

纳豆菌糖肽对 RAW264.7 巨噬细胞 NF- κ B 核转位的影响

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: 本文采用免疫荧光法分析纳豆菌糖肽(BNGP)对 RAW264.7 巨噬细胞 NF- κ B p65 核转位的影响, Western blot 检测 BNGP 对 NF- κ B p65 在细胞质及细胞核的表达的影响, 流式细胞术分析 BNGP 对 LPS-FITC 与细胞表面受体结合的影响。结果显示: 62.5~500 μ g/mL BNGP 组的发生 NF- κ B p65 核转位的细胞比例均极显著高于空白对照组; 高浓度 BNGP (500 μ g/mL) 能显著减少由 LPS 诱导发生 NF- κ B p65 核转位的细胞比例, 而低浓度 BNGP (\leq 250 μ g/mL) 则与 LPS 组无显著差异。62.5~500 μ g/mL BNGP 单独作用于细胞时, NF- κ B p65 在细胞质中表达量下降而在细胞核中表达量上升, 表明 BNGP 可促进巨噬细胞 NF- κ B p65 从胞质转移入核; 62.5~500 μ g/mL BNGP 与 LPS 共同作用时, 则 NF- κ B p65 在细胞质中表达量上升而细胞核中表达量下降, 表明 BNGP 可抑制 LPS 诱导的 NF- κ B p65 大量从胞质转移入核。62.5~500 μ g/mL BNGP 均能减少 LPS-FITC 结合到巨噬细胞上的量, 其中 500 μ g/mL BNGP 作用极显著, 表明 BNGP 对 LPS-FITC 与细胞表面受体的结合具有干扰作用。

关键词: 纳豆菌糖肽; 巨噬细胞; 免疫调节; 核转录因子

文章编号: 1673-9078(2016)2-46-52

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.008

Effect of *Bacillus natto* Glycopeptide on Nuclear Translocation of Nuclear Factor- κ B in 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 effect of *Bacillus natto* glycopeptide (BNGP) on the nuclear translocation of nuclear factor (NF)- κ B p65 into the nucleus of RAW264.7 macrophages was studied using immunofluorescence; its effect on NF- κ B p65 expression in the cytoplasm and nucleus was detected by western blot, while its effect on fluorescein isothiocyanate-lipopolysaccharide (LPS-FITC) binding to cell receptors was determined by flow cytometry. The results showed that the percentage of the cells with NF- κ B p65 nuclear translocation in 62.5~500 μ g/mL BNGP groups was significantly higher than that in the control group. High-dose BNGP (500 μ g/mL) significantly reduced the percentage of cells with NF- κ B p65 nuclear translocation induced by LPS and no significant changes were found between the low dose (\leq 250 μ g/mL) BNGP and LPS groups. When macrophages were treated with 62.5~500 μ g/mL BNGP alone, NF- κ B p65 expression level increased in the nucleus and decreased in the cytoplasm, suggesting that BNGP promoted the translocation of NF- κ B p65 from cytoplasm to nucleus. When macrophages were treated with 62.5~500 μ g/mL BNGP and LPS, the expression level of NF- κ B p65 increased in the cytoplasm and decreased in the nucleus, suggesting that BNGP inhibited the LPS-induced nuclear translocation of NF- κ B p65 from the cytoplasm to the nucleus in RAW264.7 cells. BNGP also reduced the amount of LPS-FITC bound to macrophages at doses ranging from 62.5 to 500 μ g/mL, where 500 μ g/mL BNGP showed a significant effect, indicating that BNGP interferes with the binding of LPS-FITC to macrophages.

Key words: *Bacillus natto* glycopeptides; macrophages; immunoregulation; nuclear factor- κ B

收稿日期: 2015-04-23

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

炎症是免疫系统对感染和刺激的第一应答, 在许多疾病的发生和发展中具有重要作用^[1]。在受到外来有害刺激时, 炎症作为机体的保护机制被启动。适当的炎症反应对于宿主防御中移除有害刺激并启动恢复机制具有积极作用, 但过度的炎症反应将会导致机体内平衡失调, 被认为是导致机体损伤、脓毒血症、恶

