

# 蝉棒束孢C1菌丝体多糖抑制MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路 缓解LPS诱导的RAW264.7细胞炎症反应

邵丽<sup>1</sup>, 牛珂欣<sup>1</sup>, 刘惠<sup>1</sup>, 蒋虹<sup>1,2</sup>, 贾庆文<sup>2</sup>, 马来记<sup>1\*</sup>

(1. 上海应用技术大学香料香精化妆品学部, 上海 201418)

(2. 山东福瑞达生物股份有限公司, 山东济南 250101)

**摘要:** 该文研究蝉棒束孢 (*Isaria cidada* Miquel) C1 菌丝体多糖 ISP-80 对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型的抗炎效果, 并探讨其作用机制。以热水浸提法获得菌丝体多糖 ISP-80, 采用 CCK-8 法测定 ISP-80 对 RAW264.7 细胞的毒性作用, 使用 ELISA 试剂盒测定 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 细胞因子分泌量, 通过 Western Blot 法检测 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路中相关蛋白的含量。结果显示, ISP-80 多糖提取率为 10.42%, 共含有 3 种多糖组分, 由葡萄糖 (Glc)、甘露糖 (Man)、半乳糖 (Gal) 3 种单糖组成, 摩尔比为 1.00:5.03:1.55。ISP-80 多糖在添加 0.01~1.00 mg/mL 质量浓度范围内时对细胞无毒性且能促进细胞增殖 ( $P<0.0001$ )。0.25 mg/mL ISP-80 处理组可显著降低促炎细胞因子 IL-1 $\beta$  ( $P<0.001$ ) 和 IL-6 ( $P<0.05$ ) 的分泌, 分别降至 LPS 组的 0.59 倍和 0.88 倍, 且可明显抑制细胞分化, 恢复细胞形态。ISP-80 的抗炎作用是通过 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 途径介导的, ISP-80 通过阻断 p-p38 和 p-JNK 来抑制 MAPK 途径, 分别降低了 0.20 和 0.41 ( $P<0.001$ ), 并且通过阻断 I $\kappa$ B $\alpha$  和 p65 来抑制 NF- $\kappa$ B 通路, 分别降低了 0.43 ( $P<0.01$ ) 和 0.24 ( $P<0.001$ )。因此, ISP-80 具有较好的抗炎作用, 可作为预防和治疗炎症性疾病的天然和安全的抗炎剂。

**关键词:** 蝉棒束孢 C1; 多糖; 抗炎作用; MAPK 通路; RAW264.7 巨噬细胞

文章编号: 1673-9078(2025)01-47-56

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.1.1415

## Anti-inflammatory Effects of Polysaccharides from *Isaria cidada* Miq. C1 Mycelial through the MAPK/NF- $\kappa$ B Signaling Pathways in RAW264.7 Cell Induced by LPS

SHAO Li<sup>1</sup>, NIU Kexin<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>1</sup>, JIANG Hong<sup>1,2</sup>, JIA Qingwen<sup>2</sup>, MA Laiji<sup>1\*</sup>

(1.College of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China)

(2.Shandong Freda Biotech Co. Ltd., Jinan 250101, China)

**Abstract:** The anti-inflammatory effects and mechanisms of the mycelial polysaccharide ISP-80 from the *Isaria* 引文格式:

邵丽,牛珂欣,刘惠,等.蝉棒束孢C1菌丝体多糖抑制MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路缓解LPS诱导的RAW264.7细胞炎症反应[J].现代食品科技,2025,41(1):47-56.

SHAO Li, NIU Kexin, LIU Hui, et al. Anti-inflammatory effects of polysaccharide from *Isaria cidada* Miq. C1 mycelial through the MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathways in RAW264.7 cell induced by LPS [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(1): 47-56.

收稿日期: 2023-11-27

基金项目: 香料香精化妆品省部共建协同创新中心开放课题 (1021ZK230016013)

作者简介: 邵丽 (1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品与化妆品生物技术, E-mail: teamo-lily@163.com

通讯作者: 马来记 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物与美丽健康, E-mail: laijima\_sh@163.com

*cicada* Miquel C1 was investigated in a mouse monocyte-macrophage RAW264.7 inflammation model, induced by lipopolysaccharide (LPS). The polysaccharide (ISP-80) was obtained through hot water extraction from the *Isaria cicada* C1 mycelium. The toxic effects of ISP-80 on RAW264.7 cells were evaluated using the CCK-8 assay, and the impact of ISP-80 on the secretion of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 cytokines was measured using ELISA. Furthermore, the mechanism of ISP-80 was analyzed using western blotting to detect the relevant proteins in the MAPK/NF- $\kappa$ B pathways. The findings indicated that the extraction rate of ISP-80 was 10.42% and it was composed of three polysaccharide fractions, each containing Glc, Man, and Gal monosaccharides, in a molar ratio of 1.00:5.03:1.55. Adding ISP-80 at 0.01~1.00 mg/mL exerted no cytotoxic effects and promoted cell proliferation ( $P < 0.0001$ ). The 0.25 mg/mL ISP-80 treatment significantly decreased the secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  ( $P < 0.001$ ) and IL-6 ( $P < 0.05$ ), reaching 0.59- and 0.88-times those of the LPS group, respectively, and inhibited cell differentiation while restoring cell morphology. The anti-inflammatory action of ISP-80 acted via the MAPK/NF- $\kappa$ B pathways. ISP-80 inhibited the MAPK pathway by blocking p-p38 and p-JNK, which decreased by 0.20 and 0.41, respectively ( $P < 0.001$ ). Furthermore, the NF- $\kappa$ B pathway was inhibited by blocking I $\kappa$ B $\alpha$  and p65, which decreased by 0.43 ( $P < 0.01$ ) and 0.24 ( $P < 0.001$ ), respectively. These results indicate that ISP-80 can be a natural and safe anti-inflammatory agent for the prevention and treatment of inflammatory diseases.

**Key words:** *Isaria cicada* Miquel; polysaccharide; anti-inflammatory effects; MAPK pathway; RAW264.7 macrophages

炎症往往伴随着多种疾病的发生,在一定程度上,预防或缓解炎症对保持健康至关重要。巨噬细胞作为一种在炎症反应中发挥关键作用的免疫细胞<sup>[1]</sup>。不仅参与先天免疫反应,还参与适应性免疫。活化的巨噬细胞可以通过增强 NO 释放、ROS 的产生和细胞因子(如 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ )的分泌来吞噬和破坏靶向生物体<sup>[2]</sup>。普遍认为,巨噬细胞介导的免疫活性受 MAPK/NF- $\kappa$ B 两种重要信号通路的调控。被激活的信号通路在与免疫细胞活化相关的过程中发挥中介作用,包括免疫调节、炎症反应和细胞凋亡。最重要的是,MAPK 在 NF- $\kappa$ B 的转录激活中也起着关键作用<sup>[3]</sup>。MAPK 信号通路可以介导 NF- $\kappa$ B p65 的核转位,这将有助于刺激免疫细胞的免疫调节。众所周知,天然多糖具有强大的免疫刺激活性,可与细胞表面受体结合,激活各种信号通路,从而促进免疫因子或抗体的释放。

