

铁棍山药促进巨噬细胞吞噬细菌的高内涵分析方法研究

杨文华^{1,2}, 史志龙³, 柏兆方³, 王伽伯³, 张玉君¹, 樊冬鹤¹, 张孟捷¹, 李朝峰¹, 戚姝娅¹, 肖小河³, 曹俊岭^{4,5*}, 黄璐琦^{5*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102
2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700
3. 解放军第三〇二医院全军中医药研究所, 北京 100039
4. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700
5. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700

摘要: **目的** 建立巨噬细胞系 RAW 264.7 对绿色荧光蛋白标记的大肠杆菌 (GFP-*E. coli*) 吞噬活性的高内涵分析方法, 评价铁棍山药在体外对巨噬细胞增殖和吞噬活性的促进作用。**方法** 采用 CCK-8 法测定铁棍山药作用于 RAW 264.7 巨噬细胞的增殖活性。采用高内涵技术, 建立铁棍山药调节巨噬细胞 RAW 264.7 吞噬细菌活性的评价方法。**结果** 通过考察给药时间、细菌加入量、细菌刺激时间等因素, 确定所建立方法的最佳方案为给药 12 h、细菌加入量为 50 倍、细菌刺激时间 1.5 h; 方法重复性考察 RSD 值为 2.31%。与不加药组相比, 在铁棍山药质量浓度为 0.156~1.25 mg/mL 都能促进巨噬细胞的增殖, 以及单个细胞的平均吞噬率; 在 1.25 mg/mL 时铁棍山药促进巨噬细胞的增殖及吞噬活性的能力最强。**结论** 首次建立铁棍山药促进巨噬细胞吞噬活性的高内涵分析方法, 该方法具有准确、直观、高通量等优势; 铁棍山药在体外既能促进巨噬细胞增殖, 又能提高单个细胞的吞噬能力, 为进一步分析山药等补益类中药的免疫活性及增强免疫机制的研究提供新思路和新方法。

关键词: 铁棍山药; 高内涵分析; 巨噬细胞; 吞噬作用; 细胞增殖; 大肠杆菌

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)08-1604-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.08.019

High content screening for promoting effect of *Dioscorea opposita* on macrophage phagocytosis

YANG Wen-hua^{1,2}, SHI Zhi-long³, BAI Zhao-fang³, WANG Jia-bo³, ZHANG Yu-jun¹, FAN Dong-he¹, ZHANG Meng-jie¹, LI Chao-feng¹, QI Shu-ya¹, XIAO Xiao-he³, CAO Jun-ling^{4,5}, HUANG Lu-qi⁵

1. College of traditional Chinese medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China
2. Institute of Chinese Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100700, China
3. China Military Institute of Chinese Medicine, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China
4. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China
5. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To establish a high content screening (HCS) method by testing the phagocytic function of RAW 264.7, and to evaluate the effect of *Dioscorea opposita* on cell proliferation and phagocytosis *in vitro*. **Methods** CCK-8 was used to measure the proliferation of RAW 264.7, and HCS was helpful to determine the ability of RAW 264.7 to engulf GFP-*E. coli*. **Results** The best method was established by examining the time of administration, the amount of bacteria added, and the time of bacterial stimulation: administration time of 12 h, 50 times of bacteria, and stimulation time of 1.5 h. Then, the repeatability of this method was tested, and the RSD value was 2.31%. Compared with the group without drugs, at the concentration of 0.156—1.25 mg/mL, the water extract of *D. opposita* could promote the proliferation, and improve the average phagocytosis rate of every single RAW264.7 cell. And the samples had the

收稿日期: 2016-11-29

基金项目: 中央本级重大增减支项目: 名贵中药资源可持续利用能力建设 (2060302); 国家自然科学基金项目: “道地指数”的构建及其在中药材品质评控中的应用研究 (81274026); 国家公益性行业专项: 20 种道地药材优良品种质量生物评价技术研究 (201507002)

作者简介: 杨文华 (1991—), 女, 河南商丘人, 硕士在读, 主要从事中药材山药等级规格标准的研究。E-mail: 1434296565@qq.com

***通信作者** 曹俊岭, 硕士生导师, 主要从事临床安全合理用药研究。E-mail: caojunling72@163.com
黄璐琦, 中国工程院院士, 主要从事中药资源研究。

strongest effect on proliferation and phagocytosis when the concentration was 1.25 mg/mL. **Conclusion** An HCS method is established and firstly used in *D. opposita*. HCS has the advantage of accurate, intuitive, and high throughput. *D. opposita* can not only promote cell proliferation, but also improve the phagocytic ability of each single RAW264.7 *in vitro*. A new method is provided for further study on immune activity and on the mechanism of enhancing the immune activity that some tonic herbs may have, such as *D. opposita*.

