

枸杞多糖通过 TLR4/Src 通路促进巨噬细胞吞噬金黄色葡萄球菌

张悦¹, 姜孟伶¹, 曹金丹¹, 彭忠禄², 刘科峰^{2*}, 樊竑冶^{1*}

1. 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 211198

2. 湘南学院, 湖南 郴州 423099

摘要: **目的** 探究枸杞多糖 (*Lycium barbarum* polysaccharide, LBP) 对巨噬细胞吞噬金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 的影响及其机制。 **方法** 采用 CCK-8 法检测不同浓度的 LBP 对巨噬细胞活力的影响; 利用 Western blotting 法检测 LBP 对巨噬细胞丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 及 Src 激酶家族成员 (Src family kinases, SFKs) 中的 Src 蛋白表达水平的影响; 运用庆大霉素保护实验和流式细胞术检测 LBP 对巨噬细胞吞噬 *S. aureus* 的影响, 同时使用 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、MAPK、NF- κ B 和 Src 的抑制剂初步判断 LBP 的作用机制。 **结果** 100~600 μ g/mL 的 LBP 对巨噬细胞无毒性, 但能有效提高巨噬细胞的活力 ($P < 0.01$ 、0.001), 并且显著促进巨噬细胞对 *S. aureus* 的吞噬作用。虽然 LBP 可促进巨噬细胞中 MAPK 信号通路相关蛋白、NF- κ B 以及 Src 的磷酸化水平 ($P < 0.01$ 、0.001), 但 LBP 诱导巨噬细胞吞噬 *S. aureus* 能力仅被 TLR4 抑制剂 TAK242 和 Src 激酶家族抑制剂 AZD0530 显著抑制 ($P < 0.001$), 而不受 NF- κ B、MAPK 抑制剂的影响。 **结论** LBP 能够活化巨噬细胞, 并通过 TLR4/Src 信号通路促进巨噬细胞对 *S. aureus* 的吞噬。

关键词: 枸杞多糖; 巨噬细胞; 金黄色葡萄球菌; 吞噬功能; TLR4/Src 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)22-7466-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.22.023

Lycium barbarum polysaccharide promotes macrophage phagocytosis of *Staphylococcus aureus* through TLR4/Src pathway

ZHANG Yue¹, JIANG Meng-ling¹, CHAO Jin-dan¹, PENG Zhong-lu², LIU Ke-feng², FAN Hong-ye¹

1. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

2. Xiangnan University, Chenzhou 423099, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) on phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by macrophages. **Methods** CCK-8 was used to detect the effect of different concentrations of LBP on macrophage viability. The effect of LBP on the protein expressions of mitogen-activated protein kinase (MAPK), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and Src in members of Src kinase family were detected by Western blotting. Effects of LBP on phagocytosis of *S. aureus* by macrophages detected by gentamicin protection test and flow cytometry, and the macrophages were treated with the inhibitors of TLR4, NF- κ B, MAPK and Src to preliminary assess the mechanism of LBP. **Results** LBP at 100—600 μ g/mL had no toxicity to macrophages, but effectively improved the vitality of macrophages ($P < 0.01$, 0.001), and significantly promoted the phagocytosis of macrophages on *S. aureus*. Although LBP could promote phosphorylation levels of MAPK signaling pathway-related proteins, NF- κ B and Src in macrophages, the promoting effect of LBP on phagocytic ability of macrophages to *S. aureus* was only significantly inhibited by TLR4 inhibitors TAK242 and Src kinase family inhibitors AZD0530, but not by NF- κ B and MAPK inhibitors. **Conclusion** LBP can activate macrophages and promote phagocytosis of *S. aureus* by macrophages through TLR4/Src signaling pathway.

Key words: *Lycium barbarum* polysaccharides; macrophages; *Staphylococcus aureus*; phagocytic function; TLR4/Src pathway

收稿日期: 2023-08-04

基金项目: 湖南省“十四五”药学应用特色学科项目 (湘教通[2022]351号); 生物医药微生物组学研究湖南省高校重点实验室项目 (湘教通[2021]241号)

作者简介: 张悦 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物与分子免疫。Tel: 18372610967 E-mail: Zhangyue2y@163.com

*通信作者: 樊竑冶, 女, 博士, 副教授, 主要从事细胞与分子免疫研究。E-mail: changqingshu2004@126.com

刘科峰, 女, 博士, 副教授, 主要从事心血管疾病与免疫研究。E-mail: 2874605238@qq.com

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 是广泛存在于自然界的革兰阳性致病菌，也是社区和医院感染常见的病原菌之一，可引起急性或长期持续性感染，如脓毒症、坏死性肺炎和败血症等^[1-2]，严重威胁着公众健康。*S. aureus* 感染在临床上可用多种广谱抗生素治疗，但容易产生耐药性，其中以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA）的感染危害大。MRSA 感染已成为世界范围内难以解决的感染性疾病之一^[3]。因此，除了寻找新的抗生素外，通过调节宿主天然免疫功能来对抗感染性疾病是值得重视的辅助治疗策略。

