

白及多糖对巨噬细胞 M1 型极化的调节作用及机制研究

冯永波¹, 高 景², 周忠海³, 高玉华⁴, 范 益^{2*}

1. 南京市高淳中医院 脾胃科, 江苏 南京 211300

2. 南京医科大学基础医学院 药理学系, 江苏 南京 211166

3. 中国人民解放军陆军第七十一集团军医院, 江苏 徐州 211000

4. 南京市高淳人民医院, 江苏 南京 211300

摘要: **目的** 探讨白及多糖 (BSP) 对巨噬细胞 M1 型极化过程的调节作用及其潜在机制。**方法** 诱导 THP-1 细胞分化为 M0 或 M1 型巨噬细胞, 并给予不同质量浓度 (0.001、0.010、0.100、1.000、10.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 BSP 处理, 观察细胞贴壁程度及形态, 通过 CCK-8 法检测 BSP 对细胞活力的影响。选择合适的剂量后, 运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术分析 BSP 对 M1 型巨噬细胞标记基因 [白细胞介素 (*IL*)-1 β 、*IL*-6、肿瘤坏死因子- α (*TNF*- α)、诱导型一氧化氮合酶 (*iNOS*)] 和 M2 型巨噬细胞标记基因 (*IL*-10、*CD206*) 表达的影响; 通过酶联免疫吸附实验检测 BSP 对上清液中 *IL*-1 β 、*IL*-6 和 *TNF*- α 释放的影响; 通过 Western blotting 法检测 BSP 对核因子- κ B (NF- κ B) 和信号转导子和转录激活子 (STAT1) 信号通路相关蛋白表达的影响。**结果** BSP 在 0.001~10.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对 M0 和 M1 型巨噬细胞没有明显毒性。BSP 显著抑制 M1 型巨噬细胞 *IL*-1 β 、*IL*-6、*TNF*- α 和 *iNOS* 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 并显著降低 *IL*-1 β 、*IL*-6 和 *TNF*- α 的释放 ($P < 0.01$ 、 0.001), 显著抑制 *IL*-1 β 、p65 和 STAT1 的磷酸化蛋白的表达 ($P < 0.05$)。BSP 对 M0 型巨噬细胞无显著影响。**结论** BSP 能够有效抑制 M0 型巨噬细胞向 M1 极化的转变, 其机制主要通过抑制 NF- κ B 和 STAT1 信号通路的活化实现。

关键词: 白及多糖; THP-1 细胞; 巨噬细胞 M1 极化; 抗炎活性; NF- κ B; STAT1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 11-2525-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.11.008

Effect and mechanism of *Bletilla striata* polysaccharide on M1 polarization of macrophagesFENG Yongbo¹, GAO Jing², ZHOU Zhonghai³, GAO Yuhua⁴, FAN Yi²

1. Department of Spleen and Stomach, Nanjing Gaochun Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 211300, China

2. Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

3. The 71st Group Military Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Xuzhou 211000, China

4. Nanjing Gaochun People's Hoopital, Nanjing 211300, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of *Bletilla striata* polysaccharide (BSP) on the polarization process of M1 macrophages and its potential mechanisms. **Methods** THP-1 cells were induced to differentiate into M0 or M1 macrophages and treated with different concentrations (0.001, 0.010, 0.100, 1.000, and 10.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of BSP. The CCK-8 assay was employed to assess cell adhesion and viability following BSP treatment. After selecting an appropriate dose, real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to analyze the expression of M1 macrophage marker genes [Interleukin (*IL*)-1 β , *IL*-6, tumor necrosis factor- α (*TNF*- α), inducible nitric oxide synthase (*iNOS*)] and M2 macrophage marker genes (*IL*-10, *CD206*). The release of inflammatory cytokines *IL*-1 β , *IL*-6, and *TNF*- α in the supernatant was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay, and Western blotting analysis was performed to investigate the effect of BSP on Nuclear factor kappa B (NF- κ B) and signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) signaling pathways. **Results** BSP exhibited no significant toxicity to M0 and M1 macrophages within the tested concentration range. BSP significantly downregulated the mRNA expression of M1 macrophage

收稿日期: 2024-07-16

基金项目: 南京市卫生科技发展专项资金项目(YKK21203)

第一作者: 冯永波(1973—),男,硕士,主任医师,研究方向为消化道肿瘤的诊疗。E-mail:854059272@qq.com

*通信作者: 范 益,博士,教授,主要从事药理学研究。E-mail:yfan@njmu.edu.cn

markers (*IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , and *iNOS*) and reduced the secretion of these inflammatory cytokines ($P < 0.05$, 0.01 , and 0.001). Furthermore, BSP inhibited the protein expression of *IL-1 β* and phosphorylation of p65 and STAT1 proteins. BSP had no significant effect on M0 macrophages. **Conclusion** BSP effectively suppresses the transformation of M0 macrophages into the M1 phenotype, primarily through the inhibition of NF- κ B and STAT1 signaling pathways.

