

· 药理 ·

基于PI3K/Akt信号通路探讨小金丹对巨噬细胞极化的调控作用及机制

彭博¹, 练东银¹, 张广平¹, 陈颖¹, 侯红平¹, 贺蓉¹, 李建荣^{1*}, 胡晓茹^{2*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

[摘要] 目的:探讨小金丹提取物(XJD)对巨噬细胞极化的调控作用及作用机制。方法:以脂多糖(LPS)、白细胞介素-4(IL-4)刺激RAW264.7细胞诱导M1型和M2型极化。采用细胞增殖活性检测(CCK-8)法检测10~80 mg·L⁻¹对RAW264.7细胞增殖活性的影响;采用Griess法检测一氧化氮(NO)的释放;采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞因子白细胞介素-6(IL-6)释放;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测M1型和M2型巨噬细胞标志物的mRNA表达;采用流式细胞分析法检测CD206表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路关键蛋白的活化。结果:10~80 mg·L⁻¹ XJD对0.5 mg·L⁻¹ LPS和20 μg·L⁻¹ IL-4诱导的RAW264.7细胞增殖未见明显影响。与空白组比较,LPS诱导组M1型巨噬细胞标志物表达升高,主要包括显著增加NO、IL-6释放($P<0.01$),明显上调M1型基因白细胞介素-1β(IL-1β)、一氧化氮合酶(iNOS)、前列腺素氧化环化酶-2(COX-2)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)mRNA表达($P<0.01$)。同LPS诱导组比较,20~80 mg·L⁻¹ XJD能浓度依赖性显著抑制NO、IL-6的释放($P<0.01$);10~80 mg·L⁻¹ XJD能浓度依赖性下调M1型基因IL-1β、iNOS、COX-2和TNF-α mRNA表达($P<0.01$)。与空白组比较,IL-4诱导组M2型巨噬细胞标志物表达升高,主要包括CD206⁺巨噬细胞比例显著升高($P<0.01$),显著上调M2型基因精氨酸-1(Arg-1)、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-13(IL-13)和转化生长因子-β₁(TGF-β₁)mRNA表达($P<0.01$)。同IL-4诱导组比较,10~80 mg·L⁻¹ XJD能浓度依赖性显著降低CD206⁺ M2型巨噬细胞比例($P<0.01$);显著下调Arg-1、IL-10、IL-13和TGF-β₁ mRNA表达($P<0.01$)。Western blot结果显示,与空白组比较,LPS和IL-4诱导组磷脂酰肌醇3-激酶p110(PI3K-p110)和磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)表达均显著上调($P<0.01$);同LPS或IL-4诱导组比较,XJD能明显降低PI3K p110蛋白表达和p-Akt水平($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:小金丹提取物能抑制LPS和IL-4诱导RAW264.7细胞的M1型极化和M2型极化,机制与降低PI3K/Akt通路的活化水平有关。

[关键词] 小金丹; RAW264.7; 巨噬细胞极化; 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0036-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220724

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220129.1252.004.html>

[网络出版日期] 2022-01-29 15:53

Xiaojindan Extract Modulated Macrophage Polarization by Targeting PI3K/Akt Pathway

PENG Bo¹, LIAN Dong-yin¹, ZHANG Guang-ping¹, CHEN Ying¹, HOU Hong-ping¹, HE Rong¹,

LI Jian-rong^{1*}, HU Xiao-ru^{2*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of Xiaojindan extract (XJD) on

[收稿日期] 2021-11-25

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1708100,2018YFC1708105)

[第一作者] 彭博,博士,研究员,从事中药肿瘤药理研究,E-mail:bpeng@icmm.ac.cn

[通信作者] *胡晓茹,博士,副研究员,从事中药质量控制研究,E-mail:huxiaoru@nifdc.org.cn;

