

# 莲藕渣多糖通过 MAPK/NF- $\kappa$ B 途径调节小鼠腹腔巨噬细胞的免疫应答

管雪婷<sup>1,2</sup>, 韩胜强<sup>2</sup>, 谢元<sup>1,2</sup>, 胡卫成<sup>1,2\*</sup>, 沈婷<sup>2\*</sup>

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

(2. 淮阴师范学院生命科学学院, 江苏淮安 223300)

**摘要:** 揭示莲藕渣多糖 (Lotus Root Residue Polysaccharide, LRP) 对 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞的体外免疫调节作用, 探讨 LRP 刺激腹腔巨噬细胞产生免疫应答的信号通路。利用 MTT 法测定不同浓度 LRP 对细胞活力影响; 选用不同浓度梯度及同一浓度不同时间点的 LRP 刺激细胞, Griess 法检测细胞 NO 释放量; 半定量 PCR 检测细胞 TLR4、TLR2 受体及免疫关联因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS、IL-1 $\beta$ 、COX-2、Nfkbia) mRNA 的表达, 蛋白印迹法检测其 MAPK 通路 (ERK1/2、JNK、p38) 及 Akt 的磷酸化, 同时研究了 LRP 对和蛋白 AP-1 及 NF- $\kappa$ B 的影响, 对 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞的免疫调节活性及其信号机制进行评估。研究表明, LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞无毒作用, 25~50  $\mu$ g/mL LRP 促进细胞生长, 细胞存活率为 104.82%和 102.53% ( $p < 0.05$ ); NO 浓度随 LRP 浓度提高而显著提高 ( $p < 0.05$ ), 200  $\mu$ g/mL LRP 刺激细胞产生一氧化氮 (NO) 为 36.47  $\mu$ mol/L, 200  $\mu$ g/mL 的 LRP 处理细胞, NO 产量随培养时间延长而增多 ( $p < 0.05$ ), 24 h 时 NO 浓度为 44.18  $\mu$ mol/L; mRNA 基因表达研究显示, LRP 调控 TLR4、TLR2 受体, 并调节免疫基因的表达; 此外, LRP 促进核蛋白 c-Jun、p65 由核外转向核内, 增强 ERK1/2、JNK、p38 蛋白的磷酸化水平, 但对于 Akt 的磷酸化没有显著影响。因此, 莲藕渣多糖 (LRP) 可通过 MAPK/NF- $\kappa$ B 途径增强 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞免疫应答。

**关键词:** 莲藕渣多糖; 小鼠腹腔巨噬细胞; 免疫应答; MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路

文章编号: 1673-9078(2022)12-161-168

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.12.0082

## Lotus Root Residue Polysaccharide Regulate the Immune Response of Mouse Peritoneal Macrophages via MAPK/NF- $\kappa$ B Pathway

GUAN Xueting<sup>1,2</sup>, HAN Shengqiang<sup>2</sup>, XIE Yuan<sup>1,2</sup>, HU Weicheng<sup>1,2\*</sup>, SHEN Ting<sup>2\*</sup>

(1. College of Food Science and Pharmacology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

(2. School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huaian 223300, China)

**Abstract:** The *in vitro* immunomodulatory effect of lotus root residue polysaccharide (LRP) on primary peritoneal macrophages of BALB/C mice was investigated to explore the potential signaling pathway of LRP-induced immune response. The effects of different concentrations of LRP on cell viability were determined by the MTT method; the amount of the NO released from cells was detected by the Griess method after the stimulation with LRP at different concentration gradients, and at the same concentration but at different time points; Semi-quantitative PCR was used to detect the mRNA expressions of TLR4 and TLR2 receptors as well as immune-related factors (TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, IL-1 $\beta$ , COX-2, Nfkbia) in cells; Western blotting was used to detect the phosphorylation of MAPK pathway-related factors (ERK1/2, JNK, p38) and Akt. The effect of LRP on AP-1 and NF- $\kappa$ B was also studied. the immunomodulatory activity of LRP towards mouse peritoneal

引文格式: 管雪婷, 韩胜强, 谢元, 等. 莲藕渣多糖通过 MAPK/NF- $\kappa$ B 途径调节小鼠腹腔巨噬细胞的免疫应答[J]. 现代食品科技, 2022, 38(12): 161-168

GUAN Xueting, HAN Shengqiang, XIE Yuan, et al. Lotus root residue polysaccharide regulate the immune response of mouse peritoneal macrophages via MAPK/NF- $\kappa$ B pathway [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(12): 161-168

收稿日期: 2022-01-21

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20201480)

作者简介: 管雪婷 (1998-), 女, 硕士, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 2376331560@qq.com

通讯作者: 胡卫成 (1984-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 分子营养学, E-mail: hu\_weicheng@163.com; 共同通讯作者: 沈婷 (1985-), 女, 博士, 副教授, 研

究方向: 细胞生物学, E-mail: shenting1019@163.com

macrophages and associated signaling mechanism were evaluated. The result showed that LRP has no toxic effect on mouse peritoneal macrophages, LRP at 25~50  $\mu\text{g/mL}$  could promote the cell growth with the cell viability being 104.83% and 102.53% ( $p < 0.05$ ). The NO production increased significantly with an increase of LRP concentration ( $p < 0.05$ ). The cells stimulated by LRP at 200  $\mu\text{g/mL}$  produced 36.47  $\mu\text{mol/L}$  of NO. NO production increased with the prolongation of culture time after the treatment with LRP at 200  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.05$ ), with the NO concentration reaching 44.18  $\mu\text{mol/L}$  after 24 h. The studies on mRNA expressions showed that LRP regulated the expressions of TLR4 and TLR2 receptors, and modulated the expressions of immune-related genes. In addition, LRP promoted the translocation of c-Jun and p65 from outside the nucleus into the nucleus, enhanced the phosphorylation levels of ERK1/2, JNK, and p38 proteins, while having insignificant effect on the phosphorylation of Akt. Therefore, LRP can enhance the immune response of primary peritoneal macrophages in BALB/c mice through the MAPK/NF- $\kappa\text{B}$  pathway.