Key words: *Bletilla striata* polysaccharide; THP-1 cells; M1 macrophage polarization; anti-inflammatory activity; NF- κ B; STAT1

白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f. 作为一种具有显著收敛止血、消肿生肌等功效的兰科植物,在中药领域的药用价值备受瞩目^[1-4]。白及多糖(BSP)是其主要药用成分,不仅具有抗炎、抗氧化、抗纤维化等生物学功能,还表现出赋形剂的特性,如生物黏附性、生物降解性、生物安全性等。这些特性使 BSP 在药物制剂中具有广泛应用,尤其在开发创新性免疫调节药物方面,展现了重要的实际应用价值^[5-7]。研究表明,BSP 能够激活巨噬细胞等免疫细胞,促进其增殖和分化,从而增强机体的免疫应答能力,有效抵御各类病原体 and 疾病的侵袭^[8-9]。此外,BSP 还具有抗炎特性,能够抑制炎症因子的产生和释放,减轻炎症损伤,促进愈合,为炎症相关疾病的治疗提供了新的策略^[8,10-11]。

巨噬细胞是免疫系统的核心成分,其极化状态在疾病的发生与发展中起着关键作用^[12-13]。巨噬细胞可响应外界信号转化为促炎型(M1)或抗炎型(M2),这一转化机制对疾病防控和治疗至关重要^[14-15]。在脊髓损伤中,M2型巨噬细胞的极化受阻,导致M1型巨噬细胞持续主导,引发慢性炎症^[16]。在矽肺早期,M1型巨噬细胞发挥促炎作用,释放炎症因子;在纤维化阶段,M2型巨噬细胞则促进炎症消退和组织修复^[17]。在肿瘤微环境中,肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)的极化状态直接影响肿瘤的生长、侵袭和转移^[18]。因此,深入探索调控巨噬细胞极化的药物或物质,对于开发创新性的免疫调节药物具有重要意义。

本研究旨在探究 BSP 在巨噬细胞极化过程中的调控作用及其机制。使用不同浓度的 BSP 处理 THP-1 源性巨噬细胞,检测处理后细胞标记的表达变化、细胞因子的释放情况及信号转导通路的磷酸化水平。通过一系列实验,深入研究 BSP 对 THP-1 源性巨噬细胞极化的影响,为开发新型免疫刺激剂提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

CelMate 二氧化碳培养箱(上海益世科生物有限公司); QuantStudio® 5 实时荧光定量 PCR 仪、

Nanodrop2000 分光光度计,均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; ERS300 电泳系统、Tanon 5200 全自动化学发光成像系统(上海天能生命科学有限公司); Milli-Q® Advantage 超纯水系统(美国 MerckMillipore Inc.); 冷冻高速离心机(艾本德国际贸易有限公司); 相差显微镜(徕卡显微系统贸易有限公司); Biotek 酶标仪(美国 BioTek Instruments, Inc.)。

1.2 细胞

人髓系白血病单核细胞 THP-1 (编码 BFN60700157) 购自上海中国科学院细胞库。

1.3 主要试剂

白及多糖(质量分数 $\geq 95\%$, 货号 TDT003) 购自上海融禾医药科技发展有限公司; 胎牛血清(FBS, 货号 TM999-500, 批号 0024731) 购自加拿大 Applied Biological Materials Inc.; RPMI-1640 完全培养基(货号 11875093) 和青霉素-链霉素双抗溶液(货号 15140122) 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 佛波酯(PMA, 货号 P1595)、脂多糖(LPS, 货号 L4516) 和 γ 干扰素(IFN- γ , 货号 I17001) 购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; TRIzol(货号 9108) 购自日本 Takara Bio Inc.; CCK-8 试剂盒(货号 A311)、逆转录试剂盒(货号 R412) 和 SYBR Green 荧光染料实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR) 试剂盒(货号 Q712) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; CD11b(货号 HQP155825)、白细胞介素(IL)-1 β (货号 HQP009641)、IL-6(货号 HQP127383)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 货号 HQP162162)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS, 货号 HQP175346)、IL-10(货号 HQP101055)、CD206(货号 HQP157134) 和 GAPDH(货号 HQP006940) 等引物购自美国 GeneCopoeia Inc.; IL-1 β (货号 CSB-E08053h)、IL-6(货号 CSB-E04638h) 和 TNF- α (货号 CSB-E04740h) 酶联免疫吸附试验(ELISA) 盒购自武汉华美生物工程有限公司; IL-1 β (货号 12242)、p-信号转导子和转录激活子 1(STAT1, 货号 9167)、STAT1(货号 14994)、p-p65(货号 3033) 和 p65(货号 8242) 等抗体购自美国 Cell Signaling Technology

Inc.; β -actin(货号 YFMA0052)购自南京翼飞雪生物科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养与诱导极化

THP-1细胞在含10% FBS和1%青霉素-链霉素的RPMI-1640完全培养基中,以4~5 mL的悬液接种于T25培养瓶中,并在37℃、含5% CO₂的恒温恒湿培养箱中培养。培养过程中,每2~3天进行半量换液操作,以保持细胞生长环境的稳定;每7天通过低速离心进行完全换液,以确保细胞能够获得充足的营养物质。细胞密度维持在 1×10^6 个 $\cdot$ mL⁻¹,且实验中所使用的细胞代数严格控制在20代以内,以确保细胞的稳定性和实验结果的可靠性。

