

# 补阳还五汤含药血清对 Toll 样受体 4 信号转导通路及氧化低密度脂蛋白受体-1 表达的影响

李卿姬\*, 姜华, 姜玉姬

(延边大学附属医院, 吉林 延吉 133000)

**[摘要]** 目的: 从补阳还五汤含药血清对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 信号转导通路及血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1 (LOX-1) 的影响, 研究补阳还五汤防治动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的机制。方法: 含药血清的制备: 选择新西兰大白兔 20 只, 随机分为正常组、补阳还五汤高、中、低浓度组, 每组 5 只。中药组分别以 13.2, 6.6, 3.3 g·kg<sup>-1</sup> 补阳还五汤 ig, 正常组以同等量的生理盐水 ig, 连续 ig 7 d。在末次 ig 给药 2 h 后, 心脏采血, 离心后分离血清, 获得 3 种不同浓度药物血清; 体外培养人脐静脉内皮细胞, 用脂多糖(LPS)(1 mg·L<sup>-1</sup>) 刺激后, 分别加入含 10% 高、中、低浓度补阳还五汤药物血清干预, 24 h 后收集细胞, 用荧光定量 PCR 方法测定 TLR4, MyD88, TRAF-6, TRAM, TRIF, NF- $\kappa$ B 及 LOX-1 的基因表达, 用 Western blotting 法测定 TLR4, MyD88, TRAF-6, LOX-1 的蛋白表达。结果: 用 LPS 刺激人脐静脉内皮细胞后, 引起 TLR4, MyD88, TRAF-6, TRAM, TRIF, NF- $\kappa$ B 及 LOX-1 的高表达(与空白对照组比较  $P < 0.01$ ), 用补阳还五汤含药血清干预后显著抑制 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF- $\kappa$ B 及 LOX-1 的高表达(与模型组比较  $P < 0.05$ ), 而对 TRAM 和 TRIF 与模型组比较无明显抑制作用。结论: 补阳还五汤可抑制 TLR4 和 MYD88 依赖性信号转导通路及 LOX-1 的表达, 这可能是其治疗各种免疫炎症性疾病及防治动脉粥样硬化作用的机制之一。

**[关键词]** 中药含药血清; 人脐静脉内皮细胞; toll 样受体 4; MyD88; 氧化低密度脂蛋白受体-1; 动脉粥样硬化; 补阳还五汤

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0155-04

## Effect of Serum Contained Buyang Huanwu Decoction on the Expression of Toll-like Receptor 4 and Downstream Signal Transduction Pathway and LOX-1 in Human Vein Endothelial Cells

LI Qing-ji\*, JIANG Hua, JIANG Yu-ji

(The Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the influence and possible anti-atherosclerotic mechanism. of serum contained Buyang Huanwu decoction on the expression of toll-like receptor 4 (TLR4) and its downstream signal transduction pathway and LOX-1 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Method:** Twenty New Zealand rabbits were divided into 4 groups in random; the normal control group, the high dosage group, the middle dosage group, and the low dosage group of Buyang Huanwu decoction, with 5 rabbits in each group. Each group was ig given normal saline and Buyang Huanwu decoction at dosage of 13.2, 6.6, 3.3 g · kg<sup>-1</sup>, respectively everyday. In the 7<sup>th</sup> day, blood was collected from left ventricle in 2 h after administration, and then the serum was separated. HUVECs was cultured *in vitro* and stimulated with lipopolysaccharide (LPS) 1 mg · L<sup>-1</sup> for 2 h, then treated separately with the serum contained different concentrations of Buyang Huanwu decoction for 24 h, finally the expression of TLR4, MyD88, TRAF-6, TRAM, TRIF, NF- $\kappa$ B and LOX-1 mRNA was measured

**[收稿日期]** 20110425(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81160476)

**[通讯作者]** \* 李卿姬, Tel: 15526770733, E-mail: liqingjide@163.com

with real-time PCR. Western blotting method was used to analyze the expression of TLR4, MyD88, TRAF-6 and LOX-1 protein. **Result:** LPS enhanced the expression of TLR4, MyD88, TRAF-6, TRAM, TRIF, NF- $\kappa$ B and LOX-1 (vs normal control group,  $P < 0.01$ ). The serum contained Buyang Huanwu decoction decreased the high expression of TLR4, MyD88, TRAF-6, NF- $\kappa$ B and LOX-1 (vs model group,  $P < 0.05$ ), which was stimulated by LPS. **Conclusion:** The serum contained Buyang Huanwu decoction can block the high expression of TLR4 and its downstream signal transduction pathway and the high expression of LOX-1, which may be the mechanism of anti-atherosclerosis and inhibition of inflammatory reaction.

