

榆黄菇多糖对体外诱导炎症模型细胞因子的分泌及一氧化氮合酶 (NOS) 的影响

罗晓恒¹, 赵哲坤^{1,2}, 高宜³, 赵爽^{1*}

(1. 北京市农林科学院农产品加工与食品营养研究所, 北京市农林科学院植物保护研究所, 北京 100097)

(2. 河北工程大学生命科学与食品工程学院, 河北邯郸 056038) (3. 北京市西城区妇幼保健中心, 北京 100053)

摘要: 以榆黄菇为原料, 采用水提醇沉法提取榆黄菇粗多糖, Seavage 法去除蛋白, 利用 DEAE-Cellulose 离子交换和 Superdex-75 凝胶层析方法纯化获得 PSI 和 PSII 两个组分; 通过脂多糖 (LPS) 刺激建立炎症模型; 利用 MTT 法筛选出两个多糖的优势浓度, 采用吸光度分析法测定一氧化氮合酶 (NOS) 的活力、酶联免疫吸附试剂盒测定细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的分泌水平来评价多糖对 RAW264.7 细胞的抗炎作用。研究结果显示, LPS 浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞炎症水平达到最高, 在模型的基础上筛选出 PSI 的优势浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、PSII 的优势浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 与 LPS 模型组相比较, PSI 对 NOS 活性、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的分泌水平抑制率分别为 37.54%、28.84%、28.27%和 30.25%, PSII 对 NOS 活性、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的分泌水平抑制率分别为 51.24%、37.56%、31.35%和 32.67%。研究证实, 榆黄菇多糖 PSI 和 PSII 对 LPS 诱导 RAW264.7 炎症细胞具有缓解作用, 主要表现在抑制炎症细胞因子的分泌水平、促进细胞增殖、降低巨噬细胞的吞噬能力等方面, 而对比 PSI 来说, PSII 对于一氧化氮合酶 (NOS) 以及细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的分泌水平的抑制力要更强, 具有更好的抗炎效果。

关键词: 榆黄菇; 多糖; 细胞炎症模型; 荧光分析法; 抗炎功能

文章编号: 1673-9078(2022)03-25-32

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.3.0521

Effects of *Pleurotus citrinipileatus* Polysaccharides on the of Secretion Cytokines and Nitric Oxide Synthase (NOS) in An *in Vitro* Induced Inflammation Model

LUO Xiaoheng¹, ZHAO Zhekun^{1,2}, GAO Yi³, ZHAO Shuang^{1*}

(1. Institute of Agri-food Processing and Nutrition, Institute of Plant Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100097, China)

(2. College of Life Sciences and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China)

(3. Beijing Xicheng District Health Care Center of Maternal and Child, Beijing 100053, China)

Abstract: *Pleurotus citrinipileatus* was used as the raw material, and crude polysaccharides were extracted by water extraction and alcohol precipitation from its fruiting bodies of. The Seavage method was used to remove proteins, and two components, PSI and PSII were obtained after purification by DEAE-Cellulose ion exchange and Superdex-75 gel chromatography. The *in vitro* inflammation model was established by

引文格式:

罗晓恒, 赵哲坤, 高宜, 等. 榆黄菇多糖对体外诱导炎症模型细胞因子的分泌及一氧化氮合酶 (NOS) 的影响[J]. 现代食品科技, 2022, 38(3): 25-32, +194

LUO Xiaoheng, ZHAO Zhekun, GAO Yi, et al. Effects of *Pleurotus citrinipileatus* polysaccharides on the of secretion cytokines and nitric oxide synthase (NOS) in an *in vitro* induced inflammation model [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(3): 25-32, +194

收稿日期: 2021-05-18

基金项目: 北京市农林科学院科技创新能力建设专项 (KJ CX20200208); 北京市农林科学院农产品加工与营养健康协同创新中心项目 (KJ CX201915)

作者简介: 罗晓恒 (1998-), 女, 本科生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: lxh944206855@163.com; 共同第一作者: 赵哲坤 (1996-), 男, 硕士, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: MotonK@163.com

通讯作者: 赵爽 (1982-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食用菌功能及加工技术, E-mail: shuangzhaow@126.com

lipopolysaccharide (LPS) stimulation. The optimal doses of the two polysaccharides were screened by the MTT method. The activity of nitric oxide synthase (NOS) was determined by the absorbance assay, and the levels of secreted cytokines, IL-1 β , IL-6 and TNF- α , were determined by enzyme linked immunosorbent assay kits to evaluate the anti-inflammatory effect of the polysaccharides on RAW264.7 cells. The results showed that the cellular inflammation level reached the highest when the concentration of LPS was 5 $\mu\text{g/mL}$. On the basis of the cell model, the optimal dose of PSI and PSII were 500 $\mu\text{g/mL}$ and 200 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Compared with the LPS model group, the inhibition rates of PSI on NOS activity, IL-1 β , IL-6 and TNF- α were 37.54%, 28.84%, 28.27% and 30.25%, respectively. The inhibitory rates of PSII on NOS activity, IL-1 β , IL-6 and TNF- α were 51.24%, 37.56%, 31.35% and 32.67%, respectively. The research confirmed that PSI and PSII had the alleviating effects on LPS-induced inflammatory cells, which were mainly manifested in inhibiting the level of secreted inflammatory cytokines, promoting cell proliferation, and reducing the phagocytic ability of macrophages. Compared with PSI, PSII had a greater inhibitory effect on the secretion levels of nitric oxide synthase (NOS) and cytokines, IL-1 β , IL-6 and TNF- α , thereby exhibiting a better anti-inflammatory effect.

