

绿原酸抑制巨噬细胞激活的机制研究^Δ

郑薇^{1*}, 郎静², 黄西凤¹, 肖锐¹, 白荷¹, 贾济^{1#} (1. 中国人民解放军南部战区总医院麻醉科, 广州 510501; 2. 中国人民解放军西部战区总医院骨科, 成都 610083)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)21-2601-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.21.06



摘要 目的 观察绿原酸对脂多糖(LPS)致巨噬细胞激活的影响,并探讨骨髓细胞2表达的触发受体(TREM2)蛋白在其中的作用。方法 为筛选LPS造模浓度,分别以1、10、100 ng/mL的LPS培养细胞24 h,检测细胞培养上清液中白细胞介素6(IL-6)水平和细胞中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)蛋白表达水平。为筛选绿原酸给药浓度,将细胞分为Control组、LPS处理组和3个不同浓度绿原酸(0.01、0.1、1 μmol/L)干预组,检测细胞培养上清液中肿瘤坏死因子α(TNF-α)、IL-1β水平和细胞中iNOS、TREM2蛋白表达水平以及细胞活力。为观察TREM2在绿原酸抑制巨噬细胞激活中的作用,采用TREM2小干扰RNA(TREM2-siRNA)干扰细胞TREM2蛋白表达,将细胞分为Control组、LPS处理组、绿原酸+LPS组、TREM2-siRNA+绿原酸+LPS组和乱序-siRNA(SC-siRNA)+绿原酸+LPS组,在含有上述药物的培养基/空白培养基中孵育24 h后,检测细胞培养上清液中TNF-α和IL-1β水平以及细胞中TREM2、iNOS和核因子κB p65(NF-κB p65)的蛋白表达水平。结果 10 ng/mL LPS可显著促进细胞释放IL-6,并增加细胞中iNOS蛋白表达水平,故选择该质量浓度LPS进行后续实验。与LPS处理组相比,0.1 μmol/L绿原酸干预组细胞培养上清液中TNF-α、IL-1β水平和细胞中iNOS蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),细胞中TREM2蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),细胞活力未受影响,故选择该浓度的绿原酸进行后续实验。在观察TREM2蛋白在绿原酸抑制巨噬细胞激活中的作用中发现,与Control组比较,LPS处理组细胞中iNOS和NF-κB p65蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$);与LPS处理组比较,绿原酸+LPS组细胞中iNOS和NF-κB p65蛋白表达水平均显著降低、TREM2蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与绿原酸+LPS组比较,TREM2-siRNA+绿原酸+LPS组细胞中iNOS和NF-κB p65蛋白表达水平均显著升高、TREM2蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),TREM2-siRNA明显逆转了绿原酸的上述作用;而SC-siRNA未对绿原酸产生的上述作用造成影响。结论 绿原酸可显著抑制LPS对巨噬细胞的激活,其抗炎作用可能是通过TREM2蛋白介导的。

关键词 绿原酸;巨噬细胞;脂多糖;炎症;骨髓细胞2表达的触发受体

Mechanism study of chlorogenic acid alleviating macrophage activation

ZHENG Wei¹, LANG Jing², HUANG Xifeng¹, XIAO Rui¹, BAI He¹, JIA Ji¹ (1. Dept. of Anesthesiology, General Hospital of Southern Theatre Command, Guangzhou 510501, China; 2. Dept. of Orthopedics, General Hospital of Western Theatre Command, Chengdu 610083, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To observe the effects of chlorogenic acid on the activation of macrophage induced by lipopolysaccharide (LPS), and to explore the role of triggering receptors expressed on myeloid cells-2 (TREM2) in the action. **METHODS** To find a suitable LPS concentration, the cells were cultured with 1, 10 and 100 ng/mL LPS for 24 h. The level of interleukin 6 (IL-6) in the cell culture supernatant and protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the cells were detected. To search for a suitable chlorogenic acid concentration, the cells were divided into control group, LPS group and three chlorogenic acid (0.01, 0.1 and 1 μmol/L)+LPS groups. The levels of tumor necrosis factor α (TNF-α) and IL-1β in the cell culture supernatant, the protein expressions of iNOS and TREM2 in the cells and cell viability were detected. To observe the effects of TREM2 in chlorogenic acid alleviating macrophage activation, TREM2-small interfering RNA (TREM2-siRNA) was taken to intervene in TREM2 protein expression. The cells were divided into control group, LPS group, chlorogenic acid+LPS group, TREM2-siRNA+chlorogenic acid+LPS group and SC-siRNA+chlorogenic acid+LPS group. After 24 h incubation, the levels of TNF-α and IL-1β in the cell culture supernatant and protein expressions of TREM2, iNOS and nuclear factor κB p65 (NF-κB p65) in the cells were detected. **RESULTS** 10 ng/mL LPS promoted IL-6 release and increased iNOS protein expression, and 10 ng/mL LPS was taken in the next experiments. Compared with the LPS group, 0.1 μmol/L chlorogenic acid decreased TNF-α and IL-1β levels, and down-regulated iNOS expression,

^Δ基金项目 广东省自然科学基金项目(No.2017A030313810)

