

汉黄芩素对流感病毒感染肺泡巨噬细胞 NF- κ B 核转位及表达的影响及机制

吴莹, 金叶智, 张舒, 闫玥捷, 张津, 郝钰*
(北京中医药大学医学病原系, 北京 100029)

[摘要] 目的:探讨汉黄芩素对流感病毒感染大鼠肺泡巨噬细胞(NR8383)中核转录因子- κ B(NF- κ B)核转位、表达的影响及与 Toll 样受体 7(TLR7)介导的髓样分化因子 88(MyD88)依赖性信号通路的关系。方法:流感病毒感染 NR8383 细胞 1 h 后,加入含汉黄芩素的培养基(终质量浓度 $0.016 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),药物作用后 6, 12, 24 h, RT-PCR 检测 TLR7, MyD88, NF- κ B p65 mRNA 水平;4, 6, 24 h 时,免疫组化法检测 NF- κ B p65 核转位情况,并做半定量分析;24 h 时,Western blot 检测 NF- κ B p65 表达水平。结果:汉黄芩素降低了流感病毒感染 NR8383 细胞后 TLR7, MyD88, NF- κ B p65 mRNA 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$),抑制了流感病毒感染后 NF- κ B p65 的核转位及表达($P < 0.01$)。结论:汉黄芩素通过抑制 TLR7 介导的 MyD88 依赖性信号通路,抑制了 NF- κ B p65 的核转位及表达,从而减轻流感感染中的炎症反应。

[关键词] 汉黄芩素; 流感病毒; Toll 样受体 7; 髓样分化因子 88; 核转录因子- κ B p65

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0161-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1205.021.html>

[网络出版时间] 2012-7-11 12:05

Effect and Mechanism of Wogonin on NF- κ B Nuclear Translocation and Expression in NR8383 Cells Infected by Influenza Virus

WU Ying, JIN Ye-zhi, ZHANG Shu, YAN Yue-jie, ZHANG Jin, HAO Yu*

(Department of Microbiology and Immunology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of wogonin on the nuclear translocation and expression of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in NR8383 cells infected by influenza virus and the relationship with Toll like receptor 7 (TLR7) mediated myeloid differentiation factor 88 (MyD88) -dependent signaling pathway. **Method:** After 1 h adsorption of influenza virus, the medium containing $0.016 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ wogonin was added to NR8383 cells in wells. At 24 h after drug application, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA level of MyD88, NF- κ B p65 and TLR7. At 4, 6, 24 h after drug application, immunocytochemistry was used to detect nuclear translocation of NF- κ B p65 in the cells and perform semi-quantity analysis. At 24 h after wogonin application, Western blot was used to detect the expression of NF- κ B p65 protein. **Result:** Wogonin reduced the mRNA level of TLR7, MyD88, and NF- κ B p65 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$) and inhibited the nuclear translocation and expression of NF- κ B p65 ($P < 0.01$). **Conclusion:** Wogonin inhibited the nuclear translocation and expression of NF- κ B by repressing TLR7 mediated MyD88-dependent signaling pathway, and alleviated the inflammatory reaction in influenza virus infection.

[Key words] wogonin; influenza virus; TLR7; MyD88; NF- κ B p65

[收稿日期] 20111129(006)

[基金项目] 国家自然科学基金(30772871);北京中医药大学创新团队“经方现代应用关键科学问题的基础研究”项目(2011-CXD-04)

[第一作者] 吴莹,博士,副教授,从事流感、乙肝的发病机制及防治方面的研究, Tel:15210572068, E-mail: aqiwuying@hotmail.com

[通讯作者] * 郝钰,教授,博士生导师,从事中医药治疗病毒性疾病、中医药抗肿瘤研究, E-mail: yuhao64@sina.com

汉黄芩素(wogonin)为唇形科植物黄芩的主要活性成分之一,具有广泛的药理活性,如抗氧化、抗炎、抗肿瘤、心血管保护和神经保护作用^[1-4]。我们的前期研究以流感病毒感染的肺泡巨噬细胞(NR8383)为模型,观察到汉黄芩素能明显抑制病毒感染 NR8383 细胞后炎性细胞因子、炎性介质及氧自由基的产生,具有较强的抗炎活性,提示汉黄芩素可通过减轻流感病毒感染后的过度免疫反应而减轻肺组织损伤,起到缓解流感病毒性肺炎炎性反应的作用^[5]。

