

恰麻古多糖对巨噬细胞 RAW264.7 体外免疫调节作用初探

热孜亚木·吾甫尔¹, 李月红², 海力茜·陶尔大洪*

¹新疆医科大学药学院; ²新疆医科大学第一附属医院中医科, 乌鲁木齐 830011

摘要:初步探讨恰麻古粗多糖 BRP、中性多糖 BRNP-1、BRNP-2 及酸性多糖 BRAP-1、BRAP-2 对巨噬细胞 RAW264.7 的免疫调节作用。实验方法选用 CCK-8 法检测不同质量浓度各恰麻古多糖组对巨噬细胞 RAW264.7 细胞增殖率的影响; 以中性红法观察各组恰麻古多糖对巨噬细胞 RAW264.7 吞噬活性的影响; Griess 法测定恰麻古多糖致巨噬细胞 RAW264.7 对 NO 的释放水平; 采用酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒检测细胞因子 TNF- α (肿瘤坏死因子)与 IL-6(白介素-6)分泌水平。实验结果显示不同质量浓度各恰麻古多糖组能够显著提高巨噬细胞 RAW264.7 增殖率与对中性红的吞噬活性, 并能够刺激巨噬细胞释放 NO, 且促进其 TNF- α 及 IL-6 分泌水平。通过实验, 初步验证了各恰麻古多糖具有良好的生物活性, 并对巨噬细胞 RAW264.7 具有免疫调节作用。

关键词:恰麻古; 多糖; 巨噬细胞 RAW264.7; 免疫调节

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.1.003

Immunomodulatory Effects of *Brassica rapa* L. Polysaccharides on Macrophage RAW264.7 *in vivo*

REZIYAMU wufuer¹, LI Yue-hong², HAILIQIAN taoerdahong^{1*}

¹College of Pharmacy Xinjiang Medical University;

²The first affiliated hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830011, China

Abstract: The aim of this study is to discuss the immune regularity effects of *Brassica rapa* L. polysaccharide (BRP), *Brassica rapa* L. natural polysaccharides (BRNP-1, BRNP-2) and *Brassica rapa* L. acidic polysaccharides (BRAP-1, BRAP-2) on macrophage RAW264.7. CCK-8 kit was used to detect the proliferation rate of different concentrations of polysaccharides. The phagocytosis activity was measured by toluylene red. Griess reagent was used to detect the release of NO level. ELISA kit was used to detect the secretion level of TNF- α and IL-6. The results showed that different concentrations of polysaccharides could significantly improve the proliferation rate and phagocytosis activity of macrophage RAW264.7, and it could also stimulate the RAW264.7 releasing NO, and promote the secretion of TNF- α and IL-6. This study preliminary verifies that the polysaccharides have good immune adjustment activity on macrophage RAW264.7.

Key words: *Brassica rapa* L.; polysaccharides; macrophage RAW264.7; immunomodulatory

新疆优势资源恰麻古(*Brassica rapa* L.), 学名芜菁, 为一种十字花科芸苔属芸苔种药食同源植物, 在中国新疆、西藏等高海拔地区分布广泛。恰麻古块根作为蔬菜在中国具有长时间的种植历史, 并且其块根、种子及花叶等也作为维吾尔族民间药材, 在新疆有着悠久的历史。在《维吾尔药志》中记载, 恰麻古常用于润肺、止咳平喘等疾病^[1]。研究发现, 恰麻古块根水提取物对 Lewis 小鼠具有良好的肿瘤

抑制效果^[2], 由文献可知, 恰麻古的次生代谢产物硫代葡萄糖苷能够对正常幼鼠骨形成具有促进作用^[3], 由恰麻古食用部位获得的查尔酮^[4], 其衍生物能够引起由 LPS 刺激的小胶质细胞释放 NO 水平降低。本课题组在前期研究中, 测得恰麻古中多糖含量约为 11.53%, 经过对其进行脱脂、水提取、浓缩、干燥 80% 醇沉, 以及透析后得到恰麻古中粗多糖 BRP (*Brassica rapa* L. polysaccharides), 并从 BRP 中进一步分离、纯化得到恰麻古均一多糖, 分别为中性多糖 BRNP (*Brassica rapa* L. neutral polysaccharides)、酸性多糖 BRAP (*Brassica rapa* L. acidic polysaccharides) 等。其中 BRNP 与 BRAP 分别通过柱

