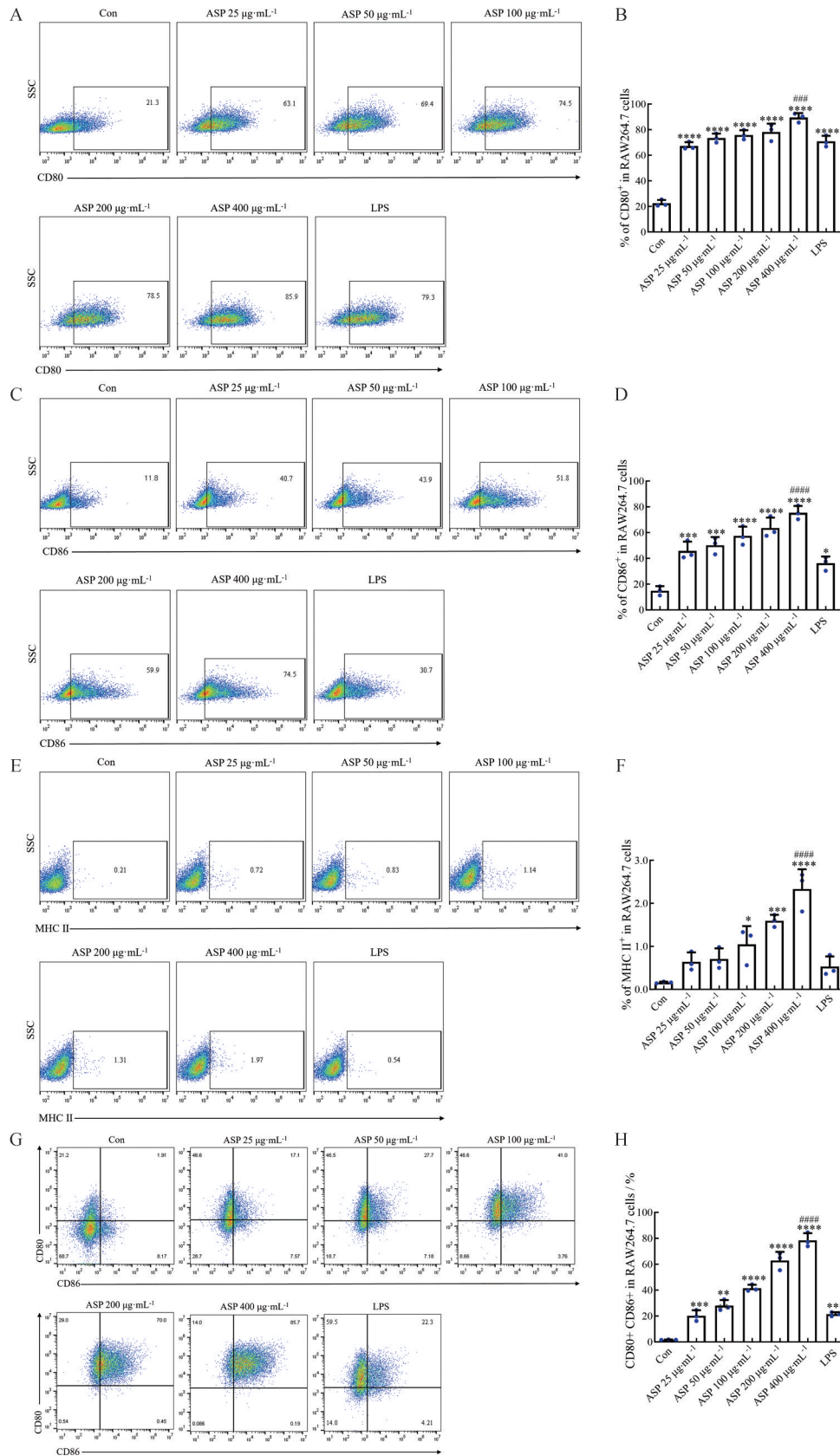


Figure 2 Effect of ASP on expression of CD80 in proportions (A) and proportions histogram profiles (B), CD86 in proportions (C) and histogram profiles (D), MHC II in proportions (E) and histogram profiles (F) and CD80⁺CD86⁺ double-positive cells in proportions (G) and histogram profiles (H) on RAW264.7 cell. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Con group; #### $P < 0.001$, ##### $P < 0.0001$ vs LPS group. CD80: Cluster of differentiation 80; CD86: Cluster of differentiation 86; MHC II: Major histocompatibility complex II