**Key words:** lotus root residue polysaccharide; mouse peritoneal macrophages; immune response; MAPK/NF- $\kappa\text{B}$  signaling pathway

免疫是机体对于外界抗原的侵入及疾病预防的一道必不可少的防线<sup>[1]</sup>, 因此, 调节机体免疫受到广泛的关注。免疫反应需要免疫细胞, 包括巨噬细胞、淋巴细胞和树突状细胞, 这些细胞在增强免疫和通过信号分子有效对抗感染发挥重要作用<sup>[2]</sup>。巨噬细胞是一种多功能免疫细胞<sup>[3]</sup>, 在先天免疫系统中占据一个独特的生态位, 负责清除入侵的病原体和死亡细胞<sup>[4]</sup>。活化的巨噬细胞通过触发不同的信号通路有效地降低疾病的易感性。当巨噬细胞被激活时, 它们表达表面识别受体, 如 Toll 样受体 TLR2/TLR4, 触发多个信号通路, 如丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK)、磷酸肌醇 3 激酶 (PI3K)-Akt 和 Janus 激酶/信号转换器, 释放炎症因子 (如一氧化氮 NO) 和促炎细胞因子 (如白细胞介素 IL-6、IL-1 $\beta$  和肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$ )<sup>[5]</sup>。最近的证据表明, 有效增强免疫系统是治疗免疫抑制、微生物感染和肿瘤的一种新兴治疗方法<sup>[6]</sup>。

多糖是由大量单糖组成的一类重要的天然生物大分子, 广泛分布于植物、动物、藻类和微生物中<sup>[7]</sup>。它们对人体几乎没有危害, 因此人们对多糖的生物活性越来越感兴趣, 包括免疫调节、抗肿瘤、抗感染、抗病毒等治疗应用<sup>[8,9]</sup>。而在这些生物活性中, 免疫刺激活性受到了广泛的关注。刺槐花多糖可以与巨噬细胞表面的 TLR2/4 结合, 诱导其释放 NO 和 TNF- $\alpha$ 、IL-18 和 IL-6, 上调 MAPKS 和 NF-KB 信号通路中关键蛋白及各自磷酸化蛋白的表达<sup>[10]</sup>。因此, 多糖可以与巨噬细胞表面受体结合, 激活巨噬细胞释放 NO 及细胞因子, 通过受体激活巨噬细胞内的信号通路, 发挥多糖的免疫活性。

莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.), 属莲科<sup>[11]</sup>, 多年水生植物, 莲藕是莲的膨大根茎<sup>[12]</sup>, 作为食物和药物在东南亚广泛种植多年<sup>[13]</sup>。莲藕具有抗氧化、抗癌、抗炎和免疫刺激活性<sup>[14,16]</sup>。在莲藕加工过程中, 产生了大量的莲藕渣。然而, 只有少量莲藕渣被用作饲料, 大部分被丢弃, 导致环境污染和资源浪费<sup>[16]</sup>。若加以利

用, 不仅能科学合理地解决资源浪费问题, 还能将废物实现价值最大化。莲藕渣中含有多糖<sup>[17]</sup>, 但由于缺乏相关研究, 严重限制了对这一资源的有效开发。实验室前期研究<sup>[18]</sup>发现, 莲藕渣多糖 (LRP) 平均分子量为  $1.24 \times 10^4$  ku, 结构为  $\alpha\text{-D-(1}\rightarrow\text{4)}$  连接的葡萄糖吡基, 在 O-6 处的非还原端  $\alpha\text{-D-Glcp}$  大约每 6 个残基作为分支。LRP 具有免疫刺激活性, 显著促进 NO、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的产生, 促进环磷酸腺苷诱导的免疫抑制小鼠中 TNF- $\alpha$  和 IL-2 的分泌。张梦洁等<sup>[19]</sup>发现莲藕多糖能够促进巨噬细胞增殖, 诱导巨噬细胞产生 NO, 具有激活免疫细胞的潜能。但 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞的免疫应答途径及信号通路尚不可知。此外, 小鼠腹腔巨噬细胞接近于小鼠体内细胞环境<sup>[20,21]</sup>, 一方面可以更好的还原动物体内的结果, 另一方面可相对减少对试验动物的杀害。阿拉伯木聚糖可以活化小鼠腹腔巨噬细胞, 增加 NO 产生, 促进免疫关联基因 mRNA 的表达, 激活 MAPK 和 Akt 信号通路, 调节免疫<sup>[22]</sup>。因此, 本试验取用小鼠原代腹腔巨噬细胞, 观察 LRP 对巨噬细胞产生 NO 的影响, 通过 PCR 与 Western Blot 检测免疫关联基因 mRNA 与 MAPK/NF- $\kappa\text{B}$  通路相关蛋白的表达量, 初步探讨 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞的免疫调节活性及其信号机制, 为 LRP 的开发与利用提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

