

• 药理 •

黄连解毒汤含药血清对 Toll 样受体 3、4 型及其下游信号转导通路的影响

赵保胜, 刘洪斌, 马悦颖, 隋峰, 李兰芳, 郭淑英, 何希荣, 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: 研究黄连解毒汤含药血清对细菌脂多糖和双链 RNA 病毒核酸类似物聚肌胞刺激的小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 Toll 样受体(TLR) 及其下游主要信号转导通路的影响。方法: 用脂多糖、聚肌胞分别刺激 RAW264.7 细胞, 同时给予黄连解毒汤含药血清进行干预, 24 h 后, 取细胞培养上清液, ELISA 法测定炎症因子 TNF- α 和 IFN- β 的含量, 荧光定量 PCR 方法测定 TLR3、TLR4 和下游信号转导通路髓样分化因子 88(MyD88), 肿瘤坏死因子受体相关因子-6(TRAF-6), TOLL 样受体相关分子(TRAM) 和 TOLL 样受体相关的干扰素活化子(TRIF) mRNA 的表达, Western blotting 法分析 TLR3、TLR4 蛋白的表达, 同时用细胞免疫荧光法分析 MyD88, TRAF-6 蛋白表达的强弱, 在 mRNA 水平和蛋白水平探讨黄连解毒汤对 Toll 样受体的作用机理。结果: 黄连解毒汤含药血清显著降低 LPS 诱导的 TLR4、MyD88、TRAF-6、TRAM 和 TRIF 的高表达(与单纯 LPS 刺激组比较, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); Poly(I:C) 刺激后, 黄连解毒汤含药血清仅对 TRAM 和 TRIF 的表达有明显的降低作用($P < 0.01$)。结论: 黄连解毒汤能阻断 TLR4 高表达、阻断 TLR4 胞内信号转导的 MyD88 依赖和非依赖两条途径(以阻断非依赖途径为主), 抑制相关基因表达产物 TNF- α 、IFN- β 过度分泌, 具有 TLR4 拮抗剂样作用。黄连解毒汤也可直接作用于接头蛋白 TRAM 和 TRIF, 影响 TLR3 信号转导的 MyD88 非依赖性途径, 抑制 IFN- β 的过度分泌。

[关键词] 黄连解毒汤; 含药血清; 肺巨噬细胞; Toll 样受体 3 型; Toll 样受体 4 型; TLR 信号转导通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)05-0015-06

Effects of Huanglianjiadu Tang Drug Serum on the Expression of Toll-like Receptors and Downstream Signaling Components in RAW 264.7 Cells

ZHAO Bao-sheng, LIU Hong-bin, MA Yue-ying, SUI Feng, LI Lanfang, GUO Shu-ying,
HE Xi-rong, 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 Huanglianjiadu Tang drug serum on the expression of TLRs and downstream signaling components in RAW264.7. **Methods:** RAW264.7 cell line was stimulated with Lipopolysaccharide and Poly(I:C), respectively, then treated with the drug serum of Huanglianjiadu Tang at the same time, after 24 hours, collected the supernatant and measured the inflammatory factors such as TNF- α and IFN- β , observed the expression of TLR3, TLR4, MyD88, TRAF-6, TRAM and TRIF mRNA with real-time PCR, using western blotting method to analyze the expression of TLR3, TLR4 antibody, and using cell immunofluorescence method to analyze the expression of MyD88 and TRAF-6 antibody. **Results:** Huanglianjiadu Tang drug serum decreased the high expression of TLR4, MyD88, TRAF-6, TRAM and TRIF (vs LPS stimulated group, $P < 0.05$ or $P < 0.01$), but it only weakened the expression of TRAM and TRIF when the cells were stimulated by Poly(I:C). **Conclusion:** Huanglianjiadu Tang blocked

[收稿日期] 2007-03-05

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

the high expression of TLR4, blocked both MyD88-dependent and MyD88-independent signaling pathways (mainly blocked the MyD88-independent signaling pathway), inhibited the excess secretion of related gene expression products such as TNF- α , IFN- β , showed TLR4-antagonist-like actions. Huanglianjiadu Tang also effected the junction protein such as TRAM and TRIF directly, influenced the MyD88-independent signaling pathway of TLR3, as a result, it inhibited the excess secretion of IFN- β .

