

张慧琴,霍乃蕊,冀霞,等. 羊骨胶原肽对大鼠腹腔巨噬细胞免疫能力的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 176-182.
Zhang HQ, Huo NR, Ji X, et al. Effect of sheep bone collagen peptide on immune function in rat peritoneal macrophages [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 176-182.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.006

羊骨胶原肽对大鼠腹腔巨噬细胞免疫能力的影响

张慧琴[#], 霍乃蕊[#], 冀霞, 段卓, 马林峰, 古少鹏^{*}

(山西农业大学动物医学学院, 山西 晋中 030801)

【摘要】 目的 探究羊骨胶原肽(sheep bone collagen peptide, SBCP)对正常状态及脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)活化状态巨噬细胞免疫能力的影响。方法 以不同剂量的 SBCP 作用于未经 LPS 活化和 LPS 活化的大鼠腹腔巨噬细胞, 分别以 MTT 法和中性红法测定巨噬细胞代谢活力和吞噬活性, Griess 法测定 NO 分泌量, ELISA 检测 TNF- α 、IL-6 含量, qRT-PCR 测定 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)通路相关基因及负性调控因子单 Ig 区 IL-1 相关受体(Single Ig IL-1-related receptor, SIGIRR)的 mRNA 表达量。结果 SBCP 作用于正常状态的巨噬细胞, 可提高其代谢活力, 吞噬活性及 NO、TNF- α 、IL-6 分泌量, 上调 TLRs 通路相关基因表达量, 下调 SIGIRR mRNA 表达量, 均呈剂量依赖性, SBCP 剂量为 $10^5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 与 LPS 空白组无显著性差异。SBCP 作用于 LPS 活化的巨噬细胞时, 可抑制其代谢活力, 以 $10^2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 效果最佳; 对吞噬活性及 NO、TNF- α 、IL-6 分泌量的抑制均以 $10^3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 最佳; 并下调 TLRs 相关基因表达量且上调 SIGIRR mRNA 的表达量。结论 SBCP 通过 TLRs 信号通路对炎症反应发挥双向调节作用, 剂量为 $10 \sim 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时可增强巨噬细胞的免疫能力, $10^5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时可诱导巨噬细胞释放大量炎症介质。而对 LPS 诱导的炎症反应, SBCP 各剂量组均具有抑制作用。

【关键词】 羊骨胶原肽; 巨噬细胞; 免疫功能; Toll 样受体(TLRs); 炎症因子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 02-0176-07

Effect of sheep bone collagen peptide on immune function in rat peritoneal macrophages

ZHANG Huiqin[#], HUO Nairui[#], JI Xia, DUAN Zhuo, MA Linfeng, GU Shaopeng^{*}

(College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China)

Corresponding author: GU Shaopeng. E-mail: shpgu@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of sheep bone collagen peptide (SBCP) on the immune function of macrophages with or without stimulation with lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Rat peritoneal macrophages were treated with different doses of SBCP, with or without stimulation with LPS. The metabolic activity and phagocytic ability of macrophages were measured by MTT assay and the neutral red method, respectively. The production of NO was measured with the Griess reaction, and TNF- α and IL-6 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression levels of key genes in the Toll-like receptor pathway and the negative regulatory factor Single Ig IL-1-related receptor were measured by qRT-PCR. **Results** SBCP treatment of normal macrophages increased their metabolic activity, phagocytosis, NO, TNF- α and IL-6 production, and upregulated mRNA expression of key genes in the TLR pathway and

【基金项目】 国家自然科学基金(31201347), 山西省重点研发计划(201803D221024-2)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(31201347), Province Key R&D Program of Shanxi(201803D221024-2).

