

菊粉对巨噬细胞 RAW 264.7 免疫活性的影响

牛甜, 杨帅, 段宏伟, 成文婧, 张丽鸿*, 胡俊杰*

甘肃农业大学动物医学院 甘肃省动物生殖生理及繁殖调控重点实验室, 兰州 730070

摘要: 菊粉 (inulin, INU) 作为一种植物多糖, 因具有广泛的应用价值以及增强免疫、抗炎、抗肿瘤等生物学功能而备受关注。但目前关于 INU 调节免疫活性的研究还相对较少。本试验旨在探究 INU 对巨噬细胞 RAW 264.7 免疫活性的影响。采用细胞增殖检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK8)、中性红试验检测 INU 对巨噬细胞 RAW 264.7 增殖活性和吞噬活性的影响。采用格里斯试剂法和免疫酶联吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测细胞中一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和细胞因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的释放量。实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR) 检测细胞因子 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) 的基因表达量以及免疫蛋白印迹 (Western blotting, WB) 检测 INU 对巨噬细胞 RAW 264.7 中环氧化酶 2 (cyclooxygenase 2, COX2)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和丝裂原蛋白活化激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 相关通路关键蛋白表达的影响。实验结果表明, INU 显著增强 RAW 264.7 细胞的增殖活性、吞噬活性并促进 NO 的分泌及 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达水平 ($P < 0.01$)。此外, INU 还以浓度依赖的方式显著上调了 COX2、iNOS 及 MAPK 通路中磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (phosphorylated extracellular regulatory protein kinase, p-ERK)、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase, p-p38) 的蛋白表达 ($P < 0.01$)。综上所述, INU 可通过 ERK/p38MAPK 通路调控巨噬细胞的免疫活性, 具有良好的免疫调节能力。

关键词: 菊粉; 巨噬细胞 RAW 264.7; MAPK 信号通路; 免疫活性

中图分类号: R967

文献标识码: A

Effect of inulin on the immune activity of RAW 264.7 macrophages

NIU Tian, YANG Shuai, DUAN Hong-wei, CHENG Wen-jin, ZHANG Li-hong*, HU Jun-jie*

Gansu Provincial Key Laboratory of Animal Reproductive Physiology and Reproductive Regulation, College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Inulin (INU), as a plant polysaccharide, has attracted much attention due to its wide application value and enhancement of immune, anti-inflammatory, anti-tumor and other biological functions. However, there are relatively few studies on the regulation of immune activity by INU. The aim of this study was to investigate the effect of INU on the immune activity of macrophage RAW 264.7. The effects of INU on the proliferative activity and phagocytotic

activity of RAW 264.7 macrophages were detected by cell counting kit-8 (CCK8) and neutral red test. The Griess assay and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect the release of nitric oxide (NO) and cytokines interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor - α (TNF - α) in cells. Real time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was used to detect the gene expression levels of cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF - α), and Western blotting (WB) was used to detect the effects of INU on the expression of key proteins related to cyclooxygenase 2 (COX2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and mitogen activated protein kinase (MAPK) pathways in RAW 264.7 macrophages. The results showed that INU significantly enhanced the proliferative activity and phagocytosis activity of RAW 264.7 cells and promoted the secretion of NO and the expression levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α ($P<0.01$). In addition, INU significantly up-regulated the protein expression of phosphorylated extracellular regulatory protein kinase (p-ERK) and phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38) in COX2, iNOS and MAPK pathways in a concentration-dependent manner ($P<0.01$). In summary, INU can regulate the immune activity of macrophages through the ERK/p38MAPK pathway, and has a good ability of immune regulation.

Key words: inulin; macrophage RAW 264.7; MAPK signaling pathway; immunoactivity

植物多糖具有多种生物活性，包括参与调节机体的免疫反应^[1]，发挥抗肿瘤^[2]、抗氧化和抗病毒^[3]等生物学功能，在畜禽生产中已被广泛应用。菊粉（inulin, INU）也是一种天然多糖，存在于菊苣、菊芋和蒲公英等多种植物中^[4]，具有膳食纤维和益生元的双重作用。此外，INU还能有效调节肠道菌群平衡，促进肠道对矿物质等营养的吸收^[5]，并增强肠道免疫防御功能，在改善畜禽生产和繁殖性能方面具有重要的经济和药用价值^[6,7]。

