纳豆菌糖肽对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用

曹靖文，黄占旺，吴少福，吴高峰

（江西省天然产物与功能食品重点实验室，江西农业大学食品科学与工程学院，江西南昌 330045）

摘要：为考察纳豆菌糖肽（BNGP）对正常状态及脂多糖（LPS）激活状态巨噬细胞的免疫调节作用，本文用不同浓度的 BNGP 单独处理或 LPS 和不同浓度的 BNGP 共同处理 RAW264.7 巨噬细胞，采用噻唑蓝（MTT）比色法检测细胞增殖作用，中性红吞噬试验检测吞噬能力，Griess 试剂检测细胞培养上清液中 NO 含量，酶联免疫分析法（ELISA）检测细胞培养上清液中细胞因子（IL-1β、TNF-α）、促炎介质（PGE2）含量，Western Blot 检测 COX-2 和 iNOS 蛋白表达水平。试验结果表明：BNGP 在 62.5~500 μg/mL 浓度范围内能提高正常状态的 RAW264.7 巨噬细胞的代谢活力，增加 NO、IL-1β、TNF-α、PGE2 的分泌量，提高 COX-2 和 iNOS 的表达量，高浓度（>125 μg/mL）能增强巨噬细胞的吞噬能力；当细胞处于 LPS 激活状态时，BNGP 在 62.5~500 μg/mL 浓度范围内能抑制 IL-1β、TNF-α、PGE2 的分泌，浓度为 500μg/mL 时可抑制 NO 的产生及 iNOS 的表达，高浓度（>125 μg/mL）则能下调 COX-2 的表达。

关键词：纳豆菌糖肽；巨噬细胞；促炎介质；细胞因子；免疫调节

文章篇号：1673-9078(2015)9-61-67 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.011

Immunomodulatory Effects of *Bacillus natto* Glycopeptides on RAW264.7 Macrophages

CAO Jing-wen, HUANG Zhan-wang, WU Shao-fu, WU Gao-feng

(Jiangxi Key Laboratory of Natural Products and Functional Food, College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: The immunomodulatory effects of *Bacillus natto* glycopeptides (BNGP) on normal and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages were investigated in the present study. After treatment with different concentrations of BNGP or combinations of LPS and BNGP in different concentrations, the proliferation of macrophages was detected by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, the phagocytic activity was detected by neutral red phagocytosis experiments, and the content of nitric oxide (NO) in the cell culture supernatants was detected by the Griess reaction. The production of cytokines (IL-1β, TNF-α) and pro-inflammatory mediator (PGE2) in culture supernatants were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression levels of iNOS and COX-2 were detected using western blotting. The results showed that at concentrations of 62.5–500 μg/mL, BNGP enhanced the metabolic activity of macrophage RAW264.7 in the normal steady state, increased the secretions of NO, IL-1β, TNF-α, and PGE2, and improved the expression levels of iNOS and COX-2; at high concentrations (>125 μg/mL), it enhanced the phagocytic capacity of macrophages. For the LPS-stimulated macrophages, BNGP inhibited the secretions of IL-1β, TNF-α, and PGE2 at concentrations of 62.5–500 μg/mL, inhibited the production of NO and the expression of iNOS at concentrations of 500 μg/mL, and downregulated the expression of COX-2 at high concentrations (>125 μg/mL).

Key words: *Bacillus natto* glycopeptides, macrophages, pro-inflammatory mediator, cytokines, immunomodulation

免疫系统是一个极其复杂而重要的生理体系，巨噬细胞作为免疫系统的第一道防线，几乎参与免疫反应的所有时期。巨噬细胞是重要的炎性细胞，具有多种功能，包括：吞噬和清除凋亡细胞及非功能性的胞外成分，从而维持内环境稳定；分泌各种细胞因子、生长因子和趋化因子参与各种炎症反应；向 T 细胞递呈抗原从而刺激活化 T 细胞[1]。

多糖及糖蛋白复合物参与和介导细胞各种生命现象的调节，特别是免疫调节和抗肿瘤作用。大量的药理和临床研究表明，多糖及糖蛋白复合物是一种良

收稿日期：2014-01-17

基金项目：国家自然科学基金(31160337)

作者简介：曹靖文(1989-)，女，硕士生，研究方向：功能性食品研究与开发

通讯作者：黄占旺(1964-)，男，教授，研究方向：食品微生物与发酵代谢产物

好的非特异性免疫调节剂，可通过活化巨噬细胞和淋巴细胞，促进细胞因子分泌，活化补体，从而增强宿主防御系统，这对于维持机体内环境的平衡具有极其重大的作用[2]。近年来研究发现，许多天然来源的多糖及糖蛋白复合物对巨噬细胞具有免疫促进(如：viili多糖[3])，或免疫抑制（如：金平菇糖蛋白[4]），或二者兼具的双向免疫调节作用（如：云芝糖肽[5]），并且没有明显毒副作用，有望发展成为新的药物、治疗辅助剂或膳食补充剂。

