

复合铁皮石斛多糖的胶原/壳聚糖支架对脊髓损伤大鼠的修复作用

梅 赞¹, 肖秀平², 武焕颖¹, 杜英杰³, 曹定岩^{1*}
(1. 承德市中心医院神经外科, 河北 承德 067000; 2. 承德市中心医院老年病科, 河北 承德 067000; 3. 承德医学院中医学院, 河北 承德 067000)

摘要: **目的** 观察胶原/壳聚糖/铁皮石斛多糖支架对脊髓损伤大鼠的修复作用。**方法** 体外实验采用不同质量浓度铁皮石斛多糖干预骨髓间充质干细胞, CCK-8 法检测细胞增殖情况; 在神经分化诱导的基础上, 以不同质量浓度铁皮石斛多糖干预骨髓间充质干细胞, RT-qPCR 法检测神经元分化相关基因的表达, 同时进行吉姆萨染色与免疫荧光染色。体内实验将 48 只大鼠随机分为假手术组、模型组、胶原/壳聚糖支架组、铁皮石斛多糖支架组, 每组 12 只, 术后 12 周, 评估大鼠后肢运动功能, 对脊髓损伤区进行 HE 染色、免疫组化染色。**结果** 一定质量浓度范围内的铁皮石斛多糖可促进骨髓间充质干细胞的增殖, 促进神经元分化相关基因 *Nestin*、*MAP-2*、*NSE* mRNA 表达, 抑制 *GFAP* mRNA 表达; 细胞染色进一步证实铁皮石斛多糖可促进骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞。与胶原/壳聚糖支架比较, 胶原/壳聚糖/铁皮石斛多糖支架可进一步恢复脊髓损伤大鼠的后肢运动功能, 缩小脊髓损伤空洞面积, 增加神经元、神经纤维数量, 抑制胶质瘢痕增生。**结论** 复合铁皮石斛多糖的胶原/壳聚糖支架可通过促进神经元的再生、神经的再髓鞘化和轴突的生长, 抑制星形胶质细胞瘢痕的产生, 促进脊髓损伤后大鼠运动功能的恢复。

关键词: 铁皮石斛; 壳聚糖支架; 脊髓损伤; 神经元再生; 神经再髓鞘化; 轴突生长

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)08-2742-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.08.050

脊髓损伤是一种致残率极高的中枢神经系统损伤, 目前尚缺乏非常有效的治疗方法, 如何采用干预措施促使缺损的神经元和轴突再生, 并恢复功能性轴突的传导能力是脊髓损伤治疗的热点。近年来迅速发展的组织工程技术为脊髓损伤的治疗提供新的思路。

组织工程中的支架不仅可以桥接脊髓损伤部位两侧的残端, 还可以作为运送细胞、生物活性分子与药物的载体, 可为干细胞提供一个三维的空间, 促进其在体内的粘附、迁移和分化^[1-4]。大量动物实验已证实, 使用以生物材料为基础的支架可以一定程度上实现神经轴突及神经元的再生^[5-8]。壳聚糖具有无毒性、成本低廉、易于加工与良好的机械性能等优点, 有利于中枢神经细胞和轴突的依附, 有利于刺激神经细胞合成分泌生长因子及营养因子等, 将其与胶原蛋白交联可提高支架的机械强度, 同时解决其自身降解过慢的不足, 是较为理想的组织工程支架^[9-11]。

铁皮石斛自古以来就有“药中黄金”“救命仙草”“中华仙草”的美称^[12], 其主要药效成分为铁皮石斛多糖, 具有增强免疫、抗氧化、抗衰老、抗感染、抗肿瘤、降血糖等广泛的生物学活性。沈鸿涛等^[13]研究证实, 铁皮石斛多糖可抑制肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 引发的小鼠海马神经元细胞系 (HT22) 的凋亡; Feng 等^[14]研究表明, 铁皮石斛多糖有可能通过调节小胶质细胞的激活对阿尔茨海默症

相关的认知障碍起到神经保护作用。以上研究显示, 铁皮石斛多糖具有神经保护作用, 但用于治疗脊髓损伤的报道不多见。本实验以胶原/壳聚糖支架为载体将铁皮石斛多糖应用于大鼠脊髓损伤部位, 观察其修复效果。

