

大黄灵仙方调控 TAK1 与 TRAF6 相互作用及共定位对胆管细胞炎症反应的影响

甘苴榕¹, 桂雄斌^{2*}, 俞渊^{2*}, 许斌², 戴建业¹, 常明², 陈金梅², 李承积¹
(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023)

[摘要] 目的:观察大黄灵仙方(DHLX)对大鼠胆管上皮细胞的修复作用,探讨其作用机制是否通过调节转化生长因子- β (TGF- β)激活激酶1(TAK1)与肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6)的相互作用,调控核转录因子- κ B(NF- κ B)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路活化而发挥作用。方法:将20只SD大鼠随机分为正常组和DHLX组,分别予生理盐水及DHLX(320 mg·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃8 d,制备正常血清及含DHLX血清;从正常SD大鼠中提取胆管上皮细胞,取胆管上皮细胞分为9组:正常组、模型组(20 mg·L⁻¹)、脂多糖(LPS)+DHLX组(20 mg·L⁻¹+10%含药血清)、LPS+PDTC组(20 mg·L⁻¹+200 μ mol·L⁻¹)、LPS+SB203580组(20 mg·L⁻¹+0.5 μ mol·L⁻¹)、LPS+PDTC+SB203580组(20 mg·L⁻¹+200 μ mol·L⁻¹+0.5 μ mol·L⁻¹)、LPS+PDTC+DHLX组(20 mg·L⁻¹+200 μ mol·L⁻¹+10%含药血清)、LPS+SB203580+DHLX组(20 mg·L⁻¹+0.5 μ mol·L⁻¹+10%含药血清)、LPS+PDTC+SB203580+DHLX组(20 mg·L⁻¹+200 μ mol·L⁻¹+0.5 μ mol·L⁻¹+10%含药血清);显微镜下观察药物干预后各组细胞的形态学变化,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组细胞中白细胞介素(IL)-1 β 与IL-6的表达量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组细胞中TAK1与TRAF6蛋白表达水平,免疫共沉淀技术检测TAK1与TRAF6的相互作用,激光共聚焦显微镜观察TAK1与TRAF6在细胞中的分布及共定位情况。结果:LPS作用后,细胞突触减少,胞体变圆变小,用药后各组细胞形态趋向正常;与正常组比较,模型组IL-1 β 和IL-6表达量明显上升($P<0.05$),TAK1表达量降低而TRAF6的表达量升高($P<0.05$),TAK1-TRAF6蛋白质复合物含量呈降低趋势;与模型组比较,LPS+DHLX组IL-1 β 和IL-6表达量明显降低($P<0.05$),TAK1表达量升高而TRAF6表达量降低($P<0.05$),TAK1-TRAF6蛋白质复合物含量显著增加($P<0.01$),两蛋白共定位于细胞质中;与LPS+DHLX组比较,其余各组IL-1 β 和IL-6表达量均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),通路阻滞剂干预后各组TAK1-TRAF6蛋白质复合物含量明显降低($P<0.05$),通路阻滞剂联合DHLX干预后各组TAK1-TRAF6蛋白质复合物含量明显增加($P<0.05$),两蛋白在细胞质中存在共定位但不明显。结论:在LPS诱导的胆管细胞炎症反应中,TAK1与TRAF6相互作用呈减弱趋势,大黄灵仙方可逆转此现象,其作用机制可能与促进TAK1与TRAF6的相互作用从而抑制NF- κ B/MAPK信号通路活化有关。

[关键词] 胆管炎症; 大黄灵仙方; 转化生长因子- β (TGF- β)激活激酶1(TAK1); 肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6); 相互作用; 核转录因子- κ B(NF- κ B)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路

[中图分类号] R2-0;R285;R33;R318.14 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)06-0092-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220640

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220124.1513.007.html>

[网络出版日期] 2022-01-25 12:05

Dahuang Lingxian Prescription Regulates Effect of TAK1 and TRAF6 Interaction and Co-localization on Inflammatory Response of Bile Duct Cells

GAN Yi-rong¹, GUI Xiong-bin^{2*}, YU Yuan^{2*}, XU Bin², DAI Jian-ye¹, CHANG Ming²,
CHEN Jin-mei², LI Cheng-ji¹

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

[收稿日期] 2021-08-16

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2019JJA140301,2018JJA140857,2019JJB140120);广西中医药大学“岐黄工程”高层次人才团队培育项目(2021006);广西中医药大学研究生创新课题项目(YCSZ2020006)

[第一作者] 甘苴榕,在读硕士,从事肝胆疾病的中西医防治研究,E-mail:2983434562@qq.com

[通信作者] * 桂雄斌,硕士,主任医师,从事中西医结合外科临床研究,E-mail:1070457863qq.com;

