

• 论著 •

芦荟多糖对体外培养人表皮细胞分泌细胞因子及一氧化氮的影响

陈晓东 黄丽英 吴伯瑜 江琼 王中成 林新华

【摘要】 目的 研究芦荟多糖对体外培养人表皮细胞分泌细胞因子及一氧化氮(NO)的影响。方法 测定经 25、50、100、200 和 400 mg/L 不同浓度芦荟多糖作用后的人表皮细胞培养上清液中转化生长因子- α (TGF- α)、TGF- β_1 、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子(TNF)及 NO 的水平;对照组则用等体积的细胞培养液处理。结果 与对照组比较,经芦荟多糖作用后,培养液中 TGF- α 、TGF- β_1 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF 水平呈不同程度升高,其差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);且随着芦荟多糖作用浓度的增加,其效应与剂量明显相关($P < 0.01$);而 NO 水平与对照组比较呈显著性下降($P < 0.01$),量-效关系明显($P < 0.01$)。结论 芦荟多糖促进人表皮细胞分泌 TGF- α 、TGF- β_1 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 TNF,而对 NO 释放则具有抑制作用。

【关键词】 芦荟多糖; 表皮细胞; 细胞因子; 一氧化氮

Effect of aloe vera polysaccharide on the release of cytokines and nitric oxide in cultured human keratinocytes

CHEN Xiao-dong*, HUANG Li-ying, WU Bo-yu, JIANG Qiong, WANG Zhong-cheng, LIN Xin-hua. * Provincial Burns Institute, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of polysaccharide extracted from Aloe Barbadensis on the release of cytokines and nitric oxide (NO) in cultured human keratinocytes. **Methods** The levels of transforming growth factor- α (TGF- α), TGF- β_1 , interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, tumor necrosis factor (TNF) and NO in the supernatants of keratinocyte culture in which culture media containing 25, 50, 100, 200, 400 μ g/ml, respectively of aloe polysaccharide were assayed. In the control group equal volume of media without the polysaccharide was used. **Results** Compared with control group, the levels of TGF- α , TGF- β_1 , IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF in the supernatants of cultured keratinocytes were significantly higher when aloe polysaccharide was added ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and they were positively correlated to the concentration of aloe polysaccharide ($P < 0.01$). However, aloe polysaccharide markedly decreased the level of NO in a dose dependent manner ($P < 0.01$). **Conclusion** Aloe polysaccharide could promote keratinocytes to secrete TGF- α , TGF- β_1 , IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF, and inhibit the release of NO.

【Key words】 aloe polysaccharide; keratinocyte; cytokine; nitric oxide

细胞因子及一氧化氮(NO)在创面愈合过程中具有重要的作用,它们可以调节愈合过程中的多种细胞反应,并影响到细胞的增殖、迁移、细胞外基质合成与释放等^[1]。芦荟是一种多年生百合科芦荟属肉质的草本植物。作为一种传统的中草药,芦荟具有良好的抑菌、抗炎、促进创面愈合等药理作用^[2,3],其中芦荟多糖成分起着主要作用。本研究中从药用库拉索芦荟中提取芦荟纯多糖作用于人表皮细胞,研究芦荟多糖对表皮细胞体外分泌细胞因子及 NO 的

影响,并探讨芦荟多糖在创面愈合过程中可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器:选择库拉索芦荟制备芦荟多糖,应用醇沉淀法提取粗多糖后,经 Sephadex G-100 凝胶柱层析纯化,并通过气相色谱、红外光谱、核磁共振光谱、高碘酸氧化、Smith 降解等方法,确定该纯化的芦荟多糖为 β -D-乙酰化甘露聚糖,其糖含量为 81.11%。无血清角朊细胞培养基(DK-SFM)及胰酶购自 Gibco 公司,其他化学试剂均为 Sigma 公司的产品。主要的设备有:Bio-Tek ELx 800 酶标仪(美国)、SHEL-LAB 二氧化碳(CO₂)培养箱(美国)、FD-1 冷冻干燥机(北京)。

