

· 药理 ·

桑菊饮含药血清对小鼠巨噬细胞 Toll 样受体表达的影响

杜新亮, 隋峰, 张畅斌, 赵保胜, 刘洪斌, 闫美娟, 李兰芳,
郭淑英, 霍海如*, 姜廷良
(中国中医科学院中药研究所 唐氏中药研究中心, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究桑菊饮对小鼠肺巨噬细胞株 RAW264.7 表达 Toll 样受体(TLR)的影响。方法: 用桑菊饮含药血清作用于正常 RAW264.7 细胞, 24 h 后以荧光定量 PCR 方法测定 TLR-1 ~ TLR-9 mRNA 的表达, 探讨桑菊饮对 Toll 样受体表达的影响。结果: 桑菊饮含药血清在一定剂量($7.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$)时, 可以促进 TLR-4 和 TLR-7 的表达, 而对 TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-5, TLR-6, TLR-8 和 TLR-9 的表达没有明显影响。结论: 桑菊饮的药效学作用可能与促进 Toll 样受体某些亚型表达有关。

[关键词] 桑菊饮; 含药血清; 肺巨噬细胞; Toll 样受体 7; Toll 样受体 4

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0057-05

Effect of the Drug Serum Containing Sangjuyin on the Expression of Toll-like Receptors in RAW 264.7 Cells

DU Xin-liang, SUI Feng, ZHANG Chang-bin, ZHAO Bao-sheng, LIU Hong-bin,
YAN Mei-juan, LI Lan-fang, GUO Shu-ying, HUO Hai-ru*, JIANG Ting-liang
(Tang Center for Herbal Medicine Research, Institute of Chinese Materia Medica,
China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of Sangjuyin drug serum on the expression of TLRs on RAW264.7. **Methods:** RAW264.7 cell line was stimulated with the drug serum containing Sangjuyin. Expressions of TLRs mRNA were detected with real-time PCR after 24 hours. **Results:** The serum contained Sangjuyin could upregulated the expression of TLR-3 mRNA and TLR-7 mRNA in RAW264.7 cells. **Conclusion:** Promoting the expression of Toll-like receptors mRNA may be the elementary basis of Sangjuyin to play the effect.

[Key words] Sangjuyin; drug serum; pulmonary macrophage; TLR-7; TLR-4

桑菊饮为吴鞠通所创,首载于清《温病条辨·卷一·上焦篇》,功效疏风清热、宣肺止咳,临床上用于治疗风温初起所致的咳嗽,身热不甚,口微渴,脉浮数等表热轻证。现代药理研究表明其主要具有抗

炎^[1],抗菌^[2],解热^[3],发汗^[4],抑制肠蠕动亢进^[5]和增强免疫^[6]等作用。

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是一类与果蝇 Toll 蛋白相类似的跨膜蛋白,含有跨膜区和富含亮氨酸重复序列的胞外区,其胞浆区结构与人 IL-1 受体的胞浆区结构很相似,在机体识别脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、肽聚糖、脂磷壁酸等多种病原体成分的反应中发挥着重要的作用。Toll 样受体是具有多个成员的家族,目前在小鼠已发现 13

[收稿日期] 2009-04-16

[基金项目] 国家自然科学基金重大研究计划资助(90709016)

[通讯作者] *霍海如, Tel: (010)64041008; E-mail: hairuhuo@gmail.com

种,分别命名为 TLR-1 ~ TLR-13,在人类也已成功克隆了 11 种。作为目前发现的能启动天然免疫、调节获得性免疫识别病原相关的分子模式的主要受体,TLRs 在机体防御感染反应中的地位至关重要^[7],中药对 TLRs 及其相关信号元件的作用和影响,理所当然地受到人们的重视。本实验用桑菊饮含药血清作用于正常巨噬细胞株,观察其对 TLR-1 ~ TLR-9 mRNA 表达的影响,以期进一步了解其发挥抗炎、解热、抗菌等作用的免疫学基础。