[Key words] Huanglianjiadu Tang; drug serum; pulmonary macrophage; toll-like receptor-3; toll-like receptor-4; signaling transduction pathway of TLR

黄连解毒汤为清热解毒的代表方药,可泻火解毒、清化湿热,现代药理研究表明其有抗病原微生物作用,对内毒素引起的大鼠实验性发热有非常显著的解热作用^[1],并可明显降低 IL-6、TNF- α 的水平^[2]。

人类 Toll 样受体 (TLR) 是近年来发现的感知病原微生物分子识别的一类受体家族,在启动先天性免疫和调节获得性免疫中起着关键作用。其中,4 型受体 (TLR4) 能感知细菌的内毒素 (LPS),3 型受体 (TLR3) 能感知病毒的双链 RNA,它们被激活后,通过细胞内髓样分化因子 88 (MyD88) 依赖和非依赖信号转导途径,启动炎症早期基因、炎症后期基因和干扰素诱导基因转录产生细胞因子和干扰素等,发挥和调节免疫反应^[3]。

本实验以细菌脂多糖 (LPS) 和聚肌胞 (Poly (I: C))^[4] 刺激小鼠肺巨噬细胞株 RAW264.7 来模拟外源性抗原刺激,观察黄连解毒汤含药血清对 TLR3、TLR4 及其下游信号转导通路和细胞分泌炎症因子的影响,以期进一步研究其清热解毒作用的免疫学基础。

1 实验材料

1.1 药物与试剂 所用中药材均购自北京卫仁中药饮片厂,经药材学鉴定,其原植物分别为黄连 *Rhizoma Coptidis*、黄柏 *Cortex Phellodendri*、黄芩 *Radix Scutellariae*、栀子 *Fructus Gardeniae*。按原方比例 (黄连 9 g, 黄柏 9 g, 黄芩 9 g, 栀子 6 g), 水煎 2 次合并药液,过滤浓缩,给药时以蒸馏水稀释至 0.5 g 药材/mL。LPS 和 Poly (I: C) 为 SIGMA 产品, RNA-OUT 总 RNA 提取试剂盒: 北京天来生物医学科技有限责任公司。M-MLV 逆转录酶, Promega 产品, 批号: 16644223。TLR3, TLR4, MyD88, 肿瘤坏死因子受体相关因子-6 (TRAF-6) 多克隆抗体, HRP 驴抗羊, HRP 羊抗兔二抗均为 SANTA CRUZ 产品; FITC 标记山羊抗兔 Ig G 抗体, 批号: 70917; TRITC 标记兔抗山羊 Ig G 抗体, 批号: 66290。以上抗体均购于北京中杉金桥

生物技术有限公司。TNF- α 测定 ELISA 试剂盒购自第四军医大学免疫学教研室, IFN- β 测定 ELISA 试剂盒, 购于 RapidBioLab, USA, 批号 012865。

1.2 动物与细胞 雄性 SD 大鼠 10 只, 体重 (250 \pm 10) g, 购于北京维通利华实验动物中心, 许可证号: SCXK (京) 2002~0003。小鼠巨噬细胞株 RAW264.7, 购于上海细胞生物研究所。

1.3 仪器 550 型酶标仪 (Bio-Rad, 美国), IQ5 荧光定量 PCR 仪 (BIO-RAD, 美国), SYNGENE-Gene Genius 全自动凝胶成像系统 (北京百晶生物技术有限公司)。垂直电泳仪, 美国 Bio-Rad。Leica DMIL 型倒置荧光显微镜 (德国), Qwin Standard V3.1.0 数据处理系统 (Leica Microsystem Imaging Solutions Ltd.)。

2 方法

2.1 含药血清制备 大鼠随机分为 2 组: 正常对照组、黄连解毒汤组, 每组各 5 只, 黄连解毒汤按其临床等效剂量的 10 倍 (30 g 药材/kg BW) 灌胃, 每天上、下午各 1 次, 共 5 次。于末次灌胃后 1 h, 乙醚麻醉, 无菌条件下, 经腹主动脉取血, 分离含药血清。将同组大鼠含药血清混匀, 56 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 灭活, 微孔滤膜过滤除菌, 冻存管分装, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.2 黄连解毒汤含药血清 IC₅₀ 的确定 调细胞浓度为 5 \times 10⁶ 个/mL, 48 孔板培养 1 h。吸弃上清液, 向细胞培养板中加入 1 640 培养基、LPS (终浓度 5 μ g/mL) 或 Poly (I: C) (终浓度 50 μ g/mL) 及黄连解毒汤含药血清 (分别为 100, 60, 36, 22, 13 μ L/孔), 每一剂量设 8 个复孔, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后, 取上清测定 TNF- α , IFN- β ; LOGIT 法计算药物 IC₅₀。含药血清中药物含量计算方法采用本研究室的计算方法^[5]。计算公式为: 含药血清中药物含量 (g \cdot kg⁻¹ \cdot U⁻¹) =

$$\frac{\text{大鼠每日公斤体重用药剂量 (g} \cdot \text{kg}^{-1})}{\text{含药血清在实验系统的稀释倍数 (U)}}$$