**[Key words]** drug-serum; human umbilical vein endothelial cells; toll-like receptor-4; MyD88; LOX-1; atherosclerosis; Buyang Huanwu decoction

目前动脉粥样硬化的免疫炎症学说被普遍得到认可<sup>[1]</sup>。近年来,多种中药已经被用于防治动脉粥样硬化及其相关疾病,并显示出良好的作用。补阳还五汤是收载于《医林改错》中的经典方剂,具有补气活血、通经活络的功效,广泛用于临床各科疾病。研究表明补阳还五汤具有良好的抗动脉粥样硬化的作用<sup>[2]</sup>,但该药抑制动脉粥样硬化的分子生物学机制及其与其他汀类药物疗效的比较尚不明了。因此笔者在实验中应用 LPS 刺激人脐静脉内皮细胞,诱导 Toll 样受体 4 (TLR4) 信号转导通路及下游氧化低密度脂蛋白受体-1 (LOX-1) 激活,用补阳还五汤含药血清进行干预,观察其对 TLR4 及其 MYD88 依赖性信号转导通路及下游 LOX-1 的影响,探讨补阳还五汤防治动脉粥样硬化的机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性新西兰大耳白兔 20 只,体重  $(2.5 \pm 0.5)$  kg,由辽宁中医药大学实验动物中心提供。合格证号 20080509。

**1.2 药物、试剂** 补阳还五汤由黄芪 120 g,赤芍 4.5 g,红花 3 g,桃仁 3 g,地龙 3 g,川芎 3 g 和当归 6 g 组成,药物由辽宁中医药大学药剂科提供。以上药物水煎 3 次,时间分别为 1.5, 1 h, 45 min,合并煎煮液后浓缩至高(含生药  $1.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、中(含生药  $0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、低(含生药  $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 浓度;阿托伐他汀(ATV)纯品为美国 LKT Laboratories 公司产品。DMEM 培养基、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;FBS 购自杭州四季青公司;第 VIII 因子相关抗原为北京中杉金桥公司产品;RNA-OUT 总 RNA 提取试剂盒、RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白定量测定试剂盒购于北京天来生物医学科技责任公司;脂多糖(LPS)为 Sigma 公司产品(批号 L-2880);M-MLV 逆转录酶为 Promega 公司产品(批号 16644224);兔抗人 TLR4(批号 sc10741)、MyD88(批号 sc8197)、TRAF-6(批号 sc33897)、LOX-1(批号 sc27354)单克隆抗体和二

抗为 Santa Cruz 公司产品。

**1.3 仪器** ABI 7500 PCR 扩增仪(德国 Biometra 产品),垂直板电泳装置(美国 BIO-RAD), Mini-Protein III;DYY 40B 型转印电泳槽(北京六一仪器厂产品),Chemi Imager5500 凝胶电泳成像分析系统(美国 Alphainnotech chemi Imager)。

## 2 方法

**2.1 人脐静脉内皮细胞的培养及鉴定** 在无菌条件下取产后新鲜脐带 15~20 cm,用 PBS 冲洗后,加入预热的 0.25% 胰蛋白酶,置于 37 °C 水浴中进行消化 10 min,收集消化液,  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min。弃掉上清液,加入 DMEM 培养液(含 20% 胎牛血清),置于 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养至融合状态,再用 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代。培养的人脐静脉内皮细胞符合内皮细胞特征,抗人 VIII 因子抗体染色阳性。实验时采用第 2~5 代细胞,待细胞生长融合成单层后用于实验。

**2.2 含药血清的制备** 20 只新西兰白兔随机分为 4 组:即正常组、补阳还五汤高、中、低剂量组,每组 5 只。补阳还五汤分别以高、中、低剂量 ( $13.2, 6.6, 3.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) ig, 正常组以同等量的生理盐水 ig, 连续 7 d。在末次给药 2 h 后心脏采血,离心后分离血清,合并同组含药血清,过滤后  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

