

文蛤寡肽对RAW264.7细胞的免疫调节作用

叶 蕾^{1,2}, 阎 洁^{1,2}, 张 文^{1,2}, 邹舒舒¹, 叶盛旺^{1,2},
杨最素^{1,2*}, 余方苗^{1,2}, 丁国芳^{1,2}

(1. 浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江 舟山 316022;

2. 浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022)

摘要: 以RAW264.7细胞为实验模型, 探讨文蛤寡肽(MMO)在体外的免疫调节作用。实验设立空白对照组、阳性药物组(脂多糖, LPS)及低、中、高浓度MMO组, 采用MTT比色法检测细胞活性, 流式细胞仪检测细胞周期变化, H.E染色观察细胞形态变化, 中性红吞噬实验检测细胞吞噬能力, 免疫荧光标记法观察诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达情况, 硝酸根还原酶法和酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞培养上清液中一氧化氮、白介素-6(IL-6)和白介素-1 β (IL-1 β)的含量。结果显示, MMO能促进RAW264.7细胞的增殖和分化。当MMO浓度为250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 增强细胞吞噬能力、增加细胞周期中G1/G0期和G2/M期细胞、诱导iNOS刺激NO释放、促进IL-6和IL-1 β 分泌效果最为显著, 表现出与LPS对RAW264.7细胞相似的激活作用。研究表明, MMO具有促使RAW264.7细胞活化, 增强非特异性免疫的潜力。

关键词: 文蛤; 寡肽; RAW264.7细胞; 免疫调节

中图分类号: R 282.77; S 917.4

文献标志码: A

文蛤(*Meretrix meretrix*)广泛分布于中国的沿海地区, 因其肉质营养丰富, 富含多种人体所需的氨基酸以及多烯不饱和酸等物质, 成为备受关注的天然药物来源^[1]。研究表明, 文蛤提取物可应用于抗疲劳、降血糖的治疗, 尤其是在抗肝癌和护肝方面有显著的疗效^[2-5]。文蛤多糖具有双向免疫调节功能, 能提高免疫, 降低小鼠的脾脏重量、外周血白细胞数和巨噬细胞吞噬能力, 下调环磷酰胺所致的迟发型超敏反应^[6]。本实验室前期通过酶解方法提取的文蛤寡肽(*M. meretrix* oligopeptides, MMO), 作用于对经软脂酸诱导正常肝细胞建立的非酒精性脂肪肝细胞模型以及经CCl₄诱导的小鼠急性肝损伤具有明显的修复和保护作用^[7-8], 可开发成护肝的保健品。肝损伤时会导致免疫系统紊乱, 肝细胞发生炎症, 继而病变坏死是各类肝损伤形成的因素之

一。非酒精性脂肪肝患者体内免疫细胞分泌的促炎因子和抗炎因子不足对脂肪肝的形成会造成一定的影响^[8]。因此, 提高免疫力, 消除或预防肝脏内炎症反应的发生是保肝护肝的有效途径, 而MMO是否有免疫调节作用尚未见报道。本实验以文蛤中提取的MMO为原料, 将不同浓度的MMO作用于巨噬细胞RAW264.7细胞, 观察其在促进RAW264.7细胞增殖并发挥免疫调节过程中的作用, 从而为MMO进一步的开发和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验对象 本实验室前期将文蛤内脏酶解分离纯化获得分子量为674.6 u, 氨基酸序列为

收稿日期: 2018-04-03 修回日期: 2018-06-26

资助项目: 浙江省自然科学基金(LY15C200016, LQ16H300001); 舟山市级公益类科技项目(2015C31012)

通信作者: 杨最素, E-mail: yangzs87@163.com

Gln-Leu-Asn-Trp-Asp的文蛤寡肽^[7], 为排除提取物中其余物质产生的影响, 本实验尝试采用人工合成文蛤寡肽进行实验, 委托上海强耀生物科技有限公司合成, 纯度为97.76%; 小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7细胞购于中科院上海细胞库。

实验试剂 改良杜氏伊格尔培养液(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)(Gibco公司); 青霉素(华北制药股份有限公司); 链霉素(山东鲁抗医药股份有限公司); 胎牛血清(杭州天杭生物科技股份有限公司); 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)(德国AppliChem公司); 脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)(美国Sigma公司); 四甲基噻唑蓝(methyl thiazolyltetrazolium, MTT)(美国Sigma公司); 中性红试剂盒、FITC-结合山羊抗兔IgG(上海碧云天生物技术有限公司); H.E染液、NO试剂盒、IL-6试剂盒、Triton X-100、DAPI(南京建成生物工程研究所)。

1.2 仪器与设备

Forma 3111型CO₂培养箱(美国Therm公司); SpectraMax M2多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司); CX31RTSF型正置显微镜、CKX4型倒置显微镜(OLYMPUS公司); Easy Cyte6 HT-2L流式细胞仪(美国Millipor公司); THZ-C恒温振荡器、QL-901涡旋混和器(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.3 RAW264.7细胞培养

将RAW264.7细胞培养于含10%胎牛血清、100 U/mL链霉素和100 U/mL青霉素的DMEM培养基中, 在37 °C、5% CO₂培养箱中常规培养。当细胞铺满培养瓶的80%时传代, 取对数生长期的细胞用于实验。

