

黑豆纳豆激酶粗提取物的免疫调节作用

田玥玮¹, 张永坡^{1*}, 高春艳¹, 赵晋忠¹, 杜维俊^{2*}

¹山西农业大学基础部 山西晋中 030801

²山西农业大学农学院 山西晋中 030801

摘要 以壶关大黑豆为原料发酵纳豆,分离得到黑豆纳豆激酶粗提取物(BNCE),对其结构进行初探,测定其酶活力和溶栓能力,并研究 BNCE 的免疫调节作用。通过红外光谱分析和扫描电镜对 BNCE 结构进行鉴定;分别使用纤维蛋白平板法和动物血块法测定 BNCE 的酶活及其对小鼠血块的体外溶栓作用;用 MTT 比色法探究 BNCE 对 RAW264.7 细胞增殖的影响;中性红染色法测定 BNCE 对 RAW264.7 细胞吞噬率的影响;ELISA 法检测 BNCE 对 RAW264.7 细胞分泌 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的影响。结果表明,BNCE 具有蛋白质的化学结构,表观呈现大小不同且无规则的碎片形状,具有一定的纤溶活性和体外溶栓作用。BNCE 可以促进正常状态以及 LPS 激活状态下 RAW264.7 细胞的增殖,增强其吞噬率,并且有浓度依赖性。另外,BNCE 还可以促进正常状态下的 RAW264.7 细胞 TNF- α 和 IL-1 β 的分泌,抑制 IL-6 的分泌;也能抑制 LPS 激活状态下 RAW264.7 细胞 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的分泌。因此,BNCE 具有一定的免疫调节作用,在食品工业上可以作为保健食品的一种优质原料。

关键词 黑豆; 纳豆激酶; 溶栓作用; RAW264.7 细胞; 免疫调节

文章编号 1009-7848(2024)01-0031-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.01.004

纳豆是以煮熟的大豆为原料,通过接种纳豆菌发酵而成的一种传统保健食品^[1],除了含有纳豆激酶、SOD、异黄酮等多种活性物质外,还富含氨基酸、有机酸、寡聚糖等有益于人体肠道健康的营养成分^[2]。近年来,由于人们越来越关注纳豆类产品的保健功能,国内外学者研究了纳豆及其主要活性物质纳豆激酶的多种功能作用^[3],结果发现其具有治疗心血管疾病^[4]、溶解血栓^[5]、降血压^[6]、抗癌^[7]、抗氧化^[8]等保健功能。黑豆含有多酚、花色苷、黄酮等多种活性物质,相对于黄豆含量更高,因此黑豆更具药用价值^[9]。研究表明,食用黑豆能够增加多酚浓度,有助于改善血管功能,并通过减少人体氧化应激,从而降低患心血管疾病的风险^[10]。本文以壶关大黑豆为原料,发酵制备提取纳豆激酶粗提取物,得到黑豆纳豆激酶粗提取物(Black

bean nattokinase crude extract, BNCE)。

动物实验表明,纳豆激酶通过口服给药能减少大鼠颈动脉形成的血栓质量,具有显著的溶栓效果^[11]。本文以不同浓度的 BNCE 进行处理,研究其对小鼠的体外溶栓作用,以期为黑豆纳豆激酶溶栓作用的深入研究提供数据支持。

除此之外,有研究发现许多天然产物成分对 RAW264.7 细胞具有免疫促进^[12]或免疫抑制^[13]或二者兼具的双向免疫调节作用^[14]。目前关于纳豆激酶的免疫调节作用尚未见报道。为研究 BNCE 对细胞免疫调节的影响,本研究以 RAW264.7 细胞为试验模型,研究 BNCE 对正常状态及脂多糖(LPS)激活状态下 RAW264.7 细胞的免疫调节作用,以期为纳豆激酶的免疫调节作用机制提供理论依据。

收稿日期: 2023-01-11

基金项目: 山西省重点研发计划项目(201903D221036, 201903D2110061-1); 国家重点研发计划项目(2021YFD1600601-2); 中央引导地方科技发展资金项目(YDZJSX2022A035)

第一作者: 田玥玮,女,硕士生

通信作者: 张永坡 E-mail: zhangyp@sxau.edu.cn
杜维俊 E-mail: duweijun@sxau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

壶关大黑豆,山西农业大学遗传与种质创新实验室;RAW264.7 细胞,天津医科大学。

1.2 主要试剂

纳豆菌粉,尚川生物科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO),阿拉丁公司;氯化钠、硫酸铵、溴化钾、

乙醇、冰乙酸,天津大茂化学试剂厂;纤维蛋白原、尿激酶、凝血酶、琼脂、RPMI Medium 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、脂多糖(LPS)、噻唑蓝(MTT)、中性红染色液、小鼠白细胞介素-6 试剂

盒、小鼠肿瘤坏死因子- α 试剂盒、小鼠白介素-1 β 试剂盒,北京索莱宝有限公司。

1.3 主要仪器与设备

仪器及设备详见表 1。

表 1 仪器及设备一览表
Table 1 List of instruments and equipment

名称	型号	生产厂家
倒置荧光光学显微镜	DMIL LED	徕卡显微系统(上海)贸易有限公司
酶标分析仪	DNM-9602	北京普朗新技术有限公司
超净工作台	SW-CJ-1D	苏州净化设备有限公司
二氧化碳细胞培养箱	WJ-80B-II	上海沪粤明科学仪器有限公司
红外光谱仪	Spectrum Two	美国 PerkinElmer
真空冷冻干燥机	ATS.D5-2M	科仪创智(北京)科技发展有限公司
高速粉碎机	QE-200	浙江屹立工贸有限公司
高压蒸汽灭菌锅	LDZF-50L	上海申安医疗器械厂
恒温恒湿培养箱	LRHS-150-III	上海跃进医疗器械有限公司

