DOI:10.12441/spyswjs.20230214003 [文章编号] 1673-1689(2024)09-0080-10

植物乳植杆菌IMAU30043胞外多糖对脂多糖诱导的RAW264.7巨噬细胞氧化损伤的保护作用

李 鸾 王丹丹 青格乐 扎木苏 李建立 陈永福*

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院,内蒙古 呼和浩特,010018)

摘要:为探究植物乳植杆菌IMAU30043胞外多糖(exopolysaccharides,EPS)对RAW264.7巨噬细胞氧化损伤的保护作用,作者以还原能力、超氧阴离子自由基抑制能力和DPPH自由基清除能力来评价EPS的体外抗氧化水平。通过离子色谱分析IMAU30043 EPS的组成,并采用脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)刺激RAW264.7巨噬细胞建立氧化损伤模型,测定其超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)酶活力、丙二醛(malondialdehyde,MDA)质量摩尔浓度、NO质量摩尔浓度及炎症因子表达水平的变化。根据Nrf2/HO-1/NF-κB通路关键基因表达水平的变化,探讨EPS保护细胞免受氧化损伤和抑制炎症反应的作用机制。结果表明,IMAU30043 EPS的体外抗氧化活性最强,由岩藻糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、葡萄糖醛酸和甘露糖醛酸组成,其摩尔比为4.50∶51.49∶256.73∶95.96∶3.64∶5.35∶111.10∶16.93。另外,EPS可显著提高LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞氧化损伤后的SOD酶活力,降低MDA和NO质量摩尔浓度;在基因水平上能显著下调*iNOS*、*TNF-α*、*IL-1β*和*IL-6*的表达量,但显著上调*IL-10*的表达量。此外,EPS促进了模型细胞中*Nrf2*和*HO-1*基因的mRNA表达,并抑制了NF-κB的激活。表明植物乳植杆菌IMAU30043产生的EPS能有效保护巨噬细胞免受氧化损伤,且该功能与Nrf2/HO-1/NF-κB信号通路有关。

关键词:植物乳植杆菌IMAU30043;胞外多糖;RAW264.7巨噬细胞;氧化损伤;抗炎作用

Protection of Exopolysaccharide from *Lactiplantibacillus plantarum* IMAU30043 Against Oxidative Damage in RAW264. 7 Macrophages

*LI Luan WANG Dandan Qinggele Zhamusu LI Jianli CHEN Yongfu**

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: To explore the protective effect of exopolysaccharides (EPS) of *Lactiplantibacillus plantarum* IMAU30043 on oxidative damage in RAW264.7 macrophages, the author assessed the *in vitro* antioxidant activity of EPS using reducing ability, superoxide anion free radical inhibition ability, and DPPH free radical scavenging ability. The composition of IMAU30043 EPS was analyzed by ion chromatography, and an oxidative damage model in RAW264.7 macrophages was established by stimulating the cells with lipopolysaccharide (LPS). The changes in superoxide dismutase (SOD) enzyme activity, malondialdehyde (MDA) and NO molality, and inflammatory factor expression levels were determined. In addition, the mechanism by which EPS protect cells from oxidative damage and inhibit inflammatory responses were further investigated by analyzing the expression levels of key genes in the Nrf2/HO-1/NF-κB signaling pathway. The results showed that IMAU30043 EPS exhibited strong *in vitro* antioxidant activity and were composed of fucose, rhamnose, galactose, glucose,

基金项目:国家自然科学基金项目(31972053);内蒙古农业大学食品科学与工程学院科技计划项目(SPKJ202008)。

通信作者:陈永福(1979—),男,博士,研究员,博士研究生导师,主要从事乳酸菌资源开发与利用研究。E-mail:nmgyfchen@126.com

收稿日期:2023-02-14 **修回日期:**2023-04-14

xylose, mannose, glucuronic acid, and mannuronic acid, with a molar ratio of 4.50∶51.49∶256.73∶95.96∶3.64∶5.35∶111.10∶16.93. Additionally, EPS significantly increased SOD enzyme activity and reduced the MDA and NO molality following LPS-induced oxidative damage in RAW264.7 macrophages. At the gene level, EPS significantly down-regulated the expression of *iNOS*, *TNF-α*, *IL-1β*, and *IL-6*, while up-regulating *IL-10* expression. Moreover, EPS enhanced the mRNA expression of *Nrf2* and *HO-1* gene and inhibited NF-κB activation in the model cells. This study found that the EPS from *Lactiplantibacillus plantarum* IMAU30043 can effectively protect macrophages from oxidative damage, with this protective effect being associated with the Nrf2/HO-1/NF-κB signaling pathway.

Keywords: *Lactiplantibacillus plantarum* IMAU30043; exopolysaccharides; RAW264.7 macrophage; oxidative damage; anti-inflammatory effect

氧化应激是指机体在受到不良刺激后，氧化与抗氧化之间平衡被打破的现象。这种失衡可能导致机体组织结构和功能的不可逆损伤，进而引发多种疾病[1-2]。炎症则是免疫系统对各种病原体、有害化学物质或免疫细胞控制失衡等对生物体细胞造成损害的反应，它可以参与人体正常的免疫活动和代谢过程[3]。通常，炎症被认为是一种局部愈合反应，但这种反应可能是一种慢性状态，如果其损害持续存在并发展到全身反应，不仅有发生慢性疾病的风险，还可能引起器官衰竭甚至死亡[4]。有研究发现，氧化应激和炎症反应在参与某些疾病的发展过程中是相互依赖和相互联系的。氧化应激是慢性炎症的诱因之一[5]，其诱导产生的活性氧在多个水平上影响各种炎症信号通路，导致部分细胞因子的增加，从而进一步加重氧化应激[1]。因此，炎症反应和氧化途径可能是预防或治疗某些疾病的调控靶点，寻求安全有效的方法来降低氧化应激水平和抑制炎症反应，对提高机体免疫力具有重要意义。