宿主导向疗法（host-directed therapy, HDT）通过激活人体自身保护性的免疫反应、抑制过度的炎症反应，从而干预病原体在体内的感染，使机体恢复内环境稳态，以此实现对感染性疾病的辅助治疗^[4]。近年来，一些中药化合物被报道具有抗感染的辅助治疗潜力。黄芩苷能够保护小鼠免受 MRSA 的感染^[5]。海胆多糖可激活 Toll 样受体 4（Toll-like receptor 4, TLR4）信号转导和转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3, STAT3）信号通路促进巨噬细胞吞噬细菌，从而减轻细菌感染引起的组织损伤^[6]。枸杞多糖（*Lycium barbarum polysaccharides*, LBP）是从枸杞子 *Lycii Fructus* 中提取的最主要的活性成分，药性温和无毒，具有抗氧化^[7-9]、抗肿瘤^[10]、抗衰老、抗糖尿病、抗纤维化、神经保护、免疫调节^[11-13]等多种药理活性，具有良好的药物研究和临床应用价值。然而，LBP 是否能调节天然免疫来防御细菌感染尚未见报道。本研究首次探索了 LBP 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 吞噬 *S. aureus* 的影响及其潜在的机制，为 LBP 作为免疫调节 HDT 的候选药物提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞株与菌株

RAW264.7 细胞购自中国典型培养物保藏中心（CCTCC），*S. aureus* 菌株（25923）购自 ATCC。

1.2 药品与试剂

DMEM 培养基（批号 8122693）购自美国 Sigma 公司；胎牛血清（fetal bovine serum, FBS, 批号 42Q1299k）购自美国 Gibco 公司；CCK-8 试剂盒（批号 MA0218）购自大连美仑生物技术有限公司；枸杞多糖（质量分数为 51.5%，批号 A18GB144984）购自上海源叶生物科技有限公司；pHrodo™ Red *S.*

aureus Bioparticles™ conjugate for phagocytosis（批号 2599191）购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；细胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase, ERK）抗体（批号 F071106）、 β -actin 抗体（批号 F180047）购自 Abways Technology 公司；p-p65（Ser536）抗体（批号 3033T）、p-JNK（Thr183）抗体（批号 4668T）、JNK 抗体（批号 9252T）、p-Src（Ser473）抗体（批号 6943T）均购自美国 CST 公司；p-ERK（Thr202/Tyr204）抗体（批号 67b4599）购自美国 Affinity Biosciences 公司；p-p38 抗体（批号 I03062031）、p38 抗体（批号 I109270764）、p65 抗体（批号 I10211980）、Src 抗体（批号 I02201570）购自中国沈阳万类生物科技有限公司；HPR 标记的羊抗兔 IgG 二抗（批号 SA00001-4）购自美国 Proteintech Group 公司；TLR4 抑制剂 TAK242（批号 HY-11109）购自美国 MedChemExpress 公司；硫酸庆大霉素（批号 S403001）、核因子- κ B（nuclear factor- κ B, NF- κ B）抑制剂 BAY11-7082（批号 S291304）、ERK 抑制剂 SCH772984（批号 S710108）、JNK 抑制剂 SP600125（批号 S146005）、p38 抑制剂 SB203580（批号 S107611）、Src 家族激酶抑制剂 AZD0530（批号 S100615）均购自美国 Selleckchem 公司；0.1% Triton X-100（批号 9002-93-1）购自上海捷倍思基因技术有限公司；增强型 ECL 化学发光检测试剂盒（批号 S7017030）购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司。

1.3 仪器

MSC-Advantage™ II 级生物安全柜、Micro CL21R 型高速冷冻离心机（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；ECLIPSE Ts2 型倒置显微镜（日本 Nikon 公司）；SpectraMax i3x 型多功能酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；C25 型恒温摇床（美国 New Brunswick Scientific 公司）；GNP-9270 型隔水式恒温培养箱（上海精宏实验设备有限公司）；BD FACSCalibur 流式细胞仪（美国 BD 公司）；Mini-Protein Tetra 垂直电泳槽、湿式转印槽（美国 Bio-Rad 公司）；Tanon-5200Multi 型全自动化学发光成像仪（上海天能科技有限公司）。

2 方法

2.1 细胞培养

RAW264.7 细胞用含 10% FBS 和 1% 链霉素-青霉素的 DMEM 培养基，置于含 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中培养。根据细胞的生长状态，当细胞融

合度为 70%~90%达到对数生长期时, 进行相关实验或传代。

2.2 CCK-8 法检测巨噬细胞活性

取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 调整密度为 2.5×10^5 个/mL, 取 100 μ L 接种至 96 孔板中, 培养过夜。待细胞贴壁后, 加入 0、100、200、300、400、600 μ g/mL 的 LBP 处理细胞, 继续培养 24 h。弃培养基, 每孔加入 100 μ L 含 10% CCK-8 溶液的培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中避光培养 1 h, 用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度 (A) 值。