1.4 试验方法

1.4.1 BNCE 的制备、提取与分离 将黑豆仔细挑选并称取 25 g,用蒸馏水清洗 2~3 遍以除去表面杂质,加入 100 mL 蒸馏水浸泡过夜。浸泡好的黑豆放入高压蒸汽灭菌锅,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min 后取出,冷却至 30~40 $^{\circ}\text{C}$ 。称取 0.3 g 纳豆菌粉,采用直投式纳豆芽孢杆菌的方法,用 40 $^{\circ}\text{C}$ 左右的蒸馏水溶解纳豆菌粉,充分溶解后均匀地接种到黑豆上以保证黑豆表面均有菌液。将接种后的黑豆放入恒温恒湿培养箱,设置温度 37 $^{\circ}\text{C}$,湿度 70%,发酵 18 h。把发酵好的黑豆放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱后熟 24 h,得到黑纳豆成品。

将黑纳豆成品放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱预冻后进行冷冻干燥,干燥后用粉碎机打粉并过筛得到黑纳豆冻干粉。称取适量黑纳豆冻干粉,并与生理盐水按照 1:10(g/mL)的料液比混匀,混匀后的溶液放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 12 h。之后在 4 $^{\circ}\text{C}$,10 000 r/min 条件下离心 10 min,弃掉沉淀,保留上清,即为黑纳豆激酶粗提取液。

向 20 mL 黑豆纳豆激酶粗提取液中缓慢加入固体硫酸铵使其终浓度达到 20%饱和度(110 g/L)^[11],放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 12 h。之后在 4 $^{\circ}\text{C}$,10 000 r/min 条件下离心 10 min,弃掉沉淀,保留上清。向上述得到的上清中缓慢加入固体硫酸铵使其终浓

度达到 60%饱和度(360 g/L),同样静置、离心,弃掉上清,保留沉淀。将最终得到的沉淀进行冷冻干燥,然后在-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用,即可得到黑豆纳豆激酶粗提取物(Black bean nattokinase crude extract, BNCE)。

1.4.2 BNCE 的结构初探 通过红外光谱分析和扫描电镜探究 BNCE 的结构。称取适量 BNCE 样品与溴化钾粉末按质量比 1:100 混合,充分研磨后压片,用红外光谱仪在波长 400~4 000 cm^{-1} 范围内扫描采集数据,通过傅里叶红外光谱法测定 BNCE 的特征吸收峰。将冷冻干燥后的 BNCE 粉末粘到铜质样品台上,吹去未粘牢的样品粉末,然后对样品表面进行喷金,通过扫描电镜观察 BNCE 的表面形状和结构。

1.4.3 BNCE 酶活的测定 采用纤维蛋白平板法测定 BNCE 的酶活。称取 25 mg 纤维蛋白原并用 10 mL 生理盐水充分溶解,缓慢均匀地加入并不断搅拌至澄清,得到乳白色的纤维蛋白原溶液(2.5 mg/mL)。称取 0.15 g 琼脂粉用 10 mL 生理盐水溶解,加热使琼脂粉完全溶解得到琼脂溶液(1.5%),并于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温。向装有 1 000 U 的凝血酶粉末管中加入 1 mL 生理盐水,充分溶解并稀释得到 25 U/mL 的凝血酶溶液。

先将上述配好的 10 mL 纤维蛋白原溶液和

10 mL 琼脂溶液混匀后倒入培养皿, 后向培养皿中加入 1 mL 凝血酶溶液, 并快速搅拌使其混匀, 在搅拌过程中要防止气泡产生。静置冷却, 待培养皿中溶液完全凝固方可制成纤维蛋白平板。点样时, 在平板上打出小孔并吸出小孔里的液体, 再向打好的小孔中加入 20 μL 待测溶液。点样完成后, 将纤维蛋白平板放于恒温恒湿培养箱中, 设置温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 70%, 反应 18 h。反应结束后对平板上小孔周围溶解圈的直径进行测量, 并根据标准曲线计算酶活。

以尿激酶作为阳性对照, 把酶活为 50 000 U/g 的尿激酶粉末用生理盐水分别配制成 1 000, 800, 600, 400, 200, 100, 50 U/mL 的浓度。按照上述方法, 打好小孔后, 每孔加入 20 μL 尿激酶溶液, 反应后对溶解圈的直径进行测量, 计算面积并绘制标准曲线。

1.4.4 BNCE 的溶栓率测定 动物血块法检测 BNCE 的体外溶栓作用。取多份新鲜小鼠血液于 2 mL 离心管中, 静置使其凝固, 将血凝块吸干多余水分后分别称重, 并同时放入相应的离心管中。称取适量 BNCE 样品, 用生理盐水溶解稀释至 156.25, 312.5, 625, 1 250, 2 500, 5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以生理盐水作为对照。将配制好的样品溶液各取 1 mL 加入装有血凝块的离心管中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下水浴, 在作用 4 h 和 8 h 后, 将血凝块取出吸干多余水分, 分别称重并计算样品作用 4 h 和 8 h 后的溶栓率。溶栓率计算公式如下:

$$\text{溶栓率} = \frac{m - m_0}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中, m ——溶解前血凝块质量(g); m_0 ——溶解后血凝块质量(g)。