1.2 实验方法

1.2.1 分组:将人表皮细胞随机分为对照组和实验组,对照组加 DK-SFM 培养液,实验组分别加入以

基金项目:福建省科技厅重点资助课题(2002I015);福建省卫生厅青年基金资助项目(2001-1-15)

作者单位:350001 福州,福建医科大学附属协和医院福建省烧伤研究所(陈晓东,吴伯瑜,江琼);福建医科大学药学院(黄丽英,王中成,林新华)

作者简介:陈晓东(1968-),男(汉族),福建省福州市人,副教授,主要从事烧伤基础与临床方面的研究。

终浓度为 25、50、100、200 和 400 mg/L 芦荟多糖的 DK-SFM 培养液,该培养液临用时配制。

1.2.2 细胞培养收集上清液:取 3~4 代融合培养的人表皮细胞,经等体积、质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶和 0.02% 的乙二胺四乙酸(EDTA)消化后,用 DK-SFM 培养液配制成单细胞悬液,按每孔细胞数为 3×10^4 个接种于 12 孔培养板中,加入培养液,置 36.5 °C、体积分数为 5% 的 CO₂,培养 24 h;贴壁后更换为实验组和对照组培养液,每孔 2 ml,置 36.5 °C、5% CO₂ 继续培养,实验组和对照组各设 8 个复孔;作用 48 h 后,吸取培养上清液,置于 -80 °C 保存。

1.2.3 转化生长因子- α 、 β_1 (TGF- α 、 β_1)及细胞因子检测:TGF- β_1 、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 和 IL-8 的测定采用酶联免疫吸附法(ELISA),TGF- β_1 试剂盒由上海茂元科技有限公司提供,IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 试剂盒由法国 Diaclone 公司提供。TGF- α 、肿瘤坏死因子(TNF)测定采用放射免疫法,试剂盒由解放军总医院科技开发中心放射免疫研究所提供。将上清液冷冻、干燥、浓缩后,用试剂盒中的样品稀释液复溶样本,浓缩样本的检测严格按说明书进行。

1.2.4 NO 测定:细胞培养上清液中 NO 测定采用 Green 法^[4]。

1.3 统计学处理:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据比较采用 ANOVA 分析,数据相互关系采用相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。统计资料采用 SPSS 12.0 统计软件包完成。

2 结果

2.1 表皮细胞培养液中 TNF 及 NO 水平(表 1):不同浓度芦荟多糖组 TNF 水平均上升,且增加趋势与剂量明显相关($r = 0.974, P < 0.01$),400 mg/L 芦荟多糖组中 TNF 水平与对照组及 25 mg/L 芦荟多糖组比较,其差异具有显著性(P 均 < 0.05);不同

浓度芦荟多糖组培养液中的 NO 水平与对照组比较均呈不同程度下降,差异具有显著性(P 均 < 0.01),并且随芦荟多糖浓度的增加而下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),量-效关系显著($r = -0.815, P < 0.01$)。

表 1 芦荟多糖对表皮细胞体外分泌 TNF 及 NO 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Levels of TNF and NO in the culture medium of keratinocytes($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	TNF(mg/L)	NO(μ mol/L)
对照组	2.26±0.13	95.43±7.44
芦荟多糖 25 mg/L 组	2.32±1.04	61.06±7.95**
50 mg/L 组	2.40±0.70	54.18±10.24**
100 mg/L 组	2.51±0.95	50.26±11.46**▲
200 mg/L 组	2.95±1.08	43.76±7.10**▲▲▲
400 mg/L 组	3.23±1.01*▲	44.14±5.50**▲▲▲

注:与对照组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与芦荟多糖 25 mg/L 组比较:▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与芦荟多糖 50 mg/L 组比较:△ $P < 0.05$

2.2 表皮细胞培养液中 TGF- α 和 TGF- β_1 的水平(表 2):与对照组比较,不同浓度芦荟多糖组培养液中 TGF- α 水平呈不同程度升高,其差异具有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);400 mg/L 芦荟多糖组中 TGF- β_1 水平与对照组比较呈显著性升高($P < 0.05$);随着芦荟多糖作用浓度的增加,培养液中 TGF- α 和 TGF- β_1 水平也呈不同程度的增加,其趋势与剂量有明显相关性(r 值分别为 0.867 和 0.996, P 均 < 0.01)。