然而,对于汉黄芩素抑制流感病毒感染后炎性因子释放的作用机制仍需进一步研究。核转录因子- κ B(NF- κ B)是调控炎性细胞因子、自由基、炎性介质等基因转录的关键转录因子,是参与机体免疫炎症反应的快速反应因子^[6]。因此,本研究通过观察汉黄芩素对流感病毒感染 NR8383 细胞中 NF- κ B 核转位及表达的影响,以及与 Toll 样受体 7(TLR7)介导的髓样分化因子-88(MyD88)依赖性信号通路的关系,进一步探讨了汉黄芩素抑制流感病毒感染后炎性物质产生的分子机制。

1 材料

1.1 病毒与细胞株 流感病毒甲型鼠肺适应株 A/FM/1/34(H1N1),由中国预防医学科学院病毒学研究所提供,常规鸡胚复苏传代,血凝滴度为 1:512,采用 Reed Muench 法^[7]测定计算病毒的 TCID₅₀ 为 $10^{-4.6/0.1L}$ 。大鼠肺泡巨噬细胞系(NR8383)购于中国科学院细胞库,由本室传代后使用。

1.2 药物与试剂 汉黄芩素(批号 111514-200403,中国药品生物制品检定所产品),F12K 干粉(Sigma 公司);胎牛血清(Hyclone 公司产品),反转录试剂(Fermentas MBI 公司),DEPC 水(Sigma 公司),聚合酶链反应(PCR)试剂盒(Takara 公司),PBS(中国中杉金桥生物技术公司),4%多聚甲醛(Solar bio 公司),Triton X-100(Amresco 公司),NF- κ B p65 一抗(Santa cruz 公司),免疫组化检测试剂盒[基因科技(上海)有限公司],胞核胞浆蛋白提取试剂盒,硝酸纤维素膜,BCA 蛋白定量试剂盒,发光液 A,B(均购自北京普利莱基因技术有限公司)。

1.3 引物设计 RT-PCR 引物由奥科生物有限公司合成。MyD88 扩增产物长度为 153 bp,上游:5'-CGACGCCTTCATCTGCTACT-3',下游:5'-ATGAGCTCGCTGGCGATGGA-3',NF- κ B 扩增产物长度为 196 bp,上游:5'-ACCTGCAGTTCGATGCTGAT-3',下游:5'-CCTGTCACCAGCCGAGTTAT-3',TLR7 扩增产

物长度为 200 bp,上游:5'-TCTCCAGA CTCCTTCCATAG-3',下游:5'-GGAAGATCCTGTGGTATCTC-3',GAPDH 扩增产物长度为 746 bp,上游:5'-GGTGATGCTGGTGCTGAGTA-3',下游:5'-TACTCCTTGGAGGCCATGTA-3'。

2 方法

2.1 药物细胞毒性实验 MTT 法检测药物对 NR8383 细胞的毒性,汉黄芩素对 NR8383 细胞的最大无毒浓度为 $0.016 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[5]。

