

# 毛酸浆果提取物对 RAW264.7 细胞的免疫调节作用

王健, 王萍\*

(东北林业大学林学院, 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150000)

**摘要:** 该文探讨了毛酸浆果提取物 (*Physalis pubescens* L. Fruits Extract, PPFE) 对 RAW264.7 巨噬细胞免疫调节作用。采用噻唑蓝比色法 (MTT) 确定细胞毒性和增殖活性, 格里斯法 (Griess)、酶联免疫法 (ELISA)、荧光探针法、中性红吞噬实验测定体外培养的巨噬细胞中一氧化氮 (NO)、肿瘤因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白介素-6 (IL-6)、干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、活性氧 (ROS) 含量以及吞噬率; 流式细胞术测定细胞周期变化及细胞凋亡情况, 荧光定量反转录-聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  以及 IL-6 等细胞因子 mRNA 表达水平。结果显示: 运用 UHPLC-Q-TOF-MS 测定 PPFE 化学成分分析, 共鉴定出 14 种黄酮类物质。PPFE 作用 RAW264.7 细胞的安全浓度在 25~250  $\mu\text{g/mL}$  范围内, 与空白组相比, 毛酸浆果提取物质量浓度为 25  $\mu\text{g/mL}$  时免疫增强效果最佳, 其细胞增殖率、NO 释放量、吞噬率、相对活性氧水平、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 的分泌量分别为 130.53%、27.79  $\mu\text{mol/L}$ 、189.88%、137.75%、150.54  $\text{pg/mL}$ 、119.36  $\text{pg/mL}$ 、15.41  $\text{pg/mL}$ 。PPFE 治疗组的细胞周期的 G0/G1 期、S 期、G2/M 期百分比分别为 53.08%、17.40%、29.52%。细胞凋亡率与空白组相比降低了 52.80%, 同时极显著 ( $p < 0.01$ ) 上调 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 的表达。综上所述, PPFE 通过调节 RAW264.7 细胞吞噬功能、分泌免疫因子、细胞周期分布及凋亡情况, 以及上调细胞因子 mRNA 表达水平, 增强 RAW264.7 细胞免疫调节作用。

**关键词:** 毛酸浆果提取物; RAW264.7 巨噬细胞; 免疫调节

文章编号: 1673-9078(2022)09-100-110

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.9.1106

## Immunomodulatory Effect of *Physalis pubescens* L. Fruit Extract in RAW264.7 Cells

WANG Jian, WANG Ping\*

(College of Forestry, Northeast Forestry University, Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization of Heilongjiang Province, Harbin 150000, China)

**Abstract:** To investigate the immunomodulatory effect of *Physalis pubescens* L. fruit extract (PPFE) in RAW264.7 cells, the cytotoxicity and proliferative activity were determined by the thiazole blue colorimetric method (MTT). Griess assay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), fluorescent probe technique and neutral red phagocytosis assay were used to measure the contents of nitric oxide (NO), tumor factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$ , IL-6 and reactive oxygen species (ROS) as well as the phagocytosis rate. The changes in cell cycle and apoptosis were measured by flow cytometry, and the mRNA expression levels of cytokines such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6 were determined by fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The results showed that UHPLC-Q-TOF-MS was used to determine the chemical composition of PPFE, and a total of 14 flavonoids were identified. The safe concentration of PPFE for RAW264.7 cells was in the range of 25~250  $\mu\text{g/mL}$ . Compared with the blank group, the immunoenhancing effect was the strongest at 25  $\mu\text{g/mL}$ , with the corresponding cell proliferation rate, content of released NO, phagocytosis rate, relative ROS level, and contents of secreted TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6 were 130.53%, 27.79  $\mu\text{mol/L}$ , 189.88%, 137.75%, 150.54  $\text{pg/mL}$ , 119.36  $\text{pg/mL}$ , 15.41  $\text{pg/mL}$ , respectively. The percentages of G0/G1 phase, S phase and G2/M phase of the cell cycle were 53.08%, 17.40%, and 29.52%, respectively. Compared with the blank group, the apoptosis rate was reduced by 52.80%, while the expressions of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6 were significantly up-regulated ( $p < 0.01$ ) for the PPFE treated group. In

引文格式:

王健,王萍.毛酸浆果提取物对 RAW264.7 细胞的免疫调节作用[J].现代食品科技,2022,38(9):100-110

WANG Jian, WANG Ping. Immunomodulatory effect of *Physalis pubescens* L. fruit extract in RAW264.7 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 100-110

收稿日期: 2021-10-04

作者简介: 王健(1997-), 女, 硕士, 研究方向: 酸浆的免疫活性, E-mail: 1345156824@qq.com

通讯作者: 王萍(1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 植物活性物质分离及功能性, E-mail: wangping2178@nefu.edu.cn

summary, PPFE can enhance the immunomodulatory effect of RAW264 cells by regulating the phagocytosis, secretion of immune factors, cell cycle distribution and apoptosis, as well as up-regulating the mRNA expression levels of cytokines.

**Key words:** *Physalis pubescens* L. Fruits Extract (PPFE); RAW264.7 cells; immunomodulatory

巨噬细胞是机体最重要的免疫细胞类型之一<sup>[1]</sup>。在胞外微环境、内分泌、异源物质和衰老等条件刺激下,巨噬细胞具有免疫防御、监视、调节等免疫功能,它通过吞噬作用<sup>[2]</sup>和分泌多种细胞因子,如炎症介质一氧化氮(NO)、前列腺素E<sub>2</sub>(PEG<sub>2</sub>)、肿瘤因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白介素-6(IL-6)等<sup>[3]</sup>调控机体的免疫应答,适度调控巨噬细胞的活化对于提高机体的免疫力也有重要意义<sup>[4]</sup>。巨噬细胞是免疫系统的重要组成部分,免疫细胞功能或活性增强,则机体免疫力相应有所提高<sup>[5]</sup>。RAW264.7细胞生长速度快,繁殖效果好,已有较多研究通过体外培养RAW264.7细胞,研究植物提取物对RAW264.7细胞的免疫调节作用<sup>[6]</sup>。

毛酸浆(*Physalis pubescens* L.)是茄科酸浆属的一年生草本植物,又名洋姑娘,其成熟果实呈金黄色<sup>[7]</sup>。酸浆作为一种北方地区特有的浆果,具有很高的食用和药用价值<sup>[8]</sup>,含有人体必需的18种氨基酸、21种微量元素、大量的矿物质、维生素及不饱和脂肪酸等营养物质<sup>[9-11]</sup>,毛酸浆中的黄酮类、甾体类、苯丙素类、生物碱类、脂肪酸类等多种化学成分具有抗肿瘤<sup>[12]</sup>、抗菌<sup>[13]</sup>、抗氧化<sup>[14]</sup>、降血糖<sup>[15]</sup>、免疫调节<sup>[16]</sup>等多种药理活性。张英蕾<sup>[17]</sup>研究毛酸浆果浆对小鼠非特异性免疫有显著影响,且醇提物的淋巴细胞增殖免疫活性大于水提物。Wang等<sup>[18]</sup>研究毛酸浆果中的醉茄内酯具有很好的抗炎潜力。由此可知,毛酸浆果具有良好的免疫潜力。因此,本文以毛酸浆果提取物(*Physalis pubescens* L. Fruit Extract, PPFE)为原料,建立巨噬细胞RAW264.7免疫模型,测定一氧化氮、细胞因子、吞噬功能及活性氧等指标,进一步测定其对RAW264.7细胞周期以及凋亡的影响,最后测定TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6的mRNA表达,以分析毛酸浆果提取物对RAW264.7细胞的影响,拟为毛酸浆在营养和保健食品、生物化学和医药领域中的应用提供一定理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