Key words: *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun; high content screening; macrophage; cell phagocytic; cell proliferation; *Escherichia coli*

山药为薯蓣科多年生蔓生草本植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干燥根茎, 性平味甘, 具有补脾养胃、生津益肺、补肾涩精的功效^[1], 是我国常用的大宗补益类中药, 铁棍山药 *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun 为薯蓣栽培变种, 是山药中的佳品。药理研究表明山药具有增强免疫的作用^[2-3], 有学者研究^[2]发现, 山药多糖可以明显促进巨噬细胞进入小鼠腹腔, 并且可体外活化巨噬细胞 (RAW264.7), 但是没有阐明免疫功能的增强是否与巨噬细胞数目的增多或单个细胞吞噬能力的增强有关。

免疫系统是人体维持健康的主要调节系统, 巨噬细胞在免疫系统中发挥着重要作用, 可通过吞噬病原体^[4]、抗原递呈、增强 T 细胞的信号传导、产生免疫活性物质^[5]等方式, 发挥免疫调节和抵御病原体的作用。科学研究中通常以巨噬细胞的吞噬功能检测药物的免疫活性, 主要研究方法有小鼠碳粒廓清实验^[6]、中性红法^[7]、流式细胞术^[8], 以及近些年来发展起来的高内涵筛选技术^[9]。高内涵筛选 (high content screening, HCS) 是一种通过高分辨率的荧光成像系统进行灵敏、快速、多参数、多靶点的细胞生物学信息采集与数据分析的新技术, 适用于建立各种高通量体外筛选模型。近些年来随着分析统计技术的进步, HCS 在研发中的应用也愈发广泛^[10-12], 已将其应用于新药的发现^[13]、炎症反应^[14]、药物作用机制研究^[15]等方面。本实验以铁棍山药为模式药, 初步建立 HCS 结合荧光标记技术检测药物调节 RAW264.7 巨噬细胞系吞噬绿色荧光标记的大肠杆菌 (GFP-*E. coli*) 的生物模型, 以期筛选发现山药等补益类中药对病原体的免疫功能物质基础及增强免疫的机制提供一种新思路、新方法。

1 材料

1.1 药材

铁棍山药样品采自河南省焦作市温县, 经中国中医科学院中药研究所冯学锋研究员鉴定为薯蓣栽培变种铁棍山药 *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun 的新鲜根茎。

1.2 细胞株与细菌

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞株由解放军第三〇二医院全军中医药研究所收藏; 绿色荧光标记的大肠杆菌 (green fluorescent protein-*Escherichia coli*, GFP-*E. coli*) 由军事医学科学院提供。

1.3 试剂

胎牛血清、胰蛋白酶购于 Gibco 公司; DMEM 高糖培养基、1×PBS 磷酸盐缓冲液 (PBS) 均购于 Hyclone 公司; 脂多糖 (LPS)、Triton 产自美国 Sigma 公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG 诱导剂)、4% 多聚甲醛均购于 Solarbio 公司; DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Life Technologies 公司); CCK-8 (cell counting Kit-8, 北京鼎国昌盛生物技术有限公司)。

1.4 主要仪器设备

高内涵筛选分析仪 (美国 Thermo scientific 公司); Synergy H1 Hybrid Reader 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); 高压蒸汽灭菌器 (日本 YAMATO 公司); CO₂ 培养箱 (NAPCO 公司); 常规倒置显微镜 (上海泽权仪器设备有限公司); SW-CJ-2FD 型双人面净化工作台 (苏州净化设备有限公司); TC10TM 自动细胞计数器 (BIO-RAD 公司); 台式低速离心机 (湖南赫西仪器装备有限公司)。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

