

苜草素多糖、黄酮和皂苷对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 β -防御素基因表达的影响

杨江涛,董晓芳,佟建明*,刘晴雪,张琪,吴莹莹

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室,北京 100193)

摘要: 本研究旨在观察苜草素活性成分多糖、黄酮、皂苷对小鼠 β -防御素表达的影响。分别采用含有 30、60、90、150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苜草素多糖、含有 10、20、30、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苜草素黄酮、含有 30、60、90、150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苜草素皂苷的细胞培养液处理 RAW264.7 细胞,观察其对小鼠 RAW 264.7 细胞 β -防御素(mouse beta-defensin, mBD)mRNA 表达水平的影响。结果发现,苜草素多糖对 mBD1 的表达水平没有影响,对 mBD2、mBD3 的表达有促进作用,30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 效果最明显;苜草素黄酮促进 mBD1 的表达,10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 效果最明显,对 mBD2、mBD3 的表达有抑制作用;苜草素皂苷对 mBD1 的表达有促进作用,对 mBD2 的表达水平没有影响,对 mBD3 表达有抑制作用。苜草素中的多糖、黄酮、皂苷对 RAW264.7 细胞 mBDs 表达的作用效果不同,苜草素多糖可能主要促进动物的特异性免疫功能,苜草素黄酮、皂苷可能促进动物的先天性免疫功能。

关键词: β -防御素;苜草素;多糖;黄酮;皂苷

中图分类号:S816.79;Q344.13

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2010)05-0608-07

Effect of Polysaccharide, Flavonoids and Saponins of Polysavone on Expression of Mouse Beta-defensins in RAW264.7 Cells

YANG Jiang-tao, DONG Xiao-fang, TONG Jian-ming*, LIU Qing-xue, ZHANG Qi, WU Ying-ying

(State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science,

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: To investigate the effect of polysaccharide, flavonoids and saponins of Polysavone on the expression of mouse beta-defensins in RAW264.7 cells, RAW264.7 cells were cultured with Polysavone polysaccharide at 30, 60, 90, 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, Polysavone flavonoids at 10, 20, 30, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, Polysavone saponins at 10, 20, 30, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The mRNA expression of mouse beta-defensin (mBD1-3) were detected. The results showed that the mBD2 and mBD3 mRNA expression could be improved by Polysavone polysaccharide, especially the treatment with 30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, but there was no effect on the mRNA expression of mBD1. The mBD1 mRNA expression could be improved by Polysavone flavonoids, especially the treatment with 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the mBD2 and mBD3 mRNA expression could be inhibited. The mBD1 mRNA expression could be improved by Polysavone saponins, the mBD3 mRNA expression could be inhibited, but Polysavone saponins had no effects on the mRNA expression of mBD2. The results showed the different effects of polysaccharide, flavonoids and saponins of Polysavone on the mRNA expression of mBD1, mBD2 and mBD3. The Polysavone polysaccharide may enhance the function of adaptive immunity. The flavonoids and saponins of Polysavone may enhance the func-

收稿日期:2009-03-25

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD12B05);农业科技成果转化资金项目(2007GB23260400);中央级公益性科研院所基本科研专项资金(ywf-td-4)

作者简介:杨江涛(1973-),男,河南开封人,硕士,主要从事动物营养免疫研究,Tel:010-62816015,E-mail:jiangtao.yang@hotmail.com

* 通讯作者:佟建明,E-mail:tjm606@263.net

tion of innate immunity.

Key words: beta-defensin; Polysavone; polysaccharide; flavonoids; saponins

苜蓿素(Ploysavone)是从天然紫花苜蓿中通过现代提取工艺技术生产的纯植物成分添加剂^[1],其主要有效成分为黄酮($\geq 5\%$)、多糖($\geq 15\%$)和皂苷($\geq 5\%$)。现代药理学研究结果表明,苜蓿中所含的黄酮、皂苷类成分具有降血脂和抗动脉粥样硬化作用^[2-4];所含的多糖具有免疫增强作用^[5]。苜蓿素具有促进动物生长^[1,6-8],提高动物免疫功能的作用^[7,9-10],但是苜蓿素促进动物免疫功能的作用机制尚不甚清楚。 β -防御素(Beta-defensins)是由动物细胞产生的天然抗菌肽,具有杀灭细菌、真菌、衣壳病毒等作用,是连接先天性免疫与特异性免疫的桥梁^[11-14]。哺乳动物的 β -防御素 1 是组成型表达,可以被调控^[15], β -防御素 2 是诱导型表达,小鼠 β -防御素 3(mouse beta-defensin 3, mBD3)与人 β -防御素 2(human beta-defensin 2, hBD2)是同族蛋白^[16],mBD2 是小鼠特有的 β -防御素^[17]。 β -防御素在动物体内具有趋化活性,趋化 T 细胞、单核细胞及未成熟的树突状细胞(iDC),能诱导单核细胞和表皮细胞产生细胞因子, β -防御素 2 通过结合 CCR6 受体趋化记忆性 T 细胞、可引起肥大细胞活化和脱颗粒,致组胺和前列腺素释放,mBD2 可以通过 TLR4 受体诱导未成熟的树突状细胞成熟,连接先天性免疫与特异性免疫^[12, 18]。众多试验证明, β -防御素是动物先天性免疫的重要组成和调控因子,是特异性免疫的增强剂,增强病原特异性体液免疫和细胞免疫应答^[18]。