1.4 MTT法检测细胞活性

将密度约为1×10⁴个/mL的RAW264.7细胞悬液接种至96孔板, 200 μL/孔。培养12 h后去除培养液, 设空白对照组和加药组A、B、C、D、E(MMO的浓度为4倍梯度稀释, 从小到大依次为2、10、50、250、1 250 μg/mL), 每个组设6个平行孔。24 h后弃上清液, 每孔加200 μL含10% MTT的PBS, 继续孵育4 h后移孔中液体, 每孔加150 μL的DMSO, 充分振荡10 min。于酶标仪490 nm处测定吸光度(A), 计算细胞增殖率。按

细胞增殖率确定后续的MMO低、中、高浓度。细胞增殖率公式:

$$\text{细胞增殖率} = \frac{(A_2 - A_1)}{A_1} \times 100\%$$

式中, A₁为空白对照组的吸光度; A₂为样品组的吸光度, 下同。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期

将细胞密度约为1×10⁵个/孔的RAW264.7细胞接种于培养瓶中, 常规培养12 h。设立空白对照组、LPS阳性组(LPS的浓度为1 μg/mL)和低、中、高加药组(MMO浓度分别为10、50、250 μg/mL), 200 μL/孔。继续培养24 h后, 参照细胞周期试剂盒的操作方法收集细胞。75%乙醇4 °C固定过夜。冷PBS洗涤后重悬细胞。离心管中加入20 μL的Rnase A溶液, 37 °C水浴30 min。细胞400目筛网过滤, 加400 μL的PI染液, 混匀后4 °C避光孵育30~60 min, 上流式细胞仪检测。

1.6 H.E染色观察细胞形态

将细胞密度约为1×10⁶个/孔的RAW264.7细胞接种于6孔板内的盖玻片上, 常规培养12 h后弃上清液。实验分组及药物处理同“流式细胞仪检测细胞周期”, 12 h后以95%乙醇固定20 min盖玻片细胞。PBS清洗后, 参照常规H.E染色的操作方法, 最后中性树胶封片, 光学显微镜下观察并拍照。

1.7 中性红法检测细胞吞噬能力

将RAW264.7细胞以约5.0×10⁵个/孔接种于96孔板培养5 h; 实验分组及药物处理同“流式细胞仪检测细胞周期”。培养12 h后, 按照中性红试剂盒的操作方法, 每孔加200 μL不含NaHCO₃的营养液和20 μL中性红染色液, 继续培养2 h弃去上清液, 每孔加入200 μL的中性红检测裂解液, 室温摇床上裂解10 min后在540 nm处检测吸光度, 计算中性红吞噬指数:

$$\text{中性红吞噬指数} = \frac{A_2}{A_1}$$

1.8 免疫荧光法观察细胞内iNOS表达情况

细胞接种、实验分组以及药物处理同“流式细胞仪检测细胞周期”。参考Lu等^[9]方法并稍作修改, 各组细胞用4%的多聚甲醛固定20 min后, 用0.2% Triton X-100治疗10 min, 5% BSA封闭1 h,

iNOS抗体稀释过夜。用FITC-结合山羊抗兔IgG室温下孵育1 h, DAPI溶解20 min, 于荧光显微镜下观察各组iNOS表达情况。

1.9 硝酸根还原法检测细胞释放NO能力

细胞接种、实验分组及药物处理同“流式细胞仪检测细胞周期”。参照NO试剂盒的操作方法, 于24 h后吸取各组的上清液, 加入检测试剂和显色液, 于550 nm波长下进行检测。

1.10 ELISA法检测细胞因子IL-1 β 、IL-6

细胞接种、实验分组以及药物处理同“流式细胞仪检测细胞周期”。参照IL-1 β 酶联免疫检测试剂盒操作, 于24 h后吸取各组上清液, 先后加入生物素抗原以及亲和素抗原, 在37 °C培养箱中孵育60 min, 最后加入显色剂、终止液, 于450 nm波长下进行测定, 根据浓度以及OD值用ELISA calc软件绘制出标准曲线的回归方程, 计算各组上清液中IL-1 β 含量。IL-6的检测方法同IL-1 β 。

1.11 数据处理

实验数据使用SPSS 19.0统计软件进行单因素分析和处理, 实验结果用mean \pm SD表示, $P < 0.05$ 表示数据具有显著性差异, $P < 0.01$ 表示数据具有极显著性差异。

2 结果

2.1 MTT法检测细胞活性结果

不同浓度的MMO对RAW264.7细胞作用24 h后, 除A组外, B、C、D、E组与空白对照组相比有极显著性差异($P < 0.01$)(图1)。结果显示, 低浓度的MMO对RAW264.7细胞增殖效果不明显, 当浓度达到10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上时, MMO对RAW264.7细胞有明显的促增殖作用, 在250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时RAW264.7细胞增殖率达到最大值, 呈剂量相关。综上所述, 选用细胞增殖率持续增加的MMO浓度范围进行后续实验, 确定低剂量为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、中剂量为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、高剂量为250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 各组RAW264.7细胞周期的变化

LPS和MMO各剂量组作用于RAW264.7细胞24 h后, 相对于空白对照组, 高剂量组和LPS组G₁/G₀期的细胞数占总细胞数的百分比增加(图2), S期占总细胞数的百分比减少, G₂/M期占细胞数