* 俞渊,博士,主任医师,从事肝胆疾病的中西医防治研究,E-mail:doctoryuyuan@163.com

[Abstract] Objective: To observe the repair effect of Dahuanglingxian prescription (DHLX) on bile duct epithelial cells of rats. To explore whether its mechanism of action is to adjust the mutual binding of transforming growth factor- β (TGF- β) activated kinase 1 (TAK1) and tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), and regulate the activation of the nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. **Method:** The 20 SD rats were randomly divided into normal group and DHLX group, 10 rats in each group, were given saline and DHLX ($320 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) for 8 days, to prepare normal serum and DHLX serum. Biliary epithelial cells were extracted from normal SD rats and divided into 9 groups: Normal group, model group ($20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), LPS+DHLX group ($20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+10\%$ DHLX), LPS+PDTC group ($20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), LPS+SB203580 group ($20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), LPS+PDTC+SB203580 group ($20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}+0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), LPS+PDTC+DHLX group ($20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}+10\%$ DHLX serum), LPS+SB203580+DHLX group ($20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}+10\%$ DHLX serum), LPS+PDTC+SB203580 +DHLX group ($20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}+0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}+10\%$ DHLX serum). The microscopic observation of morphological changes in each group of cells after drug intervention. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of IL-1 β and IL-6 in each group of cells. Western blot detected the expression levels of TAK1 and TRAF6 proteins in each group of cells, Co-IP detected the interaction between TAK1 and TRAF6, and further observed the distribution and co-localization of TAK1 and TRAF6 using Laser confocal microscope. **Result:** After the action of LPS, the cell synapses are reduced, the cell body becomes significantly rounded and smaller, but the cell morphology of each group tends to be normal after medication. Compared with normal group, the expression levels of IL-1 β and IL-6 in model group were significantly increased ($P<0.05$), while the expression level of TAK1 was decreased while the expression level of TRAF6 was increased ($P<0.05$). The content of TAK1-TRAF6 protein complex showed a decreasing trend, and the two proteins co-located in the cytoplasm. Compared with model group, the expression levels of IL-1 β and IL-6 in LPS+DHLX group were significantly decreased ($P<0.05$), the expression level of TAK1 was increased and the expression level of TRAF6 was decreased ($P<0.05$), the content of TAK1-TRAF6 protein complex was significantly increased ($P<0.01$), and the two proteins were significantly co-located in cytoplasm. Compared with LPS+DHLX group, the expression levels of IL-1 β and IL-6 in other groups were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). TAK1-TRAF6 protein complex content in each group was significantly decreased after pathway blocker intervention ($P<0.05$), while TAK1-TRAF6 protein complex content in each group was significantly increased after pathway blocker combined with DHLX intervention ($P<0.05$). Co-localization of the TAK1-TRAF6 in cytoplasm was not obvious. **Conclusion:** In the LPS-induced inflammatory response of bile duct cells, the binding of TAK1 and TRAF6 showed a weakening trend, but DHLX could reverse the phenomenon, we think the mechanism of action may be related to promoting the mutual binding of TAK1 and TARF6 to inhibit the activation of the NF- κ B/MAPK signaling pathway.

[Keywords] bile duct inflammation; Dahuang Lingxian prescription; transforming growth factor- β (TGF- β) activated kinase 1 (TAK1); tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6); interaction; nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway

原发性肝内胆管结石(HL)是指左右肝管汇合部位以上的胆道系统结石,随病情进展常引起胆管扩张、炎症及肝功能损害等并发症甚至发生癌变,是我国良性胆管疾病引起患者死亡的主要原因^[1]。HL在东亚地区发病率最高可达25%,在原发性胆管结石中占比可达13.7%~50.0%,是世界范围内公认的难治性胆管疾病,目前其发病机制尚未完全阐

明^[2]。已有研究证实,反复慢性炎症浸润可造成胆管上皮细胞损伤,使胆管上皮细胞释放白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等促炎因子,进一步加重胆管炎症的程度,引起胆管壁增生狭窄,胆汁淤积,促使HL形成^[3-5]。

胆管炎症的发生与胆道感染密切相关,而内毒素脂多糖(LPS)是诱发胆道感染的关键因素,LPS

可激活 Toll 样受体 4 (TLR4)/核转录因子- κ B (NF- κ B)/丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路,介导胆管炎症的发生发展^[6-8]。由此引发笔者思考,是否可通过控制胆管炎症的药物,下调炎症信号的表达,缓解胆管炎症,以达到预防肝内胆管结石的形成及术后复发的目的。

大黄灵仙方是广西中医药大学唐乾利教授总结多年临床经验创制的治疗胆石症的复方,经临床及实验研究证明其可有效预防肝内胆管结石的形成及术后复发,前期研究发现其机制可能与调控 TLR4/髓样分化因子 88 (MyD88) 信号通路和 NF- κ B 信号通路相关炎症因子的表达水平,使胆管恢复到非炎症状态有关^[9-10]。文献研究发现,转化生长因子- β (TGF- β) 激活激酶 1 (TAK1) 与肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6) 存在相互作用,引起 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的激活,扩大炎症反应^[11]。但在胆管炎症中, TAK1 与 TRAF6 是否会出现相互作用,大黄灵仙方对两蛋白的相互作用会产生怎样的影响,目前尚未可知。因此,本研究通过 LPS 构建胆管炎症细胞模型,观察 TAK1 与 TRAF6 在胆管上皮细胞中的相互作用及共定位,以及大黄灵仙方对两者相互作用及共定位的影响,探讨该方缓解胆管炎症的作用及机制。

