

兜唇石斛发酵多肽 Asp-Asp-Asp-Tyr 和 Asp-Tyr-Asp-Asp 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的抗炎作用

梁楚容¹, 王琴¹, 肖更生¹, 马路凯^{1,2}, 吴晖³, 肖建波⁴, 刘祎帆^{1*}

(1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室, 广东广州 510225)

(2. 西藏农牧业科学院农产品开发与食品研究所, 西藏拉萨 850000) (3. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (4. 西班牙维戈大学食品科学与技术学院, 西班牙加利西亚自治区 36310)

摘要: 为了研究兜唇石斛发酵多肽 Asp-Asp-Asp-Tyr (DDDY)、Asp-Tyr-Asp-Asp (DYDD) 对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞抗炎活性。以合成的兜唇石斛发酵多肽为研究对象, 采用噻唑蓝法筛选增殖活性最高的发酵多肽浓度, 通过中性红吞噬实验和倒置显微镜观察发酵多肽对细胞的吞噬作用和分化形态变化, 使用 ELISA 试剂盒测定细胞中 NO 及细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和肿瘤坏死因子 TNF- α 的分泌量。结果表明: 12.5、25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四组质量浓度的发酵多肽对细胞无毒性并有增殖作用; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DDDY 和 DYDD 和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 处理可以激活细胞, 增强细胞吞噬能力, 相对吞噬率为 2.05%、1.97% 和 2.19%; 构建 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型, 发现两种发酵多肽处理有效抑制细胞分化, 使细胞恢复正常形态; 抑制细胞 NO 分泌能力, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DDDY 和 DYDD 处理组的 NO 分泌能力降低到 LPS 组的 0.41 倍和 0.49 倍; 并且对抑制细胞因子分泌能力的提高和促炎细胞因子的降低有显著效果, 均表现出剂量反应关系。由此可知, DDDY 和 DYDD 对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应具有抗炎作用, 为后面探究发酵多肽的炎症机制提供理论支持。

关键词: 兜唇石斛发酵多肽; RAW264.7 巨噬细胞; 抗炎作用

文章编号: 1673-9078(2023)01-31-40

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.1.0478

Anti-inflammatory Effects of *Dendrobium aphyllum* Fermentation Polypeptides, Asp-Asp-Asp-Tyr and Asp-Tyr-Asp-Asp, on LPS-induced RAW264.7 Cells

LIANG Churong¹, WANG Qin¹, XIAO Gengsheng¹, MA Lukai^{1,2}, WU Hui³, XIAO Jianbo⁴, LIU Huifan^{1*}

(1.College of Light Industry and Food, Guangdong Provincial Key Laboratory of Lingnan Specialty Food Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China) (2.Institute of Agricultural Product Development and Food Science, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850000, China) (3.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (4.School of Food Science and Technology, University of Vigo, Galicia 36310, Spain)

Abstract: In this study, we aimed to investigate the anti-inflammatory activity of polypeptides Asp-Asp-Asp-Tyr (DDDY) and Asp-Tyr-Asp-Asp (DYDD) on LPS-induced RAW264.7 cells.

梁楚容,王琴,肖更生,等.兜唇石斛发酵多肽 Asp-Asp-Asp-Tyr 和 Asp-Tyr-Asp-Asp 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的抗炎作用[J].现代食品科技,2023,39(1):31-40

LIANG Churong, WANG Qin, XIAO Gengsheng, et al. Anti-inflammatory effects of *Dendrobium aphyllum* fermentation polypeptides, Asp-Asp-Asp-Tyr and Asp-Tyr-Asp-Asp, on LPS-induced RAW264.7 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(1): 31-40

收稿日期: 2022-04-18

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2019A1515011283); 广州市基础研究计划基础与应用研究基础项目 (202002030383); 江门市基础与应用基础研究重点项目 (2021030103330007214); 国家自然科学基金项目 (32001622)

作者简介: 梁楚容 (1997-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 1027529290@qq.com

通讯作者: 刘祎帆 (1990-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: lm_zkng@163.com

Asp-Asp (DYDD) discovered in fermentation media from *Dendrobium aphyllum* towards LPS-induced RAW264.7 macrophages. Synthetic *D. aphyllum* fermentation polypeptides were prepared and subjected to experimentation. Concentrations of fermentation polypeptides that resulted in the highest cell proliferative activity were screened for using the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The effects of fermentation polypeptides on the phagocytic activity of RAW264.7 cells were determined using neutral red phagocytosis assay. Cell differentiation and changes in morphology were observed under an inverted microscope. Secretion levels of NO, cytokines IL-1 β , IL-6, and IL-10, and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Fermentation polypeptide concentrations of 12.5, 25, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$ exerted no cytotoxic effects and promoted cell proliferation. Approximately 100 $\mu\text{g/mL}$ DDDY and DYDD and 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS enabled cell activation and enhanced RAW264.7 cell phagocytic ability, with relative phagocytic rates of 2.05%, 1.97%, and 2.19%, respectively. An LPS-induced RAW264.7 cell inflammation model was constructed, in which both types of fermentation polypeptides effectively inhibited cell differentiation and restored normal cell morphology. The respective NO secretion capacities of cells in the 100 $\mu\text{g/mL}$ DDDY and DYDD treatment groups decreased to 0.41- and 0.49-times, respectively, compared with that of the LPS group. DDDY and DYDD also significantly and dose-dependently increased anti-inflammatory cytokine secretion and decreased the secretion of pro-inflammatory cytokines. Therefore, DDDY and DYDD exert anti-inflammatory effects on the LPS-induced RAW264.7 macrophages. The results of this study may provide a scientific basis for future investigations of the anti-inflammatory mechanisms of fermentation polypeptides.

Key words: fermentation polypeptides of *Dendrobium aphyllum*; RAW264.7 macrophages; anti-inflammatory effects

炎症是各种致炎因子入侵时机体和受损细胞的自我保护反应,炎症在机体内具有双重作用,适度的炎症反应有利于机体自我调控,但过度的炎症反应会引起机体的不良反应并且会引发其他疾病的产生^[1]。研究表明多肽具有抗氧化、抗炎症及免疫调节等多种生理活性^[2]。多肽主要由 2~20 个氨基酸以不同的排列顺序组成,因氨基酸的种类、数量和排列顺序等存在差异,从而使得不同多肽的生理活性存在很大的差异^[3]。梁秋芳^[4]发现玉米蛋白酶解制备生物活性肽具有抗氧化活性并对结肠炎具有良好的抗炎效果,而且在血管内皮细胞模型具有良好的抗炎活性。武文佳^[5]利用小麦胚芽蛋白中提取得到具有良好免疫调节功能的活性肽,经凝胶层析后得到的多肽组分可显著降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞促炎因子 (NO、IL-6 和 TNF- α) 的分泌量,具有抗炎的效果。Ssa 等^[6]首次报道了体外胃肠道消化释放的发芽苜蓿活性肽,发现其中抗氧化活性最高的分解组分对 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞具有较高的抗炎作用,也可称为抗炎肽。可见,从植物中提取得到的活性肽段具有一定的研究价值。目前对兜唇石斛这类药食同源植物的研究较少,对兜唇石斛中发酵多肽的报道就更少了。

