

猪苓多糖对 LPS 诱导的 J774 炎症模型的 抗炎作用及其机制

江泽波, 李思明, 赵晋, 曾星*

(广州中医药大学第二附属医院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**研究猪苓多糖对脂多糖(LPS)诱导的 J774 巨噬细胞炎症模型细胞因子的调节作用,并探讨其可能的抗炎作用机制。**方法:**J774 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板,将细胞分为空白组、LPS 模型组、LPS 加猪苓多糖低剂量组 ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、LPS 加猪苓多糖中剂量组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、LPS 加猪苓多糖高剂量组 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),每组 6 个复孔。J774 给予 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 刺激 3 h,同时猪苓多糖干预共刺激 3 h 后收集细胞,实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 方法检测白细胞介素- 1β (IL- 1β),白细胞介素-10 (IL-10),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),干扰素- γ (IFN- γ) 和白细胞介素-6 (IL-6) mRNA 的表达,Western blotting 检测猪苓多糖对 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38),细胞外信号调节蛋白激酶 42/44 (ERK42/44),p65 丝裂原活化蛋白激酶 (p65) 蛋白磷酸化表达的影响。**结果:**与空白组相比,LPS 模型组细胞因子 IL- 1β ,IL-10,TNF- α ,IFN- γ 和 IL-6 mRNA 表达量显著升高 ($P < 0.01$),炎症模型建立成功。给予猪苓多糖干预后,猪苓多糖可降低由 LPS 诱导导致的炎症因子的升高与 LPS 导致的 p38,ERK42/44,p65 磷酸化的表达 ($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论:**猪苓多糖可以降低 LPS 导致的炎症反应,可能是通过丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路来降低炎症损伤。

[关键词] 猪苓多糖; 炎症模型; 细胞因子; 丝裂原活化蛋白激酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0156-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015030156

Anti-inflammatory Effect and Mechanism of Polyporus Polysaccharide on LPS-stimulated J774 Cells
JIANG Ze-bo, LI Si-ming, ZHAO Jin, ZENG Xing* (The Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of cytokines of polyporus polysaccharide (PPS) on lipopolysaccharide (LPS) -stimulated J774, and to explore its anti-inflammatory mechanism. **Method:** J774 cells were inoculated in 6-well plates with the density of 2×10^5 per well. The experiment was divided into blank group, model group, LPS plus low-dose PPS group ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), LPS plus middle-dose PPS group ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and LPS plus high-dose PPS group ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) were set up in this study. Each group had six wells. J774 cells were polarized to inflammatory macrophage by treating with $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS for 3 h. Meanwhile, LPS-stimulated J774 cells were treated with PPS of 1, 10, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for 3 h. The expressions of interleukin- 1β (IL- 1β), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-6 (IL-6) mRNA were detected by real-time quantitative PCR (RT-PCR). And the expressions of p38 mitogen-activated protein kinase (p38), extracellular signal-regulated kinase (ERK42/44), p65 mitogen-activated protein kinase (p65) protein were determined by using Western blotting. **Result:** Compared to blank group, the percentages of IL- 1β , IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL-6 mRNA of model group were significantly higher ($P < 0.01$). It meant the inflammation model was successfully established. After treated with PPS, the expressions of IL- 1β , IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL-6 mRNA were reduced. And the percentages of p38, ERK42/44, p65 protein were decreased ($P < 0.01, P < 0.05$). **Conclusion:** PPS could reduce inflammation in LPS-stimulated J774 cells. It might be achieved through the mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway to reduce inflammation damage.