RAW264.7细胞,上海吉满生物科技有限公司;DMEM高糖培养基、PBS磷酸盐缓冲溶液、胰蛋白酶-EDTA消化液、脂多糖、MTT、活性氧检测试剂盒、DNA含量检测试剂盒(细胞周期),北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清,浙江天航生物科技有限公司;

TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 等ELISA试剂盒,泉州科诺迪生物技术有限公司;RNAeasy<sup>TM</sup> Plus动物RNA抽提试剂盒、BeyoFast<sup>TM</sup> Probe One-Step qRT-PCR试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒,碧云天生物技术有限公司;无水对氨基苯磺酸,天津市大茂化学试剂厂;N-1-萘乙二胺盐酸盐,天津市光复精细化工研究所;磷酸,天津市富宇精细化工有限公司;中性红染色液,上海源叶生物科技有限公司。

### 1.2 主要仪器设备

旋转蒸发器,上海佑科仪器仪表有限公司;CO<sub>2</sub>培养箱,美国Thermo Fisher公司;全波长酶标仪,深圳雷杜生命科学有限公司;荧光分光光度计,日本HITACHI公司;CytoFLEX型流式细胞仪,贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司;激光共聚焦显微镜,日本NiKon公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 毛酸浆果提取物的制备

称取毛酸浆果100g,以体积分数50%乙醇为提取溶剂,料液比1:10(m/V, g/mL)在室温下浸提4h后过滤,收集滤液经真空旋转蒸发浓缩,低温烘干脱去水分,再经真空冷冻干燥后得提取物,提取物储存在-20℃以备进一步分析使用<sup>[17]</sup>。

#### 1.3.2 活性成分的测定

##### 1.3.2.1 总多酚含量测定

参考张洋婷等<sup>[19]</sup>的方法,并略作修改。移取样品液0.5mL于25mL容量瓶中,加入5mL蒸馏水,混匀后加入1mL福林酚试剂,静置1min后加入8mL质量分数10%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液,加蒸馏水定容至刻度,25℃恒温水浴中避光反应30min后,在765nm处测定吸光度,以没食子酸溶液质量浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线,得到标准曲线为: $y=0.0988x-0.0926$ ( $R^2=0.9993$ )。根据标准曲线可得其总酚含量,毛酸浆果提取物中总酚含量以毛酸浆果(干重)中总酚的毫克数表示,表示为mg/g。

##### 1.3.2.2 总黄酮含量测定

参考王晶晶<sup>[20]</sup>的方法,并略作修改。移取样品液2mL于10mL具塞比色管中,补充体积分数30%乙醇至5mL,随后加入质量分数5%亚硝酸钠溶液0.3mL,摇匀,静置5min,再加入质量分数为10%的硝酸铝溶液0.6mL摇匀,静置6min,再加入1mol/L

氢氧化钠溶液 2 mL, 定容至 10 mL, 在 510 nm 处检测吸光度, 以芦丁溶液质量浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制标准曲线, 得到标准曲线为:  $y=0.015x+0.0023$  ( $R^2=0.9995$ )。根据标准曲线可得其总酚含量, 毛酸浆果提取物中总酚含量以毛酸浆果(干重)中总酚的毫克数表示, 表示为 mg/g。

### 1.3.2.3 多糖含量测定

多糖采用苯酚-硫酸法测得<sup>[21]</sup>。

### 1.3.2.4 活性成分分析

活性成分采用 UPLC-Q-TOF-MS 分析。色谱条件: 色谱柱: BEH C18 (100×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% FA-H<sub>2</sub>O(A)-MeOH(B), 洗脱梯度为: 体积分数 2% B (0~1 min), 2%~98% B (1~12 min), 98%~2% B (12~15 min), 流量: 0.35 mL/min, 柱温: 40 °C, 自动进样: 1 μL。质谱条件: ESI 离子源 (正负离子), 喷雾电压 3800/3000 V (+/-), 气体温度 350 °C, 毛细管温度 230 °C, 扫描范围  $m/z$  70~1000。

### 1.3.3 细胞培养

由质量分数 10%胎牛血清与 DMEM 配制细胞培养液, 将细胞接种至含完全培养液 T25 细胞瓶中, 置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。当细胞密度长至 80%时进行传代, 用 3 mL PBS 洗涤两次后, 加入 500 μL 胰酶消化细胞。加入 3 mL 培养液终止消化, 转移至 10 mL 离心管中, 离心 (1 000 r/min, 5 min), 弃去上清液, 将细胞沉淀重悬于完全培养液中吹打均匀后, 移入培养瓶中<sup>[22]</sup>。

### 1.3.4 增殖活性测定

参考 Wang 等<sup>[23]</sup>的方法略作修改。取对数生长期细胞, 制成每毫升  $2 \times 10^5$  个细胞的细胞悬液, 然后以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 在细胞培养箱中培养 24 h 后, 每孔加入 100 μL 不同浓度的样品, 每组样品均做六个平行, 以加入 100 μL 不含样品的培养基为空白对照组。继续培养 24 h 后, 加入 10 μL MTT 溶液 (终浓度为 5 mg/mL), 继续培养 4 h 后弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 置于摇床上低速震荡 10 min 后, 在 490 nm 波长下测定吸光值。细胞增殖率按公式 (1) 计算:

$$Z = \frac{OD_{实}}{OD_{空}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Z—细胞增殖率, %;

$OD_{实}$ —实验组 (毛酸浆果提取物处理组) OD 值;

$OD_{空}$ —空白组 OD 值。

### 1.3.5 一氧化氮 (NO) 含量测定

参考 Fujiwara 等<sup>[24]</sup>的方法略作修改。细胞在 96 孔板上按 1.3.3 分组培养后, 同时以加入 100 μL LPS (终浓度为 0.5 μg/mL) 为阳性对照组, 按组收集细胞上清液 (每组六个平行)。每孔取 100 μL 的上清液, 在室温下分别加入 Griess Reagent I、Griess Reagent II (每孔 50 μL) 轻轻混匀后, 于 37 °C 反应 10 min 后, 在 540 nm 波长下测定吸光值。

### 1.3.6 细胞因子测定

按照 Elisa 试剂盒操作说明, 测定 TNF-α、IL-6、IFN-γ 等细胞因子含量。

### 1.3.7 TNF-α、IL-6、IFN-γ 细胞因子 qRT-PCR 检测

收集按 1.3.3 分组培养后的细胞, 按照 RNA 抽提试剂盒操作说明, 提取总 RNA, 再应用一步法 qRT-PCR 试剂盒, 使用 qPCR 引物在同一反应管内连续进行反转录和荧光定量 PCR, 采用 20 μL 反应体系, 扩增反应条件为: 37 °C、15 min; 95 °C、2 min; 95 °C、15 s; 60 °C、15 min, 总共 40 个循环。各引物序列如表 1, 通过通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算待测基因的相对表达量。

### 1.3.8 吞噬功能测定

参考苗月等<sup>[25]</sup>的方法略作修改。细胞在 96 孔板上按 1.3.4 分组培养后, 每孔加入 100 μL 质量分数 0.1%中性红溶液, 静置 20 min 后, 弃去中性红溶液并用 PBS 清洗 2 遍, 每孔加入 100 μL 细胞裂解液, 室温下放置 2 h, 待细胞裂解后, 在 540 nm 波长下测定吸光值。细胞吞噬率按公式 (2) 计算:

$$T = \frac{OD_{实2}}{OD_{空}} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

T—细胞吞噬率, %;

$OD_{实2}$ —实验组 (毛酸浆果提取物处理组和脂多糖处理组) OD 值;