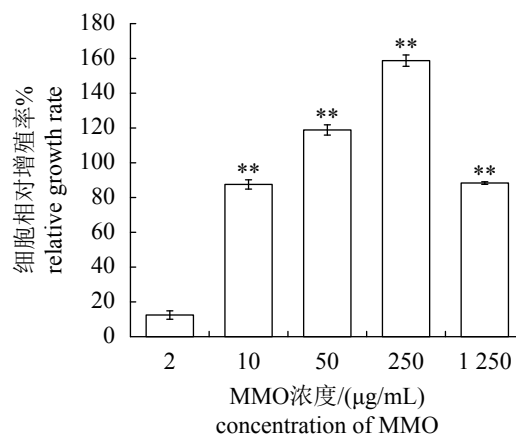


图1 不同浓度MMO对RAW264.7细胞增殖的影响

** 与空白对照组相比有极显著性差异($P < 0.01$), 下同

Fig. 1 Effects of different concentrations of MMO on the proliferation of RAW264.7 cells

** compared with control, it has highly significant difference ($P < 0.01$), the same below

的百分比增加, 且具有显著性差异($P < 0.05$)(表1)。

2.3 RAW264.7细胞形态的变化

各组RAW264.7细胞H.E染色后, 空白对照组细胞形态规则, 呈圆形, 周围无明显突起; 低剂量组细胞核内出现两个核仁, 少数细胞质内出现空泡; 中剂量组视野下细胞数明显增多, 部分细胞开始出现短小的伪足; 高剂量组中大部分细胞出现双核仁和较长的伪足; LPS组细胞双核仁和伪足明显(图3)。这些变化表明MMO能活化RAW264.7细胞, 特别是高剂量组的细胞形态更接近于LPS组, 呈明显分化状态。

2.4 RAW264.7细胞吞噬功能的变化

中性红法检测各组RAW264.7细胞吞噬功能的变化发现, 低剂量组和中剂量组的吞噬指数略高于空白对照组, 对增强RAW264.7细胞吞噬能力不明显(表2)。高剂量组促进细胞吞噬能力效果显著($P < 0.05$), 但弱于LPS组($P < 0.01$)。

2.5 RAW264.7细胞表达iNOS的变化

荧光显微镜观察各组RAW264.7细胞表达iNOS情况, 空白组细胞核间距较窄, 排列紧密, 视野下无绿色荧光。与空白对照组相比, 低剂量组细胞绿色荧光表达微弱, 中剂量组、高剂量组和LPS组细胞间核间距变大, 细胞内可见明显的绿色荧光, 且MMO药物组绿色荧光强度

