

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2020.04.008

怀牛膝多糖对 RAW264.7 细胞吞噬活性、表型和细胞因子表达的调节

杨林松, 钟 慧, 王璐瑶, 纪蔚伟, 朱 劼, 朱孝霖

(常州大学 制药与生命科学学院, 江苏 常州 213264)

摘要:研究怀牛膝多糖(ABPS)对小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞活性、表型及细胞因子表达的影响。先用不同浓度的 ABPS 溶液(0, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL)处理 RAW264.7 细胞 48 h, 后采用 MTT 法、中性红吞噬实验、流式细胞术分别检测了 ABPS 对巨噬细胞的增殖活性、吞噬能力、细胞表型及细胞因子表达的影响。ABPS 对 RAW264.7 细胞的增殖活性没有明显的影响, 但能显著提高细胞对中性红的吞噬活性和表面分子 CD80, CD86 及 CD40 的表达, 降低单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 的表达。ABPS 能够增加 RAW264.7 细胞的吞噬活性并促进其成熟, 且能发挥一定的抗炎活性。

关键词:怀牛膝多糖; 巨噬细胞; 吞噬; 表型; 细胞因子

中图分类号: R 285.5

文献标志码: A

文章编号: 2095-0411(2020)04-0055-08

Regulation of *Achyranthes Bidentata* Polysaccharide on Phagocytic Activity, Phenotype and Cytokine Expression of RAW264.7 Cells

YANG Linsong, ZHONG Hui, WANG Luyao, JI Weiwei, ZHU Jie, ZHU Xiaolin

(School of Pharmaceutical Engineering & Life Sciences, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: To study the effect of *Achyranthes bidentata* polysaccharide (ABPS) on the activity, phenotype and cytokine expression of RAW264.7 cells (murine mononuclear macrophages). RAW264.7 cells were treated with different concentrations of ABPS solution (0, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL) for 48 hours. Then, the effects of ABPS on the proliferation, phagocytosis, cell phenotype and cytokine expression of macrophage were analyzed by MTT assay, neutral red phagocytosis assay and flow cytometry respectively. ABPS had no significant effect on the proliferation of RAW264.7 cells, but signifi-

收稿日期: 2020-01-28。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21676029)。

作者简介: 杨林松(1974—), 女, 河南南阳人, 博士, 副教授。E-mail: linsongyang@cczu.edu.cn

引用本文: 杨林松, 钟慧, 王璐瑶, 等. 怀牛膝多糖对 RAW264.7 细胞吞噬活性、表型和细胞因子表达的调节[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2020, 32(4): 55-62.

cantly increased cell phagocytic activity and the expressions of CD80, CD86 and CD40. In addition, ABPS decreased the expressions of monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and tumor necrosis factor α (TNF- α). ABPS increased the phagocytic activity of RAW264.7 cells, promoted cell maturation, and exerted certain anti-inflammatory activity.

Key words: *Achyranthes bidentata* polysaccharide; macrophages; phagocytosis; phenotype; cytokine

怀牛膝为苋科多年生草本植物牛膝(*Achyranthes bidentata* Blume)的干燥根,有逐瘀通经、补肝肾、强筋骨、利尿通淋,引血下行等功效^[1]。牛膝多糖(*Achyranthes bidentata* polysaccharides, ABPS)是从牛膝根中分离、提取纯化后得到的一种小分子水溶性的多糖化合物,属禾本科型果聚糖^[2],是牛膝的主要活性成分之一,其分子质量小、水溶性好、来源广泛、毒副作用小且利用度高,拥有广阔的医药开发前景^[3]。

现代药理学研究证实 ABPS 具有抗肿瘤^[4-5]、抗氧化^[6]、抗凝血^[7]、抗病毒^[8]等多种药理作用。它能够有效减缓机体的免疫系统损伤,且副作用小,作为免疫调节剂,具有很大的发展潜力^[9-10]。目前对 ABPS 的免疫调节活性的研究较少^[11],本文探讨了 ABPS 对小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7 细胞)活性和功能的影响,为开发和利用传统中药怀牛膝多糖提供科学依据。

