

姬松茸多糖诱导巨噬细胞释放 NO 的机制

Mechanism of *Agaricus brasiliensis* polysaccharides inducing the NO release in macrophages

房雷雷^{1,2} 赵肖通¹ 张彦青^{1,2} 解军波^{1,2}

FANG Lei-lei^{1,2} ZHAO Xiao-tong¹ ZHANG Yan-qing^{1,2} XIE Jun-bo^{1,2}

(1. 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134; 2. 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300134)

(1. School of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China;

2. Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, Tianjin 300134, China)

摘要:以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为研究对象,研究姬松茸多糖对其 NO 释放和 iNOS 表达的作用,并通过检测 I κ B α 蛋白磷酸化水平的变化来探究姬松茸多糖诱导巨噬细胞释放 NO 的分子机制。结果表明,姬松茸多糖可剂量依赖性增强 RAW264.7 细胞 NO 的释放与 iNOS 蛋白的表达,且两者趋势一致。此外,25 μ g/mL 姬松茸多糖能够增强 RAW264.7 细胞中 p-I κ B α 蛋白的表达量,且在 45 min 时达到最高,证明其能够激活 NF- κ B 信号转导通路。综上,姬松茸多糖通过 NF- κ B 途径上调巨噬细胞 iNOS 的表达,进而促进 NO 释放。

关键词:姬松茸多糖;RAW264.7 细胞;NO;iNOS;NF- κ B

Abstract: In this study, macrophage RAW264.7 cells were used to study the effect of *Agaricus brasiliensis* polysaccharide on NO release and iNOS expression, and the phosphorylation level of I κ B α protein was detected to explore its mechanisms. All the studies in the present paper could provide a new theoretical basis for the development of *A. brasiliensis* polysaccharide. The results showed that different concentrations of the polysaccharides enhanced the NO release and the expression of iNOS protein in RAW264.7 cells in the same dose-dependent manner. In addition, *A. brasiliensis* polysaccharide at 25 μ g/mL promoted the expression of p-I κ B α protein in RAW264.7 cells, and the highest expression was in 45 min (0 ~ 60 min), demonstrating that it could activate NF- κ B signal transduction pathway. In conclusion, *A. brasiliensis* polysaccharides enhanced the release of NO in macrophages through up-regulating the iNOS expression by NF- κ B pathway.

Keywords: *Agaricus Brasiliensis* polysaccharide; RAW264.7 cells;

基金项目:2015 年天津市“131”创新型人才培养工程第一层次人才计划项目

作者简介:房雷雷,女,天津商业大学助理实验师,硕士。

通信作者:解军波(1975—),男,天津商业大学教授,博士。

E-mail: xjbo@tjcu.edu.cn

收稿日期:2018-01-23

NO; iNOS; NF- κ B

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种新型生物信息传递分子,可由单核巨噬细胞 RAW264.7 等产生,在免疫、循环、呼吸、神经等系统中发挥重要作用,已成为当代生物学研究的一大热点^[1]。试验证明,真菌多糖具有较强的免疫活性,且大多数真菌多糖能够增强机体免疫力^[2-4],其中重要途径之一是促进巨噬细胞产生细胞因子和免疫活性物质(如 NO 等)^[5-7]。

姬松茸(*Agaricus brasiliensis*)别名巴西蘑菇、小松菇、柏氏蘑菇,属担子菌亚门,层菌纲,伞菌目,蘑菇科,蘑菇属,为现今世界上可人工栽培的珍稀药食兼用菌之一^[7]。研究^[8]发现姬松茸对免疫系统有重要的调节作用,对非特异性免疫、特异性免疫和细胞免疫体系均有增强作用。在姬松茸的免疫调节作用中,姬松茸的多糖成分为主要活性成分,且大量文献^[9-10]证明姬松茸多糖能在多条途径和多个层面显示免疫活性。