莲藕渣购买于江苏淮安本地市场, 莲藕渣多糖 (LRP) 按照前期文献的方法分离纯化<sup>[18]</sup>。RPMI 1640 培养基, 美国 Gibco 公司; 台盼蓝、脂多糖 (LPS)、甲氮甲唑蓝 (MTT)、对氨基苯磺酰胺、亚硝酸钠 ( $\text{NaNO}_2$ )、N-1-萘乙胺盐酸盐, 美国 Sigma 公司; PVDF 膜 (0.2  $\mu\text{m}$ ), 美国 Bio-Rad 公司; 抗体 p-Akt、p-ERK、p-JNK、p-p38、Akt、ERK1/2、JNK、p38, 美国 CST 公司; 山羊抗兔 IgG-HRP, 美国 abcam 公司;

Anti- $\beta$ -Actin pAb-HRP-Direct, 日本 MBL 公司; 反转录试剂盒, 美国 Thermo 公司; Trizol 试剂, 美国 ambion 公司; 30% Acr-Bis (29:1)、2 $\times$ Taq Master Mix、化学发光检测试剂盒, 北京 cwbio 公司; 异丙醇、甲醇、十二烷基硫酸钠、三羟甲基氨基甲烷、甲醛、氯化钠、三氯甲烷、无水乙醇等试剂为分析纯, 上海国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 仪器与设备

HERACELL I50i 二氧化碳细胞培养箱, 美国 Thermo 公司; JY88-IIN 细胞超声破碎仪, 宁波新芝生物科技公司; 5414R 小型高速离心机、5810R 台式高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Tecan Infinite M200 Pro 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; PowerPacTMHC 电泳槽、T100 Thermal PCR 扩增仪, 美国 BIO-RAD 公司; 5200 multi 数码凝胶图像处理系统, 上海天能科技有限公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 小鼠腹腔巨噬细胞培养

从 SPF 级 BALB/c 小鼠中分离小鼠腹腔巨噬细胞<sup>[22]</sup>, 分离后的细胞培养在湿度适宜, 温度为 37  $^{\circ}$ C, CO<sub>2</sub> 含量为 5% (V/V) 的细胞培养箱中。细胞培养基

为 1% 的青霉素和链霉素 (V/V) 以及 10% (m/V) 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。

### 1.3.2 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞的毒性

将小鼠腹腔巨噬细胞计数后加入 RPMI 1640 培养基中, 细胞稀释至每毫升  $1 \times 10^6$  个后接种于 96 孔培养板, 每孔 100  $\mu$ L, 每组 3 个重复孔, 培养过夜。向 96 孔培养板中加入不同浓度的 LRP (0、12.5、25、50、100、200  $\mu$ g/mL), 于湿度适宜、温度为 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 24 h。弃掉孔内上层培养液, 每孔加入 100  $\mu$ L 的 0.5 mg/mL MTT 工作液, 在培养 4 h 后每孔立即加入 100  $\mu$ L 的 stopping buffer, 在 16–20 h 后混匀, 酶标仪在 570 nm 处测定吸光度值。

### 1.3.3 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞释放 NO 的影响

取细胞密度为每毫升  $1 \times 10^6$  个的小鼠腹腔巨噬细胞, 每孔 100  $\mu$ L 接种于 96 孔培养板中, 在细胞培养箱中培养 24 h。在培养板中加入不同浓度的 LRP (0、12.5、25、50、100、200  $\mu$ g/mL), 以未添加 LRP 组作为阴性对照组, 同时以 1  $\mu$ g/mL 的 LPS 将其设置为阳性对照组, 24 h 后用 Griess 法检测细胞上清液中 NO 含量。在培养板中加入 200  $\mu$ g/mL 的 LRP, 在不同时间段 (0、1、3、6、12、24 h) 取细胞上清液测定 NO 的释放量。

### 1.3.4 LRP 对免疫关联基因 mRNA 表达的影响

表 1 引物序列及 PCR 条件

Table 1 Primer sequence and conditions for PCR

引物名称	引物序列	退火温度/ $^{\circ}$ C	循环数/个
TNF- $\alpha$	F: 5'-GAACTGGCAGAAGAGGCACT-3'	55	20
	R: 5'-ACAAGGTACAACCCATCGGC-3'		
Nfkb $\beta$	F: 5'-CCGCTGACCATGGAAGTCAT-3'	58	20
	R: 5'-AAGAGCGAAACCAGGTCAGG-3'		
COX-2	F: 5'-CACTACATCCTGACCCACTT-3'	60	27
	R: 5'-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3'		
iNOS	F: 5'-CATTGATCTCCGTGACAGCC-3'	55	30
	R: 5'-CATGCTACTGGAGGTGGGTG-3'		
IL-6	F: 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'	55	30
	R: 5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3'		
IL-1 $\beta$	F: 5'-CAGGATGAGGACATGAGCACC-3'	55	25
	R: 5'-CTCTGCAGACTAACTCCAC-3'		
TLR4	F: 5'-TCAGCAAAGTCCCTGATGACATTCC-3'	59	25
	R: 5'-AGAGGTGGTGTAAAGCCATGCCA-3'		
TLR2	F: 5'-CGGAGGGAATAGAGGTGAAAG-3'	55	25
	R: 5'-GTCTCTGCGACCTAGAAGTGGA-3'		
GAPDH	F: 5'-CACTCACGGCAAATCAACGGCACA-3'	56	30
	R: 5'-GACTCCACGACATACTCAGCAC-3'		