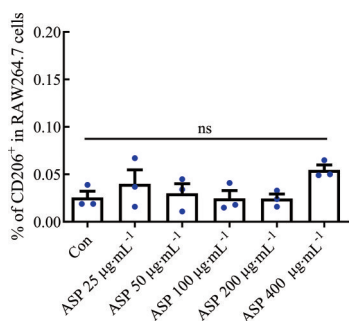


Figure 3 Effect of ASP on expression of CD206 in histogram profiles on RAW264.7 cell. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ns: Not statistically significant; CD206: Cluster of differentiation 206

显著升高 ($P < 0.05$), 且随着剂量的增加, 该实验结果中 *TLR4* 等 mRNA 表达水平的升高趋势与细胞表面分子 CD80、CD86 和 MHC II 的检测结果以及细胞上清液中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的含量结果一致。

5 当归多糖对 RAW264.7 细胞 TRAF6 蛋白、IKK 和 p65 的磷酸化蛋白表达水平的影响

为了进一步探究 ASP 对 RAW264.7 细胞激活后 TRAF6 蛋白、IKK 和 p65 的磷酸化蛋白表达水平, 本研究采用 Western blot 检测了这些蛋白的变化。如图 6E、F 所示, 与阴性对照组相比, 不同浓度的 ASP 均能使得 TRAF6 蛋白的表达水平提高; 并且在 ASP 浓度为 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, TRAF6 的表达水平达到最高; 说明

ASP 能够显著提高 RAW264.7 细胞中 TRAF6 的表达。此外, 如图 6E、G、H 所示, ASP 能够以浓度依赖性使 p65 磷酸化水平提高。而磷酸化通常意味着蛋白被激活而行使蛋白的正常功能, 由此推测, ASP 能够通过使 TRAF6 表达上调, 激活 IKK, 进而促进 p65 蛋白磷酸化。磷酸化的 NF- κB 进入细胞核后, 使 RAW264.7 分泌 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β , 最终达到激活 RAW264.7 细胞的目的。

6 TAK-242 抑制剂对当归多糖诱导的 RAW264.7 细胞分泌的细胞因子影响

为了进一步分析 ASP 是否通过 TLR4 信号通路激活 RAW264.7 细胞, 本研究采用 TLR4 特异性抑制剂 TAK-242 预处理 RAW264.7 细胞。TAK-242 抑制剂已被广泛用于 TLR4 信号通路的验证^[13,17]。如图 7 所示, 与对照组相比, 在未使用抑制剂的情况下, ASP 和 LPS 均能显著促进 IL-6 和 TNF- α 的产生 ($P < 0.0001$)。然而, 在 TAK-242 存在的情况下, ASP 诱导的 IL-6 和 TNF- α 的产生受到明显抑制, 并显著低于无抑制剂组 ($P < 0.0001$)。上述实验结果表明, ASP 对 RAW264.7 细胞的激活可能是通过 TLR4 信号通路起作用的。

讨论

巨噬细胞 RAW264.7 在先天性免疫系统中起着关

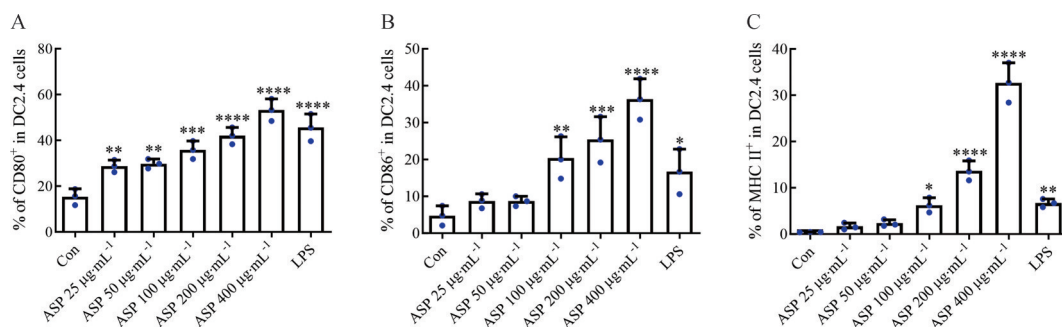


Figure 4 Effect of ASP on expression of CD80 (A), CD86 (B), MHC II (C) on DC2.4 cell. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Con group

