

铁皮石斛多糖对人脐静脉内皮细胞基因表达谱的影响研究^Δ

王瑞君^{1*}, 谢 兰^{2,3}, 冯 娟^{2,3}, 赵文龙^{2,3}, 郭志方^{2,3}, 乔连生^{2,3}, 宋维芳^{1#}[1.山西医科大学汾阳学院病理生理学教研室,山西汾阳 032200;2.清华大学医学院医学系统生物学研究中心,北京 100084;3.生物芯片北京国家工程研究中心(博奥生物),北京 102206]

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)06-0801-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.06.16

摘要 目的:探讨铁皮石斛多糖对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)基因表达谱的影响。方法:以HUVEC为对象,采用MTS法检测不同剂量铁皮石斛多糖(50、100、200、400、800 μg/mL)对HUVEC细胞增殖活性的影响,并计算30%细胞生长抑制浓度(IC₃₀)以筛选后续试验剂量;采用基因表达谱芯片技术检测铁皮石斛多糖作用24 h后HUVEC细胞基因表达谱的变化情况,筛选差异表达基因;利用DAVID生物信息学资源数据库对差异表达前5位的基因进行GO富集分析和KEGG通路富集分析;以免疫相关差异表达基因为对象,采用实时荧光定量聚合酶链反应法(qRT-PCR)对芯片检测结果进行验证。结果:经100、200、400、800 μg/mL铁皮石斛多糖作用后,HUVEC细胞的存活率均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);IC₃₀值为408 μg/mL。经400 μg/mL(据IC₃₀值确定)铁皮石斛多糖作用后,HUVEC细胞中共有差异表达基因91个,其中表达上调的有84个、表达下调的有7个。上、下调表达差异前5位的基因分别为SELE、CCL2、CXCL6、IL8、ICAM1以及VWCE、CPT1A、CLU、CCL14、CINS4,主要与免疫调节、炎症反应等有关。HUVEC细胞中的差异表达基因主要分布于胞外区域,富集于细胞因子的产生及反应、刺激反应等生物学过程,发挥趋化因子及其受体活性等分子功能;其中上调表达基因SELE、ICAM1、CXCL2等主要富集于肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、甲型H1N1流感、单纯疱疹病毒感染等通路,下调表达基因CCL14主要富集于趋化因子信号通路。qRT-PCR验证结果显示,ICAM1基因的相对表达量显著升高,CCL14基因的相对表达量显著降低($P < 0.05$),与芯片检测结果一致。结论:经铁皮石斛多糖处理后,HUVEC细胞共有91个基因表达差异明显,且以表达上调为主。表达差异基因可能通过TNF信号通路、甲型H1N1流感、单纯疱疹病毒感染等通路参与机体免疫调节。

关键词 铁皮石斛多糖;人脐静脉内皮细胞;基因表达谱;免疫调节

Effects of *Dendrobium officinale* Polysaccharides on Gene Expression Profile of HUVEC

WANG Ruijun¹, XIE Lan^{2,3}, FENG Juan^{2,3}, ZHAO Wenlong^{2,3}, GUO Zhifang^{2,3}, QIAO Liansheng^{2,3}, SONG Weifang¹[1. Dept. of Pathophysiology, Fenyang College, Shanxi Medical University, Shanxi Fenyang 032200, China; 2. Medical System Biology Research Center, Tsinghua University School of Medicine, Beijing 100084, China; 3. National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology (CapitalBio), Beijing 102206, China]

2型糖尿病胰岛素抵抗[J].中医学报,2018(10):1899-1903.

[14] 韩伟,崔秀琴,李振魁,等.肺结核伴糖尿病患者Th1/Th2细胞因子水平及意义[J].临床肺科杂志,2018,23(2):239-241.

[15] 傅晔柳,诸梦露,楼霆.白头翁汤对链脉佐菌素诱导的糖尿病肝损伤的保护作用研究[J].药物评价研究,2018,41(8):1430-1435.

[16] ZHU L, HAO J, CHENG M, et al. Hyperglycemia-in-

Δ 基金项目:北京市科学技术委员会优秀人才培养资助工作青年拔尖个人项目(No.2017000021223ZK30);中国肝炎防治基金会天晴肝病研究基金科研课题(No.TQGB20120013)

* 硕士研究生。研究方向:中药治疗肝病药理基础(免疫方向)。E-mail:841684901@qq.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:肝病。电话:0358-2892011。E-mail:bsswf@163.com

duced Bcl-2/Bax-mediated apoptosis of Schwann cells via mTORC1/S6K1 inhibition in diabetic peripheral neuropathy[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 367(2):186-195.