$OD_{空}$ —空白组 OD 值。

表 1 引物序列表

Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR

引物	上游引物	下游引物
<i>β-actin</i>	CTACCTCATGAAGATCCTGACC	CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC
<i>IL-6</i>	CTCCCAACAGACCTGTCTATAC	CCATTGCACAACCTCTTTCTCA
<i>TNF-α</i>	ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC	GCTTGTCACCTCGAATTTGAGA
<i>IFN-γ</i>	CTTGAAAGACAATCAGGCCATC	CTTGGCAATACTCATGAATGCA

### 1.3.9 活性氧水平测定

参考 Zhang 等<sup>[26]</sup>和 Liu 等<sup>[27]</sup>的方法略作修改。取对数生长期细胞，制成每毫升  $2 \times 10^5$  个细胞的细胞悬液，然后以每孔 3 mL 接种于 6 孔板中，放入细胞培养箱 24 h 后，每孔加入 3 mL 不同浓度的样品，继续培养 24 h。去除培养液，每孔加入 1 mL 适当体积稀释好的 DCFH-DA。37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。随后使用激光共聚焦显微镜 (LSCM) 直接观察成像情况，收集细胞后用荧光分光光度计检测，并根据公式 (3) 计算相对 ROS 水平：

$$S = \frac{R_{\text{实}}}{R_{\text{对}}} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

S——相对 ROS 水平；

$R_{\text{实}}$ ——实验组 (毛酸浆果提取物处理组和脂多糖处理组)

ROS 水平；

$R_{\text{对}}$ ——对照组 ROS 水平。

### 1.3.10 细胞周期测定

参考 Fu 等<sup>[28]</sup>的方法略作修改。取对数生长期细胞，制成每毫升  $5 \times 10^5$  个细胞的细胞悬液，然后以每孔 3 mL 接种于 6 孔板中，放入细胞培养箱 24 h 后，每孔加入 3 mL 不同浓度的样品，继续培养 24 h。按照细胞周期检测试剂盒说明书进行操作，随后使用流式细胞仪检测细胞周期，得出细胞周期百分比。

### 1.3.11 细胞凋亡测定

参考 Xu 等<sup>[29]</sup>的方法略作修改。取对数生长期细胞，

制成每毫升  $5 \times 10^5$  个细胞的细胞悬液，然后以每孔 3 mL 接种于 6 孔板中，放入细胞培养箱 24 h 后，每孔加入 3 mL 不同浓度的样品，继续培养 24 h。按照细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作，用流式细胞仪检测细胞凋亡。

## 1.4 数据处理

数据结果以平均值±标准差表示，采用 SPSS 软件对实验数据进行统计分析，用 Origin 2021 软件进行图形绘制，以 ANOVA 进行显著分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 毛酸浆果提取物中活性成分分析

毛酸浆果提取物中总多酚、黄酮、多糖的含量见表 2。由表 2 可知，毛酸浆果提取物中总多酚含量为 7.02 mg/g，黄酮含量为 2.81 mg/g，多糖含量为 9.57 mg/g。Hossam 等<sup>[30]</sup>对酸浆中活性成分含量进行测定，结果表明总多酚含量最高为 125.4 mg/g，黄酮含量为 6.39 mg/g，说明酸浆果富含活性物质，具有很高的营养价值，同时也具有潜在的药用特性，如抗氧化、免疫调节、抗菌等。这为进一步研究毛酸浆果提取物对巨噬细胞免疫增强作用提供依据。

表 2 毛酸浆果提取物中总酚、黄酮、多糖含量 (mg/g)

Table 2 The content of total phenols, flavones and polysaccharides in extract of *Physalis pubescens* L. fruits

样品	总酚	黄酮	多糖
毛酸浆果提取物	7.02±0.03	2.81±0.01	9.57±0.15

表 3 PPFE 组分 UHPLC-Q-TOF-MS 分析结果

Table 3 Analysis results of PPFE component by UHPLC-Q-TOF-MS

序号	名称	分子式	MS	保留时间/min
1	Apigenin 7-rhamnosyl- (1->2) -galacturonide	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> O <sub>1</sub>	592.142 15	11.836
2	3'- (2-Hydroxy-3-methylbut-3-enyl) -4,2',4'-trihydroxychalcone	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	342.111 91	0.954
3	Myricetin 3- (2',3',4'-triacylxlyloside)	C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> O <sub>15</sub>	576.112 84	11.837
4	Quercetin 3- (2'-galloylgalactoside)	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>16</sub>	616.104 6	10.818
5	Quercetin 3- (2',3',4'-triacyl-alpha-L-arabinopyranosyl) (1->6) -galactoside	C <sub>32</sub> H <sub>34</sub> O <sub>19</sub>	722.171 6	0.951
6	Quercetin 3-sambubioside-7-glucoside	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>21</sub>	758.189 87	10.835
7	Naringenin 7- (4,6-digalloylglucoside)	C <sub>35</sub> H <sub>30</sub> O <sub>18</sub>	738.142 94	0.956
8	Sagittatin B	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub>	752.213 64	0.948
9	3,4',6'-Trihydroxy-4,2'-dimethoxychalcone 4'-O-rutinoside	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	624.203	11.03
10	8-Hydroxyluteolin 4'-methyl ether 7- (6'-acetylallosyl- (1->2) -glucoside	C <sub>30</sub> H <sub>34</sub> O <sub>18</sub>	682.175 52	12.214
11	5,7-Dihydroxy-2- (8-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-yl) -4H-1-benzopyran-4-one	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	482.121 9	10.577
12	Silybin	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> O <sub>18</sub>	668.161	12.256
13	8-Hydroxyluteolin 7- [ 6'-acetylallosyl- (1->2) -glucoside ]	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	352.094 77	5.561
14	Herbactin 8- (2'',3'',4''-triacylxlyloside)	C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> O <sub>14</sub>	560.115 77	10.182

根据质谱数据库对毛酸浆果提取物组成进行定性分析, UPLC-Q-TOF-MS 总离子流色谱图见图 1。得到相关化合物信息, 结果见表 3, 表中化合物均为黄酮类物质。

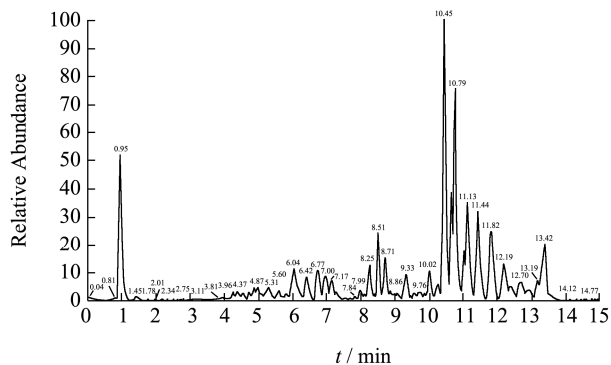


图 1 PPFE 分离组分超高压液相色谱与质谱联用分析总离子流色谱图

Fig.1 Total ions chromatogram of PPFE component analyzed by UHPLC-Q-TOF-MS

## 2.2 毛酸浆果提取物对巨噬细胞 RAW264.7 增殖的影响

将 5、10、12.5、25、50、100、250、500、1000、2000  $\mu\text{g/mL}$  的 PPFE 浓度处理巨噬细胞 24 h 后, 巨噬细胞细胞毒性和增殖活性见图 2。结果显示, 在 10~500  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内, PPFE 对 RAW264.7 细胞没有毒性作用且细胞活性显著提高 ( $p < 0.05$ ), 在 25~250  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内, 巨噬细胞增殖率分别为 130.53%、122.94%、115.94%、107.33%, 差异显著 ( $p < 0.05$ ), 所以本实验选用 25、50、100、250  $\mu\text{g/mL}$  的 PPFE 作为样品处理浓度进行后续实验。

