

· 药理 ·

桂枝汤含药血清对不同比例 Poly(I:C)-LPS 组合刺激肺巨噬细胞的干预效应

战晓玲, 唐恬, 徐文慧, 马冀, 李兰芳, 李沧海*, 姜廷良
(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:基于方证相应原理,旨在探索建立一种模拟病毒-细菌共感染的桂枝汤汤证体外细胞模型,为进一步桂枝汤汤证动物模型的建立积累数据。方法:研究桂枝汤含药血清对不同浓度比例的聚肌胞苷酸[polyinosinic polycytidylic acid, Poly(I:C)]与脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)混合物刺激的大鼠肺的巨噬细胞(NR8383)Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)及其下游信号转导通路的影响。采用大鼠肺巨噬细胞株 NR8383,分别用 25, 50, 100 mg·L⁻¹的 Poly(I:C)与 1, 5, 10 mg·L⁻¹ LPS 刺激 NR8383 细胞,前者于 3, 6, 12, 24 h 后取细胞上清,后者于 6, 12, 24, 48 h 后取细胞培养上清液,酶联免疫吸附测定方法(ELISA)测定炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β)的含量,通过上述 2 个指标选择 Poly(I:C)与 LPS 合适的浓度区间与反应的最适时间。利用其 Poly 与 LPS 配比为 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1 来探讨其对 NR8383 细胞的 TNF- α , IL-1 β 的含量和 TLR-2, 3, 4, 6 mRNA 表达的影响,以及桂枝汤含药血清的干预作用,通过上述 TNF- α , IL-1 β , TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-6 6 个指标对实验结果进行综合评价,筛选刺激效应和桂枝汤干预效应最为明显的 Poly(I:C)-LPS 比例。结果:选择刺激时间为 6 h, Poly(I:C)在 50 mg·L⁻¹以下, LPS 在 1 mg·L⁻¹时作为合适的刺激浓度。在所用 Poly(I:C)-LPS(10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1)中,与正常组比较, Poly(I:C)-LPS 50:1 组合刺激效应显著($P < 0.01$),与相对应的模型组比较,桂枝汤含药血清对 Poly(I:C)-LPS 10:1 组合干预效果最为显著($P < 0.01$)。结论:Poly(I:C)-LPS 10:1 刺激 NR8383 巨噬细胞株 NR8383 可以作为一种桂枝汤汤证细胞模型,用于桂枝汤及其类方的基础研究。

[关键词] 聚肌胞苷酸; 内毒素; 桂枝汤; Toll 样受体 (TLRs); 白细胞介素-1 β (IL-1 β); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)

[中图分类号] R22; R24; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0084-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181422

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180428.1002.002.html>

[网络出版时间] 2018-04-28 14:41

Interference Effect of Guizhitang Drug Serum on Rat Macrophages NR8383 Cells Provoked by Different Ratio of Poly (I:C) -LPS

ZHAN Xiao-ling, TANG Tian, XU Wen-hui, MA Ji, LI Lan-fang, LI Cang-hai*, JIANG Ting-liang
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a co-infections cell model of Guizhitang syndrome base on the principle of the correspondence between prescription and syndrome, in order to accumulate more data on animal model of Guizhitang syndrome. **Method:** The effect of Guizhitang drug serum on the expression of Toll-like receptors (TLRs) and downstream signaling components in NR8383 was studied. NR8383 cells was stimulated with 25, 50, 100 mg·L⁻¹ of Poly (I:C) and 1, 5, 10 mg·L⁻¹ lipopolysaccharides (LPS), respectively. The supernatant of the former was collected after 3, 6, 12, 24 h, and that of the later was collected after 6, 12, 24, 48 h, so as to measure the inflammatory factors, such as tumor necrosis factor (TNF) - α or interleukin (IL) -1 β .

[收稿日期] 20180226(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573838)

[第一作者] 战晓玲,在读硕士,从事中医证候模型的研究,E-mail:568237479@126.com

[通信作者] *李沧海,博士,副研究员,从事中药复方和青蒿素研究,Tel:010-64041008,E-mail:leechn@163.com

After suitable dose and treatment time were selected, five ratios of Poly (I: C) -LPS were used to provoke NR8383 cells with or without Guizhitang containing serum. The expressions of TLR2, TLR3, TLR4 and TLR6 mRNA in NR8383 cells, TNF- α and IL-1 β in culture supernatant were compared. The experimental results were evaluated based on the above six indexes, and the most obvious stimulation effect and intervention effect of Poly (I: C) -LPS ratio were selected. **Result:** The selected stimulation time was 6 h, when Poly (I: C) was below 50 mg·L⁻¹, and LPS at 1 mg·L⁻¹, which was the appropriate stimulus concentration. Among 10:1, 20:1, 30:1, 40:1 50:1 ratios of Poly (I: C) -LPS, the simulation of 50:1 group was more remarkable than other groups ($P < 0.01$). Furthermore, the intervention of Guizhitang in 10:1 group was more significant than other groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** The results suggest that NR8383 cells stimulated with Poly (I: C) -LPS (10:1) can be used as a syndrome cell model of Guizhitang for further study of Guizhitang and similar prescriptions.