性肿瘤和休克等的重要因素,甚至危及生命^[2]。

巨噬细胞是参与炎症进程的一类重要的细胞,在体外抗炎实验中,常使用细菌脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)刺激巨噬细胞以建立炎症模型。炎症的进程与许多转录因子如 NF- κ B、AP-1 等密切相关^[3]。其中, NF- κ B 通过调节细胞因子、趋化因子、黏附分子、急性时相蛋白和诱导效应酶类的表达从而参与先天性免疫应答^[4]。静息状态下, NF- κ B 和 I κ B 结合形成异源三聚体,以非活化的方式存在于胞浆中,在一些免疫刺激物(如:脂多糖、病毒产物、细胞因子等)的作用下, I κ B 发生降解, NF- κ B 被释放进而转移至细胞核内,启动各种炎症介质基因的转录和翻译,发挥转录水平的调控作用^[5]。NF- κ B 在一定的程度上的激活是机体生理需要和防御反应的表现,将作为一个靶位点用于临床治疗,另一方面,在机体处于过度炎症反应的状态下,抑制 NF- κ B 的活化入核,也是许多抗炎药物的重要靶点^[2]。

纳豆菌糖肽(*Bacillus natto* glycopeptide, BNGP),即从纳豆中提取分离的一类蛋白结合多糖,对小鼠巨噬细胞炎症介质及细胞因子的分泌等具有双向免疫调节作用(另文发表)。本研究拟从体外培养 RAW264.7 巨噬细胞,观察 BNGP 对正常状态及 LPS 诱导活化的 RAW264.7 巨噬细胞 NF- κ B 核转位的影响,进一步探讨其免疫调节相关机制。

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;细胞培养瓶(25 cm²):美国 Corning 公司;6 孔细胞培养板、一次性无菌离心管(1.5 mL、15 mL、50 mL):广州洁特生物过滤股份有限公司(JET);PVDF 膜:美国 Millipore 公司。

脂多糖(LPS, *Escherichia coli* 055:B5)、FITC-LPS (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 \times):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;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;胞核胞浆蛋白提取试剂盒:北京普利莱基因技术有限公司;DAB 底物显色试剂盒:天根生化科技有限公司;兔抗鼠 NF- κ B p65、TBP 一抗: Cell Signaling Technology 公司;山羊抗兔

IgG 二抗、 β -actin:北京中衫生物公司;多聚赖氨酸溶液、DAPI 染色试剂盒:南京凯基生物科技发展有限公司;FITC 羊抗小鼠二抗:美国 Jackson Immuno Research 公司。

1.2 主要仪器设备

3121 型 CO₂ 培养箱: Thermo LabSystems; 恒温培养箱: 上海跃进医疗器械有限公司; 5415D 型 Eppendorf 小型高速离心机: 德国 Eppendorf 公司; 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; 流式细胞仪: 美国 Becton-Dickinson FACS Calibur。

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 °C/15 min), 冷却后接种纳豆芽孢杆菌, 34 °C 发酵 24 h, 4 °C 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 °C 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 °C 透析 48 h, 冷冻干燥得到纳豆菌糖肽(BNGP)。

1.3.2 细胞培养与分组

RAW264.7 细胞用 DMEM 完全培养基(100 U/mL 的青霉素、100 μ g/mL 的链霉素、10% 的胎牛血清)于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 细胞生长至 80~90% 融合时使用胰酶消化后进行传代或进行试验处理。

1.3.2.1 NF- κ B 核转位试验分组(免疫荧光和免疫印迹)

细胞 5 \times 10⁵ 接种于 6 孔板中, 按如下方式分组:

(1) 空白对照组: 只加完全培养基; (2) LPS 组: 加入终浓度为 1 μ g/mL 的 LPS; (3) BNGP 处理组: 加入终浓度为 62.5、125、250、500 μ g/mL 的 BNGP (MTT 试验已证实 BNGP 在此浓度范围内无细胞毒性) 进行干预; (4) LPS+BNGP 处理组: 加入与 BNGP 处理组相同浓度的 BNGP 进行预孵 1 h 后, 再加入终浓度为 1 μ g/mL 的 LPS。以上各组在 CO₂ 培养箱中培养 1 h。

1.3.2.2 流式细胞术试验分组

细胞 5 \times 10⁵ 接种于 6 孔板中, 按如下方式分组:

(1) LPS-FITC 组: 加入终浓度为 10 μ g/mL LPS-FITC 孵育 30 min; (2) LPS-FITC 对照组: 加入等量完全培养基孵育 30 min; (3) BNGP 干扰组: 加入 BNGP 终浓度为 62.5、125、250、500 μ g/mL 孵育 30 min, 然后加入终浓度为 10 μ g/mL LPS-FITC 孵育 30 min;

