

· 基础研究 ·

栀子苷对 RAW264.7 细胞胞饮和噬菌功能双向调节作用的初步观察

沈 阳¹, 陈思遐¹, 冯旰珠^{2*}¹南京医科大学第二临床医学院, 江苏 南京 210011; ²南京医科大学第二附属医院呼吸科, 江苏 南京 210011

[摘要] 目的: 研究栀子苷对巨噬细胞系 RAW264.7 细胞活性和内吞功能的影响。方法: 采用 CCK-8 法判定在不同浓度、不同时间下栀子苷对 RAW264.7 细胞增殖的影响; 根据 CCK-8 检测结果, 挑选适宜浓度栀子苷与 RAW264.7 细胞共孵育 24 h 后, 检测 RAW264.7 细胞对中性红溶液的胞饮活性; 进一步以 2 mg/mL 栀子苷与 RAW264.7 细胞共孵育后, 检测 RAW264.7 细胞对铜绿假单胞菌的吞噬活性及胞内细菌存活情况。结果: 栀子苷的细胞毒性小, 在 0~8 mg/mL 浓度内对 RAW264.7 细胞的增殖无明显影响; 2 mg/mL 的栀子苷与细胞共孵育 24 h 后可明显促进静息状态下 RAW264.7 细胞的胞饮活性; 2 mg/mL 的栀子苷抑制 RAW264.7 细胞对铜绿假单胞菌的吞噬及胞内杀菌作用。结论: 栀子苷对 RAW264.7 细胞的胞饮和噬菌功能具有双向调节作用。

[关键词] 栀子苷; RAW264.7 细胞; 胞饮活性; 噬菌作用; 铜绿假单胞菌

[中图分类号] R392.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)10-1426-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20191004

Preliminary observation of dual regulatory effects of geniposide on pinocytosis and phagocytosis of RAW264.7 cells

Shen Yang¹, Chen Sixia¹, Feng Ganzhu^{2*}¹The Second Clinical Medical College, Nanjing Medical University, Nanjing 210011; ²Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of geniposide on activity and endocytosis of murine macrophage RAW264.7 cells. **Methods:** The RAW264.7 cells were added with geniposide at different concentrations and further cultured for several hours. The proliferation of RAW264.7 cells was measured by CCK-8 assay. According to the results of CCK-8 assay, geniposide at appropriate concentrations were selected to culture with RAW264.7 cells for 24 h, and subsequently detected the pinocytosis activity of neutral red solution. After cultured with geniposide at the optimal concentration (2 mg/mL), RAW264.7 cells were detected the phagocytosis activity of *Pseudomonas aeruginosa* and intracellular bacterial survival. **Results:** Geniposide showed little cytotoxicity on RAW264.7 cells. The proliferation of RAW264.7 cells was not seriously affected by 0~8 mg/mL geniposide. Geniposide at 2 mg/mL could significantly promote the pinocytosis of neutral red solution by RAW264.7 cells, but inhibited the phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* and intracellular bacterial survival. **Conclusion:** Geniposide has dual regulatory effect on the pinocytosis and phagocytosis of RAW264.7 cells.

[Key words] geniposide; RAW264.7 cells; pinocytosis; phagocytosis; *Pseudomonas aeruginosa*

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(10): 1426-1429, 1441]

栀子苷, 即京尼平苷(geniposide, GP), 是栀子的主要成分之一, 属于环烯醚萜苷类化合物。现代药理研究表明, 栀子苷具有抗炎、抗细胞氧化损伤作用, 能抑制铜绿假单胞菌毒力因子及其生物膜, 抑

[基金项目] 国家自然科学基金(81670013)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhu1635253@163.com

制甲型 H1N1 流感病毒感染的肺部损伤效应, 对阿尔兹海默症及糖尿病也能发挥较好的药理效应^[1-3]。单核/巨噬细胞是机体固有免疫的重要组成部分, 也是主要的效应细胞, 可通过抗原递呈启动特异性免疫应答, 识别、吞噬及消化病原体, 也可以通过胞饮作用和受体介导的内吞作用摄入胞外物质。吞噬、

