

黄芪多糖-II在小肠微褶皱细胞中的受体介导吸收转运机制研究

高秀华^{1,2,3}, 李晓飞⁴, 吕弯弯^{1,2,3}, 李 科^{1,2,3*}, 李震宇^{1,2,3}, 秦雪梅^{1,2,3}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

3. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

4. 山西省农产品质量安全中心, 山西 太原 030006

摘要: 目的 探究黄芪多糖-II (*Astragalus polysaccharides-II*, APS-II) 在微褶皱细胞上的转运机制。方法 通过人结直肠腺癌 Caco-2 细胞和人 Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞共培养构建微褶皱细胞模型; 将 APS-II 进行荧光标记, 分别加入 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、TLR2、C 型凝集素-1 (dendritic cell-associated C-type lectin-1, Dectin-1) 和补体成分 5a 受体 (complement component 5a receptor 1, C5aR) 抑制剂, 以探讨各受体在 APS-II 转运中的作用。结果 TLR4 受体抑制剂和 C5aR 受体抑制剂显著减少了 APS-II 的转运量 ($P < 0.001$), 表明 APS-II 的转运可能与 TLR4 和 C5aR 受体有关, 相反, TLR2 受体抑制剂和 Dectin-1 受体抑制剂未显著影响 APS-II 的转运量, 提示 TLR2 和 Dectin-1 受体可能不参与 APS-II 的转运。结论 APS-II 在微褶皱细胞上的转运机制可能依赖于 TLR4 和 C5aR 受体, 而 TLR2 和 Dectin-1 受体可能不参与此过程。

关键词: 微褶皱细胞; 黄芪多糖-II; 荧光标记; 受体介导; 受体抑制剂

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)22-7694-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.22.013

Research on receptor-mediated absorptive transport mechanism of *Astragalus polysaccharide-II* in intestinal microfold cells

GAO Xiuhua^{1,2,3}, LI Xiaofei⁴, LYU Wanwan^{1,2,3}, LI Ke^{1,2,3}, LI Zhenyu^{1,2,3}, QIN Xuemei^{1,2,3}

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Shanxi Key Laboratory of Active Constituents Research and Utilization of TCM, Taiyuan 030006, China

4. Shanxi Agricultural Products Quality and Safety Center, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To investigate the transport mechanism of *Astragalus polysaccharide-II* (APS-II) in microfold cells (M cells). **Methods** M cells model was constructed using Caco-2 and Raji cells. APS-II was labeled with fluorescence, and Toll-like receptor 4 (TLR4), TLR2, dendritic cell-associated C-type lectin-1 (Dectin-1) and complement component 5a receptor 1 (C5aR) inhibitors were added respectively, to explore the role of each receptor in the transport of APS-II. **Results** TLR4 and C5aR inhibitors significantly reduced the transport of APS-II, indicating that transport of APS-II may be related to TLR4 and C5aR receptors. In contrast, TLR2 and Dectin-1 inhibitors did not significantly affect transport of APS-II, suggesting that these receptors may not be involved in the transport of APS-II. **Conclusion** Transport mechanism of APS-II in M cells may depend on TLR4 and C5aR receptors, while TLR2 and Dectin-1 receptors may not be involved in this process.

Key words: microfold cells; *Astragalus polysaccharide-II*; fluorescence labeling; receptor-mediated; receptor inhibitors

收稿日期: 2024-08-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872962); 国家博士后科学基金资助项目 (2019M650851); 国家重点研发计划项目 (2019YFC1710); 山西省重点研发计划重点项目 (201603D311101); 山西省优秀人才科技创新项目 (201605D211030, 201705D211020); 山西省科技创新人才团队专项基金

作者简介: 高秀华, 硕士研究生, 研究方向为中药多糖活性与结构。E-mail: 202224303004@email.sxu.edu.cn

*通信作者: 李 科, 教授, 博士生导师, 从事中药质量控制和中药多糖研究。E-mail: like@sxu.edu.cn

多糖是一类具有广泛生物活性的天然大分子聚合物。由于多糖具有生物相容性好、免疫调节作用强等优点,使其在医药领域中得到了广泛关注^[1-2]。目前,口服是多糖首选的给药途径,因而研究其口服吸收机制对多糖的合理应用具有重要意义。

小肠是口服药物的主要吸收部位,其对免疫功能也起着重要作用^[3]。在回肠的佩耶氏斑中内存在 1 种称为微褶皱细胞的特殊运输细胞^[4],具有独特的结构,如口袋形状和薄细胞质层,使其能够有效地执行内吞和胞吐作用,从而运输生物大分子^[5]。研究表明,纳米颗粒、细菌和病毒可以通过微褶皱细胞的内吞作用转移到体内,表明微褶皱细胞转运可能是生物大分子药物口服吸收的主要机制^[6-9]。受体介导的微褶皱细胞内吞作用在肠道免疫防御中发挥关键作用,通过复杂的分子机制实现抗原识别、内吞、转运和呈递^[10]。例如,黄芪超支化异聚糖 RAP 可以被微褶皱细胞吸收和转运,该机制在人体内同样适用^[11];具有免疫调节活性的果胶多糖 VBCP1-4 通过网格蛋白介导的内吞作用可进入微褶皱细胞^[12]。

黄芪多糖(*Astragalus polysaccharides*, APS)是黄芪中含量较多的成分之一,具有较强的免疫活性^[13]。课题组前期通过超滤截留法将黄芪多糖分成 APS-I(相对分子质量 $>2\times 10^6$)和 APS-II(相对分子质量约 1×10^4),并通过体内免疫实验和体外免疫活性筛选实验证明了 APS-II 是其发挥免疫促进活性的主要成分^[14]。据此,本研究探究 APS-II 在微褶皱细胞上的吸收转运机制,为开发黄芪多糖类药物奠定基础,并为其他具有免疫活性的多糖类药物的开发和利用提供参考。

1 材料

1.1 细胞株

人结直肠腺癌 Caco-2 细胞(批号 CL-0050)、人 Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞(批号 CL-0189)均由普诺生命科技公司提供。

1.2 药品与试剂

仿野生黄芪(2020 年 5 月采集于山西浑源,经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根; MEM 培养基(批号 11995)、1640 培养基(批号 11875101)、DMEM 高糖培养基(批号 11995)、0.25%胰蛋白酶(含 1% EDTA,批号 T1300)、青链霉素混合液(批号 P1400)、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS,批号 L8880)均购

