

人参多糖对 LPS 诱导小鼠巨噬细胞炎症因子生成的抑制作用及其机制

刘鹏飞¹, 朱伟², 万进³, 邹瞭南^{3*}

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006;

2. 广东省中医院 证候临床研究重点实验室, 广州 510120; 3. 广东省中医院, 广州 510120)

[摘要] 目的: 研究人参多糖对脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应的抑制作用及机制。方法: 细胞以 2×10^4 个/mL 的密度接种于 6 孔培养板, 将细胞分为空白组, LPS 组, LPS + 地塞米松组, LPS 加人参多糖组(质量浓度分别为 31.25, 62.6, 125, 250, 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。用 LPS($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 刺激生长良好的 RAW264.7 细胞 24 h 建立体外细胞炎症模型, Griess 试剂法检测一氧化氮(NO)含量, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)含量, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测一氧化氮(NO), TNF- α 和 IL-6 mRNA 的表达, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞 K 基因结合核因子抗体核转录因子- κ B(NF- κ B) p65 蛋白的表达。结果: 与空白组比较, LPS 模型组细胞因子 NO, TNF- α , IL-6 表达量显著升高($P < 0.01$), 炎症模型建立成功。给予人参多糖干预后, 与 LPS 组比较, 31.25 ~ 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的人参多糖可以明显降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放炎症因子 NO, TNF- α 和 IL-6 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$), 抑制 iNOS, TNF- α 和 IL-6 mRNA 的转录($P < 0.05$, $P < 0.01$), 与 LPS 组比较, 125 ~ 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可以显著抑制细胞核内 NF- κ B p65 的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 人参多糖能明显抑制巨噬细胞炎症因子 NO, TNF- α 和 IL-6 过度表达, 从而抑制炎症反应, 其机制可能与抑制相关炎症因子和 mRNA 的表达和抑制 NF- κ B 信号通路相关。

[关键词] 人参多糖; 脂多糖; 小鼠巨噬细胞; 炎症因子; 术后疲劳综合征

[中图分类号] R22; R24; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0102-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181426

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180427.1733.001.html>

[网络出版时间] 2018-04-28 9:00

Inhibitory Effect of Ginseng Radix et Rhizoma Polysaccharide on LPS-induced Inflammatory Factor Formation in Mouse Peritoneal Macrophages and Its Mechanism

LIU Peng-fei¹, ZHU Wei², WAN Jin³, ZOU Liao-nan^{3*}

(1. Second Clinical Medicine School of Guangzhou University of Chinese Medicine,

Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research for Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 510120, China;

3. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-inflammatory effect and mechanism of Ginseng Radix et Rhizoma polysaccharide on inflammation factors caused by lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage in mice. **Method:** RAW264.7 cells were cultured in 6-well plates with the concentration of 2×10^4 cells/mL. The cells was divided into blank group, model group, LPS plus dexamethasone group, LPS plus Ginseng Radix et Rhizoma polysaccharide groups (31.25, 62.6, 125, 250, 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). RAW264.7 cells were polarized to

[收稿日期] 20180122(018)

[基金项目] 广东省科技厅项目(2015A030401082); 广东省科技计划项目(2017B030314166)

[第一作者] 刘鹏飞, 在读硕士, 从事胃肠肿瘤的中西医结合治疗工作, Tel: 020-81887233, E-mail: 18718415616@163.com

[通信作者] * 邹瞭南, 副教授, 副主任医师, 从事胃肠肿瘤的中西医结合治疗工作, Tel: 020-81887233, E-mail: 2409649595@qq.com

