

# 黄芩苷对脂多糖诱导的巨噬细胞 Toll样受体 4表达的影响

李岩<sup>1</sup>, 李明<sup>2</sup>, 李建婷<sup>1</sup>, 陈伟强<sup>2</sup>, 孙继贤<sup>1</sup>, 邝枣园<sup>1</sup>

(1 广州中医药大学基础医学院微生物学与寄生虫学教研室, 广东省广州市 510006)

2 广东药学院基础学院病理生理学教研室, 广东省广州市 510006)

[关键词] 黄芩苷; 巨噬细胞; Toll样受体 4 抑制蛋白 KB 脂多糖

[摘要] 目的 研究黄芩苷对脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞 Toll样受体 4和其下游信号分子抑制蛋白 KB以及效应分子肿瘤坏死因子  $\alpha$ 表达的影响。方法 分别用脂多糖(终浓度 1 mg/L)或脂多糖+黄芩苷(终浓度 10、50和 100  $\mu$ mol/L)处理生长良好的小鼠巨噬细胞 RAW 264 7, 逆转录聚合酶链反应和 Western Blot检测细胞 Toll样受体 4表达情况和抑制蛋白 KB含量变化, 酶联免疫吸附法检测细胞上清液中肿瘤坏死因子  $\alpha$ 的浓度。结果 脂多糖刺激 RAW 264 7细胞可导致 Toll样受体 4表达增高, 促进抑制蛋白 KB降解, 上调肿瘤坏死因子  $\alpha$ 表达; 黄芩苷预处理能降低脂多糖诱导的 Toll样受体 4表达增高, 降低抑制蛋白 KB降解, 下调肿瘤坏死因子  $\alpha$ 分泌。结论 黄芩苷可通过抑制 Toll样受体 4表达和降低抑制蛋白 KB降解, 影响 Toll样受体 4/抑制蛋白 KB核因子 KB炎症信号途径, 阻碍炎症因子肿瘤坏死因子  $\alpha$ 的生成, 发挥抗炎作用, 这可能是其抗动脉粥样硬化的作用机制之一。

[中图分类号] R392

[文献标识码] A

## Baicalin Attenuates Toll-like Receptor 4 Expression in Lipopolysaccharide-Treated Macrophage Cells

LI Yan<sup>1</sup>, LIMing<sup>2</sup>, LI Jian-Ting<sup>1</sup>, CHEN Wei-Qiang<sup>2</sup>, SUN Ji-Xian<sup>1</sup>, and KUANG Zao-Yuan<sup>1</sup>

(1 Department of Microbiology and Parasitology, School of Basic Medical Science, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 2 Department of Pathophysiology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[KEY WORDS] Baicalin; Macrophage Cell; Toll-Like Receptor 4; Inhibitor of Kappa B; Lipopolysaccharide

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of baicalin on the expression of toll-like receptor 4 (TLR4), inhibitor of KB (I-KB), and the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in macrophage cells RAW 264 7 induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** RAW 264 7 cells were cultured in vitro and treated with different concentration of baicalin in the presence or absence of LPS. The mRNA and protein expression of TLR4 were determined by reverse transcription PCR and Western Blot respectively. The expression of I-KB was detected by Western Blot. The concentrations of TNF- $\alpha$  in the supernatant was determined by enzyme linked immunosorbent assay. **Results** LPS significantly up-regulated the expression of TLR4 and production of TNF- $\alpha$  in macrophage cells and markedly inhibited the expression of I-KB. Pretreated with baicalin down-regulated LPS-induced TLR4 expression in both mRNA and protein levels as well reduced the secretion of TNF- $\alpha$ . Baicalin significantly inhibited the degradation of I-KB. **Conclusion** Baicalin might effectively down-regulate TNF- $\alpha$  production in LPS-induced macrophage cells through inhibiting the expression of TLR4 and degradation of I-KB. The antiinflammation effects may be associated with the amelioration of atherosclerosis damage by baicalin.

黄芩苷是从黄芩的干燥根中提取的一种黄酮类物质, 研究证实它能抑制小鼠动脉粥样硬化 (As) 斑块的形成, 具有抗 As 作用<sup>[1,2]</sup>。Toll样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4)作为介导天然免疫和获得性免疫的主要受体, 与 As 关系密切。TLR4突变小鼠高胆固醇喂养不发生 As<sup>[3]</sup>; 而激活大鼠 TLR4

可促进 As 斑块的形成<sup>[4]</sup>。氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL)、脂多糖等都可通过激活 TLR4 促进 As 的发生发展<sup>[5]</sup>。本研究通过观察黄芩苷对脂多糖诱导的巨噬细胞 TLR4 和其下游信号分子抑制蛋白 KB (inhibitor of KB, I-KB) 以及效应分子肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 分泌的影响, 从 TLR4 信号通路探讨黄芩苷抗 As 的作用机制。

[收稿日期] 2009-08-31 [修回日期] 2009-11-02

[基金项目] 广东省高校重点培养青年教师基金 (K5090005); 广州中医药大学 211 工程师资建设专项基金 (A1033002)