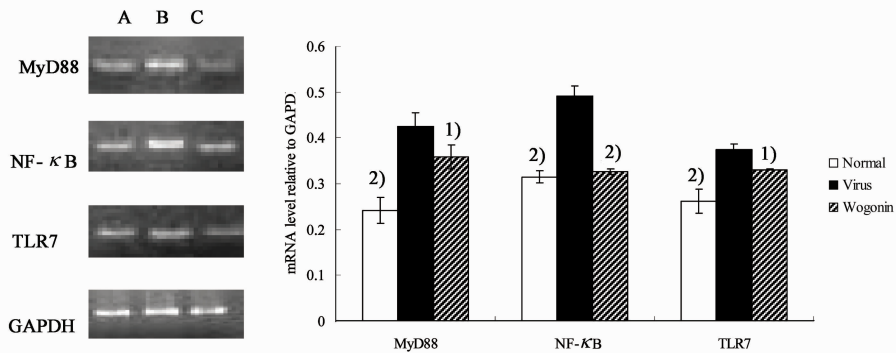
2.2 RT-PCR 检测 TLR7, MyD88 和 NF- κ B mRNA 水平 以 100 TCID₅₀ 的流感病毒吸附 NR8383 细胞 1 h 后,离心, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min, 弃上清,加入汉黄芩素药液, $500 \mu\text{L}/\text{孔}$, 药物终质量浓度 $0.016 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;同时设正常细胞对照和病毒对照。药物作用后 24 h,收集细胞,提取细胞总 RNA。以 $2 \mu\text{g}$ 总 RNA 为模板, Oligo(dT) Primer 为引物,加入 $5 \times$ reaction Buffer, dNTP mix, oligo Primer, RNA 酶抑制剂,逆转录酶及 DEPC 水,使总反应体系为 $20 \mu\text{L}$ 。逆转录条件为: $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 min, $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。在 $25 \mu\text{L}$ 反应体系中加入 cDNA $0.5 \mu\text{L}$ 及 DEPC 水 $11 \mu\text{L}$, 上下游引物各 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mix $12.5 \mu\text{L}$, 进行 PCR 扩增,扩增条件为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 min, 1 个循环; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 50 s, 共 30 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 7 min 末延伸。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,用 Quantity One 凝胶分析软件进行电泳条带分析。目的基因扩增产物的灰度值与 GAPDH 扩增产物的灰度值的比值表示检测标本的 mRNA 相对含量。

2.3 免疫组化法检测 NF- κ B p65 核转位 药物作用后 4, 6, 24 h, 收集细胞, 洗涤后, 加入 $20 \mu\text{L}$ 4% 多聚甲醛混匀。将 $10 \mu\text{L}$ 细胞悬液滴于载玻片, 使细胞铺展于载玻片上, 干燥, PBS 洗涤 3 次。加 $50 \mu\text{L}$ 0.01% Triton X-100/PBS, 室温 3 min, PBS 洗涤 3 次; $50 \mu\text{L}$ 1% 胎牛血清/PBS, 室温 15 min; 加 $50 \mu\text{L}$ 一抗(1:50), 室温 30 min, PBS 洗涤 3 次; 加 $50 \mu\text{L}$ 二抗, 室温 30 min, PBS 洗涤 3 次; 加 $50 \mu\text{L}$ DAB 显色液, 室温 10 min 后 PBS 冲洗终止显色, 干燥, 封片。用 Image-Pro Plus 图像分析软件进行免疫组化图片分析, 每组随机选择 3 张图片, 检测细胞积分吸光度(integrated absorbance, IA), 计算每组平均 IA。

$$IA = A / \text{总细胞数}$$

2.4 Western-blot 检测 NF- κ B p65 的表达水平 药物作用后 24 h, 收集细胞, 分别提取样品胞核蛋白和胞浆蛋白。制备好的蛋白上清用 BCA 蛋白定量方

法定量,每孔上样量为 40 μg。不连续 SDS-Page 10% 浓度电泳,浓缩胶 60 V,分离胶 80 V 恒压电泳。湿法转移,250 mA 恒流转膜 3 h。5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h 后孵育一抗(浓度为 1:1 000),4 ℃ 轻摇孵育过夜。洗膜后加二抗(浓度为 1:4 000),室温轻摇 1 h。TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。HRP-ECL 发光液 A,B 按等比例混合,加于膜上孵育 1 min 后将膜固定于暗盒中,盖上胶片曝光。将胶片进行拍照,用 Quantity One 凝胶分析软件分析 Western blot 电泳图像,用目标带的灰度值与β-actin 灰度值的比值表示检测标本的蛋白相对水平。



A. 汉黄芩素 0.016 g·L⁻¹组;B. 病毒组;C. 正常组;与病毒组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01(图 3 同)

图 1 汉黄芩素对流感病毒感染 NR8383 细胞中 MyD88, NF-κB 和 TLR7 mRNA 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 汉黄芩素对流感病毒感染 NR8383 细胞后 NF-κB 核转位的影响 与正常组相比,病毒组 4,6 h 时,胞浆及核内染色均多,表达增强(P < 0.01),提示核转位;与病毒组比较,汉黄芩素作用 4,6 h 时,胞浆及核内染色变淡,表达减少(P < 0.01)。与正

