

甘露消毒丹对温病湿热证大鼠 LBP mRNA、 CD14 mRNA、NF- κ Bp 动态干预

程方平*, 刘松林, 杨红兵, 李家庚, 李云海, 梅国强
(湖北中医学院, 湖北 武汉 430061)

[摘要] 目的: 观察甘露消毒丹对温病湿热证大鼠细胞内毒素特异性受体(LBP mRNA), (CD14 mRNA) 及(NF- κ Bp65) 表达变化的动态干预, 深入探讨清热化湿方的治疗机制。方法: 分为正常组、湿热模型组(高脂+ 高温高湿+ 大肠杆菌)、清热化湿组; 采用逆转录-聚合酶链反应技术(RT-PCR) 检测肝巨噬细胞 LBP mRNA, CD14 mRNA, 免疫组化技术检测肝巨噬细胞 NF- κ Bp65 活化。结果: 模型组在感染 6, 12, 24 h 等不同时相点 LBP mRNA, CD14 mRNA, NF- κ B 表达逐渐非常显著增强, 且不同时相点之间比较均有显著性差异, 说明随着病程的发展, 湿热模型 LBP mRNA, CD14 mRNA, NF- κ B 表达逐渐增强。治疗组 6, 12, 24 h 等不同时相点比较, LBP mRNA, CD14 mRNA 表达减弱, 具有非常显著性差异; 24 h 时相点治疗组与模型组比较 LBP mRNA, CD14 mRNA 表达减弱有非常显著性差异, 但仍未恢复正常, 说明 LBP mRNA, CD14 mRNA 遏制衰减是一个缓慢的过程。而治疗组 NF- κ B 表达 6, 12, 24 h 各时相点间比较无显著性差异; 且与正常组比较 NF- κ B 激活均无显著性变化。结论: 甘露消毒丹对温病湿热证大鼠肝巨噬细胞 LBP mRNA, CD14 mRNA 及 NF- κ B 的激活具有较好的干预调控作用, 能中止炎症介质的转录, 限制急性炎症反应。

[关键词] 巨噬细胞; 肝; 湿热证; 大鼠模型; 甘露消毒丹

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)04-0056-04

The Dynamic Interference in LBP mRNA, CD14 mRNA, NF- κ Bp65 on Damp-heat Syndrome Model Rats Treated by Ganlu Xiaodu Dan

CHENG Fang-ping*, LIU Song-lin, YANG Hong-bing, LI Jia-geng, LI Yun-hai, MEI Guo-qiang
(Hubei of TCM, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the dynamic interference in LBP mRNA, CD14 mRNA, NF- κ Bp65 on the cell endotoxin(ET) specific receptors of damp-heat syndrome model rats treated by Ganlu Xiaodu Dan, further to explore the therapy mechanism of Qingre Zaoshi Prescription. **Methods:** Animal were divided into normal group, model group(high fat diet+ high temperature and high humidity+ colon bacillus), Qingre Zaoshi group randomly, the expression of LBP mRNA, CD14 mRNA, in liver macrophage was semiquantitated by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR), the activation of nuclear factor-kappa Bp65(NF- κ Bp65) in liver macrophage was detected by immunohistochemical methods. **Results:** At 6 h, 12 h and 24 h action spots, the expressions of LBP mRNA, CD14 mRNA, NF- κ Bp65 in model group was remarkably increased compared with those of normal group; And at 6 h, 12 h and 24 h, the above indicators had significant difference compared with each other. The result indicated that during the development of the course of disease, the expression of LBP mRNA, CD14 mRNA, NF- κ Bp65 in model group was increased gradually. The expression of LBP mRNA, CD14 mRNA, in treatment group was decreased, and had significant difference between 6 h and 12 h and 12 h and 24 h. At 24 h, the expression of LBP mRNA, CD14 mRNA in treatment group was decreased, and had significant

[收稿日期] 2007-08-09

[通讯作者] * 程方平, Tel: (027) 68889785; E-mail: cfphbze@sina.com

difference compared with model group. The results suggested that attenuation of LBP mRNA, CD14 mRNA, is a slow course. **Conclusions:** It was suggested that Ganlu Xiaodu Dan has interference in LBP mRNA, CD14 mRNA, NF- κ Bp65 in liver macrophage of damp-heat syndrome of seasonal febrile disease rats.