与大部分抗炎抗氧化药物相比，多糖因其毒性低、副作用少等优点而成为研究热点[6]。多糖的抗氧化和抗炎作用可通过多种途径实现。例如：黑灵芝多糖通过提高抗氧化酶活性来抑制脂质氧化，表现出较强的抗氧化能力[7]；野生蒙古口蘑多糖则通过抑制细胞因子的分泌，起到良好的抗炎作用[8]。在不同来源的生物活性多糖中，乳酸菌EPS由于其安全性高、易生产、不易受季节温度影响以及成本低等优点而备受关注。乳酸菌EPS是一种乳酸菌代谢产物，不仅可以保护菌体，还具有抗炎、抗氧化等多种生物学功能[9]。Zhang等[9]发现植物乳植杆菌C88产生的EPS通过减少脂质过氧化来发挥抗氧化作用。刘聪秀等[10]发现发酵乳杆菌LFQ153的EPS可以通过降低促炎因子的分泌量来缓解巨噬细胞的氧化损伤。然而，由于乳酸菌EPS的构成较为复杂，其缓解氧化损伤和抑制炎症的作用机理至今仍不清楚。因此，仍需对乳酸菌EPS的抗氧化和抗炎活性及其机理进行全面研究。

作者通过对新疆伊犁尼勒克县酸马奶中分离得到的3株高产EPS的植物乳植杆菌进行体外抗氧化活性比较，选择IMAU30043产生的EPS为研究对象，采用LPS诱导巨噬细胞构建氧化应激损伤模型，研究EPS对LPS引起的氧化损伤的保护作用与抗炎机制，为功能性乳酸菌EPS的开发应用提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

植物乳植杆菌IMAU30043、植物乳植杆菌IMAU40001、植物乳植杆菌IMAU80103：内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室从新疆伊犁州尼勒克县酸马奶中分离得到；RAW264.7小鼠单核巨噬细胞：中国科学院细胞库。

硫酸、体积分数95%乙醇、无水乙醇、三氯乙酸（TCA）、甲醇、苯酚、三氟乙酸（TFC）：上海安谱实验科技有限公司；氢氧化钠、醋酸钠、丙二醛试剂盒：北京索莱宝科技有限公司；脂多糖：Sigma-Aldrich试剂公司；DMEM培养基：HyClone试剂公司；质量分数0.25%胰酶、磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS）：厦门安提海拉生物科技有限公司；CCK-8试剂盒、BCA试剂盒、总SOD活性检测试剂盒（WST-8法）：碧云天生物技术研究所；超氧阴离子自由基测定试剂盒、总抗氧化能力（T-AOC）测定试剂盒、DPPH自由基清除能

力试剂盒、一氧化氮检测试剂盒：南京建成生物工程研究所；总 RNA 提取试剂盒、qPCR 试剂盒、PCR 检测试剂盒：南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

旋涡混合器：XH-T 型，新宝仪器有限公司；氮吹仪：Reacti 型，美国赛默飞世尔科技公司；离子色谱：ICS500 型，美国赛默飞世尔科技公司；超微量分光光度计：SIM-100 型，杭州 Simgen 公司；超声破碎仪：VCX130 型，美国 Sonics 公司；实时荧光定量 PCR 仪：ABI7300 plus 型，美国应用生物科技公司；微型态势真空泵：GL-802 型，海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 胞外多糖的提取

将植物乳植杆菌 IMAU30043、IMAU40001、IMAU80103 分别在 5 mL MRS 液体培养基中活化，于 37 ℃恒温培养 24 h，之后以体积分数 2% 的比例连续传代至第 3 代，培养 18 h。将各培养液在 4 ℃、8 000 *g* 条件下离心 15 min 以去除菌体，分别收集上清液。随后加入质量分数 80% 的 TCA 溶液至最终质量分数为 4%，在 4 ℃下静置 8~10 h，然后于 4 ℃、14 000 *g* 条件下离心 15 min；加入 3 倍体积的体积分数 95% 冰乙醇，在 4 ℃静置过夜，4 ℃、10 000 *g* 条件下离心 20 min 并收集沉淀。用去离子水复溶后，于透析袋中透析 72 h，收集透析袋内的多糖溶液，分别进行真空冷冻干燥，得到 3 株植物乳植杆菌所产的胞外多糖。

1.3.2 EPS 的体外抗氧化活性测定

采用试剂盒测定 IMAU30043、IMAU40001、IMAU80103 胞外多糖的体外抗氧化活性。以 VC 为对照，具体操作参考试剂盒说明书。其中超氧阴离子自由基抑制能力计算见式（1），DPPH 自由基清除能力计算见式（2），Fe^{3+} 还原能力计算见式（3）。

$$Y_1=(A_1-A_2)/A_1\times 100\% \quad (1)$$

式中：

Y_1——超氧阴离子自由基抑制能力，%；

A_1——使用过氧化氢代替样品溶液的吸光度；

A_2——样品溶液的吸光度。

$$Y_2=\frac{1-(A_4-A_5)}{A_3}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

Y_2——DPPH 自由基清除能力，%；

A_3——体积分数 80% 甲醇溶液与 DPPH 工作液混合溶液的吸光度；

A_4——样品溶液与 DPPH 工作液混合溶液的吸光度；

A_5——体积分数 80% 甲醇溶液与样品溶液混合溶液的吸光度。

$$Y_3=(A_7-A_6)/A_6\times 100\% \quad (3)$$

式中：

Y_3——Fe^{3+} 还原能力，%；

A_6——使用磷酸钠缓冲液代替样品溶液的吸光度；

A_7——样品溶液的吸光度。

1.3.3 EPS 的单糖组成测定

采用离子色谱仪分析植物乳植杆菌 IMAU30043 EPS 的单糖组成，参考 Zhu 等[11]的方法并稍加修改。色谱柱为 CarboPac PA20 液相色谱柱（150 mm×3.0 mm×10 μm）。流动相 A 为 H_2O，流动相 B 为 0.1 mol/L 的 NaOH，流动相 C 为 0.1 mol/L 的 NaOH、0.2 mol/L 的 NaAc。进样量为 5 μL，流量为 0.5 mL/min。