姬松茸多糖免疫调节作用的相关研究大多集中于具体表征而非探究其机制,且多以小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 建立细胞模型,一些研究结果已经表明姬松茸多糖能够促进巨噬细胞增值、释放 NO 和分泌肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ -干扰素(Interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素 1(Interleukin-1- β , IL-1 β)与白细胞介素 8(Interleukin-8, IL-8)等^[11-13]。本试验拟建立小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞模型,分析姬松茸多糖对巨噬细胞 NO 释放与诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达的影响,同时研究其对 NF- κ B 抑制蛋白(I κ B α)磷酸化水平的影响,从姬松茸多糖影响 NF- κ B 信号传导途径的角度出发,深入探讨姬松茸多糖诱导巨噬细胞释放 NO 的机制,以期期为开发姬松茸多糖提供新的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

姬松茸多糖样品:多糖含量为 99%,实验室自制;

脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS):美国 Sigma 公司;

全蛋白提取试剂盒:上海生工生物工程股份有限公司;

DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)培养基、胎牛血清(FBS)、青链霉素:美国 Gibco 公司;

山羊 p-I κ B α 抗体:美国 Santa Cruz 公司;

BCA 蛋白浓度测定试剂盒:北京索莱宝科技有限公司;

兔 iNOS、(HRP)-共轭抗山羊二抗抗体:美国 Thermo 公司;

兔 β -actin 抗体、抗兔二抗抗体:北京博奥森生物技术有 限公司。

1.2 仪器与设备

电子分析天平:BP211D 型,德国 Sartorius 公司;

超纯水系统:Milli-Q 型,美国 Millipore 公司;

多功能酶标仪:SpectraMax[®] M3 型,美国 Molecular Devices 公司。

1.3 溶液配制

DMEM 完全培养液:分别向 DMEM 培养基中加入终浓度为 10%和 1%的胎牛血清和青链霉素双抗,保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中;

亚硝酸钠溶液:称取适量亚硝酸钠,并用 DMEM 完全培养液溶解,溶解完全后配制成终浓度为 1 mmol/L 亚硝酸钠储备液,并稀释成 5,10,25,50,75,100 μ mol/L,于 4 $^{\circ}$ C 冷藏备用;

Griess 溶液:称取适量 Griess 试剂并溶于 250 mL 蒸馏水中,配制成浓度为 40 mg/mL 的溶液,0.22 μ m 微孔滤器过滤除菌,分装,放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱避光保存;

LPS 溶液配制:称取 LPS 脂多糖标准品粉末,加入 DMEM 完全培养液溶解,溶解后混匀,得到终浓度为 1 μ g/mL 的 LPS 溶液,过滤除菌,冷藏备用;

姬松茸多糖溶液配制:精密称取姬松茸多糖样品 10 mg,将样品置于 10 mL 的容量瓶中,用 DMEM 完全培养液稀释并定容,制得 1 mg/mL 的姬松茸多糖储备液,配制成不同浓度溶液(6.25,12.50,25.00,50.00 μ g/mL),过滤后冷藏。

1.4 方 法

1.4.1 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 的培养 培养基为 DMEM 完全培养液,细胞放置于 10 cm 的细胞培养皿中,于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱,通入 5% CO₂ 中培养(相对湿度 90%)。细胞每隔 1~2 d 传代一次,试验接种细胞为对数生长期细胞。

1.4.2 RAW264.7 细胞释放 NO 的测定 运用 Griess 试剂测定 NO 的释放量,研究姬松茸多糖对巨噬细胞 NO 释放作用的影响。

(1) NO 标准曲线的测定:取 75 μ L 不同浓度(0,5,10,25,50,75,100 μ mol/L)的亚硝酸钠置于 96 孔板,每孔再加入 75 μ L Griess 溶液,混匀后静置 3 min 后,采用酶标仪检测

540 nm 处吸光度。

(2) 将培养的 RAW264.7 细胞悬液(5×10^5 个/mL)以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板,并培养 24 h。然后,用姬松茸多糖样品处理 2 组细胞:一组是将细胞在 1 μ g/mL LPS 和姬松茸多糖溶液(浓度分别为 0.00,6.25,12.50,25.00,50.00 μ g/mL)下培养 24 h;一组是将 25 μ g/mL 的姬松茸多糖溶液加入细胞后分别培养 2,4,6,8,10,12,16,24,30,36 h。而后,吸取 75 μ L 上清液于新 96 孔板中,并添加 Griess 溶液、混匀、静置,而后测定吸光度,并根据标准曲线计算得到 NO 浓度。