兜唇石斛 (*Dendrobium aphyllum*), 为兰科石斛属附生植物,是药用范围较广的中药^[7]。刘祎帆^[8]选用一种乳酸杆菌对兜唇石斛进行固态发酵,选取其中活性最强小于 1 ku 的多糖组分,经 DEAE 纯化后得到一个肽段组分,后经 LC-TOF/MS-MS 分析发现组成的肽分子序列含有: Asp-Asp-Asp-Tyr (DDDY)、Asp-Asp-Tyr-Asp (DYDD)、Met-Ala-Lys (MAK) 等。发酵多肽 DDDY 和 DYDD 等具有天然可靠、无毒无害等优点,

本课题组前期对这些多肽分子做了大量的研究, Liu 等^[9]通过量子化学理论计算,发现 DYDD 上的 O58-H59 和 DDDY 上的 N10-H12 为抗氧化活性位点,对 AAPH 诱导的 HepG2 细胞在细胞内和细胞外起到保护作用,通过对自由基进行直接清除,而不是激活 Nrf2/Keap1 信号通路,从另一个角度来解释细胞抗氧化机制。刘映君等^[10]对其中一条肽 MAK 的抗菌机理进行了研究,发现 MAK 可以抑制铜绿假单胞菌的生长,起到抑菌的作用。另外 Zhuang 等^[11]利用代谢组和转录组结合分子动力学模拟进行分析,发现 DDDY 对铜绿假单胞菌的抑菌作用与膜转运、氨基酸代谢通路和 DDDY 的 n 端 c 端氨基酸残基有关。

基于本课题组前期对兜唇石斛发酵多肽在抗氧化和抑菌方面开展了深入的研究,为继续探明发酵多肽在其他生理活性的作用,特别是抗炎症方面的探究。考虑到 DDDY 和 DYDD 具有相似的氨基酸组成,本研究以合成的 DDDY 和 DYDD 为研究对象,采用脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 刺激 RAW264.7 巨噬细胞构建体外炎症模型,以一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 和细胞因子白介素 (Interleukin, IL) -1 β 、IL-6、IL-10 和肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) 为炎症指标,探究 DDDY 和 DYDD 的体外抗炎活性,明确发酵多肽对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症是否有缓解作用,为下一步深入研究两条发酵多肽的抗炎机制提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 材料与试剂

发酵多肽 Asp-Asp-Asp-Tyr (DDDY) 和 Asp-Tyr-Asp-Asp (DYDD) 是本课题组刘祎帆通过乳酸杆菌固态发酵兜唇石斛得到多糖组分, 后经 DEAE 纯化后得到肽段 DPP, 最后经 LC-TOF/MS-MS 分析发现的多肽分子序列。本研究使用的发酵多肽 DDDY、DYDD 由上海科多肽生物技术有限公司 (中国上海) 按照发现的分子序列合成; 脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS)、噻唑蓝 (Methyl Thiazolyl Tetrazolium, MTT)、二甲基亚砷 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO) 购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA); 胎牛血清 (FBS)、青霉素和 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培养基购自 Gibco 公司 (Carlsbad, CA, USA)。中性红细胞染色液, 购自上海源叶生物技术有限公司; 一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 试剂盒、白介素 (Interleukin, IL)-1 β 试剂盒、IL-6、IL-10 试剂盒、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) 试剂盒, 购自 Mibio 酶联生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

海尔超净工作台, 上海海尔仪器设备有限公司; TECAN 连续多功能酶标仪, 美国 Thermo 公司; 倒置显微镜, 德国 Leica 公司; 台式多功能离心机, 德国 Eppendorf 公司; 二氧化碳培养箱, 美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 于 DMEM 高糖培养基 (含体积分数 10% 胎牛血清和 1% 双抗) 中培养, 37 °C、 $\varphi=5\%$ CO₂ 培养箱中孵育, 待细胞贴壁生长密度至 80% 左右进行传代, 选取对数生长期细胞进行实验, 分为空白对照组、试验组和 LPS 组。

1.2.2 MTT 细胞增殖实验

参考胡梦君^[12]的方法, 稍作修改。以每毫升 5×10^4 个细胞的密度将细胞置于 96 孔板中, 37 °C、 $\varphi=5\%$ CO₂ 培养箱培养 24 h 至细胞贴壁后弃去培养液。空白对照组加入 100 μ L 完全培养液, 试验组加入 100 μ L 不同质量浓度 (12.5、25、50、100、200、400 μ g/mL) 的发酵多肽溶液, LPS 组加入 1 μ g/mL 的 LPS 100 μ L 作为阳性对照, 每组设置 3 个平行孔。37 °C、 $\varphi=5\%$ CO₂ 培养箱培养 24 h 后弃去 96 孔板中的培养液, 每孔加入 0.5% 的 MTT 试剂 200 μ L, 放入 37 °C、 $\varphi=5\%$ CO₂ 培养箱培养 4 h, 弃去孔内液体, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 酶标仪中低速震荡 15 min 使蓝紫色晶体充分溶解, 于 490 nm 波长处检测各孔 OD 值。根据 OD 值

和公式 (1) 计算每孔细胞的存活率, 以此判断 LPS 和发酵多肽对细胞存活率 (A, %) 的影响。

$$A = \frac{OD_2 - OD_0}{OD_1 - OD_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

A——细胞存活率, %;

OD₀——空白孔 OD 值;

OD₁——对照组 OD 值;

OD₂——实验组 OD 值。

1.2.3 中性红吞噬作用评价

参照 Yu 等^[13]的方法, 稍作修改。细胞培养方法和处理方法同 1.2.2, 结束后弃去培养液, 空白对照组仅加入 150 μ L 红细胞裂解液, 其余各组加入质量分数 0.075% 中性红溶液 100 μ L, 继续培养 1 h 后弃去中性红溶液, 用 PBS 清洗 2 次, 加入 150 μ L 红细胞裂解液, 在 540 nm 波长处检测各孔吸光度值 (OD), 根据公式 (2) 计算细胞的相对吞噬率。

$$B = \frac{OD_4}{OD_3} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

B——相对吞噬率, %;

OD₃——空白组 OD 值;

OD₄——实验组 OD 值。

1.2.4 光学显微镜对 RAW264.7 细胞的形态观察

(1) 细胞培养方法: 同 1.2.2。

(2) 细胞处理分组: PBS 清洗过后 96 孔板细胞中, 空白对照组加入 100 μ L 的完全培养液, 试验组先加入 1 μ g/mL 的 LPS, 后加入 50 μ g/mL 的 DDDY 或 50 μ g/mL 的 DYDD 共 100 μ L, LPS 组加入 100 μ L 1 μ g/mL 的 LPS。37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。