[17] 沈艳,闫海洋,徐殿琴,等.2型糖尿病患者发生肾功能异常与其甲状腺功能的的关系研究[J].中国实用内科杂志,2018,38(7):644-648.

[18] YIN H, HUANG L, OUYANG T, et al. Baicalein improves liver inflammation in diabetic db/db mice by regulating HMGB1/TLR4/NF-κB signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018. DOI:10.1016/j.intimp.2017.12.002.

[19] LV J, WANG Z, WANG Y, et al. Renoprotective effect of the Shen-Yan-Fang-Shuai Formula by inhibiting TNF-α/NF-κB signaling pathway in diabetic rats[J]. *J Diabetes Res*, 2017. DOI:10.1155/2017/4319057.

(收稿日期:2018-10-04 修回日期:2019-01-23)

(编辑:段思怡)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of *Dendrobium officinale* polysaccharides on gene expression profile of HUVEC. METHODS: HUVEC was selected as objects. MTS method was used to detect the effects of different doses of *D. officinale* polysaccharides (50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/mL}$) on the proliferation activity of HUVEC. The growth inhibitory concentration of 30% cells (IC_{30}) was calculated to screen the dose of follow-up tests. cDNA microarray assay was used to detect the changes of gene expression profile for HUVEC after treated with *D. officinale* polysaccharides for 24 h, so as to screen differentially expressed genes. GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were performed for top 5 differentially expressed genes by using DAVID bioinformatics resource database. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to validate the results of microarray detection with immunity-related differentially expressed genes as objects. RESULTS: After treated with 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/mL}$ *D. officinale* polysaccharides, survival rate of HUVEC were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). IC_{30} value was 408 $\mu\text{g/mL}$. After treated with 400 $\mu\text{g/mL}$ (by IC_{30}) *D. officinale* polysaccharides, there were 91 differentially expressed genes in HUVEC cells, of which 84 were up-regulated and 7 were down-regulated. Top 5 genes of up-regulated and down-regulated expression were *SELE*, *CCL2*, *CXCL6*, *IL8*, *ICAM1* as well as *VWCE*, *CPT1A*, *CLU*, *CCL14*, *CINS4*, which may be mainly associated with immune conditions and inflammatory responses. The differentially expressed genes mainly distributed in extracellular domain, and were enriched in biological processes such as production and response of cytokines and stimulus response, and played molecular functions such as chemokine and its receptor activity. The up-regulated genes as *SELE*, *ICAM1* and *CXCL2* were mainly enriched in TNF signaling pathway, influenza A (H1N1), herpes simplex virus infection and other pathways. The down-regulated gene *CCL14* was mainly enriched in chemokine signaling pathway. Results of qRT-PCR validation tests showed that relative expression of *ICAM1* was increased significantly, while that of *CCL14* was decreased significantly ($P < 0.05$), which was in agreement with microarray detection results. CONCLUSIONS: After treated with *D. officinale* polysaccharides, the expression of 91 genes in HUVEC cells are different significantly, mainly being up-regulated. The differentially expressed genes may participate in immune regulation through TNF signaling pathway, influenza A (H1N1) and herpes simplex virus infection.

KEYWORDS *Dendrobium officinale* polysaccharides; HUVEC; Gene expression profile; Immune regulation

铁皮石斛是兰科植物铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)的干燥茎,是珍贵的药用植物,素有“药中黄金”之称。据2015年版《中国药典》(一部)记载,铁皮石斛具有益胃生津、滋阴清热、明目强身等功效^[1]。多糖是铁皮石斛的主要活性成分之一,其不仅能改善免疫系统功能,而且还具有较好的抗癌、抗炎、抗氧化等生物活性,同时在降糖方面也有一定的效果^[2]。有研究表明,铁皮石斛多糖可通过调节白细胞介素6(IL-6)编码基因的表达来激活机体免疫系统^[3],可通过调控肿瘤坏死因子(TNF)信号通路来抑制细胞凋亡^[4],同时还可通过核因子 κB (NF- κB)通路来调节炎症反应^[5]等。以往对铁皮石斛多糖药理作用的研究多局限于某一种疾病或某一条通路的数个基因,难以从基因层面全面了解其整体作用机制,而基因芯片技术的出现和发展打破了这种局限。其中,基因表达谱芯片的应用最为广泛,技术也相对成熟。该技术是将cDNA或者寡核苷酸探针固定在芯片上,通过与样品中带荧光分子标记的mRNA杂交来检测样品中成千上万个基因表达水平的变化情况,可高效、快速、高通量地分析相关生物学信息,从而实现对差异表达基因的大规模综合分析^[6]。本研究应用基因表达谱芯片技术检测经铁皮石斛多糖处理后免疫相关细胞人脐静脉内皮细胞(HUVEC)基因表达谱的变化情况,全面分析差异表达基因,揭示铁皮石斛多糖免疫调节作用的潜在靶点,以期为进一步研究其药理作用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

