·重大新药创制专项巡礼·

不同分子量枸杞多糖对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用

王　莹[1],金红宇[1],李耀磊[1],董晓旭[2],咎　珂[1],马双成[1]
(1 中国食品药品检定研究院,北京 100050;2 北京中医药大学,北京 100029)

[摘要]　**目的:**研究不同分子量枸杞多糖(lycium barbarum polysaccharides, LBP)对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的免疫调节作用。**方法:**本研究通过水提醇沉及柱分离法以获得不同分子量的 LBP 成分。运用 CCK8 法检测不同给药浓度的 LBP 对 RAW 264.7 细胞增殖的影响;采用中性红吞噬实验测定 LBP 对细胞吞噬能力的影响;采用实时荧光定量 PCR 法检测肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-6、IL-1β 和诱导型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA 的表达情况,采用 Western Blot 法检测丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路相应蛋白质的磷酸化水平。**结果:**通过分离纯化获得 2 个高纯度均一组分,分别为 LBP1[重均分子量(Mw) = 1 207 kDa]和 LBP2(Mw = 125 kDa)。与对照组相比,不同浓度的 LBP1 和 LBP2 组分对巨噬细胞的增殖和吞噬能力均有明显的促进作用(P < 0.05);LBP1 和 LBP2 在 50 ~ 200 μg·mL^{-1}浓度范围内,可促进巨噬细胞中 TNF-α,IL-1β,IL-6 和 iNOS mRNA 的表达,且呈现剂量依赖性。Western Blot 法测定结果显示 LBP1 和 LBP2 诱导 RAW264.7 细胞产生免疫应答与特异性激活 JNK MAPK 通路相关。此外,在对 RAW264.7 细胞的刺激作用基础上,LBP1 的调节作用明显优于 LBP2。**结论:**LBP 对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用可能与其特异性激活 JNK MAPK 信号转导通路相关,且其活性强弱与 LBP 分子量表现出较大的关联性。

[关键词]　枸杞多糖;免疫功能;RAW264.7 巨噬细胞;丝裂原活化蛋白激酶;细胞因子
[中图分类号]　R965　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1003 - 3734(2021)12 - 1079 - 08

Immunomodulatory effect of lycium barbarum polysaccharide of different molecular weights on macrophage RAW264.7

WANG Ying[1], JIN Hong-yu[1], LI Yao-lei[1], DONG Xiao-xu[2], ZAN Ke[1], MA Shuang-cheng[1]
(1 *National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 100050, *China*; 2 *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100029, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To investigate the immunoregulatory effect of Lycium barbarum polysaccharides (LBP) of different molecular weights (Mw) on RAW264.7 macrophages. **Methods**: LBP with different Mw was obtained by water extraction, alcohol precipitation and chromatographic column separation. CCK8 method was used to detect the effect of LBP on proliferation of RAW 264.7 cells. The effect of LBP on cell phagocytosis was determined by neutral red method. Real-time quantitative PCR was applied to detect the mRNA expression of TNF-α, IL-6, IL-1β and iNOS. Western blot was used to detect the phosphorylation level of proteins in MAPK signaling pathway. **Results**: Two high purity homogeneous components, LBPl (Mw = 1 207 kDa) and LBP2 (Mw = 125 kDa) were obtained by separation and purification. Compared with the control group, LBP1 and LBP2 at different concentrations significantly promoted the proliferation and phagocytosis of macrophages (P < 0.05). LBP1 and LBP2 in the concentration range of 50 ~ 200 μg·mL^{-1} could promote the expression of TNF-α, IL-1β, IL-6 and iNOS mRNA in macrophages in a dose-dependent manner. Western blot analysis showed that LBP1 and LBP2 induced immune response in RAW264.7 cells, which was related to the specific activation of JNK MAPK pathway. In addition, the

[基金项目]　国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(2018ZX09303-024)
[作者简介]　王莹,女,博士,副研究员,主要从事中药质量控制及安全检测研究。联系电话:(010)53852484, E-mail:wayi_1986@163.com。
[通讯作者]　咎珂,男,副研究员,主要从事中药质量评价研究。联系电话:(010)53852092, E-mail:6206310@qq.com。董晓旭,男,副教授,主要从事中药化学成分及代谢研究。联系电话:(010)67095424, E-mail: dxiaoxv@163.com。

regulatory effect of LBP1 was better than that of LBP2 on RAW264.7 cells. **Conclusion**: The immunoregulatory effect of LBP on RAW264.7 macrophages may be related to its specific activation of JNK MAPK signal transduction pathway, and its activity is closely related to the *M*w of LBP.

