

甘草酸对巨噬细胞抗绵羊肺炎支原体感染的调控作用研究

高力扬¹, 张 凯¹, 王巧辉², 裴佳瑞², 马泽华², 李 敏^{1*}

¹宁夏大学生命科学学院 宁夏大学西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室; ²宁夏大学新华学院, 银川 750021

摘要:为观察甘草酸在小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 抗绵羊肺炎支原体 (*Mycoplasma ovipneumoniae*, MO) 感染中的作用, 实验利用 CCK-8 细胞活性检测找到最佳甘草酸处理浓度; 检测甘草酸对受 MO 感染的巨噬细胞活性的影响。流式细胞仪检测甘草酸对 RAW264.7 巨噬细胞生长周期的影响; ELISA 检测甘草酸对受 MO 感染的巨噬细胞分泌 TNF- α 的影响; Western blot 检测细胞凋亡因子 Bax、Bad 的表达情况。RT-PCR 检测凋亡和自噬相关基因的表达情况。结果显示, 浓度为 12 $\mu\text{mol/L}$ 的甘草酸显著升高 RAW264.7 的活性 ($P=0.0129$), 且处于 G1 期的细胞数减少, G2 期的细胞数增加。甘草酸 (12 $\mu\text{mol/L}$) 可提高受 MO 感染的 RAW264.7 的增殖率 ($P=0.0340$), 培养上清中 TNF- α 含量升高 ($P=0.0152$), 巨噬细胞中促凋亡蛋白 Bax 表达量增加, 但基因 caspase 3 和 caspase 9 的表达量显著下调 ($P<0.0001$), 自噬相关基因 Atg 7 和 Beclin 1 表达量显著升高 ($P<0.0001$)。结果提示在 MO 感染巨噬细胞引起免疫抑制的情况下, 甘草酸可通过促增殖、抑凋亡、促进 TNF- α 的表达、增加自噬来起到免疫调控作用。

关键词:绵羊肺炎支原体; 巨噬细胞; 甘草酸; 自噬; 免疫调控

中图分类号: R285.5; R965

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)6-1075-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.6.023

The effects of glycyrrhizic acid on *Mycoplasma ovipneumoniae*-infected macrophages

GAO Li-yang¹, ZHANG Kai¹, WANG Qiao-hui², PEI Jia-rui², MA Ze-hua², LI Min^{1*}

¹Key Lab of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, Ningxia University;

²XinHua College of Ningxia University, Yinchuan 750021, China

Abstract: This study was designed to investigate the role of glycyrrhizic acid in the infection of the mouse macrophage cell line RAW264.7 against *Mycoplasma ovipneumoniae* (MO). The optimal concentration of glycyrrhizic acid was determined by CCK-8 cell activity assay and the effects of glycyrrhizic acid on the activity of MO-infected macrophages were examined. The effect of glycyrrhizic acid on the growth cycle of RAW 264.7 macrophages was detected by flow cytometry. On the other hand, the effect of glycyrrhizic acid on the secretion of TNF- α by MO-infected macrophages was detected by ELISA. The expression of apoptosis factors Bax and Bad were detected by Western blot. RT-PCR was used to detect the expression of apoptosis and autophagy related genes. The results showed that glycyrrhizic acid at a concentration of 12 $\mu\text{mol/L}$ significantly increased the activity of RAW264.7 ($P=0.0129$). In cell cycle experiment, it is found that the number of cells treated with glycyrrhizic acid in the G1 phase decreased while the number of cells in the G2 phase increased. Glycyrrhizic acid (12 $\mu\text{mol/L}$) increased the proliferation rate of MO-infected RAW264.7 ($P=0.0340$). The ELISA test resulted in an increase of TNF- α content in culture supernatant ($P=0.0152$). Western Blot analysis to examine the expression level of proapoptotic protein was done and Bax protein was found increase in macrophages. For RT-PCR, it was found that the expression levels of Caspase 3 and Caspase 9 were significantly down-regulated ($P<0.0001$), however the expression levels of autophagy-related genes Atg 7 and Beclin 1 were significantly increased ($P<0.0001$). The results suggest that glycyrrhizic acid can play an immunoregulatory role by promoting proliferation, inhibiting apoptosis, promoting the expression of TNF- α and increasing autophagy in the case of MO-infected macrophages.