色谱进行分离纯化,已得出两种中性多糖 BRNP-1 与 BRNP-2,和两种酸性多糖 BRAP-1 与 BRAP-2。经结构鉴定,BRNP-1 与 BRNP-2 分子量分别为 6873 Da,4751 Da,其中 BRNP-1 是由 α -D(1 \rightarrow 4)连接的主链,其中每 8 个 α -D(1 \rightarrow 4)-葡萄糖在 O-6 位连有 1 个端基连接的 α -葡萄糖残基,经计算分支度为 0.243。同样,BRNP-2 主链亦由 α -D(1 \rightarrow 4)-葡萄糖残基组成,但每 9 个 α -D(1 \rightarrow 4)-葡萄糖在 O-6 位连有 1 个末端连接的 α -葡萄糖残基,分支度为 0.238。BRAP-1 与 BRAP-2 表观分子量分别为 6080 Da、7590 Da。其中 BRAP-1 由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖与半乳糖醛酸组成,摩尔比为 2.07:4.53:2.20:1;BRAP-2 由鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖与半乳糖醛酸组成,摩尔比为 1.06:1.5.03:2.22:1.50。本文以巨噬细胞 RAW264.7 作为研究对象,初步研究恰麻古多糖 BRP、BRNP-1、BRNP-2、BRAP-1 及 BRAP-2 对巨噬细胞 RAW 264.7 的是否具有生物活性与免疫调节作用,并为今后进一步对恰麻古免疫调节作用机制的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

RAW264.7 细胞购自中国科学院上海细胞库,冷藏于新疆医科大学一附院科技楼液氮罐中。经复苏后,于含有 10% FBS 的 DMEM 完全培养基培养。

1.1.2 药物

称取各组多糖适量,在超净台内分别用细胞培养液溶解完全至无沉淀,并用 0.22 μ m 的无菌过滤器过滤除菌,配制各组多糖质量浓度为 5 mg/mL 的母液,用完全培养基稀释成所需浓度,置于 4 $^{\circ}$ C 备用。

LPS(脂多糖)用适量 DMEM 溶解完全后,调整浓度为 10 μ g/mL,置于 4 $^{\circ}$ C 备用。

1.1.3 试剂

DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone,批号 SH30022.01);双抗(链霉素+青霉素)(美国 Hyclone,批号 SV30010);胎牛血清 FBS(美国 USA Hyclone,批号 SV30087.02);磷酸盐缓冲液 PBS(美国 Hyclone,批号 SH30256.01);胰蛋白酶(美国 Hyclone,批号 SH30042.01);脂多糖 LPS(美国 Sigma,批号 L2880);CCK-8 细胞增殖毒性测试试剂盒(中国武汉博士德生物有限公司,批号 11A05A60);肿瘤坏死因子- α TNF- α ELISA 试剂盒(中国武汉博士德

生物公司,批号 E04071);白介素-6 IL-6 ELISA 试剂盒(美国 Abcam,批号 ab100713);Griess NO 检测试剂盒(美国 Promega,批号 G1780)。

1.1.4 仪器

超净台(中国苏州安泰,型号 SW-CJ-2F);CO₂ 培养箱(美国 Thermo,型号 371);荧光倒置显微镜(日本 Olympus,型号 IX71-12FL/PH);离心机(中国上海安亭,型号 TDL-5C);酶标仪(美国 Bio-rad,型号 1510)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

将巨噬细胞 RAW264.7 接种于高糖 DMEM 完全培养液中(含有 10% FBS、100 U/mL 的链霉素和 100 U/mL 青霉素),置 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 培养箱内培养。选择对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 测定巨噬细胞 RAW264.7 增殖率