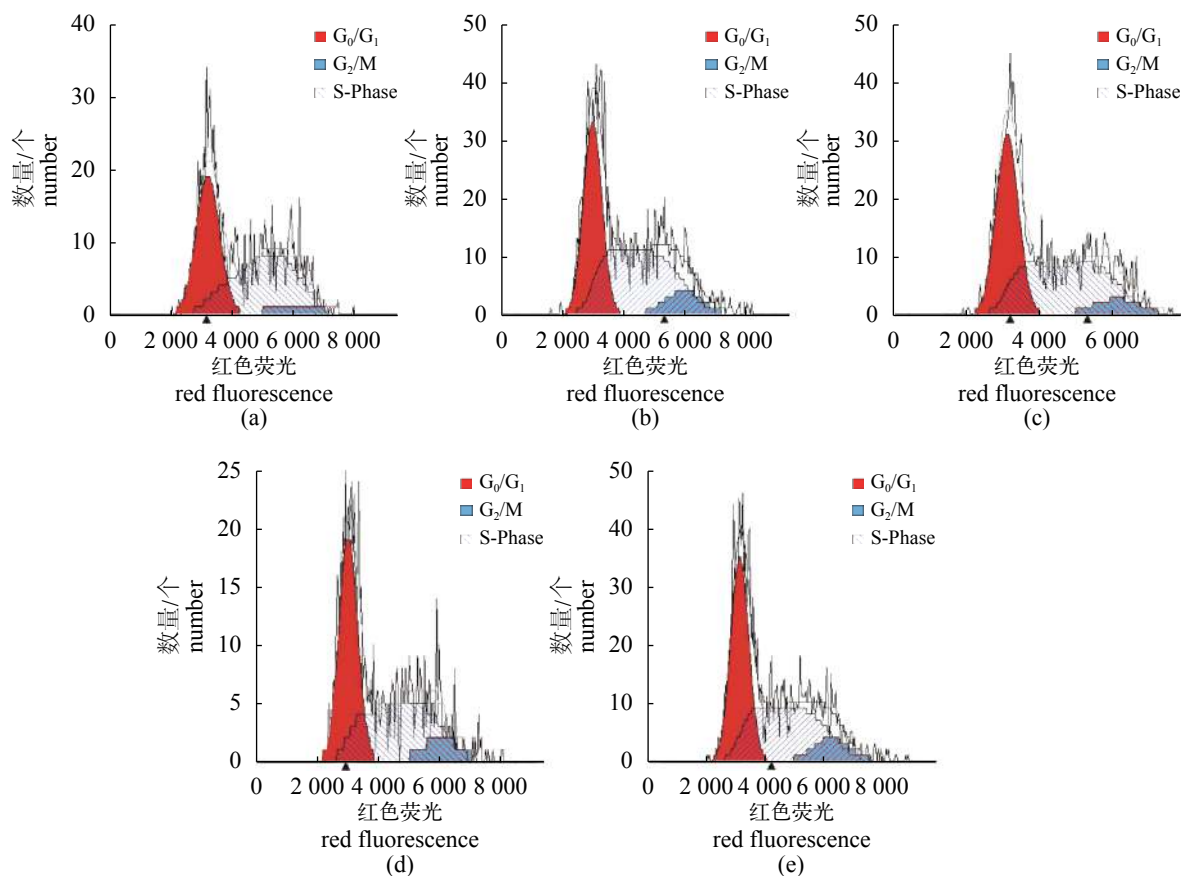


图 2 RAW264.7细胞周期的变化

(a)空白对照组; (b)低剂量组(MMO: 10 μg/mL); (c)中剂量组(MMO: 50 μg/mL); (d)高剂量组(MMO: 250 μg/mL); (e)LPS组(LPS: 1 μg/mL), 下同

Fig. 2 RAW264.7 cell cycle changes

(a) control; (b) low-dose group (MMO: 10 μg/mL); (c) middle-dose group (MMO: 50 μg/mL); (d) high-dose group (MMO: 250 μg/mL); (e) LPS group (LPS: 1 μg/mL), the same below

表 1 RAW264.7细胞周期各期结果(n=3)

Tab. 1 RAW264.7 cell cycle results

组别 groups	浓度/(μg/mL) concentration	G ₀ /G ₁ 期 G ₀ /G ₁ phase	S期 S phase	G ₂ /M期 G ₂ /M phase
空白对照组 control	0	43.28±0.20	50.75±0.33	5.97±0.37
低剂量组 low-dose group	10	39.52±0.15	51.01±0.28	9.47±0.26
中剂量组 middle-dose group	50	43.01±0.22	49.75±0.16	7.24±0.12
高剂量组 high-dose group	250	44.82±0.32	46.04±0.19*	9.14±0.18*
LPS组 LPS group	1	43.62±0.11	46.69±0.17*	9.7±0.22*

注: *. 与空白对照组相比有显著性差异($P<0.05$), 下同

Notes: *. compared with control, it has significant difference ($P<0.05$), the same below

随药物浓度增加而增强(图4)。

2.6 RAW264.7细胞分泌NO的变化

LPS和MMO作用RAW264.7细胞24 h后, NO释放量随MMO浓度的增加而增大, 呈剂量相关, 在250 μg/mL时有明显的促进作用, 但弱于

LPS组(图5), 其结果与中性红检测RAW264.7吞噬能力和免疫荧光标记法观察iNOS表达结果趋势一致。

2.7 RAW264.7细胞分泌IL-6、IL-1β的变化

MMO和LPS作用于RAW264.7细胞24 h后,

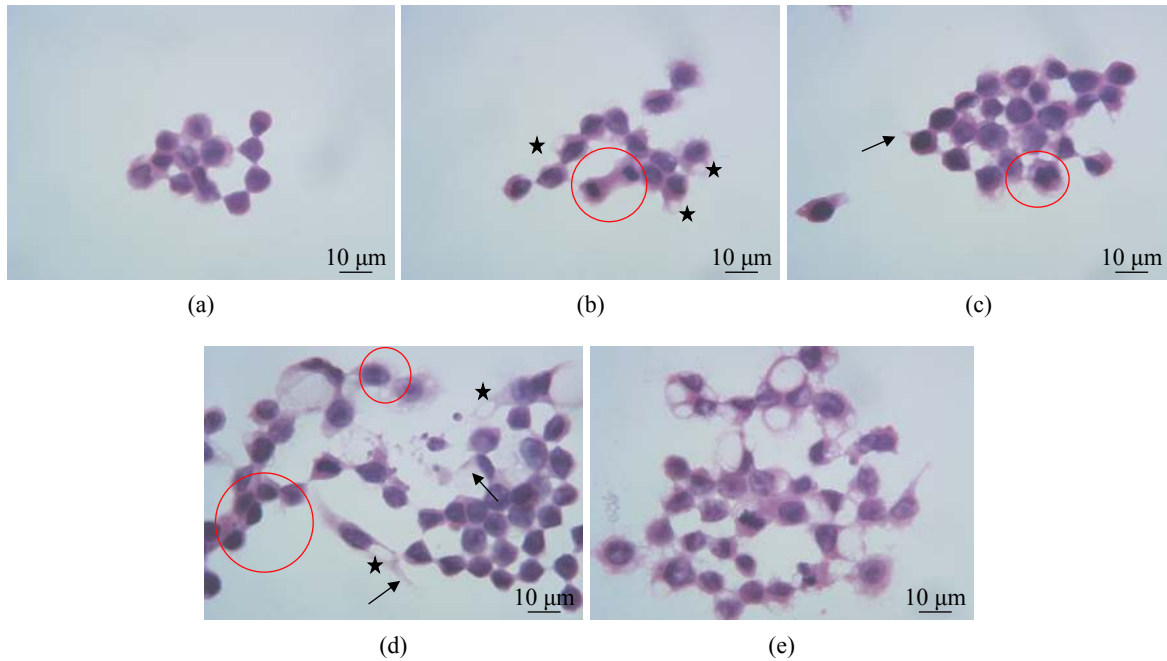


图3 RAW264.7细胞形态

圆圈标注. 双核仁; 箭头标注. 伪足; 五角星标注. 空泡

Fig. 3 The morphology of RAW264.7 cells (H.E, $\times 1\ 000$)

