

## 低聚半乳糖体外抗炎活性及其构效关系

孙聪聪<sup>1,2,3</sup>, 廖森泰<sup>2</sup>, 邹宇晓<sup>2</sup>, 庞道睿<sup>2</sup>, 刘凡<sup>2\*</sup>, 郝碧芳<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup> 江苏科技大学 江苏镇江 212018

<sup>2</sup> 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所/农业农村部功能食品重点实验室/

广东省农产品加工重点实验室 广州 510600

<sup>3</sup> 中国农业科学院蚕业研究所 江苏镇江 212018)

**摘要** 以脂多糖(LPS)诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为体外炎症模型,以促炎症细胞因子白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-6(IL-6)和炎症介质 NO 为指标,考察低聚半乳糖(GOS)的体外抗炎活性,并从聚合度的角度探究 GOS 抗炎活性的构效关系。结果表明,GOS 能显著降低促炎症细胞因子(IL-1 $\beta$ ,IL-6,TNF- $\alpha$ )和炎症介质 NO 的分泌,表现出良好的体外抗炎活性。不同聚合度的 GOS 在调控促炎症细胞因子与炎症介质分泌能力上差异显著,较高聚合度的 GOS 表现出更强的体外抗炎活性。

**关键词** 低聚半乳糖; 炎症因子; 抗炎; 聚合度

**文章编号** 1009-7848(2023)03-0070-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.03.008

巨噬细胞在机体防御中起着重要作用,当其受到外界刺激后,可通过释放如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ ,IL-1 $\beta$ )和白介素-6(interleukin-6,IL-6)等促炎细胞因子来募集其它的免疫细胞到感染或组织损伤的部位,参与炎症反应<sup>[1]</sup>。

体外试验中,脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 产生趋化因子和促炎因子<sup>[2]</sup>,进而引起炎症反应的发生和发展,因此常用 LPS 诱导小鼠巨噬细胞作为体外炎症模型。目前,该细胞模型被广泛应用于研究天然产物、化合物及药物对炎症反应的调控及机制<sup>[3-5]</sup>。

低聚半乳糖(galactooligosaccharides,GOS)是在葡萄糖或半乳糖分子上连接 1~7 个半乳糖基,即 Gal-(Gal) $n$ -Glc/Gal( $n$  为 0~6)。GOS 作为一种功能性低聚糖,在天然植物中广泛分布,如棉籽糖族低聚糖,是常见的低聚半乳糖,主要包括棉籽

糖、水苏糖及毛蕊花糖。此外,可利用乳糖作为反应底物,在半乳糖苷酶的水解与转糖基作用下人工合成聚合度 2~8 的低聚半乳糖。研究表明,GOS 具有保障肠道健康<sup>[6]</sup>,参与免疫调节<sup>[7]</sup>,抑制肿瘤细胞生成<sup>[8]</sup>,改善人体矿物质吸收<sup>[9]</sup>,改善心血管疾病<sup>[10]</sup>等多种生理功能。然而,对于 GOS 体外抗炎活性,特别是 GOS 的聚合度与其抗炎活性之间的联系尚未明确。

本研究以 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为体外炎症细胞模型,考察在炎症状态下 GOS 对促炎因子分泌情况的影响,评价其体外抗炎活性。通过对比不同聚合度的 GOS 样品的体外抗炎活性,探究 GOS 聚合度与其抗炎活性之间的关系。研究结果可为抗炎专用型低聚半乳糖的定向开发提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

天然低聚半乳糖标准品【棉籽糖( $\beta$ -D-fructofuranosyl O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-)、水苏糖( $\beta$ -D-fructofuranosyl O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-)、毛蕊花糖( $\beta$ -D-fructofuranosyl O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-)】,上海源叶生物科技有

收稿日期: 2022-03-24

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2019B020213001,2020B020225005);广东省农业科学院农业优势产业学科团队建设项目(202119TD);现代农业产业技术体系建设专项(CRAS-18)

第一作者: 孙聪聪,女,硕士生

通信作者: 刘凡 E-mail: liufan1234@126.com

郝碧芳 E-mail: bhao@just.edu.cn

限公司; 人工合成低聚半乳糖标准品 ( $\alpha$ 1-3 Galactobiose, DP2;  $\alpha$ 1-3,  $\beta$ 1-4 Galactotriose DP3,  $\alpha$ 1-3,  $\beta$ 1-4,  $\alpha$ 1-3 Galactotetraose, DP4), 上海甄淮生物科技有限公司。以上试剂均为色谱纯级。

小鼠巨噬细胞株 RAW264.7, 中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; 大肠杆菌脂多糖 (LPS, O55:B5 L2880), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 盐酸小檗碱 (Berberine hydrochloride, BH), 上海皇象铁力蓝天制药有限公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素-链霉素双抗 (100 $\times$ ), 美国 GIBCO 公司; Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒, 美国 MedChem Express 公司; ELISA 试剂盒 (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-6), 深圳欣博盛公司; NO 试剂盒, 上海碧云天生物科技有限公司; 试验用水均为超纯水。

## 1.2 设备与仪器

立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司; D1008E 掌上离心机、MX-F 涡旋混合器, 中国 Servicebio 公司; 3110 Series 二氧化碳培养箱, 美国 Thermo 公司; ALC-210.4 分析天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; 25 mL 细胞培养瓶, 24/96 孔板, 细胞刮刀, 美国 Corning 公司; DMI3000B 型倒置荧光显微镜, 瑞士 Leica 公司; Infinite Pro 200 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 主要溶液及配制