在以前的研究中发现,苜蓿素可以促进小鼠巨噬细胞 β -防御素基因的表达^[19],本研究通过分离苜蓿素中的活性成分多糖、黄酮和皂苷,分别对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 进行处理,研究苜蓿素多糖、黄酮和皂苷对小鼠巨噬细胞 β -防御素(mouse beta-defensins, mBDs)表达的影响,从而揭示苜蓿素促进动物免疫功能的物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

BALB/c 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞株购自中国科学院上海生命科学院;DMEM 细胞培养基为 Hyclone 公司产品;胰蛋白酶为美国 Gibco 公司产品;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)为德国

Biochrom AG 公司产品;大肠杆菌脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)为 Sigma 公司产品;苜蓿素标准品和齐墩果酸标准品由中国医学科学院-中国协和医科大学药用植物研究所提供;葡萄糖标准品为 Sigma 公司产品;通用型 RT-PCR 扩增试剂盒购自北京美莱博医学科技有限公司;TRIzol Reagent 为 Invitrogen 公司产品;PCR 引物由北京奥科生物技术有限公司合成;其他试剂均为分析纯。

1.2 苜蓿素活性成分多糖、黄酮、皂苷的分离与检测

1.2.1 多糖的分离与检测

1.2.1.1 多糖的分离:苜蓿素溶于适量的水中(料液比 1 : 20),100 °C 循环回流抽提 2 h。冷却,过滤,合并滤液,弃滤渣,滤液浓缩至原体积的 1/4。浓缩后的滤液加入 2 倍体积的 95%乙醇进行醇析,静置 12 h。醇析后的多糖溶液 4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,将所得的沉淀物复溶。加入 3%三氯乙酸进行脱蛋白(三氯乙酸的用量由上清液颜色判断,上清液由深绿色变为浅黄色为宜),在 5~10 °C 下静置过夜。已脱蛋白的多糖溶液 4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,弃去沉淀物,上清液为无蛋白的多糖溶液,再加入 95%乙醇,进行醇析,静置过夜 12 h,弃上清在 60 °C 下烘干,得到苜蓿素多糖。

1.2.1.2 检测多糖的葡萄糖标准曲线:1 mg · mL⁻¹ 葡萄糖标准液 0、1、2、3、4、5 mL 置于 50 mL 容量瓶中,定容至刻度,准确吸取上述标准溶液各 1 mL 置于具塞试管中。冰水浴中加入蒽酮试剂 4 mL,摇匀,放置 5 min 后,置于沸水浴中加热 10 min,自来水冷却,冷却至室温,于 620 nm 处测定吸光值(A 值)。

1.2.1.3 多糖的检测:从苜蓿素中分离的多糖制品 0.1 g 溶于 100 mL 容量瓶中定容,取 5 mL 按照标准曲线制作的方法测定吸光度,根据葡萄糖标准曲线方程计算多糖含量。

1.2.2 黄酮与皂苷的分离与检测

1.2.2.1 黄酮与皂苷的分离:黄酮和皂苷在使用聚酰胺柱层析时,黄酮吸附在聚酰胺上,皂苷不吸附聚酰胺,利用这种特征把提取出来的苜蓿素黄酮、皂苷进行分离。

苜蓿素溶于适量的 70%乙醇中(料液比 1 : 20),60 °C 循环回流抽提 4 h。样品浓缩至浸膏状,

用无水乙醇溶解,加入处理好的聚酰胺,搅拌均匀,然后,60 ℃水浴下,乙醇挥发完全后装入聚酰胺柱。加样后的聚酰胺柱,先用5倍柱体积的蒸馏水洗脱不吸附的总皂苷,洗脱液浓缩,皂苷以水溶液的形式保存待用。用5倍柱体积的95%酒精洗脱吸附在聚酰胺柱中的黄酮。洗脱液浓缩,黄酮以醇溶液的形式保存待用。