1.3.4 细胞培养

将复苏后的 RAW264.7 巨噬细胞置于 4 mL 含体积分数 10% FBS 的 DMEM 完全培养基中，在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 的细胞培养箱中培养。

1.3.5 RAW264.7 巨噬细胞存活率测定

将细胞培养至对数生长期，调整细胞密度为 3×10^5 个/mL 并接种到 96 孔板中，每孔接种体积为 100 μL。37 ℃培养过夜，待细胞贴壁后弃去培养液，每孔加入 100 μL 含有不同质量浓度 EPS 的 DMEM 完全培养基，EPS 的质量浓度分别为 0、10、20、40、78、156、312、625、1 250、2 500、5 000、10 000 μg/mL。完全培养基为空白对照组（细胞存活率视为 100%），每组设 6 个复孔。培养 24 h 后，每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，继续孵育 1 h。测定各孔 OD_{450} 值，根据式（4）计算细胞存活率。

$$H=A_8/A_9\times 100\% \quad (4)$$

式中：

H——细胞存活率，%；

A_8——DMEM 完全培养基的吸光度；

A_9——DMEM 完全培养基与样品溶液混合溶液的吸光度。

1.3.6　SOD酶活力、MDA及NO质量摩尔浓度的测定

以3×10^{5}个/mL的细胞密度分别接种于6孔板，37 ℃过夜培养后弃去培养液。其中空白对照组和LPS组均加入完全培养基，各试验组加入含不同质量浓度EPS的完全培养基，其EPS质量浓度分别为625、1 250、2 500 μg/mL，每组设3个复孔。培养结束后弃去上清液，沉淀超声破碎后离心，收集上清液，按照试剂盒说明书要求测定SOD酶活力、MAD质量摩尔浓度、NO质量摩尔浓度和蛋白质质量浓度。

1.3.7　RT-PCR测定氧化损伤相关基因的表达

细胞的接种、分组、处理同1.3.6。离心收集细胞，用PBS洗涤1次。按照试剂盒说明书合成cDNA，用RT-PCR检测mRNA表达。反应体系为20.0 μL：2× ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix10.0 μL，Primer F（10 μmol/L）、Primer R（10 μmol/L）各0.4 μL，50× ROX Reference Dye 1为0.4 μL，cDNA模板2.0 μL，补超纯水至20.0 μL。反应条件：95 ℃预变性30 s，95 ℃变性10 s，60 ℃复性30 s，95 ℃延伸15 s，循环40次。曲线分析为60 ℃保持60 s，95 ℃保持15 s。PCR引物见表1，使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算mRNA相对表达量。

表1　PCR引物

Table 1　Primers for PCR

基因类型	引物名称	引物序列（5′—3′）
内参基因	18S	F：CGACGACCCATTCGAACGTCT R：CTCTCCGGAATCGAACCCTGA
目的基因	IL-6	F：TTCAACCAAGAGATAAGC R：TGTCCACAAACTGATATG
	IL-1β	F：AACCAACAAGTGATATTCTC R：ACAGGACAGGTATAGATTC
	iNOS	F：ATTTGGGAATGGAGACTG R：AACACAGCATACCTGAAG
	TNF-α	F：CCAAAGGGATGAGAAGTTC R：CTTGGTGGTTTGTGAGTG
	p65	F：ACTTGCCAGACACAGATGAT R：TGATACTCTTGAAGGTCTCATAG
	IKB-α	F：TCCACTCCATCCTGAAGGCTA R：CAAGGACACCAAAAGCTCCACG
	Nrf2	F：CACAGCAGGAGATGGATTTCA R：ATCTCATAGTGCTTATGTCGT
	HO-1	F：CAGGATAGGCTAAGACTGCCTT R：GCTCGTATTTGTGTTTCACTGTCA

1.3.8　统计分析

各试验均重复3次，采用SPSS 25.0软件对数据进行差异显著性分析。

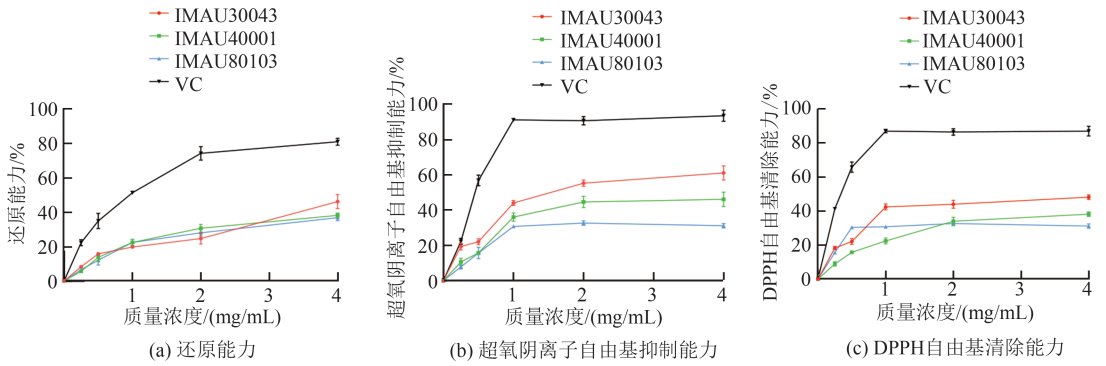
2　结果与讨论

2.1　EPS的提取与体外抗氧化活性的测定

植物乳植杆菌IMAU30043、IMAU40001、IMAU80103所得EPS质量浓度分别为223.6、259.7、186.0 mg/L。分别对其EPS的还原能力、超氧阴离子自由基抑制能力和DPPH自由基清除能力进行测定，以VC为阳性对照，综合评价3株植物乳植杆菌产生的EPS的体外抗氧化能力，见图1。IMAU30043的EPS产量虽不是最高，但体外抗氧化活性最强，在活性菌株开发层面更具有研究潜力，故选用IMAU30043产生的EPS进行后续试验。