Key words: *Pleurotus citrinipileatus*; polysaccharides; cellular inflammation model; fluorescence analysis; anti-inflammatory effect

榆黄菇 (*Pleurotus citrinipileatus*) 又名金顶侧耳、黄金菇、榆黄蘑, 隶属于担子菌亚门 (Basidiomycotina), 层菌纲 (Hymenomycetes), 伞菌目 (Agaricales), 侧耳科 (*Pleurotaceae*), 侧耳属 (*Pleurotus*), 是较为珍贵的经济食用菌之一。野生榆黄菇子实体因呈浅黄色或黄色且腐生于榆木上而得名, 主要分布于欧洲、美洲、中国、东南亚等地^[1], 榆黄菇香味十分浓郁, 形状为浅漏斗形, 菌肉为白色, 肉质脆嫩; 柄为偏生, 菇体成簇生长^[2]。榆黄菇是一种北方地区常见的食用菌, 其因为外型喜人又是食药兼用的食用菌, 现在各地都有栽培, 例如: 在河南焦作泌阳县扩大了榆黄菇的种植规模, 增加了经济效益, 帮助了很多村民脱贫致富, 巩固了脱贫攻坚的成果^[3]。有些地方甚至将榆黄菇种植业与茶园业、林园等相结合科学的发展, 进一步开发创新榆黄菇种植与农村休闲资源结合的旅游模式, 综合提升茶园和林园的利用率和经营效益^[4]。

随着人们对生活质量要求的提高, 榆黄菇因其具高蛋白、低脂肪、低糖等特点, 已经成为了人们餐桌上常见的美味佳肴。榆黄菇富含蛋白质、氨基酸、维生素、多糖、钠、钙、铁、钾、锌^[5,6]等营养物质, 食用榆黄菇不但可以帮助人体补充所需的营养物质和增强人体免疫力, 而且长期食用可以发挥降低血压、抗癌、抗脂肪肝、延缓衰老、降低血糖血脂和抗病毒^[7,8]等功效。但是有关榆黄菇功能多糖的提取纯化研究比较少, 对于榆黄菇抗炎多糖的相关报道较为少见。其功能研究多集中在护肝消脂^[9]、抗氧化和保湿等方面^[10]。石堃等^[11]对榆黄菇多糖进行体外抗氧化活性的测定, 结果显示榆黄菇多糖具有一定的 DPPH 自由基清除能力、羟自由基清除能力、超氧阴离子清除能力以及还原力。王晓洁等^[12]利用 MTT 比色法发现榆黄菇菌丝体胞外多糖对小鼠-S180 癌细胞以及人结肠低分化腺癌细胞均具有抑制作用。同时榆黄菇多糖可以通

过调节免疫细胞来提高身体抵抗病毒和抵御细菌入侵感染的能力, 能够明显地增强体液免疫系统和细胞免疫功能的作用^[13,14]。本试验通过体外建立炎症细胞模型, 综合评价榆黄菇多糖的抗炎作用, 旨在为研制抗炎功能性食品或天然药物的开发提供原料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

RAW264.7 细胞, 北纳创联生物技术有限公司; 榆黄菇菌株, 北京市农林科学院植保所保藏菌株。

1.2 仪器与试剂

Steti-cycle371 CO₂ 培养箱, 美国 Thermo 公司; R-215 旋转蒸发仪, 瑞士 Buchi 公司; 电子天平, 美国奥豪斯公司; 真空干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; 电热恒温水浴锅, 北京长安永剑科学仪器有限公司; SHZ-88A 恒温水浴锅, 北京精科华瑞仪器有限公司; 5810R 冷冻离心机, 美国 Eppendorf 公司; IX-71 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 移液器, 美国 Drummond 公司; 荧光全波长酶标仪, Tecan Austria GmbH 公司。

胎牛血清 (FBS)、RPMI 高糖培养液、胰酶和双抗 (青霉素和链霉素), 美国 Invitrogen 公司; MTT 测试液、二甲基亚砷 (DMSO), 美国 Amresco 公司; 台盼蓝染液和无水乙醇, 国药集团化学试剂有限公司; BCA 测定试剂盒, 北京博迈德基因技术有限公司; NOS 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 细胞因子 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) 测定试剂盒, 北京四正柏生物科技有限公司; 水为超纯水; 化学试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 榆黄菇多糖的提取及纯化

榆黄菇菌株接种到综合 PDA 试管中进行活化, 25 °C 恒温培养; 待菌丝长满试管后将其接种到二级培养基中 (棉籽壳 80%、麸皮 18%、石膏 1%、糖 1%、料水比为 1:1), 25 °C 恒温培养室培养至菌丝长满; 将二级种接种到栽培袋中 (棉籽壳 78%、麸皮 20%、石膏 1%、糖 1%、料水比为 1:1), 25 °C 的条件下进行发菌, 菌种长满栽培袋后进行搔菌并移入温室大棚; 出菇条件保持湿度在 90% 以上, 温度约为 20~25 °C, 收集第一潮榆黄菇子实体, 冷冻干燥后放入破碎机, 制成质地均一的榆黄菇干粉。定量称取榆黄菇干粉, 按 1:30 的比例加入去离子水, 在 90 °C 高温水浴锅中水浴 4 h, 水浴后混合物在高速冷冻离心机中以 6000 r/min 离心 30 min。取上清液, 旋蒸浓缩, 量取上清液体积, 按照 1:4 的比例加入无水乙醇搅拌均匀后盖上锡箔纸, 置于 4 °C 冰箱中冷藏过夜使多糖析出, 然后以 6000 r/min、离心 30 min 得到榆黄菇固体粗多糖, 放入于 60 °C 的烘箱中烘干至溶剂挥发, 再配置成多糖溶液待用^[15]。

利用 Sevage 法去除多糖溶液中的蛋白质, 重复多次直至无蛋白质凝胶层析出。收集好每次除蛋白后的上清液, 混合上清液后加入无水乙醇得到沉淀的多糖, 烘干去除溶剂再用去离子水溶解, 得到去除蛋白的榆黄菇粗多糖溶液^[16]。