(4) BNGP 对照组: 加入 BNGP 终浓度为 62.5、125、250、500 $\mu\text{g/mL}$ 孵育 30 min; (5) LPS 干扰组: 加入终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 孵育 30 min, 然后加入终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS-FITC 孵育 30 min; (6) LPS 对照组: 加入终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 孵育 30 min。

1.3.3 免疫荧光观察 BNGP 对 NF- κ B 核转位的影响

细胞培养结束后, 吸弃旧培养基, 自然晾干, 每孔加入 4% 的多聚甲醛固定液固定 30 min, PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min。每孔加入 0.5% Triton X-100, 室温通透 20 min, PBS 浸洗, 每次 3 min。每孔滴加 2 滴 3% H_2O_2 -甲醇溶液, 室温封闭 10 min。PBS 浸洗 3 次。每孔加入即用型山羊血清 100 μL , 室温孵育 20 分钟。每孔加入 p65 抗体(1:400 稀释)100 μL , 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。孵育结束后, PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min。每孔加入 FITC 标记的二抗 (1:200 稀释) 100 μL , 37 $^\circ\text{C}$, 避光孵育 1 h。孵育结束后 PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min。每张片子滴加配制 DAPI 染液 100 μL , 室温避光放置 5 min。用防萃灭封片胶封片。荧光显微镜下观察细胞中蛋白的表达情况, 取 3 个高表达区域拍照保存, 并统计发生核转位的细胞数占总的细胞数的比例。

1.3.4 免疫印迹法检测 BNGP 对 NF- κ B 核转位的影响

1.3.4.1 细胞核、细胞质蛋白提取方法

细胞培养结束, 移除培养基, PBS 洗 1 次, 胰酶消化后收集细胞入 1.5 mL 离心管, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 重悬, 洗涤细胞两次。每管细胞中加入 300 μL 细胞质提取液 A (CEB-A), 涡旋 30 s, 冰浴 10 min, 期间每 5 min 涡旋 30 s。加 18 μL 细胞质提取液 B (CEB-B), 涡旋 10 s, 冰浴 1 min。4 $^\circ\text{C}$, 1000 r/min 离心 5 min, 上清液转移到新的离心管中, 4 $^\circ\text{C}$, 12000 r/min 再次离心 5 min。上清液即为细胞质提取蛋白, 转移至新的离心管中, -80 $^\circ\text{C}$ 保存。

收集加完 CEB-B 离心后的沉淀物, 即为细胞核粗蛋白, 加入 100 μL 细胞质提取液 A (CEB-A) 洗涤沉淀, 1000 r/min 离心 5 min, 去上清。加入 70 μL 预冷细胞核提取液 (NEB), 涡旋混匀, 冰浴 30 min, 期间每 5 min 涡旋 10 s, 4 $^\circ\text{C}$, 12000 r/min 离心 5 min。上清液即为细胞核提取蛋白, 转移至新的离心管中, 于 -80 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.3.4.2 Western Blot

BCA 法测定各组蛋白浓度并调整一致。取一定量样品与 2 \times 上样缓冲液混匀, 100 $^\circ\text{C}$ 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 NF- κ B p65 一抗、 β -actin 抗体 (胞浆蛋白内参)、TBP 抗体 (胞核蛋白内参) (均为 1:1000 稀释), 4 $^\circ\text{C}$ 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蛋白条带灰度值得到一个比值, 将对照组的蛋白的比值设为 1, 计算各实验组与对照组的相对值。

1.3.5 流式细胞术检测 BNGP 对 FITC-LPS 结合细胞膜表面受体的影响

细胞处理结束后, 使用胰酶消化收集细胞, 用 PBS 洗涤细胞 2 次 (离心 2000 r/min, 5 min)。细胞用流式细胞仪检测各组荧光强度, 激发波长 488 nm, 测定波长 525 nm, 每管样品检测 10000 个细胞, 计算各组平均荧光强度。其中, 以 LPS-FITC 干扰组、BNGP 干扰组、LPS 干扰组的荧光强度作为阳性荧光值, 用 LPS-FITC 对照组、BNGP 对照组、LPS 对照组的荧光强度消除对应组的荧光背景值。根据下列公式计算出相对平均荧光强度值:

相对平均荧光强度值 = 阳性荧光值 - 背景荧光值

1.3.6 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 NF- κ B 核转位的调控(免疫荧光法)

NF- κ B 在静息态时存在于细胞质中, 受到外界刺激后将被激活从而快速转移入细胞核内, 使用荧光物质标记 NF- κ B 后观测其在胞质及胞核的分布情况, 可初步分析药物对细胞发生 NF- κ B 核转位的影响^[6]。