将铁棍山药新鲜根茎经轻搓去土、削皮、切片、阴干处理。取干燥饮片 50.0 g, 纯水浸泡 30 min, 用 10 倍量纯水加热回流提取 2 次, 提取时间分别为 2、1 h, 趁热滤过, 合并滤液。冻干后, 于干燥器中干燥保存, 提取率为 22.50% (含总多糖 14.18%)。实验时取冻干粉适量, 加细胞培养基溶解配成初质量浓度为 20 mg/mL 的溶液, 稀释成所需溶液, 作用于细胞的溶液均需过除菌滤膜后方可用于实验。

2.2 RAW264.7 细胞的培养

RAW264.7 细胞所用培养基为含 10% 胎牛血清、1% 双抗 (青霉素、链霉素) 的 DMEM 培养基,

于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。显微镜下观察细胞生长至 80%~90% 融合时, 用 1×PBS 溶液清洗 2 次, 胰酶消化后加培养基终止消化, 混匀后于 600 r/min 离心 4 min, 再根据需要进行传代或种板处理。

2.3 GFP-*E. coli* 的制备

2.3.1 摇菌 将保存在-80 ℃的甘油菌以 1% 的比例接种到离心管, 37 ℃、220 r/min 摇菌过夜。将上述菌以 1% 比例接种到新的离心管中, 37 ℃、220 r/min 摇菌 3.5 h。再加 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导剂, 18 ℃、180 r/min 摇菌过夜。

2.3.2 洗菌 实验前, 取适量上述菌液经 3 000 r/min 离心 5 min; 弃上清, 加 1×PBS 混匀 3 000 r/min、3 min 离心 2 次; 吸去上清, 加入胎牛血清在 CO₂ 培养箱中孵育 30 min。

2.3.3 测吸光度 (*A*) 值 孵育完成的细菌加培养基混匀, 用酶标仪在 600 nm 下检测。实验时, 根据所需感染复数 (MOI, 即感染时细菌与细胞数量的比例) 配成相应浓度的细菌溶液。

2.4 CCK-8 法检测铁棍山药对细胞增殖的影响

2.4.1 分组 设立药物处理组、不加药组和空白组。药物处理组: 加入细胞、不同质量浓度药液、CCK-8, 供试品质量浓度分别为 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078 mg/mL; 不加药组: 加入细胞, CCK-8; 空白组: 无细胞, 只加 CCK8。

2.4.2 细胞活性实验 RAW264.7 细胞培养至 80%~90% 融合时, 经清洗、消化、终止消化、离心等步骤后, 用自动计数器进行细胞计数, 接种于 96 孔板 (板的外围不种细胞, 用 1×PBS 溶液填充), 种板密度为 2×10⁴ 个/孔, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 12 h。弃上清, 分别加入不同组对应的药液或培养基 100 μL, 各设 3 个复孔。孵育 12 h 后, 除上清, 1×PBS 清洗 1 次, 避光条件下每孔加入 100 μL 的 CCK-8 试剂, 继续培养 40 min, 用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔的 *A* 值。计算平均值, 用细胞增殖率比较不同质量浓度下药物对 RAW264.7 细胞增殖的影响。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{不加药}} - A_{\text{空白}})$$

2.5 GFP-*E. coli* 结合 HCS 检测 RAW264.7 细胞的吞噬活性

2.5.1 分组 设对照组、LPS 阳性对照组^[9]、药物处理组。对照组: 不作药物处理, 加培养基代替; LPS 组: 加入 100 ng/mL 的 LPS 溶液; 药物处理组: 根据 CCK-8 实验结果选取对 RAW264.7 无细胞毒性

的药物质量浓度进行实验, 本实验选择质量浓度为 1.250、0.625、0.313、0.156 mg/mL。

2.5.2 RAW264.7 细胞吞噬 GFP-*E. coli* 的实验方法 孵育 RAW264.7 细胞, 贴壁培养至 80%~90% 融合后进行实验。种板密度为 1×10⁴ 个/孔, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育过夜。弃上清, 加入 100 μL 上述各组除菌药液, 设 4 个复孔, 孵育一段时间。去上清液, 加入适量的 GFP-*E. coli* 菌液刺激适当时间。去上清, 1×PBS 溶液清洗 2 遍; 4% 多聚甲醛室温固定 10 min; 1×PBS 溶液清洗 2 遍; 加 0.3% Triton-1×PBS 溶液, 冰箱中打孔 10 min; 1×PBS 溶液清洗 2 遍; 用 0.01% 的 DAPI-1×PBS 溶液室温下避光染核 10 min; 1×PBS 溶液将未被吞噬的细菌清洗干净。

