

黄芩苷和京尼平苷联用对THP-1来源巨噬细胞极化和炎症的影响

韦亚琼, 胡雨蝶, 田维毅*

贵州中医药大学基础医学院, 贵州 贵阳

收稿日期: 2023年3月26日; 录用日期: 2023年4月21日; 发布日期: 2023年4月28日

摘要

目的: 观察黄芩苷和京尼平苷联用对脂多糖(LPS)诱导人髓系白血病单核细胞(THP-1)来源巨噬细胞极化方向以及炎症反应的影响。方法: 采用LPS诱导THP-1来源巨噬细胞极化与炎症, 通过免疫荧光法检测M1型特征分子一氧化氮合酶(iNOS)的表达, ELISA法检测细胞上清白介素6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平。结果: 与对照组比较, LPS组M1型巨噬细胞标志物一氧化氮合酶(iNOS)均升高($P < 0.05$); 与LPS组比较, 黄芩苷和京尼平苷联用组细胞iNOS蛋白表达均降低($P < 0.05$)。与对照组比较, LPS组细胞上清炎症相关因子IL-6、TNF- α 水平表达均升高($P < 0.05$); 与LPS组比较, 黄芩苷和京尼平苷联用组细胞炎症相关因子IL-6、TNF- α 水平均降低($P < 0.05$)。结论: 黄芩苷和京尼平苷联用可能通过抑制脂多糖(LPS)诱导THP-1来源巨噬细胞向M1型极化, 改善炎症反应。

关键词

黄芩苷, 京尼平苷, 巨噬细胞极化, 炎症反应

Effect of Baicalin and Geniposide Combination on Polarization and Inflammation of THP-1-Derived Macrophages

Yaqiong Wei, Yudie Hu, Weiyi Tian*

School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

Received: Mar. 26th, 2023; accepted: Apr. 21st, 2023; published: Apr. 28th, 2023

*通讯作者。

文章引用: 韦亚琼, 胡雨蝶, 田维毅. 黄芩苷和京尼平苷联用对 THP-1 来源巨噬细胞极化和炎症的影响[J]. 临床医学进展, 2023, 13(4): 6692-6698. DOI: 10.12677/acm.2023.134936

Abstract

Objective: To observe the effects of baicalin and geniposide combination on LPS-induced polarization direction of THP-1-derived macrophages and inflammatory response. **Methods:** LPS was used to induce polarization and inflammation in THP-1-derived macrophages, and the expression of M1-type polarization marker Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) was detected by immunofluorescence, and the levels of IL-6 and TNF- α in cell supernatants were measured by ELISA. **Results:** Compared with the control group, iNOS, a molecular marker of M1-type macrophages, was increased in the LPS group ($P < 0.05$). Compared with the LPS group, iNOS protein expression was decreased in both the baicalin and geniposide combination groups ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of cellular supernatant inflammation-related factors IL-6 and TNF- α levels were increased in the LPS group ($P < 0.05$); compared with the LPS group, the levels of cellular inflammation-related factors IL-6 and TNF- α were decreased in the baicalin and geniposide combination group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Baicalin and geniposide combination may improve the inflammatory response by inhibiting its polarization toward M1 type.

Keywords

Baicalin, Geniposide, Macrophage Polarization, Inflammatory Response

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)逐渐成为人们生命安全的一大威胁, 与许多心血管疾病关系密切, 是导致中风甚至死亡的重要因素[1]。动脉粥样硬化作为慢性炎症, 其主要特点是内皮功能障碍, 血管炎症和血管内膜脂质积累。在动脉粥样硬化过程中, 内膜里的脂肪斑块和纤维斑块不断积累, 最终导致黄色粥样斑块的形成, 增加动脉壁厚, 并使之弹性降低[2]。而该病进程中各个阶段, 都有炎症参与[3]。炎性细胞浸润是其主要病理表现之一。巨噬细胞作为人体的免疫细胞, 在炎症过程中发挥必不可少的作用。不同刺激下的巨噬细胞可以分化为 M1 型和 M2 型[4]。其分化的类型可以产生不同的结果——M1 型会促进炎症或者是抑制。用 LPS 诱导的 M1 型巨噬细胞对因此, 调控巨噬细胞极化来控制炎症反应, 可作为治疗动脉粥样硬化的靶点之一。