在诱导极化过程中,细胞先以 5×10^5 个 $\cdot$ mL⁻¹的密度接种于6孔板中,随后用100 ng $\cdot$ mL⁻¹的PMA刺激36 h,以诱导其分化为巨噬细胞^[18]。接着,去除PMA并用不含PMA的RPMI-1640完全培养基替换,继续培养24 h,使细胞转化为M0型巨噬细胞。随后,进一步使用1 μ g $\cdot$ mL⁻¹的LPS和10 ng $\cdot$ mL⁻¹的IFN- γ 对细胞进行24 h的孵育,以促使M0型巨噬细胞向M1型巨噬细胞极化^[18],从而模拟体内炎症反应中的巨噬细胞极化过程。

2.2 细胞活力观察

评估BSP对M0型和M1型巨噬细胞活力的影响。诱导结束后,细胞以 5×10^3 个 $\cdot$ mL⁻¹接种于96孔板,接种后24 h给药。采用不同质量浓度的BSP(0.001、0.010、0.100、1.000、10.000 μ g $\cdot$ mL⁻¹)分别处理2种类型的巨噬细胞,对照组仅给予等量的磷酸盐缓冲溶液(PBS)处理。在继续培养24 h后,各孔的培养基被替换为含有10% CCK-8的完全培养基,随后将培养板置于培养箱中孵育1.5 h。通过酶标仪检测450 nm波长下的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 细胞形态学观察

细胞培养及接种方法同“2.1”项,设置M0组、M0+BSP(10.000 μ g $\cdot$ mL⁻¹)组、M1组、M1+BSP(0.001、0.010、0.100、1.000、10.000 μ g $\cdot$ mL⁻¹)组,其中M1+BSP组于M0型巨噬细胞向M1极化前1 h给药,M0组、M1组仅给予等量的PBS。给药后孵育24 h,利用相差显微镜(10 $\times$)观察各组细胞的形态,并记录典型的细胞形态图像。

2.4 M1和M2极化标志物mRNA水平改变

细胞培养及接种方法同“2.1”项,组别设置及给

药方法同“2.3”项,孵育24 h后,收集各组细胞,并采用TRIzol法提取细胞总RNA。提取的RNA随后使用逆转录试剂盒进行逆转录,将1 μ g RNA转化为cDNA。接着,使用SYBR Green qRT-PCR试剂盒进行qRT-PCR反应。在反应中,使用商品化引物对M1型极化标志物(IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、iNOS)和M2型极化标志物(IL-10和CD206)进行扩增,每个样本设置3个复孔,并重复实验3次,以确保结果的准确性和可靠性。最后,通过2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算各基因的相对表达量,以量化BSP对巨噬细胞极化过程中关键基因表达的影响。

2.5 M1型巨噬细胞细胞因子的分泌

细胞培养及接种方法同“2.1”项,设置M0组、M0+BSP(1 μ g $\cdot$ mL⁻¹)组、M1组、M1+BSP(1 μ g $\cdot$ mL⁻¹)组,给药方法同“2.3”项,孵育24 h后,用PBS对细胞进行2次洗涤,以去除残留的培养基和未附着的细胞。随后,根据ELISA试剂盒的说明书,测定细胞上清液中炎症相关细胞因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的表达水平。

2.6 极化相关信号通路的观察

细胞培养及接种方法、给药处理操作同“2.5”项。收集上述各组巨噬细胞,用PBS洗涤2次,随后加入含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的裂解液,在冰上裂解细胞并收集蛋白。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,并将其转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。膜在5%脱脂牛奶中封闭1 h后,与针对IL-1 β 、p-STAT1、STAT1、p-p65、p65和 β -actin的一抗及相应的二抗进行孵育。每一步孵育之间,使用含有聚山梨酯20的Tris缓冲盐溶液(TBST)对膜进行3次洗涤,每次洗涤时间为10 min,以确保去除非特异性结合。最后,使用Tanon 5200化学发光仪显影,并用Image J软件分析蛋白条带的灰度值。在数据分析过程中,以 β -actin作为内参,对目的蛋白的灰度值进行半定量处理。

2.7 统计学分析

数据分析采用GraphPad Prism 9.3统计学软件。使用Shapiro-Wilk法进行正态分布检验,对于符合正态分布的计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用Student *t*检验。

3 结果

3.1 BSP对M0和M1型巨噬细胞存活率的影响

如表1所示,在BSP质量浓度为0.001、0.010、0.100、1.000、10.000 μ g $\cdot$ mL⁻¹的作用下,M0型和M1型巨噬细胞的细胞活力与对照组相比均未