BJ-500A型粉碎机(德清拜杰电器有限公司);RE-52AA型旋蒸浓缩仪(上海亚荣生化仪器厂);Plus384型酶联免疫检测仪(美国Molecular Devices公司);Nanodrop-2000型超微量分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司);BioMixer II型芯片杂交仪、Lux-Scan™ 10KA型芯片扫描仪(北京博奥晶典生物技术有限公司);7900型实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国ABI公司);MCO-15AC型CO₂培养箱(日本Sanyo公司)。

1.2 药材与试剂

铁皮石斛饮片购自河北安国药材市场,由安国市昌达中药材饮片有限公司药材检验室鉴定为兰科植物铁皮石斛(*D. officinale* Kimura et Migo)的干燥茎。

人类全基因组寡核苷酸微阵列芯片V2.0(北京博奥晶典生物技术有限公司,批号:CP.409060);Cy5-dCTP、Cy3-dCTP溶液(美国GE Healthcare公司,批号分别为9662845、9553232);ECM培养基(美国ScienCell公司,批号:1001);胰酶、磷酸缓冲盐溶液(PBS,pH为7.2~7.4)(美国HyClone公司,批号分别为150011、202904);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTS)试剂盒(美国Promega公司,批号:0000065769);Trizol RNA抽提试剂盒(美国Life Technologies公司,批号:15596018);逆转录合成cDNA试剂盒(美国Thermo

Fisher Scientific公司,批号:303761);DEPC水(北京鼎国昌盛生物技术有限公司,批号:54100140);SYBR Green Master Mix(美国Kapa Biosystems公司,批号:4928);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 细胞

HUVEC细胞购自美国ATCC公司。

2 方法

2.1 铁皮石斛多糖的提取

取铁皮石斛饮片适量,用粉碎机粉碎。取上述粉末适量,以水为溶剂按料液比1:20(g/mL)回流提取2 h,提取液以4 000 r/min离心10 min后,取上清液,减压浓缩至10 mL,加入乙醇40 mL(乙醇终浓度为80%),于4 ℃静置24 h后,以4 000 r/min离心10 min,弃去上清液,沉淀以95%乙醇25 mL洗涤,以4 000 r/min离心5 min后,弃去上清液,沉淀按上述条件重复处理1次,弃去上清液,沉淀经干燥后,即得铁皮石斛多糖,得率为30.8%(即铁皮石斛多糖质量与铁皮石斛饮片粉末质量的百分比)。将上述多糖溶于适量PBS中,制得质量浓度为50 mg/mL(以多糖质量计)的贮备液,于4 ℃冰箱中保存,备用。

2.2 铁皮石斛多糖剂量的筛选

采用MTS法检测铁皮石斛多糖对HUVEC细胞增殖活性的影响,并以此筛选后续研究的剂量。将HUVEC细胞置于ECM培养基中,于37 ℃、5%CO₂条件下(下同)培养。取对数生长期HUVEC细胞适量,以0.25%胰酶消化、传代至所需量,再以0.25%胰酶消化,收集细胞,用ECM培养基重悬,得密度为1×10⁵个/mL的单细胞悬液,以100 μL/孔接种于96孔板中,培养过夜后,将细胞随机分为对照组和铁皮石斛不同剂量组(50、100、200、400、800 μg/mL,剂量设置参考文献[7]),每组设置3个复孔。对照组加入PBS 1.6 μL,各给药组分别加入“2.1”项下多糖贮备液0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 μL(各组总体积均为100 μL),培养24 h后,吸弃培养基,按照试剂盒说明书加入MTS试剂,用酶联免疫检测仪于490 nm波长处检测每孔吸光度(A),并计算细胞存活率和30%细胞生长抑制浓度(IC₃₀),细胞存活率=[(实验组细胞平均A值-空白组细胞平均A值)/(对照组细胞平均A值-空白组细胞平均A值)]×100%(式中,“空白组”为不加细胞、不加药的阴性对照)。上述试验重复3次。