1 实验材料

1.1 实验试剂

怀牛膝干燥根购自江苏常州万仁大药房有限公司,采用水提醇沉法,经 Sevag 试剂脱蛋白获得粗多糖 ABPS;DMEM 购自美国 GIBCO 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,MTT、胰酶、青霉素、链霉素、monensin 和 saponin 均购自美国 Sigma 公司;FITC 标记的 IgG1k,CD40 和 MCP-1 单克隆抗体及 PE 标记的 IgG2a,CD80,CD86 和 TNF- α 单克隆抗体均购自美国 Becton Dickinson 公司;中性红购自上海润捷化学试剂有限公司。其他试剂均为分析纯。

1.2 细胞

RAW264.7 细胞由南京大学医学院侯亚义教授提供。细胞培养基为 DMEM,其中添加有 10% FCS,1.5 g/L 碳酸氢钠, 5×10^{-5} mol/L β -巯基乙醇,100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素。细胞是在 37 °C,5% CO₂ 的二氧化碳培养箱中进行培养。

2 实验方法

2.1 MTT 法检测 ABPS 对 RAW264.7 细胞活性的影响

取对数生长期的 RAW264.7 细胞,调整细胞浓度,以 5×10^3 个细胞/孔接种到 96 孔板中,每孔 90 μ L,于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。试验设置对照组(加入与药物溶液同体积的培养基)和不同剂量给药组,每个实验组设 5 个复孔。细胞贴壁后,在给药组分别加入质量浓度为 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mg/mL ABPS 溶液(药物梯度的选择经过多次预实验确定,且与体外抗肿瘤实验的药物浓度一致^[12]),分别培养 24,48,72 h。结束后每孔加入 10 μ L,5 mg/mL MTT 溶液,37 °C 培养箱继续孵育 4 h。然后吸掉上清液,每孔加入 100 μ L 的 DMSO,置微量振荡器振荡 5 min,使结晶物充分溶解,在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔在的 OD 值。

2.2 中性红吞噬实验

试验设置对照组和不同剂量给药组,每个实验组设5个复孔,调整细胞浓度,以 5×10^4 个/mL接种到96孔板中,孵育过夜;给药组每孔分别加入0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mg/mL ABPS溶液,置于37℃,5% CO₂培养箱中培养48 h。弃上清,用PBS洗1次,每孔加入0.1%中性红溶液200 μL继续培养3 h,弃上清,用PBS洗3次,加入200 μL细胞裂解液,4℃静置过夜;在酶标仪490 nm处测定各孔的OD值,OD值越大,则巨噬细胞的吞噬能力越强。

2.3 流式细胞术检测细胞表型

取1.5 mL的eppendorf管,每个样品设置3个复孔,以 1×10^5 个细胞/每管,将各处理组细胞收集到管中,用PBS冲洗,4℃1 500 r/min离心5 min,弃去上清液。用90 μL PBS和10 μL的荧光抗体重悬细胞进行单染(0.1 μg FITC标记CD40单克隆抗体、0.05 μg PE标记的CD80单克隆抗体、0.05 μg PE标记的CD86单克隆抗体。FITC的激发波长和发射波长分别是494 nm和518 nm,检测通道为FL1;PE的激发波长和发射波长分别是565 nm和575 nm,检测通道为FL-2),4℃孵育30 min。结束后1 500 r/min离心10 min,去上清液。然后用PBS重复冲洗离心2次,用流式细胞仪检测荧光阳性细胞百分比。以同型荧光抗体(FITC标记的抗IgG1k的单克隆抗体和PE标记抗IgG2a的单克隆抗体)染色的样品作为阴性对照,门是依据同型阴性对照设定。

2.4 流式细胞术检测细胞因子

取对数生长期的RAW264.7细胞,调整细胞悬液浓度,以 5×10^4 个/mL接种到12孔板中,每个实验组设3个平行孔,孵育过夜。细胞贴壁后,在给药组分别加入质量浓度为0.2,0.4,0.6,0.8 mg/mL和1.0 mg/mL ABPS溶液培养48 h。加药5 h后加入终浓度为3 μmol/L的Monensin抑制细胞因子的分泌。加入ABPS 48 h后,收集细胞,PBS洗涤细胞两次。向离心管中加入浓度为4%的多聚甲醛1 mL,充分混匀,室温孵育20 min后,4℃1 300 r/min离心10 min,弃上清,用PBS洗涤细胞两次。向离心管中加入1 mL 0.5%的皂角苷,充分混匀,室温孵育30 min。4℃1 300 r/min离心10 min。弃上清,用90 μL 0.5%皂角苷和10 μL荧光染料(0.5 μg FITC标记MCP-1单克隆抗体、0.5 μg PE标记的TNF-α单克隆抗体)重悬细胞,4℃,孵育1 h。最后用0.5%皂角苷洗涤细胞,4℃1 300 r/min离心10 min,重复操作3次,用流式细胞仪检测。以同型荧光抗体(FITC标记的抗IgG1k的单克隆抗体和PE标记抗IgG2a的单克隆抗体)染色的样品作为阴性对照,门是依据同型阴性对照设定。