1 材料

1.1 细胞株 大鼠骨髓间充质干细胞, 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药物与试剂 铁皮石斛多糖 (货号 FY15925, 纯度 98%, 相对分子量 5.53×10^5 , 南通飞宇生物科技有限公司)。壳聚糖 (CAS 号 9012-76-4, 青岛博智汇力生物科技有限公司); CCK-8 试剂盒 (货号 CK04, 北京智杰方远科技有限公司); 胎牛血清、DMEM/F12 培养基 (货号 BC-SE-FBS07、BM022-10x1L, 南京生航生物技术有限公司); B27 细胞培养添加剂 (货号 17504-044, 上海恪敏生物科技有限公司); Prime ScriptTM RT-PCR 逆转录盒 (货号 K1691, 北京麦瑞博生物科技有限公司); 鼠抗 MAP-2 单抗、鼠抗 NeuN 单抗 (货号 AG2958、AG5317, 上海碧云天生物技术有限公司); 鼠抗 NF-H、鼠抗 GFAP (货号 RT1424、P14136, 南京莱富赛生物科技有限公司)。

1.3 动物 成年雄性 SD 大鼠 48 只, 体质量 (230.36 ± 16.39) g, SPF 级, 饲养于环境温度 24~26 ℃, 相对湿度 55%, 12 h/12 h 昼夜交替, 干燥通风的环境, 每隔 3 d 更

收稿日期: 2021-12-26

作者简介: 梅 赞 (1981—) 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为神经外科。Tel: 18830435938, E-mail: teti73@21cn.com

* 通信作者: 曹定岩 (1983—) 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为神经学。Tel: 13832495912, E-mail: bens211@126.com

换垫料以确保清洁。

2 方法

2.1 骨髓间充质干细胞增殖活性检测 将第 3 代骨髓间充质干细胞以每孔 1×10^4 个的密度接种于 96 孔板中，待细胞贴壁后，分别加入 10、25、50、75、100 mg/L 铁皮石斛多糖溶液，设置 6 个复孔，以未干预的细胞为阴性对照，并设置空白对照孔。干预 8 d 后，每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液继续培养 2 h，采用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值，绘制细胞生长曲线。

2.2 诱导骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化 取生长状态良好的第 3 代骨髓间充质干细胞，分组诱导，阳性对照组加入含 2% B27、20 μ g/L 碱性成纤维细胞生长因子、20 μ g/L 表皮生长因子的 DMEM/F12 培养基，阴性对照组加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基，实验组在阳性对

照组的基础上再加入 10、25、50、75、100 mg/L 铁皮石斛多糖溶液，每 3 d 换液 1 次。诱导培养 12 d 后，采用 RT-qPCR 法检测 *Nestin*、*MAP-2*、*GFAP*、*NSE* mRNA 表达。同时，吉姆萨染色后于倒置显微镜下观察细胞形态变化，利用免疫荧光染色技术检测神经分化相关标记物 MAP-2 与 NeuN 的表达。

2.3 RT-qPCR 法检测 *Nestin*、*MAP-2*、*GFAP*、*NSE* mRNA 表达 收集各组细胞，提取 RNA，检测 RNA 的浓度与纯度，利用 Prime ScriptTM RT-PCR 逆转录盒逆转录合成 cDNA，反应体积为 10 μ L。以逆转录所得 cDNA 作为模板，用不同引物序列进行扩增。PCR 扩增条件为 50 $^{\circ}$ C 2 min，95 $^{\circ}$ C 2 min，95 $^{\circ}$ C 15 s，95 $^{\circ}$ C 30 s，40 个循环。结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析，计算各组基因相对表达量。扩增引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	正向引物	反向引物
<i>Nestin</i>	5'-GGCCGTGCTGGTGGACTTAA-3'	5'-CCGACAAGCCAATGGAATAATG-3'
<i>MAP-2</i>	5'-GTCCTCGTTGTCGTGGTGAT-3'	5'-AAGGTAGCGATGGTGCTCTGC-3'
<i>GFAP</i>	5'-TCATGAGCTAGTCTGTGAGGT-3'	5'-AACCCTAAGGCCAACACTGAAAAAG-3'
<i>NSE</i>	5'-GGCACTGAAAAGCACCAAGG-3'	5'-CTGCTAGGAGGCAATGTCGG-3'
<i>GAPDH</i>	5'-AAAGAAAGGGTGTAACGCA-3'	5'-TCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3'

2.4 免疫荧光染色检测 MAP-2、NeuN 荧光表达 细胞按“2.2”项下方法诱导培养 12 d 后，将细胞接种于盖玻片上，弃培养基，PBS 清洗 3 次，置于 4% 多聚甲醛固定 30 min，0.1% TritonX-100 溶液处理 20 min，PBS 清洗 3 次，3% 过氧化氢处理 20 min，PBS 清洗 3 次，5% BSA 溶液封闭 1 h，PBS 清洗 3 次，分别置于鼠抗 MAP-2、NeuN 单抗溶液（1：20）中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，PBS 清洗 3 次，置于 PI、DAPI 溶液中染色，用鬼笔环肽对细胞骨架进行复染，PBS 清洗 3 次，于荧光显微镜下观察。

