

铁皮石斛糖蛋白对皮肤炎症期的 调控作用及机制

赵倩^{1,2},戴天浔^{1,2},洪文龙³,周丽免^{1,2},苏海冉^{1,2},田洋^{1,2,4,*},白忠彬^{1,2,*}

(1.云南农业大学食品科学技术学院,云南昆明 650201;

2.云南农业大学国家辣木加工技术研发专业中心,云南昆明 650201;

3.云南斛哥药业有限公司,云南普洱 665000;

4.食药资源开发与利用教育部工程中心,云南昆明 650201)

摘要:研究铁皮石斛糖蛋白(DOKMG)对皮肤炎症期的调控作用及机制。本文以巨噬细胞株 RAW264.7 为研究对象,用铁皮石斛糖蛋白刺激巨噬细胞并做时间和浓度依赖性分析,应用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR)检测炎症因子白介素-1 β (Interleukin-1 β 、IL-1 β)、白介素-6(Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor- α , TNF- α)以及炎症相关的环氧化酶-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)和一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, iNOS)的 mRNA 表达水平。应用酶联免疫吸附反应(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测巨噬细胞培养上清中炎症因子的表达。采用蛋白印迹(Western blot, WB)分析铁皮石斛糖蛋白对炎症因子蛋白水平表达及核转录因子- κ B(Nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)信号通路的影响。结果显示,铁皮石斛糖蛋白能在 24 h 后极显著促进 IL-1, IL-6, TNF- α 的基因表达($P < 0.001$),当浓度达到 100 μ g/mL 时促进最为明显,IL-1 β 相比对照组增加了 10.09 倍,IL-6 增加了 20.45 倍,TNF- α 增加了 0.95 倍。DOKMG 对细胞上清中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 有促进作用,且成剂量依赖性,当浓度为 100 μ g/mL 时,两者分泌量分别由 0.52 μ g/mL、118.52 pg/mL 上升至 1.99 μ g/mL、272.81 pg/mL。DOKMG 能显著促进炎症因子蛋白的表达及 NF- κ B 信号通路相关蛋白的磷酸化($P < 0.05$)。上述结果表明,铁皮石斛糖蛋白通过调节细胞炎症反应来促进伤口愈合,其部分机制与 NF- κ B 信号通路激活有关。

关键词:铁皮石斛,糖蛋白,炎症因子,核转录因子(NF- κ B),伤口愈合

Regulatory Effect of *Dendrobium officinale* Kinura et Migo Glycoprotein on Skin Inflammation and Its Mechanism

ZHAO Qian^{1,2}, DAI Tian-yi^{1,2}, HONG Wen-long³, ZHOU Li-mian^{1,2},

SU Hai-ran^{1,2}, TIAN Yang^{1,2,4,*}, BAI Zhong-bin^{1,2,*}

(1.College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2.National R&D Center for Moringa Processing Technology, Kunming 650201, China;

3.Yunnan Huge Pharmaceutical Co., Ltd., Puer 665000, China;

4.Food and Drug Resources Development and Utilization Engineering Center of
the Ministry of Education, Kunming 650201, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the regulation and mechanism of *Dendrobium officinale* Kinura et Migo glycoprotein(DOKMG) on skin inflammation. In this paper, macrophage cell line RAW264.7 was targeted and stimulated by DOKMG in different time and concentration, the mRNA expression levels of inflammatory factor IL-1 β , IL-6, TNF- α and inflammation-related COX-2 and iNOS were detected by RT-PCR. The expression of inflammatory factors in supernatant of macrophages was detected by ELISA. Western blot was used to analyze the effect of DOKMG on the expression of inflammatory factor protein and NF- κ B signaling pathway. The results showed that DOKMG significantly promoted the expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α genes after 24 h ($P < 0.001$). When the concentration reached 100 μ g/mL, the improvement was the most

收稿日期:2019-12-10

作者简介:赵倩(1994-),女,硕士研究生,研究方向:功能性食品功效研究,E-mail:357909488@qq.com。

*通信作者:田洋(1989-),男,博士,教授,研究方向:药食同源资源功能食品,E-mail:tianyang1208@163.com。

白忠彬(1969-),男,博士,教授,研究方向:云南地道中药及功能性食品,E-mail:2300436285@qq.com。

基金项目:云南农业大学人才引进科研启动项目(A2002320);云南省引进人才科研启动项目(A3007330);云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目(2018HB040)。

obvious. Compared with the control group, IL-1 β increased by 10.09 times, IL-6 increased by 20.45 times, and TNF- α increased by 0.95 times. When the concentration was 100 $\mu\text{g/mL}$, the secretion of TNF- α , IL-1 β increased from 0.52 $\mu\text{g/mL}$ and 118.52 pg/mL to 1.99 $\mu\text{g/mL}$ and 272.81 pg/mL, the expression of inflammatory cytokines and phosphorylation of NF- κB were significantly promoted ($P < 0.05$). These results indicate that DOKM can significantly promote macrophage inflammatory response to promote wound healing, and its mechanism may be related to the activation of NF- κB signaling pathway.

Key words: *Dendrobium officinale* Kinura et Migo; glycoprotein; inflammatory factor; nuclear transcription factor (NF- κB); wound healing

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)21-0305-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019120094

引文格式: 赵倩, 戴天湓, 洪文龙, 等. 铁皮石斛糖蛋白对皮肤炎症期的调控作用及机制[J]. 食品工业科技, 2020, 41(21): 304-310, 316.