*李建荣,博士,研究员,从事中药药理学和毒理学研究,E-mail:jrl@icmm.ac.cn

macrophage polarization. **Method:** Lipopolysaccharide (LPS) and interleukin-4 (IL-4) were used to induce M1 and M2 polarization of RAW264.7 cells. The influence of 10-80 mg·L⁻¹ XJD on cell proliferation was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. Nitric oxide (NO) and interleukin-6 (IL-6) release was explored by Griess assay and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. The mRNA expression of M1 and M2 macrophage markers was measured by real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the CD206⁺ expression was determined by flow cytometry. The activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway was analyzed by western blot. **Result:** 10-80 mg·L⁻¹ XJD showed no marked cytotoxicity in LPS (0.5 mg·L⁻¹)- or IL-4 (20 μg·L⁻¹)-induced RAW264.7 cells. Compared with the control group, LPS significantly promoted the expression of M1 macrophage markers ($P<0.01$), including increased NO and IL-6 release ($P<0.01$) and upregulated mRNA expression of interleukin-1β (IL-1β), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) ($P<0.01$). Compared with LPS-induced group, 20-80 mg·L⁻¹ XJD decreased the release of NO and IL-6 in a dose-dependent manner ($P<0.01$), and similarly 10-80 mg·L⁻¹ XJD suppressed the mRNA expression of IL-1β, iNOS, COX-2 and TNF-α ($P<0.01$). Compared with the control group, IL-4 obviously increased the expression of M2 macrophage markers ($P<0.01$), including increased CD206⁺ cell population and upregulated mRNA expression of arginine-1 (Arg-1), interleukin-10 (IL-10), interleukin-13 (IL-13) and transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁). Compared with IL-4-induced group, 10-80 mg·L⁻¹ XJD dose-dependently decreased CD206⁺ cell population ($P<0.01$) and inhibited the mRNA expression of Arg-1, IL-10, IL-13 and TGF-β₁ ($P<0.01$). Western blot showed that XJD significantly downregulated the activation of PI3K/Akt pathway as compared to LPS- and IL-4-induced groups ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** XJD significantly inhibited the macrophage polarization in the LPS- and IL-4-induced RAW264.7 cells by targeting PI3K/Akt pathway.

[Keywords] Xiaojindan; RAW264.7; macrophage polarization; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway

巨噬细胞是一类分布于机体各种组织的高度异质性免疫细胞,参与包括癌症、纤维化和类风湿性关节炎等多种炎症性疾病的病理过程^[1]。作为肿瘤微环境中最主要的内源性免疫细胞,在不同因素下刺激分为经典活化的M1型和选择性活化的M2型巨噬细胞,在肿瘤生存增殖、血管生成、侵袭转移中起重要作用^[2-3]。调节M1和M2型巨噬细胞极化平衡从而改善肿瘤病情是中药免疫调节的作用机制之一。小金丹出自清代王维德《外科证治全生集》,记载被广泛用于治疗乳岩,全方由白胶香、草乌、五灵脂、地龙、木鳖子、乳香、没药、当归、麝香、墨炭组成。临床研究证实小金丹对乳腺癌、乳腺癌术后并发症、乳腺癌转移等患者有良好疗效^[4-9];本课题组实验研究也证明小金丹提取物能抑制三阴性乳腺癌细胞生长和转移^[10]。进一步研究发现小金丹能改善局部炎性微环境,提高细胞免疫功能,抑制炎性蛋白表达,从而发挥抑制肿瘤作用^[6,9,11-12]。但是目前对小金丹影响巨噬细胞极化的作用尚未见报道。因此,本研究采用脂多糖(LPS)和白细胞介素-4(IL-4)分别刺激小鼠巨噬细胞RAW264.7诱

导M1型和M2型巨噬细胞极化模型,以磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路为靶点探讨小金丹对巨噬细胞极化的影响。

1 材料

1.1 药物与试剂 参考2020年版《中华人民共和国药典》,小金丹组方:制草乌50g、枫香脂50g、五灵脂(醋炒)50g、地龙50g、木鳖子50g、醋乳香25g、醋没药25g、酒当归25g、墨炭粉4g、人工麝香10g,所有中药饮片购自北京同仁堂药店,经中国食品药品检定研究院中药民族药检定所康帅副研究员鉴定均为正品。中药饮片碎成细粉混匀,采用密闭容器,加入70%乙醇400mL,55℃回流提取2h,过滤取上清液,再加入70%乙醇300mL回流提取1h,合并2次滤液,干燥成粉末,得率为每1g提取物药粉相当于生药5.94g。以二甲基亚砜(DMSO)配制为储存液,质量浓度为100g·L⁻¹,-20℃贮存。实验时以培养基稀释至所需浓度。

DMEM高糖培养基(Bioss公司,批号C7076),细胞增殖活性检测(CCK-8)、一氧化氮(NO)检测试剂盒(Beyotime公司,批号分别为073020201106、