[**Key words**] polyinosinic polycytidylic acid [Poly (I: C)]; endotoxin; Guizhitang; Toll-like receptors (TLRs); interleukin (IL) -1 β ; tumor necrosis factor (TNF) - α

中医证候模型是中医药基础研究的重要工具,是连接基础研究和临床实践的重要纽带。目前,该方面研究的进展十分缓慢,一定程度上可以说该方面的不足是限制方剂、证候等基础研究进一步深入进行的桎梏和瓶颈之一^[1]。

目前的证候动物模型距离临床辨证施治、遣方用药的实用要求——必须具体到某一类或某一具体方剂还相距甚远,“汤证”模型(针对某一具体方剂的证候动物模型)相关研究尚未见诸报道,故目前的证候动物模型难以达到中医药实践的基本要求:如方-证相应、辨证施治、“有是证,用是方”等,不利于基础研究成果向临床实践转化,也不利于与临床实践相结合、促进和指导^[2]。

表证,是外感疾病早期阶段症状的概括,临床多见于急性上呼吸道感染性疾病(上感),其有效干预关乎疾病的进程、转归和预后,体现了我国传统医学在预防和早期干预治疗方面的优势,尤其是近年来对人类健康构成较大威胁的流感,非典型肺炎(SARS)等的早期有效干预具有重要的意义^[3,4]。

桂枝汤,被誉为“群方之祖”,主治太阳中风表虚证,是作者课题组近 30 年来致力研究的经方。本研究基于作者课题组的前期探索结果^[5-10],以聚肌胞苷酸[Poly(I: C)]模拟病毒,脂多糖(LPS)模拟病菌共同刺激肺巨噬细胞,以 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)以及下游信号转导元件基因表达和细胞因子分泌为指标,发现解表方药桂枝汤/麻黄汤含药血清干预效果对于 Poly(I: C)刺激优于清热方剂清开灵等,而对于 LPS 刺激,则恰恰相反;桂枝汤证、麻黄汤证、桑菊饮证、银翘散证患者血清可以刺激肺巨噬细胞改变 TLRs 和细胞因子的表达或分泌,且刺激效应可被 Poly(I: C)和 LPS 一定程度

的模拟;分别以桂枝汤、麻黄汤、桑菊饮、银翘散含药血清交叉干预上述四证患者血清的刺激,发现特定的方剂对于相应证患者血清刺激的干预效果最好,优于其他含药血清,体外呈现了严谨的“方-证相应”。本研究基于上述前期研究,借鉴现代医学的内环境和微环境学说,吸收近年来免疫学发展成果,遵循方证相应原则,拟以 Poly(I: C)-LPS 不同比例组合物刺激肺巨噬细胞,以桂枝汤含药血清干预,观察它们下游通路元件和效应分子——同比例组样受体和细胞因子的表达和分泌,尝试探索并建立一种针对经方桂枝汤的体外细胞汤证模型,并为进一步建立桂枝汤汤证动物模型积累数据,也以期为其他汤证模型提供参考和借鉴。

1 材料

1.1 动物与细胞株 雄性 SD 大鼠,15 只,体质量(260 ± 10) g,购于北京大学医学部(实验动物科学部),合格证号 SCXK(京)2011-0012,饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所,伦理委员会的编号为 2016-030;大鼠肺巨噬细胞 NR8383 细胞(上海细胞库)。

1.2 药物及试剂 桂枝汤由桂枝 10 g,芍药 10 g,生姜 10 g,甘草 7 g,大枣 10 g 组成,所用中药饮片均购自北京双桥燕京中药饮片厂,批号分别为 1602033,1601090,1603070,1604024(除生姜外),经本所主管药师何希荣鉴定均为正品,符合 2015 年版《中国药典》规范,以原方比例混合,按本实验室常规制备方法水煎 2 次,过滤浓缩至 1.175 g·mL⁻¹。F-12 Nutrient Mixture(美国 Gibco 公司,批号 678268); LPS 干粉(美国 Sigma 公司,批号 046M4045V);Poly(I: C)注射液(广东南国生物制药有限公司,国药准字 H20003724);总 RNA 提取试

