

甘露糖对巨噬细胞炎症反应的双向调节作用

吴惠娟, 韦曲星, 张盛昔, 胡因铭, 王乐旬

(广东省代谢病中西医结合研究中心//广东省代谢性疾病中医药防治重点实验室//粤港澳联合代谢病重点实验室//广东药科大学中医药研究院, 广东 广州 510006)

摘要:【目的】探讨甘露糖(Man)对炎症反应的调控及其机制,为甘露糖在炎症疾病中的应用提供依据。【方法】利用不同浓度的甘露糖处理RAW264.7巨噬细胞24 h或48 h,细胞计数检测增殖情况。低浓度(2 mmol/L)和高浓度(20 mmol/L)Man预处理RAW264.7细胞12 h,然后脂多糖(LPS)处理8 h或24 h,收集mRNA、蛋白质及培养上清,通过Q-PCR、Western blot和ELISA检测炎症相关指标以及甘露糖受体(CD206)的变化。【结果】在5 mmol/L以下,细胞增殖随Man的浓度增加而增加;在5 mmol/L以上,则相反。和LPS处理相比,LPS+甘露糖2 mmol/L(Man2)能够增高IL-1 β 、IL-12和TNF- α 的mRNA水平以及蛋白水平(均 $P<0.05$);LPS+Man20显著抑制IL-1 β 、IL-12、TNF- α 、IL-6和CCL2的mRNA水平和蛋白水平(均 $P<0.05$)。网络药理学预测甘露糖及其代谢产物的潜在作用靶点有包括AKT和STAT3在内的20个蛋白。Man2可协同LPS刺激AKT和STAT3的磷酸化(均 $P<0.05$),而Man20可抑制LPS诱导的AKT、p65和ERK磷酸化水平的增加(均 $P<0.05$)。单独甘露糖处理可抑制AKT、STAT3和p65的磷酸化(均 $P<0.05$)。【结论】不同浓度的甘露糖对炎症反应具有不同的作用。低浓度甘露糖能够促进LPS诱导的巨噬细胞炎症反应,而高浓度的甘露糖具有抑制LPS诱导的炎症反应,其机制与调控AKT、STAT3、p65和ERK的活性有关。

关键词:甘露糖;巨噬细胞;炎症;信号通路

中图分类号:R392.12

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2020)04-0549-09

Dual-directional Regulation Effects of Mannose on Inflammatory Response of Macrophages

WU Hui-juan, WEI Qu-xing, ZHANG Sheng-xi, HU Yin-ming, WANG Le-xun

(Guangdong Metabolic Disease Research Center of Integrated Chinese and Western Medicine// Guangdong Key Laboratory of Metabolic Disease Prevention and Treatment of Traditional Chinese Medicine// Joint Laboratory of Guangdong, Hong Kong and Macao on Glycolipid Metabolic Diseases// Institute of Chinese Medicine Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, 510006, China)

Correspondence to: WANG Le-xun; E-mail: wanglexun123456@163.com

Abstract:【Objective】To explore the regulation and mechanism of mannose (Man) on inflammatory response, so as to provide the basis for application of Man in inflammatory diseases.【Methods】RAW264.7 macrophages were treated with different concentrations of Man for 24 h or 48 h, and the proliferation was detected by cell count. RAW264.7 cells were pretreated with low concentration (2 mmol/L) and high concentration (20 mmol/L) of Man for 12 h, followed by treatment with lipopolysaccharide (LPS) for 8 h or 24 h more. mRNA, protein and culture supernatant were collected, and the inflammation related cytokines, proteins and mannose receptor (CD206) were detected by Q-PCR, Western blot, and ELI-

收稿日期:2020-01-16

基金项目:广东省自然科学基金博士启动纵向协同项目(2018A030310403);广东省医学科研基金(A2018068);广东药科大学“创新强校工程”项目(2018KTSCX112)

作者简介:吴惠娟,硕士,研究方向:中医药防治糖脂代谢病,E-mail:wuhuijuan1024@163.com;韦曲星,并列第一作者,硕士,研究方向:糖脂代谢病的中西医结合研究,E-mail:tcmcrawler@163.com;王乐旬,通信作者,博士,助理研究员,研究方向:糖脂代谢病的机制研究,E-mail:wanglexun123456@163.com

SA.【Results】The cell proliferation was increased with the increase of Man concentration under 5 mmol/L, while it was decreased with the increase of Man concentration over 5 mmol/L. Compared with LPS treatment, 2 mmol/L mannose (Man2) plus LPS increased the mRNA levels of IL-1 β , IL-12 and TNF- α and the protein levels (all $P<0.05$), while Man20 + LPS treatment significantly decreased the mRNA levels of IL-1 β , IL-12, TNF- α , IL-6, and CCL2 and the protein levels (all $P<0.05$). The potential targets of network pharmacology for Man and its metabolites were 20 proteins, including AKT and STAT3. Furthermore, the phosphorylation levels of AKT and STAT3 (all $P<0.05$) were increased in Man2 + LPS group and the phosphorylation levels of AKT, p65 and ERK (all $P<0.05$) were decreased in Man20 + LPS group compared with LPS group. The phosphorylation levels of AKT, p65 and STAT3 (all $P<0.05$) were decreased in Man20 group compared with control group.【Conclusions】Different concentrations of mannose have various effects on inflammatory response. Low concentration mannose promotes macrophage inflammatory response induced by LPS, while high concentration mannose inhibits LPS-induced inflammatory response. And this mechanism is related to the regulation of AKT, STAT3, p65, and ERK activities.