1.4.5 BNCE 对 RAW264.7 细胞增殖的影响 采用 MTT 比色法探究 BNCE 对 RAW264.7 细胞增殖的影响。RAW264.7 细胞用 1640 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下培养, 待细胞生长至培养瓶的 80%~90% 时, 消化传代, 2~3 代后方可进行试验处理。将细胞按 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔细胞培养板中, 贴壁后分组。1) 正常状态下的细胞: ①空白对照组: 只加培养基; ②LPS 组: 加入终浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS; ③BNCE 处理组: 加入不同质量浓度的 BNCE 进行处理 (经过试验初筛最终选取 6

个 BNCE 终质量浓度: 15.625, 30.25, 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 2) LPS 激活状态下的细胞: ①空白对照组: 只加培养基; ②LPS 组: 加入终质量浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS; ③LPS+BNCE 处理组: 加入与正常状态 BNCE 处理组相同浓度的 BNCE 进行处理后, 再加入终质量浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS。细胞培养一段时间后, 向每孔加入 10 μL 的 MTT (5 mg/mL), 继续培养 4 h。取出培养板弃去培养液, 向每孔中加入 100 μL 的 DMSO, 振荡 10 min 后, 使用酶标仪在 570 nm 波长处对其吸光度进行检测, 计算细胞相对增殖率, 每孔设置 3 个复孔取平均值。细胞相对增殖率计算公式如下:

$$\text{细胞相对增殖率} = \frac{\text{OD}_{\text{试验组}}}{\text{OD}_{\text{空白对照组}}} \times 100\% \quad (2)$$

1.4.6 时间对 RAW264.7 细胞增殖的影响 采用 MTT 比色法探究时间对 RAW264.7 细胞增殖的影响。按照上述试验分组, 加入相对应的药物处理后, 分别培养 12, 24, 36 h。再向每孔中加入 10 μL 的 MTT (5 mg/mL) 继续培养 4 h。取出培养板弃去培养液, 向每孔中加入 100 μL DMSO, 振荡 10 min 后, 使用酶标仪在 570 nm 波长处检测吸光度, 并计算细胞相对增殖率, 每孔设置 3 个复孔取平均值, 比较不同培养时间分别对细胞增殖的影响。细胞相对增殖率按式 (2) 计算。

1.4.7 BNCE 对 RAW264.7 细胞吞噬率的影响

采用中性红染色法探究 BNCE 对 RAW264.7 细胞吞噬率的影响。将细胞按 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔细胞培养板中, 贴壁后按照上述试验分组, 加入相对应的药物处理, 培养 24 h。取出培养板弃去培养液, 向每孔 100 μL 0.1% 中性红溶液继续培养, 30 min 后弃去培养液, 用 PBS 洗涤 2~3 次。再向每孔加入 100 μL 裂解液 (乙醇: 冰乙酸体积比为 1:1), 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜, 使用酶标仪在 540 nm 波长处检测吸光度。细胞吞噬率计算公式如下:

$$\text{细胞吞噬率} = \frac{\text{OD}_{\text{试验组}}}{\text{OD}_{\text{空白对照组}}} \times 100\% \quad (3)$$

1.4.8 BNCE 对 RAW264.7 细胞分泌 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的影响 采用 ELISA 法探究 BNCE 对 RAW264.7 细胞分泌白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白介素-1 β (IL-1 β) 的影响。细胞按照上述方法进行培养处理, 收集上清液, 按

照 ELISA 试剂盒说明书操作,测定细胞各因子的浓度水平。

1.4.9 数据分析 试验结果采用 Excel 和 Graph Pad Priam 8 分析,结果均以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 BNCE 的结构

BNCE 的红外光谱吸收峰如图 1 所示, 3 342.94 cm^{-1} 宽峰是 N-H 键伸缩振动峰, 2 928.99 cm^{-1} 处的峰是 C-H 键伸缩振动峰。1 655.21, 1 553.89, 1 243.78 cm^{-1} 出现的吸收峰分别是蛋白质酰胺 I 带、酰胺 II 带和酰胺 III 带, 进一步说明分离出的 BNCE 成分具有蛋白质的化学结构^[15]。1 402 cm^{-1} 处的峰是 C-H 键的变形振动峰, 1 079.39 cm^{-1} 是 C-O 伸缩振动吸收峰。在 900 cm^{-1} 以下, 有 619.19 cm^{-1} 一个指纹特征峰。

扫描电镜下 BNCE 表观形貌如图 2 所示。400 倍下, BNCE 呈团状分布, 表面附着微小碎片; 3 500 倍下, BNCE 表观呈大小不同且无规则的碎片形状, 碎片表面光滑。

2.2 BNCE 的酶活

按照 1.4.3 的方法制备所得的纤维蛋白平板, 初始为不透明的乳白色, 点样后小孔周围呈现透明的溶解圈, 其原因是纤溶性物质会逐渐溶解纤维蛋白, 从而导致乳白色消失^[16]。以尿激酶酶活 (U/mL) 为横坐标, 尿激酶在纤维蛋白平板上的溶解圈面积 (mm^2) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程: $y=0.189x+349.55$ 。不同尿激酶浓度所对应的溶解圈面积如表 2 所示, 尿激酶酶活的标准曲线如图 3 所示。该方程表明尿激酶酶活与纤维蛋白平板上的溶解圈面积呈线性关系, 因此可以作为衡量样品纤溶活性的指标。BNCE 在纤维蛋白平板上的溶解圈如图 4 所示。将 BNCE 在纤维蛋白平板上的溶解圈面积代入方程, 计算得到 BNCE 酶活为 6 148 U/g。