胞饮和受体介导的内吞作用构成了其主要的内吞方式。内吞能力的增强有助于促进巨噬细胞免疫效能的提升,有关栀子苷对巨噬细胞内吞作用的影响目前尚未见报道,本文拟就栀子苷对巨噬细胞胞饮和噬菌能力的影响进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 细胞株、铜绿假单胞菌野生标准株 (PA01) 均为南京医科大学第二附属医院实验室保存株。栀子苷 ($C_{17}H_{24}O_{10}$) 购自成都曼斯特生物技术有限公司,批号 18103012,纯度 $\geq 98\%$; CCK-8 试剂盒、1% Triton X-100 (南京凯基生物); DMEM 培养液 (Gibco 公司, 美国); 中性红溶液 (北京 Solarbio 公司); BCECF/AM (上海碧云天生物技术有限公司); 庆大霉素 (Biosharp, 韩国), 多聚甲醛 (Sigma 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 法检测细胞存活率

在 96 孔板中加入 RAW264.7 细胞 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ (约 1×10^4 个细胞), 置 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱培养 16 h。结合文献报道^[4-6]和前期预实验结果, 分别加入终浓度为 0 (对照组)、2、4、6、8 mg/mL 的栀子苷, 每个浓度设 3 个复孔, 在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 及饱和湿度的细胞培养箱孵育 24、48 h。向各孔中加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液, 37°C 下孵育 2 h, 酶标仪在 450 nm 波长处检测每孔的吸光度值。细胞存活率 = 栀子苷组吸光度 / 对照组吸光度 $\times 100\%$ 。

1.2.2 中性红实验观察细胞胞饮活性

将 RAW264.7 细胞按 1×10^4 个/孔接种在 96 孔板中, 置 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱培养 16 h, 再用终浓度为 0 (对照组)、2、4、6、8 mg/mL 的栀子苷处理, 每个浓度 5 个复孔。24 h 后预热 PBS 洗 3 遍, 每孔加入 0.09% 中性红溶液 $100 \mu\text{L}$, 温育 3 h, 吸去中性红溶液, 预热 PBS 洗 3 遍, 加细胞裂解液 $200 \mu\text{L}/\text{孔}$, 孵育 2 h, 测定 562 nm 波长处吸光度。计算中性红胞饮指数 (栀子苷组吸光度 / 对照组吸光度)。

1.2.3 荧光染色实验观察细胞吞噬功能

将 RAW264.7 细胞分为空白对照组和栀子苷组, 按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔培养板中, 每组 3 个复孔。根据上一步实验结果, 栀子苷组选择 2 mg/mL 浓度栀子苷与 RAW264.7 细胞共孵育 24 h。将 PA01 用 BCECF/AM ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) 在 37°C 标记 30 min, 并将相同数量 PA01 (1×10^8 CFU/孔) 直接加入到 RAW264.7 细

胞无血清培养基中, 温育 1 h 后, 用培养基洗涤细胞 3 次, 4% 多聚甲醛固定并用荧光显微镜拍照。

1.2.4 细菌胞内存活试验

在 24 孔板中加入 RAW264.7 细胞 5×10^5 个/孔, 分为空白对照组和栀子苷组, 每组 24 个复孔。置 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱培养 16 h 后, 栀子苷组加入终浓度 2 mg/mL 的栀子苷, 继续孵育 24 h; PA01 在 LB 培养液中 37°C 振荡培养至对数期, 离心收集细菌, 无菌 PBS 洗细菌沉淀 2 遍, 用无抗生素细胞培养液重悬, 并调整至 1×10^8 CFU/mL; 以 100:1 的感染复数 (MOI) 加入 $500 \mu\text{L}$ 菌液感染细胞, 共孵育 1 h 后, 无菌 PBS 漂洗细胞 3 遍, 以去除培养液中游离的细菌; 用含 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素细胞培养液孵育 1 h 以杀死胞外细菌, 含 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的细胞培养液继续培养 0、2、4、6 h; 在每个预定时间点, 每组取 6 孔细胞用无菌 PBS 洗 3 遍, 加入 1 mL 含 1% Triton X-100 的 PBS 于 37°C 裂解 10 min, 释放出胞内细菌, 10 倍系列稀释后涂在 LB 琼脂平板上培养计数拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS24.0 统计软件处理, 定量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较用 t 检验; 多组比较采用 ANOVA 检验, 两两比较采用 LSD 法。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 栀子苷对 RAW264.7 细胞存活率的影响

