

不同分子量醋柴胡多糖对 Raw264.7 巨噬细胞抗炎免疫活性的影响

李苹¹, 卢柏林², 邓时贵¹, 赵瑞芝¹, 赵亚^{1*} (1. 广州中医药大学第二附属医院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

摘要: 目的 探讨不同分子量醋柴胡多糖对 Raw264.7 小鼠巨噬细胞抗炎免疫活性的影响。方法 采用截留不同分子量的透析袋将醋柴胡多糖进行不同分子量分离; 采用 MTT 检测不同分子量醋柴胡多糖对 Raw264.7 小鼠巨噬细胞活力的影响; 采用中性红吞噬实验检测多糖对细胞吞噬活性的影响; 采用 Griess 法检测不同分子量醋柴胡多糖对 LPS 刺激 Raw264.7 炎症细胞模型 NO 释放的影响。结果 分离得到 <3.5, 3.5~50, 50~100, 100~300, 300~1 000, >1 000 kDa 6 个不同分子量段的醋柴胡多糖; 各分子量段醋柴胡多糖在 1.95~31.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对巨噬细胞无毒性; 除 <3.5 kDa 分子量段外, 其他分子量段醋柴胡多糖能显著促进巨噬细胞吞噬活性, 且分子量 >100 kDa 醋柴胡多糖活性更显著; 各分子量段醋柴胡多糖均能显著抑制 LPS 刺激 Raw264.7 炎症细胞 NO 的释放。结论 分子量是影响醋柴胡多糖抗炎免疫活性差异的重要因素。

关键词: 醋柴胡多糖; 分子量; Raw264.7 巨噬细胞; 抗炎; 免疫

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)10-1153-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.10.001

引用本文: 李苹, 卢柏林, 邓时贵, 等. 不同分子量醋柴胡多糖对 Raw264.7 巨噬细胞抗炎免疫活性的影响[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(10): 1153-1156.

Study on Anti-inflammatory and Immunomodulatory Activity of Vinegar Bupleuri Radix Polysaccharides with Different Molecular Weight on Raw264.7 Macrophage

LI Ping¹, LU Bolin², DENG Shigui¹, ZHAO Ruizhi¹, ZHAO Ya^{1*} (1. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect of vinegar Bupleuri Radix polysaccharides with different molecular weight on the anti-inflammatory and immunomodulatory activity of Raw264.7 macrophage. **METHODS** Vinegar Bupleuri Radix polysaccharides with different molecular weight were separated by dialysis bags. MTT assay was used to determine the effect of vinegar Bupleuri Radix polysaccharides with different molecular weight on cell viability of Raw264.7 macrophage; neutral red phagocytosis assay was used to determine the effect of polysaccharides on cell phagocytosis; Griess method was used to detect their effect on the release of NO of Raw264.7 inflammatory cell model stimulated by LPS. **RESULTS** Six different molecular weight of vinegar Bupleuri Radix polysaccharides (<3.5, 3.5~50, 50~100, 100~300, 300~1 000, >1 000 kDa) were separated, and they had no cell toxicity to Raw264.7 macrophage in the range of 1.95~31.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. In addition to vinegar Bupleuri Radix polysaccharides with molecular weight <3.5 kDa, others significantly promoted the phagocytic activity of macrophages, and the activity of polysaccharides with molecular weights >100 kDa were more significant. All molecular weight segments of vinegar Bupleuri Radix polysaccharides significantly inhibited the release of NO in Raw264.7 inflammatory cells stimulated by LPS. **CONCLUSION** Molecular weight is an important factor affecting the activity of anti-inflammatory and immunomodulatory.

