

樟树果实多糖对巨噬细胞 RAW264.7 的免疫调节作用

吴静¹, 胡居吾¹, 熊伟¹, 顾震¹, 王慧宾¹, Bae Young-soo^{1,2}, 吴磊¹

(1. 江西省科学院应用化学研究所, 江西南昌 330096)

(2. 韩国江原大学森林与环境学院森林生物质材料工程, 江原道春川市 200-701)

摘要: 樟树被证明具有许多生物活性, 包括抗真菌、抗氧化、抗菌、抗过敏、抗炎活性。然而, 很少有研究报道樟树果实多糖 (CCFP)。本研究的目的首先从樟树果实中分离出 CCFP, 然后通过体外实验评估其对 RAW264.7 巨噬细胞免疫调节活性。结果表明, CCFP 可显著提高 RAW 264.7 细胞内一氧化氮 (NO) 的浓度和细胞因子如前列腺素 E₂ (PGE₂) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 的分泌, 在给药浓度为 100 μ g/mL 时, NO、TNF- α 和 PGE₂ 的分泌量达到最大, 分别为 53.53 \pm 4.25 μ M、1008.32 \pm 35.23 pg/mL 和 434.56 \pm 25.23 pg/mL。反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 分析结果表明, CCFP 也能够提高诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧化酶-2 (COX-2) 和 TNF- α 的表达。进一步的分析表明, CCFP 通过与 Toll 样受体 4 (TLR4) 蛋白结合, 迅速激活细胞外信号调节激酶 (ERK)、转录激活因子激活蛋白-1 (AP-1) 和核因子 (NF)- κ B。这些结果表明, CCFP 可以提高免疫力, 在功能食品的开发中, 可以作为一个潜在的免疫调节剂。

关键词: 樟树果实; 多糖; 免疫调节活性

文章编号: 1673-9078(2018)09-12-18

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.9.003

Immunomodulatory Effect of Polysaccharide Isolated from *Cinamomum camphora* Fruits on Macrophage RAW264.7

WU Jing¹, HU Ju-wu¹, XIONG Wei¹, GU Zhen¹, WANG Hui-bin¹, BAE Young-soo^{1,2}, WU Lei¹

(1. Institute of Applied Chemistry, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, China)

(2. Department of Forest Biomaterials Engineering, College of Forest & Environment Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

Abstract: *Cinamomum camphora* is proved to possess a lot of biological activities, including antifungal, antioxidant, antibacterial, anti-allergic, and anti-inflammatory activities. However, little research has been reported on the *C. camphora* fruit polysaccharides (CCFP). Therefore the objective of this study was to isolate polysaccharide from *C. camphora* and evaluate its immunomodulatory activities on Macrophage RAW264.7. The results indicated that CCFP significantly promoted the production of intracellular nitric oxide (NO) and cytokines such as prostaglandin E₂ (PGE₂) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in RAW 264.7 cells. When the dosage of CCFP was 100 μ g/mL, the secretion of NO, TNF- α and PGE₂ reached to the maximum values of 53.53 \pm 4.25 μ M, 1008.32 \pm 35.23 pg/mL and 434.56 \pm 25.23 pg/mL, respectively. The result of RT-PCR analysis indicated that CCFP also enhanced inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), and TNF- α expression. Further analyses demonstrated that CCFP rapidly activated the extracellular signal-regulated kinase (ERK) and enhanced the transcriptional activities of activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor (NF)- κ B via toll-like receptor 4 (TLR4). Taken together, these results suggest that CCFP can improve immunity, and could be explored as a potential immunomodulatory agent in functional food.

Key words: *Cinnamomum camphora*(L.) presl. fruit; polysaccharide; immunomodulatory activity

免疫调节, 作为人体内的一种重要防御, 在宿主防御病原体和抗原的入侵起到了重要的作用^[1]。来自

收稿日期: 2018-05-02

基金项目: 江西省重点研发计划项目 (20171BBH80017); 江西省科技计划项目 (20151BBF60024); 江西省科学院博士人才引进项目 (2016-YYB-07)

作者简介: 吴静 (1985-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 细胞生物学
通讯作者: 吴磊 (1985-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然产物化学与细胞生物学

血单核细胞的巨噬细胞可以通过识别感染性病原体启动先天免疫应答, 从而抑制多种肿瘤细胞的生长和微生物的入侵^[2,3]。多糖, 作为最基本的生物大分子是由单糖组成, 广泛分布在动物、植物、藻类和真菌中。近年来, 从天然资源中分离出的多糖已被证明具有广泛的生物特性, 如抗氧化、抗癌和免疫调节活性, 已广泛应用于食品和制药工业中^[4-6]。很多植物多糖已被视为重要的免疫调节剂, 由于其没有明显的毒副作用