2.5 统计学处理 实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用方差分析,方差齐性检验后进行组间 t 检验比较,P < 0.05 为有显著性差异。

3 结果

3.1 汉黄芩素对流感病毒感染 NR8383 细胞 MyD88, NF-κB, TLR7 mRNA 水平的影响 流感病毒感染后巨噬细胞 MyD88, NF-κB 和 TLR7 mRNA 水平均显著高于正常组(P < 0.01);与病毒组相比,汉黄芩素组 MyD88, NF-κB 和 TLR7 mRNA 表达水平明显下降(P < 0.05, P < 0.01, P < 0.05)(图 1)。

常组相比,病毒组 24 h 时,细胞内 NF-κB 表达增强(P < 0.01),而胞浆较核内染色深,提示核转位消失;用药 24 h 时,胞浆及核内染色淡,细胞内 NF-κB 表达降低(P < 0.01)。见表 1,图 2。

表 1 汉黄芩素对流感病毒感染 NR8383 细胞后 NF-κB 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	4 h	6 h	24 h
正常	-	1 064.8 ± 32.9 ¹⁾	1 157.4 ± 120.2 ¹⁾	1 185.8 ± 103.2 ¹⁾
病毒	-	1 733.2 ± 142.9	1 397.6 ± 101.8	2 157.5 ± 74.2
汉黄芩素	0.016	1 268.3 ± 109.3 ¹⁾	1 096.2 ± 98.5 ¹⁾	1 169.0 ± 87.3 ¹⁾

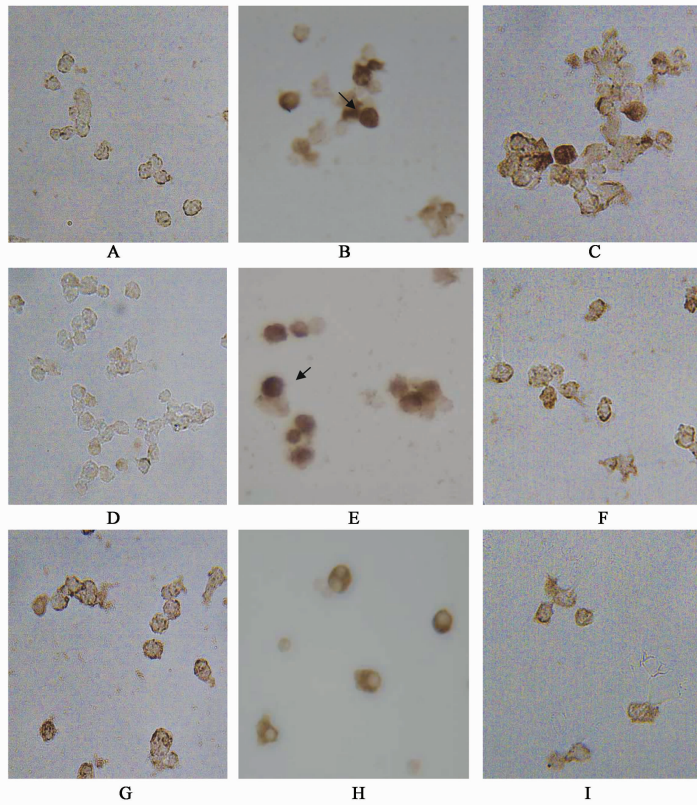
注:同一时间点与病毒组比较¹⁾P < 0.01。

3.3 汉黄芩素对流感病毒感染 NR8383 细胞后 NF-κB 表达的影响 Western blot 的结果与免疫组化一致,24 h 时,病毒组细胞核中未检测出 NF-κB,胞浆蛋白结果为:病毒组 NF-κB 蛋白表达高于正常组,与病毒组比较,汉黄芩素组 NF-κB 蛋白表达下降(图 3)。

4 讨论

流感病毒感染后,启动肺部炎症反应的关键细胞是肺泡巨噬细胞。已证实被激活的肺泡巨噬细胞

通过释放 TNF-α, IL-1, IL-8 等前炎症细胞因子,激活中性白细胞和内皮细胞等,进一步加强炎症介质的释放,并产生氧自由基、氮氧化物、花生四烯酸代谢产物等,形成瀑布效应,引起自身细胞的广泛破坏,因此,肺泡巨噬细胞是流感病毒性肺炎过程中导致肺部病理损伤,加重病情的关键细胞。体外实验中,肺泡巨噬细胞感染流感病毒后,不出现细胞病变效应(CPE),而产生大量炎性细胞因子、自由基及炎性介质,导致免疫炎症反应^[5]。本文的前期实验检