[**Key words**] macrophage; liver; damp-heat syndrome; rat model; Ganlu Xiaodu Dan

温病湿热证是由湿热病邪引起的急性外感热病。其病因与发病正如薛生白所言：“太阴内伤，湿饮停聚，客邪再至，内外相引，故病湿热。”强调“内外合邪”，“同类相召”是发病之关键。其病理具有起病较缓，病势缠绵，病程较长的特点。王孟英曰：“此（甘露消毒丹）治湿温时疫之主方也。……尚在气分，悉以此丹治之立效。”现代医学如何认识和阐述此病机，目前文献鲜有报道，本实验拟观察甘露消毒丹对模型大鼠内毒素特异性受体 LBP mRNA CD14 mRNA 及 NF- κ Bp65 表达变化的动态干预，在细胞分子、生物学层次对湿热致病机制进行探讨，赋予现代研究的直接阐释。

1 材料

1.1 实验动物 清洁级 Wistar 大鼠，雌雄各半，体重(200±10)g。由湖北省医学实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂 清热化湿方：由甘露消毒丹加郁金、姜黄组成。滑石 30 g，茵陈 20 g，黄芩 20 g，石菖蒲 12 g，川木通 10 g，川贝母 10 g，广藿香 10 g，射干 10 g，连翘 10 g，薄荷 10 g，豆蔻 10 g 等。以上药物均由湖北中医学院附属门诊部中药房提供。常规煎煮浓度为 200% 浓度药液，分装、灭菌。4℃冰箱保存。按中药药理实验方法学计算给药剂量。每次灌胃给药 2 g·mL⁻¹·200 g⁻¹。每日 3 次。

1.3 实验仪器

2 实验方法

2.1 分组造模^[1]与给药 动物分组为正常组，湿热模型组、治疗组各 24 只。正常组：在正常温湿度环境下，普通混合饲料喂养 29 d；湿热模型组：在正常温湿度环境下，高脂饲料喂养 2 周后，再放入人工气候箱中(温度 35℃，相对湿度 95%)，每天造模时间(上午 8~12 时，下午 13~17 时)，高脂饲料喂养。12 d 后，灌服大肠杆菌 10⁹·mL⁻¹·200 gBW(预实验摸索剂量)。4 h 后，再加强灌服 1 次，继续放入人工气候箱造模观察 3 d。治疗组：整个过程同湿热模型组，灌服大肠杆菌前一天预服中药及中药治疗。

分别于感染 6, 12, 24 h 时，处死各组大鼠取肝组织。

2.2 (LBP mRNA), (CD14 mRNA) 的检测 采用逆转录-聚合酶链反应技术(RT-PCR)^[1]。

2.2.1 肝组织总 RNA 的提取及鉴定 按 Trizol Reagent 操作指南提取细胞总 RNA。

2.2.2 逆转录反应 按 Superscript™ Preamplication System 操作指南进行。

2.2.3 PCR 反应 取 2 μ L RT 产物在如下体系中进行 PCR 反应。PCR 反应条件：95℃ 孵育 5 min，95℃ 变性 45 s，57℃(扩增不同片段采用合适的不同温度) 复性 50 s，72℃ 延伸 50 s。末次循环 72℃ 延伸 10 min。查基因库，设计 LBP 的引物序列：上游为 5'-CAA ACT CTG CCA GTC ACA-3'，下游为 5'-GGA CAT TGG CAC CCA AGT-3'，PCR 扩增产物长度为 774 bp，退火温度为 54℃，35 次循环。mCD14 的引物序列^[2]：上游为 5'-GTA GAC GGC GGG GGT TTG TTA-3'，下游为 5'-GAC GAA GGG ACG GGA GAG GTG-3'，PCR 扩增产物长度为 445 bp，退火温度为 60℃，30 次循环。 β -actin 引物序列：上游为 5'-ACC ACA GCT GAG AGG GAA ATC G-3'，下游为 5'-AGA GGT CTT TAC GGA TGT CAA CG-3'，扩增产物 281 bp，退火温度为 57℃，30 次循环。

2.2.4 PCR 产物电泳及结果检测 PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 μ g/mL 的溴化乙啶)，电泳缓冲液为 1×TAE，在 50 V 电压下电泳 30 min，紫外灯下观察结果，并以数码相机照相。GIS 凝胶电泳分析系统扫描并分析各组目的基因及 β -actin 基因的灰度值，以二者的比值代表目的基因的表达量。

2.3 NF- κ B 的检测 采用免疫组化技术。

用 4% 多聚甲醛固定 72 h 后的各组大鼠肝组织切取 2 mm×2 mm×2 mm 大小，石蜡包埋，取 4 μ m 厚的石蜡切片。石蜡切片脱蜡入水后，分别采用微波、高压抗原修复。每张切片加一滴正常山羊血清封闭 20 min。每张切片滴加一抗(兔抗鼠多克隆 NF- κ Bp65 抗体(1:50) 4℃ 过夜。0.01 mol/L PBS 洗涤后滴加生物素偶联的二抗，37℃ 孵育 20 min，PBS 洗涤 2 min，反复 3 次。滴加辣根过氧化物酶偶联的链霉素卵白素，37℃ 孵育 20 min，PBS 洗涤 5 min，反复 4