而且能够增强巨噬细胞的活化能力。一旦被激活,巨噬细胞可直接通过吞噬作用杀死病原体,并通过分泌一氧化氮、前列腺素 E_2 (PGE_2)、肿瘤坏死因子- α ($TNF-\alpha$)、白细胞介素- 1β ($IL-1\beta$) 和 $IL-6$ 等炎症介质间接地杀死病原体^[7]。多糖介导的免疫细胞的刺激可以通过结合巨噬细胞膜受体 (PRRs) 如树状细胞凝集素-1(Dectin-1)、Toll 样受体 (TLRs)、补体受体 3 (CR3), 并引发了一系列的信号转导通路包磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (PI3K) /Akt、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK), 以及转录因子如核因子 (NF) - κ B 和激活蛋白 (AP) -1^[8]。

樟树 (*Cinnamomum camphora* (L.) Presl.) 又名香樟、乌樟、樟木、芳樟等, 是樟科 (*Lauraceae*) 樟属 (*Cinnamomum*) 常绿高大阔叶乔木。樟树是我国重要的经济树种和绿化树种, 在中国南部各省份广泛分布, 江西省将其命为“省树”^[9]。对该属植物化学成分研究表明多含挥发油、多酚、黄酮、瑞诺烷类二萜、鞣质、芳香性化合物、生物碱、木质素、有机酸及多糖等成分^[10-12]。现代药理研究发现, 樟树资源具有抑菌、消炎、止痛、抗癌、抗氧化及提高人体免疫力等药用价值^[13,14]。目前, 素有中国最大的香精香料基地-“金溪县”, 对樟树的开发利用中, 很重要的一方面是对它的芳香资源的开发利用, 而对于提取后的樟树原料直接作为柴火进行焚烧, 对其果实多糖的研究更是处于空白。本研究以樟树果实多糖为研究对象, 在细胞和分子水平上探讨其免疫调节的潜在作用机制。为合理开发利用樟树资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

樟树果实于2017年3月上旬由江西思派思香料化工有限公司提供, 江西省科学院应用化学研究所天然产物研究室李雄辉研究员鉴定为樟树 (*Cinnamomum camphora* (L.) Presl.) 的果实。

二甲基亚砜 (DMSO)、脂多糖 (LPS)、甲氮甲唑蓝 (MTT) 均购于 Sigma 公司; RPMI 1640 培养基、抗生素、胰蛋白酶、PBS (PH 7.4) 和胎牛血清均购于 Gibco 公司; RIPA 细胞裂解液购于碧云天生物技术有限公司; GAPDH、iNOS、 $TNF-\alpha$ 、COX-2 引物购于武汉博士德公司; ECL 增强化学发光检测试剂盒及微量 BCA 蛋白定量试剂盒北京康为世纪生物科技有限公司; 所需一抗购于美国 Cell Signaling 公司, 二抗购于美国 Abcam 公司; ELISA 试剂盒购于 R&D Systems; 聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 购于 Bio-Rad;

十二烷基硫酸钠、N-1-萘乙二胺盐酸盐、对氨基苯磺酰胺、无水乙醇均为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

YC-1800 实验室低温喷雾干燥机, 上海雅程仪器设备有限公司; H1850 台式高速冷冻离心机, 厦门森态仪器仪表有限公司; TD6A-WS PPR 超速冷冻离心机, 金坛区华城润华实验仪器厂; PCR 扩增仪, ABI 公司; 电泳槽, Bio-Rad 公司; FDU-1200 冷冻干燥机, 日本东京理化; Tecan infinite M200 PRO 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; Gel XP System 伯乐凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; XD-202 倒置生物显微镜, 南京江南永新光学公司; Tanon5200 数码凝胶图像处理系统, 上海天能科技有限公司; KQ-500B 超声波清洗仪, 中国昆山超声仪器有限公司; TGL-16GA CO_2 培养箱美国 Thermo 公司; Nanopure 超纯水系统, Millipore 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 樟树果实多糖的制备

将阴干的樟树果实粉碎 (3000.00 g), 以 95% 乙醇超声提取 3 次, 每次 2 h, 滤过, 合并滤液, 减压回收乙醇, 去除挥发性成分。将所得到的樟树果实药渣在室温下阴干, 去除乙醇残留。以蒸馏水为提取溶剂, 料液比为 1:50 (m/V), $100\text{ }^\circ\text{C}$ 下热回流提取两次, 每次提取 2 h, 离心取得上清液。将上清液进行喷雾干燥, 进风口温度 $125\text{ }^\circ\text{C}$, 出风口温 $85\text{ }^\circ\text{C}$, 压强 0.4 MPa 得樟树果实多糖粗粉。将所得樟树果实粗多糖在热水中复溶解, 溶液用 Sevag 试剂 [氯仿:正丁醇=5:1 (V/V)] 5:1 除蛋白 3 次, 上层液体经减压浓缩去除 Sevag 试剂残留, 加入 4 倍体积 95% 乙醇, 搅拌并于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱过夜, 离心收集多糖沉淀。将多糖沉淀溶解于蒸馏水, 透析袋透析 48 h, 经冷冻干燥后得到樟树果实多糖 (CCFP), 放入冰箱备用。多糖含量经苯酚硫酸法测定为 62.36%, 提取得率为 3.3%。

