

月华丸(胶囊)对耐多药结核分枝杆菌感染后细胞自噬的影响

宁尚圣¹, 伍参荣¹, 欧阳建军¹, 王 茜¹, 邹俊驹¹, 陈国茜², 刘婷婷¹

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208;

2. 广州中医药大学, 广东 广州, 510403)

[摘要] 目的: 研究月华胶囊对耐多药结核分枝杆菌感染后细胞自噬的影响, 以探寻其可能的抗耐多药结核分枝杆菌作用机制。方法: 以月华胶囊含药血清作用于耐多药结核分枝杆菌感染的小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7), 观察其对感染后细胞自噬的影响。实验分组: ①阴性对照组(耐多药结核分枝杆菌+小鼠单核巨噬细胞); ②月华胶囊含药血清组; ③月华胶囊含药血清+自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)组; ④阳性对照雷帕霉素组; ⑤正常空白组。指标检测: 在透视镜下观察月华胶囊含药血清对耐多药结核分枝杆菌感染的小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)自噬体出现和形成的影响。结果: 透射电镜显示, 阴性对照组、空白对照组和自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤组中均未见自噬小体; 10%月华胶囊含药血清组及阳性对照雷帕霉素组可见自噬小体的出现和形成。结论: 月华胶囊含药血清对耐多药结核分枝杆菌感染小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)自噬有促进作用, 通过诱导巨噬细胞自噬杀灭结核分枝杆菌可能是月华胶囊抗结核、抗耐多药结核的机制之一。

[关键词] 月华胶囊; 单核巨噬细胞; 自噬小体; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.02.059

Effect of Yuehua pills/capsules on cell autophagy after multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection

NING Shangsheng¹, WU Canrong¹, OUYANG Jianjun¹,

WANG Qian¹, ZOU Junju¹, CHEN Guoqian², LIU Tingting¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510403, Guangdong, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Yuehua capsules on cell autophagy after multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection and the possible mechanism of action of Yuehua capsules in the treatment of such infection. Methods: The serum containing Yuehua capsules was used to act on mouse mononuclear macrophages(RAW264.7) with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection, in order to observe the effect of Yuehua capsules on cell autophagy after infection. The groups in this experiment were negative control group

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号:81470192); 湖南省教育厅科学研究重点项目(编号:13A065); 湖南省重点学科开发基金资助项目(编号:4982-0009005)

第一作者: 宁尚圣, 男, 2013 级本硕连读研究生, 研究方向: 针灸推拿学

通讯作者: 欧阳建军, 女, 医学硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 经方名方配伍及其作用机制研究

[9] 樊开宇, 王冰, 梅晓乐, 等. 滁菊总黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(1): 9-12.

[10] 喻小平, 陈谦学. 丁苯酞对颅脑损伤大鼠血清 S100B、NSE 蛋白水平和脑组织含水量的影响[J]. 微循环学杂志, 2017, 27(2): 17-20.

[11] 刘得水, 兴桂华, 卢长方, 等. β -细辛醚对抑郁模型大鼠海马和血清神经元特异性烯醇化酶变化的干预作用[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(5): 1040-1041.

[12] 范小璇, 赵晓平, 周振国, 等. 健脑益智胶囊对颅脑损伤大鼠血清 NSE 含量的影响[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(5):

1066-1068.

[13] 梁迪赛, 王中男, 马晓依, 等. 中药对不同出血量脑出血模型大鼠血清 NSE 水平调控的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(11): 1987-1988.

[14] 温水涛, 石义亭, 李培永, 等. 甘露醇对脑出血早期血肿扩大影响的动物实验研究[J]. 卒中与神经疾病, 2006, 13(1): 30-33.

[15] 张斌, 周家强, 何惟高, 等. 甘露醇在控制高血压性脑出血患者早期血肿扩大中的影响评估[J]. 中国现代医生, 2017, 55(13): 7-10.

[16] 苗青, 张干, 宫鑫, 等. 甘露醇治疗早期脑出血对血肿扩大及预后的影响[J]. 中华疾病控制杂志, 2015, 19(10): 1072-1074.