inflammatory macrophage by treating with $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS for 24 h. The content of nitric oxide (NO) was assayed by Griess reagent. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of inflammatory mediators, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in cell supernatant. The expressions of iNOS, IL-6, TNF- α mRNA were detected by real-time quantitative PCR (Real-time PCR). And the expression of mitogen-activated protein kinase nuclear transcription factor (NF)- κ B p65 protein was determined by Western blot. **Result:** Compared with blank group, the expressions of NO, IL-6, TNF- α of model group were significantly higher ($P < 0.01$). It meant that the inflammation model was successfully established. Compared with model group, $31.25\text{-}500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of Ginseng Radix et Rhizoma polysaccharide in LPS-induced RAW 264.7 cells greatly inhibited the release of inflammatory mediators, such as NO, TNF- α and IL-6 levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, $31.25\text{-}500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of Ginseng Radix et Rhizoma polysaccharide reduced the concentrations of iNOS, IL-6, TNF- α mRNA ($P < 0.05$, $P < 0.01$). And the expression of p65 protein was decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Ginseng Radix et Rhizoma polysaccharide can significantly inhibit the over expression of macrophage inflammatory factors NO, TNF- α and IL-6. Its mechanism may be related to the inhibition of the expressions of related inflammatory factors mRNA and the inhibition of NF- κ B signaling pathway.

[**Key words**] Ginseng Radix et Rhizoma polysaccharide; lipopolysaccharide; macrophage in mice; inflammatory factor; postoperative fatigue syndrome

术后疲劳综合征是外科术后常见的并发症^[1], 主要临床表现为乏力、嗜睡、食欲减退、注意力不集中和精神抑郁^[2], 术后炎症是诱发术后疲劳综合征的重要因素^[3]。中医传统认为术后疲劳综合征的发生以“虚劳”为主^[4], 中药人参是中医临床的补气要药^[5]。临床研究发现, 人参治疗术后疲劳综合征具有显著的疗效^[6]。前期研究发现, 以人参为君药的益元复健汤在缓解患者术后疲劳的同时可减轻患者的术后炎症反应^[7]。药理研究发现, 人参多糖作为人参药用成分之一^[8], 具有良好的抗抑郁和抗疲劳^[9-10]及降低炎症反应的作用^[11]。但有关人参多糖对炎症因子影响方面的研究鲜见报道。为进一步明确表人参多糖的抗炎作用及其机制, 以脂多糖(LPS)刺激小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 为炎症模型, 观察人参多糖对炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-6 (IL-6) 和一氧化氮(NO)的影响及 mRNA 表达的影响和核转录因子- κ B (NF- κ B) p65 蛋白磷酸化的表达作用, 探讨其抗炎的作用机制, 为人参多糖治疗术后疲劳综合征提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞 小鼠巨噬细胞(RAW264.7 细胞, 购自上海中科院细胞库)。

1.2 药物及试剂 人参多糖(上海源叶生物科技有限公司, 批号 20160415), DMEM 培养基, 胎牛血清(美国 Gibco 公司, 批号分别为 NYA1603,

GAY1209); LPS(美国 Sigma 公司, 批号 094:G9); IL-6, TNF- α 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(广州欣博盛有限公司, 批号分别为 201503, 201504); 逆转录试剂盒(美国 Roche 公司, 批号 342509); 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(瑞士罗氏公司, 批号 75298); trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司, 批号 162905); $5 \times$ 十二烷基硫酸钠(SDS)蛋白电泳上样缓冲液, 聚山梨酯(Tween)-20(北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 批号分别为 894567, 20160413); $10 \times$ 放射免疫沉淀测定(RIPA)缓冲液, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 CAZ7642, 3427); NO 检测试剂盒, p-NF- κ B p65 一抗(上海碧云天试剂有限公司, 批号分别为 4405749, AW213), 山羊抗兔二抗(聚研生物科技有限公司, 批号 201603); 增强型化学发光试剂(ECL)化学发光液(美国 Millipore 公司, 批号 160954)。

1.3 仪器 Varioskan Flash 型多功能酶标仪, NanoDrop 2000C 型微量紫外-可见光光度计(美国 Thermo 公司); TS300 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司); WH-2 型微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂); ChemiDoc XRS system 型凝胶成像系统, DYCZ-24DN 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); HH. CP-7 型二氧化碳培养箱(上海博讯实业有限公司); HH-2 型数显恒温水浴锅(江苏金坛市宏华仪器厂); TZL-5001 型水平摇床(德国 IKA 公司); PrismTM 7500 型

Real-time PCR 仪(美国 ABI 公司);KDC-40 型低速离心机(科大创新股份有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将 RAW264.7 细胞置高糖 DMEM 培养基中,并加入 10% 青霉素及链霉素 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 条件下传代培养。

