



Пищевая добавка Active Hexose Correlated Compound (АНСС) оказывает прямое иммуномодулирующее действие на эпителиальные клетки кишечника и макрофаги, включая активацию TLR/MyD88 и NF- κ B/MAPK.

Abdelali Daddaoua ^a, Enrique Martínez-Plata ^b, Mercedes Ortega-González ^c, Borja Ocón ^d, Carlos J. Aranda ^c, Antonio Zarzuelo ^d, María D. Suárez ^c, Fermín Sánchez de Medina ^d, Olga Martínez-Augustin ^{c,†}

^a Department of Environmental Protection, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Profesor Albareda 1, E-18008 Granada, Spain ^b Pharmacy Department, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería, Spain

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology II, CIBERehd, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

^d Department of Pharmacology, CIBERehd, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

Информация о статье

История статьи:

Поступила в редакцию 29 мая 2012 г.

Принято в доработанном виде 31 июля 2012 г.

Принято 5 сентября 2012 г.

Доступно онлайн 23 сентября 2012 г.

Ключевые слова:

АНСС

Энтероциты

Макрофаг иммуномодулирующий

NF κ B

TLR4

Аннотация

Active Hexose Correlated Compound (АНСС) представляет собой иммуностимулирующую пищевую добавку. Эффекты и механизм действия АНСС на эпителиальные клетки или моноциты кишечника плохо описаны. АНСС добавляли к культуральной среде эпителиальных клеток кишечника (клетки IEC18 и HT29) и моноцитов (клетки THP-1) и оценивали секрецию провоспалительных цитокинов с помощью ELISA. Ингибиторы NF κ B и MAPK использовали для изучения путей передачи сигнала, в то время как TLR4 и MyD88 подавляли в клетках IEC18 с помощью shPHK. Было обнаружено, что АНСС индуцирует секрецию GRO α и MCP1 в IEC18 и IL-8 в клетках HT29. Эти эффекты зависели от активации NF κ B и частично от активации MAPK и от присутствия MyD88 и TLR4. В клетках THP-1 АНСС вызывала секрецию IL-8, IL-1 β и TNF- α . Индукция IL-8 зависела от активации JNK и NF κ B. Таким образом, АНСС оказывает иммуностимулирующее действие на эпителиальные клетки и моноциты кишечника с участием путей передачи сигналов TLR4/MyD88 и NF κ B/MAPK.

Сокращения: АНСС- коррелированное соединение с активной гексозой; ИФА- твердофазный иммуноферментный анализ; GRO α - онкоген а, регулируемый ростом; ИЛ- интерлейкин; IECs,- кишечные эпителиальные клетки; IRAK- киназа, ассоциированная с рецептором IL-1; ИФН-с - интерферон-с; ЛПС- липополисахарид; MAPK- митоген-активируемая протеинкиназа; MCP-1- моноцитарный хемотаксический белок-1; NF κ B — ядерный фактор κ B; TLR- Toll-подобный рецептор; TNF- α - фактор некроза опухоли- α ; TRAF6- фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли.

* Автор корреспонденции. Адрес: Кафедра биохимии и молекулярной биологии II, CIBERehd, Фармацевтическая школа, Campus de Cartuja s/n, 18071 Гранада, Испания. Тел.: +34 958 241305; факс: +34 958 248960.

Адрес электронной почты: omartine@ugr.es (О. Мартинес-Августин).

1. Введение

Active Hexose Correlated Compound (АНСС) представляет собой пищевую добавку, используемую в Японии и других азиатских странах, а также в США в качестве пищевой добавки для повышения иммунной функции (Matsushita et al., 1998; Yagita, Maruyama, Wakasugi, & Сукегава, 2002). Это смесь полисахаридов, аминокислот и липидов, обогащенная α -1,4-связанными глюканами (Kidd, 2000; Matsui et al., 2002; Matsushita et al., 1998), полученная из мицелия грибов-базидиомицетов: Шиитакэ (*Lentinus edodes*) и Шимеджи (*Lyophyllum shimeji*). АНСС был предметом многочисленных исследований *in vitro*, *in vivo* и клинических исследований за последние несколько десятилетий (Aviles, Belay, Vance, Sun, & Sonnenfeld, 2004; Daddaoua et al., 2007; Gao et al., 2006; Turner & Chaudhary, 2009; Ye, Wakame, Ichimura, & Matsuzaki, 2004; Yin, Fujii, & Walshe, 2010). Исследования на моделях мышей показали, что АНСС стимулирует иммунную систему, модулируя реакцию против патогенов и увеличивая выживаемость после инфекций у мышей (Ritz, 2008). Эти исследования включают различные инфекционные агенты, такие как грипп, синегнойная палочка или метициллин-резистентный золотистый стафилококк (Ritz, 2008). Противовоспалительное действие АНСС на кишечник, вероятно, зависящее от его пребиотического действия, также описано у крыс (Daddaoua et al., 2007). АНСС широко используется у пациентов с ослабленным иммунитетом, особенно у больных раком, для ускорения выздоровления после противоопухолевой терапии (Kidd, 2000; Matsui et al., 2002; Matsushita et al., 1998; Shah et al., 2011; Sumiyoshi). и др., 2010; Тернер и Чаудхари, 2009).

Недавние исследования показывают, что АНСС усиливает иммунный ответ с помощью нескольких механизмов, включая усиленную пролиферацию макрофагов и естественных клеток-киллеров (Matsushita et al., 1998; Nishioka, Akao, & Wakame, 2009; Ritz, Nogusa, Ackerman, & Gardner, 2006) и более высокая продукция различных цитокинов макрофагами и Т-лимфоцитами (интерферон- γ (ИФН- γ), интерлейкин (ИЛ)-8, ИЛ-1 β , фактор некроза опухоли (ФНО- α , ИЛ-2 и ИЛ-12) (Инь и др., 2010).

Считается, что иммунитет слизистой оболочки кишечника модулируется высвобождением цитокинов из эпителиальных клеток кишечника, но неясно, как на самом деле работает это взаимодействие, особенно в отношении влияния факторов просвета, включая питательные вещества и различные пищевые соединения. Более того, считается, что просветные бактерии играют ключевую роль в этом отношении, а микробиота явно влияет на экспрессию генов кишечных эпителиальных клеток (ИЕС). В ИЕСs ядерный фактор κ B (NF κ B) играет ключевую роль в поддержании целостности кишечного барьера,

поскольку его стимуляция важна для продукции дефензина (Voss et al., 2006). При активации различными стимулами NF κ B транскрипционно регулирует многие клеточные гены, участвующие в ранних воспалительных реакциях, включая цитокины, что указывает на возможную роль в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). Однако эта активация может быть также важна для эффективного сдерживания люминальных микроорганизмов и предотвращения бактериальной транслокации. Таким образом, иммунная система слизистых оболочек действует как палка о двух концах в интерфазе между просветом и внутренней средой.