自北京索莱宝公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS,批号 11011-8611)、酪胺(批号 231101)、氰硼氢化钠(批号 220511)、FITC(批号 230916)、荧光素钠(批号 220805)均购自麦克林生化科技公司;Transwell 细胞培养室(批号 14312)购自兰杰柯科技公司;碱性磷酸酶试剂盒(批号 S0021S)购自碧云天生物技术公司;Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)受体抑制剂 Resatorvid(批号 HY-11109)、TLR2 受体抑制剂 C29(批号 HY-100461)、C 型凝集素-1(dendritic cell-associated C-type lectin-1, Dectin-1)受体抑制剂 Laminaran(批号 HY-119109)、补体成分 5a 受体(complement component 5a receptor 1, C5aR)抑制剂 PMX-53(批号 HY-106178)抑制剂购自美国 MedChemexpress 生物科技公司;TLR4 抗体(批号 GB11519)、TLR2 抗体(批号 GB11518)购自武汉赛维尔生物科技公司;Dectin-1 抗体(批号 AB311845)、C5aR 受体抗体(批号 AB252435)购自英国 Abcam 公司;cy3 标记的山羊抗兔二抗(批号 GB21303)购自购自武汉赛维尔生物科技公司。

1.3 仪器

SC-3610 型低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);UV-2450 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);F-7100FL 型荧光分光光度计(北京日立科学仪器有限公司);RI-201H 型示差检测器(日本昭和电工公司);P3700 型依利特液相色谱仪(大连依利特公司);Infinite 200 Pro 型酶标仪(瑞士 TECAN 公司);TSK gel G4000PWXL 型凝胶色谱柱(日本 TOSOH 公司);LC-16P 型岛津半制备高效液相色谱(日本岛津仪器有限公司);UM5800 ELSD 型蒸发光检测器(上海通微分析技术有限公司);LSM-880 型激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司)。

2 方法

2.1 APS-II 的制备

参考课题组前期方法^[15],采用水提醇沉方法,并用木瓜蛋白酶结合三氯乙酸法进行除蛋白,将沉淀冷冻干燥后得到 APS。将冷冻干燥后的 APS 配制成一定浓度的多糖溶液,采用分子截留量为 1×10^4 的超滤膜收集 APS-II,经浓缩、冷冻干燥后得 APS-II。

2.2 APS-II 的荧光标记及验证

2.2.1 APS-II-FITC 的构建 参考文献方法^[16-19],取 200 mg APS-II 溶于 20 mL 0.2 mol/L、pH 8.0 的磷酸盐缓冲液中,加入等质量的酪胺,室温下静置 1 d 后加入氰基硼氢化钠 100 mg,于 37 °C 水浴间

或振荡反应 96 h。反应完成后离心,在上清液中加入适量水,用 0.5 mol/L NaHCO_3 调节至 pH 8.5,加入 20 mg FITC,室温下避光反应过夜;加入无水乙醇至乙醇终体积分数为 80%,静置有大量沉淀析出后,离心,弃上清,沉淀加水复溶,再沉淀,重复此操作直至乙醇上清液透明;将得到的沉淀加蒸馏水复溶,用分子截留量 3 000 透析袋透析,冷冻干燥后得 APS-II-FITC。

2.2.2 紫外-可见光谱分析 将 APS-II、FITC、APS-II-FITC 样品制成 1 mg/mL 的溶液,使用紫外分光光度计在 300~700 nm 扫描,分析其紫外特性。

2.2.3 荧光光谱分析 将 APS-II、FITC、APS-II-FITC 样品制备成一定浓度的溶液,将激发波长和发射波长的狭缝宽度设置成 10 nm,并将激发波长设置成 490 nm。扫描样品溶液的荧光光谱,分析样品的差异性。

2.2.4 凝胶色谱法分析 将 APS-II-FITC 和 APS-II 样品制备成一定浓度的溶液,使用高效凝胶色谱法测定相对分子质量,研究其结构特性。

2.2.5 APS-II-FITC 对巨噬细胞增殖活力及吞噬活力的影响 参考文献方法^[20-21],将 RAW264.7 细胞制成 1×10^4 个/mL 的细胞悬液接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,培养 24 h 后,弃去培养基,将细胞分为对照(无血清的 DMEM 培养基)组、APS-II (5、25、50、100、250、500 $\mu\text{g/mL}$) 组、APS-II-FITC (5、25、50、100、250、500 $\mu\text{g/mL}$) 组和 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 组,每组设置 4 个复孔。除对照组外,各给药组加入 100 μL 含药培养基,孵育 24 h 后加入 10 μL CCK-8 溶液,将细胞置于培养箱再孵育 4 h 后,在 450 nm 处测吸光度 (A) 值。

将 RAW264.7 细胞制成 1×10^5 个/mL 的细胞悬液接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,培养 24 h 后,弃去培养基,将细胞分为对照(无血清的 DMEM 培养基)组、APS-II (5、25、50、100、250、500 $\mu\text{g/mL}$) 组、APS-II-FITC (5、25、50、100、250、500 $\mu\text{g/mL}$) 组和 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 组,每组设置 4 个复孔。除对照组外,各给药组加入 100 μL 含药培养基,孵育 24 h 后弃去培养基,用 PBS 洗涤细胞,并加入 100 μL 0.75 $\mu\text{g/mL}$ 中性红染料,于细胞培养箱内培养 2 h 后取出,PBS 洗涤细胞 2 次,加入细胞裂解液 200 μL 。于室温下静置 2 h 后,用酶标仪在 540 nm 处测定 A 值,计算吞噬指数。

$$\text{吞噬指数} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 细胞毒性实验

通过 CCK-8 法测定 APS-II-FITC 对 Caco-2 细胞及 Raji 细胞的毒性及各受体抑制剂对 Caco-2 细胞存活的影响。

2.3.1 APS-II-FITC 对 Caco-2 细胞的毒性实验 采用 CCK-8 法测定 APS-II-FITC 对 Caco-2 细胞活力的影响。将生长密度 80% 的 Caco-2 细胞,用胰酶消化后制成 2×10^4 个/mL 的单细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,置于细胞培养箱中培养,待细胞完全贴壁后,分别加入 APS-II 及 APS-II-FITC 溶液 (5、25、50、100、250、500 $\mu\text{g/mL}$) 10 μL ,无血清的 DMEM 培养基为对照组,孵育 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,置于细胞培养箱中继续孵育 4 h,采用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3.2 APS-II-FITC 对 Raji 细胞的毒性实验 将生长密度 80% 的 Raji 细胞 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 1 mL 新鲜培养基制成 1×10^4 个/mL 的单细胞悬液接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,分别加入 APS-II 及 APS-II-FITC 溶液 (5、25、50、100、250、500 $\mu\text{g/mL}$) 10 μL ,无血清的 DMEM 培养基为对照组,孵育 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,置于细胞培养箱中培养 4 h 后,通过酶标仪测定 450 nm 处的 A 值计算细胞存活率。