剂盒, RNA 逆转录试剂盒, PCR 试剂盒(天根生化科技有限公司, 批号分别为 Q5704, Q5817, Q5707); 白细胞介素-17(IL-17), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 酶联免疫吸附测定(ELISA) 试剂盒(欣博胜生物科技有限公司, 批号分别为 R180104-007a, R180104-102a); 细胞增殖-毒性检测-8(CCK-8) 试剂盒(同仁化学科技有限公司, 批号 KS607); 胎牛血清(Biowest 公司, 批号 S13934S1580); TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) 引物均为上海英威捷基公司合成。

1.3 仪器 LightCycler480 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) 仪(美国 Roche 公司); ND8000 型微量核酸蛋白测定仪, Cyler2720 型逆转录仪(美国 Thermal Scientific 公司); SpectraMax 384plus 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); Memmert 型 CO₂ 型培养箱(北京五洲东方科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备 大鼠随机分成 2 组, 分别为空白组、桂枝汤组, 分别为 7 只和 8 只, 桂枝汤组的给药剂量为 47 g·kg⁻¹ (相当于临床人体质量用量的 60 倍), 每天上、下午各给药 1 次, 共 5 次, 于末次给药后 1 h, 乙醚麻醉动物, 无菌条件下, 经腹主动脉取血, 4 °C 静置 1 h, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 分离含药血清, 将同组大鼠含药血清混匀, 在 56 °C 水浴 30 min 灭活血清, 微孔滤膜过滤除菌, 冻存管分装, -20 °C 保存备用^[2,4]。

2.2 大鼠肺巨噬细胞 NR8383 的培养 NR8383 细胞株混悬于含 15% 新生胎牛血清的 F12 培养基(15% 新生胎牛血清, NaHCO₃ 2.5 g, 100 U·mL⁻¹ 青霉素, 100 mg·L⁻¹ 链霉素) 中, 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养, 2~3 d 换液和传代 1 次, 取生长状态良好的 NR8383 细胞株, 计数并调细胞浓度。

2.3 CCK-8 法检测桂枝汤含药血清对 NR8383 细胞活性的影响 实验分为空白组和不同剂量桂枝汤组(9.4, 6.6, 4.7, 3.3, 2.4 g·kg⁻¹)。取对数生长期 NR8383 细胞, 用 F12 培养液(含 15% 血清) 调细胞密度为 1 × 10⁵ 个/mL, 铺于 96 孔板上, 每孔 80 μ L, 按实验分组分别加入不同计量的桂枝汤含药血清, 放入培养箱 24, 48 h 后, 每孔加入 CCK-8 试剂 10 μ L, 振荡器轻轻振荡 3 min, 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养 2 h, 于酶标仪 450 nm 测定各组吸光度 A。含药血清中药物含量计算方法采用本研究室的方法^[4]。

含药血清中药物含量 = 大鼠用药剂量(g·kg⁻¹)/含药血清的稀释倍数(U)

2.4 Poly(I:C) 刺激 NR8383 细胞分泌 TNF- α 的时效、量效关系 NR8383 细胞密度 1.8 × 10⁶ 个/mL, 接种于 48 孔板, 每孔加入细胞悬液 0.5 mL, 加入 Poly(I:C), 使其终质量浓度分别为 25, 50, 100 mg·L⁻¹, 刺激时间为 3, 6, 12, 24 h, 使每一含量设 4 个复孔。37 °C 5% CO₂ 培养箱培养, 至各刺激时间点取细胞上清, ELISA 试剂盒测定 TNF- α 含量, 按试剂盒说明书进行操作。

2.5 LPS 刺激 NR8383 细胞分泌 IL-1 β 的时效、量效关系 NR8383 细胞密度 1.8 × 10⁶ 个/mL, 接种于 48 孔板, 每孔加入细胞悬液 0.5 mL, 加入 LPS, 使其终含量分别为 1, 5, 10 mg·L⁻¹, 刺激时间为 6, 12, 24, 48 h, 使每一含量设 4 个复孔。37 °C 5% CO₂ 培养箱培养, 至各刺激时间点取细胞上清, ELISA 试剂盒测定 IL-1 β 含量, 按试剂盒说明书进行操作。

2.6 不同 Poly(I:C)-LPS 组合比例刺激 NR8383 细胞分泌 IL-1 β , TNF- α 含量和 TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-6 mRNA 表达以及桂枝汤含药血清干预的作用。

2.6.1 完全 F12 培养基调整 NR8383 细胞密度 1.8 × 10⁶ 个/mL, 接种于 48 孔板, 每孔 0.39 mL, 加入各比例的 Poly(I:C) 与 LPS 的混合液、桂枝汤含药血清等(表 1), 每一浓度设 4 个复孔。37 °C 5% CO₂ 培养箱培养, 至 6 h 时, 取出相应孔的上清液, 采用 ELISA 试剂盒测定 TNF- α , IL-1 β 含量, 细胞用以提取总 RNA。

