

刺糖多糖调控 Toll 样受体 4 对免疫抑制活性的影响

吕志远¹, 宋建忠^{1,2},
曲真真¹, 李进发¹, 李改茹¹, 常军民^{1,3*}

¹新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830000; ²新疆医科大学附属肿瘤医院药学部, 乌鲁木齐 830011;

³新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室, 乌鲁木齐 830000

摘要:揭示刺糖多糖对 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 的调控机制。构建 C57BL/6J 免疫抑制小鼠模型及 TAK-242 抑制剂诱导的 RAW 264.7 模型, 小鼠模型给予刺糖多糖组 800 mg/kg 以及 RAW 264.7 模型给予不同浓度的刺糖多糖 (25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 进行干预。酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 分别测定小鼠血清中细胞因子、RAW 264.7 细胞因子分泌水平。蛋白免疫印迹 (Western blot) 与实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 法检测 TLR4 和髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 与肿瘤坏死因子相关的分子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6) 在相关组织和细胞中的表达。结果表明刺糖多糖显著提高了免疫抑制小鼠的脾脏指数、胸腺指数, 以及血清中白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 和免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, IgM) 的含量。在 TAK-242 抑制剂诱导的细胞模型中, 刺糖多糖增加了白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12)、TNF- α 、核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的分泌。此外, 刺糖多糖逆转了 TLR4 和 MyD88/TRAF6 的表达下调。刺糖多糖可以通过调节 MyD88 途径激活 TLR4 受体的免疫应答。

关键词:刺糖多糖; Toll 样受体 4; 巨噬细胞 RAW 264.7; 免疫抑制

中图分类号: R967

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880 (2024) 8-1393-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.8.013

Effect of Alhagi honey polysaccharide on immunosuppressive activity by regulating Toll-like receptor 4

LYU Zhi-yuan¹, SONG Jian-zhong^{1,2},
QU Zhen-zhen¹, LI Jin-fa¹, LI Gai-ru¹, CHANG Jun-min^{1,3*}

¹College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China;

²Department of Pharmacy, Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

³Xinjiang Key Laboratory of Natural Medicines Active Components and Drug Release Technology, Urumqi 830000, China

Abstract: This study elucidates the regulatory mechanism of Alhagi honey polysaccharide on Toll-like receptor 4 (TLR4). An immunosuppressive mouse model was established using C57BL/6J mice, and a RAW 264.7 model induced by TAK-242 inhibitor was constructed. In the mouse model, Alhagi honey polysaccharide were administered at 800 mg/kg, while the RAW 264.7 model received interventions with different concentrations of Alhagi honey polysaccharide (25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to measure cytokine levels in mouse serum and RAW 264.7 cell culture supernatant. Protein immunoblotting and real-time quantitative PCR (qRT-PCR) were conducted to detect the expression of TLR4, myeloid differentiation factor 88 (MyD88), and tumor necrosis factor- α receptor associated factor 6 (TRAF6) in relevant tissues and cells. Results indicate that Alhagi honey polysaccharide significantly increased the spleen index, thymus index, and serum levels of interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), tumor necrosis factor- α (TNF- α), im-

munoglobulin G (IgG), and immunoglobulin M (IgM) in immunosuppressive mice. In the TAK-242 inhibitor-induced cell model, Alhagi honey polysaccharide increased the secretion of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-12 (IL-12), TNF- α , and nuclear factor- κ B (NF- κ B). Furthermore, Alhagi honey polysaccharide reversed the downregulation of TLR4 and MyD88/TRAF6 expression. Alhagi honey polysaccharide can activate the immune response of TLR4 receptors by modulating the MyD88 pathway.

Key words: Alhagi honey polysaccharide; Toll-like receptor 4; macrophage RAW 264.7; immunosuppression