2.3.3 受体抑制剂对 Caco-2 细胞的毒性实验 采用 CCK-8 法测定受体抑制剂 Resatorvid、C29、Laminaran 和 PMX-53 对 Caco-2 细胞存活的影响。将生长密度 80% 的 Caco-2 细胞制成 2×10^4 个/mL 的单细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养至细胞完全贴壁后,分别加入质量浓度为 (50、100、200、500、1 000、1 500 $\mu\text{g/mL}$) 的转运抑制剂溶液 10 μL ,无血清的 DMEM 培养基为对照组,孵育 6 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,置于细胞培养箱中培养 4 h,通过酶标仪测定 450 nm 处的 A 值,计算细胞存活率。

2.4 微褶皱细胞模型的建立及验证

参考文献方法^[22]构建微褶皱细胞模型,将 2×10^5 个/mL 的 Caco-2 细胞悬液接种于 Transwell 小室上层并置于 12 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,每隔 1 d 更换培养基,于第 3~5 天,翻转小室将硅管缠绕在小室的基底外侧,使硅管超过小室的高

度 1 cm。将倒置的小室与附着的硅管置于充满完全培养基的大培养皿中培养；于第 14~16 天，在硅管中加入 2.5×10^5 个/mL 的 Raji 细胞悬液，共培养 5 d，将 Caco-2 细胞的倒置单培养物设置为对照。通过碱性磷酸酶试剂盒检测碱性磷酸酶活性，以测试微褶皱细胞是否分化。在透射电镜下观察微褶皱细胞形态，并在顶端侧加入 $10 \mu\text{g/mL}$ 荧光素钠，并计算其浓度及表观渗透系数（apparent permeability, P_{app} ）。

P_{app} = 荧光素钠累计转运量 / (转运时间 $\times$ Transwell 小室的底面积 $\times$ 荧光素钠初始浓度)

2.5 微褶皱细胞上 APS-II 的受体蛋白探究

将小室上下 2 层液体弃去，在顶端侧分别加入 $400 \mu\text{L}$ 含受体抑制剂的 HBSS 缓冲液（通过预实验筛选抑制剂浓度为 $5.0 \mu\text{mol/mL}$ ），基底侧加入 $1\ 000 \mu\text{L}$ HBSS 缓冲液，分别置于细胞培养箱中，恒温培养 30 min，加入 HBSS 缓冲液为空白组。待孵育完成后，除去受体抑制剂或 HBSS 缓冲液并向顶端侧加入 $400 \mu\text{L}$ 含 $500 \mu\text{g/mL}$ APS-II-FITC 的 HBSS 缓冲液，基底侧加入 $1\ 000 \mu\text{L}$ HBSS 缓冲液，于培养箱中孵育 2 h 后，收集基底转运介质进行荧光测量，每组设置 3 个复孔，于荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 高效凝胶色谱法测量转运后 APS-II-FITC 的相对分子质量

收集转运后的 APS-II-FITC，采用蒸发光检测器

测量其不同时间段的相对分子质量，并与转运前的相对分子质量相比较。

2.7 统计学分析

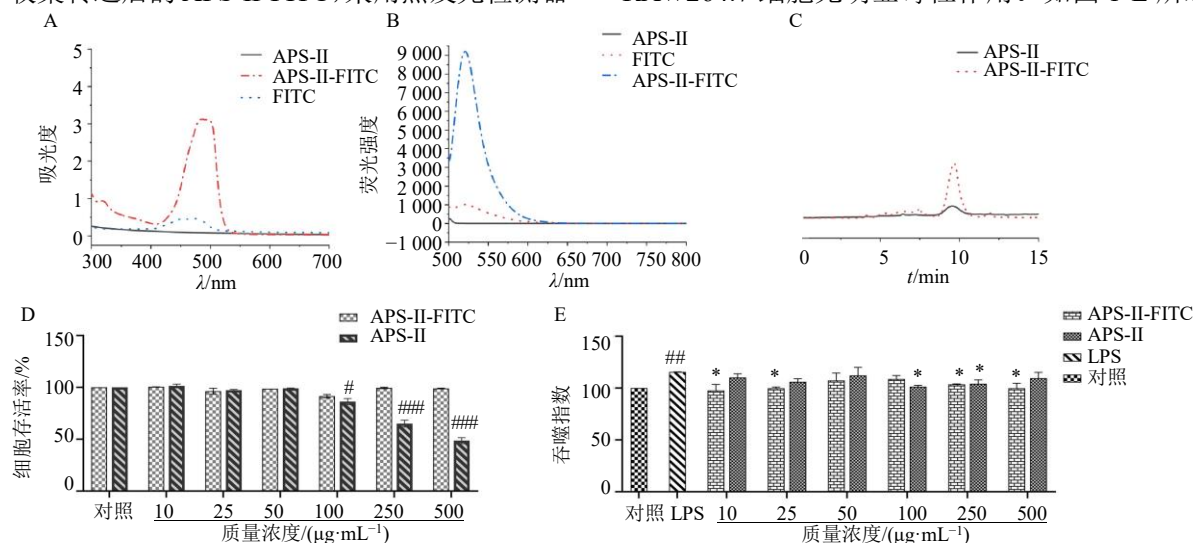
所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 GraphPad Prism 9 软件进行数据分析，各组之间的显著性采用单因素方差分析（ANOVA）。

