

穿心莲内酯提高异嗜性粒细胞吞噬和杀伤鸡大肠杆菌 O78 功能的体外试验

秦倩倩¹, 付本懂¹, 伊鹏霏¹, 董海兵¹, 白换力¹, 张立艳¹, 吕 爽¹, 蒋小林², 韦旭斌¹, 申海清^{1*}

(1. 吉林大学 畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062; 2. 中牧股份成都药械厂, 四川 成都 610100)

摘要:模拟大肠杆菌 O78 在血液中被鸡异嗜性粒细胞吞噬杀伤的过程, 利用激光共聚焦和涂板菌落计数的方法研究中药单体成分穿心莲内酯对异嗜性粒细胞吞噬杀伤大肠杆菌 O78 活性的影响。结果显示, 穿心莲内酯质量浓度为 1 mg/L 时有极显著的提高异嗜性粒细胞吞噬大肠杆菌 O78 的作用 ($P < 0.01$), 并且在异嗜性粒细胞发挥杀伤作用的 12 h 后有极显著的增强其杀伤作用的功效 ($P < 0.01$)。结果表明, 穿心莲内酯能够提高异嗜性粒细胞吞噬、杀伤大肠杆菌 O78 的活性, 从而起到增强机体抗病能力, 提高机体免疫力的作用。

关键词:穿心莲内酯; 异嗜性粒细胞; 大肠杆菌 O78; 吞噬; 杀伤

中图分类号: S852.612

文献标志码: A

文章编号: 1005-4545(2013)01-0038-05

Effect of andrographolide on phagocytic and killing activities of chicken heterophils against *Escherichia coli* O78 *in vitro*

QIN Qian-qian¹, FU Ben-dong¹, YI Peng-fei¹, DONG Hai-bing¹, BAI Huan-li¹, ZHANG Li-yan¹, LU Shuang¹, JIANG Xiao-lin², WEI Xu-bin¹, SHEN Hai-qing^{1*} (1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. Animal Husbandry Industry Joint-stock Company Chengdu Factory, Chengdu 610100, China)

Abstract: To study the effect of andrographolide on the phagocytic and killing activities of avian heterophils against *Escherichia coli* O78, the process of *E. coli* O78 captured by chicken heterophils *in vitro* was simulated and examined through laser scanning confocal microscopy and colony counting. The results showed that andrographolide at 1 mg/L could significantly enhance the phagocytic activity of chicken heterophils against *E. coli* O78 ($P < 0.01$). In addition, it could significantly enhance the killing activity of chicken heterophils against *E. coli* O78 from 12 h after phagocytosis ($P < 0.01$). These results demonstrate that andrographolide can improve the phagocytic and killing activities of chicken heterophils against *E. coli* O78, which enhance the disease resistance and immunity.

Key words: andrographolide; heterophils; *Escherichia coli* O78; phagocytosis; killing

* Corresponding author

禽类的异嗜性粒细胞 (Avian heterophils) 是禽类主要的颗粒白细胞, 存在于禽类骨髓、血液和结缔

组织中, 是机体非特异性免疫系统中的重要成员和主要调节者^[1]。异嗜性粒细胞的作用与哺乳动物的中性粒细胞类似, 具有吞噬杀伤外界入侵的病原体, 保护机体免受侵害的作用, 是禽类重要的免疫组织^[2]。近年来, 在人类防治鸡大肠杆菌病的过程中, 仍然存在着免疫接种效果不理想、用药量过大导致药物残留等问题。长期的滥用药物、免疫接种, 导致禽类免疫力下降, 特别是 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞以及异嗜性粒细胞的活性处于一种低迷甚至抑制的状态, 致使疾病的发生越来越严重^[3]。

收稿日期: 2012-04-18

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划资助项目 (2008BADB4B04-4); 北京农学院兽医学 (中医药) 北京市重点实验室开放课题 (TCVM-201104); 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所农业部兽用药物创制重点实验室甘肃省新兽药工程重点实验室开放课题 (SYSKF2011KT05)