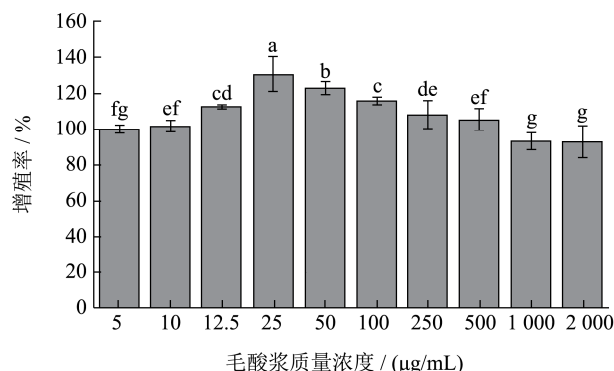


图 2 PPFE 对 RAW264.7 细胞增殖率的影响

Fig.2 Effects of PPFE on cell activity in RAW264.7 cells

注: 不同字母代表差异显著 ( $p < 0.05$ )。图 3 同。

## 2.3 毛酸浆果提取物对巨噬细胞 RAW264.7 一氧化氮 (NO) 分泌的影响

NO 是巨噬细胞产生的主要效应分子, 不仅参与许多生理和病理活动, 而且是巨噬细胞破坏细菌和肿瘤细胞主要媒介。因此, NO 可作为测定巨噬细胞活化的定量指标<sup>[31]</sup>。研究 PPFE 对 RAW264.7 细胞分泌 NO 的影响由图 3 可知, 四个 PPFE 浓度均能提高 RAW264.7 细胞 NO 分泌量。在 25~250  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围 NO 释放量分别为 27.79、23.05、19.59  $\mu\text{mol/L}$  以及 15.18  $\mu\text{mol/L}$ , 以剂量依赖方式显著减少 ( $p < 0.05$ ), NO 浓度随着 PPFE 处理浓度的升高而下降, 极显著高于空白组 7.06  $\mu\text{mol/L}$  ( $p < 0.01$ ), 显著低于 LPS 阳性对照组(0.5  $\mu\text{g/mL}$ )的 45.62  $\mu\text{mol/L}$  ( $p < 0.01$ ), 表明 PPFE 可以促进 RAW264.7 细胞 NO 分泌。因此, 可以推断 PPFE 可以激活 RAW264.7 细胞发挥免疫作用, 并且进行一系列的免疫调控反应。Chen 等<sup>[32]</sup>研究正红菇多糖对巨噬细胞 RAW264.7 免疫增强作用, 相较于空白组, 显著诱导了 NO 的产生。因此可知, 当巨噬细胞被激活后, 生成的 NO 发挥非特异免疫的主要细胞毒效应。NO 是成熟单核细胞极化为巨噬细胞后分泌的主要细胞因子或信号分子, 发挥机体免疫调节和抑制肿瘤细胞以及病原体增殖功能<sup>[33]</sup>。

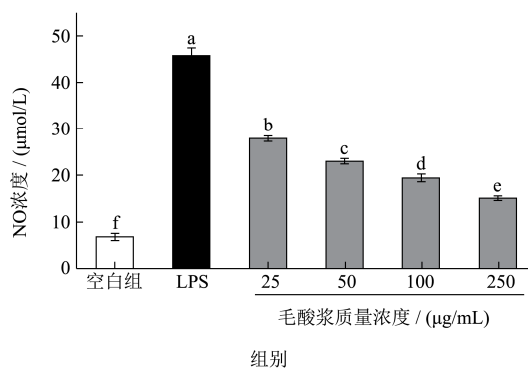


图 3 PPFE 对 RAW264.7 细胞 NO 生成的影响

Fig.3 Effects of PPFE on the NO production in RAW264.7 cells

## 2.4 毛酸浆果提取物对巨噬细胞 RAW264.7 细胞因子分泌的影响

细胞因子是细胞间信息传递的信使, 是反映机体免疫应答的重要指标。当机体正常时, 适量释放的细

胞因子相互调控, 激活免疫系统, 进而调节机体的免疫功能<sup>[34]</sup>。如图 4, 经不同浓度 PPFE 处理 RAW264.7 细胞后, TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IFN- $\gamma$  的分泌量随浓度上升呈下降趋势, 具有剂量依赖性, 均极显著高于空白组 ( $p < 0.01$ ), 在 25  $\mu\text{g/mL}$  时有最大释放量, 分别为 150.54、15.41、119.36  $\text{pg/mL}$ 。同时, LPS 阳性对照组处理的细胞因子分泌量分别为 158.32、17.06、123.13  $\text{pg/mL}$ 。Mao 等<sup>[35]</sup>研究台湾紫丹水提物对巨噬细胞免疫应答调控的影响, 结果表明紫丹水提物激活巨噬细胞增加 TNF- $\alpha$ 、IL-6 细胞因子的释放, 来增强巨噬细胞促炎能力, 从而增强个体宿主的免疫反应。本实验研究得到了类似的结果, PPFE 可以对 RAW264.7 细胞产生免疫刺激影响, 使之分泌较高水平的细胞因子, 并专职提呈抗原, 参与正向免疫应答, 发挥免疫监视的功能<sup>[36]</sup>。

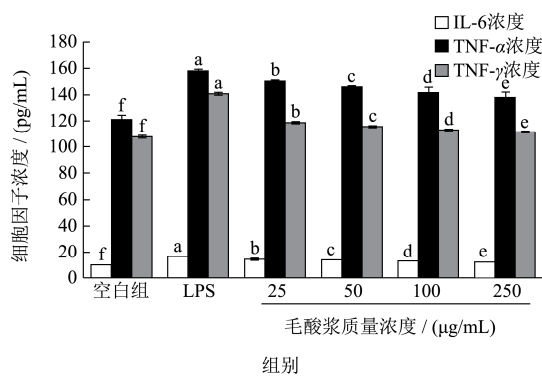


图 4 PPFE 对 RAW264.7 细胞 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  生成的影响  
Fig.4 Effects of PPFE on the IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  production in RAW264.7 cells

注: 不同字母代表差异显著 ( $p < 0.01$ )。图 5、6 同。

## 2.5 毛酸浆果提取物对巨噬细胞 RAW264.7 细胞因子 mRNA 表达的影响

为明确 PPFE 免疫分子作用机制, 采用 qRT-PCR 检测细胞因子合成基因的表达。由图 5 可知, LPS 阳性对照组细胞中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 IL-6 的相对表达量极显著 ( $p < 0.01$ ) 高于毛酸浆果提取物处理组。同时, 经不同质量浓度 PPFE 处理后, 细胞因子 mRNA 相对表达量呈剂量依赖性, 与空白组相比, 25  $\mu\text{g/mL}$  PPFE 对 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 细胞因子的表达均显著增加 ( $p < 0.01$ ) 且与 LPS 组最为接近, 相对表达量为分别为 26.17、24.70、11.39。TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 是巨噬细胞分泌的主要细胞因子, 发挥机体免疫调节和抑制肿瘤细胞以及病原体增殖功能<sup>[37]</sup>。有文献<sup>[38]</sup>指出, 浆果含丰富的酚类、黄酮类、多糖类、含氮成分等植物化学物质, 常与人类健康相关。浆果

不仅影响癌变细胞, 甚至影响免疫细胞, 同时, 浆果复合的植物化学物质提供了比高浓度单一成分更有效的免疫刺激, 由此可见, PPFE 可能通过提高巨噬细胞对细胞因子合成基因的表达, 促进巨噬细胞成熟, 调节巨噬细胞的免疫能力。