2.3 铁皮石斛多糖对HUVEC细胞基因表达谱的影响

2.3.1 HUVEC细胞总RNA的提取 取对数生长期的HUVEC细胞,用ECM培养基重悬后,按6×10⁵个/孔接种于6孔板中,培养过夜,待细胞贴壁后,将细胞随机分为对照组和铁皮石斛多糖组(400 μg/mL,剂量设置参考“2.2”项下IC₃₀值),每组设置3个复孔。对照组加入PBS 8 μL,给药组加入“2.1”项下多糖贮备液8 μL(各组

总体积均为1 mL),培养24 h。收集细胞,使用Trizol RNA抽提试剂盒并按照其说明书提取各组细胞的总RNA,使用超微量分光光度计分别于230、260、280 nm处检测各孔的A值(其中,A_{260 nm}与核酸浓度相关,A_{280 nm}与蛋白质或氨基酸浓度相关,A_{230 nm}与碳水化合物浓度相关),计算RNA的浓度(RNA浓度与A_{260 nm}/A_{280 nm}呈正比)。

2.3.2 探针标记、芯片杂交与图像采集、分析 取“2.3.1”项下各组细胞RNA适量,按照逆转录合成cDNA试剂盒说明书进行扩增、转录后,得cDNA,以Cy5-dCTP、Cy3-dCTP溶液分别标记对照组和给药组,并设置荧光交换。将标记好的探针等量混匀后,置于预杂交好的基因芯片上,放至芯片杂交仪中,于42 ℃杂交过夜,取出,用水清洗2次,每次5 min,晾干后,使用芯片扫描仪对基因芯片进行扫描,采用LuxScan™ v3.0图像分析软件分析标记物Cy5、Cy3荧光强度,并对数据进行归一化处理以校正系统误差,将Cy3与Cy5荧光强度的比值(Ratio)大于2(上调)或小于0.5(下调)的基因判定为差异基因^[8][基因名称及其功能通过查询NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)予以确定]。

2.3.3 生物信息学分析 利用DAVID生物信息学资源数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对“2.3.2”项所得差异基因进行GO富集分析,获知其潜在作用靶点的功能分布(细胞部位、生物学过程、分子功能);同法进行KEGG通路富集分析,获知其潜在作用靶点的通路分布。GO和KEGG词条的富集程度均以P表示,P值越小,表明其生物学富集途径越显著(P<0.05为差异有统计学意义)。

2.3.4 差异表达基因的验证 分别取“2.3.1”项下两组细胞RNA 1 μg,使用逆转录合成cDNA试剂盒将其逆转录为cDNA(反应体系20 μL,反应条件:37 ℃反转录60 min,95 ℃变性5 min;严格按照其说明书操作)。引物设计采用Primer Premier 5.0软件,引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)体系(总体积10 μL):cDNA(经DEPC水稀释10倍)3 μL,目的基因上、下游引物(5 μmol/L)各1 μL,SYBR Green Master Mix 5 μL。反应条件:95 ℃预变性3 min,95 ℃变性3 s,60 ℃退火30 s,共40个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因作为内参,根据各组样品荧光信号到达设定域值所经历的循环数(Ct值),运用2^{-ΔΔCt}法^[9]计算两组细胞差异表达基因的相对表达量。

2.4 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 剂量筛选结果

与对照组比较,100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 铁皮石斛多糖组细胞存活率均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表1。此外,铁皮石斛多糖的 IC_{50} 值为 408 $\mu\text{g/mL}$,故最终选择 400 $\mu\text{g/mL}$ 的铁皮石斛多糖进行后续试验。

表 1 铁皮石斛多糖对 HUVEC 细胞增殖活性的影响

Tab 1 Effects of *D. officinale* polysaccharides on the proliferation activity of HUVEC cells