3 结果

3.1 APS-II 的荧光标记及验证

如图 1-A 所示，APS-II 在 $300 \sim 700 \text{ nm}$ 无紫外吸收，APS-II-FITC 在 485 nm 处的特征峰接近 FITC 在 490 nm 处的特征峰，说明 APS-II 被 FITC 成功标记。如图 1-B 所示，FITC 的最大激发波长在 490 nm ，最大的发射波长在 518 nm 左右，未标记的 APS-II 没有表现出发射波长，表明没有荧光，而 APS-II-FITC 在 518 nm 左右与 FITC 有相同的发射波长，表明 FITC 已经被标记在 APS-II 上。如图 1-C 所示，APS-II-FITC 的保留时间在 9.59 min ，APS-II 的保留时间在 9.57 min ，色谱峰基本相同，表明标记后的 APS-II 结构未发生实质性的变化，说明标记 FITC 之后不会改变 APS-II 的结构。

RAW264.7 细胞是参与机体免疫的主要细胞之一，而 APS-II 具有免疫活性。如图 1-D 所示，不同浓度的 APS-II-FITC 培养 24 h 后的细胞存活率均在 90% 以上，说明 APS-II-FITC 在 $10 \sim 500 \mu\text{g/mL}$ 对 RAW264.7 细胞无明显毒性作用。如图 1-E 所示，



A-紫外扫描光谱；B-荧光扫描光谱；C-HPGC 测定相对分子质量结果；D-APS-II-FITC 对 RAW264.7 细胞增殖活性的影响；E-APS-II-FITC 对 RAW264.7 巨噬细胞吞噬活性的影响；与对照组比较： $^*P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ $^{###}P < 0.001$ ，与 LPS 组比较： $^*P < 0.05$ ，下同。

A-UV scanning spectrum; B-fluorescence spectrum scanning; C-determination of relative molecular mass by HPGC; D-effect of APS-II-FITC on the proliferation activity of RAW264.7 cells; E- effect of APS-II-FITC on phagocytic activity of RAW264.7 macrophages; $^*P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ $^{###}P < 0.001$ vs control group, $^*P < 0.05$ vs LPS group, same as below figures.

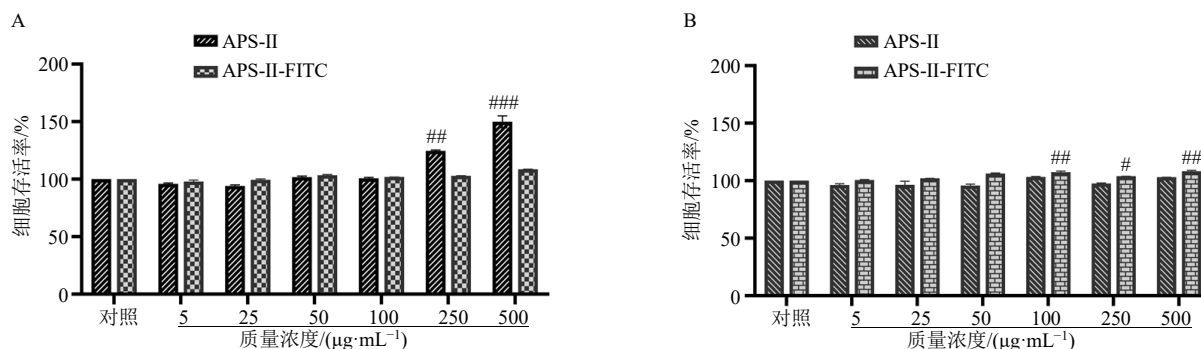
图 1 APS-II-FITC 的荧光标记和验证 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Fluorescence labeling and verification of APS-II-FITC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

与对照组比较, APS-II-FITC 在 10~500 $\mu\text{g/mL}$ 可以促进细胞吞噬 ($P<0.05$)。

3.2 细胞毒性实验

如图 2 所示, 5~500 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的 APS-II 与 APS-II-FITC 24 h 内细胞存活率均在 90% 以上。与对照组比较, 250~500 $\mu\text{g/mL}$ APS-II 显著升高 Caco-2 细胞存活率 ($P<0.01$ 、0.001); 100~500 $\mu\text{g/mL}$ APS-II-FITC 显著升高 Raji 细胞存活率 ($P<0.05$ 、0.01), 表明 APS-II 与 APS-II-FITC 无细胞毒性。

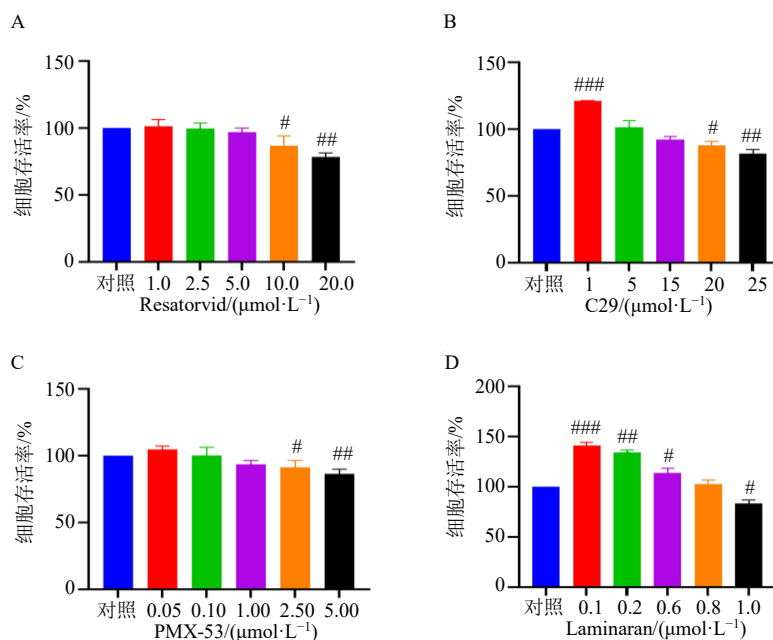


A-Caco-2 细胞毒性测试; B-Raji 细胞毒性测试。

A-Caco-2 cells toxicity test; B-Raji cells toxicity test.