巨噬细胞是机体重要的免疫效应细胞，具有分泌细胞因子、调节机体平衡和保护机体免受病原体侵害等生物学功能^[8]。巨噬细胞通过吞噬作用、细胞毒性、识别呈递抗原和直接杀死异物的方式参与先天免疫和适应性免疫。巨噬细胞活化后，不仅能够吞噬病原体，还可释放多种细胞因子，包括白细胞介素-6（interleukin-6, IL-6）、白细胞介素-1 β （interleukin-1 β , IL-1 β ）、一氧化氮（nitric oxide, NO）和肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）等来间接抵抗外来的病原体^[9,10]。在免疫调节信号通路中，丝裂原蛋白活化激酶（mitogen activated protein kinase, MAPK）信号通路是介导细胞传递信号的途径之一，可将胞外信号转入胞内，通过级联放大，参与调控多种生理学功能^[11]。MAPK 途径激活后可诱导巨噬细胞释放促炎或抗炎介质，调节机体免疫功能^[12]。

本研究旨在探讨 INU 对小鼠腹腔巨噬细胞系 RAW 264.7 免疫活性的调节作用。通过检测 RAW 264.7 细胞的增殖活性、吞噬活性、NO 释放量以及细胞因子（IL-6、IL-1 β 、TNF- α ）的表达与分泌水平，以期 INU 的开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞与材料

小鼠单核巨噬细胞系 RAW 264.7 (批号: 2LALU9OAAH, 武汉普诺赛生命科技有限公司); 菊粉 (批号: A14IS212552, 上海源叶生物科技有限公司)。

1.1.2 主要试剂

DMEM 培养基 (批号: 8123024, 美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (批号: S3903341, 美国 Invigentech 生物公司); 细胞培养瓶 (批号: 36522601, 美国 Corning 生物公司); CCK-8 试剂盒 (Cell Counting Kit-8, CCK8) (批号: 021723230417)、中性红检测试剂盒 (批号: 092222230329)、一氧化氮检测试剂盒 (批号: 052223231114) (上海碧云天生物技术有限公司); ELISA 试剂盒 IL-1 β (批号: 202308)、ELISA 试剂盒 IL-6 (批号: 202308)、ELISA 试剂盒 TNF- α (批号: 202308) (上海远慕生物科技有限公司); RNA 提取试剂盒 (批号: A5A0642)、反转录试剂盒 (批号: A5A2997) (长沙艾科瑞生物公司); 抗体: 细胞外调节蛋白激酶 1 (extracellular regulated protein kinases 1, ERK1) (批号: T02231770)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶 1/2 (phosphorylated extracellular regulatory protein kinase 1/2, p-ERK1/2) (批号: T04091512)、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase, p-p38) (批号: T02021576) (沈阳万类生物科技有限公司); 抗体: p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38) (批号: 00108974)、环氧合酶 2 (cyclooxygenase 2, COX2) (批号: 00052009)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) (批号: 00115089)、山羊抗兔 (Goat Anti-Rabbit) (批号: 20001249) (武汉三鹰生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 RAW 264.7 细胞培养

RAW 264.7 细胞的培养: 小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 于完全培养基 (含 10%胎牛血清、100 U/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素) 中生长, 将细胞瓶置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。当细胞数目达到 70%~80%时进行传代, 用细胞刮刀轻轻刮取细胞, 1 100 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重悬细胞于完全培养基中, 37 °C、5%CO₂ 条件下培养, 传至 3~4 代时, 用计数板计数, 调整细胞浓度为 1 \times 10⁵ 个/mL 备用。

1.2.2 细胞增殖活性检测

巨噬细胞 RAW 264.7 的处理：方法参考文献^[13]，INU 浓度参考文献^[14]稍作修改。将 RAW 264.7 细胞接种于 96 孔板，每孔细胞悬液（浓度为 1×10^5 个/mL）100 μL 。设空白组（加 100 μL 含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基于空白孔中）、阴性对照组（加 100 μL 含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基于细胞孔中）、阳性对照组（加 100 μL 终浓度为 1 mg/L 脂多糖（lipopolysaccharides, LPS）于细胞孔中）、实验组（分别加 100 μL 终浓度为 0.25, 0.5, 0.75 g/L 的 INU 溶液于细胞孔中），每组设 6 个复孔，处理细胞后再培养 12 h。按照 CCK-8 试剂盒说明书操作，每孔加 10 μL 的 CCK-8 溶液，培养箱中再孵育 1 h 后使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值（ $A_{450 \text{ nm}}$ ），计算细胞增殖率（ R ）。

$$R=(A_3-A_1)/(A_2-A_1) \times 100\%$$

式中， A_1 ：具有培养基和 CCK8 溶液而没有细胞的孔的吸光度； A_2 ：具有细胞、CCK8 溶液而没有药物溶液的孔的吸光度； A_3 ：具有细胞、CCK8 溶液和药物溶液的孔的吸光度