**2.3 分组及干预** 以含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液培养人脐静脉内皮细胞 18 h,待细胞生长融合成单层后,分为 6 组:空白对照组、模型组、ATV 对照组、补阳还五汤高、中、低剂量组。各组分别用以下方法干预:空白对照组:仅含 10% 空白药物血清的 DMEM 培养液;模型对照组:含 10% 空白药物血清的 DMEM 培养液 + LPS ( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。ATV 对照组:含 10% 空白药物血清的 DMEM 培养液 + LPS ( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + 阿托伐他汀 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ );补阳还五汤高浓度组:含 10% 高剂量 ( $13.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 药物血清的 DMEM 培养液 + LPS ( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ );补阳还五

汤中浓度组:含 10% 中剂量 ( $6.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 药物血清的 DMEM 培养液 + LPS ( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 补阳还五汤低浓度组:含 10% 低剂量 ( $3.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 药物血清的 DMEM 培养液 + LPS ( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。给药浓度均为终浓度,培养 24 h 后收集细胞。

**2.4 荧光定量 PCR** 用 RNA-OUT 提取总 RNA,逆转录,应用荧光定量 PCR 方法测定基因表达<sup>[3]</sup>。PCR 反应条件:扩增条件:94 °C 变性 5 min (94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min) × 55 个循环, 72 °C 延伸 5 min。本实验以 GAPDH 为内参,由大连宝生物工程有限公司合成。TLR4 上游引物 5'-AGC GCT GCC TAC ACT CAC-3', 下游引物 5'-GAT TAT ACC AGC GCG AAC-3', 扩增产物长度为 187bp; MyD88 上游引物 5'-ATA GGC ACC AGC ATG CAC-3', 下游引物 5'-TAG GGT CCT TAC CAG GTA-3', 扩增产物长度为 181bp; TRAF-6 上游引物 5'-AGC CAC AAT CCC ATG-3', 下游引物 5'-GTC ACG GAA AGG CGC-3', 扩增产物长度为 224 bp; TRAM 上游引物 5'-GTG GCA GAC AGC ATT T-3', 下游引物 5'-AAC GGA GTT CAT TAG GG-3', 扩增产物长度为 127 bp; TRIF 上游引物 5'-TGT GGG TGG GAC ATT GCT-3', 下游引物 5'-CAG TCC GAA ACA CCG TCA AT-3', 扩增产物长度为 139 bp; NF- $\kappa$ B 上游引物 5'-GAT TTC GTT TCC GTT ATG T-3', 下游引物 5'-TTT GCT GGT CCC ACA TAG-3', 扩增产物长度为 121 bp; LOX-1 上游引物 5'-ATC CAT CAT CCC TCA AG-3', 下游引

物 5'-GAA AGA AGC CAG ACA AA-3', 扩增产物长度为 142 bp。GAPDH 上游引物 5'-CTC ATG ACC ACA GTC CAT GCA-3', 下游引物 5'-CAC ATT GGG GGT AGG AAC ACG-3', 扩增产物长度为 201 bp。

**2.5 蛋白质印迹分析 (Western blot) 分析** 用细胞刷收集人脐静脉内皮细胞后加入预冷的细胞裂解液,收集细胞蛋白样品,蛋白浓度由 BCA 法测定。以 60  $\mu\text{g}$  蛋白/每泳道上样,经 SDS-PAGE 电泳,然后转膜,分别加入 1:200 兔抗人 TLR4, MyD88, TRAF-6, LOX-1 一抗稀释液,4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,再加入过氧化物酶标记的羊抗兔二抗稀释液 (1:1 000),置室温 2 h 显色,使用吸光度 (A) 分析软件处理分析<sup>[3]</sup>。

**2.6 统计学处理** 数据均应用 SPSS 15.0 统计软件进行分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 LPS 处理人脐静脉内皮细胞 TLR4, MyD88, TRAF-6, TRAM, TRIF, NF- $\kappa$ B 及 LOX-1 基因表达的影响** 用 LPS ( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 刺激 24 h 后,模型组 TLR4, MyD88, TRAF-6, TRAM, TRIF, NF- $\kappa$ B 及 LOX-1 mRNA 表达明显升高 (与空白对照组比较  $P < 0.01$ ), 而用补阳还五汤药物血清干预 24 h 后, TLR4, MyD88, TRAF-6, NF- $\kappa$ B 及 LOX-1 mRNA 表达明显降低 (与模型组比较  $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 而对 TRAM 和 TRIF 无抑制作用。见表 1。