2.2　EPS单糖组成分析

IMAU30043产生的EPS由岩藻糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、葡萄糖醛酸和甘露糖醛酸组成，摩尔比为4.50∶51.49∶256.73∶95.96∶3.64∶5.35∶111.10∶16.93，见图2。其中半乳糖、葡萄糖、甘露糖和木糖均为醛糖，可作为电子供体直接与自由基发生氧化反应，使多糖具有抗氧化活性[12]。当多糖中存在硫酸盐、乙酰基和磷酸盐等取代基团时，该酸性环境可促进水解，进一步暴露出更多半



(a) 还原能力 (b) 超氧阴离子自由基抑制能力 (c) DPPH自由基清除能力

图 1 EPS 体外抗氧化活性测定

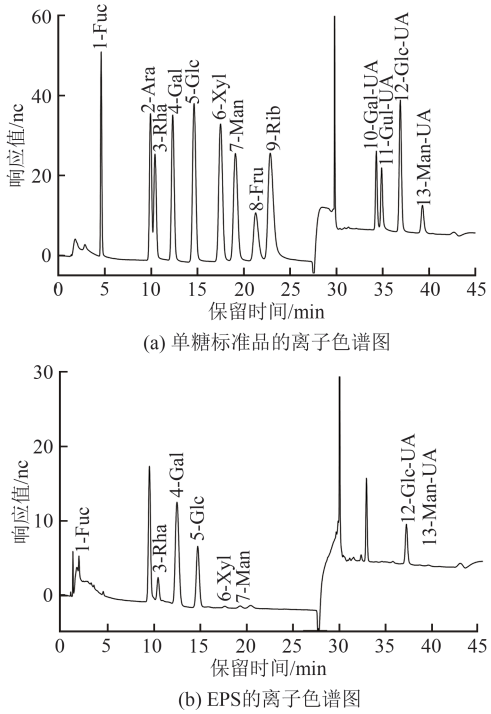
Fig. 1 Determination of *in vitro* antioxidant activity of EPS

缩醛羟基，从而提高其抗氧化活性[13]。类芽孢杆菌 BY 的 EPS 中，酸性糖主要由葡萄糖、半乳糖和葡萄糖醛酸组成，通过清除过量活性氧来降低 MDA 质量摩尔浓度，并升高 SOD 酶活力水平，可保护细胞免受氧化应激损伤[14]。试验证明，半乳糖、葡萄糖和鼠李糖可以与巨噬细胞表面识别 LPS 的 TLR4 受体结合，影响炎症信号相关通路，增强多糖对巨噬细胞的抗炎作用[15]。植物乳植杆菌 JLAU103 分泌的 EPS 主要由鼠李糖、岩藻糖、木糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖组成，能显著抑制 LPS 激活的 RAW264.7 细胞中 NO 的产生以及促炎因子的表达，具有一定的抗炎活性[16]。糖醛酸对抗氧化和抗炎活性也有一定影响[17]，富含葡萄糖醛酸的木耳多糖可以保护细胞免受氧化应激损伤[18]。

由此推断，植物乳植杆菌 IMAU30043 的 EPS 组成可能影响其抗氧化活性及抗炎活性。此外，多糖的相对分子质量、糖苷键连接类型和硫酸根含量也会显著影响其生物活性。Surayot 等[19]发现秋葵多糖是由鼠李糖和半乳糖醛酸等组成的高相对分子质量多糖，酸水解会降低其相对分子质量并去除中性糖侧链，这会影响 RAW264.7 细胞生成 TNF-α 的能力，从而减少炎症因子的产生，增强抗炎效果。因此，后续研究仍需测定 EPS 的相对分子质量和结构，以进一步探究其构效关系。

2.3 EPS 对 RAW264.7 巨噬细胞存活率的影响

EPS 的质量浓度为 0.625~2 500 μg/mL 时均未观察到 RAW264.7 细胞活力下降，见图 3。各组细胞活力与对照组之间无显著差异（P>0.05），表明当 EPS 质量浓度为 0.625~2 500 μg/mL 时未对细胞产生毒性。分别选取质量浓度为 625、1 250、2 500 μg/mL 的 EPS 用于后续试验。Wang 等[20]报道了类似结果，多糖 CMPP-1 和 CMPP-2 对 RAW264.7 巨噬细胞具有较低毒副作用。



(a) 单糖标准品的离子色谱图

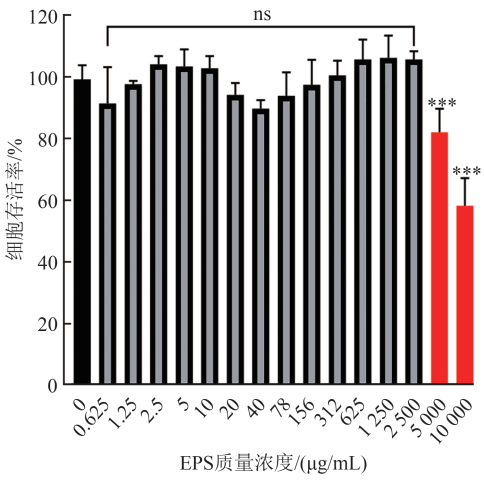
(b) EPS的离子色谱图

图 2 单糖组分分析

Fig. 2 Analysis of monosaccharide components

2.4 EPS 对 LPS 诱导的氧化损伤细胞模型中 SOD 酶活力和 MDA 质量摩尔浓度的影响

在 LPS 刺激下，细胞会产生大量的活性氧，使细胞膜中的脂质分子失去电子，导致细胞膜发生脂质过氧化，并生成过量的脂质过氧化产物 MDA[21]。MDA 具有细胞毒性，能够引发氧化应激的连锁反应，进而导致细胞分裂异常和癌症等疾病的发生[22]。SOD 是细胞抗氧化防御体系中一种重要的抗氧化酶，它能够保护细胞膜免受活性



