

麻杏石甘汤对肺炎支原体诱导巨噬细胞凋亡的保护作用

龙 燕¹ 王叶芳²

(1.中国药科大学药理教研室,江苏南京 210009; 2.南京市中西医结合医院儿科,江苏南京 210014)

摘要 目的:观察麻杏石甘汤对肺炎支原体(MP)诱导巨噬细胞凋亡的保护作用。方法:培养巨噬细胞 RAW246.7,分别将麻杏石甘汤 1、5、10、20 μ L 与巨噬细胞共孵育,模型组与空白对照组分别加入磷酸盐缓冲液(PBS)20 μ L 与细胞共孵育。除空白对照组,72h 后利用灭活 MP 感染其余各组细胞 24h。通过 MTT 检测各组细胞活力,LDH 检测细胞损伤率,流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果:与空白对照组比较,模型组细胞活力显著降低($P<0.05$),LDH 释放、细胞凋亡百分比显著增加($P<0.05$);与模型组比较,麻杏石甘汤 10 μ L 与 20 μ L 组细胞活力显著提高($P<0.05$),LDH 释放、细胞凋亡百分比显著降低($P<0.05$)。结论:麻杏石甘汤能对抗 MP 引起的 RAW246.7 细胞活力下降,抑制 MP 诱导的 RAW246.7 细胞凋亡,对细胞具有明显的保护作用。

关键词 麻杏石甘汤 巨噬细胞 细胞凋亡 细胞活力 体外实验

中图分类号 R289.51 文献标志码 A 文章编号 1672-397X(2015)10-0074-03

肺炎支原体(mycoplasma pneumoniae,MP)是儿童呼吸道感染较常见的病原体,其发病率在婴幼儿中有逐年升高的趋势。麻杏石甘汤是辨证治疗痰热闭肺型肺炎支原体肺炎(mycoplasmal pneumoniae pneumonia,MPP)的常用方剂,经临床验证疗效确切^[1]。课题组前期的研究也发现,麻杏石甘汤可降低 MP

感染后巨噬细胞内 TNF- α 蛋白水平的表达^[2]。本研究通过体外培养巨噬细胞 RAW246.7 细胞株,给予麻杏石甘汤预孵育后感染灭活 MP,观察细胞活力及细胞凋亡水平的变化,现将结果报道如下。

1 实验材料

1.1 药品、菌株与试剂 MP 菌株 29342(ATCC,

凋亡的影响,同时可研究中药对内皮细胞膜 AB 转运体的影响,以明确中药保护血脑屏障的靶点。

参考文献

- [1] Manji H,Kato T,Di Prospero NA,et al.Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders.Nat Rev Neurosci,2012,13(5):293
- [2] Erickson MA,Banks WA.Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. J Cereb Blood Flow Metab,2013,33(10):1500
- [3] Li JC,Han L,Wen YX,et al.Increased permeability of the blood-brain barrier and Alzheimer's disease-like alterations in slit-2 transgenic mice. J Alzheimers Dis, 2015,43(2):535
- [4] 王永炎.关于提高脑血管疾病疗效难点的思考.中国中西医结合杂志,1997,17(4):195
- [5] 贺燕勤,于顾然.运用《难经》“益精”理论治疗痴呆.陕西中医,2012,33(6):746
- [6] 史国娟,贺燕勤,于顾然.补肾益精方含药血清对 D-半乳糖致原代培养神经元损伤影响的研究.江苏中医药, 2015,47(2):80
- [7] 张水华,季龙凤,马琛.非接触式共培养体外血脑屏障模型的跨膜电阻及通透性.中国药理学与毒理学杂志, 2012,26(6):882

- [8] Corbett A,Ballard C.New and emerging treatments for Alzheimer's disease.Expert Opin Emerg Drugs,2012,17 (2):147