1.2.2.2 检测黄酮的标准曲线:取苜蓿素标准品10.02 mg,用甲醇溶于25 mL容量瓶,得到浓度为0.400 8 mg·mL⁻¹的标准溶液。以此标准溶液为基础,配制3.206、4.896、5.010、9.619、10.02、12.83 μg·mL⁻¹浓度的标准溶液,紫外分光光度计检测354 nm吸光值。

1.2.2.3 检测皂苷的标准曲线:精密称取干燥至恒重的齐墩果酸标准品2.18 mg,置于2 mL容量瓶中,加入甲醇至刻度,溶解摇匀。分别取40、50、60、70、80、90 μL置于具塞试管中,水浴蒸干溶剂,加显色剂(5%香草醛-冰醋酸溶液)0.2 mL,高氯酸0.8 mL,加磨口塞,置70 ℃水浴中加热15 min,流水冷却,各加冰醋酸5 mL摇匀,以显色剂为空白,紫外分光光度计检测545 nm吸光值。

1.2.2.4 黄酮的检测:从苜蓿素中分离的黄酮醇溶液100 μL于10 mL容量瓶中,用70%乙醇定容,取5 mL按照标准曲线制作的方法测定吸光值,根据黄酮标准曲线方程计算黄酮含量。

1.2.2.5 皂苷的检测:从苜蓿素中分离的皂苷水溶液50 μL于10 mL容量瓶中定容,取100 μL置于具塞试管中。按照1.2.2.3中的方法测定545 nm

处的吸光值,根据皂苷标准曲线方程计算皂苷含量。

1.3 细胞培养

RAW264.7细胞培养使用含有10% FBS和2 mmol·L⁻¹谷氨酰胺的DMEM培养基,在37 ℃、5% CO₂培养箱中培养。

1.4 苜蓿素多糖、黄酮、皂苷处理细胞

培养的RAW264.7细胞加入24孔细胞培养板,1×10⁶细胞·孔⁻¹。加入不同浓度的苜蓿素多糖(30、60、90、150 μg·mL⁻¹)、苜蓿素黄酮(10、20、30、50 μg·mL⁻¹)、苜蓿素皂苷(10、20、30、50 μg·mL⁻¹),在培养箱中孵育24 h,更换新鲜培养基,使用LPS(10 μg·mL⁻¹)诱导细胞6 h,提取细胞总RNA。

1.5 RT-PCR检测mBDs mRNA表达

1.5.1 总RNA提取 按照TRIzol产品说明进行。

1.5.2 RT-PCR扩增 取1 μg总RNA,参照通用型RT-PCR试剂盒说明,进行mRNA反转录合成第一链cDNA,取RT产物1 μL进行PCR扩增,上游引物(Sense, S)、下游引物(Antisense, AS)见表1。mBDs的PCR反应条件为95 ℃预变性5 min;94 ℃30 s,退火30 s(退火温度见表1),72 ℃30 s,循环数见表1;72 ℃延伸10 min。β-actin的PCR反应条件为95 ℃预变性5 min;94 ℃1 min,60 ℃1 min,72 ℃1 min,25个循环;72 ℃延伸10 min。扩增产物使用2%琼脂糖电泳检测,溴化乙啶(EB)染色。

表1 PCR引物和条件

Table 1 Primers and conditions for PCR

基因 Gene		引物(5'→3') Primer sequence	退火温度/℃ Annealing	循环数 Cycle	扩增长度/bp Product size	参考文献 Reference
β-防御素1	<i>mBD1</i>	S TGCCTTCAACATGGAGGATTCTG	56	34	140	[20]
	AS	CCATCGCTCGTCCCTTATGCTCA				
β-防御素2	<i>mBD2</i>	S CGAAGCAGAACTTGACCACT	60	32	113	[21]
	AS	TCGAACAGGGGTTCTTCTCT				
β-防御素3	<i>mBD3</i>	S TTGTTTGAGGAAAGGAGGCA	58	30	220	[16]
	AS	GCTAGGGAGCACTTGTTTGC				
<i>β-actin</i>	S	CAACACCCCTGCCATGTATGT	60	25	617	
	AS	GGGAGCAATGATCTTGATCT				