图 2 APS-II-FITC 对 Caco-2 细胞和 Raji 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of APS-II-FITC on viability of Caco-2 and Raji cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

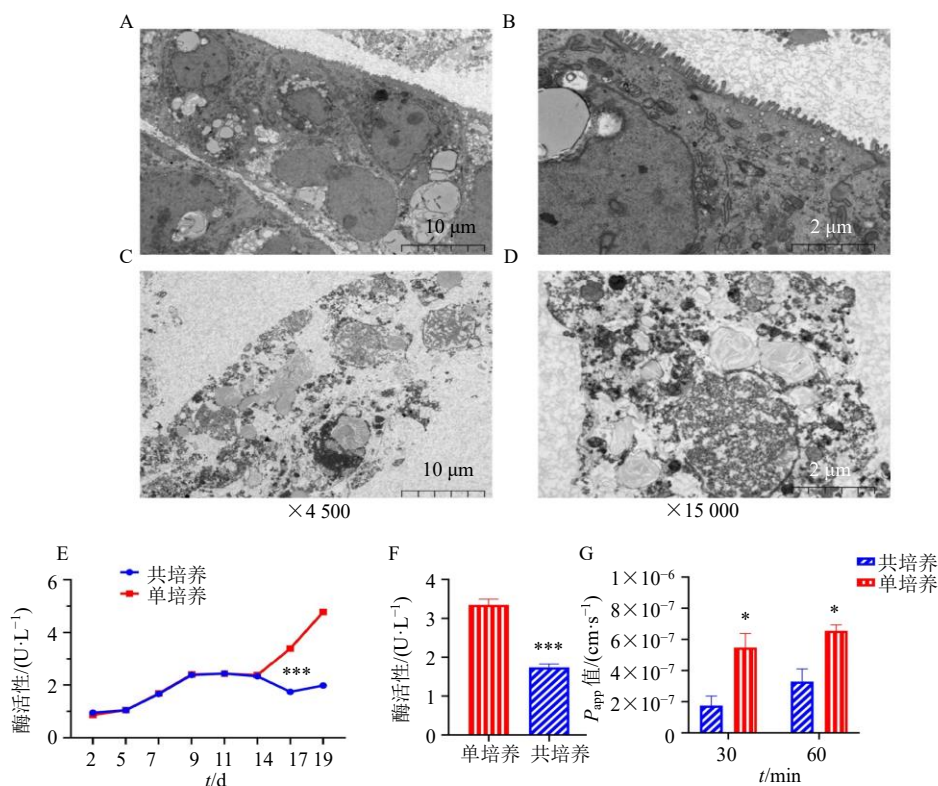


A-TLR4 受体抑制剂 (Resatorvid) 的细胞毒性; B-TLR2 受体抑制剂 (C29) 的细胞毒性; C-C5aR 受体抑制剂 (PMX-53) 的细胞毒性; D-Dectin-1 受体抑制剂 (Laminaran) 的细胞毒性。

A-TLR4 receptor inhibitor (Resatorvid) cytotoxicity; B-TLR2 receptor inhibitor (C29) cytotoxicity; C-C5aR receptor inhibitor (PMX-53) cytotoxicity; D-Dectin-1 receptor inhibitor (Laminaran) cytotoxicity.

图 3 受体抑制剂的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Receptor inhibitor cytotoxicity ($\bar{x} \pm s, n=3$)



A、B-单培养的透射电子显微镜图像；C、D-共培养的透射电子显微镜图像；E-不同时间的碱性磷酸酶测定；F-培养结束时 2 组之间碱性磷酸酶的比较；G-单培养和共培养对荧光素钠的运输；与单培养组比较：* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

A, B-transmission electron microscopy of monoculture; C, D-transmission electron microscopy of coculture; E-determination of alkaline phosphatase at different time; F-comparison of alkaline phosphatase between the two groups at the end of culture; G-transport of fluorescein sodium by monoculture and coculture; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs monoculture group.

图 4 微褶皱细胞模型的验证 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Verification of M cell model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

