

# 枸杞多糖经自噬抑制烧伤创面角质细胞凋亡的作用机制

朱永朝, 房超, 赵芳, 张庆, 赵丹

<https://doi.org/10.12307/2024.390>

投稿日期: 2023-05-05

采用日期: 2023-06-28

修回日期: 2023-07-24

在线日期: 2023-08-10

中图分类号:

R459.9; R319; R-331

文章编号:

2095-4344(2024)23-03686-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读: 枸杞多糖促进创面愈合的机制

### 体外实验:

- ◆ 只含有培养基的空白对照组
- ◆ 只含有枸杞多糖的阳性对照组
- ◆ 模拟烧伤后创面炎症环境的实验组
- ◆ 炎症环境下枸杞多糖干预的实验组

### 动物实验验证

### 创面愈合情况

### 人角质细胞

### 创面病理形态

### 深II度烧伤创面模型

### 体外实验检测指标:

- ◆ CCK-8 法检测各组角质细胞的活性情况
- ◆ 流式细胞术和 Western blot 检测各组角质细胞凋亡情况
- ◆ Western blot 法检测各组角质细胞的自噬水平

## 文题释义:

**创面愈合:** 皮肤创面愈合是指皮肤创面通过上皮重新铺设和伤口收缩而闭合。一般认为可分为止血、炎症、增殖和重建4个阶段, 涉及许多不同组织和细胞谱系的相互作用。在人皮肤中, 角质细胞是皮肤损伤的第一反应者, 也是皮肤愈合的最后一个步骤。角质细胞以尽可能快的速度重新增殖、分化、迁移, 关闭伤口, 达到皮肤愈合状态。

**自噬:** 是真核生物中一个复杂的分解代谢过程, 通过自噬体形成和溶酶体降解来降解和回收细胞质成分, 自噬对于维持细胞稳态至关重要。然而, 越来越多的证据表明, 自噬在细胞存活和细胞死亡中起着双重作用, 异常的自噬能够促进神经元凋亡级联反应的激活, 且在多种疾病模型中, 自噬能够促进细胞凋亡。

## 摘要

**背景:** 枸杞多糖具有多种生物活性, 研究发现其具有促进创面愈合的潜在效用。

**目的:** 探讨枸杞多糖在肿瘤坏死因子 $\alpha$ 介导角质细胞凋亡中的作用以及对烧伤创面愈合的作用。

**方法:** ①体外实验: 将角质细胞分4组培养, 正常组加入含体积分数15%胎牛血清及1%谷氨酰胺的 $\alpha$ -MEM培养基(完全培养基), 阳性对照组加入含枸杞多糖的完全培养基, 模型组加入含肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的完全培养基, 实验组加入含枸杞多糖与肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的完全培养基。培养24 h后, 采用CCK-8法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞凋亡, Western blot检测凋亡蛋白Cleaved caspase-8、TNF R1、FADD及自噬蛋白LC3的表达。在正常组、模型组、实验组的基础上, 再增加自噬抑制剂组(加入含3-甲基腺嘌呤的完全培养基)、自噬抑制剂+枸杞多糖组(加入含枸杞多糖、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 与3-甲基腺嘌呤的完全培养基), 培养24 h后, 采用流式细胞术检测角质细胞凋亡情况。②体内实验: 采用随机数字表法将6只SD大鼠分为对照组与实验组, 每组3只。在每只大鼠背部制作4个直径2 cm的深II度烧伤创面模型, 造模24 h后, 对照组与实验组小鼠创面分别涂抹生理盐水、枸杞多糖溶液, 1次/d。治疗后定期观察创面愈合情况, 治疗后28 d取材, 观察创面病理形态。

**结果与结论:** ①体外实验: 单独加入枸杞多糖不影响角质细胞的增殖、凋亡与凋亡及自噬蛋白的表达; 加入肿瘤坏死因子 $\alpha$ 后, 角质细胞增殖受到抑制、凋亡率增加、凋亡及自噬蛋白的表达升高, 枸杞多糖可拮抗肿瘤坏死因子 $\alpha$ 介导的上述作用; 枸杞多糖联合自噬抑制剂组可进一步降低角质细胞的凋亡率; ②体内实验: 实验组大鼠治疗后12, 16, 20, 24, 28 d的创面愈合率均高于对照组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 治疗后28 d的苏木精-伊红染色显示, 与对照组相比, 实验组大鼠创面表皮完整、清晰; ③结果表明: 枸杞多糖通过抑制角质细胞的自噬及凋亡来保护皮肤表皮组织的完整性, 促进创面的愈合。

**关键词:** 角质细胞; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 枸杞多糖; 凋亡; 自噬; 创面愈合

## Mechanism by which lycium barbarum polysaccharides inhibit keratinocyte apoptosis in burn wounds via autophagy

Zhu Yongzhao, Fang Chao, Zhao Fang, Zhang Qing, Zhao Dan

General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Zhu Yongzhao, MD, Associate researcher, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Fang Chao, Attending physician, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Zhu Yongzhao and Fang Chao contributed equally to this work.