取对数生长期的巨噬细胞 RAW264.7,用胰酶消化后,经 1000 rpm 离心 5 min,吸弃上清,加入完全培养基调整细胞浓度。以 2×10^4 个/mL、100 μ L/孔,均匀铺于 96 孔板内,置 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 培养箱内培养。细胞贴壁后,吸弃孔板内上清,并分组为:A 组空白组(只含培养基);B 组对照组(含细胞与培养基);C 组实验组(为 BRP、BRNP-1、BRNP-2、BRAP-1 及 BRAP-2 各多糖组,浓度均为 15.6、31.2、62.5、125、250、500、1000 μ g/mL),各组均 5 复孔,给药后,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内分别培养 24 h、48 h,每孔加入 10 mL CCK-8 试剂,并继续孵育 1 h 后,用酶标仪在 450 nm 处,测各孔 A 值,根据其 A 值计算细胞增殖率% = $[1 - (A_{\text{实}}/A_{\text{对}})] \times 100\%$ 。注:A_实与 A_对均减去 A_空。

1.2.3 中性红法检测巨噬细胞 RAW264.7 吞噬活性

取对数期巨噬细胞 RAW264.7,以 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中,100 μ L/孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养,贴壁后弃去上清,分组为:A 组空白组(只含培养基);B 组对照组(含细胞与培养基);C 组实验组(含有细胞,为 BRP、BRNP-1、BRNP-2、BRAP-1 及 BRAP-2 各多糖组,浓度均为 15.6、31.2、62.5、125、250、500、1000 μ g/mL);D 组 LPS 对照组(含有细胞与质量浓度为 10 μ g/mL 的含 LPS 培养基),各组均设 5 复孔,给药后,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h,弃上清。各孔用 PBS 洗 1 遍后,加入 0.79% 的中性红溶液 100 μ L/孔,避

光孵育 40 min 后,弃中性红,用 PBS 洗 3 遍,每次 200 μL /孔,并甩干,加入已配好的细胞裂解液(醋酸:无水乙醇=1:1) 100 μL /孔,继续避光孵育 1 h,并于 570 nm 处测得 A 值,计算各实验组吞噬活性% = $[(A_{\text{实}}/A_{\text{对}})-1] \times 100\%$ 。注: $A_{\text{实}}$ 与 $A_{\text{对}}$ 均减去 $A_{\text{空}}$

1.2.4 Griess 法检测巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO

取对数期巨噬细胞 RAW264.7,调整浓度后,以 1×10^5 个/mL 接种于 48 孔板中,300 μL /孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱培养,贴壁后弃去上清,分组同“1.2.3”方法,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 24 h 后,收集细胞上清,1000 xg 离心 15 min,并按 Griess 试剂盒说明书进行实验操作后,于 520 nm 处测定各孔 A 值,测定 NO 释放水平。

1.2.5 ELISA 试剂盒法检测巨噬细胞 RAW264.7 释放细胞因子

取对数期巨噬细胞 RAW264.7,并调整浓度后,以 2×10^5 个/mL 接种于 48 孔板中,300 μL /孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱培养,贴壁后弃去上清,分组同“1.2.3”方法,收集细胞上清,1000 xg 离心 15 min,收集上清,并按小鼠 TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒说明书进行实验操作后,于 450 nm 处测定各孔 A 值,根据 A 值,计算 TNF- α 、IL-6 细胞因子释放水平。

1.2.6 数据统计分析

实验数据均采用 SPSS 21.0 进行统计分析,选用单因素方差齐性检验,并用 Duncan 法检验多重比较显著性,当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 巨噬细胞 RAW264.7 增殖率

与对照组相比,在质量浓度范围为 15.6 ~ 1000.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,恰麻古多糖组 BRP、BRNP-1、BRNP-2、BRAP-1 及 BRAP-2 均能提高巨噬细胞 RAW264.7 的增殖率。由图 1 可见,BRP 在 125 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,均与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$);中性多糖 BRNP-1 与 BRNP-2 在所测定范围内能够促进细胞增殖,但与对照组相比,并无显著性差异 ($P > 0.05$);酸性多糖 BRAP-1 较 BRAP-2 对细胞增殖作用更强,并在 125、250、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,与对照组具有显著性差异 ($P < 0.05$)。可见,在多糖干预 24 h 后,BRP 组对巨噬细胞增殖作用高于其余各组,且酸性多糖组较中性多糖组对巨噬细胞增殖作用更强。