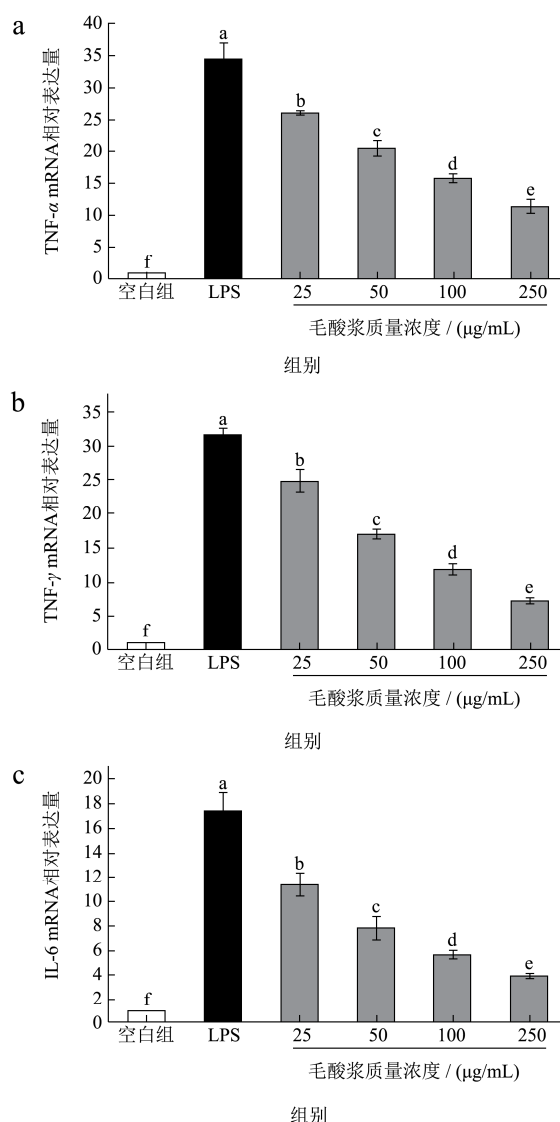


图 5 PPFE 对 RAW264.7 细胞 TNF- $\alpha$  (a)、IFN- $\gamma$  (b)、IL-6 (c) mRNA 表达的影响

Fig.5 Effects of PPFE on the expression of TNF- $\alpha$  (a), IFN- $\gamma$  (b) and IL-6 (c) mRNA in RAW264.7 cells

## 2.6 毛酸浆果提取物对巨噬细胞 RAW264.7 吞噬能力的影响

巨噬细胞在炎症的发生、维持、宿主防御等方面起着至关重要的作用<sup>[39]</sup>, 其吞噬功能是机体最重要的非特异性免疫反应之一<sup>[40]</sup>。巨噬细胞对异物的吞噬能力, 也一定程度上反应了巨噬细胞的活力。如图 6 所示, 与空白组相比, 不同浓度 PPFE 处理 RAW264.7



细胞后,细胞的吞噬率增加,并呈一定的剂量-效力关系。在 25~250  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内下吞噬率分比为 189.88%、151.49%、143.56%、128.85%,且极显著 ( $p < 0.01$ ) 高于空白组 (110.66%) 与 LPS 阳性对照组 (164.44%),表明 PPFE 能够有效激活 RAW264.7 细胞,增加巨噬细胞吞噬能力。李芳宇等<sup>[41]</sup>研究发现人参根提取物,可促进巨噬细胞增殖以及吞噬能力增强。吞噬作用是巨噬细胞等吞噬细胞清除外源性病原微生物和内源性衰老和死亡细胞的重要手段,从而达到免疫调节作用。本文通过中性红吞噬法,检测 PPFE 对 RAW264.7 细胞吞噬功能的影响,得出相似结果。活化的巨噬细胞最显著的特征之一是吞噬作用的激增,这是巨噬细胞对病原体和癌细胞反应的第一步和重要的步骤。吞噬作用是消除病原体的主要系统,可提高宿主对微生物感染的先天免疫应答。

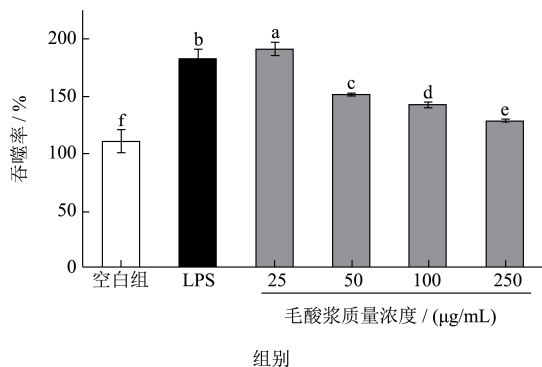


图 6 PPFE 对 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响

Fig.6 Effects of PPFE on the pinocytic capability of RAW264.7 cells

### 2.7 毛酸浆果提取物对巨噬细胞 RAW264.7 活性氧 (ROS) 生成的影响

为探究 PPFE 对 RAW264.7 细胞产生 ROS 的影响,用荧光探针 DCFH-DA 标记 PPFE 处理 24 h 后的 RAW264.7 细胞。如图 7a 所示,与空白组相比,25~250  $\mu\text{g/mL}$  的 PPFE 处理 RAW264.7 细胞后,相对 ROS 水平极显著增加 ( $p < 0.01$ ),并随着浓度上升呈下降趋势。相对 ROS 水平分别为 137.75%、131.77%、126.66%、114.62%,LPS 阳性对照组相对 ROS 水平为 136.50%。DCFH 被细胞内活性氧氧化为 DCF,产生绿色荧光,荧光强度可显示活细胞内活性氧的水平<sup>[42]</sup>。Waqas 等<sup>[43]</sup>研究绿包藤提取物可以显著增加巨噬细胞 ROS 的产生,ED<sub>50</sub> 值为 24.23  $\mu\text{mol/L}$ 。在巨噬细胞中,ROS 是分化、激活和功能的关键功能效应因子。本实验得到了相似结果,由 7b~7e 图可知,LSCM 观察显示,与空白组相比,PPFE 处理 24 h 的细胞中的 ROS 量明显

增加。说明,PPFE 处理 24 h 可促进 RAW264.7 细胞内 ROS 的产生。活性氧作为细胞复杂的信号传递网络的中心参与者,适量的 ROS 可以介导细胞信号传递的调节,激活免疫反应信号<sup>[44]</sup>。因此,推测出 PPFE 可以刺激巨噬细胞通过释放各种高活性的非特异性细胞毒介质,如 NO、活性氧等,从而增强机体非特异性免疫功能。

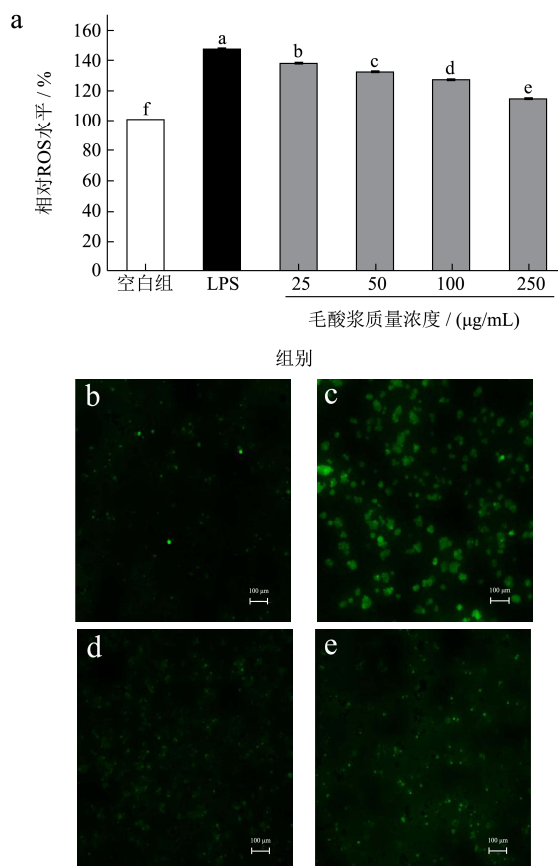


图 7 (a) PPFE 对巨噬细胞 ROS 生成的影响, (b~e) 用 PPFE 和 LPS 处理 24 h 后 RAW264.7 细胞的 LSCM 图像

Fig.7 (a) Effects of PPFE on the pinocytic capability in RAW264.7 cells, (b~e) LSCM images of RAW 264.7 cells treated with PPFE and LPS for 24 h

