

• 实验研究 •

祖师麻甲素对巨噬细胞抗金黄色葡萄球菌的作用研究*

卓诗勤¹, 葛卫红¹, 史丽云^{2△}

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 杭州师范大学医学院, 浙江 杭州 310018)

摘要: 目的 研究祖师麻甲素(daphnetin, DAPH)对于巨噬细胞抗金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)的影响。方法 选取 10、20、40、80 和 160 μ M 5 个浓度的 DAPH 分别处理小鼠巨噬细胞, 采用 MTT 检测细胞活性确定 DAPH 的安全浓度范围。分别用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和 DAPH 预处理小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 或小鼠腹腔巨噬细胞, 并以 *S. aureus* 感染上述细胞。分别通过流式细胞术和平板菌落计数法分析巨噬细胞对细菌的吞噬和清除能力。采用 RT-PCR 方法检测炎症因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 以及抗菌效应分子 IL-22、再生胰岛来源蛋白 3 β (regenerating islet-derived protein-3 β , Reg-3 β)、重组小鼠钙结合蛋白 S100A8(S100 calcium binding protein A8, S100A8)和 myc 交互锌指蛋白-1(myc-interacting zinc finger protein1, Miz1)的表达水平。结果 DAPH 可显著增强巨噬细胞对细菌的清除能力, 显著上调了 IL-22、Reg-3 β 、S100A8 和 Miz1 等抗菌效应分子的表达, 抑制 *S. aureus* 感染引起的炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达。结论 DAPH 对 *S. aureus* 引起的感染有保护作用, 具有抗菌和抗炎的双重作用。

关键词: 祖师麻甲素; 巨噬细胞; 金黄色葡萄球菌; 抗菌; 抗炎

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)05-0001-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.05.001

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 是严重危害人类生命健康的一种球菌^[1]。作为革兰阳性菌的代表, 它是引起人类化脓感染中最常见的病原菌, 可直接导致局部化脓性感染如肺炎、伪膜性肠炎、心包炎等, 甚至引起败血症、脓毒症等全身感染^[2-3]。目前, 临床上用于治疗细菌感染的药物主要是抗生素^[4]。但是, 长期使用抗生素可能催生并进一步富集耐药性菌株^[5]。细菌的耐药性已经成为严峻的全球性问题之一, 寻找一种新型、可行的抗菌药势在必行。

祖师麻甲素(daphnetin, DAPH)化学名为 7,8-二羟基香豆素^[6], 又称为瑞香素。它是祖师麻制剂(以黄瑞香、唐古特瑞香等入药)主要有效成分之一, 祖师麻制剂具有祛风湿、活血化瘀、抗炎镇痛等作用。临床上主要用于治疗各种关节炎^[6]、血栓闭塞性脉管炎和冠心病等疾病。除了常见的抗炎镇痛药理作用外, DAPH 还具有一定的抗肿瘤、抗菌和抗疟

原虫^[7-8]等作用, 有研究显示 DAPH 对自身免疫性疾病及疟原虫引起的感染均可起到保护作用^[6,9-10]。本实验拟通过体外 *S. aureus* 感染巨噬细胞的体外实验体系, 探讨 DAPH 对巨噬细胞抗菌作用的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验药物

DAPH 标准品, 供含量测定用, 由中国药品生物制品鉴定所提供, 批号: 110900-201006, 纯度 $\geq$ 99.8%。

1.1.2 细胞和菌株

小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 和金黄色葡萄球菌 USA300 均购自美国典型培养物保藏中心(American type culture collection, ATCC)。

1.1.3 试剂

RPMI1640(批号: 0021515), DMEM 高糖培养基(批号: 0021515), 胎牛血清(fetal bovine serum,

* 基金项目: 国家自然科学基金(81270066, 81470210)

收稿日期: 2016-07-31

作者简介: 卓诗勤(1990-), 女, 福建三明人, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理与新产品开发。

△通信作者: 史丽云, E-mail: shi_liyun@msn.com

FBS) (批号:20150512);Trizol (批号:9109), PrimerScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (批号:AK3802) 和 SYBR Premix Ex Taq™ (批号:1507500) 均购自 TaKaRa 公司;DMSO (批号:302A0331) 购自 sigma;其它无特殊说明的试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.4 仪器设备