2.2 Griess 法测定巨噬细胞释放 NO 取对数期生长良好的细胞,调整细胞密度为 2×10^4 个/mL,把调整好的细胞悬液加入到 24 孔板中,每孔加入 1 mL 细胞悬液,置于 CO_2 细胞培养箱 24 h,弃掉细胞上清液,实验组同时加入 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LPS $10 \text{ } \mu\text{L}$ 和不同质量浓度的人参多糖溶液 1 mL,空白组加入 $1010 \text{ } \mu\text{L}$ 的完全培养液,脂多糖最大释放组加入 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LPS $10 \text{ } \mu\text{L}$ 和完全培养液 1 mL,阳性药组加入 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LPS $10 \text{ } \mu\text{L}$ 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松溶液 $250 \text{ } \mu\text{L}$ 及完全培养液 $250 \text{ } \mu\text{L}$ 。将 24 孔板放置 CO_2 培养箱中继续培养 24 h。分别取各孔细胞上清液 $50 \text{ } \mu\text{L}$,加入到 96 孔板中,加入等体积的 Griess 试剂,使用酶标仪测 570 nm 下的吸光度 A 。(根据 NaNO_2 溶液的标准曲线,计算每个样品对应的 NO_2^- 浓度,以反映 NO 的释放量,计算出样品对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的抑制率)。

2.3 ELISA 测定 TNF- α , IL-6 的含量 取对数期生长良好的细胞,调整细胞密度为 2×10^4 个/mL,把调整好的细胞悬液加入到 24 孔板中,每孔加入细胞悬液 1 mL,置于 CO_2 细胞培养箱 24 h,弃掉细胞上清液,实验组同时加入 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LPS $10 \text{ } \mu\text{L}$ 和不同质量浓度的人参多糖溶液 1 mL(人参多糖 31.25, 62.5, 125, 250, 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),空白组加入 $1010 \text{ } \mu\text{L}$ 的完全培养液,脂多糖最大释放组加入 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LPS $10 \text{ } \mu\text{L}$ 和完全培养液 1 mL,阳性药组加入 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LPS $10 \text{ } \mu\text{L}$ 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松溶液 $250 \text{ } \mu\text{L}$ 及完全培养液 $250 \text{ } \mu\text{L}$ 。将 24 孔板放 CO_2 培养箱中继续培养 24 h。24 h 后收集细胞上清液,采用 ELISA 实验,测定各组细胞上清液中 TNF- α , IL-6 的含量。方法按照相关的 ELISA 试剂盒说明书进行测定 A 。

2.4 Real-time PCR 分析 iNOS, TNF- α 和 IL-6 mRNA 水平 取生长状态良好的对数期细胞,调整细胞密度后,以每孔 8×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中,置于 CO_2 细胞培养箱中 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养至细胞贴壁。细胞贴壁之后,弃掉细胞上清液,向每孔中加入含有 LPS(终质量浓度 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的不同质量浓度的样品(人参多糖 31.25, 62.5, 125, 250,