1 材料

1.1 动物 选用 SPF 级健康 SD 雄性大鼠 20 只, 体重 (250±15) g。购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号 SCXK(湘)2019-0004。所有动物饲养于广西中医药大学第一附属医院动物房,动物房温度恒定 18~24 °C,相对湿度 50%~60%,大鼠适应性喂养 1 周后开始实验。实验通过广西中医药大学实验动物福利伦理批准(伦理号 DW20191017-023)。

1.2 药品与试剂 大黄灵仙方由生大黄 15 g、威灵仙 30 g、芒硝 10 g、金钱草 30 g、枳壳 12 g、鸡内金 12 g、泽兰 15 g、柴胡 12 g、郁金 12 g、磁石 10 g、黄芪 30 g、炙甘草 5 g 组成,经广西中医药大学第一附属医院药剂科按相当量换算配为颗粒剂:生大黄(批号 19110323)、威灵仙(批号 19100653)、芒硝(批号 18122053)、金钱草(批号 19091523)、枳壳(批号 19110333)、鸡内金(批号 19110373)、泽兰(批号 19091823)、柴胡(批号 19120613)、郁金(批号 19120413)、磁石(批号 19091943)、黄芪(批号 19091713)、炙甘草(批号 1911103),所有中药颗粒剂均由江阴天江药业有限公司提供;LPS、p38

MAPK 信号通路阻断剂 SB203580、NF- κ B 信号通路阻断剂 PDTC(美国 Sigma 公司,批号分别为 L4391-1MG、IC50-17、5108-96-3); Triton x-100(北京 Solarbio 公司,批号 104H025);大鼠 IL-1 β 、IL-6 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉 Cusabio 公司,批号分别为 CSB-E08055r、CSB-E04640r);兔多克隆抗体 TAK1、鼠多克隆抗体 TRAF6、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗、HRP 标记羊抗鼠二抗(美国 Proteintech 公司,批号分别为 12330-2-AP、66498-1-Ig、SA00001-2、SA00001-1);兔单克隆抗体甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,美国 Affinit 公司,批号 AF7021);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Solarbio 公司,批号 PC0020);Protein A/G PLUS-Agarose(美国 Santa Cruze 公司,批号 Sc-2003);Pierce™ IP Lysis Buffer、ECL 超敏发光试剂盒(美国 Thermo 公司,批号分别为 87788、ED0015-B)。

1.3 仪器 5410 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);BSC-1300II B2 型生物安全柜(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司);371 型 CO₂ 培养箱、Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);IX71 型倒置荧光显微镜、FV3100 型激光共聚焦扫描显微镜(日本 Olympus 公司);G560E 型电泳系统(美国 Bio-Rad 公司);Amersham Imager 600 型凝胶成像仪(美国 GE 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 将 20 只 SD 大鼠随机分为正常组和 DHLX 组,每组 10 只。根据等效剂量系数折算法及前期研究基础^[12],大鼠剂量=6.3×成人的临床剂量,最终确定 DHLX 给药剂量 320 mg·kg⁻¹·d⁻¹,对照组予 DHLX 灌胃,正常组予等体积生理盐水灌胃;每日分早、晚 2 次给药,间隔时间为 8 h,连续灌胃给药 8 d。末次给药 2h 后,采用 10% 水合氯醛麻醉大鼠,无菌条件下腹主动脉采血,静置 30 min 后,4 °C,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min(离心半径 13.5 cm,下同),取上清,在超净台中进行 0.22 μ m 无菌微孔滤膜过滤,于 -20 °C 冰箱保存备用。实验时用 DMEM 细胞培养液将上述血清分别稀释为 10% 正常血清培养液和 10% 含 DHLX 血清培养液。

2.2 SD 大鼠胆管上皮细胞提取^[10] 参照文献[10]提取胆管上皮细胞,将正常组大鼠麻醉后,行全身肝素化,用预热至 37 °C 的灌注液进行灌注,去除肝组织,剩余完整的胆管树,将胆管树进行研磨消化,过滤细胞悬液,洗涤 2 次,4 °C,3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清,收集细胞,加入含胎牛血清的培养基

中进行培养。

2.3 细胞分组及给药处理 取SD胆管上皮细胞,分为9组,每组设置3个复孔,每孔加入含胎牛血清培养液各2 mL,每孔含细胞 1×10^5 个,于 37°C ,5% CO_2 浓度条件下培养待细胞生长接近融合后用药干预,除正常组外,其余各组用含 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS的10% DMEM培养液造模24 h后;LPS+DHLX组、LPS+PDTC+DHLX组、LPS+SB203580+DHLX组、LPS+PDTC+SB203580+DHLX组分别加入10%含DHLX培养液,其余各组加入含10%正常SD大鼠血清的DMEM培养液,同时LPS+PDTC组和LPS+PDTC+DHLX组用 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PDTC干预,LPS+SB203580组和LPS+SB203580+DHLX组用 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SB203580干预,LPS+PDTC+SB203580组和LPS+PDTC+SB203580+DHLX组同时加入 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PDTC和 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SB203580干预,干预时间为8 h。