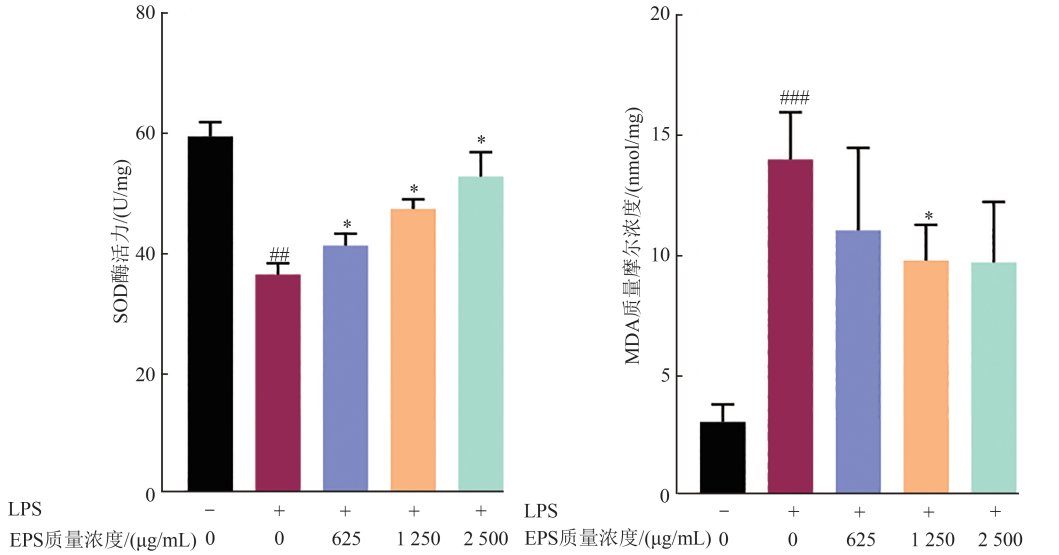
ns—无显著差异（P>0.05）；***—差异极其显著（P<0.001）。

图3　EPS对RAW264.7巨噬细胞存活率的影响

Fig. 3　Effect of EPS on the survival rate of RAW 264.7 macrophages

氧损害，缓解细胞膜的脂质过氧化反应，从而减轻LPS对细胞造成的氧化损伤[23]。

与空白对照组相比，当巨噬细胞受到质量浓度为1 μg/mL的LPS刺激后，其内部的MDA质量摩尔浓度增加极其显著（P<0.001），而SOD酶活力极显著下降（P<0.01），表明此时LPS已导致细胞发生了氧化损伤，见图4。然而，在不同质量浓度EPS处理后，细胞中SOD酶活力与LPS处理组相比均显著上升（P<0.05）。MDA质量摩尔浓度随EPS质量浓度的升高而逐渐下降，两者之间呈现出一定的量效关系，且质量浓度为1 250 μg/mL的EPS能显著降低MDA的质量摩尔浓度（P<0.05）。以上结果表明，随着EPS质量浓度的增加，细胞抗氧化酶活力逐渐升高，而MDA质量摩尔浓度变化趋势与之相反，进而有效减轻了LPS诱导的细胞氧化损伤。



—与对照组差异极显著（P<0.01）；
* —与LPS+0 μg/mL EPS组差异显著（P<0.05）。
(a) SOD酶活力的测定

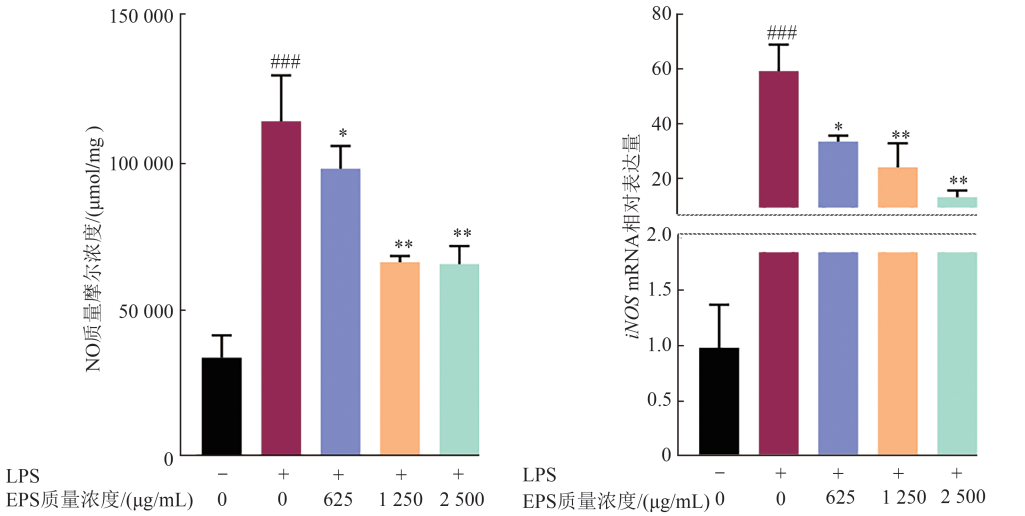
—与对照组差异极其显著（P<0.001）；
* —与LPS+0 μg/mL EPS组差异显著（P<0.05）。
(b) MDA质量摩尔浓度的测定

图4　EPS对LPS诱导的氧化损伤细胞模型中SOD酶活力和MDA质量摩尔浓度的影响

Fig. 4　Effect of EPS on SOD enzyme activity and MDA molality in the LPS-induced oxidative damage cell model