Бактерии толстой кишки, вероятно, обрабатываются в слизистой оболочке кишечника в значительной степени с помощью механизмов врожденного иммунитета, которые включают лигирование бактериальными продуктами рецепторов, предназначенных для распознавания молекулярных паттернов, связанных с микробами. К ним относятся Toll-подобные рецепторы (TLR). Одним из TLR, получившим наибольшее внимание, является TLR4. *In vitro* стимуляция моноцитов липополисахаридом-агонистом TLR4 (LPS) вызывает значительное изменение экспрессии генов (Frost, Nystrom, & Lang, 2002; Nau et al., 2002; Shoham, Huang, Chen, Golenbock, & Levitz, 2001), включая продукцию хемокинов и цитокинов. После распознавания микробных лигандов передача сигналов TLR инициируется путем связывания аdataporной молекулы MyD88 с цитоплазматическим доменом рецептора Toll/интерлейкина-1 (IL-1R), присутствующим во всех TLR. Рекрутирование IL-1R-ассоциированных киназ (IRAK4, IRAK1 и фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли (TNF) (TRAF6)) приводит к активации митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK) и путей NF κ B (Akira & Takeda, 2004).

Влияние АНСС на эпителиальные клетки кишечника и моноциты/макрофаги изучено недостаточно. В некоторых сообщениях указывается на иммуностимулирующее действие на макрофаги, но молекулярный механизм этого действия не оценивался. Как эпителиальные клетки кишечника, так и моноциты/макрофаги участвуют в врожденном иммунном ответе кишечника. Изучение эффектов и механизма действия АНСС на эти типы клеток может способствовать его использованию в качестве пищевой добавки. Это исследование было направлено на определение влияния АНСС на активацию ИЕС (клетки ИЕС18 и HT29) и моноцитов (THP-1). Результаты показывают, что АНСС оказывает иммуностимулирующее действие *in vitro*, стимулируя секрецию цитокинов (регулируемого ростом онкогена α (GRO α), моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1), IL-1 β , IL-8 и TNF- α) у клетки, действующие не только на путь NF κ B, но и путем объединения нескольких путей воспалительного ответа.

2. Материалы и методы

2.1. Материалы

За исключением указанных культуральных сред и реагентов, приобретенных у Sigma (Барселона, Испания).

2.2. Культура клеток и лечение

В работе использовали следующие клеточные линии: эпителиальные клетки кишечника крысы IEC18 (ECACC 88011801), эпителиальные клетки кишечника человека HT-29 (ECACC 91072201) и моноцитарные клетки человека THP-1 (ECACC 88081201). Клетки культивировали в среде DMEM (25 mM глюкозы) и среде RPMI-1640 соответственно с добавлением термоинактивированной фетальной телячьей сыворотки (10% об./об.), 100 ME/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина, 2,5 мкг/мл амфотерицина и 2 mM глутамин.

2.3. Подготовка АНСС

АНСС был предоставлен Amino Up Chemical (Саппоро, Япония). Процесс производства АНСС был описан в другом месте (Miyata, Kitadate, Nishioka, & Wakame, 2010). Коммерческий АНСС был свежеприготовлен путем растворения исходного порошка в полной DMEM до конечной концентрации 5 мг/мл. После 10-минутной обработки ультразвуком для обеспечения полного растворения его пропускали через фильтры 0,22 мкм и сразу использовали.

2.4. Влияние АНСС на секрецию цитокинов

Секрецию цитокинов (GRO α и MCP-1 для клеток IEC18, IL-8 для клеток HT29 и IL-1b, TNF- α и IL-8 для клеток THP-1) измеряли в 24-часовом супернатанте клеток, обработанных АНСС (0,05, 0,5 и 5 мг/мл). В некоторых случаях перед лечением АНСС добавляли специфические ингибиторы метаболического пути (см. ниже). Цитокины количественно определяли с помощью ELISA (Biosource Europe, Nivelles, Бельгия и BD Biosciences, Erembodegem, Бельгия) в соответствии с протоколами, рекомендованными производителями.

2.5. Характеристика путей передачи сигнала с использованием ингибиторов NF κ B и MAPK

Клетки обрабатывали, как указано выше, с использованием концентрации 5 мг/мл АНСС после добавления специфических ингибиторов, включая Bay 11-7082 (I κ B-а фосфорилирование), PD98059 (ERK1/2 MAPK), SB203580 (p38 MAPK), SP600152 (JNK MAPK) и вортманнин (фосфатидилинозитол-3 киназа, PI3K). Эти ингибиторы внутриклеточной

сигнализации добавляли в культуру за 60 мин до добавления к клеткам 5 мг/мл АНСС. Все ингибиторы использовали в концентрации 10 мкМ, кроме вортманнина, который использовали в концентрации 1 мкМ.

2.6. Вестерн-блот

Для экспериментов Вестерн-блоттинг клетки IEC18, HT-29 и THP-1 культивировали с АНСС в течение различных периодов времени (0, 15, 30, 60, 90 мин, 3, 6 и 24 ч), затем клетки собирали и обрабатывали как описано. Вкратце, образцы гомогенизировали в лизирующем буфере (0,1% мас./об. SDS, 0,1% мас./об. дезоксихолата натрия, 1% об./об. Triton X-100 в PBS) со смесью ингибиторов протеаз 1:100 (об./об.). Затем гомогенаты обрабатывали ультразвуком и центрифугировали при 7000g в течение 5 мин при 4°C. Концентрацию белка определяли с помощью анализа на бисинхониновую кислоту (Smith et al., 1985). Образцы кипятили в течение 5 мин в буфере Лэммли, разделяли с помощью SDS-PAGE, электроблоттировали на активированные мембраны PVDF (Millipore, Мадрид, Испания) и зондировали соответствующими антителами. Полосы были обнаружены с помощью усиленной хемилюминесценции (PerkinElmer, Waltham, MA) и количественно оценены с помощью программного обеспечения NIH (Scion Image). Состав буфера Лэммли (5) был следующим: 312 nM SDS, 50 % об./об. глицерина, 1 % об./об. 2-меркаптоэтанола, 22,5 mM тринатриевой соли ЭДТА, 220 mM Трис и следы бромфенолового синего (pH = 6,8).). Используемые первичные антитела были получены от компании Cell Signaling (Данверс, Массачусетс), за исключением антитела JLA20 против α -актина, которое было получено из Банка гибридомных исследований развития, разработано под эгидой Национального института детского здоровья и развития человека и поддерживается Университет Айовы, факультет биологических наук.

2.7. Подавление экспрессии генов

В некоторых экспериментах клетки IEC18 предварительно обрабатывали кшРНК, специфичной для MyD88 и TLR4 (Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg) для нокдауна гена, следуя инструкциям производителя. Вкратце, клетки IEC18 высевали на шестилуночные планшеты и выращивали в течение 24 часов до 50% слияния. Перед инфицированием в среду IEC18 добавляли полибрен 5 мкг/мл и инкубировали клетки в течение 10 часов. Контроль, лентивирусные частицы MyD88 и TLR4 кшРНК также отдельно обрабатывали полибреном 5 мкг/мл в течение 30 мин, добавляли в культуральную среду и инкубировали в течение ночи.