ZHAO Qian, DAI Tian-yi, HONG Wen-long, et al. Regulatory Effect of *Dendrobium officinale* Kinura et Migo Glycoprotein on Skin Inflammation and Its Mechanism[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(21): 304-310, 316. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kinura et Migo, DOKM)为石斛属兰科多年生草本植物,全球约1400多种,主要分布于亚洲的热带地区^[1]。我国石斛属植物共76种,铁皮石斛是中国药典收录的5种石斛之一,具有益胃生津、滋阴清热、润肺止咳等功效^[2]。在2018年铁皮石斛被国家卫健委收录为新资源食品。已经有研究报道,石斛与机体多个部位的炎症反应密切相关,如对于糖尿病引发的心肌病,铁皮石斛提取物可通过抑制氧化应激、炎症反应,降低炎症因子白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)的分泌来减轻心肌病症状^[3]。对于胃肠道疾病,铁皮石斛多糖对治疗急性结肠炎小鼠具有明显作用,其机理为通过 β -arrestin1信号通路抑制NLRP3炎症体^[4]。在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的巨噬细胞炎症模型中,石斛通过抑制一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, iNOS)、环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的表达以及丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径中的细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)和c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)的磷酸化达到抑制炎症的作用^[5]。

皮肤伤口愈合一般经历炎症、新生肉芽组织填充和瘢痕形成三个阶段^[6],其组织学变化为伤口部位发生凝血,细胞因子分泌及后续的炎症细胞聚集,细胞外基质填充损伤部位,愈合后瘢痕组织的降解和吸收^[7]。正常愈合过程中,在伤口受损的初期,大量的单核细胞聚集于受损部位,逐渐转化为活化的巨噬细胞,对坏死组织和细胞碎片进行吞噬,并分泌大量的炎症因子,同时释放抗菌物质,促进创面的炎症反应^[8]。到创面炎症的后阶段,创面的炎症被抑制,巨噬细胞主要分泌生长转化因子(transforming growth factor, TGF- β)和血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)等蛋白因子,使成纤维细胞、内皮细胞等修复细胞迁移至创面,肉芽组织开始覆盖损伤组织,新生血管大量生成,逐步进入创面修复时期^[9-10]。

铁皮石斛作为新资源食品,其在药食同源领域具有诸多功效,但其促进伤口愈合及其机理未见报

道。本实验采用小鼠皮肤损伤模型,检测了铁皮石斛糖蛋白对小鼠皮肤损伤愈合的促进作用,同时选用巨噬细胞株RAW264.7作为体外研究对象,应用MTT、ELISA、RT-PCR、WB等方法检测铁皮石斛糖蛋白对RAW264.7细胞分泌炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6以及NF- κB 信号通路的影响,研究了铁皮石斛糖蛋白在伤口愈合过程中的炎症调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

C57 雄性小鼠 7-8 周龄,体重(20 $\pm$ 2) g 购自常州卡文斯实验动物有限公司,饲养于云南农业大学工程中心动物饲养室(N000013);RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞由云南农业大学云南辣木所提供;三年生林下仿生铁皮石斛来自云南省普洱市斛哥庄园,于12月份采集;高糖DMEM培养基美国BI公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)美国Hyclone公司;二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液、RIPA细胞裂解液、磷酸酶抑制剂、青链霉素北京索莱宝科技有限公司;逆转录试剂盒、SYBR染料南京喆唯赞生物科技有限公司;抗体AMPK、P-AMPK、NF- κB 、P-NF- κB 、VEGF、IL-6、TNF- α 、ECL发光液辽宁万类生物科技有限公司;BCA试剂盒碧云天公司。

Epoch2 全波长酶标仪 美国BioTek公司;LightCycler480 II 荧光定量PCR仪 德国Roche公司;JY-sc2 电泳仪 美国Bio-Rad公司;K3000mini 化学发光成像系统 北京科创锐新生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 铁皮石斛糖蛋白的制备 参照白忠彬^[11]方法,在此基础上适当修改。试验采用热水浸提法,采取工艺为提取料液比1:10,浸提温度70 $^{\circ}\text{C}$,提取时间为90 min,提取次数3次,(纱布过滤)合并滤液;4000 r/min,离心15 min,合并上清液;浓缩(减压浓缩),浓缩到一定体积后,加5倍体积95%乙醇,静置24 h,离心取沉淀,沉淀用适量无水乙醇洗涤2次,冷冻干燥得到石斛糖蛋白粉,于常温储存。

1.2.2 RAW264.7 细胞培养 取出低温保存的1 mL细胞株,快速融化,放于15 mL 无菌离心管中,加入

5 mL培养液混匀后,以 1500 r/min 离心 3 min,去上清将细胞沉淀转移至 100 mm 培养皿中,于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养。待细胞生长至 80%,用磷酸缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗 2 次,0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液在 37 ℃培养箱中消化 3~4 min,用无血清培养基吹打底部细胞,使细胞脱落。取细胞悬液以 1500 r/min 离心 3 min,弃上清,加入新鲜培养液使底部细胞沉淀悬浮于培养液中。取细胞混悬液按 1:3 传代放于 3 个培养皿中,并分别补充培养液,于 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下继续培养。

1.2.3 MTT 法检测细胞毒性实验 以 200 μL/孔(10⁴ 个细胞)接种细胞到 96 孔板上,于 37 ℃、5% CO₂ 环境下培养 24 h,用 PBS 清洗未贴壁细胞,添加 25、50、100、200 μg/mL 铁皮石斛糖蛋白,对照组更换新鲜培养基。每孔 200 μL,继续培养 24 h。培养完成后,每孔用 100 μL 新鲜培养基配制的 0.25 mg/mL 的 MTT 溶液 37 ℃避光孵育 4 h 显色。吸去培养基, PBS 洗 2 次,每孔添加 150 μL DMSO,轻微振荡使紫色结晶物溶解。酶标仪于 490 nm 测定吸光值。细胞存活率计算公式如下:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{OD}_2 - \text{OD}_0}{\text{OD}_1 - \text{OD}_0} \times 100$$

式中:OD₀ 为调零孔;OD₁ 为空白孔;OD₂ 为实验孔。

1.2.4 RT-PCR 法检测 RAW264.7 细胞中细胞因子 mRNA 表达水平 将处于对数生长期 RAW264.7 细胞按每皿 1.2 × 10⁶ 个细胞接板于 60 mm 培养皿内,培养 24 h 后进行添加铁皮石斛糖蛋白。对照组更换新鲜培养基,石斛糖蛋白组添加铁皮石斛糖蛋白终浓度分别为 25、50、100 μg/mL。添加石斛糖蛋白干预 12、24、48、72 h 后,按照试剂盒说明书提取总 RNA,将 RNA 按照试剂盒说明书逆转录为 cDNA,按表 1 的扩增条件加样上机。RT-PCR 引物序列见表 2。