作者简介: 秦倩倩 (1987-), 女, 硕士。

* 通讯作者

穿心莲内酯是中药穿心莲的有效单体成分,具有较好的抗病原微生物、解热、抗炎、利肝保胆等作用,近年来研究证实穿心莲内酯同样具有调节机体免疫功能的作用,尤其是增强吞噬细胞吞噬细菌的功能^[4]。本实验室在前期大量研究的基础上,由香附、穿心莲、黄芪组成中药方剂“香芪汤”,经过临床实践证明该方剂能够显著地降低大肠杆菌 O78 感染鸡的发病率和死亡率,能减轻发病鸡的临床症状并加速其康复^[5]。本试验拟探讨中药单体成分是否通过提高异嗜性粒细胞的吞噬杀伤活性来降低大肠杆菌 O78 感染鸡的发病率和死亡率,为研究中药免疫增强剂、提高机体免疫力、提高禽类抗病能力提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞 4~6 周龄健康海兰褐蛋鸡翼下无菌采血,密度梯度离心分离血液中的异嗜性粒细胞。

1.2 细菌 大肠杆菌 O78 (*Escherichia coli*, CVCC1418),购自中国兽医药品监察所。

1.3 药品和试剂 穿心莲内酯(Andrographolide)购于江苏南京泽朗医药科技有限公司;Percoll 细胞分离液 DH-235 购自鼎国试剂公司;二甲基亚砷(DMSO)、噻唑蓝(MTT)均购自 Sigma 公司;氯化钠(NaCl)、蛋白胨(Peptone)、牛肉膏(Beef Extract)、琼脂粉(Agar)均购自北京双旋微生物培养基制品厂;Rhodaninel23 购自长春鼎国试剂公司;Hoechst33342 购自美国 invitrogen 试剂公司;胎牛血清购自长春鼎国试剂公司;RPMI Medium 1640 购自美国 invitrogen 试剂公司。

1.4 主要仪器 CO₂ 培养箱,德国 Heraeus 公司生产;ELx 酶标仪,美国 Bio-Tek Instruments Inc 公司生产;DHP-9162 细菌培养箱,上海一恒科学仪器有限公司生产;TGL-16aR 离心机,上海安亭科学仪器厂生产;激光共聚焦显微镜 OLYMPUS FV500 型,日本奥林巴斯公司生产。

1.5 细菌培养 挑取湿润、隆起的单个大肠杆菌 O78 菌落接种于 LB 液体培养基中,置于 37℃ 摇床,培养 24 h,之后取出置于 4℃ 冰箱保存。菌落计数为 5×10^8 CFU/mL。

1.6 细胞的分离和培养 9 份 Percoll 原液(密度为 1.130 g/mL)加入到 1 份的 1.5 mol/L 的 NaCl 溶液中,配成 Percoll 母液。Percoll 母液加入 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液依次配成 80%(密度为 1.108 g/mL)、73%(密度为 1.092 g/mL)、60%(密度为 1.056 g/mL)的 Percoll 细胞分离液。

无菌翼下采海兰褐蛋鸡血 4 mL,肝素钠(1 000 U/mL)抗凝,略加摇晃,防止血凝。依次取 80%、73%、60%的 Percoll 细胞分离液各 2 mL 缓慢加入 12 mL 离心管中,形成一个梯度 Percoll 细胞分离液柱。然后取 3 mL 血液缓慢加入到液柱最上层,2 000 r/min 离心 30 min。Percoll 细胞分离液分为红细胞层(A 层)、80%分离液层(B 层)、73%细胞分离液层(C 层)、60%Percoll 细胞分离液(D 层)、血清(E 层)5 个部分。异嗜性粒细胞就分布在 C 层和 D 层,也就是 60% Percoll 液层与 73% Percoll 液层的交界处以及整个 73% Percoll 液层。吸取目的层细胞加入离心管,清洗 3 次,然后加入到 15%的完全 RPMI Medium 1640 培养液中,细胞计数,调整细胞浓度为 5×10^6 /mL,37℃、5% CO₂ 条件下培养^[6]。

1.7 穿心莲内酯的毒理学检测 应用 MTT 检测方法进行检测。取细胞培养箱中培养已过 1 h 的异嗜性粒细胞,充分混匀,取 100 μ L 加入到 96 孔板中,使每孔所含细胞为 5×10^5 个,37℃、5% CO₂ 条件下培养 1 h。加入不同浓度的穿心莲内酯,对照孔加入等量的稀释药物所用的 PBS,每孔设置 5 个重复孔,37℃、5% CO₂ 条件下培养 18 h。加入 20 μ L MTT,37℃、5% CO₂ 条件下培养 4 h,终止培养。1 000 r/min 离心 10 min,小心吸掉上清,每孔加入 100 μ L DMSO,摇床振荡 10 min 后,570 nm 处检测各孔的吸光值(D 值)。