表 1 桂枝汤含药血清及 Poly(I:C)-LPS 混合物的加样信息

Table 1 Sample table of Guizhitang drug serum and mixture of Poly(I:C) and LPS

组别	含药血清	Poly(I:C)	LPS	无血清培养基
空白(C)	-	-	-	135
Poly(I:C)-LPS(10:1)	-	5	10	120
Poly(I:C)-LPS(20:1)	-	10	10	115
Poly(I:C)-LPS(30:1)	-	15	10	110
Poly(I:C)-LPS(40:1)	-	20	10	105
Poly(I:C)-LPS(50:1)	-	25	10	100
桂枝汤(G)	100	-	-	35
Poly(I:C)-LPS(10:1)+G	100	5	10	20
Poly(I:C)-LPS(20:1)+G	100	10	10	15
Poly(I:C)-LPS(30:1)+G	100	15	10	10
Poly(I:C)-LPS(40:1)+G	100	20	10	5
Poly(I:C)-LPS(50:1)+G	100	25	10	-

注: F12 液加样 365 μ L。

2.6.2 引物的设计与合成 从 Pubmed 中获取大鼠相关 mRNA 序列。引物序列、产物长度见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

基因	序列(5'-3')	扩增片段/bp
GAPDH	上游 CAGGGCTGCCTTCTTTGTG	186
	下游 TCTCGCTCCTGGAAGATGGT	
TLR-2	上游 TGGAGGTCTCCAGCTCAAATCT	188
	下游 TGTTTGCTGTGAGTCCCGAG	
TLR-3	上游 CTACAACAGCCTCCGCGAC	103
	下游 GTGAGGGGTCAAACGCTGTA	
TLR-4	上游 GCTGGTTGCAGAAAATGCCA	121
	下游 AGGAAGTACCTCTATGCAGGG	
TLR-6	上游 ATCCCTCTGGGATAGCCTCTG	189
	下游 TTTGTGCTTGGTGACAGGTCT	

2.6.3 Real-time PCR 检测 20 μL PCR 反应体系中 $2 \times \text{Mix } 10 \mu\text{L}$, 引物 $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cDNA $1 \mu\text{L}$, RNase-free ddH₂O $7.8 \mu\text{L}$, 正反引物 $1.2 \mu\text{L}$ 。同时以 GAPDH 做为内参照做平行管。PCR 仪上进行扩增, 扩增条件为 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 min, ($94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s) 55 个循环, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 5 min, 并做熔解曲线。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行数据分析。本实验已对目的基因和内参基因的扩增效率进行了比对, 其效率基本一致, 故本研究中采用的此相对定量法进行数据处理和分析^[2,4]。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用方差分析检验, 以 $P < 0.05$ 为差异均有统计学意义。

3 结果

3.1 桂枝汤含药血清对 NR8383 细胞增殖的影响

表 4 Poly(I:C) 刺激 NR8383 细胞分泌 TNF- α 时效、量效变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 Effect of Poly(I:C) on timing and dose effect of TNF- α secreted by NR8383 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	3 h	6 h	12 h	24 h
空白	-	54.90 ± 5.81	35.76 ± 2.32	29.24 ± 1.41	54.27 ± 5.03
poly(I:C)	25	40.01 ± 1.79	$235.24 \pm 9.73^{2)}$	$62.57 \pm 8.34^{1)}$	$76.95 \pm 3.41^{1)}$
	50	60.74 ± 11.32	$349.81 \pm 24.09^{2)}$	$319.87 \pm 9.99^{2)}$	$85.49 \pm 5.54^{1)}$
	100	75.98 ± 9.57	$290.95 \pm 20.85^{2)}$	$441.46 \pm 21.13^{2)}$	$96.36 \pm 4.90^{1)}$

3.3 LPS 刺激 NR8383 细胞分泌 IL-1 β 的时效、量效变化的影响 在观察 6 ~ 24 h 期间, 不同浓度 LPS 可刺激巨噬细胞使之分泌 IL-1 β 显著增加 ($P < 0.01$), 但随着时间推移逐渐降低趋势明显 (48 h 较

桂枝汤含药血清组与空白组比较, 24 h 时细胞活性在含药血清体积分数为 14% ~ 20% 无明显变化, 在 7%, 5% 时下降显著 ($P < 0.01$), 48 h 细胞活性无明显变化, 故选择桂枝汤含药血清在 20% 时作为干预体积分数 (接近临床患者等效剂量)。见表 3。

