

一种葡聚糖活性检测的新方法

张晓菲^{a,b}, 严珍珍^{a,b}, 谢辛慈^a, 吴佳^a, 宋如玺^{a,b}, 舒建洪^{a,b}, 吕正兵^{a,b}

(浙江理工大学, a. 生命科学学院生物化学研究所; b. 浙江省家蚕生物反应器和生物医药重点实验室, 杭州 310018)

摘要: 大多具有分支的 β -(1-3)-D-葡聚糖具有免疫调节及抗肿瘤活性。文章利用人单核白血病 THP-1 细胞株建立细胞水平上葡聚糖生物活性的检测方法, 实现高通量筛选活性多糖。THP-1 细胞在不同浓度的葡聚糖刺激 48h 后离心收集上清, ELISA 法检测其释放细胞因子浓度, 以筛选有效的评价指标。结果显示: THP-1 细胞在不同葡聚糖刺激下, 细胞培养液中 IFN- α 含量变化明显。IFN- α 可作为在细胞水平上评价葡聚糖活性的标准检测指标。该方法既克服了动物实验工作量大、成本高, 又克服了原代细胞不稳定等因素, 为高通量筛选活性多糖提供了新途径。

关键词: THP-1; 葡聚糖; 活性检测; 高通量筛选

中图分类号: Q819 **文献标志码:** A

0 引言

葡聚糖是由葡萄糖单体聚合而成的多糖, 分为 α 型和 β 型。 α 型是机体能量的主要来源, 不具备生物活性; β 型葡聚糖则是一种生物活性物质, 具有免疫调节、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗氧化、抗辐射、降血糖、降血脂、保肝等多种功能^[1]。研究还发现, 大多数具有抗肿瘤活性的多糖都是带有 β -(1-6)-D-糖苷键分支的 β -(1-3)-D-葡聚糖^[2]。食用菌多糖也被称作“生物反应调节剂”^[3-5], 大多为具有分支的 β -(1-3)-D-葡聚糖^[6]。近年来, 因其多重功效而备受青睐, 具有很好的开发前景。

不同多糖的生物活性有所差别。多糖活性的高低受其结构、分子量等多种因素影响^[7-9], 因此, 相同糖含量的药品或保健品的功能也会存在很大差异, 单纯的糖含量并非药物有效性的指标。检测食用菌多糖生物活性是判断多糖药品及保健品功效的一种直接有效的方法。目前, 有关多糖生物活性的检测手段主要是整体水平和原代细胞水平检测。传统的动物实验检测法存在动物个体差异、工作量大、资金

消耗多等不足; 原代细胞检测法亦存在细胞稳定性、实验误差大等问题。因此, 亟待建立一种高通量检测多糖生物活性方法。

1 实验材料和方法

1.1 材料

THP-1 细胞株, 浙江理工大学生命科学学院保存; 人 IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 、IL12 检测试剂盒, 购自北京永辉生物科技有限公司; RPMI1640 培养基, 购自杭州吉诺生物医药技术有限公司; 冬虫夏草多糖(含量 95%), 中国药科大学尹红萍老师提供; 蛹虫草多糖(含量 95%), 本实验室制备; 绣球菌葡聚糖(含量 95%), 上海科爱生物技术有限公司提供; 灰树花多糖(含量 95%以上), 购自浙江方格药物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞株的培养

THP-1 细胞株培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养基中, 置于 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养, 3~5 d 传代 1 次, 1 瓶传 2 瓶或 3

收稿日期: 2013-01-14

基金项目: 国家科技重大新药创制专项(2012ZX09102301-009); 国家高技术研究发展计划“863”项目(2011AA100603)

作者简介: 张晓菲(1987-), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学及生物工程制药的研究。

通信作者: 吕正兵, 电子邮箱: zhengbingl@yahoo.com.cn

瓶,细胞碎片较多时离心(1 000 r/min, 5 min),重悬细胞至细胞培养瓶中,调整至适当浓度继续培养,待细胞达到 $10^5 \sim 10^6$ cell/mL 开始用于实验。

1.2.2 检测指标的筛选

检测经多糖刺激后,THP-1 细胞释放的细胞因子 IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 和 IL12 的表达水平,从中筛选可作为检测葡聚糖活性的指标。

