

# 小麦麸皮阿拉伯木聚糖的免疫调节作用

何洋<sup>1,2</sup>, 周静<sup>1,2</sup>, 陈薇<sup>2</sup>, 张迹<sup>2</sup>, 沈婷<sup>2</sup>, 冯作山<sup>1\*</sup>, 胡卫成<sup>2\*</sup>

(1. 新疆农业大学, 食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

(2. 淮阴师范学院, 江苏省高校区域现代农业与环境保护协同创新中心, 江苏淮安 223300)

**摘要:** 该研究以小麦麸皮阿拉伯木聚糖 (AX) 为研究对象, 探讨其对小鼠腹腔巨噬细胞的免疫调节作用及机制。用不同浓度的 AX 处理小鼠腹腔巨噬细胞, 检测 AX 对小鼠腹腔巨噬细胞活力及 NO 释放量的影响, 用 AX 处理小鼠腹腔巨噬细胞 0、1、3、6 h, 检测 AX 对小鼠腹腔巨噬免疫关联基因及 MAPK、Akt 通路相关蛋白表达的影响。结果显示 6.25 和 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 AX 对小鼠腹腔巨噬细胞没有显著毒性, 细胞的存活率分别为 90.42% 和 89.99% ( $p>0.05$ )。当浓度高于 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 细胞存活率显著降低 ( $p<0.05$ ); 与对照组相比, AX (6.25~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 能显著增加小鼠腹腔巨噬细胞 NO 的释放量 ( $p<0.05$ ); 同时可以促进免疫关联基因 (1L-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS、COX-2、Nfkb $\alpha$ ) mRNA 的表达, 进一步研究发现 AX 可以增加 MAPK 和 Akt 信号通路蛋白 (ERK1/2、JNK、p38 MAPK、Akt) 的磷酸化水平。上述研究结果表明, AX 可以通过活化小鼠腹腔巨噬细胞, 增加 NO 的产生, 促进免疫关联基因 mRNA 的表达, 激活 MAPK 和 Akt 信号通路, 来调节免疫。

**关键词:** 阿拉伯木聚糖; 小鼠腹腔巨噬细胞; 免疫调节

文章编号: 1673-9078(2021)10-30-36

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.10.0056

## Immunoregulatory Effects and Mechanisms of Wheat Bran Arabinoxylan

HE Yang<sup>1,2</sup>, ZHOU Jing<sup>1,2</sup>, CHEN Wei<sup>2</sup>, ZHANG Ji<sup>2</sup>, SHEN Ting<sup>2</sup>, FENG Zuo-shan<sup>1\*</sup>, HU Wei-cheng<sup>2\*</sup>

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

(2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Regional Modern Agriculture & Environmental Protection, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, China)

**Abstract:** This study aims to investigate the immunomodulatory effects of arabinoxylan (AX) from wheat bran on mouse peritoneal macrophages and the relevant mechanisms. The effects of AX at different concentrations on the release of nitric oxide (NO), as well as cell viability of mouse peritoneal macrophages, were studied. Mouse peritoneal macrophages were treated with AX for 0, 1, 3, and 6 h to observe the effects of AX on the expressions of immune-associated genes and proteins related to MAPK and Akt signaling pathways. The results show that AX at concentrations of 6.25 and 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  have no significant toxicity to mouse peritoneal macrophages, and the cell survival rates are 90.42% and 89.99%, respectively ( $p>0.05$ ). However, when the concentration exceeds 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the cell survival rate is significantly reduced ( $p<0.05$ ). Comparisons between the control and treatment group demonstrate that AX at 6.25~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  can significantly increase NO release ( $p<0.05$ ). Moreover, the expressions of immune-associated gene mRNAs (1L-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS, COX-2, and Nfkb $\alpha$ ) are enhanced. The phosphorylation levels of MAPK and Akt pathway proteins (ERK1/2, JNK, p38 MAPK, and Akt) are also increased by AX. These results suggest that AX can regulate immunity by activating mouse peritoneal macrophages, increasing the production of NO, enhancing the mRNA expressions of immune-associated genes, and activating MAPK and Akt signaling pathways.