表 1 RT-PCR 扩增条件

Table 1 RT-PCR amplification conditions

反应步骤	反应环节	循环数	反应温度(℃)	反应时间(s)
Stage 1	预变性	Reps:1	95	30
Stage 2	循环反应	Reps:40	95	10
			60	15
Stage 3	融解曲线	Reps:1	95	15
			60	60
			95	15

表 2 RT-PCR 引物序列

Table 2 RT-PCR primer sequence

基因	上游引物	下游引物
TNF-α	ACCCTCAGCTCAGATCATCTT	GGTTGTCTTTGAGATCCATGC
IL-6	CACAAGTCCGGAGAGGAGAC	CAGAATTGCCATTGCACAAC
IL-1β	CGCAGCAGCACATCAACAAGAGC	TGTCCTCATCCTGGAAGGTCCACG
COX-2	AGCCAGGCAGCAAATCCTT	GGGTGGGCTTCAGCAGTAAT
iNOS	CCAAGCCCTCACCTACTTCC	CTCTGAGGGCTGACACAAGG
β-actin	GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC	GACTCATCGTACTCCTGCTTGC

1.2.5 ELISA 法检测细胞上清中炎症因子的分泌 将处于对数生长期的细胞按照 5 × 10⁴ 个/mL 每孔 200 μL 接种于 96 孔板中 37 ℃、5% CO₂ 培养 24 h。在检测 IL-1β 时,先用 1 μg/mL 的 LPS 诱导 1 h 然后添加铁皮石斛糖蛋白。对照组更换新鲜培养基,石斛糖蛋白组终浓度为 25、50、100 μg/mL。培养 24 h 后,收集上清液于 200 μL 的离心管里。每组 5 个复孔。上清液 1200 r/min 离心 10 s 后吸取上层清液分装后放于-20 ℃冰箱里备用。

从 4 ℃冰箱里取出试剂盒,室温平衡 30 min,取出事先制备好的细胞上清液振荡离心混匀后,按照试剂盒说明进行 TNF-α、IL-1β 表达量的测定。

1.2.6 蛋白印迹法检测细胞中蛋白的表达 取对数生长期 RAW264.7 细胞以 3 × 10⁵ 个/mL 接板于 60 mm 培养皿内,每皿 4 mL 培养 24 h 后待细胞贴壁。对照组更换新鲜培养基,石斛糖蛋白终浓度分别为 25、50、100 μg/mL。继续培养 24 h 后弃去培养液,预冷 PBS 清洗 2 次,吸干 PBS 后,加入蛋白裂解液 RIPA 冰上裂解 20 min,进行总蛋白提取。随后根据 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,根据浓度制备好蛋白样品备用。SDS-PAGE 电泳先采用 50 V 低电压跑 30 min,后用 100 V 高电压跑 100 min 左右。电泳后在 200 mA、60 min 冰浴转到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭膜 1.5 h, TBST 清洗 3 次,每次 5 min。随后加入一抗(TGF-β、VEGF、IL-6、TNF-α、IL-1β、P-IκB、IκB、NF-κB、P-NF-κB) 4 ℃孵育过夜。TBST 洗膜后与 1:5000 稀释的标记有辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)的鼠抗或者兔抗室温孵育 1 h,洗膜后用发光液显色,采用 image J 对目的条带进行灰度分析。

1.2.7 铁皮石斛糖蛋白对小鼠伤口的愈合影响 动物实验根据国际指南进行,实验方案经云南农业大学机构动物伦理委员会批准。选取 20 只 C57 小鼠,每只小鼠背部左右两侧用刀片划开约 1 cm 对称的两

对刀口,左侧涂抹凡士林,右侧涂抹用凡士林配制的2%铁皮石斛糖蛋白(预实验对0.5%、1%、2%、5%等浓度实验结果显示,当浓度为2%时,愈伤效果最佳),每天早晚各一次,连续7 d,停药23 d,分别于给药的第7 d、停药第5 d(即给药12 d)、第23 d(即给药30 d)用乙醚麻醉后拍照观察实验结果。事后用Image Pro对伤口面积进行分析,GraphPad Prism 5.01进行统计学分析愈合程度。

愈合率(%) = $\frac{S-S_t}{S} \times 100$

式中: S_t 为测定当天的伤口面积,S为手术当天的伤口面积。

1.3 统计分析

实验数据采用 GraphPad Prism 5.01 统计作图软件进行处理,组间比较采用单因素方差分析和独立 t 检验,*表示 $P<0.05$,差异显著,**表示 $P<0.01$,差异高度显著,***,表示 $P<0.001$,差异极显著。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛糖蛋白对 RAW264.7 细胞活力的影响

用 MTT 法检测铁皮石斛糖蛋白对 RAW264.7 细胞生长的调节作用。结果如图 1 所示,在实验剂量下,铁皮石斛糖蛋白的添加未影响细胞的存活率。因此,在本实验条件下,铁皮石斛糖蛋白在 25~200 $\mu\text{g/mL}$

的剂量下对 RAW264.7 细胞无毒害作用。

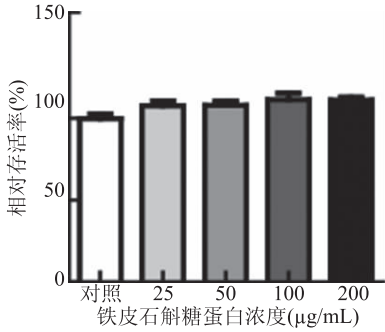


图 1 铁皮石斛糖蛋白对 RAW264.7 活力的影响
Fig.1 Effect of DOKMG on RAW264.7 vitality

2.2 铁皮石斛糖蛋白对 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 炎症因子基因的影响

IL-1 β 、IL-6、TNF- α 是炎症反应中常见的促炎因子,其表达量可间接反映炎症反应的程度。随着时间的推移,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的相对表达量呈现先上升后下降的趋势,且在 24 h 达到峰值(图 2A、B、C)。随着浓度的增加,IL-6、TNF- α 的相对表达量也随之增加,在 100 $\mu\text{g/mL}$ 时相对表达量最高。如图 2D、E、F 所示,与 24 h 的对照组相比,IL-1 β 在峰值(24 h, 100 $\mu\text{g/mL}$) 相对表达量增加了 10.09 倍,IL-6在峰值(24 h, 100 $\mu\text{g/mL}$) 相对表达量增加了