**Corresponding author:** Zhao Dan, Research assistant, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

宁夏医科大学总医院, 宁夏回族自治区银川市 750004

第一作者: 朱永朝, 男, 1981年生, 宁夏回族自治区银川市人, 汉族, 博士, 副研究员, 主要从事细胞自噬及组织修复方向研究。

共同第一作者: 房超, 男, 1987年生, 宁夏回族自治区银川市人, 汉族, 主治医师, 主要从事皮肤组织修复方向研究。

通讯作者: 赵丹, 研究实习生, 宁夏医科大学总医院, 宁夏回族自治区银川市 750004

<https://orcid.org/0000-0003-3834-0142> (赵丹)

基金资助: 宁夏回族自治区自然科学基金项目(2020AAC03412); 项目负责人: 赵丹

引用本文: 朱永朝, 房超, 赵芳, 张庆, 赵丹. 枸杞多糖经自噬抑制烧伤创面角质细胞凋亡的作用机制 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(23):3686-3691.



## Abstract

**BACKGROUND:** Lycium barbarum polysaccharide has many biological activities and has been found to have potential effects on promoting wound healing. **OBJECTIVE:** To investigate the mechanism of lycium barbarum polysaccharide in tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated keratinocyte apoptosis and its effect on the healing of burn wounds. **METHODS:** (1) *In vitro* experiment: Keratinocytes were divided into four groups: cells were cultured in the  $\alpha$ -MEM medium (complete medium) containing 15% fetal bovine serum and 1% glutamine in normal group, cultured in the complete medium containing lycium barbarum polysaccharide in positive control group, cultured in the complete medium containing tumor necrosis factor- $\alpha$  in model group, and cultured in the complete medium containing lycium barbarum polysaccharide and tumor necrosis factor- $\alpha$  in experimental group. After 24 hours of culture, cell proliferation was detected using cell counting kit-8 assay; Cleaved caspase-8, TNF R1, FADD, and LC3 were detected using western blot. Then an autophagy inhibitor group (the complete medium containing 3-methyladenine) and an autophagy inhibitor+lycium barbarum polysaccharide group (the complete medium containing lycium barbarum polysaccharide, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and 3-methyladenine) were set up. After 24 hours of culture, keratinocyte apoptosis was detected by flow cytometry. (2) *In vivo* experiment: Six Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group and an experimental group, with three rats in each group. Four deep II degree burn wounds with a diameter of 2 cm were made on the back of each rat. At 24 hours after modeling, mice in the control and experimental groups were coated with normal saline and lycium barbarum polysaccharide solution, respectively, once a day. Wound healing was observed regularly after treatment. Samples were taken 28 days after treatment and the pathologic pattern of the wound was observed. **RESULTS AND CONCLUSION:** (1) *In vitro* experiment: Addition of lycium barbarum polysaccharide alone did not affect cell proliferation and apoptosis and the expression of apoptotic and autophagic proteins in keratinocytes. After the addition of tumor necrosis factor  $\alpha$ , the proliferation of keratinocytes was inhibited, the apoptotic rate increased, and the expression of apoptotic and autophagic proteins was elevated, while lycium barbarum polysaccharide could antagonize the above effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . Lycium barbarum polysaccharide combined with autophagy inhibitors further reduced the apoptotic rate of keratinocytes. (2) *In vivo* experiment: The wound healing rate of rats in the experimental group was higher than that of the control group at 12, 16, 20, 24, and 28 days after treatment ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Hematoxylin-eosin staining results at 28 days after treatment showed an intact and well-defined epidermis of the wound in the experimental group compared with the control group. To conclude, lycium barbarum polysaccharide protects the integrity of skin epidermal tissue and promotes wound healing by inhibiting autophagy and apoptosis of keratinocytes.

**Key words:** keratinocyte; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; lycium barbarum polysaccharide; apoptosis; autophagy; wound healing

**Funding:** Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region, No. 2020AAC03412 (to ZD)

**How to cite this article:** ZHU YZ, FANG C, ZHAO F, ZHANG Q, ZHAO D. Mechanism by which lycium barbarum polysaccharides inhibit keratinocyte apoptosis in burn wounds via autophagy. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(23):3686-3691.

## 0 引言 Introduction

烧伤是指由火焰热液等物质引起的组织损害,是最广泛的软组织损伤形式<sup>[1]</sup>,严重烧伤不仅会导致瘢痕性毁容及功能障碍,而且还造成长期的躯体后遗症,给患者造成重大的经济负担和心理影响<sup>[1-2]</sup>。目前,促进烧伤创面修复的技术有自体皮片覆盖技术、异体真皮覆盖技术、表皮生长因子及干细胞应用技术等,此类方法都着力于促进皮肤细胞的增殖、分化,直至创面愈合<sup>[3-7]</sup>。角质细胞是角质层呈终末分化的角质形成细胞,皮肤角质层主要由角质细胞构成,具有阻止物理和机械外力损伤表皮、有效阻止水分扩散和丢失等功能<sup>[8-11]</sup>。烧伤后,体表皮肤角质细胞受损,在创面修复过程中,角质细胞重新经过增殖、迁移、分化形成新的上皮,直至创面愈合<sup>[12-14]</sup>。