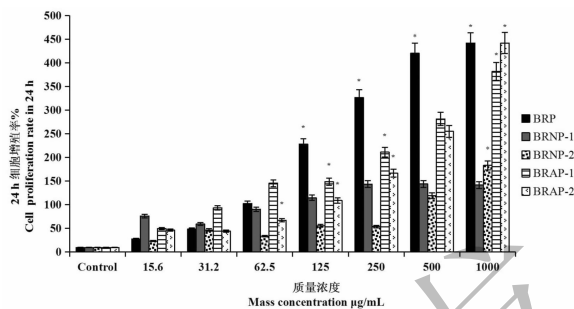


图 1 麻古多糖组作用 24 h 后对巨噬细胞 RAW264.7 增殖率的影响

Fig. 1 Impact of all BRP groups on cell proliferation rate of microphage RAW264.7 in 24 h

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

Note: * $P < 0.05$ vs Control group

由图 2 可见,在多糖干预 48 h 时,BRP 在 31.2 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其增殖作用与对照组相比,具有显著性 ($P < 0.05$),与 24 h 相比,对细胞增殖率并不明显;BRNP-1 在 31.2 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,可促进细胞增殖,且与对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$),BRNP-2 在 500 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,与对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$);BRAP-1 在 31.2 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,与对照组相比,均可显著性促进细胞增殖 ($P < 0.05$),BRAP-2 在 125 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时与对照组具有显著性差异 ($P < 0.05$)。由此可知,当多糖剂量越高,其促进细胞增殖能力越高,呈量效关系。当多糖作用 48 h 时,BRP、BRAP-1 与 BRAP-2 对巨噬细胞的增殖作用最为显著,BRNP-1 与 BRNP-2 在高浓度时增殖作用较强,但与 24 h 相比,多糖作用时间延长对巨噬细胞增殖的促进作用明显减弱。

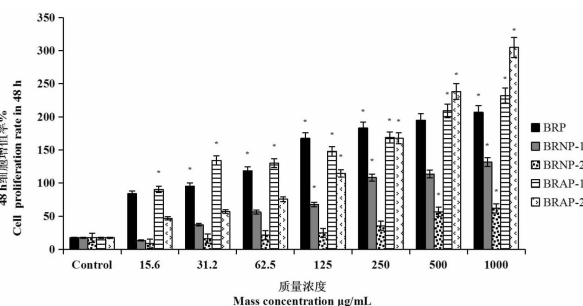


图 2 恰麻古多糖组作用 48 h 后对巨噬细胞 RAW264.7 增殖率的影响

Fig. 2 Impact of all BRP groups on cell proliferation rate of microphage RAW264.7 in 48 h

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

Note: * $P < 0.05$ vs Control group

2.2 巨噬细胞 264.7 吞噬活性

由图 3 可知, LPS 可大大提高巨噬细胞的吞噬活性, 且与对照组相比, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。其中 BRP 在 15.6 ~ 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 均能促进巨噬细胞吞噬活性, 且与 LPS 组相比较低, 具有显著性差异, 在 31.5、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 与正常对照组相比吞噬活性较高, 并具有显著性差异 ($P < 0.05$); BRNP-1 与 BRNP-2 在 15.6 ~ 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对巨噬细胞吞噬活性的影响与其他多糖相比较低, BRAP-1 及 BRAP-2 组, 在质量浓度为 15.6 ~ 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围时, 对巨噬细胞吞噬中性红的作用随多糖质量浓度的增加而加强, 且与 LPS 组具有显著性差异 ($P < 0.05$); 其中, BRP 对促进巨噬细胞吞噬活性优于其余各组。可见, 恰麻古多糖各组对巨噬细胞 RAW264.7 吞噬均有不同程度的促进作用, 并呈量效关系。