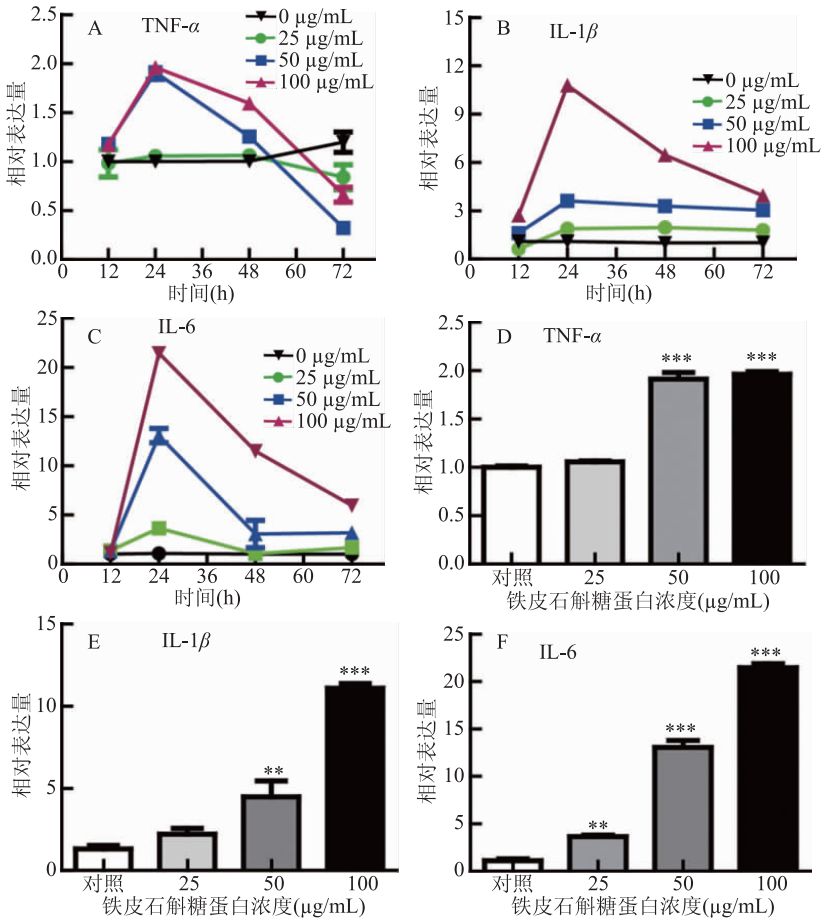


图 2 铁皮石斛糖蛋白对 RAW264.7 细胞炎症因子 mRNA 表达的影响

Fig.2 Effect of DOKMG on the mRNA expression of inflammatory factors in RAW264.7 cells

注:*表示与对照组相比两组之间的差异;* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;图 4~图 7 同。

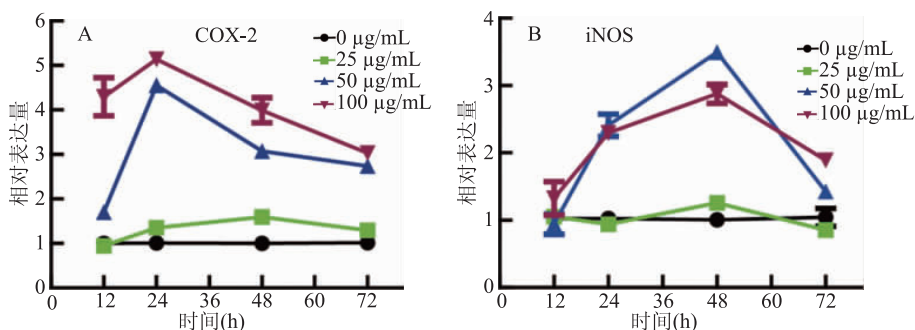


图3 铁皮石斛糖蛋白对炎症关键酶 mRNA 表达的影响

Fig.3 Effect of DOKMG on the mRNA expression of inflammatory key enzymes

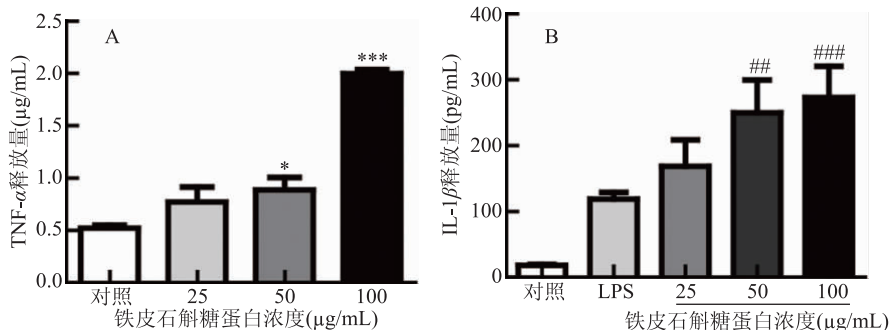


图4 铁皮石斛糖蛋白促进 RAW264.7 细胞分泌炎症因子

Fig.4 DOKMG promotes the secretion of inflammatory cytokines in RAW264.7 cells

注:图 B 中#表示与 LPS 组相比两组之间的差异;# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

20.45 倍, TNF- α 的峰值(24 h, 100 $\mu\text{g/mL}$) 相对表达量增加了 0.95 倍, 均出现极显著差异 ($P < 0.001$)。炎症因子的基因表达预示, 在铁皮石斛糖蛋白刺激 24 h 的促炎效果最佳, 因此后续炎症因子检测均选用 24 h 这个时间点。