【作者简介】 张慧琴(1995—), 女, 硕士, 研究方向: 兽医公共卫生与动物疾病防治。Email: 1374096546@qq.com;

霍乃蕊(1972—), 女, 教授, 研究方向: 兽医公共卫生与动物疾病防治。Email: tgnrhuo@163.com。

[#]共同第一作者

【通信作者】 古少鹏(1968—), 男, 教授, 研究方向: 兽医公共卫生与动物疾病防治。Email: shpgu@163.com

downregulated SIGIRR mRNA expression in a dose-dependent manner. At a concentration of $10^5 \mu\text{g/mL}$, there was no significant difference between the SBCP and LPS group. SBCP treatment of LPS-stimulated macrophages inhibited their metabolic activity, with $10^2 \mu\text{g/mL}$ having the greatest effect, while $10^3 \mu\text{g/mL}$ most strongly inhibited phagocytosis and the secretion of NO, TNF- α and IL-6. This concentration also downregulated the mRNA expression of TLR-related genes and upregulated the mRNA expression of SIGIRR. **Conclusions** SBCP has a dual regulatory effect on the inflammatory response through the TLR signaling pathway. At a concentration of $10 \sim 10^4 \mu\text{g/mL}$, it enhances the immune activity of macrophages, while at $10^5 \mu\text{g/mL}$, it induces macrophages to release various inflammatory mediators. However, SBCP inhibits the inflammatory reaction induced by LPS.

【Keywords】 sheep bone collagen peptide; macrophages; immunity; Toll-like receptors(TLRs); inflammatory factors
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

我国为畜牧大国^[1],羊骨资源十分丰富,但其生物利用率极低,多用于动物饲料的添加^[2]。羊骨营养丰富,蛋白含量约为 15.4%,但 90% 以上的羊骨蛋白为生物利用度很低的胶原蛋白^[2-3]。通过酶解制成羊骨胶原多肽(sheep bone collagen peptide, SBCP),不仅可提高生物利用度^[4-5],而且赋予了其独特的生理功能,如抗氧化^[6]、免疫调节^[7]、改善骨质疏松骨^[8]等。

巨噬细胞是一种多功能细胞^[9],几乎存在于所有组织,构成机体免疫的第一道防线,是炎症反应的核心细胞^[10]。巨噬细胞受到细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激后,释放炎症因子如 TNF- α 、IL-6、IL-1 和 IFN- γ 等,产生 NO、活性氧等一系列炎症介质,激活 TLRs、NF- κ B、MAPK 等信号通路^[11],参与机体的炎症级联反应^[12]。

前期研究表明, SBCP 可增强大鼠的免疫功能^[7]。本研究旨在探究 SBCP 对大鼠腹腔巨噬细胞体外吞噬活性、代谢活力、炎症因子释放能力等免疫功能的影响;同时以 LPS 刺激大鼠腹腔巨噬细胞,建立炎症免疫调节的细胞模型,探究 SBCP 对炎症的免疫调节作用,为 SBCP 开发为免疫调节剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只 2 ~ 3 月龄 SPF 级 SD 大鼠,体重(203 ± 20)g,雌雄兼用购自中国食品药品检定研究院(大兴)【SCXK(京)2017-0005】。饲养于山西农业大学动物实验室【SYXK(晋)2020-0003】,维持饲料购自山西医科大学动物实验中心。自由饮水,控制环境温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40% ~ 60%,昼夜交替各 12 h,其它环境条件符合 GB14923-2001 的要

求。本试验方案符合山西农业大学动物护理与使用委员会的要求(SXAU-EAW-2020SD0201)。

1.1.2 主要试剂与仪器

羊骨胶原肽购自内蒙古锡盟肽好,蛋白含量为 98.78%,其中含 90.78% 分子量 ≤ 1000 Da 的肽,6.89% 羟脯氨酸。RPMI-1640 基础培养液(Hyclone)、脂多糖(索莱宝,北京)、胎牛血清(ScienCell,美国)、肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白介素 6(Interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒购自江苏酶免;RT-PCR 及 SYBRTM Premix Ex TapTM II 试剂为 TaKaRa 产品等。

311 型 CO₂ 培养箱(Thermo,美国);SpectraMax M5 酶标仪(Molecular Devices,美国);StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪(ABI,美国)等。