1.6 图像分析

使用Analyzer™ Gel-Pro分析软件测定电泳带的积分光密度(IOD)值。

1.7 统计学处理

使用mBDs/β-actin的IOD/IOD比值进行基因表达分析,用SPSS软件进行方差分析和*t*检验。

2 结果

2.1 苜草素多糖、黄酮、皂苷的检测标准曲线

检测苜草素多糖的标准曲线方程为 $A=0.0619C+0.0144$, $R^2=0.9996$, 线性范围: $3.206\sim12.83\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。检测苜草素黄酮的标准曲线方

程为 $A=0.0619C+0.0144$, $R^2=0.9996$, 线性范围: $3.206\sim12.83\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。检测苜草素皂苷的标准曲线方程为 $A=0.0085C-0.0602$, $R^2=0.9981$, 线性范围: $43.6\sim98.1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2 苜草素多糖成分对 mBDs 表达的作用

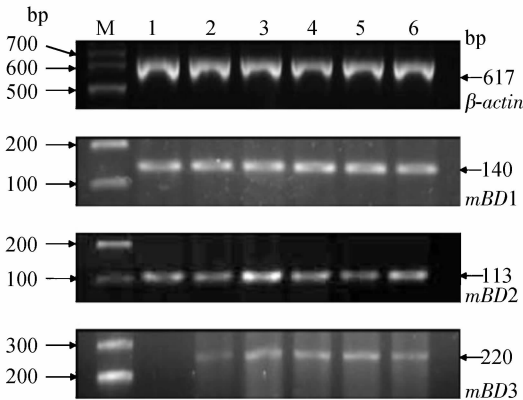
表 2 苜草素多糖对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 β -防御素基因表达的影响

Table 2 Effect of polysaccharide of Polysavone on expression of mBDs in RAW264.7 cells

组别 Group	样本数 n	β -防御素 1 mBD1	β -防御素 2 mBD2	β -防御素 3 mBD3
1	3	0.8489 \pm 0.0508 ^a	0.4723 \pm 0.0547 ^c	
2	3	0.8141 \pm 0.0351 ^a	0.4480 \pm 0.0300 ^c	0.3242 \pm 0.0164 ^c
3	3	1.0177 \pm 0.1014 ^a	0.9239 \pm 0.0369 ^a	0.7487 \pm 0.0322 ^a
4	3	1.0203 \pm 0.0488 ^a	0.6511 \pm 0.0419 ^{bc}	0.7278 \pm 0.0517 ^a
5	3	1.0175 \pm 0.0560 ^a	0.6704 \pm 0.0571 ^b	0.6049 \pm 0.0268 ^b
6	3	0.8652 \pm 0.0880 ^a	0.5390 \pm 0.0162 ^c	0.5609 \pm 0.0426 ^b

1. 对照; 2. 仅使用 LPS $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理 RAW264.7 细胞; 3~6. 分别使用苜草素多糖 $30, 60, 90, 150\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 LPS $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理 RAW264.7 细胞; 表中同一列右上角含有不同小写字母者, 表示差异显著 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)

1. Control; 2. RAW264.7 cells are only treated with LPS ($10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 3-6. RAW264.7 cells are treated with polysaccharide of Polysavone at $30, 60, 90, 150\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively and LPS ($10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); ^{a, b}. Means within each vertical row without a common superscript differ significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$)



M. 100 bp DNA Marker; 1. 对照; 2. 仅使用 LPS $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理 RAW264.7 细胞; 3~6. 分别使用苜草素多糖 $30, 60, 90, 150\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 LPS $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理 RAW264.7 细胞

M. 100 bp DNA Marker; 1. Control; 2. RAW264.7 cells are only treated with LPS ($10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 3-6. RAW264.7 cells are treated with polysaccharide of Polysavone at $30, 60, 90, 150\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively and LPS ($10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

图 1 不同剂量苜草素多糖处理细胞的 mBDs 表达水平的变化

Fig. 1 The expression levels of mBDs after RAW264.7 cells were treated with LPS and different dose of polysaccharide of Polysavone

电泳结果显示(表 2 和图 1), 苜草素中的多糖成分对 mBD1 的表达水平没有明显的影响; 分别使

用苜草素多糖 $30, 60, 90, 150\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量处理下进行 LPS 诱导, mBD2 表达水平比只使用 LPS 诱导的细胞上升, 其中 $30\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量明显高于其他剂量 ($P<0.01$); mBD3 在 LPS 诱导的情况下进行表达, 分别使用苜草素多糖 $30, 60, 90, 150\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量处理下进行 LPS 诱导, mBD3 表达水平比只使用 LPS 诱导的细胞明显上升 ($P<0.01$), 其中 $30, 60\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量明显高于 $90, 150\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量 ($P<0.05$), $30, 60\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量间没有明显的差别。