ECLIPSE TS100 倒置荧光显微镜、CLIPSE 90i 研究级正置显微镜 (Nikon);iMark 酶标仪、T100 普通 PCR 仪、S1000 梯度 PCR 仪、7500 荧光定量 PCR 仪 (BIO-RAD);Forma371 细胞培养箱、Forma1389 生物安全柜、ST16R 超速冷冻离心机、ST40R 台式超速冷冻离心机 (Thermo Scientific 公司);Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司);霉菌培养箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

1.1.5 实验动物

清洁级 C57BL/6 雄性小鼠购自中科院上海实验动物中心,饲养于杭州师范大学实验动物中心清洁级动物房,6~8 周龄,体质量 18~22g,试验动物许可证号:SYXK(浙)2016-014,SCXK(浙)2016-004。动物实验室环境温度 20~25℃,湿度 50%~70%,光照 150~200Lx,12h 明暗交替,噪音<50dB。在整个实验过程中,所有操作均遵守国家及本校伦理委员会制定的《实验动物使用条例》。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

RAW264.7 细胞用含 10%FBS 的 DMEM 完全培养基在 37℃、5%CO₂ 条件下培养传代,选取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 小鼠腹腔巨噬细胞的提取^[11-12]和培养

将 4% 巯基乙醇酸盐培养基注射入雄性小鼠腹腔内,2.5mL/只。3d 后脱颈椎法处死小鼠,用 75% 酒精浸泡 5min,在超净台用镊子提起小鼠下腹部皮肤,剪开使腹膜完全暴露,用 5mL 注射器向腹腔中注入 5mL PBS,向不同方向轻晃小鼠,使 PBS 充满小鼠整个腹腔;用注射器针尖朝上吸出腹腔灌洗液,置于 15mL 无菌离心管内,1 000rpm,离心 5min;如果细胞沉淀中有较多的红细胞,则弃去上清,加入 2mL 红细胞裂解液,室温静置 2min,用 3 倍量 PBS 终止反应。1 000rpm 离心 5min,弃上清,用新鲜含 10%FBS 培养基重悬细胞后,加入至 10cm 细胞培养皿中进行培养。在细胞培养箱中培养 1~2h 后,

弃去原有培养基,加入已预热的 8~10mL 新鲜培养基,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱内继续培养。

1.2.3 MTT 实验

将 DAPH 标准品溶于 100μL 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide,DMSO),使得浓度为 0.2mg·μL⁻¹。取 7.1μL 浓度为 0.2mg·μL⁻¹ 的 DAPH 溶于 42.9μL 的 DMSO 使得浓度为 160mM,用倍比稀释分别得到 0、10、20、40、80mM,用时再分别取 1μL 加入 1mLDMEM 稀释 1000 倍即可。分别用 0、10、20、40、80、160μM 5 个处理浓度作用于小鼠巨噬细胞株 RAW264.7^[11],每个浓度设 5 个复孔;配制浓度为 5mg·mL⁻¹ 的 MTT 溶液;收集处于对数生长期的 RAW264.7 细胞,以 1×10³~1×10⁴ 个/孔的细胞数铺板;在细胞培养箱中进行孵育,至细胞单层铺满孔底,加入浓度梯度的药物孵育,48h 后镜下观察细胞形态;每个处理孔分别加入 20μL MTT 溶液,继续培养 4h;分别加入 150μL DMSO,置摇床上低速振荡 10min,使结晶充分溶解。在 490nm 处测量各孔的吸光度值;同时设置调零孔 (DMEM、MTT、DMSO),对照孔 (细胞、相同浓度的药物溶解介质、DMEM、MTT、DMSO),进行细胞存活百分率检测。

1.2.4 RT-PCR 法检测细胞中炎症因子和抗菌效应分子的表达

用 RAW264.7 细胞以 4×10⁵ 个/孔的细胞铺入 12 孔板,分为 DMSO 和 DAPH 两组,预处理 1h 后,以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 1 的 *S.aureus* 感染细胞;分别在 0h、3h、6h、12h、24h 收集细胞,提取 RNA,逆转录。依据 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq™ 说明书操作,配制定量 PCR 反应体系 (表 2);数据以 β-actin 为内参,采用 2^{-ΔΔCT} 法进行相对定量分析。检测指标为白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1β 和肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α),以及抗菌效应分子 IL-22、再生胰岛来源蛋白 3β (regenerating islet-derived protein-3β, Reg-3β)、重组小鼠钙结合蛋白 S100A8 (S100 calcium binding protein A8, S100A8) 和 myc 互作锌指蛋白-1 (myc-interacting zinc finger protein1, Miz1) 的表达水平。其所用引物序列见表 1。