Circle. caryosome; arrows. pseudopod; star. vacuole

表2 RAW264.7细胞吞噬功能的变化(n=3)

Tab. 2 RAW264.7 cells changes of phagocytic function

组别 group	MMO($\mu\text{g}/\text{mL}$)				LPS($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	0	10	50	250	1
吞噬指数 phagocytic index	1	1.06 \pm 0.01	1.09 \pm 0.02	1.14 \pm 0.01*	1.23 \pm 0.02**

与空白组相比, MMO各剂量组均能增加IL-6和IL-1 β 含量, MMO为10和50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时增加效果不明显, 浓度为250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时促进效果显著($P < 0.05$) (图6)。结果显示, MMO具有增强RAW264.7细胞分泌IL-6和IL-1 β 的作用。

3 讨论

巨噬细胞是特异性免疫和非特异性免疫中重要的免疫细胞之一, 非活化状态下并无杀伤作用, 激活后以固定或游离的形式吞噬消化病原体, 释放多种细胞因子及NO等介质, 间接激活淋巴细胞和其他免疫细胞, 使机体对炎症做出反应。巨噬细胞在免疫调节评价实验中常作为模型细胞使用^[10], 同时激活后的巨噬细胞在治疗抗磷脂综合征、阿尔茨海默氏症、嗜中性粒细胞性呼吸窘迫综合征等疾病中也发挥着不可或

缺的作用^[11-14]。因此, 检测巨噬细胞的增殖能力、吞噬能力、释放NO及多种细胞因子的表达能力可作为评价巨噬细胞是否活化的重要指标。

本实验采用RAW264.7小鼠单核巨噬细胞模拟体内巨噬细胞参与免疫调节的过程, 应用MTT法检测细胞活性, 结果显示, 各浓度MMO对RAW264.7细胞无毒性, 且能不同程度地促进细胞生长和增殖作用。经H.E染色后观察发现, MMO作用于RAW264.7细胞后, 细胞数目明显增加, 且随着MMO浓度的增加, 大部分细胞出现双核仁并产生伪足, 从形态学上说明了MMO能促进RAW264.7细胞的增殖。细胞的增殖与细胞周期密切相关, 细胞周期是细胞生命活动的基本过程, 细胞通过建立系统的调控机制以确保细胞严格有序地交替和各时相依次有序变更, 它能反映细胞的增殖与凋亡^[15]。细胞周期的检查

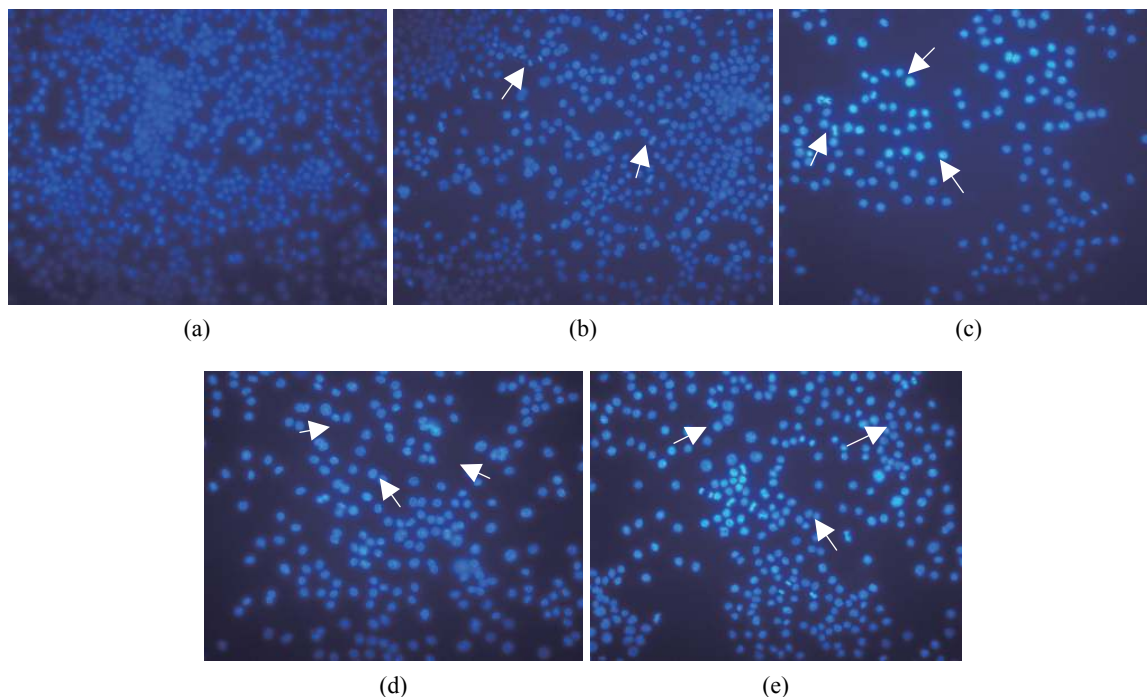


图 4 RAW264.7细胞表达iNOS的变化

箭头标注: 绿色荧光

Fig. 4 RAW264.7 cells expressing the changes in iNOS ($\times 400$)