090420201021), 白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(达科为公司, 批号1210602), 动物组织/细胞总RNA提取试剂盒(Tiagen公司, 批号W9727), RNeasy Plus Mini Kit试剂盒(Qiagen公司, 批号151047738); cDNA反转录试剂盒(北京全式金生物技术公司, 批号O10903), SYBR Green Master(Roche公司, 批号50837000); 流式抗体异硫氰酸荧光素(FITC) anti-mouse CD206 (MMR) Antibody(Biolegend公司, 批号141703), 磷脂酰肌醇3-激酶p110(PI3K-p110)、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)、蛋白激酶B(Akt)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(Cell Signaling公司, 批号分别为4249S、4060S、4685S、97166S)、辣根过氧化物酶标记(HRP)山羊抗兔二抗(中杉金桥公司, 批号131879)。

1.2 细胞培养 小鼠RAW264.7细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 使用含10% FBS, 0.1 U·L⁻¹青霉素和100 mg·L⁻¹链霉素的DMEM培养基, 在5% CO₂、37 °C的细胞培养箱中培养。0.25%胰酶消化传代。

1.3 仪器 HERAcell 240i型CO₂培养箱(美国Thermo公司), IX71型倒置显微镜(日本Olympus公司), SpectraMax i3x型酶标仪(美国Molecular Devices公司), LightCycler 480 II型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(瑞士Roche公司), CytoFLEX Flow Cytometer型流式细胞分析系统(美国Beckman Coulter公司), Mini-PROTEAN型电泳系统、Mini Trans-blot转印系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 细胞活力CCK-8检测 以每孔2×10⁴个RAW264.7细胞接种于96孔板, 培养过夜, 加入10~80 mg·L⁻¹小金丹提取物、0.5 mg·L⁻¹ LPS、20 μg·L⁻¹ IL-4培养24 h, 按CCK-8试剂盒说明书操作, 酶标仪450 nm/650 nm检测吸光度A。细胞活力=A_{给药组}/A_{空白组}×100%。

2.2 NO和IL-6释放 取细胞上清, 按NO试剂盒和ELISA试剂盒说明检测。

2.3 流式细胞法检测CD206的表达 收集细胞, 以1%牛血清白蛋白-磷酸盐缓冲液(BSA-PBS)1 mL封闭30 min, 加入含FITC anti-mouse CD206抗体的BSA-PBS 100 μL, 冰上避光孵育10 min, 用PBS洗后重悬进行流式细胞仪检测, 利用FlowJo_v10软件分析。

2.4 Real-time PCR检测炎症因子mRNA表达 收集细胞提取mRNA, 利用逆转录试剂盒制备cDNA。进行PCR扩增, 检测各组细胞目的基因mRNA表达水平。反应条件: 94 °C预处理30 s, 循环1次; 95 °C变性10 s, 60 °C退火20 s, 72 °C延伸30 s, 共循环40次。各组均设5个复孔。以2^{-ΔΔC_t}法表示各目的基因的相对表达量。引物由美国ThermoFisher公司合成, 见表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
一氧化氮合酶(iNOS)	上游 GGAGCGAGTTGTGGATTGTC 下游 GTGAGGGCTTGCTGAGTGAG	123
前列腺素氧化环化酶-2(COX-2)	上游 GAAAGCCCTCTACAGTGACATC 下游 GGTGCTCCAAGCTCTACCAT	111
白细胞介素(IL)-1β	上游 GAAATGCCACCTTTTGACAGTG 下游 TGGATGCTCTCATCAGGACAG	116
肿瘤坏死因子-α(TNF-α)	上游 CAGGCGGTGCCTATGTCTC 下游 CGATCACCCCGAAGTTTCAGTAG	89
精氨酸-1(Arg-1)	上游 CATATCTGCCAAAGACATCGTG 下游 GACATCAAAGCTCAGGTGAATC	196
IL-10	上游 GCTCTTACTGACTGGCATGAG 下游 CGCAGCTCTAGGAGCATGTG	105
IL-13	上游 CCTGGCTCTTGCTTGCCCTT 下游 GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA	116
转化生长因子(TGF)-β ₁	上游 TTTCCGCTGCTACTGCAAGTC 下游 AGGGCTGTCTGGAGTCCTCA	92
β-肌动蛋白(β-actin)	上游 AGAGGGAAATCGTGCGTGAC 下游 CAATAGTGATGACCTGGCCGT	138