刺糖 (Alhagi honey) 为豆科蝶形花亚科骆驼刺属的半灌木骆驼刺 (*Alhagi pseudoalhagi* Desv.) 分泌液凝结而成的糖粒^[1]。《本草纲目》将刺糖列为药中上品,植物多糖在临床得到了广泛使用^[2]。在调节机体免疫功能方面,多糖具有显著的优势^[3]。如生姜多糖可增加环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 诱导的免疫抑制小鼠的体重和饮食,保护免疫器官,刺激白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 的分泌^[4]。黄芪多糖通过激活 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 是介导的丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPKs) 和核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路促进 RAW 264.7 细胞细胞因子的产生,并进一步发挥其免疫调节作用^[5]。同时,另一项研究报道了刺玫根多糖调节 TLR4/MyD88/TRAF-6 信号通路和 NF- κ B p65 蛋白的表达水平来提升小鼠免疫功能^[6]。TLR4 是一种跨膜信号分子,这种受体对于多种免疫功能至关重要^[7]。当能够与 TLR4 受体进行结合的配体出现时,在 TLR 区域能够进行信号的传导,继而更深层次刺激 NF- κ B 和丝裂原激活蛋白激酶信息传导路径,随后引起细胞分泌不同炎症物质^[8]。TLR4/NF- κ B 信息传导路径和 MyD88 的末尾羧基相互影响,形成 TIR 结构域,然后利用具有氨基端的 MyD88 和拥有同源性受体有关的 IL-1 相干激酶 (IL-1 receptor-associated kinase, IRAK) 氨基端作用,进一步影响 IRAK。应答后的 IRAK 进一步激活与肿瘤坏死因子相关的分子 6 (TNF-receptor association factor 6, TRAF-6), TRAF6 进一步形成针对 NF- κ B 激酶抑制剂的复合物^[9]。NF- κ B 抑制剂在与 IKK 结合的产物的影响下磷酸化和降解,然后对 NF- κ B 起反应。并对特定基因在细胞核中产生诱导表达,激活细胞因子 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12^[10] 等。课题组前期研究已对刺糖粗多糖进行了提取,其最佳工艺条件为 70 $^{\circ}$ C 下 9 倍的水量,回流提取,醇沉浓度为 80%。经过分离纯化,得到刺糖多糖 (Alhagi

honey polysaccharide, AHP) 组分^[11]。AHP 的分子量约为 1.68×10^6 Da, 由 α -L-Arab-(1 \rightarrow , \rightarrow 3) α -L-Arab-(1 \rightarrow , \rightarrow 2) α -L-Rha-(1 \rightarrow , \rightarrow 3) α -D-Man-(1 \rightarrow 和 \rightarrow 6) α -D-GlcUA-(1 \rightarrow 3) α -D-GalUA 组成。本研究从 AHP 调控 TLR4 的角度,研究其对免疫缺陷小鼠模型的免疫调控作用以及在对 TAK-242 抑制剂诱导的巨噬细胞 RAW 264.7 模型中进行免疫活性探究,旨在为 AHP 的临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与药材

CTX (江苏恒瑞药业有限公司,批号:16071422);小鼠细胞因子 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-12、IL-10、TNF- α 、IgG、IgM 等 ELISA 试剂盒 (上海钰博科技有限公司,批号:EDL2018012025)。小鼠腹腔巨噬细胞 RAW 264.7 细胞 (中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心);胎牛血清 (Gibco USA,批号:PA131001);DMEM (杭州沃森生物技术有限公司,批号:12800-017);0.25% 胰蛋白酶消化液 (南京凯基生物科技发展有限公司,批号 KGY001-100);青霉素-链霉素双抗 (10000U) (美国 Hyclone 公司,批号:SV30010);脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) (SIGMA USA,批号:L2880);二甲基亚砜 DMSO (美国 Sigma 公司);盐酸左旋咪唑 (山东仁和堂药业有限公司,批号:150321);TLR4 靶点抑制剂 TAK-242 (批号:HY-11109)。

刺糖药材 (伊鼎辉煌公司,批号:20170711),由新疆医科大学天然药物化学教研室帕丽达教授鉴定为骆驼刺 *Alhagi pseudoalhagi* Desv. 分泌液凝结而成的糖粒。经过分离纯化、水提除醇、蛋白去除、大孔吸附树脂、纤维素柱层析和葡聚糖凝胶柱层析,经 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱,洗脱液浓缩后经 72 h 真空干燥得到 AHP,本实验以 AHP 作为后续研究。

1.2 方法

1.2.1 免疫抑制小鼠模型建立

32 只 C57BL/6J 小鼠,清洁级,体质量 18 ~ 22 g,6 ~ 8 周龄,购自北京医疗器械检验所。根据随机数字表法分为正常对照组 (control, Con) ($n = 8$)、模

型组(model, Mod) ($n = 8$)、刺糖多糖组(Alhagi honey polysaccharide, AHP) ($n = 8$)及阳性药物组(Positive, Pos) ($n = 8$)。Con 组正常饲养,第 4、6、8、10、12 d Con 组腹腔注射生理盐水,其他各组建立免疫抑制小鼠模型,第 4、6、8、10、12 d 每只小鼠腹腔注射一次 CTX(50 mg/kg)^[12]。造模后,Con 组每周腹腔注射生理盐水,其余 3 组每周腹腔注射 CTX 一次。AHP 组每天再给予 800 mg/kg 进行灌胃,Pos 组小鼠每天给予盐酸左旋咪唑 50 mg/kg 灌胃,Con 组和 Mod 组每天给予等量生理盐水灌胃,共 35 d。末次给药将小鼠摘眼球取血,颈椎脱臼处死,取其胸腺和脾脏,计算脾脏指数(spleen index, SPI)和胸腺指数(thymus index, THI)。计算方式为:SPI = 脾脏重(mg)/体重(g);THI = 胸腺重(mg)/体重(g)。实验动物生产和使用许可证号:SYXK(京)2020-0002,动物合格证号 1100111911008834。经新疆医科大学第一附属医院伦理委员会批准,伦理审批号:IACUC-20200331-83。