Arrows: green fluorescence

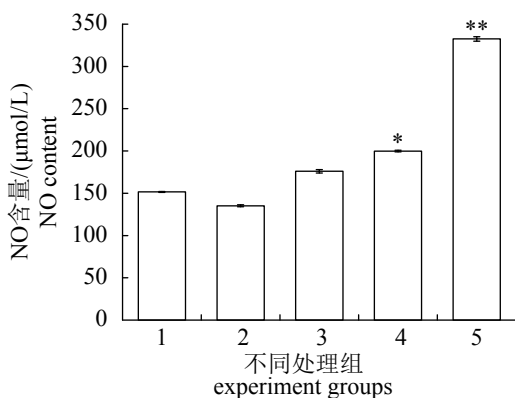


图 5 RAW264.7细胞释放NO能力的变化

Fig. 5 RAW264.7 cell releasing NO ability changes

1. control; 2. 10 $\mu\text{g/mL}$ MMO; 3. 50 $\mu\text{g/mL}$ MMO; 4. 250 $\mu\text{g/mL}$ MMO; 5. 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS; the same below

点在 G_1/G_0 期、S期及 G_2/M 期, 从各期细胞所占百分比的变化可反映细胞的增殖和分裂能力。通过流式细胞术检测细胞周期表明, 当MMO浓度为250 $\mu\text{g/mL}$ 时, G_1/G_0 期细胞增加, S期细胞减少, G_2/M 期细胞增加, 提示高浓度MMO可使RAW264.7通过S期限制点, 加速S期向 G_2/M 期和 G_2/M 期向 G_1/G_0 期的转化, 从而促进细胞周期循

环^[16]。其结果与LPS的诱导作用相似, 说明MMO对RAW264.7有活化作用。

当巨噬细胞遇到异物被激活时能产生阿米巴样运动, 具有向病原体移动的趋向性, 并伸出伪足包围病原体, 通过入胞作用时形成的吞噬体或吞饮小泡将异物带入细胞内, 然后由细胞产生的氮氧化物和氧化物杀灭, 经溶酶体融合后消化分解^[17], 此过程与NO、IL-6和IL-1 β 等细胞因子的产生相关。当机体受到病毒入侵时, iNOS能催化巨噬细胞中的L-精氨酸产生NO, 抑制病毒的繁殖^[18-19]。本研究结果表明, 当MMO的浓度为250 $\mu\text{g/mL}$ 时, RAW264.7细胞的吞噬指数、iNOS表达程度(绿色荧光强度)和细胞上清液中NO含量明显增加。这说明MMO能增强巨噬细胞吞噬能力, 增加iNOS的形成, 促使细胞分泌NO, 及时消灭病原体, 增强非特异性免疫。IL-6和IL-1 β 是巨噬细胞分泌的重要细胞因子, 共同参与免疫, 在特定的生物学特性上具有一致性^[20]。IL-1 β 可促进B细胞分化为浆细胞产生免疫球蛋白, 从体液免疫途径增强机体抵抗力^[21]。而IL-6参与P-STAT3信号通路的传导, 诱导抗凋亡基因*Bcl-2*和*Bcl-XL*的表达^[22-23], 是抑制Th1型免疫应

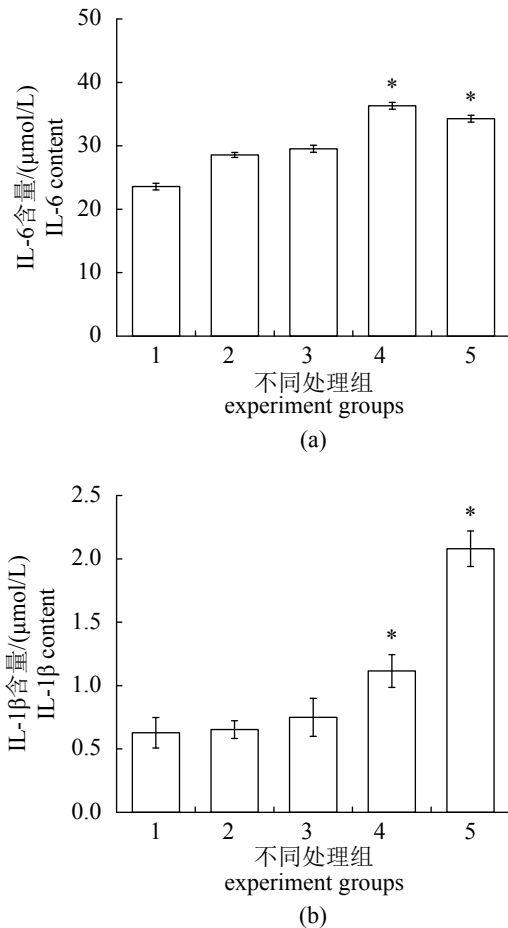


图6 RAW264.7细胞分泌IL-6(a)、IL-1β(b)的变化

Fig. 6 RAW264.7 cells secretion of IL-6(a) and IL-1β(b) changes

答和介导Th2型免疫应答的关键性细胞因子^[24]。本实验结果表明,MMO具有促进RAW264.7细胞分泌IL-1β和IL-6的作用,有增加巨噬细胞向免疫应答部位移动并间接刺激浆细胞产生免疫球蛋白的功能。当然MMO促进这些细胞因子的分泌可能存在着某种信号转导途径,有待将来的实验来证实。