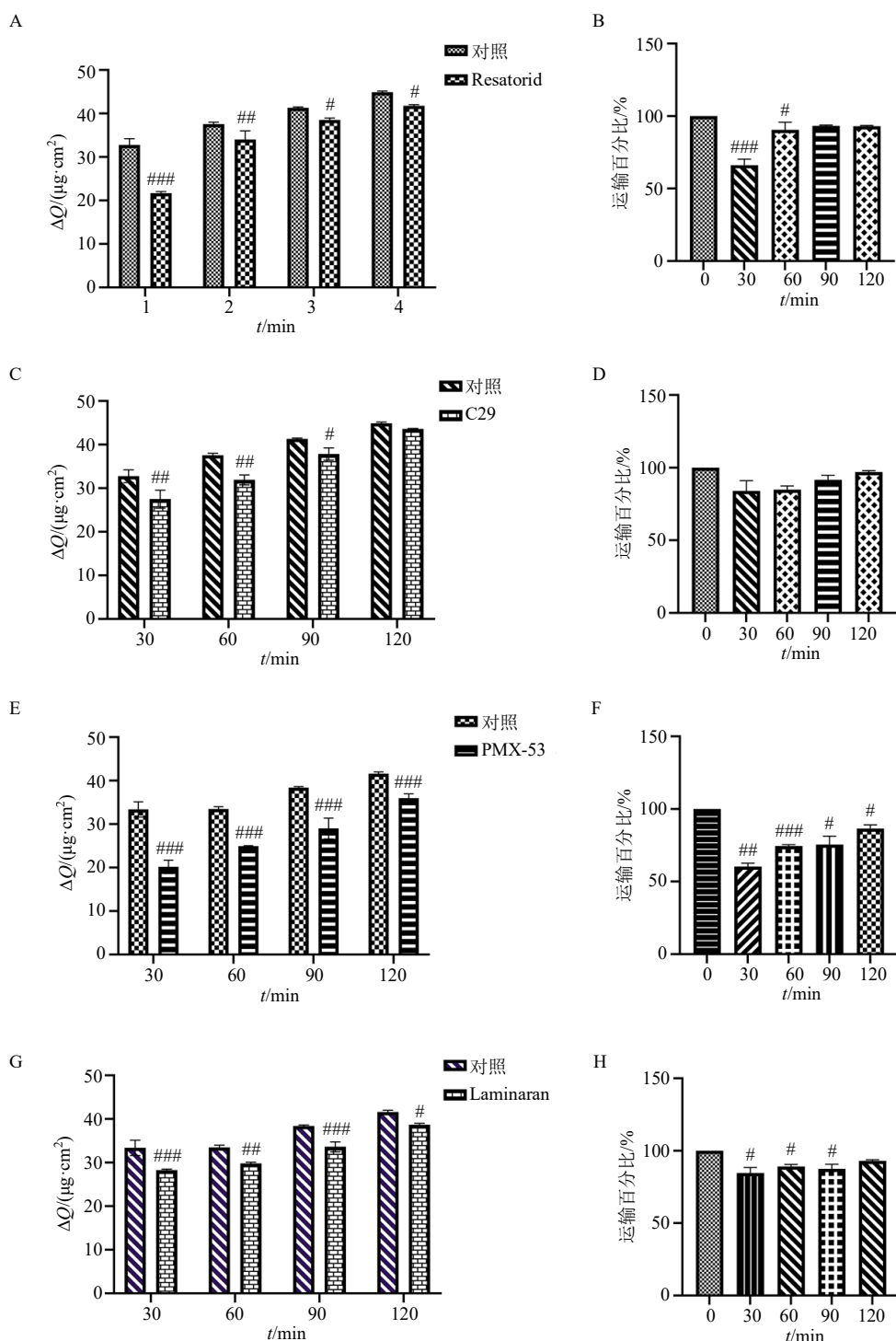
细胞间间隔较小；而共培养的 Caco-2 细胞可以看出细胞表面缺少微绒毛。

碱性磷酸酶的下调是微褶皱细胞分化的一个特征^[22]。因此通过测定细胞碱性磷酸酶活性可判断微褶皱细胞是否分化成功。经拟合碱性磷酸酶标准曲线为 $y = 0.0048x - 0.0378$, $R^2 = 0.9994$ 。如图 4-E 所示，与单培养组比较，Caco-2 细胞与 Raji 细胞共培养的第 14~17 天，其碱性磷酸酶显著活性下降 ($P < 0.001$)，而单培养的 Caco-2 细胞碱性磷酸酶活性呈上升趋势；如图 4-F 所示，与单培养组比较，共培养组 Caco-2 细胞中碱性磷酸酶活性的升高速率较为缓慢 ($P < 0.001$)，表明共培养有微褶皱细胞分化成功。如图 4-G 所示，与单培养组比较，共培养后的 Caco-2 细胞对荧光素钠的运输量显著上升 ($P < 0.05$)。

3.4 微褶皱细胞上 APS-II 的受体蛋白探究

3.4.1 转运抑制剂对 APS-II 转运量的影响 如图

5-A、B 所示，随着时间的推移，2 组微褶皱细胞中 APS-II 的累积转运量均呈上升趋势，与对照组比较，Resatorvid 处理后的 APS-II 在微褶皱细胞上的转运量显著减少 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)，且在 30 min 内其转运量下降到了 66.2%，表明 TLR4 受体被抑制后 APS-II 在微褶皱细胞上的转运显著降低，揭示了 APS-II 可能与 TLR4 受体结合进行转运。如图 5-C、D 所示，加入 C29 后，与对照组比较，APS-II 在微褶皱细胞上的转运量有明显减少 ($P < 0.05, 0.01$)，但其转运百分比在 30 min 内无显著降低，说明 TLR2 受体可能不是参与 APS-II 在微褶皱细胞上的转运主要受体。如图 5-E、F 所示，与对照组比较，加入 PMX-53 后，在 30 min 内其转运量下降到了 60.4%，即 C5aR 受体被抑制后 APS-II 在微褶皱细胞上的转运显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)，说明 APS-II 可以与 C5aR 受体结合进行转运。如图 5-G、



A-TLR4 受体抑制剂对 APS-II 运输的影响；B-加入 TLR4 受体抑制剂后运输的百分比；C-TLR2 受体抑制剂对 APS-II 运输的影响；D-加入 TLR2 受体抑制剂后运输的百分比；E-C5a 受体抑制剂对 APS-II 运输的影响；F-加入 C5a 受体抑制剂后运输的百分比；G: Dectin-1 受体抑制剂对 APS-II 运输的影响；H-加入 Dectin-1 受体抑制剂后运输的百分比。

A-effect of TLR4 receptor inhibitors on APS-II transport; B-percentage of transport after addition of TLR4 receptor inhibitors; C-effect of TLR2 receptor inhibitors on APS-II transport; D-percentage of transport after addition of TLR2 receptor inhibitors; E-effect of C5a receptor inhibitors on APS-II transport; F-percentage of transport after addition of C5a receptor inhibitors; G-effect of Dectin-1 receptor inhibitors on APS-II transport; H-percentage of transport after addition of Dectin-1 receptor inhibitors.

图 5 受体抑制剂对 APS-II 运输的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of receptor inhibitors on APS-II transport ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

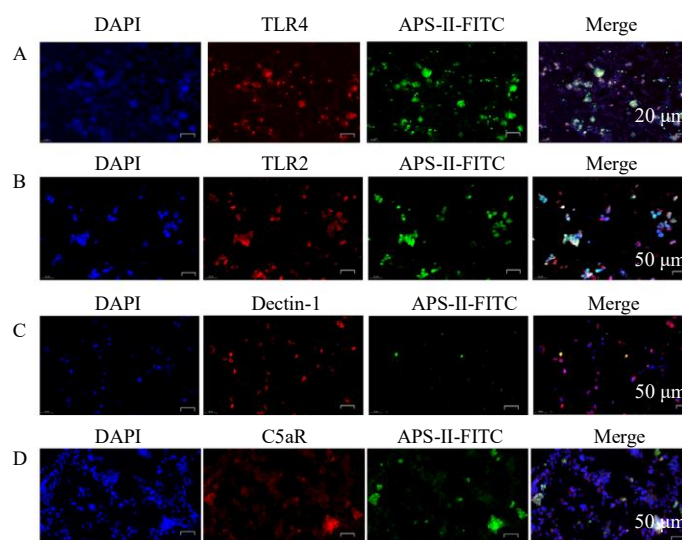
H 所示, 加入 Laminaram 后, APS-II 的转运量减少 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 即 Dectinn-1 受体被抑制后 APS-II 在微褶皱细胞上的转运量无较明显变化, 其转运百分比在 30 min 时显著降低 ($P<0.05$), 但其与 Resatorvid 及 PMX-53 处理后相比, 转运百分比下降幅度较小, 说明 Dectin-1 受体可能不是参与 APS-II 的转运主要受体。