1.4.3 RAW264.7 细胞 iNOS 表达的测定 收集已加入 0.00,6.25,12.50,25.00,50.00 μ g/mL 姬松茸多糖溶液培养 24 h 的巨噬细胞,采用全蛋白提取试剂盒提取 RAW264.7 细胞全蛋白,并选用 BCA 试剂盒检测其蛋白含量。蛋白质免疫印迹法(Western Blot, WB)^[14]测定 iNOS 的表达量(β -actin 为参比蛋白),而后采用凝胶成像系统处理胶片,并运用 Quantity One 软件分析试验结果。WB 试验选用抗体为:兔 iNOS、兔 β -actin 抗体、抗兔二抗抗体。

1.4.4 RAW264.7 细胞 p-I κ B α 蛋白表达的测定 采用 WB 法测定,姬松茸多糖浓度为 25 μ g/mL,姬松茸多糖作用巨噬细胞时间为 0,15,30,45,60 min,所选用抗体为山羊 p-I κ B α 抗体与(HRP)-共轭抗山羊二抗抗体,其他试验步骤同 1.4.3。

1.4.5 数据处理 上述所有试验均重复 6 次,数据用“平均值 \pm SD”表示,数据统计分析采用 SPSS 软件,并选用单因素方差分析(ANOVA)中 LSD 最小显著差法检验组间差异性。所有图像采用 Microsoft Office Excel 2007 软件进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 姬松茸多糖诱导 RAW264.7 细胞释放 NO

采用 Griess 法对巨噬细胞 NO 释放量进行检测,并以各浓度亚硝酸钠为底物,利用 Griess 试剂测定吸光度值,得 NO 标准曲线为 $y=0.018x+0.010$ ($R^2=0.999$)。

通过亚硝酸钠标准曲线计算得到各组 NO 浓度,结果见图 1。由图 1(a)可知,25 μ g/mL 姬松茸多糖作用 RAW264.7 细胞 36 h 内,NO 浓度随作用时间的延长而逐渐增加,具有较强的时效性。图 1(b)表明,与空白对照组相比,6.25,12.50,25.00,50.00 μ g/mL 姬松茸多糖作用 24 h 后,RAW264.7 细胞 NO 释放量极显著增大($P<0.01$),且作用效果随剂量的增大而增强。以姬松茸多糖浓度为 x 值,以 NO 浓度为 y 值进行线性分析,得到回归方程为 $y=0.1302x+2.35$,判定系数 R^2 为 0.7366,表明姬松茸多糖对 NO 释放的影响具有一定程度的线性关系。综上表明,姬松茸多糖能够诱导 RAW264.7 细胞释放 NO,且具有一定的时效性和剂量依赖性。

研究^[15]表明,NO 的释放是巨噬细胞的非特异性免疫——一种重要的机体防御过程的重要环节,当受到如肿瘤细胞、病原体及微生物等刺激时,巨噬细胞被活化并产生一系列的效应分子,NO 便是其中之一。一方面,NO 被作为巨

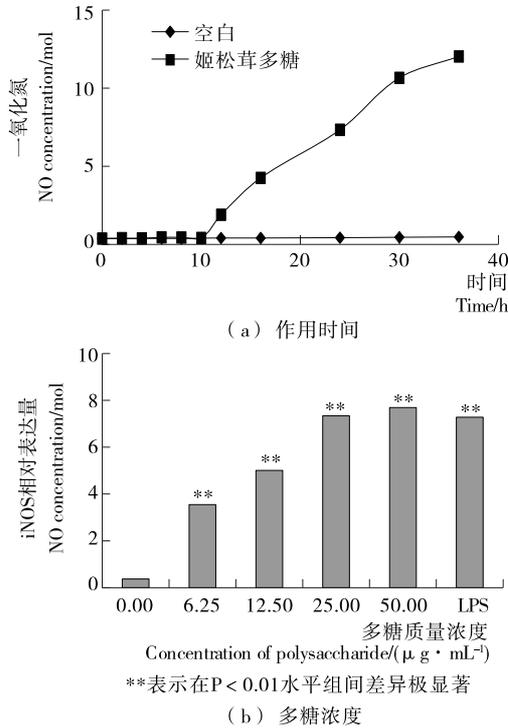


图 1 姬松茸多糖对巨噬细胞释放 NO 作用的影响

Figure 1 The effects of *Agaricus brasiliensis* polysaccharide on NO production in RAW264.7 cells