2.5 胶原/壳聚糖支架制备 参考文献 [10] 报道方法制备胶原/壳聚糖支架，剔除新鲜牛腱的外膜与周围结缔组织，充分研磨粉碎后置于 0.05 mol/L Tris 缓冲液中浸泡 12 h，高速离心后收集白色沉淀，加入含消化蛋白酶的醋酸溶液溶解沉淀，充分溶解后取上清液，利用盐析法析出沉淀物，去离子水充分清洗溶解后获得胶原蛋白凝胶。以醋酸溶液充分溶解壳聚糖粉末，将壳聚糖溶液与胶原蛋白凝胶以 1：3 比例混合，高速离心后去上清液，去离子水充分清洗，置于真空冷冻干燥机中干燥 24 h，1% NaOH 溶液浸泡 12 h，去离子水反复清洗，再次冻干后⁶⁰Co 灭菌，即得。

2.6 胶原/壳聚糖/铁皮石斛多糖支架制备 将胶原/壳聚糖支架置于 5 g/L 铁皮石斛多糖溶液中浸泡 1 h，然后于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻 4 h，最后真空冷冻干燥 24 h，即得。

2.7 脊髓损伤模型制备 大鼠腹腔注射 30 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉，背部备皮后俯卧位固定于手术台上，显露 T₉~T₁₁ 脊髓后切开硬脊膜，切除 0.2 cm 脊髓组织，制作完全脊髓横断伴部分缺损模型；假手术组（12 只）大鼠仅暴露脊髓，未给予脊髓损伤操作。将造模后的大鼠随机分为模型

组、胶原/壳聚糖支架组（脊髓损伤部位植入胶原/壳聚糖支架）、铁皮石斛多糖支架组（脊髓损伤部位植入胶原/壳聚糖/铁皮石斛多糖支架），每组 12 只，逐层缝合。等待动物苏醒，术后分笼饲养。

2.8 行为学评分 术后 12 周内，采用 BBB 评分^[15]评估大鼠的运动功能。将大鼠放入纸板试验箱内 4 min，轻敲板壁，使其自由爬行，观察损伤动物右后肢踝关节、膝关节、髌关节的活动范围和灵活程度，躯干运动及整体协调情况。所得评分越高说明大鼠运动功能恢复越好。

2.9 组织病理学观察 移植给药 12 周后，麻醉脱臼处死大鼠，心脏灌注后，以脊髓损伤点为中心截取 3 cm 长的脊髓组织，置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h，脱水后制备组织冰冻切片（10 μ m），HE 染色观察脊髓损伤区生长情况，每个样本观察 6 个视野。常温晾干切片，置于丙酮（-20 $^{\circ}$ C 预冷）中固定 6 min，PBS 清洗 3 次，于 3% 过氧化氢中 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min，PBS 清洗 4 次，于 50% 甲酰胺和 2 倍枸橼酸钠杂交液内 65 $^{\circ}$ C 处理 2 h，2 倍枸橼酸钠清洗 2 次，再用 PBS 清洗 2 次，加入 HCl 37 $^{\circ}$ C 处理 1 h，硼酸缓冲液清洗 2 次，再用 PBS 清洗 2 次，1% 牛血清蛋白 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min，分别滴加鼠抗 NeuN（1：200）、NF-H（1：300）、GFAP（1：300），37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后，4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜，次日 PBS 清洗 4 次，滴加生物素标记的兔抗鼠二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h，PBS 清洗 4 次，甘油封固后于显微镜下观察。利用 Image Pro Plus 6.0 软件分析图片的阳性细胞计数，实验均重复 3 次。

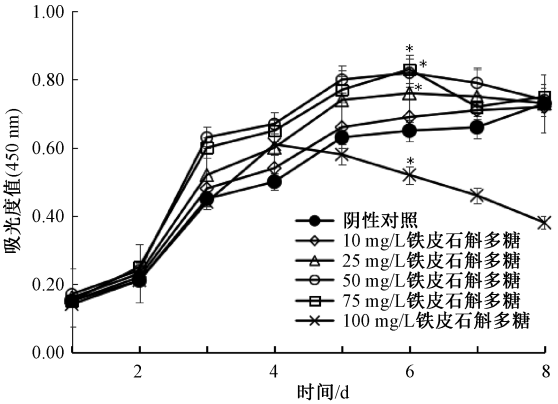
2.10 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理，结果以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步比