2.3 BNCE 的溶栓作用

不同质量浓度 BNCE 样品对小鼠体外血凝块的溶解时间与溶栓率见图 5。由图 5 可见, 随着质量浓度的增加, BNCE 的溶栓作用逐渐增强, 表现出一定的浓度依赖性; 随着时间的延长, BNCE

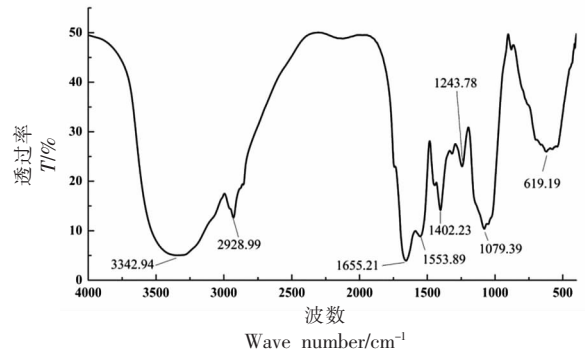


图 1 BNCE 的红外光谱图

Fig.1 Infrared spectra of BNCE

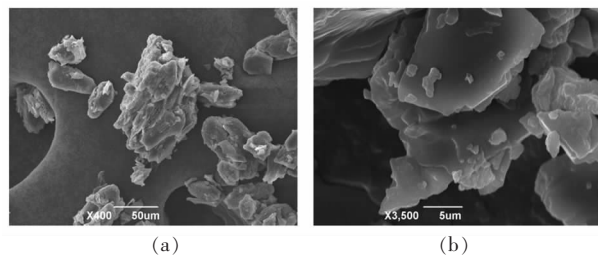


图 2 BNCE 的扫描电镜图

Fig.2 SEM images of BNCE

表 2 不同浓度的尿激酶所对应的溶解圈面积

Table 2 Fribin plate area corresponding to urokinase of different concentrations

尿激酶浓度/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	溶解圈面积/ mm^2
50	346.36
100	363.05
200	380.13
400	415.48
600	452.39
800	490.87
1 000	530.93

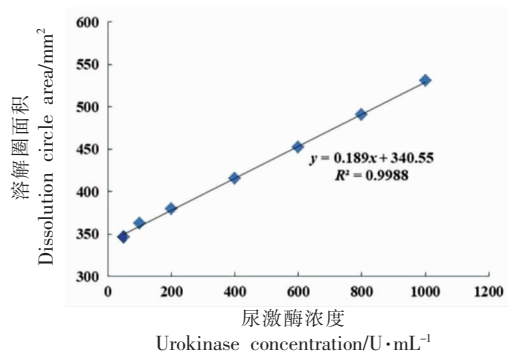


图 3 尿激酶酶活标准曲线

Fig.3 Standard curve of urokinase activity

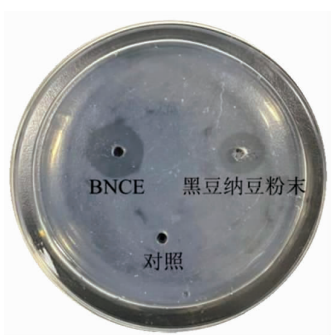


图 4 BNCE 在纤维蛋白平板上的溶解圈

Fig.4 The dissolving ring of BNCE on a fibrin plate

的溶栓作用也逐渐增强,表现出一定的时间依赖性。因此,BNCE 具有一定的体外溶栓作用。

2.4 BNCE 对 RAW264.7 细胞增殖的影响

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为不溶于水的蓝紫色结晶甲瓚,并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。DMSO 能溶解细胞中的甲瓚,用酶标仪测定其吸光度(OD)值,可间接反映活细胞数量。在一定范围内,MTT 结晶形成的量与细胞数成正比,OD 值越大,说明活细胞的数量越多^[17]。表 3 的结果表明,在正常状态下,随着 BNCE 质量浓度的升高,RAW264.7 细胞的相对增殖率呈上升趋势。加入 LPS 刺激后,RAW264.7 细胞的相对增殖率仍具有浓度依赖性。MTT 试验结果表明,在正常状态和 LPS 激活状态下,BNCE 质量浓度在 15.625~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,各浓度对 RAW264.7 细胞均有促增殖作用,无细胞毒性。

2.5 时间对 RAW264.7 细胞增殖的影响

基于 BNCE 对细胞会促增殖且无毒性的影响,进而研究了在正常状态和 LPS 激活状态下,时间对 RAW264.7 细胞增殖的影响。结果如图 6 所示,无论在正常状态(a)还是 LPS 激活状态(b)下,24 h 时 RAW264.7 细胞的增殖率均为最大。因此,选取 24 h 为最佳作用时间。

2.6 BNCE 对 RAW264.7 细胞吞噬率的影响

RAW264.7 细胞是一种具有重要功能的吞噬细胞,在清除异物和病原体方面发挥重要作用。在病原体入侵或自身组织发生病理性变化时,它能发挥细胞内杀伤作用从而消灭抗原。吞噬率是衡量 RAW264.7 细胞活性的一个重要指标^[18]。由表 6

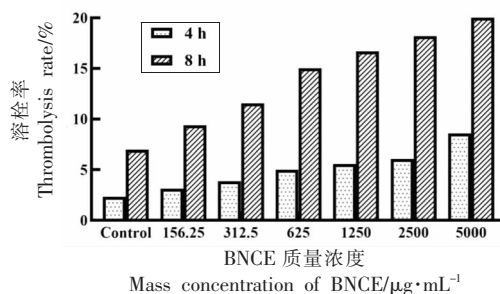


图 5 不同浓度的 BNCE 对小鼠体外血凝块的溶解率

Fig.5 Thrombolysis rate of BNCE with different concentration on blood clot *in vitro* in mice