组别	细胞存活率, %	组别	细胞存活率, %
对照组	100	200 $\mu\text{g/mL}$ 铁皮石斛多糖组	73.64 \pm 4.75*
50 $\mu\text{g/mL}$ 铁皮石斛多糖组	79.44 \pm 14.10	400 $\mu\text{g/mL}$ 铁皮石斛多糖组	69.16 \pm 4.18*
100 $\mu\text{g/mL}$ 铁皮石斛多糖组	83.44 \pm 4.55*	800 $\mu\text{g/mL}$ 铁皮石斛多糖组	65.24 \pm 0.98**

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2 芯片杂交结果

经 400 $\mu\text{g/mL}$ 铁皮石斛多糖作用 24 h 后, HUVEC 细胞中存在表达差异的基因共 91 个,其中表达上调(Ra-

表 2 铁皮石斛多糖作用后 HUVEC 细胞上/下调表达差异前 5 位的基因及其功能

Tab 2 Top 5 up-regulated and down-regulated genes and their functions in HUVEC cells after treated with *D. officinale* polysaccharides

上调基因			下调基因		
基因名称	功能	Ratio 值	基因名称	功能	Ratio 值
<i>SELE</i>	编码的细胞因子可刺激血管内皮细胞,使白细胞黏附于血管内皮,可能与动脉粥样硬化的发生有关	22.77	<i>VWCE</i>	编码表皮生长因子样结构域	0.48
<i>CCL2</i>	参与免疫调节和炎症反应	19.69	<i>CPT1A</i>	编码的蛋白在脂肪酸代谢中起作用	0.47
<i>CXCL6</i>	趋化嗜酸性粒细胞,维持血管特性	12.37	<i>CLU</i>	参与细胞凋亡、肿瘤发展,且与神经变性疾病有关	0.49
<i>IL8</i>	调节炎症应答、化学诱导,促进血管生成,与病毒感染引起的呼吸道疾病有关	6.78	<i>CCL14</i>	编码蛋白属于趋化因子,参与炎症反应与免疫调节	0.43
<i>ICAM1</i>	编码内皮细胞表面糖蛋白,参与细胞免疫反应	6.37	<i>GINS4</i>	编码蛋白与直肠癌有关	0.42

3.3 差异表达基因的生物信息学分析结果

GO 富集分析结果显示,上调表达基因多集中在胞外部分区域,且主要通过细胞因子的产生及反应等生物学过程其发挥趋化因子受体等分子功能;下调表达基因主要集中在胞外区域,且主要通过刺激反应等生物学过程来发挥趋化因子受体等分子功能,详见图 2。

KEGG 通路富集分析显示,经铁皮石斛多糖作用后, HUVEC 细胞上调表达基因主要富集于 TNF 信号通路、甲型 H1N1 流感、单纯疱疹病毒感染、麻疹、趋化因子信号通路、类风湿性关节炎等通路上,包括 *SELE*、*CCL2*、*ICAM1*、*CXCL2*、*CXCL6* 等基因;而下调表达基因主要富集于趋化因子信号通路上,包括 *CCL14* 基因,详见表 3。

3.4 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

根据“3.3”项下结果,本研究从上调和下调表达基因中分别选取 1 个与免疫相关的代表性基因(即 *ICAM1*、*CCL14* 基因^[10-11])进行 qRT-PCR 验证。*ICAM1* 基因上游引物:5'-GTGGTCTGTTCCCTGGACG-3',下游引物 5'-GCACATTCACGGTCACCTC-3';*CCL14* 基因上游引物:5'-CCAAGCCCGGAATTGTCTTCA-3',下游引物:5'-GGGTTGGTACAGACGGAATGG-3';内参基因上游

引物:5'-ACAACCTTGGTATCGTGAAGG-3',下游引物:5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'。qRT-PCR 分析结果显示,与对照组比较,400 $\mu\text{g/mL}$ 铁皮石斛多糖组 *ICAM1* 基因的相对表达量显著升高,*CCL14* 基因的相对表达量显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),与芯片检测结果一致,详见表 4。

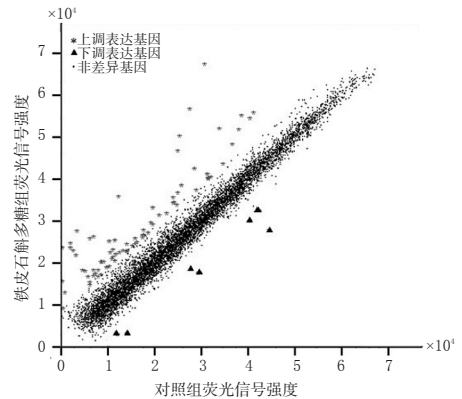


图 1 芯片杂交荧光信号的散点图

Fig 1 Scatter plot of fluorescence signals after chip hybridization

引物:5'-ACAACCTTGGTATCGTGAAGG-3',下游引物:5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'。qRT-PCR 分析结果显示,与对照组比较,400 $\mu\text{g/mL}$ 铁皮石斛多糖组 *ICAM1* 基因的相对表达量显著升高,*CCL14* 基因的相对表达量显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),与芯片检测结果一致,详见表 4。

