

# 芜菁多糖对巨噬细胞极化及 H226 细胞增殖和迁移的影响

阿曼妮萨·麦提如则<sup>1</sup>, 吴美美<sup>1</sup>, 李博灵<sup>2</sup>, 胡尔沙娜·阿布力克木<sup>2</sup>,  
迪丽飞拉·苏来曼<sup>2</sup>, 海力茜·陶尔大洪<sup>1\*</sup>, 刘九州<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>新疆医科大学药学院; <sup>2</sup>新疆医科大学口腔医学院, 乌鲁木齐 830017

**摘要:** 研究芜菁多糖对巨噬细胞极化以及对 H226 细胞增殖和迁移的影响。采用 CCK-8 (cell counting kit-8) 法测芜菁粗多糖 (*Brassica rapa* L. polysachharide, BRP)、芜菁中性多糖 (*Brassica rapa* L. netural polysachharide, BRNP)、芜菁酸性多糖 (*Brassica rapa* L. acid polysachharide, BRAP) 对 RAW 264.7 的细胞活力的影响以及 BRAP 对 H226 细胞增殖活性的影响; 采用线粒体膜电位指示剂检测 BRAP 对 H226 细胞线粒体膜电位的变化; 用划痕实验检测 BRAP 对 H226 细胞的迁移能力的影响。构建 M1/M2 型巨噬细胞模型, 采用酶联免疫吸附测定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测三种多糖对 M1/M2 型巨噬细胞的肿瘤坏死因子 $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 分泌水平的影响, 采用免疫荧光法检测三种多糖对 M2 型巨噬细胞甘露糖受体 (mannose receptor, CD206) 和一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 蛋白表达的影响; 采用实时荧光定量 PCR (realtime fluorescence quantitative PCR, qPCR) 检测三种多糖对 M1/M2 型巨噬细胞精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的 mRNA 表达水平的影响。研究结果表明, BRP、BRNP、BRAP 对巨噬细胞的增殖起促进作用, 并在 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处对巨噬细胞有较强且相近的促进增殖的作用, BRAP 抑制 H226 细胞增殖效果显著, 半数抑制浓度为 97.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; BRAP 降低 H226 细胞的线粒体膜电位, 抑制 H226 细胞的迁移; 三种多糖均能降低巨噬细胞 TNF- $\alpha$  及 IL-10 的分泌量, 均能下调 M2 型巨噬细胞 CD206 表达, 上调 iNOS 蛋白表达; BRP、BRNP、BRAP 降低 M1 型巨噬细胞 IL-6 mRNA 的表达以及 M2 型巨噬细胞 Arg-1 mRNA 的表达。本研究发现 BRP、BRNP、BRAP 都能抑制巨噬细胞向 M2 型表型极化, BRAP 能显著抑制 H226 细胞的增殖和迁移。此研究为芜菁多糖通过调控巨噬细胞极化而抑制肿瘤提供理论基础。

**关键词:** 芜菁多糖; 巨噬细胞; 极化; H226 细胞; 增殖; 迁移

中图分类号: R961

文献标识码: A

## Effect of *Brassica rapa* L. polysachharide on macrophage polarization, proliferation and migration of H226 cells

MAITIRUZE Amannisa<sup>1</sup>, WU Mei-mei<sup>1</sup>, LI Bo-ling<sup>2</sup>, ABULIKEMU Huershana<sup>2</sup>,  
SULAIMAN Dilifeila<sup>2</sup>, TAOERDAHON Hailiqian<sup>1\*</sup>, LIU Jiu-zhou<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Xinjiang Medical University; <sup>2</sup>School of Stomatology, Xinjiang Medical University, Urumqi

**Abstract:** To study the effects of *Brassica rapa* L. polysaccharide on macrophage polarization and H226 cell proliferation and migration. The CCK-8 (cell counting kit-8) method was used to measure the *Brassica rapa* L. polysaccharide (BRP), *Brassica rapa* L. neutral polysaccharide (BRNP), and *Brassica rapa* L. acid polysaccharide (BRAP) on the cell viability of RAW 264.7 cells and the effect of BRAP on the proliferative activity of H226 cells. The mitochondrial membrane potential indicator was used to detect the effect of BRAP on the mitochondrial membrane potential of H226 cells. The effect of BRAP on the migration ability of H226 cells was detected by scratch assay. An M1/M2 macrophage model was constructed, and the effects of three polysaccharides on the secretion levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-10 (IL-10) in M1/M2 macrophages were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Immunofluorescence was used to detect the effects of three polysaccharides on the expression of mannose receptor (CD206) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) proteins in M2 macrophages. Realtime fluorescence quantitative PCR (qPCR) was used to detect the effects of three polysaccharides on the mRNA expression levels of arginase-1 (Arg-1) and interleukin-6 (IL-6) in M1/M2 macrophages. The results showed that BRP, BRNP and BRAP promoted the proliferation of macrophages and had a strong and similar effect on macrophages at 350  $\mu\text{g/mL}$ , and BRAP had a significant effect on the proliferation of H226 cells, with a half inhibitory concentration of 97.84  $\mu\text{g/mL}$ . BRAP decreases the mitochondrial membrane potential of H226 cells and inhibits the migration of H226 cells. The three polysaccharides could reduce the secretion of TNF- $\alpha$  and IL-10 in macrophages, down-regulate the expression of CD206 in M2 macrophages, and up-regulate the expression of iNOS protein. BRP, BRNP and BRAP decreased the mRNA expression of IL-6 in M1 macrophages and Arg-1 mRNA in M2 macrophages. In this study, BRP, BRNP and BRAP could inhibit macrophage polarization to M2 phenotype, and BRAP could significantly inhibit the proliferation and migration of H226 cells. This study provides a theoretical basis for *Brassica rapa* L. polysaccharides to inhibit tumors by regulating macrophage polarization.