**Key words:** arabinoxylan; mouse peritoneal macrophages; immunoregulation

引文格式:

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):30-36

HE Yang, ZHOU Jing, CHEN Wei, et al. Immunoregulatory effects and mechanisms of wheat bran arabinoxylan [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 30-36

收稿日期: 2021-01-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31700304)

作者简介: 何洋 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工与综合利用, E-mail: heyang2166@163.com

通讯作者: 冯作山 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工及贮藏, E-mail: fengzuoshan@126.com; 共同通讯作者: 胡卫成 (1984-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品分子营养学, E-mail: hu\_weicheng@163.com

小麦种植范围广泛,我国是世界小麦主产国之一,2019年我国小麦产量为 $1.33 \times 10^8$  t。小麦生产加工中的主要副产物,麸皮的出品率一般为小麦的15%~25%,年产量可达 $2.00 \times 10^7$  t左右<sup>[1,2]</sup>。小麦麸皮含有丰富的脂肪酸、生育酚、膳食纤维以及酚类化合物。目前85%以上的小麦麸皮用作酿造和饲料生产的廉价原料,很少用于深加工,经济价值不高<sup>[1,3]</sup>。膳食纤维以多糖的形式存在于植物的细胞壁中,小麦麸皮中的多糖主要为阿拉伯木聚糖(Arabinoxylans, AX),约占麸皮组成的20%。

多糖是植物的次生代谢产物,具有很多生物活性,而多糖的生物活性与其单糖组成、糖苷键的连接方式、官能团、分子量、分支度等有关<sup>[4-6]</sup>。AX是一种半纤维素多聚糖,由阿拉伯糖和木糖组成,是植物细胞壁的主要成分之一,主要存在麦类、谷物及其麸糠中。AX具有诸多生物活性,如润肠通便、降低胆固醇、调节血糖、抗氧化、免疫调节等<sup>[7-9]</sup>。近年来,通过提取食物和食物来源的物质来增强免疫力已被广泛研究,AX在机体免疫调节方面已有一些研究报道,不同来源以及不同提取方式获得的AX均具有免疫调节活性。在日本,米糠中提取的AX作为免疫刺激剂已经上市。Zhou等<sup>[10]</sup>发现口服木聚糖酶和碱液提取的小麦麸皮AX对BALB/c小鼠的先天性免疫和适应性免疫都有调节作用;Cao等<sup>[11]</sup>报道AX可以通过增加S180肉瘤小鼠的胸腺指数和T、B淋巴细胞的数量来抑制肿瘤的生长;Akhtar等<sup>[12]</sup>发现碱液提取的AX对患有球虫病的鸡体液免疫功能具有增强作用,显著提高血清中IgS、IgG和IgM抗体水平。

免疫系统是一个由分子、细胞和器官构成的复杂网络,它们相互作用和交流,以防御病原体的入侵,维持机体的稳态<sup>[13]</sup>。免疫系统的性能对于保护机体免受病原体的侵害至关重要,它在维持健康平衡中发挥着重要的作用<sup>[14]</sup>。多糖可以直接或间接与免疫系统相互作用,触发多种细胞、分子活动,激活免疫系统,单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞是作出反应的主要靶点<sup>[15]</sup>。单核细胞从血液迁移到组织中分化成巨噬细胞,巨噬细胞广泛分布于全身,在宿主体内平衡和抵御病原性感染中发挥着重要作用。与传代细胞相比,原代细胞的形态结构和功能活动更接近体内组织,更适用于研究细胞的生长、分化、代谢及其生理、病理变化<sup>[16,17]</sup>。在外界因素的刺激下,巨噬细胞可以被激活,从而产生各种细胞因子、干扰素和趋化因子,最终刺激宿主的免疫系统<sup>[18]</sup>。

目前关于小麦麸皮AX的研究大部分都是基于动物实验,基于原代细胞信号转导调节的研究较少。因

此,在本研究中,进一步揭示AX的免疫功能及其机制,我们研究了AX对小鼠腹腔巨噬细胞活力、一氧化氮(NO)产生、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶-2(COX-2)、白介素 $1\beta$ (IL- $1\beta$ )、白介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和核转录因子(Nfkb)的mRNA水平的影响,以及对MAPK和Akt信号通路的影响也进行了分析。这些结果将为AX作为免疫调节剂的开发提供理论依据,提高小麦加工副产物的综合利用水平,为小麦麸皮的综合利用提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