纳豆是日本的传统发酵食品，由大豆经过纳豆芽孢杆菌发酵后制成的。纳豆不仅富含氨基酸、有机酸、寡聚糖等多种易被人体吸收的营养成分，同时还含有多种生理活性物质如纳豆激酶、超氧化物歧化酶、异黄酮、皂苷素、生育酚、维生素等。近年来，随着纳豆制品的保健功能越来越受到人们的重视，国内外学者对纳豆及其提取物的功能作用进行了诸多研究，发现其具有溶血栓、抗肿瘤、降血压、抗氧化、抗菌消炎等保健功能。此外，纳豆仍有许多活性成分及其功能有待人们探究[6]。纳豆菌糖肽（*Bacillus natto* glycopeptide ,BNGP），即从纳豆中获得的一类蛋白结合多糖，在动物实验中发现其对环磷酰胺所致免疫力低下小鼠具有增强免疫功能作用[7]。为了进一步探究BNGP在细胞水平上对免疫调节功能的影响及其分子作用机制，本实验使用RAW264.7巨噬细胞作为研究模型，考察BNGP对正常状态及LPS过度激活状态巨噬细胞的免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小鼠RAW264.7巨噬细胞株：中国科学院细胞库；纳豆芽孢杆菌（*Bacillus natto*）：江西省天然产物与功能食品重点实验室保存。

脂多糖（LPS，*Escherichia coli* 055:B5）、噻唑蓝（MTT）：美国 Sigma 公司； DMEM 培养基（不含酚红）：美国 Gibco 公司；青霉素链霉素混合液（100×）、中性红、二甲基亚砜(DMSO)：北京索莱宝公司；Trypsin（0.25%，with EDTA and Phenol Red）：北京全式金公司；胎牛血清：以色列 BI 公司；小鼠 IL-1β、TNF-α、PGE2 ELISA 试剂盒：武汉优尔生公司；一氧化氮检测试剂盒、Western 及 IP 细胞裂解液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒：江苏碧云天生物技术有限公司；BCA 蛋白测定试剂盒：南京建成科技有限公司；DAB 底物显色试剂盒：天根生化科技有限公司；兔抗鼠 iNOS、COX2 一抗：Cell Signaling Technology 公司；山羊抗兔 IgG 二抗、*β*-actin：北京中杉生物公司。

1.2 主要仪器设备

Multiskan MK3 酶标仪、3121 型 CO_2 培养箱：Thermo Labsystems；恒温培养箱：上海跃进医疗器械有限公司；TGL-20000-CR 高速冷冻离心机：上海安亭科学仪器厂；XD-202 倒置显微镜：南京江南永新光学有限公司；电泳仪、垂直板电泳槽、转膜装置：Bio-Rad; GelDoc-It 310 凝胶成像系统：美国 UVP 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 BNGP 的制备方法

黄豆清洗，浸泡 12 h，蒸煮（121 ℃/15 min），冷却后接种纳豆芽孢杆菌，34 ℃发酵 24 h，4 ℃后熟 12 h，研磨、冻干、粉碎过 40 目筛，石油醚回流脱脂 8-12 h，4 ℃水提过夜，低温离心取上清，95%乙醇醇沉，离心取沉淀，沉淀溶于一定量蒸馏水中按 Sevege 法去游离蛋白，4 ℃透析 48 h，冷冻干燥得到纳豆菌糖肽（BNGP）。

1.3.2 干预试剂配制方法

BNGP 溶液：准确称取一定量的 BNGP 干粉，溶于 DMEM 完全培养基（含 10%胎牛血清，青霉素 100 U/mL，链霉素 100 μg/mL），配成 2 mg/mL 的母液，0.22 μm 微孔滤头过滤除菌，4 ℃保存。实验时按所需浓度用完全培养基进行稀释。

LPS 溶液：向装有 10 mg 脂多糖（LPS）粉末管中加入适量的 PBS，充分溶解后稀释到 10 mL，0.22 μm 微孔滤头过滤除菌即得 1 mg/mL LPS 母液，无菌分装，-20 ℃保存。使用时用完全培养基稀释为所需工作浓度。

1.3.3 细胞培养及试验分组

RAW264.7 细胞用 DMEM 完全培养基（100 U/mL 的青霉素、100 μg/mL 的链霉素、10%的胎牛血清）于 37 ℃、5% CO_2 孵箱培养，细胞生长至 80~90%融合时使用胰酶消化后进行传代或进行实验处理。(1)空白对照组：只加完全培养基；（2）LPS 组：加入终浓度为 1 μg/mL 的 LPS；（3）BNGP 处理组：加入不同浓度的 BNGP 进行干预(MTT 实验设置 6 个 BNGP 浓度：31.25、62.5、125、250、500、1000 μg/mL，选取合适浓度进行后续试验)；（4）LPS+BNGP 处理组：加入与 BNGP 处理组相同浓度的 BNGP 进行预孵 2 h 后，加入终浓度为 1 μg/mL 的 LPS。