2.5　EPS对LPS诱导的氧化损伤细胞模型中NO生成和*iNOS*基因表达的影响

NO是一种促炎因子，由*iNOS*基因催化细胞产生，其分泌量可间接反映炎症程度[24]。如图5所示，与空白对照组相比，经LPS刺激后的巨噬细胞中*iNOS*基因的mRNA表达量及NO分泌量均显著增加。而在不同质量浓度的EPS干预后发现，质量浓度分别为1 250 μg/mL和2 500 μg/mL的EPS可极显著抑制巨噬细胞释放NO（P<0.01），*iNOS*基因表达的变化趋势与之相似。这种降低作用与EPS剂量呈现出一定的量效关系，但即使在EPS处理后，NO分泌量仍显著高于对照组。因此，EPS能够通过抑制*iNOS*基因的表达，降低NO的质量摩尔浓度，从而缓解炎症反应。



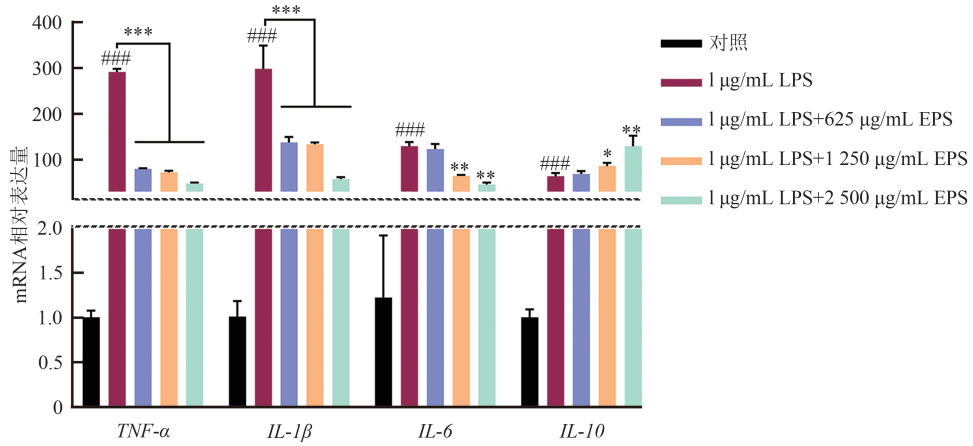
—与对照组差异极其显著(P<0.001)；
* —与LPS+0 μg/mL EPS组差异显著(P<0.05)；
** —与LPS+0 μg/mL EPS组差异极显著(P<0.01)。
(a) NO质量摩尔浓度测定
(b) *iNOS* mRNA相对表达量

图 5　EPS 对 LPS 诱导的氧化损伤细胞模型中 NO 质量摩尔浓度和 *iNOS* 基因表达的影响

Fig. 5　Effects of EPS on NO molality and iNOS gene expression in the LPS induced oxidative damage cell model

2.6　EPS 对 LPS 诱导的氧化损伤细胞模型中细胞因子表达的影响

炎症的出现往往伴随着各种炎症细胞因子的表达，如 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 等。经 LPS 刺激后，巨噬细胞中的细胞因子基因 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6* 和 *IL-10* 的 mRNA 表达量较对照组有极显著的增加（P<0.001），见图 6。经 EPS 处理后，细胞中 *TNF-α* 和 *IL-1β* 基因的 mRNA 表达量下降趋势相似，均随 EPS 质量浓度增加极其显著降低；质量浓度为 1 250、2 500 μg/mL 时可极显著抑制巨噬细胞 *IL-6* 基因的表达（P<0.01）；而 *IL-10* 基因的 mRNA 表达量随着 EPS 质量浓度的升高而显著增加，表明 EPS 在一定程度上能够缓解 RAW264.7 巨噬细胞的炎症反应，这与 Sung 等[25]的研究结果类似。EPS 可以与 LPS 竞争性结合 TLR4 受体[15]，EPS 与受体结合后可能抑制 LPS 诱导的 NF-κB 通路的激活，进而减少通路中 *iNOS*、*TNF-α* 和 *IL-6* 基因的表达，其中 *iNOS* 的表达进一步降低 NO 的产生。同时，*IL-1β* 基因的转录翻译也被抑制[26]，从而降低了 *IL-1β* 基因的表达。



*—与1 μg/mL LPS组差异显著(P<0.05)；**—与1 μg/mL LPS组差异极显著(P<0.01)；
***—与1 μg/mL LPS组差异极其显著(P<0.001)；###—与对照组差异极其显著(P<0.001)。

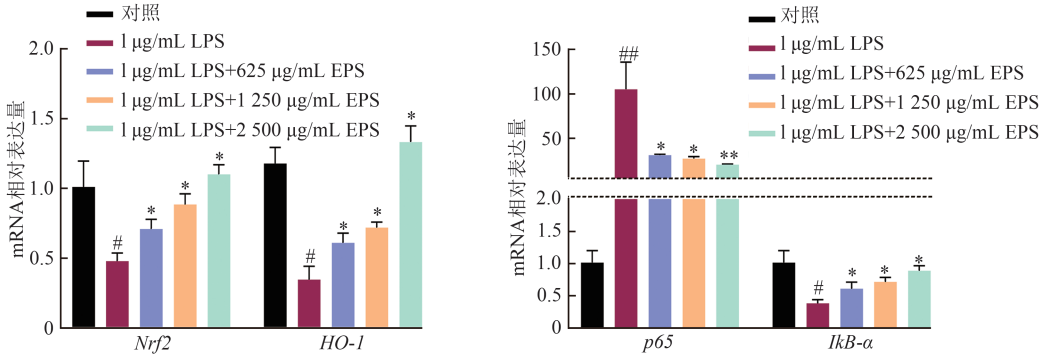
图 6　EPS 对 LPS 诱导的氧化损伤细胞模型中细胞因子基因表达的影响

Fig. 6　Effect of EPS on cytokine gene expression in the LPS induced oxidative damage cell model

2.7　EPS对LPS诱导的氧化损伤细胞模型信号通路的影响

Nrf2和NF-κB分别作为调控氧化应激的重要因子和调节炎症基因表达的重要转录因子，不仅单独影响多个信号通路，又相互联系，共同维持细胞内氧化还原稳态，并在病理环境下调节关键氧化还原调节剂的水平。因此，Nrf2和NF-κB信号通路成为氧化应激与炎症反应相互作用的研究热点。作者通过检测Nrf2/HO-1/NF-κB通路中关键基因的表达水平来探究氧化损伤机制。

