

3 种不同治法的中药复方对 Toll 样受体 4 及下游信号转导通路主要元件的影响

刘叙阳¹, 姜华^{2*}

(1. 延边大学 中医学院, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学 附属医院, 吉林 延吉 133000)

[摘要] **目的:**研究补阳还五汤(益气活血)、血府逐瘀汤(活血)、四君子汤(益气)等 3 种不同治法的中药复方含药血清对脂多糖诱导的血管内皮细胞 Toll 样受体 4 及下游信号转导通路主要元件的影响,探讨不同治法的中药复方防治动脉粥样硬化的机制。**方法:**新西兰大耳白兔随机分为正常组、补阳还五汤组、血府逐瘀汤组、四君子汤组,每组 5 只。正常组以 20 mL 生理盐水 *ig*; 3 个中药复方组分别以 20 mL 补阳还五汤($6.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 血府逐瘀汤($3.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 四君子汤($1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) *ig*, 连续 *ig* 7 d。在末次 *ig* 给药 2 h 后, 心脏取血, 离心后制备中药含药血清。血管内皮细胞随机分为空白组, 模型组, 阿托伐他汀组($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 补阳还五汤组, 血府逐瘀汤组, 四君子汤组 6 组, 用脂多糖($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 刺激 2 h 后分别加入含 10% 阿托伐他汀药、中药复方含药血清干预, 24 h 后收集细胞, 用荧光定量 PCR 方法测定 Toll 样受体 4 (TLR4), 下游髓样分化因子 88 (MyD88), 肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF-6) 及核因子 κB (NF- κB) 的基因表达, 用 Western blot 方法测定 TLR4 和 NF- κB 蛋白表达。**结果:**模型组用脂多糖刺激内皮细胞后引起 TLR4, MyD88, TRAF-6 及 NF- κB 的表达升高, 与空白组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。用补阳还五汤和血府逐瘀汤含药血清干预之后显著抑制各项指标的表达, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而四君子汤组各项指标无明显变化, 与模型组比较, 差异无统计学意义。**结论:**补阳还五汤和血府逐瘀汤可抑制 TLR4 及下游信号转导通路主要元件的表达, 这可能是 2 种方剂防治动脉粥样硬化作用的机制之一。

[关键词] 补阳还五汤; 血府逐瘀汤; 内皮细胞; Toll 样受体 4; 动脉粥样硬化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0121-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010121

Effect of Chinese Herbal Compound Prescription in Three Different Treatment Methods on Expression of Toll-like Receptor-4 and Its Downstream Signal Transduction Pathway

LIU Xu-yang¹, JIANG Hua^{2*}

(1. Yanbian University of Traditional Chinese Medicine, Yanji 133000, China;
2. Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of drug serum by Chinese herbal compound prescription in Buyang Huanwu Tang (BHT), Xuefu Zhuyu Tang (XZT) and Sijunzi Tang (ST) on the expression of Toll-like receptor-4 (TLR4) and main components of downstream signal transduction pathways, and to study their possible anti-atherosclerotic mechanism. **Method:** New Zealand rabbits were divided into 4 groups in random: normal group, BHT group, XZT group, and ST group, with 5 rabbits in each group. Rabbits in normal group were given gastric perfusion of 20 mL normal saline, rabbits in three Chinese herbal compound groups respectively received gastric perfusion of 20 mL BHT ($6.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), XZT ($3.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and ST ($1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), for 7 continuous days. Blood was drawn from rabbit's heart 2 h after the last gastric perfusion, and then the drug serum was prepared after centrifugation. Vascular endothelial cells were randomly divided into 6 groups: blank group, model group, Atorvastatin group ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), BHT group, XZT group and ST group. After stimulation with LPS ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) for 2 h, drug serum containing 10% control western medicine and drug serum containing Chinese herbal compound were added separately for intervention. Cells were collected after 24 hours. The gene expression

[收稿日期] 20150204(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160476)