(收稿日期: 2018-07-28)

(multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* + mouse mononuclear macrophages), serum containing Yuehua capsules group, serum containing Yuehua capsules + 3-MA (an autophagy inhibitor) group, rapamycin positive control group, and blank control group. An electron microscope was used to observe the effect of serum containing Yuehua capsules on the appearance and formation of autophagosome in mouse mononuclear macrophages (RAW264.7) with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection. Results: The transmission electron microscope showed no autophagosome in the negative control group, the blank control group, and the serum containing Yuehua capsules + 3-MA group. The appearance and formation of autophagosome were observed in the 10% serum containing Yuehua capsules group and the rapamycin positive control group. Conclusion: Serum containing Yuehua capsules can promote autophagy in mouse mononuclear macrophages (RAW264.7) with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection, and Yuehua capsules exert an antituberculous or anti-multidrug-resistant tuberculosis effect by inducing the autophagy of macrophages to kill *Mycobacterium tuberculosis*.

[Key words] Yuehua capsule; mononuclear macrophage; autophagosome; experimental study

月华胶囊是以月华丸改煎肝为白及而成,全方由天冬、麦冬、熟地黄、生地黄、山药、百部、沙参、川贝母、阿胶、茯苓、白及、广三七、白菊花、桑叶共14味药组成,为传统治疗癆瘵药方。自噬是巨噬细胞吞噬和杀伤病原菌的重要调控机制^[1]。自噬检测的金标准是在透射电镜下观察细胞质中是否存在膜状结构的自噬小体及其他相关亚细胞结构^[2]。本实验采用体外细胞实验方法,构建耐多药结核菌感染巨噬细胞模型,观察月华胶囊含药血清对耐多药结核菌感染后巨噬细胞自噬的影响,探讨月华丸(胶囊)抗结核、抗耐多药结核的可能作用机制。

1 实验材料

1.1 细胞系、菌株 小鼠巨噬细胞(RAW264.7细胞)购于中南大学湘雅医学院医学实验细胞中心。耐多药结核菌(multidrug-resistant mycobacterium tuberculosis)由省结核病院检验科提供,编号478,于湖南中医药大学病原免疫实验室保存。

1.2 主要试剂 月华胶囊中药饮片均从湖南中医药大学第一附属医院中药房一次性购回;胎牛血清、高糖DMEM培养基均购于sigma公司;Middlebrook 7H9肉汤基础、Middlebrook OADC增菌液购自青海海博生物技术有限公司;自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)、雷帕霉素(Rep)购自美国SantaCruz(USA)。

1.3 动物 健康SD大鼠,清洁级,雌雄各半,体质量(200±20)g,由湖南中医药大学实验动物中心提供,合格证号:43004700004879。

2 实验方法

2.1 含药血清制备 将中药饮片除阿胶外洗净,浸泡12h,加水煎煮3次,第1次3h,第2次2h,第3次1h,合并煎液,滤过,于水浴锅浓缩至药液用玻璃棒挑起呈“挂旗状”,再将隔水烊化好的阿胶放入药液中混匀,继续搅拌浓缩,然后持续冷凝干燥至每1g相当于含生药2.43g,4℃储存备用。取实验大鼠,以人与大鼠间按体表面积换算的等效剂量为大鼠的用药量,即12.05g/(kg·d)。每日灌胃1次,连续灌胃7d,末灌胃后60min处死大鼠,经腹主动脉取血

5mL,血液在3000r/min条件下离心10min,取上清液,制备成含药血清。

2.2 细菌培养 生物安全柜中,将MDR-TB接种于Middlebrook 7H9液体培养基,接种后的培养瓶于微生物快速培养监测系统内行快速液体培养,取3周培养物用0.05% Tween80/PBS充分吹散成菌悬液,用细菌浓度比浊仪测定其浊度,配制成 1×10^7 CFU/ml的菌悬液,备用。

2.3 细胞培养 小鼠巨噬细胞RAW264.7按常规方法用含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养基,在37℃、5% CO₂培养箱中培养。

2.4 耐药结核菌感染细胞构建 取对数生长期RAW264.7细胞,经消化、洗涤后,以PM1640培养液制成 1.0×10^6 /ml细胞悬液。96孔平底细胞培养板中加100μl细胞悬液,再加100μl已制备的细菌浓度为 1.0×10^7 CFU/ml细菌悬液,使细菌与细胞的比例为10:1于细胞培养箱中37℃、5% CO₂孵育4h。