1) DMEM 完全培养基 向 DMEM 高糖培养基中加入胎牛血清及青霉素-链霉素, 配成含 10% 的胎牛血清、1% 的青霉素-链霉素的 DMEM 完全培养基, 混合均匀, 4 $^{\circ}$ C 保存。

2) 不同试验样品溶液的配制 分别称取一定质量的各种试验样品 (棉籽糖、水苏糖、毛蕊花糖、DP2、DP3、DP4) 溶于无菌水中, 配成 600  $\mu$ mol/L 样品贮备液, 用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 使用时将 DMEM 完全培养基稀释成相应的浓度。

3) LPS 溶液的配制 准确称取 5 mg LPS 于 5 mL 无菌水中, 配成 1 mg/mL LPS 贮备液, 用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 使用时用 DMEM 完全培养基稀释成相应的浓度。

### 1.3.2 细胞培养 RAW264.7 细胞用 DMEM 完全

培养基培养, 置于 5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C 培养箱中, 每两天换液 1 次。当细胞处于对数期时, 将其用细胞刮刀刮下, 备用。

1.3.3 细胞活力检测 取对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板 (2 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/mL), 每孔接种 100  $\mu$ L, 设置空白组 (完全培养基)、对照组 (细胞+完全培养基)、试验组 (细胞+终浓度为 18.75, 37.5, 75, 150, 300, 600  $\mu$ mol/L 的试验样品), 试验样品为棉籽糖、水苏糖、毛蕊花糖、DP2、DP3、DP4, 每组 3 个复孔。待细胞培养至 24 h, 弃培养基; 而后加入试验样品干预 24 h, 弃培养基, 每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂孵育 30 min, 在波长 450 nm 处测定吸光度 (OD<sub>450nm</sub>), 计算细胞的存活率, 计算公式为:

$$\text{存活率}(\%) = [(\text{OD}_{\text{试验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}})] \times 100$$

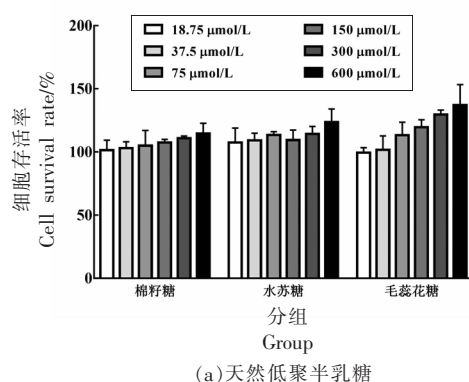
1.3.4 细胞分泌 NO 的测定 取对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 24 孔板 (2 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/mL), 每孔接种 1 mL, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 设置空白组 (1 mL 完全培养基)、LPS 组 (1 mL 终质量浓度为 1  $\mu$ g/mL LPS)、阳性对照小檗碱组 (1 mL 终质量浓度为 1  $\mu$ g/mL LPS + 10  $\mu$ g/mL 小檗碱的混合液)、试验组 (1 mL 终质量浓度为 1  $\mu$ g/mL LPS + 300  $\mu$ mol/L 试验样品的混合液), 试验样品为棉籽糖、水苏糖、毛蕊花糖、DP2、DP3、DP4, 培养 24 h 后, 按照 NO 试剂盒操作步骤测定细胞上清液中 NO 分泌量。

1.3.5 细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 炎症因子的测定 取对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 24 孔板 (2 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/mL), 每孔接种 1 mL, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 设置空白组 (1 mL 完全培养基)、LPS 组 (1 mL 终质量浓度为 1  $\mu$ g/mL LPS)、阳性对照小檗碱组 (1 mL 终质量浓度为 1  $\mu$ g/mL LPS + 10  $\mu$ g/mL 小檗碱的混合液)、试验组 (1 mL 终质量浓度为 1  $\mu$ g/mL LPS + 300  $\mu$ mol/L 试验样品的混合液), 试验样品为棉籽糖、水苏糖、毛蕊花糖、DP2、DP3、DP4, 培养 24 h 后, 分别用 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 ELISA 试剂盒检测细胞上清液中炎症因子的含量, 具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{N-S}{N-C} \times 100 \quad (2)$$

式中: $N$ ——LPS 组中 IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$ /IL-6 的质量浓度 (pg/mL, ng/mL); $C$ ——空白组中 IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$ /IL-6 的质量浓度 (pg/mL, ng/mL); $S$ ——试验组中 IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$ /IL-6 的质量浓度 (pg/mL, ng/mL)。

1.3.6 数据分析 试验结果均以平均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Duncan's 多重差异显著分析,显著性水平  $P < 0.05$ ,不同字母代表组间有显著性差异。用 GraphPad Prism 7 软件做图。



## 2 结果与分析

### 2.1 低聚半乳糖对 RAW264.7 细胞活力的影响

用不同浓度的低聚半乳糖样品处理 RAW264.7 细胞 24 h 后,结果显示:在 18.75~600  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围,天然和人工合成低聚半乳糖对 RAW264.7 细胞均没有明显的细胞毒性,各样品组的细胞存活率均保持在 95% 以上 (图 1)。兼顾活性与经济考量,选用 300  $\mu\text{mol/L}$  这一剂量组的低聚半乳糖处理 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞,进行下一步试验。