LPS刺激极显著上调了正常RAW264.7巨噬细胞中NF-κB组成蛋白*p65*基因的mRNA表达（$P<0.01$），同时显著抑制了*Nrf2*、*HO-1*及*IκB-α*的mRNA的表达（$P<0.05$），见图7。经过EPS干预后，显著促进了*Nrf2*、*HO-1*和*IκB-α*的mRNA表达（$P<0.05$），且表达量与EPS质量浓度呈正相关；而*p65*的mRNA表达水平与之相反。结果表明，EPS可能通过激活Nrf2/HO-1通路，并抑制NF-κB通路来减轻RAW264.7巨噬细胞的氧化损伤。



—与对照组差异显著（$P<0.05$）；
* —与1 μg/mL LPS组差异显著（$P<0.05$）。
(a) *Nrf2*和*HO-1*的mRNA相对表达量

—与对照组差异显著（$P<0.05$）；
* —与1 μg/mL LPS组差异显著（$P<0.05$）；
** —与1 μg/mL LPS组差异极显著（$P<0.01$）。
(b) *P65*和*IkB-α*的mRNA相对表达量

图7　EPS对LPS诱导的氧化损伤细胞模型中Nrf2/HO-1/NF-κB通路的影响

Fig. 7　Effect of EPS on the Nrf2/HO-1/NF-κB pathway in the LPS-induced oxidative damage cell model

在正常情况下，Nrf2以二聚体的形式存在于细胞质中[27]。推测EPS使Nrf2从二聚体中解离，易位至细胞核并与抗氧化反应元件结合，进而诱导*HO-1*基因的高表达并促进抗氧化酶（如SOD）酶活力的提升[28]，这与该研究结果一致，表明EPS的抗氧化作用可能与此通路有关。NF-κB与抑制蛋白IκB-α以复合物的形式存在于细胞质溶胶内。在本研究中，*IκB-α*的mRNA表达水平显著提高，而*NF-κB*的mRNA表达水平显著降低。这可能是由于当细胞被LPS和促炎细胞因子刺激后，IκB-α蛋白被IκB激酶（IKK）磷酸化，进而发生降解，从而使NF-κB解离激活，易位至细胞核中，使得多种细胞因子被诱导表达[29]。使用EPS处理后，IκB-α蛋白磷酸化被抑制，从而使NF-κB的解离和激活程度降低。已有研究表明，通过直接抑制NF-κB的激活来抑制促炎细胞因子的产生是多糖抗炎的潜在机制。此外，EPS还可能通过抑制IKK的上游信号表达来抑制NF-κB的激活或调控Nrf2通路间接抑制NF-κB通路。EPS激活Nrf2信号通路清除多余活性氧，从而降低活性氧介导的NF-κB活化[30]，EPS也可促进Nrf2信号通路进一步诱导*HO-1*基因表达，HO-1及其代谢产物可抑制NF-κB的活化[31]，并且Nrf2可与蛋白质竞争抑制IκB-α的降解，进而抑制NF-κB介导的炎症反应[30]。因此，EPS的抗炎作用可能与抑制通路的方式相关，但具体调控方式仍需进一步研究。

3　结论

植物乳植杆菌IMAU30043与同一分离源的其他两种高产EPS菌株相比，IMAU30043产生的EPS具有更高的体外抗氧化活性，其主要由鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖及葡萄糖醛酸组成。能够缓解LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞氧化损伤和炎症反应，可能是通过激活细胞Nrf2/HO-1通路促进抗氧化酶分泌，并抑制NF-κB通路，下调促炎因子的表达来实现的。该研究可为功能

性植物乳植杆菌IMAU30043胞外多糖的进一步开发利用提供参考，但后续仍需测定EPS的相对分子质量和结构，以进一步探究其构效关系及抗炎机制。

参考文献

[1] LI Y，MA Q S，LIU G Q，et al. Effects of donkey milk on oxidative stress and inflammatory response[J]. Journal of Food Biochemistry，2022，46(4)：e13935.

[2] 尹学哲，许惠仙，赵文玺，等. 草苁蓉水萃取物对脂多糖与*D*-氨基半乳糖所致小鼠肝脏氧化应激和细胞凋亡的影响[J]. 食品与生物技术学报，2013，32(5)：469-473.
YIN X Z，XU H X，ZHAO W X，et al. Effect of aqueous fraction of *Boschniakia rossica* on hepatic oxidative stress and hepatocyte apoptosis of mice with acute liver injury induced by lipopolysaccharide and *D*-galactosamine[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2013，32(5)：469-473.(in Chinese)

[3] 平舜，王凯，张江临，等. 茶蜂花粉提取物BPE对LPS诱导的RAW264.7细胞的体外抗炎症作用[J]. 食品与生物技术学报，2015，34(12)：1302-1307.
PING S，WANG K，ZHANG J L，et al. *In vitro* anti-flammatory effects of *Camellia sinensis* bee pollen extract (BPE) on LPS-induced inflammation in RAW264.7 macrophage cells[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2015，34(12)：1302-1307.(in Chinese)

[4] BRÜNE B，DEHNE N，GROSSMANN N，et al. Redox control of inflammation in macrophages[J]. Antioxidants & Redox Signaling，2013，19(6)：595-637.

[5] ANSARI M Y，AHMAD N，HAQQI T M. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis：role of polyphenols[J]. Biomedecine & Pharmacotherapie，2020，129：110452.