蝉花(*Cordyceps cicade*)俗称金蝉花,是由麦角菌科真菌蝉棒束孢属(*Isaria cicadae* Miq.)寄生于蝉类若虫后形成的无性子实体(孢梗束),是我国四大虫草之一。蝉花具有调节免疫力、抗肿瘤、抗疲劳、抗炎、抑菌、镇痛、改善肾功能和促进透明质酸合成改善皮肤等多种生理功效<sup>[4-6]</sup>,与冬虫夏草成分相似,在我国食药两用的应用历史悠久。蝉棒束孢是蝉花的分生孢子阶段即无性型时期,是形成蝉花虫草的真菌。蝉棒束孢菌中含有核苷、麦角甾醇、多糖、氨基酸、糖醇和芳香物质等多种化学成分<sup>[7]</sup>。因此,蝉棒束孢菌具有很高的食用、营养和药用价值,是最具开发价值的珍贵虫生真菌之一。

2021年1月蝉花子实体(人工栽培)被国家卫健委认定为新型食品原料,这使得未来蝉花需求量急剧增加,市场潜力巨大。目前有关蝉棒束孢菌种资源的开发和应用研究相对较少,有研究记载的主要集中在 *P. cicadae* LB、*P. cicadae* ZC001、*P. cicadae* RCEF1081、*P. cicadae* GZDXIFR4606<sup>[7]</sup>和 *P. cicadae* TJJ1213<sup>[8]</sup>等菌株,迫切需要加大蝉棒束孢菌种资源的开发。

多糖作为蝉花和蝉棒束孢菌丝体的主要活性成分,具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、免疫调节、抑菌、降血脂、降血糖、抗病毒和镇痛等多种功效<sup>[9]</sup>,近年来成为关注的焦点。由于蝉花多糖的分子量分布、单糖组成和比例以及链结构和高级结构的差异,目前研究显示其具有增强免疫功效<sup>[10-12]</sup>,而关于蝉花多糖抗炎功效的报导较少。蝉棒束孢菌株 C1 (CGMCC No.18807)是本实验室从野生蝉花中分离获得的一株生长快、产多糖高的菌株(专利号:ZL 202110230202.5),是一株具有开发前景的菌株<sup>[13]</sup>。前期实验室已完成该菌株的全基因测序,而有关菌丝体多糖的抗炎活性以及作用机理尚不清楚。本研究采用 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型来评价 C1 发酵菌丝体多糖 ISP-80 在 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路上的抗炎活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和菌株

RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞,购于中国科学院细胞库,细胞编号:TCM13;蝉棒束孢 C1 (*Isaria*

*cicadae* Miq. C1, CGMCC No. 18807), 实验室自行分离于野生蝉花。

## 1.2 培养基

固体培养基: 20% 马铃薯浸粉, 5% 葡萄糖, 0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2% 琼脂, 121 °C 灭菌 20 min。

液体培养基 (包括种子培养基和基础发酵培养基): 2% 葡萄糖, 0.2% 酵母提取物, 0.2% 蛋白胨, 0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 121 °C 灭菌 20 min。以上均按照质量分数添加。

## 1.3 试剂和仪器设备

胎牛血清、DMEM 培养基、青霉素-链霉素-两性霉素 B 溶液、DPBS 缓冲液、ELISA 试剂盒、96 孔细胞培养板、ELC 化学发光底物, 赛默飞世尔科技公司; CCK-8 试剂盒, 日本同仁化学研究所; 通路抗体提取试剂盒 II、MAPK 家族抗体提取试剂盒、磷酸化 MAPK 家族抗体提取试剂盒、 $\beta$ -Actin 抗体、抗-兔免疫球蛋白 G、HRP 辣根过氧化物酶标记二抗, 美国 Cell Signaling Technology 公司。RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂混合物, 上海碧云天生物技术股份有限公司; 马铃薯浸粉、酵母提取物、蛋白胨、琼脂粉、牛血清蛋白、明胶 (全部属于生化试剂), 上海源叶生物科技有限公司; 葡萄糖、磷酸二氢钾、七水硫酸镁、硫酸钾、氯化钡、考马斯亮蓝 G-250、无水乙醇、浓硫酸、苯酚 (全部属于分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; Fuc、Rha、Ara、Gal、Glc、Xyl、Man、Fru、GalA、GlcA 单糖标准品和葡聚糖标准品、地塞米松、LPS, 美国 sigma-aldrich 公司; VIOS 160i  $\text{CO}_2$  培养箱, 赛默飞世尔科技公司, HFsafe1500LC 生物安全柜, 上海力申科学仪器有限公司; 超净工作台, 力辰科技有限公司; TGL-16M 高速离心机, 上海湘仪有限公司; YXQ-50G 全自动灭菌锅, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; Multiskan SkyHigh 全波长酶标仪, 赛默飞世尔科技公司。

## 1.4 方法

### 1.4.1 ISP-80菌丝体多糖的发酵、提取制备

将 -80 °C 保藏的蝉棒束孢 C1 菌株甘油管划线固体平板, 置于 28 °C 恒温培养箱中培养 4~5 d, 活化两次。铲取新鲜的菌丝体转接于种子培养基, 28 °C, 160 r/min 震荡培养 3 d 得种子液, 按照 6% (V/V) 的接种量转接到基础发酵培养基中, 100 mL/250 mL 装

液量, 在 28 °C、200 r/min 震荡培养 4 d。发酵结束, 8 000 r/min 离心 15 min, 收集菌丝体, 用去离子水洗涤 2 次, 经冷冻干燥获得 C1 菌丝体。

采用热水浸提法提取菌丝体多糖。将菌丝体粉碎过 80 目筛, 料液比为 1:33, 浸提温度为 100 °C, 浸提时间为 3 h, 提取 2 次, 离心合并收集提取上清。经减压浓缩, 三氯乙酸除蛋白, 加入 4 倍体积无水乙醇醇沉过夜, 于 8 000 r/min 下离心 15 min, 收集沉淀, 用无水乙醇洗涤重复沉淀 3 次, 用去离子水复溶、透析, 冷冻干燥获得 ISP-80 菌丝体多糖 (以下称 ISP-80 多糖)。

### 1.4.2 ISP-80多糖的组成分析

采用苯酚-硫酸法测定总糖含量, 采用考马斯亮蓝法测定蛋白含量, 采用硫酸钡比浊法测定硫酸根含量<sup>[14]</sup>。

### 1.4.3 ISP-80多糖紫外全波长扫描分析

称取适量 ISP-80 多糖, 去离子水配制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液, 采用紫外-可见分光光度计对各样品进行 200~900 nm 的全波段扫描。

### 1.4.4 ISP-80多糖红外光谱分析

称取 1 mg ISP-80 多糖, 按照质量比 1:100 和已干燥至恒重的 KBr 混匀, 研磨压片后, 采用红外光谱仪在 4 000~400  $\text{cm}^{-1}$  范围内扫描。