2.3 庆大霉素保护实验检测巨噬细胞吞噬细菌的数量

RAW264.7 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 使用 600 μ g/mL LBP 处理细胞不同时间点。按 MOI=50:1 (细菌:细胞) 的比例向细胞中加入 *S. aureus*, 4 $^{\circ}$ C、400 \times g 离心 10 min, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中共孵育 1 h 使细胞吞噬细菌。弃上清, 用冷的 PBS 清洗细胞, 再加入 300 μ g/mL 庆大霉素, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 杀死胞外菌。弃上清, 冷的 PBS 清洗后用 0.1% Triton X-100 裂解细胞 10~15 min, 收集裂解液后梯度稀释并点板培养, 12 h 后统计菌落数。

2.4 流式细胞术检测吞噬细菌的巨噬细胞比例

RAW264.7 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 加入相应刺激。按 MOI=50:1 (细菌:细胞) 的比例加入 pHrodo-*S. aureus* 进行感染, 并放置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中共孵育 1 h。弃上清, 用冷的 PBS 清洗细胞, 将细胞重悬于 200 μ L PBS 中, 用流式细胞仪进行检测, FlowJo VX 软件分析结果。

2.5 Western blotting 检测蛋白表达

RAW264.7 细胞以 8×10^4 个/孔接种于 24 孔板, 待细胞贴壁后, 加入相应刺激。弃上清, 每孔加入 200 μ L 含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 裂解液, 冰上裂解 10 min 提取总蛋白。BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 加入适量蛋白上样缓冲液, 涡旋混匀, 沸水煮 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 置于 5% 脱脂牛奶中, 摇床振荡封闭 1 h, 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜, TBST 洗膜 5 次后室温孵育二抗 (1:10 000) 2 h。TBST 洗膜 5 次后, 避光用 ECL 显影, 并用全自动化学发光成像仪成像, 采用 Image J 软件分析条带灰度。

2.6 统计学分析

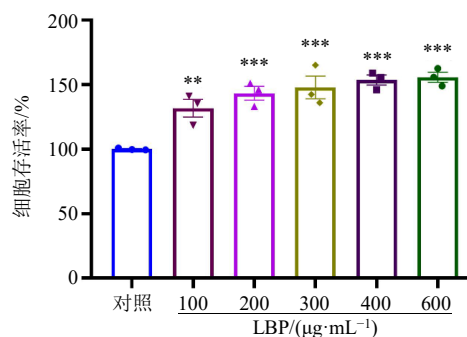
采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行分析,

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较采用 t 检验分析。

3 结果

3.1 LBP 对巨噬细胞活力的影响

为了考察 LBP 是否影响巨噬细胞的活力, 利用 CCK-8 实验检测不同质量浓度的 LBP 作用于 RAW264.7 细胞 24 h 后的细胞活力。如图 1 所示, 100~600 μ g/mL 的 LBP 对细胞无毒性, 并显著提高 RAW264.7 细胞活力 ($P < 0.01, 0.001$)。表明 LBP 能够有效提高巨噬细胞的活力。



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below figures

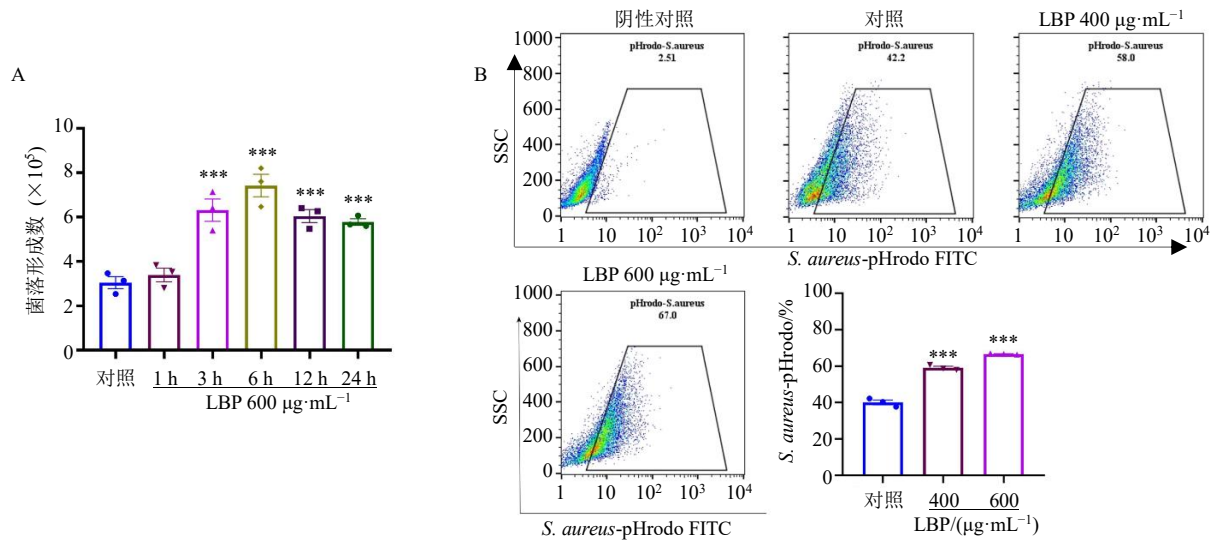
图 1 LBP 对 RAW264.7 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of LBP on RAW264.7 cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 LBP 增强巨噬细胞对 *S. aureus* 的吞噬作用