[收稿日期] 20140502(001)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2010B030700059)

[第一作者] 江泽波,李思明(共同第一作者),博士研究生,从事中药药理研究,Tel:020-39318671,E-mail:pdfism@sina.com

[通讯作者] *曾星,博士,博士研究生导师,从事中药基础药理和临床药理研究,Tel:020-39318678,E-mail:zengxing-china@163.com

[Key words] polyporus polysaccharide; inflammation model; cytokines; mitogen activated protein kinase

猪苓多糖 (polyperus polysaccharide, PPS) 是中药猪苓水提取物中的主要活性成分之一, 是良好的免疫调节剂, 中药猪苓提取物具有多种生物学功能, 如抗肿瘤, 增强免疫和保肝活动等, 尤其是对肾脏疾病的治疗中应用更多^[1-2]。猪苓多糖在治疗膀胱癌模型大鼠时, 可以影响巨噬细胞的免疫分子表达^[3]。据文献报道, 猪苓多糖类似于脂多糖 (LPS), 通过 Toll 样受体 4 (TLR4) 激活巨噬细胞, 从而分泌一系列的细胞因子和活性氧等参与机体的免疫调节功能^[4]。猪苓可以降低 LPS 诱导炎症因子白细胞介素-6 (IL-6), 诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS) 的 mRNA 的表达^[5]。本文通过 LPS 诱导巨噬细胞 J774 炎症模型, 给予猪苓多糖干预, 检测其对细胞因子白细胞介素-1 β (IL-1 β), 白细胞介素-10 (IL-10), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 干扰素- γ (IFN- γ) 和白细胞介素-6 (IL-6) mRNA 的影响和炎症相关的丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路的 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38), p65 丝裂原活化蛋白激酶 (p65) 蛋白磷酸化的表达作用, 探讨其抗炎的作用机制。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠巨噬细胞系细胞株 J774 (广东省中医院中心实验室保存)。

1.2 药物和试剂 猪苓多糖 (多孔菌科真菌猪苓 *Polyporus umbellatus* 干燥菌核提取的水溶性多糖, 含量为 92%, 惠州植物有限公司提供), DMEM 培养基 (批号 NYA0793), 双抗 (Gibco, 批号 J122751), 胎牛血清 (FBS, Hyclone 公司, 批号 GVJ0081), TRIZOL (Invitrogen, 批号 47303), 逆转录试剂盒 (Thermo, 批号 00112927), 荧光定量 PCR 试剂盒 (罗氏, 批号 68298), 脂多糖 (LPS, 批号 055: B5, Sigma), 磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p-p38, CST, USA), 磷酸化 p65 丝裂原活化蛋白激酶 (p-p65, CST, USA), 细胞外信号调节蛋白激酶 (ERK, CST, USA), 磷酸化 ERK (p-ERK, CST, USA), GAPDH 抗体 (武汉博士德生物科技有限公司), HRP-goat anti-rabbit IgG (CST, USA)。

1.3 仪器 7500 型实时荧光定量基因扩增系统 (ABI, USA), 超速冷冻离心机 (Beckman, USA)。

2 方法

2.1 细胞培养与实验分组 细胞用含 100 mL \cdot L⁻¹

的 FBS 的培养基培养常规, 条件为 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂。实验分为空白组, LPS 模型组 (10 mg \cdot L⁻¹), LPS + 猪苓多糖低、中、高剂量组, 猪苓多糖的剂量为 1, 10, 100 mg \cdot L⁻¹。

2.2 检测猪苓多糖对 LPS 诱导的 J774 细胞 IL-1 β , IL-10, TNF- α , IFN- γ 和 IL-6 mRNA 的影响 药物干预巨噬细胞 3 h 后 TRIZOL 收集细胞, 然后提取总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书将 1 μ g RNA 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板扩增 IL-1 β , IL-10, I 型精氨酸酶 (Arg-1) 的基因编码片段。按照 cDNA 合成试剂盒逆转录, 将 mRNA 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 IL-6, Arg-1, IL-1 β , IL-10, iNOS, TNF- α , IFN- γ mRNA 的基因编码片段。

