

基于核因子- κ B通路研究复方柴芩退热颗粒 对脂多糖介导细胞炎症模型的作用

李洁, 蔡妙珊, 李智勇

(广东省第二中医院, 广东 广州, 510095)

[摘要] 目的:研究复方柴芩退热颗粒对脂多糖介导炎症细胞模型的作用。方法:建立脂多糖介导 RAW264.7 细胞炎症模型,分为空白组,模型组,复方柴芩退热颗粒高、中、低浓度组,分别使用复方柴芩退热颗粒高、中、低剂量(21.12、10.56、5.28mg/mL)进行药物干预培养。酶联免疫法检测细胞培养上清液肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白介素(IL)-1 β 、IL-6及IL-10的含量。蛋白印迹法检测核转录因子(NF)- κ B P-I κ B表达水平。结果:复方柴芩退热颗粒高、中、低浓度组TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平均显著低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),且呈浓度依赖性降低;IL-10水平均显著高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但无浓度依赖性,其中复方柴芩退热颗粒高、中浓度组IL-10水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。复方柴芩退热颗粒高、中、低浓度组P-I κ B表达水平均显著低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),且呈浓度依赖性降低。结论:复方柴芩退热颗粒具有显著抗炎作用,不仅能够显著降低LPS诱导细胞炎症模型P-I κ B及TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达,同时还能升高IL-10的水平,其作用机制可能通过抑制I κ B的磷酸化而阻断NF- κ B信号通路有关。

[关键词] 柴芩退热颗粒;核转录因子- κ B;脂多糖;细胞炎症模型

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.07.078

Effect of compound Chaikin Tuire granules on the cell model of lipopolysaccharide-mediated inflammation based on the nuclear factor- κ B pathway

LI Jie, CAI Miao-shan, LI Zhi-yong

(Guangdong Second Provincial Traditional

Chinese Medicine Hospital, Guangzhou 510095, Guangdong, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of compound Chaikin Tuire granules on the cell model of lipopolysaccharide-mediated inflammation. Methods: RAW264.7 cells were used to establish a model of lipopolysaccharide-mediated inflammation. The cells were divided into blank group, model group, and high-, medium-, and low-concentration compound Chaikin Tuire granule groups, which were cultured with high-, medium-, and low-dose compound Chaikin Tuire granules (21.12, 10.56, and 5.28 mg/ml, respectively). ELISA was used to measure the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-10 (IL-10) in cell supernatant, and Western blot was used to measure the expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) P-I κ B. Results: Compared with the model group, the high-, medium-, and low-concentration compound Chaikin Tuire granule groups had significantly lower levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 ($P < 0.05$) with reductions in a concentration-dependent manner and a significantly higher level of IL-10 ($P < 0.05$) without concentration dependence, while there was no significant difference in the level of IL-10 between the high- and medium-concentration compound Chaikin Tuire granule groups ($P > 0.05$). The high-, medium-, and low-concentration compound Chaikin Tuire granule groups had significantly lower expression of P-I κ B than the model group ($P < 0.05$) with reductions in a concentration-dependent manner. Conclusion: Compound Chaikin Tuire granules have a marked anti-inflammatory effect and can significantly reduce the expression of P-I κ B, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 and increase the level of IL-10 in a cell model of lipopolysaccharide-induced inflammation, possibly by inhibiting the phosphorylation of P-I κ B and blocking the NF- κ B signaling pathway.

Key words: Chaikin Tuire granule; nuclear factor- κ B; lipopolysaccharide; cell inflammation model