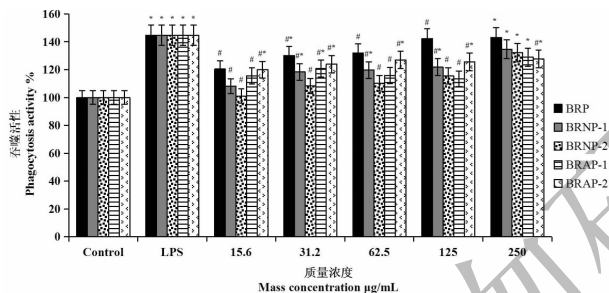


图 3 恰麻古多糖组对巨噬细胞 RAW264.7 吞噬活性的影响

Fig. 3 Impact of all BRP groups on phagocytosis activity of microphage RAW264.7

注: 与 Control 组相比, $* P < 0.05$; 与 LPS 组相比, $\# P < 0.05$; 与 Control 组、LPS 组相比, $\#\# P < 0.05$

Note: $* P < 0.05$ vs control group, $\# P < 0.05$ vs LPS group, $\#\# P < 0.05$ vs Control and LPS groups

2.3 巨噬细胞 264.7 释放 NO 水平的影响

由图 4 可知, LPS 与各多糖组在质量浓度 31.2 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 与正常组相比, 均能较好的促进巨噬细胞释放 NO, 且其释放 NO 水平随各组多糖呈剂量依赖性。其中, BRP、BRNP-1、BRNP-2 与 BRAP-2 在 31.2 ~ 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 具有显著性差异 ($P < 0.05$); 当质量浓度大于 31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, BRAP-1 与 BRAP-2 组释放 NO 水平与正常组相比, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.4 巨噬细胞 264.7 释放 TNF- α 、IL-6 水平的影响

由图 5 可知, LPS 刺激巨噬细胞释放 TNF- α 水平最高, 且在各组多糖质量浓度在 62.5 ~ 500 $\mu\text{g}/$

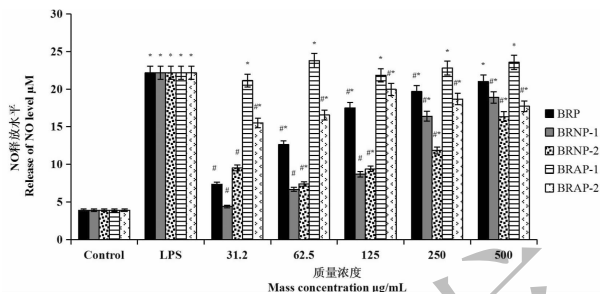


图 4 恰麻古多糖组对 RAW264.7 释放 NO 的影响

Fig. 4 Impact of all BRP groups on release of NO level of microphage RAW264.7

注: 与 Control 组相比, $* P < 0.05$; 与 LPS 组相比, $\# P < 0.05$; 与 Control 组、LPS 组相比, $\#\# P < 0.05$

Note: $* P < 0.05$ vs control group, $\# P < 0.05$ vs LPS group, $\#\# P < 0.05$ vs Control and LPS groups

mL 时, 均能促进细胞释放 TNF- α , 且与 LPS 及正常对照组相比, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。其中 BRP 在 62.5 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 促进巨噬细胞对 TNF- α 分泌作用较低, 但与正常对照组相比, 具有统计学意义 ($P < 0.05$); BRNP-1 在 62.5、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 能够较好地促进巨噬细胞释放 TNF- α , 且低于 LPS、高于正常组, 具有显著性差异 ($P < 0.05$); BRNP-2 在 62.5 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 低于 LPS 组、高于正常对照组, 但在 62.5、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 较对照组无显著性差异 ($P > 0.05$), 但随着质量浓度的增加, 其对巨噬细胞分泌 TNF- α 具有较好地促进作用, 质量浓度在 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上时, 与对照组和 LPS 组均具有显著性差异 ($P < 0.05$); BRAP-1 与在 62.5 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 高于正常对照组, 且具有显著性差异 ($P < 0.05$); BRAP-2 在 125 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 促进巨噬细胞分泌 TNF- α 水平高于正常对照组、较低于 LPS 组, 且具有显著性差异 ($P < 0.05$)。由结果可知, 各组多糖对巨噬细胞 TNF- α 分泌水平, 均呈剂量依赖性, 其中 BRAP 系列均组分多糖对促进巨噬细胞分泌 TNF- α 水平更优于 BRP、BRNP 系列。