1.8 异嗜性粒细胞吞噬大肠杆菌 O78 的激光共聚焦观察 取浓度为 5×10^6 /mL 的细胞悬浮液,3~5 遍清洗掉抗生素,加入 Hoechst33342,使其终浓度为 5 mg/L,置于 37℃、5% CO₂ 条件下染色 30 min。取浓度为 5×10^7 CFU/mL 的大肠杆菌 O78,100 μ L 稀释至 1 mL,12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清,加入荧光染料 Rhodaninel23,使其终质量浓度为 12 g/L,置于 37℃、5% CO₂ 条件下染色 30 min。30 min 后,细胞 1 500 r/min 离心 5 min,细菌 12 000 r/min 离心 10 min,清洗 3~5 遍,吸掉未结合的荧光染料。用含血清、不含抗生素的 RPMI Medium 1640 将细胞和细菌冲起,以 1/10 的比例加入到 6 孔板中,置于 40℃、5% CO₂ 条件下培养 45 min。45 min 后,上激光共聚焦显微镜观察吞噬情况。

1.9 大肠杆菌 O78 感染异嗜性粒细胞 将不同浓度的穿心莲内酯加入到细胞悬浮液中,孵育 3 h,使细胞终浓度为 5×10^6 /mL,穿心莲内酯的终质量浓度分别为 0.2、1、5 mg/L,对照组不加任何药物。3

h后,清洗细胞3~5遍,洗掉抗生素和药物,含血清、不含抗生素的RPMI Medium 1640将细胞冲起,加入到6孔板中,药物每个浓度对应一个对照孔。将浓度为 5×10^7 CFU/mL的大肠杆菌O78取100 μ L稀释至1 mL,12 000 r/min离心10 min,弃去上清,取6孔板中1 mL细胞冲起细菌,再加入该孔中,使每个孔中细胞与细菌的比例为1:10。将细胞细菌悬浮液置于40℃、5% CO₂条件下培养45 min^[7]。

1.10 穿心莲内酯对异嗜性粒细胞吞噬大肠杆菌O78的影响 应用涂板菌落计数的方法检测异嗜性粒细胞对大肠杆菌O78的吞噬作用。大肠杆菌O78侵袭异嗜性粒细胞45 min后,取药物每个浓度以及相应对照组的反应液1 mL,加入PBS,2 000 r/min离心10 min,清洗3~5遍,加入200 mg/L的庆大霉素作用1 h,清洗3~5遍,最后1遍取上清涂LB固体培养基,检测胞外菌是否杀灭干净。清洗完毕的细胞加入0.1% Triton X-100,作用5 min,裂解细胞膜。恢复至1 mL体积后稀释,取100 μ L涂LB固体培养基,每种药物每个浓度涂3个平板。平板置于37℃、5% CO₂条件下培养24 h后,菌落计数。每次试验重复3~5次。

1.11 穿心莲内酯对异嗜性粒细胞杀伤大肠杆菌O78的影响 应用涂板菌落计数的方法检测大肠杆菌O78不同时间段在异嗜性粒细胞内的存活率。大肠杆菌O78侵袭异嗜性粒细胞45 min后,取最佳吞噬浓度的药物处理组以及对照组的反应液,加

入PBS,2 000 r/min离心10 min,清洗3~5遍,加入200 mg/L的庆大霉素作用1 h,清洗3~5遍,最后1遍取上清,涂LB固体培养基,检测胞外菌是否杀灭完全。然后将细胞重新悬浮于完全RPMI Medium 1640中,并以此时间为开始时间,与上述方法类似,取每种药物处理组和对照组的细胞悬液1 mL,清洗3~5遍,清洗完毕的细胞加入0.1% Triton X-100,作用5 min,裂解细胞膜。恢复至1 mL体积后稀释,取100 μ L涂LB固体培养基,药物每个质量浓度涂3个平板。平板置于37℃、5% CO₂条件下培养24 h后,菌落计数。在距开始时间3、6、12、24、48 h分别重复此操作。每次试验重复3~5次。

1.12 数据分析 试验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异显著性比较采用SPSS13.0软件,应用ONEWAY-ANVONA和Independent-Samples T Test方法进行分析。