表 1 10% 补阳还五汤含药血清对 LPS  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理人脐静脉内皮细胞 24 h TLR4, MyD88, TRAF-6, TRAM, TRIF, NF- $\kappa$ B 及 LOX-1 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TLR4	MyD88	TRAF-6	TRAM	TRIF	NF- $\kappa$ B	LOX-1
正常	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型对照	-	3.08 ± 0.29 <sup>1)</sup>	3.74 ± 0.47 <sup>1)</sup>	3.83 ± 0.71 <sup>1)</sup>	2.96 ± 0.57 <sup>1)</sup>	2.97 ± 0.69 <sup>1)</sup>	3.55 ± 0.76 <sup>1)</sup>	2.93 ± 0.48 <sup>1)</sup>
阿托伐他汀 <sup>4)</sup>	10	1.70 ± 0.32 <sup>3)</sup>	2.15 ± 0.41 <sup>3)</sup>	2.22 ± 0.58 <sup>3)</sup>	2.01 ± 0.70 <sup>2)</sup>	2.14 ± 0.66 <sup>2)</sup>	1.85 ± 0.35 <sup>3)</sup>	1.59 ± 0.27 <sup>3)</sup>
补阳还五汤	13.2	2.11 ± 0.45 <sup>3)</sup>	2.37 ± 0.46 <sup>3)</sup>	2.68 ± 0.90 <sup>3)</sup>	2.41 ± 0.59	2.57 ± 0.57	2.13 ± 0.36 <sup>3)</sup>	1.58 ± 0.2 <sup>3)</sup>
	6.6	2.44 ± 0.44 <sup>2)</sup>	2.85 ± 0.66 <sup>2)</sup>	2.92 ± 0.55 <sup>2)</sup>	2.59 ± 0.55	2.61 ± 0.66	2.63 ± 0.71 <sup>3)</sup>	1.78 ± 0.18 <sup>3)</sup>
	3.3	2.54 ± 0.45 <sup>2)</sup>	3.03 ± 0.68 <sup>2)</sup>	3.40 ± 0.54 <sup>2)</sup>	2.76 ± 0.54	2.66 ± 0.60	2.65 ± 0.51 <sup>2)</sup>	2.26 ± 0.2 <sup>3)</sup>

注:与空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;<sup>4)</sup> 阿托伐他汀剂量单位为  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (表 2 同)。

**3.2 对 LPS 处理人脐静脉内皮细胞 TLR4, MyD88, TRAF-6 及 LOX-1 蛋白表达的影响** 用 LPS 刺激 24 h 后,模型组 TLR4, MyD88, TRAF-6 及 LOX-1 蛋白表达明显升高 (与空白对照组比较  $P < 0.01$ ), 而用补阳还五汤药物血清干预 24 h 后, TLR4, MyD88, TRAF-6 及 LOX-1 蛋白表达明显降低 (与模型组比较  $P < 0.01$ )。见表 2。

### 4 讨论

TLR4 在抗感染免疫、肿瘤的形成、动脉粥样硬化的形成及炎症性肠病等多种疾病中起着重要的作用。而研究表明 TLR4 可通过多种途径影响动脉粥样硬化进程<sup>[4]</sup>。TLR4 可通过其下游 MyD88 依赖性 & 非依赖性信号转导通路来激活各种炎症因子。MyD88 依赖性途径中参与细胞内信号转导过程的

表 2 10% 补阳还五汤含药血清对 LPS (1 mg·L<sup>-1</sup>) 处理人脐静脉内皮细胞 24 h TLR4, MyD88, TRAF-6 及 LOX-1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TLR4	MyD88	TRAF-6	LOX-1
正常	1	0.317 ± 0.027	0.35 ± 0.007	0.205 ± 0.006	0.262 ± 0.007
模型对照	-	0.902 ± 0.041 <sup>1)</sup>	0.833 ± 0.016 <sup>1)</sup>	0.717 ± 0.027 <sup>1)</sup>	0.841 ± 0.025 <sup>1)</sup>
阿托伐他汀对照 <sup>4)</sup>	10	0.391 ± 0.02 <sup>3)</sup>	0.532 ± 0.032 <sup>3)</sup>	0.317 ± 0.016 <sup>3)</sup>	0.52 ± 0.025 <sup>3)</sup>
补阳还五汤	13.2	0.541 ± 0.028 <sup>3)</sup>	0.545 ± 0.03 <sup>3)</sup>	0.386 ± 0.011 <sup>3)</sup>	0.571 ± 0.015 <sup>3)</sup>
	6.6	0.537 ± 0.024 <sup>3)</sup>	0.578 ± 0.031 <sup>3)</sup>	0.446 ± 0.017 <sup>3)</sup>	0.632 ± 0.003 <sup>3)</sup>
	3.3	0.667 ± 0.031 <sup>3)</sup>	0.652 ± 0.034 <sup>3)</sup>	0.544 ± 0.011 <sup>3)</sup>	0.731 ± 0.005 <sup>3)</sup>