1.2 方法

1.2.1 大鼠腹腔巨噬细胞的制备及分组处理

大鼠腹腔巨噬细胞的提取参照 Petinatti 等^[13]的方法,离心(1500 r/min, 5 min)所得沉淀即腹腔巨噬细胞,加入 RPMI-1640 完全培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素-庆大霉素混合溶液)重悬细胞,调节细胞浓度至每毫升 2×10^6 个。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养至细胞贴壁,弃掉培养液,无血清培养基洗去未贴壁细胞即得纯化的巨噬细胞。

96 孔板,每孔接种 2×10^5 个巨噬细胞,培养至贴壁,更换 RPMI-1640 完全培养基,加入 SBCP(PBS 溶解)和/或 LPS 后,用完全培养基补充至 200 μL 。SBCP 组分别加入终浓度为 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 $10^5 \mu\text{g/mL}$ 的 SBCP; LPS + SBCP 组在加入上述浓度 SBCP 的同时加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS。所有处理组每个浓度设置 3 个复孔,并设置阴性对照孔(只含巨噬细胞)、炎症模型孔(巨噬细胞 + 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS)和调零孔(只含培养基)。

1.2.2 巨噬细胞代谢活力及吞噬活性的测定

各组细胞培养 12 h 后,弃去培养液,每孔加入 10 μL MTT(5 mg/mL)和 90 μL 完全培养基,孵育 4 h,加入 100 μL DMSO,缓慢震荡 10 min,酶标仪 490 nm 处测定吸光度值($\text{OD}_{490\text{ nm}}$)。巨噬细胞吞噬中性红的测定参照左爱玲^[7]的方法进行。

1.2.3 巨噬细胞炎性介质和炎性因子分泌量的测定

收集各组细胞上清液,参考 Kim 等^[14]的方法测定其中炎性介质 NO 的含量,按试剂盒说明测定其中炎性因子 TNF- α 、IL-6 的含量。

1.2.4 巨噬细胞总 RNA 的提取及 qRT-PCR

6 孔板,每孔接种 2×10^6 个巨噬细胞,培养至贴壁,更换 RPMI-1640 完全培养基,加入 SBCP 和/或 LPS 后,用完全培养基补充至 3 mL。参照田胜男等^[15]的方法提取巨噬细胞 RNA,微量紫外分光光度计测定浓度。RT-PCR 参照李杰等^[16]的方法进行。qRT-PCR 按照 TaKaRa 试剂盒说明建立总体积为 10 μL 的反应体系,程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,40 个循环;插入熔解曲线,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。反应结束后,以 GAPDH 为内参基因,2 $^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算 TLRs 通路相关基因在巨噬细胞中 mRNA 的表达量。巨噬细胞 TLR4 等引物序列(上海生工合成)及预期产物大小见表 1。将 qRT-PCR 产物送至生工(上海)进行测序,确保其为目的基因片段。

1.3 统计学分析

SPSS 26.0 对试验数据进行单因素方差分析,

多重比较使用 LSD,以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,GraphPad Prism 8.0 绘制柱状图, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SBCP 对巨噬细胞代谢活力和吞噬活性的影响

MTT 法中,巨噬细胞的代谢活力与 $\text{OD}_{490\text{ nm}}$ 值呈正相关,SBCP 各剂量组除 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 外均极显著增强巨噬细胞代谢活力($P < 0.01$),且呈剂量依赖性。经 LPS 诱导后,巨噬细胞代谢活力极显著增强($P < 0.01$),SBCP 各剂量组均可抑制其代谢活力,以 10^2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 效果最佳(图 1A)。在中性红吞噬试验中, $\text{OD}_{540\text{ nm}}$ 值越大,巨噬细胞的吞噬活性越强,不经 LPS 刺激的正常巨噬细胞,SBCP 浓度越大,巨噬细胞的吞噬功能越强;经 LPS 刺激后,其吞噬活性极显著增强,SBCP ($10^2 \sim 10^4$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的加入则起到极显著的抑制作用($P < 0.01$),以 10^3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 效果最佳(图 1B)。