2.5 分组 将耐药结核菌感染后细胞随机分为:1)阴性对照组:耐多药感染后细胞;2)月华胶囊含药血清组;3)自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)+月华胶囊含药血清组;4)阳性对照雷帕霉素(Rep);另设正常空白组。以上5组均放置于37℃、5% CO₂的培养箱中。

2.6 给药 将耐药结核菌感染的各组RAW264.7细胞,冲洗后,再分别换上:月华胶囊含药血清组,3-MA+月华胶囊含药血清组,分别加已筛选好合适浓度的月华胶囊含药血清。阴性对照组加不含抗生素的10%胎牛血清DMEM,正常空白对照组加含10%胎牛血清DMEM。各组容积均为100μl,均培养4d。

2.7 自噬体形成观测 收集待测细胞,加入冰预冷的PBS,1000rpm条件下离心5min,洗涤细胞2次;调整细胞浓度 1×10^7 /ml,再用冰预冷的PBS洗涤1次,每管细胞加入固定液(2.5%戊二醛)1ml,4℃固定过夜,送透射电镜观察细胞自噬体形成。

3 实验结果

透射电镜下观察结果显示,阴性对照组及空白对照组:

细胞胞浆内细胞器丰富,结构完整,未见自噬小体(见图1a、b)。10%月华胶囊含药血清组:可见自噬小体包裹线粒体和部分胞质的自噬体(图1c、d,所示为自噬体)。雷帕霉素组:细胞内可见自噬小体,内含胞浆成分,部分呈空泡样改变(图1e、f,所示为自噬体)。3-MA组:细胞内未见自噬小体(图1g、h)。提示月华胶囊可以促进巨噬细胞自噬体的形成。

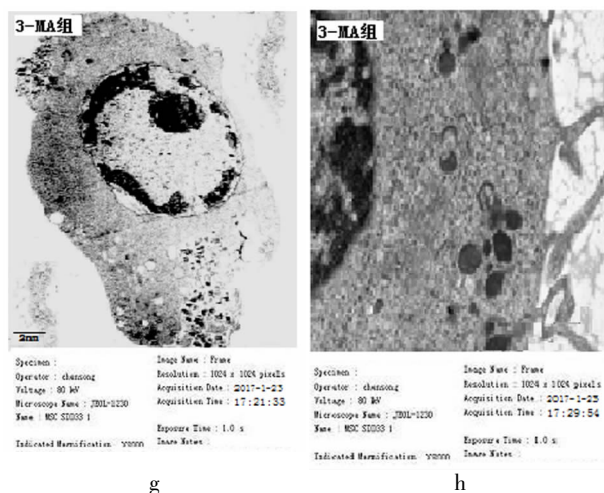
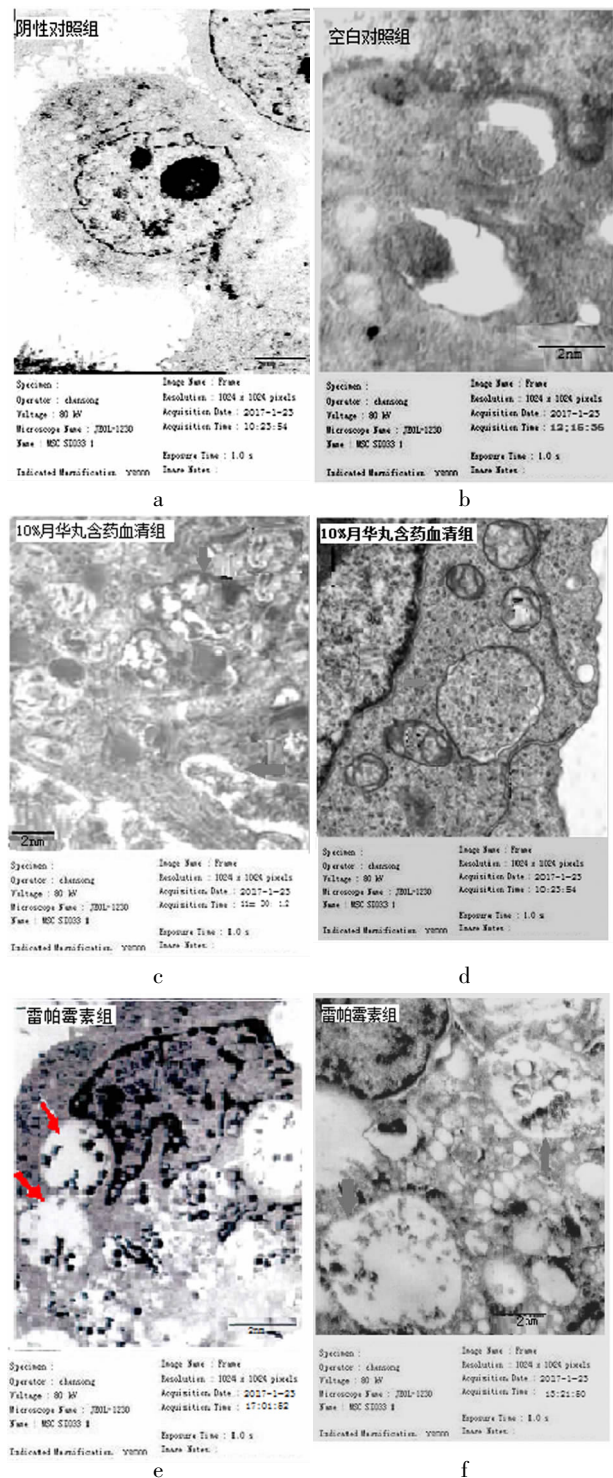