[作者简介] 李岩, 博士, 讲师, 研究方向为炎症与心血管疾病的关系及中医药干预, Email 为 ly506@163.com。李明, 博士, 讲师, 研究方向为天然免疫与炎症。通讯作者邝枣园, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为感染性疾病的发生机制及中医药干预。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂与仪器

黄芩苷 (四川广汉市维康植化有限公司, 含量

90 8%), 脂多糖 (美国 Sigma 公司), TNF- $\alpha$  ELISA 检测试剂盒 (美国 R&D 公司), Trizol (美国 Invitrogen 公司), 两步法 RT-PCR 试剂盒、引物 (大连 Takara 公司), ECL 化学发光试剂盒 (美国 Pierce 公司), 抗 I- $\kappa$ B、TLR4 和  $\beta$ -actin 抗体 (美国 Santa Cruz 公司), PCR 仪 (美国 Perkinelmer 公司), 紫外凝胶成像系统、蛋白电泳仪、电转仪、杂交箱和酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 1.2 细胞培养及干预实验

小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 细胞由本室保存。用 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、 $1 \times 10^5$  U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素) 5% CO<sub>2</sub>、37°C 条件下传代培养。取生长状态良好的 RAW 264.7 细胞, 0.25% 胰酶消化, 台盼蓝染色鉴定细胞活率  $\geq 95\%$ , 调整细胞浓度为  $1 \times 10^9$  /L, 接种到 24 孔培养板内, 每孔 1 mL, 待细胞生长至 80% 汇合状态后, 用 PBS 清洗 2 次, 更换培养液, 按以下分组分别进行刺激实验: 正常对照组, 加入等体积的 PBS; ④黄芩苷组, 加入终浓度 100  $\mu$ mol/L 的黄芩苷; ④脂多糖组, 加入终浓度 1 mg/L 的脂多糖; 黄芩苷 + 脂多糖组, 先加入 10 (低剂量组)、50 (中剂量组) 和 100  $\mu$ mol/L (高剂量组) 黄芩苷孵育 1 h 后, 再加入 1 mg/L 脂多糖刺激。根据实验要求在相应时间点取细胞或培养上清进行后续实验。

## 1.3 逆转录聚合酶链反应检测巨噬细胞 Toll 样受体 4 mRNA 的表达

各组细胞加入相应刺激物后继续培养 8 h, 用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 为 1.8~2.0 证实 RNA 纯度符合 RT-PCR 反应要求。以总 RNA 为模板, 用 Oligo-d(T) 18 为引物逆转录合成第一链 cDNA, 特异性引物分别扩增 TLR4 和  $\beta$ -actin。TLR4 引物序列为上游 5'-GGT GGC TGT GGA GAC AAA AT-3', 下游 5'-AAT TCC CTG AAA GGC TTG GT-3', 扩增长度 286 bp。  $\beta$ -actin 引物序列为上游 5'-TGA ACC CTA AGG CCA ACC-3', 下游 5'-CCA CAG GAT TCC ATA CCC-3', 扩增长度 489 bp。 PCR 条件为 94°C 预变性 4 min, 94°C 变性 45 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共循环 30 次, 最后 72°C 延伸 5 min。1.5% 琼脂糖电泳 PCR 产物, 用 Quantity One 软件分析 TLR4 与  $\beta$ -actin 的 PCR 产物灰度值, 以二者比值来表示 TLR4 mRNA 的相对表达量。

## 1.4 Western Blot 检测 Toll 样受体 4 和抑制蛋白 $\kappa$ B 蛋白的表达

RAW 264.7 细胞加入刺激物后继续培养 24 h, 以

冰冷的 PBS 终止刺激, 用细胞刮子将细胞刮下, 5 000 r/min 离心洗涤细胞 2 次, 提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取 50  $\mu$ g 样品煮沸变性后进行 SDS-PAGE 电泳 (5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶), 转膜, 5% 的脱脂奶粉 37°C 封闭 1 h, 加抗 TLR4、I- $\kappa$ B 或  $\beta$ -actin 单克隆抗体, 4°C 孵育过夜, 洗膜, 加辣根过氧化物酶标记的相应二抗稀释液 (1:3 000) 37°C 孵育 1 h, ECL 法显影, 分析条带灰度值, 以目的条带与  $\beta$ -actin 条带的灰度比值来表示蛋白相对表达量。

## 1.5 酶联免疫吸附法检测肿瘤坏死因子 $\alpha$ 浓度

RAW 264.7 细胞加入黄芩苷和脂多糖后继续培养 24 h, 收集各处理组细胞培养上清液, 用 ELISA 试剂盒检测上清液中 TNF- $\alpha$  的含量。操作步骤按试剂盒说明书完成。

## 1.6 统计学方法

所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件对实验结果进行 Student's *t* 检验分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 黄芩苷对 Toll 样受体 4 mRNA 和蛋白表达的影响