1.3.4 BNGP 对巨噬细胞增殖的影响

细胞按 1×10^5 cells/mL 密度种板，培养 2 h 贴壁后进行分组处理。细胞培养 24 h 后每孔加入 5 mg/mL 的噻唑蓝（MTT）20 μL，继续培养 4 h。小心吸弃上清，每孔加入 150 μL DMSO，震荡 10 min，使用酶标仪于 570 nm 波长处测量其吸光度值。

$$细胞相对增值率(\%)=\frac{处理组吸光度值}{空白对照组吸光度值}\times 100$$

1.3.5 BNGP 对巨噬细胞吞噬能力的影响

细胞按 1×10^5 cells/mL 密度种板，培养 2 h 贴壁后进行分组处理。细胞培养 24 h 后吸弃上清，每孔加入 100 μL 0.1%中性红溶液，30 min 后弃除，37 ℃ PBS 洗涤 3 次，每孔加入 200 μL 醇酸裂解液（乙醇和乙酸等体积混合），4 ℃静置过夜，使用酶标仪于 540 nm 波长处测量其吸光度值。

$$中性红吞噬率(\%)=\frac{处理组吸光度值}{空白对照组吸光度值}\times 100$$

1.3.6 BNGP 对巨噬细胞分泌 NO 的影响

细胞按 1×10^6 cells/mL 密度种板，培养 2 h 贴壁后进行分组处理。细胞培养 24 h 后，每孔吸取 50 μL 上清液至 96 孔酶标板中，按照碧云天一氧化氮检测试剂盒说明书，每孔分别加入 Griess A 和 Griess B 试剂各 50 μL，轻轻震荡混匀，使用酶标仪于 540 nm 波长处检测其吸光度值。根据 $NaNO_2$ 标准曲线换算为 NO_2^- 浓度，间接反映 NO 生成量。

1.3.7 BNGP 对巨噬细胞分泌 IL-1β、TNF-α 和 PGE2 的影响

细胞培养方法和 1.2.6 相同，细胞培养 24 h 后收集上清液，1000 r/min 离心 20 min，取上清采用酶联免疫分析法（ELISA）检测 IL-1β、TNF-α 和 PGE2 含量。操作按照试剂盒说明书进行。

1.3.8 BNGP 对巨噬细胞 iNOS、COX-2 蛋白表达的影响

细胞按 1×10^6 cells/mL 接种于 6 孔板中，培养 2h 贴壁后进行分组处理。24 h 后收集细胞提取总蛋白，BCA 法测定各组蛋白浓度并调整一致。取一定量样品与 6×上样缓冲液混匀，100 ℃变性 5 min，后用 8%分离胶、5%浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳，电泳结束后将蛋白转移到 PVDF 膜上，用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h，加 iNOS、COX-2 一抗或 *β*-actin 抗体（1:1000 稀释），4℃孵育过夜，TBST 洗 3 次，每次 5 min。加入 HRP 标记山羊抗兔二抗室温孵育 2 h，TBST 洗 3 次，每次 5 min。DAB 试剂显色，拍照记录，使用凝胶成像系统分析各蛋白 PVDF 膜条带的灰度值。用目的蛋白条带的灰度值除以对应的内参 *β*-actin 蛋白条带灰度值得到一个比值，将对照组目的蛋白的比值设为 1，计算各实验组与对照组的相对值。

1.3.9 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 DPS7.5 软件进行单因素方差分析，并用 Duncan's 新复极差法进行均值多重比较。

2 结果与讨论

2.1 BNGP 对巨噬细胞增殖的影响

表 1 BNGP 对巨噬细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Table 1 Effects of BNGP on the proliferation in macrophages

组别	BNGP 浓度/(μg/mL)	OD_{570nm}	相对增殖率/%
空白对照组	-	0.47±0.03	100 ± 6.73^{dD}
LPS 组	-	0.65±0.01	137.94 ± 1.2^{bAB}
BNGP 组	31.25	0.47±0.05	100.59 ± 10.96^{dD}
	62.5	0.55±0.06	116.70 ± 13.76^{cCD}
	125	0.55±0.05	117.56 ± 12.76^{cCD}
	250	0.60±0.02	129.51 ± 5.14^{bcBC}
	500	0.72±0.06	153.47 ± 11.86^{aA}
	1000	0.46±0.03	97.71 ± 5.85^{dD}

MTT 比色法通过检测活细胞线粒体脱氢酶的活力来反应活细胞数量及细胞活力，在细胞增殖分化以及与细胞代谢有关的免疫学实验中有非常广泛的应用[8]。

表 1 结果表明，随着 BNGP 浓度的升高，细胞的相对增殖率表现出先上升后下降的趋势。当 BNGP 浓度为 31.25 μg/mL 时对细胞的相对增殖率影响不显著，浓度为 62.5 μg/mL 时细胞的相对增殖率增加显著（$p<0.05$），浓度为 125 μg/mL~500 μg/mL 时细胞的相对增殖率增加极显著（$p<0.01$），并在浓度为 500 μg/mL 时达到最大值。当浓度达到 1000 μg/mL 时细胞的相对增殖率呈负增长。根据 MTT 实验结果，选取 4 个试验浓度(62.5、125、250、500 μg/mL)进行后续试验，在此范围内各浓度对细胞有促增殖作用，无细胞毒性。