### 1.4.5 ISP-80多糖分子量测定

采用高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 法测定 ISP-80 多糖分子量。分析条件: 色谱柱为 Ultrahydrogel™ Linear 2 根串联 (300 mm×7.8 mm); 色谱仪: Water 600 高效液相色谱仪 (2410 示差折光检测器和 Empower 工作站); 柱温: 45 °C; 流动相: 0.1 mol/L  $\text{NaNO}_3$ ; 流量: 0.9 mL/min; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。用  $M_w 2.000 \times 10^3$  ku、 $M_w 1.338 \times 10^2$  ku、 $M_w 41.10$  ku、 $M_w 21.40$  ku、 $M_w 4.600$  ku 和  $M_w 1.800 \times 10^{-1}$  ku 的葡聚糖标准品做标准曲线。

### 1.4.6 ISP-80多糖单糖组成测定

采用高效离子色谱 (HPAEC) 法测定单糖组成。多糖经三氟乙酸 (TFA) 水解后分析。分析条件: 戴安 Dionex ICS2500 系统: GS50 四元梯度泵、ED50A 电化学检测器 (金电极)、LC30 柱温箱 30 °C; Chromeleon 6.5 色谱工作站; CarboPac PA20 阴离子交换分析柱 (150 mm×3 mm); 淋洗程序: 2 mmol/L 的氢氧化钠淋洗液, 0.45 mL/min 的流量, 120 min。流动相为 A 去离子水, B 0.25 mol/L NaOH,

C 1 mol/L NaAc, 流速 0.4 mL/min, 进样 25  $\mu$ L。洗脱梯度: 0 min A 相 /B 相 /C 相 (99.2:0.8:0, V/V/V), 30 min A 相 /B 相 /C 相 (99.2:0.8:0, V/V/V), 40 min A 相 /B 相 /C 相 (79.2:0.8:20, V/V/V), 40.1 min A 相 /B 相 /C 相 (20:80:0, V/V/V), 60 min A 相 /B 相 /C 相 (99.2:0.8:0, V/V/V)。10 种单糖标准品为参照 (Fuc、Rha、Ara、Gal、Glc、Xyl、Man、Fru、GalA、GlcA)。

#### 1.4.7 细胞培养与处理

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞在  $\varphi=5\%$  CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中, 在添加体积分数 10% FBS 和链霉素 - 青霉素 - 两性霉素 B 溶液 10 mL/L 的 DMEM 培养基中正常培养, 隔天传代。

#### 1.4.8 CCK-8法检测细胞存活率

培养细胞至对数生长期, 使用 0.25% 胰酶消化细胞制备悬液, 接种细胞悬液至 96 孔细胞板, 每孔添加体积 100  $\mu$ L 细胞悬液, 每毫升细胞密度为  $8 \times 10^5$  个细胞, 在 37  $^{\circ}$ C、 $\varphi=5\%$  CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h 后, 按照 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00 mg/mL 系列质量浓度添加各组样品。每个实验组设置 3 个平行孔, 用 DPBS 清洗 1 次孔中细胞。之后, 每孔加入 10  $\mu$ L 的 CCK-8 溶液; 将上述的 96 孔板在孵育箱孵育 2 h, 在振荡器上震荡 2 min, 在酶标仪上于 490 nm 波长处检测细胞活力 (OD 值)。根据 OD 值和公式 (1) 计算细胞存活率, 判断 ISP-80 对细胞存活率 (C, %) 的影响。依照实验结果, 选取合适的浓度范围进行后续实验。

$$C = \frac{OD_1}{OD_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C—细胞存活率, %;

OD<sub>0</sub>—空白组 OD 值;

OD<sub>1</sub>—实验组 OD 值。

#### 1.4.9 ELISA法检测IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6含量

参照文献<sup>[15]</sup>的方法将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板, 每毫升细胞密度为  $8 \times 10^5$  个细胞, 随机分为对照组 (不做任何处理)、模型组 (以 1  $\mu$ g/mL 的 LPS 处理)、实验组 [1  $\mu$ g/mL 的 LPS 与通过细胞毒性实验优选的不同质量浓度 (0.10、0.25、0.50 mg/mL) 的 ISP-80 多糖溶液]、阳性对照组 (1  $\mu$ g/mL 的 LPS 与 80  $\mu$ mol/L 的地塞米松处理, 每组设 3 个复孔)。反应 24 h 后取各组上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-1 $\beta$ 、

TNF- $\alpha$  和 IL-6 分泌量的水平。

#### 1.4.10 Western Blot分析

参照文献<sup>[16]</sup>的方法进行蛋白免疫印迹实验检测 MAPK/NF- $\kappa$ B 相关蛋白表达, 将 RAW264.7 细胞在含  $\varphi=5\%$  CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 的培养条件下, 利用含体积分数 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基正常培养。当细胞生长至 80%~90% 汇合时, 用胰酶将其消化并按照每毫升细胞密度为  $8 \times 10^5$  个细胞接种于 12 孔板。细胞贴壁 24 h 后, 按照空白、LPS (1  $\mu$ g/mL)、LPS (1  $\mu$ g/mL)+ISP-80 (0.25 mg/mL) 和 LPS (1  $\mu$ g/mL)+DEX 80  $\mu$ M 分组处理细胞, 每组设 3 个平行孔。处理细胞 2 h 后裂解细胞提取总蛋白。蛋白样品经 10% SDS-PAGE 分离后, 转移到 0.45  $\mu$ m PVDF 膜上。在 5 wt.% BSA 室温封闭 PVDF 膜 2 h, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入稀释后的一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 次日使用 TBST 洗涤 PVDF 膜并室温孵育相应 HRP 标记抗体, TBST 洗涤 3 次后加入 ECL 发光液, 在凝胶成像系统中曝光得到蛋白条带。以  $\beta$ -Actin 为内参, 利用 Image J 软件对条带灰度值进行分析, 进而计算目标蛋白的相对表达量。

#### 1.4.11 数据分析

数据采用 Graphpad Prism 9.5 软件进行统计处理, 数据以均值  $\pm$  标准差表示, 满足正态分布和方差齐性的多组之间均数比较运用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD 法, 方差不齐者采用 Dunnett's T3 检验。P<0.05 视为差异有统计学意义。图表中 \*/# 代表 P<0.05, \*\*/## 代表 P<0.01, \*\*\*/### 代表 P<0.001, \*\*\*\*/#### 代表 P<0.000 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 多糖制备、理化性质及结构初表征

#### 2.1.1 ISP-80成分分析

蝉棒束孢菌株 C1 在基础发酵培养基中 28  $^{\circ}$ C, 发酵 4 d, 收获菌丝体。经热水浸提、乙醇醇沉、透析、冷冻干燥、获得多糖 ISP-80 样品, 计算多糖得率为 10.42%。由葡萄糖标准曲线的线性回归方程  $y=0.011\ 97x-0.009\ 9$  ( $R^2=0.999\ 1$ ) 计算得 ISP-80 总糖含量为 93.20%, 由蛋白质标准曲线的线性回归方程  $y=0.003\ 34x+0.325\ 9$  ( $R^2=0.999\ 2$ ) 计算得蛋白含量为 1.05%, 由硫酸钾标准曲线的线性回归方程  $y=0.001x-0.005\ 9$  ( $R^2=0.999\ 4$ ) 计算得 ISP-80 硫酸根含量为 2.98%。