2.3 实时定量 (Real-time) PCR 法 取 RAW264.7 细胞, 调细胞浓度为 5 \times 10⁶ 个/mL, 48 孔板培养 1 h。

吸弃上清液, 向细胞培养板加入 1 640 培养基, LPS(终浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或 Poly(I: C) (终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及黄连解毒汤含药血清, 每一剂量设 6 个复孔, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养 24 h 后, 弃上清, 提取细胞 RNA, 进行实时定量 PCR, 引物序列及 PCR 条件参见文献[4]。

2.4 Western blotting 法 调细胞浓度至 1.5×10^6 个/mL, 培养瓶贴壁 5 h 后弃上清, 分别加入 LPS(终浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或 Poly(I: C) (终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及黄连解毒汤含药血清(终浓度为 $2.4\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$ 和 $3.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$), 培养 24 h。收集细胞, 提取蛋白并定量, 配制 10% 分离胶和配制 4% 的浓缩胶, 上样电泳转膜 5% 的脱脂奶粉 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, 分别加 TLR3, TLR4 一抗(1: 1 000) 室温孵育 2 h, 洗膜, 加二抗稀释液(1: 1 000), 室温下孵育 2 h, 化学发光, 显影, 定影凝胶图象分析系统分析目标带的分子量和净光密度值。

2.5 细胞荧光免疫化学分析法 调细胞浓度至 1×10^4 个/mL, 48 孔板, 贴壁培养过夜后弃去上清, 分别加入 LPS(终浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或 Poly(I: C) (终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及黄连解毒汤含药血清(IC_{50}), 培养 24 h。吸弃培养基, PBS 冲洗细胞 3 次, 中性甲醛固定, 0.2% TritonX-100 破坏细胞膜, 加一抗(1: 300), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 加二抗(1: 100), 室温孵育 40 min, 50% 甘油封水, Leica 倒置显微镜下观察, 摄片, Qwin Standard V3. 1. 0 数据处理系统分析各孔中央视野下细胞的荧光强度。

2.6 数据统计 实时定量 PCR 实验数据用相对定量法计算^[4], 各组数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 黄连解毒汤含药血清对 LPS 或 Poly(I: C) 刺激 RAW264. 7 细胞分泌 TNF- α , IFN- β 的 IC_{50} 的计算 从表 1~ 2 可以看出, LPS 或 Poly(I: C) 刺激后, 模型组培养液中 TNF- α , IFN- β 含量均明显升高, ($P < 0.01$), 表明造模成功。加入黄连解毒汤含药血清后, TNF- α , IFN- β 含量均明显下降($P < 0.01$), 且量效关系较好, 表明黄连解毒汤可以降低 LPS 或 Poly(I: C) 引起的 TNF- α , IFN- β 等炎症因子的分泌。经计算, 对 LPS 诱导的 TNF- α 分泌升高的 IC_{50} 为 $2.3\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$, 对 IFN- β 分泌升高的 IC_{50} 为 $2.4\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$; 对 Poly(I: C) 诱导的 IFN- β 分泌升高的 IC_{50} 为 $3.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$, 对 TNF- α 分泌升高的 IC_{50} 仅能从外推法求得。