引物基因引物序列如下: GAPDH 基因引物上游序列 5'-GTTTTTCAGGGATGAAGCGGC-3', 下游序列 5'-TGGGATAGGGCCTCTCTTGC-3'; IL-10 基因引物上游序列 5'-TACTCGGCAAACCTAGTGCG-3', 下游序列 5'-GTGTCCCAACATTCATATTGTCAGT-3'; IL-6 基因引物上游序列 5'-GTCTTGGCCGAGGACTA-AGG-3', 下游序列 5'-TACTCGGCAAACCTAGTGCG-3'; IL-1 β 基因引物上游序列 5'-TGGGATAGGGC-CTCTCTTGC-3', 下游序列 5'-CCATGGAATCCGT-GTCTTCCT-3'; TNF- α 基因引物上游序列 5'-GTGTC-CCAACATTCATATTGTCAGT-3', 下游序列 5'-TGG-GAAGAGAAACCAGGGAGA-3'; iNOS 基因引物上游序列 5'-TGAGTTCCGAAGCAAGCCAA-3', 下游序列 5'-AGACCTCAACAGAGCCCTCA-3'。

采用 RT-PCR 法检测 IL-6, iNOS, IL-1 β , IL-10, TNF- α mRNA 的相对表达量。按照 RT-PCR 试剂盒说明加 2 \times SYBR[®] Green 10 μ L, 上下游引物终浓度 0.4 μ mol \cdot L⁻¹, cDNA 模板 10 μ L, DEPC 水 12 μ L, 反应总体积为 20 μ L。按照扩增试剂盒的程序欲变性 95 $^{\circ}$ C 10 min, 变性 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s 退火, 45 个循环。以 GAPDH 做为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算相对基因的表达量^[6]。

2.3 检测猪苓多糖对 LPS 诱导的 J774 细胞 p38 和 ERK 蛋白磷酸化表达的作用 培养巨噬细胞 J774, 给予 LPS 和不同剂量的猪苓多糖干预 3 h, 到时间后收集细胞, 用 RIPA 蛋白裂解液裂解细胞收集总蛋白, 检测蛋白浓度, 以 50 μ g 进行变性跑电泳, 检测猪苓多糖对 LPS 诱导的 p38, p65, ERK42/44 蛋白

磷酸化表达水平的影响。

2.4 数据分析 数据用 SPSS 11.1 做统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析法, 以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 对 LPS 诱导的 J774 细胞 IL-1 β , IL-10, TNF- α , IFN- γ 和 IL-6 mRNA 的影响 LPS 诱导后相应的 IL-1 β , IL-10, TNF- α , IFN- γ , iNOS 和 IL-6 mRNA 表

达量均升高, 与空白组相比有统计学差异 ($P < 0.01$), 验证 LPS 诱导的炎症模型成功。LPS 诱导 J774 炎症模型给予不同剂量的猪苓多糖干预后, 与模型组相比, 相应细胞因子的表达量降低, 如 IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , iNOS, 有统计学差异 ($P < 0.01$), 呈剂量依赖性。同时 IL-10 mRNA 表达量也随猪苓多糖加入剂量的升高而依赖性降低, 与模型组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 猪苓多糖对 LPS 诱导的 J774 细胞因子 mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Influence of PPS on the relative expression of cytokines mRNA in LPS-stimulated J774 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	药物浓度 /mg·L ⁻¹	2 ^{-$\Delta\Delta Ct$}					
		IL-1 β	IL-6	IL-10	TNF- α	iNOS	IFN- γ
空白	-	1.01 ± 0.02	1.02 ± 0.03	1.05 ± 0.05	1.01 ± 0.10	1.01 ± 0.04	1.08 ± 0.06
模型	-	8.34 ± 0.89 ¹⁾	5.95 ± 0.40 ¹⁾	5.41 ± 0.12 ¹⁾	1.62 ± 0.09 ¹⁾	2.59 ± 0.08 ¹⁾	6.99 ± 0.15 ¹⁾
LPS + 猪苓多糖	1	3.61 ± 0.42 ²⁾	0.93 ± 0.05 ²⁾	2.26 ± 0.06 ²⁾	1.50 ± 0.06 ²⁾	2.57 ± 0.11 ²⁾	0.97 ± 0.05 ²⁾
	10	2.94 ± 0.15 ²⁾	0.59 ± 0.05 ²⁾	1.67 ± 0.07 ²⁾	1.62 ± 0.08 ²⁾	2.26 ± 0.03 ²⁾	0.50 ± 0.01 ²⁾
	100	3.22 ± 0.22 ²⁾	0.45 ± 0.02 ²⁾	1.71 ± 0.06 ²⁾	1.42 ± 0.06 ²⁾	1.99 ± 0.01 ²⁾	0.36 ± 0.02 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 LPS 诱导的 J774 细胞核因子 κ B (NF- κ B) p65, p38, ERK42/44 蛋白表达的影响 LPS 刺激诱导 J774 细胞 3 h 后, NF- κ B p65, p38 蛋白磷酸化表达量显著上升, 和空白组比较有