4 讨论

多糖是铁皮石斛的主要成分之一,有研究表明铁皮石斛多糖具有一定的免疫活性^[12]。据相关文献报道,铁皮石斛多糖是一种可保护 HUVEC 细胞功能的药物,在发生氧化应激损伤时,其可通过抑制炎症因子的过表达来保护 HUVEC 细胞,对糖尿病血管病变的早期干预及保护具有一定的作用^[13]。有研究从细胞水平探讨了铁皮石斛多糖对小鼠 T 淋巴细胞转化功能、自然杀伤细胞活性以及巨噬细胞吞噬作用的影响,发现其可明显提高 S180 荷瘤小鼠的上述功能,具有一定的免疫调节功能^[14]。上述研究对铁皮石斛多糖的药理研究多局限于某几个基因或某几条通路,难以从整体的角度全面观察药物的作用机制。基因表达谱芯片技术可高效、快速地对相关生物学信息进行高通量分析,进而从全基因组层面寻找

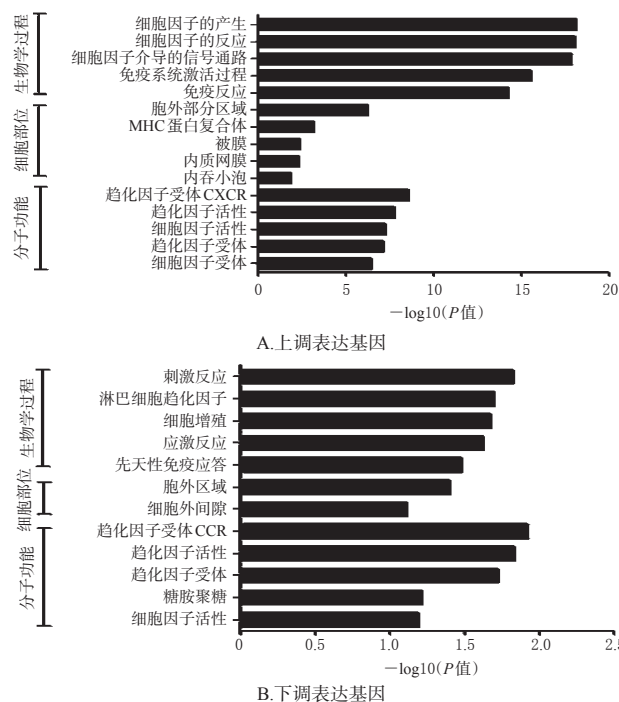


图2 铁皮石斛多糖作用后HUVEC细胞上/下调表达基因GO富集分析结果

Fig 2 GO enrichment analysis results of up-regulated and down-regulated genes in HUVEC cells after treated with *D. officinale* polysaccharides

表3 铁皮石斛多糖作用后HUVEC细胞上/下调表达基因主要KEGG通路富集分析结果

Tab 3 KEGG enrichment pathway analysis results of up-regulated and down-regulated genes in HUVEC cells after treated with *D. officinale* polysaccharides