2.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 q 检验和ANOVA法进行显著性检验, $P < 0.05$ 表示与对照组相比有显著性差异, $P < 0.01$ 表示有极显著性差异。

3 实验结果

3.1 ABPS对RAW264.7细胞活性的影响

利用MTT实验检测不同质量浓度的ABPS作用于RAW264.7细胞24,48,72 h后对细胞活性的影响。结果显示,与空白对照组相比,ABPS对RAW264.7细胞活性的影响没有统计学差异,且没有剂量和时间依赖性,如图1所示。

3.2 ABPS 增加了 RAW264.7 细胞的吞噬功能

采用中性红法检测 ABPS 对 RAW264.7 细胞吞噬活性的调节。如图 2 所示,除了最高质量浓度组,其他质量浓度组的 ABPS 均提高 RAW264.7 细胞的吞噬活性,且与空白对照组相比具有极显著的统计学差异($P < 0.01$)。

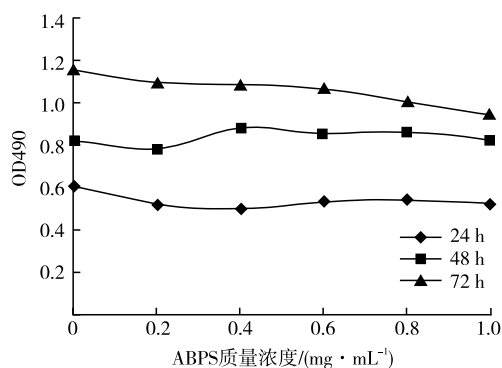


图 1 ABPS 对 RAW264.7 细胞活性的调节

Fig.1 ABPS regulated the viability of RAW264.7 cells

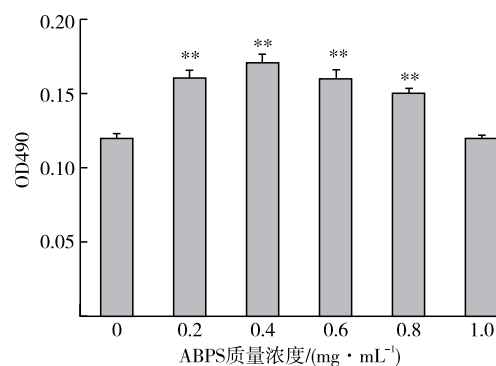


图 2 ABPS 提高 RAW264.7 细胞的吞噬活性

Fig.2 ABPS increased the endocytosis of RAW264.7 cells

3.3 ABPS 调节 RAW264.7 细胞表面分子的表达

3.3.1 ABPS 提高 RAW264.7 细胞 CD40 的表达水平

与空白对照组相比,不同质量浓度的 ABPS(0.2~1.0 mg/mL)在作用 48 h 后可以极显著提高 RAW264.7 细胞表面分子 CD40 的表达,且具有统计学意义($P < 0.01$),如图 3 所示。其中 ABPS 质量浓度达 0.6 mg/mL 时,CD40 表达最高,相较对照组提高了 30.80%,其他组的 CD40 表达提高率也不低于 21.83%。