A. 正常组 4 h; B. 病毒组 4 h; C. 汉黄芩素 0.016 g·L⁻¹ 组 4 h;
D. 正常组 6 h; E. 病毒组 6 h; F. 汉黄芩素 0.016 g·L⁻¹ 组 6 h;
G. 正常组 24 h; H. 病毒组 24 h; I. 汉黄芩素 0.016 g·L⁻¹ 组 24 h; 箭头指示 NF-κB 核转位
图 2 汉黄芩素对流感病毒感染 NR8383 细胞后 NF-κB 核转位的影响 (DAB, ×40)

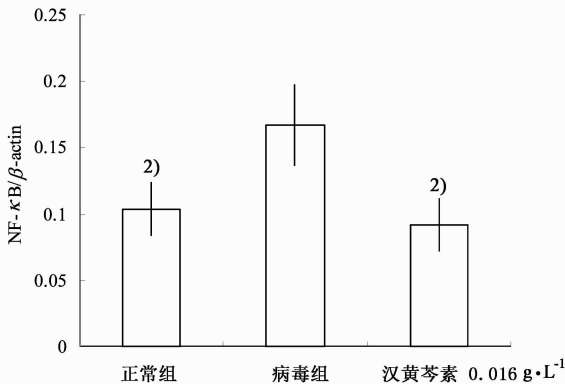
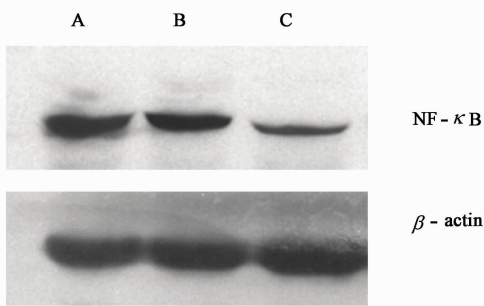


图 3 Western blot 检测 NR8383 细胞中 NF-κB 表达 (n=3, 24 h)

测到流感病毒感染肺泡巨噬细胞后,细胞上清中 MCP-1, TNF-α, PGE2, PLA2, LTB4, NO, iNOS 的含量与未感染组相比明显增加^[5];同时,本文的实验结果表明,流感病毒感染后巨噬细胞表达 MyD88, NF-κB 和 TLR7 mRNA 水平均显著高于正常组 (P < 0.01), NF-κB 发生核转位并表达增强,提示流感病毒活化 TLR7 依赖的信号转导通路,导致 NF-κB 信号转导途径的活化。

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 家族属 I 型跨膜糖蛋白,是免疫细胞识别入侵病原体及其产物的主要先天免疫受体分子^[8-9]。流感病毒为包膜的 RNA 病毒,由 7 个或 8 个片段的单链 RNA 构成^[10]。研究表明,流感病毒的 ssRNA 被 TLR7 和 TLR8 识别,大鼠流感病毒的 ssRNA 被 TLR7 识别, TLR7 以 MyD88 依赖的信号通路 (MyD88-dependent pathway) 活化免疫细胞^[11]。MyD88 依赖的信号转导途径以接头分子 MyD88, IL-1 受体相关激酶 1 (IL-1 receptor associated kinase 4, IRAK1) 和 IRAK4 复合物的形成为开始,以核因子 NF-κB 和丝裂原活化的蛋白激酶 (MAPK) 的早期相活化为特征。

IRAK1 活化后,进入胞浆与 TRAF6 结合,泛素化后,进一步活化 TAK-1。TAK-1 活化后形成 IKK α , β 和 γ 复合体,此复合体磷酸化后形成 NF- κ B 的抑制物 I κ B。I κ B 经过磷酸化,泛素化后降解,解除对 NF- κ B 的抑制作用,游离的 NF- κ B 转位入核,与 DNA 结合参与许多基因的转录调控^[12]。NF- κ B 是一类多功能核转录因子,可激活在免疫和炎症反应中起重要作用的多种细胞因子、黏附分子等物质,在感染,炎症反应、氧化应激、细胞凋亡等病理过程中发挥重要作用^[13-14]。