表 1 黄连解毒汤含药血清对 LPS 刺激 RAW264. 7 细胞分泌 TNF- α IFN- β 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1 Influence of Huanglianjiadu Tang drug serum to TNF- α and IFN- β stimulated by LPS($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	LPS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	给药剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$)	TNF- α (ng/mL)	IFN- β (pg/mL)
正常对照组	0	0	0.59 \pm 0.07	59.22 \pm 16.73
LPS 刺激组	5	0	2.52 \pm 0.28 ¹⁾	331.68 \pm 0.03 ¹⁾
LPS+ 含药血清组	5	6.0	0.83 \pm 0.14 ³⁾	216.33 \pm 39.21 ³⁾
血清组	5	3.6	1.47 \pm 0.19 ³⁾	158.55 \pm 19.64 ³⁾
	5	2.2	1.72 \pm 0.21 ³⁾	193.26 \pm 18.33 ³⁾
	5	1.3	2.06 \pm 0.20 ³⁾	203.07 \pm 18.93 ³⁾
	5	0.8	2.00 \pm 0.20 ³⁾	227.26 \pm 28.13 ³⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$, 与 LPS 刺激组比较, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, 与 Poly(I: C) 刺激组比较, ⁴⁾ $P < 0.05$. ⁵⁾ $P < 0.01$, 下同。

表 2 黄连解毒汤含药血清对 Poly(I: C) 刺激 RAW264. 7 细胞分泌 TNF- α IFN- β 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 2 Influence of Huanglianjiadu Tang drug serum to TNF- α and IFN- β stimulated by Poly(I: C) ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	Poly(I: C) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	给药剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$)	TNF- α (ng/mL)	IFN- β (pg/mL)
正常对照组	0	0	1.27 \pm 0.28	41.26 \pm 9.90
Poly(I: C) 刺激组	50	0	3.34 \pm 0.50 ¹⁾	153.17 \pm 7.74 ¹⁾
Poly(I: C) + 含药血清组	50	6.0	2.72 \pm 0.42 ⁴⁾	52.85 \pm 10.03 ⁵⁾
血清组	50	3.6	2.62 \pm 0.16 ⁵⁾	71.96 \pm 13.61 ⁵⁾
	50	2.2	2.99 \pm 0.17	98.58 \pm 8.89 ⁵⁾
	50	1.3	3.31 \pm 0.34	129.98 \pm 40.90
	50	0.8	2.98 \pm 0.20	165.90 \pm 14.92

以所得的 IC_{50} 作为给药浓度, 重复了黄连解毒汤含药血清对 LPS 或 Poly(I: C) 刺激 RAW264. 7 细胞分泌 TNF- α , IFN- β 的影响, 如表 3 结果所示, 除 Poly(I: C) 刺激 TNF- α 分泌的结果外, 其余的抑制率均在 50% 以上。故在以后的实验中, 对 TLR3 TLR4 及其信号转导元件的实验, 分别使用 $2.4\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$ 和 $3.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$ 含药血清作为药物干预剂量。

3.2 黄连解毒汤含药血清对 TLR3, TLR4 及其下游信号转导通路细胞因子 mRNA 表达的影响 从表 4 数据可知, Poly(I: C) 引起 RAW264. 7 细胞 TLR3 mRNA 的高表达(与正常对照组比较, $P < 0.01$), 而对 TLR4 mRNA 表达无明显影响; LPS 引起 RAW 264. 7 细胞 TLR4 mRNA 的高表达(与正常对照组比较, $P < 0.01$), 而对 TLR3 mRNA 表达无明显影响; 佐证了 Poly(I: C) 是 TLR3 的特异性配体, LPS 是 TLR4 的特异性

配体的已有结论。

表 3 黄连解毒汤含药血清对 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 Influence of Huanglianjiadu Tang drug serum to TNF- α and IFN- β ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	给药剂量 ($g \cdot kg^{-1} \cdot U^{-1}$)	TNF- α (ng/mL)	抑制率 (%)	IFN- β (pg/mL)	抑制率 (%)
正常对照组	0	1.43 \pm 0.20	—	38.62 \pm 4.74	—
LPS 刺激组	0	5.00 \pm 0.27 ¹⁾	—	173.51 \pm 12.34 ¹⁾	—
黄连解毒汤+ LPS 刺激组	2.4	2.97 \pm 0.48 ³⁾	56.99	90.25 \pm 8.45 ³⁾	61.72
Poly(I:C) 刺激组	0	4.49 \pm 0.13 ¹⁾	—	149.03 \pm 11.34 ¹⁾	—
黄连解毒汤组+ Poly(I:C) 刺激组	3.0	4.41 \pm 0.29	2.73	88.52 \pm 6.49 ⁵⁾	54.80

注: 抑制率= (模型组数据- 给药组数据)/(模型组数据- 对照组数据) \times 100%。

LPS 和 Poly(I:C) 均可引起 RAW264.7 细胞 MyD88, TRAM, TRIF 等 mRNA 的高表达(与正常对照组比较, $P < 0.01$)。LPS 可引起 RAW264.7 细胞 TRAF-6 mRNA 的高表达(与正常对照组比较, $P < 0.01$), 而 Poly(I:C) 未引起 TRAF-6 mRNA 的高表达。