黄连解毒汤, 首载于《外台秘要》, 临床常用于泻火解毒; 现代研究结果发现, 其中多项成分具有药理作用。中药黄芩的核心成分黄芩苷($C_{21}H_{18}O_{11}$), 具有抗炎等重要作用。研究表明[5], 黄芩苷可通过 PPAR γ /LXR- α /ABCA1/ABCG1/SR-BI 信号通路, 抑制体内外脂质积累, 抑制泡沫细胞形成, 促进早期斑块中巨噬细胞凋亡等。京尼平苷($C_{17}H_{24}O_{10}$)是中药栀子中的有效成分, 具有抗肿瘤保肝及抗慢性炎症等作用, 研究表明[6], 京尼平苷可以通过调节脂质蓄积起到抗动脉粥样硬化的作用。在黄连解毒汤中, 含有黄芩苷和京尼平苷两种单体, 但关于黄芩苷和京尼平苷联用, 来影响动脉粥样硬化进展中的炎症反应的研究尚少, 对于其中的机制也尚不明确。

因此, 本实验采用脂多糖(LPS)诱导的 THP-1 来源的巨噬细胞所诱导极化和炎症反应, 观察两种药物联用对所诱导巨噬细胞的影响。为两种单体联用防治动脉粥样硬化提供实验依据, 也为未来临床治疗提供理论基础。

2. 材料

2.1. 细胞

人髓系白血病单核细胞 THP-1 购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

2.2. 试剂与药物

黄芩苷(Solarbio 公司, 批号 610A021); 京尼平苷(Solarbio 公司, 批号 611B023); LPS (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 022621211013); CCK-8 检测试剂(上海伟寰科技有限公司, 批号 K101828133EF5E); 人 TNF- α ELISA 试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司, 批号 20221017)、IL-6 ELISA 试剂盒(杭州联科生物科技股份有限公司, 批号 A10620335); 免疫荧光抗体 iNOS (上海毕傲图生物科技有限公司, 批号 01)、DAPI (Solarbio 公司, 批号 C0065)。

3. 方法

3.1. 人髓系白血病单核细胞(THP-1)的培养

3.1.1. 细胞复苏

将细胞冻存管从液氮罐中快速取出, 并放入 37℃ 恒温水浴锅中解冻, 使 THP-1 细胞迅速、均匀的融化为悬液, 整个过程应在 20~60 s 内完成, 以免时间过长冰晶损害细胞胞质。解冻结束后, 用 75% 的酒精擦拭冻存管表面消毒并移入超净工作台。打开旋盖将融化后的细胞悬液使用 15 mL 无菌离心管盛装, 并加入 5 mL ECM 完全培养基(含 5% 胎牛血清、1% 生长因子和 1% 青链霉素)混匀, 1000 rpm 离心 5 min 后抽离上清液, 加入 ECM 完全培养基 4 mL, 重悬细胞后转入 T25 培养瓶中, 盖上瓶塞, 做好标记, 轻轻摇匀后放入 37℃ 5% CO₂ 恒温培养箱中培养。并于 4 小时后, 使用倒置显微镜观察细胞情况。

3.1.2. 细胞换液与传代

细胞生长 2 或 3 天后加入 2 mL 新培养基, 连续加入 2 次后进行换液, 使用离心法, 离心 1200 rpm 3 min。当细胞密度至 80%~90% 时, 将细胞摇匀, 平均分到两个新培养瓶中, 新瓶中补充等量培养基。