2.2 BNGP 对巨噬细胞吞噬能力的影响

巨噬细胞是一种重要的吞噬细胞，当病原体入侵或自身组织出现病理性改变时，它能通过细胞内杀伤作用消灭抗原。吞噬能力是衡量巨噬细胞活性的一个重要指标[9]。本文采用吞噬中性红的方法测定巨噬细胞的吞噬能力。由图 1a 结果来看，BNGP 浓度为 250 μg/mL 对巨噬细胞吞噬中性红能力具有显著增强作用（$p<0.05$），浓度为 500 μg/mL 时增强作用极显著（$p<0.01$），效果接近于 LPS，表明高浓度（>125

μg/mL）BNGP 能使巨噬细胞进一步分化成熟，成为活化的巨噬细胞。图 1b 结果显示，不同浓度 BNGP+LPS 组的相对吞噬率均高于空白对照组，与 LPS 组相比，只有 BNGP 浓度为 250 μg/mL 时显著增加了相对吞噬率（p<0.05），表现出与 LPS 的协同作用，但 BNGP+LPS 的作用不会随着 BNGP 浓度的进一步增加而造成巨噬细胞的过度活化。

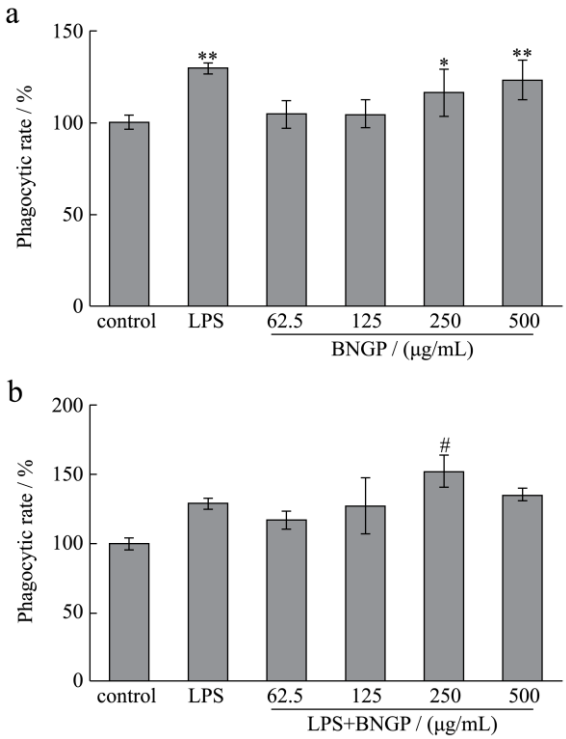


图 1 BNGP 和 LPS+BNGP 对巨噬细胞吞噬能力的影响（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Fig.1 Effects of BNGP and LPS + BNGP on the phagocytic capacity of macrophages

注：a.与空白对照组(control)比较，* P < 0.05，** P < 0.01；b.与 LPS 组比较，# P < 0.05，## P < 0.01。

2.3 BNGP 对巨噬细胞分泌 NO 的影响

NO 是一种重要的活性气体分子，对细胞间和细胞内的信号传递有重要作用，同时参与介导免疫与炎症反应[3]。本文采用目前常用的 Griess 法测定细胞培养上清液的 NO_2^- 含量，间接反应巨噬细胞的 NO 生成量。

图 2a 结果显示，空白对照组巨噬细胞仅分泌少量 NO，细胞经 LPS 激活后 NO 分泌量极显著增加（p<0.01），不同浓度 BNGP 均可极显著促进巨噬细胞生成 NO（p<0.01）。图 2b 结果显示，BNGP 浓度为 500 μg/mL 可显著抑制 LPS 诱导的 NO 分泌（p< 0.05），BNGP 其它浓度组对 NO 分泌的影响与 LPS 组比较无统计学差异。由此可见，BNGP 可促进正常巨噬细胞分泌 NO 从而对细菌等病原体产生杀伤和细胞毒作用，但这种促进作用弱于 LPS，不会引起过度的炎症反应，且在高浓度时对 LPS 引起的 NO 释放有抑制作用。