[第一作者] 刘叙阳, 从事中西医结合治疗动脉粥样硬化的研究, Tel:0433-2660101, E-mail:903438518@qq.com

[通讯作者] *姜华, 博士, 副主任医师, 从事中西医结合治疗动脉粥样硬化的研究, Tel:0433-2660101, E-mail:jianghua62@163.com

of TLR4, myeloid differentiation factor 88 (MyD88), tumor necrosis factor-associated factor 6 (TRAF-6) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) were measured with RT-qPCR. Western blotting method was used to analyze the expression of TLR4 and NF- κ B protein. **Result:** expressions of TLR4, MyD88, TRAF-6 and NF- κ B in model group were increased significantly after LPS stimulation, with statistical difference compared with blank group ($P < 0.01$). Intervention by BHT and XZD could significantly decrease the expression of TLR4, MyD88, TRAF-6 and NF- κ B, with statistical difference compared with model group ($P < 0.05$). However, ST group had no significant changes in various indicators, with no statistical difference compared with model group. **Conclusion:** BHT and XZD can inhibit the expression of TLR4 and main components of downstream signal transduction pathways, which may be one of its action mechanisms for anti-atherosclerosis.

[**Key words**] Buyang Huanwu Tang; Xuefu Zhuyu Tang; endothelial cells; Toll-like receptor-4; atherosclerosis

收载于《医林改错》中的补阳还五汤具有补气活血、通经活络的功效,广泛应用于临床各科疾病的治疗。研究表明,补阳还五汤具有良好的抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的作用^[1-2]。研究显示,动脉粥样硬化的各个阶段均伴有血管内皮细胞功能障碍。脂多糖可引起血管内皮细胞(VEC)TLR4 信号转导通路主要元件的表达升高。研究表明,Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)信号转导通路和下游各种炎症因子在动脉粥样硬化的发生和发展中起着重要的作用,而本课题组前期研究结果表明,补阳还五汤加减而成的益气活血复方对 TLR 及下游髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)依赖性信号转导通路有明显的抑制作用,并且对下游炎症因子的表达也有抑制作用,从而发挥抗动脉粥样硬化的作用^[3]。因此,以前期研究结果为基础,本实验选用补阳还五汤、血府逐瘀汤、四君子汤等代表着益气活血、活血、益气的 3 种不同中医治法的方剂对 TLR4 及下游信号转导通路主要元件的影响,比较 3 种不同治法对 AS 的影响,从方剂治法的角度探讨动脉粥样硬化的基本病机,同时为补阳还五汤和血府逐瘀汤在临床上的应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 雄性新西兰大耳白兔由辽宁中医药大学实验动物中心提供,共 20 只,体重(2.0 ± 0.5) kg,动物合格证号 SCXK(吉)2009-0003,以供制备药物血清使用。

1.2 药物及试剂 补阳还五汤由生黄芪 120 g,当归尾 6 g,赤芍 5 g,川芎 3 g,地龙 3 g,桃仁 3 g,红花 3 g 组成;血府逐瘀汤由桃仁 12 g,红花 9 g,地黄 9 g,当归 9 g,川芎 5 g,赤芍 6 g,牛膝 9 g,桔梗 5 g,枳壳 6 g,柴胡 3 g,甘草 3 g 组成;四君子汤由人参 9 g,

白术 9 g,茯苓 9 g,甘草 6 g 组成。药物由延边大学附属医院中药药剂科提供,由中药药剂科鉴定合格。各组中药分别浸泡 1 h 后,武火煮沸,文火煮 20 min,过滤,重复煎 3 次,合并煎煮液后浓缩至补阳还五汤含生药 0.8 g·mL⁻¹,血府逐瘀汤含生药 0.4 g·mL⁻¹,四君子汤含生药 0.2 g·mL⁻¹。人脐静脉内皮细胞株 ECV304 由辽宁中医药大学附属医院实验室提供。胎牛血清(美国 Gibco 公司),阿托伐他汀纯品(美国 LKT Laboratories 公司),脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,批号 L-2880),兔抗人 TLR4(批号 sc10741)和核因子 κ B(NF- κ B,批号 sc21014),抗体和羊抗兔 IgG 均为美国 Santa Cruz 公司产品。

1.3 仪器 ABI 7500 型 PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司),Mini-Protein III 型垂直板电泳装置(美国 Bio-Rad 公司),Chemi Imager5500 型凝胶电泳成像分析系统(美国 Alphainnotech chemi Imager 公司)。