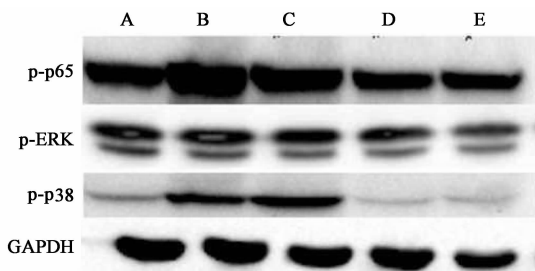
显著差异 ($P < 0.01$), 而 ERK42/44 磷酸化不明显。给予猪苓多糖干预 3 h 后, p65, p38 蛋白磷酸化与模型组比较明显降低 ($P < 0.05$), 见图 1, 表 2。

表 2 猪苓多糖对 LPS 诱导的 J774 细胞蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Influence of PPS on the expression of protein in LPS-stimulated J774 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	药物浓度 /mg·L ⁻¹	p-p65 /GAPDH	p-ERK /GAPDH	p-p38 /GAPDH
空白	-	1.12 ± 0.07	0.57 ± 0.03	0.11 ± 0.03
模型	-	1.77 ± 0.15 ¹⁾	0.65 ± 0.08	0.50 ± 0.04 ¹⁾
LPS + 猪苓多糖	1	1.81 ± 0.10	0.69 ± 0.01	0.58 ± 0.08
	10	1.12 ± 0.10 ²⁾	0.51 ± 0.02 ²⁾	0.07 ± 0.01 ²⁾
	100	0.98 ± 0.07 ²⁾	0.34 ± 0.04 ²⁾	0.08 ± 0.01 ²⁾

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



A. 空白组; B. 模型组 (LPS 10 mg·L⁻¹); C. LPS + 猪苓多糖 1 mg·L⁻¹ 组; D. LPS + 猪苓多糖 10 mg·L⁻¹ 组; E. LPS + 猪苓多糖 100 mg·L⁻¹ 组

图 1 猪苓多糖对 LPS 诱导的 J774 细胞 p-p65, p-ERK, p-p38 蛋白表达量的影响

Fig. 1 Influence of PPS on the expression of p-p65, p-ERK, p-p38 protein in LPS-stimulated J774 cells

4 讨论

猪苓提取物具有较多生命活性, 如抗肿瘤, 免疫增强和保肝活动等, 尤其是在肾脏疾病中的应用更为广泛^[1]。炎症模型是一个经典模型, 当巨噬细胞受到炎症刺激因子如 LPS 诱导刺激后, 巨噬细胞模式受体 TLR4 和脂多糖的糖链结合, 作为刺激活化信号, 刺激巨噬细胞炎症通路的传递, 增加炎症因子 mRNA 的转录, 并合成分泌大量的炎症因子到体液中, 参与机体的免疫调节, 提高巨噬细胞的吞噬功能与抗原提呈能力, 分泌更多炎症因子, 如 IFN- γ , L-1 β , TNF- α , IFN- γ 和 IL-6, 继续作为刺激信号活化巨噬细胞, 同时参与体液调节, 进而杀伤外来的病原体等^[7-9]。多糖具有着免疫调节作用, 可通过多种