1.2.5 流式检测细胞的吞噬作用

首先用荧光染料羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE) 标记细菌: *S.aureus* 计数后,用无菌 PBS

表1 RT-PCR 引物序列

Gene	Primer(5'→3')		长度 bp
	上游引物	下游引物	
β-actin	CCAGCCTTCCTTCTTGGGTATGGA	GCAGCTTTTCTGTCCGGCTCCA	365
IL-1β	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	TGGATGCTCTCATCAGGACAG	116
IL-6	TCTATACCACTTCACAAGTCGGA	GAATTGCCATTGCACAACCTCTTT	88
TNF-α	CCTGTAGCCCACGTCGTAG	GGGAGTAGACAAGGTACAACCC	148
IL-22	ATGAGTTTTTCCCTTATGGGGAC	GCTGGAAGTTGGACACCTCAA	124
Reg3β	GGAGAGGAACCCATCTACTGC	ATAGGGCAACTTCACCTCACA	109
Miz1	AGGCTGGACCAAGCAAGAG	GCCACTGGATGCACCTTTCTG	93
mS100A8	AAATCACCATGCCCTCTACAAG	CCCCTTTTATCACCATCGCAA	165

表2 Q-PCR 反应体系

Reagent	Amount
2×SYBR Green Ex Tag™(TaKaRa)	10μL
Primer1(10μmol/L-1)	0.4μL
Primer2(10μmol/L-1)	0.4μL
模板 cDNA	2μL
ddH2O	7.2μL
混匀,离心后进行 PCR	
Holding stage; holding stage; cycling stage; melt curve stage	

洗2次,去除溶菌肉汤培养基(Luria-Bertani, LB)。用100μL 37℃预热的无菌 PBS 重悬菌体,加入2μL 100μM CFSE(使其终浓度2μM),立即混匀,室温避光孵育10~15min;加入500μL 冰的 PBS 终止标记,冰上孵育约5min;再用 PBS 洗2次,按照需要对细胞进行感染。小鼠腹腔巨噬细胞(4×10^5 个/孔)用无菌 PBS 洗2次,分为 DAPH 组和 DMSO 组。药物的配制方法同1.2.3所描述。DAPH 组加入无血清、无抗性的含160μM DAPH 的 DMEM, DMSO 组细胞加入含等体积量 DMSO 的 DMEM 预处理细胞,1h 后,用 CFSE 标记的 *S.aureus* 感染细胞(MOI=10),在荧光显微镜下可以观察到绿色荧光;分别于0、30、60、120min 收集细胞,用流式细胞仪检测荧光强度。

1.2.6 平板菌落计数

(1) DAPH 对细菌的直接作用。分别用终浓度为0、10、20、40、80 和 160μM 的 DAPH 作用于金黄色葡萄球菌肉汤培养基,24h 后取菌液进行浓度梯度稀释,分别取10μL 接种于 LB 琼脂平板上,37℃培养16~18h,计数菌落形成单位(colony-forming units, CFU)。

(2) 杀伤作用。取小鼠腹腔巨噬细胞($2 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 个/孔),用无菌 PBS 洗两遍,分为 DAPH 组(160μM)和 DMSO 细胞组,预处理1h 后,以 *S.aureus* (MOI=10)感染细胞2h;用 PBS 洗2 遍后,加入含有 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶葡萄球菌素的培养基培养细胞;分别于0、8、18、24h 去掉上清, PBS 洗2 遍,用250μL 0.1% TritonX-100 充分裂解细胞,收集至离心管中;将含菌细胞裂解液用无菌 PBS 梯度稀释,分别取10μL 接种于 LB 琼脂平板上,37℃培养16~18h,计数 CFU。