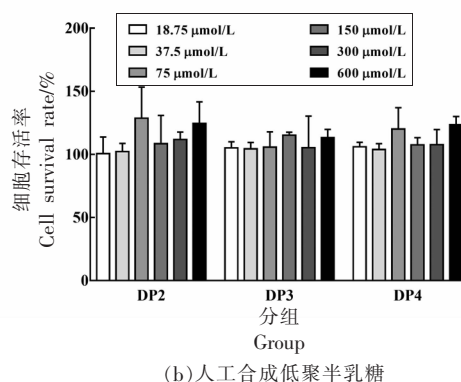


图 1 低聚半乳糖对 RAW264.7 细胞活力的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of the GOS on cell viability

### 2.2 天然低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响

当机体受到外来刺激,产生炎症反应时,NO 释放量会显著增加。由图 2 可知,与空白组相比,LPS 组的 NO 释放量显著增高 ( $P < 0.05$ );而与 LPS 组相比,棉籽糖、水苏糖、毛蕊花糖组 NO 释放量均显著下降 ( $P < 0.05$ ),且其作用效果呈现毛蕊花糖 > 水苏糖 > 棉籽糖的趋势,三者之间作用效果差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 天然低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 IL-1 $\beta$ 的影响

IL-1 $\beta$  作为一种重要的促炎因子,参与机体的免疫调节,主要由巨噬细胞在细胞感染、损伤以及炎症等过程中释放,在机体免疫调节和炎症性疾病发病机制中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。当巨噬细胞受到 LPS 刺激时,会显著提高 IL-1 $\beta$  的分泌。如图 3

所示,与空白组相比,LPS 组 IL-1 $\beta$  的含量显著升高,达  $(122.31 \pm 0.26)$  pg/mL;经 300  $\mu\text{mol/L}$  天然低聚半乳糖处理后,较 LPS 组,其 IL-1 $\beta$  的含量均显著降低 ( $P < 0.05$ )。其中,棉籽糖、水苏糖、毛蕊花糖对 IL-1 $\beta$  分泌量的抑制率分别为 57.48%, 58.54% 和 67.39%,呈现的作用效果为毛蕊花糖 > 水苏糖 > 棉籽糖,三者之间作用效果差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 天然低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 TNF- $\alpha$ 的影响

TNF- $\alpha$  是一种重要的炎症因子,直接参与炎症反应。研究表明 TNF- $\alpha$  在炎症和神经性痛觉过敏中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。如图 4 结果所示,空白组 TNF- $\alpha$  的含量极低,经 LPS 诱导后,LPS 组的 TNF- $\alpha$  的含量显著增加 ( $P < 0.05$ );与 LPS 组相比,天然低聚半乳糖处理组 TNF- $\alpha$  的含量均显著降低 ( $P < 0.05$ );棉籽糖、水苏糖、毛蕊花糖对 TNF- $\alpha$

分泌量的抑制率为 33.73%, 36.02% 和 37.11%, 呈现的作用效果: 毛蕊花糖 > 水苏糖 > 棉籽糖, 三者之间作用效果差异显著 ( $P < 0.05$ )。

## 2.5 天然低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 IL-6 的影响

IL-6 被认为是炎症标志物<sup>[13]</sup>, 它能够诱导 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  产生, 来调控炎症反应<sup>[14]</sup>。当用 LPS 诱导细胞产生炎症时, IL-6 的分泌量会显著

提高。如图 5 所示, 与空白组相比, LPS 组的 IL-6 的含量高达  $(104.48 \pm 0.12)$  ng/mL; 当经 300  $\mu\text{mol/L}$  的天然低聚半乳糖处理后, 较 LPS 组, 其 IL-6 的含量均显著降低 ( $P < 0.05$ )。棉籽糖、水苏糖、毛蕊花糖对 IL-6 分泌量的抑制率分别为 35.98%, 42.01% 和 45.96%, 呈现的作用效果: 毛蕊花糖 > 水苏糖 > 棉籽糖, 三者之间作用效果差异显著 ( $P < 0.05$ )。

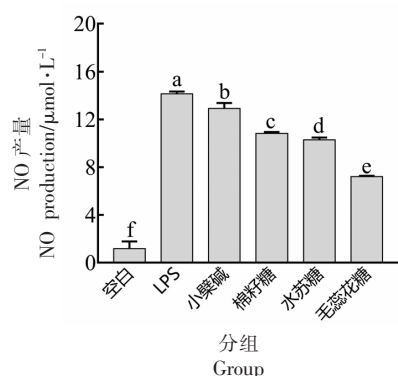


图 2 天然低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响

Fig.2 Effects of the natural GOS on the release of NO in LPS-induced RAW264.7 cells

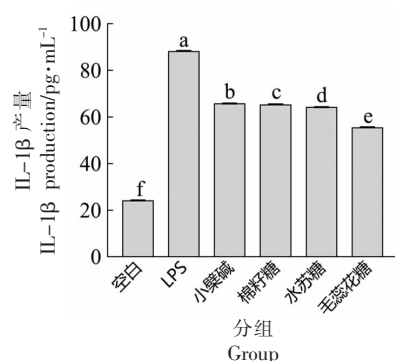


图 3 天然低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 IL-1 $\beta$  的影响

Fig.3 Effects of the natural GOS on the secretion of IL-1 $\beta$  in LPS-induced RAW264.7 cells