1.3.2 细胞培养和药液配制

RAW 264.7 细胞从美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 购得, 用 RPMI 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素) 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养至对数生长期。将 CCFP 溶解于 DMSO 中, 用 RPMI 1640 培养基稀释成供试液浓度, 所配制的药液中 DMSO 含量不能超过 0.1%。

1.3.3 细胞活性检测-MTT 法

采用 MTT 法^[15]检测细胞存活率。选取对数生长期 RAW 264.7 细胞, 按 1×10^6 个/mL、100 μL /孔接种

于 96 孔板中, 置于 CO₂ 培养箱培养过夜后, 吸取旧培养基, 加入待测药物的新培养基继续培养 24 h, 吸取旧培养基, 于每孔中加入 MTT 工作液 100 μ L, 继续孵育 3 h 后每孔加入 MTT 终止液 100 μ L 继续培养 16~20 h 后, 用酶标仪在 550 nm 处测定 OD 值, 实验重复 3 次, 计算细胞的相对存活率。相对细胞存活率 = (实验组孔吸光值-空白组孔吸光值) / (对照组孔吸光值-空白组孔吸光值) \times 100%。

1.3.4 CCFP 对 RAW264.7 细胞 NO、PGE₂ 和 TNF- α 分泌的影响

将密度为 1×10^5 个/mL 细胞接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L 置于 CO₂ 培养箱中培养过夜, 洗掉旧培养

基, 加入不同浓度供试药物的新培养基继续培养 24 h, 以加入 1 μ g/mL LPS 处理的细胞作为阳性对照组。用 Griess 法^[16]检测细胞上清液中 NO 的分泌量, 按 ELISA 检测试剂盒操作方法测定 TNF- α 及 PGE₂ 的分泌量。

1.3.5 CCFP 对 RAW264.7 细胞 iNOS、COX-2 及 TNF- α mRNA 表达的影响

将 5×10^6 个细胞放入直径为 40 mm 的小培养皿(4 mL 的培养基) 培养 16 h, 吸去旧培养基, 加入含有 100 μ g/mL 的 CCFP 分别处理 10 min、60 min、180 min、360 min 后收集细胞。采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 反转录为 cDNA, 然后扩增 cDNA。引物序列和 RT-PCR 条件如表 1 所示。

表 1 引物序列及 RT-PCR 条件

Table 1 Primer sequences and conditions for RT-PCR

基因名	引物序列(5'-3')	扩增条件	循环数
GAPDH	F: CACTCACGGCAAATTCAACGGCA	Denaturation-94 $^{\circ}$ C, 30 s	30
	R: GACTCCACGACATACTCAGCAC	Annealing-60 $^{\circ}$ C, 30 s	
		Extension-72 $^{\circ}$ C, 30 s	
iNOS	F: CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAG	Denaturation-94 $^{\circ}$ C, 30 s	27
	R:GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG	Annealing-60 $^{\circ}$ C, 30 s	
		Extension-72 $^{\circ}$ C, 30 s	
COX-2	F: CACTACATCCTGACCCACTT	Denaturation-94 $^{\circ}$ C, 30 s	30
	R: ATGCTCCTGCTTGAGTATGT	Annealing-55 $^{\circ}$ C, 30 s	
		Extension-72 $^{\circ}$ C, 30 s	
TNF- α	F: TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	Denaturation-94 $^{\circ}$ C, 30 s	30
	R: GAGGCCATTTGGGAACCTCT	Annealing-55 $^{\circ}$ C, 30 s	
		Extension-72 $^{\circ}$ C, 30 s	

1.3.6 细胞转染和荧光素酶基因测定

取对数生长期且细胞形态生长良好的 RAW264.7 细胞, 弃去旧培养基, 加入新鲜培养基, 用刮板轻轻刮下轻轻吹打至单个细胞, 采用台盼蓝法在显微镜下细胞计数, 按 5×10^5 个细胞数目接种于小培养皿中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h 后, 弃去上清, 加入新鲜培养基细胞用 Lipofectamine 3000 转染试剂盒向细胞中转染 NF- κ B 报告基因质粒或 AP-1 报告基因质粒。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h 后, 弃去上清, 再加入不同浓度梯度的 CCFP 处理细胞。荧光素酶活性采用试剂盒测定。

1.3.7 Western Blot 检测 RAW264.7 细胞因子的蛋白表达

取对数生长期 RAW264.7 细胞, 接种 5×10^6 个细胞于直径为 60 mm 的 4 mL 培养皿中, 于上述培养箱中培养 16 h。吸去旧的培养基, 加入 100 μ g/mL 的 CCFP 分别处理不同的时间点后收集细胞。用 RIPA 裂解液法提取细胞蛋白, 按 BCA 试剂盒法制作标准曲