枸杞为一种名贵的中药,因其在不同的细胞类型中具有抗衰老和保护作用,近年来引起了国内外科研工作者的广泛关注<sup>[15-19]</sup>。枸杞多糖是枸杞中生物活性最强的部分,CHEN等<sup>[16]</sup>发现枸杞多糖对紫外线诱导的角质细胞光损伤具有保护作用;此外有报道发现,枸杞多糖能够保护肝脏细胞、肺内皮细胞、海马神经元等多种组织免受各种毒性<sup>[20-22]</sup>,但其在炎症环境下对创面的修复作用及机制尚无相关报道。此次研究主要观察枸杞多糖修复烧伤创面的效果及机制。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 体外细胞实验,体内动物实验,多组间比较采用方差分析,两组间比较使用配对  $t$  检验。

**1.2 时间及地点** 实验于 2022 年 2 月至 2023 年 4 月在宁夏医科大学总医院外科学研究室与宁夏医科大学实验动物中心完成。

### 1.3 材料

**1.3.1 主要材料** 角质细胞购自于中国细胞库;谷氨酰胺、 $\alpha$ -MEM 培养基、胎牛血清购自于赛默飞世尔科技有限公司;枸杞多糖购自宝鸡辰光生物技术有限公司;肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、3-甲基腺嘌呤、Cleaved caspase-8、FADD、 $\beta$ -Tubulin、TNF R1、LC3 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白含量检测试剂盒购自江苏凯基生物技术有限公司;CCK-8 购自碧云天生物技术有限公司;AV-PI 试剂盒购自兰杰柯科技有限公司;戊巴比妥钠购自国药集团化学试剂有限公司。

**1.3.2 实验动物** 选取雌性 SD 大鼠 7 只,六七月龄,体质量 250–350 g,购自宁夏医科大学总医院实验动物中心,许可证号:SCXK(宁)2020-0001。动物实验获宁夏医科大学总医院科研伦理委员会批准;批准号为 2020-114。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 体外实验

**角质细胞培养:** 加入含体积分数 15% 胎牛血清及 1% 谷氨酰胺的  $\alpha$ -MEM 培养基(完全培养基),置于 37 °C、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。

**CCK-8 法检测角质细胞增殖:** 将角质细胞以  $1 \times 10^3$ /孔的密度种到 96 孔板中,分 4 组培养:正常组加入完全培养基,阳性对照组加入含 100  $\mu$ g/mL 枸杞多糖的完全培养基,模型组加入含 10 ng/mL 肿瘤坏死因子  $\alpha$  的完全培养基<sup>[23]</sup>,实验组加入含 100  $\mu$ g/mL 枸杞多糖与 10 ng/mL 肿瘤坏死因子  $\alpha$  的完全培养基,置于 37 °C、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。培养 24 h 后,向每个孔中加入 CCK-8 溶液(50  $\mu$ L)继续孵育 1 h,利用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度值。每组实验重复 3 次。

**Western blot 检测相关蛋白表达:** 实验分组及干预同细胞增殖检测。培养 24 h 后, 利用 Western blot 检测凋亡蛋白 Cleaved caspase-8、TNF R1、FADD 及自噬蛋白 LC3 的表达。用全蛋白提取试剂盒提取蛋白, 用 BCA 蛋白含量检测试剂盒检测并计算蛋白浓度。随后, 在 12%SDS-PAGE 凝胶上分离, 然后转移到聚偏二氟乙烯膜上后封闭。将膜与 Cleaved caspase-8、TNF R1、FADD、 $\beta$ -Tubulin、LC3 抗体 (稀释比均为 1 : 1 000) 在 4  $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜。将膜与相应的二抗孵育 1 h, 使用多功能成像仪曝光 (Amersham Imager 680), 采用 Image-J 软件对 Western blot 数据进行分析。

**流式细胞术检测角质细胞凋亡:** ①实验分组及干预同细胞增殖检测, 培养 24 h 后, 采用流式细胞术检测细胞凋亡。②将角质细胞以  $1 \times 10^3$ /孔的密度种到 96 孔板中, 分 5 组培养: 正常组加入完全培养基, 模型组加入含 10 ng/mL 肿瘤坏死因子  $\alpha$  的完全培养基, 实验组加入含 100  $\mu$ g/mL 枸杞多糖与 10 ng/mL 肿瘤坏死因子  $\alpha$  的完全培养基, 自噬抑制剂组 (加入含 5 mmol/L 3-甲基腺嘌呤的完全培养基)、自噬抑制剂 + 枸杞多糖组 (加入含 100  $\mu$ g/mL 枸杞多糖、10 ng/mL 肿瘤坏死因子  $\alpha$  与 5 mmol/L 3-甲基腺嘌呤的完全培养基), 置于 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。培养 24 h 后, 收集角质细胞。按照厂家说明书使用 Annexin V/PI 凋亡分析试剂盒进行染色, 利用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