1.2.3 吞噬能力检测

采用中性红试剂检测细胞吞噬能力。将 RAW 264.7 细胞以 1×10^5 个/mL 的密度每孔 200 μL 接种于 96 孔板中培养 24 h，处理细胞后再培养 12 h，按照中性红检测试剂盒说明书操作，弃去细胞培养液并用 PBS 洗涤 2 次，随后每孔加入 200 μL 细胞培养液和 20 μL 中性红溶液，培养箱内孵育 2 h，之后弃去含有中性红染色液的细胞培养液，用 PBS 洗涤 2 次。加入 200 μL 中性红检测裂解液，室温摇床上裂解 10 min，使用酶标仪检测 $A_{540 \text{ nm}}$ 值，计算 RAW 264.7 细胞的吞噬活性。

1.2.4 NO 分泌量检测

采用格里斯试剂法检测 NO 释放量。以 1×10^5 个/mL 密度接种 RAW 264.7 细胞于 96 孔板，处理细胞 12 h 后收集各孔上清液，按照 NO 检测试剂盒说明书操作，每孔上清中分别加入格里斯试剂 I 和格里斯试剂 II 溶液各 50 μL ，使用酶标仪检测 $A_{450 \text{ nm}}$ 值，建立标曲测定 RAW 264.7 细胞 NO 的分泌量。

1.2.5 免疫酶联吸附试验检测细胞因子分泌量

采用免疫酶联吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）检测细胞因子分泌量，将 RAW 264.7 细胞接种于 6 孔板，处理培养 12 h 后收集各组细胞上清，根据 ELISA 试剂盒说明书操作，最后使用酶标仪检测 $A_{450 \text{ nm}}$ 值，建立标曲计算 RAW 264.7 细胞中细胞因子（IL-1 β 、IL-6、TNF- α ）的分泌量。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测细胞因子基因表达量

采用实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR) 法测定细胞中 *IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α* 的 mRNA 水平。将 RAW 264.7 细胞接种于 6 孔板, 处理培养 12 h 后, 弃去细胞上清液, 用 PBS 洗涤 3 遍, 使用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 稍作稀释后使用反转录试剂盒两步法得到 cDNA, 以 β -actin 为参考基因, 检测 *IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α* 基因的表达量。qPCR 反应体系: 模版 0.8 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, 2 \times SYBR Green Pro Taq HS Premix 10 μ L, ddH₂O 8.4 μ L。qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环, 结果由 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算得出。引物序列见表 1。

表 1 目的基因与内参基因引物序列

Table 1 Sequence of target gene and reference gene primer

引物	引物序列
Primer	Primer sequences (5'→3')
<i>β-actin</i>	F: AGAGGGAAATCGTGCGTGAC
	R: AGGAGCCAGAGCAGTAATCTC
<i>IL-1β</i>	F: GGATGAGGACATGAGCACCT
	R: GGAGCCTGTAGTGCAGTTGT
<i>IL-6</i>	F: TACCACTTCACAAGTCGGAGGC
	R: CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTC
<i>TNF-α</i>	F: GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT
	R: GCCATAGAACTGATGAGAGGGAG

1.2.7 免疫蛋白印迹检测蛋白表达量

采用免疫蛋白印迹 (Western blotting, WB) 检测蛋白表达量, 将 RAW 264.7 细胞接种于 6 孔板, 处理培养 12 h 后弃去细胞培养液, PBS 洗涤 3 遍, 使用细胞裂解液和 PMSF 混合物 (100:1) 提取总蛋白, 充分裂解后, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min。使用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度, 定量稀释后, 使用 5 \times Loading Buffer 混合, 随后, 98 $^{\circ}$ C 变性 10~15 min, -20 $^{\circ}$ C 储存。使用 WB 技术, 该技术使用 SDS-PAGE 分离蛋白质, 并转移到 PVDF 膜。TBST 冲洗后, 用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 进行封闭。一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育 16 h 以上, 其中 iNOS、COX2、ERK、p-ERK、p38、p-p38 均按照说明书推荐浓度 1:500 配制, 并以 β -actin (1:2 000) 为内参, Rabbit-HRP 标记的二抗 (1:3 000) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。用化学发光仪检测免疫复合物, 并用 Image J 定量表达分析。

1.3 数据统计分析

试验数据采用 Graphpad Prism 8.0 和 Origin 软件进行统计分析，通过单因素方差分析和 Student's *t*-test 方法分析；统计结果以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示， $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 菊粉对巨噬细胞 RAW 264.7 增殖活性、吞噬活性的影响

如图 1A 所示，随着 INU 浓度的增加，其细胞增殖活力也相应增强。INU 各处理组与 Con 组相比差异极显著 ($P < 0.01$)，当浓度为 0.75 g/L 时，增殖活性达到最大。