儿童社区获得性肺炎(CAP)是临床常见的呼吸系统疾病之一,流行病学研究认为,细菌感染是我国儿童CAP的常见病原体之一,以流感嗜血杆菌、肺炎链球菌为主,其他尚有葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌等^[1]。由于儿童处于生长发育阶段,氨基糖苷类、四环素类及喹诺酮类等抗生素均受限制或禁止使用,头孢菌素和青霉素类药物为治疗细菌感染CAP的重要治疗手段,但是,耐药问题一直困扰着抗感染药物的管理。因此,寻求新型、可靠、有效的治疗手段成为目前的热点。复方柴芩退热颗粒(Chai Qin Mixture, CQM)功能清热利肺,对儿童急性上呼吸道感染具有显著疗效^[2]。前期动物实验^[3]表明,该方对2,4-二硝基苯酚及细菌内毒素所致的大鼠模型具有退热降温的作用,其机制则与减少大鼠前列腺素2、白介素(Interleukin, IL)-1 β 和肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor, TNF)- α 血清含量相关。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁上的主要组成成分,机体对LPS的识别与转导是自身防御反应的重要环节。巨噬细胞在由细菌触发的炎症性疾病中发挥介导作用。本文通过研究复方柴芩退热颗粒对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞的作用,为中医药治疗儿童CAP提供基础依据。现将实验结果报告如下。

1 实验材料

1.1 实验细胞 小鼠单核巨噬细胞(小鼠RAW 264.7细胞),购自中国科学院细胞库。

1.2 药物与试剂 实验药物主要包括复方柴芩退热颗粒(生产商:广东省第二中医院制剂室)。实验试剂主要包括澳洲胎牛血清(生产商:美国Gibco公司;规格:500mL/瓶)、高糖培养基(生产商:美国Cellgro公司;规格:500mL/瓶)、脂多糖(生产商:美国Sigma公司)、P-I κ B单克隆抗体(生产商:英国Abcam公司)、蛋白定量分析试剂盒(生产商:美国Thermo公司)、蛋白裂解液(生产商:上海贝博生物有限公司)、IL-1 β 、IL-6、IL-10酶联免疫(ELISA)试剂盒(生产商:上海贝博生物有限公司,规格:96T/套)、TNF- α ELISA试剂盒(生产商:上海贝博生物有限公司,规格:48T/套)。

1.3 主要仪器 二氧化碳培养箱由日本Sanyo公司生产,蛋白电泳仪、蛋白转膜仪由美国Bio-Rad公司生产,5424小型离心机由德国Eppendorf公司生产,倒置显微镜由日本Olympus公司生产,全波长多功能酶标仪由美国Thermo公司生产,数控金属浴由美国Labnet公司生产,5200多功能成像系统由上海天能科技有限公司生产。

2 实验方法

2.1 RAW264.7细胞的培养 细胞复苏:常规取出存放于液氮中的RAW264.7细胞,置于37.0℃水浴中解冻后转入离心管,加入含10%胎牛血清的培养基5mL,以1200r/min离心5min。细胞培养:离心后重悬,取 1.0×10^5 个/mL接种于细胞培养瓶中,以37.0℃、5.0% CO₂的条件进行细胞培养。细胞传代:待细胞生长至(75.0 $\pm$ 5.0)%融合时,使用一次性细胞刮刀进行细胞脱壁,含10%胎牛血清的培养基

重悬,调节至 1.0×10^5 个/mL接种于细胞培养瓶中,以37.0℃、5.0% CO₂的条件进行细胞培养;每12h换液1次,(48.0 $\pm$ 12.0)h传代1次,传代稳定2~3代后用于实验^[4]。

2.2 RAW 264.7炎症细胞模型的建立 取传代稳定和生长良好的RAW264.7细胞,调整细胞悬液浓度至 1×10^6 个/孔与 1×10^4 个/孔,分别接种至6孔板与96孔内,以37.0℃、5.0% CO₂的条件进行细胞培养24h。取出后弃去上清液,PBS清洗2次,分别在6孔板与96孔板的每孔中加入含有10 μ g/mL浓度LPS的培养基150 μ L与1.5mL,放回培养箱后,继续以37.0℃、5.0% CO₂的条件进行细胞培养12h,模型建立完成。

2.3 分组与给药 随机分为空白组,模型组,复方柴芩退热颗粒高、中、低浓度组(以下简称高、中、低浓度组),共5组,每组设3复孔。分别给予含有21.12mg/mL、10.56mg/mL、5.28mg/mL的培养基干预,空白组与模型组则加入等体积的培养基培养。其中,6孔板每孔加入总液量为2000 μ L,96孔板每孔加入总液量为200 μ L。