2.3 苜草素黄酮对 mBDs 表达的作用

电泳结果显示(表 3 和图 2), mBD1 的表达不受 LPS 诱导的影响, 苜草素中的黄酮对 mBD1 的表达水平有明显的促进作用 ($P<0.01$), $10, 20, 30, 50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量中, $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量明显高于其他剂量 ($P<0.01$), 随着黄酮剂量的增加, 苜草素黄酮成分对 mBD1 表达水平的促进作用降低; 分别使用苜草素黄酮 $10, 20, 30, 50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量处理下进行 LPS 诱导, mBD2 表达水平比只使用 LPS 诱导的细胞和对照相比明显下降 ($P<0.01$); mBD3 在 LPS 诱导的情况下进行表达, 分别使用苜草素黄酮 $10, 20, 30, 50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量处理下进行 LPS 诱导, mBD3 表达水平比只使用 LPS 诱导的细胞下降 ($P<0.01$), 随着黄酮剂量的增加, 苜草素黄酮对 mBD3 表达水平的抑制作用愈加明显。

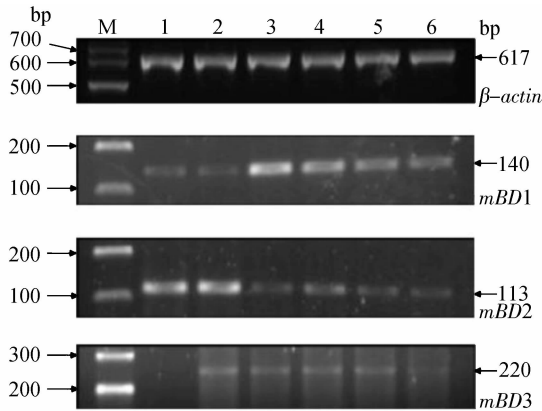
表3 苜草素黄酮对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 β -防御素基因表达的影响

Table 3 Effect of flavonoids of Polysavone on expression of mBDs in RAW264.7 cells

组别 Group	样本数 n	β -防御素 1 mBD1	β -防御素 2 mBD2	β -防御素 3 mBD3
1	3	0.335 7 \pm 0.029 4 ^d	1.601 6 \pm 0.056 2 ^b	
2	3	0.271 3 \pm 0.010 6 ^d	1.794 2 \pm 0.043 3 ^a	0.769 6 \pm 0.039 4 ^a
3	3	1.701 0 \pm 0.099 3 ^a	0.466 9 \pm 0.022 4 ^c	0.557 1 \pm 0.016 1 ^b
4	3	1.285 4 \pm 0.042 7 ^b	0.365 5 \pm 0.042 9 ^{cd}	0.391 2 \pm 0.031 6 ^c
5	3	0.791 2 \pm 0.028 3 ^c	0.381 1 \pm 0.055 4 ^{cd}	0.434 8 \pm 0.053 0 ^c
6	3	0.560 9 \pm 0.068 3 ^c	0.275 6 \pm 0.028 2 ^d	0.119 0 \pm 0.010 8 ^d

1. 对照; 2. 仅使用 LPS 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理 RAW264.7 细胞; 3~6. 分别使用苜草素黄酮 10、20、30、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 LPS 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理 RAW264.7 细胞; 表中同一列右上角含有不同小写字母者, 表示差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)

1. Control; 2. RAW264.7 cells are only treated with LPS (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); 3-6. RAW264.7 cells are treated with flavonoids of Polysavone at 10, 20, 30, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively and LPS (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); ^{a, b}. Means within each vertical row without a common superscript differ significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$)



M. 100 bp DNA Marker; 1. 对照; 2. 仅使用 LPS 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理 RAW264.7 细胞; 3~6. 分别使用苜草素黄酮 10、20、30、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 LPS 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理 RAW264.7 细胞

M. 100 bp DNA Marker; 1. Control; 2. RAW264.7 cells are only treated with LPS (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); 3-6. RAW264.7 cells are treated with flavonoids of Polysavone at 10, 20, 30, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively and LPS (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

图2 不同剂量苜草素黄酮处理细胞的 mBDs 表达水平的变化
Fig. 2 The expression levels of mBDs after RAW264.7 cells were treated with LPS and different dose of flavonoids of Polysavone