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定相关蛋白表达情况 收集细胞, 加入细胞裂解液400 μL, 冰上充分裂解冰上裂解3~5 min, 14 000 r·min⁻¹, 4 °C离心15 min(离心半径12 cm), 收集上清液, 采用BCA法测定蛋白浓度。取蛋白样品20 μg进行十二烷基磺酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳, 4 °C、300 mA湿转1 h, 5%BSA室温封闭2 h。分别用一抗(1:1 000)4 °C孵育过夜; 洗膜后, HRP标记二抗(1:2 000)室温孵育1 h, 增强型化学发光试剂(ECL)试剂盒显色检测, 以GAPDH为内参。

2.6 统计学方法 采用Graphpad Prism 8.0软件分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用One-way ANOVA Dunnet's 检验, P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对RAW264.7细胞增殖活性的影响 10~

80 mg·L⁻¹小金丹提取物处理 24 h, 10~40 mg·L⁻¹小金丹提取物对 RAW264.7 细胞未见明显增殖抑制作用, 细胞增殖抑制率为 0.79%~10.5%。与空白组比较, 60、80 mg·L⁻¹小金丹提取物对 RAW264.7 细胞增殖有显著抑制作用 ($P<0.01$), 细胞活力分别为 83.39% 和 37.47%。见表 2。

表 2 小金丹提取物对 RAW264.7 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)
Table 2 Effect of Xiaojindan extract (XJD) on cell viability in RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞活力/%
空白组		100.00±10.96
小金丹组	10	99.22±1.34
	20	93.47±1.83
	40	90.91±16.62
	60	83.89±2.31 ¹⁾
	80	37.47±1.44 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$

考虑后续实验需要在 LPS 或 IL-4 诱导下进行, 因此本研究对小金丹提取物对 LPS 和 IL-4 作用下 RAW264.7 细胞的增殖作用进行检测。与空白组比较, 0.5 mg·L⁻¹ LPS 刺激 24 h 后能显著促进 RAW264.7 细胞增殖 ($P<0.01$); 与 LPS 组比较, 10~80 mg·L⁻¹小金丹提取物对 LPS 诱导的细胞增殖未见明显抑制作用。见表 3。在 IL-4 刺激的 RAW264.7 细胞中, 小金丹提取物在相同剂量下未见明显抑制细胞增殖的作用。见表 4。

表 3 小金丹提取物对 LPS 刺激后 RAW264.7 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Effect of XJD on LPS induced cell viability in RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	LPS /mg·L ⁻¹	质量浓度 /mg·L ⁻¹	$A_{450\text{nm}}/A_{650\text{nm}}$
空白组			0.66±0.08
LPS 组	0.5		1.01±0.11 ²⁾
小金丹组	0.5	10	1.00±0.03
		20	0.97±0.05
		40	0.96±0.06
		60	0.93±0.14
		80	0.94±0.14

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 LPS 组比较³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ (表 5-表 10 同)

3.2 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放和 IL-6 分泌的影响 与空白组比较, 加入 0.5 mg·L⁻¹ LPS 刺

表 4 小金丹提取物对 IL-4 刺激 RAW264.7 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of XJD on IL-4 induced cell viability in RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	IL-4 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	质量浓度 /mg·L ⁻¹	$A_{450\text{nm}}/A_{650\text{nm}}$
空白组			0.83±0.08
IL-4 组	20		0.85±0.01
小金丹组	20	10	0.82±0.23
		20	0.87±0.04
		40	0.86±0.05
		60	0.89±0.29
		80	0.89±0.17

激 24 h 后能显著增加 NO 和 IL-6 的释放 ($P<0.01$)。与 LPS 组比较, 20~80 mg·L⁻¹小金丹提取物能浓度依赖性抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放和 IL-6 分泌 ($P<0.01$)。见表 5。