利用 10 mmol/L pH 7.0 的磷酸缓冲溶液 (PB-Buffer, PBS) 平衡 DEAE-Cellulose 层析柱 (5×20 cm), 榆黄菇粗多糖溶液调节 pH 值上样, 用 0、0.2 mol/L NaCl 和 1 mol/L NaCl 进行梯度洗脱, 洗脱流速为 1.5 mL/min, 分别收集不同时间段洗脱出的溶液, 测定洗脱液的多糖浓度, 收集到两个多糖含量较高的洗脱峰 D1 和 D2。将组分 D1 和 D2 分别上样于 Superdex-75 分子凝胶层析柱, 用超纯水进行洗脱, 洗脱流速为 0.5 mL/min, 测定洗脱液的多糖浓度, 收集多糖洗脱峰 PSI 和 PSII, 冷冻干燥 48 h 后获得多糖纯品。

1.3.2 细胞的培养

将巨噬细胞 RAW264.7 培养于含有 10% 胎牛血清、1% 10 mg/L 链霉素 (原液浓度) 和 10000 U/mL 青霉素的 RPMI 高糖培养基中, 放置于 37 °C、5% CO₂、95% 湿度的培养箱中培养, 每隔一天用 PBS 清洗后再用 0.02% EDTA 和 0.25% 的胰蛋白酶细胞消化液进行传代培养。

1.3.3 利用 LPS 诱导巨噬细胞 RAW264.7 建立炎症模型

取对数生长期细胞按照 1×10^4 cells/孔的数目接种到 96 孔板中, 放置于培养箱中培养 6 h 后用 PBS 清

洗, 分别设置空白组和炎症模型组, 炎症组加入不同浓度的 LPS 溶液, 每个组分别设置 3 个复孔, 每个孔终浓度分别为 1、3、5、7、9 μg/mL, 空白组则加入等体积的细胞培养液, 培养 24 h 后收集细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 测定 TNF-α 浓度水平。因为 TNF-α 是细胞达到炎症状态最初产生的细胞因子, 所以我们选择 TNF-α 的分泌水平最高的一组来作为脂多糖的最佳诱发炎症的浓度。

1.3.4 榆黄菇多糖纯品对 RAW264.7 炎症细胞活力的影响

取对数生长期细胞按照 8×10^3 cells/孔的数目接种到 96 孔板中, 放置于培养箱中培养 6 h 后用 PBS 清洗, 分别设置空白组、炎症组和给药组, 除空白组外加入终浓度为 5 μg/mL 的 LPS 溶液诱导细胞形成炎症, 将不同作用浓度的榆黄菇多糖加入培养板中, 使 PSI 和 PSII 终浓度为 125、250、500、1000、2000 μg/mL, 不加多糖的处理作为空白组, 每组设置 3 个重复孔, 炎症组、空白组加入同等体积的细胞培养液, 放置于培养箱培养 24 h, 采用 MTT 法测定细胞存活率, 以筛选到促增殖效果最强的作用浓度为目标, 调整 PSII 作用浓度, 使其终浓度为 12.5、25、50、100、200、250 μg/mL, 选择刺激细胞增殖的最高浓度作为抗炎功能研究的给药剂量。

1.3.5 中性红试验观察细胞吞噬活性

取对数生长期细胞按照 1×10^4 cells/孔的数目接种到 96 孔板中, 放置于培养箱中培养 24 h, 用 PBS 清洗后, 分别设置空白组、炎症组和给药组, 除空白组外加入终浓度为 5 μg/mL 的 LPS 溶液诱导细胞形成炎症, 过 2 h 后给药组加入用细胞培养液稀释的多糖 PSI 和 PSII 浓度分别为 500 μg/mL 和 200 μg/mL 的溶液 200 μL, 每组设置 3 个重复孔, 炎症组、空白组加入同等体积的细胞培养液, 置于培养箱中培养 24 h 后弃去培养液, 用 PBS 清洗, 加入 0.09% 中性红溶液 200 μL 置于培养箱中培养 4 h, 吸弃中性红培养液, 用 PBS 清洗, 加入 200 μL 细胞裂解液 (体积比为 1:1=冰醋酸:无水乙醇) 裂解 10 min, 用酶标仪在 690 nm 波长处测定吸光度, 计算细胞吞噬活性。

$$\text{吞噬活性} / \% = \frac{A_{690\text{nm}}^{\text{样品}}}{A_{690\text{nm}}^{\text{空白}}} \times 100\%$$

1.3.6 一氧化氮合酶的测定

取对数生长期细胞按照 3×10^6 cells/孔的数目接种到 24 孔板中, 同 1.3.5 的设置组别及操作步骤, 置于培养箱中培养 24 h 后收集细胞, 利用 100 μL 超纯水反复冻融细胞 3 次, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 利用 BCA 试剂盒测定细胞全蛋白的含量, 用于

NOS 的检测,同时用一氧化氮合酶试剂盒按照说明书操作,测定吸光值并换算成 NOS 酶活力值^[17]。酶活力单位定义:每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol NO 为一个酶活力单位。

$$\text{NOS酶活力(U/mg prot)} = \frac{\text{OD}_{\text{NOS}} - \text{OD}_{\text{空}}}{38.3 \times 10^{-6}} \times \frac{V_{\text{总}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{r \times t} \times C$$

式中:

OD_{NOS}——总 NOS 测定 OD 值;

OD_空——空白 OD 值;

V_总——反应液总体积;

V_样——取样量;

r——比色光径;

t——反应时间;