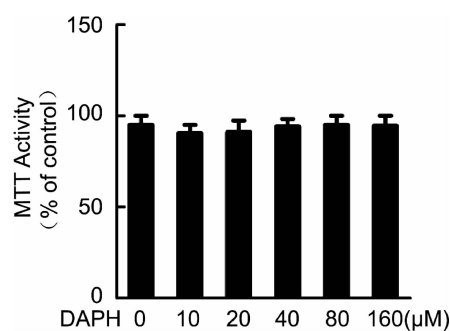
1.2.7 统计学方法

应用 SPSS 13.0 软件进行分析,所有定量数据均用 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示,两组间各指标均数的比较用 *t*-检验,多组指标比较用 one-way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DAPH 对巨噬细胞 RAW264.7 无明显毒性作用

图1 结果显示0、10、20、40、80 和 160μM 这5 个浓度均未对巨噬细胞产生毒性,为安全药物浓度范围。故在后续实验中我们选用160μM 展开进一步功能研究。

图1 对巨噬细胞存活的影响($n=5$)

2.2 DAPH 对细菌直接杀伤作用不明显

与未经处理的细菌相比,分别以 10、20、40、80 和 160 μM 浓度的 DAPH 处理细菌,其菌量差异无统计学意义($P>0.05$),各浓度间差异也无统计学意义($P>0.05$)。表明 DAPH 在所测试浓度范围内对细菌生长无明显抑制作用(图 2)。

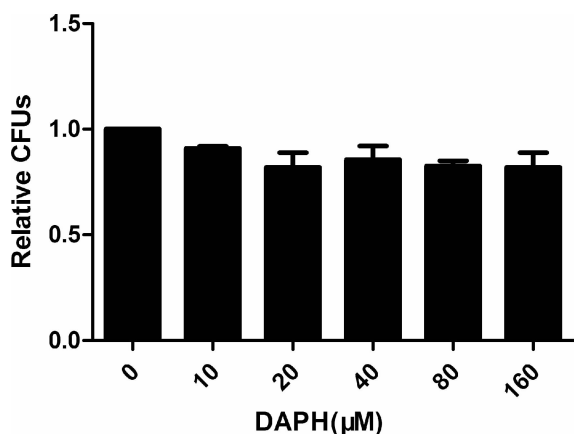


图 2 DAPH 对金黄色葡萄球菌存活的影响($n=6$)

2.3 DAPH 可增强小鼠腹腔巨噬细胞的杀菌作用

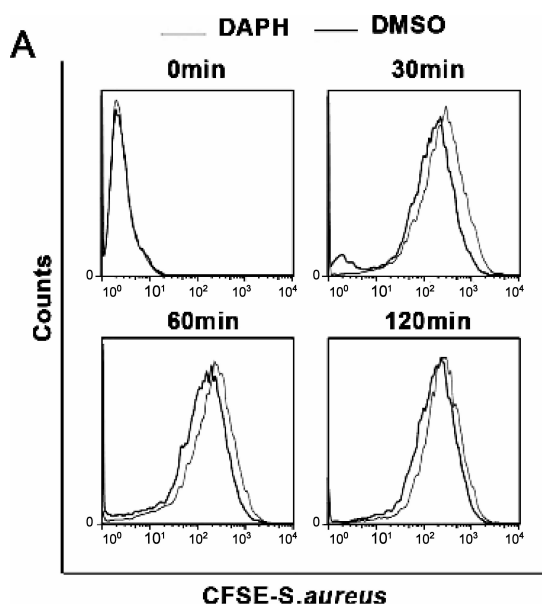
分别以 DMSO 和 DAPH 预处理小鼠腹腔巨噬细胞,再用 CFSE 标记的 *S. aureus* 感染小鼠腹腔巨噬细胞。流式细胞术分析显示,两者处理的细胞在吞噬细菌能力方面并无明显差异(图 3A);但对不同时间段胞内残余菌量 DAPH 组较 DMSO 组有明显减少,特别是 8h、18h 时两者差异有统计学意义($P<0.05$)(图 3B),表明 DAPH 处理可有效增强小鼠腹腔巨噬细胞清除细菌的能力。

2.4 DAPH 促进巨噬细胞 RAW264.7 抗菌效应分子的产生

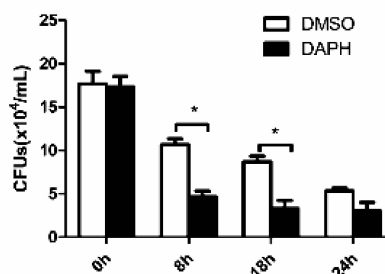
RT-PCR 结果显示,相较于 DMSO 组,DAPH 预处理可显著提高巨噬细胞表达抗菌效应分子 IL-22、Reg3 β 、s100A8 和 miz1 的水平。已有研究报道,这些分子的表达可促进对细菌的杀伤作用,并对受染组织具有修复作用^[13-19]。