巨噬细胞中 NF- κ B p65 经 FITC 标记后产生绿色荧光, 在荧光显微镜下观察结果。空白对照组的巨噬细胞绿色荧光主要分布在细胞质区, 而细胞核区几乎没有出现绿色荧光[图 1(a)]。LPS 组的绿色荧光在细胞核区有明显分布, 提示 NF- κ B p65 出现核转位, 细胞为激活状态[图 1(b)]。BNGP 处理组细胞的核区出现了不同程度的绿色荧光分布, 其中 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 组较少细胞核区出现荧光[图 1(c)], 与空白对照组差异不明显, 而 500 $\mu\text{g/mL}$ 组的细胞核区出现荧光的细胞较多[图 1(g)], 接近 LPS 组。250 $\mu\text{g/mL}$ BNGP+LPS 组及

500μg/mL BNGP+LPS 组的细胞核区出现荧光的细胞较 LPS 组减少[图 1(h)、图 1(i)], 提示高浓度 BNGP 对 NF-κB p65 的核转位有一定抑制作用, 而其它浓度 BNGP+LPS 组则无明显抑制作用。

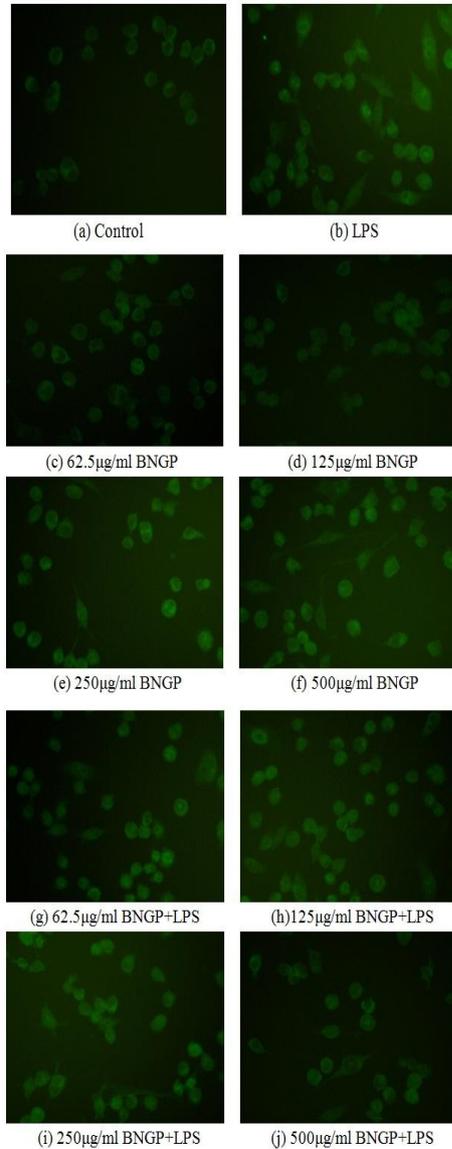


图 1 免疫荧光观察 BNGP 对巨噬细胞 NF-κB 核转位的影响
Fig.1 Effects of BNGP on the macrophage translocation of NF-κB, visualized by immunofluorescence

上述每张片子经 DAPI 染液染核后, 高倍镜下计数 100 个细胞, 计算发生核转位的细胞数占总计数细胞的比例, 结果如表 1 所示: 空白对照组无细胞发生核转位, LPS 组发生核转位率为 81.85±3.15%, 与空白对照组相比差异极显著 ($p < 0.01$), 表明 LPS 能强烈刺激巨噬细胞 NF-κB 发生核转位。62.5~500 μg/mL BNGP 作用后, 各组细胞核转位率分别较空白对照组上升了 21.23%、67.87%、70.66%、77.01%, 且具有统计学显著性 ($p < 0.01$), 表明 BNGP 能活化巨噬细胞从而发生 NF-κB 核转位; 500 μg/mL

BNGP+LPS 组核转位率较 LPS 组下降了 14.09%, 表明较高浓度 BNGP 能显著抑制 LPS 引起的 NF-κB 核转位 ($p < 0.05$), 而其它浓度 BNGP+LPS 组与 LPS 组相比无显著差异 ($p > 0.05$)。

表 1 巨噬细胞的 NF-κB p65 核转位率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Nuclear translocation rate of NF-κB p65 in macrophages