C——待测样本蛋白浓度。

1.3.7 细胞因子(IL-1β、IL-6、TNF-α)的测定

取对数生长期细胞按照 3×10⁶个/孔的数目接种到 6 孔板中,同 1.3.5 的设置组别及操作步骤,置于培养箱中培养 24 h 后收集细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,测定各细胞因子的浓度水平^[18]。

1.3.8 数据处理

使用 DPS 软件对数据进行方差分析,使用 Duncan 新复极差法并进行多重比较。

2 实验结果

2.1 榆黄菇粗多糖的 DEAE-Cellulose 离子柱

分离

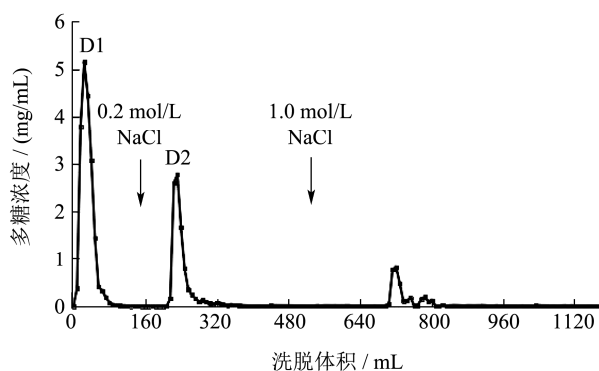


图1 榆黄菇粗多糖 DEAE-Cellulose 柱层析洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of crude polysaccharides from *Ulmus pumila* by DEAE-Cellulose column chromatography

榆黄菇子实体经过水提醇沉、去除蛋白后得到的粗多糖样品,多糖溶液经过透析调节 pH 值后上样于 DEAE-Cellulose 层析柱,分别利用 0、0.2、1 mol/L NaCl 溶液进行梯度洗脱,分别在 0 和 0.2 mol/L NaCl 溶液洗脱时获得 2 个含量较高的洗脱峰 D1 和 D2,洗脱曲

线如图 1 所示。

2.2 榆黄菇多糖的 Superdex-75 凝胶柱层析结果

D1 和 D2 组分分别采用 Superdex-75 凝胶柱层析进行分离,D1 和 D2 组分经过凝胶过滤分离后呈现出单峰,说明已获得多糖提纯品,分别命名为 PSI 和 PSII,洗脱曲线见图 2 和图 3 所示。

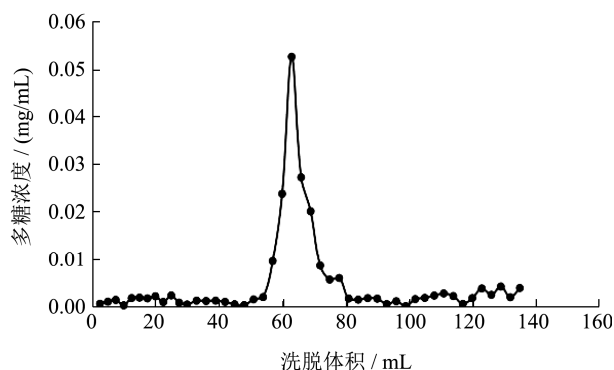


图2 D1 组分 FPLC 凝胶过滤洗脱曲线

Fig.2 Elution curves of FPLC gel filtration for D1 component

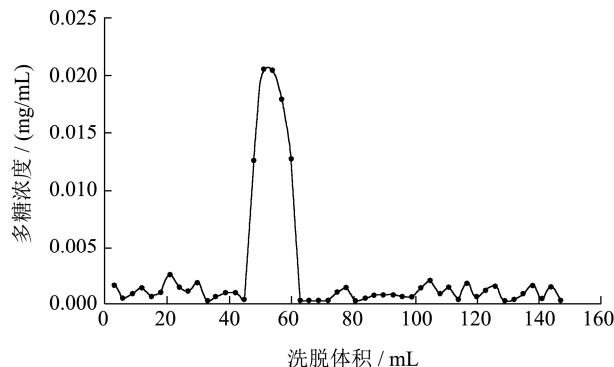


图3 D2 组分 FPLC 凝胶过滤洗脱曲线

Fig.3 Elution curve of D2 component FPLC gel filtration

2.3 LPS 诱导巨噬细胞建立炎症模型

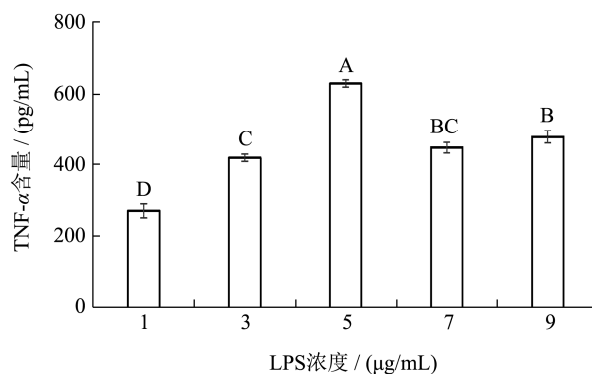


图4 LPS 刺激巨噬细胞 TNF-α 分泌的作用

Fig.4 Effects of LPS towards macrophages for secretion of TNF-α levels

注:标记相同小写字母的均数之间差异不显著 ($p>0.05$); 标记不同小写字母的均数之间差异显著 ($p<0.05$); 标记不同大

写字母的均数之间差异极显著 ($p < 0.01$), 数据展示为均值 \pm SD。下图同。

TNF- α 是细胞产生炎症反应的始发因子, 当一定浓度的 LPS 刺激巨噬细胞 RAW264.7 后能使细胞过量且持续地产生 TNF- α 引起炎症反应, 由图 4 可以看出, 当 LPS 浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞分泌 TNF- α 含量水平最高, 所以我们后续研究选择 LPS 浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 作为炎症诱导浓度。