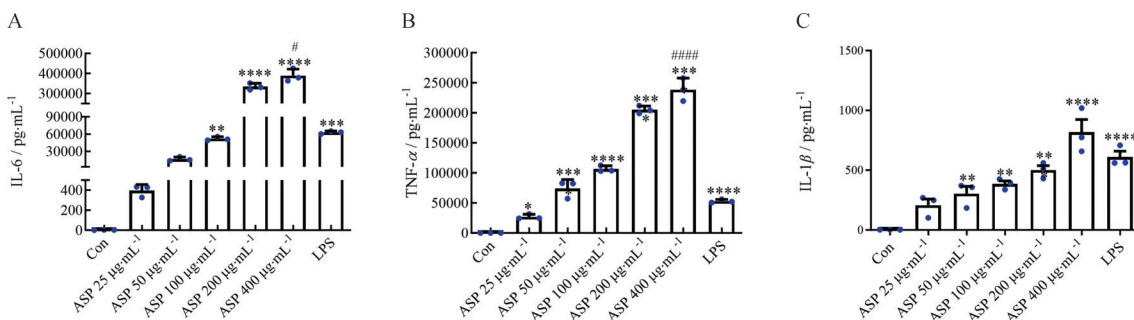


Figure 5 Effect of ASP on the secretion of cytokine IL-6 (A), TNF- α (B) and IL-1 β (C) in RAW264.7 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Con group; # $P < 0.05$, #### $P < 0.0001$ vs LPS group. IL-6: Interleukin-6; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; IL-1 β : Interleukin-1 β