4 结论

本实验结果显示,无论是从生化指标、形态学观察,还是对细胞上清液中NO、IL-6、IL-1β含量的检测,都表明MMO对RAW264.7细胞有免疫调节作用,证明MMO是一类具有免疫调节功能的活性肽,具有增强非特异性免疫的潜力。

参考文献:

[1] 康劲翻. 文蛤活性多肽生物学效应的研究[D]. 厦门: 厦

门大学, 2008: 26-27.

Kang J H. Biological function of peptide from *Meretrix meretrix* Linnaeus[D]. Xiamen: Xiamen University, 2008: 26-27(in Chinese).

[2] 祝素平. 文蛤提取液清除自由基对抗运动性疲劳的实验研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2010: 26-29.

Zhu S P. Clam extract to combat free radical scavenging experimental study of exercise-induced fatigue[D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2010: 26-29(in Chinese).

[3] 贺量. 文蛤活性多肽对肝癌细胞SMMC-7721效应的差异蛋白质组研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2007: 56.

He L. Proteomic analysis of cellular response to anti-peptide from *Meretrix meretrix* Linnaeus in hepatocarcinoma SMMC-7721 cell[D]. Xiamen: Xiamen University, 2007: 56(in Chinese).

[4] 严晓丹, 钱建瑛, 许泓瑜, 等. 文蛤不同极性提取物对糖尿病小鼠降血糖作用的研究[J]. 中国海洋药物, 2015, 34(5): 71-76.

Yan X D, Qian J Y, Xu H Y, *et al.* Hypoglycemic effect of different extracts from *Meretrix meretrix* in diabetic mice[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2015, 34(5): 71-76(in Chinese).

[5] Clee S M, Attle A D. The genetic landscape of type 2 diabetes in mice[J]. *Endocrine Reviews*, 2007, 28(1): 48-83.

[6] 何雅军, 吴谦, 朱瑞斐. 文蛤提取物对小鼠迟发型超敏反应的双向免疫调节作用[J]. 中国海洋药物, 1995, 14(3): 20-21.

He Y J, Wu Q, Zhu R F. Immunomodulating effects of the extract from clam *Meretrix meretrix* on delayed hypersensitivity in mice[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 1995, 14(3): 20-21(in Chinese).

[7] 赵莎莎, 赵玉勤, 张亚茹, 等. 文蛤多肽的制备及对非酒精性脂肪肝细胞模型的修复作用[J]. 中国食品学报, 2017, 17(6): 33-39.

Zhao S S, Zhao Y Q, Zhang Y R, *et al.* Preparation of NAFLD cell model repair polypeptide from *Meretrix meretrix*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(6): 33-39(in Chinese).

[8] 王佳佳, 赵莎莎, 杨最素, 等. 文蛤寡肽对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2017, 38(13): 190-195.

Wang J J, Zhao S S, Yang Z S, *et al.* Protective effect of *Meretrix meretrix* oligopeptides on acute liver injury in mice[J]. *Food Science*, 2017, 38(13): 190-195(in