1.2.2 定量 ELISA 分析

将所取小鼠血样以 3 000 r/min(离心半径 12.5 cm)离心 15 min,取上清,采用 ELISA 法测定 IL-2、IL-4、IL-6、TNF- α 、IgG、IgM,实验步骤严格按照说明书进行。

1.2.3 qRT-PCR 法检测小鼠脾脏中 TLR4 的表达

取小鼠脾脏组织 100 mg,在无菌的研钵中加液氮研磨成粉末状,用 Trizol 提取脾脏组织中总 RNA,逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 10 μ L 的 cDNA 后,进行荧光定量 PCR,TLR4 引物如下:上游引物:5'-ATGACTGGTTCCTCCGTC-3';下游引物:5'-ACTTAGCGCAGATTTATTCCA-3'。以 β -actin 为内参,反应体系:cDNA 2 μ L,SYBR Green I 10 μ L,上游引物 0.5 μ L,下游引物 0.5 μ L,ddH₂O 7 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 35 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$} CT 法计算 mRNA 的相对表达量。

1.2.4 Western blot 检测小鼠脾脏组织 TLR4 蛋白水平

采用 Western blot 测定脾脏组织 TLR4 蛋白水平。分析蛋白表达结果,并以 β -actin 作为内参进行定量分析。

1.2.5 构建 TAK-242 抑制剂诱导的 RAW 264.7 细胞模型

将巨噬细胞 RAW 264.7 分为四组:正常组

(Con); LPS 组(LPS); TAK-242 抑制剂组; LPS + TAK-242 抑制剂组。以下游基因 MyD88 的表达为检测目的对抑制剂针对受体封闭的情况进行检验。检验我们的模型是否成功构建。

1.2.6 AHP 对 RAW 264.7 细胞模型炎症因子释放的影响

分别设立 RAW 264.7 细胞实验组(AHP 25、50、75、100 μ g/mL, AHP 25、AHP 50、AHP 75、AHP 100)、阳性药组(LPS 组)(1 mg/mL LPS 细胞培养基)、模型组(Mod)和正常对照组(Con),各组分别设立 3 个复孔,在不同浓度药物组干扰处理 24、48 h 后将细胞培养上部液体吸取出,并移至离心管内,选用 ELISA 法检测 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-12、IL-10、TNF- α 和 NF- κ B 因子含量,450 nm 处测定吸光度值。

1.2.7 AHP 对 RAW 264.7 细胞模型相关基因的表达的影响

TLR4 靶点中的 MyD88 依赖途径由 MyD88 分子和 TRAF6 分子所调控,经其调控干预后才能发挥 TLR4 靶点的正常免疫调理作用,因此,采用 RT-PCR 测定经不同浓度 AHP 干预 TAK-242 抑制剂诱导的巨噬细胞中 MyD88 和 TRAF6 的 mRNA 的表达水平。MyD88 上游引物:5'-ATGACTGGTTCCTCCGTC-3';下游引物:5'-ACTTAGCGCAGATTTATTCCA-3'; TRAF6 上游引物:5'-CCTCCTGGTGTGACCTCC-3';下游引物:5'-GAAGCAGCCCAGCTCGTCCC-3'。

1.2.8 AHP 对 RAW 264.7 细胞模型相关蛋白的表达调控的影响

采用 Western blot 测定 TAK-242 抑制剂诱导的 RAW 264.7 细胞模型组以及各给药组的 MyD88 和 TRAF6 蛋白水平。分析蛋白表达结果,并以 β -actin 作为内参进行定量分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件包对数据进行统计学处理,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AHP 对小鼠脾脏指数和胸腺指数的影响

小鼠皮下注射 CTX 后,模型组小鼠的脾脏指数、胸腺指数低于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。AHP 组小鼠的脾脏指数和胸腺指数高于 Mod 组($P < 0.05$),结果如图 1 所示。