表 3 桂枝汤含药血清对 NR8383 细胞活性 (A) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Guizhitang drug serum on activity (A) of NR8383 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体积分数 /%	含药血清 药物剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	24 h	48 h
空白	-	-	0.95 ± 0.15	1.10 ± 0.07
桂枝汤	20	9.4	0.97 ± 0.08	1.14 ± 0.05
	14	6.6	0.94 ± 0.08	1.06 ± 0.05
	10	4.7	0.92 ± 0.07	1.04 ± 0.07
	7	3.3	$0.85 \pm 0.10^{2)}$	1.05 ± 0.09
	5	2.4	$0.83 \pm 0.09^{2)}$	1.05 ± 0.10

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 4 ~ 7 同)。

3.2 Poly(I:C) 刺激 NR8383 细胞分泌 TNF- α 时效、量效变化的影响 在 3 ~ 24 h 期间, Poly(I:C) 可刺激巨噬细胞分泌 TNF- α 呈现先升高后降低的总体趋势, $25 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Poly(I:C) 刺激效应均在 6 h 达到峰值 ($P < 0.01$), 随后下降, 而增至 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后, 整个分泌曲线上移, 峰值滞后至 12 h。Poly(I:C) 在质量浓度 $25 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $25 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 效应模式类似, 且 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的分泌量差异并非很大, 参考文献兼考虑以前本课题组结果, 选择 Poly(I:C) 刺激时间为 6 h, 刺激质量浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下。见表 4。

之 24 h 稍有增加), 所用 LPS 刺激浓度对 IL-1 β 对分泌虽有变化, 但影响不大。考虑本课题组以前结果并结合前 3.2 项下结果综合考虑, 故选择 LPS 刺激时间为 6 h, 刺激质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 5。

表 5 LPS 刺激 NR8383 细胞分泌 IL-1 β 的时效、量效变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 5 Effect of LPS on timing and dose effect of IL-1 β secreted by NR8383 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

ng·L⁻¹

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	6 h	12 h	24 h	48 h
空白	-	424.15 ± 14.54	429.34 ± 17.84	396.84 ± 9.95	410.85 ± 15.49
LPS	1	1174.63 ± 61.36 ²⁾	941.90 ± 36.53 ²⁾	481.67 ± 34.87 ²⁾	515.66 ± 42.12 ²⁾
	5	1313.22 ± 51.73 ²⁾	661.22 ± 42.09 ²⁾	509.46 ± 22.23 ²⁾	532.21 ± 25.26 ²⁾
	10	1285.82 ± 53.66 ²⁾	758.57 ± 62.13 ²⁾	478.83 ± 50.51 ¹⁾	787.97 ± 59.25 ²⁾

3.4 桂枝汤含药血清对不同比例 Poly(I:C)-LPS 组合刺激 NR8383 细胞分泌 IL-1 β , TNF- α 表达的影响 Poly(I:C)-LPS 组合比例(10:1 ~ 50:1)均可刺激 NR8383 细胞 IL-1 β , TNF- α 分泌量显著升高 ($P < 0.01$), 总体呈现余弦曲线样变化, 但呈明显的升高趋势(50:1 刺激组合分泌量最高)。桂枝汤含药血清单独应用, 也可相对升高上述 2 个细胞因子分泌量 ($P < 0.05$), 但两者叠加的结果显示, 桂枝汤可以非常显著的拮抗各组合比例 Poly(I:C)-LPS 的刺激作用, IL-1 β 降低至约为模型组的 50% 以下, TNF- α 也在 20% ~ 40%, 前者以 Poly(I:C)-LPS(10:1) 组合配比最为明显, 而后者以 Poly(I:C)-LPS(20:1) 组合比例最为显著(均为相应模型组的 20% 以下)。见表 6。

表 6 桂枝汤含药血清对不同比例 Poly(I:C)-LPS 组合刺激 NR8383 细胞分泌 IL-1 β , TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Effect of serum containing Guizhitang on IL-1 β and TNF- α of NR8383 cells are stimulated by different ratio of Poly(I:C)-LPS combination ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

ng·L⁻¹

组别	Poly(I:C)-LPS	IL-1 β	TNF- α
空白	-	73.37 ± 5.99	18.23 ± 4.16
模型	10:1	1 188.63 ± 30.07 ²⁾	219.28 ± 12.11 ²⁾
	20:1	708.23 ± 65.36 ²⁾	350.97 ± 33.17 ²⁾
	30:1	1 027.51 ± 36.73 ²⁾	440.90 ± 5.19 ²⁾
	40:1	1 372.49 ± 48.29 ²⁾	169.29 ± 0.92 ²⁾
	50:1	2 605.65 ± 68.47 ²⁾	292.58 ± 9.63 ²⁾
桂枝汤	-	136.25 ± 26.81 ¹⁾	41.98 ± 5.26 ¹⁾
桂枝汤干预	10:1	191.41 ± 56.34 ⁴⁾	167.35 ± 19.47
	20:1	475.36 ± 81.84 ⁴⁾	54.14 ± 4.42 ⁴⁾
	30:1	452.41 ± 51.03 ⁴⁾	73.89 ± 11.92 ⁴⁾
	40:1	439.28 ± 20.35 ⁴⁾	107.38 ± 19.98
	50:1	635.61 ± 39.74 ⁴⁾	161.36 ± 3.05 ⁴⁾