## 2.1.2 ISP-80紫外全波长扫描和红外光谱分析

ISP-80 多糖溶液的紫外光谱如图 1 所示, 曲线在 260 nm 和 280 nm 处较平坦, 没有明显的吸收峰, 说明 ISP-80 多糖溶液中几乎没有多肽、核酸及蛋白质等物质, 这与前述蛋白测定结果相一致。

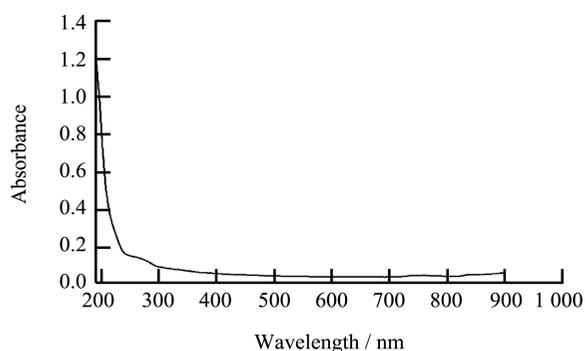


图 1 IPS-80 全波长扫描图

Fig.1 UV wavelength scanning of IPS-80

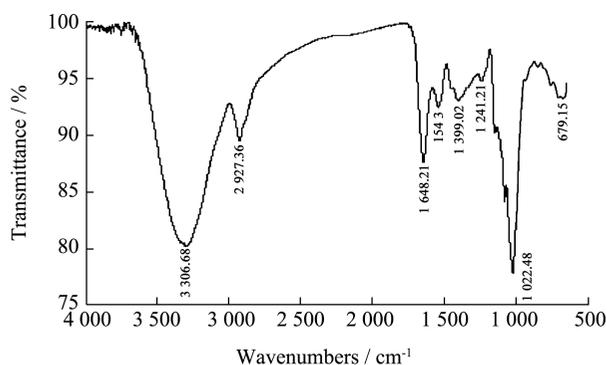


图 2 ISP-80 的红外光谱扫描图

Fig.2 FT-IR spectra of IPS-80 in the frequency range of 4 000~500  $\text{cm}^{-1}$

傅立叶红外变换光谱图是分子中基团振动能级跃迁而产生的, 可以用来分析多糖中的单糖种类、糖苷键和功能团。多糖 ISP-80 的红外光谱图如图 2 所示, 该多糖在  $3306.68 \text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰型较宽, 是由 O-H 的伸缩振动引起, 表明存在分子内或分子间的氢键; 在  $2927.36 \text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰归因于 C-H 的拉伸;  $1398.14 \text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰分别代表 C-H 的伸缩振动和变角振动特征吸收峰, 这三组吸收峰均属于多糖的典型特征峰, 表明 ISP-80 属于多糖类物质<sup>[17]</sup>。在  $1648.21 \text{ cm}^{-1}$  附近的吸收峰, 是羰基 C=O 键的伸缩振动峰;  $1200\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$  的吸收峰可能是吡喃环的羟基伸缩振动所引起的; 而  $1241.21 \text{ cm}^{-1}$  处存在特征峰代表着可能有硫酸根的存在<sup>[18]</sup>。多糖 ISP-80 红外特征官能团与 Tian<sup>[19]</sup> 蝉花 TJ1213 胞内多糖特征官能团振动吸收峰相似, 但多糖的生物活

性不尽相同。因此可推断, 多糖的生物活性与其分子量和单糖组成有更强的相关性。

## 2.1.3 ISP-80分子量分布和单糖组成

采用 GPC 凝胶色谱柱测得 ISP-80 多糖的分子量如图 3 所示, IPS80 在 10~25 min, 显示出 3 个峰, 表明存在三个分子量显著差异的多糖。组分 1 在保留时间在 14.67 min 出峰, 其重均分子质量  $M_w$  为  $1.46 \times 10^3 \text{ ku}$ , 数均质量分数  $M_n$  为  $9.58 \times 10^2 \text{ ku}$ , 峰位质量分数为  $1.21 \times 10^3 \text{ ku}$ , 分子质量分布 ( $M_w/M_n$ ) 为 1.52, 峰比例为 37.57%; 组分 2 在保留时间 16.83 min 出峰, 其重均分子质量  $M_w$  为  $1.38 \times 10^2 \text{ ku}$ , 数均质量分数  $M_n$  为  $1.01 \times 10^2 \text{ ku}$ , 峰位质量分数为  $1.01 \times 10^2 \text{ ku}$ , 分子质量分布 ( $M_w/M_n$ ) 为 1.36, 峰比例为 22.21%; 组分 3 在保留时间在 18.23 min 出峰, 其重均分子质量  $M_w$  为 13.50 ku, 数均质量分数  $M_n$  为 3.26 ku, 峰位质量分数为 20.16 ku, 分子质量分布 ( $M_w/M_n$ ) 为 4.13, 峰比例为 40.22%。

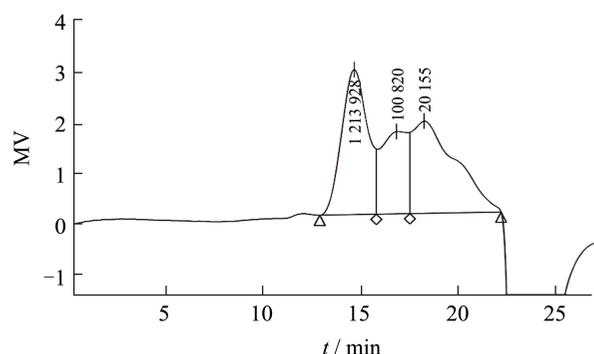


图 3 ISP-80 多糖的分子量分布

Fig.3 Molecular weight distribution of IPS-80

各单糖标准品谱图 (图 4b), ISP-80 水解产物为图 4a。通过对峰面积进行数据处理, 结果表明, ISP-80 含有 3 种单糖: 半乳糖 (Gal)、葡萄糖 (Glc) 和甘露糖 (Man), 摩尔比为 1.00:5.03:1.55。刘城移等<sup>[20]</sup>采用 GPC (凝胶色谱) 法测定蝉虫草胞内多糖分子量在  $2.50 \times 10^2 \sim 2.20 \times 10^3 \text{ ku}$  (17.30%) 范围内有分布; 而胞内多糖更集中于低分子量, 分布于  $19.10 \sim 85.00 \text{ ku}$  (94.10%), 两者均能明显抑制肝肿瘤细胞 HepG-2 的活性和增殖, 不过胞外多糖的效果更好。Tian 等<sup>[19]</sup>从蝉拟青霉 *Paecilomyces cicadae* TJJ1213 菌株的发酵菌丝体中提取胞内多糖 IPS1 和 IPS2, 分子量分别为  $2.40 \times 10^3 \text{ ku}$  和  $6.79 \times 10^2 \text{ ku}$ , 均由甘露糖、葡萄糖和半乳糖残基组成, 摩尔比分别为 1.35:6.93:1.00 和 2.04:1.00:1.87。文献表明, 蝉花菌丝体和子实体多糖分子量分布各异, 不过大部