[**Key words**] polysaccharide of lycium barbarum; immunomodulation; RAW264.7 macrophage cell; mitogen-activated protein kinase (MAPK); cytokine

枸杞子作为我国传统的中药材和重要经济作物,同时作为药食同源产品,日常应用极为广泛。枸杞多糖(lycium barbarum polysaccharides, LBP)作为枸杞子中主要化学成分及活性成分,具有多种生物活性,如抗肿瘤[1]、免疫调节[2-3]、降血脂[4]等。其中关于LBP免疫活性研究表明其对巨噬细胞的调节是发挥免疫功能的重要途径之一。巨噬细胞作为一种多功能效应型细胞,在遇到病原微生物入侵宿主时,便会合成和分泌趋化因子和细胞因子,以增强机体的免疫防御能力[5-6]。RAW264.7细胞为小鼠体内的单核巨噬细胞,其能够对病原的刺激做出反应并产生促炎因子,如肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor, TNF-α)、白细胞介素(interleukin, IL)-1β和IL-6及分泌一氧化氮(NO)等炎症介质间接地杀死病原体[7]。在多糖研究中RAW264.7小鼠单核巨噬细胞常作为体外免疫活性研究的模型,如尚京迎等[8]以RAW264.7细胞为模型,探索了竹荪多糖对其免疫功能的影响;苗月等[9]从RAW264.7细胞的增殖能力、吞噬水平和细胞因子的分泌水平探索了蛹虫草多糖的免疫作用机制。

已有部分研究采用RAW264.7细胞模型对枸杞粗多糖的体外免疫活性进行了初步评价,包括细胞增殖率及细胞因子释放水平等。本研究拟采用水提醇沉及柱分离法获得不同分子量的LBP组分,并通过研究不同LBP组分对RAW264.7细胞增殖活性、吞噬能力、细胞因子mRNA表达水平及相关细胞通路蛋白表达,以揭示LBP对巨噬细胞的免疫调节作用机制,为LBP产品开发提供参考依据。

材料与方法

1 仪器

Countess Ⅱ细胞计数仪(美国赛默飞公司);HH-4A电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司);Infinite M200型多功能酶标仪(瑞士Tecan集团);QB-9006微孔板恒温振荡器(江苏海门市其林贝尔仪器制造厂);LightCycler 480 Ⅱ实时荧光定量PCR仪(德国Roche公司);Avanti J-15R低温高速离心机(美国贝克曼库尔特公司);Trans-Blot Turbo蛋白电泳转印仪(美国Bio-Rad公司);TGL-16GA CO_2培养箱(美国Thermo公司);电子分析天平(日本岛津公司);细胞培养皿(美国Corning公司)。

2 样品与试剂

LBP1和LBP2由实验室提取分离所得,枸杞样品从宁夏中卫枸杞种植基地收集,经中国食品药品检定研究院张南平主任药师鉴定确认为茄科植物宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)的干燥成熟果实。RAW264.7细胞(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心);细胞培养皿(美国Corning公司);CCK-8试剂盒(日本同仁公司);One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit(RR096A,日本TaKaRa公司);抗体ERK1/2(9102S)、p-ERK(9101S)、JNK(9252T)、p-JNK(9251S)、p38(9212S)、磷酸化p38(4511T)和α-Tubulin(2144S)均购自美国CST公司;iNOS,TNF-α,IL-6和IL-1β引物均购自生工生物工程股份有限公司;DEAE-52纤维素(Solarbio公司);HW-65凝胶树脂(日本TOSOH公司);脂多糖(LPS,美国Sigma公司);高糖DMEM培养基、PBS缓冲液、青链霉素溶液0.25%胰蛋白酶和胎牛血清均购自美国Gibco公司;BCA蛋白定量试剂盒、PMSF、蛋白上样缓冲液和RIPA细胞裂解液均购自江苏碧云天生物有限公司;十二烷基硫酸钠($C_{12}H_{25}SO_4Na$)、无水乙醇等分析纯试剂均购自国药集团化学试剂公司。

3 LBP的制备

3.1 LBP的提取 对文献[10]中描述方法进行优化,具体操作过程为:称定枸杞子粗粉约5 g,加入80 mL乙醚后回流1 h,除乙醚液。向药渣中加入100 mL 80%的乙醇溶液,加热回流1 h后,趁热滤过。然后将滤纸连同滤渣放置于锥形瓶中,加入80 mL水,加热回流2 h,趁热滤过,滤液在水浴锅上蒸干后用5 mL水充分溶解,加入乙醇使其浓度达到80%,4 ℃冰箱中放置12 h后取出,离心5 min(5 000 r·min^{-1}),弃去上清液。沉淀物分别用乙醇、丙酮淋洗各2次,待溶剂挥干后沉淀物用10 mL热水溶解。

采用 Sevage 法去除蛋白,具体步骤为:向 LBP 溶液中加入氯仿:正丁醇混合溶剂(4:1,*v*:*v*)2 mL,充分混匀 60 min 后离心取上清液。重复脱蛋白操作步骤共 3 次,对上清液进行浓缩,冻干后得枸杞粗多糖 LBP。