2.5.3 高内涵方法 上述实验完成后, 采用高内涵仪器进行扫板、分析处理。本实验使用 20 倍物镜; 设置孔板类型 (Costar 96 Thin) 和扫板范围, 扫描视野设定为 4×4 个, 即每个孔中采集 16 个视野。设定 2 个通道: Channel 1 波长为 386 nm, 检测被 DAPI 染成蓝色的细胞核; Channel 2 波长为 485 nm, 检测 GFP-*E. coli*。

(1) 检测细菌荧光强度: Channel 1 检测细胞核即细胞的数目, 使用 DAPI 试剂对细胞核染色, 将每个细胞的细胞核染成蓝色; Channel 2 检测 GFP-*E. coli* 的荧光强度 (*F*), *F* 值的变化可以反映出吞噬细菌量的不同。使用 Thermo 公司高内涵系统 XT Infinity 的分析软件 CellHealthProfiling Bioapplication 进行 *F* 值的定量分析。

(2) 计算单个细胞平均吞噬率: “MEAN_TargetAvgIntenCh2” 中的数据代表每个孔中单个细胞的平均 *F* 值, 单个细胞平均吞噬率的计算公式为: 平均吞噬率 = $F_{\text{加药}} / F_{\text{对照}}$ 。单个细胞平均吞噬率反映了每个 RAW264.7 细胞的吞噬能力, 平均吞噬率越高, 表明药物促进细胞吞噬的能力越强。

2.5.4 RAW264.7 细胞吞噬 GFP-*E. coli* 实验影响因素的考察

(1) 给药时间的考察: 细胞在 96 孔板中贴壁过夜后弃上清, 加入 100 μL 经除菌滤膜滤过的相同药液, 设 4 个复孔, 在培养箱中孵育时间分别为 2、6、12、18、24 h。比较不同给药时间对细胞吞噬率的影响。

(2) 细菌感染复数的考察: 考察加入细菌与细胞的比例变化对细胞吞噬强度的影响, 分别设感染

复数为 12.5、25、50 倍。

(3) 细菌刺激时间的考察：考察加入细菌后，细菌的刺激时间对细胞吞噬率的影响，刺激时间分别为 0.5、1、1.5 h。

(4) 方法重复性考察：考察不同板、不同时间点、不同人员操作下，本实验所建立方法的重复性，每次实验设 4 个复孔，计算不同实验的 RSD 值。

2.6 统计学处理

应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析，实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组间数据比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对细胞增殖活性的影响

采用 CCK-8 法检测铁棍山药对 RAW264.7 细胞增殖的影响，结果见图 1。不同质量浓度铁棍山药对细胞活力的影响不同。质量浓度为 20 mg/mL 时，具有明显细胞毒性，对细胞增殖的抑制率接近 50%；而在 0.078~10 mg/mL，铁棍山药可以促进细胞的增殖，且质量浓度为 1.25 mg/mL 时促进细胞增殖的活性最强。

3.2 高内涵分析方法的考察

3.2.1 给药时间对吞噬实验的影响 结果见图 2，采用 HCS 技术可以得到细胞吞噬绿色荧光标记细菌的图像。RAW264.7 细胞吞噬细菌后，带有绿色荧光标记的细菌会进入细胞质中，被 DAPI 染料染成蓝色的细胞核周围会有绿色荧光聚集，吞噬细菌越多表明细胞的吞噬率越高。图 2 中的高内涵图片分别表示不同给药时间下 Channel 1、Channel 2、Merge 以及软件识别分析细胞轮廓的图片。高内涵图片结合柱形图可以看出，不同给药时间对

