

太子参参须皂苷对 RAW 264.7 细胞体外免疫调节作用研究

曾 丽^{1†}, 陈赛红^{1†}, 甘思言²,
杜莹莹¹, 张炎达³, 黄一帆^{2*}, 马玉芳^{1*}¹ 中西兽医结合与动物保健福建省高等学校重点实验室;² 福建省兽医中药与动物保健重点实验室, 福州 350002; ³ 福建贝迪药业有限公司, 宁德 355399

摘要: 本实验旨在研究太子参参须皂苷(Radix Pseudostellariae fibrous roots saponins, RPFRS)对小鼠单核巨噬细胞(RAW 264.7 细胞)的免疫调节作用及可能的作用机制。采用脂多糖(LPS)刺激 RAW 264.7 细胞, 检测 RAW 264.7 细胞的增殖、吞噬活性、NO 产生量、相关细胞因子含量、相关免疫分子及免疫蛋白相对表达量。结果表明: 与空白对照组相比, RPFRS 组中的 RAW 264.7 细胞的吞噬活性 OD 值呈剂量依赖式上升($P < 0.01$), NO、IL-6 的含量、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 相对表达量呈剂量依赖式上升($P < 0.05$); RPFRS 的浓度为 12.5 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, IL-10、IL-1 β 、TNF- α 的含量及 IL-10、IL-1 β 、iNOS、MyD88 和 NF- κ B 的 mRNA 表达量在呈剂量依赖式上升($P < 0.05$), 但 TLR4 的 mRNA 相对表达量呈剂量依赖式降低($P < 0.05$); WB 结果显示 RPFRS 能够上调 TLR2、MyD88、TRIF 与胞核 NF- κ B 蛋白, 下调 TLR4、I κ B- α 和胞浆 NF- κ B 蛋白的相对表达量, 上述结果表明, RPFRS 可以通过提高 RAW 264.7 细胞的增殖能力、吞噬活性、分泌 NO 和细胞因子能力从而增强 RAW 264.7 细胞的免疫功能, 提示 RPFRS 可能通过 TLR2/4-MyD88/TRIF-NF- κ B 信号通路活化 RAW 264.7 细胞。

关键词: 太子参参须皂苷; RAW 264.7 细胞; 免疫调节

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)10-1657-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.10.003

Immunomodulatory effects of Radix Pseudostellariae fibrous root saponins on RAW 264.7 cells *in vitro*ZENG Li^{1†}, CHEN Sai-hong^{1†}, GAN Si-yan², DU Ying-ying¹,
ZHANG Yan-da³, HUANG Yi-fan^{2*}, MA Yu-fang^{1*}¹ University Key Laboratory for Integrated Chinese Traditional and Western Veterinary Medicine and Animal Healthcare in Fujian Province;² Fujian Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine and Animal Health, Fuzhou 350002, China;³ Fujian Bedi Pharmaceutical Co., Ltd., Ningde 355399, China

Abstract: To study the immunomodulatory effects of Radix Pseudostellariae fibrous root saponins (RPFRS) and their mechanisms, we examined the effects of RPFRS in RAW 264.7 cells on the proliferation, phagocytic activity, production of NO and cytokines, the mRNA expression of immune molecules and relevant immune protein expression levels. RAW 264.7 cells were treated with different concentrations of RPFRS. A DMEM blank control group (control group) and LPS positive group (LPS group) were set at the same time. The results showed that compared with the control group, the OD values on phagocytosis of neutral red ($P < 0.01$), the contents of NO, IL-6 and the mRNA expression levels of IL-6, TNF- α in the RPFRS groups were significantly increased in a dose-dependent manner. The contents of IL-10, IL-1 β , TNF- α and the mRNA expression levels of IL-10, IL-1 β , iNOS, MyD88 and NF- κ B increased significantly in the RPFRS groups ($P < 0.05$) when the RPFRS concentra-

收稿日期: 2022-03-07 接受日期: 2022-08-16

基金项目: 福建省产学研重大专项(2014N5004)

† 共同第一作者

* 通信作者 Tel: 86-013705057609; E-mail: myfau850@sohu.com

tion was 12.5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, but the mRNA expression of TLR4 decreased in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). At the same time, Western blotting results also showed that RPFRS can increase the expression of TLR2, MyD88, TRIF, and nuclear NF- κB protein, while the expression of TLR4, I κB - α and cytosolic NF- κB protein was decreased. Above results indicated that RPFRS could enhance the immunity of RAW 264.7 cells by increasing their proliferation capacity, phagocytic activity and the ability to secrete NO and cytokines. And the mechanism of immune recombination of RPFRS on RAW 264.7 cells might be through the TLR2/4-MyD88/TRIF-NF- κB pathway to activate RAW264.7 cells.