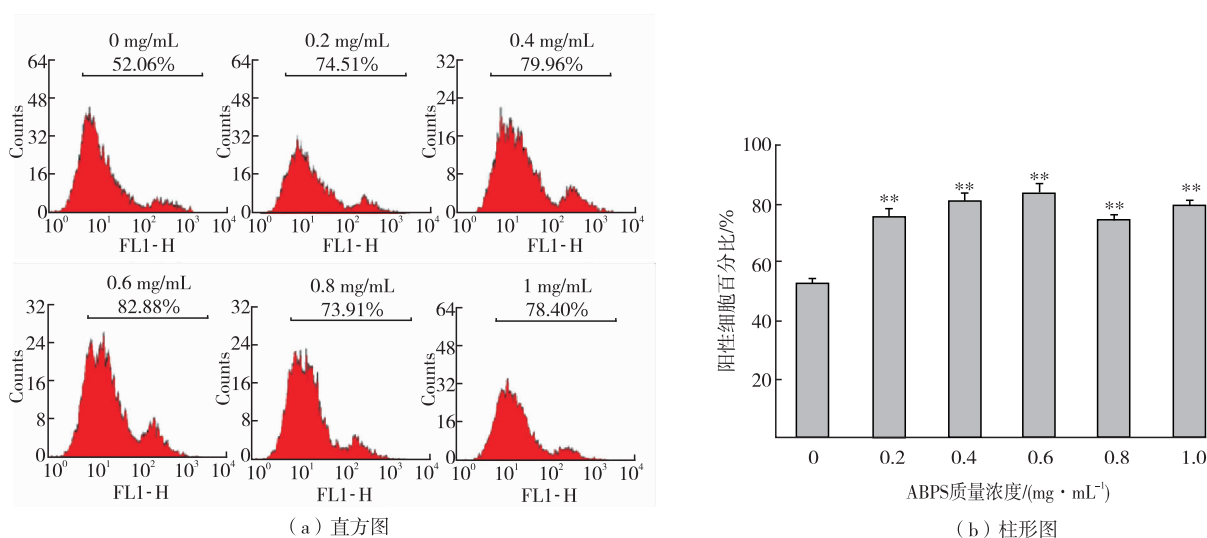


图 3 ABPS 提高 RAW264.7 细胞表面分子 CD40 的表达水平

Fig.3 ABPS up-regulated the CD40 level of RAW264.7 cells

3.3.2 ABPS 提高 RAW264.7 细胞 CD80 的表达水平

如图 4 所示,与空白对照组相比,各质量浓度组的 ABPS 均可显著提高 RAW264.7 细胞表面分子 CD80 的表达,且具有统计学意义($P<0.01$)。其中 ABPS 质量浓度达 0.6 mg/mL 时,CD80 表达最高,相较于对照组提高了 12.38%,其他组的 CD80 表达提高率也不低于 7.44%。

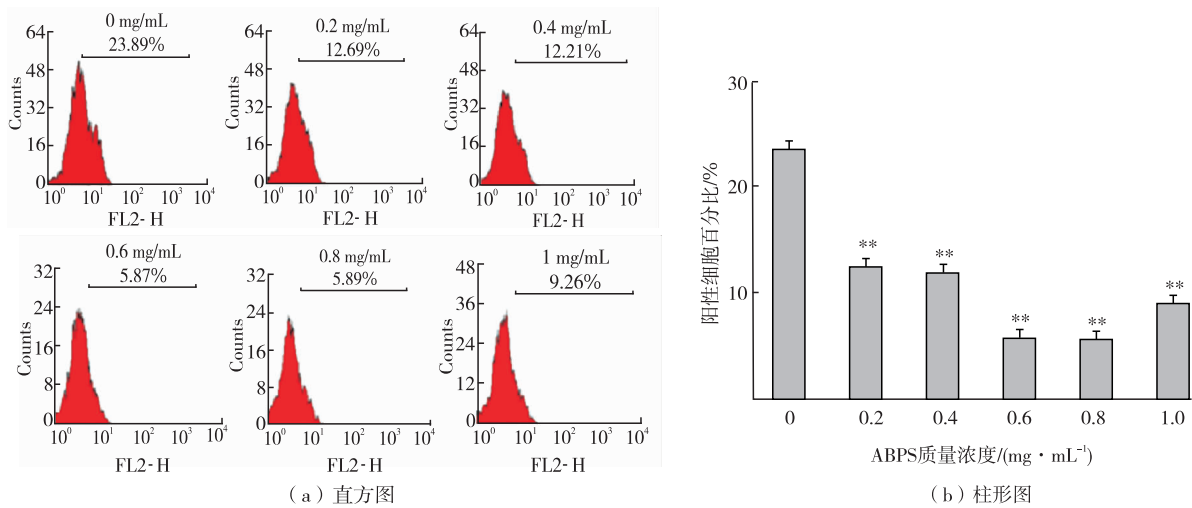


图 4 ABPS 提高 RAW264.7 细胞表面分子 CD80 的表达

Fig.4 ABPS up-regulated the CD80 level of RAW264.7 cells

3.3.3 ABPS 提高巨噬细胞 CD86 的表达水平

与空白对照组相比,不同质量浓度的 ABPS(0.2~1.0 mg/mL)均可显著提高 RAW264.7 细胞表面分子 CD86 的表达,且具有统计学意义($P<0.01$),如图 5 所示。其中 ABPS 质量浓度达 0.6 mg/mL 时,CD86 表达最高,相较于对照组提高了 15.99%,其他组的 CD86 表达提高率也不低于 12.72%。