2 方法

2.1 中药含药血清的制备 新西兰白兔随机分为正常组、补阳还五汤组、血府逐瘀汤组、四君子汤组等 4 组,每组 5 只。3 个中药组分别用 20 mL 补阳还五汤、血府逐瘀汤、四君子汤 *ig*,正常组用同等量的生理盐水 *ig*,连续 *ig* 7 d。动物给药量按生药量计为:补阳还五汤组 6.7 g·kg⁻¹,血府逐瘀汤组 3.6 g·kg⁻¹,四君子汤组 1.6 g·kg⁻¹。末次给药 2 h 后,心脏采血,离心后制备血清。

2.2 分组和干预方法 培养 VEC 18 h,待细胞生长融合成单层后,随机分为空白组、模型组、阿托伐他汀组、四君子汤组、血府逐瘀汤组、补阳还五汤组等 6 组。用 LPS 刺激血管内皮细胞 2 h 后,各组分别用以下方法干预:正常组为含 10% 正常血清的 DMEM;模型组为含 10% 正常血清的 DMEM + LPS(1

mg·L⁻¹);阳性药组为含 10% 正常血清的 DMEM + LPS(1 mg·L⁻¹) + 阿托伐他汀(10 μmol·L⁻¹);四君子汤组为含 10% 四君子汤药物血清的 DMEM + LPS(1 mg·L⁻¹);血府逐瘀汤组为含 10% 血府逐瘀汤药物血清的 DMEM + LPS(1 mg·L⁻¹);补阳还五汤组为含 10% 补阳还五汤药物血清的 DMEM + LPS(1 mg·L⁻¹)。培养 24 h 后收集细胞。

2.3 蛋白质印迹分析(Western blot)检测 收集细胞后加入 1 × SDS 上样缓冲液裂解细胞,蛋白浓度由 BCA 法检测。以 60 μg 蛋白/每泳道上样,经电泳后电转膜至硝酸纤维膜,分别加入兔抗人 TLR4 和 NF-κB 一抗(1:200),4 °C 封闭过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入羊抗兔二抗(1:1 000),置室温 2 h 显色,比较目的条带吸光度 A。

2.4 荧光定量 PCR 提取总 RNA,逆转录,用荧光定量 PCR 方法测定 mRNA 表达。扩增条件:94 °C 变性 5 min(94 °C,30 s,60 °C,30 s,72 °C,30 s) × 55 个循环,72 °C 延伸 5 min。以 GAPDH 作为内参。用 Primer5.0 软件设计引物,由大连宝生物工程有限公司合成。TLR4 上游引物为 5'-TGCCCCATCTTCAA TTGTCT-3',下游引物为 5'-GGACTCTGATCCCA GCCAT-3',扩增产物长度为 99 bp;MyD88 上游引物为 5'-TCCTGCTGCTGCTTCAAGAT-3',下游引物为

5'-GACTGCTCGAGCTGCTTACC-3',扩增产物长度为 106 bp;肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF-6) 上游引物为 5'-GCTGGATCCACAGC TGTTTT-3',下游引物为 5'-GTCCTCTACCAGCGCCTTG-3',扩增产物长度为 150 bp;NF-κB 上游引物为 5'-TTGCT GGTCCCACATAGTTG-3',下游引物为 5'-ATGT ATGTGAAGGCCCATCC-3',扩增产物长度为 105 bp;GAPDH 上游引物为 5'-CGCTCTCTGCTCC TCCTG TT-3',下游引物为 5'-CCATGGTGTCTGAGCG ATGT-3',扩增产物长度为 81 bp。C_t 值由计算机自动计算得出,用 2^{-ΔΔC_t} 方法进行计算。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计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,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 TLR4, MyD88, TRAF-6 及 NF-κB mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组 TLR4, MyD88, TRAF-6 及 NF-κB mRNA 表达明显升高(P < 0.01);与模型组比较,补阳还五汤组和血府逐瘀汤组显著抑制 TLR4, MyD88, TRAF-6 及 NF-κB mRNA 表达(P < 0.05),而四君子汤组各项指标的表达无明显变化。见表 1。

