

本文引用: 王佳贺, 万小旭, 刘丹. 连翘苷对金黄色葡萄球菌刺激的人单核巨噬细胞炎症反应的抑制作用[J]. 新乡医学院学报 2016, 33(6): 466-468. DOI: 10.7683/xyxyxb.2016.06.005.

【基础研究】

## 连翘苷对金黄色葡萄球菌刺激的人单核巨噬细胞炎症反应的抑制作用

王佳贺, 万小旭, 刘丹

(中国医科大学附属盛京医院老年病科 辽宁 沈阳 110004)

**摘要:** 目的 探讨连翘苷对金黄色葡萄球菌引起的人单核巨噬细胞 Toll 样受体 2(TLR2) 和 TLR4 表达增高的抑制作用, 研究其在感染性疾病时对机体的保护作用。方法 采用金黄色葡萄球菌刺激人单核巨噬细胞, 构建感染性疾病的体外模拟炎症模型, 实时定量多聚酶链反应(RT-PCR) 检测 TLR2 和 TLR4 表达, 酶联免疫吸附测定法(ELISA) 测定连翘苷对金黄色葡萄球菌刺激人单核巨噬细胞释放炎症介质白细胞介素-6(IL-6)、IL-8、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 和巨噬细胞集落刺激因子-1(MCSF-1) 的影响。结果 RT-PCR 检测结果显示, 金黄色葡萄球菌能够使单核巨噬细胞表达 TLR2 和 TLR4 升高, 但经连翘苷预处理后, TLR2 和 TLR4 的表达显著下降( $P < 0.05$ ), 当连翘苷为  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, TLR2 与 TLR4 的抑制剂阳性对照 OxPAPC 和 MST510 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。ELISA 检测结果显示, 当连翘苷为  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 抑制金黄色葡萄球菌刺激人单核巨噬细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-8 水平明显增强( $P < 0.05$ ), 且随着连翘苷浓度升高, 抑制效果更为明显( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ), 呈浓度依赖关系; 当连翘苷为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 抑制金黄色葡萄球菌刺激人单核巨噬细胞分泌 IL-6、MCSF-1 水平明显增强( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且随着连翘苷浓度升高, 抑制效果更为明显( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 呈浓度依赖关系。结论 连翘苷能够抑制人单核巨噬细胞活化产生的炎症反应, 其抗炎作用机制可能是通过抑制 TLR2 和 TLR4 信号通路而发挥效用。

**关键词:** 连翘苷; 金黄色葡萄球菌; 单核巨噬细胞; 炎症反应; 感染性疾病

**中图分类号:** R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2016)06-0466-03

## Inhibitory effect of forsythsin on the inflammatory responses of monocyte-macrophage induced by *Staphylococcus aureus*

WANG Jia-he, WAN Xiao-xu, LIU Dan

(Department of Geriatrics, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China)

**Abstract:** **Objective** To study the inhibitory effect of forsythsin on the expression of Toll like receptor 2 (TLR2) and TLR4 induced by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and the protective effect on the body with infectious diseases. **Methods** Monocyte-macrophage were stimulated with *S. aureus* to construct the models of inflammation of infection diseases *in vitro*. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the expression of TLR2 and TLR4. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of interleukin-6 (IL-6), IL-8, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and macrophage colony-stimulating factor-1 (MCSF-1). **Results** RT-PCR results showed that *S. aureus* could increase the expression of TLR2 and TLR4; however the expression of TLR2 and TLR4 decreased when treated with forsythsin ( $P < 0.05$ ). The concentration of  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  of forsythsin could inhibit the expression of TLR2 and TLR4 and had no significant difference compared with OxPAPC and MST510 ( $P > 0.05$ ). ELISA results showed that the expression of IL-8 and TNF- $\alpha$  decreased at the concentration of  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  of forsythsin ( $P < 0.05$ ); and with the increasing of the concentration of forsythsin, the expression of IL-8 and TNF- $\alpha$  decreased ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of IL-6 and MCSF-1 decreased at the concentration of  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  of forsythsin ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); which also had a dose dependence with the forsythsin; with the increasing of the concentration of forsythsin, the expression of IL-6 and MCSF-1 decreased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusion** Forsythsin can inhibit the inflammatory reaction of monocyte-macrophage induced by *S. aureus* and the anti-inflammatory effect is associated with TLR2 and TLR4 signaling pathway.