[6] 陈国伟，邱春红，田灵敏，等. 食源性天然产物中多糖干预炎症性肠病的研究进展[J]. 食品科学，2019，40(13)：281-287.
CHEN G W，QIU C H，TIAN L M，et al. Recent progress in food-derived natural polysaccharide intervention in inflammatory bowel disease[J]. Food Science，2019，40(13)：281-287.(in Chinese)

[7] 莫双瑗，梁健. 黑灵芝多糖对运动大鼠抗疲劳和抗氧化作用[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(5)：555-559.
MO S Y，LIANG J. Study of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on rat anti-fatigue and anti-oxidant effect[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2018，37(5)：555-559.(in Chinese)

[8] 于传宗，张凤兰，慕宗杰，等. 野生蒙古口蘑多糖通过STAT3和HIF-1α通路对LPS诱导的巨噬细胞发挥抗炎调节作用[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(6)：93-98.
YU C Z，ZHANG F L，MU Z J，et al. Anti-inflammatory effect of wild *Tricholoma mongolicum* polysaccharides on LPS-induced RAW 264.7 cells *via* STAT3 and HIF-1α pathways[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(6)：93-98.(in Chinese)

[9] ZHANG L，LIU C H，LI D，et al. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2013，54：270-275.

[10] 刘聪秀，宋佳佳，王洪伟，等. 发酵乳杆菌LFQ153胞外多糖对RAW 264.7巨噬细胞氧化损伤的保护作用[J]. 食品与发酵工业，2022，48(8)：1-8.
LIU C X，SONG J J，WANG H W，et al. Protective effect of exopolysaccharide from *Lactobacillus fermentum* LFQ153 against oxidative damage in RAW 264.7 macrophages[J]. Food and Fermentation Industries，2022，48(8)：1-8.(in Chinese)

[11] ZHU M Q，HUANG R M，WEN P，et al. Structural characterization and immunological activity of pectin polysaccharide from kiwano (*Cucumis metuliferus*) peels[J]. Carbohydrate Polymers，2021，254：117371.

[12] LIU C H，WANG C H，XU Z L，et al. Isolation，chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of *Aloe barbadensis* Miller irrigated with sea water[J]. Process Biochemistry，2007，42(6)：961-970.

[13] ZHOU Y，CUI Y H，QU X J. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria：structure，bioactivity and associations：a review[J]. Carbohydrate Polymers，2019，207：317-332.

[14] 丁莉. 一株细菌胞外多糖的分离纯化及其抗氧化活性研究[D]. 西安：西北大学，2021.

[15] CHEN Y C，WU Y J，HU C Y. Monosaccharide composition influence and immunomodulatory effects of probiotic exopolysaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2019，133：575-582.

[16] 房晓彬. 植物乳杆菌JLAU103胞外多糖的理化特性及生物活性研究[D]. 长春：吉林农业大学，2019.

[17] YI J P，LI X，WANG S，et al. Steam explosion pretreatment of achyranthis bidentatae radix：modified polysaccharide and its antioxidant activities[J]. Food Chemistry，2022，375：131746.

[18] CHAI Z，HUANG W Y，ZHAO X，et al. Preparation，characterization，antioxidant activity and protective effect against cellular oxidative stress of polysaccharide from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2018，

119：1068-1076.

[19] SURAYOT U，WANG J G，SEESURIYACHAN P，et al. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria：structural analysis，molecular weight effect on immunomodulation [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2014，68：233-240.

[20] WANG J，WU T，FANG X B，et al. Characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* JLK0142 isolated from fermented dairy tofu[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2018，115：985-993.

[21] 张凯丽，陈博，田昌义，等. 归芪多糖延缓大鼠脑组织衰老的作用机制[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(2)：51-57.
ZHANG K L，CHEN B，TIAN C Y，et al. Study on the mechanism of GUIQI polysaccharides delaying rat brain aging[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(2)：51-57.(in Chinese)

[22] UCKAN K，DEMIR H，TURAN K，et al. Role of oxidative stress in obese and nonobese PCOS patients[J]. International Journal of Clinical Practice，2022，1：4579831.

[23] WU Y T，HUO Y F，XU L，et al. Purification，characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Porphyra haitanensis* [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2020，165(Pt B)：2116-2125.

[24] 杜青，陈林，贺炜，等. 黄精多糖对RAW 264.7细胞活性及炎症因子TNF-α、IL-6、iNOS表达的影响[J]. 中成药，2022，44(8)：2676-2679.
DU Q，CHEN L，HE W，et al. Effects of *Polygonatum* polysaccharide on the activity of RAW 264.7 cells and the expression of inflammatory factors TNF-α，IL-6 and iNOS [J]. Chinese Traditional Patent Medicine，2022，44(8)：2676-2679.(in Chinese)

[25] SUNG W W，LIN Y Y，HUANG S D，et al. Exopolysaccharides of *Bacillus amyloliquefaciens* Am*y*-1 mitigate inflammation by inhibiting ERK1/2 and NF-κB pathways and activating p38/Nrf2 pathway [J]. International Journal of Molecular Sciences，2022，23(18)：10237.

[26] KWON M，LEE J，PARK S，et al. Exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* L-14 has anti-inflammatory effects *via* the toll-like receptor 4 pathway in LPS-induced RAW 264.7 cells [J]. International Journal of Molecular Sciences，2020，21(23)：9283.

[27] GUO X L，LUO J J，QI J Y，et al. The role and mechanism of polysaccharides in anti-aging [J]. Nutrients，2022，14(24)：5330.

[28] LIU Z W，SUN X. A critical review of the abilities，determinants，and possible molecular mechanisms of seaweed polysaccharides antioxidants[J]. International Journal of Molecular Sciences，2020，21(20)：7774.

[29] LIU D H，ZHONG Z Y，KARIN M. NF-κB：a double-edged sword controlling inflammation[J]. Biomedicines，2022，10(6)：1250.

[30] KUNNUMAKKARA A B，SHABNAM B，GIRISA S，et al. Inflammation，NF-κB，and chronic diseases：how are they linked?[J]. Critical Reviews in Immunology，2020，40(1)：1-39.

[31] LUU HOANG K N，ANSTEE J E，ARNOLD J N. The diverse roles of heme oxygenase-1 in tumor progression [J]. Frontiers in Immunology，2021，12：658315.

（责任编辑：刘冬梅）