* 第一作者 主治医师。研究方向:天然抗炎药物。E-mail: 277646064@qq.com

通信作者 副主任医师,博士。研究方向:抗炎药物。E-mail: jjaji1981@126.com

meanwhile increased TREM2 expression without effect on cell viability, and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ chlorogenic acid was taken in the next experiments. Compared with the control group, the protein expressions of iNOS and NF- κB p65 in the LPS group were significantly increased ($P<0.05$); compared with the LPS group, the protein expressions of iNOS and NF- κB p65 in the chlorogenic acid+LPS group were significantly decreased, the protein expressions of TREM2 was significantly increased ($P<0.05$); compared with the chlorogenic acid+LPS group, the protein expressions of iNOS and NF- κB p65 of TREM2-siRNA+chlorogenic acid+LPS group were significantly increased, the protein expressions of TREM2 was significantly decreased ($P<0.05$). TREM2-siRNA could significantly reverse the above effects of chlorogenic acid, while SC-siRNA did not significantly affect the above anti-inflammatory effects of chlorogenic acid. **CONCLUSIONS** Chlorogenic acid can inhibit the LPS-induced macrophage activation, and its anti-inflammatory may be mediated by TREM2 protein.

KEYWORDS chlorogenic acid; macrophage; lipopolysaccharide; inflammation; triggering receptors expressed on myeloid cells-2

巨噬细胞过度激活与多种炎症相关疾病的发生发展密切相关,包括川崎病、自身免疫性肝病、肾病和心肌疾病等^[1-3]。巨噬细胞过度激活后,可释放多种促炎性细胞因子,包括肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素 1β (interleukin 1β , IL- 1β)和 IL-6 等。上述促炎性细胞因子可通过血液循环损伤体内多个脏器,继而造成脏器功能受损,甚至危及生命^[4]。因此,可通过抑制巨噬细胞的过度激活,降低炎症反应水平,进而控制相关疾病的发生发展^[5]。

绿原酸是富含于中药金银花中的一种苯丙素类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗过敏和利胆等药理作用^[6]。目前,关于绿原酸的相关研究多聚焦在抑制炎症反应方面。有研究报道,绿原酸的抗炎机制包括抑制巨噬细胞/小胶质细胞激活和调节 p38 分裂原激活的蛋白激酶/Toll 样受体等细胞信号通路^[7],但其详细抑炎机制尚不明确。骨髓细胞 2 表达的触发受体(triggering receptors expressed on myeloid cells-2, TREM2)是表达于巨噬细胞上的一种蛋白,可调控巨噬细胞激活程度,抑制炎症反应^[8]。本研究使用经典致炎物质脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激小鼠 RAW264.7 巨噬细胞,模拟巨噬细胞激活^[9],观察绿原酸对 LPS 所致巨噬细胞激活的影响和 TREM2 在其中的作用,为阐明绿原酸的抗炎机制提供实验室证据。

1 材料

1.1 主要仪器

Series 2 型细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Infinite 200 型酶标仪购自瑞士 Tecan 公司; Criterion 型电泳仪和 GelDoc Go 型凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司; FV10i 型共聚焦显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 主要药品与试剂

绿原酸原料药(批号 327-97-9,纯度 $>95\%$)、DMEM 细胞培养基(批号 D5796)、胎牛血清(批号 9014-87-7)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(批号 67-68-5)和 MTT(批号 298-93-1)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;

TNF- α 、IL- 1β 和 IL-6 促炎性细胞因子检测试剂盒(批号分别为 20220314、20220517、20220418)均购自中国南京建成生物工程研究所;兔抗小鼠诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)(批号 ab178945)、核因子 κB p65 (nuclear factor κB p65, NF- κB p65)(批号 ab32536)一抗和山羊抗兔 IgG 预吸附二抗(批号 ab7090)均购自英国 Abcam 公司; TREM2 小干扰 RNA (TREM2-small interfering RNA, TREM2-siRNA)(批号 HU079401)、乱序-siRNA(SC-siRNA,批号 SIC001)和转染液(批号 L3287)均购自瑞士 Qiagen 公司; Cy3 标记的山羊抗兔荧光二抗(批号 A0516)和青链霉素混合溶液(批号 C0223)均购自中国碧云天生物技术有限公司。

1.3 细胞系

实验用小鼠 RAW264.7 巨噬细胞系获赠于中国科学院上海生命科学研究所。RAW264.7 巨噬细胞在 DMEM 细胞培养基中培养,培养基含 10% 胎牛血清、10 U/mL 的青霉素和 10 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素。培养箱内空气含 95% O_2 和 5% CO_2 , 温度为 37 $^\circ\text{C}$, 湿度为 100%。每 2~3 d 更换培养基 1 次,每周以 1:4 的比例传代 2 次。取对数生长期细胞进行后续实验。

2 方法

2.1 LPS 造模浓度的筛选

2.1.1 细胞分组及处理

为确定适宜的 LPS 刺激强度,将细胞分为 Control 组和不同质量浓度(1、10、100 ng/mL ,参考预实验结果设置)LPS 处理组。细胞在含有上述药物的培养基/空白培养基内孵育 24 h 后,进行以下各项检测。

2.1.2 细胞培养上清液中 IL-6 水平的检测

将细胞接种于 24 孔板中,密度为 5×10^5 个/孔,24 h 细胞贴壁后,按“2.1.1”项下方法分组(每组 8 个复孔)、给药、培养细胞,然后提取各孔细胞培养上清液 200 μL 置于离心管内,于 4 $^\circ\text{C}$ 下 5 000 r/min 离心 30 min。离心结束后,吸弃上清液 150 μL ,根据 IL-6 试剂盒说明书检测 IL-6 水平。

