

# 甘草甜素对 C57BL/6 小鼠脾脏中 DC 和巨噬细胞及其细胞因子分泌的影响

张梦欣<sup>1</sup>, 张杰森<sup>1</sup>, 李勇森<sup>1</sup>, 陈冰霞<sup>1</sup>, 韩孟伊<sup>1</sup>, 金晨曦<sup>2</sup>, 齐艳伟<sup>2</sup>

(1. 广州医科大学 第三临床学院, 广州 511436; 2. 广州医科大学 病原生物学与免疫学教研室, 广州 511436)

**摘要:** 为探讨甘草甜素(glycyrrhizic acid, GA)对 C57BL/6 小鼠脾脏 DC 和巨噬细胞数量及其细胞因子分泌的影响, 研究将小鼠分为对照组和 GA 组, 后者连续 4 d 同一时间皮下注射 GA, 对照组给予等量生理盐水注射。8 d 后处死两组小鼠并分离脾脏, 制备单细胞悬液, FACS 检测 DC、巨噬细胞及其表型 IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-10 的百分比。结果显示, GA 组小鼠脾脏中 DC[(0.92 $\pm$ 0.15)%]以及 DC 表达的细胞因子 IL-12[(1.15 $\pm$ 0.50)%]、IFN- $\gamma$ [(1.84 $\pm$ 1.25)%]与对照组[(1.06 $\pm$ 0.14)%、(1.16 $\pm$ 0.41)%、(2.12 $\pm$ 1.03)%]相比均呈现出减少的趋势, 但差异没有统计学意义( $P > 0.05$ ); 而 DC 表达的 IL-10[(0.40 $\pm$ 0.07)%]与对照组[(0.20 $\pm$ 0.04)%]相比明显升高( $P < 0.01$ ); 脾脏中巨噬细胞[(2.35 $\pm$ 0.48)%]较对照组[(1.43 $\pm$ 0.06)%]明显升高( $P < 0.01$ ); 巨噬细胞表达的细胞因子 IFN- $\gamma$ [(2.02 $\pm$ 0.23)%]、IL-12[(0.74 $\pm$ 0.24)%]与对照组[(2.55 $\pm$ 0.6)%、(1.31 $\pm$ 0.20)%]相比均明显减少( $P < 0.05$ ), 巨噬细胞表达的细胞因子 IL-10[(0.50 $\pm$ 0.05)%]较对照组[(0.35 $\pm$ 0.05)%]明显升高( $P < 0.05$ )。由此, 文章认为 C57BL/6 小鼠给予 GA 后, 可在一定程度上提高脾脏中巨噬细胞及其表达的 IL-10 水平和降低其表达的 IFN- $\gamma$ 、IL-12 水平, 也可提高 DC 表达的细胞因子 IL-10 的水平, 这提示 GA 在机体固有免疫反应中起一定的双向调节作用, 其主要通过提高巨噬细胞百分比发挥免疫作用, 以及通过抑制巨噬细胞的细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-12 表达和提高其与 DC 表面负性因子 IL-10 的表达发挥负性调节作用。

**关键词:** 甘草甜素; 脾脏; 固有免疫细胞; 细胞因子

**中图分类号:** R392.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-2478(2019)05-0397-05

目前, 在临床研究中利用药用植物治疗疾病已成为新的趋势<sup>[1]</sup>。作为传统草本植物的甘草, 由于其价格适中、提取工艺成熟, 从而被广泛应用<sup>[2-4]</sup>。甘草甜素(glycyrrhizic acid, GA)是甘草提取物之一, 具有很好的抗炎、抗氧化活性<sup>[5-7]</sup>, 而且近年来对其在抗病毒和抗菌方面的研究颇多, 如其能抗 HBV、HIV、流感病毒, 对革兰氏阳性球菌、革兰氏阳性芽胞杆菌及一些真菌、原虫的生长具有强大的抑制作用<sup>[8]</sup>。这些都可看出 GA 在机体免疫方面意义重大, 亦有研究表明 GA 是一种免疫调节剂, 以多种方式参与免疫反应<sup>[9]</sup>。脾脏是机体重要的免疫器官, DC 和巨噬细胞及其细胞因子是脾脏重要组成成分, 它们各司其职以维持机体正常的免疫功能。有学者研究发现一定浓度的 GA 对 NK-92MI 细胞的增殖起促进作用且加强其杀伤活性, IFN- $\gamma$