На третий день свежую среду заменяли на среду, содержащую лентивирусные частицы, и клетки культивировали до слияния в течение 24 ч. Наконец, клетки IEC18 разделяли (1:5), снова культивировали в течение 24 часов и отбирали в диапазоне 5–10 мкг/мл дигидрохлорида пуромидина.

2.8. Статистический анализ

Все результаты выражены как среднее \pm SEM. Различия между средними значениями были проверены на статистическую значимость с помощью одностороннего дисперсионного анализа и апостериорного теста наименьшей значимости для предварительно выбранных пар. Все анализы проводились с помощью программы SigmaStat 3.5 (Systat, Сан-Хосе, Калифорния). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

3. Результаты

3.1. АНСС индуцирует секрецию цитокинов в IEC в зависимости от концентрации.

Влияние АНСС на IEC проверяли, исследуя продукцию GRO α и MCP-1 линией эпителиальных клеток толстой кишки крыс IEC18, выращенных в виде монослоев в стандартных условиях культивирования. АНСС добавляли в трех различных концентрациях (0,05, 0,5 и 5 мг/мл) и через 24 часа определяли уровни цитокинов. В обоих случаях АНСС оказывал значительный стимулирующий эффект (рис. 1А).

Затем было направлено подтверждение стимулирующего действия АНСС на IEC человека, а именно на клетки HT-29. Данные, представленные на фиг.1В, показывают, что IL-8 (считающийся человеческим ортологом GRO α грызунов) индуцировался в этих клетках зависимым от концентрации образом. Наблюдаемый эффект при 5 мг/мл был максимальным, и сила эффекта была аналогична наблюдаемой в клетках IEC18.

3.2. Вызванная АНСС секреция цитокинов в клетках IEC18 зависит от NF κ B, PI3K и p38 MAPK

Это было направлено на выявление путей передачи сигнала, участвующих в индукции цитокинов АНСС, с использованием фармакологического подхода. Как показано на рис. 2А, ингибитор NF κ B, Bay11-7082, полностью стирает секрецию GRO α и MCP-1 в клетках IEC18, обработанных АНСС, указывая на определяющую роль этого транскрипционного фактора. Кроме того, наблюдалось существенное ингибирующее действие блокатора PI3K вортманнина на GRO α (76%, $p < 0,05$), но не на MCP-1. Мы также рассмотрели пути MAPK (Fig. 2В). На значительное участие p38 MAPK указывает заметное подавление ответа АНСС, полученное с помощью

специфического ингибитора SB203580. Специфический ингибитор JNK SP600125 оказывал слабое, но значимое влияние на секрецию GRO α , но, по-видимому, полностью предотвращал высвобождение MCP-1. Не было значительных изменений при использовании PD98059, блокатора ERK1/2.

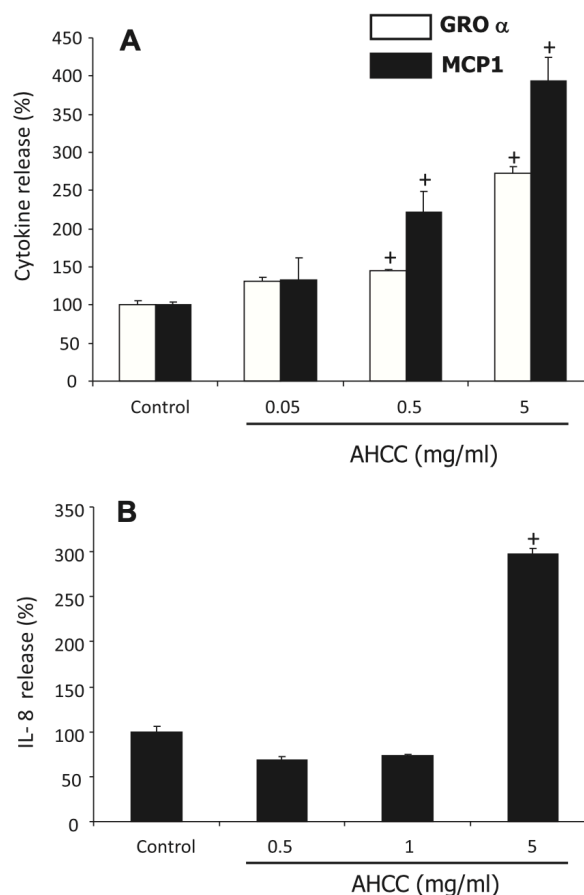


Рис. 1. Влияние АНСС на эпителиальные клетки кишечника. (А) Влияние на секрецию GRO α и MCP-1 клетками IEC18. (В) Влияние на секрецию IL-8 клетками HT-29. В культуральную среду добавляли различные концентрации АНСС и измеряли концентрацию цитокинов в культуральной среде с помощью ELISA после 24-часовой инкубации. Результаты выражены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для трех разных экспериментов ($n = 3$ в каждом эксперименте). $+p < 0,05$ по сравнению с контролем (С).

3.3. АНСС индуцирует секрецию цитокинов в клетках IEC18 через MyD88 и TLR4.

Чтобы проверить возможное участие MyD88 и TLR4 в эффектах АНСС в клетках IEC18, экспрессия соответствующего гена была нокаун со специфическими кшРНК, и секрецию цитокинов сравнивали с секрецией, полученной с контрольными клетками, обработанными кшРНК. Результаты показаны на рис. 3. ЛПС, использованный в качестве положительного контроля для MyD88/TLR4-зависимой секреции цитокинов, вызывал сильную реакцию в контрольных условиях, которая была значительно снижена при использовании любой из shРНК.

Результаты показаны на рис. 3. ЛПС, использованный в качестве положительного контроля для MyD88/TLR4-зависимой секреции цитокинов, вызывал сильную реакцию в контрольных условиях, которая была значительно снижена при использовании любой из shРНК. Нокдаун MyD88 приводил к 50% ингибированию как GRO α , так и секреции MCP-1 (рис. 3А). Однако сайленсинг TLR4 оказывает гораздо более сильное влияние на вызванное LPS высвобождение MCP-1, чем на GRO α (Fig. 3B). Эффект АНСС (5 мг/мл) на секрецию цитокинов был примерно вдвое меньше, чем эффект, полученный при 10 мкг/мл LPS, в соответствии с предыдущими экспериментами. Однако этот эффект почти полностью исчез, когда экспрессия MyD88 или TLR4 подавлялась.

3.4. АНСС индуцирует секрецию цитокинов в клетках THP-1 в зависимости от концентрации

Было протестировано действие АНСС в клетках THP-1, клеточной линии моноцитов человека, выращенных в суспензии в стандартных условиях. ИЛ-8 также повышался в этих клетках, но с большей эффективностью, чем в ИЭК, поскольку эффект был достаточно выражен при низких концентрациях 0,05 и 0,5 мг/мл (рис. 4А). IL-1 β и TNF- α также активировались АНСС с максимальной секрецией при 5 мг/мл (фиг. 4B и C).