2 结果

2.1 细胞形态 显微镜下的异嗜性粒细胞没有固定的形状,多数为圆形或椭圆形,比红细胞小,核较大,不规则,多被染成蓝紫色(图1)。A图是400倍倒置显微镜下看到的刚刚提取出聚集到一起的异嗜性粒细胞,B图为2000倍激光共聚焦显微镜下看到的单个异嗜性粒细胞,细胞核染成蓝色。密度梯度离心法提取的细胞纯度达90%左右。

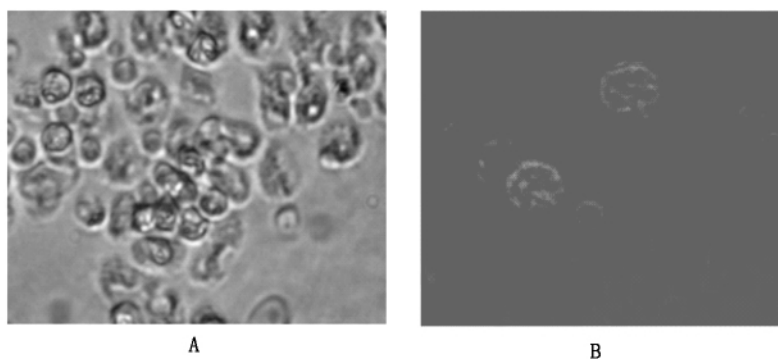


图1 显微镜下观察到的异嗜性粒细胞 A.倒置显微镜下异嗜性粒细胞(400 $\times$);B.激光共聚焦显微镜下单个异嗜性粒细胞(2 000 $\times$)

2.2 穿心莲内酯对异嗜性粒细胞的毒理学检测 穿心莲内酯在0.2、1、5 mg/L时,处理异嗜性粒细胞18 h后, D_{570} 值分别为:(0.32 ± 0.01)、(0.34 ± 0.03)和(0.34 ± 0.02),与未加药物对照组(0.34 ± 0.01)相比,细胞存活率不存在显著差异,说明该药

物该质量浓度对细胞的活性没有影响。

2.3 穿心莲内酯对异嗜性粒细胞吞噬大肠杆菌O78的影响

2.3.1 激光共聚焦下观察到的异嗜性粒细胞吞噬大肠杆菌O78 对细胞和细菌分别进行荧光染色后,

在激光共聚焦显微镜下能够清晰的看到细胞吞噬了细菌(图 2)。图中蓝色为异嗜性粒细胞细胞核,红色亮点为吞噬的大肠杆菌 O78。

2.3.2 穿心莲内酯对异嗜性粒细胞吞噬大肠杆菌 O78 的影响 由图 3 可以看出,穿心莲内酯处理后的异嗜性粒细胞吞噬大肠杆菌 O78 的数值,在药物质量浓度为 1 mg/L 时达到峰值,为每毫升细胞吞噬细菌 $(28.22 \pm 3.25) \times 10^2$ 个,极显著高于对照组的 $(23.11 \pm 2.37) \times 10^2$ ($P < 0.01$)。结果表明,穿心莲内酯质量浓度为 1 mg/L 时,对异嗜性粒细胞吞噬大肠杆菌 O78 的能力有显著的提高作用。

2.4 穿心莲内酯对异嗜性粒细胞杀伤大肠杆菌 O78 的影响

2.4.1 大肠杆菌 O78 在药物作用后的异嗜性粒细胞内的存活率 由表 1 可以看出,穿心莲内酯 1 mg/L

作用异嗜性粒细胞 3 h 后,大肠杆菌 O78 的胞内存活率从 12 h 开始与对照组相比出现极显著减小,12 h 时药物组细菌存活率为 23.93%,极显著的低于对

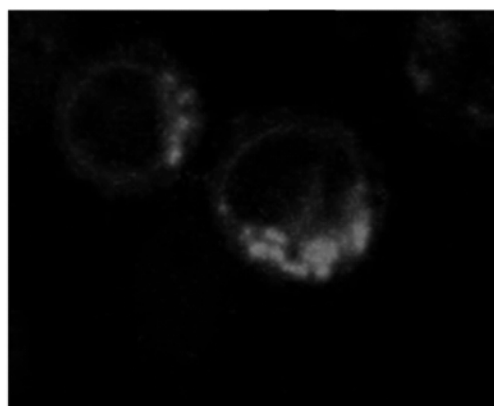


图 2 激光共聚焦下看到的细胞吞噬细菌形态(2 000×)