组别	发生核转位细胞比例/%
Control	0.00±0.00 ^{eD}
LPS	81.85±3.15 ^{abAB}
62.5 μg/mL	21.23±8.09 ^{dC}
125 μg/mL	67.87±5.08 ^{cB}
250 μg/mL	70.66±8.43 ^{cB}
500 μg/mL	77.01±4.63 ^{bcAB}
62.5 μg/mL+LPS	89.28±6.68 ^{aA}
125 μg/mL+LPS	88.03±9.74 ^{aA}
250 μg/mL+LPS	76.40±2.56 ^{bcAB}
500 μg/mL+LPS	67.76±4.52 ^{cB}

注: 同列数据不同小写字母代表差异显著 ($p < 0.05$), 不同大写字母代表差异极显著 ($p < 0.01$)。

2.2 BNGP 对 NF-κB 核转位的调控(免疫印迹法)

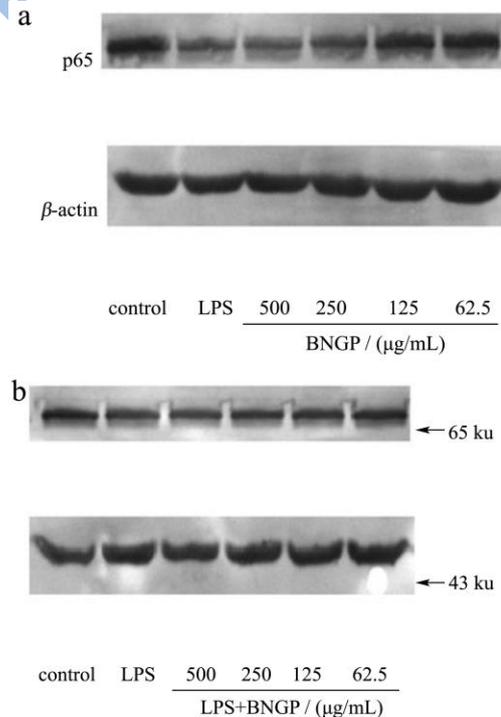


图 2 BNGP 和 LPS+BNGP 对巨噬细胞的细胞质中 p65 蛋白表达的影响

Fig.2 Effects of BNGP and LPS+BNGP on p65 protein expression in the macrophage cytoplasm

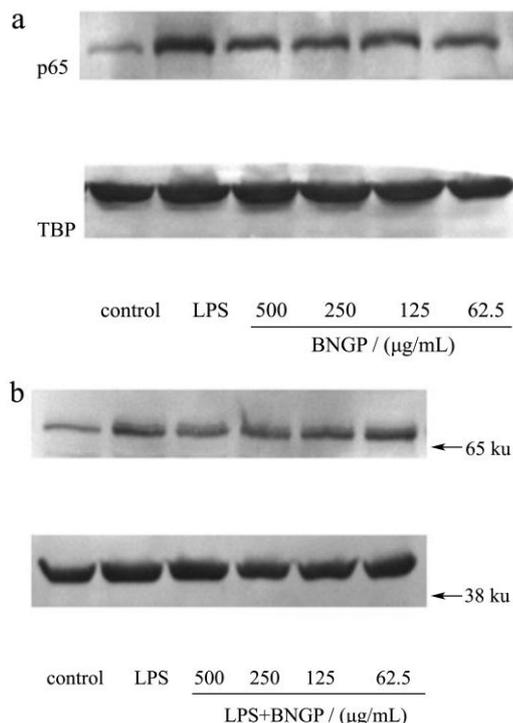


图3 BNGP和LPS+BNGP对巨噬细胞的细胞核中p65蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of BNGP and LPS+BNGP on p65 protein expression in the macrophage nucleus

表2 BNGP对巨噬细胞的细胞质及细胞核中p65蛋白表达的影响 (x±s, n=3)

Table 2 Effects of BNGP on p65 protein expression in the macrophage cytoplasm and nucleus

组别	BNGP 浓度 / (μg/mL)	相对灰密度值	
		细胞质	细胞核
空白对照组	-	1±0.06 ^{aA}	1±0.13 ^{dD}
LPS 组	-	0.52±0.03 ^{dD}	3.94±0.05 ^{aA}
BNGP	62.5	0.77±0.05 ^{bB}	1.85±0.18 ^{cC}
	125	0.75±0.02 ^{bBC}	2.53±0.13 ^{cB}
	250	0.65±0.05 ^{cC}	2.13±0.12 ^{dC}
	500	0.66±0.01 ^{cC}	2.89±0.23 ^{bB}