A. Daddaoua et al. / Food Chemistry 136 (2013) 1288–1295

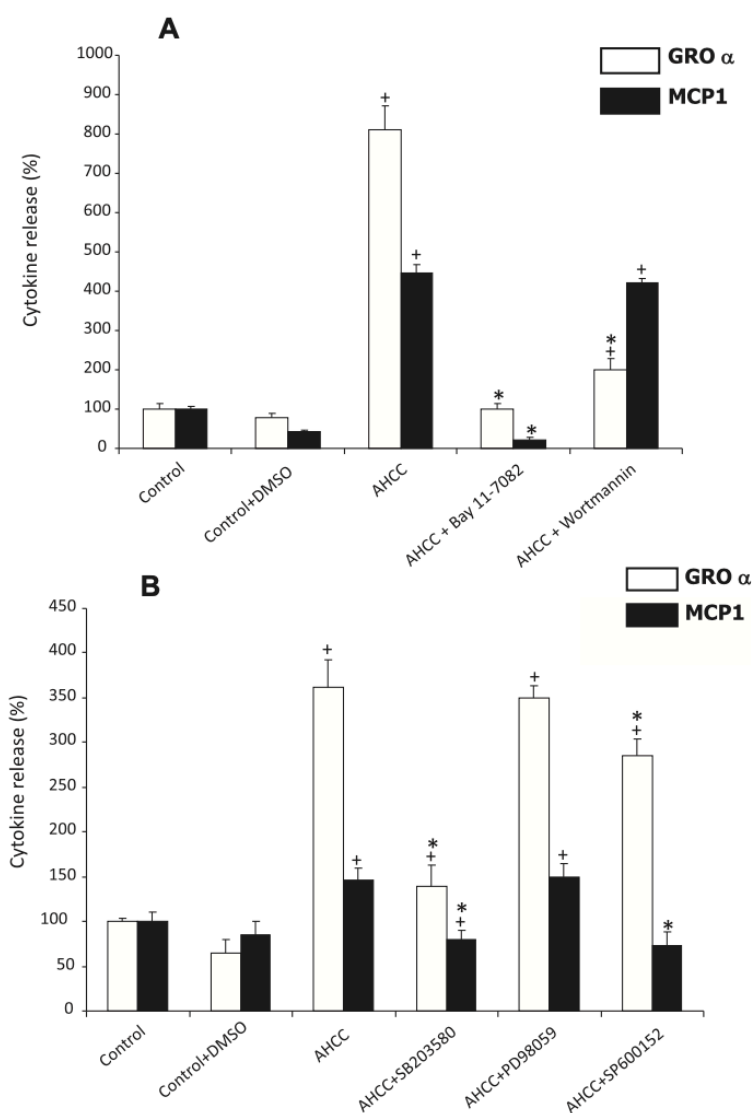


Рис. 2. Участие NFjB, PI3K и MAPK в вызванной АНСС секреции цитокинов в клетках IEC18. Клетки предварительно обрабатывали различными ингибиторами (описанными в тексте) непосредственно перед добавлением АНСС (5 мг/мл). Концентрацию цитокинов в культуральной среде определяли с помощью ELISA в 24-часовом супернатанте. (А) Эффект ингибирования NFjB и PI3K. (В) Эффект ингибирования MAPK. Данные представляют собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего по крайней мере из трех независимых экспериментов. + $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; * $p < 0,05$ по сравнению с группой АНСС.

3.5. Активация различных сигнальных путей с помощью АНСС в клетках HT-29 и THP-1

Было показано, что пути передачи сигналов MAPK и NF κ B участвуют в продукции IL-8 в моноцитах/макрофагах (Beinke & Ley, 2004). Мы оценили состояние функционирования этих путей в клетках HT-29 и THP-1, подвергшихся воздействию АНСС, с использованием вестерн-блоттинга и фосфоспецифических антител, а также влияние специфических ингибиторов на секрецию IL-8 (рис. 5). Как показано на фиг. 5А, АНСС вызывает фосфорилирование I κ B-а, относящегося к пути NF κ B, и MAPKs JNK, ERK и p38 в клетках HT-29. I κ B-а фосфорилируется в Ser32 киназой I κ B по каноническому пути активации NF κ B, что приводит к высвобождению и ядерной транслокации димеров NF κ B. Bay 11-7082 ингибирует эту стадию

фосфорилирования и, следовательно, блокирует канонический путь активации NF κ B. В клетках HT-29 это приводило к полному исчезновению ответа IL-8 на АНСС. Все три MAPK также были вовлечены в соответствии с ингибирующим действием соответствующих блокаторов в порядке p38 > ERK > JNK. Воздействие Bay11-7082 или SB203580 было максимальным, так что дополнительное ингибирование было невозможно. В клетках THP-1 ситуация была аналогичной (рис. 6), за исключением того, что увеличение фосфорилирования в I κ B-а и ERK было ниже, а в JNK и p38 очень интенсивно. Несмотря на это наблюдение, эффект ингибирования ERK был более выраженным, чем у p38. Блокатор JNK SP600125 был единственным зондом, который полностью предотвращал секрецию IL-8, вызванную АНСС, даже по сравнению с Bay11-7082, который обладал важным, но неполным ингибирующим эффектом.

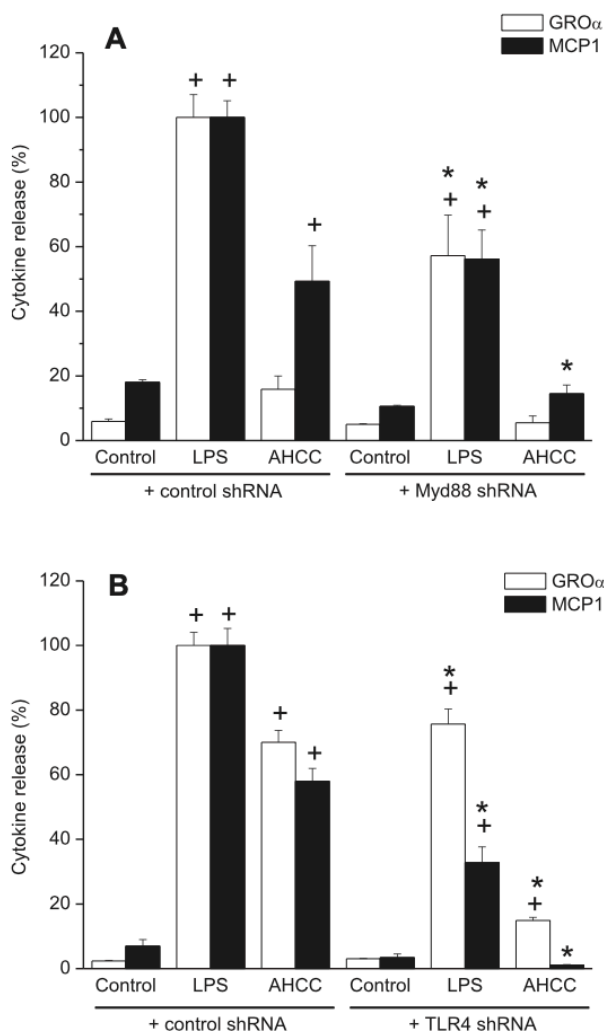


Рис. 3. Влияние knockdown гена Myd88 и TLR4 на вызванную АНСС секрецию цитокинов в клетках IEC18. Клетки IEC18, трансфицированные shRNA для Myd88 (А) или TLR4 (В) или контрольного вектора, обрабатывали АНСС (5 мг/мл) и измеряли концентрацию цитокинов в культуральной среде ELISA после 24-часовой инкубации. Клетки, обработанные ЛПС, были включены в качестве контроля. Базальная секреция GRO α составила 7186,0 и 732,5 пг/мл (А и В соответственно). Базальная секреция MCP1 составила 36327,7 и 21298,1 пг/мл (А и В соответственно). +р < 0,05 по сравнению с соответствующим контролем; *р < 0,05 по сравнению с контрольной shRNA.