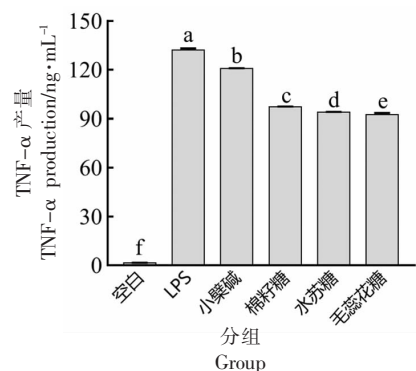


图 4 天然低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 TNF- $\alpha$  的影响

Fig.4 Effects of the natural GOS on the secretion of TNF- $\alpha$  in LPS-induced RAW264.7 cells

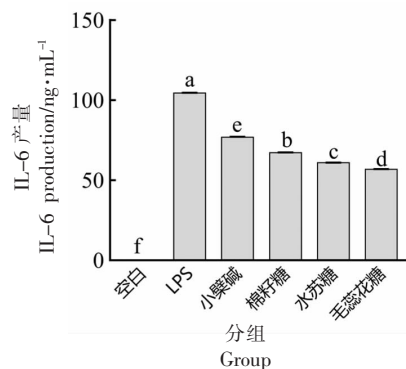


图 5 天然低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 IL-6 的影响

Fig.5 Effects of the natural GOS on the secretion of IL-6 in LPS-induced RAW264.7 cells

NO、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 等作为重要的炎症介质, 参与炎症反应, 诱导炎症细胞释放炎症因子, 从而促进炎症反应的发展, 与炎症程度呈正相关<sup>[15]</sup>。以上结果表明, 天然低聚半乳糖具有较好的抑制细胞炎症介质释放的作用, 其作用效果为毛

蕊花糖 > 水苏糖 > 棉籽糖, 提示天然低聚半乳糖具有良好的体外抗炎作用, 其抗炎活性可能与聚合度呈正相关。为进一步验证低聚半乳糖聚合度与其抗炎活性的关系, 采用结构单元更为简单的人工合成低聚半乳糖做下一步试验。



## 2.6 人工合成低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响

图 6 结果表明,与空白组相比,LPS 组 NO 的分泌量显著升高 ( $P<0.05$ );与 LPS 组相比,DP2、DP3、DP4 组均显著降低 NO 的释放 ( $P<0.05$ ),其作用效果为 DP4>DP3>DP2,三者之间作用效果差异显著 ( $P<0.05$ )。

## 2.7 人工合成低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 IL-1 $\beta$ 的影响

与空白组相比,LPS 组 IL-1 $\beta$  的含量显著升高,达  $(156.53\pm0.88)$  pg/mL;经 300  $\mu$ mol/L 的人工合成低聚半乳糖处理后,较 LPS 组,其 IL-1 $\beta$  的含量均显著降低 ( $P<0.05$ )。其中,DP2、DP3、DP4 对 IL-1 $\beta$  分泌量的抑制率分别为 41.75%、48.14%和 58.26%,呈现的趋势为 DP4>DP3>DP2,三者之间作用效果差异显著 ( $P<0.05$ ) (图 7)。

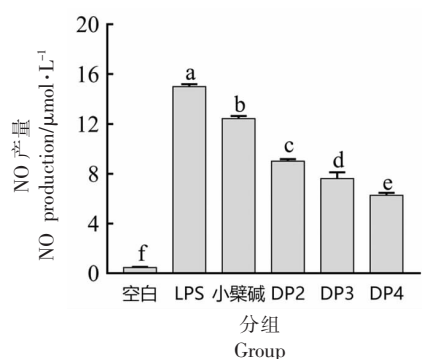


图 6 人工合成低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO 释放的影响

Fig.6 Effects of the synthetic GOS on the release of NO in RAW264.7 cells simulated by LPS

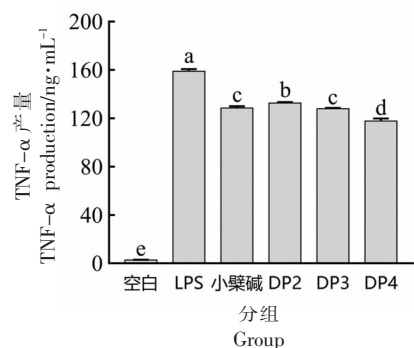


图 8 人工合成低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 TNF- $\alpha$  的影响

Fig.8 Effects of the synthetic GOS on TNF- $\alpha$  secretion in RAW264.7 cells simulated by LPS

## 2.8 人工合成低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 TNF- $\alpha$ 的影响

如图 8 所示,空白组 TNF- $\alpha$  的含量极低,经 LPS 诱导后,LPS 组的 TNF- $\alpha$  含量显著增加 ( $P<0.05$ )。当经 300  $\mu$ mol/L 的人工合成低聚半乳糖处理后,与 LPS 组相比,其 TNF- $\alpha$  的含量均显著降低 ( $P<0.05$ )。其中,DP2、DP3、DP4 对 TNF- $\alpha$  分泌量的抑制率分别为 16.9%、19.89%和 26.42%,呈现的作用效果 DP4>DP3>DP2,三者之间作用效果差异显著 ( $P<0.05$ )。