Key words: Radix Pseudostellariae fibrous root saponins; RAW 264.7 cells; immunomodulation

参与机体非特异性免疫的巨噬细胞是机体对抗病原的第一道防线^[1],被激活的巨噬细胞可以释放多种炎症因子和细胞因子(如 NO 和 TNF- α)参与机体免疫应答,调节免疫反应^[2]。研究表明,中药皂苷类成分能够激活巨噬细胞,增强细胞吞噬能力^[3],促进相关活性分子的分泌,上调相关蛋白的表达等^[4]。太子参须皂苷(Radix Pseudostellariae fibrous roots saponins, RPFRS)是从太子参(*Pseudostellaria heterophylla*)参须中分离出的生物活性成分之一,具有增强机体免疫、抗氧化等作用^[5,6]。现太子参以主根入药,根须则弃之不用,造成极大浪费,研究发现太子参须中总皂苷平均含量是块根中的 1.14 倍^[7]。课题组前期研究表明,以皂苷为主要成分的太子参须提取物对免疫抑制小鼠具有免疫保护作用,能够增强免疫抑制小鼠的免疫功能^[5,6]。目前单独对 RPFRS 免疫作用的研究鲜见报道,而小鼠单核巨噬细胞(RAW 264.7 细胞)常作为体外免疫活性研究的模型^[8]。故本实验以 RAW 264.7 细胞为靶细胞,通过检测 RPFRS 对其细胞增殖、细胞吞噬活性、相关细胞因子及其 mRNA 表达等免疫学指标,研究 RPFRS 体外免疫调节作用及可能的作用机制,研究旨在丰富 RPFRS 的免疫学内容,同时为太子参须的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

RAW 264.7 细胞来源于中国上海细胞库,太子参须皂苷(柘荣县所产)采取醇提法自行完成皂苷的提取,经检测可得皂苷浓度为 41.17%。DMEM 高糖培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)(凯基生物,批号:8122175、20201224);胎牛血清(Cell Max 公司,批号:HQ202003);含 0.25% EDTA 的胰酶(美国 HyClone,批号:2121203);脂多糖(LPS)、MTT、中性红(美国 Sigma 公司,批号:127M4030V、1015D0511、20190904);细胞因子试剂盒(上海邦奕生物有限公司,批号:20201008);RNAiso Plus(Takara 公司,批号:AJ31082A);ECL 化学发光显色液(Millipore 公

司,批号:R1KD49214);RIPA 蛋白裂解液,5 \times Loading buffer, β -actin,BCA 蛋白定量试剂盒(Erwanbiotech 公司,批号:20C28C08、C31151711、211090011、20200907);Protein Marker,Rabbit MyD88 抗体,兔抗 TLR4 抗体(生工生物公司,批号:00082872、00076193、00017692);NO 试剂盒,Rabbit I κB - α 抗体(碧云天公司,批号:00059607、10004008);兔抗 TLR2 抗体(博奥森公司,批号:200107);兔抗 TRIF 抗体,兔抗 NF- κB 抗体(武汉三鹰公司,批号:115106201、400001571),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 RAW 264.7 细胞的培养

RAW 264.7 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基(含双抗)配制的完全培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中传代培养,选取第 4 ~ 8 代处于对数生长期的细胞用于实验。

1.3 MTT 法测定 RAW 264.7 细胞的增殖

调整 RAW 264.7 细胞浓度为 2×10^4 个/ mL ,向 96 孔培养板中加入 100 μL /孔的细胞悬液,再加入 100 μL 不同浓度 RPFRS(终浓度为 12.5、25、50、100、200、400、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)溶液,同时设空白对照组(加 100 μL DMEM 培养液),每组设 3 个重复。完成后将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 加入 20 μL 5 mg/ mL MTT,继续培养 4 h 后取出,弃上清,于各孔加入 150 μL DMSO,避光条件下摇床混匀 5 min,在波长为 570 nm 处检测 OD 值。

1.4 中性红法检测 RAW 264.7 细胞吞噬活性

将 RAW 264.7 细胞以 2×10^4 个/孔接种在 96 孔板中,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h 后,向每个孔中加入 DMEM 培养基作为空白对照孔,LPS 作为阳性对照孔和不同浓度的 RPFRS(终浓度为 12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作为实验孔,每个浓度重复 4 个孔。将 96 孔板置于含 5% CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h 后除去培养基,加入 100 μL /孔的 0.075% 中性红并放入培养箱继续孵育 30 min。用 PBS 洗涤三次后,向每个孔中加入 150 μL

细胞裂解液(乙醇:乙酸 = 1:1),室温过夜,570 nm 处测量 OD 值。

1.5 Griess 法检测 NO 含量

收集用 0、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RPFERS 与 LPS 处理 24 h 的 RAW 264.7 细胞的培养物上清液,每组 4 个重复,取每孔 100 μL 加到 96 孔板中,根据 Griess 试剂盒说明书进行后续操作,使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度,绘制 NO 的标准曲线,计算 NO 浓度。

1.6 ELISA 法检测细胞因子含量

收集用 0、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RPFERS 与 LPS 处理 24 h 的 RAW 264.7 细胞的培养物上清液,每组 4 个重复。根据 ELISA 试剂盒说明书的步骤检测 IL-6、IL-10、IL-1 β 和 TNF- α 的含量,使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度,再按试剂盒中重组细胞因子的标准曲线计算浓度。

1.7 qRT-PCR 法检测 mRNA 相对表达量

收集用 0、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RPFERS 与 LPS 处理 6 h 的 RAW 264.7 细胞沉淀,使用 TRIzol 法提取总 RNA,加入 50 μL 的 RNase-free 水,测 RNA 浓度和纯度。调整 RNA 的浓度,按照 Takara 试剂盒说明书将 RNA 进行逆转录,qRT-PCR 按照 SYBR(Premix EX TaqTM 试剂说明书进行操作,引物序列见表 1。