3.1.3. 细胞冻存

当细胞密度至 80%~90% 时, 取出离心, 1000 rpm, 5 min。抽离上清液, 加入 1 mL 细胞冻存液(含 55% 基础培养基、40% 胎牛血清和 5% DMSO)混匀, 使用冻存管盛装细胞, 旋紧盖子并做好标记。将细胞 4℃, 30 min; -20℃, 2 h; -80℃ 过夜; 梯度冻存后放入液氮中长期保存。

3.1.4. 细胞活化

使用佛波酯(PMA) (70 ng/mL 48 h) 诱导活性较好的 THP-1 细胞使之分化为 THP-1 巨噬细胞, 继续进行实验。

3.2. 分组及给药

将 THP-1 巨噬细胞分为对照组、LPS 组、黄芩苷 + 京尼平苷组, 3 个组别。LPS 组与黄芩苷 + 京尼平苷组均用 LPS (100 ng/mL) 刺激 24 h; LPS 刺激后, 将黄芩苷+京尼平苷组中加入黄芩苷(100 ng/mL) 与京尼平苷(100 ng/mL), 培养 24 h。

3.3. CCK8 检测细胞活性

将细胞悬液接种于 96 孔板, 每孔约 8000 个细胞, 各组均设 3 个复孔。将不同组别细胞对应处理培

养一定时间后,加入含 10% CCK8 原液的完全培养基 100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱孵育 4 h 后,使用酶标仪在 450 nm 处检测光密度(OD)值。

3.4. 免疫荧光实验检测 iNOS 蛋白表达

使用 24 孔板接种细胞,密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$,按“3.2”项的方法处理培养后,PBS 清洗 2 次,每孔加入 300 μL 4%多聚甲醛,固定 20 min,用 300 μL 1% TritonX-100 处理 10 min,加入 300 μL 1% BSA 溶液室温封 1 h,加入 150 μL 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 清洗 3 次,加入 150 μL 荧光二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h,PBS 清洗 3 次,DAPI (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)室温避光染色 5 min,PBS 清洗后加入 200 μL PBS,使用倒置荧光显微镜拍照采图。

3.5. ELISA 法检测细胞上清 IL-6、TNF- α 水平

以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 密度,将细胞接种于 96 孔板中,按“3.2”项的方法处理培养后,收集各组细胞上清,离心后取上清液,按 ELISA 试剂盒说明书操作步骤检测细胞上清中 IL-6、TNF- α 水平。

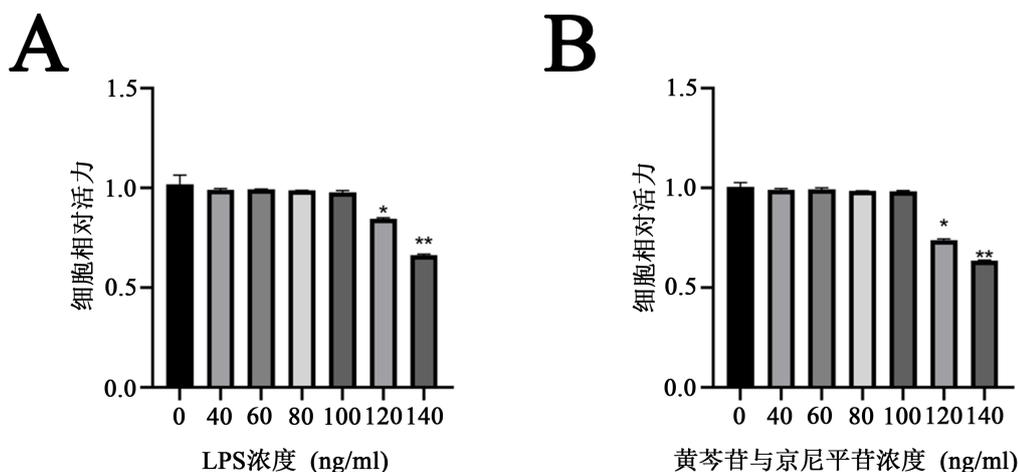
3.6. 统计学分析

统计学分析运用 SPSS26.0 统计软件,每组实验至少重复三次,以 $\bar{x} \pm s$ 来表示计量资料,采用 t 检验分析进行组间比较,采用单因素方差分析多组间比较。 $P < 0.05$ 表示具有统计学差异, $P < 0.01$ 表示差异具有显著性。