表1 BSP对M0和M1型巨噬细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 1 Effect of BSP on survival rate of M0 and M1 macrophages ($\bar{x} \pm s, n=4$)			
组别	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/%	
		M0型巨噬细胞	M1型巨噬细胞
对照	—	100.0 $\pm$ 12.7	100.0 $\pm$ 6.7
BSP	0.001	100.5 $\pm$ 12.3	98.0 $\pm$ 5.7
	0.010	103.5 $\pm$ 9.8	103.5 $\pm$ 7.3
	0.100	104.2 $\pm$ 8.5	110.4 $\pm$ 6.7
	1.000	103.1 $\pm$ 6.1	118.2 $\pm$ 7.5
	10.000	105.2 $\pm$ 10.7	95.5 $\pm$ 4.7

表现出显著统计学差异。结果表明, 0.001~10.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSP对由THP-1细胞诱导分化的M0型或M1型巨噬细胞未产生明显的毒性作用, 显示其具有较高的生物安全性。因此, 在后续的研究中, 该浓度范围内的BSP可用于进一步探讨其对M1型极化调节的影响。

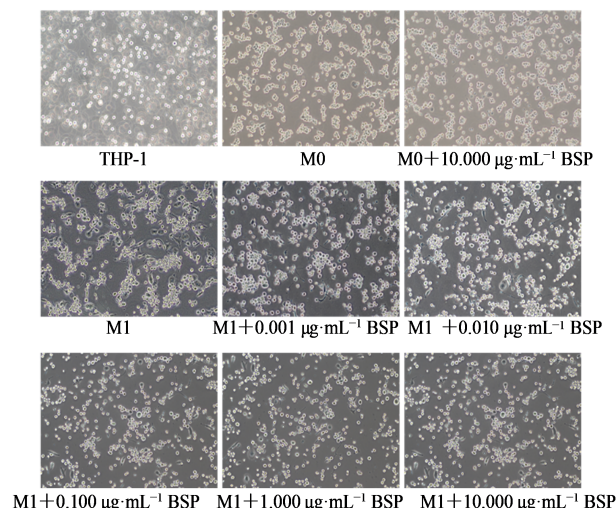
3.2 BSP对M0、M1型巨噬细胞形态的影响

如图1所示, THP-1细胞在PMA诱导后由悬浮生长转变为M0型巨噬细胞, 并附着于培养基表面, 其形态由圆形变为不规则, 细胞体积显著增大。使用10.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSP处理后, M0型巨噬细胞的形态未见显著变化。随后, 经LPS和IFN- γ 处理后, M0型巨噬细胞的形态进一步变得更加不规则, 伪足显著增多且分叉明显, 表明细胞已成功极化为M1型巨噬细胞。在此基础上, 预处理不同质量浓度的BSP显示出显著的调节效果: 与未处理的M1型巨噬细胞相比, BSP处理明显减少了伪足数量, 使细胞形态趋于规则, 尤其在0.100、1.000和10.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度下表现尤为显著。

3.3 BSP对M1型巨噬细胞标志基因表达的影响

如图2所示, 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSP处理对M0型巨噬细胞的M1标记基因(*IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 和*iNOS*)及M2标记基因(*IL-10*和*CD206*)的表达均未产生显著影响, 表明BSP本身不具备诱导M0型巨噬细胞极化的能力。然而, 在LPS和IFN- γ 处理后, 与M0组比较, M1组*IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 和*iNOS*的mRNA表达水平均显著上升($P < 0.01$ 、 0.001), 而*CD206*的mRNA表达则显著下降($P < 0.05$)。尽管*IL-10*的表达呈上升趋势, 但其变化并未达到统计学显著性。这些结果表明, M0型巨噬细胞在LPS和IFN- γ 的诱导下成功转化为M1型巨噬细胞。

进一步分析显示, 与M1组相比, 0.010、0.100、1.000、10.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSP处理均显著降低*IL-1 β* 、

图1 BSP对M0、M1型巨噬细胞细胞形态的影响($\times 10$)Fig. 1 Effect of BSP on cell morphology of M0 and M1 type macrophages ($\times 10$)