表4 苜草素皂苷对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 β -防御素基因表达的影响

Table 4 Effect of saponins of Polysavone on expression of mBDs in RAW264.7 cells

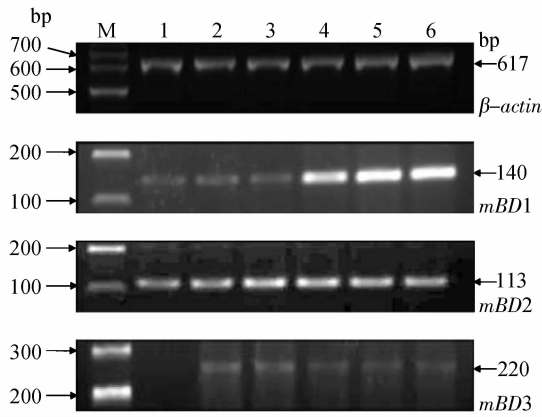
组别 Group	样本数 n	β -防御素 1 mBD1	β -防御素 2 mBD2	β -防御素 3 mBD3
1	3	0.883 9 \pm 0.061 7 ^c	3.112 5 \pm 0.638 5 ^b	
2	3	0.904 8 \pm 0.061 9 ^c	3.597 5 \pm 0.485 2 ^b	1.340 4 \pm 0.190 9 ^a
3	3	0.864 5 \pm 0.131 7 ^c	4.154 2 \pm 0.557 9 ^a	1.220 1 \pm 0.319 4 ^a
4	3	3.616 5 \pm 0.168 0 ^b	3.581 2 \pm 0.333 2 ^b	0.866 6 \pm 0.036 9 ^b
5	3	3.830 3 \pm 0.294 8 ^{ab}	3.437 8 \pm 0.478 8 ^b	0.772 5 \pm 0.098 5 ^b
6	3	4.137 4 \pm 0.228 1 ^a	3.724 5 \pm 0.412 1 ^b	0.709 0 \pm 0.087 1 ^b

1. 对照; 2. 仅使用 LPS 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理 RAW264.7 细胞; 3~6. 分别使用苜草素皂苷 10、20、30、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 LPS 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理 RAW264.7 细胞; 表中同一列右上角含有不同小写字母者, 表示差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)

1. Control; 2. RAW264.7 cells are only treated with LPS (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); 3-6. RAW264.7 cells are treated with saponins of Polysavone at 10, 20, 30, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively and LPS (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); ^{a, b}. Means within each vertical row without a common superscript differ significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$)

2.4 苜草素皂苷对 mBDs 表达的作用

电泳结果显示(表4和图3),苜草素中的皂苷对 mBD1 的表达水平有明显的促进作用,10、20、30、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量中,10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量与只使用 LPS 诱导的细胞和对照相比,mBD1 的表达水平没有变化,20、30、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量明显高于 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量 ($P < 0.01$),随着皂苷剂量的增加,苜草素皂苷对 mBD1 表达水平的促进作用增强;分别使用苜草素皂苷 10、20、30、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量处理下进行 LPS 诱导,除了 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量 mBD2 表达水平明显升高 ($P < 0.05$),其他剂量与只使用 LPS 诱导的细胞和对照相比没有明显变化;mBD3 在 LPS 诱导的情况下进行表达,分别使用苜草素皂苷 10、20、30、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量处理下进行 LPS 诱导,10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量时 mBD3 表达水平与只使用 LPS 诱导的细胞相比没有明显变化,随着皂苷剂量的增加,mBD3 表达水平明显下降 ($P < 0.01$),苜草素皂苷对 mBD3 表达表现明显的抑制作用。



M. 100 bp DNA Marker; 1. 对照; 2. 仅使用 LPS $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理 RAW264.7 细胞; 3~6. 分别使用苜草素皂苷 10 、 20 、 30 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 LPS $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理 RAW264.7 细胞

M. 100 bp DNA Marker; 1. Control; 2. RAW264.7 cells are only treated with LPS ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); 3-6. RAW264.7 cells are treated with saponins of Polysavone at 10 、 20 、 30 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively and LPS ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

图 3 不同剂量苜草素皂苷处理细胞的 mBDs 表达水平的变化
Fig. 3 The expression levels of mBDs after RAW264.7 cells were treated with LPS and different dose of saponins of Polysavone