$500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和地塞米松($\text{DXM } 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),空白组只加相同体积的 DMEM 完全培养基,同时设置 LPS 最大释放组(只加终质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LPS),每组设 3 个复孔。将 6 孔板放入 CO_2 培养箱中继续培养 12 h。作用完 12 h 后,吸弃上清液,用 PBS 清洗 2 次,按每 trizol 1 mL 加入三氯甲烷 0.2 mL ,每管加入三氯甲烷 $200 \text{ } \mu\text{L}$,用力上下剧烈摇晃震荡 20 s,室温静置 10 min。以 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 15 min,加入异丙醇 $500 \text{ } \mu\text{L}$,上下剧烈震荡 20 s 左右,室温静置 10 min,以 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 15 min,吸弃上清保留底部沉淀物。加入 75% 乙醇,上下颠倒混匀,以 $7500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 5 min,弃去上清液。加入无酶水 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 溶解沉淀, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 金属浴 10 min。取上述溶解的 RNA 溶液 $1.5 \text{ } \mu\text{L}$ 于微量紫外/可见分光光度计测定 260 nm 及 280 nm 的吸光度 A 比值并记录其 total RNA 的浓度。采用罗氏逆转录试剂盒,根据 NCBI 基因库中查询得到的相关基因序列,采用 Primer 5 引物设计软件设计。内参 GAPDH 基因引物上游序列 5'-TTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATG-3'(25 bp),下游序列 5'-TGGGATAGGGCCTCTCTTGC-3'(20 bp); iNOS 基因引物上游序列 5'-CGGCAAACATGACTTCAGGC-3'(20 bp),下游序列 5'-GCACATCAAAGCGGCCATAG-3'(25 bp); TNF- α 基因引物上游序列 5'-GGGGATTATGGCTCAGGGTC-3'(20 bp),下游序列 5'-CGAGGCTCCAGTGAATTCCG-3'(20 bp); IL-6 基因引物上游序列 5'-TACTCGGCAAACCTAGTGGC-3'(20 bp),下游序列 5'-GTGTCCCAACATTCATATTGTTCAGT-3'(25 bp)。采用 FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)试剂盒的说明配制反应体系;反应条件:包括 $2 \times \text{SYBRGreen } 10 \text{ } \mu\text{L}$,引物 $2 \text{ } \mu\text{L}$,cDNA 模板 $2 \text{ } \mu\text{L}$,灭菌水 $6 \text{ } \mu\text{L}$,共 $20 \text{ } \mu\text{L}$,混合均匀,进行反转录,将得到的 cDNA 产物。按照扩增试剂盒的程序预变性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min,变性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 34 s 退火,45 个循环。以 GAPDH 做为内参,扩增完后用 SDSShell 软件进行数据分析以得到目的基因的相对表达量。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 NF- κ B p65 蛋白表达 取生长状态良好的对数期细胞,调整细胞密度后,以每孔 10×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中,培养至贴壁。后向每孔中加入不同质量浓度的样品(人参多糖 62.5, 125, 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),空白组只加相同体积的 DMEM 完全培养基,再加 LPS($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),同时设置 LPS 最大释放组(只加终

质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LPS), 作用 12 h 后提取核蛋白, BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定总蛋白浓度。根据 BCA 法测得的蛋白浓度, 调整体积后变性, 配置后分离胶和浓缩胶。分离胶和浓缩胶配置完成以后采用 Western blot 检测各组核蛋白的 NF- κ B p65 蛋白表达量的变化。选择总蛋白 $40 \mu\text{g}$ 和 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 进行凝胶电泳, 电泳结束后转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上进行 100 min 的转膜, 结束后将 PVDF 膜置于含 5% 脱脂奶粉中, 室温封闭 1 h 后, 将配制好的一抗 [以抗体: 5% 脱脂牛奶 (V/V) 1:1 000 进行稀释配制, p-NF- κ B p65 1:1 000, GAPDH 1:1 000] 均匀覆盖于 PVDF 膜表面, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 回收一抗, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 [抗体-5% 脱脂牛奶 (V/V) 1:2 000 进行稀释配制] 室温孵育 2 h。以 GAPDH 为内参。采用 Bio-Rad 凝胶成像系统系统进行显影, 用 Image Lab 软件中的体积工具来分析和计算目的蛋白条带相对于内参的灰

度比值。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对内毒素诱导的 RAW264.7 细胞产生 NO, TNF- α , IL-6 的影响 脂多糖作用于 RAW264.7 细胞, 细胞上清液中的 NO, TNF- α 和 IL-6 分泌量明显增加, 与空白组比较, 具有显著的差异性 ($P < 0.01$), 说明炎症模型建立成功。人参与多糖各质量浓度组细胞上清液中的 NO, TNF- α 和 IL-6 含量明显低于脂多糖组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。其中当人参与多糖质量浓度为 $250, 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞上清液中的 NO 显著低于 LPS 组 ($P < 0.01$), 当人参与多糖质量浓度为 $125, 250, 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞上清液中的 TNF- α 和 IL-6 显著低于 LPS 组 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 人参与多糖对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞分泌 NO, TNF- α , IL-6 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of Ginseng Radix et Rhizoma polysaccharide on content of NO, TNF- α , IL-6 in LPS induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-6/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	2.88 ± 0.02	51.05 ± 0.48	562.17 ± 10.57
LPS	-	$42.86 \pm 0.57^{1)}$	$105\ 647.73 \pm 120.83^{1)}$	$10\ 881.45 \pm 352.23^{1)}$
地塞米松	-	19.23 ± 0.17	$54\ 190.13 \pm 938.12$	$2\ 223.89 \pm 276.45$
人参与多糖	31.25	$41.45 \pm 0.20^{2)}$	$99\ 657.81 \pm 1\ 238.43^{2)}$	$9\ 207.39 \pm 377.21^{2)}$
	62.5	$39.06 \pm 0.02^{2)}$	$93\ 872.99 \pm 1\ 354.96^{2)}$	$8\ 503.89 \pm 267.38^{2)}$
	125	$36.52 \pm 0.28^{2)}$	$73\ 854.83 \pm 1\ 245.62^{3)}$	$7\ 182.75 \pm 246.78^{3)}$
	250	$31.60 \pm 0.74^{3)}$	$68\ 870.08 \pm 1\ 237.25^{3)}$	$6\ 772.23 \pm 106.35^{3)}$
	500	$25.42 \pm 0.173^{3)}$	$54\ 190.93 \pm 1\ 030.80^{3)}$	$5\ 314.36 \pm 347.43^{3)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