表 3 BNCE 对 RAW264.7 细胞增殖的影响

Table 3 Effects of BNCE on the proliferation in RAW264.7 cells

组别	BNCE 质量		细胞相对增殖率/%
	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	OD _{570nm}	
对照组	-	0.712 ± 0.044	100.00 ± 6.23
LPS	-	0.918 ± 0.013	129.02 ± 1.87
BNCE	15.625	0.825 ± 0.012	115.99 ± 1.73
	31.25	0.832 ± 0.014	116.94 ± 2.01
	62.5	0.838 ± 0.008	117.71 ± 1.13
	125	0.854 ± 0.014	119.99 ± 2.07
	250	0.876 ± 0.019	123.16 ± 2.79
	500	0.905 ± 0.026	127.13 ± 3.75
LPS+ BNCE	15.625	0.835 ± 0.019	117.29 ± 2.79
	31.25	0.843 ± 0.019	118.45 ± 2.79
	62.5	0.865 ± 0.011	121.61 ± 1.58
	125	0.885 ± 0.005	124.39 ± 0.73
	250	0.911 ± 0.005	128.04 ± 0.77
	500	0.963 ± 0.018	135.35 ± 2.61

可得,LPS(2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激后的细胞吞噬率是对照组的 1.5 倍。与对照组相比,BNCE 在质量浓度为 15.625~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,RAW264.7 细胞的吞噬率增加且具有浓度依赖性。以上结果说明 BNCE 能够增强 RAW264.7 细胞的吞噬率,对机体的免疫调节具有重要作用。

2.7 BNCE 对 RAW264.7 细胞分泌炎症 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的影响

炎症细胞因子是指参与炎症反应的各种细胞因子。众多炎症细胞因子中,在免疫应答和炎症调节中起主要作用的是 IL-6、TNF- α 、IL-1 β ^[19]等。

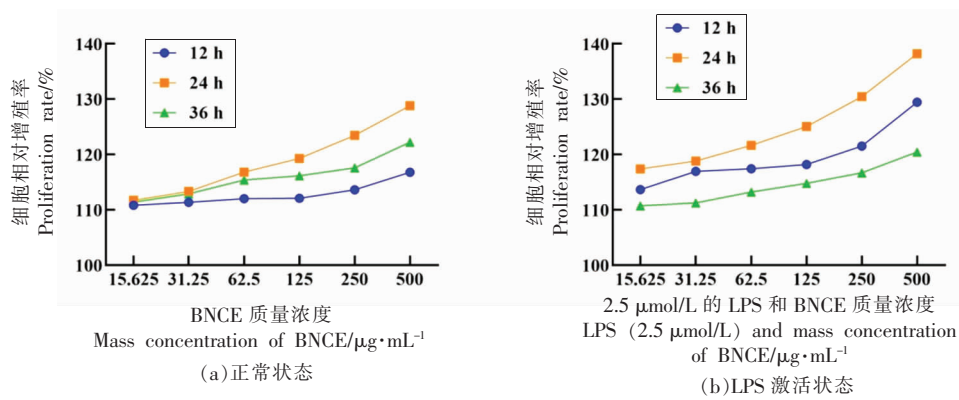


图6 时间对 RAW264.7 细胞增殖的影响

Fig.6 Effects of time on the proliferation in RAW264.7 cells

表4 BNCE对RAW264.7细胞吞噬率的影响
Table 4 Effects of BNCE on the phagocytosis rate of RAW264.7 cells

组别	BNCE 质		细胞吞噬率/%
	量浓度/ μg·mL ⁻¹	OD _{540nm}	
Control	-	0.491 ± 0.013	100.00 ± 2.69
LPS	-	0.748 ± 0.021	152.47 ± 4.35
BNCE	15.625	0.542 ± 0.017	109.77 ± 3.05
	31.25	0.580 ± 0.021	118.62 ± 4.10
	62.5	0.613 ± 0.025	123.88 ± 4.33
	125	0.621 ± 0.045	125.53 ± 8.68
	250	0.633 ± 0.021	127.60 ± 2.35
	500	0.654 ± 0.017	134.49 ± 1.29
LPS+BNCE	15.625	0.561 ± 0.015	114.37 ± 2.97
	31.25	0.594 ± 0.014	120.99 ± 2.78
	62.5	0.619 ± 0.018	126.13 ± 3.77
	125	0.629 ± 0.020	128.07 ± 4.02
	250	0.641 ± 0.028	130.67 ± 5.61
	500	0.665 ± 0.049	135.51 ± 10.06