分泌量、IFN- $\gamma$  干扰素诱导蛋白 10、IFN- $\gamma$  mRNA、NK 细胞活化受体 mRNA 的表达水平则与其浓度有密切关系<sup>[10]</sup>。

众多研究者参与探究 GA 用于疾病治疗的作用, 如王金凤<sup>[11]</sup>用 GA 配合中药治疗寻常型银屑病, 发现其治疗有效率更高; 邱婷等<sup>[12]</sup>用 GA 和丁二磺腺苷蛋氨酸治疗肝内胆胆汁淤积性肝炎, 发现联合用药有更好的临床疗效。可见 GA 辅助治疗多种疾病的效果较好。本试验通过观察 GA 对小鼠脾脏 DC 和巨噬细胞数量以及相关细胞因子的影响, 探讨 C57BL/6 小鼠脾脏不同免疫细胞及其表型在 GA 作用下的变化, 为今后 GA 应用于临床治疗提供重要的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 6~8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠购于广州中医药大学实验动物中心。

1.1.2 试剂 红细胞裂解液、PBS 缓冲液、Hank's 液购自生工生物工程(上海)股份有限公司; FCS、RPMI 1640 基础培养液购自 Thermo Fisher Scientific

收稿日期: 2019-03-11

基金项目: 广州医科大学大学生创新创业训练项目(2018A036); 广州医科大学第三临床学院大学生科研项目(2018A0024)

作者简介: 张梦欣(1996-), 女, 本科生, 主要从事小鼠固有免疫研究

通信作者: 齐艳伟(E-mail: qiyawei@gzhmu.edu.cn)

公司; 抗小鼠 CD11b-APC-Cy7、CD11c-PerCP-Cy5.5、F4/80-PE-Cy7 流式抗体购自 Abcam 公司; 抗小鼠 IFN- $\gamma$ -FITC、IL-12-PE、IL-10-APC 流式抗体购自 Biolegend 公司; GA 购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.1.3 实验仪器 FACS Calibur 流式细胞仪, 购自 Beckman Coulter 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 动物饲养 实验动物饲养于标准的 SPF 环境中(温度 20~26 °C, 相对湿度 40%~70%), 自由饮食饮水。从 6~8 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠中取 10 只大小和体重相近的小鼠, 随机分为 GA 组和对照组, 每组 5 只。GA 组小鼠连续 4 d 同一时间皮下注射 GA 100  $\mu$ L (10  $\mu$ g/mL), 对照组给予等量生理盐水注射。实验操作符合广州医科大学实验动物伦理委员会要求。

1.2.2 标本采集 对照组和 GA 组分别皮下注射生理盐水和 GA 4 d, 第 8 天颈椎脱臼处死全部小鼠。小鼠浸泡于 75% 的酒精中消毒, 用镊子无菌钝性分离小鼠脾脏。

1.2.3 脾脏免疫细胞悬液制备 将分离出的脾脏置于 200 目筛网上, 加入 1 mL Hank's 液, 用注射器内芯研磨后将细胞悬液转移到离心管中, 离心弃上清液。用 Hank's 液洗涤脾脏细胞 2 次后加入红细胞裂解液裂解红细胞, 室温放置 5 min 后加入 5 mL Hank's 液终止裂红。加入 5 mL Hank's 液重悬, 离心后弃上清液。将上述操作所得细胞沉淀于 4 mL 含 5% FCS 的 RPMI 1640 培养液中重悬并置于 200 目筛网中过滤, 滤液转移到 15 mL 离心管中, 使用细胞计数板计算并记录脾脏细胞的密度。

1.2.4 FACS 检测细胞亚群水平 将细胞密度调整为 15 000 个/ $\mu$ L, 每孔体积 100  $\mu$ L; 用 200  $\mu$ L PBS 洗涤, 离心后弃上清液, 每孔加入 100  $\mu$ L PBS 重悬。按照说明书将适量流式抗体加入细胞悬液中, 涡旋振荡 15 s 以混合抗体和细胞; 4 °C 避光孵育 30 min 后用 2 mL PBS 缓冲液终止染色, 离心弃上清后重复洗涤细胞 1 次; 最后于 250  $\mu$ L 上机液中重悬细胞。使用 FACS 对染色细胞进行检测, 并用 CytExpert 软件分析检测结果。