黄连解毒汤含药血清能显著降低 LPS 诱导的 TLR4 及其胞内信号转导元件 MyD88, TRAF-6, TRAM

等 mRNA 的高表达, 也抑制 TRIF mRNA 的高表达(与 LPS 刺激组比较, $P < 0.01$), 但不能降低 Poly(I:C) 诱导的 MyD88 mRNA 的高表达。

黄连解毒汤含药血清不能抑制 Poly(I:C) 诱导的 TLR3 及其胞内信号转导元件 MyD88 mRNA 表达增强, 但可抑制 TRAM 和 TRIF mRNA 的高表达。

表 4 黄连解毒汤含药血清对 Toll 样受体及其下游信号转导通路 mRNA 的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 4 Influence of Huanglianjiadu Tang drug serum to the mRNA expression of Toll-like receptors and downstream signaling transduction pathway elements($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	给药剂量 ($g \cdot kg^{-1} \cdot U^{-1}$)	TLR3	TLR4	MyD88	TRAF-6	TRAM	TRIF
正常对照组	0	1.02 \pm 0.23	1.02 \pm 0.23	1.02 \pm 0.25	1.03 \pm 0.26	1.03 \pm 0.28	1.04 \pm 0.34
LPS 刺激组	0	1.23 \pm 0.29	2.23 \pm 0.22 ¹⁾	3.13 \pm 0.67 ¹⁾	9.45 \pm 1.43 ¹⁾	3.25 \pm 0.68 ¹⁾	5.15 \pm 0.39 ¹⁾
LPS+ 含药血清组	2.4	1.09 \pm 0.26	1.99 \pm 0.21 ²⁾	2.56 \pm 0.24 ²⁾	7.07 \pm 1.58 ³⁾	2.13 \pm 0.28 ³⁾	3.20 \pm 0.52 ³⁾
Poly(I:C) 刺激组	0	3.64 \pm 0.80 ¹⁾	1.15 \pm 0.14	2.91 \pm 0.37 ¹⁾	1.22 \pm 0.25	5.54 \pm 0.97 ¹⁾	4.21 \pm 0.59 ¹⁾
Poly(I:C)+ 含药血清	3.0	3.37 \pm 0.57	1.16 \pm 0.12	2.67 \pm 0.44	1.20 \pm 0.19	3.49 \pm 0.54 ⁵⁾	3.50 \pm 0.52 ⁴⁾

3.3 黄连解毒汤含药血清对 TLR3, TLR4 蛋白表达的影响 已知 TLR3, TLR4 mRNA 表达量的高低反映了 TLR3, TLR4 基因的转录活性, 从 mRNA 到 TLR3, TLR4 蛋白形成需经翻译、修饰过程, mRNA 高表达并不完全等同于特定蛋白质量的增高。为此, 以 Western blotting 方法检测了 LPS 和 Poly(I:C) 刺激 RAW264.7 细胞后的 TLR3, TLR4 蛋白表达, 以及黄连解毒汤含药血清对其表达的影响。结果见表 5, 图 1~ 2, Poly(I:C) 特异性引起 RAW264.7 细胞 TLR3 蛋白的高表达(与正常对照组比较, $P < 0.01$); 而 LPS 则特异性引起 RAW264.7 细胞 TLR4 蛋白的高表达(与正常对照组比较, $P < 0.01$)。

黄连解毒汤可显著降低 LPS 诱导的 TLR4 蛋白的高表达, 而对 Poly(I:C) 诱导的 TLR3 蛋白表达的

无显著影响。本结果与黄连解毒汤对 TLR3, TLR4 mRNA 的影响相一致。

表 5 黄连解毒汤含药血清对 RAW264.7 细胞 TLR3、TLR4 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Influence of Huanglianjiadu Tang drug serum to the expression of TLR3 and TLR4($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	给药剂量 ($g \cdot kg^{-1} \cdot U^{-1}$)	TLR3 (灰度值)	TLR4 (灰度值)
正常对照组	0	0.866 \pm 0.079	0.776 \pm 0.071
LRS 刺激组	0	0.794 \pm 0.080	1.002 \pm 0.105 ¹⁾
LPS+ 含药血清组	2.4	—	0.838 \pm 0.089 ²⁾
Poly(I:C) 刺激组	0	1.528 \pm 0.148 ¹⁾	0.737 \pm 0.030
Poly(I:C)+ 含药血清组	3.0	1.471 \pm 0.128	—