3 讨论

以前的研究证明, 苜草素可以明显促进 mBD1~3 的表达水平, 苜草素 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量明显优于其他剂量 (0.4 、 0.6 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[19]。苜草素中的主要有效成分为黄酮 ($\geq 5\%$)、多糖 ($\geq 15\%$) 和皂苷 ($\geq 5\%$)。在本试验中, 使用从苜草素中提取出的多糖、黄酮、皂苷, 分别以苜草素 0.2 、 0.4 、 0.6 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的含量培养 RAW264.7 细胞, 发现多糖对 mBD1 的表达水平没有影响, 黄酮和皂苷都可以促进 mBD1 的表达, 黄酮 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量明显高于其他剂量, 随着黄酮剂量的增加, 对 mBD1 表达水平的促进作用降低, 而皂苷表现出随着剂量的增加, 对 mBD1 表达水平的促进作用增强的特点, 推测苜草素提高 mBD1 的表达主要是黄酮和皂苷起作用。有趣的是, 苜草素促进 RAW264.7 细胞 mBD1 表达的情况与黄酮的情况相似, 苜草素中黄酮和皂苷的含量接近, 但皂苷促进 mBD1 表达的特点在以前的试验中没有表现出来, 黄酮与皂苷在促进 mBD1 表达的信号途径可能存在一定的竞争, 黄酮在信号传导中处于优势, 这一点有待进一步的研究。

本试验中黄酮和皂苷对 mBD3 表达水平有抑制作用, 剂量越增加, 抑制作用越明显。黄酮对 mBD2 表达水平有抑制作用, 但发现皂苷除了 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量使 mBD2 表达水平明显增加外, 其他剂量 (20 、 30 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对 mBD2 表达水平没有影响。苜草素多糖对 mBD2、mBD3 表达水平的促进作用的特点与苜草素基本一致, 这可能是因为多糖成分在苜草素中的含量比黄酮和皂苷的含量高, 使得苜草素对 mBD2、mBD3 表达水平的促进作用主要体现出多糖的特点, 黄酮和皂苷参与其中的调节。苜草素中的多糖可以通过促进 mBD2 和 mBD3 的表达, 来增强动物机体的特异性免疫功能。黄酮和皂苷对 mBD1 的表达有明显的促进作用, 增强动物的先天性免疫功能, 抑制 mBD2 和 mBD3 的表达, 降低动物的特异性免疫功能, 可以起到抗炎症反应的作用。

已有研究表明, β -防御素 2 的诱导表达可能是通过多信号途径实现的, 其中 NF- κ B 和 AP-1 的作用较为重要, β -防御素 2 基因转录起始点近端的 2 个 NF- κ B 位点是转录表达所必需的^[22]。Lee 等研究表明茯苓多糖可以诱导 NF- κ B 的活化^[23], 在现有的研究报道中, 不同皂苷对 NF- κ B 的影响有很大的反差, 大豆皂苷、人参皂苷降低 NF- κ B 的活性^[24-25], 但是 Jeong 等报道 α -常春藤素 (三萜皂苷类) 可以活化 NF- κ B^[26]。笔者认为, NF- κ B 在苜草素多糖、黄酮和皂苷活性成分影响 β -防御素基因表达的信号途径中, 起到非常重要的作用, 三者对 NF- κ B 的影响特点有待进一步研究。

4 结论

苜草素中的多糖、黄酮、皂苷对小鼠 RAW264.7 细胞 mBDs 表达的作用效果不同。苜草素多糖对 mBD1 的表达水平没有影响, 对 mBD2、mBD3 的表达有促进作用, 苜草素多糖可能主要促进动物的特异性免疫功能; 苜草素黄酮、皂苷都可以促进 mBD1 的表达, 苜草素黄酮对 mBD2、mBD3 的表达有抑制作用, 苜草素皂苷对 mBD2 的表达水平没有影响, 对 mBD3 表达有抑制作用, 苜草素黄酮、皂苷可能主要促进动物的先天性免疫功能。

参考文献:

- [1] 佟建明, 萨仁娜, 单之玮, 等. 苜草素对肉仔鸡和仔猪生产性能的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(2): 19-21.
- [2] 赵武述, 张玉琴, 任两娟. 苜蓿多糖的免疫增强效应