噬细胞发挥杀伤靶细胞的重要信使分子,通过细胞间信息交换载体功能发挥免疫调节作用;另一方面,NO 对巨噬细胞吞噬的各类肿瘤细胞与微生物等具有细胞毒性^[16]。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁外膜的主要成分,能够诱导巨噬细胞释放 NO 等多种因子参与免疫反应^[17]。本试验结果显示姬松茸多糖作用后能够显著促进 RAW264.7 细胞释放 NO,与相关文献^[11-12]报道姬松茸多糖对巨噬细胞 NO 生成的试验结果相一致,说明姬松茸多糖对巨噬细胞的免疫活性有正向的促进作用。可见,姬松茸多糖能够通过增加巨噬细胞 NO 的释放而调节机体的免疫反应。

2.2 姬松茸多糖对 RAW264.7 细胞 iNOS 表达水平的影响

iNOS 催化 L-精氨酸生成 NO,是哺乳动物体内 NO 合成的唯一途径^[18],故本研究选用 Western Blot 法进一步检测姬松茸多糖对巨噬细胞 iNOS 表达量的影响,以 β -actin 为内参蛋白。由图 2 可知,与空白对照组相比,不同浓度姬松茸多糖(0.00,6.25,12.50,25.00,50.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作用 24 h 后,能够明显增强 RAW264.7 细胞中 iNOS 的表达水平($P < 0.01$)。线性分析得回归方程为 $y = 0.106 4x + 3.052 3$,判定系数 $R^2 = 0.649 1$,证明不同浓度姬松茸多糖作用后,对 RAW264.7 细胞 iNOS 表达水平的影响有一定的剂量依赖性。说明姬松茸多糖能够显著诱导巨噬细胞合成 iNOS,且呈现剂量依赖性。

此外,iNOS 表达量与 NO 释放量的量效关系呈现一致的趋势,进一步验证了姬松茸多糖能够诱导 RAW264.7 细胞表达 iNOS 蛋白进而大量释放 NO。

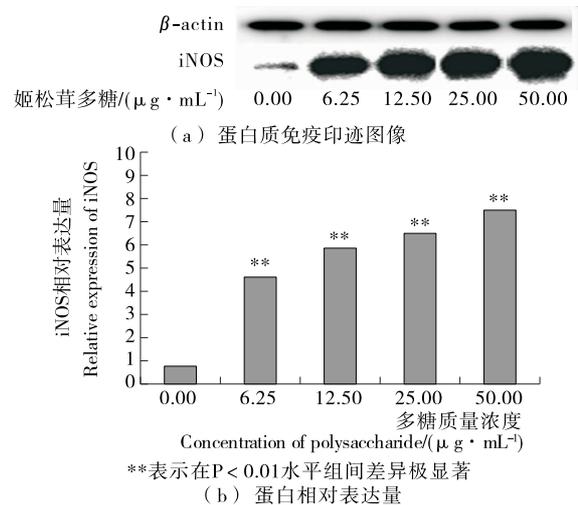


图 2 姬松茸多糖对 RAW264.7 细胞 iNOS 蛋白表达量的影响

Figure 2 The effects of *Agaricus brasiliensis* polysaccharide on iNOS protein expression in RAW264.7 cells

2.3 姬松茸多糖对 RAW264.7 细胞 I κ B α 蛋白磷酸化水平的影响

NF- κ B 具有多项调节作用,是 iNOS 基因转录与表达的调控因子,静息状态下保持 P50-P65-I κ B 三聚物的形式。当收到活化信号后,I κ B 的丝氨酸残基被磷酸化,并从 NF- κ B 解离进入胞核,起到活化转录因子的效用^[18]。而后,P50-P65 二聚体与 κ B 基序结合,表现出一系列重要生物学、病理学活性^[19]。

