

• 基础实验研究论著 •

粉防己碱对 β -葡聚糖诱导的 RAW264.7 细胞增殖的作用*

郭兰芳¹, 成晓青¹, 倪慧艳¹, 许晓芬¹, 闻平²

(1. 江苏省镇江市第四人民医院检验科, 江苏镇江 212001;

2. 江苏省镇江市第一人民医院检验科, 江苏镇江 212001)

摘要:目的 观察粉防己碱对 β -葡聚糖诱导的小鼠巨噬细胞(RAW264.7 细胞)增殖的作用。方法 建立细胞模型。四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测不同浓度粉防己碱对 RAW264.7 细胞增殖的影响,酶联免疫吸附试验(ELISA)测定培养上清液中白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、前列腺素 E_2 (PGE₂)、IL-10 的水平。结果 MTT 法检测结果提示粉防己碱对 RAW264.7 细胞增殖表现为双相性作用;ELISA 结果提示适当浓度的粉防己碱可抑制 IL-6、TNF- α 、PGE₂ 的表达,同时促进 IL-10 的表达。结论 粉防己碱影响 β -葡聚糖诱导的 RAW264.7 细胞增殖的作用,可能与抑制 IL-6、TNF- α 、PGE₂ 的表达,同时促进 IL-10 的表达有关。

关键词:粉防己碱; 白细胞介素-6; 白细胞介素-10; 肿瘤坏死因子- α ; 前列腺素 E_2

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.19.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)19-2577-02

Effects of tetrandrine on β -glucan induced RAW264.7 cells proliferation*

Guo Lanfang¹, Cheng Xiaqing¹, Ni Huiyan¹, Xu Xiaofen¹, Wen Ping²

(1. Department of Clinical Laboratory, the Fourth People's Hospital of Zhenjiang City, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Zhenjiang City, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

Abstract:Objective To observe effects of tetrandrine on β -glucan induced RAW 264.7 cells proliferation. **Methods** RAW 264.7 cells model was established. Four methyl thiazol tetrazolium(MTT) was used to detect the effects of different concentrations of tetrandrine on the proliferation of RAW264.7 cells. The levels of interleukin(IL)-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), prostaglandin E_2 (PGE₂) and IL-10 in the culture supernatant were measured by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** MTT results showed that the growth curves of different concentrations of tetrandrine on RAW264.7 cells had biphasic affections. ELISA results suggested that tetrandrine could inhibit the IL-6, TNF- α , PGE₂ expressions and promote IL-10 expression. **Conclusion** Effects of tetrandrine on β -glucan induced RAW264.7 cells proliferation are relative to inhibition of IL-6, TNF- α , PGE₂ expressions and promotion of IL-10 expression.

Key words:tetrandrine; interleukin-6; interleukin-10; tumor necrosis factor- α ; prostaglandin E_2

β -葡聚糖广泛存在于各类真菌的细胞壁中,由于其在免疫反应中表现出的诸多特点,使 β -葡聚糖成为目前研究的热点^[1]。粉防己碱是一种双苄基异喹生物碱化合物,是从防己科植物——粉防己中提取的主要生物碱^[2]。粉防己碱能协同 β -葡聚糖激活单核-巨噬细胞系统的活性,提高宿主的免疫功能。本研究观察不同浓度的粉防己碱对 β -葡聚糖诱导的小鼠巨噬细胞(RAW264.7 细胞)增殖的作用,以及对白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、前列腺素 E_2 (PGE₂)、IL-10 的表达的影响,以探讨粉防己碱对 β -葡聚糖诱导的 RAW 264.7 细胞免疫调节的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 RAW264.7 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院。细胞培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司,粉防己碱购自浙江金华制药厂, β -葡聚糖为 Sigma 公司产品,IL-6、TNF- α 、IL-10、PGE₂ 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒由天津舒普公司提供。

1.2 方法

1.2.1 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测粉防己碱对细胞增殖的影响 RAW264.7 细胞加入含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素和链霉素的培养基,置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养,待细胞贴壁后,调整细胞浓度至 5×10^4 个/毫升,接种于 96 孔细胞培养板内,每孔加 100~200 μ L 培养液,置 37℃、5% CO₂