#### 1.4.2 体内实验

**建立深 II 度烧伤创面模型** [24]: 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (100 mg/kg) 麻醉 7 只 SD 大鼠, 将加热棒 (直径 2 cm、高 3 cm、质量 200 g) 的温度加热至 100  $^{\circ}$ C, 敷在背部皮肤上 6 s, 产生深 II 度烧伤创面, 每只大鼠制作 4 个深 II 度烧伤创面, 创面之间间隔 3 cm (图 1)。为了保证创面的一致性, 由一人操作所有创面。造模 24 h 后取 1 只大鼠, 麻醉后处死, 取烧伤创面中间及未烧伤部位皮肤组织, 浸泡在甲醛中, 进行苏木精-伊红染色证实造模成功。随后采用随机数字表法将剩余的 6 只大鼠分为对照组与实验组, 每组 3 只, 对照组大鼠创面涂抹生理盐水, 实验组大鼠创面涂抹枸杞多糖溶液 (100 mg/mL, 溶剂为角质细胞培养液), 1 次/d, 使用纱布覆盖、弹力绷带围绕固定。

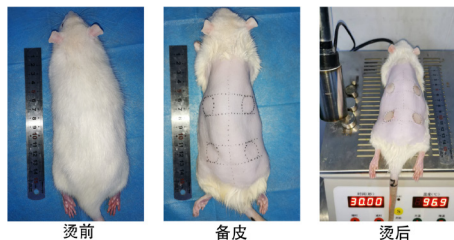


图 1 | SD 大鼠背部深 II 度烧伤创面模型的建立  
Figure 1 | Establishment of deep II degree back burn wound model on the back of Sprague-Dawley rats

**创面愈合情况观察:** 治疗后 4, 8, 12, 16, 20, 24 d, 观察大鼠进食及活动是否正常、创面面积是否减小, 并对创面进行拍照, 使用 Image-J 软件测量创面面积, 计算创面愈合率。

**创面病理形态观察:** 治疗后 28 d, 麻醉后处死大鼠, 切取创面组织, 使用体积分数 10% 缓冲中性甲醛液固定 48 h,

脱水后使用石蜡包埋、切片, 染色前将蜡块进行脱蜡和水化, 使用苏木精染色 4-6 min, 温水返蓝 1 min 左右, 使用伊红染色 30 s-1 min 后, 水洗、脱水, 最后使用中性树胶封固, 显微镜下观察。

**1.5 主要观察指标** 体外细胞实验与体内动物实验结果。

**1.6 统计学分析** 使用 SPSSAU 18 软件进行统计分析, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较使用配对  $t$  检验, 当  $P < 0.05$  时差异有显著性意义。文章统计学方法已经由宁夏医科大学总医院赵芳审核。

## 2 结果 Results

### 2.1 体外实验结果

**2.1.1 各组角质细胞增殖情况** CCK-8 检测结果显示, 与正常组 (100%) 比较, 阳性对照组细胞存活率无明显变化 [(104.60 $\pm$ 3.25)%,  $P > 0.05$ ], 模型组细胞存活率明显降低 [(41.42 $\pm$ 2.90)%,  $P < 0.01$ ]; 与模型组比较, 实验组细胞存活率升高 [(70.61 $\pm$ 4.12)%,  $P < 0.01$ ], 见图 2, 说明枸杞多糖能够保护角质细胞, 减少肿瘤坏死因子  $\alpha$  对角质细胞增殖的抑制作用。

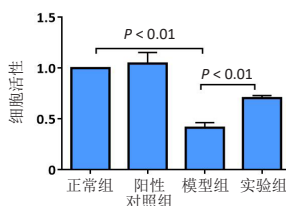


图 2 | 各组角质细胞存活率的比较  
Figure 2 | Cell viability of keratinocytes

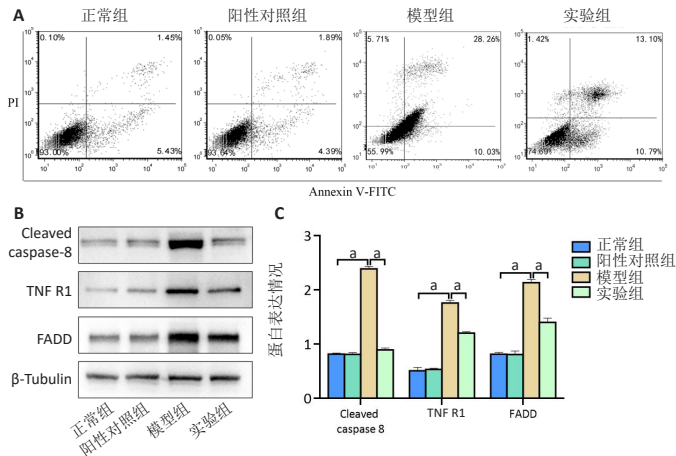
**2.1.2 各组角质细胞凋亡情况** 流式细胞术检测结果显示, 正常组、阳性对照组、模型组与实验组的细胞凋亡率分别为 (6.87 $\pm$ 0.27)%, (6.25 $\pm$ 0.32)%, (38.50 $\pm$ 0.16)%, (23.89 $\pm$ 0.23)%, 见图 3A。与正常组相比, 肿瘤坏死因子  $\alpha$  干预的角质细胞发生明显凋亡 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 实验组细胞凋亡率明显降低 ( $P < 0.05$ )。

为了进一步确认枸杞多糖能够抑制肿瘤坏死因子  $\alpha$  介导角质细胞的凋亡作用, 利用 Western blot 检测细胞凋亡蛋白 Cleaved caspase-8、TNF R1、FADD 的蛋白水平, 结果见图 3B、C。与正常组比较, 阳性对照组细胞内 Cleaved caspase-8、TNF R1、FADD 的蛋白表达均无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 模型组细胞内 Cleaved caspase-8、TNF R1、FADD 的蛋白表达均升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 实验组细胞内 Cleaved caspase-8、TNF R1、FADD 的蛋白表达均降低 ( $P < 0.01$ )。