2.2 SBCP 对巨噬细胞炎性介质和炎性因子分泌量的影响

SBCP 各剂量组均可促进巨噬细胞炎性介质 NO(图 2A)和炎性因子 TNF- α (图 2B)、IL-6(图 2C)的分泌,且呈剂量依赖性,浓度为 10^5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,上述物质的分泌量与 LPS 组无显著性差异($P > 0.05$)。

表 1 TLRs 通路各基因的 qRT-PCR 引物序列及预期产物大小

Table 1 Primer sequences and the expected size of qRT-PCR product of genes in TLRs pathway

基因 Gene	引物序列 Primer sequences	产物大小(bp) Product size (bp)
TLR4	F:GACTTTAACTACCAACAGAGAGGAT R:AAATCAGAATAAGAACAGCAACC	120
SIGIRR	F:GTGGCTGAAAGATGCTCTGGCATTG R:CAGGTGAAGGTTCATAGTCTCTGTC	123
Nf- κ Bp65	F:AGAGAAGCACAGATACCACTAAGA R:GTTCAGCCTCATAGAAGCCATC	165
MyD88	F:ATTGAGAAAAGGTGTCGTCGCAT R:TCGCAGATAGTATGAACCGTAGG	191
TRAF6	F:GAGAGATTCTTTCCCTGACGGTA R:TTGGGGACAAATCACTAGAGCC	119
TNF- α	F:TCGTCTACTCCTCAGAGCCC R:ACTTCAGCGTCTCGTGTGTT	128
GAPDH	F:TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG R:AGTGGGAGTTGCTGTTGAAGT	233

经 LPS 诱导,巨噬细胞的 NO, TNF- α 和 IL-6 分泌量极显著升高 ($P < 0.01$), 不同剂量的 SBCP 均可抑制上述炎性介质和炎性因子的分泌, 均以 $10^3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 效果最佳。

2.3 SBCP 对巨噬细胞内 TLRs 通路相关基因 mRNA 表达量的影响

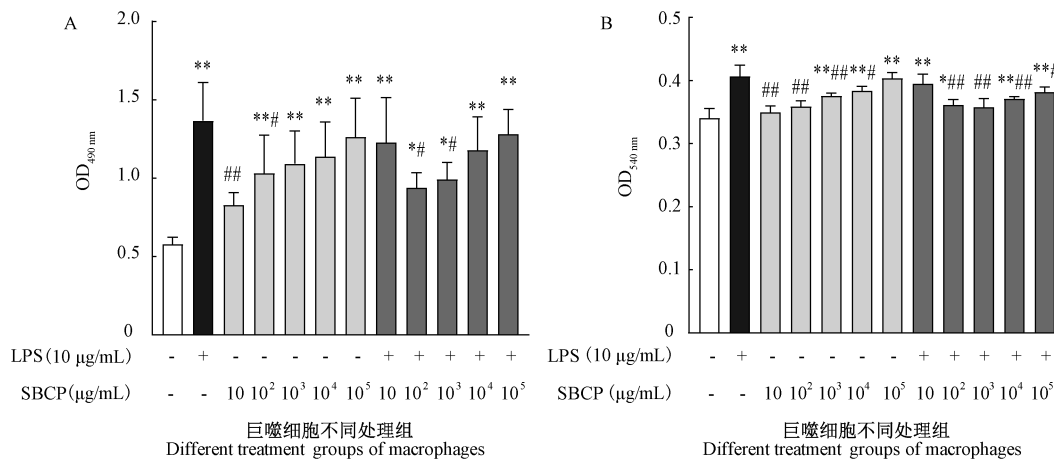
不同剂量的 SBCP 均可上调巨噬细胞中 TLR4 (图 3A)、Nf- $\kappa\text{Bp}65$ (图 3C)、MyD88 (图 3D)、TRAF6 (图 3E) 和 TNF- α (图 3F) mRNA 的表达量, 并下调其负性调控因子 SIGIRR (图 3B) mRNA 的表达量, 且均呈剂量依赖性。