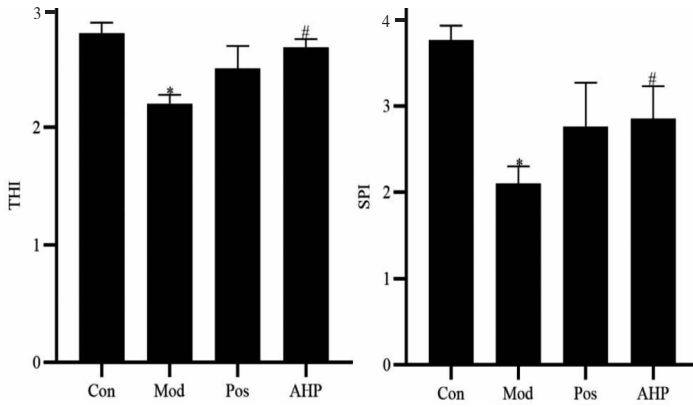


图1 各组小鼠的胸腺指数和脾脏指数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Thymus index and spleen index of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

注:与 Con 比较,* $P < 0.05$;与 Mod 比较,# $P < 0.05$,下同。Note: Compared with Con,* $P < 0.05$;Compared with Mod,# $P < 0.05$,the same below.

2.2 各组小鼠血清中细胞因子的指标检测

Mod 组小鼠血清中 IL-2、IL-4、IL-6、TNF- α 的含量均低于 Con 组,AHP 组 IL-2、IL-4、IL-6、TNF- α 的含量高于 Mod 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),AHP 组与 Con 组 IL-2、IL-4、IL-6、TNF- α 的比较差异无统计学意义($P < 0.05$),结果如图 2 所示。

Mod 组小鼠血清中 IgG 和 IgM 值低于 Con 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),AHP 组 IgG 和 IgM 值高于 Mod 组($P < 0.05$),结果如图 3 所示。

2.3 各组小鼠脾脏组织中 TLR4 mRNA 的表达

Mod 组小鼠脾脏组织中的 TLR4 表达量水平低于 Con 组,AHP 组 TLR4 mRNA 水平明显高于 Mod 组($P < 0.05$)。表明 AHP 具有增强免疫抑制模型

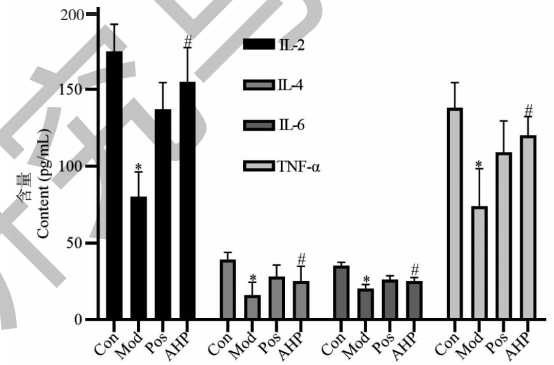


图2 各组小鼠血清中 IL-2、IL-4、IL-6、TNF- α 的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 The levels of IL-2,IL-4,IL-6 andTNF- α in serum of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

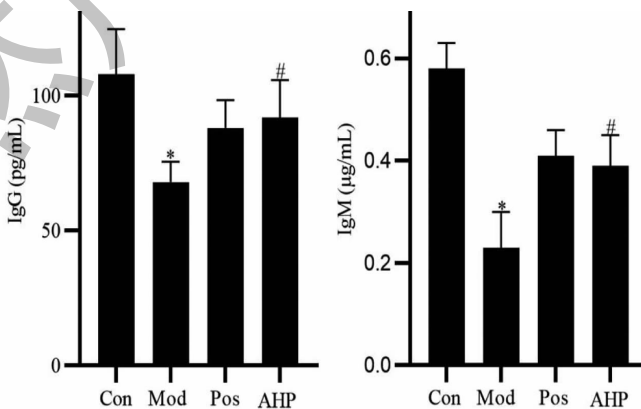


图3 各组小鼠血清中 IgG、IgM 含量 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 The content of IgG and IgM in serum of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

小鼠中 TLR4 相关基因表达的作用, 结果如图 4 所示。

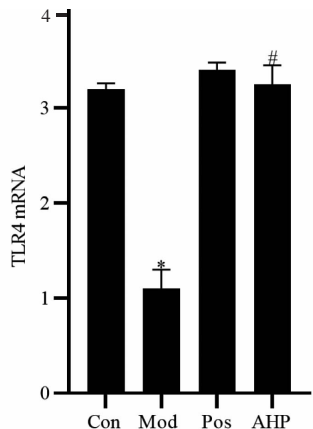


图 4 各组小鼠脾脏组织中 TLR4 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 The expression of TLR4 mRNA in spleen tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.4 各组小鼠脾脏组织 TLR4 蛋白水平测定