用 RPMI 1640 培养基将细胞密度调整为每毫升  $5 \times 10^6$  个后接种至培养皿中, 用 200  $\mu$ g/mL 的 LRP 分别

处理细胞 0、0.5、1、3、6 h。在不同的时间段弃去培养皿中上清液, 加入 1 mL Trizol 裂解细胞, 收集不同

时间段的样品待用。上述溶液中加入 100  $\mu\text{L}$  三氯甲烷, 混匀、离心, 取水层加入等体积异丙醇, 充分振荡, 静置、离心, 管底出现胶状沉淀即为 RNA, 用 0.1% ( $m/V$ ) DEPC(焦炭酸二乙酯)水配制的体积分数 75% 乙醇清洗 RNA 后置于通风橱中晾干, 再加入 30  $\mu\text{L}$  DEPC 水溶解 RNA, 置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冷冻箱中待测。RNA 使用反转录试剂盒进行逆转录, 得到 cDNA, 使用不同的引物(上海生工生物工程股份有限公司)在 PCR 扩增仪中检测不同免疫因子 mRNA 的表达量。其中 PCR 反应体系如下: 6  $\mu\text{L}$  的无菌超纯水, 10  $\mu\text{L}$  的 2 $\times$ Taq Master Mix、1  $\mu\text{L}$  的上游引物、1  $\mu\text{L}$  的下游引物、2  $\mu\text{L}$  的 cDNA。引物序列及 PCR 扩增条件如表 1 所示。

### 1.3.5 Western Blot 检测 MAPK/NF- $\kappa\text{B}$ 和 Akt 通路相关蛋白表达量

在培养皿中接种小鼠腹腔巨噬细胞, 细胞密度为  $5\times 10^6$  个, 使用 200  $\mu\text{g/mL}$  的 LRP 培养细胞, 在不同时间段获取样品 (0、0.5、1、3、6 h)。将培养基上清吸除后用 1 mL 的 PBS 冲洗并收集细胞, 离心后取沉淀加入 250  $\mu\text{L}$  蛋白酶裂解液充分混匀, 使用超声破碎仪破碎细胞后, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 得到上清液。BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 通过 Western Blot 检测 MAPK/NF- $\kappa\text{B}$  和 Akt 通路相关蛋白表达。将样品蛋白在 95  $^{\circ}\text{C}$  下变性 5 min 后, SDS-PAGE 电泳分离蛋白并转至 PVDF 膜。将膜移至封闭液 (5% BSA,  $m/V$ ) 中, 加入一抗孵育过夜, 二抗孵育 2 h, 室温下在摇床上用 TTBS 洗涤后加入曝光液采集图像。

## 1.4 数据处理

本研究的数据分析使用 SPSS 23.0 统计分析软件, 结果表示为 Mean $\pm$ SD,  $p<0.05$  表示差异显著, 绘图软件为 Sigma Plot。

## 2 结果与讨论

### 2.1 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞活力的影响

如图 1 所示, 考察 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞活力的影响。使用不同浓度梯度的 LRP 培养细胞 24 h, 结果显示, 浓度为 25~50  $\mu\text{g/mL}$  的 LRP 对细胞生长活力有促进作用 ( $p<0.05$ ), 细胞存活率分别为 104.82% 和 102.53%, 200  $\mu\text{g/mL}$  浓度以内细胞活力没有降低趋势。小麦麸皮中阿拉伯木聚糖与小鼠腹腔巨噬细胞共培养, 结果显示 6.25 和 12.5  $\mu\text{g/mL}$  多糖处理后细胞存活率分别为 90.42% 和 89.99%, 证实阿拉伯木聚糖对细胞没有显著毒性<sup>[22]</sup>。因此, 200  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内, LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞无毒性作用。

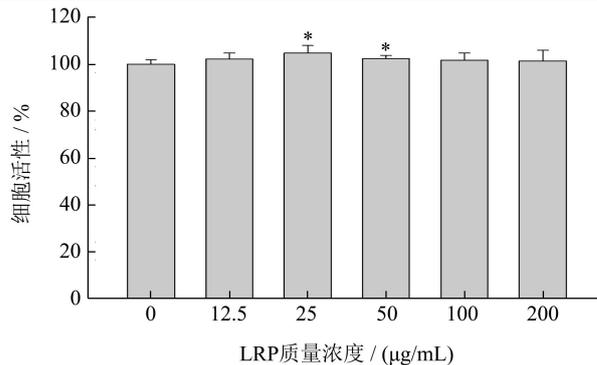


图 1 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞活性的影响

Fig.1 Effect of LRP on the activity of mouse peritoneal macrophages

注: 图中\*表示与 0 h 差异显著 ( $p<0.05$ )。图 2、3 同。

### 2.2 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞 NO 释放量的影响

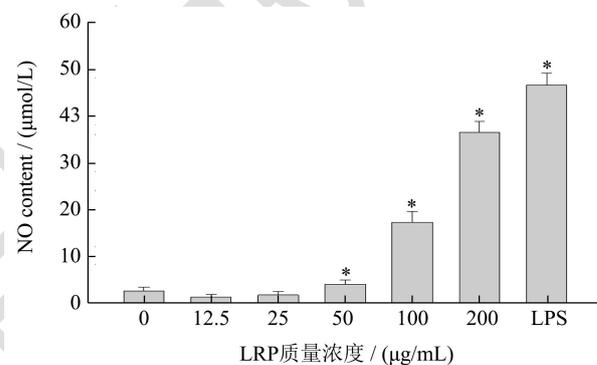


图 2 LRP 的不同处理浓度对小鼠腹腔巨噬细胞释放 NO 的影响

Fig.2 Effect of different treatment concentration of LRP on the release of NO from mouse peritoneal macrophages