2.4 检测方法 (1)酶联免疫法。采用酶联免疫法(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)检测给药干预3h后96孔板内细胞上清液TNF- α 的浓度。采用ELISA检测给药干预12h后96孔板内细胞上清液IL-1 β 、IL-6、IL-10的浓度水平。其中,检测波长选择570nm与450nm,制备标准曲线,OD值进行换算,OD=OD_{450nm}-OD_{570nm},操作步骤参考试剂盒说明书。(2)蛋白印迹法。采用蛋白印迹法(Western Blot, WB)检测^[5]给药干预12h后6孔板内细胞NF- κ B p65的表达水平。具体方法:①洗涤。将6孔板置于冰盒上,吸去旧培养基,预冷的PBS清洗3次,微量加样器尽量残留液。②裂解。每孔加入含有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA裂解液100 μ L,置于4℃水平摇床上裂解30min。③刮取。使用一次性细胞刮刀刮取贴壁细胞,尽量以微量加样器将6孔板中的细胞及液体转移至1.5mL EP管中,以4℃ 13000r/min条件离心5min。④蛋白定量。BCA法测定蛋白浓度,检测波长选择562nm,BCA法操作步骤参考试剂盒说明书。⑤样品制备。取80 μ L蛋白样品置于EP管内,加入20 μ L 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,封口后瞬时离心,放入数控金属浴内孵育10min,使蛋白充分变性。⑥凝胶。SDS-PAGE法进行凝胶。其中,分离胶:浓缩胶=7.5:2.5,加样同时加入标志物;电泳的起始电压选择80V,恒定工作30min,溴酚蓝至分离胶后将电压调至120V,恒定工作60min,直至溴酚蓝达到底部结束。⑦转膜。凝胶转至PVDF膜,PVDF膜工作面积为5cm $\times$ 7cm,转膜时选择250mA恒定电流模式工作60min。⑧孵育。根据标志物及预设分子量进行分离,以TBST洗涤3次后,放入封闭液进行封闭,置于室温水平摇床孵育60min。加入一抗(P-I κ B 1:1000),置于4℃水平摇床上孵育过夜。而后TBST洗涤3次,加入二抗(兔抗1:3000),置于室温水平摇床上孵育60min,TSBT洗涤3次,每次10min。⑨显影。加入ECL发

光显色液,置于成像系统收集显色条带。

2.5 统计学方法 采用 Image J 软件进行灰度值分析,相应蛋白相对表达量 = 相应蛋白表达量灰度值/β-actin 表达量灰度值。采用 SPSS 20.0 进行数据整理与统计分析。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异比较采用单因素方差分析,假定方差齐用 Bonferroni 法,未假定方差齐用 Games-Howell 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 对 LPS 诱导炎症细胞模型生长影响 LPS 给药孵育后,RAW 264.7 细胞呈生长抑制状态,部分细胞出现脱落漂浮现象。而复方柴芩退热颗粒高、中、低浓度组干预孵育后,RAW 264.7 细胞仍能生长。(见图 1)