1.2.3 葡聚糖生物活性检测方法的建立

用 RPMI 1640 培养基调整 THP-1 的细胞密度至 $10^5 \sim 10^6$ cell/mL 转移至 96 孔板中 200 μ L/孔,在 37℃、CO₂ 浓度 5% 的培养箱中培养 24 h。向培养孔中加入绣球菌葡聚糖至终浓度分别为 0、10、100、200 μ g/mL,保持总体积相同,各浓度均重复 3 次,培养 48 h;离心(1 000 r/min, 20 min),收集细胞上清,ELISA 法分别检测 IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 和 IL12 的表达水平。

1.2.4 方法有效性鉴定

用 RPMI 1640 培养基调整 THP-1 的细胞密度至 $10^5 \sim 10^6$ cell/mL 转移至 96 孔板中 200 μ L/孔,在 37℃、CO₂ 浓度 5% 的培养箱中培养 24 h。向培养碟中加入蛹虫草多糖、灰树花多糖、冬虫夏草多糖,至蛹虫草和灰树花多糖的浓度分别为 0、500 μ g/mL、1、2 mg/mL,冬虫夏草多糖浓度为 0、10、100、

200 μ g/mL,各浓度均重复 3 次,培养 48 h;离心(1 000 r/min, 20 min),收集细胞上清,ELISA 法检测表达水平高的细胞因子的浓度。

2 结果与分析

2.1 检测指标的筛选

多糖的免疫调节能力并非直接作用于肿瘤细胞和病原微生物,而是通过刺激、激活免疫细胞释放细胞因子发挥作用。因此,当具有活性的多糖刺激免疫细胞时,会影响免疫细胞所释放的细胞因子水平。THP-1 细胞为人急性单核白血病细胞,具有吞噬活性,在受到刺激后能够分泌细胞因子 IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 和 IL12。因此,在本实验中选用 IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 和 IL12 作为候选检测指标进行研究。

2.2 葡聚糖生物活性检测方法的建立

通过不同多糖刺激 THP-1 细胞 ELISA 法分别检测 IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 和 IL12 浓度,其中对照组与实验组的 TNF- α 含量均较低,浓度低于检测范围的最低值,未在图中标示(如图 1 所示)。结果显示,IL12 的浓度也偏低且浓度变化不明显;实验组 IFN- γ 浓度稍高于对照组,但变化不明显。故 TNF- α 、IL12、IFN- γ 三者均非理想的检测指标。

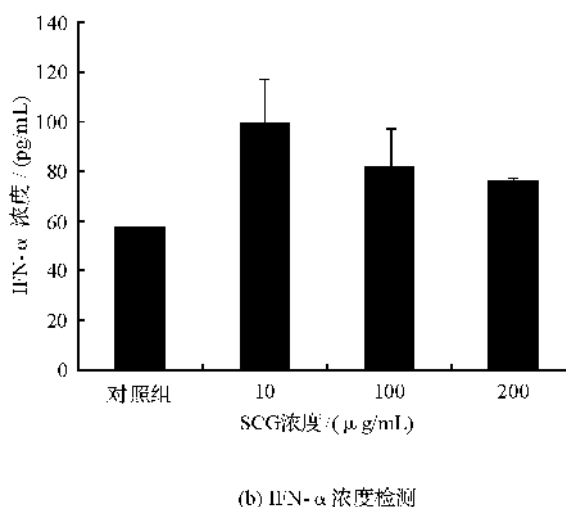
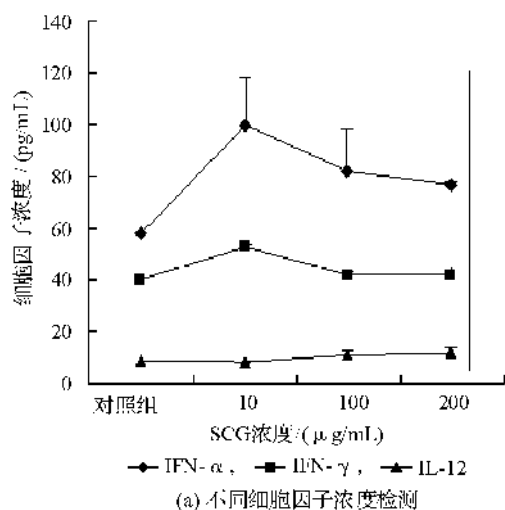