由图 6 可知, 5 种恰麻古多糖均能较强促进巨噬细胞分泌 IL-6 的能力, 且均有剂量依赖性。其中 BRP 在 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 能够较强促进巨噬细胞分泌 IL-6; BRNP-1 与 BRNP-2 相比, 前者较强促进 IL-6 分泌, 且均具有显著性差异 ($P < 0.05$); BRAP-1 与 BRAP-2 相比, BRAP-1 促进 IL-6 分泌作用较强, 与正常对照组及 LPS 组相比, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。由结果可见, 在质量浓度 125 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

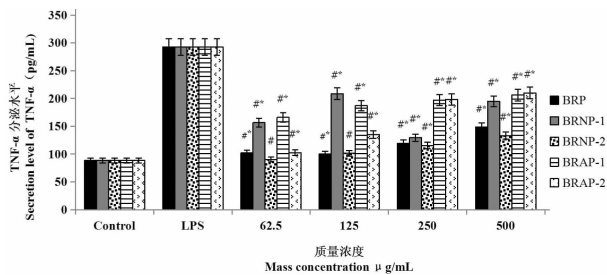


图5 恰麻古多糖组对 RAW264.7 分泌 TNF- α 的影响

Fig.5 Impact of all BRP groups on secretion level of TNF- α of microphage RAW264.7

注:与 Control 组相比, * $P < 0.05$; 与 LPS 组相比, # $P < 0.05$; 与 Control 组、LPS 组相比, ** $P < 0.05$

Note: * $P < 0.05$ vs control group, # $P < 0.05$ vs LPS group, ** $P < 0.05$ vs Control and LPS groups

时, BRP 促进巨噬细胞分泌 IL-6 的能力强于 BRNP 组、BRAP 组, 而 BRAP 组更优于 BRNP 组。

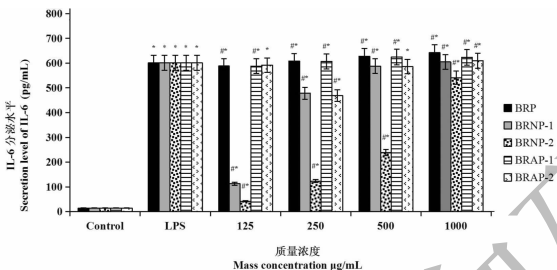


图6 恰麻古多糖对 RAW264.7 分泌 IL-6 的影响

Fig.6 Impact of all BRP groups on secretion level of IL-6 of microphage RAW264.7

注:与 Control 组相比, * $P < 0.05$; 与 LPS 组相比, # $P < 0.05$; 与 Control 组、LPS 组相比, ** $P < 0.05$

Note: * $P < 0.05$ vs control group, # $P < 0.05$ vs LPS group, ** $P < 0.05$ vs control and LPS groups

3 讨论与结论

多糖是一种具有多种生物活性的天然大分子物质,且广泛存在于各种生物体中,是构成生命四大基本物质之一,并参与机体多种生理过程^[5]。研究表明,大部分天然多糖具有抑制肿瘤生长、激活免疫相关受体和改善机体免疫功能等作用,以及低毒、安全、高效等特征,因此天然多糖化合物已成为当今新药发展研究方向之一,也不乏应用于临床上调节患者免疫功能或抗癌的实例^[6,7]。

巨噬细胞源于单核细胞,是由骨髓造血干细胞演化而来的细胞之一,也是重要的递呈细胞,它在机体免疫应答和防御机制中发挥着至关重要的作用^[8,9]。研究表明,天然多糖对巨噬细胞调节作用,

一般表现在对其增殖率、吞噬功能、以及细胞因子分泌等方面^[10]。巨噬细胞具有强大的吞噬功能,它通过将病原体等大分子抗原异物通过胞吞作用摄入细胞内,形成吞噬体,再与胞内溶酶体形成吞噬溶酶体,在多种酶的辅助下,达到杀灭和降解病原体等异物。并且其大部分的降解产物通过胞吐作用排出细胞体外,还有一部分在胞内转化为免疫原性肽段,形成复合物后被呈递给 T 细胞,启动适应性免疫反应,以此调节机体免疫功能。其中最常见细胞因子 IL-6、TNF- α 及生物活性效应分子 NO 的分泌与释放,均能使巨噬细胞有效识别肿瘤等靶细胞,达到治疗或预防癌症等目的^[11]。此外还能及时有效清除机体内不断产生的衰老、死亡或突变的细胞,维持机体内环境稳定。