2.5 DAPH 抑制金黄色葡萄球菌感染引起的炎症因子的表达

经 DAPH 处理的巨噬细胞组在炎症因子 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平上明显低于 DMSO 处理组,且有一定的时间依赖性(图 5A-C),表明 DAPH 对细菌感染引起的炎症反应具有一定的抑制作用。



B



A. DAPH 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬细菌能力的影响;

B. DAPH 对小鼠腹腔巨噬细胞杀菌能力的影响。

图 3 DAPH 对巨噬细胞体外杀菌作用的影响($n=4$)

注:与 DMSO 组比,* $P<0.05$

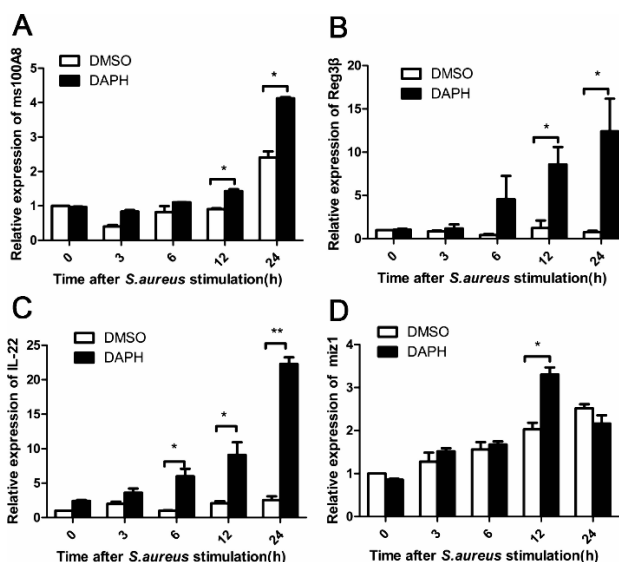


图 4 DAPH 对巨噬细胞抗菌效应分子表达的影响($n=6$)

注:与 DMSO 组相比,* $P<0.05$;** $P<0.01$

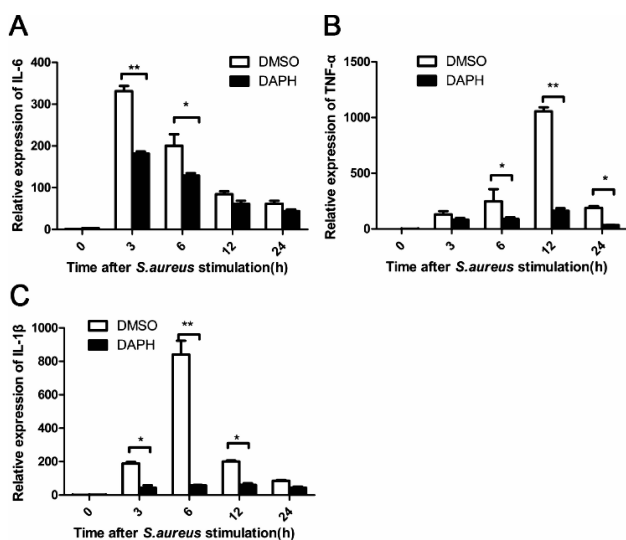


图5 DAPH抑制炎症因子的表达($n=6$)

注:与DMSO组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3 讨论

本实验通过体外研究发现,DAPH不影响巨噬细胞的吞噬作用,但能增强其对金黄色葡萄球菌的清除杀伤能力,促进其产生抗菌效应分子。同时,RT-PCR的结果提示DAPH对金黄色葡萄球菌感染后所引起的炎症信号通路有一定的抑制作用,即DAPH在抗感染的同时又具有抗炎作用。