图1 不同细胞因子浓度检测

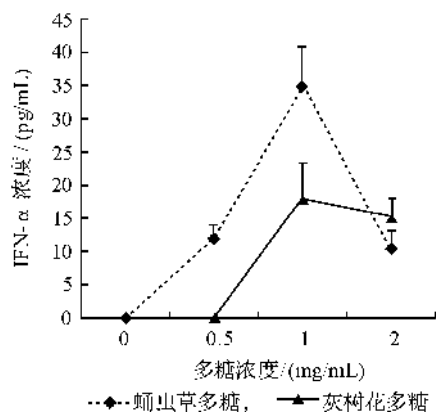
检测发现 IFN- α 的浓度变化十分明显。随多糖浓度的升高 IFN- α 的浓度呈现先升高后降低的趋势,且当多糖浓度为 10 μ g/mL 时 IFN- α 的浓度基本达到最高,为 99.59 pg/mL。当多糖浓度大于 10 μ g/mL 时,即多糖含量过高时可能超出细胞的免疫调节能力,对细胞产生毒害,细胞免疫能力下降,所释放的细胞因子减少,因此所检测到的 IFN- α

的浓度降低。重复实验发现,检测的 IFN- α 结果较稳定,且浓度变化明显,因此将 IFN- α 作为葡聚糖生物活性检测的指标。

2.3 方法有效性鉴定

目前对于蛹虫草多糖、灰树花多糖、冬虫夏草多糖的研究已取得较理想的成果,已有大量动物实验验证其免疫调节活性^[10-12]。因此,用以上 3 种多糖

来验证本实验所建立的检测多糖活性方法的有效性(如图2所示)。图2检测结果与动物实验成果相符,



因此,证明利用 THP-1 细胞以 IFN-α 为指标检测多糖生物活性的方法是可行的,且可实现高通量检测。

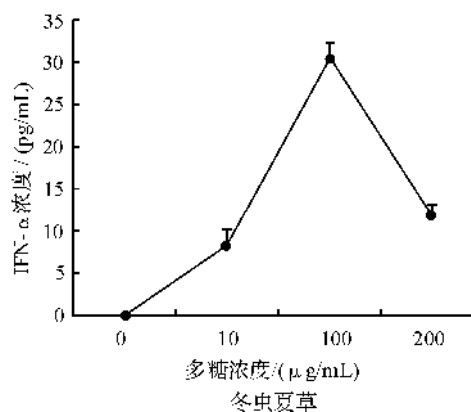


图2 不同多糖活性检测

根据 THP-1 细胞的特点,选择 IFN-α、IFN-γ、TNF-α 和 IL12 4 种细胞因子作为候选评价指标。经实验,筛选出浓度变化明显、重复性理想的 IFN-α 作为多糖活性检测的指标。

目前关于多糖的研究在世界范围内引起了人们的广泛关注^[13-15]。蛹虫草多糖可抑制 Hela 细胞的增殖^[16];绣球菌葡聚糖可使小鼠脾细胞产生细胞因子^[17],还可以提高炎症相关细胞因子的表达量,如 IL-12、IL-1β、IFN-α/β 等,促使树突状细胞的成熟^[18-19];虫草多糖可促进脾细胞增殖和 IFN-γ、TNF-α 的表达,抑制肿瘤细胞^[20]。多糖类药物的研发由于其较高的安全性和较丰富的来源,而成为研发的热点之一,因此,高通量有效筛选候选活性多糖对于多糖药物的开发尤为重要。

3 结论

本文建立了一种高通量葡聚糖活性检测方法:检测 THP-1 细胞在多糖刺激下细胞培养液中 IFN-α 的含量,IFN-α 的含量变化可作为在细胞水平上评价多糖活性的有效方法,可用于活性多糖的高通量检测。

4 致谢

感谢上海科爱生物技术有限公司与中国药科大学为本研究所提供的帮助。

参考文献:

[1] Ohno N, Suzuki I, Oikawa S, et al. Antitumor activity and structural characterization of glucans extracted from cultured fruit bodies of *Grifola frondosa* [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1984, 32(3): 1142-1151.

[2] Tada R, Yoshikawa M, Kuge T, et al. A highly branched 1, 3-beta-D-glucan extracted from *Aureobasidium pullulans* induces cytokine production in DBA/2 mouse-derived splenocytes [J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(12): 1431-1436.

[3] Kim H S, Hong J T, Kim Y, et al. Stimulatory effect of β-glucans on immune cells [J]. Immune network, 2011, 11(4): 191-195.

[4] Tada R, Yoshikawa M, Ikeda F, et al. Induction of IFN-gamma by a highly branched 1, 3-beta-d-glucan from *Aureobasidium pullulans* in mouse-derived splenocytes via dectin-1-independent pathways [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(4): 1105-1110.