Key words: mannose; macrophage; inflammation; signal pathway

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2020, 41(4):549-557]

甘露糖(mannose, Man),是一种6碳单糖,为葡萄糖的一种异构体,主要以甘露聚糖、半纤维素和纤维素等聚糖的形式存在于植物、微生物和动物体内^[1-2]。少量游离的甘露糖存在于柑橘、苹果和桃等多种水果中^[1,3]。正常情况下,哺乳动物体内甘露糖的浓度约为50~100 $\mu\text{mol/L}$ ^[2,4],人体血浆中甘露糖的浓度不超过50 $\mu\text{mol/L}$ ^[2,5]。甘露糖主要借助于细胞膜上的己糖转运受体通过易化扩散的方式进入细胞^[2]。进入细胞的甘露糖被己糖激酶(hexokinase, HK)催化生成甘露糖6磷酸(mannose-6-phosphate, M6P),然后被磷酸甘露糖异构酶(phosphomannose isomerase, PMI)催化生成果糖6磷酸,进入糖酵解途径分解(约占95~98%),或者被磷酸甘露糖变位酶(phosphomannomutase, PMM2)催化生成甘露糖1磷酸,参与蛋白质糖基化途径(约占2%)^[2,4-5]。甘露糖具有重要的生理功能,比如可促进肠道菌群的平衡和促进胰岛素的分泌等;其还可作为维生素合成、抗肿瘤药物以及免疫调控药物的成分^[1]。另外,甘露糖具有无毒副作用、甜味强和低热量的特点,常作为食品添加剂用于食品的生产^[1]。正是由于甘露糖的诸多优点和应用,使其受到越来越多的关注和研究。随着对甘露糖研究的深入,发现甘露糖对炎症反应具有重要的调控作用。研究^[6]显示甘露糖可以抑制皮肤损伤引起的炎症,以及抑制活化的白细胞通过与透明质酸的结合而在损伤部位的聚集。另外,甘露糖不仅通过抑制中性粒细胞氧化爆发进而抑制炎症反应^[7],还

可通过诱导T淋巴细胞向Teg细胞分化进而抑制气道的炎症反应^[8]。此外,在动物水平上,甘露糖可显著抑制LPS所致的急性肺损伤^[9-11]。上述研究大都为现象的描述,没有在巨噬细胞上探讨不同浓度下甘露糖单糖对炎症调控的作用及其机理。本研究以LPS诱导小鼠巨噬细胞RAW264.7作为体外炎症细胞模型,观察不同剂量甘露糖单糖对炎症状态下细胞内炎症因子mRNA水平及其蛋白表达的影响,并探讨其对炎症相关信号通路的调控,进一步明确甘露糖对炎症的调控作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

RAW264.7小鼠巨噬细胞购自中国科学院细胞库,用含有100 U/mL的青霉素和0.1 mg/mL的链霉素以及100 mL/L的胎牛血清的DMEM低糖培养基于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 培养箱中常规培养。

1.2 试剂及仪器

DMEM培养基、胎牛血清、青/链霉素、HRP标记的羊抗鼠IgG和羊抗兔IgG购自Thermo Fisher Scientific公司;台盼蓝、Man和脂多糖(LPS)购自Sigma-Aldrich公司;iNOS抗体购自Abcam公司;GAPDH抗体购自ProteinTech公司;p-STAT3、STAT3、p-p65、p65、p-ERK和ERK抗体购自Cell Signaling Technology公司;CD206抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;硝酸纤维素膜为Millipore

公司产品;ECL发光液为武汉聚能慧达生物科技有限公司产品;RNAiso-Plus试剂为Takara公司产品;IL-6、IL-10、TNF- α 、IL-1 β 和CCL2的ELISA试剂盒为江苏菲亚生物科技有限公司产品;逆转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒购自TOYOBO公司;蛋白定量试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;牛血清白蛋白(BSA)、Western细胞裂解液为上海碧云天生物技术公司产品。LightCycler 480荧光定量PCR仪为Roche公司产品;5810R低温离心机为Eppendorf公司产品;NanoDrop 2000核酸浓度测定仪为Thermo Fisher Scientific公司产品;Mithras LB-940酶标仪购自德国Berthold公司;电泳仪及转膜仪为Bio-Rad公司产品。

1.3 细胞计数检测增殖情况

将对数生长期的RAW264.7细胞种于6孔培养板中,每孔含有5 $\times$ 10⁵个细胞,待细胞贴壁后,加入0、1.25、2.5、5、10、20、40 mmol/L的甘露糖,继续培养24 h。然后消化、收集细胞,0.4%的台盼蓝染色,计数活细胞的数量。

1.4 细胞处理

将RAW264.7细胞种于6孔培养板中,每孔含有1 $\times$ 10⁶个细胞,加入不同浓度的甘露糖预处理12 h后,加入LPS(50 ng/mL),设置对照组、LPS组、Man低剂量组(2 mmol/L, Man2)、Man高剂量组(20 mmol/L, Man20)、LPS + Man2组和LPS + Man20组,然后处理8 h或24 h,收集细胞提取mRNA、蛋白质或培养上清进行后续检测试验。

1.5 Q-PCR检测细胞内mRNA表达

mRNA提取、Q-PCR过程详见参考文献[12]。引物由上海英潍捷基公司合成,序列见表1。

1.6 Western blot检测细胞内蛋白的变化

过程详见参考文献[12]。

1.7 ELISA检测细胞培养上清炎症因子的含量

收取刺激24 h后的培养上清及培养液,按照上述计数方法计数活细胞数量,并按照试剂盒说明书进行操作,检测上清中IL-12、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和CCL2的含量,最终计算每10⁶个细胞所分泌的炎症因子的蛋白量。