为了进一步确认枸杞多糖通过抑制自噬保护炎症微环境下角质细胞凋亡, 利用 Western blot 检测自噬蛋白 LC3 的表达水平, 结果见图 4。与正常组比较, 阳性对照组细胞内 LC3 的蛋白表达均无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 模型组细胞内 LC3 的蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 实验组细胞内 LC3 的蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ )。

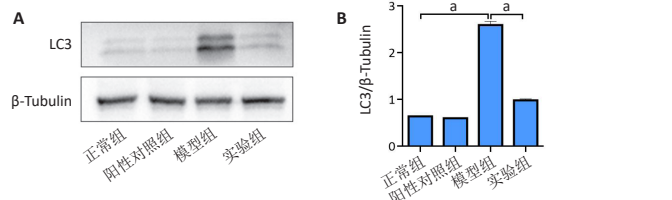
为了进一步确定自噬在角质细胞凋亡中的作用, 使用自噬抑制剂进行干预, 利用流式细胞术检测细胞凋亡情况。





图注: A 为流式细胞术检测角质细胞凋亡水平; B 为 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达水平; C 为凋亡相关蛋白水平的半定量分析,  $^aP < 0.01$

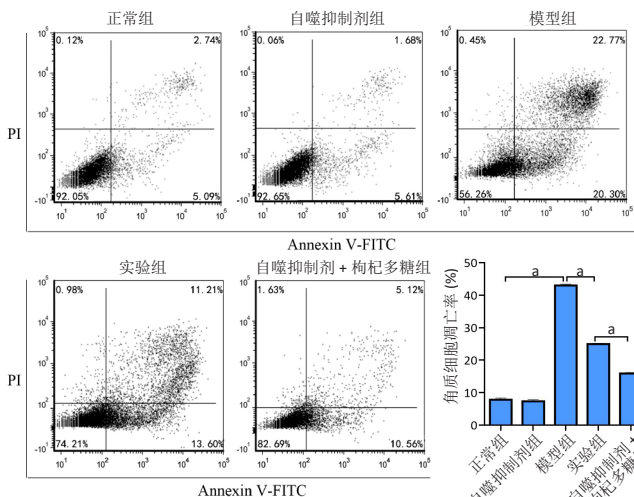
Figure 3 | The level of keratinocyte apoptosis



图注: A 为 Western blot 检测角质细胞内 LC3 蛋白表达水平; B 为 LC3 蛋白水平的半定量分析,  $^aP < 0.01$

Figure 4 | Expression of autophagy protein LC3 in keratinocytes

流式细胞术检测结果显示, 正常组、自噬抑制剂组、模型组、实验组、自噬抑制剂 + 枸杞多糖组的细胞凋亡率分别为  $(7.83 \pm 0.29)\%$ ,  $(7.33 \pm 0.28)\%$ ,  $(43.00 \pm 0.24)\%$ ,  $(24.96 \pm 0.12)\%$ ,  $(15.90 \pm 0.19)\%$ , 见图 5。与正常组比较, 自噬抑制剂组细胞凋亡率无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 模型组细胞凋亡率升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 实验组细胞凋亡率降低 ( $P < 0.01$ ); 与实验组比较, 自噬抑制剂 + 枸杞多糖组细胞凋亡率降低 ( $P < 0.01$ )。



图注:  $^aP < 0.01$

Figure 5 | Flow cytometry detection of the effect of autophagy on apoptosis induced by lycium barbarum polysaccharide

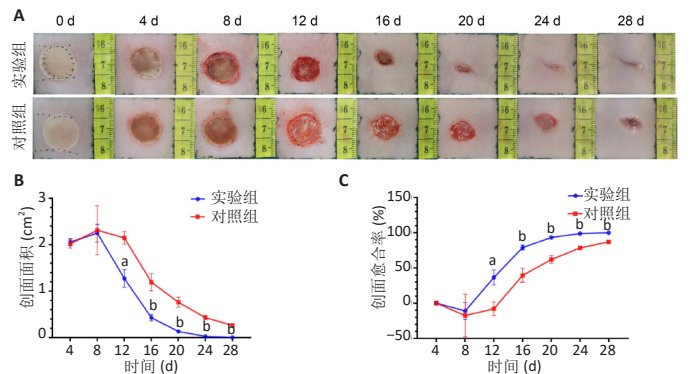
综上所述, 枸杞多糖能够抑制肿瘤坏死因子  $\alpha$  介导的

角质细胞自噬。

## 2.2 体内实验结果

2.2.1 实验动物数量分析 对照组 3 只与实验组 3 只大鼠全部进入结果分析。

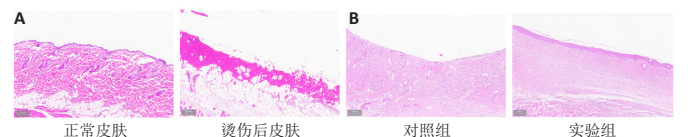
2.2.2 两组大鼠创面愈合率比较 随着治疗时间的延长, 两组大鼠创面面积缩小, 创面愈合率升高; 与对照组相比, 实验组治疗后 12, 16, 20, 24, 28 d 时的创面面积缩小明显 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 创面愈合率升高明显 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 6。