次。低价 DAB, 室温染色 7 min 后蒸馏水洗涤, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片。阳性结果判断: NF- κ Bp65 免疫反应阳性细胞为细胞核染成棕黄色或深棕色颗粒沉积。在 HMIAS-2000 型图像分析仪上, 每个切片随机取 8 个高倍视野, 测定一定面积内平均光密度。

2.4 统计学处理 用 spss 13.0 统计软件统计处理, 数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 组间用 q 检验。 $P < 0.05$ 为有显著性差异, $P < 0.01$ 为有非常显著性差异。

3 结果

3.1 对大鼠肝组织巨噬细胞 LBP mRNA 表达水平的影响 结果见表 1。

表 1 甘露消毒丹对大鼠肝组织巨噬细胞 LBP mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	灰度值		
		6 h	12 h	24 h
正常组	—	0.291 \pm 0.019	0.291 \pm 0.020	0.291 \pm 0.018
模型组	—	0.570 \pm 0.022 ²⁾	0.650 \pm 0.022 ^{2, 3)}	0.970 \pm 0.019 ^{2, 3, 4)}
甘露消毒丹	30	0.702 \pm 0.020 ^{2, 3, 6)}	0.645 \pm 0.016 ²⁾	0.605 \pm 0.017 ^{2, 5, 6)}

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组 6 h 比较³⁾ $P < 0.01$; 与模型组 12 h 比较⁴⁾ $P < 0.01$; 与模型组 24 h 比较⁵⁾ $P < 0.01$; 与治疗组 12 h 比较⁶⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.2 对大鼠肝细胞巨噬细胞 CD14 mRNA 表达水平的影响 结果见表 2。

表 2 甘露消毒丹对大鼠肝组织巨噬细胞 CD14 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	灰度值		
		6 h	12 h	24 h
正常组	—	0.507 \pm 0.004	0.506 \pm 0.010	0.503 \pm 0.012
模型组	—	0.820 \pm 0.048 ²⁾	1.010 \pm 0.044 ^{2, 3)}	1.149 \pm 0.009 ^{2, 3, 4)}
甘露消毒丹	30	0.887 \pm 0.042 ^{2, 3, 6)}	0.878 \pm 0.053 ^{2, 4)}	0.728 \pm 0.044 ^{2, 5, 6)}

3.3 对大鼠肝细胞巨噬细胞中 NF- κ Bp65 表达水平的影响 结果见表 3。

表 3 甘露消毒丹对大鼠肝组织巨噬细胞中 NF- κ Bp65 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	OD 值		
		6 h	12 h	24 h
正常组	—	0.120 \pm 0.100	0.122 \pm 0.011	0.121 \pm 0.009
模型组	—	0.197 \pm 0.046 ¹⁾	0.269 \pm 0.034 ²⁾	0.286 \pm 0.049 ^{2, 4)}
甘露消毒丹	30	0.124 \pm 0.010 ³⁾	0.134 \pm 0.009 ^{3, 5)}	0.131 \pm 0.016 ^{3, 6)}

4 讨论

脂多糖 (lipopolysaccharide LPS) 是由革兰阴性细菌崩解释放出来的, 是内毒素的主要生物活性成分。近几年, 实验研究表明: LPS 或脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide binding protein LBP) 与敏感受体

CD14 结合, 由于膜结合 CD14 (mCD14) 是一种 GPI 锚着膜蛋白, 缺乏跨膜区, 不能直接转导 LPS 信号。Toll 样受体 (Toll like receptor TLR) 4 是目前研究最多的与 LPS 跨膜信号转导有关的胞内受体, 并证实它能够诱导核因子- κ B (nuclear factor-kappaB NF- κ B) 激活和核易位, 从而使效应细胞合成和分泌大量的炎症介质, 触发机体一系列病理性反应。

LBP 是急性期反应蛋白的一种, 已证明, 当 LPS 为 ng·L⁻¹ 水平时, LPS 的效应依赖 LBP 含量, 在细胞对 LPS 的应答过程中, LBP 主要起催化作用^[3], 可增强 LPS 对含 mCD14 细胞的刺激作用, 即 LBP 将 LPS 单体从其多聚体中转运到 CD14, 加速 LPS 与 CD14 的结合。LBP 作为急性期反应蛋白, 在介导内毒素生物活性中也起双重作用。LBP 可介导内毒素结合到 mCD14^[4], sCD14 和 HDL^[5] 上, 将 LPS 的刺激作用增加 100~ 1 000 倍; 而高浓度 LBP 则可抑制体外和体内 LPS 的作用, 保护机体免受细胞侵袭^[6]。说明 LBP 的生物学效应是一个较长而复杂的过程。