- [9] Pardridge WM. Blood-brain barrier biology and methodology. J Neurovirol,1999,5(6):556
- [10] Lo EH,Dalkara T,Moskowitz MA.Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. Nat Rev Neurosci,2003,4 (5):399
- [11] Hermann DM,C'hopp M.Promoting brain remodelling and plasticity for stroke recovery;therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation. Lancet Neurol,2012,11(4):369
- [12] Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders.Nat Rev Neurosci,2011,12(12):723

第一作者:王丹丹(1990—),女,硕士研究生,神经内科学专业。

通讯作者:于顾然,医学博士,主任医师,教授,硕士研究生导师。dr.ygrdf@163.com

收稿日期:2015-06-04

编辑:吴宁

M129-B7)。麻杏石甘汤,药物组成:麻黄、杏仁、石膏、甘草(1:3:6:2),内含生药 0.36g/mL,由南京市中西医结合医院药剂科提供。DMEM 高糖培养基(Gibcol,USA);胎牛血清(Gibcol,USA);3-(4,5-二甲基噻唑)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,sigma-Aldrich,USA);二甲基亚砷(DMSO,Gibcol,USA);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)检测试剂盒(南京建成生物制品有限公司);Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒(thermo,USA)。

1.2 仪器 DG3033A 型酶联免疫仪(华东电子管厂);XSZ-D 倒置生物显微镜(重庆光学仪器厂);BB-16 型二氧化碳培养箱(Heraeus),XIDP 超净工作台(苏州吴县实验动物仪器厂);FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD)。

2 实验方法

2.1 MP 菌株培养 MP 菌株培养于支原体肉汤培养基中。解冻培养基至溶液变黄时进行 MP 菌落培养,约 12d 形成荷包蛋样菌落,随机挑取一个菌落加入支原体肉汤后,37℃5%CO₂,800r/min×72h 培养,收集菌液,调整浓度至 10⁶~10⁷CFU/mL。

2.2 巨噬细胞 RAW246.7 培养及分组 DMEM 培养基培养 RAW246.7 细胞株,待细胞密度达到 60% 后,将细胞接种于 96 与 24 孔板内,并分为以下组别:空白对照组,加入 20μL 磷酸盐缓冲液(PBS);模型组,给予 20μL PBS,72h 后加入灭活 MP(灭活条件:将 MP 菌株暴露于紫外线中 2h)10μL;麻杏石甘汤各剂量给药组,分别以麻杏石甘汤 1、5、10、20μL 与细胞共孵育 72h 后,给予灭活 MP 菌株。

2.3 检测指标 培养 24h 后,各组采用 MTT 检测细胞活力,LDH 试剂盒检测 LDH 水平,流式细胞仪检测细胞凋亡水平。

2.3.1 细胞活力测定(MTT 法) MTT 可以被活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶还原成难溶性的蓝紫色结晶并沉积在细胞体内,但是死亡细胞内的 MTT 不能被还原。DMSO 可以溶解这些紫色结晶,通过测定 570nm 波长下吸光度不同,可以检测细胞活力。配制 MTT 至终浓度为 5mg/mL 工作液。向 96 孔板每孔加入 50μL MTT 工作液。待反应 4h 后,吸去上清液(注意避免吸走甲瓞结晶),每孔加入 200μL 的 DMSO,待孔内颗粒完全溶解后,以 DMSO 调零,测定 570nm 处的光密度值(OD),以空白对照组的 OD 值为 100%,计算各给药组 RAW246.7 细胞活力。

2.3.2 LDH 活性测定及抑制率计算 收集 24 孔板内每孔培养液 0.5mL,按照乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒使用说明书的步骤,测定细胞培养液的 LDH 活性,再根据下式计算各组 LDH 抑制率。

LDH 抑制率=(模型组 LDH 含量-给药组 LDH 含量)/(模型组 LDH 含量-空白对照组 LDH 含量)

2.3.3 Annexin V 与 PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡率 根据 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒说明书,PBS 洗涤细胞后,用双蒸水 1:4 稀释结合缓冲液,以稀释的结合缓冲液重悬细胞,并调细胞密度为 2×10⁵ 个/mL,取 195μL 细胞悬液,加 5μL Annexin V-FITC 和 10μL PI 混匀,室温避光反应 30min,上机检测。