图注: A 为两组大鼠创面大体观察图片; B 为两组大鼠创面面积; C 为两组大鼠创面愈合率。与对照组比较,  $^aP < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$

Figure 6 | Healing of burn wounds in rats at different time points after treatment

2.2.3 两组大鼠创面病理形态观察 造模后 24 h 的苏木精 - 伊红染色显示, 正常皮肤组织完整、形态正常; 烧伤后的皮肤表皮坏死、真皮层组织受损, 提示造模成功 (图 7A)。治疗后 28 d 的苏木精 - 伊红染色显示, 与对照组相比, 实验组大鼠创面表皮完整、清晰 (图 7B)。



图注: A 为造模后 24 h 的创面病理形态, 烧伤后的皮肤表皮坏死、真皮层组织受损; B 为治疗后 28 d 的创面病理形态, 与对照组相比, 实验组大鼠创面表皮完整。标尺为 200  $\mu$ m

Figure 7 | Pathological observation of burn wounds in rats at 24 hours after modeling and 28 days after treatment (hematoxylin-eosin staining)

## 3 讨论 Discussion

细胞凋亡是烧伤创面进展的促成因素之一, 抑制细胞凋亡减少持续的组织损失能够促进烧伤创面愈合 [24-26]。研究表明, 由于体表皮肤角质细胞损伤, 烧伤患者创面浸润大量肿瘤坏死因子  $\alpha$  等炎性因子, 导致细胞活力显著下降 [27]。因此, 此次研究利用 AV/PI 细胞流式法和 Western blot 检测了细胞凋亡相关蛋白表达, 结果显示, 当使用枸杞多糖处理角质细胞时, 凋亡蛋白减少、细胞凋亡减弱。有意思的是, 结果显

示单独使用枸杞多糖对细胞凋亡并无明显变化,表明枸杞多糖并不能直接影响角质细胞的凋亡,而是对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 介导的细胞凋亡具有抑制作用。可以推测,在创面愈合过程中枸杞多糖能够抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的角质细胞凋亡。

肿瘤坏死因子 $\alpha$ 同时参与细胞的凋亡与自噬,且自噬在细胞存活和细胞死亡中起着双重作用<sup>[28-29]</sup>。CAO等<sup>[29]</sup>发现异常的自噬能够促进神经元凋亡级联反应的激活,且可以通过3-甲基腺嘌呤等自噬抑制剂缓解。然而,YOUNG等<sup>[30]</sup>发现自噬通过抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的细胞凋亡来保护肿瘤免受T细胞介导的细胞毒性。为此,此次研究通过探究枸杞多糖对角质细胞自噬的影响,从而探究其抑制角质细胞凋亡的作用机制,研究结果显示:在肿瘤坏死因子 $\alpha$ 模拟的炎性微环境中,角质细胞内自噬蛋白LC3的蛋白表达显著升高,并伴随凋亡信号Cleaved caspase-8和FADD蛋白表达的升高,表明自噬诱导的细胞凋亡导致了角质细胞损伤;枸杞多糖介入后,细胞自噬和凋亡蛋白同时减弱。为了证实自噬在细胞凋亡中的作用,此次研究使用3-甲基腺嘌呤抑制自噬,流式细胞术检测结果显示,与正常组相比,3-甲基腺嘌呤可有效抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 介导的细胞凋亡。这些结果表明自噬参与了肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的角质细胞凋亡,并且枸杞多糖通过抑制自噬有效减弱角质细胞的凋亡。此外有文献报道,在槟榔碱诱导的口腔黏膜细胞凋亡模型中,自噬能够促进细胞凋亡,与此次研究结果一致<sup>[31-32]</sup>。

最后,此次研究建立了SD大鼠深II度烧伤模型,以确定枸杞多糖促进创面愈合的能力。深II度烧伤是指烧伤深度累及皮肤表皮及真皮乳头层以下的损伤,苏木精-伊红染色结果证实此次研究烧伤模型构建成功。此次研究证实,使用枸杞多糖溶液涂抹创面后,创面的愈合速度和效率明显高于对照组,且在28d时创面完全愈合,此时对照组的创面还未愈合。

虽然,此次研究发现枸杞多糖在炎性环境下具有促进创面愈合的作用,并揭示了肿瘤坏死因子 $\alpha$ 介导的角质细胞自噬和凋亡过程参与了创面愈合的作用机制,但该研究仍存在一些局限性。大量证据已经证实,自噬并不一定能保护细胞,相反,它可能会产生负面影响并诱导细胞凋亡<sup>[33]</sup>。此次研究发现,枸杞多糖能够抑制自噬标志物LC3的形成和凋亡受体Caspase-8、TNF R1、FADD的蛋白水平,这提示枸杞多糖可能参与了肿瘤坏死因子 $\alpha$ 介导的角质细胞自噬与凋亡相互作用。外在途径诱导的细胞凋亡由肿瘤坏死因子受体家族成员跨膜死亡受体触发,肿瘤坏死因子 $\alpha$ 与TNF R1结合后,FADD将被募集并与配体-受体复合物结合,激活Caspase-8启动细胞凋亡级联反应<sup>[34-35]</sup>。同时,肿瘤坏死因子 $\alpha$ 可以通过激活核因子 $\kappa$ B-mTOR通路依赖性Beclin 1过表达促进细胞自噬<sup>[28, 36]</sup>。已有文献报道,高级氧化蛋白产物通过mTOR-Beclin-1通路诱导细胞自噬介导的人角质形成细胞凋亡<sup>[37]</sup>。作者推测枸杞多糖可能通过抑制角质细胞的凋亡和自噬来促进创面愈合。此外,烧伤可引起不同程度的内质网