培养箱培养 2~3 h,细胞贴壁后,分别加入 0.01、0.10、1.00、10.00、100.00 μ mol/L 的粉防己碱,再分为加入(或不加入)100 μ g/mL β -葡聚糖处理;对照组仅加入 0.1% 的二甲基亚砜(DMSO)处理。每组 8 个复孔,连续培养 7 d 后采用 MTT 法检测,用酶标仪在 570 nm 波长处检测吸光度值,记录结果。以时间为横坐标,吸光度值为纵坐标,使用 Microsoft Excel 软件绘制细胞生长曲线。

1.2.2 ELISA 检测 IL-6、IL-10、PGE₂、TNF- α 的表达 将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞悬液调整浓度为 6×10^4 个/毫升,加入 96 孔板内,每孔 1 mL,分为 5 组,每组 6 个复孔,置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。各组按以下方法进行处理,(1)对照组:完全无血清培养基培养;(2)模型组:加入 100 μ g/mL β -葡聚糖培养;(3)粉防己碱培养组:终浓度为 100 μ g/mL 的 β -葡聚糖和 0.01、0.10、1.00 μ mol/L 粉防己碱(低、中、高剂量组)共同培养细胞。培养 24 h 后检测上清液中 IL-6、TNF- α 、PGE₂、IL-10 的水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 粉防己碱对 β -葡聚糖诱导的 RAW264.7 细胞增殖的影响 0.01、0.10、1.00 μ mol/L 粉防己碱单独培养 RAW264.7

* 基金项目:镇江市科技计划项目(SH2013062)。 作者简介:郭兰芳,女,主管技师,主要从事临床检验研究工作。

细胞,对其生长无影响;与 100 $\mu\text{g/mL}$ β -葡聚糖共同培养时,可促进 RAW264.7 细胞增殖,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。10.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ 粉防己碱单独或与 100 $\mu\text{g/mL}$ β -葡聚糖共同培养 RAW264.7 细胞时,均表现出明显的抑制作用,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 粉防己碱对 β -葡聚糖诱导的 RAW264.7 细胞 IL-6、

TNF- α 、PGE₂ 和 IL-10 表达的影响 对照组上清液中 IL-6、TNF- α 、PGE₂ 和 IL-10 表达水平较低;加入 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 β -葡聚糖培养后,IL-6、TNF- α 、PGE₂ 和 IL-10 的表达水平较对照组明显增加($P<0.05$);中、高剂量粉防己碱培养组 IL-6、TNF- α 、PGE₂ 水平明显下降($P<0.05$),而 IL-10 水平明显增加($P<0.05$)。见表 1。

表 1 粉防己碱对 β -葡聚糖诱导的 RAW264.7 细胞 IL-6、TNF- α 、PGE ₂ 和 IL-10 表达的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)				
组别	IL-6(ng/mL)	TNF- α (pg/mL)	PGE ₂ (pg/mL)	IL-10(pg/mL)
对照组	6.25 \pm 3.06	256.40 \pm 41.77	28.05 \pm 5.44	30.58 \pm 3.75
模型组	28.35 \pm 3.45 [#]	2 013.45 \pm 123.18 [#]	66.29 \pm 6.54 [#]	78.53 \pm 4.70 [#]
粉防己碱培养组				
低剂量组	21.17 \pm 3.83	1 816.68 \pm 197.23	59.37 \pm 5.24	86.53 \pm 4.53
中剂量组	18.19 \pm 3.73 [*]	1 451.75 \pm 269.51 [*]	43.66 \pm 3.22 [*]	98.54 \pm 4.82 [*]
高剂量组	9.16 \pm 1.63 [*]	473.45 \pm 110.29 [*]	39.48 \pm 2.56 [*]	118.15 \pm 6.08 [*]

[#]: $P<0.05$,与对照组比较;^{*}: $P<0.05$,与模型组比较。

3 讨 论

近年来,随着广谱抗菌药物、抗肿瘤药物、免疫抑制剂及放射治疗的广泛应用,酵母样真菌引起的全身性感染呈上升趋势。白色念珠菌是最常见的真菌病原体,在免疫受损的患者中可能导致危及生命的侵袭性感染^[3-4]。临床上治疗白色念珠菌可用的抗菌药物非常有限,并且耐药性已经成为了很大的威胁^[5-6]。因此阐明真菌相关疾病的发病机制,从而推动抗菌药物治疗的研究,无疑具有重要意义。 β -葡聚糖被甘露聚糖包裹,无法被宿主细胞的特异性受体识别。而在真菌发生形态转换或受外界特殊刺激后,细胞壁结构发生改变, β -葡聚糖暴露在细胞壁表面,易被宿主细胞受体识别,激发宿主细胞免疫反应^[7]。