收稿日期: 2018-09-07 接受日期: 2019-02-18

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (31460039); 国家自然科学基金地区项目 (31260035); 宁夏回族自治区重点研发计划 (2017BN04); 宁夏大学西部一流大学重大创新项目 (ZKZD2017001); 宁夏大学研究生创新项目 (GIP2018036)

* 通信作者 Tel: 86-951-2062976; E-mail: lim@nxu.edu.cn

Key words: *Mycoplasma ovipneumoniae*; macrophages; glycyrrhizic acid; autophagy; immunoregulation

绵羊肺炎支原体 (*Mycoplasma ovipneumoniae*, MO) 是引起绵羊、山羊传染性胸膜肺炎及增生性间质性肺炎的病原体,对宁夏滩羊养殖业危害较大。大环内酯类抗生素、泰乐菌素、红霉素及阿奇霉素等对绵羊支原体肺炎具有减缓病情的作用,但无法根治该病,而且易产生耐药性。以往研究发现支原体对机体有免疫抑制作用,主要体现在:促进巨噬细胞凋亡^[1,2],影响炎症因子表达^[-3,4],抑制巨噬细胞自噬^[5]。甘草酸提取于甘草根部,是甘草中最主要的活性成分,可溶于水,分子式为 $C_{42}H_{62}O_{16}$,可以水解为 2 分子葡萄糖醛酸和 1 分子甘草次酸。目前研究显示甘草提取物有抑菌能力^[6,7],增强鸡巨噬细胞吞噬和清除胞内沙门氏菌的能力^[8],对治疗病毒性肝炎^[9]、抑制铜绿假单胞菌^[10]、鸡混合艾美耳球虫感染的免疫调节有一定作用^[11],而且可以抑制猪嗜血支原体对红细胞的黏附^[12]。然而甘草酸对天然免疫细胞的影响尚不明确,因此本研究聚焦甘草酸在巨噬细胞抗 MO 感染中发挥的作用,为利用增强天然免疫的方式来预防绵羊支原体肺炎提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

胎牛血清购自全式金公司,高糖 DMEM、胰酶、PBS 购自 Hyclone 公司;青霉素-链霉素双抗、马血清购自 Solarbio 公司;CCK-8 细胞活性检测试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天公司;mRNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司;凋亡及自噬相关基因引物由 Sangon Biotech 公司合成;Real-time PCR 相关试剂盒购自 TaKaRa 公司;Bad 抗体、Bax 抗体、肿瘤坏死因子 (TNF- α) ELISA 检测试剂盒、Western Blot 显色剂、DMSO、NanoDrop 8000 设备、QuantStudio 5 设备购自 Thermo Fisher 公司;GAPDH 购自北京义翘神州科技有限公司;支原体培养基基础、支原体肉汤培养基购自青岛海博生物技术有限公司;甘草酸使用 PBS 配制为 12、1.2、120、12 μ M 浓度。全波段酶标仪购自美国 BIO-RAD 公司;CO₂ 细胞培养箱购自日本 SANYO 公司;多模式微孔板检测仪购自 PerkinElmer 公司;流式细胞仪购自德国 Sysmex 公司。

1.2 甘草酸的配制

称取甘草酸粉末溶于温 PBS 中,涡旋震荡溶解

后用 0.22 μ m 的过滤器过滤,配制成终浓度为 120 mM 的甘草酸储存液,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 实验分组

本实验一共分为对照组、甘草酸处理组、MO 感染组、甘草酸/MO 感染组。其中对照组及 MO 感染组分别加入与甘草酸处理组、甘草酸/MO 感染组稀释前甘草酸储存液相同体积的 PBS 缓冲液作为参照。

1.4 细胞培养

小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7 采用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素混合液的高糖 DMEM 培养液于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养。1~2 天进行传代处理,取生长状态良好的细胞进行后续实验。

1.5 CCK-8 细胞活性检测

接种 2 000~5 000 个细胞悬浮于 100 μ L 培养基中,接种于 96 孔板中,置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,每孔加入 10 μ L CCK-8 检测试剂,于培养箱内孵育 1~4 h 后用全波段酶标仪 450 nm 波长处测定吸光值。