为了探究 LBP 对 RAW264.7 细胞吞噬 *S. aureus* 的影响, 首先采用庆大霉素保护实验检测 LBP 对 RAW264.7 细胞吞噬 *S. aureus* 数量的影响。如图 2-A 所示, 600 μ g/mL LBP 刺激 3 h 可显著提高 RAW264.7 细胞对 *S. aureus* 的吞噬数量 ($P < 0.001$), 且该作用持续至 24 h。说明 LBP 处理 3 h 即可有效促进 RAW264.7 细胞对 *S. aureus* 的吞噬作用。

pHrodo 是一种 pH 敏感的荧光染料, 其荧光强度随环境中 pH 值的变化而改变。pHrodo-细菌偶联物被巨噬细胞吞噬进入溶酶体后, 该染料在溶酶体的酸性环境中荧光强度显著增加。用不同质量浓度 (400、600 μ g/mL) 的 LBP 处理巨噬细胞 24 h 后, 按 MOI=50:1 (细菌:细胞) 的比例加入 pHrodo-*S. aureus* 并与 RAW264.7 细胞共孵育 1 h。流式细胞术检测 RAW264.7 细胞对 pHrodo-*S. aureus* 的吞噬作用。如图 2-B 所示, LBP 呈剂量相关性地促进巨噬细胞吞噬 pHrodo-*S. aureus* ($P < 0.001$)。以上结果均表明 LBP 能够显著增强巨噬细胞对 *S. aureus* 的吞噬能力。



A-庆大霉素保护实验检测 LBP 处理不同时间点对 RAW264.7 细胞吞噬 *S. aureus* 的影响 B-流式细胞术检测不同剂量 LBP 对 RAW264.7 细胞吞噬 pHrodo-*S. aureus* 的影响

A-effect of LBP on phagocytosis of *S. aureus* in RAW264.7 cells by gentamicin protection assay B-effect of LBP with different doses on phagocytosis of pHrodo-*S. aureus* in RAW264.7 cells detected by flow cytometry

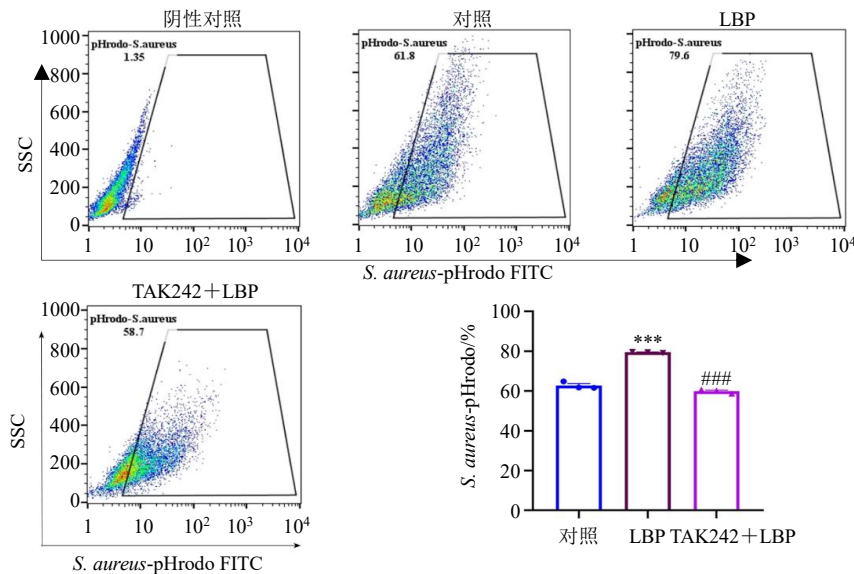
图 2 LBP 对巨噬细胞吞噬 *S. aureus* 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of LBP on macrophage phagocytosis of *S. aureus* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 LBP 可通过 TLR4 信号促进巨噬细胞吞噬 *S. aureus*

TLRs 是机体感应病原微生物, 并及时做出防御反应的重要模式识别受体^[14]。为了探究 LBP 对 RAW264.7 细胞吞噬 *S. aureus* 能力的促进作用是否与 TLR4 信号通路有关, 使用 TLR4 抑制剂 TAK242 (20 µmol/L) 预处理 RAW264.7 细胞 1 h 后,

再用 600 µg/mL LBP 处理 RAW264.7 细胞 24 h, 采用流式细胞术检测 RAW264.7 细胞对 pHrodo-*S. aureus* 的吞噬作用。如图 3 所示, TAK242 预处理后, LBP 对 RAW264.7 细胞吞噬 *S. aureus* 的促进作用被显著抑制 ($P < 0.001$)。表明 TLR4 信号通路参与了 LBP 诱导的 RAW264.7 细胞对 *S. aureus* 的吞噬功能。



与 LBP 组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 图 6、7 同

$P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs LBP group, same as figs. 6, 7

图 3 TLR4 信号通路对 LBP 诱导的巨噬细胞吞噬的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of TLR4 signaling pathway on macrophage phagocytosis induced by LBP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 LBP 活化巨噬细胞中 NF-κB 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路