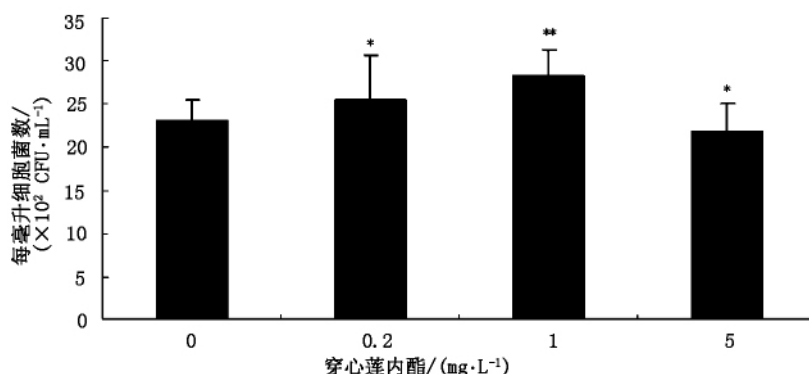


图 3 穿心莲内酯对异嗜性粒细胞吞噬大肠杆菌 O78 的影响 *表示与对照组相差异显著($P < 0.05$), **表示与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。下同

表 1 各个时间点大肠杆菌 O78 的胞内存活率 %

吞噬完成后时间/h	对照组	穿心莲内酯组
3	63.63 ± 1.40	85.23 ± 4.31**
6	57.13 ± 10.61	45.43 ± 3.78
12	35.27 ± 2.08	23.93 ± 1.65**
24	2.86 ± 0.29	1.76 ± 0.18**
48	0.19 ± 0.04	0.00**

对照组的 35.27% ($P < 0.01$); 48 h 时药物组细菌胞内存活率降低为 0%, 也极显著的低于对照物的 0.19% ($P < 0.01$)。结果表明,穿心莲内酯在 1 mg/L 能显著提高异嗜性粒细胞杀灭大肠杆菌 O78 的能力。

2.4.2 大肠杆菌 O78 在药物作用后的异嗜性粒细胞内的胞内存活数 由图 4 可以看出,穿心莲内酯组从 12 h 开始每毫升细胞中大肠杆菌 O78 的存活数开始出现极显著的减少,12 h 时药物组细菌存活

数为 634 ± 29.2 , 极显著的低于对照组的 860 ± 43.0 ($P < 0.01$); 48h 时,药物组细菌存活数为 0.22 ± 0.44 , 也极显著的低于对照组的 4.78 ± 1.79 ($P < 0.01$)。结果显示,穿心莲内酯在 1 mg/L 时,能显著提高异嗜性粒细胞杀灭大肠杆菌 O78 的作用。

3 讨论

试验用中药单体成分处理异嗜性粒细胞,模拟血液中感染大肠杆菌 O78 的情境,将处理后的细胞与未经过药物处理的细胞同时给予细胞 10 倍数量的大肠杆菌 O78 感染。用涂板菌落计数方法检测吞噬细菌数达到最大值,统计发现药物组的细菌吞噬数量与对照组相比有显著提高作用,在药物质量浓度为 0.2 mg/L 时,吞噬作用显著增强,1 mg/L 时吞噬作用极显著增强,5 mg/L 质量浓度时吞噬作用比 1 mg/L 质量浓度时略降低,这说明药物增强了异嗜性粒细胞吞噬 O78 能力,并且在 1 mg/L 促