## 2.9 人工合成低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 IL-6 的影响

图 9 表明,与空白组相比,LPS 组的 IL-6 的含量高达  $(137.47\pm0.42)$  ng/mL;经 300  $\mu$ mol/L 的人工合成低聚半乳糖处理后,较 LPS 组,其 IL-6 的含量均显著降低 ( $P<0.05$ ),DP2、DP3、DP4 对

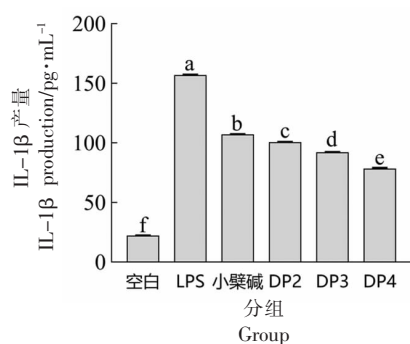


图 7 人工合成低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 IL-1 $\beta$  的影响

Fig.7 Effects of the synthetic GOS on the secretion of IL-1 $\beta$  in LPS-induced RAW264.7 cells

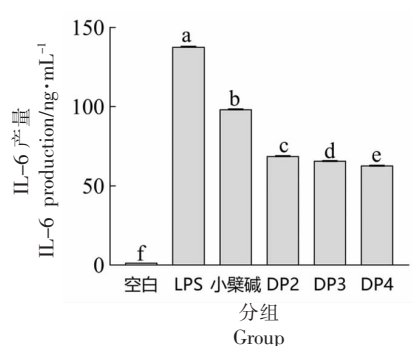


图 9 人工合成低聚半乳糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 IL-6 的影响

Fig.9 Effects of the synthetic GOS on IL-6 secretion in RAW264.7 cells simulated by LPS

IL-6 分泌量的抑制率分别为 50.59%, 52.78% 和 54.96%, 呈现的作用效果  $DP4 > DP3 > DP2$ , 三者之间作用效果差异显著 ( $P < 0.05$ )。

以上结果表明低聚半乳糖具有良好的抗炎活性, 同时也再次证明半乳糖残基的数量(聚合度)可能影响低聚半乳糖的抗炎活性, 即聚合度越大, 低聚半乳糖的抗炎活性越强。

### 3 讨论

#### 3.1 下调促炎因子表达可能是 GOS 抗炎作用机理之一

炎症是机体应对外部有害刺激(如化学刺激、组织损伤及脂多糖等)的一种防御反应<sup>[16]</sup>。炎症反应不消除, 随着时间的推移, 炎症会进一步恶化, 甚至可能发展成全身性慢性炎症, 进而导致一些慢性疾病(如心脑血管疾病、糖尿病、自身免疫性疾病、癌症和神经退行性疾病等<sup>[17]</sup>)的发生。脂多糖作为革兰氏阴性菌细胞壁主要成分, 能够与 TLR4 受体结合, 从而诱导巨噬细胞产生炎症反应<sup>[18]</sup>。当受到 LPS 刺激时, 巨噬细胞可以分泌一些促炎酶, 如环氧合酶-2(COX-2)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)。同时, 巨噬细胞可能释放促炎因子(如 IL-1 $\beta$ 、NO、TNF- $\alpha$  和 IL-6 等), 而这些炎症因子的产生不仅参与炎症反应, 而且进一步加速炎症的发展<sup>[19]</sup>。研究表明, 促炎因子(如 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ ) 的失调与多种疾病的发生有关, 包括冠状动脉粥样硬化、阿尔兹海默病以及充血性心力衰竭等<sup>[20]</sup>。抑制炎症因子的过度表达, 可有效抑制炎症性疾病, 这为治疗慢性病提供一个新的治疗策略。

本研究以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞为模型, 通过 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生炎症反应。在 0~600  $\mu\text{mol/L}$  的作用剂量下, GOS 对 RAW264.7 细胞活力无明显影响。Sun 等<sup>[19]</sup>用 LPS(1  $\mu\text{g/mL}$ ) 刺激 RAW264.7 细胞产生炎症反应, 经 LPS 刺激后, 与空白组相比, NO、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌显著增加, 这表明试验模型成功; 而经 GOS 处理后, NO、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌量降低显著, 说明 GOS 有较好的抗炎活性, 这与戴竹青<sup>[21]</sup>、Chu 等<sup>[22]</sup>研究结果一致。

#### 3.2 聚合度对 GOS 的抗炎活性有重要影响

聚合度是表征低聚糖等聚合物分子的重要指标之一, 可用于衡量聚合物分子大小, 对其分子生物活性也有一定影响。有研究表明, 壳寡糖(Chitosan oligosaccharides, COS)的抗炎活性与其聚合度密切相关, 即在一定的聚合度范围, 聚合度越高, 其抗炎活性越好。尤其是聚合度为 7 的 COS 具有最高的抗炎活性<sup>[23]</sup>。此外, Deng 等<sup>[24]</sup>研究发现 *N*-乙酰壳寡糖显著抑制 LPS 诱导细胞产生的炎症反应, 与聚合度为 1 的 *N*-乙酰壳寡糖相比, 聚合度为 6 的 *N*-乙酰壳寡糖显著降低了 IL-1 $\beta$  的分泌与 p65 的磷酸化水平。