2.1.3 细胞中iNOS蛋白表达水平的检测

采用Western blot法检测细胞中iNOS蛋白的表达水平。将细胞接种于6孔板中,密度为 1×10^6 个/孔,24 h细胞贴壁后,按“2.1.1”项下方法分组(每组4个复孔)、给药、培养细胞。培养结束后,吸弃上层培养基,采用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)清洗3次(5 min/次),然后每孔加入细胞裂解液500 μ L,在4 $^{\circ}$ C下裂解5 min,采用细胞刮将细胞收集至清洁的离心管内,在4 $^{\circ}$ C下以12 000 r/min离心30 min后,收集上清液,采用Bradford法进行蛋白定量。取蛋白进行高温变性后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(电压120 V,电泳时间2 h),并转移至聚偏二氟乙烯膜上(转膜电流200 mA,转膜时间2 h),加入5%脱脂奶粉封闭非特异性抗原,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;加入稀释的iNOS、GAPDH一抗(稀释比例分别为1:500、1:1 000),在37 $^{\circ}$ C下孵育4 h;洗膜后加入山羊抗兔IgG预吸附二抗(稀释比例为1:1 000),室温孵育60 min;使用化学发光法显色后,采用凝胶成像系统成像,使用Image Lab软件分析各条带的灰度值,以iNOS蛋白与GAPDH蛋白的灰度值比值表示iNOS蛋白的表达水平。

2.2 绿原酸给药浓度的筛选

2.2.1 细胞分组及处理

参考相关文献中的绿原酸浓度^[10],将细胞分为Control组、LPS处理组(10 ng/mL,按“2.1”项下结果设置,下同)和不同浓度绿原酸干预组(培养基分别含0.01、0.1、1 μ mol/L绿原酸和10 ng/mL LPS),每组8个复孔。将细胞在含有上述药物的培养基/空白培养基中常规孵育24 h后,进行以下各项检测。

2.2.2 细胞培养上清液中TNF- α 、IL-1 β 水平的检测

按“2.1.2”项下方法接种细胞,常规培养,待细胞贴壁后,按“2.2.1”项下方法进行细胞分组、给药与培养,然后根据TNF- α 和IL-1 β 试剂盒说明书检测细胞培养上清液中TNF- α 、IL-1 β 水平。

2.2.3 细胞中iNOS、TREM2蛋白表达水平的检测

采用Western blot法检测细胞中iNOS、TREM2蛋白的表达水平。按“2.1.3”项下方法接种细胞,常规培养,待细胞贴壁后,按“2.2.1”项下方法进行细胞分组(每组4个复孔)、给药、培养,按“2.1.3”项下方法进行指标检测。本实验中iNOS、GAPDH、TREM2、 β -actin一抗的稀释比例分别为1:500、1:1 000、1:200、1:1 000。以iNOS蛋白与GAPDH蛋白的灰度值比值表示iNOS蛋白的表达水平,以TREM2蛋白与 β -actin蛋白的灰度值比值表示TREM2蛋白的表达水平。

2.2.4 细胞活力的检测

采用MTT法检测细胞活力。将细胞接种于96孔板中,密度为 1×10^5 个/孔,待细胞贴壁后,按“2.2.1”项下方

法进行细胞分组(每组8个复孔)、给药和培养。培养结束后,每孔加入MTT溶液(5 mg/mL)20 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育4 h后;吸弃上层培养基,每孔加入150 μ L的DMSO,振荡15 min,待甲瓖完全溶解后,取空白孔加150 μ L蒸馏水作为空白组,在490 nm波长处使用酶标仪检测各孔吸光度,计算细胞活力。细胞活力(%)=(实验组吸光度-空白组吸光度)/(Control组吸光度-空白组吸光度) \times 100%。

2.3 TREM2在绿原酸抑制巨噬细胞激活中的作用考察

2.3.1 转染TREM2-siRNA对巨噬细胞中TREM2蛋白表达水平的影响

将细胞接种于6孔板中,密度为 1×10^6 个/孔。接种24 h后,吸弃上层培养基,每孔加入含90 pmol的TREM2-siRNA转染液1 mL,37 $^{\circ}$ C孵育6 h后,吸弃上层转染液;PBS常温清洗3次,每孔加入细胞裂解液200 μ L,裂解30 min后,收集细胞;按“2.2.3”项下方法检测细胞中TREM2蛋白的表达水平。实验重复4次。

2.3.2 细胞分组及处理

为观察TREM2在绿原酸抑制巨噬细胞激活中的作用,将细胞分为Control组、LPS处理组(10 ng/mL LPS)、绿原酸+LPS组[培养基含1 μ mol/L绿原酸(按“2.2”项下结果设置)和10 ng/mL LPS]、TREM2-siRNA+绿原酸+LPS组(细胞经TREM2-siRNA处理后,再经1 μ mol/L绿原酸和10 ng/mL LPS处理)和SC-siRNA+绿原酸+LPS组(细胞经SC-siRNA处理后,再经1 μ mol/L绿原酸和10 ng/mL LPS处理),每组8个复孔。在含有上述药物的培养基/空白培养基中孵育24 h后,进行以下各项检测。