TLR4 信号激活后可引起一系列的信号级联反应, 包括下游 NF-κB 和 MAPK 信号通路。为探究 LBP 对巨噬细胞中 NF-κB 和 MAPK 信号活化的影

响, 采用 600 μg/mL 的 LBP 处理 RAW264.7 细胞, Western blotting 实验检测 LBP 对 TLR4 下游信号的活化作用。如图 4 所示, LBP 刺激 1 h 后即可显著促进 p65、JNK、ERK 和 p38 的磷酸化蛋白表达水平 ($P < 0.01$ 、 0.001)。说明 LBP 能够激活巨噬细胞中的 NF-κB 和 MAPK 信号通路。

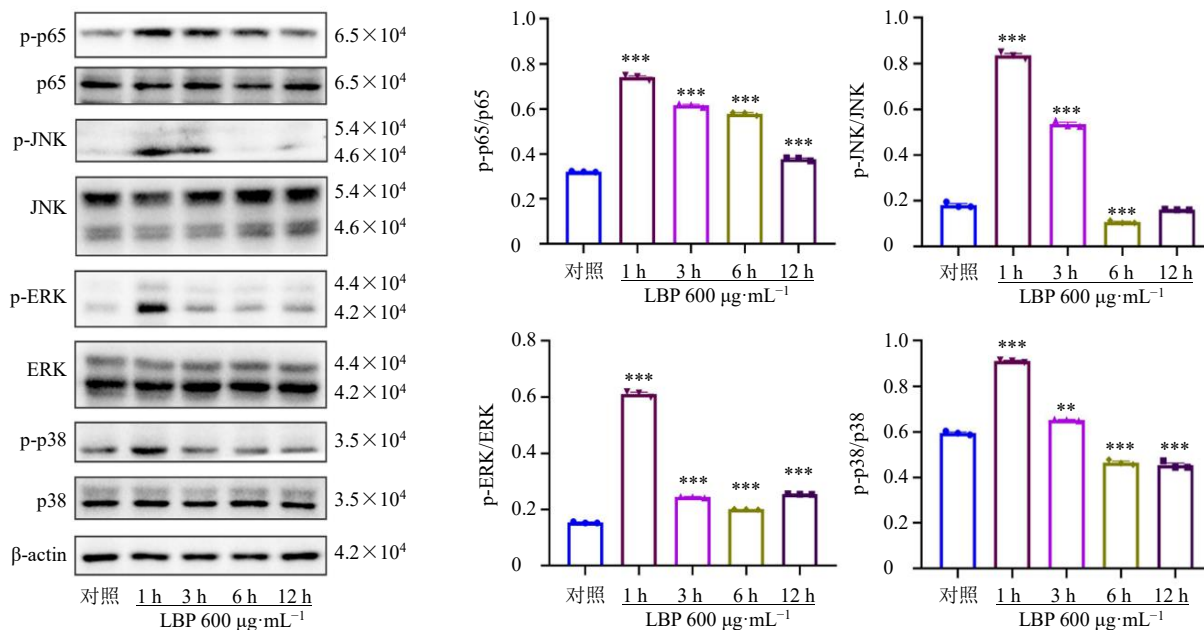


图 4 LBP 对巨噬细胞 NF-κB/MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of LBP on NF-κB/MAPK signaling pathway-related protein expressions in macrophage ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 LBP 促进巨噬细胞的吞噬作用与 NF-κB 和 MAPK 无关

为了考察 LBP 对巨噬细胞吞噬 *S. aureus* 的促进作用是否与其激活 TLR4 下游 NF-κB 和 MAPK 信号通路有关, 采用 NF-κB 抑制剂 BAY11-7082 (2 μmol/L)、ERK 抑制剂 SCH772984 (0.5 μmol/L)、JNK 抑制剂 SP600125 (5 μmol/L) 和 p38 抑制剂 SB203580 (2 μmol/L) 预处理 RAW264.7 细胞 1 h, 再使用 600 μg/mL LBP 刺激细胞 12 h。流式结果显示, 抑制 NF-κB、ERK、JNK 和 p38 信号均不影响 LBP 诱导的 RAW264.7 细胞对 pHrodo-*S. aureus* 的吞噬作用 (图 5)。以上结果说明 LBP 对巨噬细胞吞噬 *S. aureus* 的促进作用不受 NF-κB 和 MAPK 信号的调控。

3.6 LBP 通过 TLR4 活化 Src 信号

Src 家族激酶通过磷酸化细胞质中受体结构域的 ITAM 序列中的酪氨酸, 促进免疫识别受体聚集并启动巨噬细胞骨架重塑^[15], 导致细胞膜内陷, 形

成吞噬体进入细胞。为探究 LBP 是否能够活化 Src 信号, 使用 600 μg/mL LBP 处理细胞, Western blotting 实验检测 LBP 对 Src 信号的活化作用。如图 6-A 所示, LBP 可显著增加 Src 的磷酸化水平 ($P < 0.001$)。而 TLR4 抑制剂 TAK-242 预处理 1 h, 显著抑制了 LBP 诱导的 Src 的活化 ($P < 0.01$, 图 6-B)。说明 LBP 能够通过 TLR4 活化 Src 信号通路。