4. 结果

4.1. 药物对细胞活性的影响

黄芩苷和京尼平苷联用在 100 ng/mL 浓度(黄芩苷 100 ng/mL、京尼平苷 100 ng/mL)以下,对细胞不存在毒性作用(图 1(A)),选择黄芩苷和京尼平苷实验浓度为 100 ng/mL;LPS 在 100 ng/mL 浓度以下对细胞无毒性作用(图 1(B)),选择 LPS 诱导浓度为 100 ng/mL。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

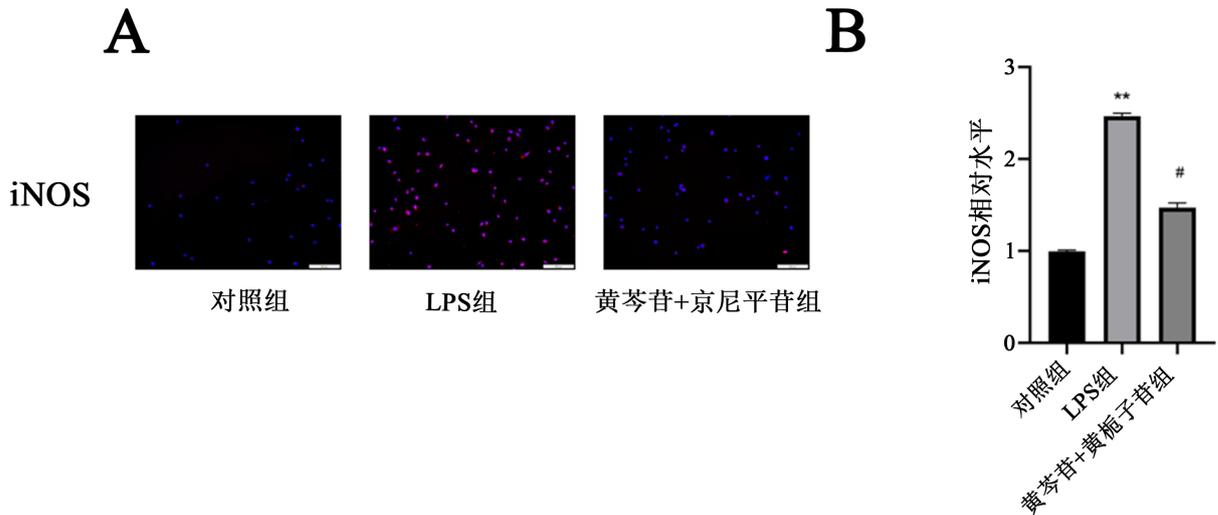
Figure 1. Effect of baicalin in combination with geniposide and LPS on cell activity ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

图 1. 黄芩苷与京尼平苷联用和 LPS 对细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4.2. 黄芩苷与京尼平苷联用对 LPS 诱导 THP-1 来源的巨噬细胞极化的影响

如图 2(A),图 2(B)所示,与对照组相比,LPS 组细胞一氧化氮合成酶(iNOS)荧光强度增强($P < 0.01$);

与 LPS 组比较, 黄芩苷与京尼平苷组细胞内 iNOS 荧光强度减弱($P < 0.05$)。以上结果提示, 黄芩苷与京尼平苷联用, 可以抑制 LPS 诱导的 THP-1 来源的巨噬细胞向 M1 型极化。