近年来,随着研究的深入,中药抗炎抗菌的优点越来越为人们所认识:如不易产生耐药性,副作用小等。中药抗炎已经是一个热点,而中药抗菌的研究也逐渐成为一个重要研究领域。在中国乃至世界,抗炎药物及抗感染药物已分别成为第一、二大类药物。中药资源丰富,来源广泛,利用中药进行抗炎治疗在国内外已得到广泛应用,例如从中草药中提取出来的有效成分紫花前胡苷、雷公藤甲素等,均有一定的抗炎作用。而一些常见的中药,如黄连、苦参、连翘、大黄等,都具有明显的抑菌作用^[20-22]。尽管有大量的临床基础,但就整体而言关于中药抗菌方面的研究依然比较少,许多中药的抗炎抗菌作用机制尚不明确。现有的研究显示中药抗菌及逆转抗生素耐药性的效用^[23-24]可能是多重作用协调的结果^[25-26]。中药成分复杂、有效成分所针对的疾病各不相同,是否能够筛选出针对抗菌的中药,但从免疫调控的角度研究中药抗炎抗菌机理仍不多见。

祖师麻在民间广泛用于支气管炎,风湿、类风湿性关节炎,但通过查阅文献不难发现,祖师麻中的化学成分主要为二萜和香豆素,其中DAPH即瑞

香素为香豆素类。DAPH的药理作用还包括抑菌、免疫调节等^[27]。本研究中我们开展了有关巨噬细胞的吞噬及清除实验,结果显示DAPH预处理可有效增强巨噬细胞的清除能力,但不影响其吞噬能力,初步阐明DAPH的抗菌的作用机理。金黄色葡萄球菌^[28-29]作为人类化脓感染中最常见的病原菌,可引起一些致命的炎症甚至败血症脓毒症等全身感染,而其致病力强弱主要取决于其产生的毒素和侵袭性酶,包括溶血毒素(外毒素)、杀白细胞素、血浆凝固酶、脱氧核糖核酸酶等,其中杀白细胞素可破坏人的白细胞和巨噬细胞而产生致病力。本研究证实DAPH可增强巨噬细胞抗菌效应并抑制其产生炎症因子,为临床抗感染治疗提供了一种新的选择,但其抗菌的具体机制仍需作进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Shu K, Kuang N, Zhang Z, et al. Therapeutic effect of daphnetin on the autoimmune arthritis through demethylation of proapoptotic genes in synovial cells [J]. J Transl Med, 2014, 14(12):287.
- [2] Bradley SF. MRSA colonisation (eradicating colonisation in people without active invasive infection)[J]. BMJ Clin Evid, 2015, 11(13):2015.
- [3] Lee YD, Park JH. Phage Conversion for beta-lactam Antibiotics Resistance of Staphylococcus aureus from Foods[J]. J Microbiol Biotechnol, 2015, 26(2):263-269.
- [4] Zapater P, González-Navajas JM, Such J, et al. Immunomodulating effects of antibiotics used in the prophylaxis of bacterial infections in advanced cirrhosis[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(41):11493-11501.
- [5] Du G, Tu H, Li X, et al. Daphnetin, a natural coumarin derivative, provides the neuroprotection against glutamate-induced toxicity in HT22 cells and ischemic brain injury[J]. Neurochem Res, 2014, 39(2):269-75.
- [6] Shu K, Kuang N, Zhang Z, et al. Therapeutic effect of daphnetin on the autoimmune arthritis through demethylation of proapoptotic genes in synovial cells [J]. J Transl Med, 2014, 14(12):287.
- [7] 郑玉强,叶彬,武卫华,等. 瑞香素体外抗卡氏肺孢子虫作用的初步研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(2):129-134.
- [8] 张文亮,李荣亨. 瑞香素药理作用研究现状[J]. 实用中医药杂志, 2007, 23(6):402-403.
- [9] Wang D, Lu Z, Zhang H, et al. Daphnetin Alleviates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis via Regulating Dendritic Cell Activity [J]. CNS Neurosci Ther, 2016, 22(7):558-567.