1.2.5 FACS 检测胞内细胞因子水平 取密度为  $1.5 \times 10^6$  个/ $\mu$ L 的脾脏单细胞悬液置于流式管中, 加入 10% RPMI 1640 完全培养液和 2  $\mu$ L 10  $\mu$ g/mL 的 PMA 及 1  $\mu$ L 1 mg/mL 的离子霉素, 混匀。

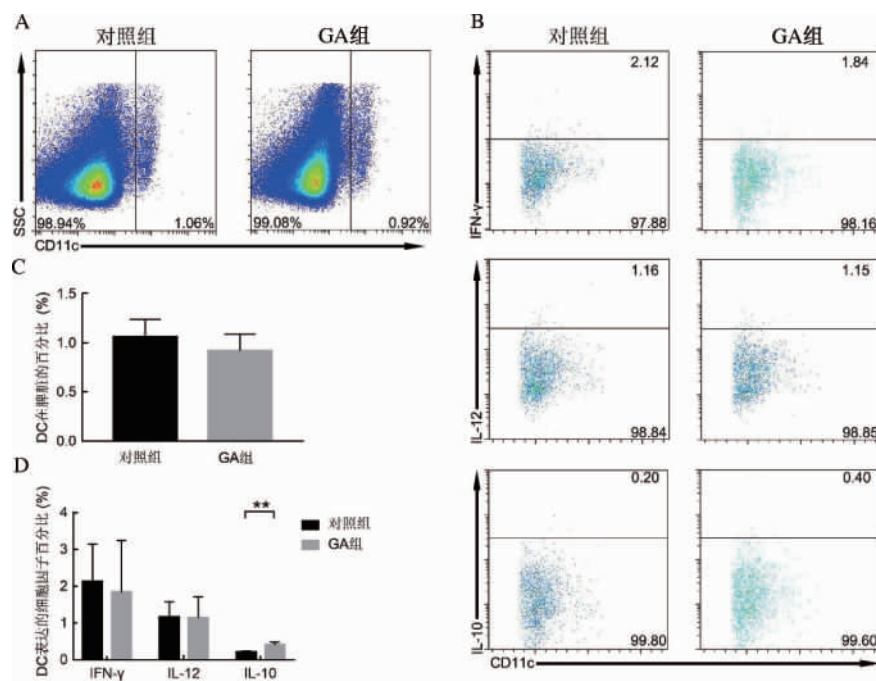
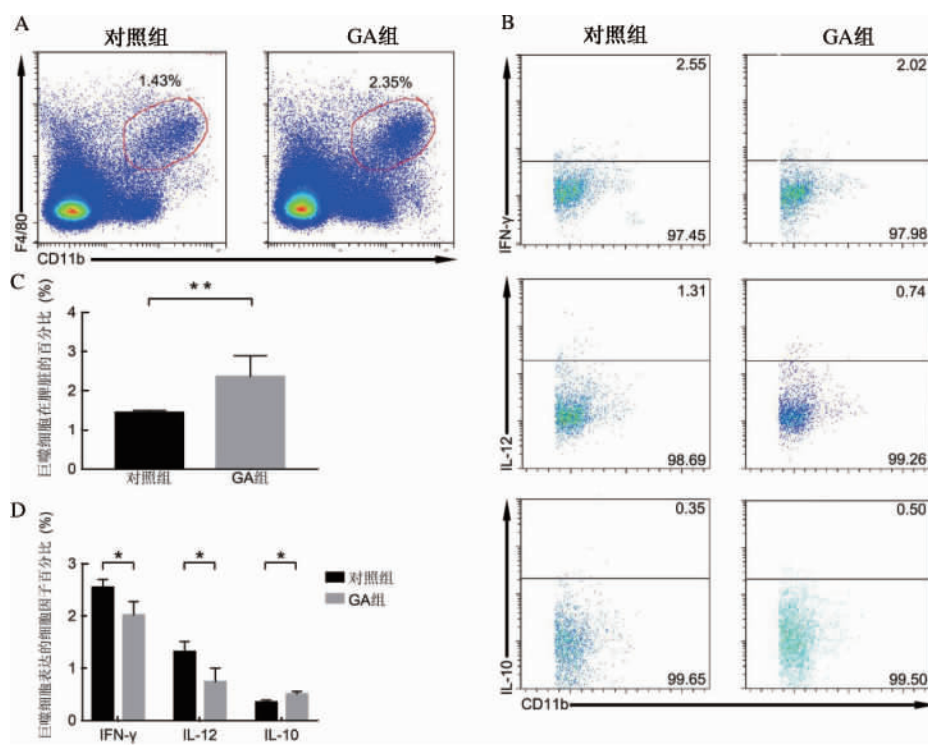
于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 1 h; 加 1  $\mu$ L 10  $\mu$ g/mL 的布雷非德菌素 A, 培养 4 h。加 PBS 溶液, 离心(600 $\times g$ 、4 °C、5 min)2 次, 弃上清, 加 100  $\mu$ L PBS 重悬。按照说明书要求加入适量流式抗体于细胞悬液中, 振荡混匀, 4 °C 避光孵育 30 min; 加 250  $\mu$ L 细胞固定液, 混匀, 4 °C 避光孵育 30 min。加 2 mL PBS 缓冲液, 离心(800 $\times g$ 、4 °C、8 min)。加 2 mL 胞内细胞因子染色缓冲液, 离心(800 $\times g$ 、4 °C、8 min)弃上清, 加 200  $\mu$ L 胞内细胞因子染色缓冲液重悬细胞, 4 °C 避光静置过夜。将抗胞内细胞因子抗体按照说明书用量加入对应细胞中, 混匀, 4 °C 避光孵育 30 min; 用 PBS 缓冲液终止染色, 离心(800 $\times g$ 、4 °C、8 min)弃上清后洗涤细胞 2 次, 加入细胞染色缓冲液重悬细胞, 用 FACS 检测并用 CytExpert 软件分析检测结果。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 20.0 软件, 对数据进行方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 DC 及其表达的细胞因子在小鼠脾脏中的百分比 通过 FACS 检测小鼠脾脏混悬液中 DC 的含量及其表达的细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-12 和 IL-10 的水平。结果显示, GA 组小鼠脾脏 DC 比例[(0.92 $\pm$ 0.15)%]显著低于对照组[(1.06 $\pm$ 0.14)%](图 1A、图 1C); DC 表达的细胞因子 IL-12 和 IFN- $\gamma$  的百分比分别为(1.15 $\pm$ 0.50)%、(1.84 $\pm$ 1.25)% (图 1B、图 1D), 较对照组[(1.16 $\pm$ 0.41)% 和 (2.12 $\pm$ 1.03)%]均减少, 但差异没有统计学意义( $P > 0.05$ ); 而 IL-10 百分比[(0.40 $\pm$ 0.07)%]较对照组[(0.20 $\pm$ 0.04)%]明显升高( $P < 0.01$ ) (图 1B、图 1D)。