较采用 SNK-*q* 检验, 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 铁皮石斛多糖对骨髓间充质干细胞增殖活性的影响
阴性对照组与 10、25、50、75 mg/L 铁皮石斛多糖组细胞生长曲线基本呈“S”形, 第 1、2 天时细胞生长较缓慢, 处于生长潜伏期; 第 3 天起细胞进入快速增殖期, 在第 5、6 天时进入增殖平台期, 见图 1。100 mg/L 铁皮石斛多糖组细胞在第 1~5 天处于增殖期, 在第 6 天时呈现抑制增殖。根据细胞生长曲线可知, 25、50、75 mg/L 铁皮石斛多糖组第 6 天细胞增殖率高于阴性对照组 ($P<0.05$); 100 mg/L 铁皮石斛多糖组第 6 天细胞增殖率低于阴性对照组 ($P<0.05$); 10 mg/L 铁皮石斛多糖组第 6 天细胞增殖率与阴性对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

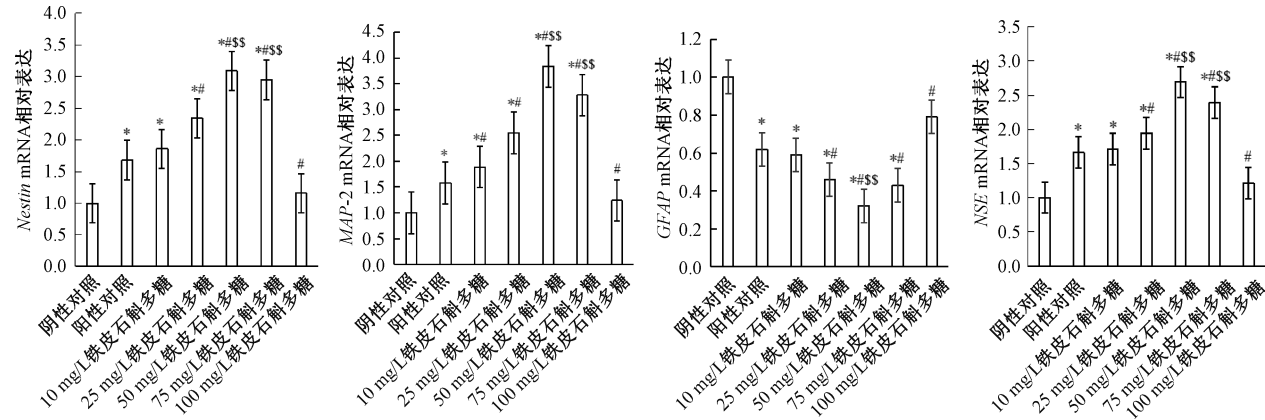
3.2 铁皮石斛多糖对骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化的影响
细胞诱导分化 12 d 后, 与阴性对照组比较, 阳性对照组 *Nestin*、*MAP-2*、*NSE* mRNA 表达升高 ($P<0.05$), *GFAP* mRNA 表达降低 ($P<0.05$); 与阳性对照组比较, 10~75 mg/L 铁皮石斛多糖组细胞 *Nestin*、*MAP-2*、*NSE*



注: 与阴性对照组比较, * $P<0.05$ 。

图 1 各组骨髓间充质干细胞的生长曲线 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

mRNA 表达升高 ($P<0.05$), *GFAP* mRNA 表达降低 ($P<0.05$), 其中以 50 mg/L 铁皮石斛多糖的效果最明显; 而 100 mg/L 铁皮石斛多糖组 *Nestin*、*MAP-2*、*NSE*、*GFAP* mRNA 表达与阴性对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 2。故后续实验选择 50 mg/L 剂量进行。



注: 与阴性对照组比较, * $P<0.05$; 与阳性对照组比较, # $P<0.05$; 与 25 mg/L 铁皮石斛多糖组比较, ** $P<0.01$ 。

图 2 各组骨髓间充质干细胞 *Nestin*、*MAP-2*、*NSE*、*GFAP* mRNA 表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

图 3A 显示, 阴性对照组细胞形态无明显变化; 而阳性对照组和铁皮石斛多糖组细胞出现明显的分支与轴突, 呈现典型的神经元样细胞形态。图 3B~3C 显示, 与阴性对照组比较, 阳性对照组和铁皮石斛多糖组细胞 *MAP-2* 与 *NeuN* 阳性表达升高 ($P<0.05$), 且铁皮石斛多糖组升高更明显 ($P<0.05$)。