注: 不同字母代表差异显著 ( $p < 0.05$ )。b: 空白组; c: LPS 组 (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ); d: 毛酸浆低浓度组 (25  $\mu\text{g/mL}$ ); e: 毛酸浆高浓度组 (250  $\mu\text{g/mL}$ )。图 8、9 同。

### 2.8 毛酸浆果提取物对巨噬细胞 RAW264.7 细胞周期的影响

本文探究 PPFE 对 RAW264.7 细胞周期分布的影响,检测结果如图 8 和表 4 所示。与空白组相比,经 25  $\mu\text{g/mL}$  和 250  $\mu\text{g/mL}$  PPFE 处理 24 h 后,RAW264.7 细胞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期所占百分比下降,分别减少到 53.08%和 56.30%。同时发现,S 期和 G<sub>2</sub>/M 期所占百分比上升,由空白组的 14.08%、26.68%,分别增

加到 17.40%、29.52%和 15.48%、28.22%。当 PPFE 质量浓度为 25  $\mu\text{g/mL}$  时, 各时期的变化趋势与 LPS 阳性对照组最接近。Sérgio 等<sup>[45]</sup>研究报道, 用酸浆乙醇提取物处理诱导淋巴细胞周期停滞在 G1 期, 且在 S 期的比例增加, 加快淋巴细胞凋亡的进程。在细胞周期中, G1 期主要合成 RNA 和核糖体, S 期主要是 DNA 复制、组蛋白和酶的合成; G2 期为有丝分裂的准备期。G0 期细胞大量存在, 则不利于细胞进行有丝分裂<sup>[46]</sup>。根据结果可知, PPFE 可以调节 RAW264.7 细胞周期分布比例, 防止 RAW264.7 细胞阻滞于 G0/G1 期, 促使巨噬细胞在 G1 期向 G2 期和 S 期转化, 促进巨噬细胞生长增殖, 使之更好的发挥免疫调节作用。

表 4 PPFE 对 RAW264.7 细胞周期的影响 (%)

**Table 4 Effects of PPFE on the cell cycle of RAW264.7 cells**

组别	G0/G1 期	S 期	G2/M 期
空白组	59.23±0.10 <sup>a</sup>	14.08±0.17 <sup>d</sup>	26.68±0.27 <sup>d</sup>
毛酸浆低剂量组 (25 $\mu\text{g/mL}$ )	53.08±0.75 <sup>c</sup>	17.40±0.63 <sup>b</sup>	29.52±0.67 <sup>b</sup>
毛酸浆低剂量组 (250 $\mu\text{g/mL}$ )	56.30±0.31 <sup>b</sup>	15.48±0.24 <sup>c</sup>	28.22±0.38 <sup>c</sup>
LPS 组 (0.5 $\mu\text{g/mL}$ )	46.01±0.44 <sup>d</sup>	20.33±0.22 <sup>a</sup>	33.66±0.66 <sup>a</sup>

注: 不同字母代表差异显著 ( $p < 0.05$ )。

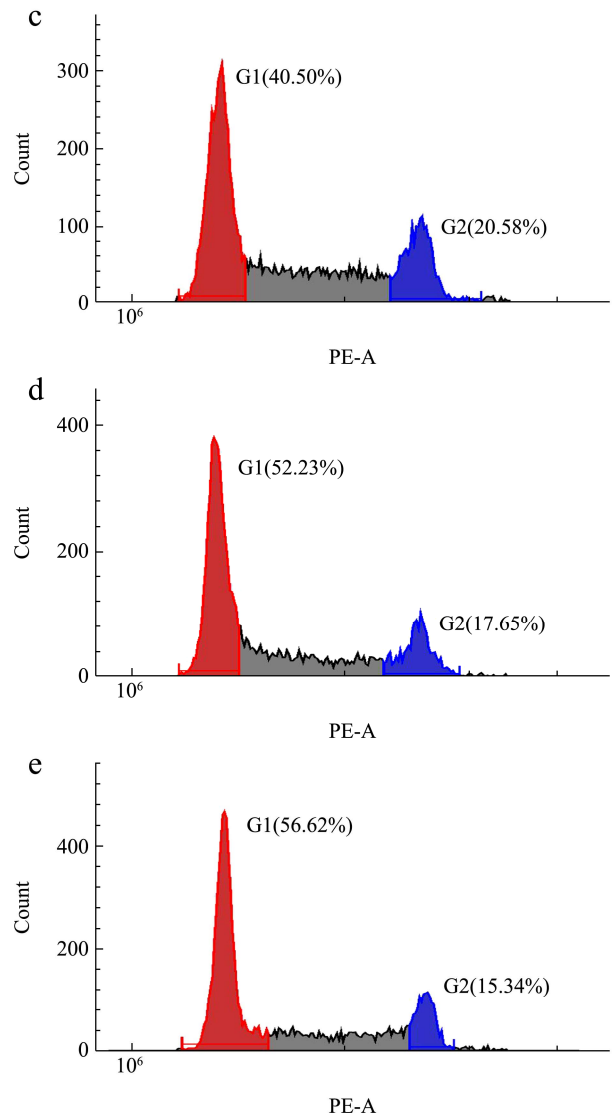
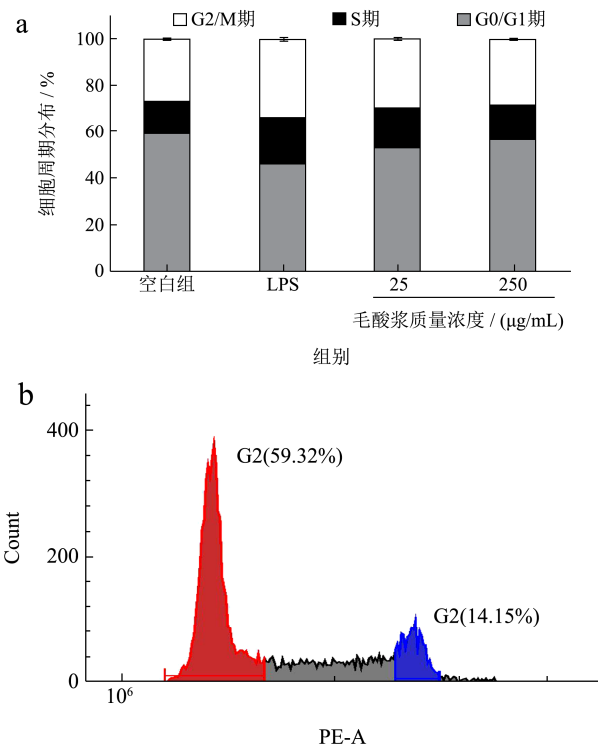


图 8 (a) PPFE 对 RAW264.7 细胞周期的影响, (b~e) PPFE 和 LPS 处理 24 h 后 RAW264.7 细胞的 FCM 图像

**Fig.8 (a) Effects of PPFE on the cell cycle of RAW264.7 cells, (b~e) FCM images of RAW264.7 cells treated with PPFE and LPS for 24 h**