KEYWORDS: vinegar Bupleuri Radix polysaccharides; molecular weight; Raw264.7 macrophage; anti-inflammatory; immunomodulatory

柴胡为伞形科植物北柴胡(*Bupleurum chinense* DC.)或狭叶柴胡(*Bupleurum scorzonrifolium* Willd.)的干燥根。柴胡多糖作为其主要成分之一, 研究表明其具有抗氧化、抗炎、抗辐射、抗肿瘤、免疫调节和肝保护作用^[1]。其中抗炎和免疫调节作用是其活性作用。柴胡多糖是个复杂混合物,

其分子量分布范围较广^[2-4], 研究表明分子量对多糖活性有较大影响, 醋柴胡多糖抗炎免疫活性是所有分子量段醋柴胡多糖共同作用的结果, 还是某段或某几个分子量段的多糖在起作用尚不明确, 因此本实验将醋柴胡多糖分为 <3.5, 3.5~50, 50~100, 100~300, 300~1 000, >1 000 kDa 6 个不

基金项目: 国家自然科学基金项目(81703798, 81573612)

作者简介: 李苹, 女, 硕士生 Tel: 13751850492 E-mail: 908679518@qq.com *通信作者: 赵亚, 女, 博士, 实习研究员 Tel: (020)39318571 E-mail: 13423631120@163.com

同分子量段,并以巨噬细胞 Raw264.7 为研究对象^[5]对不同剂量的 6 个分子量段的醋柴胡多糖进行抗炎免疫活性研究,以期醋柴胡多糖活性成分的有效开发利用提供理论依据。

1 仪器与试剂

LD5-10B 低温高速离心机(北京京立离心机有限公司); BT-125D 电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; CO₂ 孵箱(美国 Thermo Scientific 公司); ESCO SVE-4A1 型生物洁净工作台(德国 ESCO BioTECH 公司); VictorTM X5 生物酶标仪(美国 PerkinElmer 公司); 透析袋(3.5, 50, 100, 300, 1 000 kDa)(上海远业公司)。

RAW264.7 小鼠巨噬细胞(美国 ATCC 公司),醋制柴胡(康美药业有限公司,批号:201706),由广州中医药大学第二附属医院陈文良副主任中药师鉴定为正品。

澳洲胎牛血清(批号:12491023)、DMEM 培养基(批号:20171014)、0.25%胰蛋白酶(批号:15050065)、PBS 磷酸盐缓冲液(批号:20170918)均购自美国 Gibco 公司;二甲基亚砜(DMSO,批号:201703)、脂多糖(LPS,批号:057M4013V)、3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,批号:DH343-1)粉末均购自美国 Sigma 公司;NO 检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:S0021);无水乙醇、丙酮、氯仿、正丁醇(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司)。

2 方法

2.1 不同分子量段醋柴胡多糖的提取与制备

粉碎的醋柴胡药材,过 2 号筛,按料液比(1:10)加入蒸馏水,沸水浸提 3 次,每次提取 1 h,上清液用纱布过滤,并浓缩至药液浓度为 1 g·mL⁻¹(相当于生药量),然后加入 4 倍量乙醇,慢加快搅,于 4℃冰箱静置过夜,过滤得沉淀,沉淀用无水乙醇和丙酮反复冲洗 3 次后冷冻干燥。冻干粉重新用蒸馏水溶解,并通过 Sevage 法除去蛋白质,得醋柴胡总多糖。醋柴胡总多糖依次用 3.5, 50, 100, 300, 1 000 kDa 透析袋透析,并冷冻干燥至恒重。

2.2 Raw264.7 细胞活力测定(MTT 法)

把细胞悬液浓度调为 4×10⁵ 个·mL⁻¹,以每孔 200 μL 加入到 96 孔细胞培养板内,置于 37℃的含 5%CO₂ 培养箱培养。培养 24 h 后,细胞贴壁,吸出培养液,加入不同浓度的醋柴胡多糖溶液(31.25, 15.6, 7.8, 3.9, 1.95 μg·mL⁻¹),每孔 200 μL,