AHP 组 TLR4 表达高于 Mod 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组小鼠脾脏组织 TLR4 蛋白表达的定性和定量分析结果如图 5 所示。

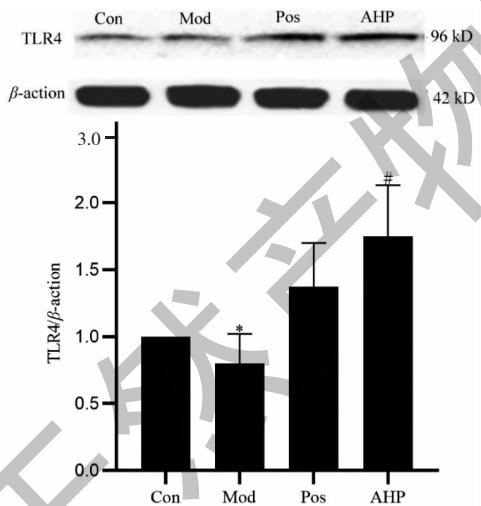


图 5 各组小鼠脾脏组织 TLR4 蛋白表达结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 The expression of TLR4 protein in spleen tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.5 TAK-242 抑制剂诱导的 RAW 264.7 细胞模型确证

使用 TLR4 靶点抑制剂 TAK-242 以针对 TLR4 靶点对巨噬细胞 RAW 264.7 进行封闭造模, 并以下游基因 MyD88 的表达为检测目的对抑制剂针对受

体封闭的情况进行检验。从 MyD88 表达量条带图中可以看出, 不同细胞加药处理组干预巨噬细胞 RAW 264.7 后, TAK-242 抑制水平明显上升。确证 TAK-242 抑制剂诱导的巨噬细胞 RAW 264.7 模型的构建, 结果如图 6 所示。

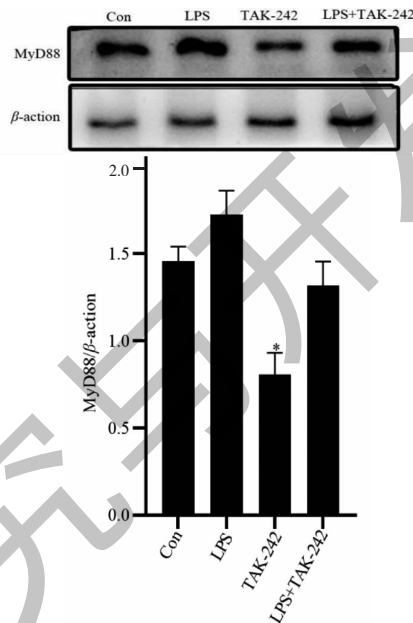


图 6 巨噬细胞 RAW 264.7 中 MyD88 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 The expression of MyD88 protein in RAW 264.7 macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.5.1 AHP 对 RAW 264.7 细胞模型炎症因子释放的影响

AHP 各剂量浓度组能刺激造模后巨噬细胞中 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-12、IL-10、TNF- α 和 NF- κ B 的分泌, 随着剂量的增加, 细胞因子的分泌量增加, 结果如图 7 所示。

与 Con 组比较, AHP 在不同浓度下 (50、75、100 μ g/mL) 显著影响了 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α 以及 NF- κ B 的水平 ($P < 0.05$)。48 h 处理后, 50 μ g/mL 浓度下的 AHP 组 IL-2 显著不同于 Con 组 ($P < 0.05$); 75 μ g/mL 浓度下 AHP 组的 IL-1 β 、IL-6、IL-12 和 NF- κ B 也具有统计学意义的差异 ($P < 0.05$); 100 μ g/mL 浓度下 AHP 组的 TNF- α 显著不同于 Con 组 ($P < 0.05$); 此外, AHP 处理下 IL-10 水平无明显变化, 结果如图 7 所示。综上所述, AHP 能够促进 TAK-242 抑制剂诱导的巨噬细胞 RAW 264.7 分泌 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α 和 NF- κ B, 参与免疫调节作用。