**Keywords:** *Brassica rapa* L. polysaccharide; macrophages; polarization; H226 cells; proliferation; migration

肺癌 (lung cancer) 是全球常见的恶性肿瘤之一, 据统计每年大概有超过二百一十万肺癌新发病例和一百七十万肺癌死亡病例, 其中非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 在肺癌中占百分之八十至八十五<sup>[1]</sup>。肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 是由多种免疫相关细胞、肿瘤细胞和非细胞成分及可溶性分子所构成的复杂的局部组织状态<sup>[2]</sup>。其中巨噬细胞分化对 NSCLC 发生具有重要影响, 并与肿瘤的发生与发展有着密切的关系。作为 TME 的重要组成部分的肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAM), 其包括经典激活状态和交替激活状态<sup>[3]</sup>。经典的巨噬细胞极化模型: M1 型巨噬细胞是由脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和干扰素 $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 诱导的, 其可释放炎症因子如肿瘤坏死因子 $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12), 以激发细胞免疫应答和抗肿瘤的功能; 由白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 和白细胞介素 13 (interleukin-13, IL-13) 触发的“替代型” M2 型巨噬细胞可释放抗炎因子 IL-10, 抑制免疫反应, 从而促进肿瘤细胞增殖和侵袭<sup>[4,5]</sup>。TAM 在 NSCLC 形成的早期阶段, 通常呈现为 M1 型, 然而在 NSCLC 发展中, TAM 会转变为

M2 型，增加程序性死亡受体配体 2 (programmed death-ligand 2, PD-L2)，这会导致免疫逃逸，从而触发程序性死亡受体 (programmed death receptor-1, PD-1) 信号通路，进一步推动肿瘤的发生发展<sup>[6]</sup>。因此重塑 TAM 是癌症免疫治疗的有效手段。

芜菁 (*Brassica rapa* L.)，俗称芜根，为十字花科芸薹属两年生草本植物<sup>[7]</sup>。研究发现，芜菁的生物活性物质主要包括多糖<sup>[7,8]</sup>、黄酮<sup>[9,10]</sup>、皂苷<sup>[11]</sup>、挥发油<sup>[12,13]</sup>、生物碱<sup>[14,15]</sup>等，其中多糖类是宏量组分<sup>[16]</sup>，其具有润肺、开胸顺气、治疗哮喘、止咳等功效<sup>[17]</sup>。现代药理学研究表明，芜菁的提取物及其成分具备显著抗肿瘤活性<sup>[18]</sup>，能有效促进脾淋巴细胞转化，并诱导 T 细胞和 B 细胞等免疫细胞的增殖，从而增强免疫力、调整白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18)、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、TNF- $\alpha$  细胞因子水平，上调有关凋亡通道的表达，如外混合系列蛋白激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like, MLKL)、受体相互作用蛋白激酶 1 (receptor-interacting protein kinase 1, RIP1)、受体相互作用蛋白激酶 3 (receptor-interacting protein kinase 3, RIP3)<sup>[12,19]</sup>。前期研究表明芜菁多糖具有明显的抗 NSCLC 活性，并且生物活性检测结果显示，高剂量的芜菁多糖能刺激 RAW 264.7 巨噬细胞增殖、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 释放和细胞因子 (白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、TNF- $\alpha$ ) 分泌，而低剂量的芜菁多糖能减少 M1 巨噬细胞细胞因子<sup>[20,21]</sup>。M1 型 TAM 的标志性细胞因子是 IL-6、TNF- $\alpha$ 。因此，本研究以芜菁多糖为研究对象，研究其对巨噬细胞极化的影响以及对人肺鳞癌细胞 H226 的增殖和迁移的影响，为芜菁多糖通过调控巨噬细胞极化而抑制肿瘤提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验材料

本研究所用细胞株，包括人肺鳞癌细胞 NCI-H226 细胞和 RAW 264.7 细胞，均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。芜菁采自新疆阿克苏柯坪县。

#### 1.1.2 实验试剂

NCL-H226 细胞专用培养基 (批号: WH3324C018)、RAW 264.7 细胞专用培养基 (批号: WH2222P051, 武汉普诺赛生命科技有限公司); CCK-8 试剂 (批号: C0005, 上海陶术生物科技有限公司); 4% PFA (批号: 0103A24, 北京雷根生物技术有限公司); BSA (批号: CR2306018)、PBS 缓冲液 (批号: GA23020061693) (武汉塞维尔生物科技有限公司); IL-10 ELISA 试剂盒 (批号: 202404)、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒 (批号: 202404) (上海优选生物科技有限公司); cDNA 合成试剂盒 (批号: R21013)、染料法荧光定量预混试剂 (批号: S10117) (北京全式金生物技术有限公司); DAPI 染色液 (批号: 20150710)、

线粒体膜电位检测试剂盒 JC-1 (批号: 240004003) (北京索莱宝科技有限公司); iNOS 抗体 (批号: 2h43856)、MRC1/CD206 抗体 (批号: 3g55801)、二抗 (批号: 60t9420) (澳大利亚 Affinity 公司); IL-4 (批号: RP01161)、IFN- $\gamma$  (批号: RP01070) (武汉埃博泰克生物科技有限公司); LPS (批号: L2880, 美国 Sigma 公司); 引物 (批号: 260411760, 生工生物工程股份有限公司)。

### 1.1.3 实验仪器

TECANF50 酶标仪 (美国赛默飞世尔科技公司); HERA cell 150 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 (美国 Thermo 公司); SW-CJ-2F 超净台 (美国赛默飞世尔科技公司); SM536287 倒置荧光显微镜 (德国 leica 公司); Q6Flex 实时荧光定量仪 (美国 ABI 公司); TC-96/G/H (b) B PCR 仪 (杭州博日科技股份有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 芜菁多糖的提取方法

按前期优化条件提取得到芜菁粗多糖 (*Brassica rapa* L. polysachharide, BRP)<sup>[22]</sup>。将 BRP 上样与处理好的 DMEM 柱子, 用纯化水和 0.5 mol/L 的 NaCl 洗脱, 分别收集洗脱液、浓缩、用 3 500 Da 分子量的透析袋透析 48 h, 浓缩、冷冻干燥, 分别得到芜菁中性多糖 (*Brassica rapa* L. netural polysachharide, BRNP) 和芜菁酸性多糖 (*Brassica rapa* L. acid polysachharide, BRAP)。

### 1.2.2 CCK-8 法检测 BRP、BRNP 和 BRAP 对 RAW 264.7 活性的影响

取对数生长期的 RAW 264.7 细胞调整为  $2 \times 10^5$  个/mL, 100  $\mu$ L/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h, 按照 BRP、BRNP 和 BRAP 各质量浓度为 0、50、100、200、300、350、400、500、600、800、1 000  $\mu$ g/mL 给药培养培养 24 h。每孔加入 100  $\mu$ L 新配制溶液 (CCK8:完培=1:9), 孵育 30 min, 酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 (optical density, OD), 参照 CCK-8 试剂盒说明书的公式计算细胞的存活率, 筛选 BRP、BRNP 和 BRAP 的最佳作用浓度。