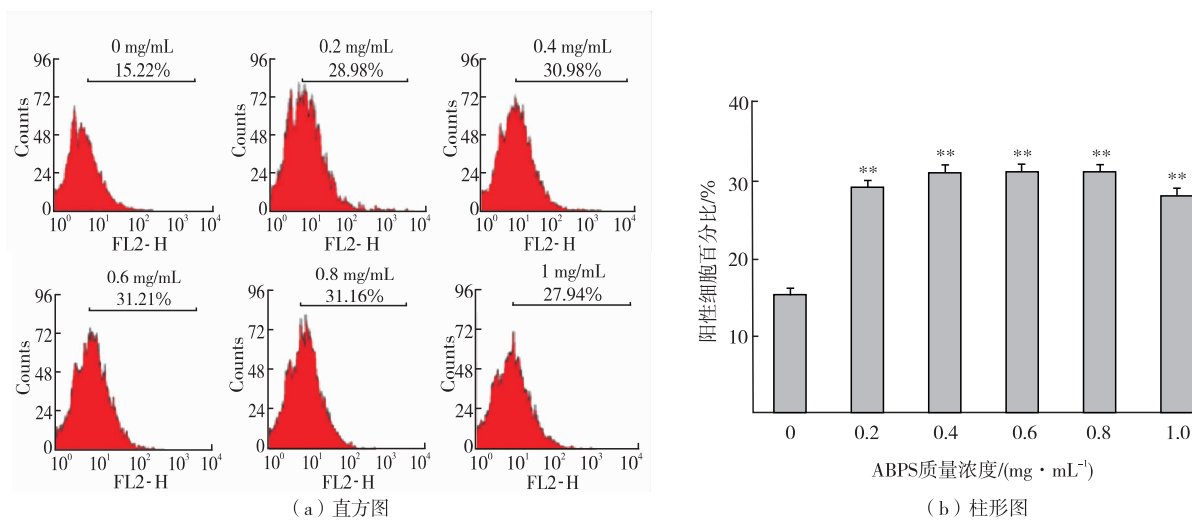


图 5 ABPS 提高 RAW264.7 细胞表面分子 CD86 的表达

Fig.5 ABPS up-regulated the CD86 level of RAW264.7 cells

3.4 ABPS 调节 RAW264.7 细胞细胞因子的表达

3.4.1 ABPS 降低 RAW264.7 细胞 MCP-1 的表达

ABPS 对 RAW264.7 细胞分泌炎症细胞因子有显著影响。如图 6 所示,与空白对照相比,任何质量

浓度组的 ABPS 均可显著降低 RAW264.7 细胞 MCP-1 的表达水平,具有极显著性差异($P < 0.01$)。

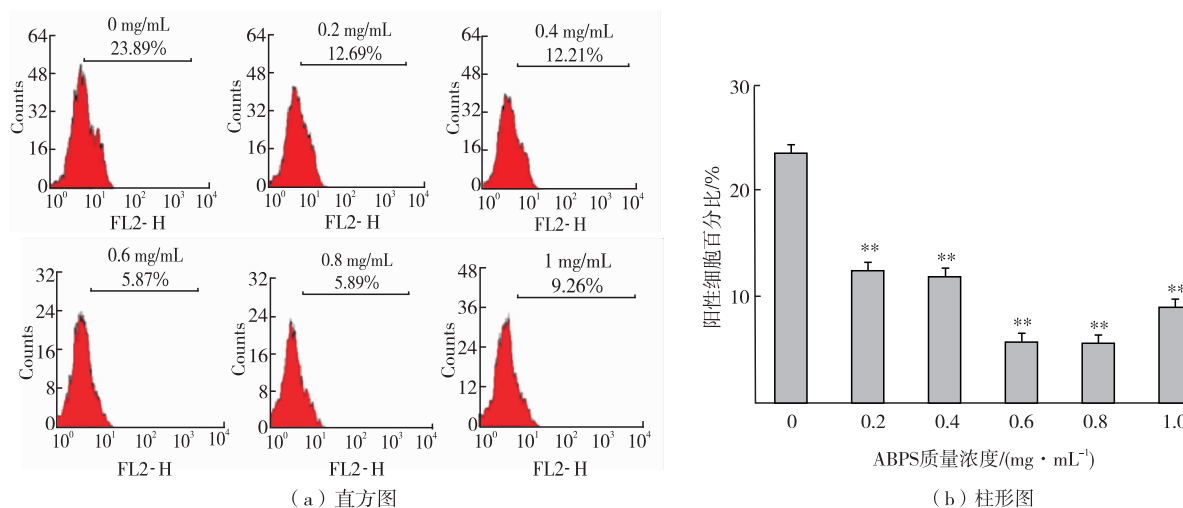


图 6 ABPS 下调 RAW264.7 细胞因子 MCP-1 的表达

Fig.6 ABPS decreased the level of MCP-1 in RAW264.7 cells

3.4.2 ABPS 降低 RAW264.7 细胞 TNF- α 的表达

如图 7 所示,与空白对照组相比,各质量浓度组 ABPS 显著下调 RAW264.7 细胞内 TNF- α 的表达水平($P < 0.01$),且随着质量浓度增加,TNF- α 的表达不断下降,呈现一定的剂量依赖性。