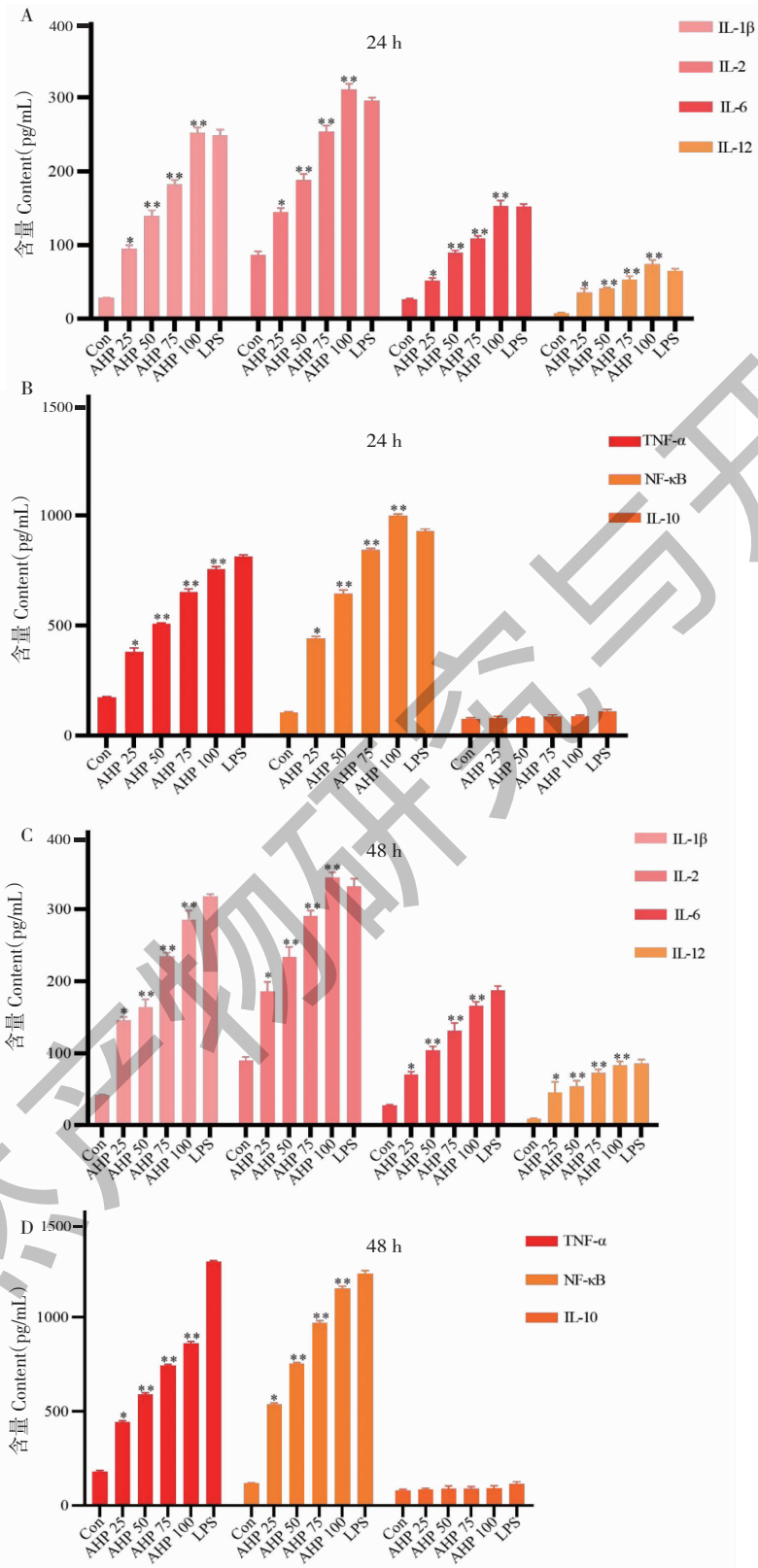


图7 AHP对RAW 264.7细胞模型炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of AHP on inflammatory factors in RAW 264.7 cell model($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与Con比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。Note: Compared with Con,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

2.5.2 AHP 对 RAW 264.7 细胞模型的相关基因表达调控的影响

与 Mod 组比较,目的基因 MyD88 的 mRNA 表达量在 LPS 组和 75 μg/mL AHP 组明显上调,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。由于给药浓度的增加,AHP 给药组对 TRAF6 分子的相关基因表达从

0.69 倍增至 1.31 倍;同 Con 组对比,Mod 组具有显著性差异 ($P < 0.05$);与 Mod 组比较,目的基因 TRAF6 的 mRNA 表达量在 LPS 组和 75 μg/mL AHP 剂量组显著上调,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。当 MyD88 和 TRAF6 的表达量最高时,AHP 的浓度为 75 μg/mL,结果如图 8 所示。