2.3.3 干扰TREM2表达后细胞培养上清液中TNF- α 、IL-1 β 水平的检测

按“2.1.2”项下方法接种细胞,常规培养,待细胞贴壁后,按“2.3.2”项下方法进行细胞分组、给药,根据TNF- α 、IL-1 β 试剂盒说明书检测细胞培养上清液中TNF- α 、IL-1 β 水平。

2.3.4 干扰TREM2表达后细胞中iNOS蛋白染色情况的检测

将细胞接种于共聚焦显微镜专用培养皿中,密度为 1×10^5 个/孔。接种24 h后,按“2.3.2”项下方法分组处理,吸去上层培养基,每孔加入4%多聚甲醛溶液1 mL固定,30 min后,PBS清洗3次,5 min/次;随后,每孔加入1%牛血清白蛋白1 mL包被非特异性抗原,30 min后,PBS清洗1次;每孔加入iNOS一抗(稀释比例为1:100),在4 $^{\circ}$ C下孵育12 h后,PBS清洗3次,5 min/次;每孔加入Cy3标记的山羊抗兔荧光二抗(稀释比例为1:100)200 μ L,常温避光孵育90 min;随后,每孔加入100 μ L的DAPI染液标记细胞核(蓝色),常温避光孵育5

min后,PBS避光清洗3次,5 min/次;采用共聚焦显微镜在532 nm波长处进行观测,并随机选取视野拍照。

2.3.5 干扰TREM2表达后细胞中TREM2、iNOS和NF-κB p65蛋白表达水平的检测

按“2.1.3”项下方法接种细胞,常规培养,待细胞贴壁后,按“2.3.2”项下方法分组、处理,每组4个复孔。培养结束后,按“2.1.3”项下方法操作检测TREM2、iNOS和NF-κB p65蛋白表达水平,iNOS、GAPDH、TREM2、β-actin、NF-κB p65一抗的稀释比例分别为1:500、1:1 000、1:200、1:1 000、1:200。以iNOS蛋白与GAPDH蛋白的灰度值比值表示iNOS蛋白的表达水平,以TREM2、NF-κB p65蛋白与β-actin蛋白的灰度值比值分别表示TREM2、NF-κB p65蛋白的表达水平。

2.4 统计学方法

实验数据采用SPSS 20.0软件进行分析处理。所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析和Tukey多重比较检验进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 LPS造模浓度的筛选结果

与Control组[(7.25±2.22) pg/mL]比较,10、100 ng/mL LPS处理组细胞培养上清液中IL-6水平[(121.80±8.85)、(126.30±8.65) pg/mL]均显著升高($P<0.05$)。与Control组(0.12±0.02)比较,10、100 ng/mL LPS处理组细胞中iNOS蛋白表达水平(0.84±0.06、0.86±0.04)均显著升高($P<0.05$),且10、100 ng/mL LPS处理组间细胞中iNOS蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。因此,本研究选择质量浓度为10 ng/mL的LPS进行后续实验。iNOS蛋白表达的电泳图见图1。

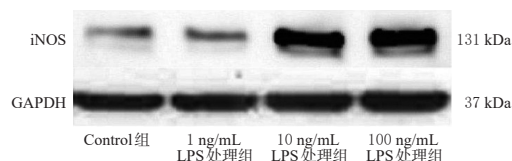
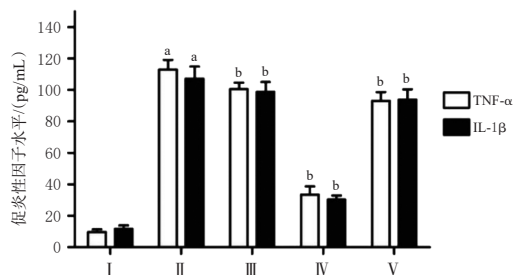


图1 不同质量浓度LPS作用下巨噬细胞中iNOS蛋白表达的电泳图

3.2 绿原酸给药浓度的筛选结果

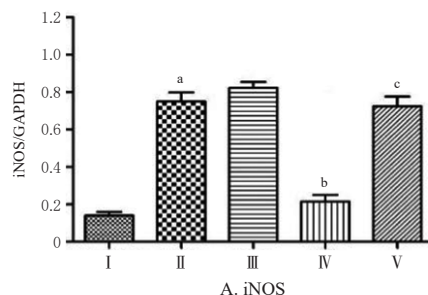
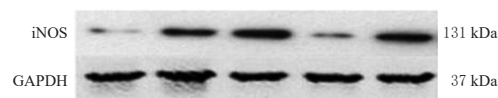
结果(图2)显示,与Control组比较,LPS处理组培养基中TNF-α、IL-1β水平显著升高($P<0.05$);与LPS处理组比较,0.01、0.1、1 μmol/L绿原酸干预组细胞培养上清液中TNF-α、IL-1β水平均显著降低($P<0.05$)。与Control组比较,LPS处理组细胞中iNOS蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与LPS处理组比较,0.1 μmol/L绿原酸干预组细胞中iNOS蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);与0.1 μmol/L绿原酸干预组比较,1 μmol/L绿原酸干预组细胞中iNOS表达水平显著升高($P<0.05$),结果见图3A。与LPS处理组比较,0.1 μmol/L绿原酸干预组细胞中TREM2蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),结果见图3B。此外,上述各处理组间细胞活力比较差异无统计学