表 5 小金丹提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 和 IL-6 释放的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Effect of XJD on NO and IL-6 release in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	LPS /mg·L ⁻¹	质量浓度 /mg·L ⁻¹	NO 释放 /nmol·L ⁻¹	IL-6 /ng·L ⁻¹
空白组			13.74±5.78	7.66±3.31
LPS 组	0.5		44.64±7.54 ²⁾	875.85±64.01 ²⁾
小金丹组	0.5	10	41.68±5.03	781.73±44.13
		20	25.62±4.08 ⁴⁾	703.09±24.56 ⁴⁾
		40	19.71±4.74 ⁴⁾	594.50±37.55 ⁴⁾
		60	7.94±2.56 ⁴⁾	354.33±57.84 ⁴⁾
		80	3.71±3.11 ⁴⁾	0.26±4.83 ⁴⁾

3.3 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 IL-1 β 、iNOS、COX-2 和 TNF- α mRNA 表达的影响 与空白组比较, LPS 诱导 24 h 后能显著促进 RAW264.7 细胞的 IL-1 β 、iNOS、COX-2 和 TNF- α mRNA 表达 ($P<0.01$)。与 LPS 组比较, 10~80 mg·L⁻¹小金丹提取物能显著降低 IL-1 β 、iNOS、COX-2 和 TNF- α mRNA 表达 ($P<0.01$), 呈现浓度依赖性。见表 6。

3.4 对 IL-4 诱导的 RAW264.7 细胞 CD206 表达的影响 与空白组比较, IL-4 组 RAW264.7 细胞 CD206 的表达显著升高 ($P<0.01$)。与 IL-4 组比较, 10~80 mg·L⁻¹小金丹提取物浓度依赖性降低 RAW264.7 细胞 CD206 的表达 ($P<0.01$)。见表 7。

3.5 对 IL-4 诱导的 RAW264.7 细胞 Arg-1、IL-10、IL-13 和 TGF- β_1 mRNA 表达的影响 与空白组

表6 小金丹提取物对LPS诱导RAW264.7细胞M1型巨噬细胞标志物的基因表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 6 Effect of XJD on mRNA expression of M1 macrophage markers in LPS induced RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	LPS/mg·L ⁻¹	质量浓度/mg·L ⁻¹	IL-1 β	iNOS	COX-2	TNF- α
空白组			1.00±0.80	1.00±1.26	1.00±0.41	1.00±0.69
LPS组	0.5		23 277.79±0.36 ²⁾	48.67±0.38 ²⁾	4 182.07±0.38 ²⁾	48.06±0.28 ²⁾
小金丹组	0.5	10	20 311.37±0.40 ⁴⁾	35.63±0.22 ⁴⁾	3 821.70±0.37 ⁴⁾	21.56±0.19 ⁴⁾
		20	18 432.96±0.39 ⁴⁾	27.76±0.69 ⁴⁾	3 492.39±0.09 ⁴⁾	20.11±0.21 ⁴⁾
		40	13 034.07±0.54 ⁴⁾	12.34±0.68 ⁴⁾	2 836.70±0.32 ⁴⁾	19.12±0.86 ⁴⁾
		60	1 284.21±0.12 ⁴⁾	10.33±0.06 ⁴⁾	1 595.73±0.25 ⁴⁾	12.35±0.41 ⁴⁾
		80	29.24±0.42 ⁴⁾	9.75±0.64 ⁴⁾	367.94±0.31 ⁴⁾	7.62±0.46 ⁴⁾

表7 小金丹提取物对IL-4刺激后CD206⁺M2型巨噬细胞比例的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 7 Effect of XJD on CD206⁺ macrophage population in IL-4 induced RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	IL-4/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	质量浓度/mg·L ⁻¹	CD206 ⁺ M2型巨噬细胞/%
空白组			5.17±1.18
IL-4组	20		82.90±2.40 ²⁾
小金丹组	20	10	59.50±0.85 ⁴⁾
		20	29.90±0.28 ⁴⁾
		40	12.45±0.07 ⁴⁾
		60	11.20±0.57 ⁴⁾
		80	7.24±0.06 ⁴⁾