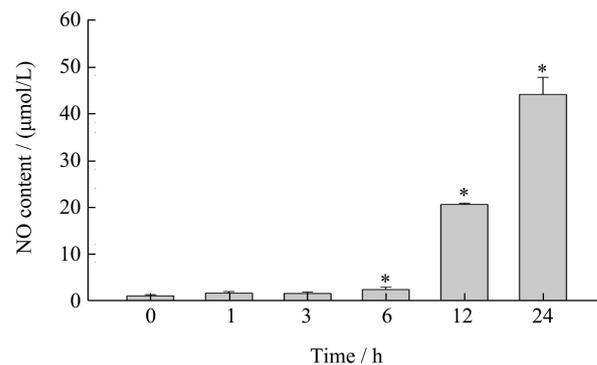


图 3 LRP 的不同处理时间对小鼠腹腔巨噬细胞释放 NO 的影响

Fig.3 Effect of different treatment time of LRP on the release of NO from mouse peritoneal macrophages

小鼠腹腔巨噬细胞培养接近动物体内的环境, 可研究对病原体的先天免疫应答<sup>[22]</sup>。一氧化氮 (NO) 是巨噬细胞的主要介质, 对细菌和肿瘤细胞具有杀伤作用<sup>[23]</sup>。为了确定巨噬细胞的活性, 用不同浓度的 LRP 刺激腹腔巨噬细胞后, 测定细胞上清中 NO 的浓度。巨噬细胞中 NO 浓度随 LRP 浓度的提高显著增加

( $p < 0.05$ ), LRP 浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时 NO 产量为 36.47  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 略低于阳性对照组 LPS 中 NO 浓度 46.58  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 如图 2 所示。为了监测 NO 释放的具体时间段, 使用 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LRP 处理腹腔巨噬细胞。如图 3, 随着时间的延长, NO 产量逐渐增多, 培养时间至 24 h 时 NO 产量为 44.18  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。不难看出, NO 的释放量由 6 h 开始显著增加 ( $p < 0.05$ ), 处理 24 h 后的 NO 释放量大致与之前处理结果吻合。研究表明, NO 调节细胞的增殖和分化, 在细胞中, NO 浓度在 (0.01~0.25) mmol/L 的低浓度下, 细胞增殖增加, 在  $> 0.5$  mmol/L 的浓度时, 细胞生长停滞<sup>[24]</sup>。图 2~3 中, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LRP 处理巨噬细胞 24 h 产生 NO 的量处于 (0.01~0.25) mmol/L 间, 即 LRP 可促进细胞生长。玉米麸皮中阿拉伯木聚糖的体外结果显示阿拉伯木聚糖促进人 U937 单细胞细胞株 NO 合成, 从 53.7  $\mu\text{mol}/\text{L}$  增加至 62.9  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 研究表明来自玉米麸皮膳食可能会增强先天免疫反应<sup>[25]</sup>。因此, LRP 激活腹腔巨噬细胞释放 NO, 促进细胞生长, 提高巨噬细胞对细菌和肿瘤细胞的杀伤作用, 发挥 LRP 的免疫刺激活性。

### 2.3 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞 TLR4/TLR2 及免疫关联因子表达的影响

多糖具有免疫刺激活性, 巨噬细胞已被报道为多糖反应的靶点<sup>[26]</sup>。多糖对免疫细胞的直接刺激作用涉及到特定的识别受体, 这些识别受体可以决定最终的反应。多糖与这些受体结合时, 可能会触发不同的信号通路, 使反应可以被检测到。多糖可以通过激活 toll 样受体对细胞产物如脂多糖和脂磷壁酸产生反应, 从而产生各种细胞因子, 可能在炎症中诱发 T 细胞介导的免疫反应<sup>[27,28]</sup>。TLR2 和 TLR4 在多种免疫细胞中表达<sup>[29]</sup>, TLR2 被多糖激活后, TGF-激活激酶被磷酸化, 激活由丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 组成的激酶复合物, 分别激活 NF- $\kappa$ B 和 c-Jun 端激酶 (JNK) 信号通路, 从而触发细胞因子 (IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ) 的表达<sup>[30]</sup>。同时, TLR4 已被确定为巨噬细胞对植物多糖的重要膜受体, 利用转接分子传递信号至细胞内, 激活下游相关分子, 如 NF- $\kappa$ B, 从而促进炎症因子的分泌<sup>[31]</sup>。iNOS 是免疫中最重要的内源性免疫介质之一, 在正常免疫功能中起着关键作用, 包括巨噬细胞活化和宿主对细胞内病原体的防御<sup>[32]</sup>。

为了探讨 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞 Toll 样受体及免疫关联因子表达的影响, 使用 PCR 仪半定量检测细胞中 Toll 样受体 (TLR4、TLR2) 以及免疫关联因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS、IL-1 $\beta$ 、COX-2、Nfkbia) 等

基因的表达。

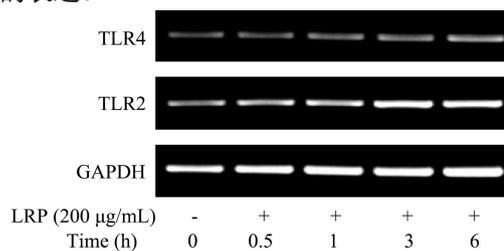


图 4 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞免疫关联 Toll 样受体 mRNA 表达的影响