本试验基于巨噬细胞 RAW264.7,初步研究恰麻古多糖对其增殖率、吞噬活性、释放 NO 水平以及分泌细胞因子 TNF- α 、IL-6 等细胞功能的影响。由结果可知,恰麻古多糖 BRP、BRNP-1、BRNP-2、BRAP-1 及 BRAP-1 均能够明显提高巨噬细胞增殖率,其中作用 24 h 时, BRP 组和 BRAP 组对巨噬细胞的增殖率提高最为明显;当作用 48 h 时,各多糖组对巨噬细胞的增殖率均有提高,但在 24 h 基础上并未明显变化,说明恰麻古多糖作用 24 h 时,其药效更好。当各多糖组的质量浓度在 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 以上时,能够较好的促进巨噬细胞吞噬活性,并与 LPS 组与(或)正常对照组均有显著性差异($P < 0.05$);其中 BRNP-2 在 15.6 ~ 125 $\mu\text{g/mL}$ 时,对巨噬细胞的吞噬活性与对照组相比无明显差异($P > 0.05$),说明 BRNP-2 较其他多糖组对巨噬细胞吞噬活性的促进作用较弱,且在高浓度时才有明显促进作用。各多糖组质量浓度在 31.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上时,均可使巨噬细胞释放 NO,释放量大于正常对照组、低于 LPS 组,且具有显著性差异($P < 0.05$)。当各组多糖质量浓度在 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上时,能够刺激巨噬细胞分泌细胞因子 TNF- α 与 IL-6,其中 BRNP-1 在 250 $\mu\text{g/mL}$ 时对巨噬细胞分泌 TNF- α 较其它浓度较低,说明 BRNP-1 在低浓度和高浓度时可刺激巨噬细胞分泌 TNF- α ; BRNP-2 在 62.5、125 $\mu\text{g/mL}$ 时,与对照组相比无显著性差异,但随浓度的增加也表现出较好的促进巨噬细胞分泌 TNF- α 作用,这或许与两种中性多糖分子量大小相关。各组多糖相比较而言,其中 BRP 组与 BRAP 组对细胞因子分泌具有较强的促进作用,且高于正常组,均有显著性差异($P < 0.05$)。

该试验表明, 恰麻古多糖对巨噬细胞 RAW264.7 通过提高其增殖率, 刺激其吞噬功能, 并促进巨噬细胞经过其胞吞胞吐作用释放和分泌 NO 和 TNF- α 、IL-6, 有效提高细胞内环境稳定, 以此参与免疫功能调节。研究表明, 当天然多糖分支度在 0.20~0.30 范围时, 能够表现出较好的生物活性; 当其分子量在适当范围时, 更易进入生物膜内部发挥生物活性, 过大或过小都不易形成活性聚合结构而发挥活性作用, 此外, 还可能与糖链连接方式及单糖组成有关^[12]。由于 BRP 为粗多糖, 其中包含多种单糖组分, 这也可能是其对巨噬细胞增殖率、吞噬活性及 IL-6 分泌等作用均高于其它多糖组分的主要原因; 目前已知 BRNP-1、BRNP-2 的分支度分别为 0.243、0.238, 分子量为 6873 Da、4751 Da, 该特点也说明了 BRNP-1 相比 BRNP-2 生物活性较好。BRAP-1 与 BRAP-2 虽在细胞增殖与吞噬活性的促进作用较弱于 BRP, 但在促进巨噬细胞释放 NO、TNF- α 及 IL-6 分泌等作用下强于其他多糖, BRAP-1 与 BRAP-2 中均含有活性单糖成分如阿拉伯糖、半乳糖和半乳糖醛酸等, 不同之处是其摩尔比与分子量, 这也能够说明酸性糖生物活性更优于中性多糖, 其中 BRAP-1 中还含有鼠李糖, 利于生物膜渗透性, 更好的发挥出生物活性^[13-15]。