意义($P>0.05$),结果见图4。以上结果表明,0.1 μmol/L绿原酸可显著抑制LPS对巨噬细胞的激活,并提高TREM2蛋白表达水平,且未对细胞增殖产生显著影响,故本研究选择浓度为0.1 μmol/L的绿原酸进行后续实验。

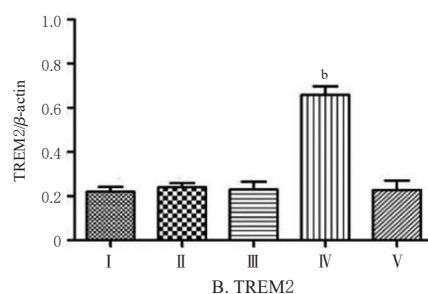
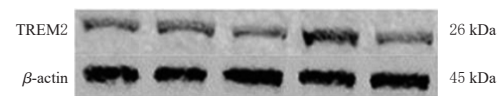


I: Control组; II: LPS处理组; III: 0.01 μmol/L绿原酸干预组; IV: 0.1 μmol/L绿原酸干预组; V: 1 μmol/L绿原酸干预组; a: 与Control组比较, $P<0.05$; b: 与LPS处理组比较, $P<0.05$ 。

图2 不同浓度绿原酸对巨噬细胞中TNF-α、IL-1β水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)



A. iNOS



B. TREM2

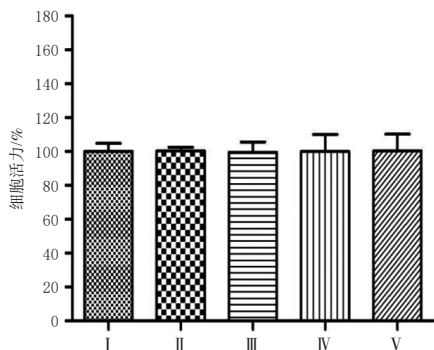
I: Control组; II: LPS处理组; III: 0.01 μmol/L绿原酸干预组; IV: 0.1 μmol/L绿原酸干预组; V: 1 μmol/L绿原酸干预组; a: 与Control组比较, $P<0.05$; b: 与LPS处理组比较, $P<0.05$; c: 与0.1 μmol/L的绿原酸干预组比较, $P<0.05$ 。

图3 不同浓度绿原酸对巨噬细胞中iNOS、TREM2蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

3.3 TREM2在绿原酸抑制巨噬细胞激活中的作用

3.3.1 转染TREM2-siRNA对巨噬细胞中TREM2蛋白表达水平的影响

结果(图5)显示,TREM2-siRNA可显著降低细胞TREM2蛋白表达水平($P<0.05$),表明TREM2-siRNA的干扰有效,可用于后续实验。



I: Control组; II: LPS处理组; III: 0.01 μmol/L绿原酸干预组; IV: 0.1 μmol/L绿原酸干预组; V: 1 μmol/L绿原酸干预组。

图4 不同浓度绿原酸对巨噬细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

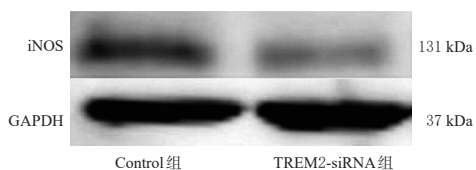
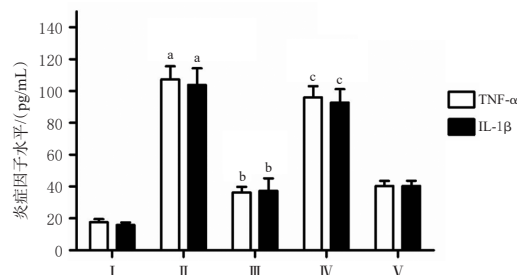


图5 转染 TREM2-siRNA 干扰细胞 TREM2 蛋白表达效果验证的电泳图

3.3.2 干扰 TREM2 表达后对 TNF-α、IL-1β 水平的影响

与 Control 组比较, LPS 处理组培养基中 TNF-α、IL-1β 水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与 LPS 处理组比较, 绿原酸+LPS 组培养基中 TNF-α、IL-1β 水平均显著降低 ($P < 0.05$); 与绿原酸+LPS 组比较, TREM2-siRNA+绿原

酸+LPS 组细胞培养上清液中 TNF-α、IL-1β 水平均显著升高 ($P < 0.05$), 而 SC-siRNA 未对绿原酸抑制 TNF-α 和 IL-1β 释放的作用产生显著影响 ($P > 0.05$)。结果见图 6。



I: Control组; II: LPS处理组; III: 绿原酸+LPS组; IV: TREM2-siRNA+绿原酸+LPS组; V: SC-siRNA+绿原酸+LPS组; a: 与Control组比较, $P < 0.05$; b: 与LPS处理组比较, $P < 0.05$; c: 与绿原酸+LPS组比较, $P < 0.05$ 。

图6 干扰 TREM2 表达对 TNF-α、IL-1β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

3.3.3 干扰 TREM2 表达对 iNOS 蛋白染色情况的影响

结果(图7)显示, LPS 可明显增加巨噬细胞中 iNOS 蛋白表达水平(红色), 绿原酸可明显降低 iNOS 蛋白表达水平, TREM2-siRNA 显著逆转了绿原酸对 iNOS 蛋白表达水平的抑制作用, 而 SC-siRNA 未对 iNOS 的蛋白表达水平产生明显影响。