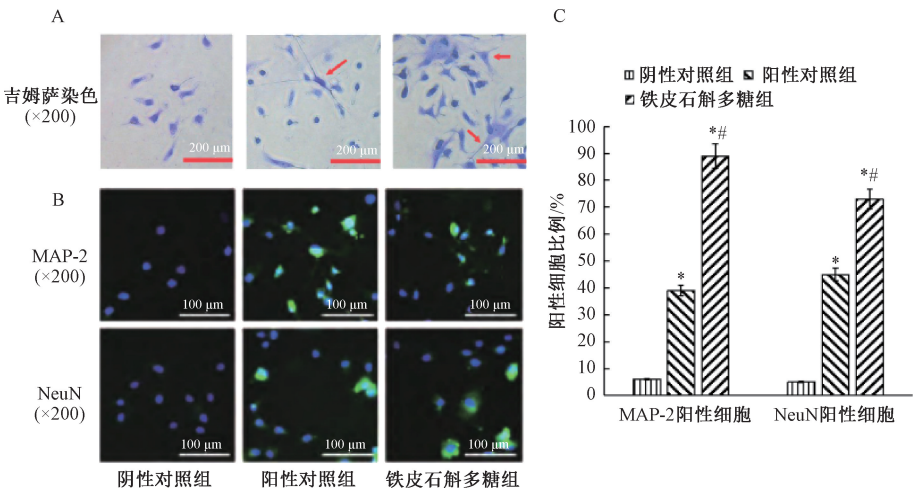
3.3 胶原/壳聚糖支架的微观形貌
扫描电镜下观察可见, 支架内部呈现疏松多孔结构, 孔隙较均匀, 孔与孔之间具有良好的连通性, 见图 4。

3.4 铁皮石斛多糖支架对脊髓损伤大鼠行为学评分的影响
图 5 显示, 与假手术组比较, 模型组和各给药组 BBB 评分降低 ($P<0.01$), 术后第 2 周起, 脊髓损伤各组大鼠行为学 BBB 评分逐渐升高。与模型组比较, 胶原/壳聚糖支架组和铁皮石斛多糖支架组 BBB 评分升高 ($P<0.05$); 术后 3 周起, 铁皮石斛多糖支架组行为学 BBB 评分高于胶原/

壳聚糖支架组 ($P<0.05$)。

3.5 铁皮石斛多糖支架对脊髓损伤大鼠脊髓组织病理形态的影响
图 6 显示, 假手术组脊髓完整, 无空洞; 模型组、胶原/壳聚糖支架组、铁皮石斛多糖支架组脊髓损伤区可见大小不等的空洞结构。其中模型组空洞面积最大, 为 (1.3 ± 0.2) mm²; 胶原/壳聚糖支架组空洞面积小于模型组 ($P<0.05$), 为 (0.8 ± 0.1) mm²; 铁皮石斛多糖支架组空洞面积小于胶原/壳聚糖支架组 ($P<0.05$), 为 (0.6 ± 0.1) mm²。

3.6 铁皮石斛多糖支架对脊髓损伤大鼠脊髓组织 *NeuN*、*NF-H*、*GFAP* 阳性表达的影响
表 2、图 7 显示, 与假手术组比较, 模型组 *NeuN*、*NF-H* 阳性细胞数减少 ($P<0.01$), *GFAP* 阳性细胞数增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 胶原/壳聚糖支架组和铁皮石斛多糖支架组 *NeuN*、*NF-H* 炎症细胞数增加 ($P<0.05$), *GFAP* 阳性细胞数减少 ($P<0.05$);



注：与阴性对照组比较，* $P<0.05$ ；与阳性对照组比较，# $P<0.05$ 。
图 3 各组骨髓间充质干细胞神经分化的吉姆萨染色与 MAP-2、NeuN 免疫荧光表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

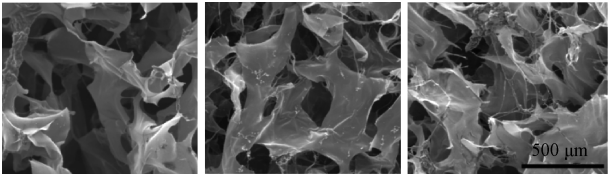
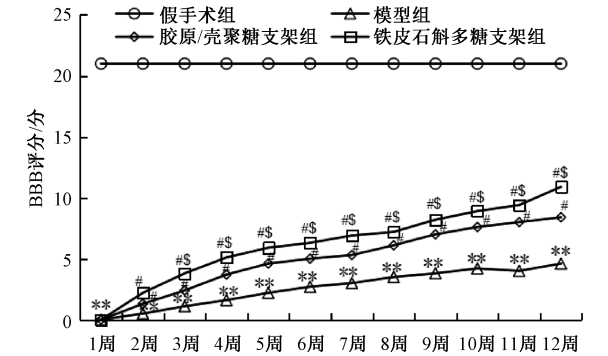


图 4 胶原/壳聚糖支架的微观形态 ($\times 100$)



注：与假手术组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ；与胶原/壳聚糖支架组比较， $^sP<0.05$ 。