2.3 铁皮石斛糖蛋白对 iNOS、COX-2 基因表达的影响

iNOS 可催化 L-精氨酸不断地产生 NO, 且其产生能活化自身的环氧合酶 COX, 而 COX-2 与炎症密切相关^[12]。由图 3A、B 所示, 50、100 $\mu\text{g/mL}$ 各时间点的 iNOS、COX-2 的 mRNA 的表达量均在对照组之上。随着时间的推移, COX-2 与 iNOS 的相对表达量均出现先上升后下降的趋势, iNOS 在 48 h 达到峰值。随着浓度的增加, COX-2 的相对表达量也随之增加。与 24 h 的对照组相比, COX-2 在峰值(24 h, 100 $\mu\text{g/mL}$) 的表达量增加了 4.14 倍, 与 48 h 的对照组相比, iNOS 在峰值(48 h, 50 $\mu\text{g/mL}$) 的表达量增加了 3.49 倍。结果表明, 铁皮石斛糖蛋白能促进炎症关键酶的 mRNA 的表达。

2.4 铁皮石斛糖蛋白对 RAW264.7 细胞炎症因子分泌量的影响

TNF- α 作为肿瘤坏死因子, 主要由巨噬细胞产生, 是机体发生炎症反应的重要促炎因子。IL-1 β 是 IL-1 家族的一种, 同样具有介导炎症的作用, 在生理状态下巨噬细胞 IL-1 β 的分泌量较少。LPS 具有诱导 RAW264.7 细胞大量分泌 IL-1 β 的作用, 当细胞分泌的炎症因子因分泌量过少而不易检查时, 加入 LPS 可促进检测的顺利完成^[13]。如图 4 所示, 随着铁皮

石斛糖蛋白的浓度的升高, 在其浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, TNF- α 的分泌量呈现极显著增加 ($P < 0.001$), 对照组中仅为 0.52 $\mu\text{g/mL}$, 而当铁皮石斛糖蛋白浓度上升为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 分泌量达到 1.99 $\mu\text{g/mL}$ 。IL-1 β 分泌量未能达到检测阈值, 采用 LPS 诱导 1 h 后, 再用铁皮石斛糖蛋白刺激, 其分泌量由 118.52 pg/mL 达到 272.81 pg/mL。此实验结果表明, 铁皮石斛糖蛋白能促进炎症因子分泌。

2.5 铁皮石斛糖蛋白对炎症相关蛋白表达水平的影响

如图 5 所示, 经过铁皮石斛糖蛋白处理 24 h 后巨噬细胞中的 TGF- β 、VEGF 对铁皮石斛糖蛋白呈浓度依赖性变化, 随着浓度的升高, 其蛋白表达量逐渐增强。而炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的蛋白表达也随着石斛糖蛋白浓度的增加而增加, 且在浓度达到 100 $\mu\text{g/mL}$ 时有显著性差异 ($P < 0.05$), TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的相对蛋白表达量分别为 1.41、3.01、1.61。

2.6 铁皮石斛糖蛋白对信号通路 NF- κ B 的影响

为了了解铁皮石斛糖蛋白促进炎症的机制是否与 NF- κ B 信号通路有关, 检测不同浓度铁皮石斛糖蛋白处理后 NF- κ B 信号通路上各项蛋白的变化情况。如图 6 所示, 当铁皮石斛糖蛋白的浓度达到 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, NF- κ B 的上游蛋白 I κ B 的磷酸化程度相比对照组高度显著 ($P < 0.01$) 增加了 0.99, 当铁皮石斛糖蛋白处理的浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, NF- κ B 的磷酸化程度显著 ($P < 0.05$) 增加了 0.85。上述结果表明, 铁皮石斛糖蛋白能显著促进 NF- κ B 信号通路相关蛋白的磷酸化。据文献报道, AMPK 是一种参与能量稳态

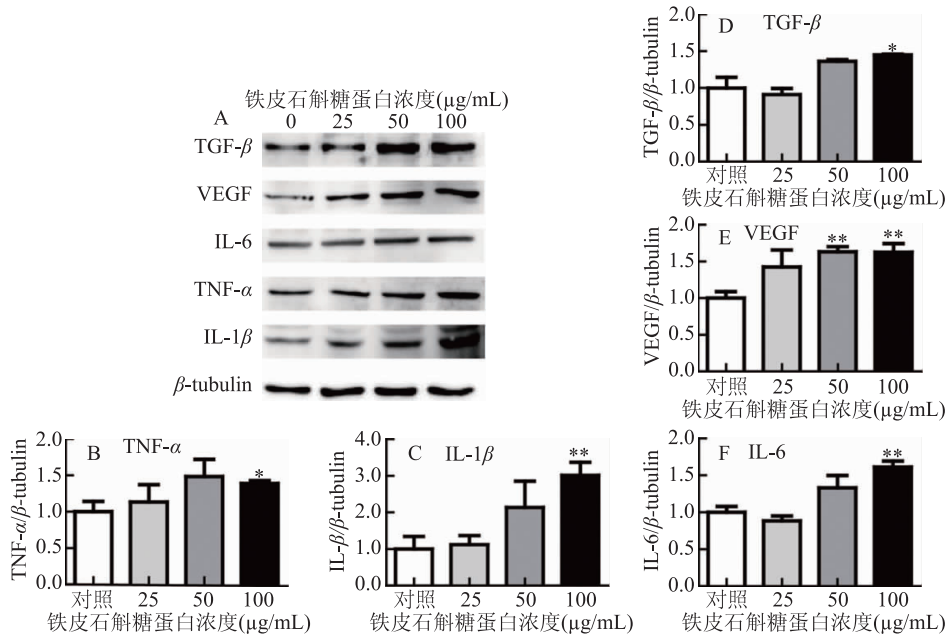


图5 铁皮石斛糖蛋白促进炎症因子蛋白表达

Fig.5 DOKMG promotes the expression of inflammatory cytokines

的酶,能调节炎症反应,与 NF-κB、COX-2 有一定关联^[14]。结果表明,在经过 25 μg/mL 的铁皮石斛糖蛋白刺激后其磷酸化相比对照组有显著增强 ($P < 0.05$)。因此,铁皮石斛糖蛋白可能通过 AMPK 介导的 NF-κB 信号通路促进炎症发生。