1.8 免疫印迹(Western blotting)法检测蛋白表达

RAW 264.7 细胞分别用 25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 RPFERS,DMEM 培养基与 LPS 处理 1 h 后弃上清,收集细胞,加入细胞裂解液,充分裂解,离心,取上清液,按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行操作,根据被检测的蛋白相对分子量的大小,配制 5% 的上层浓缩胶以及最适宜浓度的下层分离胶,将制备好的电泳凝胶置于 5 \times 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)缓冲液中电泳(浓缩胶 80 V,分离胶 120 V),结束后将其转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)上,冰浴条件下 250 mA 恒流转膜 2 h,将 NC 膜放置于封闭液(5% 脱脂奶粉的 TBS)中,室温封闭 2 h,一抗、二抗孵育,二抗孵育结束后,将 NC 膜取出放在 TBS 里面清洗半小时,取培养皿加入等量的化学发光显色液 A 液和 B 液,混合均匀,再将 NC 膜置于其中,均匀吹打后,取出 NC 膜放置于化学发光成像仪里进行曝光。

表 1 基因及引物序列

Table 1 Gene and primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5'→3')
β -actin	F:GAGACCTCAACACCCACGCC R:AATGTCACGCACGATTTCCC
IL-6	F:CGGAGAGGAGACTTCACAGAG R:CATTTCCACGATTTCCCAGA
IL-10	F:AATAAAGTGCACCCACTTCCCA R:GCTAAAAGTGGATCATTTCGG
IL-1 β	F:GGCAACTGTTCTGAAGTCA R:TGAATTAAGAAGTGCTCA
TNF- α	F:TTGTCTACTCCAGGTTCTCT R:GAGGTTGACTTTCTCCTGGTATG
iNOS	F:CTCACCTACTTCTGGACATTAC R:GCCTCCAATCTCTGCCTATC
TLR4	F:GCACTGRRCTTCTCCTGCCT R:AGAGGTGGTGAAGCCATGC
MyD88	F:CGCGTATCTCAGTTGTGTCAGGATC R:GGAGCAGAGGATTGAATGTCAGAAGC
NF- κ B	F:GACACGACAGAATCCTCAGCATCC R:GCCACCAGCAGCAGCAGAC

1.9 数据处理

所有数据均应用 SPSS Statistics 19.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),LSD 法进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 RPFERS 对 RAW 264.7 细胞增殖的影响

RPFERS 对 RAW 264.7 细胞增殖的影响如图 1 所示:与空白对照组相比,各浓度的 RPFERS 均可显著提高 RAW 264.7 细胞的增殖作用($P < 0.05$),并且对 RAW 264.7 细胞无毒性作用。当浓度为 12.5 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可极显著提高 RAW 264.7 细胞的增殖作用($P < 0.01$),且在 RPFERS 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时作用最为明显。所以选择浓度为 12.5 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 RPFERS 进行实验。

2.2 RPFERS 对 RAW 264.7 细胞吞噬活性的影响

RPFERS 对 RAW 264.7 细胞吞噬活性的影响如图 2 所示:与空白对照组相比,LPS 与不同浓度的 RPFERS 均可极显著增强 RAW 264.7 细胞的吞噬活性($P < 0.01$),且在 RPFERS 浓度为 12.5 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时呈上升趋势。

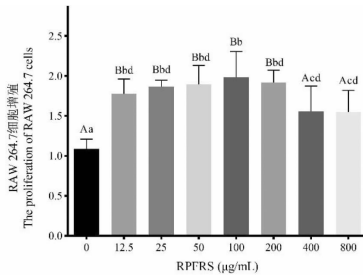


图1 RPFRS对RAW 264.7细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of RPFRS on the proliferation of RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与空白对照组相比,不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$);不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);相同字母或无字母标注表示差异不显著($P > 0.05$),下同。Note: Compared with control group, different uppercase letters indicate extremely significant difference ($P < 0.01$); different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$); the same letter or no letter mark indicates no significant difference ($P > 0.05$), the same below.

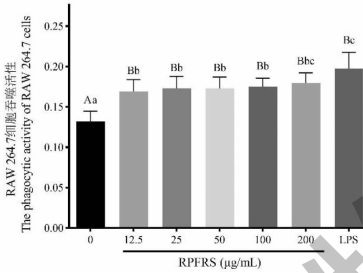


图2 RPFRS对RAW 264.7细胞吞噬活性的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 2 Effect of RPFRS on phagocytic activity of RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s, n=4$)

2.3 RPFRS对RAW 264.7细胞分泌NO含量的影响

RPFRS对RAW 264.7细胞分泌NO含量的影响如图3所示:与空白对照组相比,12.5 µg/mL与25 µg/mL的RPFRS可显著增强RAW 264.7细胞分泌NO的能力($P < 0.05$),50~200 µg/mL的RPFRS可极显著提高RAW 264.7细胞分泌NO的能力($P < 0.01$),且在RPFRS浓度为12.5~200 µg/mL时呈剂量效应关系。

2.4 RPFRS对RAW 264.7细胞培养物上清液细胞因子含量的影响

RPFRS对RAW 264.7细胞培养物上清液细胞因子含量的影响如图4所示:与空白对照组相比,25 µg/mL与50 µg/mL的RPFRS可显著增强RAW 264.7细胞分泌IL-6和TNF-α的能力($P < 0.05$),

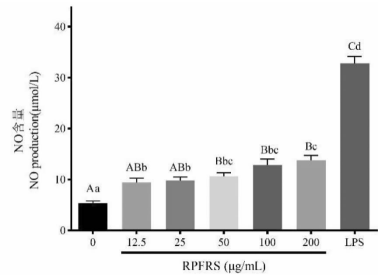


图3 RPFRS对RAW 264.7细胞分泌NO的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 3 Effect of RPFRS on NO production in RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s, n=4$)