**Key words:** forsythsin; *Staphylococcus aureus*; monocyte-macrophage; inflammatory response; infectious diseases

DOI: 10.7683/xyxyxb.2016.06.005

收稿日期: 2015-12-21

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(编号: 81101224); 中国医科大学附属盛京医院自由研究者资助项目(编号: 201206)。

作者简介: 王佳贺(1973-), 女, 辽宁沈阳人, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 细菌感染机制。

金黄色葡萄球菌广泛分布于自然界,是引起医院和社区获得性感染最常见的革兰阳性致病菌。单核-巨噬细胞系统在机体受到感染时发挥重要的作用,在先天性免疫中的活性较高,静止状态下均是有效的吞噬细胞,不仅可以作为感应细胞而引发炎症,还参与后期的清除过程<sup>[1-2]</sup>。作者前期工作发现<sup>[3]</sup>,金黄色葡萄球菌能够通过调节人单核巨噬细胞中 Toll 样受体 2 (Toll like receptor 2, TLR2) 和 TLR4 的表达影响单核巨噬细胞的功能。连翘是我国临床常用的传统中药之一,其主要活性成分为连翘苷,是连翘质量控制的检测成分<sup>[4]</sup>。研究表明,连翘苷具有抗氧化、拮抗细菌内毒素、降血脂等作用<sup>[5-6]</sup>,但目前仍缺乏对其有关的抗炎作用及相关机制的深入研究。本研究采用金黄色葡萄球菌刺激诱导人单核巨噬细胞,使其活化,建立体外模拟炎症模型,考察连翘苷对该炎症的抑制作用并初步对其进行机制研究,为连翘苷应用于感染性疾病的治疗提供科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人急性单核白血病细胞系 (Human acute monocytic leukemia cell line, THP-1) 细胞购于美国模式培养物研究所,连翘苷(北京中科仪友化工技术研究院,纯度 98%)。RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 培养基和胎牛血清购于美国 Gibco 公司;佛波酯购于美国 Sigma 公司;白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-8、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ) 和巨噬细胞集落刺激因子-1 (macrophage colony-stimulating factor-1, MCSF-1) 酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购于美国 R&D 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细菌培养** 野生型金黄色葡萄球菌 Wood46 在 37 °C 培养基中过夜培养。次日  $4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 收集细菌,用等量磷酸盐缓冲液重悬制备细菌悬液。

**1.2.2 细胞培养** THP-1 细胞在 37 °C、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  和 100% 湿度条件下,于体积分数 10% 的 RPMI-1640 培养基中培养,每 2~3 d 更换 1 次培养液。终浓度  $1\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的佛波酯诱导分化  $2 \times 10^5$  细胞于 24 孔板诱导分化 24 h,使其分化为单核巨噬细胞。

**1.2.3 连翘苷对 TLR2 和 TLR4 表达的影响** 向诱导分化的人单核巨噬细胞中加入连翘苷 (50、100、200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预处理 2 h,弃上清液,加入  $2 \times 10^9\ \text{CFU} \cdot \text{L}^{-1}$  金黄色葡萄球菌刺激 12 h,弃掉培养液,收集细胞,提取 RNA,利用鼠白血病反转录酶体系 (美国普洛麦格公司) 按照说明书反应合成 cD-

NA,利用实时定量多聚酶链反应 (real time quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 TLR2 和 TLR4 的表达。具体如下:按照 TRIzol 试剂盒说明书步骤提取单核细胞总 RNA,将 RNA 反转录为 cDNA。RT-PCR 采用 SYBR-Green 相对定量法,以 GAPDH 作为归一化的 TLR4 持家基因。RT-PCR 在 ABI 7000 上进行,反应的总体积为 25  $\mu\text{L}$ ,含 5  $\mu\text{L}$   $5 \times$  缓冲液, cDNA 1  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$  ( $10\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) EXTaq 酶 0.25  $\mu\text{L}$  ( $5 \times 10^6\ \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ), dNTP 0.75  $\mu\text{L}$  ( $10\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $\text{Mg}^{2+}$  0.5  $\mu\text{L}$  ( $250\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 2 min;94 °C 15 s,64 °C 40 s,40 个循环。以 TLR2 与 TLR4 的抑制剂 OxPAPC 和 MST510 作为相应的阳性对照。