### 1.2.3 CCK-8 法检测 BRAP 对 H226 细胞增殖的影响

取对数生长期的 H226 细胞以每孔  $5 \times 10^3$  接种于 96 孔板, 培养 24 h, 取出 96 孔板, 吸弃原有液, 每列按空白组和各浓度给药组进行药物干预, 培养 24 h, 弃去原液, 每孔加入 100  $\mu$ L 新配制溶液 (CCK8:完培=1:9), 孵育 1 h, 在 450 nm 处检测 OD 值, 计算半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) 和增殖率。

### 1.2.4 线粒体膜电位实验

取对数生长期的 H226 细胞以每孔  $2 \times 10^5$  个接种于 6 孔板中。待细胞贴壁后, 按 BRAP

质量浓度 0、1/4 IC<sub>50</sub>、1/2 IC<sub>50</sub>、IC<sub>50</sub> 进行给药干预，依次设置为正常组（control group, Con），BRAP 低剂量组（BRAP in low dose group, BRAP-L, 24.46 μg/mL）、BRAP 中剂量组（BRAP in middle dose group, BRAP-M, 48.92 μg/mL）、BRAP 高剂量组（BRAP in high dose group, BRAP-H, 97.84 μg/mL）放入 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱。24 h 后取出 6 孔板，向阳性对照组（positive control group, Pos）的细胞每孔加入 2 μL 的羰基氰化物间氯苯胺，在培养箱内孵育 20 min，取出 6 孔板，弃原有液，每孔加 1 mL 的完全培养基和 1 mL JC-1 工作液，孵育 20 min，用 JC-1 染色缓冲液（1×）洗去残留的溶液，每孔加 2 mL 完全培养基，在倒置荧光显微镜下拍照并计算单位面积下红色荧光强度与绿色荧光强度的比值。

### 1.2.5 划痕实验

用油性记号笔在 6 孔板每孔背面划 3 条等间距的平行线，取对数生长期的 H226 细胞以每孔 2×10<sup>5</sup> 个接种于 6 孔板中。当细胞密度达 90% 时，采用 0.2 mL 吸头垂直孔底划痕，每孔 3 条。吸弃原有液，用 PBS 清洗 2 遍，给药干预，培养 24 h。倒置荧光显微镜拍照记录各组细胞 0、24 h 时的划痕情况并计算愈合率。

### 1.2.6 RAW 264.7 细胞极化模型制备及分组

M1 型巨噬细胞极化：收集培养 24 h 的 RAW 264.7 细胞，1 000 r/min 离心 5 min，加入 2 mL 完全培养基重悬后，均匀加入 6 孔板中，待细胞贴壁后加入 100 ng/mL LPS 和 20 ng/mL IFN-γ 干预 24 h，使巨噬细胞向 M1 型极化。

M2 型巨噬细胞极化：收集培养 24 h 的 RAW 264.7 细胞，1 000 r/min 离心 5 min，加入 2 mL 完全培养基重悬后，均匀加入 6 孔板中，待细胞贴壁后加入 50 ng/mL IL-4 干预 24 h，使巨噬细胞向 M2 型极化。

将培养 24 h 的 RAW 264.7 细胞将分为 9 组：M0 正常组（M0 control group, Con-M0）、M1 模型组（M1 model group, Mod-M1）、M2 模型组（M2 model group, Mod-M2）、M1+ 芫菁粗多糖组（M1 BRP group, BRP-M1）、M2+ 芫菁粗多糖组（M2 BRP group, BRP-M2）、M1+ 芫菁中性多糖组（M1 BRPNP group, BRNP-M1）、M2+ 芫菁中性多糖组（M2 BRNP group, BRNP-M2）、M1+ 芫菁酸性多糖组（M1 BRAP group, BRAP-M1）、M2+ 芫菁酸性多糖组（M2 BRAP group, BRAP-M2）。除了 M0 正常组之外，其他组按以上方法进行造模，并给 BRP、BRNP、BRAP 进行培养 24 h。

### 1.2.7 ELISA 法检测各组细胞上清中 M1/M2 型巨噬细胞极化相关细胞因子水平

RAW 264.7 细胞按照 2×10<sup>4</sup> 个/孔接种于 24 孔板，培养 24 h，弃去上清，再按“1.2.6”项下的方法继续培养 24 h，取上清，在 4 °C 下 3 000 r/min 条件下离心 15 min，取上清，根

据试剂盒说明书的步骤检测其中 TNF- $\alpha$ 、IL-10 含量。

### 1.2.8 免疫荧光法检测 M1/M2 型巨噬细胞标志物的表达

在 24 孔板上接种 RAW 264.7 细胞，每孔数量为  $4 \times 10^5$  个，培养 24 h。按“1.2.6”项下的方法给药培养 24 h，PBS 洗涤，4% PFA 固定，用 PBST 清洗。加 5% PBST 溶解的 BSA 及 Triton 溶液封闭 1 h。加入 iNOS 抗体、MRC1/CD206 抗体稀释液（CD206（1：100）、iNOS（1：100）），4 °C 孵育过夜。用 PBS 清洗 3 次。滴加二抗孵育 2 小时。用 PBS 清洗 3 次，加 DAPI 孵育 5 min，用 PBST 清洗 3 次。将爬片放到载玻片上，封片后观察荧光，采集照片。

### 1.2.9 q-PCR 检测 M1/M2 型巨噬细胞标志物基因表达

按“1.2.6”项中方法处理干预 24 h，收集 RAW264.7 细胞，用 Trizol 法提取 RNA。按 TB Green q-PCR 试剂盒说明书步骤操作。引物设计如下表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列 (5'→ 3')
Gene name	Primer sequences (5'→ 3')
<i>IL-6</i>	F:CTTCTTGGGACTGATGCTGGTGAG
	R:AGGTCTGTTGGGAGTGGTATCCTC
<i>Arg1</i>	F:GGCAACCTGTGTCCTTCTCCTC
	R:GGTCTACGTCTCGCAAGCCAATG
<i>GAPDH</i>	F:GGCAAATTCAACGGCACAGTCAAG
	R:TCGCTCCTGCAAGATGGTGATGG

### 1.2.10 数据处理与统计分析

采用 SPSS、ImageJ 等软件进行数据分析，采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行图表制作，数据以平均值 $\pm$ 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，两组之间的比较应用非配对 t 检验或非参数检验，多组间比较使用方差分析，以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 BRP、BRNP 和 BRAP 对 RAW 264.7 活性的影响

为了排除 BRP、BRNP 和 BRAP 采用的浓度对 M0 巨噬细胞活力的影响，本实验采用 CCK-8 法检测 BRP、BRNP、BRAP 对于 M0 巨噬细胞增殖活力的影响。结果如图 1 所示，随着 BRP 浓度增大，细胞活力提高；当 BRP 浓度为 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时细胞活力最大，当 BRP