经 LPS 诱导, 巨噬细胞 TLR4、Nf- $\kappa\text{Bp}65$ 、

MyD88、TRAF6 和 TNF- α mRNA 的表达量极显著升高 ($P < 0.01$), SIGIRR mRNA 的表达量极显著降低 ($P < 0.01$)。LPS+SBCP 组中, 不同剂量的 SBCP 对 TLRs 通路上述相关基因表达则呈反向调节, $10^3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SBCP 极显著下调 Nf- $\kappa\text{Bp}65$ 、TRAF6、TNF- α mRNA 的表达量 ($P < 0.01$), $10^2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SBCP 极显著下调 MyD88 mRNA 的表达量 ($P < 0.01$), $10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SBCP 使 TLR4 的表达极显著下降, 使 SIGIRR mRNA 表达极显著上升 ($P < 0.01$)。

3 讨论

炎症反应过程中, 机体组织中的巨噬细胞首先



注:“-”代表不加 LPS,“+”代表加 LPS;与阴性对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与炎症模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下同)。

图 1 SBCP 对巨噬细胞代谢活性及吞噬活性的影响

Note. “-” means no LPS. “+” means adding LPS. Compared to the negative control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared to the inflammatory model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Effects of SBCP on metabolic activity and phagocytic function of macrophages with or without the stimulation by LPS