1 实验材料

1.1 药物与试剂 所用中药饮片均购自北京卫仁中药饮片厂,经本所主管药师何希荣鉴定,其原植物分别为桑叶 *Morus alba* L、菊花 *Chrysanthemum morifolium* Ramat、连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl、杏仁 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim、薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch、桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC、芦根 *Phragmites communis* Trin。以原方比例(桑叶 7.5 g,菊花 3 g,连翘 5 g,杏仁 6 g,薄荷 2.5 g,生甘草 2.5 g,桔梗 6 g,芦根 6 g)按本实验室常规水煎两次,过滤浓缩至所需浓度。新生牛血清为杭州四季青有限公司产品;NO 试剂盒购于南京建成生物工程研究所,批号:20070122;RNA-OUT 总 RNA 提取试剂盒、DEPC 处理水均购于北京天来生物医学科技有限责任公司;Erasol 购自北京赛百盛基因技术有限公司;M-MLV 逆转录酶为 Promega 产品,批号:1684213;TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 和内参 GAPDH 引物由上海英骏生物技术有限公司合成;其它试剂均为市售分析纯。

1.2 动物与细胞 雄性 SD 大鼠,10 只,体重(250 ± 20)g,购于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,许可证号:SCXK(军)2002-0001SD。小鼠巨噬细胞株 RAW264.7,购于上海细胞生物研究所。

1.3 仪器 BB16 型 CO₂ 培养箱,德国 Heraeus 公司;550 型酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;5417C/R 型高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;OLYMPUS-CK 光学显微镜,日本 OLYMPUS 公司;一次性细胞培养瓶及 48 孔培养板,美国 Coster 公司;医用净化工作台,北京半导体设备一厂。

2 实验方法

2.1 含药血清制备方法与步骤 大鼠随机分为两组:空白对照组与桑菊饮组各 5 只,桑菊饮的给药剂

量为:38.5 g · kg⁻¹(相当于临床人公斤体重用量的 60 倍),每天上、下午各 ig 1 次,共 5 次。于末次 ig 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。

2.2 小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 的培养 RAW264.7 细胞株混悬于含 10% 新生牛血清的 1640 培养基(10% 新生牛血清、NaHCO₃ 2 g、100 U · mL⁻¹青霉素、100 μg · mL⁻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 RAW264.7 细胞株,用 0.25% 胰蛋白酶消化 3 min 后,弃胰酶,加适量 1 640 完全培养基吹打细胞,计数并调细胞浓度为 5 × 10⁵ 个 · mL⁻¹,移入 48 孔板,每孔加细胞悬液 0.5 mL,贴壁培养 1 h。

2.3 MTT 法检测桑菊饮含药血清对 RAW264.7 细胞活性的影响 实验分对照组和不同剂量(1.2, 2.1, 3.5, 5.8, 9.6 g · kg⁻¹ · U⁻¹)桑菊饮含药血清各组。取对数生长期 RAW264.7 细胞 1 瓶,用 1640 (含 10% 血清)调细胞浓度为 1 × 10⁵ 个 · mL⁻¹,铺于 48 孔板上,每孔 200 μL,铺板 1 h 后,置换为无血清 1 640(150 μL · 孔⁻¹),按实验分组分别加入不同剂量的桑菊饮含药血清,放入培养箱中培养 24 h 后,吸去培养上清液,每孔再加入 0.2 mL 不含血清的 1 640 培养液和 20 μL 浓度为 5 mg · mL⁻¹的 MTT 染液(1 640 做为培养基),37 °C、5% 的 CO₂ 培养箱培养 4h,小心吸弃上清,每孔再加入 0.2 mL 二甲基亚砷溶液,振荡器轻轻振荡 5 min,室温下静置 10 min,于酶标仪 490 nm 测定各组吸光度值。

2.4 桑菊饮含药血清作用于 RAW264.7 细胞的时间点确定 取对数生长期 RAW264.7 细胞,消化悬浮于 1 640 (含 10% 血清)中,浓度为 5 × 10⁵ 个 · mL⁻¹,接种于 48 孔板中,每孔 0.5 mL(共 8 板)。铺板后 1 h,细胞落地后,置换上清为无血清 1 640,480 μL · 孔⁻¹,加入不同剂量的桑菊饮含药血清(1.2, 2.1, 3.5, 5.8, 9.6 g · kg⁻¹ · U⁻¹),分别于药后 2, 4, 12, 24 h 吸取上清,备测 NO。细胞冻存于 -80 °C 备提 RNA。