2.4 指标检测

2.4.1 用药后各组胆管上皮细胞的变化 用药干预8 h后,在光学显微镜下观察各组胆管上皮细胞的形态学变化。

2.4.2 ELISA检测各组胆管上皮细胞IL-1 β 和IL-6表达情况 收集各组胆管上皮细胞上清液,按照IL-1 β 和IL-6 ELISA试剂盒说明书分别孵育一抗、二抗等试剂后,于450 nm处测定各孔内吸光度 A ,进行统计学分析。

2.4.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组细胞TAK1和TRAF6蛋白的表达 提取细胞总蛋白,BCA蛋白含量检测试剂盒检测蛋白浓度,SDS-PAGE电泳后,蛋白经半干转至 $0.45 \mu\text{m}$ PVDF膜上,5%脱脂牛奶封闭后,加入一抗TRAF6(1:1 000)、TAK1(1:1 000)、GAPDH(1:1 000), 4°C 孵育过夜,TBST漂洗后,分别加入HRP标记的二抗(1:6 000)室温孵育1 h,再次经TBST漂洗,ECL发光剂显影,Image J软件分析条带灰度值。

2.4.4 免疫共沉淀检测各组细胞中TAK1与TRAF6蛋白质复合物的表达 在蛋白样品中加入兔IgG重悬的Protein A/G PLUS-Agrose, 4°C 孵育2 h后将蛋白样品进行离心,取上清加入一抗, 4°C 孵育1 h,加入重悬的Protein A/G PLUS-Agrose $20 \mu\text{L}$, 4°C 条件下孵育过夜;IP Lysis Buffer洗涤免疫沉淀反应后的Agrose beads 4次,加入上样缓冲液进行沸水浴制备电泳样本;将制备好的免疫共沉淀样品进行SDS-PAGE凝胶电泳分离,ECL显影观察各组细胞内

TAK1-TRAF6蛋白复合沉淀物表达情况。使用NIH Image J 6.0软件计算灰度值比值。

2.4.5 激光共聚焦检测TAK1与TRAF6在胆管细胞中的定位 细胞分组用药处理后,从培养箱中取出,经4%组织细胞固定液固定15 min,之后用0.5% Triton x-100室温通透20 min,在培养孔里滴加正常的山羊血清,封闭30 min;吸水纸吸干封闭液后每孔滴加一抗1.5 mL并放入湿盒, 4°C 过夜;湿盒中用二抗孵育1 h,复染核后,激光共聚焦显微镜观察结果。

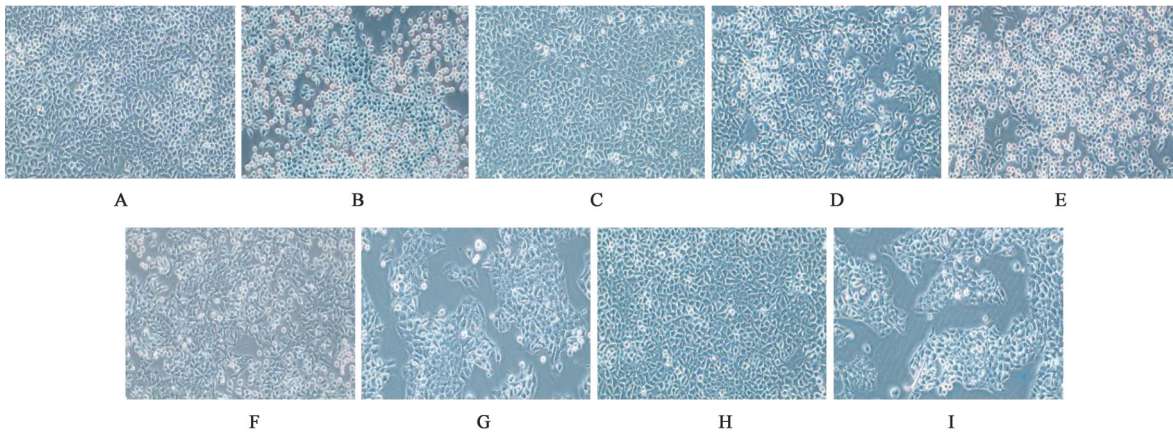
2.5 统计学分析 采用SPSS 20.0软件进行数据统计分析,定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 来表示。两组间若符合正态性分布,采用单因素方差分析,组间比较采用最小显著性差异法(LSD)多重比较法,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对胆管上皮细胞形态学变化的影响 光学显微镜下观察发现,正常胆管上皮细胞贴壁单层生长,细胞外形不规则,细胞胞体较大,可见深褐色细胞核;LPS干预后,与正常组比较,模型组细胞形态改变,胞体明显变圆变小,细胞大量脱落,漂浮于液面;与模型组比较,用药后其余各组细胞形态趋向正常,胞体较大,细胞核明显可见。见图1。