虽然 GOS 聚合度与其抗炎活性间的关系尚未见报道, 但是有研究表明 GOS 的聚合度与其益生活性之间存在一定的联系。利用乳制品(商业奶粉)中的低聚半乳糖来支持菌株生长的体外试验表明, 双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*)DR10 可优先利用聚合度为 3 和 4 的 GOS<sup>[25]</sup>。Barboza 等<sup>[26]</sup>研究表明, 在双歧杆菌的发酵试验中, 菌株会优先利用聚合度为 3~8 的 GOS, 这一结果暗示聚合度高的 GOS 可能具有更好的益生活性。

本研究发现, 与对照组相比, LPS 诱导细胞后, 促炎因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和炎症介质 NO 的分泌量显著提高; 而经天然低聚半乳糖处理后, 促炎因子和 NO 的分泌均显著下降, 并呈现一致的抗炎活性趋势。毛蕊花糖(聚合度 5)>水苏糖(聚合度 4)>棉籽糖(聚合度 3), 且三者之间作用效果显著差异。由图 10 中低聚半乳糖(棉籽糖、水苏糖、毛蕊花糖)的结构可知, 棉籽糖、水苏糖、毛蕊花糖的结构类似, 均有 1 分子果糖残基和 1 分子葡萄糖残基, 区别在于棉籽糖还含有 1 分子半乳糖残基, 水苏糖含有 2 分子半乳糖残基, 而毛蕊花糖含有 3 分子半乳糖残基, 即三者含有半乳糖残基的数量不同(聚合度不同)。推测 GOS 的抗炎活性可能与其含有的半乳糖残基数量有关, 即含有半乳糖基的数量越多, 其抗炎活性越好。

为了进一步探究 GOS 抗炎活性的构效关系, 本研究选择结构单元更为简单的人工合成低聚半乳糖: DP2、DP3、DP4 (三者之间结构类似, DP2 由 2 分子半乳糖残基构成, DP3 由 3 分子半乳糖残

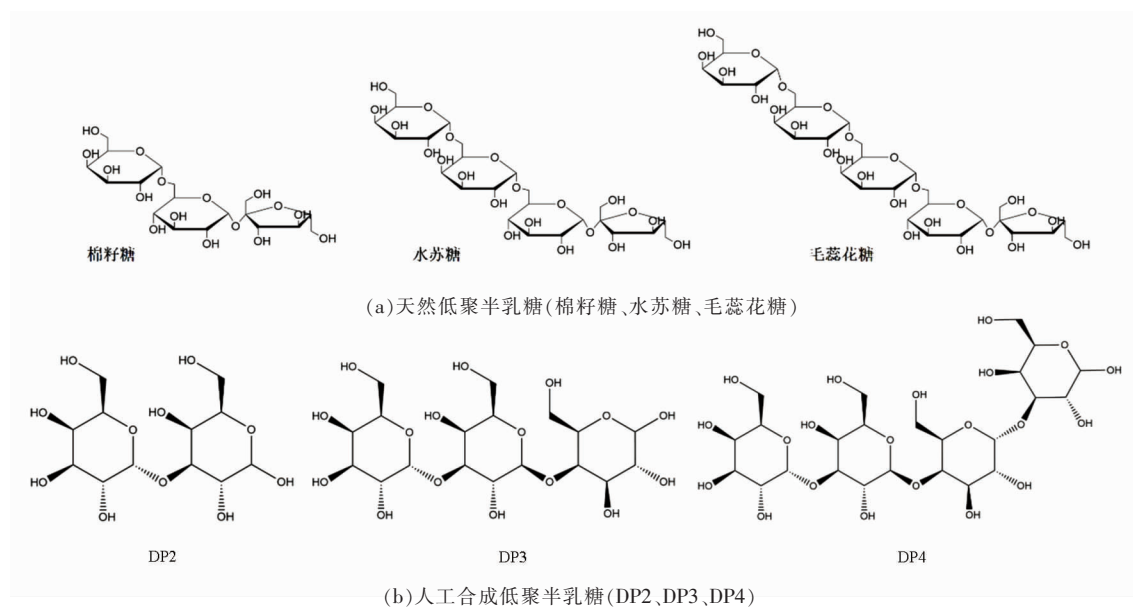


图 10 低聚半乳糖结构图

Fig.10 The chemical structure of the GOS

基构成,而 DP4 由 4 分子半乳糖残基构成),开展试验。结果表明,相较 LPS 模型组,人工合成低聚半乳糖样品组 NO、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌量均显著降低,且作用效果呈 DP4>DP3>DP2 趋势。此结果表明聚合度对 GOS 抗炎活性有重要影响。