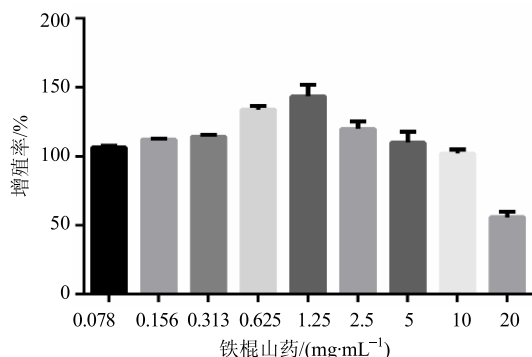


图 1 铁棍山药对 RAW264.7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Effects of *D. opposita* on RAW264.7 proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

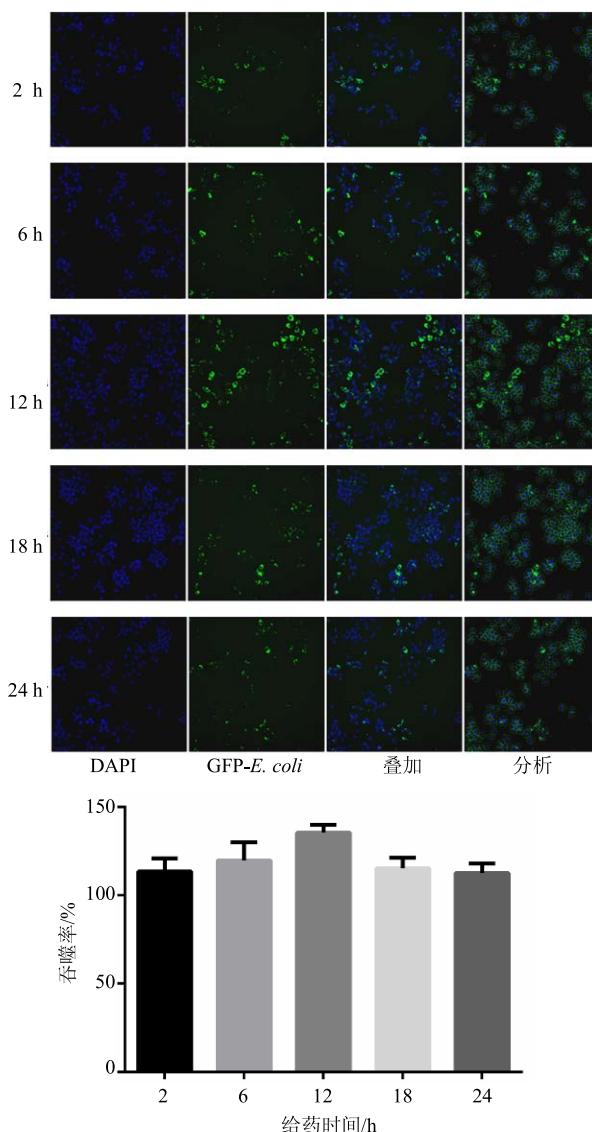


图 2 不同给药时间对细胞吞噬率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 2 Effects of different administration time on cell phagocytic rate ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

RAW264.7 细胞吞噬 GFP-*E. coli* 的影响不同，给药 12 h 可最大程度促进细胞吞噬功能。

3.2.2 细菌感染复数对吞噬实验的影响 结果见图 3，高内涵图片显示出，感染复数的不同会带来细胞吞噬细菌量的变化。当感染复数为 50 即加入细菌量是细胞量的 50 倍时，细胞吞噬细菌的量最多，表明 RAW264.7 细胞吞噬细菌的强度最大。

3.2.3 细菌刺激时间对吞噬实验的影响 结果见图 4，高内涵图片结合柱形图可知，不同刺激时间对 RAW264.7 细胞吞噬细菌的影响不同，刺激 1.5 h 可以最大程度地促进细胞吞噬细菌，时间延长吞噬率将不再升高。