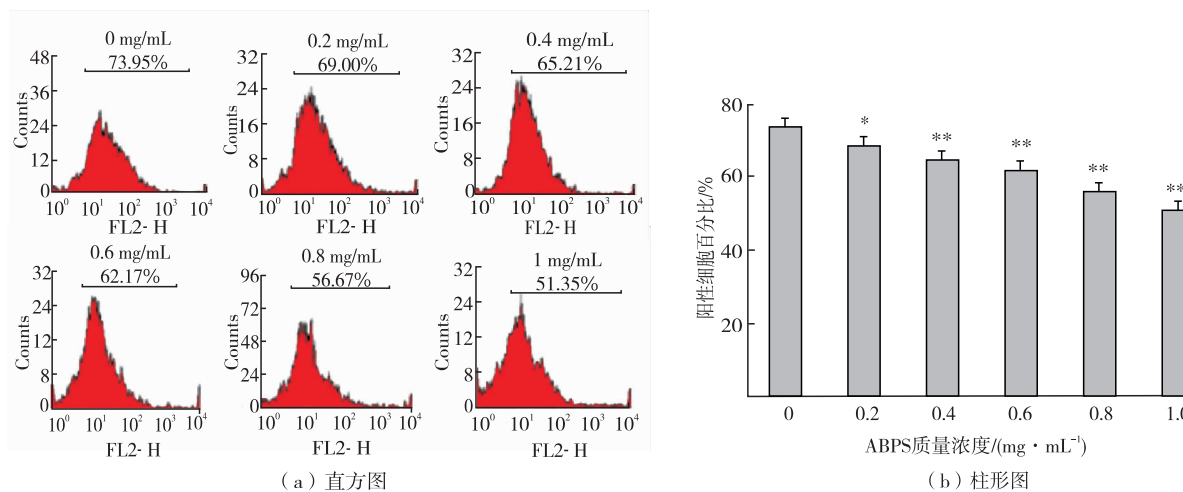


图 7 ABPS 降低 RAW264.7 细胞 TNF- α 的表达

Fig.7 ABPS decreased the level of TNF- α in RAW264.7 cells

4 讨 论

中药具有 5 千多年的历史,且随着人们对肿瘤的病因、发病机制、治疗效果认识的不断深入,其通过激活免疫系统间接发挥抗肿瘤作用被广泛关注。怀牛膝是中国传统的常用中药材,ABPS 是其主要活性成分之一,具有直接的杀伤肿瘤的作用,如它可抑制小鼠肝癌 H22 细胞^[13]和肉瘤 S180 细胞^[14]。众多研究也表明,大部分天然多糖均具有激活免疫相受体和改善机体免疫功能等作用^[15],日益成为新药

研发的热点,且有部分多糖免疫药物已应用于临床。巨噬细胞作为抗原递呈细胞,在机体免疫应答中发挥至关重要的作用,不仅可以直接吞噬和杀伤病原体,还可以分泌多种细胞因子启动免疫应答^[13]。以往研究表明天然多糖可通过调节巨噬细胞的功能,如增殖活性、吞噬活性和细胞因子的分泌等^[14],影响机体的免疫应答。因此,ABPS 除了发挥直接的抗肿瘤作用,也可能通过激活免疫系统发挥间接的抗肿瘤作用。