图1 各组电镜观察结果

4 讨论

巨噬细胞对结核分枝杆菌的杀伤与抑制作用主要为自身凋亡、细胞吞噬、自噬作用^[3]。自噬是一种存在于真核细胞并有别于细胞坏死和凋亡的生命现象,是细胞的“管家”^[4],其在抗结核感染方面发挥着重要作用^[5]。一系列文献表明自噬可助于巨噬细胞清除结核杆菌。雷帕霉素可以通过抑制 mTOR 信号通路诱导细胞产生自噬^[6]。3-MA 可抑制自噬起始阶段,从而抑制自噬体的积累^[7]。本研究经月华胶囊含药血清作用感染结核分枝杆菌的 RAW264.7 细胞,以证实月华胶囊是否诱发自噬产生。结果表明阳性对照雷帕霉素作用于巨噬细胞后感染 MTB,在透射电镜下可观察到大量自噬体形成。且 10% 月华胶囊含药血清也可见自噬体形成。而 3-MA 组明显抑制了自噬的发生。

综上所述,阳性对照雷帕霉素组与 10% 月华胶囊含药血清均可诱导自噬体产生,说明月华胶囊含药血清在某种程度上可助于巨噬细胞产生自噬,从而清除 MTB,对细胞生长起到保护作用。因此月华胶囊诱导巨噬细胞自噬能为治疗耐药结核菌提供新的途径。

参考文献

- [1] Rich KA, Burkett C, Webster P. Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy[J]. Cell Microbiol, 2003, 5(7): 455-468.
- [2] 王自彬,王静,王玲,等. 自噬小体的超微结构分析[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2016, 36(4): 426-429.
- [3] 苗青,申阿东. 结核分枝杆菌与宿主巨噬细胞相互作用机制的研究进展[J]. 山西医科大学学报, 2010, 41(10): 920-924.
- [4] 黄凤媛,李菲,曾飞剑,等. 自噬基因 Beclin1 启动子细胞自噬模型的建立[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(2): 325-330.
- [5] 宗文静,张华敏,唐丹丽. 中医药对细胞自噬认识及实验研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(11): 1593-1595.
- [6] 张华娟,李悦,崔振泽. IL-10 与儿童呼吸系统疾病的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(13): 2338-2340.
- [7] Correia JW, Freitas MV, Queiroz JA, et al. Interleukin-6 blood levels in sensitive and multiresistant tuberculosis[J]. Infection, 2009, 37(2): 138-141. (收稿日期: 2018-07-17)