2.2 巨噬细胞及其表达的细胞因子在小鼠脾脏中的百分比 在两组小鼠脾脏细胞中, GA 组小鼠脾脏巨噬细胞[(2.35 $\pm$ 0.48)%]与对照组[(1.43 $\pm$ 0.06)%]比较明显升高( $P < 0.01$ ) (图 2A、图 2C); GA 组脾脏巨噬细胞表达的细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-12 百分比分别为(2.02 $\pm$ 0.23)%、(0.74 $\pm$ 0.24)% (图 2B、图 2D), 与对照组[(2.55 $\pm$ 0.6)%、(1.31 $\pm$ 0.20)%]相比均显著降低, 而其表达的细胞因子 IL-10[(0.50 $\pm$ 0.05)%]较对照组[(0.35 $\pm$ 0.05)%]明显升高( $P < 0.05$ ) (图 2B、图 2D)。

图1 DC及其表达的细胞因子在小鼠脾脏中的百分比(\*\* $P < 0.01$ )图2 巨噬细胞及其表达的细胞因子在小鼠脾脏中的百分比(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

### 3 讨论

脾脏是机体富含免疫成分的一大器官, DC 是其重要成员之一, 它可识别、摄取、处理、提呈抗原, 也是激活 T 细胞发挥免疫功能的细胞之一<sup>[13]</sup>。巨噬细胞是机体发挥免疫功能最早的细胞, 也是单

核吞噬细胞系统成员, 参与机体固有免疫反应<sup>[14]</sup>。

GA 为甘草重要的成分之一, 其应用十分广泛, 是一种有效的免疫调节剂。它具有增强机体免疫功能, 促进免疫细胞活性和调节细胞因子表达及抗炎等作用, 以直接或间接的方式参与免疫反应。它主要通过提高巨噬细胞的吞噬功能和清除抑制性