注:与相应刺激浓度比的模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 桂枝汤给药体积分数为 20% (表 7 同)。

3.5 桂枝汤含药血清对不同比例 Poly(I:C)-LPS 组合刺激 NR8383 细胞分泌 TLR-2, TLR-3, TLR-4,

TLR-6 mRNA 表达的影响

Poly(I:C)-LPS 的任一比例组合物均可显著升高 TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-6 mRNA 表达 ($P < 0.01$), 且大致呈余弦曲线样阶梯型升高的变化规律, 其内在机制未明。单用桂枝汤含药血清也对一定程度的升高 TLRs mRNA 表达作用 (TLR2 除外), 而两者叠加的结果显示, 桂枝汤含药血清均可明显对抗各组合 Poly(I:C)-LPS 刺激的 TLRs 升高 ($P < 0.05$), 平均降低至刺激组的 1/3 以下, 总体干预药效以 Poly(I:C)-LPS(10:1) 比例最为明显, 尤其是对 TLR3 和 TLR4 较为明显。见表 7。

3.6 桂枝汤含药血清对不同 Poly(I:C)-LPS 比例组合的干预效果综合比较 采用主成分分析法 (Bartlett 检验, $P < 0.05$) 比较桂枝汤含药血清对不同 Poly(I:C)-LPS 比例组合刺激的综合干预效果, 见图 1。主成分 1 的累计方差为 72.649%, 主成分 2 的累计方差为 15.512%, 两者合计 88.161%。从图上可以明显看出, Poly(I:C)-LPS 各组合比例刺激呈现整体正性量效关系, 距离正常组的向量值依次增大 (偏离正常状态愈甚), 以桂枝汤含药血清干预后, 各组向正常状态回归, 最为明显的依次为 10:1, 20:1, 30:1, 40:1 和 50:1, 其中 50:1 干预效果最差。同时采用系统聚类法进行分析, 其原理是按相似性系数作为判别其分类群的依据, 具体分类见图 2, 表 8, 从中可看出桂枝汤含药血清几乎中和了 Poly(I:C)-LPS 为 10:1 的刺激效应。

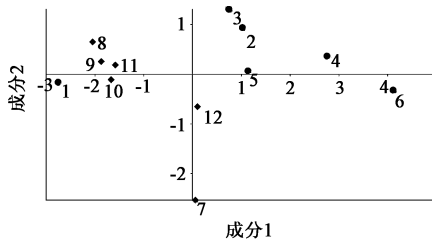
4 讨论

表证多见于急性上呼吸道感染性疾病 (上感)。上感是呼吸道微生物在一定条件下引发的免疫反应和炎症过程, 70% ~ 80% 由病毒 (鼻病毒、冠状病毒、腺病毒、流感和副流感病毒、呼吸道合胞病毒、埃可病毒、柯萨奇病毒等) 引起, 另有 20% ~ 30% 的由细菌 (溶血性链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎球菌、葡萄球菌等) 直接引起或者继发的感染, 菌-毒共感染可以相互促进并加重病情^[11-12]。