分子有 MyD88, TRAF-6 等, 经过一系列信号转导最终激活 NF-κB, 引起促炎细胞因子基因的转录和表达, 诱发各种炎症反应。而 MyD88 非依赖性途径主要包括 TRAM 及 TRIF 等主要元件<sup>[5]</sup>。氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 作为致动脉粥样硬化的独立危险因素, 可通过其特异性受体-LOX-1 结合、摄取及降解并介导其生物学功能。研究发现 ox-LDL 经 LOX-1 介导使内皮细胞活化, 胞内活性氧簇大量产生, 并形成正反馈促进脂质氧化, 诱导核转录因子如 NF-κB 的活化, 从而引发促炎因子和黏附分子的表达升高<sup>[6]</sup>; LOX-1 本身也可作为内皮黏附分子, 促进 ox-LDL 和细胞聚集于血管壁, 进一步导致斑块的炎症反应, 增加斑块的不稳定性<sup>[7]</sup>。

补阳还五汤具有补气扶正、祛瘀活血以达到振奋心阳, 活血通络等作用, 具有良好的抗动脉粥样硬化的作用, 对改善病人血液循环状态, 增强心肌收缩力, 提高病人体质, 改善预后具有重要的意义。实验结果表明, 用 LPS 刺激内皮细胞后, TLR4 表达明显升高, 并激活下游 MyD88 依赖性信号转导通路和非依赖性信号转导通路。通过这两条信号转导通路的激活, 最终激活 NF-κB。活化后的 NF-κB 激活下游炎症因子, 从而引起动脉粥样硬化等各种炎症性疾病。用补阳还五汤干预 24 h 后, TLR4, MyD88 及 TRAF-6 的表达明显下降, 但是 TRAM 及 TRIF 表达无明显改变, 说明补阳还五汤对 TLR4 及下游 MyD88 依赖性信号转导通路有明显的抑制作用, 而对 MyD88 非依赖性信号转导通路无抑制作用。

另一方面用补阳还五汤干预 24 h 后, LOX-1 表达明显下降, 说明补阳还五汤对 LOX-1 有明显的抑制作用。通过抑制 LOX-1 的表达, 补阳还五汤可减

少单核细胞与血管内皮细胞黏附以及内皮细胞的损伤, 从而达到抗动脉粥样硬化的作用。但补阳还五汤是通过抑制 TLR4 及下游 MyD88 依赖性信号转导通路来发挥其抑制 LOX-1 的作用, 还是直接抑制 LOX-1 的表达, 尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] Hansson G K. Atherosclerosis-an immune disease: the anitschkov lecture 2007 [J]. Atherosclerosis, 2009, 202:2.

[2] 孙学刚, 赵益业, 谢小丹, 等. 补阳还五汤对动脉粥样硬化小鼠诱导型一氧化氮合酶表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(1):9.

[3] 姜华, 张艳, 王辰. 益气活血复方含药血清对人脐静脉内皮细胞 TLR4 及其下游髓样分化因子 88、肿瘤坏死因子受体相关因子-6 表达的影响[J]. 中西医结合杂志, 2010, 30(5):519.

[4] Hollestelle S C, De Vries M R, Van Keulen J K, et al. Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling [J]. Circulation, 2004, 109(3): 393.

[5] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling [J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 117(5):979.

[6] Reiss A B, Anwar K, Wirkowski P. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 ( LOX-1 ) in atherogenesis; a brief review [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(21):2641.

[7] Mehta J L, Chen J, Yu F, et al. Aspirin inhibits ox-LDL-mediated LOX-1 expression and metalloproteinase-1 in human coronary endothelial cells [J]. Cardiovasc Res, 2004, 64(2):243.

[责任编辑 聂淑琴]