(3) 细胞观察: 光学显微镜下对空白对照组、试验组和 LPS 组的细胞进行观察, 调整视野, 放大 10 倍比较细胞形态差异。

1.2.5 对细胞信号物质 NO 分泌的影响

参照胡梦君^[12]的方法, 稍作修改。以每毫升 1×10^6 个细胞的密度将细胞置于 24 孔板中, 37 °C、 $\varphi=5\%$ CO₂ 培养箱培养 24 h 至细胞贴壁后弃去培养液。按照 1.2.4 的分组方法设计空白对照组、试验组和 LPS 组, 每孔 0.5 mL, 每组设置 3 个平行孔。37 °C、 $\varphi=5\%$ CO₂ 培养箱培养 24 h。培养结束后, 将孔板中的细胞培养液转入离心管, 2 500 r/min 离心 10 min 后收集细胞上清液。采用 ELISA 试剂盒测定细胞上清液的 NO 水平。

1.2.6 RAW264.7 细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 分泌量的影响

细胞培养与处理方法同 1.2.5 中, 培养结束后吸取

培养液,采用 ELISA 试剂盒测定 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 分泌量的水平。

1.3 数据分析

每个处理做 3 次重复试验,数据采用 SPSS 25.0 对实验数据进行单因素方差分析,结果以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示,以 Duncan 多边检验对实验均值进行差异显著分析 ($p < 0.05$),用 Origin 2018 对分析数据作图。

2 结果与讨论

2.1 DDDY 和 DYDD 对 RAW264.7 细胞活力的影响

的影响

单核-巨噬细胞在机体免疫体系中扮演着非常重要的角色,RAW264.7 巨噬细胞受到脂多糖刺激后构建的体外炎症模型,通过检测其各个炎症指标的变化,从而探究阐明该药物的抗炎效果及作用机制^[14]。但是药物的毒性会抑制细胞增殖,进而影响细胞炎症因子分泌量,会降低对药物抗炎效果判断的准确性,MTT 法是检测细胞活性常用的方法,结果可以反映药物对细胞的毒性大小^[15]。

因此,本研究首先采用 MTT 法考察不同质量浓度发酵多肽 (DDDY 和 DYDD) 对 RAW264.7 巨噬细胞活性的影响。图 1 反映的是不同质量浓度的 DDDY 和 DYDD 作用于 RAW264.7 小鼠巨噬细胞 24 h 后细胞的活性情况。从图可以看出,一定质量浓度范围的 DDDY 和 DYDD 能显著 ($p < 0.05$) 促进 RAW264.7 细胞的增殖,并且 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 处理可以明显地 ($p < 0.05$) 促进细胞的活性。不同质量浓度 DDDY 溶液对 RAW264.7 细胞的增殖影响如图 1a 所示,当 DDDY 质量浓度在 12.5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,随着质量浓度的增加,细胞的存活率也明显增加,证明此质量浓度范围增强了细胞的增殖率。但是当质量浓度超过 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,细胞的活性下降,最低下降到 87.23%。不同质量浓度 DYDD 溶液对细胞的增殖作用如图 1b 所示,与空白对照组 (细胞存活率为 100.00%) 相比, DYDD 质量浓度在 12.5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内细胞活性维持在 100.40%~126.08% 之间;质量浓度在 200~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,细胞的存活率显著降低 ($p < 0.05$)。结果表明,12.5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DDDY 和 DYDD 对 RAW264.7 小鼠巨噬细胞无显著毒性,故选取 12.5、25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四种质量浓度的两种发酵多肽分别作为后续试验的试验组。选取对细胞无毒性的 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

作为构建炎症模型的 LPS 刺激质量浓度,这个 LPS 质量浓度也是炎症模型常用的质量浓度^[16,17]。

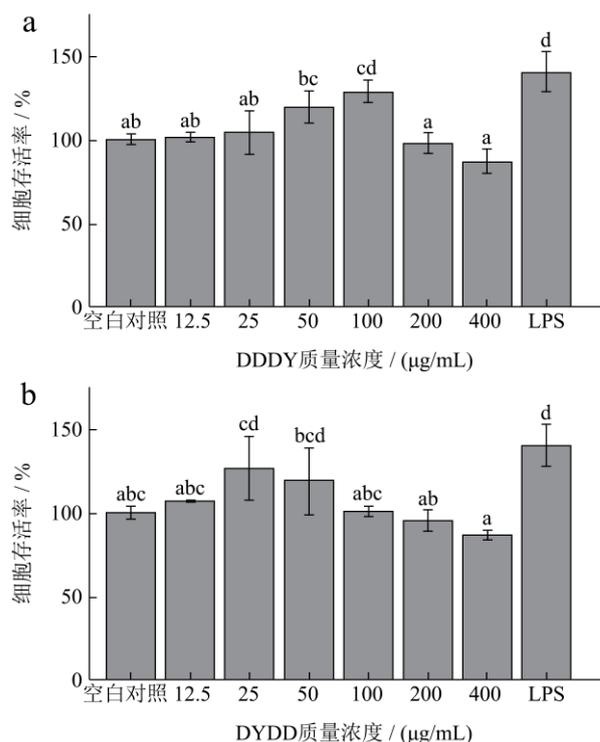


图 1 不同质量浓度 DDDY (a) 和 DYDD (b) 对 RAW264.7 细胞的增殖影响

Fig.1 Effects of different concentrations of DDDY (a) and DYDD (b) on proliferation of RAW264.7 cells

注:不同处理组之间字母不同表示差异性显著, $p < 0.05$,下同。

2.2 DDDY 和 DYDD 对 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响

能力的影响

吞噬能力是巨噬细胞的一个重要功能,吞噬能力的增强是巨噬细胞活化的一种表现^[18],吞噬能力的大小可以反映出细胞的活性的高低^[19],而中性红吞噬实验就是用来研究细胞的吞噬能力的。所以,接下来本研究采用中性红吞噬实验来研究 DDDY 和 DYDD 对细胞吞噬率的影响。图 2 反映的是不同质量浓度的 DDDY 和 DYDD 对 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响,不同质量浓度的 DDDY 对细胞的相对吞噬率如图 2a 所示,质量浓度在 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, DDDY 能显著增强细胞的吞噬作用 ($p < 0.05$),而且随着质量浓度的增加,细胞的吞噬能力越强,其中 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DDDY 处理组的细胞吞噬能力比空白对照组的上升 1.05 倍;同时如图 2b 所示不同质量浓度 DYDD 对细胞的吞噬能力,与空白对照组相比, DYDD 能显著提高细胞的吞噬能力 ($p < 0.05$),四个质量浓度 DYDD 处理组的细胞吞噬能力在 1.75%~1.97% 之间,