2.4 统计学方法 使用 Stata (Version 10.0,Stata-Corp,LP) 软件进行统计分析,所有数据用(x±s)表示,采用的分析方法为单因素方差分析及两两比较(Scheffe test),P<0.05 为差异有统计学意义。

3 实验结果

结果表明,MP 感染 RAW246.7 细胞后,与空白对照组相比,模型组的细胞活力显著下降,细胞外 LDH 释放显著上升,细胞凋亡率显著增高;与模型组相比,麻杏石甘汤 10μL 与 20μL 组细胞活力显著上升,细胞外 LDH 释放显著下降,细胞凋亡率显著降低。见表 1、图 1。

表 1 各组细胞活力、细胞外 LDH 含量及 LDH 抑制率、细胞凋亡率比较

组别	细胞活力 (x±s)	LDH 含量 (x±s, U/L)	LDH 抑制率	细胞凋亡率 (x±s, %)
空白对照组	1.00±0.24	753.8±35.0	1	1.58±0.43
模型组	0.47±0.16 [#]	1412.4±54.8 [#]	0	38.73±8.01 [#]
麻杏石甘汤 1μL 组	0.40±0.12	1387.0±85.9	0.04	35.55±2.46
麻杏石甘汤 5μL 组	0.51±0.19	1244.2±108.3	0.24	26.40±2.45
麻杏石甘汤 10μL 组	0.71±0.18 [*]	1003.6±79.2 [*]	0.62	16.00±2.33 [*]
麻杏石甘汤 20μL 组	0.79±0.09 [*]	877.4±60.0 [*]	0.82	8.35±2.10 [*]

注:与空白对照组比较,#P<0.05;与模型组比较,*P<0.05。

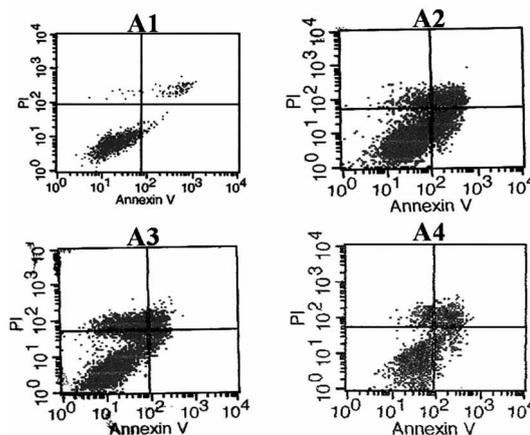


图 1 细胞凋亡检测图谱

注:A1—A4 依次分别表示空白对照组、模型组、麻杏石甘汤 10μL 组,麻杏石甘汤 20μL 组。

4 讨论

支原体肺炎发病机制目前尚不明确,现认为感染后 MP 与机体免疫系统相互作用,导致多克隆促进 T 细胞与 B 细胞增殖,激活巨噬细胞、NK 细

胞与细胞毒 T 细胞的溶细胞活力,刺激淋巴细胞、巨噬细胞及单核细胞产生细胞因子,造成组织损伤^[3]。有文献报道,呼吸道 MP 感染患者血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平明显增高^[4]。TNF- α 主要由巨噬细胞产生,可明显促进白介素 8 (IL-8) 含量升高,而 IL-8 可趋化白细胞至炎症部位,加重组织损伤;亦可通过 T 细胞、B 细胞调节机体的特异性及非特异性免疫功能,诱导中心粒细胞的趋化作用和局部浸润,损伤内皮细胞,降低细胞跨膜电位,诱发其他炎性介质释放;高水平 TNF- α 可促进 B 细胞合成过多的 IgE,使机体出现高敏状态和 I 型变态反应^[5-8]。亦有研究发现,MP 可诱导巨噬细胞凋亡^[9]。