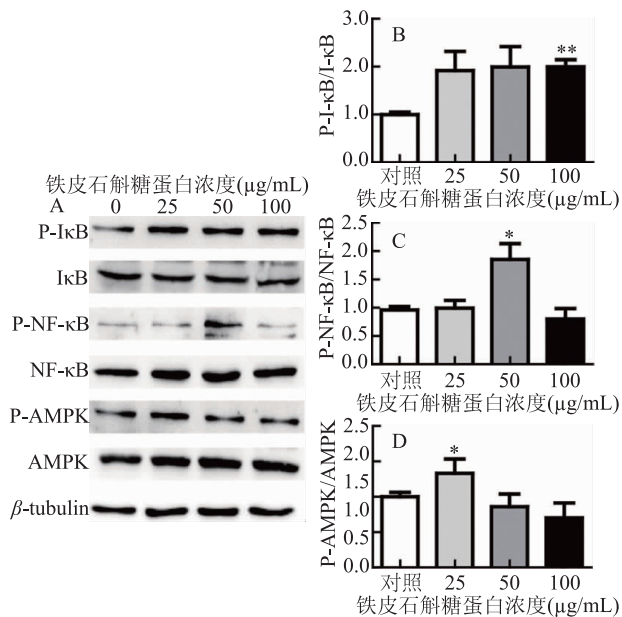


图6 铁皮石斛糖蛋白通过 NF-κB 信号通路促进炎症发生

Fig.6 DOKMG promotes inflammation through the NF-κB signaling pathway

2.7 铁皮石斛糖蛋白对小鼠伤口愈合的影响

通过小鼠皮肤损失模型检测了铁皮石斛糖蛋白是否具有促进伤口愈合的功效。由图 7 可知,相对伤口愈合率以时间依赖的方式增加,铁皮石斛糖蛋白组在第 7 和第 12 d 愈合率达到 65.45%、72.45%,比凡士林为对照的组增加了 15.20%、12.36%。本结果结合前面的细胞及炎症因子的检测,预示着铁皮石斛糖蛋白

可能在受损早期(炎症期)通过调节炎症因子表达来促进小鼠皮肤伤口愈合。

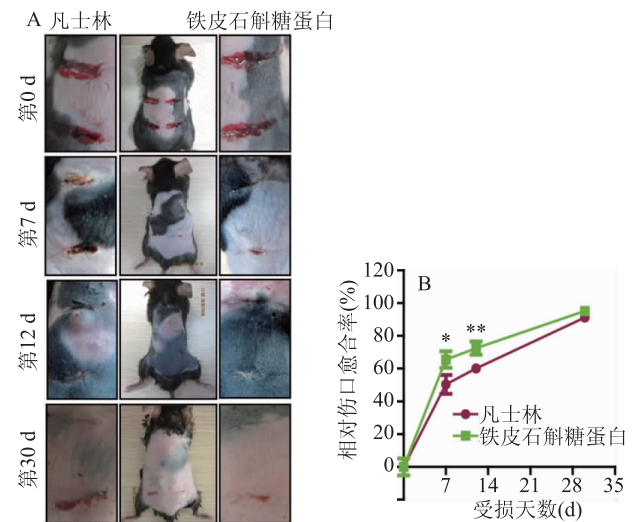


图7 铁皮石斛糖蛋白对小鼠伤口的作用

Fig.7 Effect of DOKMG on wound healing in mice

3 讨论与结论

伤口愈合是一个复杂和动态的过程^[15],包括炎症、肉芽组织形成、瘢痕形成三个阶段。炎症阶段作为伤口愈合的第一个时期,适度的炎症反应有利于伤口的愈合。巨噬细胞在创面修复的炎症期中起到了重要作用^[16-17]。在炎症的初期,巨噬细胞能清除坏死组织,细胞碎片以及其他机体组织中的异物,分泌转化生长因子(TGF-β),成纤维细胞生长因子(FGF)血管生长因子(VEGF)等细胞因子,刺激成纤维细胞增殖迁移,有利于胶原沉积,肉芽组织生成。同时促进新生血管生成^[18]。

NF-κB 是一种核转录因子,与多种免疫细胞的增殖,迁移,分化紧密相关^[19]。Park 等发现,丝素蛋白通过 NF-κB 信号通路调节成纤维细胞的波形蛋

白、周期蛋白、纤维连接蛋白和血管内皮生长因子的表达促进伤口愈合^[20]。低温等离子体可通过诱导活性氧 ROS 的产生,上调磷酸化的 p65,下调 I κ B 的表达,激活 NF- κ B 信号传导途径改变成纤维细胞周期实现伤口愈合^[21]。AMPK 是一种能量传感器,调节能量代谢和机体能量的储存^[22]。AMPK α 1 是巨噬细胞功能和表型极化的重要调节因子,与 NF- κ B、COX-2 有一定的关联^[14]。研究结果发现,以 RAW264.7 为细胞系,铁皮石斛糖蛋白刺激 24 h 后, NF- κ B、I κ B 的磷酸化随着其浓度增加相对对照组有一定的显著性差异,意味着铁皮石斛糖蛋白可能通过 NF- κ B 途径调控炎症。与此同时,在铁皮石斛糖蛋白浓度为 25 μ g/mL 时,AMPK 的磷酸化也相对对照组有显著性增加,这可能暗示着 AMPK 与 NF- κ B 是正相关关系,与 NF- κ B 协同调控炎症。

本研究发现在基因的水平上,铁皮石斛糖蛋白能在一定时间内促进炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和炎症相关酶 COX-2、iNOS 的表达。且随着时间的延长促进作用有所降低。这种现象可以很好地解释铁皮石斛糖蛋白在伤口愈合的炎症期,先起到促炎的作用,使巨噬细胞快速清理细胞碎片和坏死的组织,将体内异物排除,随时间推移,促炎效果减弱,降低持续炎症给机体带来的伤害。为更好地研究铁皮石斛糖蛋白的促炎机理,选用促炎效果最好的 24 h 这个时间点对后续实验研究,发现细胞上清分泌的炎症因子在铁皮石斛糖蛋白的刺激下也有所增加,这种现象同样发生在通过 WB 实验检测的蛋白水平。Western blot 实验同时发现,铁皮石斛糖蛋白激活了 NF- κ B 信号通路导致炎症加深。为验证铁皮石斛糖蛋白是否通过调控炎症促进伤口愈合,建立了小鼠全程皮肤损伤模型,结果发现,相对凡士林组,石斛糖蛋白组的愈合率在第 7 与第 12 d 都出现了显著增加($P < 0.05$)。从体内证明了起初的假设——铁皮石斛糖蛋白通过调控炎症促进伤口愈合。