100 µg/mL与200 µg/mL的RPFRS可极显著提高RAW 264.7细胞分泌IL-6和TNF-α的能力($P < 0.01$),且在RPFRS浓度为12.5~200 µg/mL时呈剂量效应关系(图4A、4D);25 µg/mL的RPFRS可显著增强RAW 264.7细胞分泌IL-10的能力($P < 0.05$),50~200 µg/mL的RPFRS可极显著提高RAW 264.7细胞分泌IL-10的能力($P < 0.01$),且在RPFRS浓度为12.5~100 µg/mL时呈剂量依赖性上升(图4B);12.5 µg/mL的RPFRS可显著增强RAW 264.7细胞分泌IL-1β的能力($P < 0.05$),25~200 µg/mL的RPFRS可极显著提高RAW 264.7细胞分泌IL-1β的能力($P < 0.01$),且在RPFRS浓度为12.5~100 µg/mL时呈剂量效应关系(图4C)。

2.5 RPFRS对RAW 264.7细胞iNOS的mRNA表达量的影响

RPFRS对RAW 264.7细胞iNOS的mRNA表达量的影响如图5所示:与空白对照组相比,12.5 µg/mL的RPFRS可显著提高RAW 264.7细胞iNOS的mRNA表达量($P < 0.05$),25~200 µg/mL的RPFRS可极显著提高RAW 264.7细胞iNOS的mRNA表达量($P < 0.01$),且在RPFRS浓度为12.5~100 µg/mL时呈剂量效应关系。

2.6 RPFRS对细胞因子mRNA表达量的影响

RPFRS对细胞因子mRNA表达量的影响如图6所示:与空白对照组相比,25~200 µg/mL的RPFRS可极显著提高RAW 264.7细胞IL-6的mRNA表达量($P < 0.01$),且呈剂量效应关系(见图6A);50 µg/mL的RPFRS可显著提高RAW 264.7细胞IL-10的mRNA表达量($P < 0.05$),100 µg/mL与200 µg/mL的RPFRS可极显著提高RAW 264.7细胞

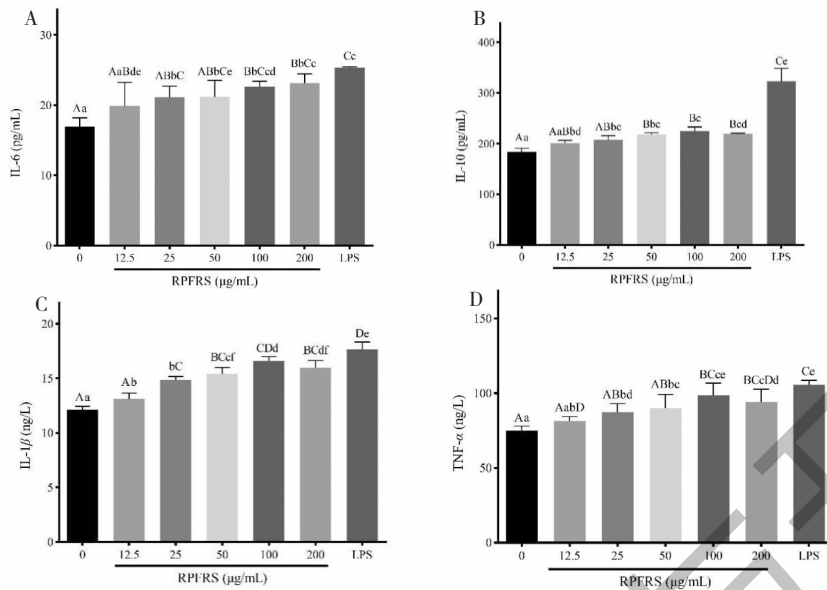


图4 RPFRS对RAW 264.7细胞培养物上清液细胞因子含量的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 4 Effect of RPFRS on cytokines production in RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s, n=4$)

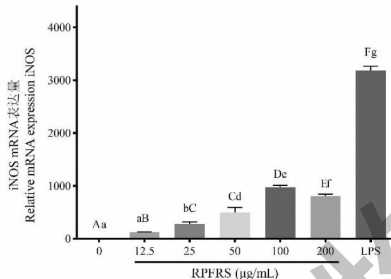


图5 RPFRS对RAW 264.7细胞分泌细胞iNOS的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 5 Effect of RPFRS on iNOS mRNA expression in RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s, n=4$)

IL-10的mRNA表达量($P < 0.01$),且在12.5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时呈剂量效应关系(见图6B);各浓度的RPFRS均可极显著提高RAW 264.7细胞IL-1 β 的mRNA表达量($P < 0.01$),且在12.5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时呈剂量效应关系(见图6C);25~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的RPFRS可极显著提高RAW 264.7细胞TNF- α 的mRNA表达量($P < 0.01$),且呈剂量-效应关系(见图6D)。

2.7 RPFRS对RAW 264.7细胞TLR4受体、MyD88及NF- κ B mRNA表达的影响

RPFRS对RAW 264.7细胞TLR4受体、MyD88及NF- κ B mRNA表达的影响如图7所示:与空白对照组相比,各浓度的RPFRS均可极显著降低RAW 264.7细胞TLR4受体mRNA的表达量($P < 0.01$),有明显的剂量依赖性;各个浓度的RPFRS均可极显