浓度大于 350  $\mu\text{g/mL}$  时, 细胞活力降低 ( $P < 0.001$ ) ; 随着 BRNP 浓度增大, 细胞活力提高 ( $P < 0.001$ ) ; 随着 BRAP 浓度增大, 细胞活力提高 ( $P < 0.01$ ) 。根据结果当给药浓度为 350  $\mu\text{g/mL}$  时 BRP、BRNP、BRAP 对 M0 巨噬细胞活力影响最相近, 因此之后的实验采用 350  $\mu\text{g/mL}$  分别作为三种多糖的给药浓度。

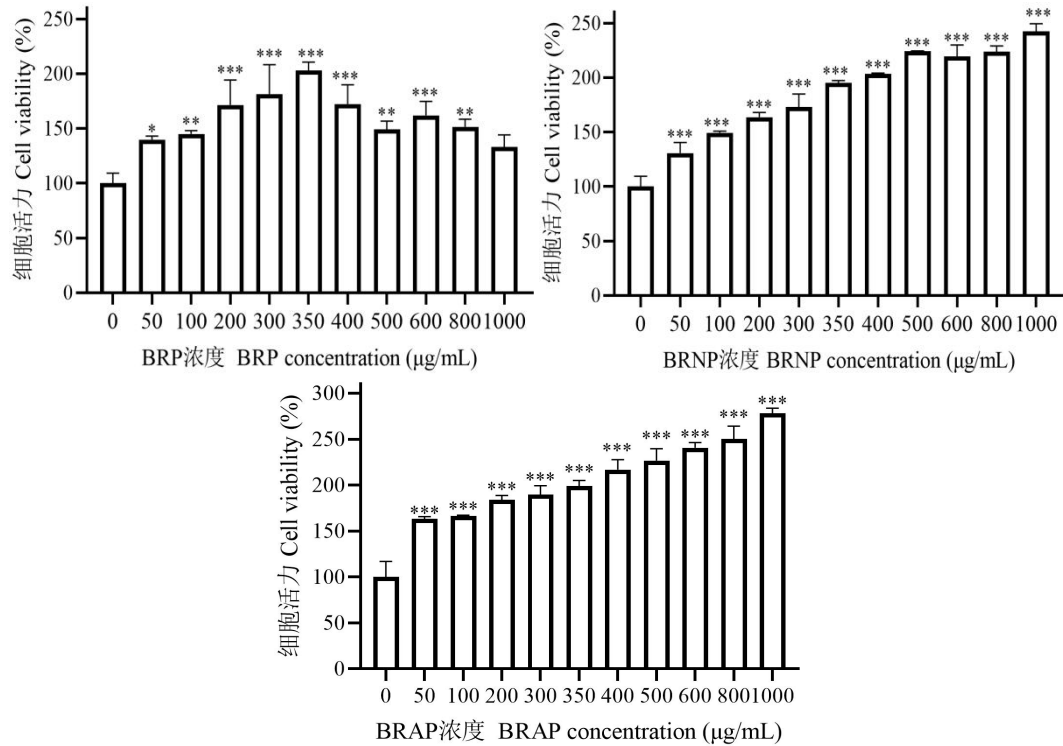


图 1 不同浓度 BRP, BRNP, BRAP 对 RAW 264.7 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig.1 Effect of different concentrations of BRP, BRNP, BRAP on RAW264.7 cell activity ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: 与 Con-M0 比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。Note: Compared with Con-M0, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

## 2.2 CCK8 法检测 BRAP 对人肺鳞癌细胞 H226 的增殖情况

如图 2 所示, 实验组与对照组相比较, 随着 BRAP 的浓度增加, 人肺鳞癌细胞 H226 活性逐渐降低, 呈浓度依赖性, BRAP 浓度越高对人肺鳞癌细胞 H226 的抑制率越高 ( $P < 0.001$ )。用非线性回归方程拟合曲线得到 BRAP 浓度为 97.84  $\mu\text{g/mL}$  时, 人肺鳞癌细胞 H226 增殖被抑制了 50%。

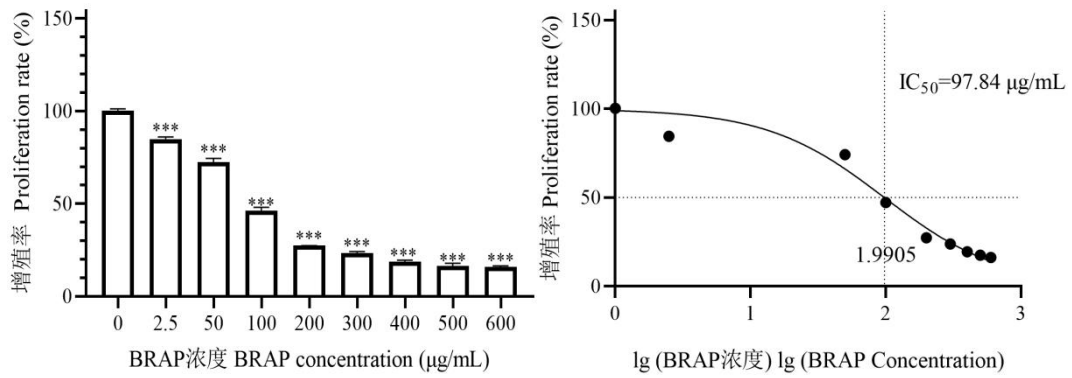


图2 BRAP 对人肺鳞癌细胞 H226 的增殖作用影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig.2 Effect of BRAP on the proliferation of human lung squamous cell carcinoma cells H226 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: 与 Con 比较, \*\*\* $P < 0.001$ 。 Note: Compared with Con, \*\*\* $P < 0.001$ 。

### 2.3 线粒体膜电位实验

如图 3 所示, Pos 与 Con 比较, 经药物 CCCP 处理后的细胞, 线粒体膜电位极显著下降, 显微镜视野下以绿色荧光为主, BRAP-L、BRAP-M 和 BRAP-H 与 Con 比较, 随着 BRAP 浓度的增加, 绿色荧光区逐渐增多 ( $P < 0.001$ )。结合 JC-1 试剂盒原理可知, BRAP 降低 H226 细胞的线粒体膜电位从而导致绿色荧光区增多。综上所述, BRAP 降低 H226 细胞的线粒体膜电位, 呈剂量依赖性。