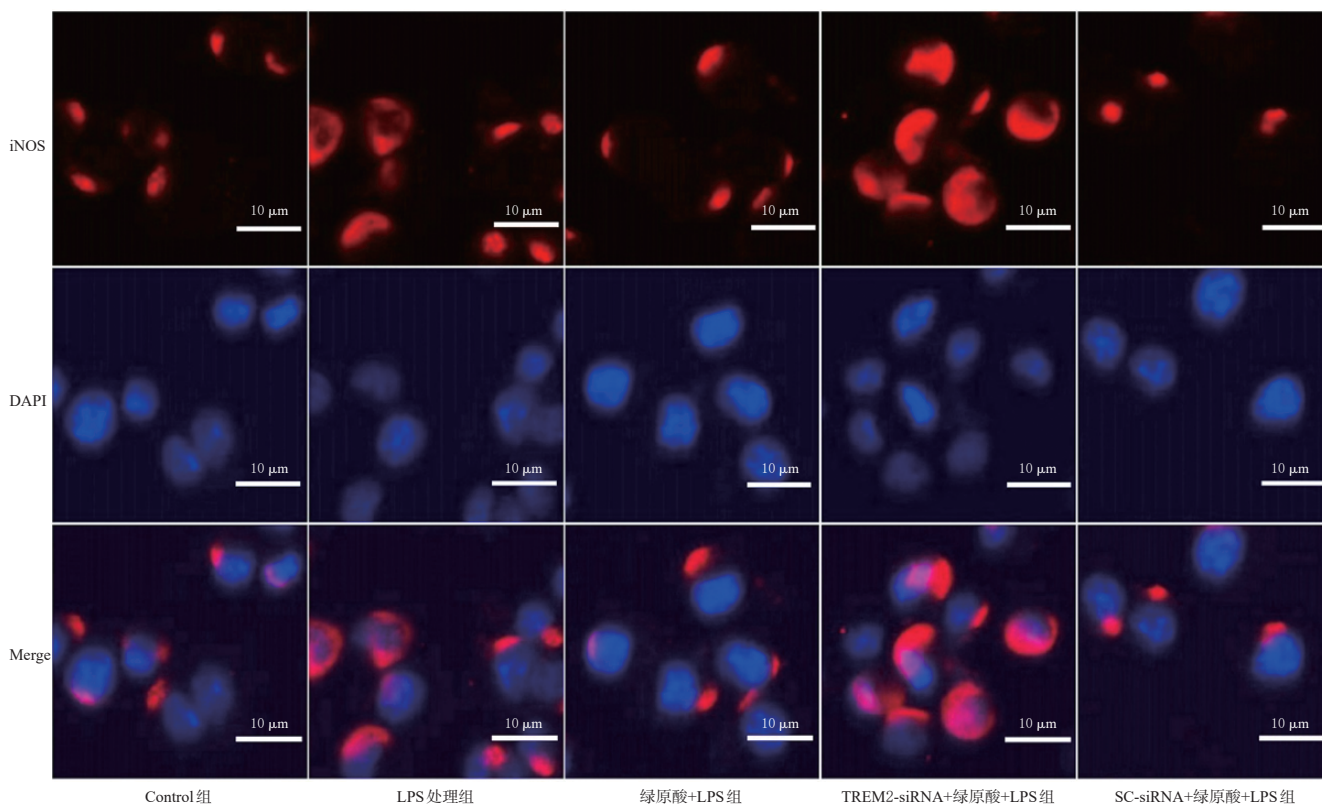
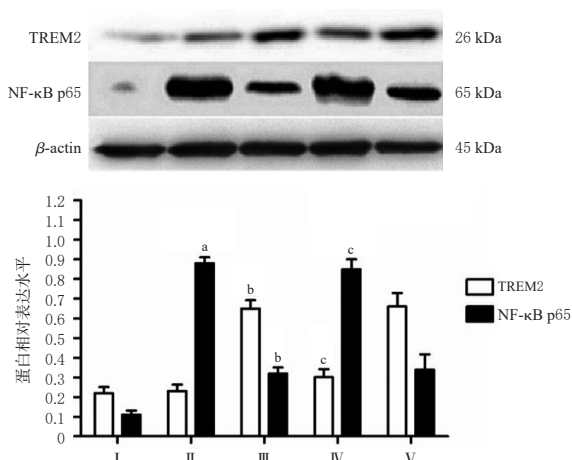


图7 干扰 TREM2 表达对 iNOS 蛋白表达影响的免疫荧光染色图

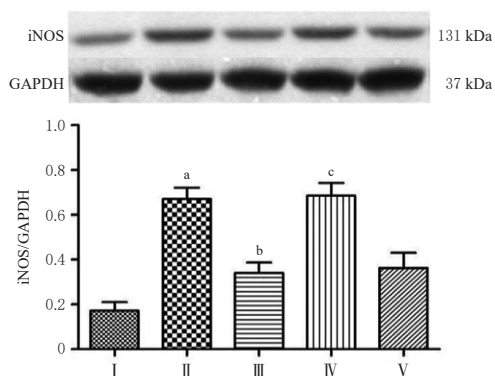
3.3.4 干扰 TREM2 表达对 TREM2、NF- κ B p65 和 iNOS 蛋白表达水平的影响