著提高RAW 264.7细胞MyD88 mRNA的表达量($P < 0.01$),且在RPFRS浓度25~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时呈剂量依赖性上升;25~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的RPFRS可极显著提高RAW 264.7细胞NF- κ B mRNA的表达量($P < 0.01$),且在RPFRS浓度12.5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时呈剂量依赖性上升。

2.8 RPFRS对RAW 264.7细胞NF- κ B相关蛋白表达量的影响

RPFRS对RAW 264.7细胞NF- κ B相关蛋白表达量的影响如图8所示:与空白对照组相比,各个浓度的RPFRS均可极显著提高RAW 264.7细胞TLR2受体和TRIF蛋白的表达量($P < 0.01$),前者在RPFRS浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到峰值,而后者在50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到峰值(见图8A、8D);各浓度的RPFRS均可降低RAW 264.7细胞TLR4受体的表达量,且在RPFRS浓度为25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到最低值(见图8B);各浓度的RPFRS均可极显著提高RAW 264.7细胞MyD88蛋白的表达量($P < 0.01$),且在RPFRS浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到峰值(见图8C),该结果与RPFRS对RAW 264.7细胞MyD88 mRNA表达量的影响的结果一致;各浓度的RPFRS均可极显著降低RAW 264.7细胞I κ B- α 蛋白的表达量($P < 0.01$),且在RPFRS浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到最低值(见图8E);RPFRS可降低胞浆NF- κ B的表达量($P < 0.01$),并且提高胞核的NF- κ B的表达量($P < 0.01$),且呈剂量依赖性下降和上升(见图8F、8G)。

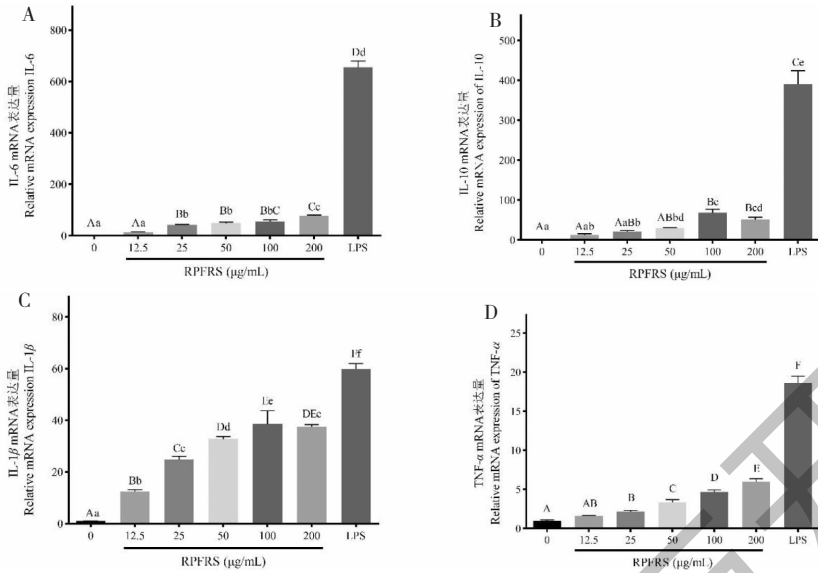


图6 RPFRS对RAW 264.7细胞的细胞因子 mRNA 表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig.6 Effect of RPFRS on cytokines mRNA expression in RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s, n = 4$)

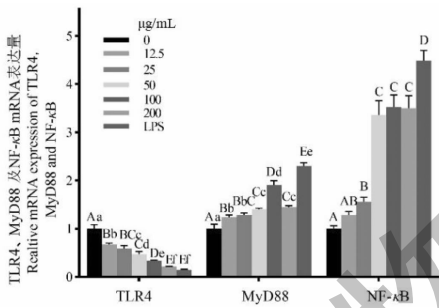


图7 RPFRS对RAW 264.7细胞TLR4受体、MyD88及NF-κB mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig.7 Effect of RPFRS on TLR4, MyD88 and NF-κB mRNA expression in RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3 讨论与结论