1.8 网络药理学方法预测甘露糖及其代谢产物的靶点

1.8.1 作用靶点预测 通过有机小分子生物活性数据库PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>)查询甘露糖及其代谢产物甘露糖-6-磷酸的SMILE结构。将查询到的SMILE结构输入SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)获取甘露糖与甘露糖-6-磷酸的作用靶点,并导入Uniprot数据库(<http://www.uniprot.org/>)进行基因标准化。

1.8.2 炎症靶点预测 通过DisGeNET数据库(<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu/home>)检索与炎症有关的靶点基因,经UniProt统一为基因名。

1.8.3 甘露糖及甘露糖-6-磷酸炎症靶点收集 将甘露糖、甘露糖-6-磷酸和炎症靶点导入Excel表格,通过“重复值”找出甘露糖或甘露糖-6-磷酸与炎症的共同靶点。

1.8.4 通路分析 将化合物与炎症的共有靶点导入DAVID 6.8数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),物种选择小鼠(Mus musculus, mouse),进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,按照 $P<0.05$ 筛选出炎症相关通路。

表1 Q-PCR引物序列
Table 1 Primer sequences for Q-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
IL-1 β	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
IL-6	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TCCACGATTTCAGAAAC
IL-10	CAGGACTTTAAGGGTTACTTGG	GGCCTTGTAGACACCTTGTC
CCL2	ATTAAAAACCTGGATCGGAAC	GCATTAGCTTCAGATTACGGGT
TNF- α	CTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
CD206	ACCTGGCAAGTATCCACAGCTTG	TGTTGTTCTCATGGCTTGGCTCTC
GAPDH	GGTCATCCATGACAACTT	GGGGCCATCCACAGTCTT

1.8.5 网络构建 将整理好的化合物-靶点关系导入 Cytoscape 3.6.1 软件构建“化合物-靶点”网络。

1.9 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7 软件(GraphPad Software 公司)进行统计分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示。样本数据首先进行正态性检验和方差齐性检验,对于符合正态分布且方差齐性的数据,采用单因素方差分析(ANOVA),多重比较采用 Tukey 检验;不符合正态分布或方差不齐的数据采用 H 检验。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

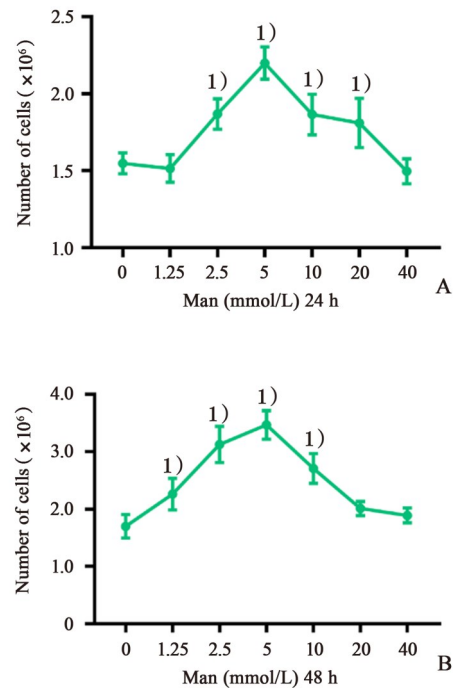
2 结果

2.1 不同浓度甘露糖对 RAW263.7 细胞增殖的影响

首先,我们验证了不同浓度的甘露糖对巨噬细胞增殖的影响。实验结果显示,不同浓度的甘露糖处理细胞 24 h 后,5 mmol/L 组的细胞数量最多,为 $(2.20 \pm 0.10) \times 10^6$,约为对照组 $(1.55 \pm 0.07) \times 10^6$ 的 1.4 倍(图 1)。在 5 mmol/L 以下,随着浓度的增加,细胞数量随之增加;在 5 mmol/L 以上,随着甘露糖浓度的增加,细胞数量随之降低,但没有低于对照组。48 h 的细胞增殖趋势与 24 h 的类似(图 1)。鉴于此,我们选择了甘露糖的两个浓度:2 mmol/L (低浓度)和 20 mmol/L (高浓度)进行后续的实验。

2.2 不同浓度甘露糖对 LPS 刺激的巨噬细胞中炎症因子 mRNA 水平的影响

和对照组相比,LPS 能够显著增强 RAW263.7 细胞中 IL-1 β ($P=0.000$)、IL-6 ($P=0.000$)、IL-12 ($P=0.000$)、CCL2 ($P=0.000$) 和 TNF- α ($P=0.000$) 的 mRNA 水平(图 2)。利用 2 mmol/L 的甘露糖预处理后,能够显著增强 LPS 对 IL-1 β ($P=0.000$)、IL-12 ($P=0.0004$) 和 TNF- α ($P=0.025$) 的 mRNA 水平的刺



Compared with 0, 1) $P<0.05$. (A: 24 h, $F=33.24$, $P<0.0001$; B: 48 h, $F=49.56$, $P<0.0001$), $n=3$