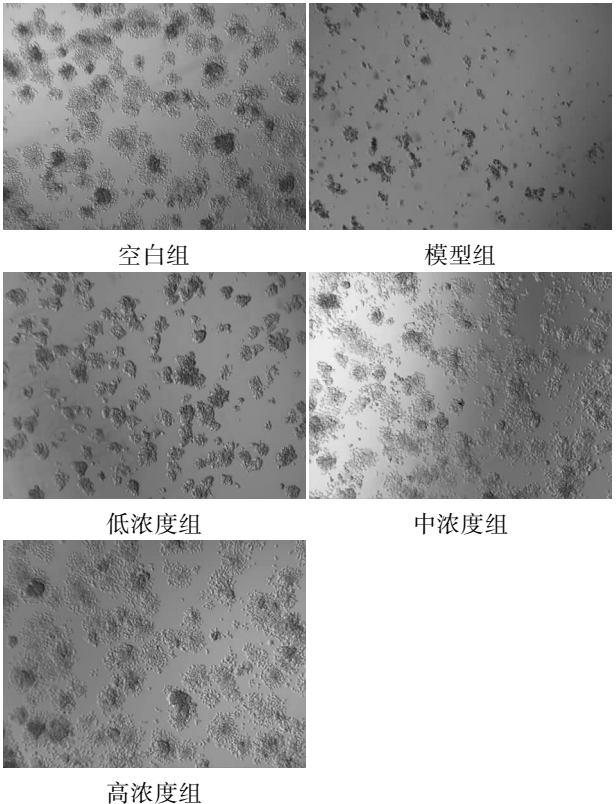


图 1 对 LPS 诱导炎症细胞模型生长的影响(200 ×)

3.2 对 LPS 诱导炎症细胞模型 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10 水平的影响 与空白组相比,模型组及高、中、低浓度组 TNF-α 水平均显著上升,差异有统计学意义;高、中、低浓度组 TNF-α 水平均显著低于模型组,差异有统计学意义,且呈浓度依赖性降低。与空白组相比,模型组及高、中、低浓度组 IL-1β、IL-6 水平均显著上升,差异有统计学意义;高、中、低浓度组 IL-1β、IL-6 水平均显著低于模型组,差异有统计学意义,且呈浓度依赖性降低。与空白组相比,模型组及高、中、低浓度组 IL-10 水平均显著下降,差异有统计学意义;高、中、低浓度组 IL-10 水平均显著高于模型组,差异有统计学意义,但无浓度依赖性。(见表 1)

表 1 对 LPS 诱导炎症细胞模型 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10 水平的影响($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	TNF-α	IL-1β	IL-6	IL-10
空白组	3	149.67 ± 16.26	14.00 ± 2.45	24.90 ± 6.51	46.31 ± 6.74
模型组	3	791.33 ± 35.17 ^a	77.18 ± 7.17 ^a	81.52 ± 8.74 ^a	18.74 ± 7.22 ^a
高浓度组	3	346.48 ± 34.18 ^{ab}	34.21 ± 5.77 ^{ab}	41.16 ± 6.14 ^{ab}	39.66 ± 6.82 ^{ab}
中浓度组	3	461.63 ± 46.53 ^{ab}	54.95 ± 9.59 ^{ab}	56.18 ± 4.62 ^{ab}	37.43 ± 5.79 ^{ab}
低浓度组	3	549.65 ± 39.44 ^{ab}	60.08 ± 6.92 ^{ab}	73.89 ± 5.06 ^{ab}	26.53 ± 5.48 ^{ab}

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

3.3 对 LPS 诱导炎症细胞模型 NF-κB P-IκB 表达量的影响 与空白组相比,模型组及中、低浓度组 P-IκB 表达水平均显著上升,差异有统计学意义,而 CQM 高浓度组 P-IκB 表达水平与空白组比较,差异无统计学意义。高、中、低浓度组 P-IκB 表达水平均显著低于模型组,差异有统计学意义,且呈浓度依赖性降低。(见图 2、表 2)



图 2 对 LPS 诱导炎症细胞模型 NF-κB P-IκB 的影响

表 2 对 LPS 诱导炎症细胞模型 NF-κB P-IκB 表达量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P-IκB 表达量
空白组	3	0.288 ± 0.005
模型组	3	0.860 ± 0.020 ^a
高浓度组	3	0.296 ± 0.014 ^{bc}
中浓度组	3	0.331 ± 0.005 ^{ac}
低浓度组	3	0.428 ± 0.012 ^{ac}

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$,^b $P > 0.05$;与模型组比较,^c $P < 0.05$ 。