3.4.2 激光共聚焦显微镜观察受体 如图 6-A 所示, 大部分 APS-II-FITC 与 TLR4 共定位, 这说明 APS-II 可以通过与 TLR4 受体结合进行转运; 如图 6-B 所示, 少量的 APS-II-FITC 与 TLR2 共定位, 与上述受体抑制剂的结果相符合, 说明不同的受体需要识别不同的结构。课题组前期研究

表明^[23], APS-II 的主要连接方式为 1→4 和 1→6 连接, 且有研究表明 α -(1→4) 连接的葡聚糖活性与 TLR4 信号传导有关。如图 6-C 所示, 仅存在少量的 APS-II-FITC 与 Dectin-1 受体共定位, 说明 Dectin-1 可能不参与 APS-II 的转运, 这与上述结果相一致; 如图 6-D 所示, APS-II-FITC 与 C5aR 共定位, 说明 APS-II 可以通过与 C5aR 受体结合进行转运。

3.5 高效凝胶色谱法测量转运后 APS-II-FITC 的相对分子质量

如图 7 所示, 转运前 APS-II-FITC 的保留时间在 11.858 min, 转运 30 min 后其保留时间在 11.848 min, 转运 60 min 后保留时间在 11.895 min,



A-抗 TLR4 抗体染色微褶皱细胞的免疫荧光结果; B-抗 TLR2 抗体染色微褶皱细胞的免疫荧光结果; C-抗 Dectin-1 抗体染色微褶皱细胞的免疫荧光结果; D-抗 C5aR 抗体染色微褶皱细胞的免疫荧光结果。

A-immunofluorescence results of M cells stained with anti-TLR4; B-immunofluorescent results of M cells stained against TLR2; C-immunofluorescence results of M cells stained against Dectin-1; D-immunofluorescence results of M cells stained with anti-C5aR staining.

图 6 免疫荧光结果

Fig. 6 Immunofluorescence results

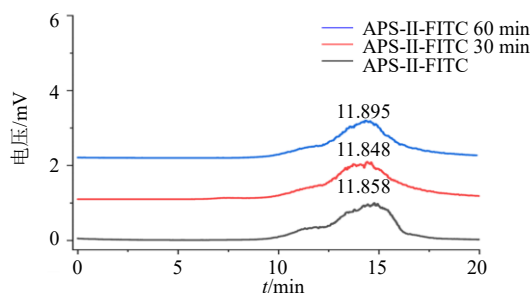


图 7 APS-II-FITC 运输前后的相对分子质量测定

Fig. 7 Molecular weight determination of APS-II-FITC before and after transport

转运前后 APS-II-FITC 的相对分子质量没有发生改变, 说明转运后的 APS-II-FITC 没有被细胞中的酶类降解。

4 讨论

微褶皱细胞在肠道对多糖的吸收和转运中发挥着重要作用。微褶皱细胞表面含有多种能够识别特定结构多糖的受体, 例如 C5aR、Dectin-1、TLR4、TLR2 等^[24-25], 这些受体可以识别特定结构的多糖并对其进行转运。课题组前期研究发现 APS-II 主要由 α -葡聚糖构成^[15], 其关键结构由通过 1→4 和 1→6

连接方式形成的主链,以及 2,6 位的分支结构组成,这可能是其发挥免疫促进作用的主要原因^[26]。

本研究通过受体抑制剂处理微褶皱细胞,发现经 TLR4 受体抑制剂 Resatorvid 处理后的微褶皱细胞对 APS-II 转运量明显下降,并通过免疫荧光图发现 APS-II、TLR4 与细胞共定位。有研究表明 TLR4 是 APS 的受体之一^[27-28],这说明 APS-II 可以通过 TLR4 受体结合进行转运,这一发现也与其他文献中 TLR4 受体参与多糖诱导的免疫反应一致^[29-30]。采用 C5aR 受体抑制剂 PMX-53 处理后,APS-II 的转运量显著降低,并通过免疫荧光图发现 APS-II、C5aR 与细胞共定位,说明 APS-II 可以通过与 C5aR 结合进行转运。这与 Jiang 等^[31]关于 C5aR 参与多糖发挥免疫作用的结果一致。研究发现,补体系统中的 C5aR 和 TLR 受体之间存在相互作用,这种相互作用可以通过协同或拮抗机制增强先天免疫反应或调节过度的炎症,表明 C5aR 和 TLR 受体在调控免疫反应中可以相互协调^[32],进而影响 APS-II 的转运和免疫调节作用。相比之下,Dectin-1 受体和 TLR2 受体则对 APS-II 转运量的影响不明显。这可能是因为 Dectin-1 主要识别 β -葡聚糖^[33],TLR2 识别主要识别多糖中的葡萄糖和甘露糖部分^[34],而 APS-II 主要由 α -葡聚糖构成^[15]。