线测定核蛋白浓度。移取 30 μ L 体系核蛋白, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 采用半干半湿法将蛋白转至 PVDF 膜。将转好的 PVDF 膜置于摇床, 将膜取出, 放在摇床上, 1*TBST 10 mL 清洗一次, 10 min 后倒掉, 用 3% BSA 5 mL 室温洗膜 1 h 后倒掉。TTBS 10 mL 洗三次, 每次 10 min, 一抗 2.5 μ L 与 5 mL 3%BSA 混合清洗 1 h 后回收一抗, TTBS 10 mL 洗三次, 每次 10 min 倒掉, 对应二抗 Rabbit/mouse 2.5 μ L+5 mL 3% BSA 清洗 1 h 后倒掉。TTBS 10 mL 洗三次, 每次 10 min 后显影。洗膜后加入辣根过氧化物酶试剂显色, 将混合液滴加到 PVDF 膜上, 用数码凝胶图像处理系统进行化学发光成像。放入暗室预设曝光时间为 30 s、60 s、90 s、120 s 和 5 min。检测各组细胞蛋白表达水平。

1.3.8 结果分析

数据结果采用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组之间的差异性采用单向方差分析通过统计软件包 SPSS 19.0 版, $p < 0.05$ 认为有显著性差异, $p > 0.05$ 则无显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 樟树果实多糖对炎症因子释放的影响

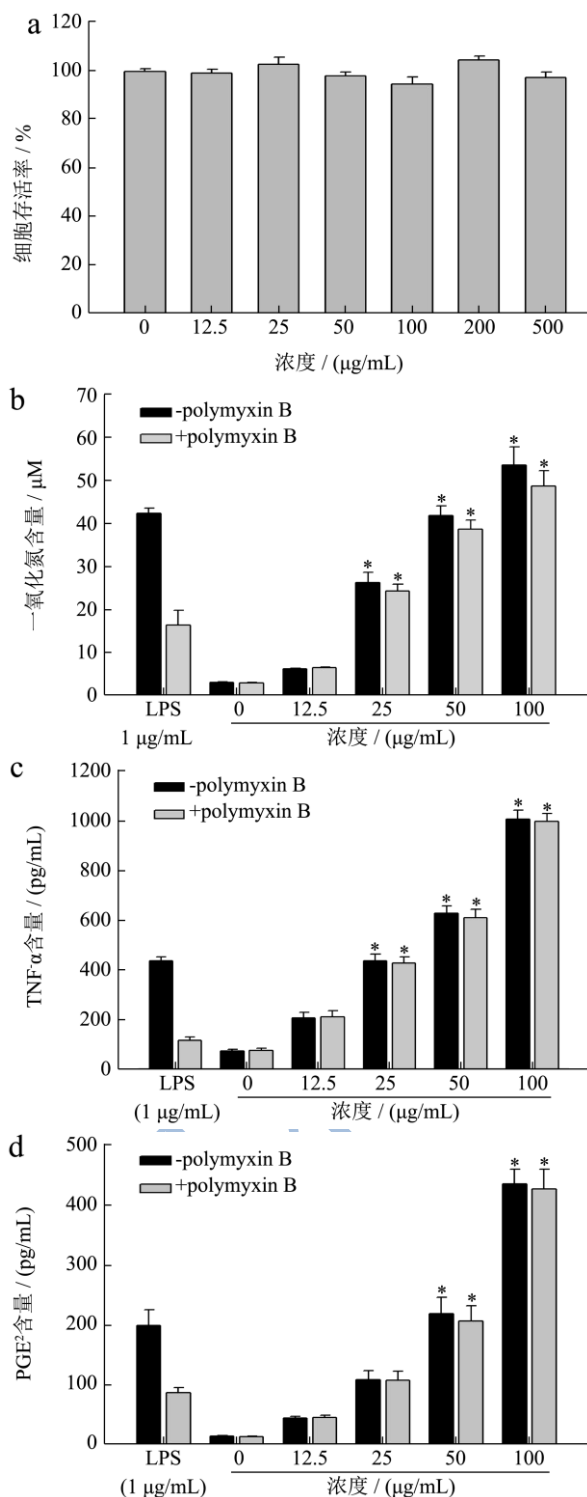


图1 CCFP对RAW264.7细胞存活率及炎症因子含量的影响

Fig.1 The effects of CCFP on cells viability and the contents of cytokines secretion in RAW 264.7

为了研究樟树果实多糖 (CCFP) 对 RAW264.7 细胞活性的影响, 本实验采用 MTT 法检测 CCFP 一

定的浓度范围内细胞的存活率。结果如图 1 (a) 所示, 在给药范围 12.5~500 µg/mL 内, 细胞存活率所呈现的趋势与空白对照组相比基本一致, 这说明 CCFP 在浓度 12.5~500 µg/mL 范围内对 RAW 264.7 细胞并无毒性, 可进行下面的实验研究。

细胞因子是细胞间的信号分子, 由免疫和非免疫细胞分泌, 在免疫反应中起到重要的作用。活化的巨噬细胞能够释放大量的细胞因子, 比如 NO, TNF-α 和 PGE₂。这些炎症因子在细胞毒性/抑制细胞生长的机制中发挥着重要的作用^[17,18]。因此, 我们将 NO 的释放水平作为免疫刺激中巨噬细胞活化的指标之一。NO 的含量测定采用 Griess 试剂法, 结果如图 1 (b) 所示, 正常组中 RAW264.7 细胞只释放少量的 NO (3.12±0.12 µM), 随着给药浓度的增加, RAW264.7 细胞释放 NO 的含量逐渐增加, 并呈现出浓度依赖性关系。在给药浓度为 100 µg/mL 时, NO 的分泌量达到最大 (53.53±4.25 µM)。另一方面, 在给药浓度在 12.5~50 µg/mL 范围时, RAW264.7 细胞释放 NO 的含量比 LPS 组低, 说明 CCFP 比 LPS 更温和^[19], 适合作为免疫调节剂。