目前跟炎症相关的文献,大部分认为炎症是对机体是有害的,因此,研究的侧重点主要在药物的抗炎性,而早期适度的炎症反应有利于创面的愈合^[23-24],本文评价了炎症在早期伤口愈合过程中扮演的正向调节作用,发现炎症有利于伤口愈合的特性,但伤口愈合后期炎症同样会延误受损部位的恢复。

总之,本研究在评估铁皮石斛糖蛋白对巨噬细胞炎症的调控的基础上,对铁皮石斛糖蛋白促炎的分子机理进行了初步的探索,明确了铁皮石斛糖蛋白能明显促进炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达。通过本研究,可以为铁皮石斛糖蛋白愈伤作用的机理研究提供重要的理论依据,有利于铁皮石斛在功能食品与膳食方面的开发,促进石斛产业的可持续发展。

参考文献

- [1] 牛晓丹,宋增锋.我国石斛栽培专利技术综述[J].河南科技,2019(24):53-55.
- [2] 吴韵琴,斯金平.铁皮石斛产业现状及可持续发展的探讨[J].中国中药杂志,2010,35(15):2033-2037.
- [3] Zhang Z H, Zhang D D, Dou M M, et al. *Dendrobium*

officinale Kimura et Migo attenuates diabetic cardiomyopathy through inhibiting oxidative stress, inflammation and fibrosis in streptozotocin - induced mice [J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2016, 84: 1350-1358.

[4] Liang J, Chen S, Chen J H, et al. Therapeutic roles of polysaccharides from *Dendrobium officinale* on colitis and its underlying mechanisms [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 185: 159-168.

[5] Zeng Qiang, Chun Hayko, Wing Sum Siu, et al. Inhibitory effect of different *Dendrobium* species on LPS-induced inflammation in macrophages via suppression of MAPK pathways [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2018, 16(7): 481-489.

[6] Govindaraju P, Todd L, Shetye S, et al. CD44 - dependent inflammation, fibrogenesis, and collagenolysis regulates extracellular matrix remodeling and tensile strength during cutaneous wound healing [J]. Matrix Biology, 2019, 76 (1): 314-330.

[7] 赵倩,田洋,白忠彬,食药促进皮肤伤口愈合研究进展[J]. 饮食保健,2019,6(25):296-297.

[8] Landen N X, Li D, Stahle M. Transition from inflammation to proliferation: A critical step during wound healing [J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2016, 73(20): 3861-3885.

[9] Boniakowski, Anna E, Kimball, et al. Macrophage - mediated inflammation in normal and diabetic wound healing [J]. Journal of Immunology, 2017, 199(1): 17-24.

[10] Balaji Swathi, Watson Carey L, Ranjan R et al. Chemokine involvement in fetal and adult wound healing [J]. Advances in Wound Care, 2015, 4(11): 660-672.

[11] 白忠彬,周丽免,洪文龙,等.一种铁皮石斛粗多糖提取方法及多糖含量检测方法:中国,CN110272505A[P].2019-09-24.

[12] 姜南雁,聂刚,邱伟,等.宫颈癌细胞 GM-CSF 与 COX-2/iNOS 表达的相关性研究[J].免疫学杂志,2014,30(3):185-191,201.

[13] 刘远锦,田媛媛,刘博,等. γ -谷维素对脂多糖诱导巨噬细胞 RAW264.7 炎症因子表达的影响[J].食品科学,2015,36(19):238-243.

[14] Yi Chin - Ok, Jeon Byeong Tak, Shin Hyun Joo, et al. Resveratrol activates AMPK and suppresses LPS-induced NF- κ B - dependent COX-2 activation in RAW 264.7 macrophage cells [J]. Anatomy & Cell Biology, 2011, 44(3): 194-203.

[15] Oryan Ahmad, Alemzadeh Esmat, Moshiri Ali. Role of sugar-based compounds on cutaneous wound healing: what is the evidence? [J]. Journal of Wound Care, 2019, 28(3): 13-14.

[16] Huang Yewei, Zhu Qiangqiang, Yang Xiaoying et al. Wound healing can be improved by (-)-epigallocatechin gallate through targeting Notch in streptozotocin - induced diabetic mice [J]. FASEB journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2019, 33(1): 953-964.

[17] Babak Mahdavian Delavary, Willem M van der Veer, Marjolein van Egmond, et al. Macrophages in skin injury and repair [J]. Immunobiology, 2011, 216(7): 753-762.

[18] 刘宸,章宏伟,徐宁,等.糖尿病大鼠创面愈合中巨噬细胞的浸润变化[J].医学研究生学报,2014,27(10):1033-1037.

[19] Dresswllhaus EC, Meffert M K. Cellular specificity of NF- κ B (下转第 316 页)