分是由葡萄糖、甘露糖、半乳糖组成,虽然单糖组成相同,但各单糖的占比以及最高的单糖都不尽相同<sup>[19]</sup>,这种差异可能是由菌株、培养基和培养条件差异引起的,猜测这也是导致了蝉花多糖的生物活性相差较大的主要原因。

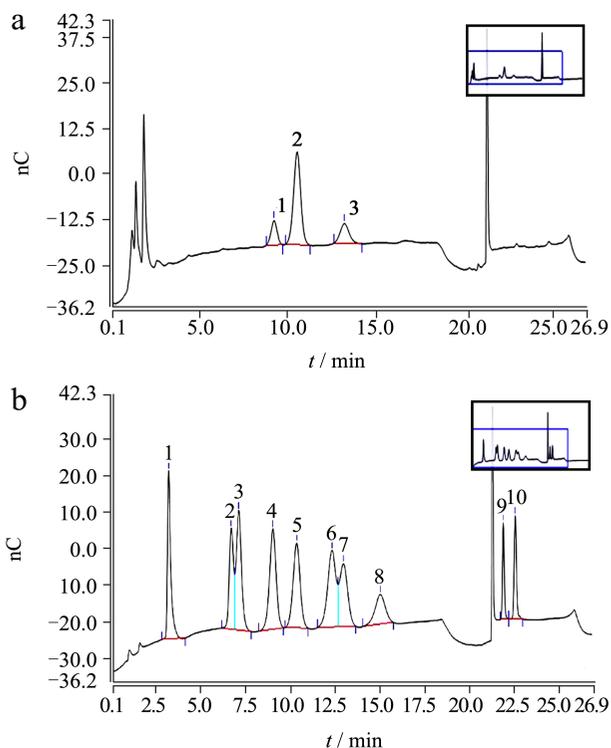


图4 ISP-80的单糖组分

Fig.4 Monosaccharide fraction of ISP-80

注: a: ISP-80 (图中峰1、2、3依次为Gal、Glc、Man)。b: 标准品 (图中峰1~10依次为Fuc、Rha、Ara、Gal、Glc、Xyl、Man、Fru、GalA、GlcA)。

## 2.2 ISP-80对RAW264.7细胞存活率的影响

将不同质量浓度的ISP-80多糖同RAW264.7细胞共培养,采用CCK-8法测定细胞存活率。该方法基于细胞代谢活力与细胞数量的关联,通过测量细胞对CCK-8试剂的还原能力来评估细胞的活力水平。结果如图5所示,与空白对照组相比,添加ISP-80多糖在0.01~1.00 mg/mL质量浓度范围内,都未显示细胞毒性,并且还能显著促进RAW264.7细胞的增殖( $P<0.0001$ )。在ISP-80质量浓度在0.05~0.5 mg/mL范围内,细胞活性逐渐递增,由138.18%升至153.17%。但随着质量浓度继续增大至1.00 mg/mL时,细胞活性却下降到141.32%,不过依旧显著优于空白组。这个结果与前人研究结果相符<sup>[21,22]</sup>,在合适的质量浓度范围内,大多数多糖并不会对细胞产生强毒性。为了得到更好的抗炎效果,本实验选

择0.10、0.25、0.50 mg/mL分别作为低、中、高剂量组进行后续实验。

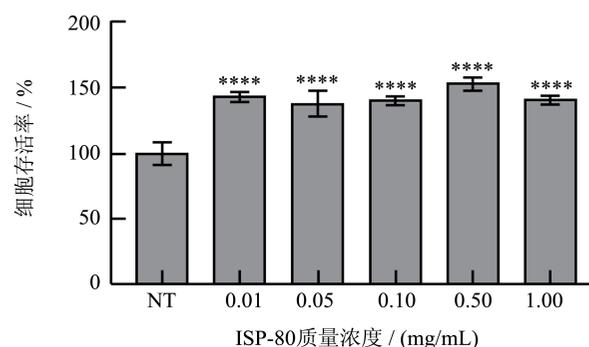


图5 不同质量浓度ISP-80对RAW264.7细胞存活率的影响

Fig.5 Effect of ISP-80 different concentration on RAW264.7 cell viability

注: NT: 阴性对照组; ISP-80: 不同浓度ISP-80多糖处理组。\*\*\*\*表示实验组vs空白组,  $P<0.0001$ 。

## 2.3 ISP-80对LPS诱导RAW264.7细胞分泌IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6的影响

ELISA测定各组细胞因子的结果见图6,给予LPS刺激后,模型组(LPS组)中炎症因子IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 生成量显著增加( $P<0.001$ ),分别为 $6.41\times 10^4$ 、 $4.54\times 10^4$ 和 $44.09$  pg/mL,表明建模成功。在添加0.1~0.5 mg/mL范围内的ISP-80后,发现其对IL-6(图6a,  $P<0.05$ )、IL-1 $\beta$ (图6c,  $P<0.001$ )和TNF- $\alpha$ (图6b)的分泌都具有较明显的抑制作用。结果显示,在上述一系列质量浓度下的ISP-80对炎症因子IL-1 $\beta$ 分泌量的抑制效果最显著。添加0.25 mg/mL ISP-80处理,IL-1 $\beta$ 分泌量下降最多,由 $44.09$  pg/mL降到了 $25.96$  pg/mL ( $P<0.001$ )。而针对IL-6炎症因子,添加ISP-80质量浓度的增大和减小,抑制效果都不显著,只有在0.25 mg/mL ISP-80作用下,IL-6的分泌量降低至LPS处理组的0.88倍( $P<0.05$ )。最后,ISP-80各个质量浓度对TNF- $\alpha$ 因子有抑制作用,但剂量关系都不显著( $P>0.05$ )。总的来说,虽然ISP-80的抗炎效果不如阳性对照组地塞米松,但对LPS诱导的巨噬细胞炎症反应都有明显的抑制作用。

IL-6、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 作为重要的促炎细胞因子,能够诱导许多其他免疫调节和炎症因子的表达。研究表明,多糖的分子量在 $10\sim 10^3$  ku之间分布,包括单糖组成为半乳糖、葡萄糖和甘露糖,它们与免疫调节密切相关<sup>[23]</sup>。Kim等<sup>[24]</sup>研究发现,蝉花粗多糖(PCP)可通过TLR4信号通路激活巨噬细胞,促进

RAW264.7 细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  基因的表达, 有较好的免疫激活性。同样, Tian 等<sup>[19]</sup>从蝉拟青霉 *Paecilomyces cicadae* TJJ1213 菌株的发酵菌丝体中提取胞内多糖 IPS1 和 IPS2, 两者均可显著增加 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的分泌水平, 表现出较好的免疫刺激活性。不过, Olatunji 等<sup>[25]</sup>从蝉虫草中提取的多糖 CPA-1 和 CPB-2, 其单糖组成和分子量与我们提取的蝉花多糖不同, 但生物活性表现相似, 都可明显抑制 LPS 诱导的巨噬细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 炎症因子的水平, 呈现出良好的抗炎效果。