Fig.4 Effect of LRP on mRNA expression of immune-associated Toll-like receptors in mouse peritoneal macrophages

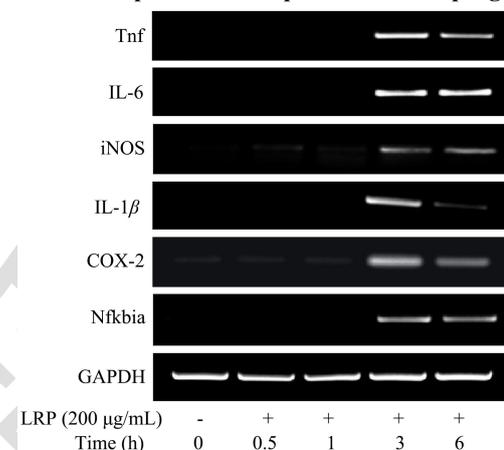


图 5 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞免疫关联因子 mRNA 表达的影响

Fig.5 Effect of LRP on mRNA expression of immune-related factors in mouse peritoneal macrophages

如图 4~5 所示, 在细胞中, TLR4 和 TLR2 的表达随 LRP 刺激时间延长而增加, 因此, LRP 与巨噬细胞表面的 TLR4、TLR2 结合, 使其表达量提高; 而 TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS、IL-1 $\beta$ 、COX-2、Nfkbia 等基因的 mRNA 在前 1 h 内几乎不表达, 而在 LRP 处理 3 h 之后的表达量显著增加, 其中, TNF- $\alpha$  与 IL-1 $\beta$  在 6 h 表达降低。因此, LRP 与巨噬细胞表面受体结合, 刺激巨噬细胞分泌细胞因子, 3 h 时达到峰值, 此时条带较亮。大量研究表明, 在机体发生炎症反应的过程中, TLR2 与 TLR4 介导的信号转导通路发挥着最为重要的作用, 植物多糖可以通过 Toll 样受体介导巨噬细胞激活细胞内信号通路, 促进相关细胞因子的释放, 发挥其免疫调节功能<sup>[33]</sup>。 $\beta$ 2GPI/抗 $\beta$ 2GPI 复合物激活小鼠腹腔巨噬细胞过程中, TLR2 表达增加<sup>[34]</sup>; 蘑菇多糖在腹腔巨噬细胞中通过激活 TLR4/NF- $\kappa$ B 途径, 致其细胞因子的分泌量显著增强<sup>[35]</sup>; 大黄多糖刺激巨噬细胞激活 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 途径, 诱导 IL-1 $\beta$ 、IFN- $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  等细胞因子表达<sup>[36]</sup>。这些研究结果与此结果皆显示诱导 TLR2 与 TLR4 受体及其下游免疫相关因子表达的增加是植物多糖发挥免疫调节作用的重要途径

之一。因此,免疫关联细胞因子 mRNA 表达上调结果显示,LRP 结合巨噬细胞表面免疫关联 Toll 样受体,刺激巨噬细胞分泌细胞因子,从而激活细胞产生免疫应答。

## 2.4 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞 MAPK/NF- $\kappa$ B 及 Akt 信号通路的影响

据报道,MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路参与刺激免疫应答中的基因表达(如 iNOS、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA)和细胞因子分泌(如 NO、IL-6 和 TNF- $\alpha$ )<sup>[37]</sup>。MAPK 通路与激活蛋白 1(AP-1)信号通路相关,它在巨噬细胞激活过程中介导免疫关联基因的表达<sup>[38]</sup>。p38 MAPK、细胞外信号调节激酶(ERK)和 c-Jun NH<sub>2</sub> 末端激酶(JNK)的磷酸化和激活已在免疫细胞中通过各种炎症刺激得到证实<sup>[39,40]</sup>。NF- $\kappa$ B 是参与炎症过程的转录因子,通过 I $\kappa$ B 亚基磷酸化和从非活性细胞质复合物分离而激活,p65 的活性二聚体易位到核<sup>[41]</sup>。这些免疫细胞的激活对免疫系统炎症反应的调节可能是治疗各种疾病的有前途的治疗策略之一。为了检测 MAPK/NF- $\kappa$ B 通路是否介导了 LRP 处理后的小鼠腹腔巨噬细胞的基因表达和细胞因子的产生,用 200  $\mu$ g/mL 的 LRP 处理细胞 0、0.5、1、3、6 h,测定了 ERK1/2、JNK、p38 的磷酸化及核蛋白中 c-Jun 和 p65 的水平。另外,Akt 参与细胞生长,调节细胞代谢及凋亡。有研究表明 Akt 可能激活 MAPK 信号通路<sup>[42]</sup>,因此,测定 Akt 的磷酸化水平,确定 Akt 信号通路是否与介导 LRP 处理小鼠腹腔巨噬细胞产生免疫关联因子相关。