表 1 3 种中药复方含药血清对血管内皮细胞的 TLR4, MyD88, TRAF-6 and NF-κB mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effects of three kinds of Chinese herbal compound containing serum on expression of TLR4, MyD88, TRAF-6 and NF-κB mRNA in VEC ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	含药血清	TLR4	MyD88	TRAF-6	NF-κB
空白	-	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.11	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.11
模型	-	6.66 ± 0.30 ¹⁾	5.15 ± 0.96 ¹⁾	5.81 ± 0.43 ¹⁾	3.85 ± 0.49 ¹⁾
阿托伐他汀	10 μmol·L ⁻¹	2.61 ± 0.34 ²⁾	2.00 ± 0.66 ²⁾	2.93 ± 0.30 ²⁾	1.75 ± 0.47 ²⁾
四君子汤	10%	6.17 ± 0.49	5.06 ± 0.90	5.24 ± 0.42	3.62 ± 0.62
血府逐瘀汤	10%	5.06 ± 0.46 ²⁾	3.93 ± 0.86 ²⁾	4.13 ± 0.74 ²⁾	3.13 ± 0.32 ²⁾
补阳还五汤	10%	4.41 ± 0.75 ²⁾	3.54 ± 0.82 ²⁾	3.62 ± 0.47 ²⁾	2.64 ± 0.70 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P < 0.01;与模型组比较²⁾P < 0.05 (表 2 同)。

3.2 对 TLR4 及 NF-κB 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组 TLR4 及 NF-κB 蛋白表达明显升高(P < 0.01);与模型组比较,补阳还五汤组和血府逐瘀汤组显著抑制 TLR4 及 NF-κB 蛋白表达(P < 0.05),而四君子汤组各项指标的蛋白表达无明显变化。见表 2,图 1。

4 讨论

研究显示,动脉粥样硬化的各个阶段均伴有血管内皮细胞功能障碍。致动脉粥样硬化的各种危险因素均可导致血管内皮细胞的功能障碍,而血管内皮细胞损伤是动脉粥样硬化的始动因素,它可引起

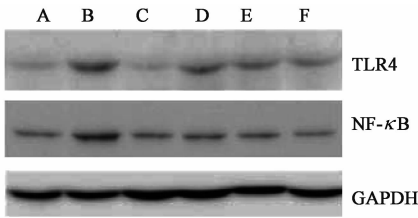
脂质沉积和单核细胞、血小板在损伤部位的黏附。这些细胞与内皮一起释放生长因子引起平滑肌细胞的移行和增殖,从而导致动脉粥样硬化。因此,目前大多数对动脉粥样硬化发病机制的研究都建立在血管内皮细胞基础上。

研究表明,脂多糖可引起血管内皮细胞 TLR4 信号转导通路主要元件的表达升高。研究表明 TLR4 参与了动脉粥样硬化的发生和发展^[4-5]。TLR4 下游 MyD88 依赖性信号转导通路包括 MyD88, TRAF-6 及 NF-κB 等因子^[6]。NF-κB 是一个多向性核转录调节因子,可调节与炎症、免疫及生

表 2 3 种中药复方含药血清对血管内皮细胞 TLR4 及 NF-κB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effects of three kinds of Chinese herbal compound containing serum on expression of TLR4, NF-κB protein in VEC ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	含药血清	TLR4	NF-κB
空白	-	0.29 ± 0.03	0.35 ± 0.02
模型	-	0.93 ± 0.06 ¹⁾	0.90 ± 0.04 ¹⁾
阿托伐他汀	10 μmol·L ⁻¹	0.38 ± 0.05 ²⁾	0.45 ± 0.05 ²⁾
四君子汤	10%	0.89 ± 0.05	0.87 ± 0.04
血府逐瘀汤	10%	0.65 ± 0.04 ²⁾	0.60 ± 0.08 ²⁾
补阳还五汤	10%	0.56 ± 0.07 ²⁾	0.57 ± 0.06 ²⁾



A. 空白组; B. 模型组; C. 阿托伐他汀组; D. 四君子汤组; E. 血府逐瘀汤组; F. 补阳还五汤组

图 1 3 种中药复方含药血清对血管内皮细胞 TLR4 及 NF-κB 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effects of three kinds of Chinese herbal compound containing serum on expression of TLR4, NF-κB protein in VEC

长调控有关的蛋白基因的表达。活化后的 NF-κB 可引起下游各种促炎细胞因子的转录和表达, 诱发各种炎症反应, 最终形成动脉粥样硬化^[7-8]。因此抑制 TLR4/NF-κB 信号通路对抑制下游各种炎症基因的激活以及对动脉粥样硬化的防治有重要作用。