采用中性红试剂检测 INU 对 RAW 264.7 细胞吞噬能力的影响。如图 1B 所示，与 Con 组相比，INU 浓度为 0.25 g/L 时，显著提高了细胞吞噬活性 ($P < 0.05$)。而浓度为 0.5~0.75 g/L 之间时，Con 组与 INU 处理组吞噬活性差异极显著 ($P < 0.01$)。

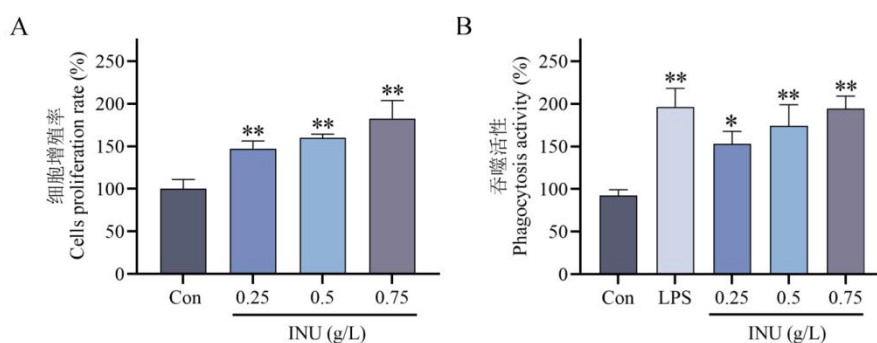


图 1 INU 对巨噬细胞 RAW 264.7 增殖活性 (A)、吞噬活性 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.1 Effect of INU on proliferation activity (A) and phagocytosis activity (B) of macrophage RAW 264.7 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注：与 Con 相比，* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ，下同。Note: Compared with Con, * $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$, the same below.

2.2 菊粉对巨噬细胞 RAW 264.7 中细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 分泌量的影响

活化的巨噬细胞可分泌大量的细胞因子 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α)，以调节细胞免疫反应。如图 2A、B、C 所示，当 INU 浓度为 0.25 g/L 时，RAW 264.7 细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量无显著差异 ($P > 0.05$)。当浓度为 0.5 g/L 时，与 Con 组相比，IL-1 β 、IL-6 的分泌量显著升高 ($P < 0.05$)，TNF- α 的分泌量也显著升高 ($P < 0.01$)。INU 浓度为 0.75 g/L 时，与 Con 组相比，IL-1 β 、IL-6、TNF- α 分泌量均显著上升 ($P < 0.01$)，其中 TNF- α 的分泌量呈浓度依赖性。

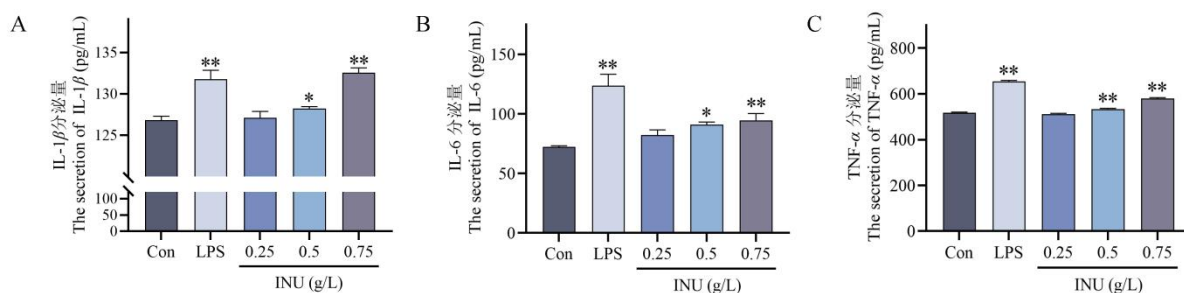


图2 INU对巨噬细胞RAW 264.7中细胞因子IL-1 β (A)、IL-6 (B)、TNF- α (C)分泌量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.2 Effect of INU on the secretion of cytokines IL-1 β (A), IL-6 (B) and TNF- α (C) in macrophage RAW 264.7 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.3 菊粉对巨噬细胞RAW 264.7中细胞因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 基因表达量的影响

采用qPCR法检测INU对巨噬细胞中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 基因表达的影响。如图3A所示，INU浓度为0.5~0.75 g/L时，与Con组相比，IL-1 β 基因的相对表达量显著增加 ($P < 0.01$)。如图3B所示，与Con组相比，0.5 g/L的INU显著提高IL-6基因的相对表达 ($P < 0.05$)，0.75 g/L的INU显著提高IL-6基因的相对表达 ($P < 0.01$)。如图3C所示，INU各处理组均能显著上调RAW 264.7细胞中TNF- α 基因的相对表达量 ($P < 0.01$)，其中INU浓度达到0.5 g/L时，TNF- α 基因的相对表达量最高。