无明显差异。从图中也可以看出, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 处理也能提高 RAW264.7 细胞的吞噬能力, 此研究结果与王洁^[18]不同质量浓度的林蛙骨肉小肽促进 RAW264.7 细胞吞噬能力的研究相似。结果表明, 12.5、25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四个质量浓度的 DDDY 和 DYDD 和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 处理可以激活 RAW264.7 细胞, 显著增强细胞的吞噬能力。猜测可能此质量浓度的发酵多肽和 LPS 可以很好的与 RAW264.7 细胞表面的特异性受体结合, 对细胞进行活化, 活力高的巨噬细胞吞噬能力增强, 进而细胞的杀菌功能抗炎功能显著上调。

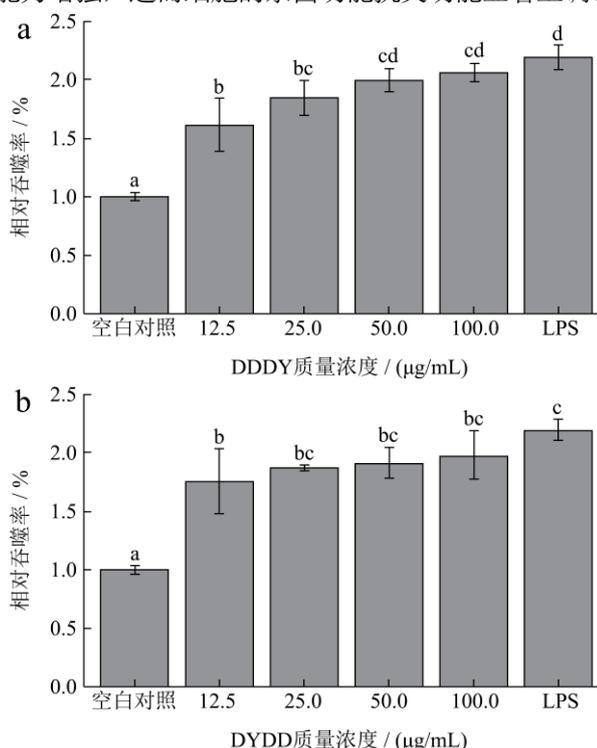


图2 不同质量浓度的 DDDY (a) 和 DYDD (b) 对 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of DDDY (a) and DYDD (b) on phagocytosis of RAW264.7 cells

2.3 RAW264.7 细胞形态的光学显微镜观察

RAW264.7 作为一种在微生物学免疫学等中常用的试验性细胞, 具有很强的粘附能力和抗原吞噬能力, 作为类单核细胞, 它的理想形态应该是小圆而透亮, 较少伪足和类似“触角”样的东西^[14]。倒置显微镜 10 倍镜下观察不同处理组中 RAW264.7 细胞的形态, 如图 3 所示分别为空白对照组、LPS 处理组、DDDY 作用组、DYDD 作用组。空白对照组中 RAW264.7 细胞形态正常, 呈正常圆形或者椭圆形, 细胞之间紧密接触生长 (图 3a); LPS 刺激后 RAW264.7 细胞出现分支情况, 细胞触角分明, 细胞间距明显增大, 多数细胞没有紧密连接在一起 (图 3b); DDDY 和 DYDD 分

别与 LPS 共作用于 RAW264.7 细胞后, 分支状细胞明显减少, 大部分细胞形态为圆形或椭圆形, 细胞恢复正常形态 (图 3c 和图 3d)。

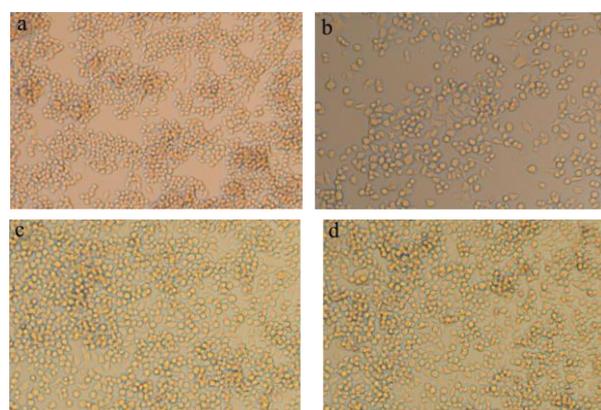


图3 不同处理下的 RAW264.7 细胞光学显微镜形态 (10 \times): 空白对照组 (a)、LPS 处理组 (b)、DDDY+LPS 处理组 (c)、DYDD+LPS 处理组 (d)

Fig.3 Optical microscope morphology of RAW264.7 cells under different treatments (10 \times): Blank control group (a), LPS treatment group (b), DDDY+LPS treatment group (c), DYDD+LPS treatment group (d)

根据显微镜对细胞形态的观察, 可知, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 可成功诱导 RAW264.7 细胞产生炎症, 使巨噬细胞形态有明显分化, 形成了许多伪足, 出现不规则的圆形, 这样与蛋白样品接触面积增加, 这也可能是 LPS 增强了巨噬细胞的吞噬能力的原因; 而 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DDDY 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DYDD 发酵多肽处理后可有效抑制细胞分化, 改善 LPS 诱导的巨噬细胞形态, 缓解细胞的炎症反应, 促进细胞增殖。猜测可能是发酵多肽的加入, 占据巨噬细胞表面上的某种特定识别受体, 使 LPS 与细胞的接触减少或者功能减弱, 从而缓解了 LPS 对巨噬细胞的过度刺激, 改善 RAW264.7 细胞的形态。这些研究结果与陈磊研究的山梨酸对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞形态的变化具有较好的保护作用^[1]和王洁研究的林蛙骨肉小肽对 RAW264.7 细胞形态恢复正常并且有增殖的结果相似^[18]。

2.4 DDDY 和 DYDD 对 RAW264.7 细胞 NO 分泌量的影响

LPS 可诱导巨噬细胞释放 NO、IL-1s 等多种炎症因子, 其中 NO 可经一氧化氮诱导合酶 iNOS 催化可短时大量生成, 可以通过测定其含量反映炎症发生的程度^[20]。由图 4 可知, 不同处理组的 NO 分泌量有显著的差异 ($p < 0.05$), LPS 处理组的 NO 分泌量高于其他处理组, 这是因为巨噬细胞受 LPS 刺激, 影响了

机体中 iNOS 的表达,进而影响了 NO 的生成量^[21]。如图 4a 所示,与 LPS 处理组对比,DDDY 处理降低了 NO 的分泌量,而且质量浓度在 12.5 μg/mL~100 μg/mL 范围内呈剂量依赖性,LPS 处理组 NO 分泌量为 100 μg/mL DDDY 处理质量浓度的 2.46 倍;由图 4b 可以看出,不同质量浓度 DYDD 处理组的 NO 生成量显著高于空白组 ($p < 0.05$),低于 LPS 组 ($p < 0.05$),其中 12.5 μg/mL DYDD 处理组为空白对照组的 16.28 倍,两种发酵多肽对 RAW264.7 细胞 NO 分泌量的刺激呈剂量相关性。