CCK-8 实验结果显示, 2、4、6、8 mg/mL 栀子苷作用 24 或 48 h 后对 RAW264.7 细胞体外生长均没有明显抑制作用 ($P > 0.05$, 图 1)。

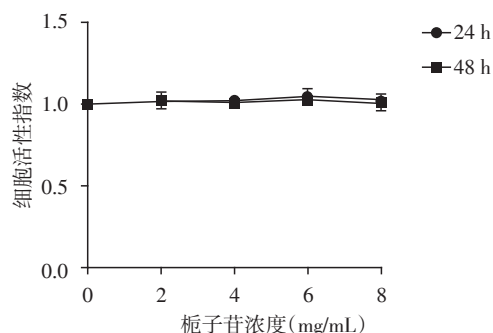


图 1 栀子苷对 RAW264.7 细胞活性的影响 ($n=3$)

Figure 1 Effect of of geniposide on the activity of RAW264.7 cells ($n=3$)

2.2 栀子苷对 RAW264.7 细胞胞饮活性的影响

RAW264.7 细胞与 2、4、8 mg/mL 的栀子苷共孵育 24 h 后, 其对中性红的胞饮指数分别是 1.17 ± 0.05 、

1.03 ± 0.06、0.91 ± 0.07。与对照组相比,2 mg/mL的栀子苷显著增加RAW264.7细胞对中性红的吞饮,差异有统计学意义($P < 0.01$,图2)。4 mg/mL的栀子苷与对照组相比无明显差异,而8 mg/mL的栀子苷则抑制RAW264.7细胞对中性红的吞饮($P < 0.05$,图2)。不同浓度下的栀子苷对RAW264.7细胞胞饮活性影响不同,依据该实验进一步选择噬菌实验中的栀子苷浓度为2 mg/mL。

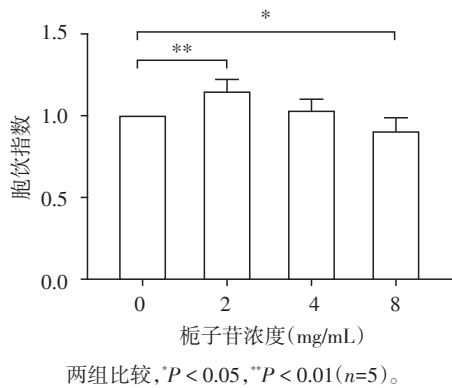


图2 栀子苷对RAW264.7细胞胞饮活性的影响

Figure 2 Effect of geniposide on pinocytotic activity of RAW264.7 cells

2.3 栀子苷对RAW264.7细胞吞噬铜绿假单胞菌的影响

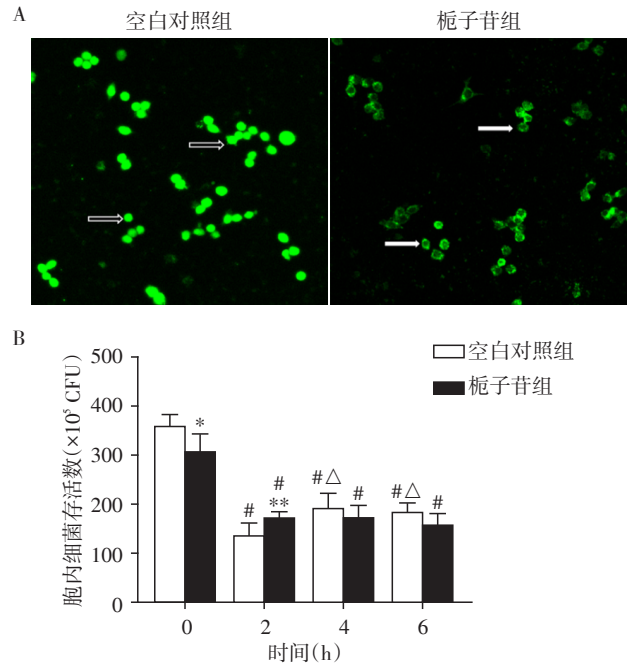
2.3.1 荧光显微镜观察结果

荧光显微镜下可见空白对照组RAW264.7细胞吞噬了大量铜绿假单胞菌,胞内铜绿假单胞菌基本无法分清,绿色荧光强度高。栀子苷组RAW264.7细胞胞体不规则,细胞界限不清,胞内也可见被吞噬的荧光染色的铜绿假单胞菌,但荧光强度较空白对照组低(图3A)。