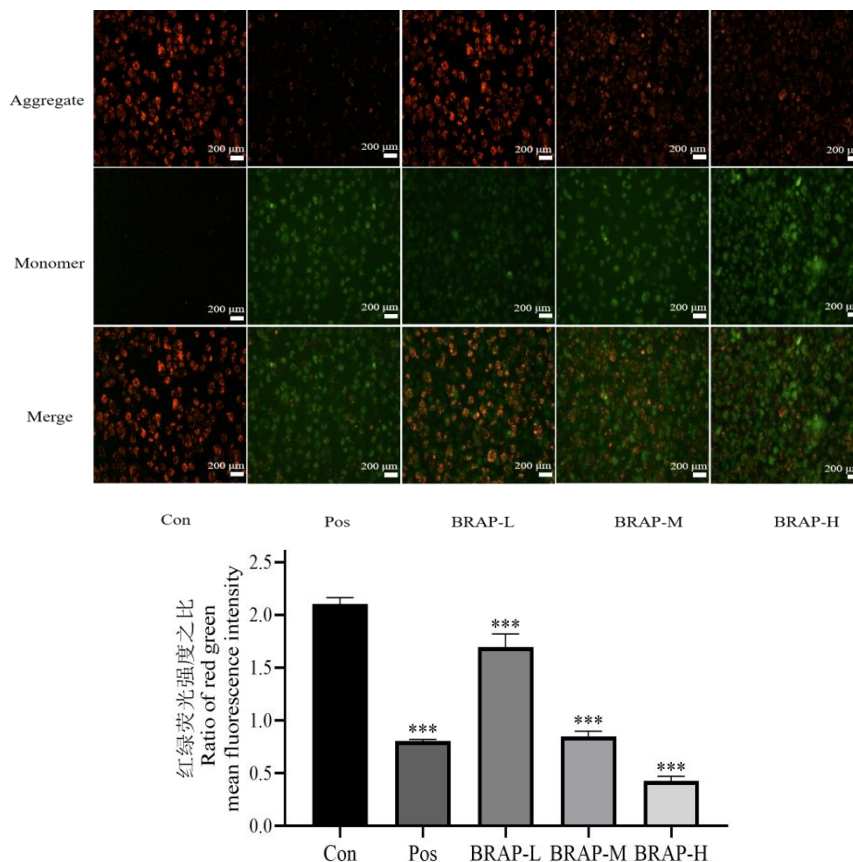


图3 BRAP 对人肺鳞癌细胞 H226 中的线粒体膜电位的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig.3 Effect of BRAP on mitochondrial membrane potential in human lung squamous cell carcinoma cells H226



( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注：与 Con 比较，\*\*\* $P < 0.001$ 。Note: Compared with Con, \*\*\* $P < 0.001$ .

## 2.4 划痕实验结果

如图 4 所示，与 Con 比较，给药 24 h 之后 H226 细胞的愈合率降低 ( $P < 0.001$ )，随着 BRAP 浓度的升高，H226 细胞的愈合率越低，呈剂量依赖性。以上可知，芫菁酸性多糖可抑制 H226 细胞的迁移。

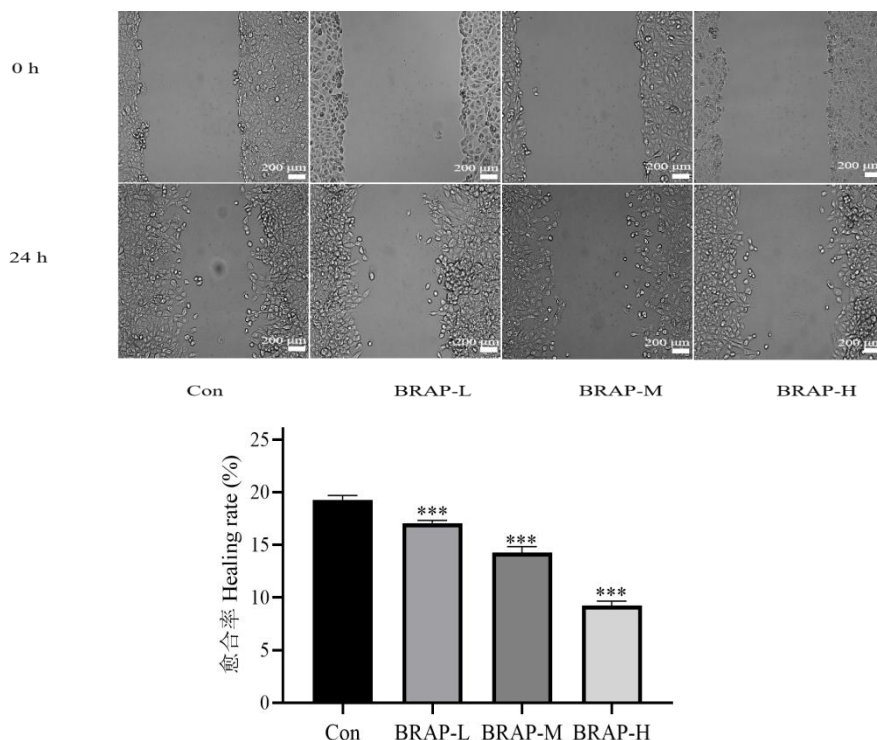


图 4 BRAP 对人肺鳞癌细胞 H226 的迁移的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig.4 Effect of BRAP on the migration of H226 cells from human lung squamous cell carcinoma ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注：与 Con 比较，\*\*\* $P < 0.001$ 。Note: Compared with Con, \*\*\* $P < 0.001$ .

## 2.5 BRP、BRNP 和 BRAP 对 M1、M2 型 TAM 细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-10 分泌的影响

本研究采用 ELISA 分别检测了 BRP、BRNP 和 BRAP 处理巨噬细胞后 TNF- $\alpha$ 、IL-10 的分泌水平。结果如图 5 所示，Mod-M1、Mod-M2 以及给药组的细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-10 分泌水平高于 Con-M0 ( $P < 0.05$ )；给药组 TNF- $\alpha$ 、IL-10 的分泌水平低于 Mod-M1、Mod-M2 ( $P < 0.05$ )。以上结果可知，三种多糖都能降低 Mod-M1、Mod-M2 的 TNF- $\alpha$ 、IL-10 的分泌水平。其中，BRAP 降低巨噬细胞 TNF- $\alpha$  分泌量效果最显著，BRNP 降低 IL-10 分泌量效果最显著。