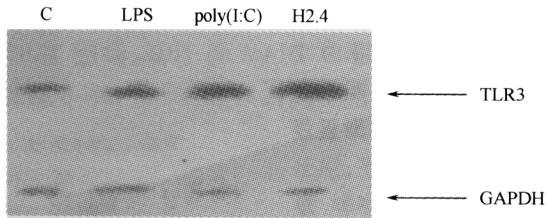


图 1 黄连解毒汤含药血清对 TLR3 蛋白表达的影响

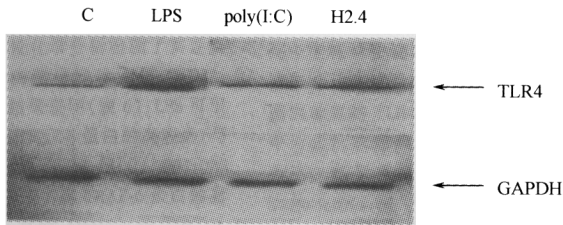


图 2 黄连解毒汤含药血清对 TLR4 蛋白表达的影响

3.4 黄连解毒汤含药血清对 MyD88, TRAF-6 蛋白表达的影响 以细胞荧光免疫化学分析检测了黄连解毒汤含药血清对 TLR 胞内信号转导元件 MyD88, TRAF-6 蛋白表达的影响, 结果表明(表 6): LPS 可引起 RAW264.7 细胞 MyD88, TRAF-6 蛋白的高表达(与正常对照组比较, $P < 0.01$), 而 Poly(I:C) 对 MyD88 蛋白的表达有增强作用, 但未引起 TRAF-6 蛋白的高表达。

黄连解毒汤含药血清显著降低 LPS 诱导的 MyD88 和 TRAF-6 蛋白的高表达(与 LPS 刺激组比较, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但对 Poly(I:C) 诱导的 MyD88 蛋白的高表达则无明显影响。

表 6 黄连解毒汤含药血清对 RAW264.7 细胞 MyD88、TRAF-6 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Influence of Huanglianjiedu Tang drug serum to the expression of MyD88 and TRAF-6 proteins($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	给药剂量		MyD88	TRAF-6
	($g \cdot kg^{-1}$)	(U^{-1})		
正常对照组	0		15.082 \pm 1.750	16.070 \pm 1.110
LPS 刺激组	0		19.870 \pm 1.709 ¹⁾	20.575 \pm 1.836 ¹⁾
LPS+ 含药血清组	2.4		15.570 \pm 1.242 ³⁾	17.987 \pm 0.892 ²⁾
Poly(I:C) 刺激组	0		20.205 \pm 0.965 ¹⁾	17.207 \pm 0.904
Poly(I:C) + 含药血清组	3.0		19.743 \pm 0.957	17.023 \pm 0.770

4 讨论

免疫系统的基本功能是识别外源性抗原, 并诱

导机体产生一系列反应, 清除外源致病性物质, 以保持机体的稳定, 如外源性致病因子过多或致病性过强, 或机体反应过度, 又能造成机体损伤。作为先天性免疫始动环节, 识别外源微生物分子模式的 TLR, 保持其适当活性, 成为当前维护健康、防治疾病的重要靶标, 受到国际医药生物界的瞩目。如 TLR4 的数量或反应性过低, 不能诱导机体产生一系列免疫反应, 不能清除外源性致病物质, 可能引起流感、过敏、哮喘等, 国外现已以上述疾病为靶标, 发现了一些 TLR4 的激动剂; 如 TLR4 的反应过度, 则可导致败血症、内毒素休克、风湿性关节炎等, 也已发现了一些用以治疗这些疾病的 TLR4 拮抗剂, 有的正在进行临床试验^[6]。

黄连解毒汤源于唐代《外台秘要》, 是清热泻火的名方, 常用于败血症、脓毒血症和各种感染。为进一步探讨其功效的免疫学基础, 以细胞免疫系统中的重要构成——巨噬细胞为载体, 为摒除药物粗制剂中非特异性物质在体外系统中的干扰, 用含药血清作为药物试验的应用形式, 选择主要识别 G⁻ 性细菌内毒素的 TLR4 型受体和识别病毒感染、增殖过程中形成的病毒双链 RNA 的 TLR3 型受体, 以观察其作用。结果表明, 黄连解毒汤能抑制 LPS 诱导的 TLR4 mRNA 和 TLR4 蛋白的高表达, 对 Poly(I:C) 诱导的 TLR3 受体高表达则无明显影响, 提示它能阻断 TLR4 的生物合成, 作用类似于 TLR4 的拮抗剂。