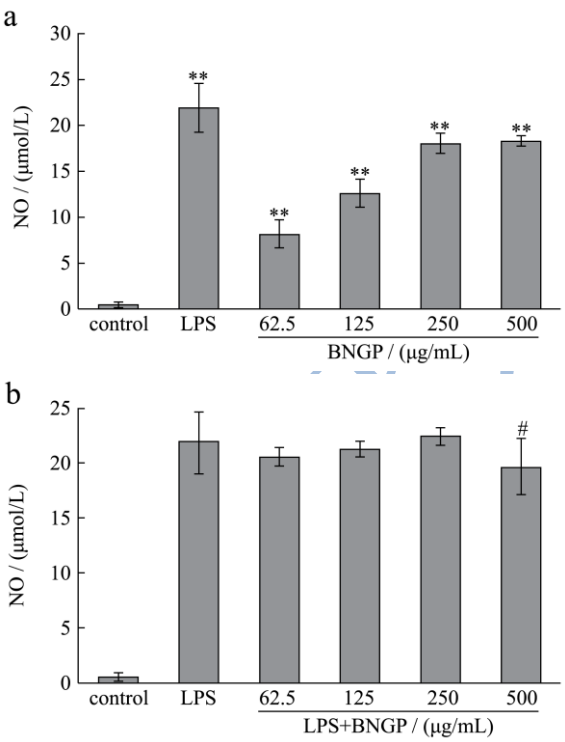


图 2 BNGP 和 LPS+BNGP 对巨噬细胞分泌 NO 的影响（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Fig.2 Effects of BNGP and LPS + BNGP on the production of NO in macrophages

注：a.与空白对照组(control)比较，* P < 0.05，** P < 0.01；b.与 LPS 组比较，# P < 0.05，## P < 0.01。

2.4 BNGP 对巨噬细胞分泌 IL-1β、TNF-α、PGE2 的影响

IL-1 为体内一类重要的细胞因子，具有 IL-1α 和 IL-1β 两种不同的分子形式，但二者可结合相同的细胞表面受体，发挥相同的生物学作用。IL-1 生物学作用非常广泛，能介导多种炎症反应[10]。由图 3（a）可知，与空白对照组相比，IL-1β 的分泌量随 BNGP 浓度的增加而增加，在浓度 500μg/mL 时 IL-1β 分泌量达到最大值，表明 BNGP 对巨噬细胞分泌 IL-1β 具有极显著促进作用（p<0.01）。图 3b 结果显示，BNGP 能极显著抑制 LPS 活化后巨噬细胞 IL-1β 的产生（p< 0.01），并且这种抑制作用呈现剂量关联性。

TNF-α 是目前所发现的炎性细胞因子中抗肿瘤活性最强的，在炎症与肿瘤的发生发展中具有重要作用，可促进单核细胞和巨噬细胞产生或表达 IL-6、IL-1β、PGE2、胶原酶和粘附分子等，进一步扩大全身炎症反应[11]。

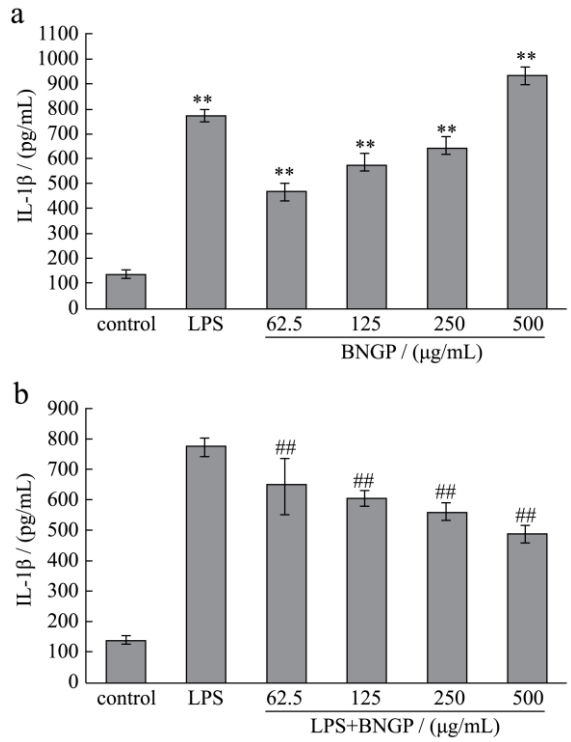


图 3 BNGP 和 LPS+BNGP 对巨噬细胞分泌 IL-1β 的影响（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Fig.3 Effects of BNGP and LPS + BNGP on the production of IL-1β in macrophages

注：a.与空白对照组(control)比较，* P < 0.05，** P < 0.01；b.与 LPS 组比较，# P < 0.05，## P < 0.01。

图 4a 结果显示，随 BNGP 浓度的增加，巨噬细胞 TNF-α 的分泌量呈上升趋势，与空白对照组比较，BNGP 的浓度为 62.5 μg/mL 时，TNF-α 的分泌量增加显著（p<0.05），浓度为 125 μg/mL~500 μg/mL 时，TNF-α 的分泌量增加极显著（p < 0.01）。图 4b 结果显示，不同浓度 BNGP 均能极显著抑制 LPS 诱导的 TNF-α 分泌（p < 0.01）。

PGE2 参与机体多种基础生理功能的调控，包括免疫应答。它是一种很强的脂质促炎介质，在炎症反应中主要由环氧化酶和前列腺素酶催化花生四烯酸转化生成，能增加微静脉、毛细血管后微静脉的通透性[12]。