在继续培养 24 h 后,吸出培养液,用 PBS 洗涤 2 次,加入配置好的 MTT 溶液(MTT:完全培养基=1:7),继续培养 4 h,吸出培养液,加入每孔 150 μL 二甲基亚砜,放置在摇床上低速振荡 5 min,充分溶解结晶物,酶标仪 570 nm 测量各孔的吸光度值(OD 值)。

2.3 巨噬细胞吞噬功能检测

将巨噬细胞 Raw264.7 以 4×10⁴ 个·mL⁻¹ 的浓度接种至 96 孔培养板中,每孔 200 μL,24 h 后更换细胞培养液。实验组[加不同分子量的醋柴胡多糖(31.25, 15.6, 7.8, 3.9, 1.95 μg·mL⁻¹)、LPS 组[加入 1 μg·mL⁻¹ 的 LPS 细胞培养液],空白组各设 3 个复孔,作用于巨噬细胞 Raw264.7 并在 24 h 后弃去 96 孔板各孔中的细胞培养上清液,用 PBS 清洗 96 孔板 2 遍,加 100 μL 中性红染料(1 μg·mL⁻¹),置 37℃,5%CO₂ 培养箱内培养 30 min 后取出,再用 PBS 洗 2 遍,加细胞裂解液 100 μL。继续放入 37℃,含 5%CO₂ 培养箱内培养,4 h 后在酶标仪 540 nm 处检测 OD 值。细胞对中性红吞噬能力用吞噬指数表示:吞噬指数=实验组 OD 值/空白组 OD 值。

2.4 LPS 刺激巨噬细胞 Raw264.7 NO 释放量的测定

将细胞 Raw264.7 配成 3×10⁵ 个·mL⁻¹,加入 1 mL 于 24 孔板中,培养 24 h 后,弃去上清,分别加入空白培养液组(空白组),LPS 组(1 μg·mL⁻¹ LPS,模型组),阳性药组(5 μg·mL⁻¹ 地塞米松, Dex 组),不同分子量段醋柴胡多糖溶液(31.25, 15.6, 7.8, 3.9, 1.95 μg·mL⁻¹)各 1 mL,其中阳性药组和多糖溶液均用 1 μg·mL⁻¹ LPS 配置完成。放在培养箱培养 48 h,按照 NO 试剂盒说明进行操作,用 Griess 法测定样品中 NO 的含量。NO 抑制率(%)=(1-给药组 NO 含量/模型组 NO 含量)×100%。

3 结果

3.1 不同分子量段醋柴胡多糖的分布

分离得到<3.5, 3.5~50, 50~100, 100~300, 300~1 000, >1 000 kDa 6 个不同分子量段的醋柴胡多糖,其所占总糖的比例见图 1,按所占比例从大到小的顺序依次为>1 000, 300~1 000, 100~300, <3.5, 3.5~50, 50~100 kDa,其中分子量>100 kDa 的醋柴胡多糖占多数,占总糖比例的 68.8%。

3.2 不同分子量段醋柴胡多糖对 Raw264.7 细胞活力的影响

不同分子量段醋柴胡多糖对细胞活力的影响见图 2。结果表明加药培养 24 h 后,不同浓度不同分

子量段的醋柴胡多糖的细胞存活率均>90%，说明不同分子量段醋柴胡多糖浓度在 1.95~31.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内不影响细胞活力，对 Raw264.7 细胞无毒性。

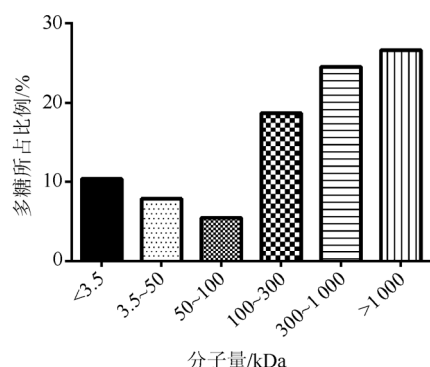


图 1 不同分子量段醋柴胡多糖的分布

Fig. 1 Distribution of vinegar Bupleuri Radix polysaccharides with different molecular weight