对此,作者猜测 GOS 可能通过竞争性干预 LPS 诱导的 TLR4/MD-2 通路信号传导而发挥抗炎活性,GOS 分子大小(聚合度)对其活性具有重要影响。TLR4 是 LPS 的主要配体,LPS 激活的 TLR4 的信号通路在炎症信号传导过程中起着重要作用<sup>[27]</sup>。当 LPS 激活 TLR4 信号通路,随样分化蛋白-2 (MD-2)与 TLR4 结合形成二聚体,从而启动下游反应<sup>[28]</sup>。推测:因 GOS 具有和 LPS 核心多糖段相似的糖基结构,故可能干扰 LPS 诱导 TLR4/MD-2 复合物的二聚化,进而抑制 TLR4 通路的信号传导,起到抗炎作用。随着 GOS 聚合度的增加,分子空间位阻相应增大。当聚合度高的 GOS 与 MD-2 结合后,更易填满 MD-2 疏水口袋的疏水部,使其能够竞争性地结合在 MD-2 疏水腔体内<sup>[29]</sup>,阻止 LPS 进入疏水口袋,进而抑制下游 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症因子的大量释放(图 11)。具体的作用靶点和相关机制,还有待研究。

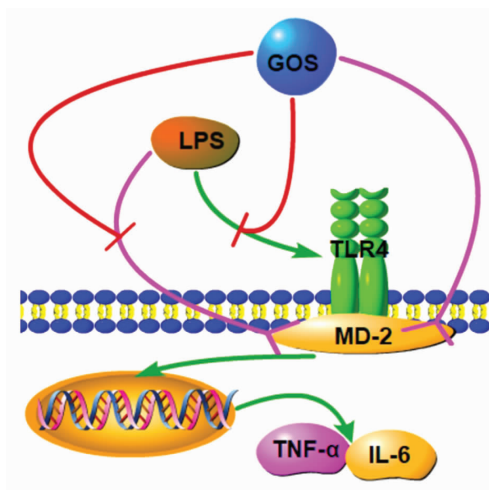


图 11 低聚半乳糖抗炎机制

Fig.11 The anti-inflammatory mechanisms of the GOS

## 4 结论

采用 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞建立体外炎症细胞模型,探讨 GOS 的抗炎活性。结果显示,与 LPS 组相比,GOS 各样品组均能显著降低炎症介质 NO 和 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 等促炎因子的分泌,表明 GOS 具有较好的抗炎活性。

构效关系是化合物结构与其生理活性之间的关系,涉及化合物的官能团分布、化学反应性、分子外形、大小及立体构象等多方面的因素。本研究

仅从聚合度(分子大小)的角度探讨 GOS 抗炎活性的构效关系,即 GOS 的聚合度越高,其空间位阻越大,可能竞争性地结合在 MD-2 疏水腔体内,阻止 LPS 诱导 TLR4/MD-2 二聚化,抑制炎症介质与促炎因子的释放。聚合度越高,GOS 体外抗炎活性越好。后续需借助计算机辅助工具等开展深入的定量构效关系研究。

### 参 考 文 献

- [1] BOSCA L, ZEINI M, TRAVÉS P G, et al. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate[J]. *Toxicology*, 2005, 208(2): 249-258.
- [2] ZHU T, ZHANG W, FENG S J, et al. Emodin suppresses LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells through a PPAR $\gamma$ -dependent pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2016, 34: 16-24.
- [3] 夏炎, 管晓辉, 崔艳艳, 等. 蒲公英糖蛋白体外抗炎作用及对 NF- $\kappa$ B 信号通路的调控[J]. *食品科学*, 2017, 38(19): 182-188.  
XIAN Y, GUAN X H, CUI Y Y, et al. Inhibitory effects of Taraxacum glycoprotein on LPS-induced inflammation via regulating NF- $\kappa$ B pathways in RAW 264.7 cells[J]. *Food Science*, 2017, 38(19): 182-188.
- [4] JIN S W, WANG J Q, CHEN S Y, et al. A novel limonin derivate modulates inflammatory response by suppressing the TLR4/NF- $\kappa$ B signalling pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 100: 501-508.
- [5] XIE Q F, CHENG J J, CHEN J F, et al. Comparison of anti-inflammatory and antioxidant activities of curcumin, tetrahydrocurcumin and octahydrocurcumin in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 2020: 1-10.
- [6] MANO M C R, NERI-NUMA I A, da SILVA J B, et al. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2018, 102(1): 17-37.
- [7] PERDIJK O, VAN BAARLEN P, FERNANDEZ-GUTIERREZ M M, et al. Sialyllactose and galactooligosaccharides promote epithelial barrier functioning and distinctly modulate microbiota composition and short chain fatty acid production *in vitro* [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1-14.
- [8] FERNÁNDEZ J, MORENO F J, OLANO A, et al. A galacto-oligosaccharides preparation derived from lactulose protects against colorectal cancer development in an animal model[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1-14.
- [9] MAAWIA K, IQBAL S, QAMAR T R, et al. Production of impure prebiotic galacto-oligosaccharides and their effect on calcium, magnesium, iron and zinc absorption in Sprague-Dawley rats [J]. *Pharmaceuticals*, 2016, 4(4): 154-160.
- [10] VULEVIC J, JURIC A, TZORTZIS G, et al. A mixture of trans-galactooligosaccharides reduces markers of metabolic syndrome and modulates the fecal microbiota and immune function of overweight adults[J]. *Journal of Nutrition*, 2013, 143(3): 324-331.
- [11] GARLANDA C, DINARELLO C, MANTOVANI A. The interleukin-1 family: back to the future[J]. *Immunity*, 2013, 39(6): 1003-1018.
- [12] ZHANG J M, AN J X. Cytokines, inflammation, and pain[J]. *International Anesthesiology Clinics*, 2007, 45(2): 27-37.
- [13] DESREUMAUX P. Specific targeting of IL-6 signalling pathway: a new way to treat IBD? [J]. *Gut*, 2000, 47(4): 465-466.
- [14] TANAKA T, NARAZAKI M, MASUDA K, et al. Regulation of IL-6 in immunity and diseases[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016, 941: 79-88.
- [15] LIANG N, SANG Y, LIU W, et al. Anti-inflammatory effects of gingerol on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Inflammation*, 2018, 41(3): 835-845.
- [16] KALAISELVAN S, RASOOL M K. Triphala herbal extract suppresses inflammatory responses in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and adjuvant-induced arthritic rats via inhibition of NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Journal of Immunotoxicology*, 2016, 13(4): 509-525.
- [17] WEI R R, RONG C P, XIE Q F, et al. Neuroprotective effect of optimized yinxieling formula in 6-OHDA-induced chronic model of Parkinson's disease through the inflammation pathway[J]. *Evidence-based*