4 讨论

病原谱比例研究表明,发达国家 CAP 可明确病原约在 85% 左右,我国东部沿海发达地区则有 76% 左右可明确病原。其中,单纯细菌感染占 20%,细菌合并病毒混合感染占 8.48%,细菌合并肺炎支原体感染占 7%^[6]。由此可见,单纯使用抗生素治疗无法覆盖 CAP 的可明确病原,需要更多手段配合方可提高整体疗效。直接抑制或杀灭病原体以及提高机体自身免疫力是目前治疗的可靠方法。中医学认为“正气存内,邪不可干”,在祛除毒邪之余,应注重顾护正气,以防乘虚而入,侵袭脏腑。

复方柴芩退热颗粒是课题组的临床验方,临床研究^[7]表明,该方能显著改善病毒引起的急性上呼吸道感染患儿的临床症状,在退热、鼻咽部症状等方面具有显著治疗作用。动物实验表明,复方柴芩退热颗粒对 2,4 二硝基苯酚及细菌内毒素所致 SD 大鼠模型具有显著降温作用,同时还能降低其血清 PGE₂、IL-1β 及 TNF-α 含量。目前研究^[8]证明, NF-κB 信号通路参与了 LPS 诱导的炎症因子的产生,为 LPS 介导巨噬细胞炎症反应的中心环节。PGE₂ 的产生控制促炎细胞因子在 LPS 介导巨噬细胞活化中的作用。IκB 是

NF- κ B 通路的抑制因子, LPS 刺激作用可导致 I κ B 发生磷酸化成为活性状态的 P-I κ B, 导致 NF- κ B 持续活化并引起炎症因子 TNF- α 与 IL-6 的合成增加。结合本研究结果, 模型组 P-I κ B 的表达量明显高于对照组, 而加入复方柴芩退热颗粒干预后, P-I κ B 表达量呈剂量依赖性减少, 提示复方柴芩退热颗粒可能通过抑制 I κ B 的磷酸化而阻断 NF- κ B 信号通路以实现抑炎作用。另外, 本研究结果还表明, 复方柴芩退热颗粒能明显降低 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 的含量水平, 且呈剂量依赖性降低。IL-6 是促炎细胞因子之一^[9], 在病原侵袭情况下, 在 TNF 及 IL-1 的作用下, 由单核-巨噬细胞及内皮细胞生成。TNF- α 出现较早, 提示炎症急性期的发生, 而 IL-6 稍晚出现, 提示炎症的发展及加重。由此可见, 复方柴芩退热颗粒能够干预 LPS 介导细胞炎症的发生发展, 复方柴芩退热颗粒具有抑炎作用。IL-10 是经典抑炎因子^[10], 可抑制 T 辅助细胞 1 分泌炎症因子。本研究结果则表明, 复方柴芩退热颗粒能够显著升高 IL-6 的含量水平, 但其不呈现剂量依赖性增加, 这可能与机体的动态平衡相关。已有研究证明, 在感染疾病模型中 IL-10 发挥经典免疫抑制作用, 但在慢性炎症性疾病如克罗恩病中, 超过一定浓度的 IL-10 会介导负向调节作用, 促进干扰素及炎症标志物新蝶呤的表达。由此可见, 实现 IL-10 的动态平稳对于控制炎症表现更具意义。

综上所述, 复方柴芩退热颗粒能够显著降低 LPS 诱导细胞炎症模型 P-I κ B 及相应炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达, 同时还能升高 IL-10 的水平, 其作用可能与