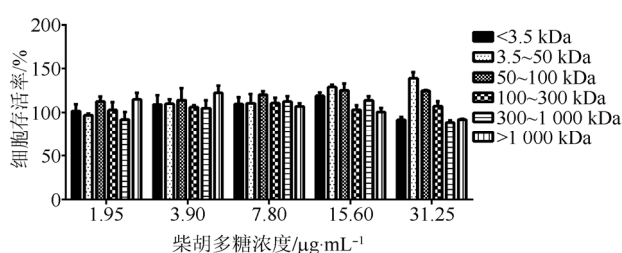


图 2 不同分子量段醋柴胡多糖对 Raw264.7 巨噬细胞活力的影响

Fig. 2 Effect of vinegar Bupleuri Radix polysaccharides with different molecular weight on cell viability of Raw264.7 macrophage

3.3 不同分子量段醋柴胡多糖对巨噬细胞吞噬功能的影响

不同分子量段醋柴胡多糖对巨噬细胞吞噬功能的影响见图 3。与正常对照组相比，<3.5 kDa 分子量段醋柴胡多糖各浓度对巨噬细胞吞噬中性红，均无显著性差异；3.5~50, 50~100 kDa 分子量段醋柴胡多糖仅 1.95 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度时能够显著促进巨噬细胞吞噬中性红($P<0.01$ 或 $P<0.05$)，而 300~1 000 kDa 分子量段醋柴胡多糖在 3.90~15.60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 100~300 kDa 以及>1 000 kDa 分子量段醋柴胡多糖在 1.95~31.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内均能显著促进巨噬细胞吞噬中性红($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

3.4 不同分子量段醋柴胡多糖对 LPS 刺激巨噬细胞 Raw264.7 NO 释放量的影响

不同分子量段醋柴胡多糖对 LPS 刺激巨噬细胞 NO 释放量的影响见图 4。与正常对照组相比，LPS 模型组能显著促进细胞释放 NO，不同浓度不同分子量段醋柴胡多糖均对 LPS 刺激巨噬细胞 NO 释放量有显著抑制作用($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

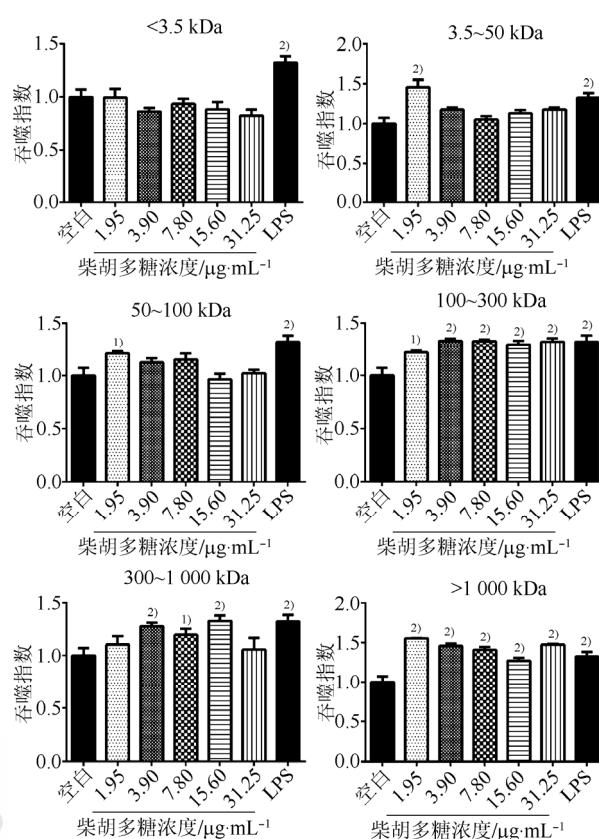


图 3 不同分子量段醋柴胡多糖对 Raw264.7 巨噬细胞吞噬功能的影响

与空白组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of vinegar Bupleuri Radix polysaccharides with different molecular weight on cell phagocytosis of Raw264.7 macrophage

Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

4 讨论

本研究采用透析法对醋柴胡总多糖进行良好的分离，并初步明确了不同分子量醋柴胡多糖的分布特征，结果显示其中>68.8%的醋柴胡多糖分子量>100 kDa。

巨噬细胞吞噬实验结果表明，除<3.5 kDa 分子量段部分，其余各分子量段醋柴胡多糖均能增强巨噬细胞吞噬活性，提示机体尚未发生明显的炎症反应时，即病原菌侵入早期，醋柴胡多糖能促进巨噬细胞的吞噬功能，提高机体免疫力；而≥100 kDa 分子量段醋柴胡多糖较<100 kDa 分子量段醋柴胡多糖吞噬活性增加更为显著，且<3.5 kDa 分子量段醋柴胡多糖对细胞吞噬活性无影响，证实相对分子量对醋柴胡多糖免疫活性有影响，醋柴胡总多糖的促进巨噬细胞吞噬功能的活性主要是≥100 kDa 分子量段醋柴胡多糖作用的结果，而<3.5 kDa 分子量段醋柴胡多糖活性差可能因其分子量过低而无法形成产生活性的聚合结构所致^[6]。

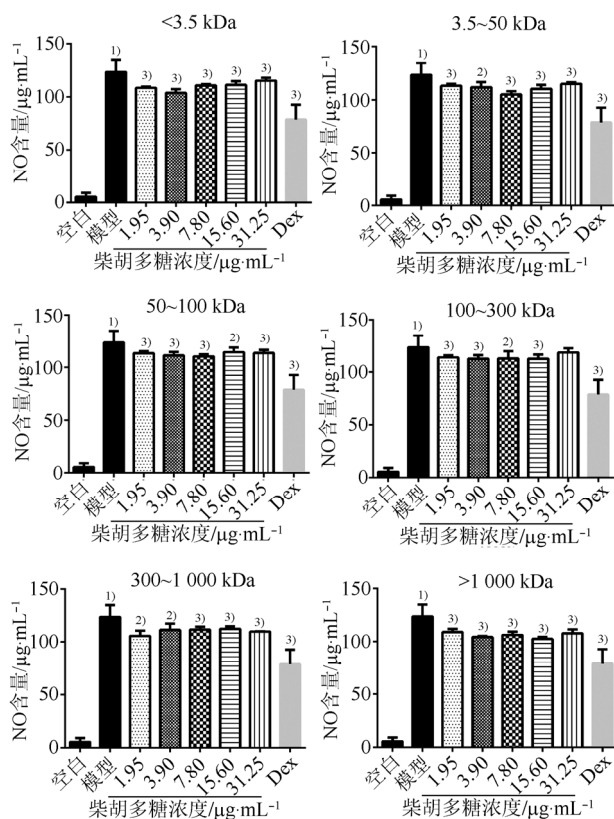


图4 不同分子量段醋柴胡多糖对LPS刺激巨噬细胞NO释放量的影响

与空白组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effect of vinegar *Bupleuri Radix* polysaccharides with different molecular weight effect on release of NO of Raw264.7 inflammatory cell model stimulated by LPS

Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

NO是炎症反应和免疫调节的关键因子^[7]。在多种炎症细胞和动物实验模型中, NO浓度显著增高, NO释放量减少是炎症改善的重要指标^[8]。但NO在体内极易氧化成 NO_2^- , 无法直接测定其含量, 因此本实验使用NO检测试剂盒, 其原理是在酸性条件下, NO_2^- 与重氮盐磺胺发生重氮反应生成重氮化合物, 然后进一步与萘基乙烯基二胺发生偶合反应。该反应生成的产物在540 nm处有最大吸收峰, 其浓度与 NO_2^- 浓度具有线性关系。使用试剂盒的方法能快速、简便且准确地测定各组样品中NO的含量变化, 提高了该指标数据的可信度。