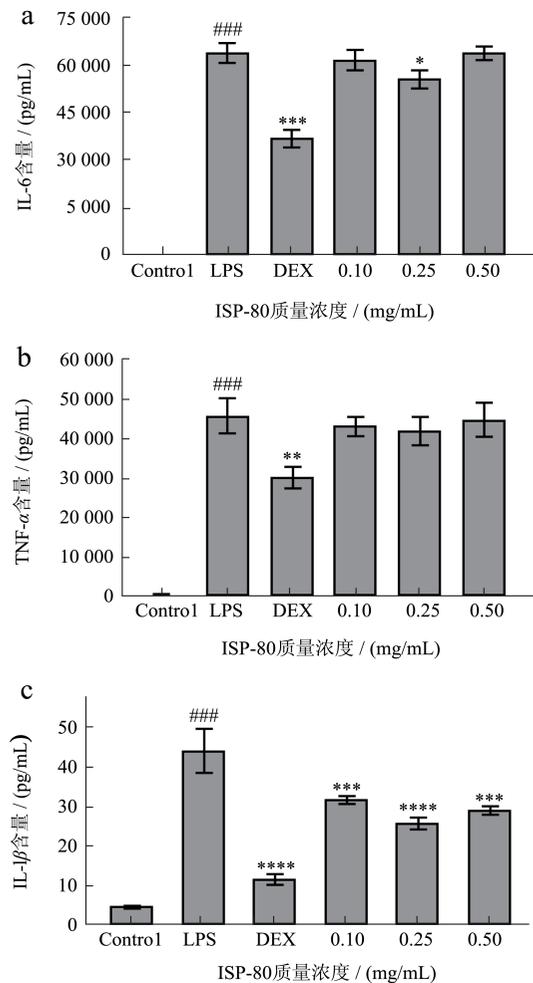


图 6 不同质量浓度的 ISP-80 对炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的影响

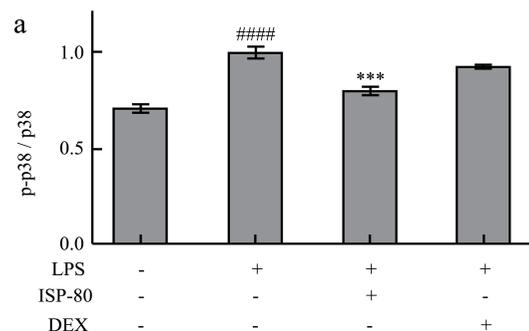
Fig.6 Effects of ISP-80 different mass concentration on inflammatory factors L-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$

注: Control: 阴性对照组; LPS: 脂多糖处理组; DEX: 阳性对照组, 地塞米松; ISP-80: 不同质量浓度多糖 ISP-80 处理组。### 表示模型组 vs 空白组,  $P < 0.001$ ; \* 表示实验组 vs 模型组,  $P < 0.05$ ; \*\* 表示实验组 vs 模型组,  $P < 0.01$ ; \*\*\* 表示实验组 vs 模型组,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\* 表示实验组 vs 模型组,  $P < 0.0001$ 。

## 2.4 ISP-80对MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路相关蛋白表达量的影响

炎症调节的潜在分子机制是复杂多样的。MAPK 具有交通枢纽的地位, 其主要包括 ERK、JNK 和 p38 蛋白, 可参与细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭和形态改变等多种生理过程, 通过炎症蛋白 (包括 iNOS 以及调节启动子区炎症蛋白表达的细胞因子和转录因子) 的磷酸化来响应和调节炎症刺激<sup>[16]</sup>。NF- $\kappa$ B 作为巨噬细胞基因表达的另一重要调节因子, 高度集中于炎症反应<sup>[26]</sup>。I $\kappa$ B $\alpha$  作为 NF- $\kappa$ B 的内源性抑制蛋白, 被刺激磷酸化后发生泛素化降解, 从而释放出 NF- $\kappa$ B p65 复合物, 其主要负责调节 iNOS、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 细胞因子等促炎蛋白的转录调控<sup>[27]</sup>。另外 p-NF- $\kappa$ B p65 作为 MAPK 信号通路的主要下游, 能够穿过膜进入细胞核, 在那里它与各种促炎介质和细胞因子的启动子区结合, 从而调节它们的 mRNA 表达<sup>[28,29]</sup>。总之, I $\kappa$ B $\alpha$  的磷酸化与 p65 的释放密切相关, NF- $\kappa$ B p65 的磷酸化对 p65 的激活和易位以及促炎介质和细胞因子基因的反式激活极为重要<sup>[16]</sup>。

在本实验中, 我们研究了包括 ERK、JNK 和 p38 MAPK 信号在内的 MAPK 通路, 以揭示 ISP-80 潜在的抗炎机制。依据 Western blot 结果 (图 7) 所示, 与对照组相比, 小鼠 RAW264.7 细胞经 LPS 刺激后, 引起了所有 MAPK 蛋白的磷酸化, 显著提高了 p-ERK、p-JNK 和 p-p38 蛋白的表达水平 ( $P < 0.0001$ ), 分别提升至 2.43、8.33 和 1.43 倍。与模型组相比, 经多糖 ISP-80 (0.25 mg/mL) 处理后, p38 和 JNK 磷酸化蛋白的表达水平显著减少, 但并没有减弱 p-ERK。其中, p-p38 与 p38 蛋白表达水平比值由 1.00 降到了 0.80 ( $P < 0.001$ ), p-JNK 与 JNK 蛋白的表达水平比值下降了将近 1/2 ( $P < 0.001$ )。另外, 阳性对照组对这三种磷酸化蛋白的表达并无抑制作用。由此可见, 多糖 ISP-80 具有抑制 p-p38、p-JNK 蛋白表达的作用。