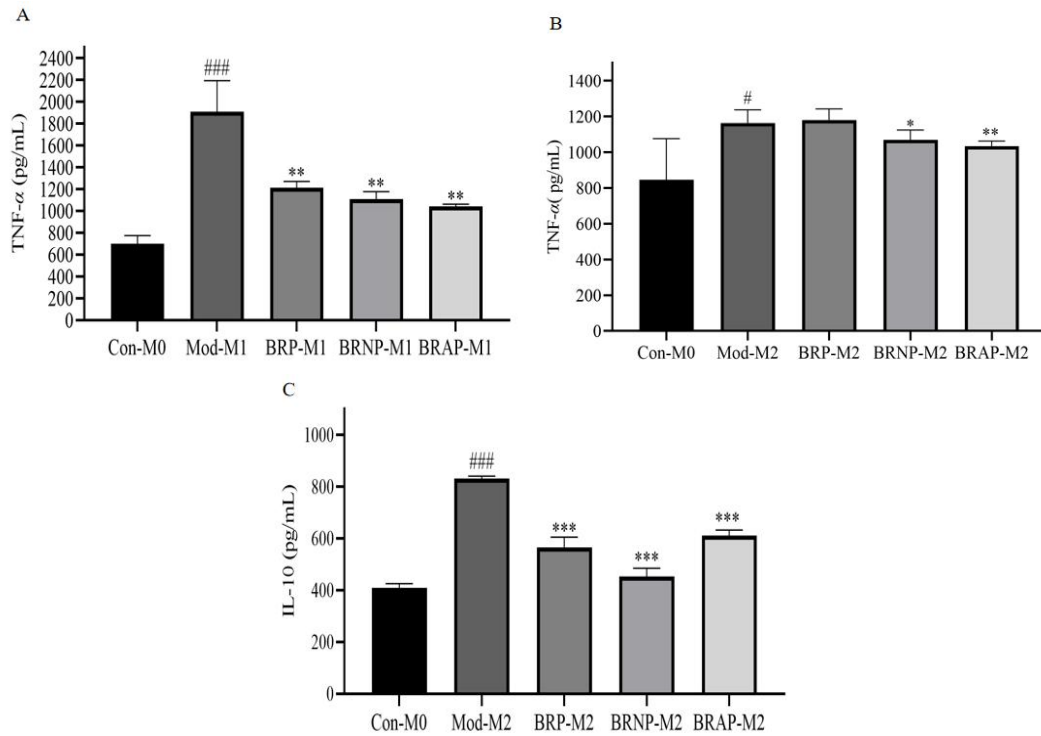


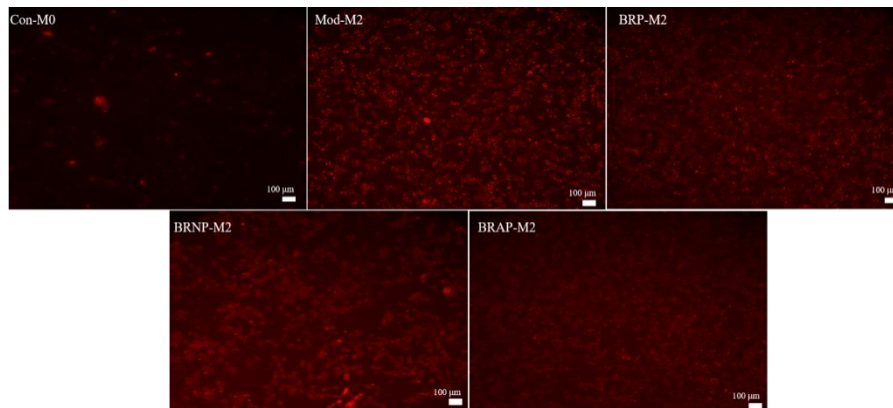
图5 BRP、BRNP 和 BRAP 对巨噬细胞分泌免疫因子的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig.5 Effects of BRP, BRNP and BRAP on the secretion of immune factors by macrophages ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 注: 与 Con-M0 比较, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ ; 与 Mod-M1、Mod-M2 比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with Con-M0, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ ; Compared with Mod-M1 and Mod-M2, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

## 2.6 免疫荧光法检测 M2 型巨噬细胞标志物的表达

如图 6 所示, Mod-M2 的相对荧光强度高于 Con-M0 ( $P < 0.001$ ); 给药组的相对荧光强度高于 Mod-M2 型巨噬细胞组 ( $P < 0.01$ )。以上结果可知 BRP、BRNP、BRAP 能下调 M2 型巨噬细胞 CD206 表达, 其中 BRAP 效果最显著。



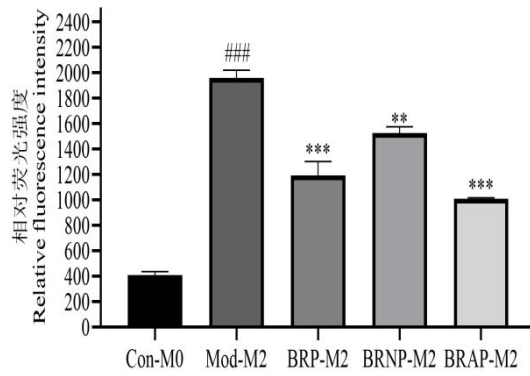


图6 BRP、BRNP和BRAP对巨噬细胞CD206表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig.6 Effects of BRP, BRNP and BRAP on CD206 expression ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: 与 Con-M0 比较, ### $P < 0.001$ ; 与 Mod-M2 比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。Note: Compared with Con-M0, ### $P < 0.001$ ; Compared with Mod-M2, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

如图7所示,与Con-M0、Mod-M2比,给药组的相对荧光强度高于Con-M0及Mod-M2 ( $P < 0.001$ )。以上结果可知,BRP、BRNP、BRAP可上调M2型巨噬细胞中iNOS蛋白表达,其中BRAP效果最显著。