2.3.2 细菌胞内存活实验

空白对照组和栀子苷组RAW264.7细胞中释放的胞内细菌计数结果见图3B。空白对照组中细菌计数呈先明显下降再稍微回升的趋势,0 h与2 h、4 h、6 h以及2 h与4 h、6 h之间细菌数量差异均有统计学意义($P < 0.01$)。0 h菌落计数显示了RAW264.7细胞对铜绿假单胞菌的吞噬能力;2 h菌落计数显著下降,提示RAW264.7细胞对胞内铜绿假单胞菌有效的杀菌作用;而4 h、6 h细菌计数又较2 h有所上升,考虑为存活的铜绿假单胞菌在胞内继续增殖。栀子苷组中仅0 h与2 h、4 h、6 h间差异有统计学意义($P < 0.01$),提示栀子苷作用下RAW264.7细胞对铜绿假单胞菌同样具有吞噬及消化杀菌能力,而胞内铜绿假单胞菌增殖不明显。

与空白对照组相比,栀子苷组RAW264.7细胞0 h对铜绿假单胞菌的吞噬数量少($P < 0.05$),2 h胞内存活细菌多($P < 0.01$),提示栀子苷抑制了RAW264.7细胞对铜绿假单胞菌的吞噬以及对胞内铜绿假单胞菌的杀菌、消化过程。



A: 荧光显微镜观察RAW264.7吞噬的铜绿假单胞菌(×200); B: RAW264.7细胞吞噬铜绿假单胞菌后胞内细菌存活数;与同组0 h比较,* $P < 0.01$;与同组2 h比较,Δ $P < 0.01$;与同时时间点空白对照组比较,# $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=6$)。

图3 栀子苷对RAW264.7细胞吞噬铜绿假单胞菌的影响
Figure 3 Effect of geniposide on phagocytosis activity of RAW264.7 cells

3 讨论

栀子苷作为栀子的主要活性成分,可以通过PI3K/Akt信号通路抗氧化^[7],通过miR-101/MKP-1/p38信号通路减轻炎性损伤^[8],也通过下调雷帕霉素(mTOR)信号通路增强自噬和溶酶体对淀粉样蛋白纤维的清除来逆转阿茨海默病的神经病理性损伤及认知障碍^[9]。还有多项研究表明,栀子苷可以通过TLR4-NF-κB信号通路抑制内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激RAW264.7细胞产生炎性反应介质,发挥抗炎免疫作用;对LPS诱导的脓毒血症模型小鼠有保护作用^[4-5]。杨东等^[6]的动物体内实验则证实了栀子苷还可以拮抗大肠埃希菌脓毒症。上述实验主要探讨了栀子苷对巨噬细胞炎症因子的抑制性效应,关于栀子苷对巨噬细胞内吞功能的影响尚未见报道。

巨噬细胞能根据不同的环境刺激改变其表型和功能^[11]。在静息下,主要为抑炎状态,维持微环境稳定;而在受到病原菌刺激时,则可通过表型极化加强促炎作用,开启有效的免疫应答。内吞作用则是巨噬细胞摄入生物大分子的主要途径,包括对病原微生物的吞噬作用和对细胞外基质中液滴的胞饮作用。在本研究中我们选用传统的中性红溶液作为胞饮对象,而吞噬作用则选择铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)作为观察对象,其目的在于探究栀子苷能否促进巨噬细胞对临床重要病原菌的吞噬效应。