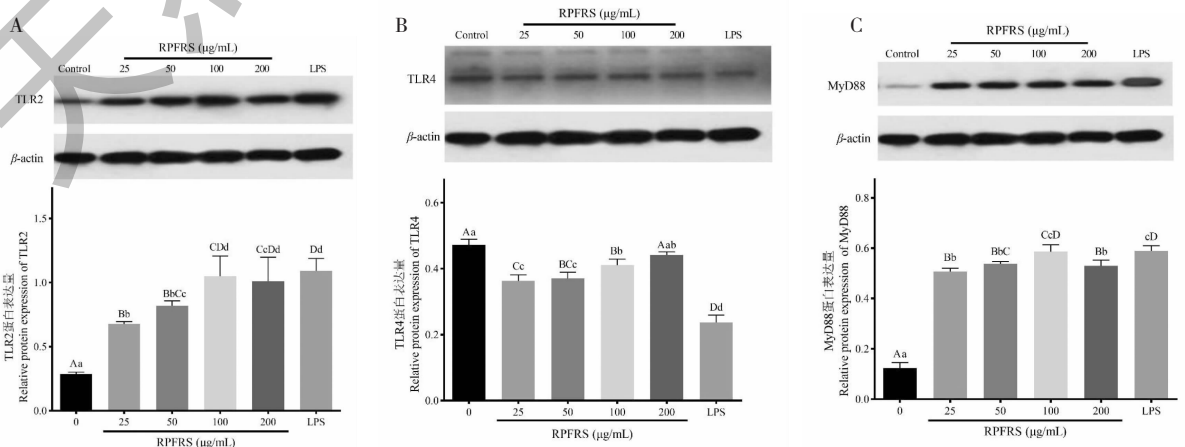
3.1 RPFRS对RAW 264.7细胞增殖的影响

皂苷有一定的溶血性和毒性,且比其他植物提

取物具有更低的中毒剂量,因此在使用时需注意剂量^[9]。为确定RPFRS对RAW 264.7细胞是否具有毒性作用并筛选用于实验的RPFRS的最佳浓度,经MTT法测定不同浓度的RPFRS对RAW 264.7细胞增殖作用的影响,本实验结果显示在12.5~800 μg/mL的浓度范围内RPFRS可极显著促进RAW 264.7细胞的增殖($P < 0.01$),且在12.5~100 μg/mL时呈剂量效应关系,故选择12.5~200 μg/mL的浓度进行后续实验。

3.2 RPFRS对RAW 264.7细胞吞噬活性的影响

吞噬是巨噬细胞的主要功能之一,在非特异性免疫中巨噬细胞可以通过吞噬作用杀死或消化细胞内的病原体或者机体的死亡细胞以及其他大颗粒抗原,而在特异性免疫中,它能够发挥免疫调节及抗原递呈作用^[10]。有研究报道,桔梗皂苷D^[11]和球兰



续图8(Continued Fig.8)

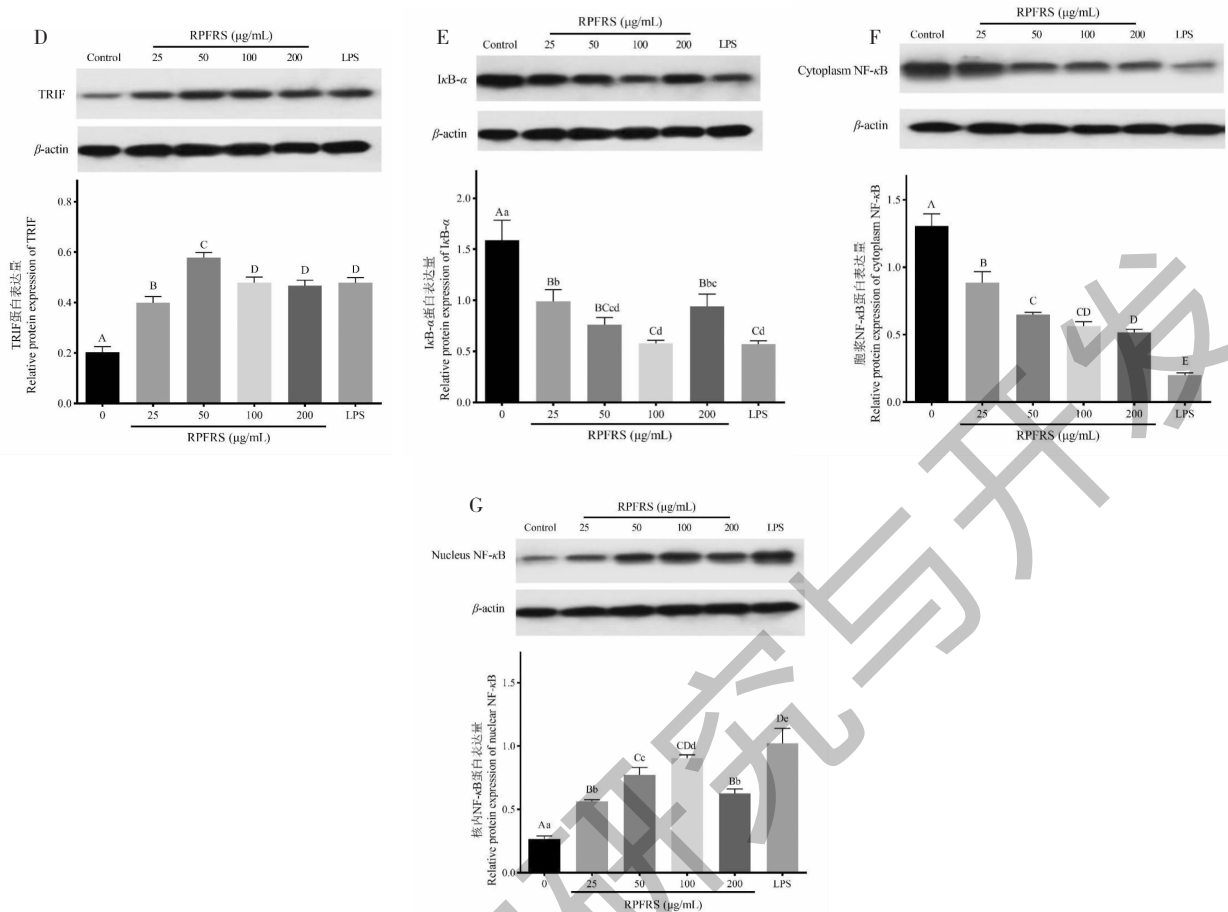


图8 RPFRS对RAW 264.7细胞相关蛋白表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 8 Effect of RPFRS on protein expression of RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

皂苷^[12]都可提高小鼠巨噬细胞的吞噬能力。与前人研究一致,本实验结果表明,RPFRS可以在浓度为12.5~200 μg/mL下以剂量依赖的方式增大RAW 264.7细胞吞噬中性红实验的OD值($P < 0.01$),说明RPFRS可以增强RAW 264.7细胞的吞噬活性,增强其免疫功能。