阿拉伯木聚糖(AX),水提醇沉法提取于“淮麦33号”小麦麸皮,Sevage法除蛋白,经DEAE 52和Sephadex-G100色谱柱分离纯化,透析除去单糖后冻干。RPMI1640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、ERK、JNK、p38,美国CST公司;山羊抗兔IgG(HRP)、山羊抗鼠IgG(HRP),美国Abcam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 Mastermix、 $\beta$ -actin抗体、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、乙醇等,上海国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

HERA cell 150i型CO<sub>2</sub>细胞培养箱、MSC 1.2型超净工作台,美国Thermo公司;JY88-IIN型细胞超声破碎机,宁波新芝生物科技公司;Mix Mate混匀仪、5415R型小型高速离心机、5810R型台式离心机,德国Eppendorf公司;Infinite 200 pro型酶标仪,瑞士Tecan公司;GEL-DOC-XR型凝胶成像系统、T100型PCR仪,美国BIO-RAD公司;FE20型pH计,上海Mettler Toledo公司;AE31型倒置生物显微镜,厦门Motic公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 细胞的培养

小鼠腹腔巨噬细胞分离于SPF级ICR小鼠腹腔<sup>[16]</sup>,生长于含有10%胎牛血清、1%(V/V)青霉素和

链霉素的 RPMI medium 1640 培养基中, 培养在 37 °C, 湿润的含有 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中。

### 1.3.2 MTT 法检测细胞活力

参考 Hu<sup>[19]</sup>的方法, 细胞计数后, 用培养基将细胞稀释为  $1 \times 10^7$  cells/mL, 移液枪吸取 100  $\mu$ L 种入 96 孔板, 每组设三个复孔, 培养过夜后, 加入 AX, 使其终浓度为 0、6.25、12.5、25、50、100、200  $\mu$ g/mL, 放入培养箱内继续培养 24 h, 去除上清液, 用无血清的培养基将 MTT 母液 (5 mg/mL) 稀释为 0.5 mg/mL 的工作液, 每孔加入 100  $\mu$ L MTT 工作液, 并设空白对照组, 培养 4 h 后加 100  $\mu$ L stopping buffer, 继续培养 16~20 h, 酶标仪摇晃 30 s 混匀后在 570 nm 测定吸光度。

### 1.3.3 NO 释放量的检测

细胞计数后, 用培养基将细胞稀释为  $1 \times 10^7$  cells/mL, 移液枪吸取 100  $\mu$ L 种入 96 孔板, 每组设三个复孔, 放入培养箱中培养 24 h, 加入终浓度为 0、6.25、12.5、25、50、100、200  $\mu$ g/mL 的 AX, 同时设置阳性对照组, 加入 1  $\mu$ g/mL 的 LPS, 24 h 后测 NO

释放量。配制浓度 0、1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50、100  $\mu$ mol/L 的 NaNO<sub>2</sub> 制作标准曲线, 取 100  $\mu$ L 细胞上清液于 96 孔板中, 加入 100  $\mu$ L Griess 试剂, 室温下反应 10 min 后于 570 nm 处测吸光度值。

### 1.3.4 半定量 PCR 检测免疫关联基因 mRNA 的表达

根据 MTT 和 NO 的结果, 考虑高浓度的 AX 对细胞增殖有抑制作用, 故选择 6.25  $\mu$ g/mL 的 AX 进行后续研究。调整细胞密度为  $5 \times 10^6$  cells/mL, 种入培养皿中, 用 6.25  $\mu$ g/mL 的 AX 分别处理细胞 1、3、6 h, 弃去培养基, 加入 1 mL Trizol 于冰上裂解细胞, 然后加入 100  $\mu$ L 三氯甲烷, 振荡、离心后取水层加入等体积异丙醇, 混匀后静置, 管底出现的胶状沉淀即为 RNA, 用 0.1% DEPC (焦炭酸二乙酯) 水配制的 75% 乙醇清洗 RNA, 置于通风橱中晾干, 加入 30  $\mu$ L DEPC 水溶解 RNA, 保存在 -80 °C 冰箱中。

使用反转录试剂盒完成反转录, 得到 cDNA, 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 引物序列及 PCR 条件如表 1 所示。