2.5 桑菊饮含药血清对 RAW264.7 细胞 TLR-1 ~ TLR-9 mRNA 表达的影响。

2.5.1 RNA 提取与 cDNA 合成

2.5.1.1 含细胞的 48 孔培养板,每孔加 0.5 mL RNAOUT,吹打使细胞全部裂解,转移至新的离心管(2.5 mL,经 Erasol 预处理)中。每管加 0.1 mL 氯仿,振荡器上充分振荡混匀 30 s。

2.5.1.2 室温离心 15 000 g,3 min。将上清液转移到另一干净离心管中,有机相和中间层含有 DNA 和蛋白质,避免触及。

2.5.1.3 在上清液中加入等体积的异丙醇,振荡器上振荡混匀 30 s。15 000 g,4 ℃ 离心 5 min。小心吸弃上清液,注意不要吸弃 RNA 沉淀。

2.5.1.4 在含 RNA 沉淀的离心管中加入 1 mL 75% 乙醇(DEPC 水配制),振荡混匀 30 s。15 000 g,4 ℃ 离心 1 min。小心吸弃上清液。

2.5.1.5 室温放置 10 min 使酒精挥发,每管加入 50 μL DEPC 水溶解 RNA 沉淀,取 5 μL,加无菌水至 1 mL,测定 RNA 含量。

2.5.1.6 无菌水稀释总 RNA,使每 10 μL 含总 RNA 2 μg,各取 10 μL 加入 PCR 管中。按如下比例配制 RT 系统反应液: dNTP: RNasin: M-MLV Reverse Transcriptase: M-MLV Reverse RT 5 × Buffer: Oligo = 1: 1: 1: 2: 4,混匀。

2.5.1.7 取 10 μL 逆转录系统反应液至 PCR 管,使成 20 μL 反应体系,混匀。42 ℃ 水浴 60 min,转至 94 ℃ 水浴 5 min,冰浴 10 min, -20 ℃ 冰箱保存备用。

2.5.2 引物的设计与合成 从 Genebank 中获得小鼠相关指标 mRNA 序列。引物序列、产物长度及位置如下表。

2.5.3 荧光定量 PCR 方法 20 μL PCR 反应体系中含 2 × SYBR Green PCR Master Mix 10 μL, cDNA 2 μL,引物 2 pmol。同时以 GAPDH 做为内参照平行管。IQ5 荧光定量 PCR 仪上进行扩增,扩增条件为 94 ℃ 5 min 变性,(94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s) × 55 个循环,72 ℃ 延伸 5 min,并做熔点曲线。

2.5.4 荧光定量 PCR 数据统计方法 目前最常用的分析实时定量 PCR 实验数据的方法有两种,绝对

表 1 引物序列一览表

引物	意义链	序列 (5'-3')	扩增片段 (bp)
TLR-1	Sense:	GGACCTACCCCTTGCAAACAA	212
	Anitsense:	GGTGGCACAAGATCACCTTT	
TLR-2	Sense:	CTCCCACTTCAGGCTCTTTG	217
	Anitsense:	AGAACTGGGTGGAGAACCT	
TLR-3	Sense:	AGCTTTGCTGGAACTTTCA	127
	Anitsense:	GAAAGATCGAGCTGGGTGAG	
TLR-4	Sense:	TGCTCAGACATGGCAGTTTC	206
	Anitsense:	TCAAGGCTTTTCCATCCAAC	
TLR-5	Sense:	CAGATTCCTGGATCCTCAA	265
	Anitsense:	ACAGCCGAAGTTCCAAGAGA	
TLR-6	Sense:	ACACAATCGGTGCAAAACA	128
	Anitsense:	GGAAAGTCAGCTTCGTCAGG	
TLR-7	Sense:	CCACAGGCTCACCCATACTT	132
	Anitsense:	CAAGGCATGTCCTAGGTGCT	
TLR-8	Sense:	GGCACAACCTCCCTGTGATT	195
	Anitsense:	CATTTGGGTGCTGTTGTTTG	
TLR-9	Sense:	TGCAGGAGCTGAACATGAAC	297
	Anitsense:	TAGAAGCAGGGGTGCTCAGT	
GAPDH	Sense:	CTCATGACCACAGTCCATGC	201
	Anitsense:	CACATTGGGGGTAGGAACAC	