图 5 各组大鼠术后行为学 BBB 评分 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

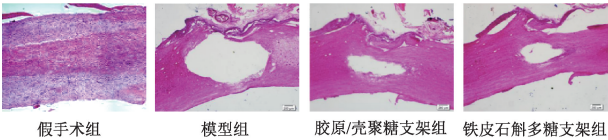


图 6 各组大鼠脊髓损伤部位组织 HE 染色 ($\times 100$)

与胶原/壳聚糖支架组比较，铁皮石斛多糖支架组 NeuN、NF-H 阳性细胞数增加 ($P<0.05$)，GFAP 阳性细胞数减少 ($P<0.05$)。

4 讨论

本实验以不同质量浓度铁皮石斛多糖干预骨髓间充质干细胞，CCK-8 实验结果显示铁皮石斛多糖可促进骨髓间充质干细胞的生长，有利于神经细胞的再生。同时体外神

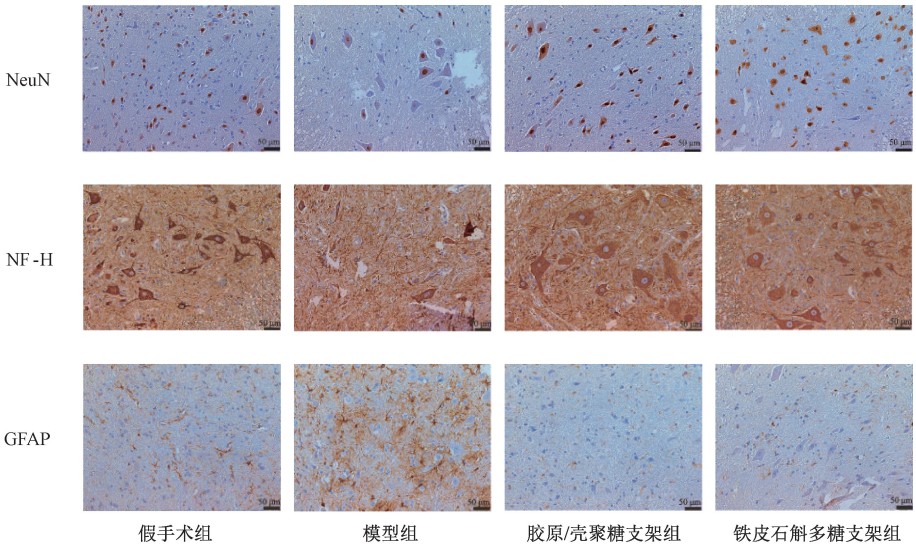
表 2 各组大鼠脊髓损伤部位每个视野阳性细胞计数 (个, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	NeuN 计数	NF-H 计数	GFAP 计数
假手术组	89±10	35±7	24±5
模型组	12±3 **	6±1 **	47±10 **
胶原/壳聚糖支架组	43±8 #	12±4 #	22±8 #
铁皮石斛多糖支架组	58±7 ## \$	20±5 ### \$	13±2 ## \$

注：与假手术组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与胶原/壳聚糖支架组比较， $^sP<0.05$ 。

经向诱导的实验结果显示，铁皮石斛多糖可促进骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞，抑制其分化为星形胶质细胞。Nestin 是特异性表达于神经上皮干细胞的一种分子标记物^[16]，已被广泛作为神经前体细胞的标志分子，对神经系统的进化具有重要作用，同时也可以作为神经系统病变和损伤的快速敏感诊断指标之一。MAP-2 是组成神经元细胞骨架的重要组成成分，在神经系统发育、形成和再生过程的不同时期扮演着重要的角色^[17]。MAP-2 在正常脑组织中主要存在于神经元的胞体、树突和树突棘，是脑内最丰富的蛋白之一，其可调节微管的聚合作用和微管的稳定性，同时对神经元轴突和树突的发生、延长、稳定和突触可塑性调节具有重要作用^[18]。NSE 是神经元和神经内分泌细胞所特有的一种酸性蛋白酶，可作为评价神经细胞损伤严重程度及判断预后的敏感指标^[19]。并且通过细胞形态与免疫荧光染色进一步证实，铁皮石斛多糖可促进骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞。但是铁皮石斛多糖诱导骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的具体作用途径还有待进一步的研究。

BBB 评分结果显示，胶原/壳聚糖支架可在一定程度上恢复脊髓损伤大鼠的后肢运动功能，与以往的研究结论一致^[20]，而胶原/壳聚糖/铁皮石斛多糖支架可更大程度地恢复脊髓损伤大鼠的后肢运动功能，证实铁皮石斛多糖对脊髓损伤的运动功能恢复发挥了重要作用。HE 染色显示，胶原/壳聚糖/铁皮石斛多糖支架组的脊髓损伤空洞较胶原/壳