由图 4 可知, RAW264.7 巨噬细胞在 LPS 的诱导下释放炎症因子 TNF- α 的水平明显增高, LPS 浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 释放炎症因子 TNF- α 的水平达到最高值, 因此设定其为诱导炎症模型的最佳浓度。

2.4 榆黄菇多糖对 RAW264.7 细胞活力的影响

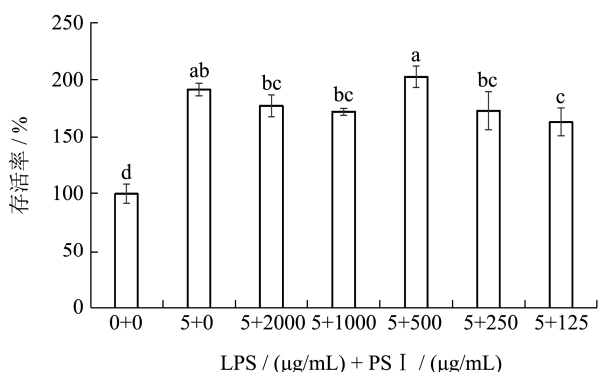


图 5 PSI 对 LPS 诱导的巨噬细胞活力的影响

Fig. 5 Influence of PSI on the viability of LPS-induced macrophages

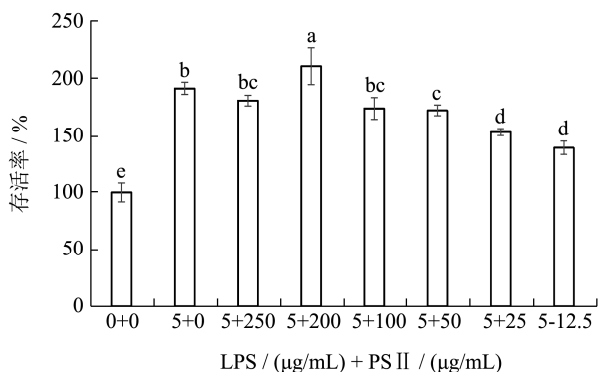


图 6 PSII 对 LPS 诱导的巨噬细胞活力的影响

Fig. 6 The effect of PSII on the activity of LPS-induced macrophages

经不同浓度的榆黄菇多糖作用与被 LPS 刺激过的 RAW264.7 细胞培养 24 h 后, PSI 浓度过高和过低时, 细胞存活率出现下降的趋势 ($p < 0.05$), 说明过高浓度的 PSI 对 RAW264.7 细胞具有毒性, 浓度过低可能使细胞产生过激炎症反应发生凋亡, 但在 PSI 为 500 $\mu\text{g/mL}$ 细胞存活率最大, 为 206.08%, 虽然未与 LPS 处理组形成显著性差异, 但是该作用浓度是 PSI 刺激

细胞增殖的最佳剂量。同理, 可筛选出 PSII 浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞存活率最大, 为 210.86%, 后期我们选择榆黄菇多糖 PSI 浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 和 PSII 浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 两个剂量对 LPS 诱导的炎症细胞进行抗炎功能的研究。

2.5 中性红试验观察细胞吞噬活性

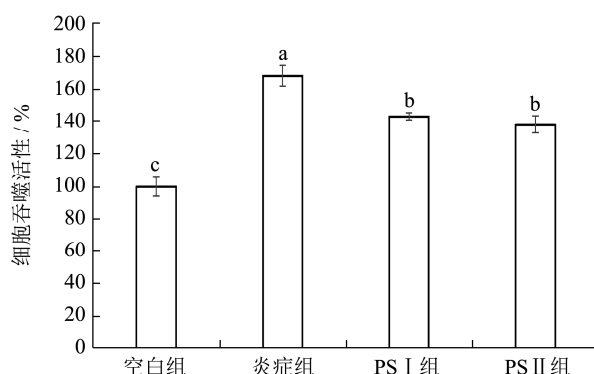


图 7 PSI 和 PSII 对炎症细胞吞噬能力的影响

Fig. 7 Effects of PSI and PSII on phagocytosis of inflammatory cells

由图 7 可知, 与空白组相比较, 以空白组的吞噬率 100% 作为参照, 炎症组的细胞吞噬率增加了 68.13%, 由此可见巨噬细胞在受到 LPS 的刺激后其吞噬能力显著性增加 ($p < 0.05$); 与炎症组相比, 多糖纯品 PSI 的浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时的细胞吞噬率减少 14.91%; 多糖纯品 PSII 的浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞的吞噬率减少 17.84%, 说明 500 $\mu\text{g/mL}$ 多糖 PSI 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 PSII 都具有显著性减少细胞吞噬能力作用 ($p < 0.05$), 可以缓解 LPS 对巨噬细胞的刺激作用。

2.6 一氧化氮合酶的测定

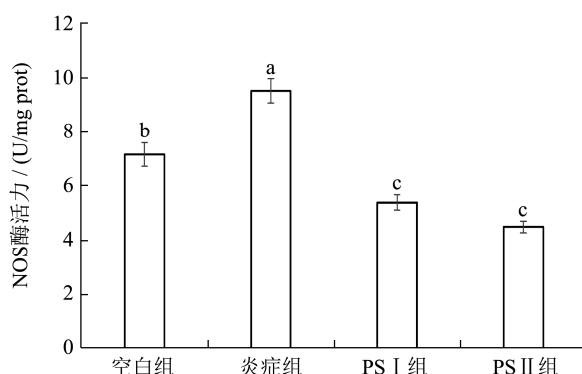


图 8 PSI 和 PSII 对炎症细胞 NOS 酶活力的影响

Fig. 8 Effects of PSI and PSII on NOS enzyme activity in inflammatory cells

如图 8 测定 PSI 和 PSII 对炎症细胞 NOS 酶活力的影响, 与炎症组中 NOS 浓度相比较, 多糖 PSI 和 PSII 对巨噬细胞 NOS 的活性抑制率分别 37.54%、