表 1 引物序列及 PCR 条件

Table 1 Primer sequence and conditions for PCR

基因	序列	退火温度/°C	循环数
TNF- $\alpha$	F:5'-TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC-3'	55	20
	R:5'-GAGGCCATTTGGGAACCTTCT-3'		
COX-2	F:5'-CTGGTGCCTGGTCTGATGATGATG-3'	60	27
	R:5'-TCTCCTATGAGTATGAGTCTGCTGGTT-3'		
IL-1 $\beta$	F:5'-TGAAGCAGCTATGGCAACTG-3'	55	30
	R:5'-AGGTCAAAGTTTGGAAAGGA-3'		
iNOS	F:5'-CCCTCCGAAGTTTCTGGCAGCAG-3'	55	30
	R:5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'		
IL-6	F:5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'	55	30
	R:5'-GAGGATAACCACTCCCAACAGACC-3'		
Nfkb $\alpha$	F:5'-CCGCTGACCATGGAAGTCAT-3'	58	20
	R:5'-AAGAGCGAAACCAGGTCAGG-3'		
GAPDH	F:5'-CACTCACGGCAAATTCACGCGACA-3'	56	30
	R:5'-GACTCCACGACATACTCAGCAC-3'		

表 2 PCR 反应体系

Table 2 PCR reaction system

试剂	20 $\mu$ L 反应体系
2 $\times$ Taq Master Mix	10 $\mu$ L
Forward Primer (10 $\mu$ mol/L)	1 $\mu$ L
Reverse Primer (10 $\mu$ mol/L)	1 $\mu$ L
Template DNA	2 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	6 $\mu$ L

PCR 反应体系如表 2 所示, 配制 1% 琼脂糖凝胶,

每孔加 10  $\mu$ L PCR 产物, 电泳的条件为 90 V, 20 min, 完成后用凝胶成像系统拍照。

### 1.3.5 Western Blot 检测 MAPK 和 Akt 通路相关蛋白表达量

参考 Zhang<sup>[20]</sup>的方法, 调整细胞密度为  $5 \times 10^6$  个/mL, 种入培养皿中, 6.25  $\mu$ g/mL 的 AX 处理细胞 1、3、6 h, 弃去培养基, 加 1 mL 预冷的 PBS, 细胞刮收集细胞于 1.5 mL 离心管, 离心去除上清液, 沉淀中加入的 RIPA 细胞裂解液 250  $\mu$ L (含磷酸酶抑制剂和蛋

白酶抑制剂各 2.5  $\mu\text{L}$ ), 细胞超声破碎仪冰浴破碎细胞, 离心 (4  $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min) 10 min 收集上清, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, BSA 作为标准品, 蛋白上样量为 30  $\mu\text{g}$ , 上样体系为 25  $\mu\text{L}$ 。10% SDS-PAGE 凝胶电泳 (120 V, 90 min) 分离蛋白, 湿转法转蛋白至 PVDF 膜上 (100 V, 70 min), 5% BSA 封闭 2 h, TTBS 清洗三次, 一抗孵育过夜, TTBS 清洗三次, 二抗孵育 2 h, 清洗三次后加曝光液曝光。

#### 1.4 数据处理

使用 SPSS 23.0 软件分析数据, Duncan 法进行多组样本间差异显著性分析,  $p < 0.05$  时表示差异显著, 使用 Origin 2018 绘图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 AX 对小鼠腹腔巨噬细胞活力的影响

为了验证 AX 对小鼠腹腔巨噬细胞活力的影响, 用不同浓度的 AX 处理细胞 24 h, 实验结果如图 1 所示, AX 浓度为 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时细胞的存活率分别为 90.42% 和 89.99% ( $p > 0.05$ ), 对巨噬细胞的活力没有显著影响, 随着 AX 浓度逐渐增大, 细胞的存活率显著降低 ( $p < 0.05$ )。文献报道 AX 对巨噬细胞没有显著毒性, 本实验中高浓度 AX 引起了细胞毒性, 可能与 AX 中共价结合的酚酸 (主要是阿魏酸) 含量较高有关。阿魏酸对细胞没有毒性作用, 但会抑制细胞增殖<sup>[21,22]</sup>。