从图 5a 结果可以看出，与空白对照组相比，不同浓度 BNGP 对巨噬细胞 PGE2 的分泌均有极显著促进作用（p<0.01）。图 5b 结果显示，不同浓度 BNGP 对 LPS 诱导的 PGE2 分泌有极显著抑制作用（p <0.01），与其对 IL-1β、TNF-α 的抑制作用结果类似。活化的巨噬细胞通过分泌多种酶类、细胞因子和促炎介质发挥强大的杀伤微生物和肿瘤细胞的功能，但巨噬细胞在受到如内毒素的过度刺激可能导致脓毒性休克、颅脑损伤、心肌缺血、局部或全身的炎症反应以及一些其它疾病[4]。许多研究发现一些天然产物尤其是中药成分对机体具有双向免疫调节作用，这种调节作用使过高或过低的免疫反应恢复正常[13]。上述结果显示，BNGP 对巨噬细胞的 IL-1β、TNF-α 和 PGE2 的分泌具有类似的双向免疫调节作用。

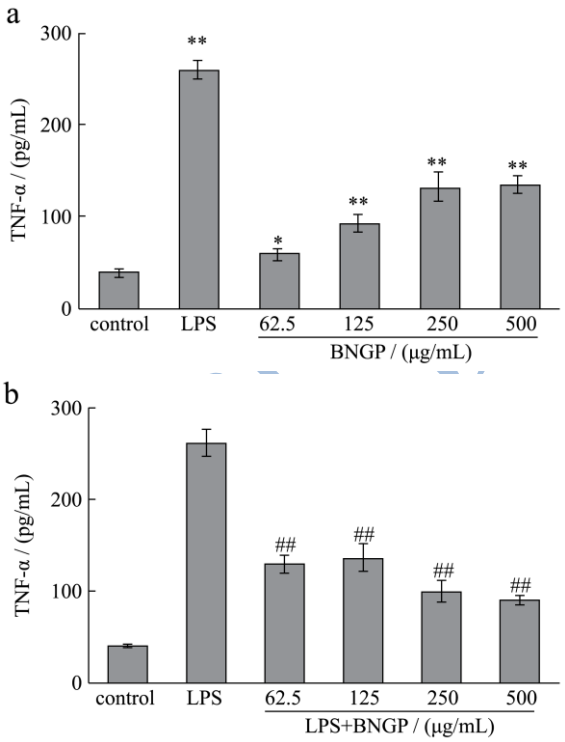


图 4 BNGP 和 LPS+BNGP 对巨噬细胞分泌 TNF-α 的影响（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Fig.4 Effects of BNGP and LPS + BNGP on the production of TNF-α in macrophages

注：a.与空白对照组(control)比较，* P < 0.05，** P < 0.01；b.与 LPS 组比较，# P < 0.05，## P < 0.01。

2.5 BNGP 对巨噬细胞 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响

正常状态下巨噬细胞几乎不表达诱导型一氧化氮合成酶（iNOS）和诱导型环氧化酶（COX-2），经 LPS 刺激后的巨噬细胞可大量表达，二者分别是 NO 和 PGE2 合成的上游关键酶，参与炎症发生、发展的关键步骤，对其调控是免疫类药物的重要靶点[14]。由图 6a 和表 2 可以看出，与空白对照组相比，低浓度（≤125 μg/mL）BNGP 显著促进巨噬细胞 iNOS 的表达（p<0.05），高浓度（>125 μg/mL）BNGP 则极显著促进巨噬细胞 iNOS 的表达（p<0.01）；当 BNGP 浓度为 62.5 μg/mL 时，巨噬细胞 COX-2 的表达量显著增加（p<0.05），浓度为 125 μg/mL~500 μg/mL 时，COX-2 的表达量极显著增加（p<0.01）。这表明 BNGP 对巨噬

细胞 NO 和 PGE2 的促进作用通过上调其对应的关键酶表达实现。由图 6b 和表 3 则可以看出，低浓度（≤125 μg/mL）BNGP 与 LPS 对 iNOS 的表达表现为协同作用，这种协同作用在图 2b 结果中未发现，需要后续试验进一步探究原因；BNGP 浓度为 500 μg/mL 时极显著抑制 iNOS 的表达（$p<0.01$）。BNGP 在低浓度（≤125 μg/mL）对 COX-2 的表达无抑制作用，高浓度（>125 μg/mL）则表现出极显著抑制作用（$p<0.01$）。这与图 5b 的结果不完全相同，我们推测，BNGP 还有可能通过抑制 COX-2 的酶活性而引起 PGE2 分泌量下降。