协同增效作用。

肉苁蓉补肾气、益精血^[24],当归补血活血^[25],黄芪补诸虚不足、益元气、壮脾胃^[26],三者合用,平补阴阳,调养五脏,温而不燥,补而不腻,性味平和,无阴阳偏盛之弊,全方共奏补肾填精养血活血之功效,因而能够发挥增强机体免疫力的功效。动物实验也证明,以3者作为原料制备的复方片剂,可以提高正常小鼠淋巴细胞增殖能力、促进抗原攻击下的迟发型变态反应、提高小鼠体内碳颗粒被清除的速率、巨噬细胞吞噬鸡红细胞的能力和脾细胞抗体生成能力,但是,对溶血素水平、NK细胞活性没有积极影响(数据未列出)。根据《保健食品检验与评价技术规范》之标准^[15],受试样品在细胞免疫功能、体液免疫功能、单核-巨噬细胞功能、NK细胞活性4个方面任2个方面结果为阳性,即具有增强免疫力功能。因此,可以判定本复方片剂具有增强免疫力功能,且主要是通过调节正常小鼠细胞免疫、单核-巨噬细胞功能发挥增强免疫力作用的。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015年版一部)[M]. 2015年版一部. 北京: 化学工业出版社, 2015: 135.
- [2] RunLan Cai R, MeiHua Yan, Yue Shi, et al. Antifatigue activity of phenylethanoid-rich extract from *Cistanche deserticola* [J]. *Phytotherapy Research*, 2010, 24(2): 313-315.
- [3] ZueLing Kong, Athira Johnson, FanChi Ko, et al. Effect of *Cistanche tubulosa* extracts on male reproductive function in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats [J]. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1562-1584.
- [4] Xiaoming Wang, Jinfang Wang, Huanyu Guan, et al. Comparison of the chemical profiles and antioxidant activities of different parts cultivated *Cistanche deserticola* using ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and a 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-based assay [J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 2011-2032.
- [5] XingChao Geng, XueFei Tian, PengFei Tu, et al. Neuroprotective effects of echinacoside in the mouse MPTP model of Parkinson's disease [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2007, 564(1-3): 66-74.
- [6] ZhiMing Li, HuiNuan Lin, Long Gu, et al. *Herba Cistanche* (Rou Cong-Rong): One of the best pharmaceutical gifts of traditional chinese medicine [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2016, 7: 41-48.
- [7] 高云佳, 姜勇, 戴昉, 等. 肉苁蓉润肠通便的药效物质基础 [J]. *中国现代中药*, 2015, 17(4): 307-310.

(上接第310页)

- function in the nervous system [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1043-1065.
- [20] Park ye Ri, Sultan Md Tipu, Park Hyun Jung, et al. NF- κ B signaling is key in the wound healing processes of silk fibroin [J]. *Acta Biomaterialia*, 2018, 67: 183-195.
- [21] Shi Xingmin, Xu Guimin, Zhang GuanJun, et al. Low-temperature plasma promotes fibroblast proliferation in wound healing by ROS-activated NF- κ B signaling pathway [J]. *Current Medical Science*, 2018, 38(1): 107-114

- [8] 王丽超, 刘丹, 姜勇, 等. 基于分子亲和色谱技术的肉苁蓉低分子糖巨噬细胞激活作用靶点群鉴定与机制分析 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(19): 3666-3671.
- [9] 张雨荷, 王丽超, 屠鹏飞, 等. 肉苁蓉低分子糖对巨噬细胞激活作用的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(21): 4207-4210.
- [10] 王翔岩. 肉苁蓉多糖的免疫调节活性及吸收特性研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009.
- [11] 曾群力, 郑一凡, 吕志良. 肉苁蓉多糖的免疫活性作用及机制 [J]. *浙江大学学报*, 2002(4): 284-287.
- [12] Gulinuer Muteliefu, Mingju Liu, Jingfen Lu. Effect of Cistanoside compounds on oxidative stress and immunity [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, 10(3): 157-159.
- [13] Ningqun Wang, Shaozhen Ji, Hao Zhang, et al. *Herba cistanches*: Anti-aging [J]. *Aging and Disease*, 2017, 8(6): 740-759.
- [14] Liwei Dong, Debin Yu, Nuoting Wu, et al. Echinacoside Induces Apoptosis in Human SW480 Colorectal Cancer Cells by Induction of Oxidative DNA Damages [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 14655-14668.
- [15] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范(2003年版) [M]. 北京: 2003: 22-34.
- [16] 王守芹. 紫菜多糖对小鼠NK细胞杀伤活性和淋巴细胞转化功能的上调作用 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2006.
- [17] 孙洋. 四逆散药对及全方对迟发型变态反应的影响及机理研究 [D]. 南京: 中国药科大学, 2003.
- [18] 雷晴, 万屏. 昆明山海棠对小鼠迟发型超敏反应的免疫抑制作用 [J]. *山东医药*, 2012, 52(47): 26-28.
- [19] 刘亚娟, 霍炳杰, 贾喜花, 等. 银翘散在不同煎煮时间下对小鼠网状内皮系统对血流中中性粒粒的吞噬廓清能力和游泳耐力的影响 [J]. *陕西中医*, 2008, 29(8): 1081-1083.
- [20] 任健, 张倩落, 郑莉. 人工虫草多糖对免疫低下小鼠免疫功能的影响 [J]. *第四军医大学学报*, 2007, 28(21): 1967-1969.
- [21] 秦瑞, 来颖. 红蓼对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的影响 [J]. *通化师范学院学报*, 2003, 24(4): 62-63.
- [22] 陈家磊. 车前草多糖对小鼠巨噬细胞免疫功能的调节作用及机制的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [23] 李龙. 坛紫菜和龙须菜多糖对巨噬细胞免疫调节作用的研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2015.
- [24] 朱晓玉, 刘雄, 高建德, 等. 肉苁蓉资源概况及药理作用新进展 [J]. *甘肃中医药大学学报*, 2016, 33(4): 91-94.
- [25] 何立. 当归对神经和免疫系统作用的研究现状与展望 [J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(9): 2282-2284.
- [26] 潘运安, 刘江红, 张志超, 等. 中药黄芪与五指毛桃的免疫调节机制及临床应用进展 [J]. *中医临床研究*, 2019, 11(5): 141-143.

- [22] 阿米拉·阿不拉提, 张楠楠, 古丽拜克热木热合曼, 等. 马利昔通过 AMPK 通路抑制高糖软脂酸诱导大鼠肾小球系膜细胞氧化应激及炎症损伤的作用机制 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(8): 1133-1137.
- [23] 刘宸, 章宏伟, 徐宁, 等. 糖尿病大鼠创面愈合中巨噬细胞的浸润变化 [J]. *医学研究生学报*, 2014, 27(10): 1033-1037.
- [24] 王齐, 曹晓赞, 朱冠姪, 等. 外源性阻断 RAGE 效应对糖尿病小鼠创面中巨噬细胞浸润的影响 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2017, 37(12): 1588-1593.