注: 同列数据不同小写字母代表差异显著 (p < 0.05), 不同大写字母代表差异极显著 (p < 0.01)。

基于 2.1 免疫荧光的结果, 本文进一步通过 Western blot 研究了 BNGP、LPS+BNGP 对细胞质及细胞核中 NF-κB p65 变化的影响。从上述结果可以看出, 当巨噬细胞未被激活时 (空白对照组), p65 大量存在于细胞质中, 当细胞受到 LPS 的作用时, p65 的相对表达量下降极显著 (p < 0.01), 提示细胞已被激活从而启动了 NF-κB 信号通路。与空白对照组相比, 62.5-500 μg/mL BNGP 作用于细胞时, 细胞质中的 p65 的相对表达量分别下调 23%、25%、35%、34%, 均

具有统计显著性 (p < 0.01) [图 2 (a) 和表 2]。与 LPS 组相比, 62.5~500 μg/mL BNGP 与 LPS 共同作用于细胞时, 细胞质中的 p65 的相对表达量均有不同程度升高: 其中, BNGP 浓度在 62.5 μg/mL 时 p65 相对表达量上调 29.3% (p < 0.05), 在 125、250、500 μg/mL 时分别上调 43.1%、44.8%、36.2% (p < 0.01) [图 2 (b) 和表 3]。

表 3 LPS+BNGP 对巨噬细胞的细胞质及细胞核中 p65 蛋白表达的影响 (x±s, n=3)

Table 3 Effects of LPS+BNGP on p65 protein expression in the macrophage cytoplasm and nucleus

组别	BNGP 浓度 / (μg/mL)	相对灰密度值	
		细胞质	细胞核
空白对照组	-	1±0.03 ^{aA}	1±0.09 ^{dD}
LPS 组	-	0.58±0.02 ^{cC}	3.85±0.27 ^{aA}
BNGP+LPS (1 μg/mL)	62.5	0.75±0.01 ^{bBC}	3.58±0.21 ^{abAB}
	125	0.83±0.08 ^{bAB}	3.33±0.18 ^{bB}
	250	0.84±0.12 ^{bAB}	3.30±0.08 ^{bB}
	500	0.79±0.09 ^{bB}	2.82±0.07 ^{cC}

注: 同列数据不同小写字母代表差异显著 (p < 0.05), 不同大写字母代表差异极显著 (p < 0.01)。

本文同时研究了细胞核中 p65 的变化。由于巨噬细胞在受到 LPS 的刺激时, NF-κB 被活化从而转位入核, 因此 LPS 组的细胞核内 p65 的相对表达量是空白对照组的 3.85 倍。不同浓度 BNGP 作用于细胞时, 细胞核中的 p65 的相对表达量均极显著高于空白对照组 (p < 0.01), 其中 500 μg/mL 组的表达量最高, 为空白对照组的 2.89 倍 [图 3 (a) 和表 2]。另一方面, BNGP 与 LPS 共同作用时, BNGP 浓度为 125、250、500 μg/mL 时细胞核内 p65 的表达量与 LPS 组相比分别下降了 13.5%、14.3%、26.8% (p < 0.01), 而 BNGP 在浓度为 62.5 μg/mL 时无显著作用 (p > 0.05) [图 3 (b) 和表 3]。综上试验结果, NF-κB p65 在细胞核和细胞质中的变化规律基本一致: 即 BNGP 能激活巨噬细胞引发 p65 从胞质入核, 另一方面, BNGP 能抑制 LPS 诱导的 p65 大量转位入核, 使部分 p65 停留在细胞质中。

研究发现, 许多天然抗炎药物都通过抑制 NF-κB 转位入核实现。刘晶等^[7]使用牛蒡低聚果糖 (BFOS) 预处理 RAW264.7 细胞 1 h, 再与 LPS 共同作用 1 h, 细胞内 Phospho-p65 的蛋白表达量较 LPS 单独处理组显著下降。乔静等^[8]研究发现 p65 在正常的 RAW264.7 细胞核内水平较低, LPS 刺激 4 h 后核内 p65 水平显著升高, 而葫芦素 E (CuE) 能抑制 LPS 诱导的 NF-κB 核转位。Ying 等^[9]研究发现 piperine (胡椒碱) 可抑制 LPS 刺激引起巨噬细胞的 NO、PGE2、iNOS、COX-2、

TNF- α 的表达, 这种抗炎活性是通过下调 NF- κ B p65 的表达实现。Liou 等^[10]研究发现, Casticin (蔓荆子黄素) 下调炎症介质及细胞因子通过抑制 NF- κ B 信号通路实现, 具有良好的抗炎效果有望发展为新的药物。本文的研究发现, BNGP 调控炎症反应通过调控 NF- κ B p65 在细胞质和胞核中表达实现, 与上述报道的结果一致, 且 BNGP 的这种调控具有双向性, 其良好的免疫调节作用值得进一步开发利用。