与 Control 组比较, LPS 处理组细胞中 iNOS 和 NF- κ B p65 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与 LPS 处理组比较, 绿原酸+LPS 组细胞中 iNOS 和 NF- κ B p65 蛋白表达水平均显著降低、TREM2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与绿原酸+LPS 组比较, TREM2-siRNA+绿原酸+LPS 组细胞中 iNOS 和 NF- κ B p65 蛋白表达水平均显著升高、TREM2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), TREM2-siRNA 明显逆转了绿原酸的上述作用; 而 SC-siRNA 未对绿原酸产生的上述作用造成影响。以上结果表明, 绿原酸可通过巨噬细胞 TREM2 介导, 降低 LPS 引起的巨噬细胞激活。结果见图 8、图 9。



I: Control 组; II: LPS 处理组; III: 绿原酸+LPS 组; IV: TREM2-siRNA+绿原酸+LPS 组; V: SC-siRNA+绿原酸+LPS 组; a: 与 Control 组比较, $P < 0.05$; b: 与 LPS 处理组比较, $P < 0.05$; c: 与绿原酸+LPS 组比较, $P < 0.05$ 。

图 8 干扰 TRME2 表达对 TREM2 和 NF- κ B p65 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)



I: Control 组; II: LPS 处理组; III: 绿原酸+LPS 组; IV: TREM2-siRNA+绿原酸+LPS 组; V: SC-siRNA+绿原酸+LPS 组; a: 与 Control 组比较, $P < 0.05$; b: 与 LPS 处理组比较, $P < 0.05$; c: 与绿原酸+LPS 组比较, $P < 0.05$ 。

图 9 干扰 TRME2 表达对 iNOS 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

4 讨论

现代医学研究发现, 绿原酸具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化和心血管保护等作用^[10], 但目前其作用机制尚不十分明确, 这也大大限制了绿原酸的临床应用。巨噬细胞是一种分布于人体血液循环和肺内的免疫细胞, 在炎症反应过程中, 巨噬细胞受到刺激后, 可分泌大量促炎性细胞因子, 如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等, 高浓度的促炎性细胞因子可增强人体内的炎症反应程度, 对心、脑、肾、肝等多个脏器造成损伤。若巨噬细胞的引起的炎症反应得不到有效控制, 可引起全身炎症反应综合征, 甚至导致死亡^[11]。因此, 控制或抑制巨噬细胞的过度激活, 被认为是治疗炎症相关疾病的关键环节。目前研究发现, 巨噬细胞激活后可处于 2 种状态: 经典激活状态 (M1 状态) 和选择性激活状态 (M2 状态)。M1 状态的巨噬细胞目前认为是有害的, 而 M2 状态的巨噬细胞被认为是有益的。因此, 将巨噬细胞调控至 M2 状态是治疗这类炎症反应相关疾病的关键环节^[12-13]。本课题组使用 LPS 刺激巨噬细胞, 引起细胞激活, 观察使用绿原酸后对 LPS 引起巨噬细胞激活水平的影响。结果发现, 绿原酸可显著减弱 LPS 对巨噬细胞的激活作用, 降低巨噬细胞的炎症反应程度。促炎性细胞因子 (如 TNF- α 和 IL-6) 分泌增加和 iNOS 蛋白表达上调, 表明巨噬细胞处于 M1 激活状态; 而绿原酸降低了巨噬细胞促炎性细胞因子分泌和 iNOS 蛋白表达水平, 说明该药物减少了处于 M1 激活状态的巨噬细胞数量, 具有明显的抗炎能力^[14]。由于 NF- κ B 调控了很多炎症反应相关的基因, 且巨噬细胞促炎性细胞因子分泌水平的高低, 受 NF- κ B 蛋白表达水平调控^[14], 因此, 本研究检测了巨噬细胞中 NF- κ B p65 的蛋白表达水平。结果发现, LPS 刺激可明显升高巨噬细胞中 NF- κ B p65 蛋白表达水平, 而绿原酸可明显抑制 LPS 引起的 NF- κ B p65 蛋白表达上调。以上结果表明, 绿原酸可抑制 LPS 引起的巨噬细胞炎症反应。

髓样细胞触发受体 (TREM) 是在 2000 年被发现的一类免疫球蛋白超家族, 目前已知 TREM 家族有 3 个成员, 分别为 TREM1、TREM2 和 TREM3^[15]。其中, TREM1 和 TREM2 是目前研究较多的 2 个 TREM 家族成员, 其结构较为相似, 但其功能大有不同——TREM1 对炎症反应起着促进和放大的作用, 而 TREM2 对炎症反应起着抑制的作用。研究表明, TREM2 表达上调可抑制免疫细胞分泌炎症因子, 减轻炎症损伤^[16]。研究表明, TREM2 基因敲除肺炎模型小鼠与野生型小鼠相比, 前者肺炎的严重程度和死亡率显著降低, 其机制可能是肺泡巨噬细胞上的 TREM2 基因敲除后, 细胞吞噬能力显著增加, 清除细菌等病原微生物的能力增强^[17]。另一项研究表明, 与巨噬细胞特性类似的小胶质细胞, 其 TREM2 表达上调后, 可显著抑制小胶质细胞激活, 通过