3.2 对 LPS 诱导的巨噬细胞 iNOS, TNF- α , IL-6 mRNA 的影响 LPS 作用于 RAW264.7 细胞, 细胞上清液中的 iNOS, TNF- α , IL-6 mRNA 分泌量明显增加, 与空白组比较, 具有显著的差异性 ($P < 0.01$)。人参与多糖各质量浓度组细胞上清液中的 IL-6 mRNA 含量明显低于 LPS 组 ($P < 0.05, P < 0.01$), 其中当人参与多糖质量浓度为 $125, 250, 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞上清液中的 iNOS, TNF- α , IL-6 mRNA 显著低于 LPS 组 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 对 LPS 诱导的巨噬细胞 NF- κ B p65 蛋白的影响 与空白组比较, LPS 可以使 p-NF- κ B p65 蛋白显著表达, 激活 NF- κ B 信号通路, 当不同质量浓度的人参与多糖共同作用于模型组, NF- κ B p65 蛋白被

明显抑制 ($P < 0.05, P < 0.01$), 当人参与多糖质量浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 此种抑制效果最为显著, 人参与多糖可通过抑制 NF- κ B 信号通路, 抑制炎症因子产生。见图 1 和表 3。

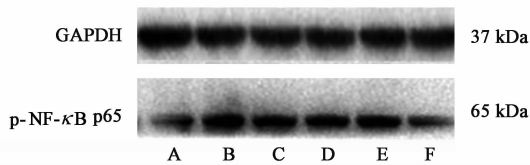
4 讨论

炎症是机体组织受外界有害刺激时所产生的的一种保护性应答反应, 炎症反应的产生伴随着促炎症因子的释放^[12]。正常情况下, 抗炎性细胞因子与促炎症性细胞因子之间存在着正负反馈机制, 共同调节炎症反应程度, 当机体受到手术刺激时, 抗炎性细胞因子受到抑制, 促炎症性细胞因子的过度释放, 诱发术后炎症反应^[13]。巨噬细胞是免疫效应细胞, 在机体的免疫系统中起着非常重要的作用, 也是体内启动

表 2 人参多糖对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞分泌 iNOS, TNF- α , IL-6 mRNA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Ginseng Radix et Rhizoma polysaccharide on content of iNOS, TNF- α , IL-6 mRNA in LPS induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	iNOS	TNF- α	IL-6
空白	-	1.05 \pm 0.03	1.45 \pm 0.08	420.38 \pm 45.13
LPS	-	26.08 \pm 1.43 ¹⁾	18.85 \pm 1.20 ¹⁾	8 870.56 \pm 234.43 ¹⁾
地塞米松	-	5.15 \pm 0.25	6.09 \pm 0.95	2 489.43 \pm 132.78
人参多糖	31.25	23.04 \pm 1.05 ²⁾	17.43 \pm 1.03 ²⁾	8 160.49 \pm 201.35 ²⁾
	62.5	21.15 \pm 0.98 ²⁾	14.35 \pm 0.98 ²⁾	7 523.54 \pm 190.48 ²⁾
	125	17.40 \pm 1.42 ³⁾	11.23 \pm 0.83 ³⁾	5 633.67 \pm 140.45 ³⁾
	250	10.40 \pm 0.88 ³⁾	9.43 \pm 0.78 ³⁾	4 521.89 \pm 120.98 ³⁾
	500	8.42 \pm 0.78 ³⁾	7.03 \pm 0.71 ³⁾	3 001.09 \pm 101.43 ³⁾