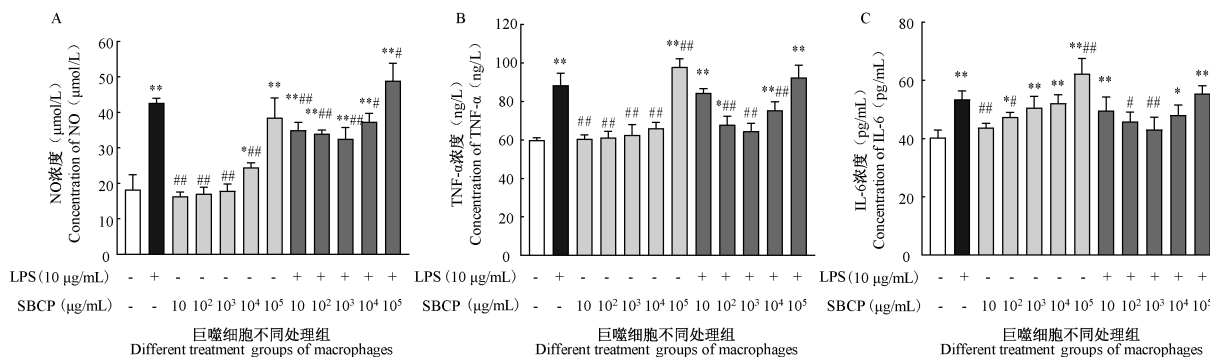


图 2 SBCP 对巨噬细胞 NO、TNF- α 及 IL-6 分泌量的影响

Figure 2 Effects of SBCP on NO, TNF- α and IL-6 production by macrophages

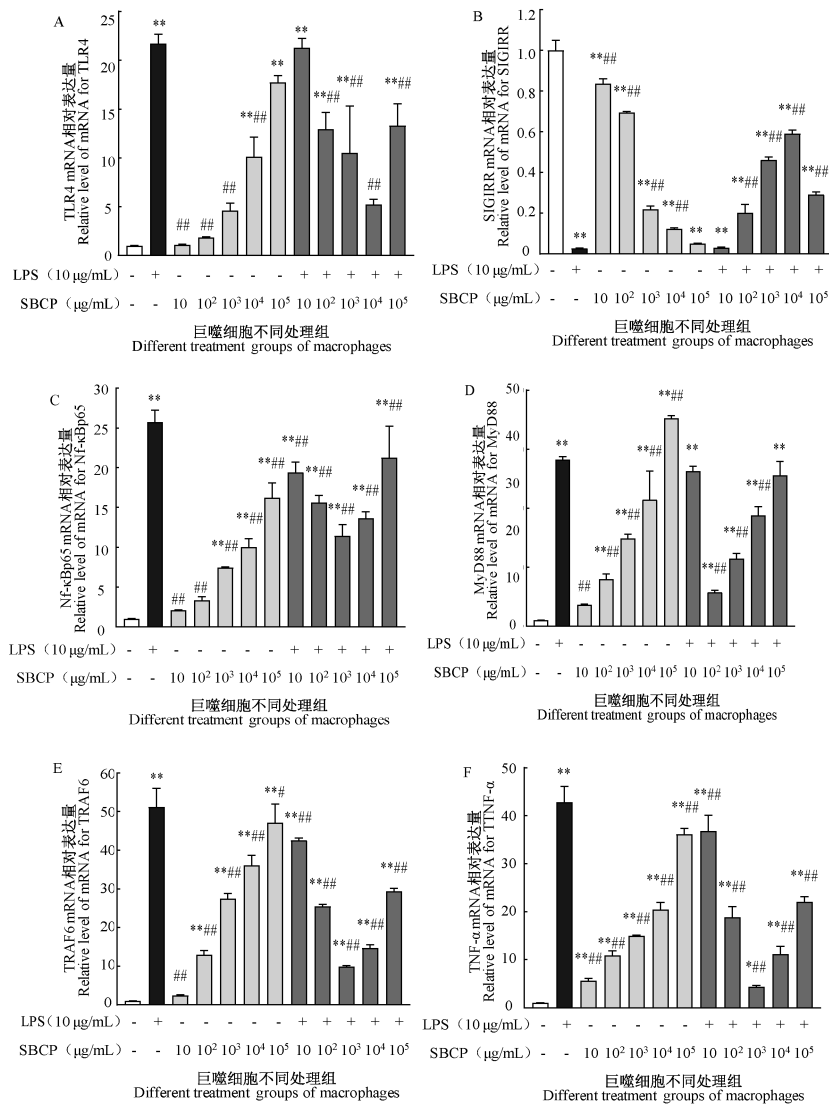


图 3 SBCP 对巨噬细胞 TLRs 通路关键基因 mRNA 表达量的影响

Figure 3 Effects of SBCP on mRNA expression of key genes in TLRs signaling pathway in macrophages

与异物接触而活化,分泌并释放各种炎症介质和炎症细胞因子,招募单核细胞、嗜中性粒细胞等到达炎灶,吞噬降解细菌、递呈抗原,激活 Th、Tc 以及 B 淋巴细胞,辅助激活特异性免疫应答,在抗感染、抗肿瘤免疫中发挥作用^[17]。炎症是一种保护性的生理反应,反应初期,炎症介质和炎症因子的适量释放有助于机体对抗炎症反应,过量释放则加重炎症反应,造成机体组织损伤。本研究 $10 \sim 10^4 \mu\text{g/mL}$ SBCP 可增强巨噬细胞的吞噬活性和代谢活性,促进 TNF- α 、IL-6 等炎症因子和炎症介质 NO 的释放,但 $10^5 \mu\text{g/mL}$ 的 SBCP 刺激巨噬细胞时上述指标变化与 LPS 差异都不显著,所以在实际应用中应当控制 SBCP 的用量,适当浓度可发挥免疫增强作用,浓

度过高则可能诱发炎症反应。

炎症反应初期 NO、TNF- α 、IL-6 的分泌量是判断炎症模型是否建立成功的标志^[18-19]。经 LPS 活化的巨噬细胞,炎症介质 NO 及炎症因子 TNF- α 、IL-6 等的分泌量极显著增加,与姜文清等^[20]、庞逸敏等^[21]的研究结果一致,说明 LPS 诱导的巨噬细胞炎症模型建立成功。LPS+SBCP 组中,不同剂量的 SBCP 对巨噬细胞的代谢活力和吞噬活性均起到抑制作用,同时可降低炎症因子 TNF- α 、IL-6 和炎症介质 NO 的释放,说明 SBCP 可通过抑制巨噬细胞的代谢和吞噬活性,降低炎症因子和炎症介质的分泌发挥抗炎作用。