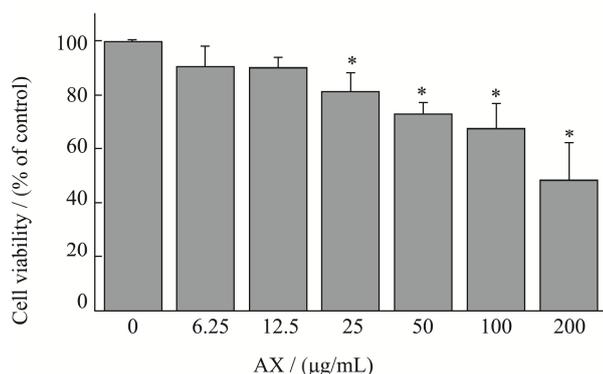


图 1 AX 对小鼠腹腔巨噬细胞活力的影响

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

注: \*表示与对照组的差异显著 ( $p < 0.05$ )。图 2 同。

### 2.2 AX 对腹腔巨噬细胞 NO 释放量的影响

一氧化氮 (NO) 是一种生物功能分子, 参与了很多重要的生物学活动, NO 的产生是活化巨噬细胞的杀伤机制。研究证实, 从药用植物或食物中分离的多

糖可增加巨噬细胞中 NO 的产生, 从而发挥免疫增强作用<sup>[23,24]</sup>。在本文研究中, 如图 2 所示, 用不同浓度的 AX (6.25~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理小鼠腹腔巨噬细胞 24 h 后, 所有浓度的 AX 均能显著增加 NO 的释放 ( $p < 0.05$ ), 且与阳性对照 LPS 诱导的细胞产生的 NO 的含量 (50.20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 没有显著差异 ( $p > 0.05$ ); 当 AX 浓度为 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, NO 的释放量为 50.25  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 是空白对照组的 16.78 倍 ( $p < 0.05$ )。低浓度的 NO (10~250  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 可以刺激细胞分裂, 而高浓度的 NO (>500  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), 则会抑制细胞分裂<sup>[25]</sup>, 说明 AX 诱导小鼠腹腔巨噬细胞产生的 NO 均对细胞增殖有促进作用。

NO 通过抑制 DNA 合成, 引起氧化损伤, 抑制细胞增殖和抗微生物防御作用<sup>[26]</sup>, 在先天免疫系统中起着重要作用。类似的报告显示, 米糠阿拉伯木聚糖在 RAW264.7 细胞和小鼠腹腔巨噬细胞中均可以诱导 NO 释放<sup>[27]</sup>; 玉米麸皮酶改性碱提阿拉伯木聚糖 (E-AEAX) 和碱提阿拉伯木聚糖 (AEAX) 也均可以促进 U937 单核细胞 NO 释放量的增加<sup>[28]</sup>。说明 AX 可能通过 NO 途径诱导免疫系统应答, 从而增强天然免疫, 维持机体健康。活化的巨噬细胞可以通过 NO 杀死肿瘤细胞, iNOS 的表达起着关键作用, Zhang 等<sup>[29]</sup>从小麦面粉中用水提取的 AX 和酶提 AX 均能通过增加的 iNOS 水平而不同程度地刺激 NO 的分泌。因此, 推测 AX 通过激活小鼠腹腔巨噬细胞增加 iNOS 的表达来增加 NO 的释放。

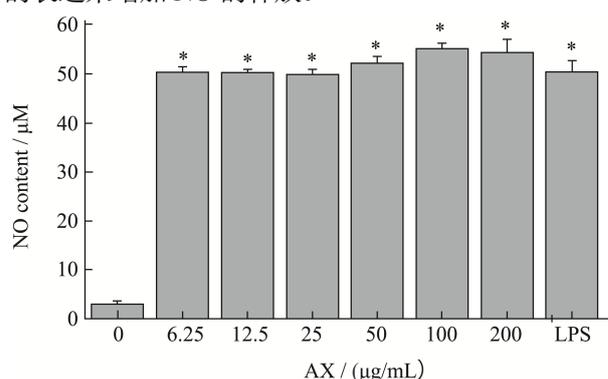


图 2 AX 对小鼠腹腔巨噬细胞 NO 释放量的影响

Fig.2 Effect of AX on the release of NO from mouse peritoneal macrophages

### 2.3 AX 对腹腔巨噬细胞免疫关联基因表达的影响

植物多糖可以激活巨噬细胞, 活化的巨噬细胞通过分泌炎症因子来调节免疫<sup>[15]</sup>, 如  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-6}$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 。Nfkbia 是核因子- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) 的抑制因子, 可以阻止