通路	富集基因数	基因	P	备注
TNF信号通路(TNF signaling pathway)	10	SELE, CCL2, ICAM1, CXCL1, CXCL2, CXCL10, CSF2, IL6, NFKBIA, TNFAIP	5.081×10^{-10}	上调
甲型H1N1流感[Influenza A(H1N1)]	10	ICAM1, IL6, CCL2, JRF7, OAS1, OAS3, NFKBIA, DNAJC3, MX1, CXCL10	2.222×10^{-9}	上调
单纯疱疹病毒感染(Herpes simplex virus infection)	7	IL6, JRF7, CCL2, OAS1, OAS3, NFKBIA, HLA-B	9.725×10^{-7}	上调
麻疹(Measles)	7	IL6, JRF7, OAS1, OAS3, NFKBIA, MX1, TNFAIP3	2.251×10^{-5}	上调
趋化因子信号通路(Chemokine signaling pathway)	7	CXCL1, CXCL2, CXCL6, CXCL10, CXCL11, CCL2, NFKBIA	1.390×10^{-5}	上调
类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis)	6	CSF2, ICAM1, IL6, CCL2, CXCL6, MMP1	8.758×10^{-8}	上调
军团菌病(Legionellosis)	4	CXCL1, CXCL2, IL6, NFKBIA	8.965×10^{-5}	上调
疟疾(Malaria)	4	ICAM1, IL6, CCL2, SELE	6.100×10^{-5}	上调
NOD样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)	5	CXCL1, CXCL2, IL6, CCL2, TNFAIP3	9.638×10^{-5}	上调
Toll样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)	5	IL6, JRF7, NFKBIA, CXCL10, CXCL11	9.557×10^{-5}	上调
趋化因子信号通路(Chemokine signaling pathway)	1	CCL14	2.691×10^{-2}	下调

表4 qRT-PCR验证ICAM1、CCL14基因的表达情况($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Expression of ICAM1 and CCL14 gene in qRT-PCR validation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ICAM1	CCL14
对照组	1	1
400 μg/mL铁皮石斛多糖组	$8.87 \pm 2.72^*$	$0.35 \pm 0.11^*$

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$

主要分布于胞外区域,通过细胞因子的产生及反应、刺激反应等生物学过程来发挥趋化因子及其受体活性等分子功能。这提示铁皮石斛多糖的免疫调节作用可能

差异表达基因,以便更为全面地汇总药物潜在作用靶点的通路信息^[6]。目前,利用基因芯片等高通量技术对铁皮石斛多糖的免疫调节作用进行全面研究的相关文献较少,且有关其作用于HUVEC细胞(HUVEC细胞能产生多种免疫因子,是机体发挥免疫功能的重要细胞^[15])的报道更为鲜见。为此,本研究通过MTS试验筛选铁皮石斛多糖的试验剂量,并利用基因表达谱芯片技术探讨了经铁皮石斛多糖处理后HUVEC细胞基因表达谱的变化情况。

结果显示,经100、200、400、800 μg/mL铁皮石斛多糖作用24 h后, HUVEC细胞的存活率均较对照组显著降低,差异均有统计学意义,提示铁皮石斛多糖对HUVEC细胞的增殖具有一定的抑制作用。此外,铁皮石斛多糖的IC₃₀值为408 μg/mL,故将400 μg/mL作为后续研究的剂量。

基因芯片结果显示,经铁皮石斛多糖处理后, HUVEC细胞中共有差异表达基因91个,其中表达上调的有84个、表达下调的有7个。Ratio值排序前5位的上调表达基因分别为SELE、CCL2、CXCL6、IL8、ICAM1,主要与免疫调节、炎症反应等有关;Ratio值排序前5位的下调表达基因分别为VWCE、CPT1A、CLU、CCL14、CINS4,主要与肿瘤、免疫调节等有关。GO富集分析结果显示,经铁皮石斛多糖处理后, HUVEC细胞的差异表达基因

与促进HUVEC细胞表面免疫相关趋化因子及其受体等的表达有关。KEGG通路富集分析结果显示,经铁皮石斛多糖作用后, HUVEC细胞上调表达基因主要富集于TNF信号通路、甲型H1N1流感、单纯疱疹病毒感染、麻疹、趋化因子信号通路、类风湿性关节炎等通路上,可见SELE、CCL2、ICAM1、CXCL2、CXCL6等基因;而下调表达基因主要富集于趋化因子信号通路上,如CCL14基因。

结合GO富集分析和KEGG通路富集结果,本研究选择与免疫调节作用相关的代表性基因进行qRT-PCR验证。其中,上调表达基因ICAM1编码蛋白是免疫球蛋白

白超家族的成员之一,其表达与细胞内多种抗炎通路有关,上调 *ICAM1* 基因的表达可促进抗炎效果、修复机体炎症损伤,是抗炎关键性分子之一^[10];此外, *ICAM1* 介导的信号通路的激活可促进 T 细胞的生长与活化,并促进细胞因子的释放,从而激活机体免疫系统、提高机体免疫力^[6]。 *CCL14* 基因编码蛋白又称血浆过滤 CC 趋化因子,在免疫相关疾病中,可活化巨噬细胞,参与免疫调节,该基因表达的降低可抑制巨噬细胞的活化,并减轻机体炎症反应^[11]。本研究采用 qRT-PCR 法对 *ICAM1*、*CCL14* 基因的表达情况进行了验证。结果显示,经铁皮石斛多糖处理后, HUVEC 细胞中 *ICAM1* 基因的相对表达量较对照组显著升高, *CCL14* 基因的相对表达量较对照组显著降低,差异均有统计学意义,与基因谱芯片检测结果一致,进一步佐证了铁皮石斛的免疫调节及抗炎作用。