NO 分泌量是炎症反应中重要的促炎分子,细胞 NO 的分泌量可间接反映炎症发生的程度^[22],因此,药物对炎症反应的作用可通过测定 NO 的含量高低来进行判断。结果表明,LPS 处理能增加细胞 NO 的分泌,添加四种质量浓度的 DDDY 和 DYDD 处理后,能对细胞 NO 的分泌产生抑制作用,使 NO 的分泌量明显下降,起到抗炎作用。我们猜测发酵多肽的加入影响了细胞中与 iNOS 表达的相关蛋白的产生,从而影响了 NO 的分泌,改善了 LPS 对巨噬细胞的过度刺激,降低了细胞的炎症程度,同时证明活性发酵多肽能对细胞起到抗炎的效果,He 等^[23]表明小米糠生物活性肽在 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞以剂量依赖的方式显著降低 NO 的产生。这与与本试验结果相似。

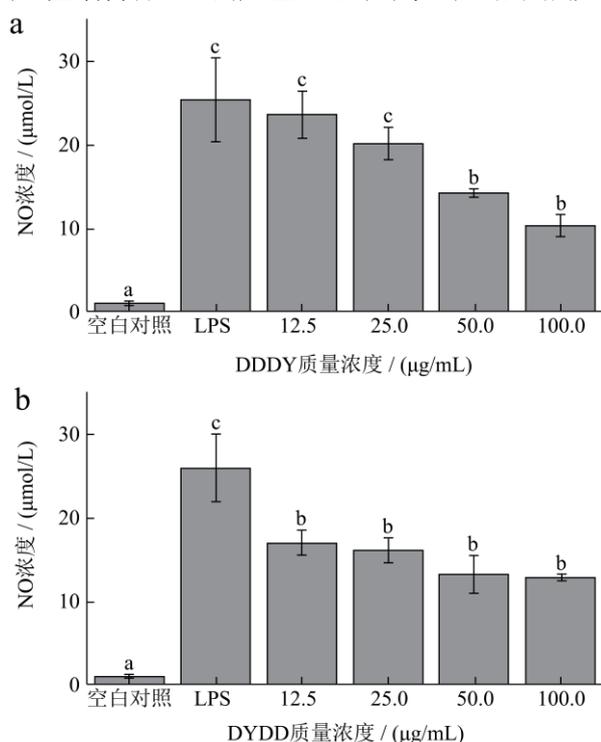


图 4 不同质量浓度的 DDDY (a) 和 DYDD (b) 对 RAW264.7 细胞 NO 分泌量的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of DDDY (a) and DYDD (b) on NO secretion in RAW264.7 cells

2.5 DDDY 和 DYDD 对细胞因子分泌量的影响

研究发现,当巨噬细胞受到外界抗原刺激时(如 LPS)会释放 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10 等重要的细胞因子^[24,25]。其中促炎细胞因子如 TNF-α、IL-1β、IL-6 等可与抑炎细胞因子 IL-10 等相互影响,共同发挥对炎症的调节作用^[12]。为更全面地对 DDDY 和 DYDD 的体外抗炎效果进行研究,以 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞作为体外抗炎模型,分别探究四个质量浓度的 DDDY 和 DYDD 对细胞分泌因子分泌量的影响。

2.5.1 TNF-α 分泌量

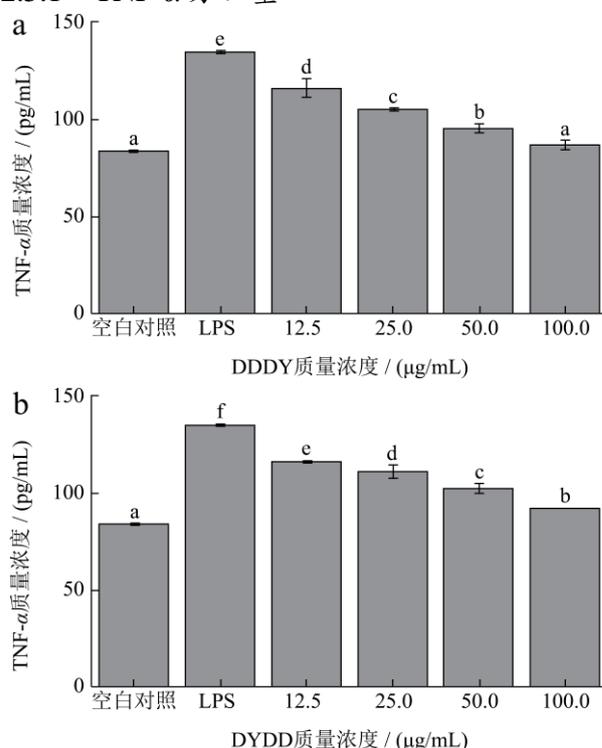


图 5 不同质量浓度的 DDDY (a) 和 DYDD (b) 对 RAW264.7 细胞 TNF-α 分泌量的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of DDDY (a) and DYDD (b) on TNF-α secretion in RAW264.7 cells

TNF-α 能够诱导其它免疫因子的分泌,TNF-α 具有上调 iNOS 的表达,促进 NO 的生成,所以通常被选为药物对巨噬细胞免疫调节作用的指标^[24]。如图 5 实验结果所示,LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞 24 h 后,与空白对照组相比,LPS 处理组的 TNF-α 分泌量显著升高($p < 0.05$),当用不同质量浓度的 DDDY 和 DYDD 作用后,TNF-α 分泌量明显下降。DDDY 处理后如图 5a 所示,与 LPS 处理组相比,随着 DDDY 质量浓度升高,TNF-α 分泌量越低,当经 100 μg/mL DDDY 处理后,TNF-α 分泌量下降到 86.73 pg/mL。12.5~100 μg/mL 质量浓度范围的 DYDD 处理后如图 5b 所

示, TNF- α 的分泌量降低到 LPS 处理组的 0.68~0.86 倍, 随着 DYDD 质量浓度的升高而抑制更多, 表现出质量浓度依赖性。Yang 等^[26]表明车前花乙醇提取物对 LPS 刺激的 RAW264.7 巨噬细胞中 TNF- α 分泌有较强的抑制作用。He 等^[23]发现谷糠发酵多肽能显著降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 TNF- α 等炎症因子的水平。我们的研究结果与前人的研究结果相似, 结果表明, DDDY 和 DYDD 能显著降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 TNF- α 的分泌量, 并且发酵多肽的质量浓度越高 TNF- α 分泌量越低, 均具有质量浓度依赖性。我们猜测, 由于发酵多肽的介入, 影响了 LPS 诱导的炎症模型细胞中促炎症因子 TNF- α 合成蛋白或基因的表达, 导致 TNF- α 分泌量下降, 下调了 iNOS 的表达, 进而影响 NO 的生成。这也解释了 DDDY 和 DYDD 处理后 RAW264.7 细胞中 TNF- α 分泌量的变化趋势与 NO 分泌量相似。