2.3 表皮细胞培养液中 ILs 的水平(表 2):不同浓度芦荟多糖组培养液中 IL-1 β 、IL-6 及 IL-8 水平与对照组比较呈不同程度升高,其中芦荟多糖各组中 IL-1 β 和 IL-6 水平及 100、200 和 400 mg/L 芦荟多糖组中 IL-8 水平均高于对照组,其差异具有显著性(P 均 < 0.01),并随着芦荟多糖浓度的增加,培养液中 IL-1 β 、IL-6 及 IL-8 水平也呈不同程度增加,量-效关系显著(r 值分别为 0.910、0.935 和 0.856, P 均 < 0.01)。

表 2 表皮细胞培养液中 TGF- α 、TGF- β_1 和 ILs 的水平($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Levels of TGF- α , TGF- β_1 and interleukins in the culture medium of keratinocytes($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	TGF- α (ng/L)	TGF- β_1 (ng/L)	IL-1 β (ng/L)	IL-6(ng/L)	IL-8(ng/L)
对照组	1.87±0.52	2.04±0.80	8.67±1.65	30.55±5.61	146.99±28.64
芦荟多糖 25 mg/L 组	2.56±0.56*	2.17±0.64	12.47±1.52**	71.62±14.11**	151.00±16.63
50 mg/L 组	2.94±0.94*	2.27±0.71	13.24±1.53**	81.97±24.04**	154.53±33.11
100 mg/L 组	3.09±0.87*	2.32±1.05	13.50±2.40**	83.49±17.11**	260.73±31.64**▲▲▲
200 mg/L 组	3.22±1.52**	2.51±1.08	14.02±1.27**	91.75±21.21**▲	316.84±87.45**▲▲▲
400 mg/L 组	3.44±0.75**	2.97±1.04*	14.49±3.05**▲	99.72±19.20**▲▲	330.16±91.20**▲▲▲*

注:与对照组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与芦荟多糖 25 mg/L 组比较:▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与芦荟多糖 50 mg/L 组比较:△ $P < 0.01$;与芦荟多糖 100 mg/L 组比较:* $P < 0.05$

3 讨论

研究表明,芦荟具有促进创面愈合等功能,而芦荟多糖则是芦荟中主要生物活性成分^[5,6]。创面愈合首先表现为局部炎症反应,由多种炎性介质介导,这种局部炎症反应不仅是清除坏死组织和异物所必需,而且可同时启动和调控创面修复,进入细胞增殖修复状态,在表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、TGF- α 和TGF- β_1 等细胞因子作用下,促进了细胞增殖及细胞间基质蛋白合成^[7-9]。

本研究表明,芦荟多糖能促进表皮细胞以自分泌形式合成TGF- α ,TGF- α 可刺激表皮细胞、成纤维细胞和内皮细胞增殖,对创面愈合起促进作用;芦荟多糖可促进表皮细胞合成TGF- β_1 ,TGF- β_1 在体内则可刺激血管内皮细胞、成纤维细胞的增殖,加速血管化和上皮化,促进胶原合成与成熟^[10]。有研究表明,芦荟可通过促进创面组织的胶原更新来影响创面愈合^[11]。芦荟多糖能够不同程度地促进表皮细胞分泌IL-1 β 、IL-6、IL-8和TNF,其分泌的IL-1 β 、IL-6、IL-8和TNF一方面可能作为炎症介质参与局部炎症反应,另一方面对自身或其他细胞的增殖起不同调节作用。有资料显示,TNF作为一种创伤局部介质,能促进成纤维细胞成熟,或在IL-1及IL-6共同作用下,可诱导组织损伤后的修复作用^[9];而IL-6对表皮细胞也有活化增殖作用^[12],并且能间接诱导表皮细胞的迁移^[13];IL-8是一种前炎性细胞因子,它不但可促进表皮细胞生长、增殖,而且可加速新生血管形成^[10]。

NO在炎症过程中可能具有调节炎症反应的作用。研究表明,低浓度NO可促进体外培养表皮细胞增生,高浓度时则可抑制其增生并促进细胞表达终末分化标记物^[14,15]。本研究结果显示,芦荟多糖对表皮细胞体外分泌NO有抑制作用,可能有利于表皮细胞的生长和胶原合成,其机制可能与细胞因子间构成网络来调控局部炎症反应及创面修复有关。