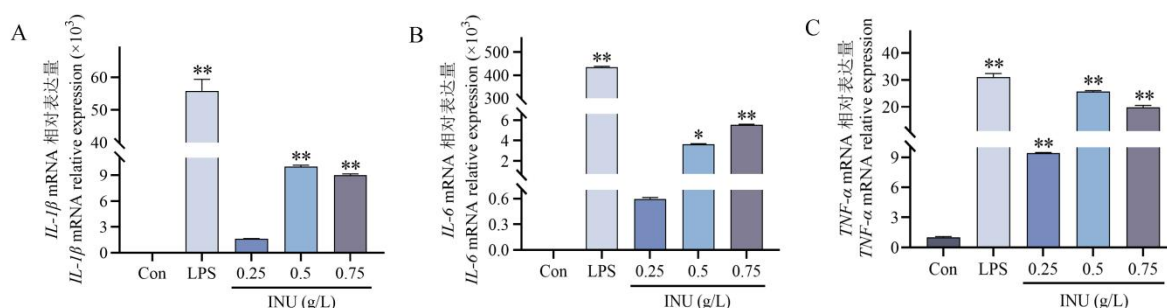


图3 INU对巨噬细胞RAW 264.7中细胞因子IL-1 β (A)、IL-6 (B)、TNF- α (C)基因表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.3 Effect of INU on expression of cytokines IL-1 β (A), IL-6 (B) and TNF- α (C) in macrophage RAW 264.7 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.4 菊粉对巨噬细胞RAW 264.7中NO分泌量及iNOS、COX2蛋白表达的影响

作为免疫应答的重要介质，NO的分泌可被确定为巨噬细胞活化的定量指标。结果如图4A所示，INU各处理组均能显著促进巨噬细胞RAW 264.7中NO的释放，与Con组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。随着INU浓度的增大，RAW 264.7细胞释放NO的能力也相应增强，具有剂量依赖，且在0.75 g/L时NO的释放量最大。

在巨噬细胞内，iNOS是一种重要的酶，能够促进NO的合成，并且参与调节免疫反应和炎症过程。如图4B、4C所示，Con组的iNOS蛋白表达水平较低，用INU处理RAW 264.7后，iNOS蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)，并呈浓度依赖性。COX2是一种诱导酶，负责催化花生四烯酸转化为前列腺素。这些前列腺素在免疫细胞中发挥关键作用，影响其分化和激活过程。如图4B、4D所示，INU处理导致COX2蛋白水平显著升高 ($P < 0.01$)，表明INU通过促进RAW 264.7细胞中

COX2 的释放发挥免疫调节作用。结果证明，INU 通过促进 RAW 264.7 细胞中 iNOS 和 COX2 蛋白的表达增强免疫。

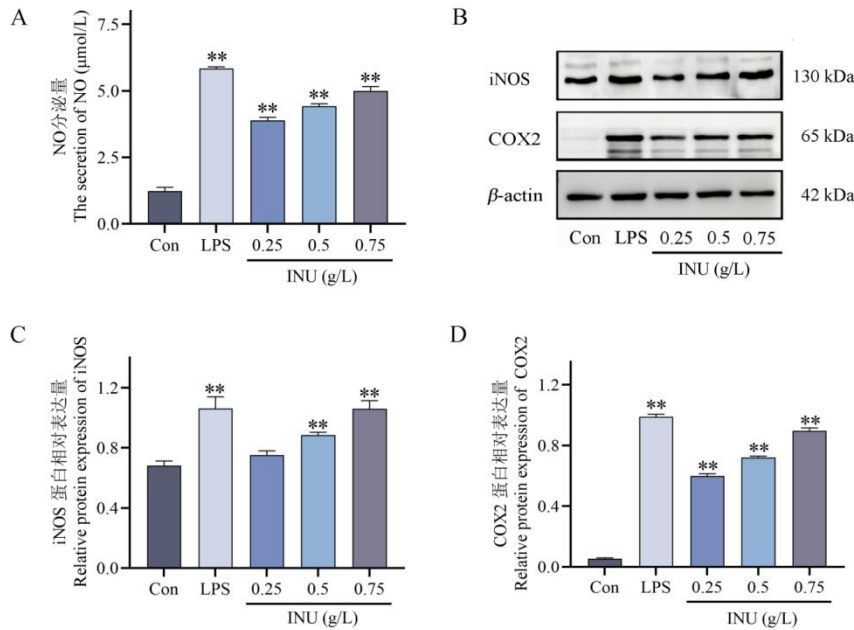


图4 INU对巨噬细胞RAW 264.7中NO分泌量(A)及iNOS(C)、COX2(D)蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.4 Effects of INU on the secretion of NO (A) and the relative expression of iNOS (C) and COX2 (D) proteins in RAW 264.7 macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.5 菊粉对巨噬细胞RAW 264.7 MAPK 信号通路中关键蛋白表达的影响