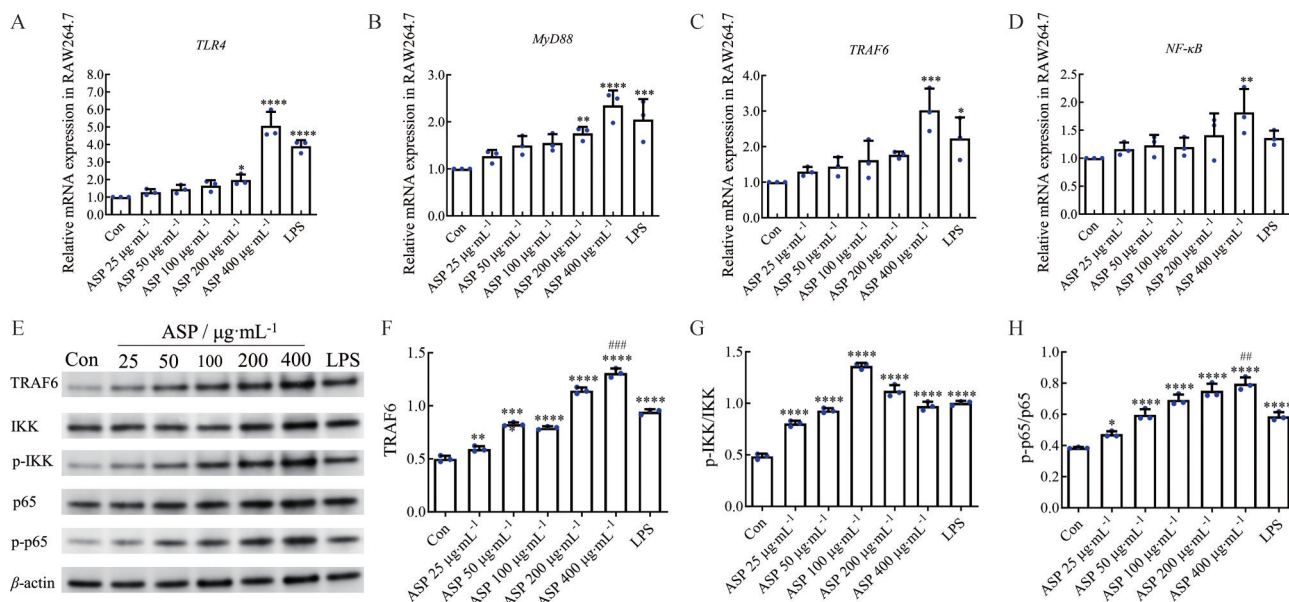


Figure 6 Effects of ASP on mRNA expressions of *TLR4* (A), *MyD88* (B), *TRAF6* (C) and *NF-κB* (D) in RAW264.7 cells and the key proteins of TRAF6, p-IKK, p-p65 were measured by Western blot (E). F: The protein quantification of TRAF6; G, H: The relative protein quantification of p-IKK (G) and p-p65 (H). β -Actin expression was used as control. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Con group; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs LPS group

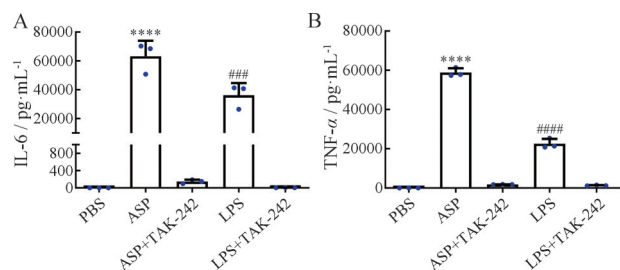


Figure 7 Effect of TLR4 inhibitors TAK-242 on the secretion of IL-6 (A) and TNF- α (B) induced by ASP in RAW264.7 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. **** $P < 0.0001$ vs ASP + TAK-242 group; ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs LPS+ TAK-242 group

键作用,其抗原递呈功能对于增强适应性免疫系统至关重要。目前研究证明,中药多糖对巨噬细胞的免疫调节是其发挥免疫功能的途径之一。

本研究发现,在 $25 \sim 400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内,ASP 对 RAW264.7 细胞无细胞毒性,且能促进 RAW264.7 细胞的分化,而免疫细胞分化是其发挥免疫应答的前提与基础。五种不同浓度的 ASP 均能显著上调细胞表面共刺激分子 CD80、CD86 和 MHC II 表达水平,且呈现浓度依赖性。上调的共刺激分子 CD80 和 CD86,通常与 T 细胞的激活密切相关。尽管本研究未直接观察到 T 细胞的激活,但 CD80 和 CD86 的上调表明 ASP 可通过增强 T 细胞的共刺激信号,促进 T 细胞的激活。此外,MHC I 类分子几乎在所有细胞上均有表达,主要呈递的是胞内抗原;而 MHC II 类分子则主要在激活的 B

细胞、巨噬细胞、树突状细胞等抗原提呈细胞上表达,负责呈递胞外抗原^[18]。因此,ASP 对 MHC II 类分子表达的增强,有助于巨噬细胞对外源性抗原的更有效呈递。总之,ASP 通过激活巨噬细胞,使其表面 MHC II、CD80 和 CD86 表达增强,促进了巨噬细胞对外来抗原的识别、处理和呈递能力,从而发挥 ASP 作为疫苗佐剂的潜在效应。

在观察到 ASP 对巨噬细胞表面分子表达的显著影响之后,本研究还进一步探讨了 ASP 对 RAW264.7 细胞分泌细胞因子的影响。RAW264.7 细胞通常通过分泌多种细胞因子而发挥重要的免疫调节作用^[12]。本研究结果显示,5 种不同浓度的 ASP 均能显著促进 RAW264.7 细胞分泌 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 。其中,TNF- α 主要是由 TLR4-MyD88 依赖信号通路的激活产生^[19],其能杀死肿瘤细胞和被病毒感染的细胞,也能辅助激活免疫系统细胞。