TNF-α 和 PGE₂ 两个细胞因子是免疫刺激中巨噬细胞活化的另外两个指标。为进一步探讨 CCFP 如何作用于巨噬细胞, 通过 ELISA 试剂盒法检测细胞内 TNF-α 和 PGE₂ 细胞因子的分泌, 结果如图 1 (c 和 d) 所示, 在测试浓度范围内, CCFP 能够促进 TNF-α 和 PGE₂ 细胞因子的分泌, 与 NO 分泌的结果一致都呈现出浓度依赖性关系。在给药浓度为 100 µg/mL 时, TNF-α 和 PGE₂ 的分泌量达到最大, 分别为 1008.32±35.23 pg/mL 和 434.56±25.23 pg/mL。为了排除 CCFP 污染而引起的炎症因子释放, 我们向实验组中加入内毒素 B (PolyB), 实验结果图 1 (b-d) 所示, 内毒素 B (PolyB) 能够降低 LPS 激活巨噬细胞产生炎症因子, 而对 CCFP 激活巨噬细胞的炎症因子并无影响, 这表明 CCFP 并没有污染。

2.2 CCFP 对 RAW264.7 细胞炎症因子基因表达的影响

iNOS 是重要的内源性免疫介质之一, 在正常的免疫功能中起重要作用, 包括巨噬细胞的活化和宿主对细胞内病原体的防御^[20]。以上研究结果表明, CCFP 能激活巨噬细胞分泌炎症因子, 接下来我们想确定 CCFP 是否对巨噬细胞中 COX-2、iNOS 和 TNF-α 基因的表达有促进作用, 用 CCFP 处理细胞 10 min、30 min、60 min、180 min、360 min 后, COX-2、iNOS

和 TNF- α 基因的表达采用 RT-PCR 测定,如图 2 所示。结果表明,CCFP 能够显著诱导 COX-2、iNOS 和 TNF- α 基因的表达并呈现一定的时效关系。与此同时,研究人员^[21]发现多糖可以诱导 RAW264.7 产生 NO、PGE2 和 TNF- α 是通过上调 iNOS、COX-2 和 TNF- α mRNA 表达来完成的,这与 2.1 的研究结果基本一致。以上研究表明 CCFP 通过调节细胞中 COX-2、iNOS 和 TNF- α 基因的表达来调节细胞中 NO、PGE₂ 和 TNF- α 的分泌量,这与 Wu^[22]和 Shen^[23]等研究的猴头菇和麸皮多糖免疫调节活性机制一致。

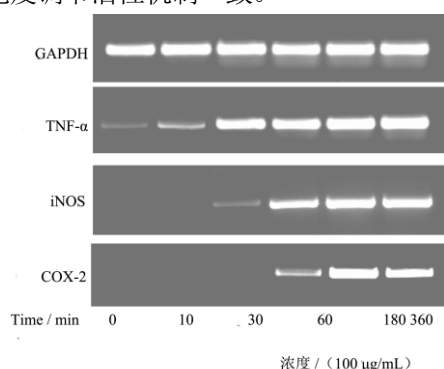


图 2 CCFP 对 RAW264.7 细胞炎症因子 iNOS、COX-2 和 TNF- α 基因表达的影响

Fig.2 The effect of CCFP on the expression of mRNAs of iNOS, COX-2, and TNF- α in RAW 264.7 cells

2.3 CCFP 对 TLR4 介导的信号通路的影响

NF- κ B 和 AP-1 转录因子,广泛控制着细胞内一些基因的表达包括 iNOS, TNF- α 和 IL-6, 以及参与细胞凋亡, 细胞衰老, 炎症与免疫等反应过程^[24]。为进一步研究 NF- κ B 和 AP-1 是否与 CCFP 诱导巨噬细胞 COX-2、iNOS 和 TNF- α 基因的表达有关,在 RAW264.7 细胞中构建 NF- κ B-Luc 和 AP-1-Luc, 采用荧光素酶报告基因检测方法考察 CCFP 对 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 和 AP-1 的表达情况。结果(图 3a, b): 在没有受到 CCFP 刺激的细胞, NF- κ B 和 AP-1 的表达量分别为 1.00 ± 0.12 和 1.00 ± 0.12 , 而经 12.5 μ g/mL, 25 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL 的 CCFP 处理 RAW264.7 细胞后, NF- κ B 和 AP-1 的表达量显著增加, 分别为: 6.32 ± 1.24 和 2.34 ± 1.45 , 12.45 ± 2.56 和 8.60 ± 2.56 , 14.67 ± 2.86 和 11.32 ± 3.22 , 18.75 ± 3.56 和 14.56 ± 3.78 。这充分说明 CCFP 对巨噬细胞的激活作用是通过 NF- κ B 和 AP-1 转录因子的参与。