定量和相对定量法。绝对定量通过标准曲线计算起始模板的拷贝数;相对定量方法则是比较经过处理的样品和未经处理的样品目标转录本之间的表达差异。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示的方法是实时定量 PCR 实验中分析基因表达相对变化的一种简便方法^[8],在目的基因和内参的扩增效率相同或接近相同时,可用本方法进行数据分析。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,故本研究中采用此相对定量法进行数据处理和分析,其计算公式如下:

$$\Delta\Delta Ct = (C_{t,Target} - C_{t,GAPDH}) X - (C_{t,Target} - C_{t,GAPDH}) Control$$

X 表示任意组,Control 表示经 GAPDH 校正后 1 倍量的目标基因表达。

2.6 含药血清药物含量的计算 含药血清药物含量的计算与表述采用本研究室的方法,公式如下^[9]:
含药血清药物含量(生药 $g \cdot kg^{-1} \cdot U^{-1}$) = $\frac{\text{动物每日公斤体重给药剂量(生药 g/kg 体重)}}{\text{含药血清在体外试验系统的稀释倍数(U)}}$

2.7 统计学处理 实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为非常显著性差异。

3 实验结果

3.1 MTT 法检测桑菊饮含药血清对 RAW264.7 细胞活性的影响 表 2 中结果显示含药血清药物含量在 $0 \sim 9.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$ 之间不会降低细胞活性, 对细胞无损伤作用。因此实验时我们在此区间内选择用药剂量。

表 2 MTT 法检测桑菊饮含药血清对 RAW264.7 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	含药血清药物含量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$)	吸光度值
正常对照	—	1.264 ± 0.159
桑菊饮	1.2	1.163 ± 0.149
	2.1	1.367 ± 0.171
	3.5	1.314 ± 0.154
	5.8	1.309 ± 0.162
	9.6	1.547 ± 0.219 ¹⁾

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.2 桑菊饮含药血清刺激后 RAW264.7 细胞分泌 NO 含量的经时变化 表 3 结果提示, 桑菊饮含药血清作用后 2 h 即可使 RAW264.7 细胞激活、NO 含量上升, 以后略有下降, 至 24 h 含量继续升高, 呈现一定的时相变化。因而将含药血清对该细胞株 TLRmRN 表达和相关细胞因子分泌影响的检测点设定在作用后 24 h。

表 3 桑菊饮含药血清刺激后 RAW264.7 细胞分泌 NO 含量的经时变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$)	NO ($\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$)			
		2 h	4 h	12 h	24 h
正常对照	—	7.341 ± 0.465	7.102 ± 0.226	7.709 ± 0.439	9.031 ± 0.320
桑菊饮	1.0	8.531 ± 0.442	7.890 ± 0.317 ²⁾	8.203 ± 0.286 ¹⁾	9.410 ± 0.225 ¹⁾
	1.9	8.773 ± 0.635 ²⁾	7.56 ± 0.406	8.399 ± 0.361 ¹⁾	9.581 ± 0.274 ¹⁾
	3.9	8.854 ± 0.135 ²⁾	7.312 ± 0.185	7.813 ± 0.355	9.781 ± 0.548 ¹⁾
	7.7	8.397 ± 0.628 ¹⁾	7.643 ± 0.151 ²⁾	7.395 ± 0.296	10.015 ± 0.409 ²⁾

3.3 桑菊饮含药血清对 RAW264.7 细胞 TLR1 ~ 9 mRNA 表达的影响 结果发现, 桑菊饮含药血清在所用剂量范围内以 $7.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$ 剂量对 Toll 受体的作用较强 (如图 1 所示), 引起了 TLR-4 和 TLR-7 的表达明显上调, 分别为刺激前的 3.9 倍和 1.9 倍

(与空白对照组比较, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而对 TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-5, TLR-6, TLR-8 和 TLR-9 的表达没有显著性影响 ($P > 0.05$)。