近期研究表明,中药多糖的免疫调节活性与 TLR4 信号通路的激活密切相关^[20,21]。如枸杞多糖能够与巨噬细胞表面的 TLR4 受体结合,进而激活下游的 MyD88-NF- κ B 信号通路,并促进了 IL-12p40、TNF- α 等细胞因子的分泌^[22];新型人参多糖 (GSPA-0.3) 通过 TLR4-MyD88-NF- κ B 信号通路的激活,显著提高了小鼠体内 H1N1 疫苗的中和抗体水平,显示出优于传统铝佐剂的免疫增强效果^[23]。在本研究中,ASP 增加了 RAW264.7 细胞中 *TLR4*、*MyD88*、*TRAF6* 和 *NF-κB* 的

mRNA 的表达。不同浓度的 ASP 均能使得 RAW264.7 细胞中 TRAF6、p-IKK 和 p-p65 蛋白的表达水平提高。同时, TLR4 受体抑制剂 TAK-242 能显著降低 ASP 诱导的细胞因子 IL-6 和 TNF- α 的分泌。该结果表明, ASP 可能通过特异性激活 TLR4 信号通路来增强巨噬细胞的免疫反应。本研究的发现与其他中药多糖通过 TLR4 信号通路激活免疫细胞的研究结果相一致^[22,23], 这进一步证实了 ASP 可通过相似的机制发挥其免疫调节作用。

文献研究表明, 当归多糖可以促进巨噬细胞和树突状细胞分泌细胞因子, 通过 TLR4 途径进一步激活 NK 细胞, 增强 IFN- γ 的含量, 从而提高其抗肿瘤的免疫反应, 但在该研究中当归多糖的具体成分及其作用的信号通路尚未完全阐明^[4]。进一步的研究表明, 不同结构的当归多糖对 TLR4 信号通路具有不同影响。如 Liu 的研究^[24]发现, 当归多糖 APS-2 I 可降低 LPS 诱导的巨噬细胞中 MyD88 和 NF- κ B 的表达, 抑制 TLR4 复合物的形成, 显示出对 TLR4 信号通路的抑制作用。而同样的, 该团队也发现当归多糖 APS-4 I 和 APS-4 II 可提高其抗黑色素瘤的能力^[5], 这表明 ASP-4 I 和 ASP-4 II 是一类对 TLR4 信号通路具有促进作用的多糖类型。这些结果表明, 当归多糖可通过 TLR4 发挥双向的免疫调节作用, 而这种调节作用的差异可能是由于当归多糖的来源不同导致的结构差异而造成的。此外, 黄芪多糖也因其结构差异对 TLR4 信号通路也表现出双向调节作用^[10]。这进一步强调了中药多糖结构多样性对其免疫调节功能的重要性。

综上, 当归多糖可经 TLR4-MyD88-TRAF6-NF- κ B 通路激活并诱导巨噬细胞 RAW264.7 分化成熟, 上调共刺激分子 CD80、CD86 和 MHC II 等, 产生 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 细胞因子。该研究结果初步揭示了当归多糖在细胞水平的免疫调节作用机制, 为其作为疫苗佐剂的潜在应用价值提供了理论基础。

尽管本研究取得了积极的结果, 但仍存在一定的局限性, 需要进一步的多糖结构解析, 以及小鼠体内实验来验证 ASP 的免疫调节效果, 以及与其他免疫激动剂的协同效应, 以期开发出更安全、更有效的疫苗佐剂。