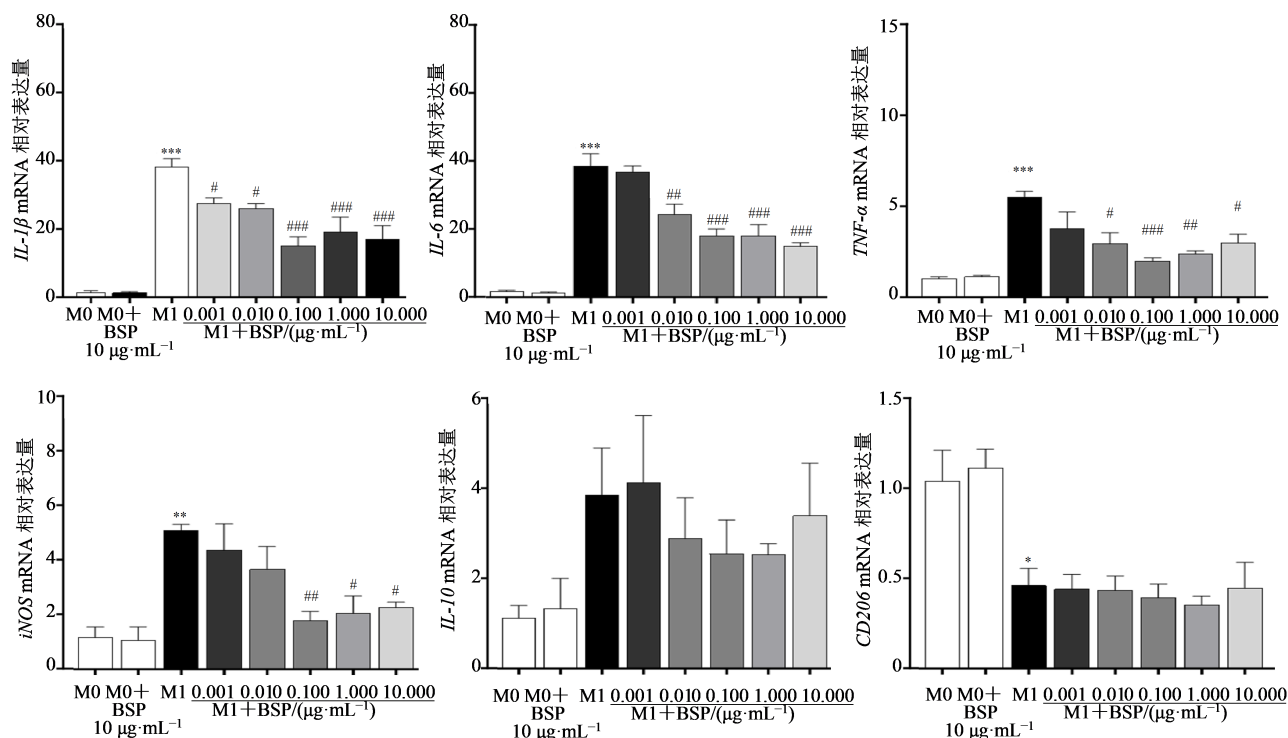
*IL-6*和*TNF- α* 的mRNA表达水平($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 此外, 0.100、1.000、10.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSP处理也显著降低*iNOS*的mRNA表达水平($P < 0.05$ 、 0.01)。然而, 各浓度的BSP对*IL-10*、*CD206*的mRNA表达未产生显著影响。结果表明, BSP能够有效抑制M0型巨噬细胞向M1型的极化过程, 并且这种抑制效果随着BSP浓度的升高而增强。选择1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度进行后续研究。

3.4 BSP对上清液中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 释放水平的影响

为了深入研究BSP对M1型巨噬细胞功能的影响, 进一步探讨了1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSP对巨噬细胞促炎因子释放的调控作用。如图3所示, 与M0组比较, 在LPS和IFN- γ 的诱导下, M1巨噬细胞中*IL-1 β* 、*IL-6*和*TNF- α* 的释放显著增加($P < 0.001$), 这与M1型巨噬细胞典型的促炎特性相一致。在加入1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSP处理后, 与M1组相比, *IL-1 β* 、*IL-6*和*TNF- α* 的释放水平显著降低($P < 0.01$ 、 0.001), 表明BSP能够有效降低M1型巨噬细胞的促炎活性。值得注意的是, 在未经刺激的M0型巨噬细胞中, BSP对促炎因子的释放水平没有显著影响。结果进一步证实了BSP对M1型巨噬细胞具有选择性的抑制作用。

3.5 BSP对巨噬细胞NF- κ B和STAT1信号通路的影响

为了探索BSP抑制M1型巨噬细胞极化的潜在机制, 进一步研究了1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSP对NF- κ B和STAT1信号通路的影响。如图4所示, 与M0组比较, 在LPS和IFN- γ 的刺激下, 巨噬细胞内*IL-1 β* 的

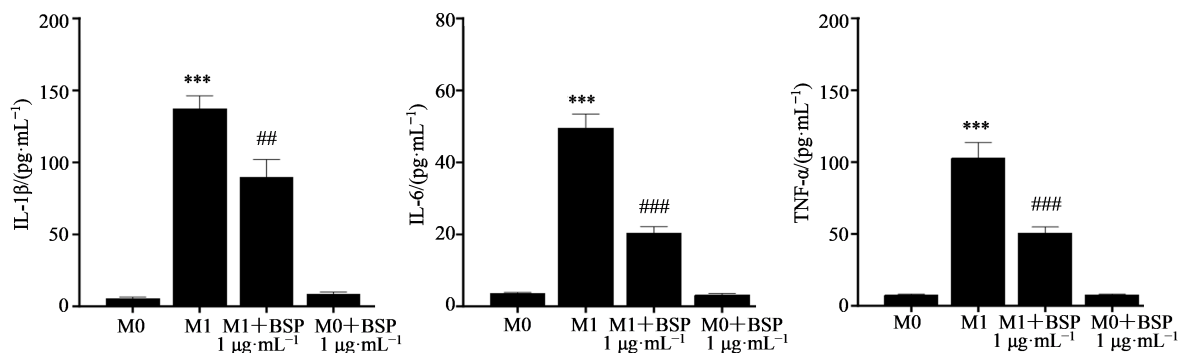


与M0组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与M1组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs M0 group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs M1 group.