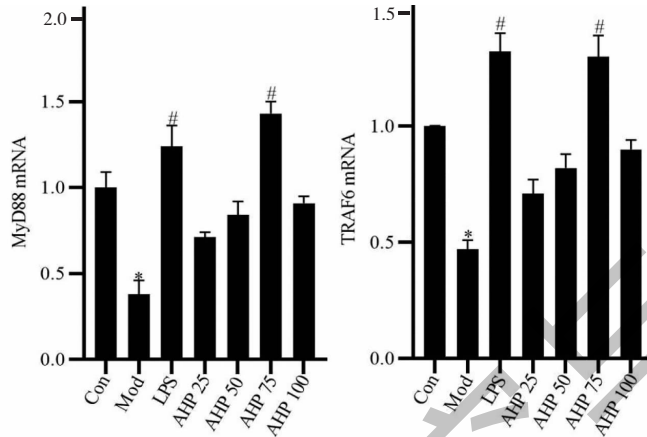


图 8 AHP 对 RAW 264.7 细胞模型 MyD88、TRAF6 mRNA 表达调控的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of AHP on the regulation of MyD88 and TRAF6 mRNA expression in RAW 264.7 cell model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.5.3 AHP 对 RAW 264.7 细胞模型相关蛋白表达调控的影响

从 MyD88 蛋白表达(见图 9)中能够显著观察到在给药 25-75 μg/mL 的浓度范围内,条带颜色逐渐变深。随着 AHP 浓度的增加,靶蛋白 MyD88 和 TRAF6 的表达量逐渐增高,呈剂量依赖性。根据表 1 的数据,观察到在目的蛋白 MyD88 的表达中,50 和 75 μg/mL 剂量的 AHP 组的调节水平显著升高 ($P < 0.05$)。在蛋白 TRAF6 的表达方面,与 75 μg/

$P < 0.05$ 。mL 组相比,显著升高 ($P < 0.05$)。与 LPS 组相比,AHP 组中 MyD88 蛋白的表达水平在 75 μg/mL 剂量下明显升高 ($P < 0.05$);此外,在 AHP 组中,TRAF6 蛋白的表达水平在 75 和 100 μg/mL 剂量下显著升高 ($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度 AHP 对 RAW 264.7 细胞模型蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of different concentrations of AHP on the protein expression of RAW 264.7 cell model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	蛋白表达量 Protein expression	
	MyD88	TRAF6
Con	0.333 ± 0.062	0.435 ± 0.086
Mod	0.296 ± 0.075	0.217 ± 0.064
LPS	0.351 ± 0.103	0.258 ± 0.106
AHP 25	0.307 ± 0.012	0.247 ± 0.042
AHP 50	0.359 ± 0.013 *	0.329 ± 0.059
AHP 75	0.371 ± 0.107 **	0.425 ± 0.105 **
AHP 100	0.313 ± 0.083	0.340 ± 0.047 **

注:与 AHP 25 μg/mL 组比较, * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, # $P < 0.05$ 。
Note: Compared with the AHP 25, * $P < 0.05$; compared with the LPS, #

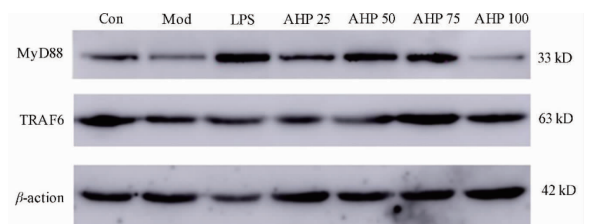


图 9 不同浓度 AHP 对 RAW 264.7 细胞模型中 MyD88 和 TRAF6 蛋白表达的影响

Fig. 9 Effect of different concentrations of AHP on the expression of MyD88 and TRAF6 protein in RAW 264.7 cell model

3 讨论与结论

研究表明,Toll 样受体信号通路是多糖免疫调节的热点通路。研究表明,TLR4/NF-κB 信号通路在多种炎症性疾病中被激活并参与其发病机制^[13]。机体免疫系统由免疫器官、免疫细胞和免疫分子等组成^[14]。脾脏和胸腺作为重要的免疫器官,其指数

下降代表免疫系统受损^[15]。免疫系统在正常生理条件下负责维持免疫稳态平衡^[14]。然而,在临床上使用化疗药物会破坏这种平衡并导致免疫紊乱。CTX作为一种常用的化疗药物,可引起免疫抑制。在本研究中,采用 C57BL/6J 小鼠腹腔注射 CTX 溶液降低小鼠机体的免疫应答能力,通过持续使用 CTX,使正常小鼠的免疫功能形成低下。我们发现在 CTX 诱导的免疫功能低下小鼠中,脾脏组织中的 TLR4 明显下降,而 AHP 能抑制 TLR4 的降低,AHP 干预的小鼠脾脏组织中 TLR4 有明显增加,表明 TLR4 参与了 CTX 诱导的免疫功能低下小鼠的调节,起到增强免疫力的作用。本研究结果显示,模型组小鼠脾脏组织 TLR4 蛋白水平降低,给予 AHP 干预后,小鼠脾脏组织 TLR4 蛋白水平升高,提示 TLR 信号通路在炎症反应中发挥重要作用。TLRs 参与机体固有免疫反应,TLR2 和 TLR4 是 TLRs 家族重要成员,在炎症反应过程中发挥作用^[16]。