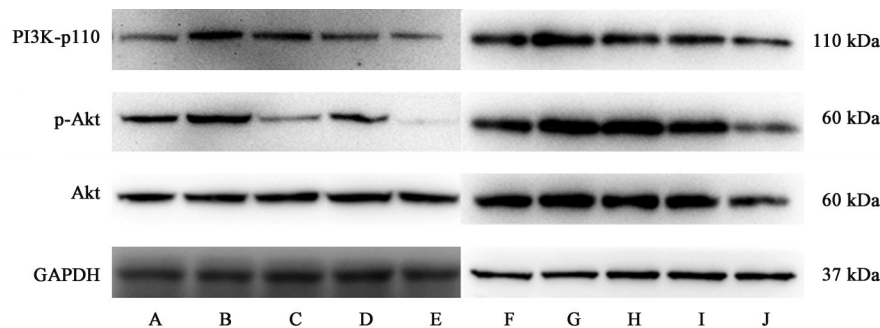
比较,IL-4诱导24 h后能显著促进RAW264.7细胞的Arg-1、IL-10、IL-13和TGF- β_1 mRNA表达($P<0.01$)。与IL-4组比较,10~80 mg·L⁻¹小金丹提取物可显著降低RAW264.7细胞的Arg-1、IL-10、IL-13和TGF- β_1 mRNA表达($P<0.01$),作用呈现浓度依赖性。见表8。

3.6 小金丹提取物对LPS和IL-4诱导的PI3K/Akt通路活化的影响 与空白组比较,LPS组、IL-4组PI3K-p110、p-Akt蛋白表达显著上调($P<0.01$);与LPS组、IL-4组比较,小金丹提取物(20,40,60 mg·L⁻¹)能浓度依赖性明显下调PI3K-p110、p-Akt蛋白表达($P<0.05, P<0.01$)。见图1、表9、表10。

表8 小金丹提取物对IL-4诱导RAW264.7细胞M2型巨噬细胞标志物的mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 8 Effect of XJD on mRNA expression of M2 macrophage markers in IL-4 induced RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	IL-4/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	质量浓度/mg·L ⁻¹	Arg-1	IL-10	IL-13	TGF- β_1
空白组			1.00±1.17	1.00±0.92	1.00±0.84	1.00±0.29
IL-4组	20		1 002.93±0.61 ²⁾	11.29±0.69 ²⁾	12.59±0.72 ²⁾	5.12±0.61 ²⁾
小金丹组	20	10	622.75±1.35 ⁴⁾	7.77±0.49 ⁴⁾	7.28±2.69 ⁴⁾	4.57±0.67 ⁴⁾
		20	398.24±0.11 ⁴⁾	6.01±0.44 ⁴⁾	6.19±1.66 ⁴⁾	4.24±0.62 ⁴⁾
		40	218.40±0.81 ⁴⁾	5.51±0.51 ⁴⁾	4.96±1.64 ⁴⁾	3.67±0.30 ⁴⁾
		60	142.27±0.82 ⁴⁾	4.21±0.20 ⁴⁾	3.52±0.33 ⁴⁾	2.61±0.33 ⁴⁾
		80	26.66±1.30 ⁴⁾	2.52±0.39 ⁴⁾	2.85±1.21 ⁴⁾	1.98±0.33 ⁴⁾



注:A.空白组;B.LPS组;C~E.LPS+小金丹组(20,40,60 mg·L⁻¹);F.空白组;G.IL-4组;H~J.IL-4+小金丹组(20,40,60 mg·L⁻¹)

图1 LPS和IL-4诱导的PI3K途径相关蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of markers of PI3K pathway expressions

表9 小金丹提取物对LPS诱导的RAW264.7细胞中PI3K-p110和p-Akt表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 9 Effect of XJD on expression of PI3K-p110 and p-Akt in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	LPS /mg·L ⁻¹	质量浓度 /mg·L ⁻¹	PI3K-p110 /GAPDH	p-Akt/Akt
空白组			0.33±0.09	0.85±0.07
LPS组	0.5		0.69±0.16 ²⁾	1.07±0.05 ²⁾
小金丹组	0.5	20	0.50±0.15 ³⁾	0.55±0.14 ⁴⁾
		40	0.37±0.13 ⁴⁾	0.45±0.19 ⁴⁾
		60	0.25±0.02 ⁴⁾	0.04±0.01 ⁴⁾

表10 小金丹提取物对IL-4诱导的PI3K-p110和p-Akt表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 10 Effect of XJD on expression of PI3K-p110 and p-Akt in IL-4 induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	IL-4 /μg·L ⁻¹	质量浓度 /mg·L ⁻¹	PI3K-p110 /GAPDH	p-Akt/Akt
空白组			1.83±0.12	0.78±0.05
IL-4组	20		2.47±0.04 ²⁾	1.27±0.03 ²⁾
小金丹组	20	20	1.35±0.02 ⁴⁾	1.11±0.01 ³⁾
		40	1.08±0.03 ⁴⁾	1.06±0.01 ³⁾
		60	0.76±0.04 ⁴⁾	1.04±0.01 ⁴⁾