图2 BSP对M0、M1型巨噬细胞标志基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 2 Effect of BSP on expression of marker genes in M0 and M1 macrophages ($\bar{x} \pm s, n=4$)



与M0组比较: *** $P < 0.001$; 与M1组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs M0 group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs M1 group.

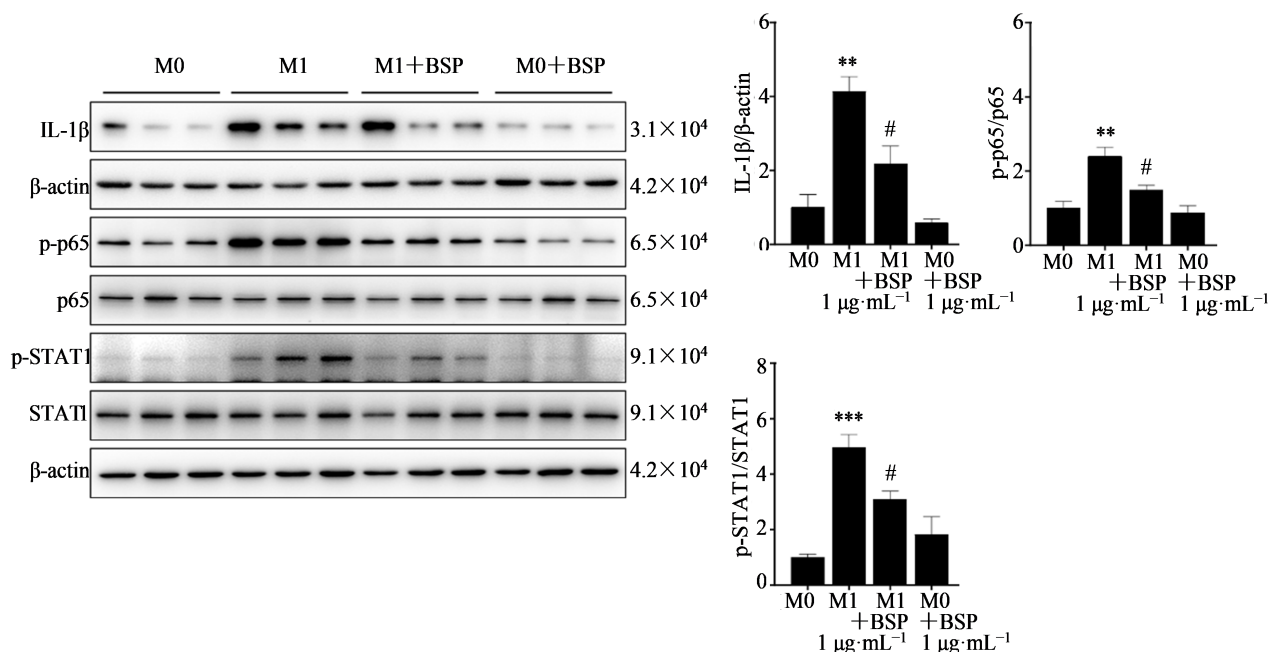
图3 BSP对上清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 释放水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Effect of BSP on release levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in supernatants ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表达水平显著上升($P < 0.01$),同时观察到NF- κ B的p65亚基和STAT1的磷酸化水平显著增高($P < 0.001$)。与M1组比较,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSP显著抑制了细胞内IL-1 β 的蛋白表达水平($P < 0.05$),并有效降低了p65和STAT1的磷酸化水平($P < 0.05$)。此外,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSP对未受刺激的M0型巨噬细胞内IL-1 β 、p-p65和p-STAT1的表达没有显著影响。结果表明,BSP主要通过调控NF- κ B和STAT1信号通路抑制巨噬细胞向M1型的极化过程。

4 讨论

本研究在体外条件下深入探讨了BSP对巨噬细胞M1极化过程的调控作用。实验数据显示,在0.001~10.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质量浓度范围内,BSP对M0和M1型巨噬细胞均未显示明显的细胞毒性。进一步分析显示,BSP显著抑制了M0型巨噬细胞向M1型的极化,并有效降低了M1型巨噬细胞的促炎活性。这一调控作用主要通过影响NF- κ B和STAT1信号通路的活化来实现。



与M0组比较:** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与M1组比较:# $P < 0.05$ 。

** $P < 0.0$ *** $P < 0.001$ vs M0 group; # $P < 0.05$ vs M1 group.

图4 BSP对巨噬细胞内NF-κB和STAT1信号通路的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of BSP on NF-κB and STAT1 signaling pathways in macrophages ($\bar{x} \pm s, n=3$)