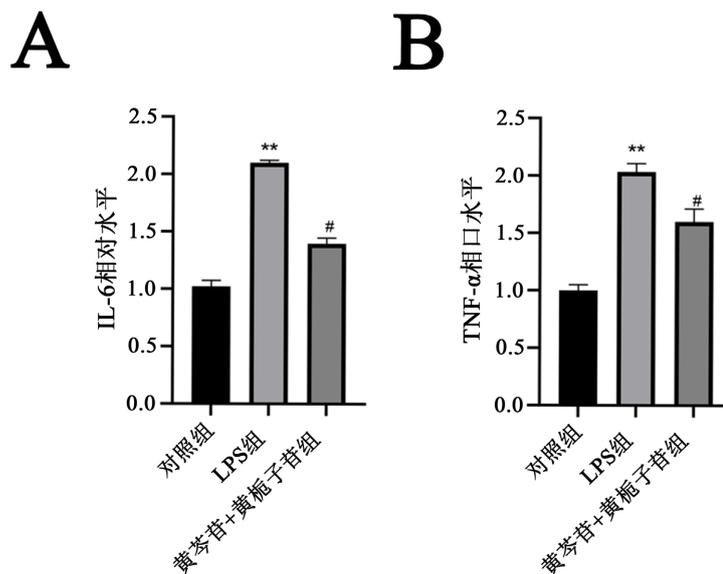
注: 与对照组比较, $**P < 0.01$, 与 LPS 组相比, $#P < 0.05$ 。

Figure 2. Effect of baicalin in combination with geniposide on LPS-induced macrophage polarization ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

图 2. 黄芩苷与京尼平苷联用对 LPS 诱导巨噬细胞极化的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4.3. 黄芩苷与京尼平苷联用对 LPS 诱导 THP-1 来源的巨噬细胞炎症反应的影响

如图 3(A), 图 3(B)所示, 与对照组比较, LPS 组细胞中白介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 表达水平升高($P < 0.01$); 与 LPS 组比较, 黄芩苷与京尼平苷组细胞中的 IL-6、TNF- α 表达水平降低($P < 0.05$)。以上结果提示, 黄芩苷与京尼平苷联用抑制了 LPS 诱导的 THP-1 来源巨噬细胞的炎症反应。



注: 与对照组比较, $**P < 0.01$, 与 LPS 组相比, $#P < 0.05$ 。

Figure 3. Effect of baicalin in combination with geniposide on LPS-induced inflammatory response in macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

图 3. 黄芩苷与京尼平苷联用对 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

5. 讨论

动脉粥样硬化是一种病程发展缓慢的血管炎症性疾病，一旦粥样斑块从血管内膜滑落，极易造成栓塞，导致残疾与死亡等结果。炎症始终贯穿 AS 发展的始末，有许多种因素可以加快或是减缓炎症的进程，尤其是巨噬细胞的极化，在近年来逐渐成为热点。巨噬细胞在细胞因子、趋化因子和修饰蛋白等多种因素的调节下，可以分化为 M1 表型的巨噬细胞和 M2 表型的巨噬细胞。M1 表型的巨噬细胞可以分泌 TNF- α 、IL-6、分泌白介素 8 (IL-8) 和 iNOS 等因子，继而起到促炎的作用，也会导致动脉粥样硬化的加剧；M2 表型的巨噬细胞可以分泌白介素 10 (IL-10) 等细胞因子，可以起到抗炎的作用，进而有利于维持斑块的稳定。研究发现[7]，参红通络方可通过抑制巨噬细胞的 M1 型极化、并转向 M2 型极化，减少炎症反应。以此来稳定动脉内粥样斑块，起到抗动脉粥样硬化的功效。刘继军等[8]研究发现，与诱导的 M1 型巨噬细胞比较，沙格列汀组过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)、转化生长因子 B (TGF- β)、精氨酸酶 1 (Arg-1) mRNA 表达水平上调，TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平下调，证明沙格列汀改善动脉粥样硬化的作用机制可能是通过激活 PPAR α 通路以促进巨噬细胞向 M2 型极化。因此调控巨噬细胞极化控制炎症反应可以作为治疗动脉粥样硬化的新策略。