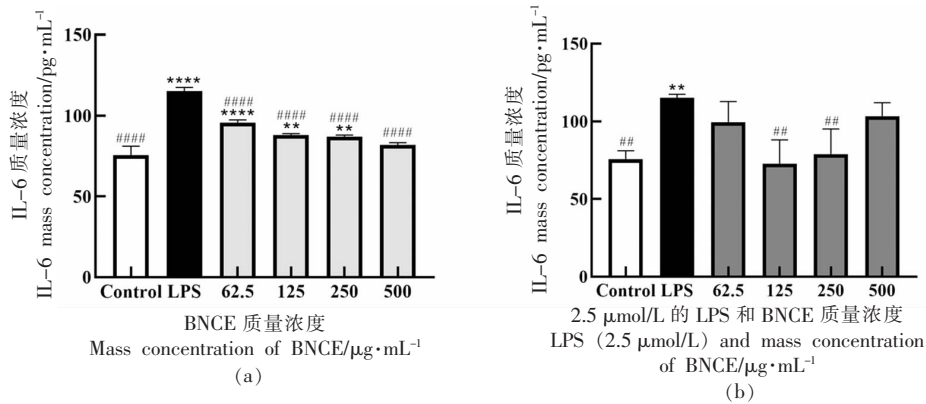
IL-6是一种具有多种功能的细胞因子,主要由巨噬细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞产生,它参与机体的免疫调节及炎症反应,对机体的防御起重要作用^[20]。由图7可见,与对照组相比,随着BNCE质量浓度的增加,IL-6的分泌量逐渐降低,表明BNCE对RAW264.7细胞分泌IL-6具有抑制作用。与LPS组相比,随着BNCE质量浓度的增加,IL-6的分泌量先降低后增加,在质量浓度为125 μg/mL时,IL-6的分泌量达到最小值,且质量浓度为62.5~500 μg/mL时,IL-6分泌量的水平均没有

高于LPS组,表示BNCE能够降低IL-6分泌量的水平,并能抑制LPS诱导RAW264.7细胞的炎症反应。

TNF-α是一种单核因子,主要由活跃的巨噬细胞和单核细胞分泌,并且能促进这些细胞分泌及表达IL-6、IL-1β、胶原酶和黏附分子等,更能反映机体的炎症反应,在免疫功能中起着至关重要的作用^[21]。由图8可见,与对照组相比,随着BNCE质量浓度的增加,TNF-α的分泌量先增加后降低,在质量浓度为250 μg/mL时,TNF-α的分泌量达到最大值,且质量浓度为62.5~250 μg/mL时,TNF-α的分泌量有浓度依赖性,表明BNCE对RAW264.7细胞分泌TNF-α具有促进作用。与LPS组相比,随着BNCE质量浓度的增加,TNF-α的分泌量降低并呈现出浓度依赖性,表示BNCE能够有效降低TNF-α分泌量的水平,并有效抑制LPS诱导RAW264.7细胞的炎症反应。

IL-1β既参与多种细胞活动,如细胞增殖、分化和凋亡,还可活化T细胞、B细胞,促进多种免疫分子相关基因表达,是炎症反应的重要介质^[22]。由图9可见,与对照组相比,随着BNCE质量浓度的增加,IL-1β的分泌量增加并呈现出浓度依赖性,表明BNCE对RAW264.7细胞分泌IL-1β具有促进作用。与LPS组相比,随着BNCE质量浓度的增加,IL-1β的分泌量降低并呈现出浓度依赖性,表示BNCE能够有效降低IL-1β分泌量的水平,并有效抑制LPS诱导RAW264.7细胞的炎症反应,与其对TNF-α的抑制作用结果类似。

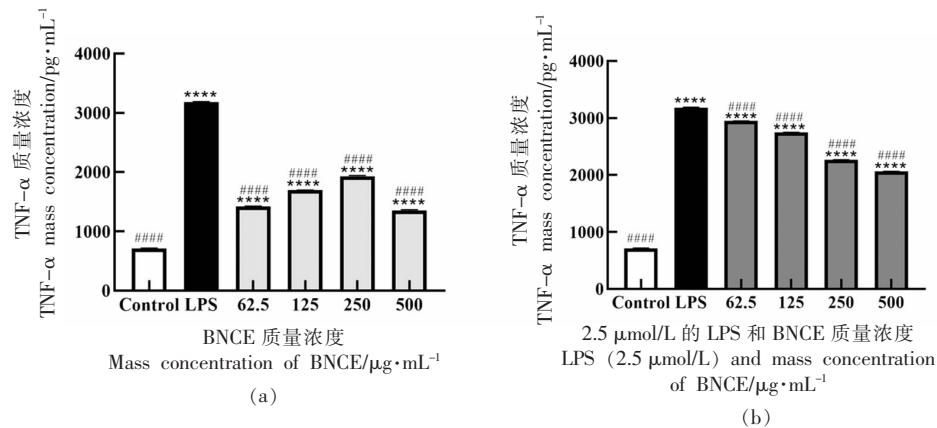
RAW264.7细胞活化后会产生多种细胞因



注:与对照组比较,****. $P < 0.01$, **. $P < 0.05$;与LPS组比较,####. $P < 0.01$, ##. $P < 0.05$.

图 7 BNCE 对 RAW264.7 细胞分泌 IL-6 的影响

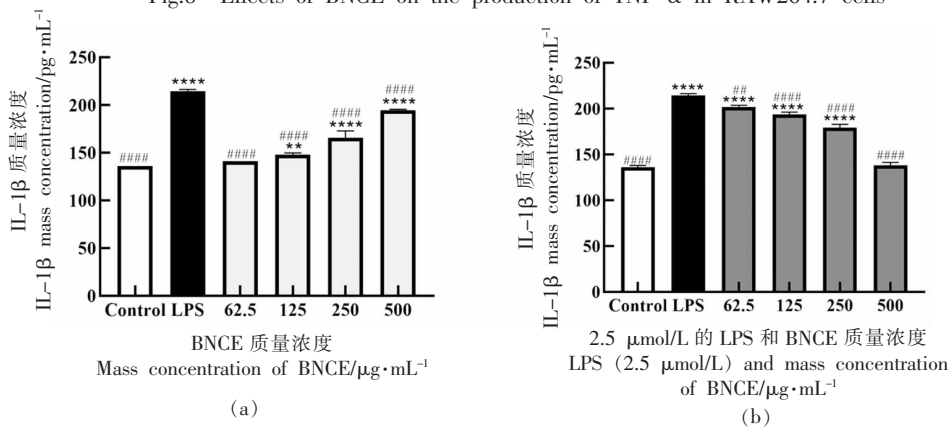
Fig.7 Effects of BNCE on the production of IL-6 in RAW264.7 cells



注:与对照组比较,****. $P < 0.01$, **. $P < 0.05$;与LPS组比较,####. $P < 0.01$, ##. $P < 0.05$.