作者贡献: 何沅聪和王建负责实验方案设计; 何沅聪负责实验实施、数据收集、结果分析和文章修改等; 王建负责提供文章思路和文章撰写, 并在文章写作方面进行指导和修改; 尤朋涛、黄雅宁、张剑锋负责文中数据分析的指导; 苟君波对整个实验内容给予监督并负责对文章内容的修改完善。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Mou CY, Yin Y, Shen ZX. Research progress on chemical components and pharmacological effects of Danggui (*Angelica sinensis* Radix) [J]. Shandong J Tradit Chin Med (山东中医杂志), 2024, 5: 544-551.
- [2] Wang XM, Zhou WC, Huang LZ, et al. Application progress on anti-skin aging effect of traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 1093-1102.
- [3] Ma YC, Wu WX, Hu JH, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Angelica sinensis* [J]. Acta Chin Med Pharmacol (中医学报), 2022, 50: 111-114.
- [4] Shen J, Qin H, Li KK, et al. The angelica polysaccharide: a review of phytochemistry, pharmacology and beneficial effects on systemic diseases [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 133: 112025.
- [5] Zhang T, Liu WJ, Fu CY, et al. Structures and anti-melanoma activities of two polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 183: 972-981.
- [6] Wang ZH, Yan PH, Chao X. Research progress on anti-tumor mechanism of *Angelica sinensis* polysaccharide [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med (山东中医药大学学报), 2023, 47: 819-824.
- [7] Wang KP, Zeng F, Liu JY, et al. Inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Angelica sinensis* on hepcidin expression [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134: 944-948.
- [8] Zhang Y, Wang KP. Research progress of polysaccharides from *Angelica sinensis* [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2023, 58: 1065-1073.
- [9] Chi H, Pepper M, Thomas PG. Principles and therapeutic applications of adaptive immunity [J]. Cell, 2024, 187: 2052-2078.
- [10] Fan XH, Li K, Yang YD, et al. Screening for anti-inflammatory components of *Astragalus* polysaccharide and metabolomics research based on molecular weight distribution [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 783-792.
- [11] Huang LL, Sun Q, Li QH, et al. Screening and characterization of an anti-inflammatory pectic polysaccharide from *Cucurbita moschata* Duch [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 264: 130510.
- [12] He YF, He XY, Zhang HF, et al. Adjuvant effect of two polysaccharides from the petals of *Crocus sativus* and its mechanisms [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 204: 50-61.
- [13] Zhou LJ, Liu ZJ, Wang ZX, et al. *Astragalus* polysaccharides exerts immunomodulatory effects via TLR4-mediated MyD88-dependent signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. Sci Rep, 2017, 7: 44822.
- [14] Wan XH, Yin YM, Zhou CZ, et al. Polysaccharides derived from Chinese medicinal herbs: a promising choice of vaccine adjuvants [J]. Carbohydr Polym, 2022, 276: 118739.
- [15] Zhang Y, Li XL, Li HY, et al. Application and prospect of natural active ingredients of traditional Chinese medicine in immunological

- adjuvant for influenza vaccine [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2023, 22: 5985-5992.
- [16] Li CX, Liu Y, Zhang YC, et al. Astragalus polysaccharide: a review of its immunomodulatory effect [J]. *Arch Pharm Res*, 2022, 45: 367-389.
- [17] Zhang HX, You XR, Wang XJ, et al. Delivery of mRNA vaccine with a lipid-like material potentiates antitumor efficacy through Toll-like receptor 4 signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118: e2005191118.
- [18] Neefjes J, Jongstra M, Paul P, et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11: 823-836.
- [19] Sakai J, Cammarota E, Wright J, et al. Lipopolysaccharide-induced NF- κ B nuclear translocation is primarily dependent on MyD88, but TNF α expression requires TRIF and MyD88 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 1428.
- [20] Zhang XR, Qi CH, Guo Y, et al. Toll-like receptor 4-related immunostimulatory polysaccharides: primary structure, activity relationships, and possible interaction models [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 149: 186-206.
- [21] Zhu CY, Xiao P, Fang YY, et al. Advances in methods and techniques for the study of polysaccharide *in vivo* processes and immunomodulatory mechanisms [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2024, 59: 322-335.
- [22] Bo RN, Liu ZG, Zhang J, et al. Mechanism of *Lycium barbarum* polysaccharides liposomes on activating murine dendritic cells [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 205: 540-549.
- [23] Feng L, Han N, Han YB, et al. Structural analysis of a soluble polysaccharide GSPA-0.3 from the root of *Panax ginseng* C. A. Meyer and its adjuvant activity with mechanism investigation [J]. *Carbohydr Polym*, 2024, 326: 121591.
- [24] Liu WJ. The Study on the Structures of Polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels and Their Inhibiting Mechanism on LPS-induced Inflammatory Response (当归多糖的结构及其抑制 LPS 诱导巨噬细胞激活的作用机制研究) [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2022.