3.2 LBP 的分离 配制 40 mg·mL^{-1}的 LBP 水溶液,上样 5 mL,采用 DEAE-52 纤维素柱分离(柱规格为 70 cm×2.6 cm,有效柱长 50 cm),依次用蒸馏水、0.20 和 0.50 mol·L^{-1}氯化钠溶液进行洗脱。收集样品洗脱液,每管 5 mL,控制洗脱流速为 0.3 mL·min^{-1}。采用苯酚硫酸比色法隔管进行检测,以洗脱管数为横坐标,紫外分光光度法测得的 *A* 值为纵坐标,绘制洗脱曲线。根据洗脱曲线,对同一洗脱峰的样品进行合并,对洗脱液进行浓缩,冷冻干燥后得粉末样[2]。用蒸馏水溶解配制 40 mg·mL^{-1}的溶液,上样 5 mL,采用 HW-65F 凝胶柱分离(80 cm×2.6 cm,60 cm),用 0.1 mol·L^{-1} NaCl 溶液洗脱,收集洗脱液,每管 5 mL,控制洗脱流速为 0.3 mL·min^{-1}。采用苯酚硫酸比色法隔管进行检测,对同一洗脱峰的样品进行合并,再经透析、浓缩、冷冻干燥得高纯度 LBP 成分,分别为 LBP1 和 LBP2。

4 枸杞多糖理化性质的测定

按照《中华人民共和国药典》2015 版一部枸杞项下总糖测定法,即苯酚硫酸法测定 LBP 中性糖含量[11];采用咔唑硫酸法测定 LBP 中酸性糖含量[12];采用考马斯亮蓝法对 LBP 中蛋白含量进行检测;采用本课题组前期建立的 GPC-RI-MALLS 法测定 LBP 的重均分子量(*M*w)[13]。测定色谱条件为:Shodex SB806HQ 与 Shodex SB-804HQ 柱串联;柱温为 40 ℃;流动相为 0.1% NaCl 溶液;柱流速为 0.5 mL·min^{-1};进样量为 50 μL。MALLS 检测条件:石英玻璃样品池,激光波长为 658 nm。实验前采用甲苯对 MALLS 90°光电二极管检测器进行校正,其余角度二极管检测器采用 *M*w = 3 000 右旋糖酐对照品归一化,dn/dc 值设置为 0.138。

5 CCK-8 法检测 LBP 对 RAW264.7 细胞增殖的影响

选择处于生长对数期的 RAW264.7 巨噬细胞,将其密度调整至 5×10^4 个·mL^{-1},向 96 孔板中每一个孔位接种 100 μL,培养 12 h 后,向孔位中替换 25,50,100,200 和 400 μg·mL^{-1}的不同组分 LBP 溶液,不同浓度设定 6 个复孔,并且设立正常组及空白培养基组。分别培养 24 和 48 h 后[14],按完全培养基:CCK-8试剂为 10:1的比例配制混合溶液,在每一个孔内加入混合溶液 100 μL,进行 2 h 的孵育,使用多功能型酶标仪测定 450 nm 波长下的 *A* 值[15],计算细胞存活率。

细胞存活率/% =(实验组孔 *A* 值 - 空白组孔 *A* 值)/(正常组孔 *A* 值 - 空白组孔 *A* 值)×100%

公式(1)

6 中性红法检测吞噬活性

按照“**5**”项下方法对实验组细胞进行处理,空白对照组需要加入 200 μL 的培养液,阳性对照组则加入 200 μL 浓度为 1.0 μg·mL^{-1}的 LPS 的 DMEM 高糖培养基,各实验组设 6 个平行。培养 24 h 后,将上清液舍弃,加入 100 μL 浓度为 0.1% 的中性红溶液,并继续培养 1 h,将中性红溶液弃去,PBS 清洗 2 次,再向每一个孔加 100 μL 冰醋酸-无水乙醇(1:1,*v*:*v*)细胞裂解液,室温条件下静置过夜,在 570 nm 波长处测定 *A* 值[16],按照公式(2)计算吞噬率。

吞噬率/% =(实验组孔 *A* 值 - 空白组孔 *A* 值)/(正常组孔 *A* 值 - 空白组孔 *A* 值)×100%

公式(2)

7 LBP 对 RAW264.7 细胞 iNOS,IL-6,IL-1β 和 TNF-α mRNA 表达的影响

按照“**5**”项下方法对实验组细胞进行处理,参照文献[9]中的阳性对照组造模方法及剂量,在样品组分别添加浓度为 50,100,200 μg·mL^{-1}的不同组分 LBP 溶液,LPS 对照组中加入 LPS 浓度为 1 μg·mL^{-1}的培养基溶液,培养 6 h。使用 Trizol 法对不同组细胞的 RNA 进行提取,反转录为 cDNA,再扩增 cDNA。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列与扩增产物长度表

目的基因	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	产物长度
IL-6	CTCCCAACAGACCTGTCTATAC	CCATTGCACAACTCTTTTCTCA	97
TNF-α	ATCCGCGACGTGGAACTG	ACCGCCTGGAGTTCTGGAA	70
iNOS	TGCCACGGACGAGACGGATAG	CTCTTCAAGCACCTCCAGGAACG	109
IL-1β	GAGCACCTTCTmCCTTCATCTT	TCACACACCAGCAGGTTATCATC	84
GAPDH	TGGCCTTCCGTGTTCCTAC	GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA	178