3.2 对胆管上皮细胞IL-1 β 和IL-6表达的影响 与正常组比较,模型组胆管上皮细胞上清液IL-1 β 和IL-6表达量明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,其余各组IL-1 β 和IL-6表达量均呈降低趋势,其中LPS+PDTC+DHLX组、LPS+SB203580+DHLX组、LPS+PDTC+SB203580+DHLX组显著降低,差异具有显著统计学意义($P < 0.01$);与LPS+DHLX组比较,LPS+PDTC+DHLX组、LPS+SB203580+DHLX组、LPS+PDTC+SB203580+DHLX组IL-1 β 和IL-6表达量明显降低,差异具有明显统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

3.3 对胆管上皮细胞TAK1与TRAF6蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组TAK1表达量降低而TRAF6的表达量明显升高,差异具有明显统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,LPS+DHLX组TAK1表达量显著升高而TRAF6表达量显著降低,其中LPS+PDTC+DHLX组TRAF6明显增加,差异具有明显统计学意义($P < 0.05$);与LPS+DHLX组比较,LPS+PDTC+DHLX组TRAF6的表达量明显增加($P < 0.05$),LPS+SB203580+DHLX组TAK1的表达量明显降低,差异具有明显统计学意义($P < 0.05$)。见图2、表2。



注: A. 正常组; B. 模型组; C. LPS+DHLX组; D. LPS+PDTC组; E. LPS+SB203580组; F. LPS+PDTC+SB203580组; G. LPS+PDTC+DHLX组; H. LPS+SB203580+DHLX组; I. LPS+PDTC+SB203580+DHLX组(图2-图4同)

图1 大黄灵仙方(DHLX)对大鼠胆管上皮细胞形态学变化的影响(倒置显微镜, ×200)

Fig. 1 Effect of DHLX on morphological changes of bile duct epithelial cells in rats (inverted microscope, ×200)

表1 大黄灵仙方对胆管上皮细胞IL-1β和IL-6表达的影响(̄x±s, n=3)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-1β	IL-6
正常组		3.23±0.37	27.28±3.25
模型组	20 ⁵⁾	18.26±0.42 ¹⁾	65.33±2.07 ¹⁾
LPS+DHLX组	20 ⁵⁾ +320	15.21±0.68 ²⁾	53.61±0.65 ²⁾
LPS+PDTC组	20 ⁵⁾ +200 ⁶⁾	16.32±0.10	52.78±3.12 ²⁾
LPS+SB203580组	20 ⁵⁾ +0.5 ⁶⁾	13.35±0.07 ²⁾	56.82±2.35 ²⁾
LPS+PDTC+SB203580组	20 ⁵⁾ +200 ⁶⁾ +0.5 ⁶⁾	14.19±0.13 ²⁾	47.93±1.95 ²⁾
LPS+PDTC+DHLX组	20 ⁵⁾ +200 ⁶⁾ +320	12.37±0.83 ^{2,3)}	42.32±2.68 ^{2,3)}
LPS+SB203580+DHLX组	20 ⁵⁾ +0.5 ⁶⁾ +320	13.49±1.31 ^{2,3)}	36.48±0.29 ^{2,3)}
LPS+PDTC+SB203580+DHLX组	20 ⁵⁾ +200 ⁶⁾ +0.5 ⁶⁾ +320	8.18±0.35 ^{2,4)}	32.76±1.65 ^{2,4)}

注: 与正常组比较¹⁾P<0.05; 与模型组比较²⁾P<0.05; 与LPS+DHLX组比较³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01; ⁵⁾表示质量浓度单位为mg·L⁻¹; ⁶⁾表示浓度单位为μmol·L⁻¹

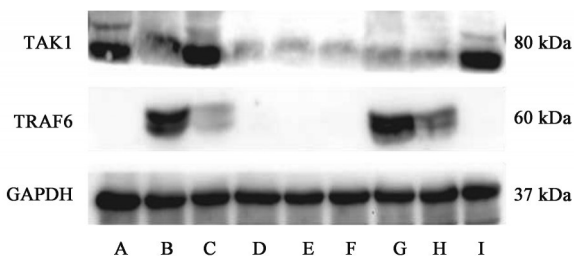


图2 各组TAK1与TRAF6蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of TAK1 and TRAF6 proteins expression in each group

3.4 对胆管上皮细胞TAK1与TRAF6相互作用的影响 免疫共沉淀结果显示, 与正常组比较, 模型组TAK1-TRAF6蛋白质复合物表达量有下降趋势, 但差异无统计学意义; 与模型组比较, 通路阻滞剂干预各组TAK1-TRAF6蛋白质复合物表达量明显下降, 差异具有统计学意义(P<0.05), 而LPS+