1.6 Western blot

将各个分组中细胞裂解后采用 BCA 蛋白定量检测试剂盒检测蛋白浓度,配平后加入蛋白上样缓冲液金属浴 100 $^{\circ}$ C 保持 5 min。Bad、Bax、GAPDH 一抗 1:1 000 稀释,4 $^{\circ}$ C 下孵育 12 h,二抗 1:10 000 稀释后室温下孵育 2 h 后上机检测。

1.7 Real-time PCR

将各个分组中细胞裂解后采用 mRNA 提取试剂盒对细胞 mRNA 进行提取,NanoDrop 8 000 进行浓度测定后利用反转录试剂盒反转录获取 cDNA,按照 TaKaRa Real-time PCR 试剂盒说明利用 QuantStudio 5 设备对凋亡及自噬相关基因表达量进行测定。

1.8 ELISA

取各个分组细胞培养上清用于 ELISA 检测,TNF- α 检测步骤参照试剂盒内说明书,酶标仪读取 450 nm 处 OD 值。

1.9 细胞周期检测

实验分为 2 组,分别为对照组和甘草酸处理组,培养 24 h 后收集细胞于 1 mL 预冷的 70% 乙醇中-20 $^{\circ}$ C 固定一夜。采用细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒处理两组细胞,然后用流式细胞仪检测细胞周期。

表 1 Real-time qPCR 引物序列

Table 1 The Real-time qPCR primer sequences

Gene	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
Caspase 3	GAGCTTGGAAACGCTACGCT	GTCCACTGACTTGCTCCCAT
Caspase 8	GGCCACAGGTTACAGCTCTT	CATCCTCGATGGTCTCCTGC
Caspase 9	ATTCAGCAGGCAGGATCTGG	GGCCTGTCTCTCTAAGCAG
Atg 7	TCAAGAGACCCAAGCTGCTG	TGGAGATCAGGACCAGGGAG
Beclin 1	AGCAGCTGGAGTTGGATGAC	CCAGATGTGGAAGGTGGCAT
GAPDH	TTCACCACCATGGAGAAGGC	CTCGTGTTTCACACCGATCA

1.10 MO 培养

支原体培养基基础 33 g 溶解于 1 L 蒸馏水中,高压后冷却至室温,加入 20% 马血清、80 万单位氨苄青霉素、1% 醋酸铊 10 mL,充分混匀后分装于 50 mL 离心管中,置于 -20 °C 冰箱保存。Y98 标准株培养于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中,待培养基颜色由红色变为橙黄色 (pH6.8) 左右时 1:5 传代培养。MO 浓度采用颜色变化单位测定法 (colour change unit, CCU) 计算,即十倍梯度稀释 MO 菌液后观察 MO 培养基颜色变化,以最后发生颜色改变的稀释倍数为待检的 MO 菌液的 CCU。

1.11 甘草酸处理 RAW264.7

将预先配置好的甘草酸储存液用新鲜的细胞培养液稀释到合适浓度,然后用稀释好的甘草酸对待处理细胞进行换液处理,空白对照组将所用甘草酸储存液相应体积的 PBS 用新鲜培养液进行同比稀释处理并对待处理细胞进行换液。

1.12 MO 侵染 RAW264.7

RAW264.7 细胞对数生长时,以 5×10^6 的密度接种于 10 cm 细胞培养皿中,待细胞贴壁且生长状态良好,12 000 rpm,10 min 离心收集 MO 并用新鲜细胞培养液将 MO 重悬后按感染复数 MOI = 10:1 加入待感染的细胞,并置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后分别提取各个分组细胞的总蛋白及总 mRNA 进行后续实验。

1.13 统计学分析

统计学软件采用 GraphPad Prism 7.04,两组数据之间采用 T tests 非参数检验法统计,三组及三组以上数据采用单因素方差分析法进行统计学分析。

2 结果

2.1 甘草酸对巨噬细胞 RAW264.7 的毒性检测

为了验证不同浓度甘草酸对巨噬细胞活性的影响,我们采用 12、1.2、120、12 μM 浓度的甘草酸-PBS 溶液处理 RAW264.7 细胞,培养 24 h 后用

CCK-8 法检测细胞活性(图 1)。结果显示与对照组相比浓度为 120、12 μM 的甘草酸显著提高 RAW 264.7 巨噬细胞活性($P < 0.000 1$, $P = 0.012 9$);而 12、1.2 mM 高浓度甘草酸与对照组相比显著抑制 RAW264.7 巨噬细胞存活($P < 0.000 1$)。因此本实验采用最小浓度 12 μM 甘草酸溶液处理细胞。

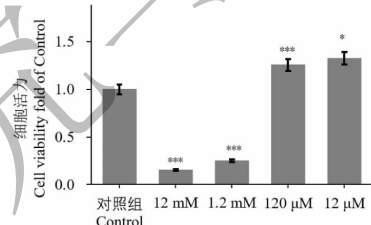


图 1 筛选适合 RAW264.7 巨噬细胞的甘草酸处理浓度
Fig. 1 Optimal concentration for glycyrrhizic acid to treat RAW264.7 macrophages.