多糖是植物、动物和微生物代谢的产物,因其治疗功效引起广泛关注,被认为是先天免疫系统的免疫分子,其作用机制包括通过增强外膜的完整性和稳定性,提高巨噬细胞对外界应激的抵抗力以及在各种条件下生存的能力^[17]。巨噬细胞属于免疫细胞,通过非特异性识别抗原物质,对病原体进行吞噬,诱导免疫应激,产生抗原递呈,从而激活机体的免疫系统,实现免疫细胞对抗原分子的识别、活化、增殖和分化,启动免疫应答^[18]。巨噬细胞能够分泌生物活性效应分子(如细胞因子 TNF- α 、IL-6 等),以促进其识别抗原性异物的能力,提高吞噬功能,从而增强机体的抵抗力。因此,TNF- α 、IL-6 等细胞因子的分泌在细胞吞噬、抗原提呈和炎症调节中扮演着重要角色,可作为衡量巨噬细胞激活和免疫功能调节的重要指标^[19]。已有研究证实,AHP 能够促进巨噬细胞 RAW 264.7 的增殖以及对其免疫活性有良好的影响^[20]。结合前人研究及本研究结果:AHP 显著提高了免疫抑制小鼠的脾脏指数、胸腺指数,以及血清中 IL-2、IL-4、IL-6、TNF- α 、IgG 和 IgM 的含量及促进 TAK-242 抑制剂诱导的巨噬细胞 RAW 264.7 分泌 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α 和 NF- κ B 等细胞因子,并逆转了 TLR4 和 MyD88/TRAF6 的表达下调。我们进一步证实 AHP 可能通过促进 TLR4 信号通路的激活,进而增强其下游 IL-6、TNF- α 等炎症细胞因子表达,增强免疫抑制模型小鼠的体内免疫功能,从而提升机体的免疫活性。本研究探究了

AHP 调控 Toll 样受体 4 对免疫抑制活性的影响,为 AHP 在炎症反应、免疫应答相关研究奠定了理论基础。

参考文献

- 1 Chen YY, Song JZ, Li J, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Saccharum Alhagi* [J]. *Chin Med Herald* (中国医药导报), 2023, 20:42-45.
- 2 Chen N, Xi WJ, Hu MF, et al. Relationship between immune regulation and structure of polysaccharides [J]. *China J Chine Mater Med* (中国中药杂志), 2023, 48:2667-2678.
- 3 Chen XL, Li WW, Chen Q, et al. Structure analysis and anti-inflammatory activity evaluation of neutral polysaccharides from *Arctium lappa* L. [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2023, 44:45-54.
- 4 Jun-ping L, Jie W, Si-xuan Z, et al. Ginger polysaccharides enhance intestinal immunity by modulating gut microbiota in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 223:1308-1319.
- 5 Wei W, Xiao H, Bao W, et al. TLR-4 may mediate signaling pathways of *Astragalus* polysaccharide RAP induced cytokine expression of RAW 264.7 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179:243-252.
- 6 Cha SN, Su RN, Qi HRM, et al. Immunomodulatory effect of polysaccharides from *Rosa davurica* roots on immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2024, 36:196-205.
- 7 Yu S, Qian H. Deoxyschizandrin treats mice with ulcerative colitis possibly via the TLR4/NF-kappaB signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13:3856-3863.
- 8 Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response [J]. *Cell*, 2012, 111:927-930.
- 9 Prescott Jack A, Mitchell Jennifer P, Cook Simon J. Inhibitory feedback control of NF- κ B signalling in health and disease [J]. *Biochem J*, 2021, 478:2619-2664.
- 10 Lin X, Lu ZL, Xu DS, et al. Comparison of distribution of *Ophiopogon japonicus* polysaccharide in hearts of normal rats and myocardial ischemic rats [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2013, 34:230-233.
- 11 Zheng J. Isolation, purification, structural elucidation and antidiabetic activity of polysaccharide from *Alhagi-honey* [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University (新疆医科大学), 2016.
- 12 Liu YS, Yu Z, Wang X. Effects of *Viola tianshanica* Maxim extract on immune function of immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中药药理与临床), 2022, 38:120-123.