众所周知,PA作为一种条件致病菌,是医院获得性肺炎(hospital-acquired pneumonia, HAP)及呼吸机相关性肺炎(ventilator-associated pneumonia, VAP)中最为常见的重要病原菌^[12]。PA的细胞壁成分LPS具有强大的抗原刺激能力,可通过与巨噬细胞表面受体结合,促进巨噬细胞的活化,释放炎症介质,如白细胞介素、肿瘤坏死因子 α 等,进一步促进巨噬细胞吞噬和杀灭病原体^[13-14],而大量的炎症性因子则会形成瀑布效应使巨噬细胞过度活化,表现出强烈的炎症反应,甚至引发死亡^[15]。因此控制过度活化的巨噬细胞、减少过度损伤是在肺部感染、脓毒血症治疗中需要关注的重点。由于既往研究多是基于单一物质LPS的刺激,可能忽略了病原菌作为一种活的生物体包含了多重致病因子,基于此,本研究直接选用PA作为巨噬细胞噬菌实验的对象,模拟观察巨噬细胞对PA的吞噬、消化的过程。

本研究结果发现,栀子苷在8 mg/mL浓度下对RAW264.7存活率仍无明显影响,提示栀子苷对巨噬细胞作用的安全范围较大,为后期的临床应用提供一定基础。在本实验中,我们还观察到栀子苷能够促进RAW264.7细胞对中性红的吞饮活性,提示栀子苷能增加静息状态下巨噬细胞的免疫活性,这种促进效应有助于巨噬细胞摄入胞外液体及宿主巨噬细胞微环境周围的有害溶质,加强细胞对营养的摄取及对胞外微环境变化调控效应并维持胞内环境的相对稳定等。而在噬菌实验中,我们除了验证RAW264.7细胞能对胞外PA进行吞噬和胞内杀菌,也进一步发现栀子苷能对巨噬细胞吞噬和胞内消化PA有一定程度的抑制作用。这种抑制作用考虑和前人研究中发现的栀子苷抑制炎症反应递质释放等相关,该抑制作用有利于控制炎症反应,减少组织损伤。

综上所述,本研究初步观察到栀子苷对于

RAW264.7细胞胞饮和噬菌功能具有双向调节作用。一方面,栀子苷能增强生理功能下的巨噬细胞活性,有助于保护机体,维持和恢复机体功能的稳态;另一方面,当PA感染时,则可减少炎症因子释放,抑制脓毒血症,降低炎症损伤。对于其中的机制仍需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 王恩力,董 方,姚景春. 栀子苷药理学和毒理学研究进展[J]. 中国药房,2015,26(19):2730-2733
- [2] 王 平,夏 飞,江必武,等. 栀子对铜绿假单胞菌毒力因子抑制作用及机制研究[J]. 中药药理与临床,2014,30(6):77-80
- [3] 张耘实,祁 贤,卢协勤,等. 栀子苷对甲型H1N1流感病毒的抑制作用[J]. 中国药科大学学报,2016,47(2):204-209
- [4] 黄丽华,王纯洁,纳仁高娃,等. 栀子苷对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞TLR4-NF- κ B通路的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2013,29(10):1012-1014
- [5] 伏建峰,赵 华,史清海,等. 栀子苷拮抗内毒素的实验研究[J]. 中国现代应用药学,2013,30(4):352-356
- [6] 杨 东,曹红卫,伏建峰,等. 栀子拮抗内毒素活性物质京尼平苷的分离制备及其活性评价[D]. 重庆:第三军医大学,2008:8-20
- [7] Yin F, Liu J, Zheng X, et al. Geniposide induces the expression of heme oxygenase-1 via PI3K/Nrf2-signaling to enhance the antioxidant capacity in primary hippocampal neurons[J]. Biol Pharm Bull,2010,33(11):1841-1846
- [8] Cheng S, Zhou F, Xu Y, et al. Geniposide regulates the miR-101/MKP-1/p38 pathway and alleviates atherosclerosis inflammatory injury in ApoE^{-/-} mice[J]. Immunobiology,2019,224(2):296-306
- [9] Zhang Z, Wang X, Zhang D, et al. Geniposide-mediated protection against amyloid deposition and behavioral impairment correlates with downregulation of mTOR signaling and enhanced autophagy in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Aging,2019,11(2):536-548
- [11] Wang N, Liang HW, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance [J]. Front Immunol,2014,5:614
- [12] 何 玉. 897例老年肺部感染病原菌及耐药性分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2009,29(6):904-905
- [13] Cruz GV, Pereira PV, Patricio FJ, et al. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves[J]. J Ethnopharmacol,2007,111(1):148-154