3.7 LBP 通过 TLR4/Src 促进巨噬细胞对 *S. aureus* 的吞噬作用

为探究 LBP 对巨噬细胞吞噬 *S. aureus* 的促进作用是否与其激活 Src 信号通路有关, 使用 600 μg/mL LBP 预处理 RAW264.7 细胞 12 h, 再用 Src 家族激酶抑制剂 AZD0530 (15 μmol/L) 处理细胞 2 h。流式细胞术检测 RAW264.7 细胞对 pHrodo-*S. aureus* 的吞噬能力。结果显示, 阻断 Src 家族激酶显著抑制 RAW264.7 细胞对 *S. aureus* 的吞噬能力 ($P < 0.001$, 图 7)。综合以上实验结果说明, LBP 通过 TLR4/Src 信号促进巨噬细胞对 *S. aureus* 的吞噬。

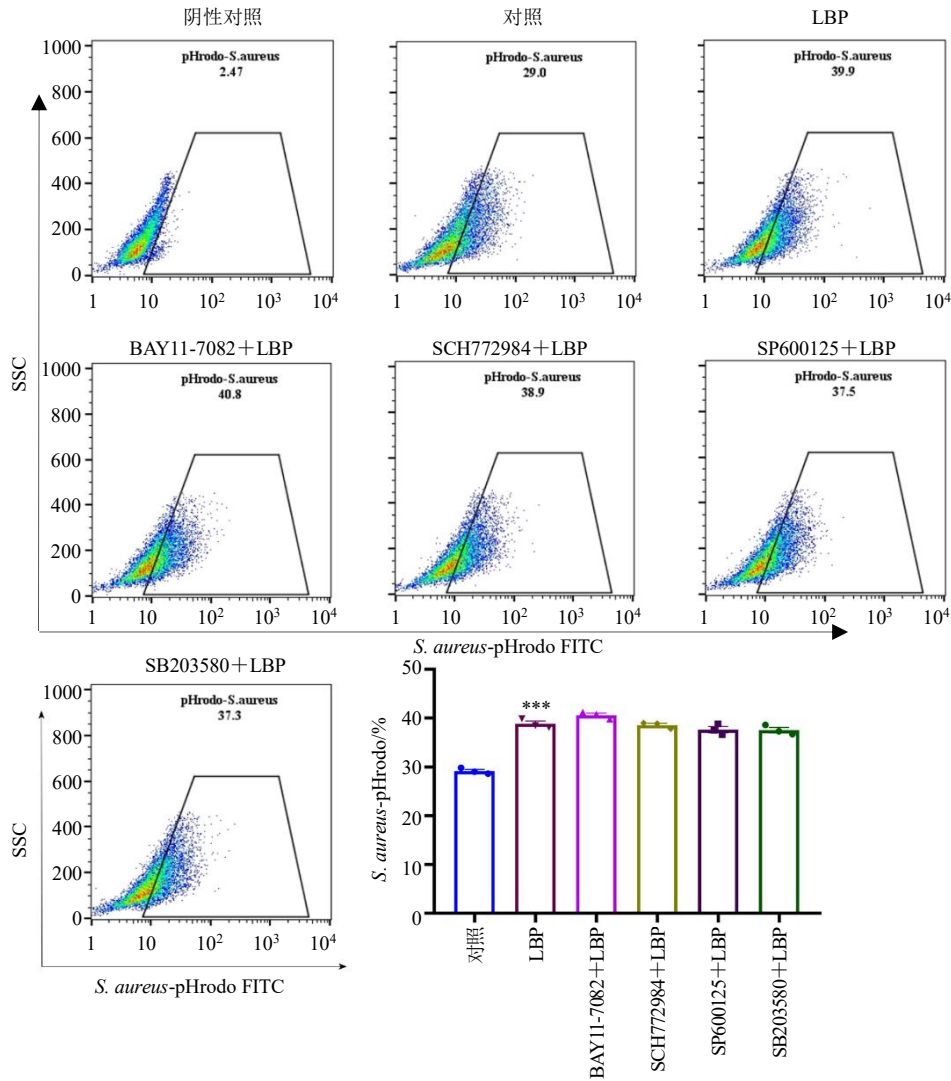
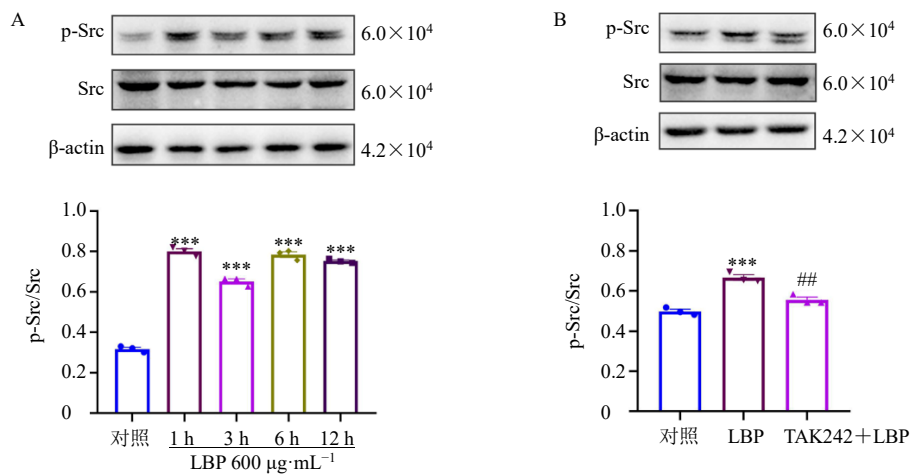