8 Western Blot 检测 LBP 对 RAW264.7 细胞因子蛋白表达的影响

参考文献[17-18]提出的方法，实验分组同“**5**”项下方法，使用不同终质量浓度的 LBP（50，100，200 μg·mL^{-1}）处理 RAW264.7 细胞 6 h，使用裂解液提取细胞总蛋白。电转印至 PVDF 膜后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，分别加入稀释后的兔源性一抗（α-Tubulin，1∶1 000；JNK，1∶1 000；p-JNK，1∶1 000；p38，1∶1 000；p-p38，1∶1 000；ERK，1∶1 000 和 p-ERK，1∶1 000），4 ℃过夜孵育。Western Blot 法检测 MAPKs 通路蛋白表达水平，包括胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase，ERK）1/2、phosphor-ERK1/2、c-Jun 氨基末端激酶（c-Jun NH2-terminal kinase，JNK）、phosphor-JNK、p38、phosphor-p38，本研究中采用 α-Tubulin 作为内参[19-20]。

9 结果分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析，以 $\bar{x} \pm s$ 表示测定数据，组间比较则采用单因素方差分析（one-way ANOVA），$P<0.05$ 为有显著性差异。

结　果

1 LBP 理化性质分析

按照“**3**”项所制备的枸杞粗多糖，其得率为 4.1%（相对于枸杞样品粉末），蛋白含量为 7.8%，*M*w 为 316 000，分子量分散系数为 3.97。采用方法 1 和方法 2 对枸杞多糖进行提取和分离，获得 2 个成分均一且产率较高的 LBP 成分，分别命名为 LBP1 和 LBP2，其得率分别为 30.6% 和 26.4%（以枸杞粗多糖干重计）。采用方法 2 中描述内容分别对 LBP1 和 LBP2 的理化性质进行测定，结果见表 2。从表 2 可看出，2 个 LBP 组分的纯度均较高，且 2 组分 *M*w 存在很大差异，分别为 1 207 和 125 kDa。采用 GPC-RI-MALLS 法测定 LBP1 和 LBP2 的 *M*w，色谱图见图 1。

表 2　LBP 理化性质测定

分级组分	酸性糖/%	中性糖/%	蛋白含量/%	*M*w	分散系数
LBP1	18.5 ± 2.5	73.2 ± 3.7	2.4 ± 0.22	1 207 400	1.43
LBP2	15.8 ± 2.0	76.7 ± 3.4	3.8 ± 0.37	125 000	1.77

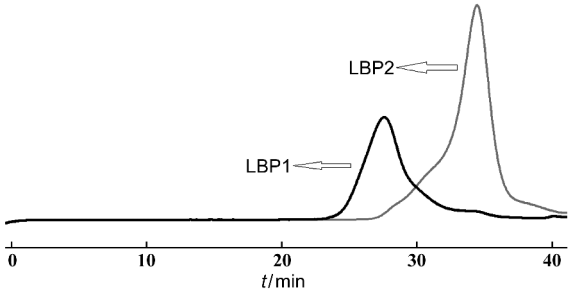
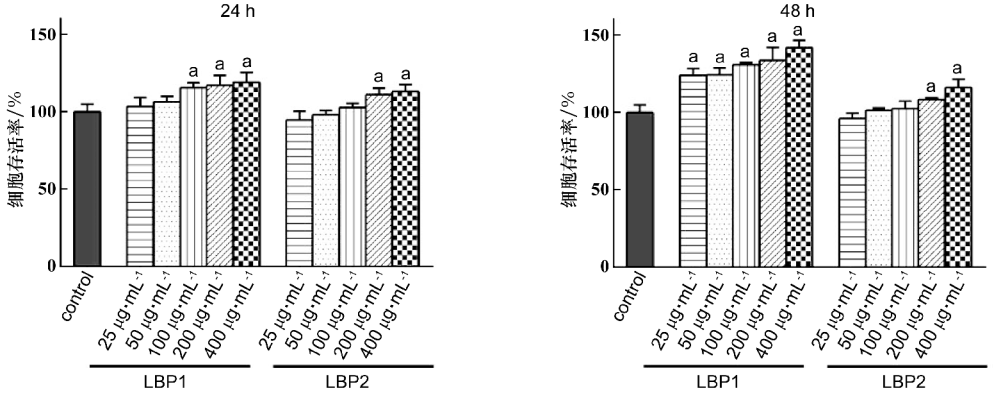


图 1　LBP1 和 LBP2 的 GPC-RI 色谱图

2 LBP 对 RAW264.7 巨噬细胞增殖活性的影响

如图 2 所示，LBP1 对 RAW264.7 巨噬细胞作用 24 和 48 h 后，50 ~ 400 μg·mL^{-1}浓度范围的 LBP1 对巨噬细胞的增殖率与正常对照组比较有明显的促进作用（$P<0.05$），且呈剂量依赖性关系。LBP2 对 RAW264.7 巨噬细胞作用 24 和 48 h 后，在浓度为 200 ~ 400 μg·mL^{-1}范围内，实验组相比较于正常对照组对 RAW264.7 的增殖作用明显（$P<0.05$）。