应激,引起活性氧生成,长时间不缓解则会导致细胞凋亡<sup>[38]</sup>。FERNANDO等<sup>[39]</sup>报道,橙皮苷通过抑制氧化应激和自噬保护角质细胞免受颗粒物2.5诱导的细胞凋亡。枸杞多糖通过调节氧化应激保护皮肤细胞免受毒性作用。IRE1-JNK-Hog1和CHOP-钙-钙蛋白酶信号通路是参与细胞凋亡和自噬过程的共同信号通路,在氧化应激下,内质网应激可通过caspase-2/12和IRE1 $\alpha$ -JNK/p38-p53-PUMA途径导致自噬和细胞凋亡<sup>[28, 40]</sup>。此次研究结果显示,枸杞多糖可能通过调节内质网应激作用调节角质细胞自噬和凋亡、促进创面愈合。接下来的工作将利用代谢组学和蛋白质组学技术,进一步探究枸杞多糖在肿瘤坏死因子 $\alpha$ 介导的角质细胞凋亡和自噬中的作用机制。

综上所述,枸杞多糖可以抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 介导的角质细胞的自噬,并减少角质细胞凋亡,有效保护皮肤表皮组织的完整性。此次研究证实,枸杞多糖能够加快烧伤创面的愈合时间和效率、促进创面愈合,为临床治疗烧伤创面的药物开发提供基础理论依据。

**作者贡献:** 朱永朝、赵丹进行实验设计,实验实施为朱永朝、赵丹、房超,实验评估为赵芳、张庆,资料收集为房超,房超成文,朱永朝、赵丹审核。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

## 4 参考文献 References

- [1] 陈孝平,汪建平. 外科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013.
- [2] ORYAN A, ALEMZADEH E, MOSHIRI A. Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. J Wound Care. 2017;26(1):5-19.
- [3] SARKOZYOVA N, DRAGUNOVA J, BUKOVCAN P, et al. Preparation and processing of human allogenic dermal matrix for utilization in reconstructive surgical procedures. Bratisl Lek Listy. 2020;121(6):386-394.
- [4] SHAKHAKARMI K, SEO JE, LAMICHHANE S, et al. EGF, a veteran of wound healing: highlights on its mode of action, clinical applications with focus on wound treatment, and recent drug delivery strategies. Arch Pharm Res. 2023;46(4):299-322.
- [5] JING S, LI H, XU H. Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Therapy in Diabetic Wound Repair. Int J Nanomedicine. 2023;18:2707-2720.
- [6] ZHAO D, XIAO J, QIANG L, et al. Walnut ointment promotes full-thickness burning wound healing: role of linoleic acid. Acta Cir Bras. 2022;37(9):e370902.
- [7] LIU J. A new way of repairing special wounds. Heliyon. 2023;9(5):e15755.