改善小胶质细胞激活状态,即降低M1状态的细胞数量,增加M2状态的细胞数量,减轻脑组织缺血后的炎症反应程度^[7]。TREM2是调控炎症细胞(包括小胶质细胞和巨噬细胞)激活状态的重要靶点。早期研究提示,TREM2上调可抑制免疫细胞过度激活,从而抑制促炎性细胞因子分泌,最终降低炎症反应程度^[7]。国外也有研究表明,TREM2可通过减轻巨噬细胞激活,减轻炎症反应^[18]。在本研究中,研究者采用TREM2-siRNA干扰巨噬细胞的TREM2蛋白表达后,绿原酸在巨噬细胞中产生的抗炎作用被显著逆转。以上结果表明,绿原酸在LPS刺激下的巨噬细胞中产生的抑炎作用,可能是通过细胞上的TREM2蛋白介导的。

综上所述,绿原酸可显著抑制LPS对巨噬细胞的激活,其抗炎作用可能是通过巨噬细胞上的TREM2蛋白介导的。但本研究也有一些不足之处:首先,本研究采用巨噬细胞系作为研究对象,所得结论并非来源于动物或临床研究结果;其次,本研究仅观察了TREM2蛋白的作用,TREM1或TREM3在绿原酸抑制巨噬细胞激活中是否发挥了作用尚不明确。因此在后续研究中,还应采用更多实验对本研究结果进行进一步验证,并探索其更多的作用机制。

参考文献

[1] SCHERAGA R G, SOUTHERN B D, GROVE L M, et al. The role of TRPV4 in regulating innate immune cell function in lung inflammation[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1211.

[2] LEE H W, FESSLER M B, QU P, et al. Macrophage polarization in innate immune responses contributing to pathogenesis of chronic kidney disease[J]. *BMC Nephrol*, 2020, 21(1):270.

[3] YANG W Q, LI S M, ZHAO Y, et al. Changes in the expression of interleukin-10 in myocardial infarction and its relationship with macrophage activation and cell apoptosis[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(10):643.

[4] BOSHTAM M, ASGARY S, KOUHPAYEH S, et al. Aptamers against pro- and anti-inflammatory cytokines: a review[J]. *Inflammation*, 2017, 40(1):340-349.

[5] MARAFINI I, SEDDA S, DINALLO V, et al. Inflammatory cytokines: from discoveries to therapies in IBD[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19(11):1207-1217.

[6] 赵玉玺,魏莹,陈珍,等.透明质酸修饰的绿原酸脂质体对U14宫颈癌荷瘤小鼠的抑制作用[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(26):5029-5033.

ZHAO Y X, WEI Y, CHEN Z, et al. The anti tumor effect of hyaluronic acid decorated chlorogenic acid liposomes on mice bearing uterine cervical carcinoma(U14)[J]. *Prog Mod Biomed*, 2017, 17(26):5029-5033.

[7] CHEN D, PAN D, TANG S, et al. Administration of chlorogenic acid alleviates spinal cord injury via TLR4/NF- κ B and p38 signaling pathway anti-inflammatory activity[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1):1340-1346.

[8] ZHAI Q, LI F, CHEN X Y, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells 2, a novel regulator of immune cell phenotypes, confers neuroprotection by relieving neuroinflammation[J]. *Anesthesiology*, 2017, 127(1):98-110.

[9] SHOU J Q, KONG X Z, WANG X Y, et al. Tizoxanide inhibits inflammation in LPS-activated RAW264.7 macrophages via the suppression of NF- κ B and MAPK activation[J]. *Inflammation*, 2019, 42(4):1336-1349.

[10] XUE N N, ZHOU Q, JI M, et al. Chlorogenic acid inhibits glioblastoma growth through repolarizing macrophage from M2 to M1 phenotype[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:39011.

[11] KUMAR M K, SURESH M K, DALUS D. Macrophage activation syndrome[J]. *J Assoc Physicians India*, 2006, 54:238-240.

[12] MURRAY P J, ALLEN J E, BISWAS S K, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines[J]. *Immunity*, 2014, 41(1):14-20.

[13] VOGEL D Y, GLIM J E, STAVENUITER A W, et al. Human macrophage polarization *in vitro*: maturation and activation methods compared[J]. *Immunobiology*, 2014, 219(9):695-703.

[14] YAN G L, CHEN L Y, WANG H H, et al. Baicalin inhibits LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells through miR-181b/HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(9):10127-10141.

[15] FORD J W, MCVICAR D W. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease[J]. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21(1):38-46.

[16] YE Y, SONG Y N, ZHUANG J H, et al. Anticancer effects of echinacoside in hepatocellular carcinoma mouse model and HepG2 cells[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2):1880-1888.

[17] SHARIF O, GAWISH R, WARSZAWSKA J M, et al. The triggering receptor expressed on myeloid cells 2 inhibits complement component Iq effector mechanisms and exerts detrimental effects during pneumococcal pneumonia [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(6):e1004167.

[18] LI Y X, LIU X B, GUO L X, et al. Traditional Chinese herbal medicine for treating novel coronavirus (COVID-19) pneumonia: protocol for a systematic review and meta-analysis[J]. *Syst Rev*, 2020, 9(1):75.

(收稿日期:2023-04-15 修回日期:2023-10-10)
(编辑:曾海蓉)