补阳还五汤和血府逐瘀汤广泛应用于临床各科疾病的治疗, 尤其在治疗心脑血管系统疾病中疗效显著。研究表明, 补阳还五汤和血府逐瘀汤均有良好的抗动脉粥样硬化的作用^[9]。因此, 本实验选用益气活血法代表方剂补阳还五汤、活血法代表方剂血府逐瘀汤、益气法代表方剂四君子汤等 3 种不同中医治法的方剂, 研究不同治法的方剂对 TLR4 及下游信号转导通路主要元件的影响, 比较 3 种不同治法对 AS 的疗效, 从方剂治法的角度研究动脉粥样硬化的基本病机。

结果表明, 用 LPS 刺激血管内皮细胞后 TLR4 表达明显升高, 并激活下游 MyD88 依赖性信号转导通路, 因此 MyD88, TRAF-6, NF-κB 表达也显著升高。用中药含药血清干预 24 h 后, 补阳还五汤组及血府逐瘀汤组 TLR4, MyD88, TRAF-6 及 NF-κB 的表达明显下降。说明补阳还五汤和血府逐瘀汤对

TLR4 及下游 MyD88 依赖性信号转导通路有明显的抑制作用。补阳还五汤和血府逐瘀汤可能通过抑制 TLR4 及下游 MyD88 依赖性信号转导通路, 抑制 NF-κB 的激活, 最终抑制下游各种促炎细胞因子 (如 ICAM-1, VCAM-1 等) 的表达, 这可能是两种方剂抗动脉粥样硬化机制。而四君子汤组各项指标的表达无明显变化, 说明单纯以益气为主的四君子汤对动脉粥样硬化无明显疗效。

比较补阳还五汤和血府逐瘀汤, 补阳还五汤重用黄芪, 具有益气作用, 而血府逐瘀汤应用柴胡、桔梗、枳壳, 具有行气作用。实验结果表明, 具有益气作用的补阳还五汤组疗效比具有理气作用的血府逐瘀汤组明显, 说明动脉粥样硬化治疗当中, 益气药物起着重要的作用。由此笔者推断动脉粥样硬化可能是由气虚血瘀引起, 在治疗动脉粥样硬化时, 不仅要活血化瘀, 还要应用益气药物治疗。本课题组将进一步研究补阳还五汤等 3 种方剂对 LOX-1, TNF-α, VCAM-1 及 ICAM-1 等炎症因子的影响, 解释补阳还五汤防治动脉粥样硬化的机制。

[参考文献]

[1] 白会强, 孙学刚, 范钦, 等. 补阳还五汤对稳定性心绞痛患者 hs-CRP, IL-6 和 IL-18 的影响及其相关性研究 [J]. 中药药理与临床, 2009, 25(2): 110-112.

[2] 刘玉晖, 邱顺辉, 游宇, 等. 补阳还五汤抗 Hcy 致动脉硬化作用与调控核因子 κB 活性相关性的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(2): 104-108.

[3] 姜华, 姜玉姬. 益气活血复方对 Toll 样受体 4 信号转导通路及下游炎症因子的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(2): 219-223.

[4] Li H, Sun B. Toll-like receptor 4 in atherosclerosis [J]. J Cell Mol Med, 2007, 11(1): 88-95.

[5] Kiechl S, Wiedermann C J, Willeit J. Toll-like receptor 4 and atherogenesis [J]. Ann Med, 2003, 35(3): 164-171.

[6] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling [J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(7): 499-511.

[7] Zeuke S, Ulmer A J, Kusumoto S, et al. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS [J]. Cardiovasc Res, 2002, 56(1): 126-134.

[8] 王虹艳, 曲鹏, 吕申, 等. Toll 样受体 4/核因子 κB 和氧化低密度脂蛋白受体 LOX-1 对单核内皮细胞粘附的影响 [J]. 中华心血管杂志, 2005, 33(9): 827-831.

[9] 董超, 黄威, 杨阳, 等. 血府逐瘀汤抗大鼠动脉粥样硬化作用及其机制 [J]. 医药导报, 2013, 32(5): 579-582.

[责任编辑 周冰冰]