综上所述,经铁皮石斛多糖处理后, HUVEC 细胞共有 91 个基因表达差异明显,且以表达上调为主;表达差异基因可能通过 TNF 信号通路、甲型 H1N1 流感、单纯疱疹病毒感染等通路参与机体免疫调节。本研究通过分析铁皮石斛多糖作用于 HUVEC 细胞后基因表达谱的变化以及差异表达基因的富集通路,可初步探索其在免疫调节过程中的分子机制,可为全面阐明其药理作用机制提供参考。但是,目前关于上述基因与免疫相关疾病的研究有限,铁皮石斛多糖如何通过调控靶基因的表达来增强机体免疫功能尚有待深入研究;此外,上述潜在靶基因及富集通路仍有待在体研究进一步验证。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015 年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:282-283.

[2] HUANG K, LI Y, TAO S, et al. Purification, characterization and biological activity of polysaccharides from *Dendrobium officinale*[J]. *Molecules*, 2016. DOI: 10.3390/molecules20160701.

[3] LIN X, SHAW PC, SZE SC, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharides ameliorate the abnormality of aquaporin 5, pro-inflammatory cytokines and inhibit apoptosis in the experimental Sjögren's syndrome mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(12):2025-2032.

[4] XIANG L, STEPHEN SZE CW, NG TB, et al. Polysaccharides of *dendrobium officinale* inhibit TNF- α -induced apoptosis in A-253 cell line[J]. *Inflamm Res*, 2012, 26(3):

313-324.

[5] 何小群,黄锁义,肖刚,等.铁皮石斛多糖对癫痫大鼠海马 NF- κ B 和 IL-10 表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(7):123-125.

[6] 程京,邢婉丽.生物芯片技术[M].北京:清华大学出版社, 2004:291-303.

[7] 丁艳.铁皮石斛对高糖环境下人脐静脉内皮细胞产生 NO、TNF-A 和 ICAM-1 的影响[D].衡阳:南华大学, 2013.

[8] BRAZMA A, VILO J. Gene expression data analysis[J]. *Microbes Infect*, 2001, 3(10):823-829.

[9] YANAIHARA N, HIRATA Y, YAMAGUCHI N, et al. Antitumor effects of interleukin-6 (IL-6)/interleukin-6 receptor (IL-6R) signaling pathway inhibition in clear cell carcinoma of the ovary[J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55(5):832-841.

[10] HUBBARD AK, ROTHLEIN R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades[J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(9):1379-1386.

[11] YI L, ZHENG Y, LI T, et al. Chemokines CCL2, 3, 14 stimulate macrophage bone marrow homing, proliferation and polarization in multiple myeloma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27):24218-24229.

[12] HUANG X, NIE S, CAI H, et al. Study on *Dendrobium officinale* O-acetyl-glucomannan (*Dendronan*[®]): Part VI: protective effects against oxidative stress in immunosuppressed mice[J]. *Food Res Int*, 2015. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.01.035.

[13] 石梅兰.铁皮石斛对高糖环境下 HUVECs 氧化应激损伤的保护作用[D].衡阳:南华大学, 2012.

[14] 张红玉,戴关海,马翠,等.铁皮石斛多糖对 S180 肉瘤小鼠免疫功能的影响[J]. *浙江中医杂志*, 2009, 44(5):380-381.

[15] SUN XL, LAW BY, DE SEABRA RODRIGUES DIAS IR, et al. Pathogenesis of thromboangiitis obliterans: gene polymorphism and immunoregulation of human vascular endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2017. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.009.

[16] Parameswaran N, Suresh R, Bal V, et al. Lack of ICAM-1 on APCs during T cell priming leads to poor generation of central memory cells[J]. *J Immunol*, 2005, 175(4):2201-2211.

(收稿日期:2018-09-16 修回日期:2019-01-12)

(编辑:张元媛)