综上,TLR4 和 C5aR 受体介导 APS-II 在微褶皱细胞上的转运,APS-II 通过 TLR4 和 C5aR 受体介导的内吞作用进入微褶皱细胞,激活肠道免疫系统,从而发挥免疫调节作用。在后续的研究中,课题组将通过动物实验来探究 APS-II 在体内的分布代谢情况,根据 APS-II 的药动学,研究 APS-II 对淋巴系统的影响。深入了解 APS-II 在淋巴系统的转运机制,为后续黄芪多糖类药物新剂型的开发提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang X J, Lin L Z, Li H, *et al.* Update on new trend and progress of the mechanism of polysaccharides in the intervention of Alzheimer's disease, based on the new understanding of relevant theories: A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 218: 720-738.
- [2] Yang Z Z, Wang H Y, Liu N, *et al.* Algal polysaccharides and derivatives as potential therapeutics for obesity and related metabolic diseases [J]. *Food Funct*, 2022, 13(22): 11387-11409.
- [3] Dahan A, González-Álvarez I. Regional intestinal drug absorption: Biopharmaceutics and drug formulation [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(2): 272.
- [4] Kobayashi N, Takahashi D, Takano S, *et al.* The roles of peyer's patches and microfold cells in the gut immune system: Relevance to autoimmune diseases [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2345.
- [5] He Y M, Huang Y H, Xu H H, *et al.* Aptamer-modified M cell targeting liposomes for oral delivery of macromolecules [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2023, 222: 113109.
- [6] Jia Z Y, Wignall A, Prestidge C, *et al.* An *ex vivo* investigation of the intestinal uptake and translocation of nanoparticles targeted to Peyer's patches microfold cells [J]. *Int J Pharm*, 2021, 594: 120167.
- [7] Nakamura Y, Mimuro H, Kunisawa J, *et al.* Microfold cell-dependent antigen transport alleviates infectious colitis by inducing antigen-specific cellular immunity [J]. *Mucosal Immunol*, 2020, 13(4): 679-690.
- [8] Lai N Y, Musser M A, Pinho-Ribeiro F A, *et al.* Gut-innervating nociceptor neurons regulate peyer's patch microfold cells and SFB levels to mediate Salmonella host defense [J]. *Cell*, 2020, 180(1): 33-49.
- [9] Pais Soares E F, Fernandes Borges O M. Oral vaccination through peyer's patches: Update on particle uptake [J]. *Curr Drug Deliv*, 2018, 15(3): 321-330.
- [10] Khan I, Steeg P S. Endocytosis: A pivotal pathway for regulating metastasis [J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(1): 66-75.
- [11] Zhang Q W, Hao S, Li L F, *et al.* M cells of mouse and human Peyer's patches mediate the lymphatic absorption of an Astragalus hyperbranched heteroglycan [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 296: 119952.
- [12] Zhao Y, Li P, Wang X S, *et al.* A novel pectin polysaccharide from vinegar-baked *Radix Bupleuri* absorbed by microfold cells in the form of nanoparticles [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 266(Pt 1): 131096.
- [13] 王成志, 刘一帆, 张晓青, 等. 黄芪多糖调控免疫细胞抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(8): 122-127.
- [14] Li K, Cui L J, Cao Y X, *et al.* UHPLC Q-exactive MS-based serum metabolomics to explore the effect mechanisms of immunological activity of Astragalus polysaccharides with different molecular weights [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 595692.
- [15] Li K, Cao Y X, Jiao S M, *et al.* Structural characterization and immune activity screening of polysaccharides with different molecular weights from *Astragali Radix* [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 582091.
- [16] Anastuyuk S D, Imbs T I, Shevchenko N M, *et al.* ESIMS analysis of fucoidan preparations from *Costaria costata*, extracted from alga at different life-stages [J]. *Carbohydr*

- Polym*, 2012, 90(2): 993-1002.
- [17] Liu Y, Xiao M, Zhao J, *et al.* Fluorescent labeling affected the structural/conformational properties of Arabinoxylans [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 265: 118064.
 - [18] Bi J L, Zhao C J, Jin W F, *et al.* Study on pharmacokinetics and tissue distribution of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide in rats by fluorescence labeling [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 215: 541-549.
 - [19] Dong Y H, Chen C, Fu X, *et al.* Study on the pharmacokinetics of mulberry fruit polysaccharides through fluorescence labeling [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 186: 462-471.
 - [20] Sun S, Li K J, Xiao L, *et al.* Characterization of polysaccharide from *Helicteres angustifolia* L. and its immunomodulatory activities on macrophages RAW264.7 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 262-270.
 - [21] Li P Y, Jing Y S, Qiu X Y, *et al.* Structural characterization and immunomodulatory activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposita* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 265(Pt 1): 130734.
 - [22] Belouqui A, Brayden D J, Artursson P, *et al.* A human intestinal M-cell-like model for investigating particle, antigen and microorganism translocation [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(7): 1387-1399.
 - [23] 肖芊含, 王宇帆, 曹蔚. 中药多糖体内代谢和作用靶点及基于靶点的构效关系研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2023, 25(9): 2027-2036.
 - [24] Rochereau N, Drocourt D, Perouzel E, *et al.* Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells [J]. *PLoS Biol*, 2013, 11(9): e1001658.
 - [25] Tyrer P, Foxwell A R, Cripps A W, *et al.* Microbial pattern recognition receptors mediate M-cell uptake of a gram-negative bacterium [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(1): 625-631.
 - [26] Li K, Li X Q, Li G X, *et al.* Relationship between the structure and immune activity of components from the active polysaccharides APS-II of *Astragali Radix* by enzymolysis of endo α -1,4-glucanase [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 839635.
 - [27] Du Y, Wan H T, Huang P, *et al.* A critical review of *Astragalus* polysaccharides: From therapeutic mechanisms to pharmaceuticals [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 147: 112654.
 - [28] Zhao W X, Duan C C, Liu Y L, *et al.* Modulating effects of *Astragalus* polysaccharide on immune disorders via gut microbiota and the TLR4/NF- κ B pathway in rats with syndrome of dampness stagnancy due to spleen deficiency [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2023, 24(7): 650-662.
 - [29] Pu Y W, Liu Z J, Zhong C, *et al.* Immunomodulatory effects of a polysaccharide from *Solanum nigrum* Linne through TLR4-MyD88 signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 88: 106973.
 - [30] Yu Y, Zhu H B, Shen M Y, *et al.* Sulfated *Cyclocarya paliurus* polysaccharides exert immunomodulatory potential on macrophages via Toll-like receptor 4 mediated MAPK/NF- κ B signaling pathways [J]. *Food Sci Hum Wellness*, 2024, 13(1): 115-123.
 - [31] Jiang L J, Yao F L, Zhang E S, *et al.* Combined treatment of xyloglucan derivative hydrogel and anti-C5a receptor antibody in preventing peritoneal adhesion [J]. *Acta Biomater*, 2022, 151: 163-173.
 - [32] Hajishengallis G, Lambris J D. Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system [J]. *Trends Immunol*, 2010, 31(4): 154-163.
 - [33] Wu X C, Zheng Z M, Guo T T, *et al.* Molecular dynamics simulation of lentinan and its interaction with the innate receptor dectin-1 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 171: 527-538.
 - [34] Jiang X L, Ma G F, Zhao B B, *et al.* Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Panax notoginseng* [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1190233.

[责任编辑 罗 曦]