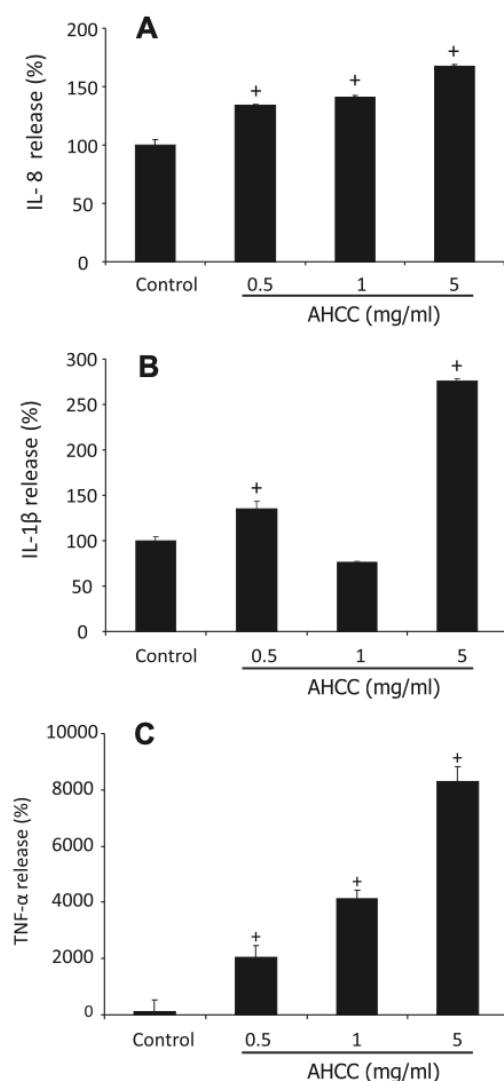


Рис. 4. Влияние АНСС на секрецию цитокинов клетками THP-1. (А) секреция ИЛ-8; (Б) ИЛ-1 β ; (С) Секреция TNF- α . Клетки обрабатывали различными концентрациями АНСС (0,5, 1 или 5 мг/мл) и измеряли концентрацию цитокинов в культуральной среде с помощью ELISA после 24-часовой инкубации. Результаты выражены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для трех разных экспериментов (n = 3 в каждом эксперименте). +р < 0,05 по сравнению с контролем (С).

4. Дискуссия

АНСС широко используется у людей в ряде стран, и он широко изучался на животных моделях. Интерес к АНСС растет из-за преимуществ пищевых добавок в лечении заболеваний человека. В частности, АНСС обладает хорошо документированными иммуномодулирующими свойствами, и особый интерес представляла возможная роль АНСС в лечении воспалительных заболеваний кишечника. Наша группа изначально изучала противовоспалительные свойства этого препарата в толстой кишке на основании его высокого содержания неабсорбируемых глюкоидов, что предполагало пребиотические свойства. Используя крысиную модель колита с тринитробензолсульфоокислотой, АНСС продемонстрировал значительный терапевтический эффект, который был связан с ожидаемой модуляцией микробиоты толстой кишки, с увеличением количества бифидобактерий и молочнокислых бактерий и снижением количества клостридий (Daddaoua et al., 2007). Таким образом, АНСС действительно функционирует как пребиотик. Однако эти данные не исключают возможности того, что АНСС могут иметь дополнительные, не связанные между собой механизмы действия при воспалении кишечника. Следовательно, настоящее исследование направлено ответить на этот вопрос путем оценки эффектов, оказываемых АНСС *in vitro* при полном отсутствии бактерий (или бактериальных компонентов).

Наши результаты подтверждают, что АНСС оказывает иммуномодулирующее действие на линии эпителиальных клеток крысиного и человеческого происхождения (IEC18 и HT-29). Клетки IEC18 были выбраны, потому что они не являются опухолевыми и их можно использовать для изучения изменений в передаче сигнала с использованием методов трансфекции (Beinke & Ley, 2004; Lopez-Posadas et al., 2010). Клетки HT-29 использовали дополнительно с двумя целями: во-первых, подтвердить, что АНСС оказывает влияние на клетки толстой кишки (клетки IEC18 имеют фенотип подвздошной кишки), и, во-вторых, распространить наши наблюдения на клетки человека. Конечно, клетки кишечного эпителия первоначально были сфокусированы, потому что они являются очевидной предполагаемой мишенью для внутрипросветных агентов, таких как АНСС. Следует отметить, что АНСС стимулировал, а не снижал секрецию провоспалительных цитокинов в этих клетках. Этот эффект зависел от концентрации и был максимальным при 5 мг/мл. Кроме того, величина ответа была весьма существенной, поскольку она составляла примерно половину от той, которая была достигнута при субмаксимальной концентрации LPS 10 мкг/мл.

Было высказано предположение, что высокое содержание сахара в АНСС может сделать его предполагаемым лигандом TLR4, на основании того же явления в прототипе агониста TLR4, LPS.

Следовательно, мы использовали сайленсинг гена shRNA для модуляции секреции цитокинов LPS и АНСС в клетках IEC18. Как и ожидалось, эффекты LPS значительно подавлялись, когда либо MyD88, либо TLR4 подавлялись. MyD88 представляет собой внутриклеточный сигнальный белок, участвующий в эффектах всех TLR, кроме TLR3 (Brikos & O'Neill, 2008). Некоторые эффекты других TLR также не зависят от MyD88. Таким образом, ожидается, что вмешательство в экспрессию TLR4 приведет к результатам, аналогичным результатам подавления MyD88. Это действительно было в случае с АНСС, что указывает на то, что АНСС лигирует TLR4 и передает дополнительные сигналы через MyD88. Интересно отметить, что ингибирование эффектов ЛПС было менее заметным. Это может быть связано с неполным подавлением гена в сочетании с более сильным стимулом LPS по сравнению с АНСС. Так как замалчивание Myd88 имеет более сильный ингибирующий эффект, чем нокдаун TLR4, вполне вероятно, что АНСС может воздействовать на др. Myd88-зависимые рецепторы, как это было недавно предположено для TLR2 (Nishioka et al., 2009).