51.24%，多糖 PSI 和 PSII 能显著性降低 NOS 水平 ($p<0.05$)。

2.7 细胞因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)的测定

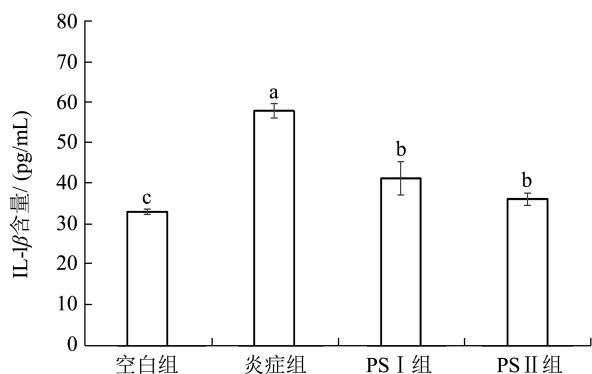


图9 PSI 和 PSII 对炎症细胞分泌 IL-1 β 水平的影响

Fig.9 Effects of PSI and PSII on IL-1 β secreted by inflammatory cells

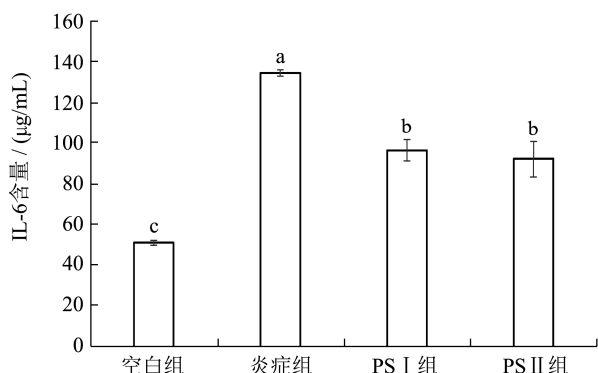


图10 PSI 和 PSII 对炎症细胞分泌 IL-6 水平的影响

Fig.10 Effects of PSI and PSII on IL-6 secretion of inflammatory cells

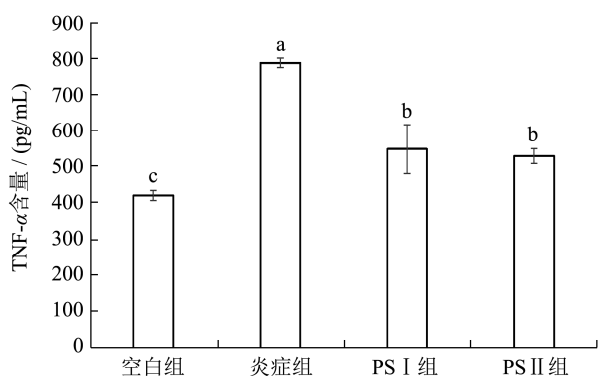


图11 PSI 和 PSII 对炎症分泌 TNF- α 水平的影响

Fig.11 Effects of PSI and PSII on inflammatory secretion of TNF- α levels

由图9所示,利用最佳浓度的PSI和PSII组分处理RAW264.7炎症细胞24h后,测定IL-1 β 的含量,与炎症组相比较,多糖PSI和PSII组的IL-1 β 的含量分别为分别降低了28.84%和37.56%,说明多糖纯品PSI和PSII均能显著性降低炎症细胞分泌IL-1 β 的水

平 ($p<0.05$)。

由图10可知,炎症组与空白组的IL-6含量相比较增加了162.19%,存在差异显著 ($p<0.05$);炎症组分别与PSI和PSII组IL-6的含量相比较,PSI组IL-6的分泌水平的抑制率为28.27%,PSII组IL-6分泌水平的抑制率为31.35%,说明PSI和PSII都能显著性降低炎症细胞的IL-6的分泌水平 ($p<0.05$)。

如图11所示,利用最佳浓度的PSI和PSII组分处理RAW264.7炎症细胞24h后测定TNF- α 的含量,与空白组的相比较,炎症组的TNF- α 含量增加了86.54%,存在显著性差异 ($p<0.05$);与炎症组比较PSI、PSII组的TNF- α 分泌水平的抑制率分别为30.25%、32.67%,存在显著性差异 ($p<0.05$)。

3 讨论

巨噬细胞在炎症反应中具有关键的作用,其能够通过促进机体免疫系统释放炎症介质来参与炎症反应^[19]。LPS作为一种细胞毒素,对巨噬细胞具有一定的激活作用,刺激巨噬细胞产生NO和释放细胞免疫因子等生物活性物质,适量的免疫因子具有提高机体抵抗外界刺激和修复机体损伤的作用,而过量持续的刺激产生的免疫活性物质则会引起细胞的炎症反应,导致细胞的损伤和凋亡^[20]。

TNF- α 、IL-6和IL-1 β 作为主要细胞因子,在机体免疫应答和炎症调节中发挥着重要作用。TNF- α 是一类在炎症调控中占据主导地位的双重活性细胞因子,正常的机体可以适量的分泌TNF- α ,其可以介导免疫应答,增强巨噬细胞的杀伤活性,进而增强机体的免疫机能。但是当TNF- α 大量释放的时候,其能够诱导其它炎性介质和氧自由基的分泌,加剧炎症发展的进程^[21]。IL-6能调节各种生理过程,包括应急反应、炎症、免疫反应、造血和细胞生长等,它通过促进嗜中性粒细胞运输到炎症部位而参与炎症的引发和维持,导致产生许多炎症介质,还可调节T淋巴细胞的激活和分化,促进B淋巴细胞成熟^[22]。IL-1 β 是一种淋巴细胞及单核细胞激活因子,作用于机体的各个系统,参与免疫调节、介导炎性反应、影响组织代谢,诱导其它多种细胞因子的分泌,是炎性反应过程中重要的细胞因子之一^[23]。一氧化氮合酶(NOS)是一种同工酶,分别存在于内皮细胞、巨噬细胞、神经吞噬细胞及神经细胞中,在免疫反应过程中,内毒素和某些细胞因子如IL-1、TNF- α 、干扰素等可诱导NOS酶催化L-精氨酸产生大量NO,对肠黏膜具有杀伤毒性和促炎作用。