图 8 BNCE 对 RAW264.7 细胞分泌 TNF-α 的影响

Fig.8 Effects of BNCE on the production of TNF-α in RAW264.7 cells



注:与对照组比较,****. $P < 0.01$, **. $P < 0.05$;与LPS组比较,####. $P < 0.01$, ##. $P < 0.05$.

图 9 BNCE 对 RAW264.7 细胞分泌 IL-1β 的影响

Fig.9 Effects of BNCE on the production of IL-1β in RAW264.7 cells

子、酶类和促炎介质,对微生物和肿瘤细胞具有强大的杀伤作用,然而若受到过多内毒素的刺激,可能会出现颅脑损伤、心肌缺血、局部或全身炎症反

应以某些其它疾病。有研究发现,部分天然产物成分对人体有一种双向的免疫调节功能,可使机体的免疫功能从过高或过低的水平恢复到正常水

平^[23]。这些天然产物不仅是一种免疫激活剂,可提高机体的免疫水平,同时也可以作为一种免疫抑制剂,能够在一定程度上避免机体的免疫系统因免疫过度而受损。上述结果显示,BNCE对RAW264.7细胞分泌TNF- α 和IL-1 β 具有类似的双向免疫调节作用。

3 结论

从黑豆纳豆中提取得到的BNCE具有蛋白质的化学结构,表现呈现大小不同且无规则的碎片形状,具有一定的纤溶活性。体外溶栓作用试验结果表明:BNCE的溶栓作用具有一定的浓度依赖性和时间依赖性。以RAW264.7细胞作为试验模型,研究BNCE对RAW264.7细胞的免疫调节作用。结果表明:1)BNCE在质量浓度为15.625~500 $\mu\text{g/mL}$,作用时间为24 h时,可以促进正常状态以及LPS激活状态下RAW264.7细胞的增殖,无细胞毒性,并且能增强RAW264.7细胞的吞噬率,具有浓度依赖性;2)BNCE在质量浓度为62.5~500 $\mu\text{g/mL}$ 时,可以活化正常状态下的RAW264.7细胞,从而促进细胞因子TNF- α 和IL-1 β 的分泌,具有一定的浓度依赖性,这表明BNCE能够提高机体的免疫水平,是一种免疫激活剂;3)BNCE在质量浓度为62.5~500 $\mu\text{g/mL}$ 时,不仅能抑制正常状态下的RAW264.7细胞IL-6的分泌,也能抑制LPS激活状态下RAW264.7细胞IL-6、TNF- α 和IL-1 β 的分泌,这表明BNCE在一定程度上也能够防止免疫过度造成的机体损伤,是一种免疫抑制剂。有关溶栓作用和免疫调节的进一步作用机制,仍需通过后续试验继续探究。

参 考 文 献

- [1] DEVI C S, MOHANSRINIVASAN V, SHARMA P, et al. Production, purification and stability studies on nattokinase: A therapeutic protein extracted from mutant *Pseudomonas aeruginosa* CMSS isolated from bovine milk[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2016, 22(2): 263-269.
- [2] 金鑫强, 张庆庆, 李根. 纳豆芽孢杆菌原生质体制备条件的研究[J]. 安徽工程大学学报, 2013, 28(1): 19-22.
- [3] JIN X Q, ZHANG Q Q, LI G. Research on protoplast formation conditions of *Bacillus natto*[J]. Journal of Anhui Polytechnic University, 2013, 28(1): 19-22.
- [4] CIONI P, GABELLIERI E, CAMPANINI B, et al. Use of exogenous enzymes in human therapy: Approved drugs and potential applications[J]. Curr Med Chem, 2022, 29(3): 411-452.
- [5] CHEN H J, MCGOWAN E M, REN N, et al. Nattokinase: A promising alternative in prevention and treatment of cardiovascular diseases[J]. Biomark Insights, 2018, 13: 1-8.
- [6] DABBAGH F, NEGAHDARPOUR M, BERENJIAN A, et al. Nattokinase: Production and application[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(22): 9199-9206.
- [7] ZHOU X, LIU L, ZENG X. Research progress on the utilisation of embedding technology and suitable delivery systems for improving the bioavailability of nattokinase: A review[J]. Food Structure, 2021, 30: 100219.
- [8] YAN Y M, WANG Y J, QIAN J L, et al. Nattokinase crude extract inhibits hepatocellular carcinoma growth in mice[J]. J Microbiol Biotechnol, 2019, 29(8): 1281-1287.
- [9] 王笙戎, 任宇杰, 苑宁. 纳豆及其功能性质研究进展[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(6): 21-23.
- [10] WANG S X, REN Y J, YUAN N. Research progress on natto and its functional properties[J]. Cereals & Oils, 2020, 33(6): 21-23.
- [11] 徐飞, 葛阳阳, 刘新春, 等. 黑豆营养成分及生物活性的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(9): 55-61.
- [12] XU F, GE Y Y, LIU X C. Research advancement of nutritional composition and biological activity of black soybean[J]. Food and Nutrition in China, 2019, 25(9): 55-61.
- [13] YAMASHITA Y, WANG L, NAKAMURA A, et al. Black soybean improves the vascular function through an increase in nitric oxide and a decrease in oxidative stress in healthy women[J]. Arch Biochem Biophys, 2020, 688: 108408.
- [14] 王天琦. 纳豆激酶体内药效和毒性研究[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2018.
- [15] WANG T Q. Study on pharmacodynamics and toxicity of nattokinase *in vivo*[D]. Shenyang: Liaoning University, 2018.