已有资料表明, TLR4 被激动以后, 可通过两条胞内信号转导途径作用于炎症基因和干扰素诱导基因的转录: (1) MyD88 依赖途径, 也是主要途径, 即 TLR4 受体被激动后, 其胞内部分募集接头蛋白 MyD88 \rightarrow 激活 TRAF-6 \rightarrow 激活 IKK \rightarrow 激活 NF- κ B \rightarrow 启动炎症细胞因子相关基因的转录 \rightarrow 产生和分泌 TNF- α 等。(2) MyD88 非依赖途径, 即 TLR4 受体被激动后, 其胞内部分依次募集接头蛋白 TRAM 和 TRIF \rightarrow 激活 TRAF-6, RIP1 或 TBK1 \rightarrow 分别激活 NF- κ B 或 IRF-3 \rightarrow 启动 NF- κ B 相关的后期基因或干扰素诱导基因的转录, 产生和分泌白介素或干扰素等。由于我们在探讨 LPS 激动 TLR4 受体及其胞内信号转导元件的 mRNA 表达, 以及黄连解毒汤含药血清对它们的影响, 是在同一批细胞提取的样本上检测的, LPS 刺激后的相应指标的 mRNA 表达相对量比值有一定可比性, 从所得数据似乎可以看出, LPS 刺激后, TLR-4 mRNA 表达比正常增加 1 倍, MyD88 和

TRAM 增加 2 倍, TRIF 增加 4 倍, TRAF-6 增加 8 倍左右, 似呈现级联放大现象; 而黄连解毒汤含药血清对这些信号转导元件 mRNA 高表达的抑制率依次为 19.8%, 27.0%, 28.3%, 50.5% 和 47.4.1%。这些结果提示, 黄连解毒汤含药血清对 TLR4 的两条胞内信号转导通路都有抑制作用, 而以对 MyD88 非依赖性通路的抑制作用为强。

TLR3 被激动后, 主要为 MyD88 非依赖性转导途径, 近来也发现它有 MyD88 依赖性途径。黄连解毒汤含药血清不能抑制 Poly(I:C) 诱导的 TLR3 mRNA, TLR3 蛋白的高表达, 也不能抑制 MyD88 高表达和 TNF- α 的分泌, 说明它对 TLR3 及其 MyD88 依赖性信号转导途径无明显影响; 但它对 MyD88 非依赖途径上的 TRAM 和 TRIF mRNA 高表达以及 IFN- β 分泌, 与 TLR4 信号通路上相似, 有显著抑制作用, 提示黄连解毒汤含药血清对 TRAM 和 TRIF 有直接作用。

从本实验的结果分析, 给我们有如下印象: 黄连解毒汤能阻断 TLR4 高表达, 阻断 TLR4 胞内信号转导的 MyD88 依赖和非依赖两条途径(以阻断非依赖途径为主), 抑制相关基因表达产物 TNF- α , IFN- β 过

度分泌, 具有 TLR4 拮抗剂样作用。黄连解毒汤也可直接作用于接头蛋白 TRAM 和 TRIF, 影响 TLR3 信号转录的 MyD88 非依赖性途径, 抑制 IFN- β 的过度分泌。

[参考文献]

- [1] 谭毓治, 彭旦明, 肖舜玲, 等. 九个方剂对大鼠实验性发热的影晌[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(5): 306-309.
- [2] 邝枣园, 刘倩娴. 黄连解毒汤对细胞因子的影响[J]. 辽宁中医杂志, 1999, 29(8): 38-39.
- [3] 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): 62-65.
- [4] 赵保胜, 李兰芳, 马悦颖, 等. 参苏饮含药血清对小鼠巨噬细胞 Toll 样受体及其下游信号转导通路的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 327-331.
- [5] 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[J]. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(4): 342-345.
- [6] Foldes G., Won Haehling S., Anker SD.: Toll-like receptor modulation in cardiovascular disease: a target for intervention [J]. Expert Opin Invest. Drugs, 2006, 15(8): 857-871.