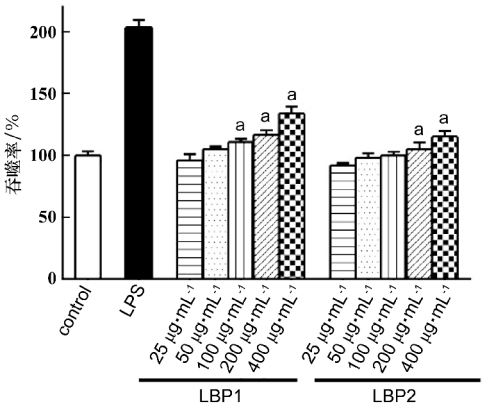
与对照组比较，a：$P<0.05$

图 2　LBP1 和 LBP2 对 RAW264.7 细胞增殖的影响

当 LBP1 和 LBP2 的浓度达到 400 μg·mL^{-1}时，对细胞促进增殖效果最为显著，24 h 后细胞存活率分别达到 122% 和 116%。同时发现 200 ~ 400 μg·mL^{-1}浓度水平的 LBP1 和 LBP2 在促进细胞增殖效果上有明显差异，LBP1 的刺激作用优于 LBP2（$P < 0.05$）。

3 LBP1 和 LBP2 对 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响

如图 3 所示，与正常对照组比较，100 ~ 400 μg·mL^{-1}浓度的 LBP1 和 200 ~ 400 μg·mL^{-1}浓度的 LBP2 干预 RAW264.7 细胞后，其吞噬活性得到明显增强（$P < 0.05$）。当 LBP1 和 LBP2 质量浓度为 400 μg·mL^{-1}时，RAW264.7 细胞吞噬活性最强。从而得出结论：LBP1 和 LBP2 在一定的浓度范围内对 RAW264.7 细胞的吞噬能力有上调作用，说明 LBP 能够提高巨噬细胞的非特异性免疫功能。同时发现 200 ~ 400 μg·mL^{-1}浓度水平的 LBP1 和 LBP2 在增强细胞吞噬活性上有明显差异，LBP1 的刺激作用优于 LBP2（$P < 0.05$）。

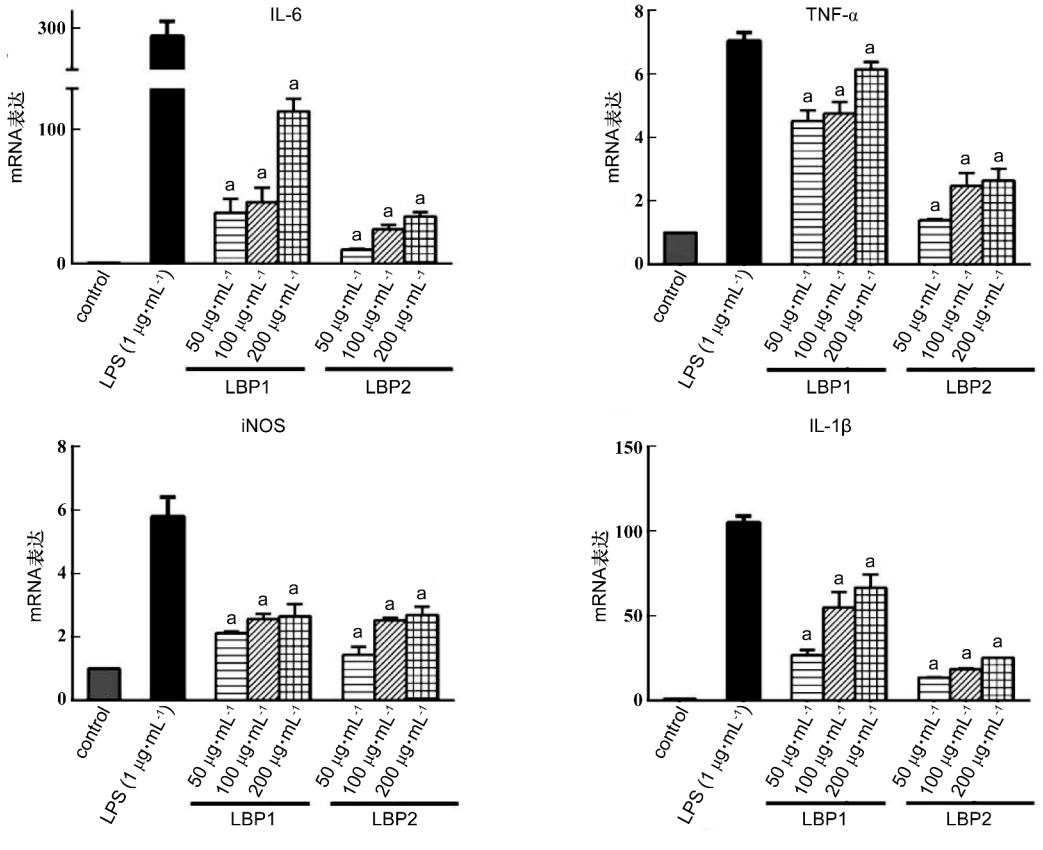


与对照组比较，a：$P < 0.05$

图 3 LBP1 和 LBP2 对 RAW264.7 吞噬活性的影响

4 LBP 对 RAW264.7 细胞炎症因子释放的影响

见图 4。



与对照组比较，a：$P < 0.05$

图 4 LBP 对 RAW264.7 细胞中炎症因子 IL-6，TNF-α，iNOS 和 IL-1β 表达的影响

相较于对照组，采用 50 ~ 200 μg·mL^{-1}浓度范围的 LBP1，LBP2 以及 1.0 μg·mL^{-1}的 LPS 分别干预细胞 6 h 后，IL-6，TNF-α，IL-1β 和 iNOS 的表达明显增加（$P < 0.05$），且呈剂量依赖性升高，说明与对