在 LRP 刺激的腹腔巨噬细胞中,如图 6 所示,核蛋白 p65 的水平在 0~3 h 逐渐增多,在 3 h 后略有降低;c-Jun 的水平也在 3 h 达到峰值后降低。结果显示,LRP 对腹腔巨噬细胞的刺激上调其核蛋白中 p65 及 c-Jun 表达的水平,c-Jun 的表达与 AP-1 有关<sup>[38]</sup>,证明 LRP 可激活巨噬细胞介导免疫相关因子表达,p65 的活性二聚体易位至核,这说明参与此过程的转录因子 NF- $\kappa$ B 也被激活。在图 7 中,磷酸化的 ERK1/2 在 0.5 h 显著增多,随后逐渐降低;磷酸化的 JNK 在 1 h 时显著增多,随后降低;磷酸化的 p38 具体来说,在 0~1 h 呈现逐渐增多的趋势,而 1~6 h 逐渐降低。值得注意的是,巨噬细胞中 Akt 的磷酸化水平没有显著变化趋势。这些结论在其他研究中也得到了证明。玫瑰茄(*Hibiscus sabdariffa* Linn.)多糖通过 MAPKs 信号通路激活巨噬细胞,进而激活 ERK、JNK、p38 和 p65 的磷酸化,显著增加细胞因子 mRNA 表达<sup>[31]</sup>。蘑菇多糖通过 TLR/NF- $\kappa$ B 途径增强小鼠巨噬细胞的免疫应答,调节

一系列细胞因子的 mRNA 的表达<sup>[35]</sup>。与其他同类型多糖相比,LRP 实现废物利用,而小鼠原代腹腔巨噬细胞比其他来源巨噬细胞更接近小鼠体内反应。这些结果证实 LRP 激活 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路,上调通路中关键蛋白 p38、ERK1/2 和 JNK 及其磷酸化,发挥其免疫调节作用。

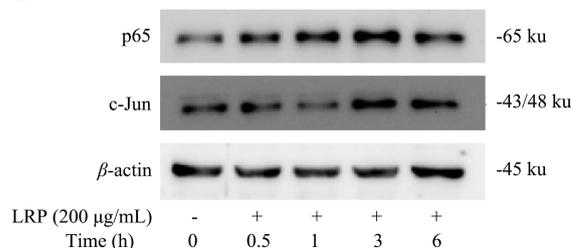


图 6 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞 p65 及 c-Jun 蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of LRP on the expression of p65 and c-Jun proteins

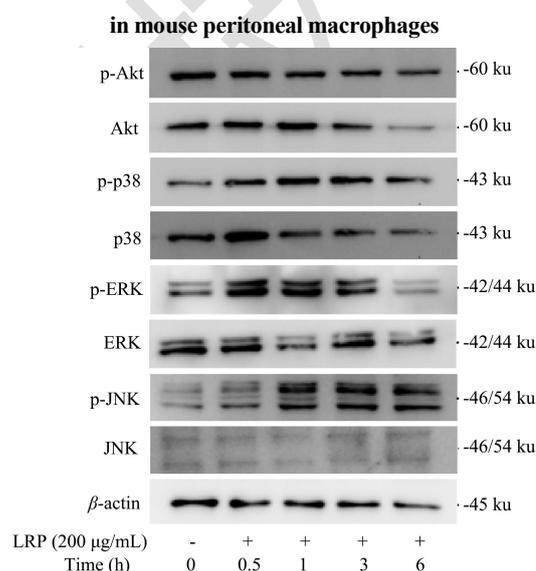


图 7 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞 MAPK 和 Akt 信号通路表达的影响

Fig.7 Effects of LRP on the expression of MAPK and Akt signaling pathways in mouse peritoneal macrophages

## 3 结论

本试验通过 LRP 与小鼠腹腔巨噬细胞共培养,探究 LRP 对小鼠腹腔巨噬细胞产生免疫应答的信号通路。研究表明,LRP 通过激活 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路发挥其免疫作用。LRP 结合巨噬细胞表面受体 TLR4 及 TLR2,刺激腹腔巨噬细胞分泌 NO,促进 TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS、1L-1 $\beta$ 、COX-2、Nfkbia 等细胞因子的释放,上调 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路中核蛋白 c-Jun 和 p65 的表达,增强关键蛋白 ERK1/2、JNK、p38 及其磷酸化。因此,LRP 在预防疾病及增强免疫中可发挥重要作用,但需要更多的研究来阐明 LRP 在体内免疫应答中的作用。