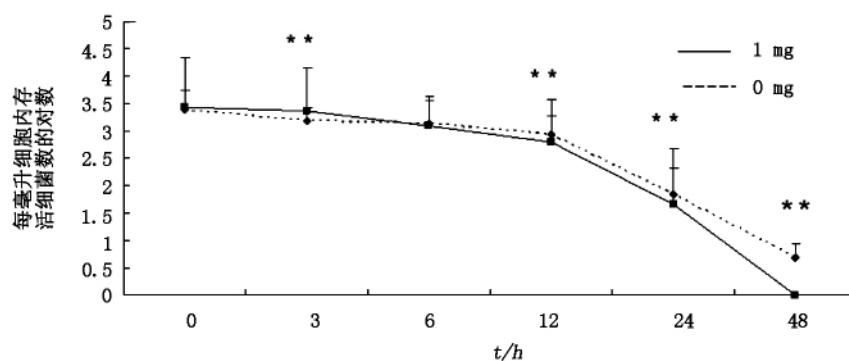


图 4 同时间点大肠杆菌 O78 在异嗜性粒细胞内存活数目

吞噬作用最强。进一步观察异嗜性粒细胞的杀伤作用发现,药物 1 mg/L 作用后的异嗜性粒细胞从吞噬完成的 12 h 开始,药物组细胞内存活的细菌数比对照组显著地减少,这说明药物作用后的细胞杀伤大肠杆菌 O78 能力增强。试验表明,穿心莲内酯能够提高异嗜性粒细胞吞噬杀灭大肠杆菌 O78 的能力。

异嗜性粒细胞杀伤大肠杆菌 O78 的试验中,3 h 时,出现了药物组的细菌存活数比对照组高的情况,而在吞噬完成的 12 h 以后药物作用后的细胞才发挥比对照组更强的杀灭作用,这可能是吞噬和杀灭作用通路不同,穿心莲内酯可能对于吞噬过程中的模式识别受体 (PRRs),包括 Toll-like receptors (TLR) 和 C-type lectin receptors (CLRs) 在内的作用比较迅速,而对杀灭过程中的酶和蛋白作用比较缓慢,比如非氧依赖性杀灭作用中的通透性蛋白、溶菌酶、乳铁蛋白、防御素^[8]、核外分泌物 (Neutrophil extracellular traps, NETs)^[9],以及氧依赖性杀菌作用中的髓过氧化物酶 (MPO) 等。关于穿心莲内酯对异嗜性粒细胞吞噬杀伤机制中的影响和药物的血液药动力学研究将在下一步的试验中继续深入研究。

中医治疗疾病讲究的是“整体性”,既调动整个机体的所有器官功能抵御外邪,使机体再次达到一个阴阳平衡的和谐状态。异嗜性粒细胞与哺乳动物的中性粒细胞类似,是禽类免疫系统的重要组成部分,具有吞噬杀伤外界入侵的病原体,保护机体免受侵害的作用。试验用最经典的涂板菌落计数的方法,发现中药单体成分穿心莲内酯能有效的增强机体免疫系统中的异嗜性粒细胞的吞噬和杀伤功能。这提示我们,从中药调动机体免疫力角度出发,研究开发中药免疫增强剂可能会有有效的提高机体的抗病能力。

参考文献:

[1] Sarah B, Chuammitri P, Andreassen C B, et al. Genetic

control of chicken heterophil function in advanced intercross lines; associations with novel and with known Salmonella resistance loci and a likely mechanism for cell death in extracellular trap production [J]. Immunogenetics, 2011, 63: 449-458.

[2] Shaniko S, Pete K, Agim S, et al. Differential alterations in ultrastructural morphology of chicken heterophils and lymphocytes induced by corticosterone and lipopolysaccharide [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2008, 122: 83-93.

[3] 贺常亮,付本懂,韦旭斌,等.防治鸡大肠杆菌病方剂统计分析[J].中兽医医药杂志,2008(3):74-76.

[4] 胡宇莉,廖晓兵,黎建华,等.穿心莲对肉鸡淋巴细胞活性及白细胞吞噬功能影响[J].中兽医医药杂志,2006(5):17-19.

[5] He C L, Fu B D, Shen H Q, et al. Xiang-qi-tang increases avian pathogenic Escherichia coli-induced survival rate and regulates serum levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 and soluble endothelial protein C receptor in chicken [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34 (3): 379-382.

[6] Sarah B R, Phongsakorn C, Claire B A, et al. Genetic control of chicken heterophil function in advanced intercross lines; associations with novel and with known Salmonella resistance loci and a likely mechanism for cell death in extracellular trap production [J]. Immunogenetics, 2011, 63: 449-458.

[7] Melha M, Maryvonne D M, Charles M D, et al. Role of avian pathogenic Escherichia coli virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages [J]. Infect Immun, 2003(7): 494-503.

[8] van Dijk A, Veldhuizen E J A, Haagsman H P. Avian defensins [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2008, 124: 1-18.

[9] Phongsakorn C, Jelena O, Claire B A, et al. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): Novel defense mechanism of chicken heterophils [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2009, 129: 126-131.