2.5.2 IL-1 β 分泌量

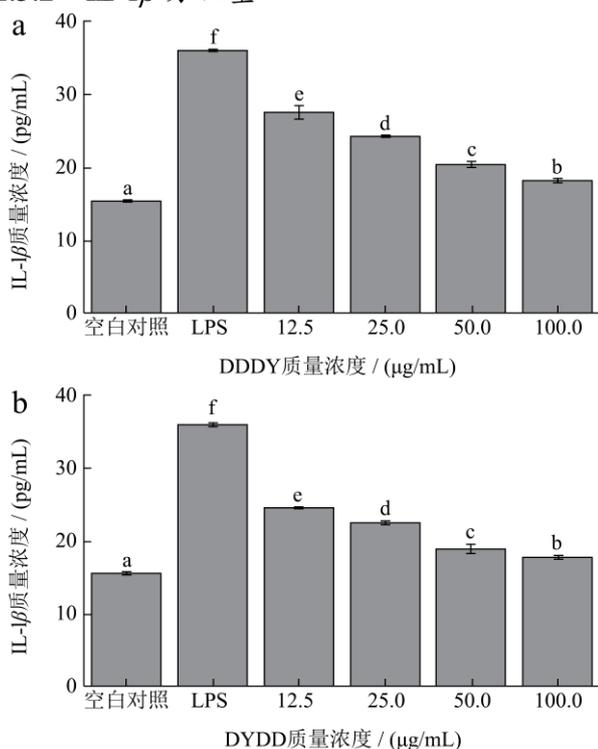


图6 不同质量浓度的 DDDY (a) 和 DYDD (b) 对 RAW264.7 细胞 IL-1 β 分泌量的影响

Fig.6 Effects of different concentrations of DDDY (a) and DYDD (b) on IL-1 β secretion in RAW264.7 cells

IL-1 β 作为一种关键的促炎细胞因子, 参与多种自身免疫性炎症反应和多种细胞活动^[27]。不同质量浓度的 DDDY 和 DYDD 对 RAW264.7 细胞 IL-1 β 分泌量的影响如图 6 所示, 空白对照组的 IL-1 β 分泌量均比较低, 经过 LPS 刺激后, LPS 处理组的 IL-1 β 释放量明显升高($p < 0.01$), 当采用 12.5、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$

质量浓度的 DDDY 和 DYDD 分别处理后, IL-1 β 分泌量逐步降低 ($p < 0.05$)。不同质量浓度的 DDDY 对 RAW264.7 细胞 IL-1 β 分泌量影响如图 6a 所示, 100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的 DDDY 处理后, IL-1 β 分泌量下降至原来的 0.51 倍; 不同质量浓度的 DYDD 对 RAW264.7 细胞 IL-1 β 分泌量影响如图 6b 所示, 随着 DYDD 处理质量浓度越高, IL-1 β 分泌量越低, 显现出明显的剂量效应关系。结果表明, DDDY 和 DYDD 能显著降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 IL-1 β 的分泌量, 其中两种发酵多肽的质量浓度在 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, IL-1 β 分泌量显著降低。He 等^[23]发现小米糠活性肽能显著降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 IL-1 β 等炎症因子的水平。Kim 等^[28]发现藜乙醇提取物可下调 LPS 刺激的 RAW264.7 巨噬细胞中促炎介质如 NO 和细胞因子 IL-1 β 的表达。这些结果与我们的试验结果相似。

2.5.3 IL-6 分泌量

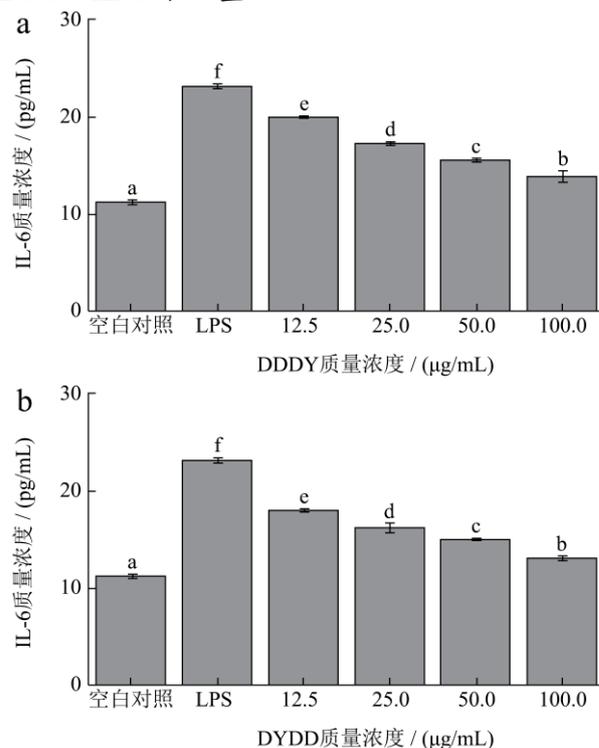


图7 不同质量浓度的 DDDY (a) 和 DYDD (b) 对 RAW264.7 细胞 IL-6 分泌量的影响

Fig.7 Effects of different concentrations of DDDY (a) and DYDD (b) on IL-6 secretion of RAW264.7 cells

IL-6 是一种重要的促炎细胞因子, 在炎症的发病机制中起重要的作用^[29]。不同质量浓度的 DDDY 和 DYDD 对 RAW264.7 细胞 IL-6 分泌量的影响如图 7 所示, LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞 24 h 后, 与空白对照组相比, LPS 处理组中 IL-6 分泌显著增加 ($p < 0.01$), 当逐渐增加 DDDY 和 DYDD 两种发酵多肽的作用质量浓度后, IL-6 分泌量降低, 并且呈依

赖性。由图 7a 可知, 经过 100 $\mu\text{g/mL}$ DDDY 处理后, 与 LPS 处理组对比, IL-6 分泌量下降 1.67 倍; 由图 7b 可知, 经过四种质量浓度的 DYDD 处理后, 与 LPS 处理组对比, IL-6 分泌量下降 1.28~1.76 倍。结果表明, DDDY 和 DYDD 能显著降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 IL-6 的分泌量, 对巨噬细胞的过度刺激有作用进而对炎症反应有作用。这与 Hong 等^[30]发现的脐带菌显著抑制 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 NO、PGE2 和 IL-6 的产生, 显著抑制 LPS 刺激的炎症反应结果相似。IL-6 作为一种促炎细胞因子, 发酵多肽处理后的 RAW264.7 细胞的分泌量变化趋势与 TNF- α 和 IL-1 β 相似, 我们猜测发酵多肽对 LPS 诱导的细胞影响与促炎因子相关基因表达受到干扰有关。