**1.2.4 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  和 MCSF-1 水平测定** 向诱导分化的人单核巨噬细胞中加入连翘苷 (50、100、200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预处理 2 h,弃掉上清液,加入  $2 \times 10^9\ \text{CFU} \cdot \text{L}^{-1}$  金黄色葡萄球菌刺激 12 h,收集细胞培养液 ( $5\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 10 min) 按试剂盒说明书方法检测 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  和 MCSF-1 水平。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用单因素方差分析进行多组间比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同浓度连翘苷对金黄色葡萄球菌刺激人单核巨噬细胞表达 TLR2 和 TLR4 的影响** 结果见表 1。RT-PCR 检测结果显示,金黄色葡萄球菌能够使单核巨噬细胞表达 TLR2 和 TLR4 升高,但是,经过连翘苷预处理后,TLR2 和 TLR4 的表达显著下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ),当连翘苷为 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,TLR2 与 TLR4 的抑制剂阳性对照 OxPAPC 和 MST510 组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 不同浓度连翘苷对金黄色葡萄球菌刺激人单核巨噬细胞表达 TLR2 和 TLR4 的影响

Tab. 1 Effect of different concentrations of forsythoside on the expressions of TLR2 and TLR4 of mononuclear macrophage induced by *Staphylococcus aureus* ( $\bar{x} \pm s$ )

不同刺激	TLR2/GAPDH	TLR4/GAPDH
OxPAPC	0.18 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	
MST510		0.38 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
金黄色葡萄球菌	0.85 $\pm$ 0.19	1.05 $\pm$ 0.19
50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 连翘苷 + 金黄色葡萄球菌	0.46 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	0.66 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>
100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 连翘苷 + 金黄色葡萄球菌	0.27 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>	0.47 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>
200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 连翘苷 + 金黄色葡萄球菌	0.09 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>

注:与金黄色葡萄球菌比较<sup>a</sup> $P < 0.001$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ,<sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

**2.2 不同浓度连翘苷对金黄色葡萄球菌刺激人单核巨噬细胞分泌炎症介质情况** 结果见表 2。

ELISA 检测结果显示,当连翘苷为  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,抑制金黄色葡萄球菌刺激人单核巨噬细胞分泌  $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-8 水平明显增强,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),且随着连翘苷浓度升高,抑制效果更为明显 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ),呈浓度依赖关系;当连翘苷为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,抑制金黄色葡萄球菌刺激人单核巨噬细胞分泌 IL-6、MCSF-1 水平明显增强,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),且随连翘苷浓度升高,抑制效果更为明显 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ),呈浓度依赖关系。

表2 不同浓度连翘苷对金黄色葡萄球菌刺激人单核巨噬细胞分泌炎症介质情况

Tab.2 Effect of different concentrations of forsythoside on the secretion of inflammatory medium of mononuclear macrophage induced by *Staphylococcus aureus* ( $\bar{x} \pm s$ )

不同刺激	炎症介质/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{Pro}$ )			
	TNF- $\alpha$	IL-8	IL-6	MCSF-1
金黄色葡萄球菌	25.45 $\pm$ 4.21	24.26 $\pm$ 3.69	21.21 $\pm$ 3.51	10.60 $\pm$ 1.75
$50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 连翘苷 + 金黄色葡萄球菌	21.66 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>	18.43 $\pm$ 0.90 <sup>a</sup>	18.05 $\pm$ 1.17	9.02 $\pm$ 0.58
$100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 连翘苷 + 金黄色葡萄球菌	19.75 $\pm$ 2.55 <sup>bd</sup>	17.22 $\pm$ 1.45 <sup>a</sup>	16.46 $\pm$ 2.12 <sup>a</sup>	7.48 $\pm$ 0.96 <sup>bd</sup>
$200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 连翘苷 + 金黄色葡萄球菌	16.75 $\pm$ 2.39 <sup>cd</sup>	14.80 $\pm$ 0.76 <sup>bc</sup>	13.96 $\pm$ 2.00 <sup>bc</sup>	5.58 $\pm$ 0.80 <sup>cd</sup>

注:与金黄色葡萄球菌比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ,<sup>c</sup> $P < 0.001$ ;与  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  连翘苷 + 金黄色葡萄球菌比较<sup>d</sup> $P < 0.05$ ,<sup>e</sup> $P < 0.01$ ;与  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  连翘苷 + 金黄色葡萄球菌比较<sup>f</sup> $P < 0.01$ ,<sup>g</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

连翘是常用的中药材之一,为中医常用的清热解毒药,为木犀科植物连翘的干燥果实,具有疏风散热、消肿散结等功效。现代研究表明,连翘的主要化学成分为连翘苷和连翘酯苷等木质素类、挥发油类等,具有抗菌、抗氧化等作用<sup>[7-8]</sup>。连翘苷是一种具有双骈呋喃环的木脂素糖苷类天然产物,是连翘的主要活性成分之一,具有抗病毒、抗菌、抗氧化、降血脂和调节非特异性免疫功能等药理作用,但是其作用机制目前尚未明确。研究发现,连翘苷对铜绿假单胞菌的黏附和生物被膜具有较强的抑制作用<sup>[9]</sup>。