图 5 NF-κB、MAPK 信号对 LBP 诱导的巨噬细胞吞噬的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of NF-κB and MAPK signaling on macrophage phagocytosis induced by LBP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-LBP 对 Src 信号的活化作用 B-给予 TLR4 抑制剂 TAK-242 预处理后, LBP 对 Src 信号通路相关蛋白表达的影响

A-activation of Src signaling by LBP B-effect of LBP on Src signaling pathway-related protein expressions after pretreatment with TLR4 inhibitor TAK-242

图 6 LBP 对巨噬细胞 Src 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of LBP on Src signaling pathway-related protein expressions in macrophage ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

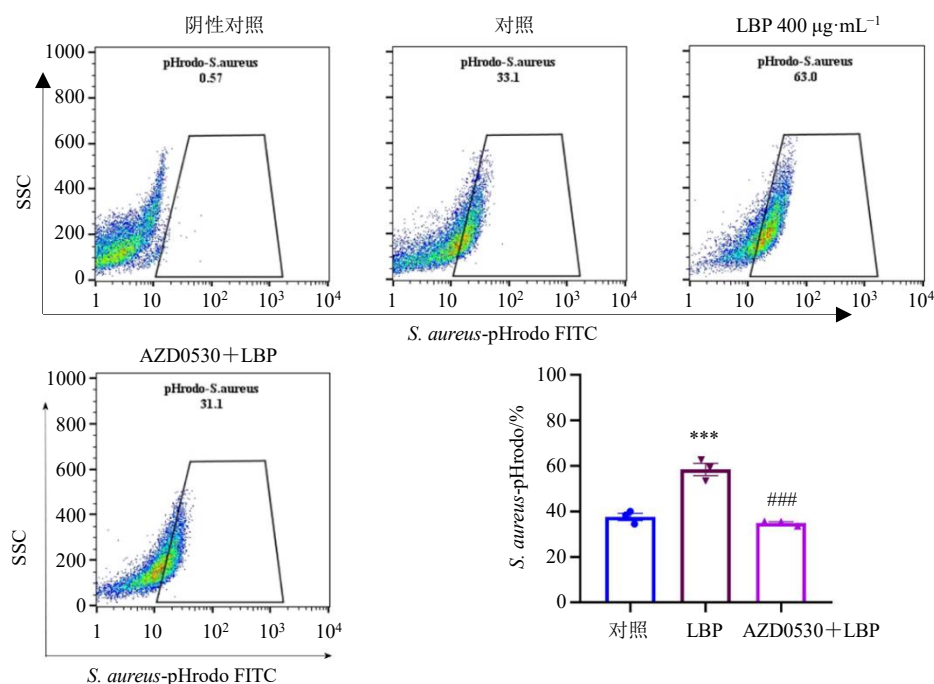


图 7 Src 信号对 LBP 诱导的巨噬细胞吞噬的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Src signaling on macrophage phagocytosis induced by LBP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

HDT 作为一种新型抗病原体感染的治疗策略, 受到越来越多的关注。在治疗金葡菌感染性炎症过程中, 大量天然提取物通过辅助治疗显示了其潜在药用价值, 如穿心莲内酯^[16]、黄芩苷^[5]等。本研究发现, LBP 不仅可以活化巨噬细胞, 还能增强巨噬细胞对 *S. aureus* 的吞噬能力, 其机制可能主要涉及 LBP 对 TLR4/Src 信号通路的激活作用。这些结果也表明 LBP 在增强宿主天然免疫、抵御细菌感染方面的潜力, 并为其成为辅助治疗细菌感染的 HDT 策略的候选药物提供依据。

巨噬细胞的吞噬作用包括识别配体、黏附、肌动蛋白聚合、吞噬杯的形成、摄取和降解等过程^[17]。TLR4 是一类天然免疫模式识别受体, 广泛存在于单核细胞、树突状细胞和巨噬细胞表面^[18]。TLR4 信号传导在对微生物感染的先天免疫反应中起关键作用^[19]。细菌感染或 LPS 刺激触发 Piezo1 和 TLR4 形成复合物, 促进肌动蛋白重塑, 增强巨噬细胞的吞噬功能^[20]。本研究发现, TLR4 抑制剂可以显著抑制 LBP 诱导的巨噬细胞的吞噬能力, 表明 TLR4 信号参与了 LBP 诱导的巨噬细胞对 *S. aureus* 的吞噬。

TLR4 下游 NF- κ B 和 MAPK 信号是调节炎症和免疫的关键因子。据报道, 抑制 NF- κ B 和 MAPK 信号可显著减少细胞因子的释放, 降低巨噬细胞对肠