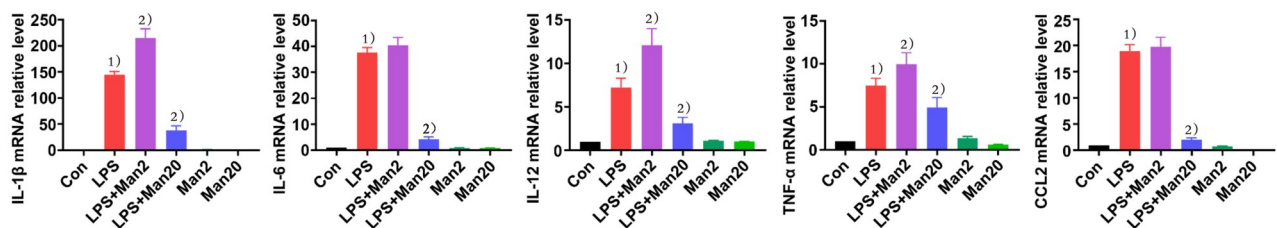
图1 不同浓度甘露糖对 RAW246.7 细胞增殖的影响

Fig.1 The effects of different concentrations of mannose on the proliferation of RAW246.7 cells

激。然而,20 mmol/L 的甘露糖预处理后,能够显著抑制 LPS 诱导的 IL-1 β ($P=0.000$)、IL-6 ($P=0.000$)、IL-12 ($P=0.0016$)、CCL2 ($P=0.000$) 和 TNF- α ($P=0.022$) 的 mRNA 水平的升高(图 2)。

2.3 不同浓度甘露糖对炎症因子蛋白水平的影响

和对照组相比,LPS 能够显著刺激巨噬细胞中 IL-1 β ($P=0.000$)、IL-6 ($P=0.000$)、IL-12 ($P=0.000$)、TNF- α ($P=0.000$) 和 CCL2 ($P=0.000$) 蛋白的分泌(图 3)。和 LPS 单独处理相比,2 mmol/L 甘露糖能够协同 LPS 对巨噬细胞 IL-1 β ($P=0.0009$)、



Compared with Con, 1) $P<0.05$; Compared with LPS, 2) $P<0.05$. (IL-1 β : $F=352.5$, $P<0.0001$; IL-6: $F=502.2$, $P<0.0001$; IL-12: $F=71.16$, $P<0.0001$; TNF- α : $F=68.73$, $P<0.0001$; CCL2: $F=332.5$, $P<0.0001$) $n=3$

图2 不同浓度甘露糖对 LPS 诱导的炎症因子 mRNA 的影响

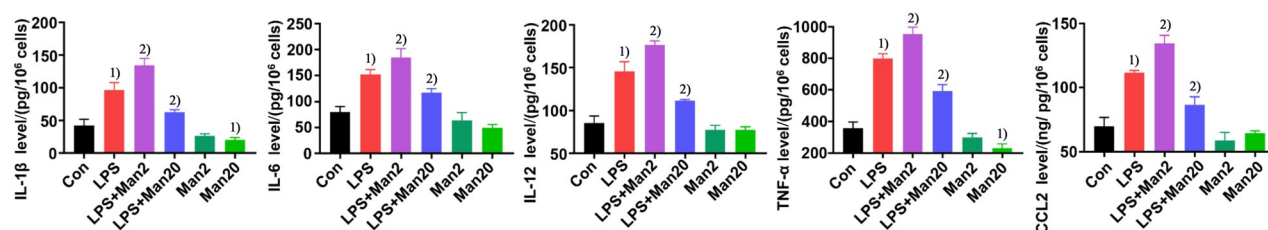
Fig.2 The effects of different concentrations of mannose on the mRNA level of inflammatory cytokines induced by LPS

IL-6 ($P=0.047$)、IL-12 ($P=0.000\ 9$)、TNF- α ($P=0.002$)和CCL2($P=0.002\ 2$)蛋白分泌的刺激,而20 mmol/L甘露糖则能够显著抑制LPS诱导的IL-1 β ($P=0.002\ 1$)、IL-6($P=0.029$)、IL-12($P=0.000\ 4$)、TNF- α ($P=0.000\ 1$)和CCL2($P=0.001$)蛋白分泌。另外,20 mmol/L的甘露糖单独处理能够抑制对巨噬细胞中IL-1 β ($P=0.045$)和TNF- α ($P=0.008\ 3$)的分泌。