DHLX组及通路阻滞剂联合DHLX用药后各组TAK1-TRAF6蛋白质复合物表达量明显升高(P<0.05); 与LPS+DHLX组比较, 通路阻滞剂联合DHLX用药后各组TAK1-TRAF6蛋白质复合物表达量明显下降, 差异具有明显统计学意义(P<0.05)。见图3、表3。

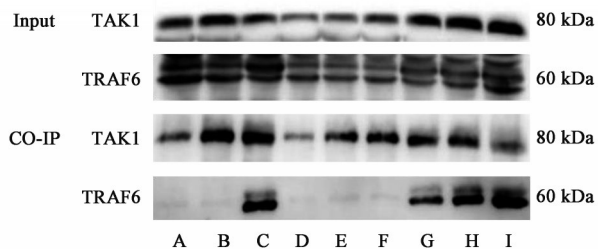
3.5 对胆管上皮细胞TAK1与TRAF6共定位的影响 正常组细胞核(蓝色荧光)完整, 包膜清晰可见, TRAF6蛋白标记为绿色荧光, TAK1蛋白标记为红色荧光, 两种蛋白主要在细胞质中表达, 共定位(黄色荧光)于细胞质中; 造模后, 模型组细胞核出现皱缩, TAK1和TRAF6在细胞质中大量表达, 共定位明显; 通路阻滞剂干预后, TAK1蛋白主要在核中表达, 细胞核不完整, 两蛋白不存在共定位; 通路阻滞剂联合DHLX用药后, TAK1蛋白分布在细胞质

表2 大黄灵仙方对胆管上皮细胞 TAK1 与 TRAF6 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of DHLX on expression of TAK1 and TRAF6 proteins in bile duct epithelial cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TAK1/GAPDH	TRAF6/GAPDH
正常组		1.01±0.21	0.00±0.00
模型组	20 ⁴⁾	0.97±0.42 ¹⁾	1.71±1.07 ¹⁾
LPS+DHLX 组	20 ⁴⁾ +320	1.21±0.08 ²⁾	0.61±0.65 ²⁾
LPS+PDTC 组	20 ⁴⁾ +200 ⁵⁾	0.32±0.10 ²⁾	0.00±0.00 ²⁾
LPS+SB203580 组	20 ⁴⁾ +0.5 ⁵⁾	0.35±0.07 ²⁾	0.00±0.00 ²⁾
LPS+PDTC+SB203580 组	20 ⁴⁾ +200 ⁵⁾ +0.5 ⁶⁾	0.19±0.13 ²⁾	0.00±0.00 ²⁾
LPS+PDTC+DHLX 组	20 ⁴⁾ +200 ⁵⁾ +320	0.53±0.83	2.32±4.68 ^{2,3)}
LPS+SB203580+DHLX 组	20 ⁴⁾ +0.5 ⁵⁾ +320	0.49±0.31 ³⁾	0.83±0.29 ²⁾
LPS+PDTC+SB203580+DHLX 组	20 ⁴⁾ +200 ⁵⁾ +0.5 ⁵⁾ +320	1.18±0.35 ²⁾	0.00±0.00 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05;与LPS+DHLX组比较³⁾P<0.05;⁴⁾表示质量浓度单位为mg·L⁻¹;⁵⁾表示浓度单位为μmol·L⁻¹(表3同)



注:Input为等量总蛋白;CO-IP为免疫共沉淀所得蛋白质混合物

图3 大黄灵仙方对胆管上皮细胞 TAK1 与 TRAF6 相互作用的影响

Fig. 3 Effect of DHLX on interaction of bile duct epithelial cells TAK1 with TRAF6

中与 TRAF6 蛋白相互作用,细胞核完整,两蛋白存在共定位,但不明显。见图4。

4 讨论

免疫共沉淀技术是检测蛋白间相互作用的经典方法,其原理是利用抗原抗体结合的高特异性,可以验证已知蛋白间的相互作用,还可以用来验证

已知蛋白与未知蛋白间的相互作用^[13]。本研究证实了 TAK1 与 TRAF6 在胆管炎症中存在相互作用。TAK1 是丝裂原活化蛋白激酶激酶(MAP3K)家族的成员,可被 TGF-β₁、IL-1β 和 TNF-α 激活,活化的 TAK1 可促进 NF-κB 和 MAPK 信号通路的相互作用,在应激反应、炎症和免疫中发挥关键调控作用^[14]。TRAF6 是含有 C 端 TRAF 结构域的 TRAF 家族的蛋白质,由卷曲螺旋和高度保守结构域组成,具有控制 NF-κB 抑制剂激活酶(IκK)和 NF-κB 活化的泛素连接酶活性,可以通过介导不同的信号通路来调控炎症反应^[15]。研究发现,LPS 的刺激可引起 TRAF6 的泛素化,在经典的 NF-κB 激活途径中,TRAF6 泛素化后与细胞质中的 TAK1/IκK 激酶形成复合物并被其激活,导致核转录因子-κB 抑制蛋白 α(IκBα)降解,使 NF-κB 转移到细胞核中导致炎症相关基因的转录和表达^[16]。TRAF6 和 TAK1 共同作用于信号复合体中,对 NF-κB 与 MAPK 信号通