球菌的吞噬和清除能力^[21]。本研究发现, 抑制 NF- κ B 和 MAPK 均不影响 LBP 诱导的巨噬细胞的吞噬功能, 而使用 Src 家族激酶抑制剂 AZD0530 能够有效抑制 LBP 诱导的巨噬细胞的吞噬能力。Src 家族激酶在巨噬细胞骨架重排、吞噬体形成的过程中发挥重要作用^[22]。这些结果表明 TLR4/Src 通路介导了 LBP 对巨噬细胞吞噬功能的促进作用。

综上, LBP 可以活化巨噬细胞, 并促进巨噬细胞对 *S. aureus* 的吞噬作用, 且这种促进作用可能部分通过 TLR4/Src 信号介导的, 关于 LBP 促进巨噬细胞吞噬 *S. aureus* 的更深入机制还需要进一步探索。本研究初步探究了 LBP 通过提高天然免疫的活化从而增强抗感染能力, 并在一定程度上阐明了 LBP 促进巨噬细胞吞噬 *S. aureus* 的相关机制, 为其成为 HDT 相关药物的开发提供了理论和实验依据。然而, 本研究仅进行了体外实验, 并未在体内探究 LBP 的抗细菌感染作用。下一步将建立动物实验模型, 进一步确认 LBP 在增强宿主天然免疫、抵御细菌感染方面的作用, 这将对 HDT 药物的开发具有积极意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hou H J, Li Y, Jin Y F, *et al.* The crafty opponent: The defense systems of *Staphylococcus aureus* and response

- measures [J]. *Folia Microbiol*, 2022, 67(2): 233-243.
- [2] Rowe S E, Wagner N J, Li L P, *et al.* Reactive oxygen species induce antibiotic tolerance during systemic *Staphylococcus aureus* infection [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(2): 282-290.
- [3] Lee A S, de Lencastre H, Garau J, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 18033.
- [4] Nisini R, Oggioni M R, Rossolini G M, *et al.* Editorial: Exploiting novel combined host- and pathogen-directed therapies for combating bacterial multidrug resistance [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 616486.
- [5] Shi T, Li T T, Jiang X R, *et al.* Baicalin protects mice from infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via alleviating inflammatory response [J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 108(6): 1829-1839.
- [6] Tian X L, Guo M, Zhang X Y, *et al.* *Strongylocentrotus nudus* eggs polysaccharide enhances macrophage phagocytosis against *E. coli* infection by TLR4/STAT3 axis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 807440.
- [7] He N W, Yang X B, Jiao Y D, *et al.* Characterisation of antioxidant and antiproliferative acidic polysaccharides from Chinese wolfberry fruits [J]. *Food Chem*, 2012, 133(3): 978-989.
- [8] Xiao J, Liong E C, Ching Y P, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharides protect mice liver from carbon tetrachloride-induced oxidative stress and necroinflammation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(2): 462-470.
- [9] 邓清月, 吕芳, 董英, 等. 枸杞多糖中医药研究概况: 文献计量学分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(9): 2852-2862.
- [10] Zhang M, Chen H X, Huang J, *et al.* Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on human hepatoma QGY7703 cells: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis [J]. *Life Sci*, 2005, 76(18): 2115-2124.
- [11] Bo R N, Zheng S S, Xing J, *et al.* The immunological activity of *Lycium barbarum* polysaccharides liposome *in vitro* and adjuvanticity against PCV₂ *in vivo* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 85: 294-301.
- [12] Xiao Z Y, Deng Q, Zhou W X, *et al.* Immune activities of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. What do we know so far? [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 229: 107921.
- [13] Du M Z, Hu X Y, Kou L, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharide mediated the antidiabetic and antinephritic effects in diet-streptozotocin-induced diabetic Sprague Dawley rats via regulation of NF- κ B [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 3140290.
- [14] Duan T H, Du Y, Xing C S, *et al.* Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 812774.
- [15] Fitzer-Attas C J, Lowry M, Crowley M T, *et al.* Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn [J]. *J Exp Med*, 2000, 191(4): 669-682.
- [16] Zhang L L, Wen B, Bao M, *et al.* Andrographolide sulfonate is a promising treatment to combat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its biofilms [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 720685.
- [17] Weiss G, Schaible U E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria [J]. *Immunol Rev*, 2015, 264(1): 182-203.
- [18] Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(4): 1233-1261.
- [19] Li D Y, Wu M H. Pattern recognition receptors in health and diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 291.
- [20] Geng J, Shi Y R, Zhang J J, *et al.* TLR4 signalling via Piezo1 engages and enhances the macrophage mediated host response during bacterial infection [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3519.
- [21] Zou J, Shankar N. Roles of TLR/MyD88/MAPK/NF- κ B signaling pathways in the regulation of phagocytosis and proinflammatory cytokine expression in response to *E. faecalis* infection [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136947.
- [22] Berton G, Mócsai A, Lowell C A. Src and Syk kinases: Key regulators of phagocytic cell activation [J]. *Trends in Immunology*, 2005, 26(4): 208-214.

[责任编辑 李亚楠]