上感早期阶段, 机体先天免疫系统占据重要

表 7 桂枝汤含药血清对不同比例 Poly(I:C)-LPS 组合刺激 NR8383 细胞分泌 TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-6 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 7 Effect of serum containing Guizhitang on TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-6 mRNA of NR8383 cells are stimulated by different ratio of Poly(I:C)-LPS combination ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Poly(I:C)-LPS	TLR2	TLR3	TLR4	TLR6
空白	-	1.05 ± 0.04	1.03 ± 0.06	1.19 ± 0.13	1.08 ± 0.15
模型	10:1	10.14 ± 0.56 ²⁾	4.14 ± 0.33 ²⁾	3.48 ± 0.55 ¹⁾	22.27 ± 4.78 ²⁾
	20:1	8.70 ± 0.36 ²⁾	4.66 ± 0.56 ²⁾	3.14 ± 0.35 ¹⁾	15.22 ± 4.17 ²⁾
	30:1	8.74 ± 0.25 ²⁾	9.35 ± 0.99 ²⁾	5.05 ± 0.46 ¹⁾	33.35 ± 3.08 ²⁾
	40:1	7.55 ± 0.67 ²⁾	7.78 ± 1.18 ²⁾	3.87 ± 0.36 ¹⁾	17.58 ± 3.43 ²⁾
	50:1	10.01 ± 0.13 ²⁾	10.67 ± 1.16 ²⁾	5.06 ± 0.81 ¹⁾	54.04 ± 14.19 ²⁾
桂枝汤	-	0.62 ± 0.03 ²⁾	8.11 ± 0.78 ²⁾	5.02 ± 0.60 ²⁾	34.06 ± 14.32 ²⁾
桂枝汤干预	10:1	2.82 ± 0.18 ⁴⁾	0.55 ± 0.06 ⁴⁾	0.72 ± 0.10 ³⁾	8.76 ± 1.64 ⁴⁾
	20:1	3.73 ± 0.13 ⁴⁾	1.43 ± 0.24 ⁴⁾	1.26 ± 0.17 ⁴⁾	7.95 ± 1.18
	30:1	2.67 ± 0.07 ⁴⁾	1.75 ± 0.35 ⁴⁾	1.48 ± 0.23 ⁴⁾	14.78 ± 3.01 ³⁾
	40:1	3.25 ± 0.05 ⁴⁾	2.33 ± 0.41 ⁴⁾	1.36 ± 0.15 ⁴⁾	10.75 ± 1.69 ³⁾
	50:1	4.11 ± 0.14 ⁴⁾	4.55 ± 0.43 ⁴⁾	2.75 ± 0.38 ³⁾	36.75 ± 3.43



1. 正常组; 2. 10:1; 3. 20:1; 4. 30:1; 5. 40:1; 6. 50:1; 7. 桂枝汤组; 8. 10:1 加桂枝汤; 9. 20:1 加桂枝汤; 10. 30:1 加桂枝汤; 11. 40:1 加桂枝汤; 12. 50:1 加桂枝汤 (图 2 同)

图 1 主成分特征向量

Fig. 1 Principal component eigenvector graph

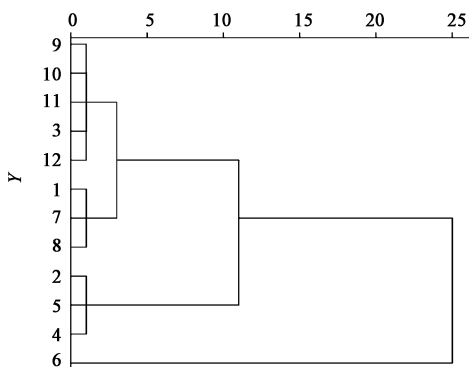


图 2 系统聚类法的树状信息

Fig. 2 Tree graph of system clustering method

地位,其中吞噬细胞尤其是肺巨噬细胞在早期防御和免疫损伤以及启动后续的获得性免疫过程中均扮演者重要角色^[13-16],这也是作者课题组从近 10 多年一直采用肺巨噬细胞系列如 RAW264.7 细胞株,

表 8 系统聚类法组别分类

Table 8 Classification of system clustering method

类别	组别
第 1 类	50:1
第 2 类	10:1, 30:1, 40:1
第 3 类	C, G, 10:1 + G
第 4 类	20:1, 20:1 + G, 30:1 + G, 40:1 + G, 50:1 + G

NR8383 细胞株研究清热解表方剂的原因之一^[8],这也符合中医“肺为华盖”、“太阳与肺共主表”的表证病机病理^[17]。

巨噬细胞具有多种 TLRs,其中 TLR3 识别病毒的双链 RNA(dsRNA)以及人工合成的聚肌胞 [Poly(I:C)] 双链 RNA 类似物,主要产生 γ -干扰素 (IFN- γ), IFN- γ 和 TNF- α 等抗病毒细胞因子或炎症因子 (本研究预实验发现细胞上清液中几乎检测不到 IFN,故正式实验中并未检测); TLR4 主要识别 LPS 等成分,通过核转录因子- κ B (NF- κ B) 通路产生 IL-1 β 等细胞因子。TLR2 和 TLR1 或 TLR6 可形成共聚体,识别多种微生物模式识别成分^[18-19]。

故本研究选用了大鼠肺巨噬细胞 NR8383 作为研究对象,以 Poly(I:C)-LPS 不同比例组合模拟细菌共感染 (近来细菌共感染模型逐渐为业界重视^[8,15]),以病毒和细菌模式识别受体 (TLR2, TLR3, TLR4 和 TLR6) 表达以及终端主要效应因子 (IL-1 β 和 TNF- α) 分泌为指标,多指标综合评价与桂枝汤干预的对应性 (模拟方证相应),以期建立桂