- Chinese).
- [9] Lu Z Y, Xie D Y, Chen Y, *et al.* TLR2 mediates autophagy through ERK signaling pathway in *Mycoplasma gallisepticum*-infected RAW264.7 cells[J]. *Molecular Immunology*, 2017, 87: 161-170.
- [10] Lin H W, Liu C W, Yang D J, *et al.* *Dunaliella salina* alga extract inhibits the production of interleukin-6, nitric oxide, and reactive oxygen species by regulating nuclear factor- κ B/Janus kinase/signal transducer and activator of transcription in virus-infected RAW264.7 cells[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2017, 25(4): 908-918.
- [11] 张海博, 王宇. 非酒精性脂肪肝的现代研究进展[J]. *海南医学*, 2017, 28(10): 1651-1653.
Zhang H B, Wang Y. Research progress of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Hainan Medical Journal*, 2017, 28(10): 1651-1653(in Chinese).
- [12] Wolberg A S. Antiphospholipid antibody effects on monocytes[J]. *Current Rheumatology Reports*, 2007, 9(3): 198-204.
- [13] Casal J A, Robles A, Tutor J C. Serum markers of monocyte/macrophage activation in patients with Alzheimer's disease and other types of dementia[J]. *Clinical Biochemistry*, 2003, 36(7): 553-556.
- [14] Mokart D, Kipnis E, Guerre B P, *et al.* Monocyte deactivation in neutropenic acute respiratory distress syndrome patients treated with granulocyte colony-stimulating factor[J]. *Critical Care*, 2008, 12(1): R17.
- [15] 王海, 连燕娜, 高丽萍. 低聚葡萄籽原花青素联合顺铂对A549细胞增殖及细胞周期的影响[J]. *食品科学*, 2017, 38(7): 213-218.
Wang H, Lian Y N, Gao L P. Effect of oligomer grape seed proanthocyanidins combined with cisplatin on A549 cell proliferation and cell cycle[J]. *Food Science*, 2017, 38(7): 213-218(in Chinese).
- [16] 郑小香, 李萍, 潘晓丽, 等. 金线莲多糖对小鼠脾淋巴细胞体外增殖、细胞周期及分泌IL-2、IFN- γ 的影响[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(6): 47-52.
Zheng X X, Li P, Pan X L, *et al.* Effects of polysaccharide from *Anoectochilus formosanus* on murine splenic lymphocytes proliferation, cell cycle and cytokine secretion[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(6): 47-52(in Chinese).
- [17] 李雪, 王义乾, 罗海华, 等. NF- κ B信号通路对BLP耐受巨噬细胞iNOS表达的影响[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2014, 32(3): 300-305.
Li X, Wang Y Q, Luo H H, *et al.* The effect of NF- κ B signaling pathway on iNOS expression in BLP-tolerized macrophages[J]. *Chinese Journal of Clinical Anatomy*, 2014, 32(3): 300-305(in Chinese).
- [18] Li J W, Liu Y, Li B H, *et al.* A polysaccharide purified from *Radix Adenophorae* promotes cell activation and pro-inflammatory cytokine production in murine RAW264.7 macrophages[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2016, 14(5): 370-376.
- [19] Nemoto T, Shibata Y, Inoue S, *et al.* MafB enhances the phagocytic activity of RAW264.7 macrophages by promoting Fcgr3 expression[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 482(2): 375-381.
- [20] 林洁. 胃癌患者组织中IL-1 β 、IL-6表达水平与幽门螺杆菌感染的相关性分析[J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(1): 40-41, 44.
Lin J. Analysis on correlation between expression of IL-1 β and IL-6 in gastric cancer tissues with *Helicobacter pylori* infection in patients with gastric cancer[J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2017, 14(1): 40-41, 44(in Chinese).
- [21] Carlos A J, Tong L Q, Prieto G A, *et al.* IL-1 β impairs retrograde flow of BDNF signaling by attenuating endosome trafficking[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2017, 14: 29.
- [22] Atreya R, Neurath M F. Signaling molecules: The pathogenic role of the IL-6/STAT-3 trans signaling pathway in intestinal inflammation and in colonic cancer[J]. *Current Drug Targets*, 2008, 9(5): 369-374.
- [23] 翟涛, 宫鹏涛, 张西臣, 等. 新孢子虫感染小鼠巨噬细胞IFN- γ 、TNF- α 和IL-6分泌的变化[J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, 12(4): 350-352.
Qu T, Gong P T, Zhang X C, *et al.* Induction of changes in IFN- γ , TNF- α , and IL-6 secretion in mouse macrophages with *Neospora caninum*[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2017, 12(4): 350-352(in Chinese).
- [24] Hwang J H, Kim K J, Ryu S J, *et al.* Caffeine prevents LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 cells and zebrafish[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2016, 248: 1-7.

Immunomodulatory effects of *Meretrix meretrix* oligopeptides on RAW264.7 cells

YE Lei^{1,2}, YAN Jie^{1,2}, ZHANG Wen^{1,2}, ZOU Shushu¹, YE Shengwang^{1,2},
YANG Zuisu^{1,2*}, YU Fangmiao^{1,2}, DING Guofang^{1,2}

(1. School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Zhejiang Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products, Zhoushan 316022, China)

Abstract: This experiment discussed the immunomodulatory effect of MMO *in vitro*, which used *Meretrix meretrix* oligopeptides (MMO) as raw material and RAW264.7 cells as experimental models. The research set up control group, positive medicine group (lipopolysaccharides, LPS), low concentration MMO group, medium concentration MMO group, and high concentration MMO group. Cell activity was detected by methyl thiazolyltetrazolium (MTT) colorimetric method, cell cycle was detected by flow cytometry, and cell morphology change was observed by hematoxylin-eosin staining (H.E) and cell phagocytosis ability was detected by neutral red phagocytic experiment. And immunofluorescence labeling was used to observe the expression of iNOS in cells. The contents of nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) in cell supernatant were detected by nitrate reductase analysis and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that MMO group exhibited increased proliferation and differentiation of RAW264.7 cells. When the concentration of MMO was 250 $\mu\text{g/mL}$, it obviously enhanced the phagocytosis capacity, increased the G1/G0 phase and G2/M phase cells in the cell cycle, induced NO release of iNOS, and promoted the secretion effect of IL-6 and IL-1 β . All the phenomena were similar to LPS for RAW264.7 cells. Therefore, it is proved that MMO has the effect of promoting the activation of RAW264.7 cells and the potential of enhancing the non-specific immunity.

Key words: *Meretrix meretrix*; oligopeptides; RAW264.7 cells; immunomodulation

Corresponding author: YANG Zuisu. E-mail: yangzs87@163.com

Funding projects: Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LY15C200016, LQ16H300001); Zhoushan Municipal Public Welfare Science and Technology Projects (2015C31012)