照组相比,LBP1 和 LBP2 均能够显著促进 NO,IL-6,TNF-α 和 IL-1β 的产生。在观察 LBP 对细胞因子释放能力的影响中发现其对于 TNF-α 的刺激作用最为明显。同时发现 LBP 所诱导的 iNOS 及其他细胞因子的 mRNA 表达均低于 LPS 模型对照组,初步表明其刺激 NO 及炎症因子的释放控制在一定安全范围内,并没有达到导致产生炎症的效果。进一步比较了 LBP1 和 LBP2 的调节效果,发现 50 ~ 200 μg·mL^{-1}浓度水平的 LBP1 对巨噬细胞的细胞因子的刺激作用明显高于 LBP2($P<0.05$),这与对 RAW264.7 细胞增殖、吞噬活性的调节作用结果一致,进一步证明了 LBP 的免疫活性与其多糖结构特征紧密相关,揭示体外细胞实验中高端分子量成分 LBP1 的免疫调节活性可能高于低端分子量成分 LBP2。

5 Western-Blot 测定结果

如图 5 和图 6 所示,通过检测 MAPK 通路上的 3 种蛋白发现,LBP1 和 LBP2 能显著激活 JNK 信号通路,且在 50 ~ 200 μg·mL^{-1}浓度范围内其蛋白表达随着浓度的增加而逐渐增强,而对 p38 和 ERK 信号通路的激活不明显,这说明 LBP 对细胞的活化功能可能与其特异性激活 p-JNK 蛋白信号通路有关。同时从对 JNK 的激活情况看,100 ~ 200 μg·mL^{-1}浓度水平 LBP1 的激活强度优于 LBP2($P<0.05$)。

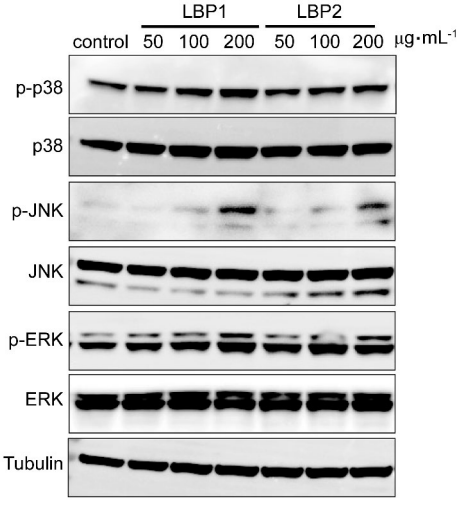
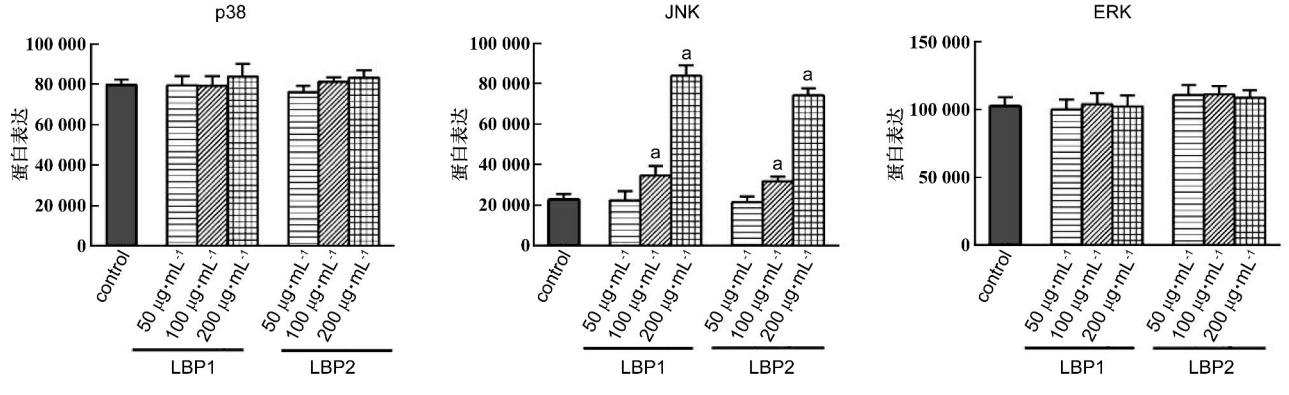


图 5 LBP1 和 LBP2 对 RAW 264.7 细胞 MAPK 通路激活的影响



与对照组比较, a:$P<0.05$

图 6 LBP1 和 LBP2 对磷酸化 p38,JNK,ERK 蛋白与总蛋白的影响

讨　论

在多糖纯化中常采用离子交换色谱柱和凝胶色谱柱对粗多糖成分进行分离,前者通过不同组分与离子交换剂之间的作用力强弱不同进行分离,后者按照分子量大小进行分离。如 Zhang 等[2]利用 DEAE 纤维素柱对枸杞粗多糖进行分离,获得 5 个高纯度的枸杞多糖组分。Tang 等[21]采用 DEAE 柱和 Sephadex G-150 柱结合的方式对枸杞多糖进行纯化,最终获得 5 个高纯度组分。本研究采用 DEAE-52 离子色谱柱和 HW-65F 树脂柱相结合的方式,获得了 LBP1 和 LBP2 这 2 个纯度较高且峰形均一的成分。HW-65F 尺寸排阻树脂是一种大孔树脂,其是由乙烯醇和甲基丙烯酸酯共聚而成的球状体,由于具有窄的颗粒尺寸分布,HW 凝胶树脂对蛋白和多糖等生物大分子有较好的分离效果。已有报道采用 HW-65 凝胶柱对植物多糖按照分子量大小进行分离[22]。