注：棕色为阳性表达。

图 7 各组大鼠脊髓损伤部位 NeuN、NF-H、GFAP 免疫组化染色图（×200）

聚糖支架组面积更小，说明胶原/壳聚糖支架为内源性神经干细胞的生长及粘附提供了良好的条件，而支架中的铁皮石斛多糖可进一步促进神经干细胞的增殖，有利于缩小空洞面积。免疫组化染色结果显示，与胶原/壳聚糖支架组比较，胶原/壳聚糖/铁皮石斛多糖支架组的神经元、神经纤维数量增多，而胶质瘢痕增生减少，进一步促进了脊髓损伤大鼠运动功能的恢复。由此推测，复合于胶原/壳聚糖支架中的铁皮石斛多糖植入脊髓损伤部位后，可促进内源性神经干细胞增殖并调解其定向分化，促进神经元的再生、神经的再髓鞘化和轴突的生长，抑制星形胶质细胞瘢痕的产生。

综上所述，将铁皮石斛多糖、胶原/壳聚糖支架联合应用于脊髓损伤部位，可以通过促进神经元的再生、神经的再髓鞘化和轴突的生长、抑制星形胶质细胞瘢痕的产生而促进大鼠脊髓损伤后运动功能的恢复。

参考文献：

[1] Karsy M, Hawryluk G. Modern medical management of spinal cord injury[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2019, 19(9): 65.

[2] Zhou X, Shi G, Fan B, *et al.* Polycaprolactone electrospun fiber scaffold loaded with iPSCs-NSCs and ASCs as a novel tissue engineering scaffold for the treatment of spinal cord injury [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 6265-6277.

[3] Hakim J S, Rodysill B R, Chen B K, *et al.* Combinatorial tissue engineering partially restores function after spinal cord injury[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, 13(5): 857-873.

[4] Bedir T, Ulag S, Ustundag C B, *et al.* 3D bioprinting applications in neural tissue engineering for spinal cord injury repair [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 110: 110741.

[5] Ong W, Pinees C, Chew S Y. Scaffold-mediated sequential drug/gene delivery to promote nerve regeneration and remyelination following traumatic nerve injuries [J]. *Adv Drug*

Deliv Rev, 2019, 149-150: 19-48.

[6] Yao Z, Yan L W, Qiu S, *et al.* Customized scaffold design based on natural peripheral nerve fascicle characteristics for biofabrication in tissue regeneration[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 3845780.

[7] 刘晓银, 钟琳, 郑博, 等. 弥散张量成像预测 3D 打印支架促进脊髓损伤后运动功能恢复 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(28): 4547-4554.

[8] 革军, 康乐, 朱澍, 等. 壳聚糖神经支架复合免疫性脱髓鞘剂修复长节段神经缺损研究 [J]. *临床军医杂志*, 2019, 47(3): 261-264; 267.

[9] Hua Y, Ma C, Wei T, *et al.* Collagen/chitosan complexes: Preparation, antioxidant activity, tyrosinase inhibition activity, and melanin synthesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(1): 313.

[10] 史新宇, 李晓红, 叶益超, 等. 3D 打印胶原/壳聚糖支架改善大鼠脊髓损伤后神经功能恢复 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(22): 3474-3479.

[11] 李毅, 王洪瑾, 冯艳萍, 等. 京尼平-壳聚糖牦牛跟腱胶原蛋白支架的构建及其细胞毒性和组织相容性的研究 [J]. *中华损伤与修复杂志 (电子版)*, 2019, 14(6): 410-415.

[12] 邵华, 张玲玲, 李俊梅, 等. 铁皮石斛研究进展 [J]. *中草药*, 2004, 35(1): 109-112.

[13] 沈鸿涛, 刘雪, 吴婷婷, 等. 铁皮石斛多糖对神经细胞凋亡抑制作用的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(8): 1214-1220.

[14] Feng C Z, Cao L, Luo D, *et al.* Dendrobium polysaccharides attenuate cognitive impairment in senescence-accelerated mouse prone 8 mice *via* modulation of microglial activation [J]. *Brain Res*, 2019, 1704: 1-10.

[15] 陈丹莹, 张立新. 超短波对脊髓损伤后内源性神经干细胞存活和分化的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2020, 35(4): 390-397.

[16] Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications [J]. *Cell Mol Life*

Sci, 2018, 75(12): 2177-2195.

[17] Schwab D E, Lepski G, Borchers C, et al. Immunohistochemical comparative analysis of GFAP, MAP-2, NOGO-A, OLIG-2 and WT-1 expression in WHO 2016 classified neuroepithelial tumours and their prognostic value[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(1): 15-24.