采用WB检测了INU对巨噬细胞RAW 264.7 MAPK信号通路中关键蛋白表达的影响。结果如图5A~5C所示，与Con组相比，INU处理组中p-ERK、p-p38蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$)，并且具有剂量依赖性。这表明INU可通过增强RAW 264.7细胞中p38和ERK的磷酸化水平来激活MAPK信号通路。

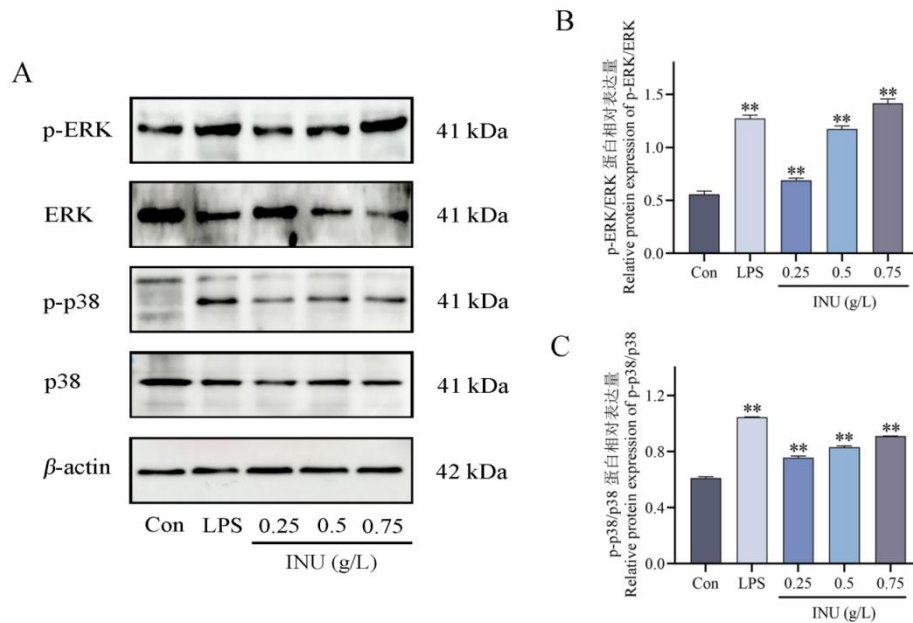


图5 INU对巨噬细胞RAW 264.7 MAPK信号通路中p-ERK (B)、p-p38 (C) 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.5 Effect of INU on relative expression levels of p-ERK (B), p-p38 (C) proteins in RAW 264.7 MAPK signaling pathway of macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论与结论

本研究探讨了 INU 对巨噬细胞 RAW 264.7 免疫活性的影响。结果显示，0.25~0.75 g/L 浓度范围内的 INU 对 RAW 264.7 细胞无明显的细胞毒性作用，并显著提高细胞吞噬能力和 NO 分泌量。此外，INU 浓度在 0.5~0.75 g/L 范围内时，RAW 264.7 细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的分泌量和基因表达量显著升高。值得注意的是，0.25~0.75 g/L 浓度范围内 INU 以浓度依赖的方式显著上调 RAW 264.7 细胞中 iNOS、COX2 蛋白表达，并通过上调 ERK、p38 蛋白磷酸化水平激活 MAPK 信号通路，研究结果表明 INU 对 RAW 264.7 细胞具有良好的免疫调节活性。

INU 是一种具有抗炎、抗癌、降血糖、免疫调节等生物学功能的天然多糖^[15]。巨噬细胞能够调节 B、T 细胞参与免疫应答，还能直接通过吞噬作用和分泌细胞因子杀伤病原菌或异物^[16]。NO 作为一种重要的气体信号分子，在增强巨噬细胞抵抗细胞内病原体方面发挥着关键作用。通过调控 iNOS 活性和 NO 水平，可以有效地影响巨噬细胞对于各类微生物的清除能力，从而保护机体免受感染侵害^[17]。近年来，植物多糖被认为是一类高效免疫调节剂，可以激活巨噬细胞并增强其免疫功能，从而调控机体免疫反应。研究发现锁阳多糖能够提高巨噬细胞 RAW 264.7 的增殖、吞噬活性及 NO 的分泌，并且有着明显的量效关系^[18]。Liu 等^[19]发现茶树菇能促进巨噬细胞表面分子的表达及 NO 和细胞因子的分泌，在机体免疫中发挥重要作用。类似的研究发现无花果多糖也可通过增强巨噬细胞吞噬能力，促进 NO 和细胞因子的分泌调节机体免疫^[20]。本研究分析了 INU 对巨噬细胞