- [J]. 中国药理学报, 1993, 14(3): 273-276.
- [3] 彭 芳, 陈植和. 黄酮类化合物的生物学作用[J]. 大理医学院学报, 1998, 7(4): 52-54.
- [4] 刘 凯, 余书勤. 苜蓿皂苷对胆固醇排泄和内皮细胞释放一氧化氮的影响[J]. 徐州医学院学报, 1999, 19(6): 442-444.
- [5] MALINOW M R, MCLAUGHLIN P, NALTO H K, et al. Effect of alfalfa meal on shrinkage (regression) of atherosclerotic plaques during cholesterol feeding in monkeys[J]. *Atherosclerosis*, 1978, 30(1): 27-43.
- [6] 陈立伟, 黄大鹏. 苜草素对早期断奶仔猪生产性能和腹泻发生率的影响[J]. 养殖技术顾问, 2005, 33(8): 23.
- [7] 王长庚, 刘 昊, 吴振糜, 等. 苜草素、恩拉霉素和林克霉素对肉用仔鸡的免疫器官发育和生产性能的影响[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2005, 34(4): 505-508.
- [8] 王长康, 刘 昊, 邵良平. 苜草素对蛋鸡生长性能和血液生化指标的影响[J]. 福建农业学报, 2006, 21(3): 215-218.
- [9] 董晓芳, 江 勇, 高微微, 等. 苜草素对肉仔鸡免疫、内分泌和脂类代谢的一些指标的影响[J]. 动物营养学报, 2007, 19(4): 407-410.
- [10] 赵 远, 和占龙, 陈丽雄, 等. 日粮中添加苜草素对幼猴免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 的影响[J]. 实验动物科学, 2007, 24(3): 33-35.
- [11] HARDER J, BARTELS J, CHRISTOPHERS E, et al. A peptide antibiotic from human skin[J]. *Nature*, 1997, 387(6636): 861.
- [12] YANG D, CHERTOV O, BYKOVSKAIA S N, et al. β -defensins; Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6 [J]. *Science*, 1999, 286(5439): 525-528.
- [13] ONEIL D. Regulation of expression of beta-defensins; endogenous enteric peptide antibiotics[J]. *Molecular Immunology*, 2003, 40(7): 445-450.
- [14] HAVARD J, PAMELA F, ROBERT E W. Peptide antimicrobial agents [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, 19(3): 491-511.
- [15] ROSENKILDE M M, SCHWARTZ T W. The chemokine system—a major regulator of angiogenesis in health and disease[J]. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 2004, 112(7): 481-495.
- [16] ROBERT B, WANG X R, RUPALIE L M, et al. Mouse β -defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs[J]. *Infection And Immunity*, 1999, 67(7): 3542-3547.
- [17] GILLIAN M M, DONALD J D, JULIA R D. A novel mouse beta defensin, Defb2, which is upregulated in the airways by lipopolysaccharide [J]. *Federation of European Biochemical Societies*, 1999, 442(1): 112-116.
- [18] YANG D, BIRAGYN A, HOOVER D H, et al. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense[J]. *Annual Review of Immunology*, 2004, 22(1): 181-215.
- [19] 杨江涛, 佟建明, 刘晴雪. 苜草素对小鼠巨噬细胞 RAW264-7 β -防御素基因表达的影响[J]. 中国饲料, 2008, 18(12): 4-6.
- [20] KENNETH M H, CHRISTINE A K, CHARLES L B. The mouse genome encodes a single homolog of the antimicrobial peptide human β -defensin 1 [J]. *Federation of European Biochemical Societies*, 1997, 413(1): 45-49.
- [21] HONG P J, STEPHEN A W, BRIAN C S, et al. A Novel Murine β -defensin expressed in tongue, esophagus and trachea [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(43): 33314-33320.
- [22] TSUTSUMI Y, NAGAOKA I. NF-kappa B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2002, 71(1): 154-162.
- [23] LEE K Y, YOU H J, JEONG H G, et al. Polysaccharide isolated from *Poria cocos sclerotium* induces NF- κ B/Rel activation and iNOS expression through the activation of p38 kinase in murine macrophages [J]. *International Immunopharmacology*, 2004, 4(8): 1029-1038.
- [24] KANG J H, SUNG M K, LEE T H, et al. Soybean saponins suppress the release of proinflammatory mediators by LPS-stimulated peritoneal macrophages [J]. *Cancer Lett*, 2005, 230(2): 219-227.
- [25] KIM N D, KIM E M, KANG K W, et al. 20(S)-Protopanaxatriol, one of ginsenoside metabolites, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expressions through inactivation of nuclear factor-kappaB in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide [J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 140(4): 661-670.
- [26] JEONG H G, CHOI C Y. Expression of inducible nitric oxide synthase by alpha-hederin in macrophages [J]. *Planta Med*, 2002, 68(5): 392-396.