2.4 甘露糖及甘露糖-6-磷酸的作用靶点预测

甘露糖进入细胞后大部分会在己糖激酶的作用下转变成甘露糖-6-磷酸^[2],我们通过网络药理

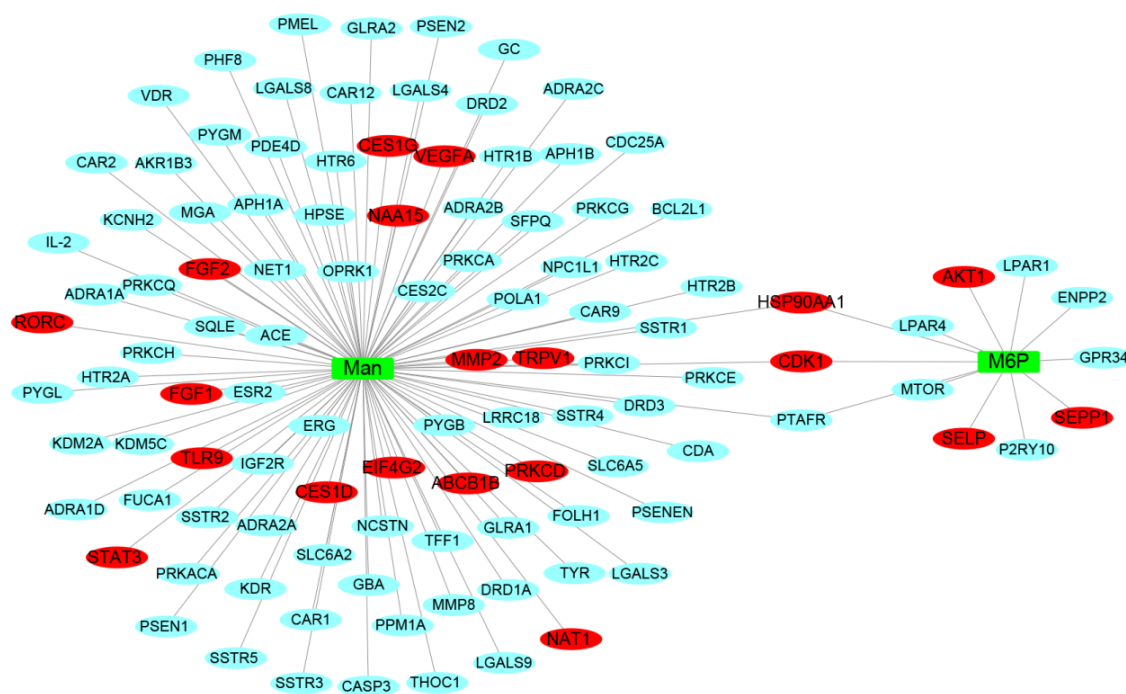
学的方法分析了甘露糖及甘露糖-6-磷酸的潜在作用靶点。结果显示,甘露糖有101个作用靶点,甘露糖-6-磷酸有12个靶点,其中有3个是两者的共同靶点(图4)。另外,通过将化合物和炎症的20个共有靶点导入DAVID数据库进行通路富集显示,甘露糖及甘露糖-6-磷酸通过和炎症相关的20个靶点影响9条炎症信号相关通路,分别是:PI3K-Akt信号通路、HIF-1信号通路、胰岛素抵抗通路、Ras信号通路、Rap1信号通路、雌激素信号通路、孕酮介导的卵母细胞成熟通路、调节干细胞多能性的信号通路和麻疹相关通路。



1) Compared with Con, $P<0.05$; 2) Compared with LPS, $P<0.05$. (IL-1 β : $F=93.74$, $P<0.000\ 1$; IL-6: $F=61.7$, $P<0.000\ 1$; IL-12: $F=117.5$, $P<0.000\ 1$; TNF- α : $F=204.5$, $P<0.000\ 1$; CCL2: $F=93.55$, $P<0.000\ 1$), $n=3$

图3 不同浓度甘露糖对LPS诱导的炎症因子蛋白的影响

Fig.3 The effects of different concentrations of mannose on the protein levels of inflammatory cytokines induced by LPS



The green nodes represent compounds, the blue nodes represent the target protein, and the red nodes represent inflammation-related proteins. The lines between the nodes represent the interaction between the compound and the target protein.