注:(120 μmol/L) *** $P < 0.000 1$ vs 对照组;(12 μmol/L)

* $P = 0.012 9$ vs 对照组;(12 mmol/L,1.2 mmol/L)

*** $P < 0.000 1$ vs 对照组。

Note:(120 μmol/L) *** $P < 0.000 1$ vs Control;(12 μmol/L)

* $P = 0.012 9$ vs Control;(12 mmol/L,1.2 mmol/L)

*** $P < 0.000 1$ vs Control.

2.2 甘草酸对 RAW 264.7 巨噬细胞细胞周期的影响

图 2 为流式细胞仪检测甘草酸处理前后 RAW264.7 巨噬细胞周期,结果显示:与未处理组相比甘草酸处理后,处于 G1 期的细胞数量减少,S 期细胞数量减少,G2 期细胞数量增加。

2.3 甘草酸对受 MO 感染的 RAW 264.7 巨噬细胞细胞活性的影响

取 CCU 浓度为 1×10^7 生长良好的 MO,按照 MOI 值为 10:1 感染 RAW264.7 细胞。实验分为无感染对照组,MO 感染组,经甘草酸处理的 MO 感染组,分别培养 24 h 后检测细胞活性。结果显示与对照组相比 24 h 内 MO 没有显著抑制 RAW264.7 的

生长($P=0.6594$),加入甘草酸组中 RAW264.7 巨噬细胞增殖显著增加($P=0.0217$,图3)。

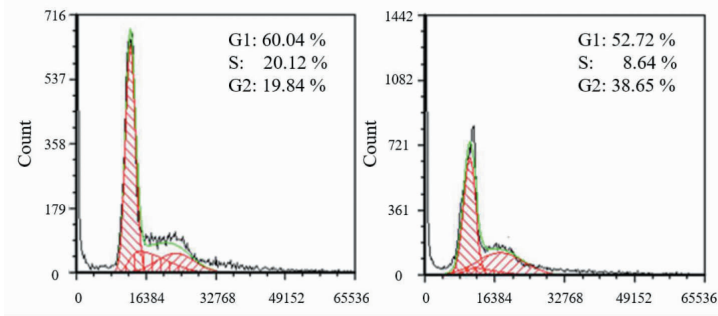


图2 甘草酸处理前后巨噬细胞周期。

Fig. 2 Cell cycle in non-treated and glycyrrhizic acid treated macrophages

注:左侧为未处理组,右侧为甘草酸处理组。

Note: The left side is the untreated group, and the right side is the glycyrrhizic acid treated group.

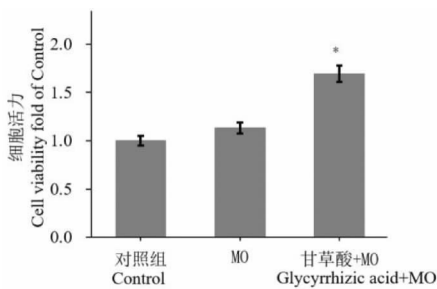


图3 甘草酸对受 MO 感染的 RAW264.7 巨噬细胞活性的影响。

Fig. 3 Effect of glycyrrhizic acid on cell viability of MO-infected RAW264.7 macrophages

注: $P=0.6594$ MO 感染组 vs 对照组;

* $P=0.0217$ 甘草酸+MO 组 vs 对照组。

Note: $P=0.6594$ MO treated vs Control;

* $P=0.0217$ glycyrrhizic acid+MO treated vs Control.