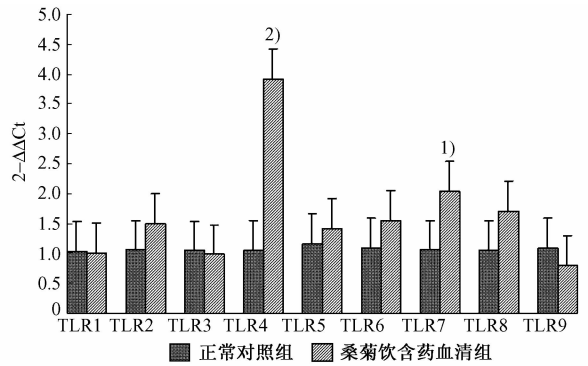


图 1 桑菊饮含药血清对 RAW264.7 细胞 TLR-1 ~ 9 mRNA 表达的影响

4 讨论

识别外源性抗原, 并诱导机体产生一系列反应, 进而清除外源致病性物质, 以保持机体的稳定是免疫系统的基本功能。而巨噬细胞作为机体免疫系统的重要递呈细胞, 在机体发挥天然免疫防御机制中起着重要作用。近年的研究发现, 内毒素等刺激巨噬细胞的活化主要是通过位于细胞膜上 TLR 家族中部分成员的信号介导, 当 TLR 的表达过高或活性过强, 就会引起炎症递质的过量释放, 从而造成炎症反应, 成为炎症的重要病理过程; TLR 的表达过低或活性较弱, 则会导致机体的免疫功能下降。

本研究首先通过检测桑菊饮含药血清对 RAW264.7 细胞活性的影响, 确定了含药血清的最大无毒浓度, 在此浓度下选取了桑菊饮含药血清的 4 个试验浓度; 鉴于 NO 的产生和释放是巨噬细胞被激活的标志, 我们又以 NO 的释放量为观测指标对不同浓度的桑菊饮含药血清做了 24 h 内的时效分析, 并选择 NO 释放最大量的时间点——24h 作为后续实验的作用时间。

在确定桑菊饮含药血清的实验浓度和作用时间的基础上, 我们又从免疫学角度, 采用含药血清体外加药的方法, 在 TLRs 基因表达环节对桑菊饮这一临床常用有效方剂的现代分子机理进行了研究, 结果发现, 桑菊饮含药血清的一定剂量 ($7.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$) 可明显上调 TLR-4、TLR-7 的 mRNA 表达, 对其余 TLRs 的亚型表达没有明显影响。桑

菊饮上调这两种受体的 mRNA 表达,既可为其传统功能提供一些现代科学诠释,也为其扩大主治提供一点新的线索。

[参考文献]

- [1] 杨奎,曾南,沈映君,等. 桑菊饮抗炎作用的研究[J]. 中药药理与临床,1994(3):45.
- [2] 卢芳国,朱应武,田道法,等. 12个中药复方体外抗菌作用的研究[J]. 湖南中医学院学报,2004,24(4):9-11.
- [3] 许庆棣. 古典清热方对体温影响的实验观察[J]. 中西医结合杂志,1985,5(6):378-379.
- [4] 富杭育,周爱香,贺玉琢,等. 以发汗的药效法再探麻黄汤、桂枝汤、银翘散、桑菊饮的药代动力学[J]. 中药药理与临床,1992,8(5):1-3.

- [5] 富杭育,周爱香,贺玉琢,等. 以抑制肠蠕动亢进作用再探麻黄汤、桂枝汤、银翘散、桑菊饮的药代动力学[J]. 中成药,1993,15(1):35-36.
- [6] 钱瑞生. 中草药免疫促进剂[J]. 中医杂志,1980,21(3):235-236.
- [7] Takeda K., Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. Intern. Immunol,2005,17(1):1-14.
- [8] Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, et al. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. Anal Biochem,2000,285(2):194-204.
- [9] 姜廷良,霍海如,李兰芳,等. 15种中西药物含药血清对大鼠成骨细胞增殖成熟的影响. 中国骨质疏松杂志,2002,8(4):342-345.