图4 化合物-靶点网络

Fig.4 Compound-target network

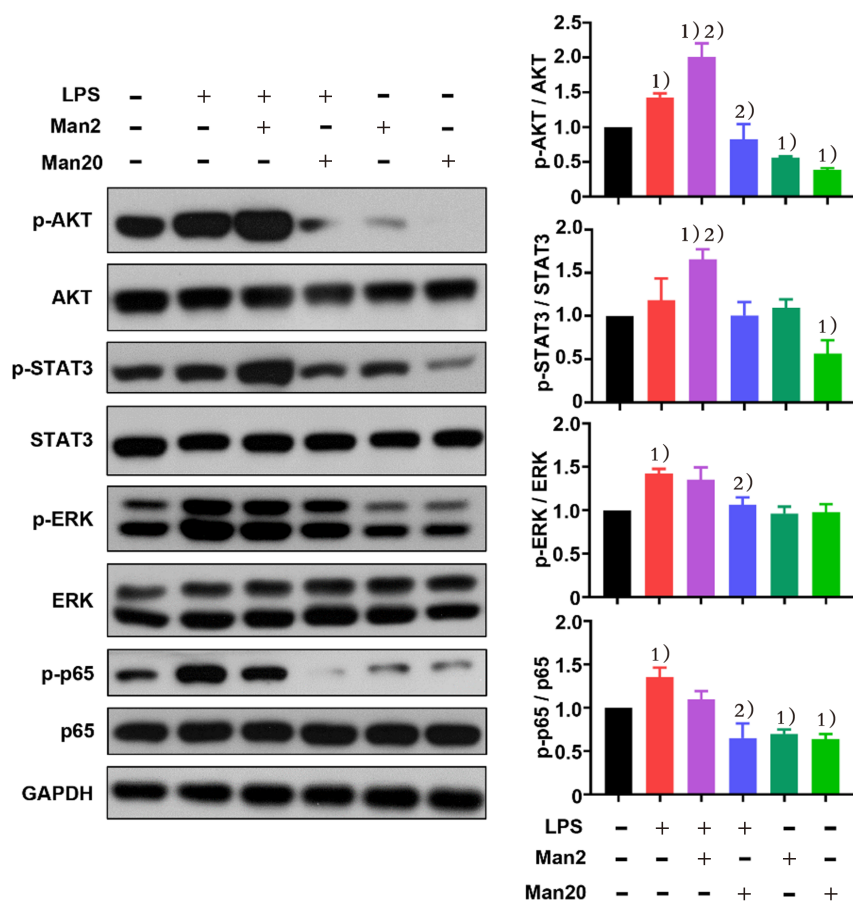
2.5 不同浓度甘露糖对炎症细胞模型信号通路的影响

网络药理学预测显示,进入细胞内的甘露糖及其代谢产物甘露糖-6-磷酸对包括 AKT 和 STAT3 在内的炎症相关蛋白具有潜在作用,接下来我们验证了甘露糖对巨噬细胞中 AKT 和 STAT3 的磷酸化形式的影响。结果显示,和对照组相比,LPS 能够显著增加 AKT($P = 0.011$)、ERK($P = 0.0007$)和 p65($P = 0.0078$)的磷酸化水平,但对 STAT3 的磷酸化水平影响不大(图5)。和 LPS 处理相比,2 mmol/L 甘露糖能够协同 LPS 增强巨噬细胞中 AKT($P = 0.0009$)和 STAT3($P = 0.02$)的磷酸化水平,而 20 mmol/L 甘露糖则显著抑制 LPS 诱导 AKT($P = 0.0007$)、ERK($P = 0.0028$)和 p65($P = 0.000$)的磷酸化水平。和对照相比,单独甘露糖处理对巨噬细胞中 AKT

($P = 0.0095$, Man2; $P = 0.0006$, Man20)、STAT3($P = 0.037$, Man20)和 p65($P = 0.024$, Man2; $P = 0.0068$, Man20)的磷酸化水平产生了一定的抑制作用,但对 ERK 的磷酸化没有明显的影响。

3 讨论

作为葡萄糖 C-2 差向异构体,甘露糖往往以多糖形式存在于植物和水果中,在人体血液中的浓度不足葡萄糖的五十分之一^[8]。近年来,随着对其生理功能认识的不断加深,发现甘露糖具有抗菌、调节免疫、治疗疾病等多种功能^[7-8,13],受到越来越多的关注和研究。本研究探讨了不同浓度的甘露糖单糖对 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应的影响。我们证实低浓度的甘露糖能够促进



Compared with Con, ¹⁾ $P < 0.05$; Compared with LPS, ²⁾ $P < 0.05$. (p-AKT/AKT: $F = 70.73$, $P < 0.0001$; p-STAT3/STAT3: $F = 16.52$, $P < 0.0001$; p-ERK/ERK: $F = 16.84$, $P < 0.0001$; p-p65/p65: $F = 27.16$, $P < 0.0001$) $n = 3$

图5 不同浓度甘露糖对细胞信号通路蛋白的影响

Fig.5 The effects of different concentrations of mannose on the signaling pathways

LPS 诱导的炎症因子的表达,而高浓度的甘露糖则抑制 LPS 诱导的炎症反应。机制上,甘露糖对炎症反应的调控是通过 p65、STAT3 和 ERK 信号通路来进行的。

甘露糖对细胞增殖有一定的影响。研究^[14]显示,25 mmol/L 的甘露糖处理不同肿瘤细胞 48 h 及 72 h,能够显著抑制多种肿瘤细胞的增殖。另有研究^[8]显示,利用 25 mmol/L 的甘露糖处理 T 淋巴细胞 48 及 72 h,同样能够抑制 T 细胞的增殖。和上述研究结果不同,本研究的结果显示,5 mmol/L 以下的甘露糖具有促进 RAW264.7 细胞增殖的作用;在 5 mmol/L 以上浓度的甘露糖处理下,细胞增殖随甘露糖浓度的增加呈下降趋势。但是,和对照组相比,20 及 40 mmol/L 的甘露糖处理并未明显抑制细胞的增殖。可能原因是:①细胞系不同,上述研究所用的细胞为人的肿瘤细胞系和小鼠原代 T 淋巴细胞^[8,14],而本研究中所用的 RAW264.7 细胞是小鼠巨噬细胞系;②培养基含糖量不同,Zhang 在培养原代 T 淋巴细胞时,培养基中不含葡萄糖^[8],而本研究中所用培养基含有 5 mmol/L 的葡萄糖,由于葡萄糖的存在,在一定程度上能够促进细胞的快速增殖。本研究的结果证实在随着甘露糖浓度的增加,细胞增殖先升后降,其中可能涉及到不同的作用及其机制。因此,我们选择了两个浓度:一个在细胞增殖上升期的 2 mmol/L 浓度(低浓度),一个在细胞增殖下降期的 20 mmol/L 浓度(高浓度)来进行后续的实验,以验证对细胞增殖具有不同作用的甘露糖对炎症反应的影响。

炎症是一种基本的病理过程,是具有血管系统的活体组织对损伤因素所做出的防御反应,其目的是为了确保去除有害刺激并修复受损组织。在炎症反应及相关疾病发生过程中,巨噬细胞作为主要的炎症细胞发挥了重要的作用。在体外实验中,往往以 LPS 诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞作为体外炎症细胞模型。LPS 可诱导巨噬细胞产生多种炎症介质、细胞因子和趋化因子等^[15],均可引起和促进炎症反应的发生和发展,所以该细胞模型被广泛用于研究化合物或药物对炎症的影响及机制^[12,15-16]。有研究显示,甘露糖具有抑制 LPS 诱导的急性肺损伤的作用^[9,11]。机制上,甘露糖(1 和 10 mmol/L)单糖能够抑制 LPS 诱导巨噬细胞的炎症反应进而改善急性肺损伤^[11]。和上述研究相同,在本研究中,高浓度的甘露糖