既往研究表明,BSP具有免疫刺激和抗炎的双重效应。BSP独特的葡甘聚糖结构使其能够深度参与细胞内外的信号传递,从而显著增强免疫活性。体内实验数据证实,BSP提升胸腺和脾脏指数,展现了其显著的免疫调节功能^[19]。这一效应主要归因于BSP对免疫细胞的直接刺激^[20-21]。此外,BSP还能够有效提高机体免疫器官的功能指数,增加血清中免疫球蛋白、TNF-α、IL-4等物质的含量,激活巨噬细胞的吞噬能力,并诱导其分泌细胞因子^[9]。BSP通过特定的信号通路调控机制,有效减轻炎症反应。例如,在溃疡性结肠炎大鼠模型中,BSP显著降低了血清中IL-1β和TNF-α的水平,并促进抑炎因子IL-10的表达,从而保护结肠组织免受损伤^[22]。在硫代乙酰胺诱导的肝硬化大鼠模型中,BSP通过抑制炎症因子的表达和内毒素水平,有效修复和保护肠上皮屏障^[23]。体外实验同样显示,BSP以剂量相关的方式,通过NOX4和TLR2途径抑制人肾小球系膜细胞中活性氧的产生及炎症因子的表达^[24]。

在本研究中,BSP显著抑制了IL-1β、IL-6、TNF-α和iNOS等促炎因子的表达,但尚未观察到其对IL-10和CD206抑炎因子的影响。这一发现可能与实验条件有关,本研究主要采用LPS和IFN-γ诱导M1型巨噬细胞。后续研究需要利用IL-4和IL-13诱导M2型巨噬细胞,以更全面地评估BSP对

这些抗炎因子的作用。

值得注意的是,BSP主要对M1型巨噬细胞极化产生抑制作用,而对M0型巨噬细胞则无显著影响。M0型巨噬细胞在未激活状态下负责免疫反应中的巡逻与监视,参与初级防御机制。相反,M1型巨噬细胞通常通过与炎症因子如IFN-γ和LPS的相互作用被激活,主要分泌促炎细胞因子,如TNF-α、IL-1β和IL-6等。这些因子在炎症初期发挥关键作用,有助于病原体的清除和其他免疫细胞的激活,但在疾病后期可能引发过度的炎症反应,造成损伤。例如,在自身免疫性疾病或慢性炎症性疾病中,M1型巨噬细胞可能过度活化,导致组织损伤^[15]。因此,BSP对M1型巨噬细胞的选择性作用有助于减少对正常免疫监视的干扰,同时针对病理性炎症的M1型巨噬细胞进行治疗,从而控制疾病进程而不损害整体免疫功能。

NF-κB信号通路在M1型巨噬细胞活化过程中占据核心地位,响应多种外界刺激,如促炎因子、自由基、紫外线辐射以及细菌和病毒感染。这些刺激激活NF-κB,推动巨噬细胞向M1表型分化,并分泌促炎因子,如TNF-α、IL-12和IL-23^[25]。尽管已有研究指出BSP能激活NF-κB信号通路以产生免疫增强效应^[9],但本研究发现BSP能抑制p65的磷酸化,从而调控炎症反应。因此,需要进一步深入研究

BSP在NF- κ B信号通路中的复杂作用。

此外,STAT1作为IFN- γ 信号通路的关键分子,在M1型巨噬细胞极化过程中也发挥重要作用^[26]。当IFN- γ 与相应受体结合时,JAK1和JAK2被激活,进而促使STAT1活化。这一过程有助于促进相关基因的表达,从而增强巨噬细胞在炎症反应和抗病原体防御中的功能。本研究发现,BSP能通过某种机制抑制STAT1的磷酸化,从而调控M1极化过程。尽管BSP的精确调控机制尚待阐明,但这一发现为理解其抗炎作用提供了新的视角。