通过抑制 I κ B 的磷酸化而阻断 NF- κ B 信号通路有关。

参考文献

- [1] 谢庆玲, 甄宏, 唐晓燕, 等. 儿童社区获得性肺炎细菌病原学特点分析研究[J]. 中国临床新医学, 2014, 7(12): 1101-1106.
- [2] 李洁. 柴芩退热颗粒的制备工艺研究[J]. 按摩与康复医学, 2017, 8(6): 56-58.
- [3] 李洁, 杨萍, 李绍强, 等. 复方柴芩退热颗粒对发热大鼠模型退热作用的研究[J]. 新中医, 2017, 49(10): 20-24.
- [4] 肖新华, 廖二元, 董源媛, 等. 小鼠单核细胞 RAW264.7 的细胞生物学特征[J]. 南华大学学报: 医学版, 2008(3): 282-285.
- [5] 代艳文, 袁丁, 万静枝, 等. 竹节参总皂苷通过 NF- κ B 通路对 LPS 致 RAW264.7 细胞炎症的保护作用研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 2076-2080.
- [6] 章云霞, 李文斌. 儿童社区获得性肺炎病原菌分布及其药敏结果分析[J]. 中国医药导报, 2014, 11(3): 39-41.
- [7] 许娟, 杨萍, 李洁, 等. 复方柴芩退热颗粒治疗儿童急性上呼吸道感染的疗效观察 30 例[J]. 按摩与康复医学, 2017, 8(14): 50-52.
- [8] Laura AS, Michael JM. The I κ B kinase complex: master regulator of NF- κ B signaling[J]. Immunol Res, 2008, 42(1): 3.
- [9] 侯小飞, 高方友. IL-6 跨信号转导作用与其相关疾病的研究进展[J]. 海南医学, 2016, 27(16): 2667-2670.
- [10] 郭锦锦, 孙万邦. IL-10 受体及其信号转导研究进展[J]. 临床医学工程, 2012, 19(1): 135-137.

(收稿日期: 2017-04-18)

调治便秘 中医给你支妙招——食疗药膳

(1) 热秘。表现为大便干结、排便困难, 伴口干口臭、面红心烦。宜通便泻热。可选生军茶, 取生大黄(别名生军)4g, 以沸水冲泡 5min, 加白糖适量调味, 代茶频饮, 每天 1~2 次。(2) 冷秘。表现为大便艰涩、排出困难, 伴腹部冷痛、不喜按压、手足不温, 或有恶心呕吐等。宜温里通便。可选薤白粥, 取薤白 10~15g(鲜者 30~50g), 与粳米 100g 同煮成粥, 温食, 每天 1~2 次。(3) 气秘。表现为大便干结或不甚干结, 欲便不得或便而不爽, 伴腹胀肠鸣、胸胁胀闷等。宜行气通便。可用木香槟榔粥, 取木香、槟榔各 5g 水煎留汁, 入粳米 100g 煮粥, 粥将熟时加冰糖适量, 稍煎化开即可, 温食, 每天 1~2 次。(4) 气虚秘。表现为大便并不干硬, 虽有便意但排便困难, 用力努挣则汗出短气, 伴精神不振、身疲乏力。宜行气通便。可用牛髓膏, 取人参、山药、桃仁、杏仁各 60g, 核桃肉 90g 研为细末, 牛髓 90g 放入铁锅内, 加热溶化, 再加入蜂蜜 240g 熬炼, 煮沸后滤去滓, 加入药末, 用竹片不断搅拌, 至黄色为度, 候冷, 瓷器盛装备用, 用时每次 5~10g, 空腹嚼食。(5) 血虚秘。表现为大便干结、排便不畅, 伴面色无华、头晕失眠。宜养血通便。可用奶蜜饮, 取黑芝麻 25g 捣烂, 用煮好的牛奶、蜂蜜各 50mL 调匀, 清晨空腹饮用。(6) 阴虚秘。表现为大便干结、状如羊屎, 伴形体消瘦、口干口苦。宜养阴通便。可用桑椹、地黄蜜膏, 取桑椹 500g、生地黄 200g 水煎 2 次, 合并煎液, 再以小火煎熬浓缩至较稠黏时, 加蜂蜜 1 倍, 至沸停火, 待冷装瓶备用, 每次 1 汤匙, 沸水冲化服, 每天 2 次。(7) 阳虚秘。表现为大便干或不干、排解困难, 伴面色青白、畏寒肢冷。宜温润通便。可用锁蓉羊肉面, 取锁阳、肉苁蓉各 5g 水煎留汁, 待凉, 取面粉 200g, 以药汁合面做面条, 用羊肉汤煮面, 加葱、盐等调味即成, 作主食或点心食用。(http://www.cntcm.com.cn/yskp/2018-06/29/content_46341.htm)