3.3 RPFRS对RAW 264.7细胞分泌NO和iNOS mRNA表达的影响

巨噬细胞可通过引起免疫-炎症反应消灭病原体,也可辅助机体进行特异性免疫应答调节机体免疫,而由一氧化氮合酶(iNOS)合成的NO则与其发挥炎症-免疫反应功能密切相关^[13]。Yang等^[13]研究发现太子参蛋白水解物可促进RAW 264.7细胞分泌NO和TNF-α活化巨噬细胞,增强其免疫活性。本实验结果表明,与空白对照组相比,RPFRS可以显著提高RAW 264.7细胞上清液中NO的含量($P < 0.05$),同时,RAW 264.7细胞中的iNOS表达量也极显著提高($P < 0.01$),二者都呈剂量依赖式上

升。这结果与Li等^[14]研究发现的黄芪甲苷IV可提高RAW 264.7细胞上清液NO和细胞iNOS mRNA表达的结果一致。

3.4 RPFRS对RAW 264.7细胞分泌的细胞因子及其mRNA表达的影响

细胞因子,如IL-6、IL-10、IL-1β以及TNF-α主要在局部及全身炎症反应中发挥作用。IL-6可诱导B淋巴细胞前体成为抗体分泌细胞^[15]。IL-10作为抗炎因子可抑制巨噬细胞活性和IL-6、TNF-α等炎性细胞因子^[16]。IL-1β可促使巨噬细胞和中性粒细胞活化及脱颗粒,促进其他炎性因子表达^[17]。TNF-α是巨噬细胞对各种刺激反应产生的主要促炎细胞因子,可以促进如IL-6和IL-8等的分泌^[18]。Sun等^[19]研究发现大豆皂甙Ab能够提高RAW 264.7细胞上清液中TNF-α和IL-1β的含量。Li等^[14]研究发现黄芪甲苷IV可以提高RAW 264.7细胞上清液中IL-6、IL-1β和TNF-α的含量及其mRNA的表达。本研究结果显示:与空白对照组相比,RPFRS

可剂量依赖式提高 RAW 264.7 细胞上清液中 IL-6、IL-10、IL-1 β 和 TNF- α 的含量,且 RPFRS 对 RAW 264.7 细胞中 IL-6、IL-10、IL-1 β 以及 TNF- α 的 mRNA 表达量也有不同程度提高,说明 RPFRS 可通过刺激 RAW 264.7 细胞分泌细胞因子进而对其免疫功能起到调节作用。

3.5 RPFRS 对 RAW 264.7 细胞 NF- κ B 通路相关蛋白表达的影响

NF- κ B 作为核转录因子,可激活早期防御反应有关的多种基因的表达,从而调控细胞凋亡、免疫应答、炎症和组织重塑等生理过程^[20]。而 NF- κ B 信号通路的激活受多种信号分子刺激,TLR2 和 TLR4 作为模式识别受体家族的成员能在巨噬细胞、B 细胞、DC 细胞表面高表达,且能监视识别疾病相关分子模式而启动信号通路的信号转导^[21],后者还可刺激 MyD88 触发信号级联诱导 NF- κ B 激活^[22]。MyD88 与 TRIF 在胞质内与 TLR 结合蛋白结合,在泛素的作用下激活 MAPK 通路还可以促进 I κ B- α 磷酸化激活 NF- κ B 通路,并调节下游基因的表达^[23]。He 等^[24]研究发现经不同剂量的桔梗总皂苷干预后,胶原性关节炎大鼠踝关节滑膜组织中的 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 含量降低,同时 TLR2、TLR4、MyD88 等蛋白水平降低。Shin 等^[25]研究经热处理后的人参皂苷 Rg₁ 和 Rg₃,能够促进 RAW 264.7 细胞分泌 IL-6 和 TNF- α ,并且能够促进 MAPK 的磷酸化和 I κ B- α 的降解激活 NF- κ B 传导途径。本实验结果显示,在 RPFRS 的作用下,RAW 264.7 细胞的 TLR4 的 mRNA 表达降低,而 MyD88 和 NF- κ B 的 mRNA 表达则升高;与之相符,WB 的结果显示 TLR4、I κ B- α 和胞浆 NF- κ B 蛋白表达降低,TLR2、MyD88、TRIF 和胞核 NF- κ B 蛋白表达升高,提示 NF- κ B 从胞浆转位至胞核。而 NF- κ B 通路被激活后又可反作用于促炎细胞因子介导其转录诱导^[26],这也与上述细胞因子含量及 mRNA 表达的结果相对应,说明 RPFRS 可以通过 TLR2、TLR4 介导的 TRIF/MyD88-NF- κ B 转导途径激活 RAW 264.7 细胞。

RPFRS 可以促进 RAW 264.7 细胞的增殖、增强吞噬活性、提高相关细胞因子含量和 mRNA 表达量,下调 TLR4 的 mRNA 表达,上调 TLR2、MyD88、TRIF、胞核 NF- κ B 蛋白的表达,下调 TLR4、I κ B- α 及胞浆 NF- κ B 蛋白的表达,并呈一定的剂量效应。提示 RPFRS 可通过抑制 LPS 对 TLR4 的刺激作用而起免疫保护作用,也可能通过 TLR2/4-MyD88/TRIF-NF- κ B 信号通路活化 RAW 264.7 细胞,参与