(20 mmol/L)则能够显著降低 LPS 诱导巨噬细胞中 L-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α 和 CCL2 的 mRNA 及蛋白的水平。而和上述结果不同的是,我们证实低浓度(2 mmol/L)的甘露糖具有协同 LPS 的促炎作用。可能的原因是 Xu^[11]所用 LPS 为 1 μ g/mL,而在本实验中所用 LPS 的浓度为 50 ng/mL。高浓度的 LPS 对细胞的刺激过于剧烈,往往会导致细胞对处理因素反应抵抗,而低浓度的 LPS 所诱导的炎症模型能够更好的反应处理因素对炎症的影响。

网络药理学是融合网络生物学、计算生物学、多向药理学、分子药理学等多学科的方法,构建“疾病-表型-基因-药物”多层次网络,分析药物或化合物在网络中与特定节点的相互作用关系,从系统、整体角度探索药物与机体相互作用的一门新兴、交叉学科^[17]。网络药理学不仅在中药领域中药复方多靶点、多成分、整体性、系统性作用机制研究提供了强有力的技术支撑^[17-18],而且还可以用于预测单体化合物的作用靶点及影响疾病进展的相关通路^[19]。在本研究中,我们通过网络药理学的方法预测了甘露糖及其主要代谢中间产物甘露糖-6-磷酸的炎症作用靶点。预测显示甘露糖及代谢产物有 113 个靶点,其中与炎症相关的有 20 个,包括对炎症具有重要影响的 AKT 和 STAT3。通过炎症靶点与相关信号通路的匹配预测,甘露糖及甘露糖-6-磷酸影响 9 条炎症信号相关通路,为甘露糖的后续研究提供了指导。

甘露糖可影响多条炎症反应相关的信号通路。p65 所介导的 NF- κ B 通路和 ERK 信号通路是炎症反应的最为重要的细胞信号通路,其磷酸化水平的增加可直接指示炎症反应的增强^[20-21]。有研究^[22]显示,甘露糖单糖可抑制成纤维细胞中 p65 和 ERK 的磷酸化进而抑制炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达。和上述成纤维细胞中的研究相似,本研究在巨噬细胞中证实,高浓度甘露糖单糖可以显著抑制 LPS 诱导的 p65 和 ERK 的磷酸化水平。这表明,在高浓度的甘露糖抑制炎症反应中,主要是影响了 NF- κ B 和 ERK 通路。此外,AKT 信号通路和 STAT3 信号通路在炎症反应中也发挥着重要的作用^[21,23-24]。网络药理学预测显示 AKT 和 STAT3 为甘露糖和甘露糖-6-磷酸的炎症靶点。我们的细胞实验证实,高浓度的甘露糖可显著抑制 LPS 诱导的 AKT 和 STAT3 的磷酸化水平,且单独甘露糖处理可抑制 AKT、STAT3 和 p65 的磷酸化水平。这说

明,至少高浓度的甘露糖抑制炎症作用是通过影响 AKT、STAT3 和 p65 通路的活化。

另外,低浓度的甘露糖(Man2)对 AKT 和 p65 活性的影响与 LPS + Man2 对上述两个蛋白活性的影响不同。一般情况下,较低浓度的甘露糖进入细胞后可被 HK 催化生成 M6P,以 M6P 形式存在;在较高浓度情况下,会有一部分以甘露糖单体形式存在^[2,4,14]。根据网络药理学分析,M6P 的靶点之一是 AKT。我们的试验证实,单独 Man2 可以抑制 AKT 的活性。此外,有研究显示,AKT 为 p65 的上游^[25],AKT 可正性调控 p65 的活性。我们推测,Man2 单独处理后抑制了 AKT 的活性,进而对 p65 的活性有了一定的影响。另外,有研究显示,M6P 在 PMI 催化下生成果糖 6 磷酸(fruct-6-phosphate, F6P),其在磷酸果糖激酶(6-phosphofructo-2-kinase)催化下生成的 F1,6-BP 能够促进 AKT 的活化^[26]。我们推测,在 LPS 存在情况下,低浓度的甘露糖在 PMI 和磷酸果糖激酶催化下转变成 F1,6-BP,对 LPS 调

控 AKT 及 p65 的活性产生了协同作用。具体机制是否如此,还需要进一步的研究证实。

甘露糖具有较高的安全性。有研究显示,用含有 1.1 mol/L (198 g/L) 甘露糖的水给小鼠饮用 16 周,未出现毒副作用^[8]。另有研究证实,用含有 20% 甘露糖的水给小鼠饮用,同时给予 20% 的甘露糖水 200 μ L/只灌胃,每周 3 次,约 10 周,结果对小鼠没有明显的影响^[14]。在人体上,通过静脉注射甘露糖维持其血清浓度在 2 mmol/L 连续 3 周,患者显示出很好的耐受性,没有任何肝脏毒性或肾毒性的征兆^[27]。同时,甘露糖已用于治疗尿路感染和先天性糖基化障碍病^[2]。这为甘露糖的临床安全应用提供了依据。

综上,不同浓度的甘露糖对 LPS 诱导的炎症反应具有不同的作用,低浓度的甘露糖具有协同促进炎症的作用,而高浓度的甘露糖则能够显著抑制炎症反应。本实验的结果为甘露糖临床用于抗炎提供了依据。