(下转第1441页)

它参与了心梗的发生过程,但它可能并不参与急性心肌梗死后心肌修复的过程。

[参考文献]

- [1] Talmud PJ, Holmes MV. Deciphering the causal role of sPLA2s and Lp-PLA2 in coronary heart disease[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(11):2281-2289
- [2] Jensen MK, Bertola ML, Cahill LE, et al. Novel metabolic biomarkers of cardiovascular disease[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(11):659-672
- [3] 秦明明, 黄雨馨, 陈雪梅. LP-PLA2与sd-LDL联合检测对动脉粥样硬化的辅助诊断价值[J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(1):38-43
- [4] Liu HM, Yao Y, Wang YX, et al. Association between high-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein-associated phospholipase A2 and carotid atherosclerosis: a cross-sectional study[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(10):5145-5150
- [5] Wang C, Fang X, Hua Y, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of carotid atherosclerosis and cardiovascular events in community-based older adults in China[J]. *Angiology*, 2017, 69(1):3319717704554
- [6] Acosta S, Taimour S, Gottsater A, et al. Lp-PLA2 activity and mass for prediction of incident abdominal aortic aneurysms: a prospective longitudinal cohort study[J]. *Atherosclerosis*, 2017, 262:14-18
- [7] Wallentin L, Held C, Armstrong PW, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is a marker of risk but not a useful target for treatment in patients with stable coronary heart disease[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(6):e003407
- [8] Wu X, Zhang Y, Wu Z, et al. Plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 level is an Independent predictor of high thrombus burden in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction[J]. *Int Heart J*, 2016, 57(6):689-696
- [9] Kandhai-Ragunath JJ, De Wagenaar B, Doelman C, et al. Endothelial function after ST-elevation myocardial infarction in patients with high levels of high-sensitivity CRP and Lp-PLA2: A substudy of the RESPONSE randomized trial[J]. *Cardiovasc Revasc Med*, 2017, 18(3):202-206
- [10] He S, Chousterman BG, Fenn A, et al. Lp-PLA(2) antagonizes left ventricular healing after myocardial infarction by impairing the appearance of reparative macrophages[J]. *Circ Heart Fail*, 2015, 8(5):980-987
- [11] Stankovic S, Asanin M, Trifunovic DA, et al. Utility of lipoprotein-associated phospholipase A2 for prediction of 30-day major adverse coronary event in patients with the first anterior ST-segment elevation myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention[J]. *Clin Lab*, 2012, 58(11/12):1135-1144
- [12] Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, et al. 2015 ACC/AHA/SCAI focused update on primary percutaneous coronary intervention for patients with ST-elevation myocardial infarction an update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI guideline for percutaneous coronary intervention and the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67(10):1235-1250
- [13] 中华医学会心血管病分会介入心脏病学组, 中国医师协会心血管内科医师分会, 血栓防治专业委员会和中华心血管病杂志编辑委员会. 稳定性冠心病诊断和治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2018, 46(9):680-694
- [14] 严建军, 高伟, 徐崇, 等. 磷脂酶A2与非ST段抬高急性冠脉综合征临床相关性研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(12):1711-1714
- [15] Li JW, Wang H, Tian JP, et al. Change in lipoprotein-associated phospholipase A2 and its association with cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndrome[J]. *Medicine(Baltimore)*, 2018, 97(28):e11517

[收稿日期] 2019-06-25

(上接第 1429 页)

- [14] 张小宝, 朱敏敏, 朱海慧, 等. 氯胺酮对脂多糖诱发的大鼠肺泡巨噬细胞一氧化氮及氧自由基生成的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2007, 27(10):1115-1117
- [15] Cinel I, Opal SM. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer[J]. *Crit Care Med*, 2009, 37(1):291-304

[收稿日期] 2019-06-14