RAW264.7 巨噬细胞的增殖活性是免疫细胞分化成多种功能表型并在免疫应答中发挥相应作用的

前提与基础,而巨噬细胞的吞噬活性反映了巨噬细胞吞噬细胞、清除外源性病原微生物以及内源性死亡细胞的能力[23]。实验结果表明 LBP1 和 LBP2 对 RAW264.7 细胞的增殖和吞噬能力均有明显的调节作用。同时发现 LBP 的 2 个组分均可刺激 RAW264.7 巨噬细胞中细胞因子的表达与释放。细胞因子具有多种生物效应,在机体免疫过程中发挥关键作用,主要表现在诱导炎症反应、杀伤肿瘤细胞、促进巨噬细胞的增殖等功能[24]。其中 IL-6 对 B 细胞终末分化和抗体产生具有刺激作用,并同时能够促进淋巴细胞增殖;TNF-α 能够杀死或抑制肿瘤细胞的生长,并且可提高中性粒细胞的吞噬和分化能力;IL-1β 可促进免疫细胞的活化,对 T 细胞增殖有协同作用,并且参与抗体的产生[25]。此外发现 LBP 可刺激巨噬细胞产生 NO,NO 的释放可使得巨噬细胞有效识别肿瘤等靶细胞,从而达到治疗目的。这与已有研究报道一致,杨青[26]研究发现 LBP 能显著提高 RAW264.7 巨噬细胞的数量,重新调定极化状态,促进其向 M1 的状态转变,有助于巨噬细胞发挥抗炎作用。张小锐等[27]发现 LBP 对 RAW264.7 巨噬细胞中 TNF-α、IL-1β、干扰素(interferon,IFN)-α 和 IFN-β 的 mRNA 表达量有明显调节作用。

已有报道指出植物多糖可通过结合巨噬细胞表面受体,如 Toll 样受体 4(Toll-like receptors 4,TLR4)和补体受体 3(complement receptor 3,CR3)等,激活下游的信号途径,进一步激活 MAPKs 或/和核因子 κB(nuclear factor kappa-B,NF-κB)等下游信号通路,诱导产生多种细胞因子和趋化因子,最终达到免疫调控目的[28]。其中 MAPK 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其包括的 ERK,JNK 和 p38 MAPK 3 个亚族能被 LPS 及其他外源性物质激活,有研究显示植物多糖可通过激活磷酸化 MAPK 信号通路而对巨噬细胞产生调节作用。Long 等[29]发现黄精多糖能与巨噬细胞表面的 TLR4 受体结合,促进信号通路传导,激活 ERK,JNK 和 p38 等蛋白。Xu 等[30]研究发现杏鲍菇多糖可以刺激 RAW 264.7 细胞中 p38,ERK 和 JNK 的磷酸化,并呈现剂量依赖性,表明其可通过 MAPK 通路对巨噬细胞功能产生调控。本实验中亦对 MAPK 信号通路相关蛋白 ERK,JNK 和 p38 进行考察,研究发现 LBP1 和 LBP2 对细胞的活化功能可能与其特异性激活 p-JNK 蛋白信号通路存在联系。但 LBP 调节巨噬细胞免疫反应具体的分子机制仍需进一步研究,如使用 MAPK 的 3 个亚基抑制剂预处理细胞,以明确 LBP 刺激的信号通路。

综上所述,本研究通过 RAW264.7 细胞考察了不同分子量 LBP 的体外免疫调节作用,研究证明 LBP1 和 LBP2 这 2 个多糖组分对巨噬细胞的增殖率和吞噬活性均有明显的正向调节作用,且在不同程度上促进巨噬细胞中 TNF-α,IL-1β,IL-6 和 NO 的 mRNA 表达,呈现剂量依赖关系。通过 Western Blot 法测定显示 LBP 诱导 RAW264.7 细胞产生免疫应答可能与激活 JNK MAPK 通路相关,为进一步深入探讨 LBP 细胞水平的免疫调节作用机制提供了参考。同时发现,在对 RAW264.7 细胞的刺激作用上,LBP1 的调节作用明显优于 LBP2,即分子量较大的 LBP1 成分(M_w = 1 207 kDa)表现出更强的免疫调节作用。

[参 考 文 献]

[1] ZHANG ZP, LIU XM, WU T, *et al*. Selective suppression of cervical cancer Hela cells by 2-O-β-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2011, 27(2): 107 - 121.