## 2.9 毛酸浆果提取物对巨噬细胞 RAW264.7 细胞凋亡的影响

PPFE 对 RAW264.7 细胞凋亡的影响见图 9a。25  $\mu\text{g/mL}$  和 250  $\mu\text{g/mL}$  PPFE 处理组 RAW264.7 细胞凋亡率分别为 16.50%、23.68%, 与空白对照组 34.94% 凋亡率相比, 极显著降低 ( $p < 0.01$ ), LPS 阳性对照组凋亡率为 9.48%。由图 9b~9e 可知, 流式细胞仪观察显示, PPFE 处理组正常具有细胞活性且可增殖的



细胞比例显著高于空白组 ( $p < 0.01$ )。表明 PPFE 可减缓 RAW264.7 细胞凋亡, 凋亡结果与增殖率结果相对应。因此可知, PPFE 可缓解巨噬细胞凋亡进程, 促进其分化增殖, 从而增强个体宿主免疫调控应答。

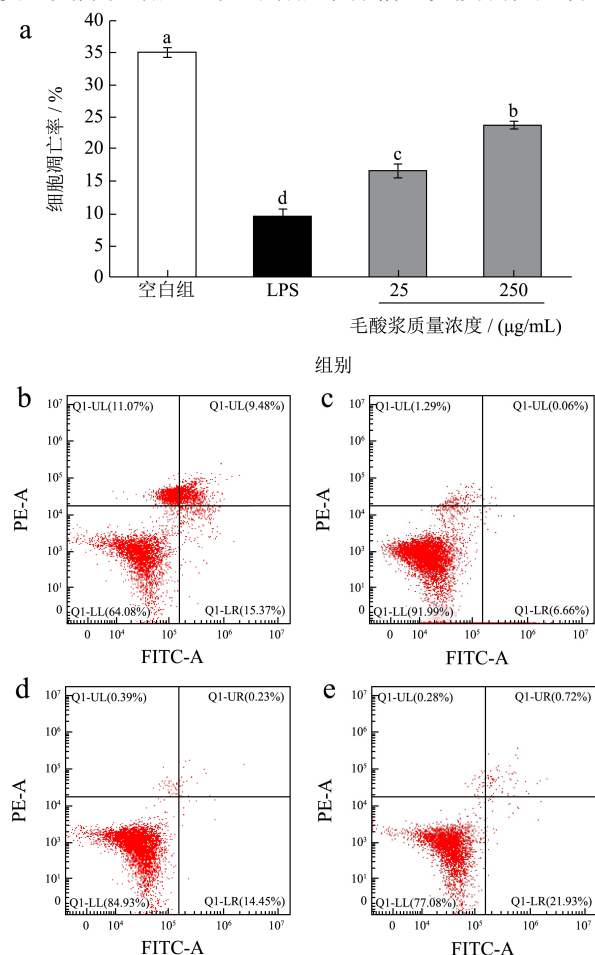


图9 (a) PPFE 对 RAW264.7 细胞细胞凋亡的影响, (b-e) PPFE 和 LPS 处理 24 h 后 RAW264.7 细胞的 FCM 图像

Fig.9 (a) Effects of PPFE on the apoptosis of RAW264.7 cells, (b-e) FCM images of RAW264.7 cells treated with PPFE and LPS for 24 h

### 3 结论

本研究测定了毛酸浆果提取物中总多酚、黄酮以及多糖的含量, 通过 UPLC-Q-TOF-MS 分析, 共鉴定出 14 种黄酮成分。并基于 RAW264.7 巨噬细胞免疫模型探究 PPFE 免疫调节作用, 得出 PPFE 提高 RAW264.7 巨噬细胞中 NO、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6、ROS 等免疫信号分子含量以及吞噬功能, PPFE 能够减轻 RAW264.7 细胞凋亡情况, 促进其分化增殖, 同时 PPFE 可缓解 RAW264.7 细胞阻滞于 G0/G1 期, 使细胞正常的进行分化繁殖, PPFE 使 RAW264.7 巨噬细胞在基因表达层次上促进 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6, 文中探讨了 PPFE 功能组分和体外免疫增强作用, 而

PPFE 物质分离、结构表征和在通路水平上免疫影响有待后续的研究。

### 参考文献

- [1] Peng K Y, Gu J F, Su S L, et al. Salvia miltiorrhiza stems and leaves total phenolic acids combination with tanshinone protect against DSS-induced ulcerative colitis through inhibiting TLR4/PI3K/AKT/m TOR signaling pathway in mice [J]. Journal of Ethnopharmacol, 2021, 264: 113052
- [2] Branco A C C C, Yoshikawa F S Y, Pietrobon A J, et al. Role of histamine in modulating the immune response and inflammation [J]. Mediator of Inflammation, 2018: 1-10
- [3] Tatiana N, Tatiana G, Yana S, et al. Macrophages derived from human induced pluripotent stem cells are low-activated “naïve-like” cells capable of restricting *Mycobacteria* growth [J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 1016
- [4] Neupane A S, Willson M, Chojnacki A K, et al. Patrolling alveolar macrophages conceal bacteria from the immune system to maintain homeostasis [J]. Cell, 2020, 183(1): 110-125
- [5] Fan P, Han B, Hu H, et al. Proteome of thymus and spleen reveals that 10-hydroxydec-2-enoic acid could enhance immunity in mice [J]. Expert Opin Ther Targets, 2020, 24(3): 267-279
- [6] Fernandes A C F, Souza D, Cristina A, et al. Sensorial, antioxidant and antimicrobial evaluation of vinegars from surpluses of physalis (*Physalis pubescens* L.) and red pitahaya (*Hylocereus monacanthus*) [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(5): 2267-2274
- [7] Xia G Y, Li Y, Sun J W, et al. Withanolides from the stems and leaves of *Physalis pubescens* and their cytotoxic activity [J]. Steroids, 2016, 115: 136-146
- [8] Zhao X L, Liu H C, Wu Y J, et al. Intervention with the crude polysaccharides of *Physalis pubescens* L. mitigates colitis by preventing oxidative damage, aberrant immune responses, and dysbacteriosis [J]. Journal of Food Science, 2020, 85(8): 2596-2607
- [9] Fan Y Q, Mao Y W, Cao S J, et al. S5, a withanolide isolated from *Physalis pubescens* L., induces G2/M cell cycle arrest via the EGFR/P38 pathway in human melanoma A375 cells [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2018, 23(12): 3175
- [10] 徐伟,王新贵.均质对毛酸浆果汁稳定性的影响及其粒径形态表征[J].食品科学,2016,37(4):68-72

XU Wei, WANG Xingui. The effect of homogenization on the stability of *Physalis pubescens* L. juice and its particle