当受到多种细胞外刺激如 LPS, 促炎性细胞因子和多糖时, MAPKs 蛋白激酶家族将会参与发起并激活 NF- κ B 和 AP-1 等转录因子活化^[25]。最近研究报道, 黄芪多糖、*Sutherlandia frutescens* 多糖、灵芝多糖通

过激活磷酸化 MAPKs 蛋白诱导细胞免疫反应^[26]。

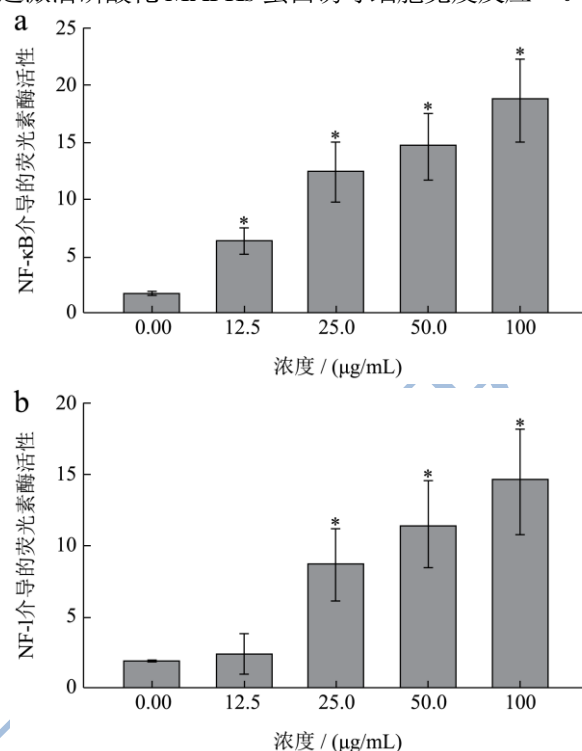


图 3 CCFP 对核转录因子 NF- κ B (a) 和 AP-1 (b) 的影响
Fig.3 Effect of CCFP on the nuclear translocation of NF- κ B (a) and AP-1 (b)

因此, 为了解 CCFP 介导的巨噬细胞活化期 3 条关于 MAPK 的信号通路的蛋白表达情况。免疫印迹法检测了 ERK、JNK 和 p38 MAPK 的磷酸化水平, 图 4 (a-b) 研究表明, CCFP (100 μ g/mL) 诱导的巨噬细胞能够迅速激活 p-ERK MAPKs, 并呈现时间依赖性关系。而 JNK, p-JNK, p-38, p-p38, ERK 的表达并无变化, 说明 CCFP 诱导细胞活化可能和激活 p-ERK MAPK 蛋白信号通路有关。这与之前的报道的黄芪多糖免疫调节活性通过激活 p-ERK MAPK 蛋白信号通路机制一致^[27]。Toll 样受体 (TLR) 在识别病原体 and 激活先天免疫中起着重要的作用, TLR4 是在细胞膜上最先发现的 Toll 蛋白, 可以识别革兰氏阴性细菌脂多糖 (LPS)^[28], 它在增强天然免疫应答和多糖诱导的细胞因子产生中起着重要作用。此外, 相关研究证实天然多糖如黄精多糖^[29], 菌菇多糖^[30], 黄芪多糖^[31]诱导巨噬细胞主要是通过 TLR4 受体结合, 更重要的是, TLR4 一旦被激活, 它能够促进细胞内信号通路传导从而激活相关蛋白, 如 ERK、JNK 和 p38 蛋白的激活, 以及转录因子如 NF- κ B 和 AP-1 的表达^[32]。本研究通过免疫印迹法, 对 CCFP 处理细胞不同时间点 (5, 10, 30, 60 min), 结果如图 4 (c-d) 所示, TLR4 受体蛋白表达随着反应的进行而逐渐增强, 研究结果表明 TLR4 受体是 CCFP 激活细胞的膜