2.3 BNGP 对 FITC-LPS 结合细胞膜表面受体的竞争性抑制

巨噬细胞表面表达多种受体分子, 其中大部分都是模式识别受体。外来刺激物如病原体等与巨噬细胞表面受体的结合是巨噬细胞发挥其吞噬、分泌等免疫功能的第一步^[11]。巨噬细胞表面能够识别 LPS 的受体不止一种, 它们之间发挥了协同作用, 目前研究较为清楚的是 CD14 和 TLR 受体, LPS 通过与巨噬细胞膜表面的受体结合, 启动炎症信号通路。活性多糖与受体之间的结合以及与信号通路之间的相互作用是十分复杂的, 其中能与多糖结合发生作用的受体有: β -葡聚糖受体、甘露糖受体、半乳糖受体、TLR、CD14、清道夫家族等^[12]。任文智等^[13]研究发现, 云芝糖肽通过干扰与细胞表面的多糖受体结合, 从而弱化 LPS 的刺激作用。BNGP 是一种糖肽, 前期研究发现对体外培养的巨噬细胞有良好的抑炎效果, 因此, BNGP 可能通过干扰 FITC-LPS 与受体的结合从而阻碍 NF- κ B 的活化, 本文通过流式细胞术初步探究其在细胞受体水平上的抗炎机理。

表 4 BNGP 对 FITC-LPS 结合细胞膜表面受体的干扰作用
($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 4 Interference by BNGP at cell surface receptors bound to LPS-FITC			
组别	阳性荧光值	背景荧光值	相对荧光值
LPS-FITC	15.32 \pm 0.67	8.95 \pm 0.34	6.37 \pm 0.67
BNGP 干扰组 (62.5 μ g/mL)	13.88 \pm 0.10	8.55 \pm 0.06	5.33 \pm 0.10
BNGP 干扰组 (125 μ g/mL)	13.87 \pm 0.10	8.18 \pm 0.05	5.69 \pm 0.10
BNGP 干扰组 (250 μ g/mL)	14.04 \pm 0.37	8.65 \pm 0.02	5.39 \pm 0.37
BNGP 干扰组 (500 μ g/mL)	12.61 \pm 0.13	8.37 \pm 0.02	4.24 \pm 0.13**
LPS 干扰组	11.52 \pm 1.07	8.29 \pm 0.09	3.23 \pm 1.07**

注: *p < 0.05, **p < 0.01 vs LPS-FITC。

流式细胞的结果显示 (表 4), LPS-FITC 组的荧光强度最高 (6.37 \pm 0.67), 表明细胞已与 LPS-FITC 的表面受体发生了结合; 当细胞中加入 LPS 与 LPS-FITC 共同作用时 (即 LPS 干扰组), 荧光强度下降了 3.14, 与 LPS-FITC 组相比差异极显著 ($p < 0.01$), 由于 LPS 与 LPS-FITC 结合细胞表面同种受体, 因此使得细胞表面受体结合的 LPS-FITC 显著减少; 当细胞中加入不同浓度的 BNGP 与 LPS-FITC 共同作用时 (即 BNGP 干扰组), 从低剂量到高剂量各组荧光强度与 LPS-FITC 组相比分别下降了 1.04、0.68、0.98、2.13, 其中 BNGP 浓度为 500 μ g/mL 时, 荧光强度下降极显著 ($p < 0.01$), 表明 BNGP 能抑制 LPS-FITC 与细胞表面受体的结合, 并且在 500 μ g/mL 时这种抑制作用最强。上述结果提示, BNGP 可能通过与 LPS-FITC 竞争结合细胞表面受体, 减轻 LPS 对细胞的活化作用, 从而发挥抑炎的作用。

3 结论

3.1 免疫荧光与 Western blot 结果显示, 正常状态下的 RAW264.7 巨噬细胞 NF- κ B 主要存在细胞质中呈静止状态, LPS 对细胞有强烈刺激作用, 可引发细胞 NF- κ B 大量转移入核。BNGP 单独作用于细胞时, 可剂量依赖性地激活 NF- κ B 从胞质转移入核, 表明通过激活信号转导途径是 BNGP 发挥免疫调节作用的一个途径, 从而增加机体免疫功能; 但 BNGP 又能够弱化由 LPS 刺激细胞引起的 NF- κ B 剧烈的核转位现象, 表明 BNGP 对巨噬细胞的抑炎作用通过抑制 NF- κ B 的核转位实现。