有研究表明,中药对机体有免疫调节作用,粉防己碱是粉防己干燥根茎中提取的一种生物碱,临床发现其药理及生理作用广泛^[8-13]。本研究观察不同浓度的粉防己碱对 β -葡聚糖诱导的 RAW264.7 细胞增殖的作用,结果表明粉防己碱对细胞增殖呈双相性影响,0.01、0.10、1.00 $\mu\text{mol/L}$ 粉防己碱单独培养 RAW264.7 细胞,对其生长无影响;与 100 $\mu\text{g/mL}$ β -葡聚糖共同培养时,对 RAW264.7 细胞生长表现为促进作用,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。10.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ 粉防己碱单独或与 100 $\mu\text{g/mL}$ β -葡聚糖共同培养 RAW264.7 细胞时,均表现出明显的抑制作用,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

本研究还发现,对照组上清液中 IL-6、TNF- α 、PGE₂ 和 IL-10 表达水平较低;加入 100 $\mu\text{g/mL}$ β -葡聚糖培养后,IL-6、TNF- α 、PGE₂ 和 IL-10 的表达水平较对照组明显增加($P<0.05$);中、高剂量粉防己碱培养组 IL-6、TNF- α 、PGE₂ 水平明显下降($P<0.05$),而 IL-10 水平明显增加($P<0.05$)。提示粉防己碱可能在 β -葡聚糖的免疫调节中发挥重要的作用。

综上所述,本研究为进一步研究粉防己碱影响 β -葡聚糖诱导的 RAW264.7 细胞增殖的作用机制打下良好基础,也为粉防己碱进一步开发应用提供了理论依据。

参考文献

[1] Delatte SJ, Evans J, Hebra A, et al. Effectiveness of beta-glucan collagen for treatment of partial-thickness burns in children[J]. J

Pediatr Surg,2001,36(1):113-118.
[2] Chen L,Chen L,Lv Y,et al. Tetrandrine ameliorates cognitive impairment via inhibiting astrocyte-derived S100B activation in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. Neurol Res,2013,35(6):614-621.
[3] Azie N,Neofytos D,Pfaller M,et al. The PATH(prospective antifungal therapy) alliance registry and invasive fungal infections: update 2012[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2012,73(4):293-300.
[4] Ferreira AV,Prado CG,Carvalho RR,et al. Candida albicans and non-candida albicans candida species: comparison of biofilm production and metabolic activity in biofilms, and putative virulence properties of isolates from hospital environments and infections[J]. Mycopathologia,2013,175(3/4):265-272.
[5] Alexander BD, Perfect JR. Antifungal resistance trends towards the year 2000. Implications for therapy and new approaches[J]. Drugs,1997,54(5):657-678.
[6] Nett JE,Sanchez H,Cain MT,et al. Interface of candida albicans biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation[J]. Eukaryot Cell,2011,10(12):1660-1669.
[7] Gantner BN,Simmons RM,Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of candida albicans yeast but not filaments[J]. EMBO J,2005,24(7):1277-1286.
[8] 黄勋,徐秀华. 粉防己碱提高铜绿假单胞菌对氧氟沙星敏感性的体外试验研究[J]. 中华医院感染学杂志,2011(20):4191-4193.
[9] 罗福玲,赵恒光,李洪忠,等. 粉防己碱对脂多糖诱导下 RAW 264.7 细胞炎症模型细胞因子的作用[J]. 中草药,2011,42(3):542-545.
[10] 杨旭,刘凤玲. 粉防己碱在逆转肿瘤化疗多药耐药性中的作用[J]. 现代中西医结合杂志,2011,20(15):1942-1944.
[11] 崔智威,熊新,陈力学,等. 粉防己碱对硝酸甘油致三叉神经节卫星胶质细胞激活的影响[J]. 中国中药杂志,2011,36(15):2134-2139.
[12] 王金华,叶祖光,孙爱续,等. 粉防己碱逆转人乳腺癌 MCF-7 多药耐药细胞的抗凋亡作用[J]. 中国中药杂志,2002,27(1):46-50.
[13] 刘德伍,李国辉,曹勇,等. 粉防己碱对人皮肤成纤维细胞生长的抑制作用观察[J]. 中国中药杂志,1998,23(1):55-57.