结合位点。同时可以说明 CCFP 通过与细胞膜上 TLR4 受体结合，向下引发一系列的级联反应，从而激活巨噬细胞，释放大量的炎症因子。

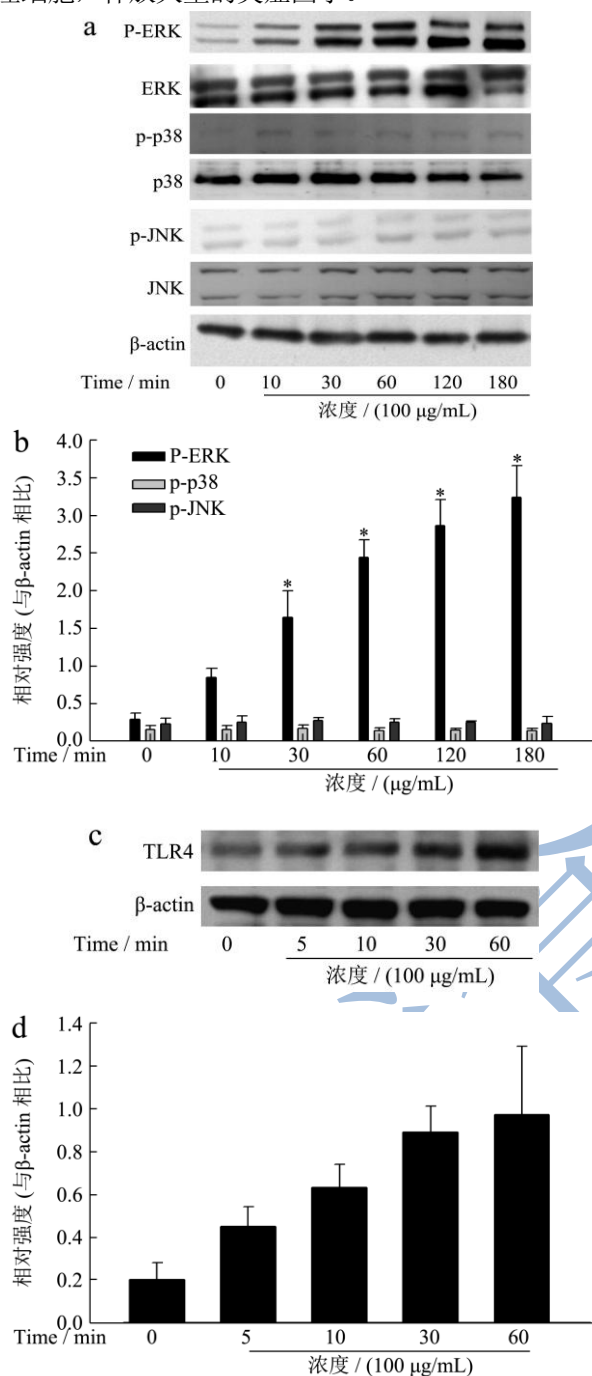


图 4 CCFP 对磷酸化 ERK1/2, p-JNK, p38 MAPK (a) 以及 TLR4 (b) 蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of CCFP on the phospho-ERK1/2, the phospho-JNK, the phospho-p38 MAPK (a-b) and TLR4 (c-d)

3 结论

3.1 巨噬细胞是一种吞噬细胞，在先天免疫反应中起着关键作用，在宿主遇到病原微生物入侵时，巨噬细胞作为抗原提呈细胞（APC），将抗原递呈给 T 淋巴

细胞，诱导适应性免疫应答。此外，巨噬细胞在胚胎发生、肿瘤发生、皮肤创伤愈合和造血等方面也发挥着重要作用^[33]。因此，巨噬细胞通常作为理想的细胞模型来评估活性物质的免疫调节性能。

3.2 樟树作为江西省省树，在开发和利用上面还存在很多不足。尤其是以江西省金溪县为主，虽然目前对樟树中挥发性成分的提取和应用有了一定的规模，但对于提取后的残渣并没有物尽其用。本研究发现樟树果实多糖对 RAW264.7 细胞的免疫调节活性首先通过与巨噬细胞 TLR4 膜受体结合，诱导下游 p-ERK MAPKs 蛋白的激活，NF-κB 和 AP-1 转录因子以及 COX-2、iNOS 和 TNF-α 基因的表达的上调，从而释放相应的 NO, TNF-α 和 PGE₂ 等炎症因子。据文献可知，本研究是首次以樟树果实多糖为研究对象阐述其可能存在的免疫调节活性机制，为合理开发利用樟树资源尤其是樟树农林废弃物提供理论依据和参考。

参考文献

- [1] Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, et al. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2017, 17(2): 97-111
- [2] Tarte S, Takeuchi O. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells [J]. *International Reviews of Immunology*, 2017, 36(2): 57-73
- [3] Berraondo P, Minute L, Ajona D, et al. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance [J]. *Immunological Reviews*, 2016, 274(1): 290-306
- [4] Cör D, Knez Ž, Knez Hrnčič M. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and anti-acetylcholinesterase effect of *Ganoderma lucidum* terpenoids and polysaccharides: a review [J]. *Molecules*, 2018, 23(3): 649-658
- [5] ZONG A, CAO H, WANG F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 90(4): 1395-1410
- [6] Liu J, Willför S, Xu C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications [J]. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2015, 5(1): 31-61
- [7] Zhang L, Wang C C. Inflammatory response of macrophages in infection [J]. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 2014, 13(2): 138-152
- [8] 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