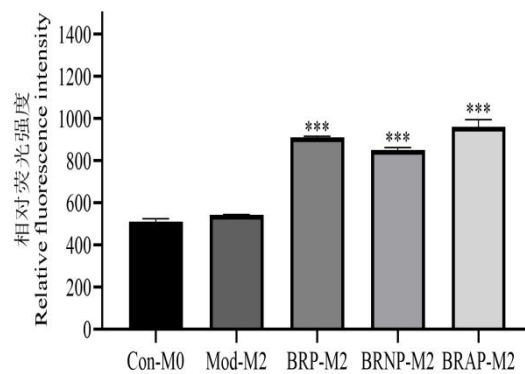
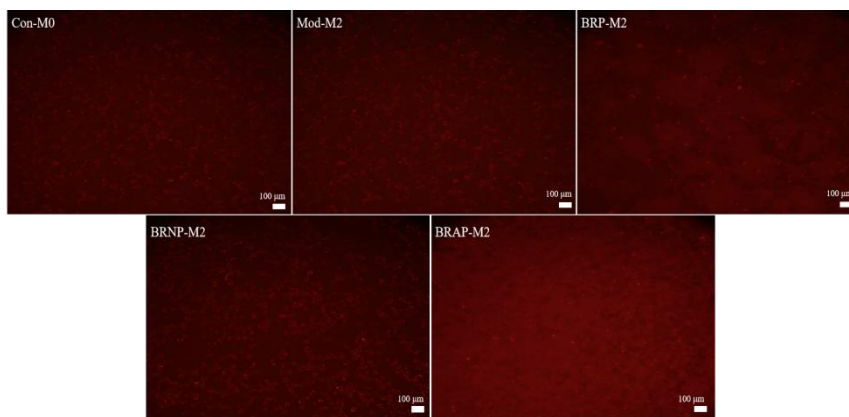


图7 BRP、BRNP和BRAP对巨噬细胞iNOS表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig.7 Effects of BRP, BRNP and BRAP on the expression of iNOS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: 与 Mod-M2 比较, \*\*\* $P < 0.001$ 。Note: Compared with Mod-M2, \*\*\* $P < 0.001$ .

## 2.7 q-PCR 检测 M1/M2 型 TAM 标志物基因表达

如图 8 所示, M1 型巨噬细胞中 *IL-6* 基因的 mRNA 表达水平高于 Con-M0 ( $P < 0.001$ ); 给药组中 *IL-6* 基因的 mRNA 表达水平低于 Mod-M1 ( $P < 0.05$ ); Mod-M2 中 *Arg-1* 基因的 mRNA 表达水平高于 Con-M0 ( $P < 0.01$ ); 给药组中 *Arg-1* 基因的 mRNA 表达水平低于 Mod-M2 ( $P < 0.05$ )。以上结果可知, BRP、BRNP、BRAP 降低 M1 型巨噬细胞 *IL-6* mRNA 的表达以及 M2 型巨噬细胞 *Arg-1* mRNA 的表达, 其中 BRNP 对 *IL-6* mRNA 表达的影响最显著, BRAP 对 *Arg-1* mRNA 表达的影响最显著。

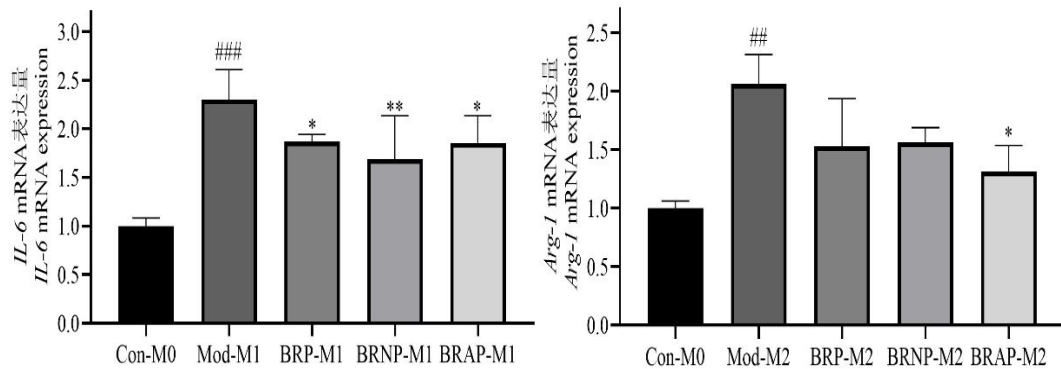


图 8 巨噬细胞中 *Arg-1*、*IL-6* mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig.8 Expression levels of *Arg-1* and *IL-6* mRNA in macrophages ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: 与 Con-M0 比较, ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ ; 与 Mod-M1、Mod-M2 比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。Note: Compared with Con-M0, ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ ; Compared with Mod-M1 and Mod-M2, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

### 3 讨论与结论

NSCLC 是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一。近年来随着分子靶向治疗的发展, 晚期 NSCLC 的治疗效果得到了很大改善<sup>[23]</sup>。TME 是肿瘤细胞生存的特殊环境, 由各组细胞和生化因子组成, 是影响肿瘤治疗 (如靶向治疗或免疫治疗) 疗效的关键因素<sup>[22]</sup>。TAM 是 TME 中最常见的与免疫系统相关的基质细胞, 并且被选择性激活之后, 促进癌症增殖、侵袭和转移, 从而导致患者预后不良。同时, 癌细胞激活 TME 中的巨噬细胞和其他非恶性基质细胞, 如成纤维细胞和血管内皮细胞, 以诱导恶性肿瘤<sup>[24]</sup>。这表明肿瘤细胞和 TAM 之间存在促进恶性肿瘤的正反馈。

细胞进行能量代谢主要与线粒体有关, 线粒体膜电位发生改变, 则线粒体功能也发生改变。已有研究表明, 细胞的线粒体膜电位的降低使细胞内 ATP 的生成减少, 影响细胞的增殖能力, 线粒体膜电位的改变也可诱导细胞凋亡<sup>[25,26]</sup>。

本研究以 RAW 264.7 为实验对象, 研究芫菁多糖对巨噬细胞极化的影响。ELISA 实验结果显示, BRAP 降低巨噬细胞 TNF- $\alpha$  分泌量效果最显著; BRNP 降低 M2 型巨噬细胞 IL-10 分泌量效果最显著。免疫荧光实验结果显示, BRAP 降低 M2 型巨噬细胞的 CD206 蛋白的

表达及上调 iNOS 蛋白的表达效果最显著。q-PCR 实验结果显示, BRNP 降低 M1 型巨噬细胞 *IL-6* mRNA 的表达效果最显著, BRAP 降低 M2 型巨噬细胞 *Arg-1* mRNA 的表达效果最显著。以上可知, 芜菁多糖可抑制巨噬细胞向 M2 型表型极化, 其中 BRNP 和 BRAP 的效果较好。根据 CCK-8 实验结果, 发现 BRAP 抑制 H226 细胞的增殖。进一步进行线粒体膜电位实验, 发现 BRAP 能降低 H226 细胞的线粒体膜电位。进行划痕实验, 发现 BRAP 能抑制 H226 细胞的迁移。以上结果表明, BRAP 通过降低线粒体膜电位来抑制 H226 细胞的增殖与迁移。此研究结果表明, 芜菁多糖能对肿瘤相关巨噬细胞极化起作用, 也能对非小细胞肺癌 H226 细胞增殖和迁移起作用, 这为后期巨噬细胞和 H226 细胞共培养研究提供实验数据支撑, 为进一步研究芜菁多糖通过抑制巨噬细胞极化来治疗肺癌提供基础。