[5] Harada T, Ohno N. Contribution of dectin-1 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) to immunomodulating actions of beta-glucan [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(4): 556-566.

[6] Harada T, Miura N N, Adachi Y, et al. Effect of SCG, 1, 3-, BETA. -D-Glucan from *sparassis crispa* on the hematopoietic response in cyclophosphamide induced leukopenic mice [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(7): 931-939.

[7] Okazaki M, Adachi Y, Yadomae T, et al. Structure-activity relationship of immunomodulating (1→3)-beta-D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, in vitro [J]. Recent Res Dev Chem Pharm Sci, 1995, 18(10): 1320-1327.

[8] Kim Y T, Kim E H, Cheong C, et al. Structural characterization of β-D-(1→3, 1→6)-linked glucans using NMR spectroscopy [J]. Carbohydrate Research, 2000, 328(3): 331-341.

[9] Tsoni S V, Brown G D. β-Glucans and Dectin-1 [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008, 1143(1): 45-60.

- [10] 龚晓健, 季 晖, 卢顺高, 等. 人工虫草多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(1): 53-55.
- [11] Hida T, Ishibashi K, Miura N, et al. Cytokine induction by a linear 1, 3-glucan, curdlan-oligo, in mouse leukocytes in vitro[J]. Inflammation Research, 2009, 58(1): 9-14.
- [12] 季锡中, 宁 青, 谈 唯, 等. 复方蛹虫草制剂对C57BL/6 荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 227-230.
- [13] Gan Lu, Zhang Shenghua, Yang Xiangliang, et al. Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide - protein complex from lycium barbarum [J]. International Immunopharmacology, 2004, 4(4): 563-569.
- [14] Suzuki I, Hashimoto K, Oikawa S, et al. Antitumor and immunomodulating activities of a beta-glucan obtained from liquid-cultured grifola frondosa[J]. Chemical & pharmaceutical bulletin, 1989, 37(2): 410-413.
- [15] Jianming X, Changhai D, Liande L. Evaluation for the protective effect of cordyceps polysaccharides on immunological liver injury in mice [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanhui, 1999, 34(3): 173-175.
- [16] 逯城宇, 张尊凯, 刘 艳, 等. 蛹虫草 N102 多糖提取条件优化及其抗肿瘤活性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(014): 250-254.
- [17] Harada T, Miura N N, Adachi Y, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (gm-csf) regulates cytokine induction by 1, 3- β -d-glucan scg in dba/2 mice in vitro[J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2004, 24(8): 478-489.
- [18] Harada T, Miura N N, Adachi Y, et al. Highly expressed dectin-1 on bone marrow-derived dendritic cells regulates the sensitivity to β -glucan in dba/2 mice[J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2007, 28(8): 477-486.
- [19] Bishop R E. Structural biology of membrane-intrinsic β -barrel enzymes: sentinels of the bacterial outer membrane[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2008, 1778(9): 1881-1896.
- [20] Zhu Z Y, Chen J, Si C L, et al. Immunomodulatory effect of polysaccharides from submerged cultured Cordyceps gunnii[J]. Pharmaceutical Biology, 2012, 50(9): 1103-1110.

A New Method for Activity Detection of Glucan

ZHANG Xiao-fei^{a,b}, YAN Zhen-zhen^{a,b}, XIE Xin-ci^a, WU Jia^a, SONG Ru-yun^{a,b}, SHU Jian-hong^{a,b}, LV Zheng-bing^{a,b}

(a. Institute of Biochemistry, School of Life Science; b. Key Laboratory of Silkworm Bioreactor and Biomedicine of Zhejiang Province, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Most β -(1-3)-D-glucans with branches have immunoregulation and antineoplastic activity. This paper establishes a detection method of glucan bioactivity at cellular level by using human monocytes leukemia THP-1 cell line and achieves high-throughput screening of active polysaccharides. THP-1 cell is centrifuged 48 h after stimulation by glucans with different concentrations and its supernatant is collected. Its releasing cell factor concentration is detected with ELISA method so as to screen effective evaluation indexes. The result shows that IFN- α content in cell culture fluid changes greatly when THP-1 cell is stimulated by different glucans. IFN- α can be used as a standard detection index evaluating glucan activity at cellular level. This method overcomes problems of heavy workload and high cost of animal experiment and instability of primary cell and provides a new way for high-throughput screening of active polysaccharides.

Key words: THP-1; glucan; activity detection; high-throughput screening

(责任编辑: 许惠儿)