TLRs 是介导炎症反应的主要信号通路^[22]。

LPS 与巨噬细胞表面的 Toll 样受体相互作用,进一步激活 NF- κ B 通路^[23],NF- κ B 转移至细胞核内,启动炎症因子 TNF- α 等基因的转录和翻译,引发炎症反应^[24]。LPS 刺激下,负性调控因子 SIGIRR 与 TLR4 受体复合物结合,抑制 TLRs 信号通路的传导,从而抑制炎症的发生^[25]。qPCR 结果表明,不同剂量的 SBCP 均可上调巨噬细胞 TLRs 通路相关基因 mRNA 的表达量,下调 SIGIRR mRNA 的表达量,说明 SBCP 可通过激活 TLRs 通路增强机体免疫功能。LPS 诱导的炎症模型中,巨噬细胞 TLRs 通路相关基因 mRNA 的表达量极显著升高,SIGIRR mRNA 的表达量极显著降低,与 Brady 等^[26]的研究结果一致。LPS 诱导,加入不同剂量的 SBCP 对 TLRs 通路相关基因及 SIGIRR 表达呈反向调节,说明 SBCP 可通过抑制 TLRs 通路相关基因的表达,促进负性调控因子的表达从而发挥抗炎作用。

综上所述,SBCP 可通过 TLRs 信号通路对炎症反应发挥双向调节作用,剂量为 $10 \sim 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 可增强巨噬细胞的免疫能力, $10^5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时诱导巨噬细胞释放大量炎性介质,引起炎症反应。而对 LPS 诱导的炎症反应,SBCP 各剂量组均发挥抑制作用,具有一定的抗炎效果。

参 考 文 献(References)

- [1] 霍乃蕊,马俪珍,忻欣,等.羊骨酶解发酵液钙螯合物对骨质疏松大鼠骨密度和骨代谢生化指标的影响[J].中国实验动物学报,2010,18(3):216-220.
Huo NR, Ma LZ, Xin X, et al. Effect of SBEF-Ca on bone mineral density and biochemical parameters of bone metabolism in rats with osteoporosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2010, 18(3): 216-220.
- [2] 霍乃蕊,岳文斌,刘玉花,等.羊骨木瓜蛋白酶水解物对小鼠免疫功能的影响[J].中国实验动物学报,2010,18(5):417-420.
Huo NR, Yue WB, Liu YH, et al. Immunomodulatory effect of papain hydrolysate originated from sheep bone on mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2010, 18(5): 417-420.
- [3] Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2003, 55(12): 1531-1546.
- [4] Zhao Y, Li B, Dong S, et al. A novel ACE inhibitory peptide isolated from Acaudina molpadioidea hydrolysate [J]. Peptides, 2009, 30(6): 1028-1033.
- [5] Guo H, Kouzuma Y, Yonekura M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein [J]. Food Chem, 2009, 113(1): 238-245.
- [6] 张琪.骨胶原肽及钙螯合胶原肽对去卵巢大鼠抗氧化能力的改善作用[D].太谷:山西农业大学;2018.
Zhang Q. The improvement of antioxidant capacity of sheep bone collagen peptide (SBCP) and collagen peptide chelated calcium (CPCC) in ovariectomized rats [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University; 2018.
- [7] 左爱玲.钙螯合胶原肽等对去卵巢大鼠免疫功能的改善作用[D].太谷:山西农业大学;2017.
Zuo AL. Immunoregulatory Effect of calcium chelating collagen peptides on ovariectomized rats [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University; 2017.
- [8] 原恺,李爱玲,韩克光,等.羊骨胶原肽对去卵巢大鼠的骨质改善作用[J].山西农业大学学报(自然科学版),2019,39(1):102-106.
Yuan K, Li AL, Han KG, et al. Sheep bone collagen peptide improve bone quality of ovariectomized rats [J]. J Shanxi Agr Univ (Social Sci Edition), 2019, 39(1): 102-106.
- [9] van Rooijen N, Sanders A. Elimination, blocking, and activation of macrophages: three of a kind? [J]. J Leukoc Biol, 1997, 62(6): 702-709.
- [10] Song JY, Han SK, Son EH, et al. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan [J]. Int Immunopharmacol, 2002, 2(7): 857-865.
- [11] Lai JC, Peng LZ, Chen HD, et al. Amino acid sequence identification and anti-inflammatory potency evaluation of dandelion oligopeptides in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells [J]. J Mol Struct, 2020, 1216: 128280.
- [12] Pioletti DP, Takei H, Lin T, et al. The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast function [J]. Biomaterials, 2000, 21(10): 1103-1114.
- [13] Petinatti PD, Nogueira EF, Callejon DR, et al. Novel bisabolane derivative from "arnica-da-serra" (Vernoniaeae: Asteraceae) reduces pro-nociceptive cytokines levels in LPS-stimulated rat macrophages [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(3): 993-998.
- [14] Kim GY, Choi GS, Lee SH, et al. Acidic polysaccharide isolated from Phellinus iinteus enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from peritoneal macrophages [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 95(1): 69-76.
- [15] 田胜男,苏静芬,向志光,等.两种核酸提取方法对小鼠诺如病毒 RNA 提取效能的比较[J].中国比较医学杂志,2013,23(9):60-63.
Tian SN, Su JF, Xiang ZG, et al. Comparison of two RNA extration methods for Murine Norovirus [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(9): 60-63.
- [16] 李杰,谢燕燕,王馨,等.人凝血因子 IX 基因在小鼠脂肪干细胞中的稳定表达[J].中国实验动物学报,2020,28(4):532-538.
Li J, Xie YY, Wang X, et al. Stable expression of human coagulation factor IX in mouse adipose-derived stem cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 532-538.