3.2 流式细胞结果显示, 不同浓度 BNGP 与 LPS-FITC 共同作用后, 荧光强度呈现出下降的趋势, 提示 BNGP 可能与 LPS 具有相同的结合受体, 能干扰 LPS 与细胞受体的结合, 从而阻碍 LPS 对细胞的过度活化。

参考文献

- [1] 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]. J. Ethnopharmacol., 2014, 155: 753-757
- [2] Xu X, Yin P, Wan C, et al. Punicalagin Inhibits Inflammation in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages via the Suppression of TLR4-Mediated MAPKs and NF- κ B Activation [J]. Inflammation, 2014, 37(3): 956-965
- [3] Kwon DJ, Ju SM, Youn GS, et al. Suppression of iNOS and COX-2 expression by flavokawain A via blockade of NF- κ B and AP-1 activation in RAW 264.7 macrophages [J]. Food

- Chem. Toxicol., 2013, 58: 479-486
- [4] Yun KJ, Shin JS, Choi JH, et al. Quaternary alkaloid, pseudocoptisine isolated from tubers of *Corydalis turtschaninovi* inhibits LPS-induced nitric oxide, PGE(2), and pro-inflammatory cytokines production via the down-regulation of NF- κ B in RAW 264.7 murine macrophage cells [J]. *Int. Immunopharmacol.*, 2009, 9(11): 1323-1331
- [5] Guma M, Stepniak D, Shaked H, et al. Constitutive intestinal NF- κ B does not trigger destructive inflammation unless accompanied by MAPK activation [J]. *J. Exp. Med.*, 2011, 208(9): 1889-1900
- [6] 姜鲜,李佳,匡红英,等.白藜芦醇对 LPS 刺激下 NF- κ B 核转位影响[J].*现代预防医学*,2010,37(14):2706-2707
JIANG Xian, LI Jia, KUANG Hong-ying, et al. Effect of resveratrol on translocation of NF- κ B into nuclear induced by LPS [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2010, 37(14): 2706-2707
- [7] 刘晶,潘晓华,宋珍,等.牛蒡低聚果糖对脂多糖诱导下 RAW264.7 细胞炎症模型的抗炎作用[J].*山东大学学报(医学版)*,2012,50(12):41-46
LIU Jing, PAN Xiao-hua, SONG Zhen, et al. Anti-inflammatory effect of burdock fructo-oligosaccharide on lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cell [J] *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2012, 50(12): 41-46
- [8] 乔静,徐丽慧,何健,等.葫芦素 E 对脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应的影响及作用机制[J]. *现代免疫学*, 2012, 32(4): 327-331
QIAO Jing, XU Li-hui, HE Jian, et al. The effect of cucurbitacin E on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophage and its mechanism [J]. *Current Immunology*, 2012, 32(4): 327-331
- [9] Ying X, Yu K, Chen X, et al. Piperine inhibits LPS induced expression of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells [J]. *Cell Immunol.*, 2013, 285: 49-54
- [10] Liou CJ, Len WB, Wu SJ, et al. Casticin inhibits COX-2 and iNOS expression via suppression of NF- κ B and MAPK signaling in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages [J]. *J. Ethnopharmacol.*, 2014: 310-316
- [11] 侯丽娜.巨噬细胞表面的主要模式识别受体研究进展[J].*国外医学免疫学分册*,2005,28(4):249-252
HOU Li-na. Progress of research on the main pattern recognition receptors on the surface of macrophages [J]. *Foreign Medical Sciences Section of Immunology*, 2005, 28(4): 249-252
- [12] 荣岳光,佟建明.多糖对巨噬细胞功能影响的研究进展[J].*中国畜牧兽医*,2007,34(5):9-13
RONG Yue-guang, TONG Jian-ming. Progress of research on effects of polysaccharides on macrophage [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2007, 34(5): 9-13
- [13] 任文智,杨晓彤,马伟超等.云芝糖肽下调脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞炎症性因子[J].*中国新药与临床杂志*,2010,29(4):306-309
REN Wen-zhi, Yang Xiao-tong, Ma Wei-chao, et al. Down-regulating effects of *Coriolus versicolor* polysaccharopeptide on murine macrophage production of inflammatory mediators induced by lipopolysaccharide [J]. *Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies*, 2010, 29(4): 306-309