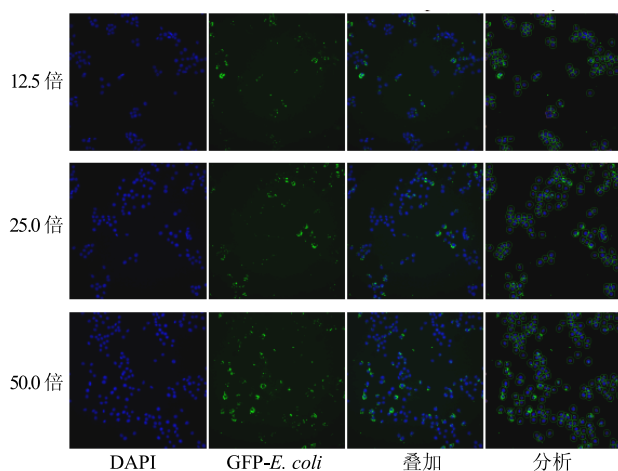


图 3 不同感染复数对细胞吞噬强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 3 Effects of different multiplicity of infection on cell phagocytic rate ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

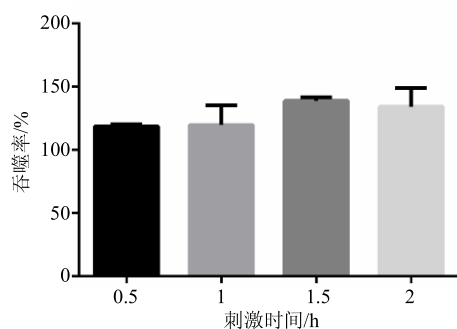
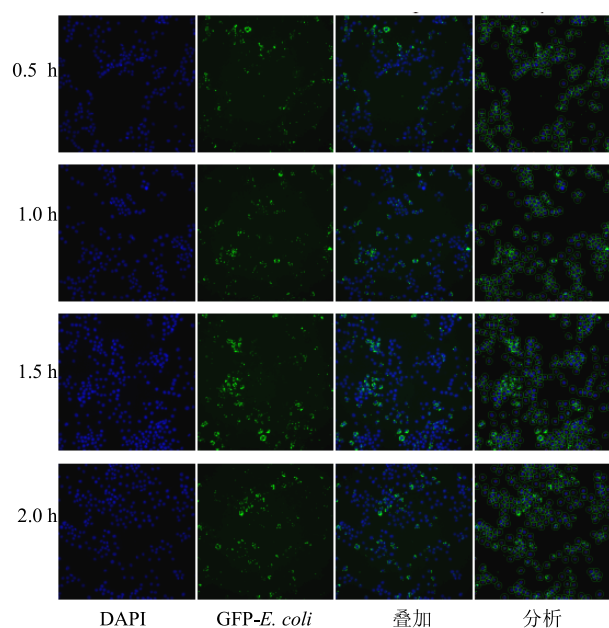


图 4 细菌刺激时间对细胞吞噬率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 4 Effects of different stimulation time on cell phagocytic rate ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.2.4 方法重复性的考察 考察不同板、不同时间点、不同人员操作下, 本实验所建立方法的重复性, 4 次实验细胞的吞噬率分别为 $(138.97 \pm 2.64) \%$ 、 $(138.13 \pm 5.29) \%$ 、 $(134.03 \pm 7.38) \%$ 、 $(141.77 \pm 5.25) \%$, 但 RSD 值较小为 2.31%。说明不同时间点、不同操作人员以及不同板之间, 同一样品的吞噬率较稳定, 重复性较好, 可以采用此方法评价药物的吞噬活性。

3.3 不同质量浓度铁棍山药对 RAW264.7 吞噬 GFP-*E. coli* 活性的影响

结果见图 5。高内涵实验分析得出的细胞吞噬率是孔中单个细胞的平均吞噬率, 每个高内涵图片中绿色荧光强度的不同能够反映出药物作用后细胞吞噬能力的变化。图中显示不同质量浓度铁棍山药作用后 RAW264.7 细胞的吞噬率有所不同, 铁棍山药增强细胞吞噬率在 1.25 mg/mL 时为最高, 随质量浓度降低其增强细胞吞噬作用也有下降趋势。统计分析得出, 与对照组相比, 阳性药 LPS 可明显促进细胞的吞噬能力, 说明造模成功; 在 0.625~1.25 mg/mL, 铁棍山药可明显促进细胞的吞噬活性 ($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