[2] ZHANG XR, QI CH, CHENG JP, *et al*. *Lycium barbarum* polysaccharide LBPF4-OL may be a new Toll-like receptor 4/MD2-MAPK signaling pathway activator and inducer[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 19(1): 132 - 141.

[3] NAN Y, WANG R, YUAN L, *et al*. Effects of *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) on immune function of mice[J]. *Afr J Microbiol Res*, 2012, 6(2): 4757 - 4760.

[4] LUO Q, CAI YZ, YAN J, *et al*. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*[J]. *Life Sci*, 2004, 76(2): 137 - 149.

[5] JANEWAU CA Jr, MEDZHITOV R. Innate immune recognition [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20(1): 197 - 216.

[6] UTHAISANGSOOK S, DAY NK, BAHNA SL, *et al*. Innate immunity and its role against infections[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2002, 88(3): 253 - 264.

[7] ZHANG L, WANG CC. Inflammatory response of macrophages in infection[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2014, 13(2): 138 - 152.

[8] 尚京迎, 付海田, 邓超, 等. 基于巨噬细胞模型的竹荪多糖的免疫功能[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 40(8): 849 - 854.

[9] 苗月, 任桂红, 甄东, 等. 蛹虫草多糖调节小鼠巨噬细胞 RAW264.7 免疫活性的分子机制[J]. 食品科学, 2019, 35(9): 188 - 194.

[10] ZHU J, LIU W, YU J, *et al*. Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of *Lycium barbarum* L[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 98(1): 8 - 16.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2015 年版. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.

[12] 张倩, 张民, 王超, 等. 枸杞多糖的分离纯化及结构研究[J]. 食品与发酵工业,2014, 40(12): 41 - 47.

[13] WANG Y, JIN HY, DONG XX, *et al*. Quality evaluation of Lycium barbarum (wolfberry) from different regions in China based on the structure, yield and bioactivities of polysaccharides[J]. *Chin Med*, 2019, 14(1): 1 - 10.

[14] 祖丽胡玛尔·阿卜杜合力力,帕丽达·阿不力孜,木尼萨·迪力夏提,等. 阿里红多糖组分对 RAW264.7 巨噬细胞免疫功能的影响[J]. 食品安全质量检测学报,2017, 8(12):4638 -

4644.
[15] CHEN H, JIAO HW, CHENG Y, *et al*. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) polysaccharides[J]. *J Med Food*, 2016, 19(3): 253 - 265.
[16] 祖丽胡玛尔·阿卜杜合力力, 帕丽达·阿不力孜, 木尼萨·迪力夏提, 等. 阿里红多糖组分对 RAW264.7 巨噬细胞免疫功能的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(12): 4638 - 4644.
[17] WEI W, XIAO HT, BAO WR, *et al*. TLR-4 may mediate signaling pathways of *Astragalus* polysaccharide RAP induced cytokine expression of RAW264.7 cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179: 243 - 252.
[18] 董莎莎, 杨晓彤, 冯慧琴, 等. 云芝糖肽在 ROS、p38 信号通路中对巨噬细胞 RAWA264.7 的免疫调节作用[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(15): 2848 - 2850.
[19] 查倩,江琼,伍亚民, 等. 黄芪多糖含药血清对神经干细胞增殖和分化的影响[J]. 中药材, 2015,38(8):1721 - 1723.
[20] 张琪琳. 香菇多糖的结构鉴定及抗肿瘤作用机制研究[D]. 华中科技大学, 2015.
[21] TANG HL, CHEN C, WANG SK, *et al*. Biochemical analysis and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 77: 235 - 242.
[22] 岳雨曦, 王小燕, 柏丁丁, 等. 野阳合多糖及其纯化组分对胆汁酸的结合能力[J]. 食品科学, 2018, 39(12): 154 - 160.
[23] 崔石阳, 姜帆, 韩建春, 等. 北五味子多糖对 RAW264.7 细胞的免疫调节作用[J]. 食品科学, 2017, 38(19): 201 - 205.
[24] LEE SB, LEE WS, SHIN JS, *et al*. Xanthotoxin suppresses LPS induced expression of iNOS, COX-2, TNF-alpha, and IL-6 via AP-1, NF-kappaB, and JAK-STAT inactivation in RAW 264.7 macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49: 21 - 29.
[25] 吴静, 胡居吾, 熊伟, 等. 樟树果实多糖对巨噬细胞 RAW264.7 的免疫调节作用[J]. 现代食品科技, 2018, 34(9): 12 - 18.
[26] 杨青. 枸杞多糖通过诱导巨噬细胞极化抗胰腺癌的实验研究[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2016.
[27] 张小锐. 枸杞多糖 LBPF4-OL 免疫调节靶细胞及其作用位点研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2011.
[28] 谢燕霞, 安利国, 杨桂文. 植物多糖对巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(4): 307 - 314.
[29] LONG T, LIU Z, SHANG J, *et al*. *Polygonatum sibiricum* polysaccharides play anti-cancer effect through TLR4-MAPK/NF-κB signaling pathways[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 111: 813 - 821.
[30] XU DD, WANG H Y, ZHENG W, *et al*. Charaterization and immunomodulatory activities of polysaccharide isolated from *Pleurotus eryngii*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 92: 30 - 36.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 - 03 - 16