MyD88 связывается с несколькими промежуточными белками, включая IRAK1/4, TRAF6 и TAK1, конвергируя, наконец, при активации комплекса ИКК, который, в свою очередь, фосфорилирует I κ B-а, что приводит к высвобождению активных димеров NF κ B. Наши данные показывают, что фосфорилирование I κ B-а необходимо для эффектов АНСС, что согласуется с TLR4/Сигнализация MyD88. Несмотря на участие, MAPK и PI3K, по-видимому, играют второстепенную роль (за исключением последней в секреции GRO α), поскольку эффект Bay11-7082 максимален. Примечательно, что эффекты на HT-29 были очень похожими, хотя участие MAPK было более выраженным, так что полного ингибирования можно было достичь, просто воздействуя на эти киназы. Хотя ожидается, что только поверхность кишечного эпителия контактирует с люминальными агентами, такими как бактерии, бактериальные продукты или питательные вещества, включая АНСС, взаимодействие с другими типами клеток, присутствующими в слизистой оболочке ниже поверхности кишечного эпителия, не может следует исключить, особенно в ситуациях нарушения барьерной функции и повышенной проницаемости, например при воспалительных заболеваниях кишечника. Таким образом, изучалось влияние АНСС на моноциты/макрофаги с использованием клеточной линии THP-1 в качестве модели. Концентрация АНСС вызывала секрецию провоспалительных цитокинов, как и в эпителиальных клетках. Результаты согласуются с недавними результатами, показывающими, что АНСС индуцирует IL-1b в моноцитах человека, стимулируя ответы Th17 и Th1, м самым усиливая кишечный иммунитет (Lee, Lee, Fujii, & Kang, 2012).

С другой стороны, исследование *in vivo* показало, что АНСС увеличивает частоту CD4(+) и CD8(+) Т-клеток, продуцирующих только IFN- γ , только TNF- α или оба (Yin et al., 2010). Хотя в этом исследовании использовались разные типы клеток, оно согласуется с описанной здесь увеличенной продукцией TNF- α с помощью АНСС. Фармакологический анализ передачи сигнала в клетках THP-1 показал результаты, очень похожие на результаты, полученные с клетками IEC18 и

особенно HT-29, т. е. почти полную зависимость фосфорилирования I κ B-а и/или активации MAPK, особенно JNK.

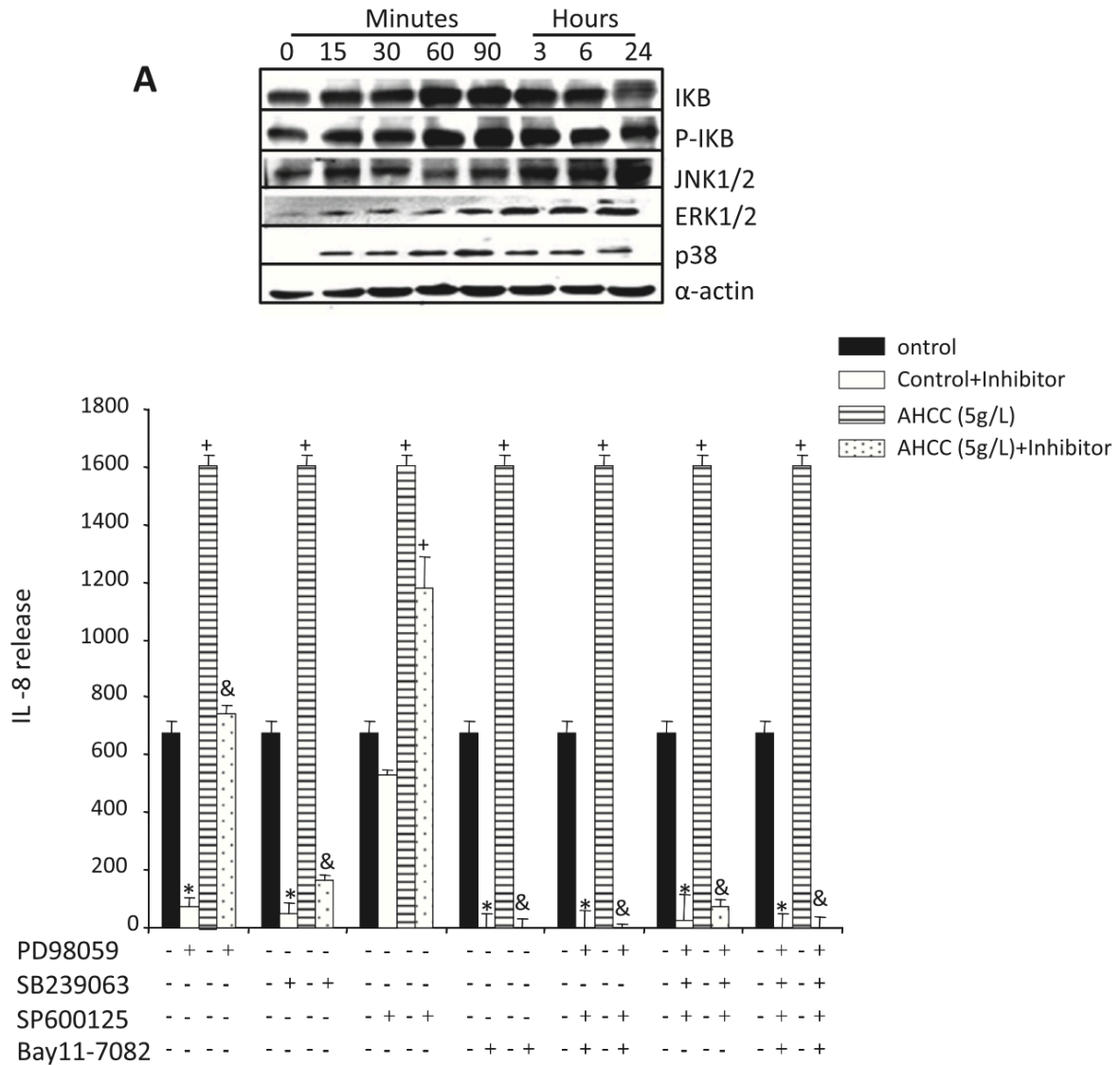


Рис. 5. Участие MAPK и NF κ B в секреции IL-8, вызванной АНСС, при HT-29. Клетки предварительно обрабатывали различными ингибиторами (описанными в тексте) непосредственно перед добавлением АНСС (5 мг/мл). Пути активации оценивали с помощью Вестерн-блоттинга и по ингибированию секреции цитокинов, измеренному с помощью ELISA в культуральной среде после 24-часовой инкубации. α -Актин использовали в качестве контроля загрузки. Данные представляют собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего по крайней мере из трех независимых экспериментов. + p < 0,05 по сравнению с контрольной группой; $\&$ p < 0,05 по сравнению с группой АНСС. ИКБТ: I κ B-всего.