本文探讨了 ABPS 对 RAW264.7 细胞增殖和吞噬活性的影响。结果显示 ABPS 不影响巨噬细胞的增殖活性但显著增加其吞噬活性。以往的研究表明,ABPS 对肿瘤细胞如小鼠肝癌细胞 H22 和小鼠肉瘤 S180 细胞的增殖具有一定的抑制作用^[13,16],对青年鼠的淋巴细胞增殖没有影响^[17]。这与本文的结果不尽一致,可能是 ABPS 对细胞增殖活性的影响具有一定的细胞特异性。李凯等发现怀牛膝可增强重型颅脑损伤大鼠外周血 PMN 吞噬能力,陆兔林等的研究也表明^[18]怀牛膝能是提高机体免疫机能,激活小鼠巨噬细胞系统对细胞的吞噬作用。此外,ABPS 能提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能^[19]及大鼠肺泡巨噬细胞(AMO)和腹腔巨噬细胞(PMO)摄取中性红的能力^[20]。本文的研究结果与其一致。

ABPS 不仅影响 RAW264.7 细胞的吞噬活性,也显著提高细胞表面 CD40、CD80 和 CD86 的表达。CD40、CD80 和 CD86 是抗原呈递细胞表面的协同刺激分子,在刺激 T 细胞活化的过程中发挥重要作用。研究表明 ABPS 促进小鼠骨髓来源树突状细胞(DCs)的分化、成熟及上调 CD80^[21]和 CD86^[22]的表达。邹亚轩发现 ABPS 可增强 C57BL/6 小鼠髓系 DCs 表面分子 CD40 和 CD86 的表达^[23],促使其成熟,增强其抗原递呈能力^[24]。

巨噬细胞不仅能够吞噬处理呈递抗原,也可通过释放可溶性细胞因子及趋化因子来调节机体免疫反应,如 TNF- α 和 MCP-1 等。TNF- α 主要由巨噬细胞、NK 细胞和 T 细胞产生,具有杀伤靶细胞和促进细胞凋亡,参与局部炎症和内皮细胞活化的作用。它是在炎症反应中出现最早、发挥作用最快的细胞因子。MCP-1 是趋化因子超家族的成员之一,对 T 淋巴细胞及单核细胞有明显的趋化作用,使其到达炎症部位发挥作用^[25]。本文的研究发现 ABPS 具有降低 TNF- α 和 MCP-1 表达的作用。郭娇红等的研究表明怀牛膝水煎液可降低去卵巢大鼠血清 TNF- α 的水平^[26],而有关 ABPS 和 MCP-1 的关系未见报道。由此可推,ABPS 可降低炎性细胞因子及趋化因子的表达,减轻或抑制炎症的发生。

5 结 论

随着人们对食品药品安全的关注,天然药物显示出一定优势。近年来研究发现,许多中药尤其是补益类中药具有免疫促进作用,多糖是其活性成分之一,对机体的特异性和非特异性免疫功能具有增强作用,其作用机制是通过刺激单核-巨噬细胞系统的吞噬功能、促进淋巴细胞增殖和转化、促进抗体生成、诱导细胞因子的分泌、激活补体系统等途径实现对机体免疫系统功能的调节。而且多糖是天然产物,对动物及人类安全、无毒副作用,因此受到人们的普遍重视。ABPS 作为传统中药中的多糖组分,显著上调巨噬细胞的吞噬作用、降低其炎性细胞因子的表达,表现出一定的抗炎、免疫调节活性,这为在医药及功能性食品上的研发提供参考依据。

参考文献:

- [1]国家药典委员会. 中华人民共和国药典:第一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:38.
- [2]陈晓明,徐愿坚,田庚元. 牛膝多糖的理化性质研究及结构确证[J]. 生命有机化学,2005,40(1):32-35.
- [3]郭宁,郭婕. 怀牛膝茎叶多糖提取及生物活性[J]. 周口师范学院学报,2017(2):120-122.
- [4]JIN L Q, ZHENG Z J, PENG Y, et al. Opposite effects on tumor growth depending on dose of *Achyranthes bidentata*-