表3 大黄灵仙方对胆管上皮细胞 TAK1-TRAF6 蛋白质复合物相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of DHLX on relative expression of TAK1-TRAF6 protein complex in bile duct epithelial cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TAK1-TRAF6 蛋白质复合物
正常组		0.46±0.13
模型组	20 ⁴⁾	0.31±0.15
LPS+DHLX 组	20 ⁴⁾ +320	3.52±1.03 ^{1,2,3)}
LPS+PDTC 组	20 ⁴⁾ +200 ⁵⁾	0.32±0.12
LPS+SB203580 组	20 ⁴⁾ +0.5 ⁵⁾	0.37±0.09
LPS+PDTC+SB203580 组	20 ⁴⁾ +200 ⁵⁾ +0.5 ⁵⁾	0.21±0.10
LPS+PDTC+DHLX 组	20 ⁴⁾ +200 ⁵⁾ +320	0.93±0.09 ^{2,3)}
LPS+SB203580+DHLX 组	20 ⁴⁾ +0.5 ⁵⁾ +320	1.05±1.12 ^{2,3)}
LPS+PDTC+SB203580+DHLX 组	20 ⁴⁾ +200 ⁵⁾ +0.5 ⁵⁾ +320	1.24±0.47 ^{1,2,3)}

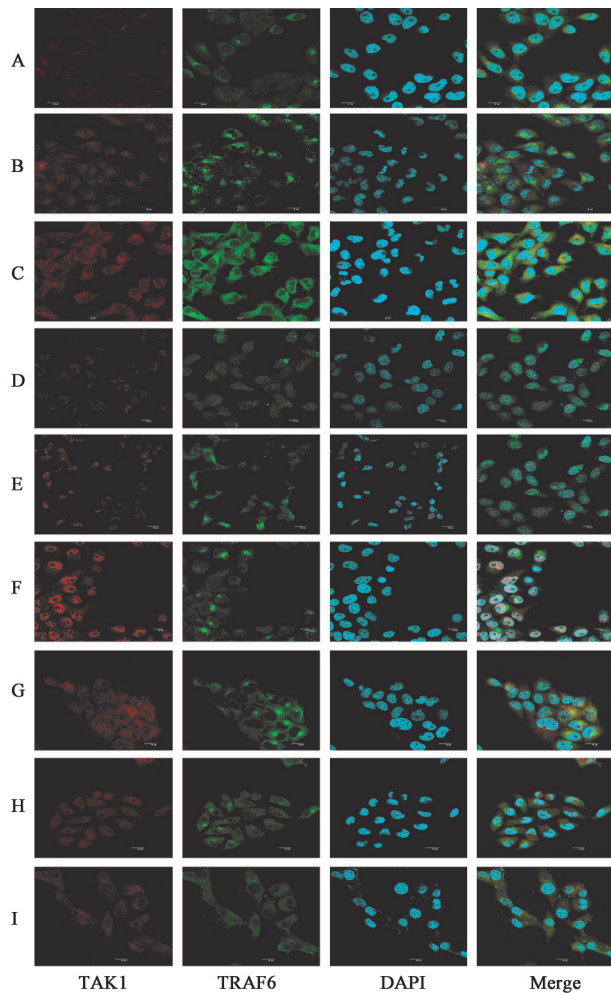


图4 大黄灵仙方对胆管上皮细胞 TAK1 与 TRAF6 共定位的影响 (免疫荧光, ×400)

Fig. 4 Effect of DHLX on co-localization of TAK1 and TRAF6 in bile duct epithelial cells (IF, ×400)

路的串联之间起着重要的桥梁作用。

经免疫共沉淀实验发现,正常大鼠胆管上皮细胞中, TAK1 与 TRAF6 存在相互结合,与正常组比较,模型组细胞炎性反应最重, TAK1-TRAF6 蛋白质复合物呈减少趋势,说明 LPS 可能抑制 TAK1-TRAF6 的形成;中药干预后,炎性反应减轻,蛋白质复合物显著增加,说明大黄灵仙方促进 TAK1 与 TRAF6 之间相互结合,这可能是其缓解胆管炎症的机制之一;分别用 MAPK 及 NF- κ B 通路抑制剂干预后,与模型组比较,炎症反应减轻, TAK1-TRAF6 蛋白质复合物的表达量有下降趋势,但差异无统计学意义,说明抑制 NF- κ B/MAPK 信号通路活化可以减少 TAK1 与 TRAF6 蛋白的结合;通路抑制剂联合中药干预后, TAK1 与 TRAF6 结合明显增加,与正常组比较,差异具有显著统计学意义。说明 LPS 诱导的胆管细胞炎性反应可抑制 TAK1 和 TRAF6 的相互