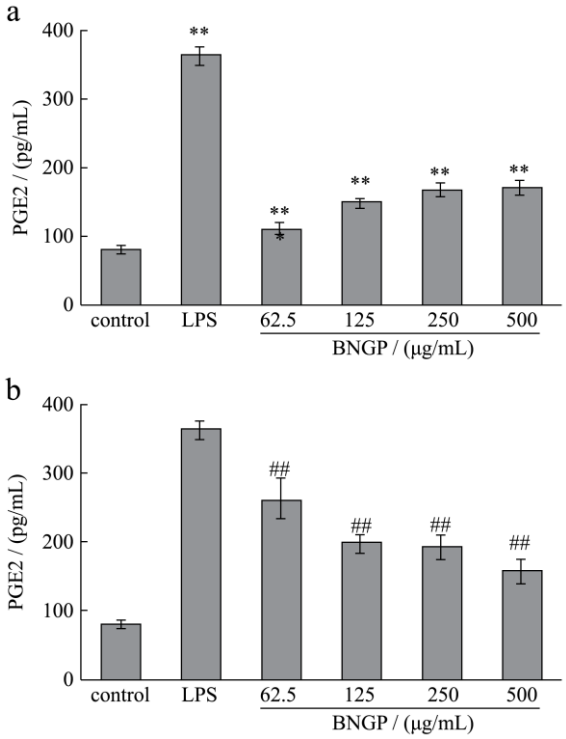


图 5 BNGP 和 LPS+BNGP 对巨噬细胞分泌 PGE2 的影响（ $\bar{x}\pm s$，n=4）

Fig.5 Effects of BNGP and LPS + BNGP on the production of PGE2 in macrophages

注：a.与空白对照组(control)比较，* P < 0.05，** P < 0.01；b.与 LPS 组比较，# P < 0.05，## P < 0.01。

表 2 BNGP 对巨噬细胞 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响（ $\bar{x}\pm s$, n=3）

Table 2 Effects of BNGP on iNOS and COX-2 protein expression in macrophages

组别	BNGP 浓度 /(μg/mL)	相对灰密度值 iNOS	相对灰密度值 COX-2
空白对照组	-	1 ± 0.05^{eC}	1 ± 0.34^{dD}
LPS 组	-	9.95 ± 0.05^{aA}	59.99 ± 9.07^{aA}
BNGP	62.5	2.96 ± 0.50^{dBC}	14.16 ± 7.04^{cCD}
	125	2.52 ± 0.27^{dBC}	17.03 ± 7.55^{cC}
	250	4.60 ± 0.01^{cB}	20.81 ± 1.35^{cBC}
	500	8.23 ± 1.47^{bA}	33.18 ± 5.94^{bB}

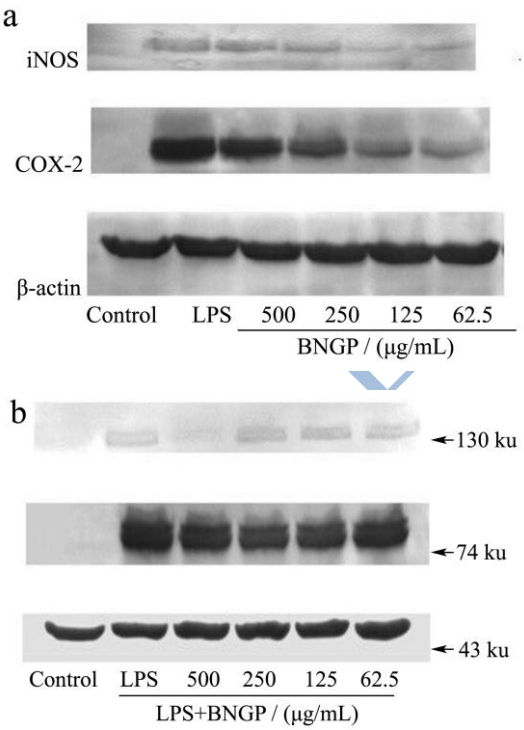


图 6 BNGP 和 LPS+BNGP 对巨噬细胞 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of BNGP and LPS + BNGP on iNOS and COX-2 protein expression in macrophages

表 3 BNGP+LPS 对巨噬细胞 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响（ $\bar{x}\pm s$, n=3）

Table 3 Effects of BNGP + LPS on iNOS and COX-2 protein expression in macrophages

组别	BNGP 浓度 /(μg/mL)	相对灰密度值 iNOS	相对灰密度值 COX-2
空白对照组	-	1 ± 0.32^{eD}	1 ± 0.10^{dC}
LPS 组	-	11.16 ± 0.82^{cB}	33.00 ± 3.95^{aA}
BNGP+LPS (1 μg/mL)	62.5	18.73 ± 1.84^{aA}	35.17 ± 6.90^{aA}
	125	15.92 ± 1.36^{bA}	28.59 ± 0.83^{abAB}
	250	11.04 ± 2.02^{cB}	22.32 ± 4.42^{bcB}
	500	4.87 ± 1.95^{dC}	21.09 ± 2.96^{cB}

3 结论

本试验使用 RAW264.7 巨噬细胞作为研究模型，研究纳豆糖肽（BNGP）对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用。试验结果表明：（1）在 62.5~500 μg/mL 浓度范围内 BNGP 能促进正常状态巨噬细胞的增殖并提高其代谢活性，活化巨噬细胞从而增加细胞因子（IL-1β、TNF-α）和促炎介质（NO、PGE2）的分泌量，且呈现出一定的剂量关联性；高浓度（>125μg/mL）BNGP 能刺激巨噬细胞进一步分化成熟，增强其吞噬能力。这表明 BNGP 是一种免疫激活剂，可提高机体