途径活化巨噬细胞。

本实验中, J774 细胞给予 LPS 刺激后, 相应的炎症因子 IL-1 β , IFN- γ , IL-6 等和 iNOS mRNA 表达量升高, 体外炎症模型构建成功。给予不同剂量的猪苓多糖干预后, 相应的炎症因子 mRNA 受到抑制, 与模型组相比均有不同程度的降低。文献报道猪苓多糖可通过与巨噬细胞模式受体 TLR4 结合, 启动巨噬细胞的模式信号传导^[4]。脂多糖是目前激活巨噬细胞 TLR4 受体能力最强的刺激因子, 与其相比, 猪苓多糖激活能力较弱, 亲和性较强。J774 细胞受 LPS 刺激与猪苓多糖干预后, 猪苓多糖与脂多糖共同结合 TLR4 受体, 竞争性地激活 J774 巨噬细胞, 从而导致其活化强度的改变。

MAPK 是 LPS 影响巨噬细胞活化重要的炎症通路, p38 和 ERK 是其中信号转导较为重要的两个通路蛋白, 参与炎症的发生和发展。当巨噬细胞受到刺激信号刺激后, 相应的蛋白发生构象改变, 磷酸化, 进入细胞核内, 激活相应的基因转录, 从而活化巨噬细胞, 分泌一系列的活性因子参与机体的免疫调节^[10]。NF- κ B 信号通路能调控机体免疫、炎症反应和细胞增殖, 影响炎症介质、黏附分子等的表达, 从而调节蛋白合成与表达权。p65 是一个较为公认的活化巨噬细胞通路蛋白, 其活化后, 可大量的分泌各种炎症因子^[11]。细胞模型给予猪苓多糖干预后, 相应蛋白的磷酸化降低, 猪苓多糖则可能是通过抑制其磷酸化程度, 降低炎症因子的表达, 从而产生抗炎作用。

[参考文献]

[1] Zhao Y Y. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and quality control of *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries: a review [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 149(1):35-48.
[2] Zhang G, Zeng X, Li C, et al. Inhibition of urinary

bladder carcinogenesis by aqueous extract of sclerotia of *Polyporus umbellatus* fries and polyporus polysaccharide [J]. Am J Chin Med, 2011, 39(1):135-144.

[3] 曾星, 李彩霞, 黄羽, 等. 猪苓及猪苓多糖对膀胱癌模型大鼠腹腔巨噬细胞吞噬和表面免疫相关分子表达的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2011(5):414-418.
[4] Li X, Xu W. TLR4-mediated activation of macrophages by the polysaccharide fraction from *Polyporus umbellatus* (pers.) Fries[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135(1):1-6.
[5] 胡金萍, 江泽波. 猪苓对 LPS 诱导的 J774 细胞 IL-6 与 iNOS 表达的影响[J]. 当代医学, 2013(6):19-20.
[6] 吴玉, 翟渊粉, 黄明霞, 等. 家蚕常用内参基因稳定性分析及丝蛋白相关基因表达调控研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(4):423-431.
[7] Mantovani A, Biswas S K, Galdiero M R, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling[J]. J Pathol, 2013, 229(2):176-185.
[8] Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology[J]. Hepatology, 2014, 59(5):2034-2042.
[9] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization; *in vivo* veritas[J]. J Clin Invest, 2012, 122(3):787-795.
[10] Hyam S R, Lee I A, Gu W, et al. Aretigenin ameliorates inflammation *in vitro* and *in vivo* by inhibiting the PI3K/AKT pathway and polarizing M1 macrophages to M2-like macrophages [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 708(1/3):21-29.
[11] Wang C, Liu X, Liu Y, et al. Zinc finger protein 64 promotes Toll-like receptor-triggered proinflammatory and type I interferon production in macrophages by enhancing p65 subunit activation [J]. J Biol Chem, 2013, 288(34):24600-246008.

[责任编辑 聂淑琴]