4 讨论

巨噬细胞是具有高度异质性的一类免疫细胞,在体内不同微环境影响下,不同亚型巨噬细胞处于动态平衡,参与抗原呈递、吞噬和其他免疫调节过程,从而在肿瘤等疾病的发展中起关键作用^[1]。肿瘤微环境中的巨噬细胞受到细胞因子、分泌蛋白和生物小分子的刺激,表现出明显的表型和功能差异。M1型巨噬细胞可以分泌高水平的IL-1、IL-6、IL-12、IL-23、TNF-α等细胞因子,一氧化氮,趋化因子,促进炎症反应。M2型巨噬细胞可分泌高水平的IL-10、IL-13和TGF-β₁参与肿瘤生长、血管淋巴管形成,促进肿瘤转移^[2-3];同时M2型巨噬细胞可以通过减少抗原递呈,阻碍T细胞增殖,抑制NK细胞的迁移而抑制免疫应答^[13]。M1型和M2型巨噬细胞在肿瘤的各阶段均存在,既往研究认为巨噬细胞及分泌的细胞因子等炎症标志物与恶性肿瘤的发生发展和预后密切相关^[14]。已有实验研究也证实多种中药可以通过调节巨噬细胞极化,抑制炎症反应对多种组织来源的肿瘤发挥抑制作用^[15-17]。

小金丹方中草乌“通经络,寻蹊达径而直抵病所”(《药性论》),木鳖子“散血热、除痼毒”(《本草经疏》),两药能散寒邪之凝闭,宣湿浊之壅阻,祛凝结

之痰毒。五灵脂、乳香、没药能活血祛瘀,消肿定痛;当归能和血补血;白胶香与墨炭能调气血,消痼疽,化痰肿;地龙清热通络;麝香走窜通络,散结开壅,亦可引导诸药直达病所。诸药合用具有温经散寒通滞,祛痰化湿,化痰通络之功效,从而在防治乳腺癌及其转移方面显示独特疗效。已有文献报道小金丹通过增强巨噬细胞吞噬功能发挥抑制小鼠H22肝癌作用^[11];能降低乳腺癌患者血清细胞因子TNF-α、IL-6、IL-1β水平^[9];其中筛选的13种候选化学成分作用于PTGS1、PTGS2等炎症相关蛋白,调节前列腺素E₂的合成^[12],从而发挥抑制炎症反应的作用。本实验在LPS刺激诱导RAW264.7细胞M1型极化模型中,M1型巨噬细胞标志物NO、IL-6分泌增多及NO合成关键酶iNOS、IL-1β、COX-2、TNF-α mRNA表达升高;小金丹提取物能剂量依赖性下调iNOS、IL-1β、COX-2、TNF-α mRNA表达,降低NO和IL-6分泌,提示小金丹能抑制LPS诱导的小鼠RAW264.7细胞的M1型极化导致的炎症反应。本实验还采用IL-4刺激RAW264.7细胞后诱导巨噬细胞M2型极化模型评价小金丹的调节作用,结果发现它能明显抑制M2型巨噬细胞标志物CD206、Arg-1、IL-10、IL-13、TGF-β₁的表达,提示小金丹能逆转IL-4诱导的巨噬细胞M2型极化。由此推测小金丹可能通过调节巨噬细胞极化,抑制炎症反应,发挥其抑制乳腺癌生长及其转移的作用。

PI3K/Akt通路是细胞内重要的信号转导通路之一,PI3K通过由催化亚基p110和调节亚基p85组成具有类脂激酶和蛋白激酶双重活性的异源二聚体,激活Akt参与下游信号因子的调控,参与细胞增殖、凋亡,血管生成与免疫重塑以及炎症反应等过程^[18]。此通路的关键蛋白也是调节巨噬细胞M1/M2型活化的关键分子,以其为靶点的治疗策略为从肿瘤微环境角度治疗肿瘤提供新的切入点^[19]。本实验发现LPS和IL-4刺激后RAW264.7细胞PI3K/Akt通路均高度活化,小金丹提取物可以抑制此通路活化,主要表现在下调PI3K-p110蛋白表达,降低Akt磷酸化水平。提示小金丹调节LPS或IL-4诱导的巨噬细胞极化的作用可能与抑制PI3K/Akt途径活化有关。