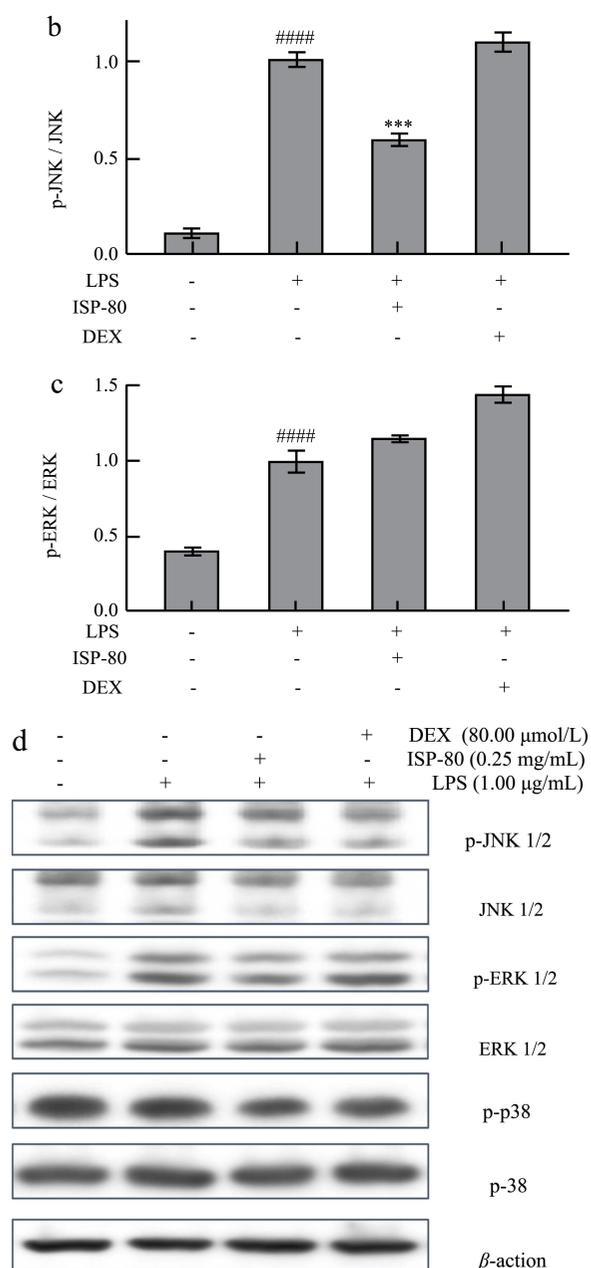


图7 ISP-80对LPS刺激的RAW264.7细胞MAPK信号通路磷酸化的影响

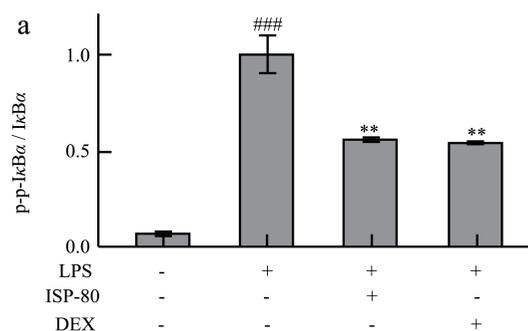
Fig.7 Effects of ISP-80 on the LPS-stimulated phosphorylation of MAPK signaling pathways in RAW264.7 cells

注：以总MAPK为内部对照，通过蛋白质印迹检测MAPK和MAPK的磷酸化水平。#表示模型组vs空白组， $P < 0.05$ ；####表示模型组vs空白组， $P < 0.0001$ ；\*表示实验组vs模型组， $P < 0.05$ ；\*\*\*表示实验组vs模型组， $P < 0.001$ 。

为了揭示ISP-80是否可以抑制p65及IκBα的磷酸化和降解，通过Western blot检测LPS模型组、DEX阳性对照组和ISP-80实验组处理的RAW

264.7细胞中的p-NF-κB p65、NF-κB p65、IκBα和p-IκBα蛋白。以Lamin B为内参计算各组细胞中NF-κB信号通路关键蛋白表达相对含量。如图8所示，LPS刺激细胞使p-IκBα表达量显著提升了10.76倍 ( $P < 0.0001$ )，表明LPS刺激增加了IκBα的磷酸化。而继续用ISP-80孵育RAW264.7细胞后，使p-IκBα的表达量下降了0.43 ( $P < 0.01$ )，这可能会导致p65活化降低。p65的磷酸化对于活化及其向细胞核的移位具有重要意义。结果表明，LPS刺激依旧显著增加了p65的磷酸化，而ISP-80孵育处理显著减弱了p-p65，蛋白表达水平比值由1.00降到了0.76 ( $P < 0.001$ )。这个结果可能不可避免地抑制p65的易位，表明ISP-80通过抑制LPS刺激的p65磷酸化和细胞核移位，即通过抑制NF-κB信号通路，潜在地抑制促炎介质和细胞因子的释放及基因表达。

尽管炎症涉及的信号通路是多种复杂的。MAPK和NF-κB信号通路被认为是调节炎症介质和细胞因子的核心通路。Tian等<sup>[21]</sup>发现，蝉拟青霉胞外多糖EPS1和EPS2可以上调巨噬细胞中iNOS、TNF-α、IL-6、IFN-γ和IL-4的基因表达，通过TLR4介导的MyD88依赖性信号通路诱导巨噬细胞活化，启动细胞因子和NO的基因表达，随后调节巨噬细胞的免疫活性。Deng等<sup>[30]</sup>的研究数据表明，蝉菌丝体提取物具有强大的抗炎效果，主要通过抑制TLR4/NF-κB/MAPK、HO-1/Nrf2和AMPK/Sirt1信号通路介导的。在本研究中，ISP-80多糖抗炎作用通过MAPK和NF-κB途径介导，ISP-80通过阻断p38、ERK和JNK的磷酸化来抑制MAPK途径，同时通过抑制IκBα的磷酸化和降解以及阻断NF-κB p65的磷酸化来抑制NF-κB通路。可见，不同来源的蝉花多糖或蝉拟青霉或蝉棒束孢多糖，因菌株、培养条件、多糖的分子量大小、单糖组成比例以及链构象的不同，确实呈现出不同的免疫活性，具有免疫激活或者抗炎效果。



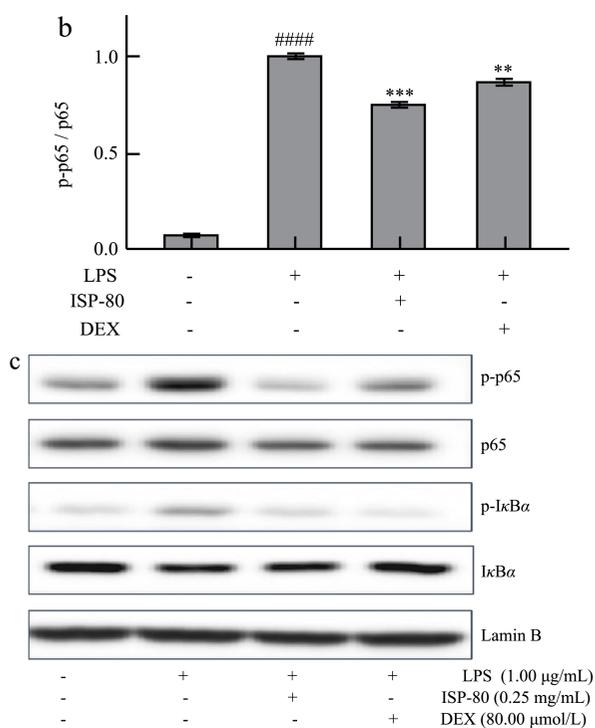


图8 ISP-80对LPS刺激的RAW264.7细胞NF-κB信号通路磷酸化的影响

Fig.8 Effects of ISP-80 on the LPS-stimulated phosphorylation of NF-κB signaling pathways in RAW264.7 cells

注：用总细胞裂解物通过免疫印迹检测 p-IκBα、IκBα、p-p65 和 p65 的水平。### 表示模型组 vs 空白组， $P < 0.001$ ；#### 表示模型组 vs 空白组， $P < 0.0001$ ；\*\* 表示实验组 vs 模型组， $P < 0.01$ ；\*\*\* 表示实验组 vs 模型组， $P < 0.001$ 。

### 3 结论

综上所述，蝉棒束孢 C1 菌丝体多糖 ISP-80 可促进 RAW264.7 巨噬细胞增殖，有效抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应，降低 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 促炎因子的分泌量。ISP-80 主要通过 MAPK 和 NF-κB 信号通路介导发挥抗炎作用。ISP-80 通过阻断 p38 和 JNK 的磷酸化而抑制 MAPK 通路；同时，ISP-80 通过抑制 IκBα 磷酸化以及阻断 NF-κB p65 磷酸化来抑制 NF-κB 信号通路。本研究为蝉花多糖的开发以及抗炎机制的研究提供了理论基础。在将来，蝉花多糖 ISP-80 可作为有效预防和治疗炎症性疾病的天然和安全的抗炎剂，在食品、化妆品领域具有广泛的应用前景。

### 参考文献

[1] HARBELOUI H, HICHAMI A, AIDI WANNES W, et al. Anti-

inflammatory effect of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extract through the downregulation of NF-kappa B and MAPK pathways in LPS-induced RAW264.7 macrophages [J]. South African Journal of Botany, 2019, 125: 1-8.