RAW 264.7 的体外免疫活性, 发现 INU 可提高巨噬细胞的增殖和吞噬能力, 并显著增加巨噬细胞 NO 的分泌水平, 呈一定剂量依赖型增长。通过 WB 检测 iNOS 和 COX2 蛋白水平, INU 以浓度依赖的方式上调 iNOS 和 COX2 的蛋白表达。上述结果进一步证实 INU 能够活化巨噬细胞 RAW 264.7。

巨噬细胞可分泌多种细胞因子, 如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等, 这些细胞因子参与免疫反应、促进细胞生长和修复损伤组织^[21]。同时, 细胞因子的释放也是巨噬细胞被激活的标志之一。研究显示, IL-1 β 包含 Toll-IL-1 受体结构域, 能够对微生物和病毒刺激做出应答^[22]。此外, IL-1 β 是多种炎症疾病的关键细胞因子, 参与调控免疫细胞增殖和活化等过程, 并且还可诱导 IL-6、TNF- α 等其他免疫相关细胞因子的分泌。Liu 等^[23]研究发现黄芪多糖 (*Astragalus polysaccharide*, APS) 能够显著提高鸡巨噬细胞中特定免疫相关基因的表达水平, 并通过提高 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 IL-10 的分泌来活化巨噬细胞调控免疫应答。苜蓿中提取的 APS 也能够通过提高 IL-6、TNF- α 等特定免疫相关因子的分泌和基因表达来提高巨噬细胞活力^[24]。在本研究中, 0.5 和 0.75 g/L 的 INU 能显著增加 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的基因和分泌水平。上述结果表明 INU 具有良好的调节机体内部环境稳态并抵御外界侵害的能力。

MAPK 通路在先天免疫应答中起着至关重要的作用, 能够激活免疫细胞, 调节细胞增殖和分化及多种关键细胞因子的表达^[12]。ERK、p38 作为 MAPK 信号通路中重要的细胞信号传递者, 在免疫等生物学过程发挥着重要的作用。Zongo 等^[25]证明丹参多糖可增加 MAPK 通路中 ERK、p38 蛋白的磷酸化表达, 并诱导巨噬细胞活化, 其效果与剂量呈正相关。Xie 等^[24]研究发现, 通过阻断 p38 信号通路时, APS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 TNF- α 的分泌显著降低且添加 MAPK 抑制剂也会降低 NO、IL-6 和 TNF- α 的产生。在本研究中, INU 能够显著上调 MAPK 通路中 p38、ERK 蛋白磷酸化的表达水平, 并且与 INU 浓度呈正比。研究结果进一步证实, INU 能够通过 MAPK 信号通路发挥巨噬细胞的免疫调节功能。

INU 具有较强的免疫调节活性, 能够激活巨噬细胞 RAW 264.7, 增强巨噬细胞吞噬活性并诱导细胞因子的产生。此外, INU 可上调 iNOS 和 COX2 蛋白的表达及 MAPK 通路中重要转录因子 ERK、p38 蛋白磷酸化的表达水平。实验结果表明 INU 通过 MAPK 信号通路诱导巨噬细胞 RAW 264.7 产生免疫应答, 具有潜在的免疫调节作用。本文为深入研究 INU 及其应用提供了理论依据, 但其免疫调节的机制仍需深入探究。

参考文献

- 1 Wang J,Wang H,Zhang H,et al.Immunomodulation of ADPs-1a and ADPs-3a on RAW 264.7 cells through NF- κ B/MAPK signaling pathway[J].Int J Biol Macromol,2019,132:1024-1030.
- 2 Guo L,Xie J,Ruan Y,et al.Characterization and immunostimulatory activity of a polysaccharide from the spores of *Ganoderma lucidum*[J].Int Immunopharmacol,2009,9:1175-1182.