- [8] MARKS R. Seeing through the stratum corneum. *Keio J Med.* 2000; 49(2):80-83.
- [9] NORLÉN L. Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J Invest Dermatol.* 2001;117(4):830-836.
- [10] VOEGELI R, RAWLINGS AV, BRETERNITZ M, et al. Increased stratum corneum serine protease activity in acute eczematous atopic skin. *Br J Dermatol.* 2009;161(1):70-77.
- [11] FOLDVARI M, KUMAR P, KING M, et al. Gene delivery into human skin in vitro using biphasic lipid vesicles. *Curr Drug Deliv.* 2006;3(1):89-93.
- [12] HORVÁTH D, SIPOS A, MAJOR E, et al. Myosin phosphatase accelerates cutaneous wound healing by regulating migration and differentiation of epidermal keratinocytes via Akt signaling pathway in human and murine skin. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(10): 3268-3280.
- [13] MORIYAMA M, MORIYAMA H, UDA J, et al. Beneficial Effects of the Genus Aloe on Wound Healing, Cell Proliferation, and Differentiation of Epidermal Keratinocytes. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164799.
- [14] GRIEB G. Basic and Clinical Research in Wound Healing. *Biomedicines.* 2023;11(5):1380.
- [15] YU MS, LEUNG SK, LAI SW, et al. Neuroprotective effects of anti-aging oriental medicine Lycium barbarum against beta-amyloid peptide neurotoxicity. *Exp Gerontol.* 2005;40(8-9):716-727.
- [16] CHEN L, LI W, QI D, et al. Lycium barbarum polysaccharide protects against LPS-induced ARDS by inhibiting apoptosis, oxidative stress, and inflammation in pulmonary endothelial cells. *Free Radic Res.* 2018;52(4):480-490.
- [17] ZHANG M, TANG X, WANG F, et al. Characterization of Lycium barbarum polysaccharide and its effect on human hepatoma cells. *Int J Biol Macromol.* 2013;61:270-275.
- [18] NIU Y, ZHANG G, SUN X, et al. Distinct Role of Lycium barbarum L. Polysaccharides in Oxidative Stress-Related Ocular Diseases. *Pharmaceutics (Basel).* 2023;16(2):215.
- [19] RAJKOWSKA K, OTLEWSKA A, BRONCEL N, et al. Microbial Diversity and Bioactive Compounds in Dried Lycium barbarum Fruits (Goji): A Comparative Study. *Molecules.* 2023;28(10):4058.
- [20] LI H, LI Z, PENG L, et al. Lycium barbarum polysaccharide protects human keratinocytes against UVB-induced photo-damage. *Free Radic Res.* 2017;51(2):200-210.
- [21] XIAO J, LIONG EC, CHING YP, et al. Lycium barbarum polysaccharides protect rat liver from non-alcoholic steatohepatitis-induced injury. *Nutr Diabetes.* 2013;3(7):e81.
- [22] LAM CS, TIPOE GL, SO KF, et al. Neuroprotective mechanism of Lycium barbarum polysaccharides against hippocampal-dependent spatial memory deficits in a rat model of obstructive sleep apnea. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117990.
- [23] LENG H, PU L, XU L, et al. Effects of aloe polysaccharide, a polysaccharide extracted from Aloe vera, on TNF- $\alpha$ -induced HaCaT cell proliferation and the underlying mechanism in psoriasis. *Mol Med Rep.* 2018;18(3):3537-3543.
- [24] XIAO M, LI L, LI C, et al. Role of autophagy and apoptosis in wound tissue of deep second-degree burn in rats. *Acad Emerg Med.* 2014; 21(4):383-391.
- [25] SINSUEBPOL C, BURAPAPADH K, CHOWJAROEN V, et al. The radical scavenging activity of vanillin and its impact on the healing properties of wounds. *J Adv Pharm Technol Res.* 2023;14(2):99-104.
- [26] GALLEGOS-ALCALÁ P, JIMÉNEZ M, CERVANTES-GARCÍA D, et al. Glycomacropeptide Protects against Inflammation and Oxidative Stress, and Promotes Wound Healing in an Atopic Dermatitis Model of Human Keratinocytes. *Foods.* 2023;12(10):1932.
- [27] WOO YK, PARK J, RYU JH, et al. The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of advanced anti-inflammation composition (AAIC) in heat shock-induced human HaCaT keratinocytes. *J Cosmet Dermatol.* 2020;19(8):2114-2124.
- [28] DONG Y, CHEN H, GAO J, et al. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2019;136:27-41.
- [29] CAO Y, LI Q, LIU L, et al. Modafinil protects hippocampal neurons by suppressing excessive autophagy and apoptosis in mice with sleep deprivation. *Br J Pharmacol.* 2019;176(9):1282-1297.
- [30] YOUNG TM, REYES C, PASNIKOWSKI E, et al. Autophagy protects tumors from T cell-mediated cytotoxicity via inhibition of TNF $\alpha$ -induced apoptosis. *Sci Immunol.* 2020;5(54):eabb9561.
- [31] ZHU B, JIANG Q, QUE G, et al. Role of autophagy and apoptosis in atrophic epithelium in oral submucous fibrosis. *J Oral Sci.* 2020;62(2): 184-188.
- [32] ZHANG P, WANG H, CHEN Y, et al. DR5 related autophagy can promote apoptosis in gliomas after irradiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;522(4):910-916.
- [33] ZHU S, LI X, DANG B, et al. Lycium Barbarum polysaccharide protects HaCaT cells from PM2.5-induced apoptosis via inhibiting oxidative stress, ER stress and autophagy. *Redox Rep.* 2022;27(1):32-44.
- [34] WAJANT H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science.* 2002;296(5573):1635-1636.
- [35] KISCHKE FC, HELLBARDT S, BEHRMANN I, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995;14(22):5579-5588.
- [36] DJAVAHERI-MERGNY M, AMELOTTI M, MATHIEU J, et al. NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem.* 2006;281(41):30373-30382.
- [37] DING R, LIU Z, TAN J, et al. Advanced oxidation protein products mediate human keratinocytes apoptosis by inducing cell autophagy through the mTOR-Beclin-1 pathway. *Cell Biochem Funct.* 2022;40(8): 880-887.
- [38] TANG SC, KO JL, LU CT, et al. Chloroquine alleviates the heat-induced to injure via autophagy and apoptosis mechanisms in skin cell and mouse models. *PLoS One.* 2022;17(8):e0272797.
- [39] FERNANDO PDSM, PIAO MJ, KANG KA, et al. Hesperidin Protects Human HaCaT Keratinocytes from Particulate Matter 2.5-Induced Apoptosis via the Inhibition of Oxidative Stress and Autophagy. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(7):1363.
- [40] YOUNCE CW, KOLATTUKUDY PE. MCP-1 causes cardiomyoblast death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCPIP. *Biochem J.* 2010;426(1):43-53.

(责任编辑: WL, GW, ZN, LWJ)