2.4 甘草酸调控 MO 感染后巨噬细胞中 TNF- α 的分泌

为了验证甘草酸对巨噬细胞炎症因子分泌的影响,本实验采用 ELISA 分析巨噬细胞上清液中的 TNF- α 的表达量(图4)。结果显示与对照组相比 MO 感染后巨噬细胞 TNF- α 的表达量显著下降($P < 0.0001$),而正常巨噬细胞在甘草酸处理后 TNF- α 的表达量也会显著降低($P = 0.0097$),但加入甘草酸的巨噬细胞被 MO 感染后,细胞上清中 TNF- α 表达量有所上升($P < 0.05$)。

2.5 甘草酸对受 MO 感染后巨噬细胞凋亡相关基因的表达的影响

为了研究 MO 对巨噬细胞凋亡的影响,以及甘草酸在此过程中的作用,本实验采用 Real-time PCR

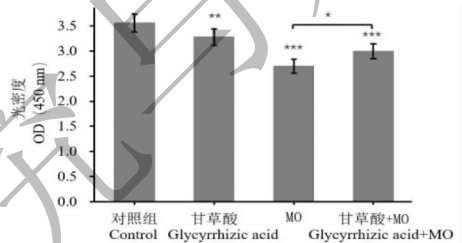


图4 巨噬细胞培养上清中 TNF- α 的分泌

Fig. 4 Secretion of TNF- α in macrophage culture supernatant

注:*** $P < 0.0001$ MO 感染组 vs 对照组; ** $P = 0.0097$ 甘

草酸组 vs 对照组; * $P < 0.05$ MO 感染组 vs 甘草酸+MO 组。

Note: *** $P < 0.0001$ MO treated vs Control; ** $P = 0.0097$ glycyrrhizic acid treated vs Control;

* $P < 0.05$ MO treated vs glycyrrhizic acid + MO treated.

法检测凋亡相关基因 caspase 3、caspase 8、caspase 9 的表达情况(图5)。结果显示,与 Control 组相比巨噬细胞中凋亡相关基因 caspase 3 的表达在 MO 感染后上调($P < 0.0001$),caspase 8 无显著变化($P = 0.3479$),caspase 9 表达量下调($P < 0.0001$)。与 MO 组相比受 MO 感染的巨噬细胞中经甘草酸处理后 caspase 3、caspase 8 的表达量均显著下调($P < 0.0001$),caspase 9 则无显著变化($P = 0.4246$)。

2.6 甘草酸对受 MO 感染后巨噬细胞凋亡相关蛋白的表达的影响

为了进一步研究 MO 对巨噬细胞凋亡的影响,以及甘草酸在此过程中的作用,本实验采用 Western blot 法检测凋亡蛋白 Bax、Bad 的表达情况(图6)。结果显示,与对照组相比巨噬细胞中促凋亡蛋白 Bax 的表达在 MO 感染后上调,而加入甘草酸处理不会引起正常巨噬细胞 Bax 蛋白的表达,但在受 MO

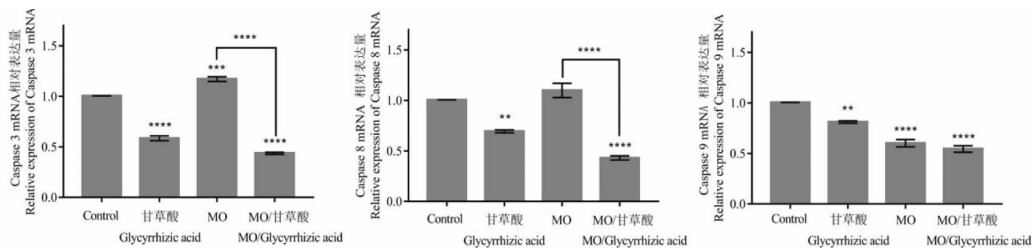


图5 凋亡相关基因在巨噬细胞中的表达情况。

Fig. 5 Expression of apoptosis-related genes in macrophages.

注:(Caspase 3) $*** P < 0.000 1$; (Caspase 8) $P = 0.347 9$; (Caspase 9) $**** P < 0.000 1$ MO组 vs Control.

(Caspase 3、Caspase 8) $**** P < 0.000 1$; (Caspase 9) $P = 0.424 6$ MO/甘草组 vs MO组。

Note: (Caspase 3) $*** P < 0.000 1$; (Caspase 8) $P = 0.347 9$; (Caspase 9) $**** P < 0.000 1$ MO treated vs Control. (Caspase 3、Caspase 8) $**** P < 0.000 1$; (Caspase 9) $P = 0.424 6$ MO/ glycyrrhizic acid treated vs MO treated.