## 参考文献

- [1] Düwell P, Heidegger S, Kobold S, et al. Innate immune stimulation in cancer therapy [J]. *Hematology/oncology Clinics of North America*, 2019, 32(2): 1-17
- [2] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity [J]. *Immunity*, 2011, 34(5): 637-650
- [3] 陈婷婷,单杉,李南,等.  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(1): 40-46
- [4] Sasagawa T, Takagi H, Makinoda S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer [J]. *Journal of Infection & Chemotherapy*, 2012, 18(6): 807-815
- [5] Tapping R I. Innate immune sensing and activation of cell surface toll-like receptors [J]. *Seminars in Immunology*, 2009, 21(4): 175-184
- [6] Lei S. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: a review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 92: 37-48
- [7] Yu L, Wang D, Hu Y, et al. Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV [J]. *Chinese Journal of Animal & Veterinary Ence*, 2008, 71(2): 180-186
- [8] Li M, Sun B W, et al. Purification and bioactivity of a sulphated polysaccharide conjugate from viscera of abalone *Haliotis discus hannai* Ino [J]. *Food & Agricultural Immunology*, 2010, 21(1): 15-26
- [9] Tzianabos A O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, 13(4): 523-533
- [10] 刘爽. TLRs 介导的硒化刺槐豆多糖体外免疫增强效应研究 [D]. 兰州: 西北师范大学, 2021
- [11] Deng X. The establishment of an efficient callus induction system for lotus (*Nelumbo nucifera*) [J]. *Plants*, 2020, 9: 1436
- [12] Zhu F. Structures, properties, and applications of lotus starches [J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 63(feb.): 332-348
- [13] Liao C H, Lin J Y. Purification, partial characterization and anti-inflammatory characteristics of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) plumule polysaccharides [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 1818-1827
- [14] 麻玉莹, 杨忍忍, 高蔚娜, 等. 莲藕活性成分及其生物学功能研究进展[J]. *营养学报*, 2020, 42(5): 509-513
- [15] Jiang Y, Tzi B N, Liu Z, et al. Immunoregulatory and anti-HIV-1 enzyme activities of antioxidant components from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) rhizome [J]. *Bioscience Reports*, 2011, 31(5): 381-390
- [16] 夏秋良, 张臣飞, 尹乐斌, 等. 莲藕渣的综合利用研究进展[J]. *湖南农业科学*, 2016, 7: 138-140
- [17] 严浪, 张树明, 张凡华, 等. 莲藕渣中多糖的提取及性质初步研究[J]. *食品科学*, 2007, 12: 226-230
- [18] Hu W C, Jiang Y Y, Xue Q, et al. Structural characterisation and immunomodulatory activity of a polysaccharide isolated from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) root residues - ScienceDirect [J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 60(C): 103457
- [19] 张梦洁, 易阳, 闵婷, 等. 不同浓度醇沉级分的莲藕多糖成分分析与对 RAW264.7 细胞免疫活性的影响[J]. *食品科技*, 2021, 46(8): 162-170
- [20] 陈莎燕, 施继禹, 崔云峰, 等. 急性胰腺炎中腹腔巨噬细胞相关研究进展[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2021, 27(6): 913-916
- [21] 吴贞思. CPE 对小鼠腹腔巨噬细胞极化的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021
- [22] 何洋, 周静, 陈薇, 等. 小麦麸皮阿拉伯木聚糖的免疫调节作用 [J]. *现代食品科技*, 2021, 37(10): 1-7
- [23] Park, Hye J. Immune stimulatory activity of BRP-4, an acidic polysaccharide from an edible plant, *Basella rubra* L [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2014, 7(11): 849-853
- [24] Krischel V, Bruch Gerharz D, Suschek C, et al. Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 1998, 111(2): 286-289
- [25] Zhang Z, Smith C, Li W, et al. Characterization of nitric oxide modulatory activities of alkaline-extracted and enzymatic-modified arabinoxylans from corn bran in cultured human monocytes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(43): 8128-8137
- [26] Ferreira S S, Passos C P, Madureira P, et al. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: a review [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 5(132): 378-396
- [27] Kang O H, Lee J H, Kwon D Y. Apigenin inhibits release of inflammatory mediators by blocking the NF- $\kappa$ B activation pathways in the HMC-1 cells [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2011, 33(3): 473-479
- [28] Begon E, Michel L, Flageul B, et al. Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin [J]. *European Journal of Dermatology*, 2007, 17(6): 497-506

- [29] Mukherjee S, Karmakar S, Babu S P. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review [J]. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2016, 20(2): 193-204
- [30] Oeckinghaus A, Hayden M S, Ghosh S. Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. Nature Immunology, 2011, 12(8): 695-708
- [31] Gowda D C. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs [J]. Trends in Parasitology, 2007, 23(12): 596-604
- [32] Shen C Y, Zhang W L, Jiang J G. Immune-enhancing activity of polysaccharides from *Hibiscus sabdariffa* Linn. via MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways in RAW264.7 cells [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 34: 118-129
- [33] 逯晓旭,邓焯,张鹏超,等.CD317 促进巨噬细胞 TLR4 信号转导的作用机制研究[J].集成技术,2021,10(5):1-11
- [34] 于尹婧.TLR2 在 $\beta$ -2GPI/抗 $\beta$ -2GPI 复合物刺激小鼠腹腔巨噬细胞过程中的作用探讨[D].镇江:江苏大学,2016
- [35] Ghosh S, Khatua S, Acharya K. Crude polysaccharide from a wild mushroom enhances immune response in murine macrophage cells by TLR/NF- $\kappa$ B pathway [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2019, 71(8): 1311-1323
- [36] Zhang X, Wang J, Xu Z, et al. The impact of rhubarb polysaccharides on Toll-like receptor 4-mediated activation of macrophages [J]. International Immunopharmacology, 2013, 17(4): 1116-1119
- [37] WEI Wei, XIAO Haitao, BAO Wanrong, et al. TLR-4 may mediate signaling pathways of astragalus polysaccharide RAP induced cytokine expression of RAW264.7 cells [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 179: 243-252
- [38] Won J O, Uhee J, Hyun S E, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by *Buddleja officinalis* extract in BV-2 microglial cells via negative regulation of NF- $\kappa$ B and ERK1/2 signaling [J]. Molecules, 2013, 18(8): 9195-9206
- [39] Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy - from molecular mechanisms to therapeutic benefits [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2005, 1754(1-2): 253-262
- [40] Krens S F, Spaink H P, Snaar J B. Functions of the MAPK family in vertebrate-development [J]. FEBS Letters, 2006, 580(21): 4984-4990
- [41] Matthew S, Hayden, Sankar, et al. Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling [J]. Cell, 2008, 132(3): 344-362
- [42] Yu Q, Nie S P, Wang J Q, et al. Polysaccharide from *Ganoderma atrum* induces tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion via phosphoinositide 3-kinase/Akt, mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathways in RAW264.7 cells [J]. International Immunopharmacology, 2012, 14(4): 362-368