NF- $\kappa$ B 信号通路的激活。细胞因子的分泌是一种细胞反应，其特征是受体和多种信号通路的协调激活。有研究表明，活化的 MAPK 和 Akt 信号通路可以通过刺激/抑制炎症因子的产生和基因的表达来调节免疫 [26,30,31]。为了探讨 AX 对小鼠腹腔巨噬细胞免疫关联基因 mRNA 表达的影响，用 6.25  $\mu$ g/mL 的 AX 处理小鼠腹腔巨噬细胞 0、1、3、6 h，半定量 PCR 检测细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS、COX-2、Nfkbia 等基因 mRNA 的表达。

如图 3 所示，在正常细胞中，IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS、COX-2、Nfkbia 等基因的 mRNA 几乎不表达，而在 AX 处理之后的表达量显著增加。在其他相关研究中，Diao 等 [32] 发现白芨多糖诱导并提高 RAW264.7 细胞 iNOS、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 水平，并增强这些基因的表达。Park [23] 发现落葵多糖可以通过上调 iNOS mRNA 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO。目前的研究表明 AX 显著增加了小鼠腹腔巨噬细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS、COX-2、Nfkbia 基因的表达，这些数据说明 AX 在体外具有较强的免疫调节作用。Srinivasan 等 [22] 从两个不同品种的小米中提取了两种不同的酚酸结合 AX (PCA-AXs)：PCA-AX-L 和 PCA-AX-K，发现高分支度的 PCA-AX-L 可以上调 RAW264.7 细胞 TNF- $\alpha$ 、iNOS 和 COX-2 等基因 mRNA 的表达，而酚酸含量高的 PCA-AX-K 呈下调趋势，推测 AX 发挥不同的免疫调节作用可能与它的结构相关，因此，未来还需要对 AX 进行详细的结构分析和多靶点的分子机制研究，以确定其免疫调节潜能。

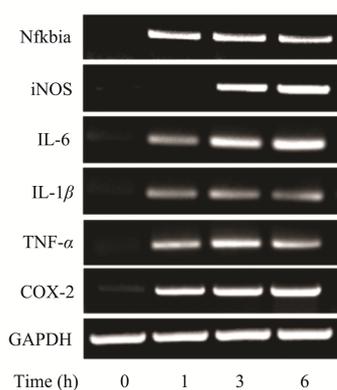


图 3 AX 对小鼠腹腔巨噬细胞免疫关联基因 mRNA 表达的影响  
Fig.3 Effect of AX on mRNA expression of immunoassociated genes in mouse peritoneal macrophages

### 2.4 AX 对小鼠腹腔巨噬细胞 MAPK 和 Akt 信号通路的影响

多糖免疫刺激作用的一个重要机制是增强巨噬细

胞的功能，细胞因子的分泌也是受多种信号通路和受体的协调激活。丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinases, MAPK) 是先天和适应性免疫反应的重要调节因子，细胞外信号调节激酶 (ERK1/2)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 是 MAPK 通路的三个亚家族。ERK、JNK 和 p38 在许多关键的细胞过程中发挥重要作用，调控基因 (如 TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS) 表达 [28,33]。蛋白激酶 B (Akt) 是生存激酶之一，参与调节细胞的生长、代谢和凋亡。有研究表明，Akt 可能参与 MAPK 信号通路的激活 [34]。为了检测 MAPK 和 Akt 信号通路是否介导了 AX 处理的小鼠腹腔巨噬细胞的免疫关联基因的表达，用 6.25  $\mu$ g/mL 的 AX 处理细胞 0、1、3、6 h，western blot 检测 ERK1/2、JNK、p38 MAPK、Akt 蛋白磷酸化水平的变化。