本实验发现,MP 可诱导巨噬细胞发生凋亡,细胞活力显著下降,细胞外 LDH 活力显著上升。LDH 是机体能量代谢中的一种重要酶,主要存在于细胞内,属胞浆酶,细胞破裂时 LDH 释放到基质中,测定 LDH 活性可以推断细胞损伤程度。不同体积的麻杏石甘汤预处理细胞后,10 μ L 及 20 μ L 麻杏石甘汤可显著降低由 MP 诱导的巨噬细胞凋亡率,提高细胞活力并同时降低细胞外 LDH 活力,但麻杏石甘汤 1 μ L 及 5 μ L 未显示出对细胞的保护作用,这可能由于麻杏石甘汤有效浓度过低所致。上述结果提示,MP 可诱导巨噬细胞发生凋亡,麻杏石甘汤则对巨噬细胞具有保护作用。吞噬清除损伤细胞是巨噬细胞的重要生理功能,同时巨噬细胞可释放大量的 TNF- α 参与调节机体细胞免疫。因此,当机体感染 MP 后,在疾病的后期由于大量巨噬细胞发生凋亡,细胞内大量的 TNF- α 被释放至细胞外,炎症加重。而麻杏石甘汤通过抑制 MP 诱导的巨噬细胞凋亡,提高巨噬细胞活力,是其能够有效辅助治疗 MP 的主要机制之一。同时,本实验结果提示,麻杏石甘汤的有效浓度与其对巨噬细胞的保护作用有相关性,但是否在辅助治疗 MP 感染时,麻杏石甘汤浓度越高其疗效就越好仍需进一步验证。并且,麻杏石甘汤通过何种机制调节巨噬细胞凋亡仍需深入研究。

综上所述,本实验为麻杏石甘汤通过调节机体

免疫达到辅助治疗 MP 提供了有力证据,且由于其对巨噬细胞具有保护作用,可推测麻杏石甘汤在其他炎症疾病中也可能发挥有效治疗作用。

参考文献

- [1] 曾军文. 中西医结合治疗小儿肺炎支原体肺炎 100 例. 江西中医药, 2007, 38(7): 63
- [2] 王叶芳, 王艳波, 边逊. 麻杏石甘汤对幼龄大鼠肺炎支原体肺炎的辅助治疗及相关机制研究. 江苏中医药, 2013, 45(11): 69
- [3] Ngeow YF, Suwanjutha S, Chantarojanasri T, et al. An Asian study on the prevalence of a typical respiratory pathogens in community-acquired pneumonia. Int J Infect Dis, 2005, 9(3): 144
- [4] 袁红瑛, 于芳, 张青晓, 等. 肺炎支原体感染患儿血清肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素 6 及 8 变化. 实用儿科临床杂志, 2003, 18(9): 749
- [5] McMasters KM, Cheadle WG. Regulation of macrophage TNF alpha, IL-1 beta, and Ia (I-A alpha) mRNA expression during peritonitis is site dependent. J Surg Res, 1993, 54(5): 426
- [6] Eleftheriadis T, Antoniadi G, Liakopoulos V, et al. Paricalcitol reduces basal and lipopolysaccharide-induced (LPS) TNF-alpha and IL-8 production by human peripheral blood mononuclear cells. Int Urol Nephrol, 2010, 42(1): 181
- [7] Kim EJ, Bu SY, Sung MK, et al. Analysis of Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Silicon in Murine Macrophages. Biol Trace Elem Res, 2013, 156(1-3): 329
- [8] Eysink PE, Terriet G, Aalberse RC, et al. Accuracy of specific IgE in the prediction of asthma: development of a scoring formula for general practice. Br J Gen Pract, 2005, 55(511): 125
- [9] 朱翠明, 汪世平, 游晓星, 等. 肺炎支原体脂质相关膜蛋白在动脉粥样硬化发生发展中的作用机制. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(9): 773

第一作者: 龙燕 (1978—), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向: 药理学及神经生物学。

通讯作者: 王叶芳, 本科学历, 副主任医师。
wangyefang@126.com

收稿日期: 2015-07-01

编辑: 吴宁

江苏中医药信息网 (www.jstcm.com)

——做最专业的中医药网络传媒!