感染的巨噬细胞中,甘草酸不能改善 MO 引起的巨噬细胞 Bax 蛋白表达($P = 0.076 3$)。Bad 蛋白在

正常巨噬细胞中弱表达,在 MO 处理组中无表达,但甘草酸处理组表达量较高($P < 0.000 1$)。

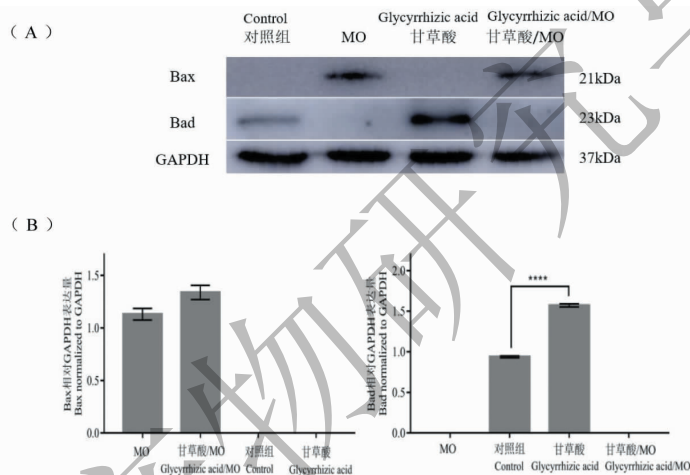


图6 促凋亡因子在巨噬细胞中的表达情况。

Fig. 6 Expression of pro-apoptotic factors in macrophages. (A) images of Western blot results. (B) quanlitative analysis of bands by ImageJ software.

注:(Bax) $P = 0.076 3$ MO组 vs 甘草酸/MO组;(Bad) $**** P < 0.000 1$ 对照组 vs 甘草酸。

Note: (Bax) $P = 0.076 3$ MO treated vs MO/ glycyrrhizic acid treated; (Bad) $**** P < 0.000 1$ Control vs glycyrrhizic acid treated.

2.7 甘草酸对受 MO 感染后巨噬细胞自噬相关基因的表达的影响

为了研究 MO 对巨噬细胞自噬的影响,以及甘草酸在此过程中的作用,本实验采用 Real-time PCR 法检测自噬相关基因 Atg 7、Beclin 1 的表达情况(图 7)。结果显示,与 Control 组相比受 MO 感染的巨噬细胞中经甘草酸处理后自噬相关基因 Atg 7 的表达量显著上调($P < 0.000 1$),Beclin 1 表达量显著上调($P = 0.001 6$);与 MO 组相比 MO/甘草酸组自噬相关基因 Atg 7、Beclin 1 的表达量均显著上调($P < 0.000 1$)。

3 讨论

研究结果显示,高浓度甘草酸溶液对细胞有抑制作用,但 $12 \mu\text{mol/L}$ 甘草酸溶液可以促进 RAW264.7 巨噬细胞增殖。以往研究发现支原体感染可使巨噬细胞活力下降,感染后期巨噬细胞凋亡,从而破坏宿主免疫系统对原发感染和继发感染的控制,使得炎症得以扩散和蔓延^[13]。甘草酸处理后细胞周期 G1 期、S 期细胞数量减少,而进入 G2 期的细胞数量增加,结合细胞增殖检测,提示甘草酸可能通过调节细胞周期来促进巨噬细胞的细胞增殖,从而对巨噬细胞抗 MO 感染有一定积极作用。在细胞凋

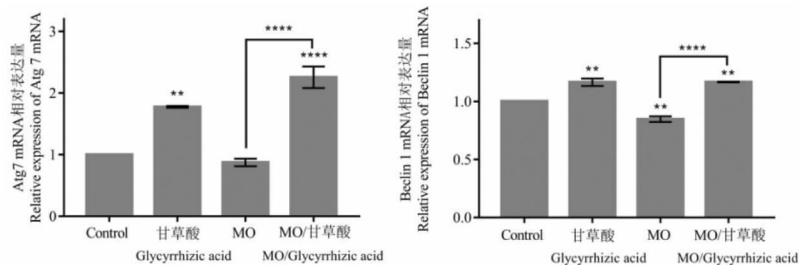


图7 自噬相关基因在巨噬细胞中的表达情况

Fig. 7 Expression of autophagy-related genes in macrophages

注: (Atg 7) **** $P < 0.0001$; (Beclin 1) ** $P = 0.0016$ MO/甘草酸组 vs Control. (Atg 7, Beclin 1)