结合,而大黄灵仙方促进 TAK1 与 TRAF6 的结合。

进一步通过激光共聚焦显微镜可观察到, TAK1 与 TRAF6 两种蛋白散布于细胞核和细胞质中,但主要定位于细胞质,正常情况下, TAK1 与 TRAF6 存在共定位;与正常组比较,模型组 TRAF6 的表达明显变弱,两蛋白在细胞质中共定位不明显;与模型组比较, LPS+DHLX 组 TAK1 与 TRAF6 明显表达于细胞质,共定位显著,再次证明 LPS 可使 TAK1 与 TRAF6 相互结合减弱,大黄灵仙方加强两蛋白的相互作用;与模型组比较,通路抑制剂各组细胞中 TAK1 入核, TRAF6 位置基本不变,两种蛋白不存在共定位,说明通路抑制剂抑制了炎症相关蛋白在细胞中的表达,从而减轻炎症反应。而中药联合通路抑制剂干预后, TAK1 从细胞核转移至细胞质,与 TRAF6 存在共定位。免疫共沉淀及激光共聚焦显微镜观察结果基本一致,说明大黄灵仙方主要通过促进 TAK1 与 TRAF6 相互结合,缓解 LPS 诱导的胆管细胞炎症反应。

综上所述,在 LPS 诱导的胆管上皮细胞炎症反应中, TAK1 与 TRAF6 相互作用呈减弱趋势,但与已有文献研究发现 LPS 诱导 TAK1 与 TRAF6 相结合,激活 NF- κ B 信号通路,引起炎症反应的结果不相一致^[16],推测其原因可能是存在其它信号因子与 TAK1 或 TRAF6 发生竞争性结合,使 TAK1 和 TRAF6 的结合减少有关,结果仍需进行下一步验证。目前初步推测大黄灵仙方可以缓解 LPS 诱导的胆管上皮细胞炎症反应,其作用机制可能与促进 TAK1 与 TRAF6 的相互结合从而抑制 NF- κ B/MAPK 信号通路活化有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] KIM H J, KIM J S, JOO M K, et al. Hepatolithiasis and intrahepatic cholangiocarcinoma: a review [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(48): 13418-13431.
- [2] 张尧评,程瑞洪,王海军,等. 超声结合 X 线指导原发性肝内胆管结石患者手术的价值[J]. 分子影像学杂志, 2020, 43(3): 495-499.
- [3] MENG Z W, HAN S H, ZHU J H, et al. Risk factors for cholangiocarcinoma after initial hepatectomy for intrahepatic stones [J]. World J Surg, 2017, 41(3): 835-843.
- [4] FABRIS L, SPIRLI C, CADAMURO M, et al. Emerging concepts in biliary repair and fibrosis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2017, 313

- (2):G102-G116.
- [5] CLEMENTE M G, PATTON J T, ANDERS R A, et al. Rotavirus infects human biliary epithelial cells and stimulates secretion of cytokines IL-6 and IL-8 via MAPK pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2015, doi: 10.1155/2015/697238.
- [6] SOARES J B, PIMENTEL-NUNES P, RONCON-ALBUQUERQUE R, et al. The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases [J]. *Hepatol Int*, 2010, 4 (4) : 659-672.
- [7] 刘浩润,赵洪强,李为民. Toll样受体与急性胆管炎关系的研究进展[J]. *中国当代医药*, 2015, 22(6) : 13-16.
- [8] 徐涛,张波,周文策. 胆道菌群与胆管癌关系的研究进展[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2021, 28(3) : 404-408.
- [9] 吴华帅,俞渊,陈金梅,等. 基于TLR4/MyD88信号通路探讨大黄灵仙方缓解胆管细胞炎症反应的作用研究[J]. *中医药学报*, 2020, 48(5):9-13.
- [10] 俞渊,尹星,唐乾利,等. 大黄灵仙方调控NF- κ B信号通路相关因子基因影响胆管细胞炎性反应的研究[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(5):1034-1037.
- [11] TIAN J, LI J W, CHEN J, et al. The safety and feasibility of reoperation for the treatment of hepatolithiasis by laparoscopic approach [J]. *Surg Endosc*, 2013, 27(4):1315-1320.
- [12] 黄名威,唐乾利,伍松合,等. 胆通胶囊预防色素性结石形成的机制研究[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2005(4):248-250.
- [13] ZHAO J, YU H, LIN L, et al. Interactome study suggests multiple cellular functions of hepatoma-derived growth factor (HDGF) [J]. *J Proteomics*, 2011, 75(2):588-602.
- [14] LI H, OU G, HE Y, et al. Resveratrol attenuates the MSU crystal-induced inflammatory response through the inhibition of TAK1 activity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67:62-68.
- [15] WANG J, WU X, JIANG M, et al. Mechanism by which TRAF6 participates in the immune regulation of autoimmune diseases and cancer[J]. *Biomed Res Int*, 2020, doi:10.1155/2020/4607197.
- [16] BELLET M M, PIERONI S, CASTELLI M, et al. HOPS/Tmub1 involvement in the NF- κ B-mediated inflammatory response through the modulation of TRAF6[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10):865.

[责任编辑 孙丛丛]