- ta polysaccharides in C57BL/6 mice[J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(5): 568-577.
- [5]冯婷,刘霞,赵明耀,等.牛膝多糖联合 5-氟尿嘧啶对食管癌的作用及相关机制的探讨[J].重庆医科大学学报, 2011, 36(5): 531-534.
- [6]王洪伟,张久涛.牛膝多糖对脑外伤大鼠脑组织中 SOD 与 MDA 影响的试验研究[J].牡丹江医学院学报, 2006, 27(3): 8-10.
- [7]MAO P, XIA H L, YUAN X R, et al. The experimental research on anticoagulant function of polysaccharides in *Achyranthes bidentata*[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2000, 11(12): 1075-1076.
- [8]LIU C, CHEN H, CHEN K, et al. Sulfated modification can enhance antiviral activities of *Achyranthes bidentata* polysaccharide against porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV) *in vitro* [J]. Int J Biol Macromol, 2013, 52: 21-24.
- [9]邵树军,刘彩玉.牛膝多糖对小鼠免疫功能影响的研究[J].肿瘤防治杂志, 2002, 9(1): 57-59.
- [10]FENG H B, LIU J, SONG Z, et al. Effects of the polysaccharide from the Radix Cyathulae Officinalis Kuan(RC) on maturation of dendritic cells(DCs) from the mice immunized with FMD vaccine[J]. Chin J Veter Med, 2014, 50(3): 18-21.
- [11]WENG X, LIN P, LIU F, et al. *Achyranthes bidentata* polysaccharides activate the Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote chondrocyte proliferation[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2014, 34(4): 1045-1050.
- [12]YANG L S, SHEN Y H, WANG F. Study on the extraction and antitumor activity of *Achyranthes bidentata* polysaccharide[J]. International Journal of Biology, 2018, 10(2): 23-30.
- [13]宋军,杨金蓉.川牛膝多糖对小鼠肝癌细胞 H22 抑制作用研究[J].中药药理与临床, 2001, 17(3): 19.
- [14]石富胜,杨正国,马福云,等.蜕皮甾酮减轻肺水肿的实验研究[J].第三军医大学学报, 2001, 23(2): 182-184.
- [15]LI F, YUAN B X, MAN M I, et al. Effects of purified polysaccharides from Lily on tumor growth and immune functions of tumor-bearing mice[J]. Journal of Modern Oncology, 2008, 16: 188-189.
- [16]陈红,刘友平.川牛膝多糖抗肿瘤作用初探[J].成都中医药大学学报, 2001, 24(1): 49.
- [17]向道斌,蒋超,李晓玉,等.牛膝多糖对 T 淋巴细胞和天然杀伤细胞功能的影响[J].中国药理学与毒理学杂志, 1994, 8(3): 209-212.
- [18]陆兔林,毛春芹,张丽.牛膝不同炮制品镇痛抗炎作用研究[J].中药材, 1997(10): 507-509.
- [19]王剑,蒲蓓,何开泽,等.川牛膝多糖的体外免疫活性研究[J].应用与环境生物学报, 2008, 14(4): 481-483.
- [20]金丽琴,许艳芳,金晶.牛膝多糖对老龄大鼠非特异性免疫功能的影响[J].中国病理生理杂志, 2007, 23(7): 1408-1411.
- [21]冯婷,赵明耀,孙丽莎,等.牛膝多糖对小鼠骨髓来源树突状细胞抗肿瘤能力的影响[J].郑州大学学报(医学版), 2010, 45(3): 359-362.
- [22]孙丽莎.牛膝多糖、锌对小鼠树突状细胞增殖分化和抗原提呈能力的影响[D].郑州:郑州大学, 2010.
- [23]邹亚轩.牛膝多糖对树突状细胞表型及功能成熟影响[D].沈阳:中国医科大学, 2010.
- [24]罗李媛,贾仁勇,殷中琼,等.川牛膝多糖对鸡免疫器官及其免疫活性细胞动态变化的影响[J].黑龙江畜牧兽医, 2008, 1: 82-83.
- [25]SMITS A I, BALLOTTA V, DRIESSEN-MOL A, et al. Shear flow affects selective monocyte recruitment into MCP-I-loaded scaffolds[J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(11): 2176-2188.
- [26]郭姣红.怀牛膝对去卵巢肥胖大鼠的影响[D].兰州:兰州大学, 2007.

(责任编辑:殷丽莉)