免疫是人体维持机体生理平衡的一种重要功能, 不仅可以抵抗病原的侵入, 防止疾病的发生, 还能清除体内衰老、死亡和损伤的细胞, 以及监视、识别和清除体内产生的异常细胞 (如肿瘤细胞)。巨噬细胞是机体发挥免疫调节作用的重要免疫细胞, 与机体自身抗癌、抗菌、抗病毒等功能的发挥密切相关^[16], 而 RAW264.7 细胞是一种来源于小鼠的可以无限增殖的巨噬细胞系。本实验采用 HCS 这一新技术, 初步建立了一种简便、精确、重复性好、自动化强度高的新方法检测 RAW264.7 细胞吞噬 GFP-*E. coli* 的方法。在考察多种影响因素的前提下, 确定了最佳实验条件为给药时间 12 h, 细菌感染复数为 50 倍, 细菌刺激时间为 1.5 h。另外, 本实验还考察了所建立方法的重复性, 4 次不同时间点、不同人员、不同 96 孔板测定后, RSD 值为 2.31%, 说明本实验的重复性较好, 实验方法可行。

巨噬细胞是机体的重要免疫细胞, 巨噬细胞数目的多少及单个细胞吞噬能力的变化都可能影响到机体免疫作用的发挥。本研究应用 HCS 筛选平台, 将 RAW264.7 巨噬细胞吞噬带有荧光标记细菌

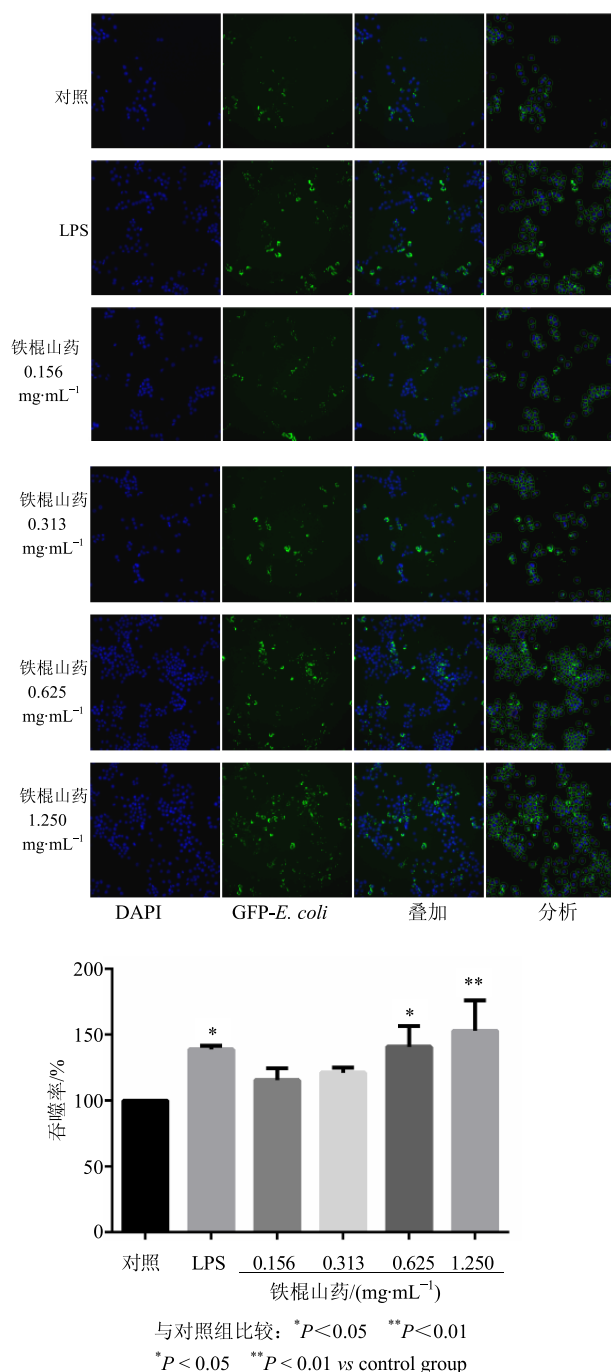


图 5 不同质量浓度铁棍山药对 RAW264.7 细胞吞噬 GFP-*E. coli* 细菌的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 5 Effects of different concentration of *D. opposita* on RAW264.7 phagocytosis ($\bar{x} \pm s, n=4$)