A. 空白组; B. LPS 组; C. 人参多糖 62.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 人参多糖 125 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; E. 人参多糖 250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; F. LPS + 人参多糖 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 1 人参多糖对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 p-NF- κ B p65 蛋白表达量的影响

Fig. 1 Effect of Ginseng Radix et Rhizoma polysaccharide p-NF- κ B p65 expression in LPS induced RAW264.7 cells

表 3 人参多糖对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 p-NF- κ B p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Ginseng Radix et Rhizoma polysaccharide p-NF- κ B p65 expression in LPS induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	p-NF- κ B p65/GAPDH
空白	-	0.12 \pm 0.05
LPS	-	0.96 \pm 0.13 ¹⁾
地塞米松	-	0.94 \pm 0.10
人参多糖	31.25	0.74 \pm 0.12 ²⁾
	62.5	0.61 \pm 0.11 ²⁾
	125	0.49 \pm 0.12 ³⁾

炎症介质产生的中心细胞^[14]。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的成分,可以刺激巨噬细胞等免疫细胞的活化,引起全身的炎症反应,LPS 模型是经典的炎症模型^[15]。在实验中,1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 刺激 RAW264.7 细胞 24 h 后,LPS 组细胞上清液中 NO, TNF- α , IL-6 释放量较空白组显著上升,表明炎症模型造模成功。

术后炎症因子的释放和术后疲劳综合征的发生联系密切。NO 是氧化应激反应中的主要介质,氧化应激能参与并加剧炎症反应,因此,NO 的水平与

多种炎症疾病的发病机制密切相关^[15]。TNF- α 是全身或局部炎症反应早期重要细胞因子, TNF- α 的分泌不但可以促进 IL-1, IL-8 等炎症细胞因子的释放^[16],其浓度的升高可引起神经性疼痛从而诱发术后疲劳^[17-18]。IL-6 作为一种多效性细胞因子,是炎症反应与免疫调节重要细胞因子之一,术后 IL-6 的异常升高可引起患者情绪低落诱发术后疲劳^[19]。本研究表明人参多糖对 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 激活的 RAW264.7 细胞产生 NO, TNF- α , IL-6 和分泌相应的炎症因子 mRNA 起到抑制作用,并呈现浓度依赖关系,说明人参多糖可能是通过抑制细胞内相关炎症因子 mRNA 的表达,抑制炎症因子的分泌,起到降低炎症反应的作用,与相关研究结果一致^[20],说明人参治疗术后疲劳综合征可能与人参多糖抑制术后炎症反应相关。

NF- κ B 是一个多向性核转录因子,可调节多种细胞因子、酶等基因的表达,能调控机体免疫、炎症反应和细胞增殖,影响炎症介质、黏附分子等的表达,从而调节蛋白合成与表达权^[21-22]。p65 是 NF- κ B 家族里非常重要的一种蛋白,也是炎症过程中重要的信号分子,是一个较为公认的活化巨噬细胞通路蛋白,其活化后可大量的分泌各种炎症因子^[23]。本实验研究结果表明,1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 刺激诱导巨噬细胞后,上调细胞内磷酸化的 NF- κ B p65 蛋白的表达,说明 LPS 可以使 NF- κ B p65 蛋白表达水平明显升高,激活 NF- κ B 信号通路。当不同浓度的人参多糖样品作用于细胞模型之后, NF- κ B p65 蛋白表达磷酸化被人参多糖所抑制,当人参多糖为 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑制效果最明显。

综上所述,人参多糖能明显抑制巨噬细胞炎症因子 NO, TNF- α 和 IL-6 过度表达,从而抑制炎症反

应,其机制可能与抑制相关炎症因子和 mRNA 的表达和抑制 NF- κ B 信号通路相关。

[参考文献]

[1] 陈红燕,庞凤舜,秦有. 术后疲劳综合征评估的研究进展[J]. 岭南现代临床外科, 2016, 16(3): 357-360.