本实验以榆黄菇多糖为活性物质,在体外抗炎研

究中发现,多糖提纯品 PSI 和 PSII 处理 RAW264.7 炎症细胞 24 h 后,利用 MTT 法测定细胞存活率来筛选出促增殖活性最佳剂量分别为 500 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$,云少君等^[24]通过使用 MTT 法检测巨噬细胞的增殖发现巴氏蘑菇多糖在浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 时效果最佳,相对比,榆黄菇多糖抗炎效用明显优于巴氏蘑菇多糖。研究通过测定巨噬细胞的吞噬能力来发现抗炎功效,与炎症组比较,经过 500 $\mu\text{g/mL}$ 多糖 PSI 处理后,细胞的吞噬能力减少了 15.05%;经过 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 PSII 处理后,细胞的吞噬能力减少了 17.82%,说明多糖 PSI 与 PSII 具有良好的抗炎功效;在抗炎功效研究中,与炎症组相比,经过 500 $\mu\text{g/mL}$ PSI 处理后的炎症细胞,其 NOS 活性减少了 37.54%,细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的分泌水平分别下降了 29.25%、28.34%和 30.27%;而经过 200 $\mu\text{g/mL}$ PSII 处理后的炎症细胞,其 NOS 活性减少了 51.24%,细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的分泌水平分别下降了 38.54%、31.45%和 32.76%。这一结果说明了多糖 PSI 与 PSII 可通过降低炎症细胞因子的分泌,抑制其诱导炎症介质的能力;同时多糖 PSI 与 PSII 还有效抑制炎症细胞 NOS 酶的活力,降低其促炎作用,从而达到抗炎的效果。董瑛等^[25]的研究发现,香菇多糖联合 GP 化疗方案对于促炎性细胞分子 IL-1 β 、TNF- α 的分泌具有良好的抑制作用,抑制率达到了 46.66%,相比较 PSI 和 PSII 对于促炎性细胞分子 IL-1 β 、TNF- α 的分泌也具有明显的抑制作用,其中单独使用 PSII 就可以抑制细胞分泌 IL-1 β 达到 38.54%,抑制率与香菇多糖和化疗药物联合应用的效果相近,说明其作用优于香菇多糖。另外,多糖被公认为是生物免疫反应调节剂,具有无毒的特性,与当前广泛研究的抗炎醛类物质相比,其具有更为广泛的应用前景。本研究发现榆黄菇多糖 PSI 和 PSII 可以调节巨噬细胞增殖和吞噬能力,从而发挥抗炎的功能,这与欧阳学农等^[26]研究香菇多糖抗炎的作用机理相吻合。

4 结论

本研究从榆黄菇中提取得到 PSI 和 PSII 两个多糖提纯品,通过体外细胞炎症模型的评价,确定了两个多糖提纯品能够缓解细胞的炎症反应,具备抗炎功能。其中低作用浓度的 PSII 对于细胞 NOS 的活性和细胞因子分泌的抑制作用更为明显,其作用效果优于 PSI,该研究结果可以为榆黄菇多糖在抗炎功能研究及应用方向提供科学支持。

参考文献

- [1] 何英,万德云,张玉兴.榆黄菇提取物对保护肝脏作用的初步探讨[J].中国实验诊断学,2010,9:1368-1369
HE Ying, WAN Deyun, ZHANG Yuxing. Preliminary study on liver protection effect of extract of *Pleurotus citrinipileatus* [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2010, 9: 1368-1369
- [2] 周赛静.榆黄菇子实体多糖的分离纯化、结构鉴定和生物活性研究[D].杭州:浙江工业大学,2013
ZHOU Saijing. Isolation, purification, structure identification and biological activity of polysaccharide from fruit body of *Pleurotus citrinipileatus* [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2013
- [3] 苏江生.食用菌撑起“致富伞”[J].当代兵团,2020,10:41
SU Jiangsheng. Edible fungi props umbrella to get rich [J]. Modern Production and Construction Corps, 2020, 10: 41
- [4] 张攀攀.茶园栽培榆黄菇的休闲协同一体化[J].中国食用菌,2020,39(8):185-187,191
ZHANG Panpan. Leisure collaborative integration of cultivation of *Pleurotus citrinipileatus* in tea garden [J]. Edible Fungi of China, 2020, 39(8): 185-187, 191
- [5] 胡晓艳.金顶之冠 榆黄菇[J].北京农业,2015,10:41
HU Xiaoyan. Golden crown of *Pleurotus citrinipileatus* [J]. Beijing Agriculture, 2015, 10: 41
- [6] 王玥玮,王麒麟,张丽娟.榆黄蘑营养成分及其生物活性的研究进展[J].食品研究与开发,2017,38(4):201-203
WANG Yuewei, WANG Qilin, ZHANG Lijuan. Research advance on nutritional ingredient and biological activity of *Pleurotus citrinipileatus* Sing [J]. Food Research and Development, 2017, 38(4): 201-203
- [7] 杨立红,蔡颖娜,黄媛媛.榆黄菇多糖生物活性物质的研究及现状[J].当代生态农业,2003,1:25-27
YANG Lihong, CAI Yingna, HUANG Yuanyuan. Research and status of bioactive substances of polysaccharides from *Pleurotus citrinipileatus* [J]. Contemporary Eco-Agriculture, 2003, 1: 25-27
- [8] ZHAO Shuang, GAO Qi, RONG Chengbo, et al. Immunomodulatory effects of edible and medicinal mushrooms and their bioactive immunoregulatory products [J]. Journal of Fungi, 2020, 6(4): 269
- [9] 赵爽,荣成博,刘宇,等.3 种食用菌分级多糖消脂护肝功能研究[J].食品研究与开发,2017,38(8):158-162
ZHAO Shuang, RONG Chengbo, LIU Yu, et al. Reduce fat and hepato-protective studies on fractional polysaccharides of *Pleurotus citrinipileatus*, *Auricularia polytricha* and *Grifola frondosa* [J]. Food Research and Development, 2017, 38(8):