的荧光信号进行量化,通过药物刺激与否产生的菌通道荧光强度的比值,即加药组荧光度/对照组荧光度表示药物对巨噬细胞吞噬率的影响。实验结果显示加药组的吞噬率高于对照组,且随着药物质量浓度的降低其吞噬率逐渐减小,说明铁棍山药各质

量浓度组均能促进巨噬细胞的吞噬功能,在一定的范围内吞噬率与药物质量浓度呈正相关趋势。另外,本研究采用 CCK-8 法考察了铁棍山药的 RAW264.7 细胞增殖活性,1.250 mg/mL 时细胞的增殖活性最强。综上所述,铁棍山药增强 RAW264.7 细胞的吞噬作用表现在 2 个方面:促进细胞的增殖,以及增强单个细胞的吞噬能力。

本研究采用的主要技术手段是 HCS 技术,初步建立的基于高内涵结合荧光标记技术这一细胞吞噬细菌生物模型可以用于铁棍山药的免疫活性分析。而山药在我国各地分布较广、品系繁杂,道地药材“怀山药”以及普遍认为质量较好的铁棍山药与其他山药的生物活性到底有何差异等问题,本课题组还将采用此方法进一步考察。希望本实验能为进一步筛选和发现山药等补益类中药发挥免疫作用的物质基础及机制研究提供帮助。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Huang P T T, Jeon Y J. Macrophage activation by glycoprotein isolated from *Dioscorea batatas* [J]. *Toxicol Res*, 2011, 27(3): 167-172.
- [3] 徐新,于莲,马淑霞,等. 纳米山药多糖对大鼠免疫器官及巨噬细胞吞噬功能的影响 [J]. *中国微生态杂志*, 2014, 26(12): 1376-1378.
- [4] Kim M Y, Cho J Y. 20S-dihydroprotopanaxadiol, a ginsenoside derivative, boosts innate immune responses of monocytes and macrophages [J]. *J Ginseng Res*, 2013, 37(3): 293-299.
- [5] Villalonga N, David M, Bielanska J, et al. Immunomodulation of voltage-dependent K⁺ channels in macrophages: molecular and biophysical consequences [J]. *J Gen Physiol*, 2010, 135(2): 135-147.
- [6] 宋媛媛,周越,孙守兵,等. 丁香苷对免疫功能低下小鼠的免疫调节作用 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(2): 44-47.
- [7] 曹靖文,黄占旺,吴少福,等. 纳豆菌糖肽对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用 [J]. *现代食品科技*, 2015, 31(9): 1-67.
- [8] Hong Z, Li Y, Li G J, et al. Kv1.3 channel blockade enhances the phagocytic function of RAW264.7 macrophages [J]. *Sci China Life Sci*, 2015, 58(9): 867-875.

- [9] Lv X C, Chen D D, Yang L C, *et al.* Comparative studies on the immunoregulatory effects of three polysaccharides using high content imaging system [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 86(1): 28-42.
- [10] Shantanu S, Anne E. Carpenter, auguste genovesio. Increasing the content of high-content screening: An overview [J]. *J Biomol Screen*, 2014, 19(5): 640-650.
- [11] 王俨如, 陶晓倩, 胡玉梅, 等. 基于高内涵技术的20种中药提取物对 β 淀粉样蛋白致SH-SY5Y细胞损伤保护作用研究 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 267-274.
- [12] 马喆, 赵珺睿, 董冉冉, 等. 基于高内涵分析技术的何首乌提取物及其主要成分肝毒性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4021-4029.
- [13] Kubben N, Brimacombe K R, Donegan M, *et al.* A high-content imaging-based screening pipeline for the systematic identification of anti-progeroid compounds [J]. *Methods*, 2016, 96: 46-58.
- [14] Syam S, Bustamam A, Abdullah R. β mangostin suppress LPS-induced inflammatory response in RAW264. 7 macrophages *in vitro* and carrageenan-induced peritonitis *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(2): 435-445.
- [15] Overk C R, Yao P, Chen S N, *et al.* High-throughput screening and mechanism-based evaluation of estrogenic botanical extracts [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2008, 11(4): 283-293.
- [16] Lee Y G, Lee J, Byeon S E, *et al.* Functional role of Akt in macrophage-mediated innate immunity [J]. *Front Biosci*, 2011, 16(4): 517-530.