巨噬细胞的抑制功能、双向调节 DC 等方式调节免疫反应<sup>[15]</sup>。有研究表明 GA 可抑制 DC 激活 T 细胞来减弱以 IFN- $\alpha$  为主导的细胞免疫反应, 调节细胞因子释放量以维持 Th1/Th2 平衡<sup>[16-17]</sup>, 从而调节免疫反应。此外, IFN- $\gamma$ 、IL-12 和 IL-10 等在免疫反应过程中也发挥重要作用, 其中 GA 可通过上调 IL-12 和调节其他细胞因子的表达水平来参与免疫应答。另外, Bordbar 等<sup>[18]</sup>也检测到 GA 与小鼠脾脏细胞体外共培养后 DC 表面 CD40、CD86 等分子表达升高, 培养液中 IFN- $\gamma$ 、IL-10 含量也增加。

本试验结果显示, GA 组小鼠脾脏巨噬细胞百分比及其表达的细胞因子 IL-10 水平升高, 而其表达的 IFN- $\gamma$ 、IL-12 水平降低; 脾脏中 DC 百分比及其表达的 IFN- $\gamma$ 、IL-12 水平下降不明显, 但其表达的细胞因子 IL-10 的百分比升高。以上提示 GA 可通过提高巨噬细胞百分比来发挥免疫作用, 同时也可抑制巨噬细胞的细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-12 表达, 以及提高其与 DC 表面负性因子 IL-10 的表达发挥负性调节作用。王晓利等<sup>[9]</sup>研究表明, 高浓度的 GA 可抑制小鼠巨噬细胞分泌 IL-4、TGF- $\beta$ , 低浓度时 GA 浓度变化对其影响不大。Kato 等<sup>[19]</sup>的研究发现, 与 LPS 联用时, 低浓度 GA 能使小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 产生前列腺素等, 而高浓度则起抑制作用, 表明 GA 的免疫调节作用与浓度有关。不同机体环境下, GA 对 DC 的调节具有双向性<sup>[19]</sup>。本试验结果与其他研究者存在差异, 提示可能是本试验注射 GA 的浓度较高引起的。

综上, GA 可在机体固有免疫反应中起一定作用, 主要通过提高巨噬细胞百分比发挥免疫作用, 另外其也可通过抑制巨噬细胞表达细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-12 和上调其与 DC 表面负性因子 IL-10 的表达水平来发挥负性调节作用。

## 参考文献

- [1] 牟感恩, 贾艺悦, 李园园, 等. 甘草甜素镁对小鼠辐射损伤的防护作用[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2018, 36(3): 3-9.
- [2] Yang R, Yuan BC, Ma YS, *et al.* The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb[J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 5-18.
- [3] 张明发, 沈雅琴. 甘草酸类和甘草黄酮类化合物对心脏保护作用的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(4): 429-434.
- [4] 张胜. 甘草在《伤寒论》中用义浅探[J]. 河南中医药学报, 2001, 4: 7-8.
- [5] Wu TY, Khor TO, Saw CL, *et al.* Anti-inflammatory/Anti-oxidative stress activities and differential regulation of Nrf2-mediated genes by non-polar fractions of tea *Chrysanthemum zawadskii* and licorice *Glycyrrhiza uralensis*[J]. *AAPS J*, 2011, 13(1): 1-13.
- [6] Takhshid MA, Mehrabani D, Ai J, *et al.* The healing effect of licorice extract in acetic acid-induced ulcerative colitis in rat model[J]. *Comp Clin Path*, 2012, 21(6): 1139-1144.
- [7] 王肖娜, 金玉姬, 刘洋, 等. 甘草甜素的应用及研究现状[J]. 吉林医药学院学报, 2014, 35(2): 144-147.
- [8] 王小丽, 陈思东. 甘草酸作用的研究进展[J]. 中国医药导报, 2012, 9(24): 20-21; 23.
- [9] 王晓利, 廖成水, 程源斌, 等. 甘草甜素甘草多糖和光甘草定对小鼠巨噬细胞的毒性与免疫功能的调节[J]. 中国兽医学, 2014, 44(3): 320-325.
- [10] 崔敬惠. 甘草甜素增强 NK92-M1 细胞杀伤功能机制的研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2012.
- [11] 王金凤. 中药联合甘草甜素片治疗寻常型银屑病疗效观察[J]. 中国处方药, 2018, 16(3): 102-103.
- [12] 邱婷, 金燕. 甘草甜素片联合腺苷蛋氨酸治疗肝胆汁淤积性肝炎的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(11): 2161-2164.
- [13] 张晗, 罗清琼, 朱丽萍, 等. 芍药苷抑制骨髓源性树突状细胞的成熟及功能[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(24): 3015-3018.
- [14] 郑晓纯, 白丽. 巨噬细胞与肿瘤发展及其靶向治疗[J]. 国际免疫学杂志, 2018, 41(6): 659-664.
- [15] 吴巧珍, 黄建安. 甘草酸免疫调节机制研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2013, 36(4): 276-280; 286.
- [16] Chan HT, Chan C, Ho JW. Inhibition of glycyrrhizic acid on aflatoxin B-1-induced cytotoxicity in hepatoma cells[J]. *Toxicology*, 2003, 188(2/3): 211-217.
- [17] Lin JC. Mechanism of action of glycyrrhizic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication *in vitro* [J]. *Antiviral Res*, 2003, 59(1): 41-47.
- [18] Bordbar N, Karimi MH, Amirghofran Z. The effect of glycyrrhizin on maturation and T cell stimulating activity of dendritic cells[J]. *Cell Immunol*, 2012, 280(1): 44-49.
- [19] Kato T, Horie N, Hashimoto K, *et al.* Bimodal effect of glycyrrhizin on macrophage nitric oxide and prostaglandin E2 production[J]. *In Vivo*, 2008, 22(5): 583-586.