2.5.4 IL-10 分泌量

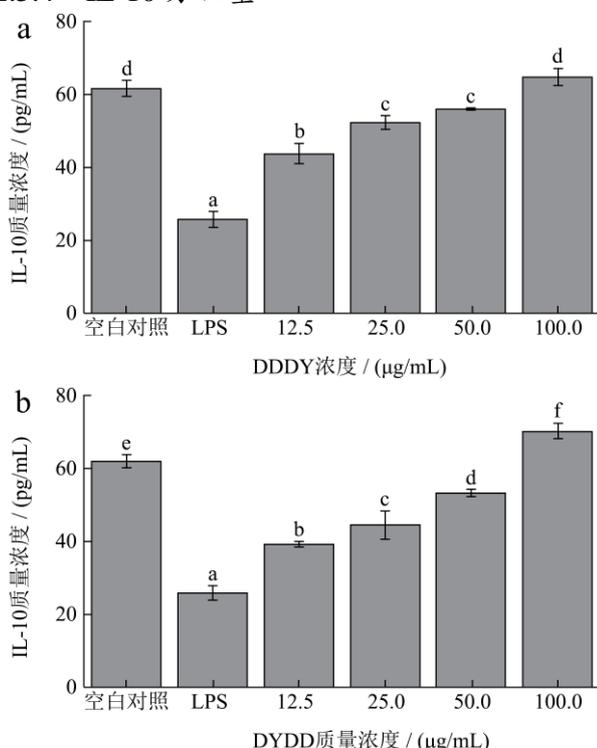


图 8 不同质量浓度的 DDDY (a) 和 DYDD (b) 对 RAW264.7 细胞 IL-10 分泌量的影响

Fig.8 Effects of different concentrations of DDDY (a) and DYDD (b) on IL-10 secretion in RAW264.7 cells

IL-10 是一种多细胞源、多功能的细胞因子, 调节细胞的生长与分化, 参与炎症反应和免疫反应, 是公认的炎症中的抑炎与免疫抑制因子^[31]。不同质量浓度的 DDDY 和 DYDD 对 RAW264.7 细胞 IL-10 分泌量的影响如图 8 所示, LPS 诱导细胞 24 h 后, IL-10 分泌量明显降低, 与空白对照组相比有显著性差异 ($p < 0.01$)。12.5、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度 DDDY 和 DYDD 作用于 LPS 诱导后的细胞, IL-10 质量浓度逐渐升高, 与 LPS 处理组相比均有显著性 ($p < 0.01$)。

由图 8a 可知, 经过 100 $\mu\text{g/mL}$ DDDY 处理后, 与 LPS 处理组对比, IL-10 含量上升到原来的 2.52 倍; 由图 8b 可知, 经过四个质量浓度的 DYDD 处理后, IL-10 分泌量为 LPS 处理组的 1.52~2.73 倍。结果表明, DDDY 和 DYDD 能显著升高 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 IL-10 的分泌量, 对炎症反应有作用。结果与 Kim 等^[32]对绿头仙鹤根提取物在 LPS 诱导炎症反应中的抗炎作用 IL-10 分泌量变化相似。

LPS 为革兰氏阴性菌产生的病原体, 具有激活巨噬细胞的作用^[33]。LPS 诱导 RAW264.7 小鼠巨噬细胞是体外抗炎研究中常用的炎症模型, 活化后的 RAW264.7 细胞的吞噬能力明显增强, 且能分泌大量生物活性物质如 NO 和多种细胞因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等^[34]; 因此, 巨噬细胞 NO 及相关细胞因子的分泌量可作为评价 DDDY 和 DYDD 是否具有激活巨噬细胞从而起到抗炎功效的试验依据。

有研究报道细胞因子如 TNF- α 和 IL-6 可通过激活 NF- κB 和 MAPK 等信号通路的关键蛋白引发炎症^[35]。本实验结果表明, 与空白对照组的 RAW264.7 细胞相比, LPS 刺激后细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的分泌量均有明显提高, 与 LPS 处理组比较, 不同质量浓度的 DDDY 和 DYDD 处理能不同程度地抑制促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的分泌。但与空白对照组相比, LPS 刺激后细胞中的抑炎因子 IL-10 质量浓度显著降低, 与 LPS 组相比, 不同质量浓度的 DDDY 和 DYDD 作用后细胞中 IL-10 的质量浓度均有显著升高。根据 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 等细胞因子含量的测定, 一定质量浓度的 DDDY 和 DYDD 处理可有效抑制 RAW264.7 细胞中促炎细胞因子的分泌, 同时促进抑炎因子的分泌, 由此缓解 LPS 诱导产生的细胞炎症反应的发生。这与胡梦君^[12]的研究结果相符。

3 结论

综上所述, 适度浓度的兜唇石斛发酵多肽 Asp-Asp-Asp-Tyr (DDDY) 和 Asp-Tyr-Asp-Asp (DYDD) 具有激活 RAW264.7 巨噬细胞、促进细胞的增殖和提高吞噬能力的功效; 通过构建 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型, 发现 DDDY 和 DYDD 可以有效抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的分化, 使细胞恢复正常形态; 并且能抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 分泌能力, 进一步对细胞炎症因子的分泌量分析, 一定质量浓度的 DDDY 和 DYDD 处理能抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中促炎因子的产生, 对抗炎因子的分泌有促进作用, 表明 DDDY 和 DYDD 对 LPS 诱

导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型有一定的抗炎作用。本研究为进一步探究发酵多肽 DDDY 和 DYDD 的抗炎机制提供了基础,后续将从基因水平和细胞信号通路关键蛋白方面予以研究。