本研究为新型抗炎药物的研发提供了BSP作为潜在抗炎药物的初步证据,并指明了其在抗炎活性方面的潜在应用。未来的研究将引入新的实验技术或方法,例如高通量筛选、流式细胞分析和实时动态监测,以进一步探讨BSP在不同免疫环境下的作用机制,并评估其在临床应用中的实际效果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] He X R, Wang X X, Fang J C, et al. *Bletilla striata*: Medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 195: 20-38.
- [2] Bai L, Wang T, Deng Q C, et al. Dual properties of pharmacological activities and preparation excipient: *Bletilla striata* polysaccharides [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 254(Pt 1): 127643.
- [3] 王坤堂,王逸伦,崔元璐,等.白及多糖药理作用及在中药现代制剂领域的研究进展[J].中成药,2023,45(7): 2281-2287.
Wang K T, Wang Y L, Cui Y L, et al. Pharmacological effects of *Bletilla striata* polysaccharide and research progress in the field of modern Chinese medicine preparations [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(7): 2281-2287.
- [4] 黎晓星,杨莹,李群,等.白及主要有效成分特征及其影响因素研究进展[J].中草药,2024,55(8): 2820-2827.
Li X X, Yang Y, Li Q, et al. Research progress on characteristics and influencing factors of main active ingredients in *Bletillae Rhizoma* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(8): 2820-2827.
- [5] Gou K J, Li Y, Qu Y, et al. Advances and prospects of *Bletilla striata* polysaccharide as promising multifunctional biomedical materials [J]. Mater Des, 2022, 223: 111198.
- [6] He X M, Liu L Y, Gu F L, et al. Exploration of the anti-inflammatory, analgesic, and wound healing activities of *Bletilla striata* polysaccharide [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 261(Pt 2): 129874.
- [7] 葛雯,陈宏降,罗益远,等.白及多糖的研究进展[J].人参研究,2021,33(3): 55-59.
Ge W, Chen H J, Luo Y Y, et al. Research progress on *Bletilla striata* polysaccharides [J]. Ginseng Res, 2021, 33(3): 55-59.
- [8] Qiu M Y, Zhong G F, Zhang J B, et al. Biocompatible and biodegradable *Bletilla striata* polysaccharides hydrogels crosslinked by BDDE for wound healing through the regulating of macrophage polarization [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 254(Pt 3): 128015.
- [9] Niu X F, Yu J B, Huang Q X, et al. Immunoenhancement activity of *Bletilla striata* polysaccharide through MAPK and NF- κ B signalling pathways *in vivo* and *in vitro* [J]. Autoimmunity, 2022, 55(8): 650-660.
- [10] Chen Z Y, Cheng L Z, He Y C, et al. Extraction, characterization, utilization as wound dressing and drug delivery of *Bletilla striata* polysaccharide: A review [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 120(Pt B): 2076-2085.
- [11] Zhao Y, Wang Q B, Yan S, et al. *Bletilla striata* polysaccharide promotes diabetic wound healing through inhibition of the NLRP3 inflammasome [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 659215.
- [12] Wynn T A, Vannella K M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis [J]. Immunity, 2016, 44(3): 450-462.
- [13] Lazarov T, Juarez-Carreño S, Cox N, et al. Physiology and diseases of tissue-resident macrophages [J]. Nature, 2023, 618(7966): 698-707.
- [14] Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod A B, et al. Macrophage polarization: Different gene signatures in M1 (LPS⁺) vs. classically and M2 (LPS⁻) vs alternatively activated macrophages [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1084.
- [15] Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity [J]. Annu Rev Pathol, 2020, 15: 123-147.
- [16] 杨真吾,彭颖,林浩东.脊髓损伤后巨噬细胞脂代谢与炎症表型关系研究进展[J].中国骨与关节杂志,2024,13(4): 290-298.
Yang Z W, Peng Y, Lin H D. Research progress on the relationship between macrophage lipid metabolism and inflammation phenotype after spinal cord injury [J]. Chin J Bone Jt, 2024, 13(4): 290-298.
- [17] 吕碧君,李蕾,王月,等.巨噬细胞极化在肺纤维化中的作用及研究进展[J].中国医药科学,2023,13(15): 24-27.
Lv B J, Li L, Wang Y, et al. The role and research progress of macrophage polarization in pulmonary

- fibrosis [J]. China Med Pharm, 2023, 13(15): 24-27.
- [18] Goossens P, Rodriguez-Vita J, Etzerodt A, et al. Membrane cholesterol efflux drives tumor-associated macrophage reprogramming and tumor progression [J]. Cell Metab, 2019, 29(6): 1376-1389.e4.
- [19] Wang Y, Han S, Li R, et al. Structural characterization and immunological activity of polysaccharides from the tuber of *Bletilla striata* [J]. Int J Biolog Macromol, 2019, 122: 628-635.
- [20] Peng Q, Li M, Xue F, et al. Structure and immunobiological activity of a new polysaccharide from *Bletilla striata* [J]. Carboh Pol, 2014, 107: 119-123.
- [21] Niu J, Wang S, Wang B, et al. Structure and anti-tumor activity of a polysaccharide from *Bletilla ochracea* Schltr [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 154: 1548-1555.
- [22] 黎笑兰, 张新广, 尹少萍. 白及多糖抑制溃疡性结肠炎大鼠炎症反应与氧化应激 [J]. 基础医学与临床, 2020, 40(2): 224-228.
- LiX L, Zhang X G, Yin S P. Polysaccharides of *Radix Bletillae* inhibit inflammatory reaction and oxidative stress in rats with ulcerative colitis [J]. Basic Clinl Med, 2020, 40(2): 224-228.
- [23] Luo L, Zhou Z, Xue J, et al. *Bletilla striata* polysaccharide has a protective effect on intestinal epithelial barrier disruption in TAA-induced cirrhotic rats [J]. Exp Therap Med, 2018, 16(3): 1715-1722.
- [24] Yue L, Wang W, Wang Y, et al. *Bletilla striata* polysaccharide inhibits angiotensin II-induced ROS and inflammation via NOX4 and TLR2 pathways [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 89: 376-388.
- [25] Guo Q, Jin Y, Chen X, et al. NF- κ B in biology and targeted therapy: New insights and translational implications [J]. Signal Transd Targ Ther, 2024, 9(1): 1-37.
- [26] Stark G R, Darnell J E. The JAK-STAT pathway at twenty [J]. Immunity, 2012, 36(4): 503-514.

【责任编辑 兰新新】