枝汤体外汤证模型。

和前期研究类似,桂枝汤含药血清本身显示对上述系统具有增强作用,机制未明,从升高幅度推测,是促进了大鼠巨噬细胞 NR8383 的免疫反应,而非以过度免疫的损伤反应。而对于 Poly(I:C)-LPS 刺激,桂枝汤又可显著抑制其刺激效应,呈现双向作用。

经多次重复,验证了 Poly(I:C)-LPS 不同比例可以显著升高大鼠巨噬细胞 NR8383 TLRs 表达和细胞因子分泌,但令人不解的是随着剂量比例的加大,刺激效应呈现类似余弦曲线样的阶梯上升,提示 Poly(I:C)/TNF- α 通路和 LPS/IL-1 β 通路存在着复杂的交互对话^[8]。

综合分析 IL-1 β , TNF- α 蛋白表达,以及 TLR-2, TLR3, TLR4 和 TLR6 基因表达结果,可以得到初步结论为在所试比例剂量下, Poly(I:C)-LPS 10:1 可能适合作为建立体外桂枝汤证模型的刺激组合。这尚待进一步验证(如何桂枝汤证患者血清比较,和治疗表证的其他方剂比较以及整体动物上的相关比较)。

[参考文献]

[1] 刘涛,王伟. 证候动物模型研究的思索[J]. 中华中医药杂志,2006,21(9):550-551.

[2] 张兰凤,王阶,王永炎. 方证对应研究[J]. 中华中医药杂志,2005,20(1):8-10.

[3] 郑新,田令群,杜树明,等. 卫气营血在内科热病的辩证论治规律探讨——附 2391 例分析[J]. 重庆医学,1980,9(6):8-12.

[4] 齐有胜,孙毅坤,刘为萍. 单味中药抗流感病毒研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(14):210-218.

[5] 姜廷良,赵保胜,杜新亮,等. 解表剂功能与 Toll 样受体(TLR)[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2010,12(1):115-117.

[6] DU X L, SUI F, HUO H R, et al. Reciprocal effects of Guizhitang to the Guizhitang syndrome by toll-like receptor mRNA expression and cytokines secretion[J]. Chin J Integr Med,2013,19(11):826-835.

[7] 赵保胜,李兰芳,马悦颖,等. 参苏饮含药血清对小鼠巨噬细胞 Toll 样受体及其下游信号转导通路的影响

[J]. 中国中药杂志,2007,32(4):327-331.

[8] 赵保胜. 桂枝汤等解表/清热方和相关成分对 TLRs 及其信号转导通路的影响[D]. 北京:中国中医科学院,2007.

[9] 杜新亮,隋峰,张畅斌,等. 桑菊饮含药血清对小鼠巨噬细胞 Toll 样受体表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(1):57-61.

[10] 赵保胜,刘洪斌,马悦颖,等. 黄连解毒汤含药血清对 Toll 样受体 3、4 型及其下游信号转导通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(5):15-20.

[11] Amanda M J, Lesley P, Shuang Y, et al. Role of tissue protection in lethal respiratory viral-bacterial coinfection [J]. Science,2013,340(6137):1230-1234.

[12] LIN X, HUANG C, SHI J, et al. Investigation of Pathogenesis of H1N1 influenza virus and swine streptococcus suis serotype co-infection in pigs by microarray analysis [J]. PLoS One, 2015, 10(4):e0124086.

[13] Kolli D, Gupta M R, Sbrana E, et al. Alveolar macrophages contribute to the pathogenesis of human metapneumovirus infection while protecting against respiratory syncytial virus infection [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014,51(4):502-515.

[14] Gordon S B, Read R C. Macrophage defences against respiratory tract infections[J]. Med Bull,2002,61(1):45-61.

[15] Byrne A J, Mathie S A, Gregory L G, et al. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways[J]. Thorax, 2015,70(12):1189-1196.

[16] Didierlaurent A, Goulding J, Hussell T. The impact of successive infections on the lung microenvironment[J]. Immunology,2007,122(4):457-465.

[17] 刘玉良,张文立.《伤寒论》太阳病篇多见肺病的机理分析[J]. 中华中医药学刊,2011,29(12):2805-2807.

[18] Alexopoulou L, Holt A C, Medzhitov R A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3 [J]. Nature, 2001,413(6857):732-738.

[19] Gopal R, Rapaka R R, Kolls J K. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with pulmonary pathogens[J]. Eur Respir Rev,2017, doi: 10.1183/16000617.0042-2016.

[责任编辑 周冰冰]