如图 4 所示，AX 处理后的小鼠腹腔巨噬细胞中 ERK1/2、JNK、p38 MAPK、Akt 蛋白的磷酸化水平较对照组显著增加，AX 处理 1 h 后，JNK、p38 MAPK 的磷酸化水平达到了峰值；AX 处理 3 h 后，Akt 的磷酸化水平显著增加；AX 处理 6 h 后，ERK1/2 的磷酸化水平显著增加，这些结果表明 AX 的免疫反应主要是通过激活 MAPK 和 Akt 信号通路，这些结论在其他研究中也得到了证明。Ren [35] 等发现白沙蒿多糖可以激活 MAPK 和 PI3K/Akt 通路，并且提高 RAW264.7 巨噬细胞 ERK1/2、JNK、p38 MAPK、Akt 蛋白的磷酸化水平；灵芝多糖 [34]、黄芪多糖 [36] 也被证实能通过 MAPK 信号通路蛋白磷酸化诱导免疫细胞激活，说明 AX 可能通过刺激小鼠腹腔巨噬细胞激活 MAPK 和 Akt 通路，上调 ERK1/2、JNK、p38 MAPK、Akt 蛋白的磷酸化水平，发挥免疫调节作用。

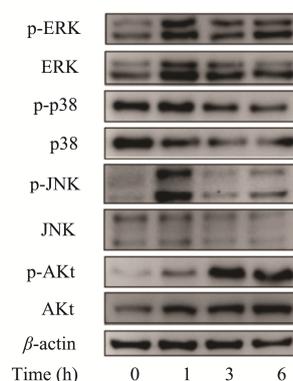


图 4 AX 对小鼠腹腔巨噬细胞 MAPK 和 Akt 信号通路的影响  
Fig.4 Effects of AX on MAPK and Akt signaling pathways in mouse peritoneal macrophages

### 3 结论

本文以小麦麸皮 AX 为对象, 研究 AX 对小鼠腹腔巨噬细胞免疫调节功能的影响。研究表明, AX 可以刺激小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO, 促进 COX-2、iNOS、Nfkb $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  基因 mRNA 的表达, 其免疫反应可能是通过激活 MAPK 和 Akt 信号通路来实现的。因此, 小麦麸皮 AX 可用于增强免疫功能和预防疾病, 同时也为小麦麸皮的综合利用提供新思路, 需要更多的研究来阐明 AX 的结构在免疫应答中的作用。

## 参考文献

- [1] 林琳. 小麦麸皮的营养成分及其开发利用[J]. 农业科技与装备, 2010, 3: 41-42  
LIN Lin. On the nutrient components and utilization of wheat bran [J]. Agricultural Science & Technology and Equipment, 2010, 3: 41-42
- [2] 江生. 小麦麸皮不同提取物的分析和抗氧化活性研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2009  
JIANG Sheng. Analysis and antioxidant activity of different extracts from wheat bran [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2009
- [3] Prueckler M, Siebenhandl-Ehn S, Apprich S, et al. Wheat bran-based biorefinery 1: composition of wheat bran and strategies of functionalization [J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 56(2): 211-221
- [4] Ferreira S S, Passos C P, Madureira P, et al. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: a review [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 132: 378-396
- [5] Liu J, Willför S, Xu C. A review of bioactive plant polysaccharides: biological activities, functionalization, and biomedical applications [J]. Bioactive Carbohydrates & Dietary Fibre, 2015, 5(1): 31-61
- [6] Wang K P, Wang J, Li Q, et al. Structural differences and conformational characterization of five bioactive polysaccharides from *Lentinus edodes* [J]. Food Research International, 2014, 62: 223-232
- [7] Ayala-Soto F E, Serna-Saldívar S O, García-Lara S, et al. Hydroxycinnamic acids, sugar composition and antioxidant capacity of arabinoxylans extracted from different maize fiber sources [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35(3): 471-475
- [8] Malunga L N, Eck P, Beta T. Inhibition of intestinal  $\alpha$ -glucosidase and glucose absorption by feruloylated arabinoxylan mono- and oligosaccharides from corn bran and wheat aleurone [J]. Journal of Nutrition and Metabolism, 2016, 2016: 1932532
- [9] Tong L T, Zhong K, Liu L, et al. Effects of dietary wheat bran arabinoxylans on cholesterol metabolism of hypercholesterolemic hamsters [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 112: 1-5
- [10] Zhou S, Liu X, Guo Y, et al. Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(4): 784-789
- [11] Cao L, Liu X, Qian T, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of arabinoxylans: a major constituent of wheat bran [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48(1): 160-164
- [12] Akhtar M, Tariq A F, Awais M M, et al. Studies on wheat bran arabinoxylan for its immunostimulatory and protective effects against avian coccidiosis [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(1): 333-339
- [13] Thompson, A E. The immune system [J]. Jama the Journal of the American Medical Association, 2015, 313(16): 1686
- [14] Nairz M, Schleicher U, Schroll A, et al. Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin-1 controls macrophage iron homeostasis and immune function in *Salmonella* infection [J]. Journal of Experimental Medicine, 2013, 210(5): 855-873
- [15] Ferreira S S, Passos C P, Madureira P, et al. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: a review [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 132: 378-396
- [16] 徐元年, 刘桂林, 蒙臣, 等. 快速振荡法高效提取小鼠腹腔巨噬细胞研究[J]. 中国全科医学, 2016, 19(3): 303-306  
XU You-nian, LIU Gui-lin, MENG Cheng, et al. Highly effective extraction of mouse peritoneal macrophages by quick vibrating method [J]. Chinese General Practice, 2016, 19(3): 303-306
- [17] 严玉兰, 刘洋, 步雪峰, 等. 鼠肺细胞的分离纯化及原代培养[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2008, 18(1): 11-14  
YAN Yu-lan, LIU Yang, BU Xue-feng, et al. Isolation and purification and primary culture of lung cells from rats [J]. Journal of Jiangsu University: Medicine Edition, 2008, 18(1): 11-14
- [18] Zhang J, Liu N, Sun C, et al. Polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* Delar. ex redoute induce an immune response in the RAW264.7 cell line via an NF- $\kappa$ B/ MAPK pathway [J]. RSC Advances, 2019, 9(31): 17988-17994
- [19] Hu W, Wang X, Wu L, et al. Apigenin-7-O- $\beta$ -d-glucuronide

- inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of AP-1 and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 macrophages and protects mice against endotoxin shock [J]. *Food & Function*, 2016, 7(2): 1002-1013
- [20] Zhang J, Jiang Y, Li Y, et al. Micelles modified with a chitosan-derived homing peptide for targeted intracellular delivery of ginsenoside compound K to liver cancer cells [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 230: 115576
- [21] 张欣,高增平.阿魏酸的研究进展[J].*中国现代中药*,2020, 22(1):138-147  
ZHANG Xin, GAO Zeng-ping. Research progress in ferulic acid [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2020, 22(1): 138-147
- [22] Srinivasan A, Aruldas J, Perumal S S, et al. Phenolic acid bound arabinoxylans extracted from Little and Kodo millets modulate immune system mediators and pathways in RAW 264.7 cells [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45: e13563
- [23] Park H 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] Zhang X, Li Y, Cheng J, et al. Immune activities comparison of polysaccharide and polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 65: 441-445
- [25] 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): 286-291
- [26] 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
- [27] Ghoneum M, Matsuura M. Augmentation of macrophage phagocytosis by modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) [J]. *International Journal Immunopathology and Pharmacology*, 2003, 17(3): 283-292
- [28] 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
- [29] Zhang Z, Smith C, Ashworth J, et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase by arabinoxylans with molecular characterisation from wheat flour in cultured human monocytes [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 53(5): 1294-1302
- [30] Harikrishnan H, Jantan I, Haque M A, et al. Anti-inflammatory effects of hypophyllanthin and niranthin through downregulation of NF- $\kappa$ B /MAPKs/PI3K-Akt signaling pathways [J]. *Inflammation*, 2018, 41(3): 984-995
- [31] Seo J Y, Lee C W, Choi D J, et al. Ginseng marc-derived low-molecular weight oligosaccharide inhibits the growth of skin melanoma cells via activation of RAW264.7 cells [J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 29(2): 344-353
- [32] Diao H, Li X, Chen J, et al. *Bletilla striata* polysaccharide stimulates inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression in macrophages [J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2008, 105(2): 85-89
- [33] Oh W J, Jung U, Eom H S, 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
- [34] 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
- [35] Ren D, Lin D, Alim A, et al. Chemical characterization of a novel polysaccharide ASKP-1 from *Artemisia sphaerocephala* Krasch seed and its macrophage activation via MAPK, PI3k/Akt and NF- $\kappa$ B signaling pathways in RAW264.7 cells [J]. *Food & Function*, 2017, 8(3): 1299-1312
- [36] Wei W, Xiao H T, Bao W R, 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