**** $P < 0.0001$ MO/甘草酸组 vs MO 组。

Note: (Atg 7) **** $P < 0.0001$; (Beclin 1) ** $P = 0.0016$ MO/ glycyrrhizic acid treated vs Control. (Atg 7, Beclin 1)

**** $P < 0.0001$ MO/ glycyrrhizic acid treated vs MO treated.

亡方面, caspase 半胱氨酸蛋白酶家族引发的级联反应是介导细胞凋亡的中心环节, 通过选择性地切割某些蛋白质使靶蛋白活化或失活, 从而介导下游的细胞凋亡过程^[14,15]。本实验验证了 caspase 家族的重要成员 caspase 3, caspase 8, caspase 9 在甘草酸参与的巨噬细胞应对 MO 感染中的作用。实验发现甘草酸可以抑制凋亡基因 caspase 3、caspase 8、caspase 9 在正常巨噬细胞中的表达。蛋白检测发现促凋亡因子 Bax 表达在正常组和甘草酸处理组均无明显表达, 而在 MO 处理后表达量明显升高, 提示 MO 感染可能会引起巨噬细胞凋亡。实验结果提示甘草酸处理可以减少巨噬细胞凋亡因子的表达, 从而增加 MO 处理后的巨噬细胞活性。

本课题组前期研究发现, MO 可能通过抑制巨噬细胞自噬而减少巨噬细胞对 MO 的清除^[5]。Bad 蛋白在促凋亡和激活自噬中均发挥作用, 本实验中 Bad 在正常组中表达, 在甘草酸处理组中高表达, 而在 MO 感染组中均无表达, 提示甘草酸可能在激活巨噬细胞自噬中发挥作用。因此本实验对自噬相关基因进行验证。自噬基因 Beclin 1 和 Atg 7 表达变化说明, 正常情况下甘草酸处理和甘草酸处理后经 MO 感染情况下, 都可以引起自噬相关蛋白编码基因的高表达, 结果提示甘草酸可能对巨噬细胞自噬有一定正向调控作用。

巨噬细胞可吞噬病原微生物, 放大炎症信号, 并通过抗原递呈调节 T 细胞应答参与获得性免疫应答^[16,17]。TNF- α 主要由活化的巨噬细胞产生, 可以诱导 T 细胞及 NK 细胞增殖活化^[18,19], 及促进单核细胞白血病细胞 U937 向巨噬细胞分化^[20], 而且 TNF- α 能有效刺激肺泡上皮细胞 A549 产生过度炎

症反应^[21]。本实验发现 MO 可以抑制巨噬细胞分泌 TNF- α , 可能是 MO 对巨噬细胞免疫抑制的一个体现。然而甘草酸处理过的巨噬细胞在受到 MO 感染后, 其 TNF- α 分泌量显著回升。

综上所述, 甘草酸可以抑制受 MO 感染后巨噬细胞的凋亡, 并且可以增加巨噬细胞增殖, 而且甘草酸可以促进受 MO 感染的巨噬细胞分泌炎症因子 TNF- α , 除此之外, 甘草酸可能通过对巨噬细胞自噬产生激活作用, 从而在消除 MO 感染中发挥作用。

参考文献

- Long Y, Wang YF. Protective effect of ma xing shi gan tang on macrophages apoptosis induced by mycoplasma pneumoniae[J]. J Tradit Chin Med (江苏中医药), 2015, 47(10): 74-76.
- Parrott GL, Takeshi K, Jiro F. A compendium for mycoplasma pneumoniae[J]. Front Microbiol, 2016, 7:513.
- Liu X, Fang XM, Zou XL. Alterations of toll-like receptors tlr2 and tlr4 and gene expression of proinflammatory factors tnf- α and il-1 β in lungs of swine after mycoplasma pneumoniae infection[J]. Jiangsu J Agr Sci (江苏农业学报), 2011, 27:305-309.
- Zhao LY. Changes of immune function and inflammation factors of mycoplasma pneumoniae pneumonia infants in acute and recovery stage[J]. MCHCC (中国妇幼保健), 2014, 29(1):86-88.
- Li XH. Role of macrophage autophagy in m. ovipneumoniae infection resistance[D]. Yinchuan: Ningxia University (宁夏大学), 2017.
- Yang J, Change XQ, Wang X, et al. Extraction and antimicrobial activity of active components from glycyrrhiza [J]. Henan Sci (河南科学), 2017, 35:1587-1591.