综上所述,小金丹对LPS诱导RAW264.7细胞的M1型极化有抑制作用;同时能抑制IL-4诱导RAW264.7细胞的M2型极化,机制可能与降低PI3K/Akt通路的活化水平有关。由此提示,小金丹可能通过调节巨噬细胞极化作用重塑巨噬细胞表

型和功能,从而干预肿瘤微环境角度发挥抗肿瘤作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] GORDON S, TAYLOR P R. Monocyte and macrophage heterogeneity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(12):953-964.
- [2] LARIONOVA I, TUGUZBAEVA G, PONOMARYOVA A, et al. Tumor-associated macrophages in human breast, colorectal, lung, ovarian and prostate cancers [J]. *Front Oncol*, 2020, 10:566511.
- [3] WU K, LIN K, LI X, et al. Redefining tumor-associated macrophage subpopulations and functions in the tumor microenvironment [J]. *Front Immunol*, 2020, 11:1731.
- [4] 周菊英, 中西医结合治疗晚期乳腺癌86例临床观察 [J]. *山西中医*, 2000, 16(6): 30-31.
- [5] 苗文红, 小金丸联合OFDDT治疗晚期乳腺癌皮肤转移20例临床疗效观察 [J]. *现代肿瘤医学*, 2006, 14(9): 1097-1098.
- [6] 张超, 冯秀芳, 王秀云, 等. 小金丸联合多西他赛、表柔比星、环磷酰胺治疗Ⅲ期乳腺癌的疗效及对患者免疫功能的影响 [J]. *中国药房*, 2016, 27(15): 2059-2061.
- [7] 柳芳, 鞠海, 苗颖, 等. 小金丸及其组成药味抗肿瘤作用的研究进展 [J]. *中国药房*, 2015, 26(13): 1844-1846.
- [8] 吴迪, 邹莹, 邹晓东, 邹晓东教授中医辨治乳腺癌的思路 [J]. *光明中医*, 2018, 33(12): 1711-1713.
- [9] 范曲峰, 小金胶囊联合纤维乳管镜在乳腺炎患者中的疗效及对炎症因子的影响研究 [J]. *中外医学研究*, 2021, 19(10): 64-66.
- [10] 彭博, 贺蓉, 徐启华, 等. 小金丹抑制乳腺癌细胞转移及其机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(11): 4916-4919.
- [11] 谢佐福, 魏莉, 袁丁, 等. 小金丹对荷瘤小鼠NK细胞杀伤活性的影响 [J]. *福建中医学院学报*, 2006, 16(5): 42-43.
- [12] CAO B, LIN J, WU Z, et al. Mechanisms exploration of Xiaojin pills on lung cancer based on metabolomics and network pharmacology [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, 73(8):1071-1079.
- [13] KRNETA T, GILLGRASS A, ASHKAR A A. The influence of macrophages and the tumor microenvironment on natural killer cells [J]. *Curr Mol Med*, 2013, 13(1):68-79.
- [14] 陈蕊, 张俊勇, 赵琪. 炎症标志物与消化系统恶性肿瘤相关性的研究进展 [J]. *泰山医学院学报*, 2021, 42(4): 317-320.
- [15] NYIRAMANA M M, CHO S B, KIM E J, et al. Sea hare hydrolysate-induced reduction of human non-small cell lung cancer cell growth through regulation of macrophage polarization and non-apoptotic regulated cell death pathways [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(3):726.
- [16] ISLAM S U, LEE J H, SHEHZAD A, et al. Decursinol angelate inhibits LPS-induced macrophage polarization through modulation of the NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *Molecules*, 2018, 23(8):1880.
- [17] 王原来, 卞卡, 章丹丹. 肿瘤中巨噬细胞表型极化的调控机制及中药干预的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(2):180-184.
- [18] COSTA R, HAN H S, GRADISHAR W J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: A review [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2018, 169(3):397-406.
- [19] VERGADI E, IERONYMAKI E, LYRONI K, et al. Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization [J]. *J Immunol*, 2017, 198(3): 1006-1014.

[责任编辑 张丰丰]