- [10] Huang F, Tang LH, Yu LQ, et al. In vitro potentiation of antimalarial activities by daphnetin derivatives against *Plasmodium falciparum* [J]. *Biomed Environ Sci*, 2006, 19(5):367–370.
- [11] Yu WW, Lu Z, Zhang H, et al. Anti-inflammatory and protective properties of daphnetin in endotoxin-induced lung injury[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(51):12315–12325.
- [12] Pietrofesa RA, Velalopoulou A, Albelda SM, et al. Asbestos Induces Oxidative Stress and Activation of Nrf2 Signaling in Murine Macrophages: Chemopreventive Role of the Synthetic Lignan Secoisolaricresinol Diglucoside (LGM2605)[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3):322.
- [13] Myles IA, Fontecilla NM, Valdez PA, et al. Signaling via the IL-20 receptor inhibits cutaneous production of IL-1 β and IL-17A to promote infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(8):804–811.
- [14] Do-Umehara HC, Chen C, Urich D, et al. Suppression of inflammation and acute lung injury by Miz1 via repression of C/EBP- δ [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(5):461–469.
- [15] Wolf E, Gebhardt A, Kawauchi D, et al. Miz1 is required to maintain autophagic flux[J]. *Nat Commun*, 2013, 4(7):2535.
- [16] Passey RJ, Xu K, Hume DA, et al. S100A8: emerging functions and regulation [J]. *J Leukoc Biol*, 1999, 66(4):549–556.
- [17] Nacken W, Sopalla C, Pröpper C, et al. Biochemical characterization of the murine S100A9 (MRP14) protein suggests that it is functionally equivalent to its human counterpart despite its low degree of sequence homology[J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(2):560–565.
- [18] Rendon JL, Li X, Akhtar S, et al. Interleukin-22 modulates gut epithelial and immune barrier functions following acute alcohol exposure and burn injury [J]. *Shock*, 2013, 39(1):11–18.
- [19] Willing BP, Vacharaksa A, Croxen M, et al. Altering host resistance to infections through microbial transplantation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10):e26988.
- [20] 刘云宁, 李小凤, 班旭霞, 等. 中药抗菌成分及其抗菌机制的研究进展[J]. *环球中医药*, 2015, 8(8):1012–1017.
- [21] 殷建玲. 中药抗菌研究进展 [J]. *北方药学*, 2014, 11(4):111.
- [22] 阮贤妹, 史道华. 中药有效成分及单体抗菌作用机制的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2015, 27(2):244–248.
- [23] Zhang S, Wang J, Xu W, et al. Antibacterial effects of Traditional Chinese Medicine monomers against *Streptococcus pneumoniae* via inhibiting pneumococcal histidine kinase (VicK)[J]. *Front Microbiol*, 2015, 6(5):479.
- [24] Liu J, Qiu H, Zhu Z, et al. Antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant effects of Yinzhihuang injection [J]. *Biomed Mater Eng*, 2015, 26(Suppl 1):S2123–S2132.
- [25] 刘华钢, 申庆荣, 刘丽敏. 中药抗菌研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(2):463–465.
- [26] 王科峰, 杨海卿. 中药抗菌作用研究思路探讨[J]. *临床合理用药杂志*, 2012, 5(8):83–84.
- [27] 徐静, 傅颖媛. 瑞香素的药理作用研究进展 [J]. *广东医学*, 2006, 27(1):131–133.
- [28] 于旭红, 王冬, 王睿. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2011, 27(4):306–310.
- [29] 王蕾, 李武平, 刘冰, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究进展[J]. *护理研究*, 2011, 25(19):1695–1697.

(编辑:徐建平)

Effect of Daphnetin on Antibacterial Activity of Macrophages

ZHUO Shiqin¹, GE Weihong¹, SHI Liyun²

(1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. School of Medicine, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310018, China)

ABSTRACT: **Objective** To study the effect of daphnetin (DAPH) on the antibacterial activity of macrophages. **Methods** Firstly, the safety concentration of DAPH (in a range of 10, 20, 40, 80 and 160 μ M) on macrophages was determined by MTT. Then RAW264. 7 cell lines or murine peritoneal macrophages were pretreated with DMSO and DAPH, followed by *S. aureus* infection. The phagocytic activity was analyzed by flow cytometry and the bactericidal capability was tested by CFU counting method in DAPH-treated macrophages. Also, the expression of inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α and IL-1 β) and antimicrobial effector molecules (IL-22, Reg3 β , S100A8 and Miz1) were assayed by quantitative PCR. **Results** Daphnetin treatment significantly enhanced the bacteria-clearance capability of macrophages, although it did not affect cellular phagocytosis. Associated with this, daphnetin remarkably increased the capability of macrophages to express antimicrobial effector molecules while repressing their production of inflammatory cytokines. **Conclusion** Daphnetin has a protective effect on *S. aureus* infection with both anti-bacterial and anti-inflammatory properties.

KEY WORDS: DAPH; macrophage; *Staphylococcus aureus*; antibacterial; inflammation