- size morphology characterization [J]. Food Science, 2016, 37(4): 68-72
- [11] Hassan H A, Serag H M, Qadir M S, et al. Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) juice as a modulator agent for hepatocellular carcinoma-linked apoptosis and cell cycle arrest [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 94: 1129-1137
- [12] Annayara C F F, Souza A C D, Cintia L R, et al. Sensorial, antioxidant and antimicrobial evaluation of vinegars from surpluses of physalis (*Physalis pubescens* L.) and red pitahaya (*Hylocereus monacanthus*) [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(5): 2267-2274
- [13] Xia C L, Xia G Y, He H, et al. New withanolides with TRAIL-sensitizing effect from *Physalis pubescens* L. [J]. RSC Advances, 2016, 58(6): 52925-52936
- [14] Chen X Y, Li X, Zgang X B, et al. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of a polysaccharide from *physalis pubescens* L. in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice [J]. Food & Function, 2019, 10(8): 4868-4876
- [15] 张婧. 酸浆体内降糖活性及其化学成分的研究[D]. 武汉: 湖北大学, 2017
- ZHANG Qiang. Research on hypoglycemic activity *in vivo* and chemical constituents of *Physalis alkekengi* [D]. Wuhan: Hubei University, 2017
- [16] Helen M G, Eduardo D B L, Gabriela D M L, et al. Cytotoxic and immunomodulatory potential activity of peruviana fruit extracts on cervical cancer (HeLa) and fibroblast (L929) cells [J]. Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine, 2017, 22(4): 777-787
- [17] 张英蕾. 毛酸浆免疫活性物质的精制及评价[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010
- ZHANG Yinglei. Purification and evaluation of immunologically active substances from *Physalis pubescens* L. [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2010
- [18] Wang G H, Xu L, Liu W, et al. New anti-inflammatory withanolides from *Physalis pubescens* fruit [J]. Fitoterapia, 2020, 146: 104692
- [19] 张洋婷, 郝艳丽, 葛红娟, 等. 福林酚比色法测定酸浆宿萼中总多酚含量[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(23): 138-141
- ZHANG Yangting, CHI Yanli, GE Hongjuan, et al. Folin colorimetric method for determination of total polyphenols in physalis calyx [J]. Food Research and Development, 2016, 37(23): 138-141
- [20] 王晶晶. 毛酸浆黄酮分离、鉴定及生物活性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019
- WANG Jingjing. Study on separation, identification and biological activity of flavonoids from *Physalis pubescens* L. [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019
- [21] 王文祥. 酸浆多糖的提取及抗氧化性质研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2019
- WANG Wenxiang. Study on extraction and antioxidant properties of *Physalis pubescens* L. polysaccharide [D]. Tianjin: Tianjin Science and Technology University, 2019
- [22] Teng Y L, Liang H H, Zhang Z, et al. Biodistribution and immunomodulatory activities of a proteoglycan isolated from *Ganoderma lucidum* [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 74: 104193
- [23] Wang Y L, LAI L, Teng L P, et al. Mechanism of the immunostimulatory activity by a polysaccharide from *Dictyophora indusiata* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 752-759
- [24] Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation [J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005, 4(3): 281-286
- [25] 苗月, 任桂红, 甄东, 等. 蛹虫草多糖调节小鼠巨噬细胞 RAW264.7 免疫活性的分子机制[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 188-194
- MIAO Yue, REN Guihong, ZHEN Dong, et al. The molecular mechanism of *Cordyceps militaris* polysaccharide in regulating the immune activity of mouse macrophages RAW264.7 cell [J]. Food Science, 2019, 40(9): 188-194
- [26] Zhng J, Ahmad S, Wang L Y, et al. Cell death induced by  $\alpha$ -terthienyl via reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the midgut of *Aedes aegypti* larvae [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2019, 137: 87-98
- [27] Liu Y J, Deng Z Z, Geng L H, et al. *In vitro* evaluation of the neuroprotective effect of oligo-porphyrin from *Porphyra yezoensis* in PC12 cells [J]. Journal of Applied Phycology, 2019, 31: 2559-2571
- [28] Fu J D, Yao J J, Wang H, et al. Effects of EGCG on proliferation and apoptosis of gastric cancer SGC7901 cells via down-regulation of HIF-1 $\alpha$  and VEGF under a hypoxic state [J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2019, 23(1): 155-161
- [29] Xu Q Q, Li Y, Zheng Y J, et al. Clostridium difficile toxin B-induced colonic inflammation is mediated by the FOXO3/PPM1B pathway in fetal human colon epithelial cells [J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(9): 8350-8359
- [30] Hossam S, El B, Heba I M, et al. Chemical composition and biological activity of *Physalis peruviana* L. [J]. Gesunde

- Pflanzen, 2019, 71(2): 113-122
- [31] Zheng T, GU D, Wang X, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Leccinum crocipodium* (Letellier) Watliag [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 148: 647-656
- [32] Chen Q, Qi C, Peng G, et al. Immune-enhancing effects of a polysaccharide PRG1-1 from *Russula griseocarnosa* on RAW264.7 macrophage cells via the MAPK and NF- $\kappa$ B signalling pathways [J]. Food and Agricultural Immunology, 2018, 29(1): 833-844
- [33] Vannini F, Kashfi K, Nath N, et al. The dual role of iNOS in cancer [J]. Redox Biogly, 2015, 6: 334-343
- [34] Wang Y F, Tian Y Q, Shao J J, et al. Macrophage immunomodulatory activity of the polysaccharide isolated from *Collybia radicata* mushroom [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 108: 300-306
- [35] Mao L C, Semon W, Tzung C T, et al. Effect of aqueous extract of *Tournefortia sarmentosa* on the regulation of macrophage immune response [J]. International Immunopharmacology, 2013, 17(4): 1002-1008
- [36] Abbas S M, Saeed M, Hossein V, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. Cell Physiol, 2018, 233(9): 6425-6440
- [37] Weisser S B, McLaren K W, Kuroda E, et al. Generation and characterization of murine alternatively activated macrophages [J]. Methods in Molecular Biology, 2013, 946: 225-239
- [38] Coen G, Muzeyyen B K, Addie A V D S, et al. Review of the health effects of berries and their phytochemicals on the digestive and immune systems [J]. Nutrition Reviews, 2017, 76(1): 29-46
- [39] 赵丽, 金周雨, 荆波, 等. 多糖受体与巨噬细胞吞噬作用关系研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(21): 311-316
- ZHAO Li, JIN Zhouyu, JIN Bo, et al. Recent progress in the relationship between polysaccharide receptor and macrophage phagocytosis [J]. Food Science, 2019, 40(21): 311-316
- [40] Lin S, Guo H, Lu M Y, et al. Correlations of molecular weights of  $\beta$ -glucans from Qingke (*Tibetan hulless barley*) to their multiple bioactivities [J]. Molecules, 2018, 23(7): 1710
- [41] 李芳宇, 齐滨, 边帅, 等. 人参根提取物增强巨噬细胞 RAW264.7 的自噬水平并提高其增殖和吞噬能力[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(3): 380-385
- LI Fangyu, QI Bin, BIAN Shuai, et al. Ginseng root extract enhances the autophagy level of macrophage RAW264.7 and improves its proliferation and phagocytic ability [J]. Natural Product Research and Development, 2021, 33(3): 380-385
- [42] 沈阳, 陈思遐, 冯肝珠. 栀子苷对 RAW264.7 细胞胞饮和噬菌功能双向调节作用的初步观察[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 39(10): 1426-1429, 1441
- SHEN Yang, CHEN Sixia, FENG Ganzhu. Preliminary observation of dual regulatory effects of geniposide on pinocytosis and phagocytosis of RAW264.7 cells [J]. Journal of Nanjing Medical University (Natural Science Edition), 2019, 39(10): 1426-1429, 1441
- [43] Waqas A, Ibrahim J, Endang K, et al. Immunomodulatory effects of *Tinospora cripa* extract and its major compounds on the immune functions of RAW264.7 macrophages [J]. International Immunopharmacology, 2018, 60: 141-151
- [44] Ren K, Lv Y Z, Zhuo Y J, et al. Suppression of IRG-1 reduces inflammatory cell infiltration and lung injury in respiratory syncytial virus infection by reducing production of reactive oxygen species [J]. Journal of Virology, 2016, 90(16): 7313-7322
- [45] Sérgio R T D, Ivanilson P S, Paula L B, et al. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of *Physalis angulata* concentrated ethanolic extract [J]. Planta Medica, 2021, 87(1): 160-168
- [46] 赵大群, 丁祥, 刘露, 等. 香乳菇多糖对 HeLa 细胞凋亡及对 RAW264.7 细胞免疫活性的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(6): 1-6
- ZHAO Daqun, DING Xiang, LIU Lu, et al. Inhibitory effect on HeLa cells and immune effects on RAW264.7 cells of a polysaccharide from *Lactarius camphoratum* (Bull.) Fr [J]. Food and Machinery, 2017, 33(6): 1-6