CD14 作为 LPS 的重要受体之一, 在介导细胞对 LPS 的应答中起关键性作用。识别并结合 LPS 或 LPS/LBP 复合物。LBP 将 LPS 传给 mCD14, 形成三者的复合物, 复合物中 LPS 解聚后, 与 TLR4 作用, 进而通过 IL-1 信号转导过程中信号分子间的相互作用, 最终导致核转录因子 NF- κ B 的活化促使多种细胞因子基因的表达。从而释放 TNF- α , IL-1, IL-6, NO, 补体, 氧自由基, 前列腺素类, 血小板激活因子等等, 使 LPS 的毒性作用得以发挥。这些由内毒素跨膜信号的转导过程引起炎症反应可表现出临床湿热特征。

研究表明, 单核-巨噬细胞对低浓度 LPS 的反应有 CD14 依赖性^[7], mCD14 是细胞被低剂量 LPS (< 100 μ g/L) 激发炎症反应的关键受体 (大剂量 LPS 刺激不依赖于 mCD14, 表明 CD14 在细胞对 LPS 的反应中并不是必需的)。Lee 等^[8] 证明, mCD14 可增强 CD14⁻ 细胞对 LPS 的反应, CD14⁻ 细胞在转染 CD14 后对 LPS 的反应性可增强 1 000 倍。

清热化湿方对内毒素特异性受体 LBP mRNA, CD14 mRNA 动态干预的实验结果发现甘露消毒丹干预后, 在灌服大肠杆菌后 6 h, 治疗组 LBP mRNA, CD14 mRNA 表达与湿热模型组比较, 增强更明显, LBP mRNA, CD14 mRNA 有极显著性差异。推测似由清热化湿方提前干预机体, 改善肠道组织及细胞外环境, 而有利于细胞膜内毒素信号的转导。但治疗

组细胞核因子 NF- κ B 表达与模型组比较有显著降低,与正常组比较无显著变化,说明了清热化湿方在 6 h 阶段,主要干预核因子 NF- κ B 的激活,从而减弱许多炎症介质参与的内毒素的生物学效应如 TNF- α , IL-1 等,保护机体免受侵害。

在灌服大肠杆菌后的 12 h 及 24 h,清热化湿方对 LBP mRNA, CD14 mRNA 的表达干预逐渐明显。12 h 治疗组的表达已较湿热模型组减少,而到 24 h 具有极显著性差异 ($P < 0.01$),但治疗组的 LBP mRNA, CD14 mRNA 表达与正常组比较仍维持较高水平,与正常组比较仍有极显著差异。分析原因大概有以下两方面:其一,因实验经费所限,不能使各组动物的观察时间,继续向理想的时间延长。其二,因湿热证多有病程长的特点,故 24 h 上述信号表达仍处在较高水平。而在 6 h 以后治疗组与模型组比较 NF- κ B 激活显著性抑制 ($P < 0.05$),且与正常组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。说明了清热化湿方对内毒素转导信号及核因子 NF- κ B 的激活具有较好的干预抑制作用,中止炎症介质的转录,限制急性炎症反应。而 24 h 治疗组的 LBP mRNA, CD14 mRNA 表达与正常组比较仍维持较高水平,从另一侧面阐释了湿热病症病势缠绵,传变较缓,若中断治疗干预,易于复发之特性。

[参考文献]

[1] 程方平,周洁,陈娟,等. 湿热证大鼠模型 mCD14 mRNA NF- κ B 动态表达的对比研究[J]. 医学综述,

2006, 12(24): 40-43.

- [2] 龚建平,徐明清,刘长安,等. 内毒素血症时肝组织中脂多糖受体 CD14 的表达及其意义[J]. 中华肝胆外科杂志, 2002, 8(3): 175-178.
- [3] Hailman E, Lichenstein HS, wurfel MM, *et al.* LBP accelerates the binding of LPS to CD14[J]. J Exp Med, 1994, 179: 269.
- [4] Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, *et al.* Structure and function of lipopolysaccharide binding protein[J]. Science, 1990, 249: 1429-1431.
- [5] Haiman E, Vasselon T, Kelloy M, *et al.* Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14[J]. J Immunol, 1996, 156: 4384.
- Troelstra A, Giepmans BN, van kessel KP, *et al.* Dual effects of soluble CD14 on LPS binding of neutrophils[J]. J Leukoc Biol, 1997, 6(2): 173-178.
- [6] Bazil V, Strominger J L. Shedding as a mechanism of down modulation of CD14 on stimulated human monocytes[J]. J Immunol, 1991, 147(5): 1567-1574.
- [7] Bazil V, Strominger J L. Shedding as a mechanism of down modulation of CD14 on stimulated human monocytes[J]. J Immunol, 1991, 147(5): 1567-1574.
- [8] Perera PY, Vogel SN, Detore GR, *et al.* CD14-dependent and CD14-independent signaling pathways in murine macrophages from normal and CD14 knockout mice stimulated with Lipopolysaccharide or taxol[J]. J Immunol, 1997, 158(9): 4422-4429.