- Complementary and Alternative Medicine, 2019, 2019: 1–11.
- [18] ROSSOL M, HEINE H, MEUSCH U, et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages[J]. Critical Reviews in Immunology, 2011, 31(5): 379–446.
- [19] SUN S P, ZHANG J H, LI H X, et al. Anti-inflammatory activity of the water extract of *Chloranthus serratus* roots in LPS-stimulated RAW264.7 cells mediated by the Nrf2/HO-1, MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 271(2): 1–13.
- [20] 吴洪福, 耿排力. 炎症细胞因子网络与疾病[J]. 青海医学院学报, 2003, 24(4): 267–270.
- WU H F, GENG P L. Inflammatory cytokine network and disease[J]. Journal of Qinghai Medical College, 2003, 24(4): 267–270.
- [21] 戴竹青. Alpha--低聚半乳糖的酶法合成, 生理活性评价及其构--效关系研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- DAI Z Q. Enzymatic synthesis of alpha--galactooligosaccharides and evaluation of its physiological function and structure-activity relationship[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
- [22] CHU H Q, TAO X, SUN Z G, et al. Galactooligosaccharides protects against DSS-induced murine colitis through regulating intestinal flora and inhibiting NF- $\kappa$ B pathway[J]. Life Sciences, 2019, 242: 1–8.
- [23] ZHAO Q N, YIN L Q, ZHANG L R, et al. Chitoheptaose promotes heart rehabilitation in a rat myocarditis model by improving antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic properties[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020, 2020: 1–13.
- [24] DENG J J, LI Z Q, MO Z Q, et al. Immunomodulatory Effects of *N*-Acetyl Chitooligosaccharides on RAW264.7 Macrophages[J]. Marine Drugs, 2020, 18(8): 421–436.
- [25] GOPAL P K, SULLIVAN P A, SMART J B. Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20[J]. International Dairy Journal, 2001, 11(1/2): 19–25.
- [26] BARBOZA M, SELA D A, PIRIM C, et al. Glycoprofiling bifidobacterial consumption of galacto-oligosaccharides by mass spectrometry reveals strain-specific, preferential consumption of glycans[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7319–7325.
- [27] MURAD S. Toll-like receptor 4 in inflammation and angiogenesis: A double-edged sword[J]. Frontiers in Immunology, 2014, 5: 1–5.
- [28] KANG S, LEE S P, KIM K E et al. Toll-like receptor 4 in lymphatic endothelial cells contributes to LPS-induced lymphangiogenesis by chemotactic recruitment of macrophages[J]. Blood, 2009, 113(11): 2605–2613.
- [29] 张晓铮, 张天舒, 崔凤超, 等. 靶向 Toll 样受体 4 的小分子调节剂[J]. 应用化学, 2016, 33(8): 876–886.
- ZHANG X Z, ZHANG T S, CUI F C, et al. Toll-like receptor 4 small molecule modulators[J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2016, 33(8): 876–886.

### The Anti-inflammatory Activity *in Vitro* and Structure-Activity Relationship of Galactooligosaccharides

Sun Congcong<sup>1,2,3</sup>, Liao Sentai<sup>2</sup>, Zou Yuxiao<sup>2</sup>, Pang Daorui<sup>2</sup>, Liu Fan<sup>2\*</sup>, Hao Bifang<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, Jiangsu

<sup>2</sup>Sericultural & Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Functional Food, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/ Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangdong Province, Guangzhou 510600

<sup>3</sup>Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, Jiangsu)

**Abstract** Inflammatory mediator (NO) and proinflammatory factors (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6) were utilized to evaluate

the anti-inflammatory activity of galactooligosaccharide (GOS) *in vitro* by LPS-induced RAW264.7 macrophages. Moreover, the structure-activity relationship of this bio-activity was also explored from the perspective of the degree of polymerizations. The results showed that GOS could significantly reduce the secretion of inflammatory mediator (NO) and proinflammatory factors (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6), implying that GOS had the excellent anti-inflammatory capacity. Besides, the *in vitro* anti-inflammatory activities of GOS with different degrees of polymerization indicated that there are significant differences in the ability to regulate the secretion of proinflammatory cytokines and inflammatory mediators. In conclusion, GOS with higher degree of polymerization showed stronger anti-inflammatory activity *in vitro*.

**Keywords** galactooligosaccharide; inflammatory factor; anti-inflammation; degree of polymerization