- 3 Mazumder S,Ghosal PK,Pujol CA,et al.Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta)[J].Int J Biol Macromol,2002,31:87-95.
- 4 Liu Z,Liu F,Wang W,et al.Study of the alleviation effects of a combination of *Lactobacillus rhamnosus* and inulin on mice with colitis[J].Food Funct,2020,11:3823-3837.
- 5 Zhao J,Zhang WJ,Chen Y,et al.Effect of bee pupal polypeptide on the immune activity of macrophage RAW 264.7[J].Curr Biotechnol(生物技术进展),2020,10:550-556.
- 6 Wang H,Xu X,Yin Z,et al.Activation of RAW 264.7 cells by PCp-I, a polysaccharide from *Psoralea corylifolia* L,through NF- κ B/MAPK signalling pathway[J].Int J Immunopathol Pharmacol,2021.
- 7 Fan R,Zhu C,Qiu D,et al.Activation of RAW 264.7 macrophages by an acidic polysaccharide derived from *Citrus grandis* 'Tomentosa'[J].Int J Biol Macromol,2020,156:1323-1329.
- 8 Ou Y,Zhu L,Xu S,et al.Activation of RAW 264.7 macrophage by Exopolysaccharide from *Aphanothece halaphytica* (EPSAH) and the underlying mechanisms[J].Fundam Clin Pharmacol,2020,34:591-602.
- 9 Zhang GW.Study on the immune functional components of Ejiao based on RAW 264.7 cells and immunosuppressed mouse models[D].Wuxi:Jiangnan University(江南大学),2022.
- 10 Liu Q,et al.Research progress of *Astragalus* polysaccharide on natural immune regulation of macrophages[J].China Anim Husb Vet Med(中国畜牧兽医),2022,49:1746-1756.
- 11 Han ZJ.Study on immunomodulation and signaling pathway of macrophage RAW 264.7 by *spinosa* polysaccharide[D].Urumqi:Xinjiang Medical University(新疆医科大学),2017.
- 12 Yan ZR,Yin HW,Pan JQ,et al.To explore the mechanism of Jiedu Huoxue Decoction in the treatment of type III prostatitis based on ERK/p38 MAPK signaling pathway[J].J Yunnan Univ Chin Med(云南中医药大学学报),2024,47:67-78.
- 13 Ye WJ,Zhou JH,Liu CG,et al.*In vitro* evaluation of the immunomodulatory effect of *Lactobacillus* on RAW 264.7 macrophages[J].China Brew(中国酿造),2022,41:51-55.
- 14 Wang JQ.Effects of inulin on gut microbiota and macrophage immune function[D].Taiyuan:Shanxi University(山西大学),2021.
- 15 Ning C.Study on the mechanism of regulation of JNK and p38 MAPK signaling pathway by chicory inulin on blood glucose in type II diabetes mellitus[D].Shenyang:Shenyang Agricultural University(沈阳农业大学),2017.
- 16 Rong Y,Yang R,Yang Y,et al.Structural characterization of an active polysaccharide of longan and evaluation of immunological activity[J].Carbohydr Polym,2019,213:247-256.
- 17 Lee JS,Synysya A,Kim HB,et al.Purification, characterization and immunomodulating activity of a pectic polysaccharide isolated from Korean mulberry fruit Oddi (*Morus alba* L.)[J].Int Immunopharmacol,2013,17:858-866.

- 18 Abliz R, Li M, Hu JP. The effect of *Cynomorium songaricum* polysaccharide on macrophage RAW264.7[J]. *J Food Saf Qual*(食品安全质量检测学报), 2018, 9: 5694-5698.
- 19 Liu L, Lu H, Cai GF, et al. Effect of tea tree mushroom polysaccharide on immune function of mouse macrophage RAW 264.7[J]. *Chin J Vet Med*(中国兽医杂志), 2023, 59: 25-30.
- 20 Du J, Li J, Zhu J, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Ficus carica*[J]. *Food Funct*, 2018, 9: 3930-3943.
- 21 Brodin P, et al. Human immune system variation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17: 21-29.
- 22 Sun WL, Wang HQ, Ze LX, et al. Polymorphism of pro-inflammatory factors (IL-1 β , IL-6, TNF- α) and their association with immune traits in Tibetan pigs[J]. *Acta Vet Zootech Sin*(畜牧兽医学报), 2019, 55: 1958-1969.
- 23 Liu Q, Wang L, Zhang K, et al. Immunomodulatory effect of *Astragalus* polysaccharides on HD11 in chicken macrophages[J]. *Chin J Vet Med*(中兽医医药杂志), 2023, 42: 1-7.
- 24 Xie Y, Wang L, Sun H, et al. Polysaccharide from alfalfa activates RAW 264.7 macrophages through MAPK and NF- κ B signaling pathways[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 126: 960-968.
- 25 Zongo AWS, Zogona D, Zhang Z, et al. Immunomodulatory activity of *Senegalia macrostachya* (Reichenb. ex DC.) Kyal. & Boatwr seed polysaccharide fraction through the activation of the MAPK signaling pathway in RAW 264.7 macrophages[J]. *Food Funct*, 2022, 13: 4664-4677.

收稿日期: 2024-08-26 接受日期:

基金项目: 甘肃农业大学伏羲青年英才项目 (Gaufx-05Y07); 甘肃农业大学公招博士科研启动基金项目 (GAU-KYQD-2021-09)

*通信作者 Tel: 15071224619; E-mail: zhanglih@gsau.edu.cn, huji@gsau.edu.cn