如图 3 所示,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的姬松茸多糖处理 RAW264.7 细胞不同时间(0,15,30,45,60 min)后,p-I κ B α 蛋白的含量随处理时间的延长而增加,45 min 时达到最高,表明姬松茸多糖可以引起 I κ B α 蛋白磷酸化水平的升高,表示姬松茸多

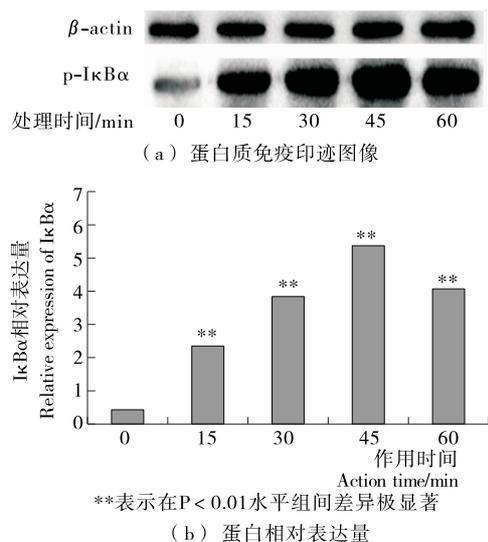


图 3 姬松茸多糖对 RAW264.7 细胞 I κ B α 蛋白磷酸化水平的影响

Figure 3 Effects of *Agaricus brasiliensis* polysaccharide on phosphorylation of I κ B α protein in RAW264.7 cells

糖能够诱导 I κ B α 蛋白的磷酸化,从而证明姬松茸多糖能够激活 NF- κ B 信号转导途径。

研究^[20]表明,iNOS 蛋白的表达、NO 的释放与 NF- κ B 信号转导通路的活化密切相关,NF- κ B/I κ B 途径在其中起重要作用,故由试验结果可推测姬松茸多糖能够通过激活巨噬细胞 NF- κ B 通路诱导其合成 iNOS 从而促进释放 NO。

3 结论

本试验以巨噬细胞释放 NO 的行为变化为靶点,检测姬松茸多糖的免疫调节作用并探究其机制。试验结果显示,姬松茸多糖作用于小鼠巨噬细胞 RAW264.7 后,可通过激活 NF- κ B 信号转导通路上调 iNOS 蛋白的表达,进而促进 NO 释放,从而发挥免疫调节作用,作用效果显著且具有良好的时效和量效性。本文选用了 NF- κ B 信号转导通路探究姬松茸多糖对巨噬细胞的 NO 释放作用的影响机制,在后续的研究中,将对多糖的免疫活性及其他相关信号通路与机理等做进一步深入的探索。