免疫应答过程,发挥免疫调节作用。而 RPFRS 对 RAW 264.7 细胞免疫调节的其他信号通路及其各组分与免疫活性之间的关系有待进一步深入研究。

参考文献

- Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential [J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6: 330-333.
- Batatinha HAP, Biondo LA, Lira FS, et al. Nutrients, immune system, and exercise: where will it take us? [J]. *Nutrition*, 2019, 61: 151-156.
- Shen Y, Chen SX, Feng GZ, et al. Preliminary observation of dual regulatory effects of geniposide on pinocytosis and phagocytosis of RAW 264.7 cells [J]. *J Nanjing Med Univ: Nat Sci (南京医科大学学报: 自科版)*, 2019, 39: 1426-1429.
- Zhou LJ, Liu ZJ, Wang ZX, et al. Astragalus polysaccharides exerts immunomodulatory effects via TLR4-mediated MyD88-dependent signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44822.
- Yi WM, Chen SH, Min SM, et al. Study on the immunoprotective effects of Radix Pseudostellariae fibrous root extraction in immunosuppressed mice [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2020, 32: 837-844.
- Gan SY, Yi WM, Qiao S, et al. Effect of extract from the fibrous root of Radix Pseudostellariae on the serum immune and antioxidant indexes in immunosuppressed mice [J]. *Anim Husb Vet Med (畜牧与兽医)*, 2020, 52: 121-124.
- Ding CH, Lin PL, Zeng JW, et al. Determination of polysaccharides and total saponins in root tuber and fibrous root of pseudostellaria heterophylla [J]. *J Fujian Tradit Chin Med (福建中医药大学学报)*, 2012, 22: 40-43.
- Wu J, Hu JW, Xiong W, et al. Immunomodulatory effect of polysaccharide isolated from *Cinamomum camphora* fruits on macrophage RAW 264.7 [J]. *Mod Food Sci Technol (现代食品科技)*, 2018, 34: 12-18.
- Wang LC, Ruan ZT, Liu CG, et al. Review of plant extracts on poultry immunity [J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med (黑龙江畜牧兽医)*, 2020: 32-36.
- Wen Y, Peng D, Li CL, et al. A new polysaccharide isolated from morchella importuna fruiting bodies and its immunoregulatory mechanism [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 137: 8-19.
- Li JS, Feng HH, Wang M, et al. Effect of platycodin D on lymphocyte and macrophage immune function of mice [J]. *J Northwest A & F Univ: Nat Sci (西北农林科技大学学报: 自科版)*, 2019, 47: 39-44.
- Chen YJ, Huang ZJ, Jiang HJ. Effects of hoyo saponins on immune function and antioxidation activity of mouse perito-

- neal macrophages[J]. *Acta Vet Zootech Sin* (畜牧兽医学报), 2013, 44:1838-1843.
- 13 Yang Q, Huang M, Cai X, et al. Investigation on activation in RAW 264.7 macrophage cells and protection in cyclophosphamide-treated mice of *Pseudostellaria heterophylla* protein hydrolysate[J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 134:110816.
- 14 Li Y, Meng TT, Hao N, et al. Immune regulation mechanism of Astragaloside IV on RAW 264.7 cells through activating the NF- κ B/MAPK signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49:38-49.
- 15 Zhang M, Tian X, Wang Y, et al. Immunomodulating activity of the polysaccharide TLH-3 from *Tricholoma lobayense* in RAW 264.7 macrophages [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107:2679-2685.
- 16 Johnson JL, Jones MB, Cobb BA. Polysaccharide-experienced effector T cells induce IL-10 in FoxP3⁺ regulatory T cells to prevent pulmonary inflammation [J]. *Glycobiology*, 2018, 28:50-58.
- 17 Zhao H, Lv P, Hou L, et al. Effects of Wumei on interleukin-1 β , phosphorylase nuclear factor- κ B and forkhead transcription factor 3 in rats with immune colitis [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2019, 42:947-953.
- 18 Yao J, Du X, Chen S, et al. Rv2346c enhances mycobacterial survival within macrophages by inhibiting TNF- α and IL-6 production via the p38/miRNA/NF- κ B pathway [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7:158.
- 19 Sun T, Yan X, Guo W, et al. Evaluation of cytotoxicity and immune modulatory activities of soyasaponin Ab: an *in vitro* and *in vivo* study [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21:1759-1766.
- 20 Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8:49-62.
- 21 Atkin-smith GK, Duan M, Chen W, et al. The induction and consequences of influenza A virus-induced cell death [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9:1002.
- 22 Chamanara M, Rashidian A, Mehr SE, et al. Melatonin ameliorates TNBS-induced colitis in rats through the melatonin receptors: involvement of TLR4/MyD88/NF- κ B signalling pathway [J]. *Inflammopharmacology*, 2019, 27:361-371.
- 23 Luo T, Qin J, Liu M, et al. Astragalus polysaccharide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in microglial cells: regulation of protein kinase B and nuclear factor- κ B signaling [J]. *Inflamm Res*, 2015, 64:205-212.
- 24 He XL, Zhong XG, Gong JM, et al. Anti-inflammatory effect of *Platycodon grandiflorum* saponins on collagen induced arthritis rats and its effect on TLR/MyD66/NF- κ B [J]. *Chin J Neuroimmunol Neurol* (中国免疫学杂志), 2021, 37:931-935.
- 25 Shin MS, Song JH, Choi P, et al. Stimulation of innate immune function by panax ginseng after heat processing [J]. *J Agr Food Chem*, 2018, 66:4652-4659.
- 26 Brunaker SW, Bonham KS, Zanoni I, et al. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective [J]. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33:257-290.