[18] Nag T C, Kathpalia P, Wadhwa S. Microtubule alterations may destabilize photoreceptor integrity: Age-related microtubule changes and pattern of expression of MAP-2, Tau and hyperphosphorylated Tau in aging human photoreceptor cells[J]. *Exp Eye Res*, 2020, 198: 108153.

[19] Bagheri M, Ghaneialvar H, Oshnokhah M, et al. GFAP and neuron specific enolase (NSE) in the serum of suicide attempters[J]. *Med J Islam Repub Iran*, 2022, 36: 103.

[20] Sun Y, Yang C, Zhu X, et al. 3D printing collagen/chitosan scaffold ameliorated axon regeneration and neurological recovery after spinal cord injury[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2019, 107(9): 1898-1908.

清热散结胶囊体外和体内抗菌活性研究

赵文楠¹, 周朝忠², 吴志平², 朱明明¹, 宋明霞¹, 邓先清^{1*}
(1. 井冈山大学医学部, 江西 吉安 343009; 2. 江西普正制药股份有限公司, 江西 吉安 343100)

摘要: **目的** 研究清热散结胶囊体外和体内抗菌活性。**方法** 采用微量肉汤稀释法进行体外抗菌实验,测定清热散结胶囊对一系列常见菌株,包括耐药菌在内的抑菌活性。评价清热散结胶囊对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌引起小鼠感染的体内抗菌活性。探究清热散结胶囊抗菌有效成分对热、紫外光的稳定性。采用棋盘法评价清热散结胶囊与临床常用抗生素的联合用药效果。**结果** 清热散结胶囊具有广谱抗菌活性,对所筛菌株如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、变异链球菌、粪肠球菌、铜绿假单胞菌表现出明显的活性抑制,最小抑菌浓度(MIC)为20 mg/mL或40 mg/mL。体内抗菌实验结果显示,中、高剂量清热散结胶囊(10、20 g/kg)可提高小鼠感染金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的存活率($P<0.05$, $P<0.01$)。稳定性实验结果显示,清热散结胶囊的抗菌有效成分具有很好的热稳定性,经50℃至121℃处理30 min后,抑菌MIC没有变化;紫外光照射30、60 min后,清热散结胶囊的抗菌活性亦没有变化,说明其抗菌活性成分对紫外光稳定。联合用药实验结果显示,清热散结胶囊与青霉素、氯霉素或者庆大霉素联合用药时具有协同作用。**结论** 清热散结胶囊具有广谱的体外抑菌性能和明显的体内抗菌活性。该制剂与临床抗生素联合应用时,可以产生协同作用,从而提高临床疗效,减少抗生素的用量,降低耐药性。

关键词: 清热散结胶囊; 千里光; 抗菌活性; 联合用药; 体外实验; 体内实验

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)08-2747-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.08.051

细菌性感染是临床常见疾病,尤其是细菌性呼吸道、肺部与肠道感染更为常见^[1]。细菌感染临床常用药为头孢类与沙星类等化学类抗生素^[2-3]。但随着对抗菌药物研究的不断深入,抗生素的滥用误用导致细菌的耐药性问题日益加剧^[4-5]。

我国拥有丰富的中药资源,各类中成药为临床各种疾病的治疗提供了选择。近年来,研究发现多种清热散结、消炎止痛的中药材及制剂都具有一定抗菌活性^[6-8]。中药具有多成分、多靶点的作用特点,可发挥广谱抗菌作用,并具有增强机体免疫力、抗炎、镇痛等整体调节的优势^[9]。因此抗菌中药逐渐成为诸多学者研究的热点,通过对抗菌中药的研究与开发,有望减少抗生素的使用,提高临床治

疗效果,缓解临床耐药性问题。

清热散结胶囊是一种中成药胶囊制剂,其主要成分是千里光,具有清热散结、散结止痛的功效,临床上常用于急性结膜炎、急性咽喉炎、急性扁桃腺炎、急性肠炎等疾病的辅助治疗。本研究对其进行了系统的抗菌作用研究,包括体外抗菌实验、体内抗菌实验、抗菌成分稳定性实验和临床抗生素联合用药实验,以期对清热散结胶囊辅助临床抗生素对各种感染性疾病的治疗提供参考。

1 材料

1.1 仪器 AR224CN型电子天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司]; WT2002型电子天平(杭州万特衡器有限公司); JP-031S型台式超声清洗机(深圳洁盟技术股份有限

收稿日期: 2022-09-21

基金项目: 江西省自然科学基金项目(20202BAB216041, 20224ACB206044); 井冈山大学科研基金项目 2022 年服务地方专项(JFD2203)

作者简介: 赵文楠(2001—),女,从事抗菌药物研究。E-mail: 1909525917@qq.com

* 通信作者: 邓先清(1984—),男,博士,教授,从事新药开发研究。E-mail: dengxianqing1121@126.com