参考文献

- [1] ZHANG Xiao-long, WANG Jing, XU Zhuo-zai, et al. The impact of rhubarb polysaccharides on Toll-like receptor 4-mediated activation of macrophages [J]. *International Immunopharmacology*, 2013, 17(4): 1 116-1 119.
- [2] 曹静, 刘高强, 王晓玲, 等. 可食真菌 β -葡聚糖的生物功能及检测技术[J]. *食品与机械*, 2014, 30(2): 247-268.
- [3] 李佳媚. 两种真菌多糖的体外生物活性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2013: 27-65.
- [4] 王斌, 连宾. 食药真菌多糖的研究与应用[J]. *食品与机械*, 2005, 21(6): 96-100.
- [5] SUN Hong-xiang, ZHANG Juan, CHEN Feng-yang, et al. Activation of RAW264.7 macrophages by the polysaccharide from the roots of *Actinidia eriantha* and its molecular mechanisms[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 121: 388-402.
- [6] 汪名春, 聂陈志鹏, 朱培蕾, 等. 葛苳茎水溶性多糖的单糖组成及免疫调节活性研究[J]. *食品与机械*, 2016, 32(5): 148-151.
- [7] FANG Lei-lei, ZHANG Yan-qing, XIE Jun-bo, et al. Royal sun medical mushroom, *Agaricus brasiliensis* (Agaricomycetidae), derived polysaccharides exert immunomodulatory activities *In Vitro and In Vivo* [J]. *International Journal of Medical Mushroom*, 2016, 18(2): 123-132.
- [8] FÖRLAND D T, JOHNSON E, TRYGGESTAD A M A, et al. An extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei*, Murill stimulates monocyte-derived dendritic cells to cytokine and chemokine production *in vitro* [J]. *Cytokine*, 2010, 49(3): 245-250.
- [9] 王丽娟, 张彦青, 王勇, 等. 姬松茸多糖增强免疫作用及急性毒性研究[J]. *食品科学*, 2014, 35(13): 258-261.
- [10] CUI Li-ran, SUN Yong-xu, XU Hao, et al. A polysaccharide isolated from *Agaricus blazei* Murill (ABP-AW1) as a potential Th1 immunity-stimulating adjuvant [J]. *Oncology Letters*, 2013, 6(4): 1 039-1 044.
- [11] 贾薇, 樊华. 姬松茸多糖组分对小鼠巨噬细胞作用研究[J]. *食品科学*, 2011, 32(11): 277-280.
- [12] 云少君, 李晨光, 冯翠萍, 等. 巴氏蘑菇多糖对巨噬细胞 RAW264.7 免疫活性的影响[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(8): 32-36.
- [13] 石少华, 杨文涛, 王春风, 等. 巴西蘑菇活性成分的免疫调节作用研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2015, 31(9): 1 290-1 293.
- [14] 赵肖通. 双孢蘑菇多糖的提取分离及其免疫调节作用研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2017: 29-32.
- [15] VOLMAN J J, HELSPER J P, WEI S, et al. Effects of mushroom-derived beta-glucan-rich polysaccharide extracts on nitric oxide production by bone marrow-derived macrophages and nuclear factor-kappaB transactivation in Caco-2 reporter cells; can effects be explained by structure? [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54(2): 268-276.
- [16] 王慧. AEPS 对 RAW264.7 细胞的免疫调控作用及其机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010: 24-33.
- [17] 康峰. 灵芝多糖对长期运动大鼠巨噬细胞吞噬功能及 NO 和 IL-1 β 表达的影响[J]. *动物医学进展*, 2017, 38(6): 61-65.
- [18] ZENG Zhao-jing, ZHAN Ling-ling, LIAO Hui, et al. Curcumin improves TNBS-induced colitis in rats by inhibiting IL-27 expression via the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Planta Medica*, 2012, 29(2): 102-109.
- [19] BEINKE S, LEY S C. Functions of NF- κ B 1 and NF- κ B 2 in immune cell biology[J]. *Biochemical Journal*, 2004, 382(2): 393-409.
- [20] 朱杰, 肖震, 沈月爽, 等. 黄芪多糖通过 NF- κ B 诱导巨噬细胞产生 NO 和 TNF- α [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 30(6): 511-515.
- [21] 豆玉新. 动态超高压微射流均质对卵清蛋白改性机理的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2008: 58.
- [22] MUTIEL Subirade, FRANCK Loupil, ANNE Françoise Allain, et al. Effect of dynamic high pressure on the secondary structure of beta-lactoglobulin and on its conformational properties as determined by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *International Dairy Journal*, 1998, 8(2): 738-744.
- [23] EUGENE A Permyakov, LAWRENCE J Berliner. α -Lactalbumin: structure and function[J]. *FEBS Letters*, 2000, 473(3): 269-274.
- [24] LIU Jian-hua, RU Qiao-mei, DING Yu-ting. Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review[J]. *Food Research International*, 2012, 49(1): 170-183.
- [25] 豆玉新. 动态超高压微射流均质对卵清蛋白改性机理的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2008: 58.
- [26] CHEN Lin, CHEN Jian-she, REN Jiao-yan, et al. Effects of Ultrasound Pretreatment on the Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein Isolates and on the Emulsifying Properties of Hydrolysates[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2011, 59(6): 2 600-2 609.
- [27] SUN Yuan-xia, SHIGERU Hayakawa, SOMWIPA Puangmanee, et al. Chemical properties and antioxidative activity of glycosylated α -lactalbumin with a rare sugar, d-allose, by Maillard reaction[J]. *Food Chemistry*, 2006, 95(3): 509-517.
- [28] YU Xiang-ying, ZHAO Ming-yue, HU Jun, et al. Correspondence analysis of antioxidant activity and UV-Vis absorbance of Maillard reaction products as related to reactants [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2012, 46(1): 1-9.

(上接第 15 页)