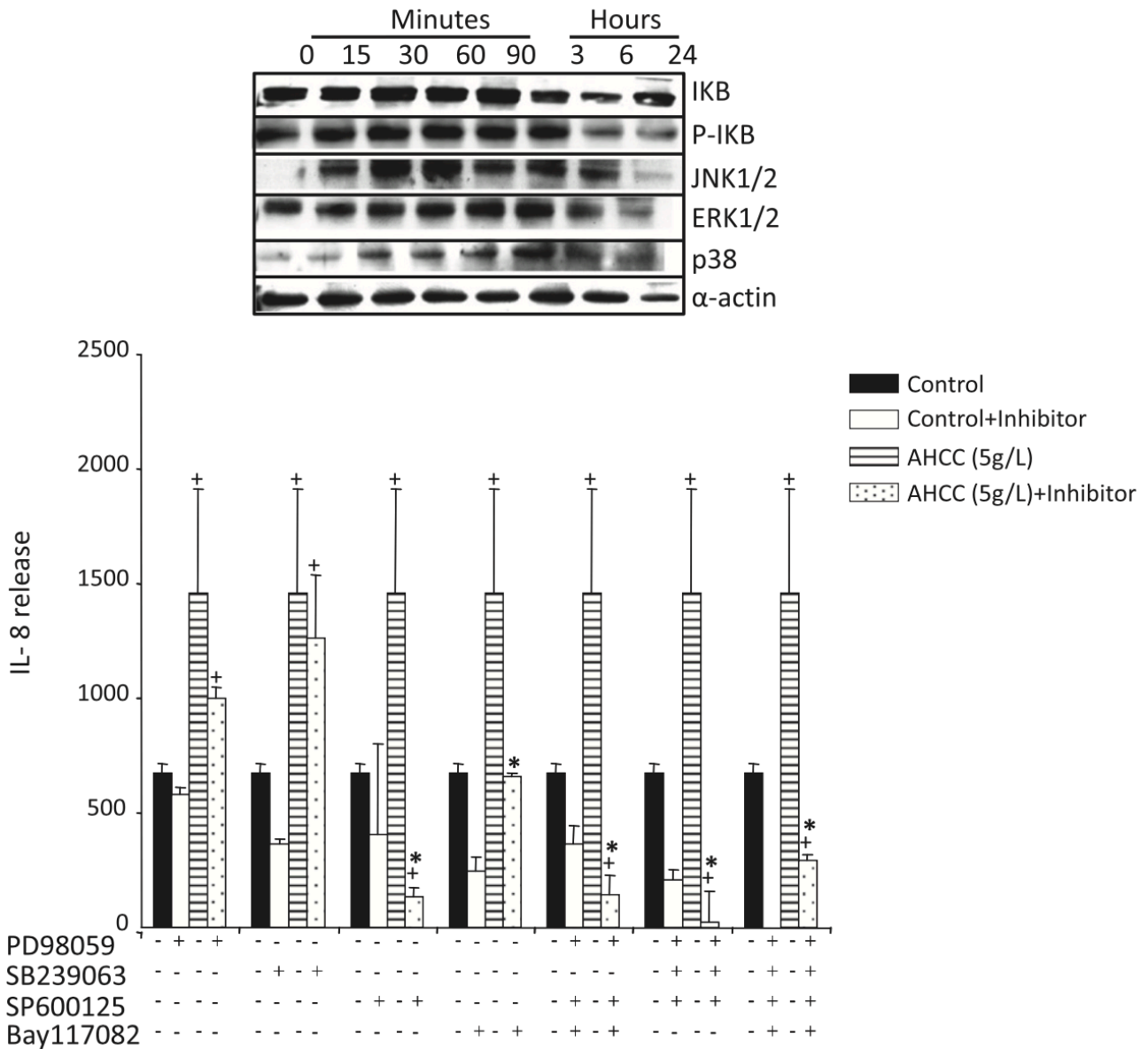


Рис. 6. Участие MAPK и NFjB в АНСС, вызванной секрецией IL-8 в ТНР-1. Клетки предварительно обрабатывали различными ингибиторами (описанными в тексте) непосредственно перед добавлением АНСС (5 мг/мл). Пути активации оценивали с помощью Вестерн-блоттинга и по ингибированию секреции цитокинов, измеренному с помощью ELISA в культуральной среде после 24-часовой инкубации. α-Актин использовали в качестве контроля загрузки. Данные представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка среднего по крайней мере из трех независимых экспериментов. †р < 0,05 по сравнению с контрольной группой; *р < 0,05 по сравнению с группой АНСС. ИКБТ: IjB-всего.

В заключение, результаты свидетельствуют о том, что АНСС активирует TLR4 в эпителиальных клетках и моноцитах кишечника, вызывая ожидаемые последующие этапы передачи сигналов, ведущие к активации NFjB/MAPK и секреции провоспалительных цитокинов. Результаты, с другой стороны, ставят вопрос об актуальности для лечения хронического воспалительного заболевания. Хотя этот механизм противоречит здравому смыслу, он совместим с гипотезой о том, что воспалительное заболевание кишечника может быть результатом не сверхактивной иммунной системы, а относительно слабой. Неспособность

слизистого барьера сдерживать бактериальную флору приводит к транслокации и сильной воспалительной реакции. Таким образом, воспаление может быть вторичным по отношению к первичному дефекту защиты слизистой оболочки. Например, Ненси и др. наблюдали, что условное подавление экспрессии ИКК-с (также известного как NEMO) или ИКК-а/б в эпителии кишечника, приводящее к снижению активации пути NF-jB, вызывает тяжелую воспалительную реакцию (Nenci et al., 2007).

В другом исследовании было показано, что введение GM-CSF оказывает защитное действие при экспериментальном колите, воздействуя на механизмы врожденного иммунитета (Sainathan et al., 2008). Соответственно, мыши с нокаутом GM-CSF более восприимчивы к индуцируемому колиту (Xu, Hunt, & Bao, 2008). Сходным образом отсутствие экспрессии CXCL1, считающегося основным хемокином, ответственным за рекрутирование нейтрофилов в толстой кишке, связано с усиленным колитом (Shea-Donohue et al., 2008). В соответствии с этими выводами, истощение нейтрофилов само по себе усугубляет колит (Kuhl et al., 2007). Таким образом, АНСС может частично работать за счет усиления барьерной функции и защиты слизистой оболочки.

Наконец, стоит отметить, что АНСС широко используется пациентами для преодоления побочных эффектов химиотерапии при раке. Химиотерапия влияет на слизистую оболочку кишечника, вызывая мукозит и потерю целостности слизистой оболочки (van Vliet, Harmsen, de Bont, & Tissing, 2010). Хотя всегда трудно перевести результаты *in vitro* в эффекты *in vivo*, действие АНСС на слизистый барьер также может дать молекулярное и клеточное объяснение его благоприятному влиянию на лечение побочных эффектов, вызванных химиотерапией у пациентов с раком.

Источники финансирования

Это исследование было поддержано Amino Up Chemical и Министерством науки и инноваций (SAF2008-01432, AGL2008-04332, SAF2011-22922 и SAF2011-22812), средствами Андалусии (CTS-6736 и CTS164) и Фонд Рамона Аресеса. CIBERed финансируется Instituto de Salud Carlos III.

Использованная литература

Akira, S., & Takeda, K. (2004). Functions of toll-like receptors: Lessons from KO mice. *Comptes Rendus Biologies*, 327(6), 581–589.