- 7 Gao XJ, Wu XL, Wu YL, et al. Separation of licorice flavonoids-producing salt-resistant endophytic fungi from wild glycyrrhiza uralensis fisch living in ningxia district [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28: 1549-1556.
- 8 Wang BK, Mao YL. Glycyrrhizic acid activates chicken macrophages and enhances their salmonella-killing capacity in vitro [J]. J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol), 2018, 19: 785-795.
- 9 Xiang Q. Clinical observation of yunzhijun capsules combined with diammonium glycyrrhizinate capsules in tree [J]. Drugs & Clinic (药物与临床), 2017, 32: 1118-1121.
- 10 Chakotiya A S, Tanwar A, Srivastava P, et al. Effect of aquo-alcoholic extract of glycyrrhiza glabra against pseudomonas aeruginosa in mice lung infection model [J]. Biomed & Pharmacother, 2017, 90: 171-178.
- 11 Hussain, Iqbal Z, Abbas RZ, et al. Immunomodulatory activity of glycyrrhiza glabra extract against mixed eimeria infection in chickens [J]. Int J Agric Biol (国际农业与生物工程学报), 2017, 19: 928-932.
- 12 Liang R, Dong ZY, Shi ZY, et al. Effect of single chinese herb on the adhesion of mycoplasma suis to erythrocytes [J]. J Trad Chin Vet Med (中兽医医药杂志), 2017, 36(4): 13-16.
- 13 Bewley MA, Naughton M, Preston J, et al. Pneumolysin activates macrophage lysosomal membrane permeabilization and executes apoptosis by distinct mechanisms without membrane pore formation [J]. Mbio, 2014, 5(5): 10-14.
- 14 Zhao RJ, Li YQ, Wang H, et al. Relationship of caspase family and apoptosis [J]. Chin J Anim Sci (中国畜牧杂志), 2010, 46(17): 73-78.
- 15 Zhao D, He LF, Liu H, et al. Mitochondria, cytochrome c, caspase and apoptosis [J]. JMPC (医学动物防制), 2012, 28: 1337-1340.
- 16 Benedetti F, Davinelli S, Krishnan S, et al. Sulfur compounds block mcp-1 production by mycoplasma fermentans-infected macrophages through nf- κ b inhibition [J]. J Transl Med, 2014, 12: 145.
- 17 Ibuki Y, Goto R. Contribution of inflammatory cytokine release to activation of resident peritoneal macrophages after in vivo low-dose γ -irradiation [J]. J Radiat Res, 2018, 40: 253.
- 18 Zinöcker S, Wang MY, Gaustad P, et al. Mycoplasma contamination revisited: mesenchymal stromal cells harboring mycoplasma hyorhinis potently inhibit lymphocyte proliferation *in vitro* [J]. PLoS One, 2011, 6: e16005.
- 19 Mawarti H, Rajin M, Asumta Z. The effects of aloe vera on tnf- α levels, the percentage of nk cells and th 17 cells in rat that received izoniazid and rifampycin [J]. Med Arch, 2017, 71: 308-311.
- 20 Krayem I, Bazzi S, Karam M. The combination of crp isoforms with oxldl decreases tnf- α and il-6 release by u937-derived macrophages [J]. Biomed Rep, 2017, 7: 272.
- 21 Huang JH, Li L, Qiu X, et al. Stimulating effects on alveolar type II epithelial a549 cells by tnf- α and lps [J]. Immunol J (免疫学杂志), 2013, 29: 211-215.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

王红兵	戈惠明	尹文兵	尹胜	吕兆林	刘相国
WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin	LIU Xiangguo
孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱莉	汪海波
SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo
沐万孟	张炳火	陈益华	林昌俊	欧阳杰	易华西
MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	CHEN Yihua	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi
罗应刚	周文	胡友财	袁涛	夏永刚	高慧敏
LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin
唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕	曾克武	蓝蔚青
TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan	ZENG Kewu	LAN Weiqing
廖晨钟	薛永波				
LIAO Chenzhong	XUE Yongbo				