TLRs 是一个模式识别受体家族,主要表达在上皮细胞、固有性免疫应答细胞及获得性免疫应答细胞内。TLRs 参与多种疾病的发生,是参与非特异性免疫(天然免疫)的一类重要蛋白质分子。当微生物入侵机体时,TLRs 可以对其进行识别,既可以通过识别抗原分子—病原相关分子模式,诱发抵抗病原体的免疫反应,也能够给机体造成由免疫反应引起的损伤<sup>[10]</sup>。其中,TLR4 是造成机体炎症反应的关键分子,与病原体及其成分结合后,跨膜信号会通过 TLRs 的胞内结构,激活核转录因子  $\kappa\text{B}$ 、转录激活因子,进而使多种炎症因子(IL-1、IL-8)释放<sup>[11-12]</sup>。作者前期研究结果显示,干扰 TLR2 和 TLR4 能够影响单核巨噬细胞对金黄色葡萄球菌的吞噬功能<sup>[3]</sup>。这说明 TLR2 和 TLR4 参与了单核巨噬细胞对病原

菌的体内清除,但是连翘苷对金黄色葡萄球菌感染所致宿主细胞的炎症是否有影响尚未探讨。本研究结果发现,金黄色葡萄球菌能够使宿主细胞的炎症介质  $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-8 和 MCSF-1 表达上调,而且连翘苷能显著抑制金黄色葡萄球菌诱导的人单核巨噬细胞炎症介质的分泌,并抑制 TLR2 和 TLR4 表达。因此推断连翘苷可能通过干扰 TLR2 和 TLR4 信号通路,从而抑制细胞炎症介质的分泌。在后续的研究中,将进一步探讨连翘苷通过 TLR2 和 TLR4 通路抑制金黄色葡萄球菌感染所涉及的下游信号分子,为连翘苷在临床上治疗由金黄色葡萄球菌引起的感染提供新的思路和实验依据。

### 参考文献:

- [1] ZHAN R, HAN Q, ZHANG C *et al.* Toll-Like receptor 2 (TLR2) and TLR9 play opposing roles in host innate immunity against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection [J]. *Infect Immun*, 2015, 83(4): 1641-1649.
- [2] GILLETTE D D, TRIDANDAPANI S, BUTCHAR J P. Monocyte/macrophage inflammatory response pathways to combat *Francisella* infection: possible therapeutic targets [J]. *Front Cell Infect Microbiol* 2014, 4: 18.
- [3] 王佳贺,周勇,仇小敏. Toll 样受体在金黄色葡萄球菌所致单核巨噬细胞功能障碍中的作用 [J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(11): 883-885.
- [4] 段飞,张双民,杨建雄,等. 连翘叶提取物抑菌作用的研究 [J]. 西北药学杂志, 2005, 20(2): 66-67.
- [5] 赵咏梅,李发荣,杨建雄,等. 连翘苷降血脂及抗氧化作用的实验研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(2): 157-159.
- [6] 段林建,张清,王农荣,等. 连翘苷对甲型流感病毒核蛋白基因表达的影响研究 [J]. 中国全科医学, 2012, 15(18): 2082-2084.
- [7] CHENG L, LI F, MA R *et al.* Forsythiaside inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation by activation of Nrf2 and inhibition of NF- $\kappa\text{B}$  [J]. *Int Immunopharmacol* 2015, 28(1): 494-499.
- [8] ZHAO L, YAN X, SHI J *et al.* Ethanol extract of *Forsythia suspensa* root induces apoptosis of esophageal carcinoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2): 871-880.
- [9] 王业梅,程惠娟. 连翘苷对铜绿假单胞菌黏附功能及生物被膜形成能力的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(4): 832-834.
- [10] LI X, JIANG S, TAPPING R I. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival [J]. *Cytokine* 2010, 49(1): 1-9.
- [11] ANAS A A, DE VOS A F, HOOGENDIJK A J *et al.* Endoplasmic reticulum chaperone gp96 in macrophages is essential for protective immunity during Gram-negative pneumonia [J]. *J Pathol*, 2016, 238(1): 74-84.
- [12] SANIN D E, PRENDERGAST C T, MOUNTFORD A P. IL-40 production in macrophages is regulated by a TLR-driven CREB-mediated mechanism that is linked to genes involved in cell metabolism [J]. *J Immunol* 2015, 195(3): 1218-1232.

(本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟月)