Aviles, H., Belay, T., Vance, M., Sun, B., & Sonnenfeld, G. (2004). Active hexose correlated compound enhances the immune function of mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions. *Journal of Applied Physiology*, 97(4), 1437–1444.

Beinke, S., & Ley, S. C. (2004). Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *The Biochemical Journal*, 382(Pt 2), 393–409.

Brikos, C., & O'Neill, L. A. (2008). Signalling of toll-like receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 183, 21–50.

Daddaoua, A., Martinez-Plata, E., Lopez-Posadas, R., Vieites, J. M., Gonzalez, M., Requena, P., Zarzuelo, A., Suarez, M. D., de Medina, F. S., & Martinez-Augustin, O. (2007). Active hexose correlated compound acts as a prebiotic and is antiinflammatory in rats with hapten-induced colitis. *The Journal of Nutrition*, 137(5), 1222–1228.

Frost, R. A., Nystrom, G. J., & Lang, C. H. (2002). Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283(3), R698–R709.

Gao, Y., Zhang, D., Sun, B., Fujii, H., Kosuna, K., & Yin, Z. (2006). Active hexose correlated compound enhances tumour surveillance

through regulating both innate and adaptive immune responses. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55(10), 1258–1266.

Kidd, P. M. (2000). The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 5(1), 4–27.

Kuhl, A. A., Kakirman, H., Janotta, M., Dreher, S., Cremer, P., Pawlowski, N. N., Loddenkemper, C., Heimesaat, M. M., Grollich, K., Zeitz, M., Farkas, S., & Hoffmann, J. C. (2007). Aggravation of different types of experimental colitis by depletion or adhesion blockade of neutrophils. *Gastroenterology*, 133(6), 1882–1892.

Lee, W. W., Lee, N., Fujii, H., & Kang, I. (2012). Active Hexose Correlated Compound promotes T helper (Th) 17 and 1 cell responses via inducing IL-1beta production from monocytes in humans. *Cellular Immunology*, 275(1–2), 19–23.

Lopez-Posadas, R., Ballester, I., Mascaraque, C., Suarez, M. D., Zarzuelo, A., Martinez-Augustin, O., & Sanchez de Medina, F. (2010). Flavonoids exert distinct modulatory actions on cyclooxygenase 2 and NF-kappaB in an intestinal epithelial cell line (IEC18). *British Journal of Pharmacology*, 160(7), 1714–1726.

Matsui, Y., Uhara, J., Satoi, S., Kaibori, M., Yamada, H., Kitade, H., Imamura, A., Takai, S., Kawaguchi, Y., Kwon, A. H., & Kamiyama, Y. (2002). Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: A prospective cohort study. *Journal of Hepatology*, 37(1), 78–86.

Matsushita, K., Kuramitsu, Y., Ohiro, Y., Obara, M., Kobayashi, M., Li, Y. Q., & Hosokawa, M. (1998). Combination therapy of active hexose correlated compound plus UFT significantly reduces the metastasis of rat mammary adenocarcinoma. *Anti-Cancer Drugs*, 9(4), 343–350.

Miura, T., Kitadate, K., Nishioka, H., & Wakame, K. (2010). Basic and clinical studies on Active Hexose Correlated Compound. In D. Bagchi, F. C. Lau, & D. k. Ghosh (Eds.), *Biotechnology in functional foods and nutraceuticals* (vol. 1, pp. 51–60). Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Nau, G. J., Richmond, J. F., Schlesinger, A., Jennings, E. G., Lander, E. S., & Young, R. A. (2002). Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1503–1508.

Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., Gumucio, D., Neurath, M. F., & Pasparakis, M. (2007). Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*, 446(7135), 557–561.

Nishioka, H., Akao, Y., & Wakame, K. (2009). Potentiating action of AHCC on natural immunity. *Medical Science Digest*, 35(6), 2–6.

Ritz, B. W. (2008). Supplementation with active hexose correlated compound increases survival following infectious challenge in mice. *Nutrition Reviews*, 66(9), 526–531.

Ritz, B. W., Nogusa, S., Ackerman, E. A., & Gardner, E. M. (2006). Supplementation with active hexose correlated compound increases the innate immune response

of young mice to primary influenza infection. *The Journal of Nutrition*, 136(11), 2868–2873.

Sainathan, S. K., Hanna, E. M., Gong, Q., Bishnupuri, K. S., Luo, Q., Colonna, M., White,

F. V., Croze, E., Houchen, C., Anant, S., & Dieckgraefe, B. K. (2008). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor ameliorates DSS-induced experimental colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(1), 88–99.

Shah, S. K., Walker, P. A., Moore-Olufemi, S. D., Sundaresan, A., Kulkarni, A. D., & Andrassy, R. J. (2011). An evidence-based review of a *Lentinula edodes* mushroom extract as complementary therapy in the surgical oncology patient. *JPEN. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 35(4), 449–458.

- Shea-Donohue, T., Thomas, K., Cody, M. J., Aiping, Z., Detolla, L. J., Kopydlowski, K. M., Fukata, M., Lira, S. A., & Vogel, S. N. (2008). Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 (KC/GRO- α), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *Innate Immunity*, 14(2), 117–124.
- Shoham, S., Huang, C., Chen, J. M., Golenbock, D. T., & Levitz, S. M. (2001). Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF- α release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *Journal of Immunology*, 166(7), 4620–4626.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85.
- Sumiyoshi, Y., Hashine, K., Kakehi, Y., Yoshimura, K., Satou, T., Kuruma, H., Namiki, S., & Shinohara, N. (2010). Dietary administration of mushroom mycelium extracts in patients with early stage prostate cancers managed expectantly: A phase II study. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 40(10), 967–972.
- Turner, J., & Chaudhary, U. (2009). Dramatic prostate-specific antigen response with activated hemicellulose compound in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Anti-Cancer Drugs*, 20(3), 215–216.
- van Vliet, M. J., Harmsen, H. J., de Bont, E. S., & Tissing, W. J. (2010). The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS Pathogens*, 6(5), e1000879.
- Voss, E., Wehkamp, J., Wehkamp, K., Stange, E. F., Schroder, J. M., & Harder, J. (2006). NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *Journal of Biological Chemistry*, 281(4), 2005–2011.
- Xu, Y., Hunt, N. H., & Bao, S. (2008). The role of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor in acute intestinal inflammation. *Cell Research*, 18(12), 1220–1229.
- Yagita, A., Maruyama, S., Wakasugi, S., & Sukegawa, Y. (2002). H-2 haplotype-dependent serum IL-12 production in tumour-bearing mice treated with various mycelial extracts. *In Vivo*, 16(1), 49–54.
- Ye, S. F., Wakame, K., Ichimura, K., & Matsuzaki, S. (2004). Amelioration by active hexose correlated compound of endocrine disturbances induced by oxidative stress in the rat. *Endocrine Regulations*, 38(1), 7–13.
- Yin, Z., Fujii, H., & Walshe, T. (2010). Effects of active hexose correlated compound on frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells producing interferon- γ and/or tumour necrosis factor- α in healthy adults. *Human Immunology*, 71(12), 1187–1190.