综上所述, 芜菁多糖能抑制巨噬细胞向 M2 型表型极化, 抑制 H226 细胞的增殖和迁移。此研究为芜菁多糖通过抑制巨噬细胞极化来治疗肺癌提供基础。

#### 参考文献

- 1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *Ca-Cancer J Clin* 2021, 71:209-249.
- 2 Boutilier AJ, ElSawa SF. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment[J]. *Int J Mol Sci* 2021, 22:6995.
- 3 Chen YS, Wang TT, Han XY, et al. Effect of M1 macrophage polarization regulated by berberine combined with curcumin on atherosclerosis[J]. *J Pract Med(实用医学杂志)*, 2024, 40:1915-1921.
- 4 Jia R, Hui Y, Yan SG, et al. Research progress on relationship between macrophage M1/M2 polarization and immune inflammatory diseases[J]. *Chin J Immunol(中国免疫学杂志)*, 2021, 37:2791-2797.
- 5 Miyoshi T, Aokage K, Wakabayashi M, et al. Prospective evaluation of watchful waiting for early-stage lung cancer with ground-glass opacity: a single-arm confirmatory multicenter study: japan clinical oncology group study JCOG1906 (EVERGREEN study)[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2021, 51:1330-1333.
- 6 Yang H, Zhang Q, Xu M, et al. CCL2-CCR2 axis recruits tumor associated macrophages to induce immune evasion through PD-1 signaling in esophageal carcinogenesis[J]. *Mol Cancer*, 2020, 27:19:41.
- 7 Wang W, Yang XJ, Gao L, et al. Optimization the extraction process of polysaccharide by response surface methodology from *Brassica rapa* L. and its antioxidant activity[J]. *Sci Technol Food Ind(食品工业科技)*, 2018, 39:229-233.
- 8 Wang W, Buligen JLBK, Chen K, et al. Composition analysis and immunoactivity evaluation of pectic polysaccharide from *Brassica rapa* L. in Xinjiang Uygur Autonomous region[J]. *Sci Technol Food Ind(食品工业科技)*, 2019, 40:62-67.
- 9 Chen WB, Shi Y, Zhang BW, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activity of flavonoids from *Brassica rapa*[J]. *J Jiangxi Univ Tradit Chin Med(江西中医药大学学报)*, 2019, 31:115-118.
- 10 Song SH, Liu PY, He HJ, et al. Analysis of nutritional components and glucosinolates in turnip[J]. *Acta Nutri Sin(营养学报)*, 2016, 38:610-612.
- 11 Itoh T, Ninomiya M, Nozawa Y, et al. Chalcone glycosides isolated from aerial parts of *Brassica rapa* L. hidabeni suppress antigen-stimulated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells[J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18:7052-7057.
- 12 Chen ZE, Gunana DSBK, Wu Y. Study on the anti-tumor effect of aqueous extract from *Brassica rapa*

- L.[J].North-west Pharm J(西北药学杂志),2016,31:264-267.
- 13 Li HZ,Qi Y,Guo SC,et al.Protective effect of *Brassica rapa* volatile oli on rat skin photo aging induced by UV[J].North-west Pharm J(西北药学杂志),2021,36:745-750.
  - 14 Wan L,Sun M,Liu GJ,et al.Long noncoding RNA PVT1 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation through epigenetically regulating LATS2 expression[J].Mol Cancer Ther,2016,15:1082-1094.
  - 15 Chen WB,Ye YH,Zhang BW.Research progress on extraction process and pharmacology activity of polysaccharide from *Brassica rapa* L.[J].J Jiangxi Univ Tradit Chin Med(江西中医药大学学报),2018,3:110-114.
  - 16 Ma YD,Li XJ,Zhao ML,et al.Evaluation of nutrient components of different turnip germplasm resources[J].Food Ferment Ind(食品与发酵工业),2021,19:277-287.
  - 17 Xiao C,Wu Q,Zhang J.Antidiabetic activity of ganoderma lucidum polysaccharides F31 down-regulated hepatic glucose regulatory enzymes in diabetic mice[J].J Ethnopharmacol,2017,196:47-57.
  - 18 Jin H,Li M,Tian F,et al.An overview of antitumour activity of polysaccharides[J].Molecules,2022,27:8083-8083.
  - 19 Gulmila K,Amannisa M,Li MZ,et al.The antitumor activity of *Brassica rapa* L. acid polysaccharides *in vivo*[J].Food Mach(食品与机械),2024,40:149-155.
  - 20 Zhuo EC,Reziyamu W,Jin HJ,et al.Structural characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L.[J].J Agric Food Chem,2017,65:9685-9692.
  - 21 Wufuer R,Bai J,Liu Z,et al.Biological activity of *Brassica rapa* L.polysaccharides on RAW 264.7 macrophages and on tumor cells[J].Bioorg Med Chem,2020,28:115330.
  - 22 Gulmila K,Ajiranmu ABL,Ren GR,et al.Study on the deproteinization and inhibitory effects on the pyroptosis of RAW264.7 macrophages of *Brassica rapa* L. polysaccharide[J].J Food Saf Qual(食品安全质量检测学报),2023,14:183-190.
  - 23 Li Z,Zhang Z,Fang L,et al.Tumor microenvironment composition and related therapy in hepatocellular carcinoma[J].J Hepat Carcin,2023,10:2083-2099.
  - 24 Guo Z,Song J,Hao J,et al.M2 macrophages promote NSCLC metastasis by upregulating CRYAB[J].Cell Death Dis,2019,10:377.
  - 25 Abdurrahim K, Metin EG.Curcumin induce DNA damage and apoptosis through generation of reactive oxygen species and reducing mitochondrial membrane potential in melanoma cancer cells.[J].Cell Mol Biol ,2017,63:97-105.
  - 26 Duan G,Hou S, Ji J,et al.The study of sclareol in inhibiting proliferation of osteosarcoma cells by apoptotic induction and loss of mitochondrial membrane potential[J].Cancer Bio,2018,22:29-34.

收稿日期: 2024-07-31 接受日期:

基金项目: 新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室开放课题项目(2024XJTR009); 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目(2022A03007-3); 国家自然科学基金地区科学基金项目(81960765)

\*通信作者 E-mail:hailiqian2471@sina.com, liujiuzhou\_career@163.com