## Effects of glycyrrhizin acid on DC, macrophages and their production of cytokines in spleen of C57BL/6 mouse

ZHANG Meng-xin<sup>1</sup>, ZHANG Jie-sen<sup>1</sup>, LI Yong-sen<sup>1</sup>, CHEN Bing-xia<sup>1</sup>, HAN Meng-yi<sup>1</sup>, JIN Chen-xi<sup>2</sup>, QI Yan-wei<sup>2</sup> (1. *The Third Clinical School, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China*; 2. *Department of Pathogenic Biology and Immunology, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China*)

**Abstract:** In order to explore the effects of glycyrrhizic acid(GA) on the number of spleen DCs and macrophages, as well as the secretion of cytokines in C57BL/6 mice, the mice were divided into control group and GA group. The GA group was injected subcutaneously with GA at the same time for four consecutive days, and the control group was given the same amount of physiological saline. 8 d later, both groups were sacrificed and the spleens were isolated to prepare single cell suspension. The percentages of DCs, macrophages and their phenotypes in terms of IFN- $\gamma$ , IL-12 and IL-10 expressions were determined by FACS. The results showed that, compared with the control group [(1.06 $\pm$ 0.14)%, (1.16 $\pm$ 0.41)%, (2.12 $\pm$ 1.03)%], the percentages of DC [(0.92 $\pm$ 0.15)%] and its cytokines IL-12 [(1.15 $\pm$ 0.50)%] and IFN- $\gamma$  [(1.84 $\pm$ 1.25)%] in the GA group were decreased, but the difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). The level of IL-10 [(0.40 $\pm$ 0.07) %] was higher than that in the control group [(0.20 $\pm$ 0.04) %] ( $P < 0.01$ ). The percentage of macrophages in the spleen [(2.35 $\pm$ 0.48) %] was significantly higher than that in the control group [(1.43 $\pm$ 0.06) %] ( $P < 0.01$ ). The percentages of cytokines IFN- $\gamma$  and IL-12 [(2.02 $\pm$ 0.23)%, (0.74 $\pm$ 0.24)%] expressed by macrophages were significantly decreased compared with the control group [(2.55 $\pm$ 0.6)%, (1.31 $\pm$ 0.20)%] ( $P < 0.05$ ). But the level of IL-10 [(0.50 $\pm$ 0.05)%] expressed by macrophages was higher than that in the control group [(0.35 $\pm$ 0.05)%] ( $P < 0.05$ ). Therefore, it seems that the administration of GA in C57BL/6 mice can increase the number of macrophages and the level of IL-10 expressed in the spleen and decrease the levels of IFN- $\gamma$  and IL-12, and also increase the level of IL-10 expressed by DC. Our study suggests that GA plays a two-way regulation of the body's innate immune response, mainly by increasing the percentages of macrophages to exert immunity, inhibiting IFN- $\gamma$ , IL-12 expressed by macrophages and increasing the IL-10 expressed by macrophage and DC to play a negative regulatory role.

**Key words:** glycyrrhizic acid; spleen; innate immune cell; cytokine