- [2] LIU C, CHEN J, CHEN L, et al. Immunomodulatory activity of polysaccharide-protein complex from the mushroom sclerotia of *Polyporus rhinocerus* in murine macrophages [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2016, 64(16): 3206-3214.
- [3] WANG D D, PAN W J, MEHMOOD S, et al. Polysaccharide isolated from *Sarcodon aspratus* induces RAW264.7 activity via TLR4-mediated NF-κB and MAPK signaling pathways [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 1039-1047.
- [4] 梁世伟,王洪凯.蝉花研究进展[J].浙江农业学报,2023, 35(8):2013-2022.
- [5] SHAO L, JIANG S J, LI Y, et al. Aqueous extract of *Cordyceps cicadae* (Miq.) promotes hyaluronan synthesis in human skin fibroblasts: A potential moisturizing and anti-aging ingredient [J]. PLoS One, 2023, 18(7): e0274479.
- [6] 王惠,陈康,郝雯雯,等.蝉花抑菌抗氧化谱效关系的初步研究[J].食品与生物技术学报,2022,41(5):56-65.
- [7] 周思静,乔宇琛,刘桂君,等.蝉花的研究现状与分析[J].食品与发酵工业,2024,50(1):341-350.
- [8] TIAN J J, WANG X M, ZHANG X L, et al. Isolation, structural characterization and neuroprotective activity of exopolysaccharide from *Paecilomyces cicada* TJJ1213 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 1034-1046.
- [9] DI F Q, ZHANG J C, CHENG W J, et al. *Paecilomyces cicadae*: a systematic overview of the biological activities and potential mechanisms of its active metabolites [J]. Food and Agricultural Immunology, 2023, 34(1): 2243059.
- [10] XU Z C, LIN R Y, HOU X N, et al. Immunomodulatory mechanism of a purified polysaccharide isolated from *Isaria cicadae* Miquel on RAW264.7 cells via activating TLR4-MAPK-NF-κB signaling pathway [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 4329-4338.
- [11] WANG Y B, HE P F, HE L et al. Structural elucidation, antioxidant and immunomodulatory activities of a novel heteropolysaccharide from cultured *Paecilomyces cicadae* (Miquel.) Samson [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 216: 270-281.
- [12] CHEN Y, WANG T, ZHANG X, et al. Structural and immunological studies on the polysaccharide from spores of a medicinal entomogenous fungus *Paecilomyces cicadae* [J]. Carbohydrate Polymers: Scientific and Technological Aspects of Industrially Important

- Polysaccharides, 2021, 254: 117462.
- [13] 邵丽,臧雪梅,俞苓,等.一株产胞外多糖的蝉棒束孢菌株胞外多糖及制备方法和应用:中国,CN202110230202.5[P]. 2021-05-14.
- [14] 朱宇竹.白背三七多糖的提取、纯化、理化特性及其降血糖活性的研究 [D].杭州:浙江工商大学,2023.
- [15] 李帅帅,罗瑞熙,韦亚琼,等.黄芩苷通过调控TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路对脂多糖诱导RAW264.7细胞极化的影响[J]. 中成药,2022,44(12):3835-3841.
- [16] XU J, XIAO C M, XU H S, et al. Anti-inflammatory effects of *Ganoderma lucidum* sterols via attenuation of the p38 MAPK and NF- $\kappa$ B pathways in LPS-induced RAW 264.7 macrophages [J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 150(7203): 112073.
- [17] LI Y M, ZHONG R F, CHEN J, et al. Structural characterization, anticancer, hypoglycemia and immune activities of polysaccharides from *Russula virescens* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 184: 380-392.
- [18] 余蕊宏,孟祯,孙梦珂,等.短管兔耳草多糖的结构表征及其免疫调节活性研究[J].畜牧兽医学报,2021,(11):052.
- [19] TIAN J J, ZHANG C P, WANG X M, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of intracellular polysaccharide from the mycelium of *Paecilomyces cicadae* TJJ1213 [J]. Food Research International, 2021, 147: 110515.
- [20] 刘城移,郝心怡,林沛霖,等.1株野生蝉虫草的鉴定及其胞内和胞外多糖抗肝癌活性比较[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2020,48(12):117-126.
- [21] TIAN J J, TANG C, WANG X M, et al. Supramolecular structure features and immunomodulatory effects of exopolysaccharide from *Paecilomyces cicadae* TJJ1213 in RAW264.7 cells through NF- $\kappa$ B/MAPK signaling pathways [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 207: 464-474.
- [22] YOU X, YANG L, ZHAO X J, et al. Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus pentosus* LZ-R-17 isolated from Tibetan kefir [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 158: 408-419.
- [23] LEE J Y, LI C S, SURAYOT U, et al. Molecular structures, chemical properties and biological activities of polysaccharide from *Smilax glabra* rhizome [J]. International Journal of Biological Macromolecules: Structure, Function and Interactions, 2018, 120(Pt B): 1726-1733.
- [24] KIM H S, KIM J Y, RYU H S, et al. Phenotypic and functional maturation of dendritic cells induced by polysaccharide isolated from *Paecilomyces cicadae* [J]. Journal of Medicinal Food, 2011, 14(7-8): 847-856.
- [25] OLATUNJI O J, FENG Y, OLATUNJI O O, et al. Polysaccharides purified from *Cordyceps cicadae* protects PC12 cells against glutamate-induced oxidative damage [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 153: 187-195.
- [26] BEINKE S. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology [J]. Biochemical Journal, 2004, 382(2): 393-409.
- [27] HAN C, YANG J K, SONG P Y, et al. Effects of salvia miltiorrhiza polysaccharides on lipopolysaccharide-induced inflammatory factor release in RAW264.7 cells [J]. J Interferon Cytokine Res, 2018, 38(1): 29-37.
- [28] HOESEL B, SCHMID J A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer [J]. Molecular Cancer, 2013, 12(1): 1-15.
- [29] NATOLI G, CHIOCCA S. Nuclear ubiquitin ligases, NF- $\kappa$ B degradation, and the control of inflammation [J]. Science Signaling, 2008, 1(1): pe1.
- [30] DENG J S, JIANG W P, CHEN C C, et al. *Cordyceps cicadae* mycelia ameliorate cisplatin-induced acute kidney injury by suppressing the TLR4/NF- $\kappa$ B/MAPK and activating the HO-1/Nrf2 and Sirt-1/MAPK pathways in mice [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020, 2020: 1-17.