- [9] 桂克印,文赤夫,汪兰,等.大孔树脂纯化樟树果实红色素的吸附性能研究[J].食品科学,2009,30(20):53-55
GUI Ke-yin, WEN Chi-fu, WANG Lan, et al. Purification of red pigment from *camphor* tree fruits by macroporous resin adsorption [J]. Food Science, 2009, 30(20): 53-55
- [10] 张峰,毕良武,赵振东,等.樟树植物资源分布及化学成分研究进展[J].天然产物研究与开发,2017,3:517-531
ZHANG Feng, BI Liang-wu, ZHAO Zhen-dong, et al. Review on plant resources and chemical composition of *camphor* tree [J]. Nature Product Research and Development, 2017, 3: 517-531
- [11] 郭丹,曾解放,范国荣,等.樟树精油的化学成分及生物活性研究进展[J].生物质化学工程,2015,49(1):53-57
GUO Dan, ZENG Jie-fang, FAN Guo-rong, et al. Research progress in chemical compositions and bioactivity of essential oil from *Cinnamomum camphora* [J]. Biomass Chemical Engineering, 2015, 49(1): 53-57
- [12] 尹爱武,田润,李探芳.樟树木化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2014,26(6):876-878
YIN Ai-wu, TIAN Run, LI Tan-fang. Studies on the chemical constituents of the stem of *Cinnamomum camphora* [J]. Nature Product Research and Development, 2014, 26(6): 876-878
- [13] 曾娟,李会娜.樟树叶多酚对油脂的抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2012,28(8):949-951
ZENG Juan, LI Hui-na. Antioxidant activity of polyphenol in *Camphor* leaf on lipid [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(8): 949-951
- [14] ZHOU H, REN J, LI Z. Antibacterial activity and mechanism of pinosresinol from *Cinnamomum Camphora* leaves against food-related bacteria [J]. Food Control, 2017, 79: 192-199
- [15] 罗海青,吴磊,强倩,等.黑蒜提取物对脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞炎症因子的影响[J].食品科技,2017,42(8): 199-205
LUO Hai-qing, WU Lei, QIANG Qian, et al. The effect of aged black garlic extract on cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells [J]. Food Science and Technology, 2017, 42(8): 199-205
- [16] Wu L, Li X, Hu W, et al. 5-Methoxyl aesculetin abrogates lipopolysaccharide-induced inflammation by suppressing MAPK and AP-1 pathways in RAW 264.7 cells [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(3): 315-342
- [17] Yu J, Hu M, Wang Y, et al. Extraction, partial characterization and bioactivity of polysaccharides from *Senecio scandens* Buch.-Ham [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 109: 535-543
- [18] Wen Z S, Xiang X W, Jin H X, et al. Composition and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Sargassum horneri* in RAW264. 7 macrophages [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 88: 403-413
- [19] Nie C, Zhu P, Ma S, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 188: 236-242
- [20] Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy [J]. Nature Medicine, 2007, 13(9): 1050-1059
- [21] Shen C Y, Zhang W L, Jiang J G. Immune-enhancing activity of polysaccharides from *Hibiscus sabdariffa* Linn. via MAPK and NF- κ B signaling pathways in RAW264. 7 cells [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 34: 118-129
- [22] Wu F, Zhou C, Zhou D, et al. Structural characterization of a novel polysaccharide fraction from *Heridium erinaceus* and its signaling pathways involved in macrophage immunomodulatory activity [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 37: 574-585
- [23] Shen T, Wang G, You L, et al. Polysaccharide from wheat bran induces cytokine expression via the toll-like receptor 4-mediated p38 MAPK signaling pathway and prevents cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice [J]. Food & Nutrition Research, 2017, 61(1): 1344523
- [24] Zhang M, Tian X, Wang Y, et al. Immunomodulating activity of the polysaccharide TLH-3 from *Tricholomalobayense* in RAW264. 7 macrophages [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 2679-2685
- [25] Lee J S, Kwon D S, Lee K R, et al. Mechanism of macrophage activation induced by polysaccharide from *Cordyceps militaris* culture broth [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 120: 29-37
- [26] 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- κ B signaling pathways in RAW264. 7 cells [J]. Food & Function, 2017, 8(3): 1299-1312
- [27] 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(8): 243-252
- [28] Chen X, Yu G, Fan S, et al. *Sargassum fusiforme*

- polysaccharide activates nuclear factor kappa-B (NF- κ B) and induces cytokine production via Toll-like receptors [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 105: 113-120
- [29] Long T, Liu Z, Shang J, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharides play anti-cancer effect through TLR4-MAPK/NF- κ B signaling pathways [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 813-821
- [30] Yang S, Zhuang T, Si Y, et al. *Coriolus versicolor* mushroom polysaccharides exert immunoregulatory effects on mouse B cells via membrane Ig and TLR-4 to activate the MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. Molecular Immunology, 2015, 64(1): 144-151
- [31] Zhou L, Liu Z, Wang Z, et al. *Astragalus* polysaccharides exerts immunomodulatory effects via TLR4-mediated MyD88-dependent signaling pathway in vitro and in vivo [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44822
- [32] Wang Z, Dong B, Feng Z, et al. A study on immunomodulatory mechanism of Polysaccharopeptide mediated by TLR4 signaling pathway [J]. BMC Immunology, 2015, 16(1): 34-45
- [33] Liao W, Luo Z, Liu D, et al. Structure characterization of a novel polysaccharide from *Dictyophora indusiata* and its macrophage immunomodulatory activities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(2): 535-544