参考文献:

- 1 屈纪富,郝利,孙薇,等.细胞因子在创伤愈合过程中的变化及其意义的研究进展[J].创伤外科杂志,2003,5:74-76.
- 2 Muller M J, Hollyoak M A, Moaveni Z, et al. Retardation of wound healing by silver sulfadiazine is reversed by Aloe vera and nystatin[J]. Burns, 2003, 29: 834-836.
- 3 Avijgan M. Phytotherapy: an alternative treatment for non-healing ulcers[J]. J Wound Care, 2004, 13: 157-158.
- 4 Blanco F J, Geng Y, Lotz M. Differentiation-dependent effects of IL-1 and TGF-beta on human articular chondrocyte proliferation are related to inducible nitric oxide synthase expression [J]. J Immunol, 1995, 154: 4018-4026.
- 5 Choi S W, Son B W, Son Y S, et al. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from Aloe vera [J]. Br J Dermatol, 2001, 145: 535-545.
- 6 Somboonwong J, Thanamitramanee S, Jariyapongskul A, et al. Therapeutic effects of Aloe vera on cutaneous microcirculation and wound healing in second degree burn model in rats [J]. J Med Assoc Thai, 2000, 83: 417-425.
- 7 付小兵,盛志勇.现代高新技术与创伤以及创伤修复[J].中国危重病急救医学,2000,12:451-453.
- 8 付小兵,程鹰,盛志勇.有关创伤修复与组织再生的现代认识[J].中国危重病急救医学,2002,14:67-68.
- 9 付小兵,李校坤,赵建钢.创伤修复的分子生物学.见:付小兵,王德文,主编.现代创伤修复学[M].北京:人民军医出版社,1999. 162-198.
- 10 肖仕初,夏照帆,杨王君,等.成纤维细胞促进真皮替代物血管化的作用机制[J].中国修复重建外科杂志,2003,17:100-103.
- 11 Chithra P, Sajithlal G B, Chandrakasan G. Influence of Aloe vera on collagen turnover in healing of dermal wounds in rats [J]. Indian J Exp Biol, 1998, 36: 896-901.
- 12 魏志平,殷金珠,沈力.重组人IL-6对角质细胞体外增殖分化影响的研究[J].临床皮肤科杂志,1996,5:257-260.
- 13 Gallucci R M, Sloan D K, Heck J M, et al. Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration [J]. J Invest Dermatol, 2004, 122: 764-772.
- 14 Ormerod A D, Copeland P, Hay I, et al. The inflammatory and cytotoxic effects of a nitric oxide releasing cream on normal skin [J]. J Invest Dermatol, 1999, 113: 392-397.
- 15 Krischel V, Bruch-Gerharz D, Suschek C, et al. Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts [J]. J Invest Dermatol, 1998, 111: 286-291.

(收稿日期:2004-08-12 修回日期:2004-09-28)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

肠内给予精氨酸能促进肠缺血-再灌注时早期促炎转录因子的表达

美国学者最近报道了肠内给予精氨酸和谷氨酰胺对肠缺血-再灌注损伤时早期致炎因子的影响。研究人员将肠系膜上动脉夹闭60 min后松夹6 h,在夹闭后立即向空肠袋内注满精氨酸或谷氨酰胺(60 mmol/L),并设对照。应用电泳法对空肠组织核转录因子- κ B(NF- κ B)以及激活蛋白-1(AP-1)进行分析,并检测AP-1家族中c-jun和c-fos的基因表达。结果显示,NF- κ B和AP-1在肠缺血-再灌注过程中均被活化。给予精氨酸的动物AP-1表达显著高于给予谷氨酰胺者,但NF- κ B在两组间差异无显著性。研究者认为:精氨酸能增加促炎转录因子AP-1的表达,而不能增加NF- κ B的表达,提示精氨酸可能通过一种未知的机制对危重症患者造成损害。

浦践一,编译自《J Trauma》,2005,58:455-461;胡森,审校