- [12] 刘佳. 女贞子免疫增强活性成分分离鉴定及作用机制研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2021.
LIU J. Study on the isolation and mechanism of the components in Ligustri Lucidi Fructus with immune-enhancing activity[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2021.
- [13] CHEN J N, DE MEJIA E D, WU J S B. Inhibitory effect of a glycoprotein isolated from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus*) on the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in RAW264.7 macrophage [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(13): 7092-7097.
- [14] 江泽波, 胡金萍, 温晓文, 等. 猪苓多糖对巨噬细胞 RAW264.7 的双向免疫调节作用[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(12): 1033-1038.
JIANG Z B, HU J P, WEN X W, et al. Bidirectional immunomodulatory effects of polyporus polysaccharide on RAW264.7 macrophages[J]. Immunological Journal, 2014, 30(12): 1033-1038.
- [15] 李会梅. 豆类的红外光谱分析与元素含量测定研究[D]. 昆明: 云南师范大学, 2016.
LI H M. Study on infrared spectrum analysis and elements determination for beans[D]. Kunming: Yunnan Normal University, 2016.
- [16] PINONTOAN R, ELVINA, SANJAYA A, et al. Fibrinolytic characteristics of *Bacillus subtilis* G8 isolated from natto[J]. Biosci Microbiota Food Health, 2021, 40(3): 144-149.
- [17] 高春艳, 乔佩佩, 杨皇泽, 等. 吡啶类单核钴(II)配合物的合成、结构与 DNA 的相互作用及细胞毒性(英文)[J]. 无机化学学报, 2020, 36(9): 1783-1790.
GAO C Y, QIAO P P, YANG H Z, et al. Synthesis, structure, DNA interaction and cytotoxicity of pyridine based mononuclear cobalt (II) complex[J]. Chinese Journal of Inorganic Chemistry, 2020, 36(9): 1783-1790.
- [18] LIU X, XIE J H, JIA S, et al. Immunomodulatory effects of an acetylated *Cyclocarya paliurus* polysaccharide on murine macrophages RAW264.7[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 98: 576-581.
- [19] KIM E Y, MOUDGIL K D. Immunomodulation of autoimmune arthritis by pro-inflammatory cytokines [J]. Cytokine, 2017, 98: 87-96.
- [20] JONES S A, JENKINS B J. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer[J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(12): 773-789.
- [21] ZELOVA H, HOSEK J. TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances [J]. Inflamm Res, 2013, 62(7): 641-651.
- [22] BOSHTAM M, ASGARY S, KOUHPAYEH S, et al. Aptamers against pro- and anti-inflammatory cytokines: A review[J]. Inflammation, 2017, 40(1): 340-349.
- [23] 曹靖文, 黄占旺, 吴少福, 等. 纳豆菌糖肽对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 现代食品科技, 2015, 31(9): 61-67.
CAO J W, HUANG Z W, WU S F, et al. Immunomodulatory effects of *Bacillus natto* glycopeptides on RAW264.7 macrophages [J]. Modern Food Science & Technology, 2015, 31(9): 61-67.

The Immunomodulatory Effects of Black Bean Nattokinase Crude Extract

Tian Yuewei¹, Zhang Yongpo^{1*}, Gao Chunyan¹, Zhao Jinzhong¹, Du Weijun^{2*}

¹Department of Basic Sciences, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi

²College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi

Abstract In this paper, Black bean nattokinase crude extract (BNCE) was isolated by fermenting natto from Huguang black beans. Its structural was preliminary investigated, as well as the determination of enzyme activity, thrombolytic function and immunomodulatory effect were carried out. The structure of BNCE is identified by infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. Enzymatic activity and thrombolytic function of BNCE were determined by fibrin plate method and animal blood clot method, respectively. The effect of BNCE on the proliferation of RAW264.7 cells was investigated by MTT colorimetric method. Neutral red staining was employed to investigate the effect of BNCE on the phagocytosis rate of RAW264.7 cells. In the effect of BNCE, the secretion of IL-6, TNF- α and IL-1 β by RAW264.7

cells was investigated by ELISA. The results showed that BNCE was a protein with different sizes and irregular shapes of fragments, exhibiting certain fibrinolytic activity and thrombolytic function. BNCE can promote the proliferation and enhanced the phagocytosis rate of RAW264.7 cells in normal state as well as in the LPS-activated state in a concentration-dependent manner. In addition, BNCE can also promote the secretion of TNF- α and IL-1 β and inhibit the secretion of IL-6 in normal state RAW264.7 cells. Meanwhile, BNCE can also inhibit the secretion of IL-6, TNF- α and IL-1 β in LPS-activated state RAW264.7 cells. Therefore, BNCE has certain immunomodulatory effects, and can be used as a good raw material for food industry.

Keywords black bean; natto kinase; thrombolytic effect; RAW264.7 cells; immunomodulation