前期实验证明[9]，黄连解毒汤含药血清发挥抗炎的作用可能是通过激活 PPAR γ 来促进氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 向 M2 表型极化。前期实验[10]还通过黄芩苷干预 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞证明，黄连解毒汤中的中药单体黄芩苷可以抑制 M1 表型的极化方向，并促进 M2 表型极化；其结果提示，黄芩苷可能通过 TLR-4-NF- κ B 信号通路，来进行极化方向的调节。表明巨噬细胞极化可以通过黄连解毒汤来调控，而黄芩苷可以作为防治动脉粥样硬化药物的一种。也有实验发现[11]，黄芩苷与京尼平苷联用可以抑制动脉粥样硬化。本研究发现，LPS 可以促进巨噬细胞 M1 型表型标志物 iNOS 蛋白的表达，同时促进了细胞炎症因子 IL-6、TNF- α 的释放。我们使用黄芩苷和京尼平苷联合干预后，明显降低了 iNOS 蛋白的表达，同时抑制了 IL-6、TNF- α 的释放，说明黄芩苷和京尼平苷联合用药，可以有效抑制 LPS 诱导的 THP-1 来源的巨噬细胞极化和细胞炎症反应。

综上所述，黄芩苷和京尼平苷联用可能通过抑制巨噬细胞向 M1 型极化，从而改善炎症反应。本研究为治疗动脉粥样硬化提供了新的靶点。

基金项目

1) 国家自然科学基金资助项目，项目编号：81760790；2) 贵州省科技创新人才团队，项目编号：黔科合平台人才[2020] 5010。

参考文献

- [1] Björkegren, J.L.M. and Lusis, A.J. (2022) Atherosclerosis: Recent Developments. *Cell*, **185**, 1630-1645. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.004>
- [2] Libby, P. (2021) The Changing Landscape of Atherosclerosis. *Nature*, **592**, 524-533. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03392-8>
- [3] Engelen, S.E., Robinson, A.J.B., Zurke, Y.X., et al. (2022) Therapeutic Strategies Targeting Inflammation and Immunity in Atherosclerosis: How to Proceed? *Nature Reviews Cardiology*, **19**, 522-542. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00668-4>
- [4] De Paoli, F., Staels, B. and Chinetti-Gbaguidi, G. (2014) Macrophage Phenotypes and Their Modulation in Atherosclerosis. *Circulation Journal*, **78**, 1775-1781. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-14-0621>
- [5] Baradaran Rahimi, V., Askari, V.R. and Hosseinzadeh, H. (2021) Promising Influences of *Scutellaria baicalensis* and Its Two Active Constituents, Baicalin, and Baicalein, against Metabolic Syndrome: A Review. *Phytotherapy Research*, **35**, 3558-3574. <https://doi.org/10.1002/ptr.7046>
- [6] Shan, M., Yu, S., Yan, H., et al. (2017) A Review on the Phytochemistry, Pharmacology, Pharmacokinetics and Toxi-

- ology of Geniposide, a Natural Product. *Molecules*, **22**, 1689. <https://doi.org/10.3390/molecules22101689>
- [7] 石妍玉, 曲婉彤, 张泽鹏, 等. 参红通络方调控巨噬细胞极化防治动脉粥样硬化机制[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(14): 3510-3514.
- [8] 刘继军, 于林君, 王博, 等. 沙格列汀激活 AMPK-PPAR α 途径促进巨噬细胞向 M2 型极化减轻动脉粥样硬化的作用研究[J]. 实用药物与临床, 2022, 25(4): 295-301.
- [9] 于红红, 俞琦, 盛蒙, 等. 黄连解毒汤含药血清对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞泡沫化 TLR7 信号通路的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(17): 2082-2085.
- [10] 李帅帅, 罗瑞熙, 韦亚琼, 等. 黄芩苷通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞极化的影响[J]. 中成药, 2022, 44(12): 3835-3841.
- [11] Liao, P., Liu, L., Wang, B., *et al.* (2014) Baicalin and Geniposide Attenuate Atherosclerosis Involving Lipids Regulation and Immunoregulation in ApoE $^{-/-}$ Mice. *European Journal of Pharmacology*, **740**, 488-495. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.039>