的免疫水平。（2）当巨噬细胞处于 LPS 激活状态时，BNGP 在一定浓度（250 μg/mL）可协同 LPS 增强其吞噬能力，在 62.5~500 μg/mL 浓度范围内 BNGP 能抑制细胞因子（IL-1β、TNF-α）和促炎介质（PGE2）的分泌，在 BNGP 浓度达到 500μg/mL 时对 NO 的抑制作用有显著效果。这表明 BNGP 同时是一种免疫抑制剂，在一定程度上可防止免疫过度造成机体的损伤。（3）随着 BNGP 浓度增大，巨噬细胞 iNOS 和 COX-2 的表达量增加。低浓度（≤125μg/mL）BNGP 与 LPS 表现为协同作用，BNGP 浓度为 500μg/mL 时能下调 LPS 诱导的 iNOS 的表达；低浓度（≤125μg/mL）BNGP 对 LPS 诱导的 COX-2 表达无显著作用，高浓度（>125 μg/mL）BNGP 对 LPS 诱导的 COX-2 表达有极显著抑制作用。因此，BNGP 对巨噬细胞分泌 NO 和 PGE2 的调节作用除通过调控其上游关键酶 iNOS 和 COX-2 的表达以外，还有可能从其它途径发挥作用，有关机理尚需要通过后续试验探究。

参考文献

[1] 李丹,任亚娜,范华骅.巨噬细胞的分类及其调节性功能的差异[J].生命科学,2011,23(3):249-253
LI Dan, REN Ya-na, FAN Hua-hua. Macrophages classification and the difference of their regulatory function[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23(3): 249-253

[2] Ooi W E C, Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes [J]. Current Medicinal Chemistry, 2000, 7: 715-729

[3] Wu J H, Li MX, Liu L, et al. Nitric oxide and interleukins are involved in cell proliferation of RAW264.7 macrophages activated by viili exopolysaccharides [J]. Inflammation, 2013, 36(4): 954-961

[4] Chen J N, De Mejia E G, Wu J S B. Inhibitory effect of a glycoprotein isolated from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus)* on the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in RAW 264.7 macrophage [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59: 7092-7097

[5] 任文智.云芝糖肽(PSP)对小鼠巨噬细胞的双向免疫调节及 NF-κB 信号通路的调控研究[D].上海:上海师范大学,2010
REN Wen-zhi. A Study of the bidirectional immunomodulatory effects of *Trametes versicolor* polysaccharopeptide (PSP) on mouse macrophage and its regulation on NF-κB signal pathway [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2010

[6] 高瑞萍,刘辉,刘嘉,等.纳豆的研究进展[J].食品与发酵科技,2011,47(1):23-26
GAO Rui-ping, LIU Hui, LIU Jia, et al. The research development of natto [J]. Food and Fermentation Technology, 2011, 47(1): 23-26

[7] 沈柱英, 黄占旺, 曹靖文. 纳豆菌糖肽对免疫功能低下小鼠的免疫调节作用[J]. 营养学报, 2014,36(4):361-365
SHEN Zhu-ying, HUANG Zhan-wang, CAO Jing-wen. The immunoregulating effect of *Bacillus natto* glycopeptides in immuno-suppressed mice [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2014, 36(4): 361-365

[8] 白生宾,陈红香,钟近洁,等.MTT 法检测 RAW264.7 细胞活力及可能因素分析[J].中国现代医学杂志,2011,21(23):2831-2833
BAI Sheng-bin, CHEN Hong-xiang, ZHONG Jin-jie, et al. RAW264.7 cell viability via MTT assay and possible factor analysis [J]. China Journal of Modern Medicine, 2011, 21(23): 2831-2833

[9] 陈健, 向莹. 滑子菇多糖的免疫活性及抗肿瘤作用[J]. 现代食品科技, 2013,29(8):1800-1804
CHEN Jian, XIANG Ying. Immunological and Antitumor Activities of the Polysaccharides from *Pholiota nameko* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 1800-1804

[10] Dinarello C A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism [J]. Blood ,1991,77,1627-1652

[11] Heo S J, Yoon W J, Kim K N, et al. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48: 2045-2051

[12] Tanigawa T, Odkhuu E, Morikawa A, et al.Immunological role of prostaglandin E2 production in mouse auditory cells in response to LPS [J]. Innate Immunity,2014, 20(6): 639-646

[13] 马洪第,卢芳汀,陶艳艳,等.中药免疫调节作用的研究进展[J].临床肝胆病杂志,2011,27(5):462-466
MA Hong-di, LU Fang-ting, TAO Yan-yan, et al. Immunological regulation of Chinese herbal medicine [J]. Journal of Clinical Hepatology, 2011, 27(5): 462-466

[14] Xiong H Z, Cheng Y, Zhang X, et al. Effects of taraxasterol on iNOS and COX-2 expression in LPS-induced RAW264.7 macrophages [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 155: 753-757.