[2] Zargar-Shoshtari K, Hill A G. Postoperative fatigue: a review[J]. World J Surg, 2009, 33(4): 738-745.

[3] 秦有,庞凤舜,王浩,等. 术后疲劳相关因素及评估方法的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19(10): 1146-1149.

[4] 陈洁生,黎芳,吴申锋,等. 参芪扶正注射液治疗腹部术后疲劳综合征疗效观察[J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(3): 477-478.

[5] 佟彤,董文茜,梁晓雨,等. 人參多糖免疫调节作用的实验研究[J]. 北京中医药, 2016, 35(1): 41-45.

[6] 陈洁生,黎芳,吴申锋,等. 参芪扶正注射液治疗腹部术后疲劳综合征疗效观察[J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(3): 477-478.

[7] 陈国滨. 益元复健汤治疗腹腔镜结直肠癌术后疲劳综合征的临床研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.

[8] 佟彤,董文茜,梁晓雨,等. 人參多糖免疫调节作用的实验研究[J]. 北京中医药, 2016, 35(1): 41-45.

[9] Irshad Hosenie, 钱进军, 张维宁, 等. 人參果胶酸性组分调控 BDNF/TrkB 信号通路抗抑郁样行为的研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(7): 1551-1554.

[10] WANG J, LI S, FAN Y, et al. Anti-fatigue activity of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 130(2): 421-423.

[11] Ahn J Y, Choi I S, Shim J Y, et al. The immunomodulator ginsan induces resistance to experimental sepsis by inhibiting Toll-like receptor-mediated inflammatory signals[J]. Eur J Immunol, 2006, 36(1): 37-45.

[12] Suliburk J, Helmer K, Moore F, et al. The gut in systemic inflammatory response syndrome and sepsis.

Enzyme systems fighting multiple organ failure[J]. Eur Surg Res, 2008, 40(2): 184-189.

[13] 闫长红,许艳春. 腹腔镜胆囊切除术对患者血清 IL-6, IL-10, TNF- α 水平的影响[J]. 宁夏医科大学学报, 2016, 38(4): 469-471.

[14] 邹桂欣,孙小玲,王光函,等. 鸢尾甲黄素 A 对脂多糖诱导小鼠 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的调节作用[J]. 中国药业, 2017, 26(22): 1-3.

[15] 张梦雅,王春丽,杜先华,等. 血根碱通过 STAT3 通路对 LPS 致 RAW264.7 细胞炎症的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(6): 714-718.

[16] Krabbe K S, Reichenberg A, Yirmiya R, et al. Low-dose endotoxemia and human neuropsychological functions[J]. Brain Behav Immun, 2005, 19(5): 453-460.

[17] Leung L, Cahill C M. TNF-alpha and neuropathic pain: a review [J]. J Neuroinflammation, 2010, doi: 10.1186/1742-2094-7-27.

[18] 周锋,张培趁,余震,等. ω -3 多不饱和脂肪酸对胃癌病人术后炎症反应和疲劳综合征的影响[J]. 肠外与肠内营养, 2012, 19(1): 8-11.

[19] Dinan T, Siggins L, Scully P, et al. Investigating the inflammatory phenotype of major depression: focus on cytokines and polyunsaturated fatty acids [J]. J Psychiatr Res, 2009, 43(4): 471-476.

[20] 吴晓民,赵丹,朱艳萍,等. 人參多糖的药理作用与临床研究进展[J]. 人参研究, 2016, 28(5): 40-46.

[21] 孙中仪,田纪伟. NF- κ B 信号通路与椎间盘退变的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(23): 2162-2164.

[22] 江泽波,李思明,赵晋,等. 猪苓多糖对 LPS 诱导的 J774 炎症模型的抗炎作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(3): 156-159.

[23] WANG C, LIU X, LIU Y, et al. Zinc finger protein 64 promotes Toll-like receptor-triggered proinflammatory and type I interferon production in macrophages by enhancing p65 subunit activation[J]. J Biol Chem, 2013, 288(34): 24600-24608.

[责任编辑 周冰冰]