我们的前期研究观察到汉黄芩素可明显抑制流感病毒感染肺泡巨噬细胞后炎性相关因子的产生,因此,本研究进一步观察了汉黄芩素对流感病毒感染肺泡巨噬细胞中 TLR7 介导的 MyD88 依赖性信号通路,NF- κ B 核转位及表达的影响,以明确汉黄芩素抗炎作用的分子机制。研究表明,流感病毒感染后巨噬细胞表达 MyD88,NF- κ B 和 TLR7 mRNA 水平均显著高于正常组($P < 0.01$),提示流感病毒活化 TLR7 依赖的信号转导通路,导致 NF- κ B 的活化。汉黄芩素使用后,TLR7,MyD88,NF- κ B mRNA 水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$),提示汉黄芩素可抑制 TLR7 介导的 MyD88 依赖的信号转导途径中关键分子的转录,从而抑制病毒通过 TLR7 信号通路过度活化巨噬细胞的免疫反应。

本研究观察了汉黄芩素对流感病毒感染肺泡巨噬细胞中 NF- κ B 核转位及表达的影响。4,6 h 时,病毒组细胞核中 NF- κ B 表达明显增多,发生核转位,与病毒组相比,汉黄芩素组细胞胞浆及核内的 NF- κ B 明显减少,提示汉黄芩素能抑制 NF- κ B 核转位,从而抑制 NF- κ B 启动炎性相关因子基因的转录。在 24 h 时,病毒组 NF- κ B 主要表达于胞浆,核内少,免疫组化与 Western-blot 实验结果相一致。汉黄芩素作用后,胞浆 NF- κ B 表达降低($P < 0.01$),提示汉黄芩素不但抑制核转位,还降低 NF- κ B 蛋白的产生,从而降低炎症物质的产生,减轻病毒性肺炎中的炎性损伤。

[参考文献]

- [1] 邓远雄,俞森,陈天焱,等. 黄芩提取物中有效成分黄芩苷和汉黄芩苷在糖尿病大鼠中的药理学研究[J]. 中国新药杂志,2007,16(19):1573.
- [2] 徐丹洋,陈佩东,张丽,等. 黄芩的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):78.
- [3] 杨莉,尤启冬,杨勇,等. 汉黄芩素抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国药科大学学报,2009,40(6):576.
- [4] 任晓东,符伟,张晓芸,等. 天然产物汉黄芩素的研究进展[J]. 中国新药杂志,2011,20(9):777.
- [5] 吴莹,金叶智,吴珺,等. 汉黄芩素对流感病毒感染肺泡巨噬细胞炎症相关因子的影响[J]. 中国病理生理杂志,2011,27(3):533.
- [6] 薛凤麟,张旋,王殿华. 核因子- κ B 与肺疾病研究进展[J]. 现代生物医学进展,2009,9(3):552.
- [7] 郭元吉,程小雯. 流行性感病毒及其实验技术[M]. 北京:中国三峡出版社,1997:111.
- [8] 付金玲,李其林. Toll 样受体与病毒感染的研究现状[J]. 中国皮肤性病学杂志,2009,23(1):57.
- [9] 赵保胜,霍海如,姜廷良. 钟声蛋白样受体的研究及现状[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(8):62.
- [10] 董志珍,姚登福. 流感病毒致病机制的研究进展[J]. 现代医药卫生,2003,19(4):406.
- [11] Sampsa M, Jukka S. Tumor necrosis factor alpha enhances influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines by activating RIG-I gene expression[J]. J Virol, 2006, 180(7):3515.
- [12] 闫小毅. TLR7 介导抗病毒免疫应答研究进展[J]. 国外医学:免疫学分册,2005,28(5):292.
- [13] Emery J G, Ohlstein E H, Ja Y M. Therapeutic modulation of transcription factor activity[J]. Trends Pharmacol Sci, 2001,22(5):233.
- [14] 马武开,姚血明,王莹,等. 解毒化瘀药含药血清对白血病 HL60/ADR 耐药细胞 NF- κ B 信号靶干预研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):154.

[责任编辑 聂淑琴]