参考文献

- [1] Wu H, Zhang WL, Mu WM. Recent studies on the biological production of D-mannose[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(21-22): 8753-8761.
- [2] Vandana S, Mie I, Hudson HF. Mannose metabolism: More than meets the eye[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 453(2): 220-228.
- [3] Herman RH. Mannose metabolism. I [J]. Am J Clin Nutr, 1971, 24(4): 488-498.
- [4] Alton G, Hasilik M, Niehues R, et al. Direct utilization of mannose for mammalian glycoprotein biosynthesis[J]. Glycobiology, 1998, 8(3): 285-295.
- [5] Sharma V, Freeze HH. Mannose efflux from the cells: a potential source of mannose in blood[J]. J Biol Chem, 2011, 286(12): 10193-10200.
- [6] Jokela TA, Kuokkanen J, Kärnä R, et al. Mannose reduces hyaluronan and leukocytes in wound granulation tissue and inhibits migration and hyaluronan-dependent monocyte binding [J]. Wound Repair Regen, 2013, 21(2): 247-255.
- [7] Kössi J, Peltonen J, Ekfors T, et al. Effects of hexose sugars: glucose, fructose, galactose and mannose on wound healing in the rat [J]. Eur Surg Res, 1999, 31(1): 74-82.
- [8] Zhang D, Chia C, Jiao X, et al. D-mannose induces regulatory T cells and suppresses immunopathology [J]. Nat Med, 2017, 23(9): 1036-1045.
- [9] Xu XL, Xie QM, Shen YH, et al. Mannose prevents lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats [J]. Inflamm Res, 2008, 57(3): 104-110.
- [10] Xu X, Xie Q, Shen Y, et al. Involvement of mannose receptor in the preventive effects of mannose in lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 641(2-3): 229-237.
- [11] Xu XL, Zhang P, Shen YH, et al. Mannose prevents acute lung injury through mannose receptor pathway and contributes to regulate PPAR γ and TGF- β 1 level [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(6): 6214-6224.
- [12] 王乐句, 吴惠娟, 张盛昔, 等. 伊马替尼抑制脂多糖诱导的巨噬细胞炎症表型[J]. 中山大学学报(医学版), 2019, 40(5): 689-697.
Wang LX, Wu HJ, Zhang SX, et al. Imatinib inhibits the inflammatory phenotype of macrophage induced by lipopolysaccharide [J]. J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(5): 689-697.

- [13] Sihra N, Goodman A, Zakri R, et al. Nonantibiotic prevention and management of recurrent urinary tract infection [J]. *Nat Rev Urol*, 2018, 15(12): 750–776.
- [14] Gonzalez PS, O'Prey J, Cardaci S, et al. Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy [J]. *Nature*, 2018, 563(7733): 719–723.
- [15] Zhu T, Zhang W, Feng SJ, et al. Emodin suppresses LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells through a PPAR γ -dependent pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 34: 16–24.
- [16] Javed S, Li WM, Zeb M, et al. Anti-inflammatory activity of the wild mushroom, *echinodontium tinctorium*, in RAW264.7 macrophage cells and mouse microcirculation [J]. *Molecules*, 2019, 24(19): 3509.
- [17] 陈海彬, 周红光, 李文婷, 等. 网络药理学—中药复方作用机制研究新视角 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(7): 2873–2876.
- Chen HB, Zhou HG, Li WT, et al. Network pharmacology: A new perspective of mechanism research of traditional Chinese medicine formula [J]. *Chung-hua Chung I Yao Tsa Chih*, 2019, 34(7): 2873–2876.
- [18] 张晶, 李冰冰, 黄敏仪, 等. 基于网络药理学的参芪降糖颗粒治疗2型糖尿病机制探讨 [J/OL]. *中草药*: 1–12 [2020-01-14]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1108.r.20191227.1016.004.html>.
- Zhang J, Li BB, Huang MY, et al. Potential targets research of Shenqi Jiangtang Granules on Type 2 Diabetes Based on Network Pharmacology [J/OL]. *Chin Tradit Herb Drugs*: 1–12 [2020-01-14]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1108.r.20191227.1016.004.html>.
- [19] Boezio B, Audouze K, Ducrot P, et al. Network-based approaches in pharmacology [J]. *Mol Inform*, 2017, 36(10). doi:10.1002/minf.201700048.
- [20] Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation [J]. *J Inflamm Res*, 2018, 11:407–419.
- [21] Qiu Z, Lu P, Wang K, et al. Dexmedetomidine inhibits neuroinflammation by altering microglial M1/M2 polarization through MAPK/ERK pathway [J]. *Neurochem Res*, 2019. doi: 10.1007/s11064-019-02922-1.
- [22] Tsai YM, Hsu SC, Zhang J, et al. Functional interaction of cockroach allergens and mannose receptor (CD206) in human circulating fibrocytes [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64105.
- [23] Fan Y, Mao R, Yang J. NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer [J]. *Protein Cell*, 2013, 4(3): 176–185.
- [24] Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, et al. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization [J]. *J Immunol*, 2017, 198(3): 1006–1014.
- [25] Xu J, Zhang H, Li C, et al. Activation of PLC γ /AKT/I κ B α /p65 signaling increases inflammation in mast cells to promote growth of cutaneous neurofibroma [J]. *Life Sci*. 2019, 239: 117079.
- [26] Wu C, Khan SA, Peng LJ, et al. Perturbation of glucose flux in the liver by decreasing F26P2 levels causes hepatic insulin resistance and hyperglycemia [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 291(3): E536–543.
- [27] Mayatepek E, Schröder M, Kohlmüller D, et al. Continuous mannose infusion in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I [J]. *Acta Paediatr*, 1997, 86(10): 1138–1140.

(编辑 孙慧兰)