参考文献

- [1] 陈磊.山楂酸对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的抗炎作用及其机制研究[D].太原:山西农业大学,2019
- [2] SUN Suling, ZHANG Hao, SHAN Kai, et al. Effect of different cereal peptides on the development of type 1 diabetes is associated with their anti-inflammatory ability: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2019, 63(11): e1800987
- [3] Assaad Sila, Ali Bougatef. Antioxidant peptides from marine by-products: isolation, identification and application in food systems. A review [J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 21(3): 10-26
- [4] 梁秋芳.玉米发酵多肽制备技术及其抗氧化和抗炎活性的研究[D].镇江:江苏大学,2018
- [5] 武文佳.小麦胚芽蛋白的免疫活性评价及球蛋白免疫活性肽的结构鉴定与机理研究[D].广州:华南理工大学,2017
- [6] Eslim Suguey Sandoval Sicairos, Ada Keila Milán Noris, Diego Armando Luna Vital, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of peptides released from germinated amaranth during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion [J]. *Food Chemistry*, 2020, 343(3): 128394
- [7] 李桂林.兜唇石斛种植技术[J].热带农业科技,2016,39(1):47
- [8] 刘祎帆.兜唇石斛免疫活性多糖及抗氧化肽的结构鉴定及功能表征[D].广州:华南理工大学,2018
- [9] LIU Huifan, LIANG Jiayi, XIAO Gengsheng, et al. Active sites of peptides Asp-Asp-Asp-Tyr and Asp-Tyr-Asp-Asp protect against cellular oxidative stress [J]. *Food Chemistry*, 2021, 366(4): 130626
- [10] 刘映君,李素芬,刘祎帆,等.抗菌肽 Met-Ala-Lys 对铜绿假单胞菌细胞膜的作用机制[J].现代食品科技,2019,35(6):56-63
- [11] ZHUANG Shanshan, BAO Yao, ZHANG Yaxin, et al. Antibacterial mechanism of the Asp-Asp-Asp-Tyr peptide [J]. *Food Chemistry: X*, 2022, 13(3): 100229
- [12] 胡梦君.化橘红黄酮对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的抗炎作用及其机制探究[D].武汉:华中农业大学,2017
- [13] YU Jie, XIE Jie, MAO Xiejian, et al. Hepatotoxicity of major constituents and extractions of radix polygoni multiflori and radix polygoni multiflori praeparata [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 137(3): 1291-1299
- [14] 杨海星.金银花中新绿原酸对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的抗炎作用及机制[D].西安:西北大学,2015
- [15] 陈向阳.薄荷酚类部位化学成分及抗炎活性研究[D].北京:北京中医药大学,2016
- [16] HU Xiaoyu, FU Yunhe, TIAN Yuan, et al. The anti-inflammatory effect of TR6 on LPS-induced mastitis in mice [J]. *International Immunopharmacology*, 2016, 30(12): 150-156
- [17] KONG Guiqing, HUANG Xiao, WANG Lipeng, et al. Astilbin alleviates LPS-induced ARDS by suppressing MAPK signaling pathway and protecting pulmonary endothelial glycocalyx [J]. *International Immunopharmacology*, 2016, 36(6): 51-58
- [18] 王洁.林蛙骨肉小肽的制备与结构鉴定及其对 RAW264.7 细胞的免疫调节作用[D].长春:吉林大学,2020
- [19] Anil Kumarchauhan, Rekha Jakhar, Souren Paul, et al. Potentiation of macrophage activity by thymol through augmenting phagocytosis [J]. *International Immunopharmacology*, 2014, 18(2): 20-29
- [20] CHA Sumi, CHA Jeongdan, JANG Eunjin, et al. Sophoraflavanone G prevents Streptococcus mutans surface antigen I/II-induced production of NO and PGE2 by inhibiting MAPK-mediated pathways in RAW 264.7 macrophages [J]. *Archives of Oral Biology*, 2016, 68(1): 97-104
- [21] Park Byungjun, Ei-Gamal Mohammedi, Lee Woosuck, et al. Synthesis and inhibitory effects of triarylpyrazoles on LPS-induced NO and PGE2 productions in RAW 264.7 macrophages [J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2017, 26(2): 2161-2171
- [22] Abdel-Maksoud Mohammed, El-Gamal Mohammed, El-Din Mahmoudmgamal, et al. Synthesis of new triarylpyrazole derivatives possessing terminal sulfonamide moiety and their inhibitory effects on PGE2 and nitric oxide productions in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages [J]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2556-2566
- [23] HE Rong, LIU Mengting, ZOU Zhipeng, et al. Anti-inflammatory activity of peptides derived from millet bran *in vitro* and *in vivo* [J]. *Food & Function*, 2022, 13(4): 1881-1889
- [24] XIN Shengliang, YANG Xia, ZHANG Yuping, et al. Zhikang capsule ameliorates inflammation, drives polarization to M2 macrophages, and inhibits apoptosis in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells [J]. *Current Medical Science*, 2021, 41(6): 1214-1224
- [25] CHEN Jie, LI Dongli, XIE Lingna, et al. Synergistic

- anti-inflammatory effects of silibinin and thymol combination on LPS-induced RAW264.7 cells by inhibition of NF- κ B and MAPK activation [J]. *Phytomedicine*, 2020, 78(1): 153309
- [26] YANG Li, HE Junwei. Anti-inflammatory effects of flavonoids and phenylethanoid glycosides from *Hosta plantaginea* flowers in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages through inhibition of the NF- κ B signaling pathway [J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2022, 22(1): 1-9
- [27] JI Rong, MA Lixiang, CHEN Xinyu, et al. INCB24360 suppresses M1-like macrophage formation and NLRP3 expression whereas increases IL-1 β secretion in RAW264.7 and BV-2 [J]. *Research Square*, 2020, 1(4): 1-19
- [28] Kim Chulhwan, Hwang Buyngsu, Hwang Yong, et al. Evaluation of antioxidant and antiinflammatory activity of ethanolic extracts of *Polygonum senticosum* lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages [J]. *Laboratoriums Medizin*, 2022, 46(1): 51-59
- [29] Saiki Papawee, Kawano Yasuhiro, Nakajima Yoshihiro, et al. Novel and stable dual-color IL-6 and IL-10 reporters derived from RAW 264.7 for anti-inflammation screening of natural products [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4620
- [30] Hong Jumi, Kim Jungeun, Mim Seulki, et al. Anti-inflammatory effects of antarctic lichen *Umbilicaria antarctica* methanol extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage cells and zebrafish model [J]. *BioMed Research International*, 2021, 2: 1-12
- [31] SUN Liang, LI Xin, JI Wenjie, et al. Knockdown of kruppel like factor 4 (KLF4) promotes RAW264.7 macrophages into M1 polarization [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2020, 36(9): 782-787
- [32] Kim Dasol, Kyoung Eun Park, Yeon Ju Kwak, et al. *Agrimonia pilosa* ledeb root extract: anti-inflammatory activities of the medicinal herb in LPS-induced inflammation [J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2020, 48(8): 1875-1893
- [33] WANG Zhixue, LIU Zijing, ZHOU Lijing, et al. Immunomodulatory effect of APS and PSP is mediated by Ca²⁺-cAMP and TLR4/NF- κ B signaling pathway in macrophage [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 94(Pt A): 283-289
- [34] YU Qiang, NIE Shaoping, LI Wenjuan, et al. Macrophage immunomodulatory activity of a purified polysaccharide isolated from *Ganoderma atrum* [J]. *Phytotherapy Research*, 2013, 27(2): 186-191
- [35] Gila Moalem-taylor, David Tracey. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain [J]. *Brain Research Reviews*, 2006, 51(2): 240-264