恰麻古多糖作为新发现的天然多糖之一, 不仅有安全、高效、无毒副作用等特点, 还具有较好的抗氧化活性^[16], 调节机体免疫功能的信号通路及具体作用机制, 目前课题组仍在深入研究中。

参考文献

- Liu YM (刘勇民), Liu WX (刘伟新), Shawuti YKM (沙吾提·伊克木), et al. Pharmacography of Uighur part two (维吾尔药志) [M]. Xinjiang: Xinjiang Science & Technology & Hygiene Publishing House, 1999, 09: 01.
- Chen ZE (陈卓尔), Gunana D (古娜娜·对山别克), Wu Y (乌英), et al. Study on the anti tumor effect of aqueous extract from Brassica rapa L [J]. Northwest Pharm J (西北药学杂志), 2016, 31: 264-267.
- Sun Ju K, Masahiko I, Taeko M, et al. Separation and identification of glucosinolates of vegetable turnip rape by LC/APCI-MS and comparison of their contents in ten cultivars of vegetable turnip rape (L.) [J]. Soil Science & Plant Nutrition, 2001, 47: 167-177.
- Ninomiya M, Mai E, Inuzuka T, et al. Chalcone glycosides from aerial parts of Brassica rapa L. 'hidabeni', turnip [J]. Phytochemistry Letters, 2010, 3(2): 96-99.
- Liu SM (刘淑梅), Li FR (李芙蓉), Chen J (陈军). Review of biopolysaccharide extraction technology based on literature research [J]. China Food Industry (中国食品工业), 2016 (11): 62-64.
- LI F, Yuan BX, Man MI, et al. Effects of purified polysaccharides from Lily on tumor growth and immune functions of tumor-bearing mice [J]. Journal of Modern Oncology, 2008, 16: 188-189.
- Zhang Q (张庆), Xu Y (徐溢), Cao K (曹坤), et al. Research and Prospect of conjugates of polysaccharides and drugs [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics (生物化学与生物物理进展), 2017, 44: 303-315.
- Yuan XL (袁小林), Li DJ (李殿俊), Zhang CL (张春蕾), et al. The research progress on the macrophage differentiation [J]. International Journal of Immunology (国际免疫学杂志), 2008, 31: 200-204.
- Hao HH (郝慧慧), Chen Y (陈永), Lin ZJ (林志娟), et al. Effect of different polysaccharide fraction from Acanthopanax Giraldii Harms on peritoneal macrophage [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2013, 25: 612-616.
- Jun HW, Luo C. Effect of Viili exopolysaccharides on the activation, cell proliferation and cytokine production of murine macrophage cell line RAW264.7 [J]. Current Immunology, 2013, 33: 113-118.
- Cao XT (曹雪涛), Yu YZ (于益芝), Xiong SD (熊思东). Medical Immunology (医学免疫学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015: 236-250.
- Lucimara M C C, Carolina Pierobom de A, Marcello I. Unusual linear polysaccharides: (1 \rightarrow 5)- α -l-Arabinan, (1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 4)- α -d-glucan and (1 \rightarrow 4)- β -d-xylan from pulp of buriti (Mauritia flexuosa), an edible palm fruit from the Amazon region [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 141-146.
- Lucimara MCC, Vanessa de Fátima R, Marcello I. Glucomannan and branched (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6) β -glucan from the aposymbiotically grown Physcia kalbii mycobiont [J]. Phytochemistry, 2012, 84: 88-93.
- Sheng J, Sun Y. Antioxidant properties of different molecular weight polysaccharides from Athyrium multidentatum (Doll.) Ching [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 108(1): 41-45.
- Wang ZM (王兆梅), Li L (李琳), Guo QY (郭祀远), et al. Review on structure-activity relationship of active polysaccharides [J]. Modern Chemical Industry (现代化工), 2002, 22(8): 18-21.
- Wang W, Wang X, Ye H, et al. Optimization of extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from Brassica rapa L [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 979-988.