- 158-162
- [10] 黄怡雯. 榆黄菇提取液在化妆品中的研究与应用[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2018
HUANG Yiwen. Research and application of the extract from *Pleurotus citrinipileatus* in cosmetics [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Technology, 2018
- [11] 石莹, 王再明, 潘玲玲, 等. 榆黄蘑多糖的提取及其抗氧化活性研究[J]. 林业科技, 2015, 40(3): 34-36
SHI Kun, WANG Zaiming, PAN Lingling, et al. Study on extraction and antioxidant activity of polysaccharide from *Tricholoma ulmus* [J]. Forestry Science & Technology, 2015, 40(3): 34-36
- [12] 王晓洁, 蔡德华, 杨立红, 等. 金顶侧耳多糖体外抗肿瘤作用的研究[J]. 食用菌学报, 2005, 1: 9-13
WANG Xiaojie, CAI Dehua, YANG Lihong, et al. Study on in vitro antitumor effect of polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* [J]. Acta Edulis Fungi, 2005, 1: 9-13
- [13] 李承范. 7 种常见食用菌中多糖的提取和测定[J]. 光谱实验室, 2012, 29(2): 996-999
LI Chengfan. Extraction and determination of polysaccharides from seven kind of common edible fungus [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2012, 29(2): 996-999
- [14] 徐显利, 田晓蕾. 茶薪菇、榆黄蘑、猴头菇三种食用菌中总糖、多糖及还原糖的测定[J]. 黑龙江农业科学, 2011, 1: 96-97
XU Xianli, TIAN Xiaolei. Determination of total carbohydrate, polysaccharide and reducing sugar in three kinds of edible fungi [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2011, 1: 96-97
- [15] 辛晓林, 黄清荣, 史亚丽. 榆黄菇菌丝体多糖提取及抗肿瘤活性研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 2: 256-258
XIN Xiaolin, HUANG Qingrong, SHI Yali. Study on extraction and antitumor activity of polysaccharide from mycelium of *Pleurotus citrinipileatus* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2006, 2: 256-258
- [16] 李欣欣, 李文香. 桦褐孔菌多糖的分离纯化及其抗氧化活性测定[J]. 食品工业科技, 2021, 4(8): 1-13
LI Xinxin, LI Wenxiang. Isolation, purification and antioxidant activity of *Inonotus obliquus* polysaccharide [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 4(8): 1-13
- [17] 高纳影, 赵艳敏, 刘岱琳, 等. 蔓越莓提取物对脂多糖诱导 RAW246.7 细胞炎症反应的抑制作用[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(16): 1-7
GAO Naying, ZHAO Yanmin, LIU Dailin, et al. Inhibitory effect of cranberry extract on LPS induced inflammatory response in RAW246.7 cells [J]. Food Research and Development, 2018, 39(16): 1-7
- [18] 叶莎莎, 曾耀英, 尹乐乐. 红景天苷对小鼠腹腔巨噬细胞体外增殖、凋亡、吞噬、ROS 和 NO 产生的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(3): 237-241
YE Shasha, ZENG Yaoying, YIN Lele. Effects of salidroside on proliferation, apoptosis, phagocytosis, ROS and NO production of murine peritoneal macrophages *in vitro* [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2011, 27(3): 237-241
- [19] Hortelano S, Castrillo A, Alvarez A M, et al. Contribution of cyclopentenone prostaglandins to the resolution of inflammation through the potentiation of apoptosis in activated macrophages [J]. J Immunol, 2000, 165(11): 6525-6531
- [20] 倪湾, 李敬双, 于洋. 洋葱槲皮素对脂多糖诱导的小鼠腹腔巨噬细胞炎症反应抑制作用[J]. 食品工业科技, 2017, 38(23): 284-288
NI Wan, LI Jingshuang, YU Yang. Inhibiting effect of onion quercetin on lipopolysaccharide-induced mice's enterocoelia macrophage inflammatory response [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(23): 284-288
- [21] 潘灵辉. 细胞因子平衡在炎症反应中作用的研究进展[J]. 医学综述, 2005, 11(9): 775-777
PAN Linghui. Research progress on the role of cytokine balance in inflammatory response [J]. Medical Recapitulate, 2005, 11(9): 775-777
- [22] 李萍, 刘馨, 刘洪璐, 等. 癌相关性炎症因子 IL-6 在肿瘤微环境中的作用研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(19): 3174-3177
LI Ping, LIU Xin, LIU Honglu, et al. The cancer-associated inflammatory cytokine IL-6 plays roles in tumor microenvironment [J]. Journal of Modern Oncology, 2017, 25(19): 3174-3177
- [23] 马卫剑, 彭伟. 白细胞介素-1 β 与牙周炎的关系研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2014, 7(20): 179-181
MA Weijian, PENG Wei. Research progress on the relationship between interleukin-1 β and periodontitis [J]. Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use, 2014, 7(20): 179-181

(下转第 194 页)