LPS刺激Raw264.7炎症细胞模型NO释放量的测定结果显示6个分子量段醋柴胡多糖均能显著抑制LPS刺激巨噬细胞NO的释放。表明在炎症过激(LPS刺激巨噬细胞)的情况下, 各分子量段醋柴胡多糖能有效抑制NO的释放, 从而发挥抗炎活性, 进而有效阻止因炎症过激引起的机体组织损伤。与吞噬结果不同的是, 醋柴胡总多糖的抗

炎活性是所有分子量段醋柴胡多糖共同作用的结果, 表明分子量对不同活性的影响趋势不同, 因此在研究多糖不同活性时, 均需考察其分子量的影响。多糖的生物活性还受到结构及理化性质的影响^[9]; 此外, 多糖在体外的生物活性并不能全面反映其体内生物活性^[10], 尤其是大分子量的多糖, 很难进入体内直接发挥活性。这部分多糖可能先在肠道或其他部位发挥局部免疫调节和抗炎作用, 进而影响整体机体的免疫炎症状态^[11-12]。因此醋柴胡多糖结构和理化性质对醋柴胡多糖体内活性的影响还需进一步研究, 从而更有效地开发出醋柴胡多糖活性成分。

REFERENCES

- [1] 叶方, 杨光义, 王刚, 等. 柴胡多糖的研究进展[J]. 医药导报, 2012, 31(8): 1042-1045.
- [2] XU H, ZHANG Y Y, ZHANG J W, et al. Isolation and characterization of an anti-complementary polysaccharide D3-S1 from the roots of *Bupleurum smithii* [J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(2): 175-182.
- [3] LUO C H. Molecular weight measurement of *Bupleurum* polysaccharide [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 1997, 28(6): 267-268.
- [4] 万鹏. 醋柴胡多糖增加难溶性药物溶解度作用及机制初探[D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [5] LIANG S, CHEN B S, ZHU M L, et al. Effect of ermiao recipe on regulating macrophage polarization [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(8): 920-923.
- [6] BAO S H, ZHA X Q, HAO J, et al. *In vitro* antioxidant activity of polysaccharides with different molecular weights from *Dendrobium candidum* [J]. Food Sci(食品科学), 2009, 30(21): 123-127.
- [7] COLEMAN J W. Nitric oxide in immunity and inflammation [J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1(8): 1397-1406.
- [8] BHARDWAJ M, SALI V K, MANI S, et al. Neophytadiene from *turbinaria ornata* suppresses LPS-induced inflammatory response in Raw 264.7 macrophages and sprague dawley rats [J]. Inflammation, 2020. Doi: 10. 1007/s10753-020-01179-z.
- [9] LIU S Z, ZHOU W G, YE W J, et al. Research advance on biological activity and structure-activity relationships of bioactive polysaccharide [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2017, 38(18): 211-218.
- [10] ZHANG Q, XU Y, LV J, et al. New utilization of *Polygonum multiflorum* polysaccharide as macromolecular carrier of 5-fluorouracil for controlled release and immunoprotection [J]. Int J Biol Macromol, 2018(116): 1310-1316.
- [11] GAO B B, PENG Y, LI X B. Research progress on intestinal immunoregulation and mechanism of Sijunzi Decoction polysaccharide [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(2): 462-467.
- [12] XU X F, YANG J G, LUO Z, et al. Lentinula edodes-derived polysaccharide enhances systemic and mucosal immunity by spatial modulation of intestinal gene expression in mice [J]. Food Funct, 2015, 6(6): 2068-2080.

收稿日期: 2019-06-21

(本文责编: 沈倩)