- [17] Classen A, Lloberas J, Celada A. Macrophage activation: classical versus alternative [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 531(6): 29-43.
- [18] 李玉秀, 李覃, 姬文婕, 等. 土荆皮乙酸对脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应及 M1 表型偏移的抑制作用 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(5): 625-629.
Li YX, Li T, Ji WJ, et al. Inhibitory effects of pseudolaric acid B on inflammatory response and M1 phenotype polarization in RAW264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide [J]. *Chin J Cell Mol Imm*, 2016, 32(5): 625-629.
- [19] Balne K, Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs [J]. *J Pain Res*, 2015, 8: 105-118.
- [20] 姜文清, 戚艳, 沙若荷, 等. PTEN 在多烯磷脂酰胆碱下调 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应中的抑制作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(8): 44-49.
Jiang WQ, Qi Y, Sha RH, et al. Inhibitory effect of PTEN on polyene phosphatidylcholine in downregulating LPS-induced macrophage inflammatory response [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(8): 44-49.
- [21] 庞逸敏, 甘露, 王献哲, 等. 塞来昔布对脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型炎症因子的影响 [J]. *中国当代医药*, 2017, 24(10): 4-7.
Pang YM, Gan L, Wang XZ, et al. Influence of Celecoxib on inflammatory cytokines of inflammation model in RAW 264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide [J]. *Chin Mod Med*, 2017, 24(10): 4-7.
- [22] 王琴, 付宇, 王平. 沉默 miRNA-16 对肺结核模型小鼠免疫功能的调控作用及其机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 86-91.
Wang Q, Fu Y, Wang P. Regulatory effect and mechanism of silencing microRNA-16 on immune function in mice with pulmonary tuberculosis [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(4): 86-91.
- [23] Haque MA, Jantan I, Harikrishnan H, et al. Standardized extract of Zingiber zerumbet suppresses LPS-induced pro-inflammatory responses through NF- κ B, MAPK and PI3K-Akt signaling pathways in U937 macrophages [J]. *Phytomedicine*, 2019, 54: 195-205.
- [24] Guma M, Stepniak D, Shaked H, et al. Constitutive intestinal NF- κ B does not trigger destructive inflammation unless accompanied by MAPK activation [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(9): 1889-1900.
- [25] O'Neil LA. SIGIRR puts the brakes on Toll-like receptors [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(9): 823-824.
- [26] Brady M, Bhatia M, Christmas S. Expression of the chemokine MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2002, 25(3): 260-269.

[收稿日期] 2020-10-28