RT-PCR 结果显示, 在无外源性刺激的情况下巨噬细胞 TLR4 mRNA 表达极低, 单独加入黄芩苷对其表达无显著影响。脂多糖可以上调巨噬细胞 TLR4 mRNA 表达, 而在脂多糖刺激前加入黄芩苷进行预处理, 可以显著抑制脂多糖诱导的 TLR4 mRNA 增高 (图 1 和表 1)。Western Blot 结果显示, 脂多糖能上调 TLR4 蛋白表达, 黄芩苷预处理能降低脂多糖诱导的 TLR4 蛋白表达 (图 1 和表 1)。

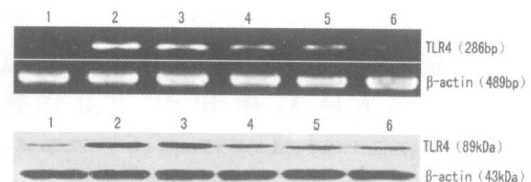


图 1 黄芩苷抑制脂多糖诱导的巨噬细胞 Toll 样受体 4 mRNA (上图) 和蛋白 (下图) 的表达 1 为对照组, 2 为脂多糖组, 3 为脂多糖 + 低剂量黄芩苷组, 4 为脂多糖 + 中剂量黄芩苷组, 5 为脂多糖 + 高剂量黄芩苷组, 6 为黄芩苷组。

### 2.2 黄芩苷对抑制蛋白 $\kappa$ B 蛋白表达的影响

Western Blot 结果显示, 脂多糖诱导下巨噬细胞

I- $\kappa$ B 被降解;脂多糖刺激前用黄芩苷预处理可抑制 I- $\kappa$ B 降解,上调胞浆内 I- $\kappa$ B 含量,与脂多糖组比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ ),说明黄芩苷能抑制 I- $\kappa$ B 降解,阻碍脂多糖引起的巨噬细胞核因子  $\kappa$ B 信号途径活化。脂多糖 + 高剂量黄芩苷组抑制作用最强,与其他两组比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ ,图 2 和表 1)。

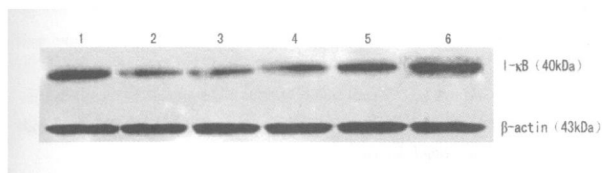


图 2 黄芩苷抑制脂多糖诱导的巨噬细胞抑制蛋白  $\kappa$ B 的降解 1 为对照组,2 为脂多糖组,3 为脂多糖 + 低剂量黄芩苷组,4 为脂多糖 + 中剂量黄芩苷组,5 为脂多糖 + 高剂量黄芩苷组,6 为黄芩苷组。

表 1 黄芩苷对巨噬细胞 Toll 样受体 4 mRNA 和蛋白表达以及抑制蛋白  $\kappa$ B 降解的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

分 组	TLR4 mRNA	TLR4 蛋白	I- $\kappa$ B 蛋白
对照组	0.153 $\pm$ 0.040	0.120 $\pm$ 0.036	1.093 $\pm$ 0.110
黄芩苷组	0.192 $\pm$ 0.097	0.193 $\pm$ 0.035	1.063 $\pm$ 0.118
脂多糖组	0.783 $\pm$ 0.076 <sup>a</sup>	0.793 $\pm$ 0.100 <sup>a</sup>	0.367 $\pm$ 0.080 <sup>a</sup>
脂多糖 + 低剂量黄芩苷组	0.590 $\pm$ 0.100 <sup>c</sup>	0.683 $\pm$ 0.114 <sup>b</sup>	0.473 $\pm$ 0.104 <sup>b</sup>
脂多糖 + 中剂量黄芩苷组	0.467 $\pm$ 0.080 <sup>c</sup>	0.383 $\pm$ 0.129 <sup>b</sup>	0.517 $\pm$ 0.070 <sup>b</sup>
脂多糖 + 高剂量黄芩苷组	0.377 $\pm$ 0.103 <sup>cd</sup>	0.340 $\pm$ 0.174 <sup>b</sup>	0.810 $\pm$ 0.091 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比; b 为  $P < 0.05$ ,c 为  $P < 0.01$ ,与脂多糖组比; d 为  $P < 0.01$ ,与脂多糖 + 低剂量黄芩苷组比。

### 2.3 黄芩苷对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 生成的影响

ELISA 结果显示,在正常情况下巨噬细胞 RAW 264.7 培养上清中 TNF- $\alpha$  含量很低,100  $\mu$ mol/L 黄芩苷不影响细胞 TNF- $\alpha$  表达。1 mg/L 脂多糖刺激可以显著促进 RAW 264.7 细胞 TNF- $\alpha$  合成。不同浓度黄芩苷预处理均能显著抑制脂多糖诱导的 TNF- $\alpha$  表达,与脂多糖组比较差异有显著性 ( $P < 0.01$ );黄芩苷不同浓度组间比较差异也具有显著性,说明黄芩苷呈浓度依赖性抑制脂多糖诱导的 TNF- $\alpha$  分泌(表 2)。

## 3 讨论

1999 年, Ross 提出关于 As 发病的“炎症学说”,明确提出炎症是 As 的主要发病机制之一<sup>[6]</sup>。随后的研究证实 ox-LDL、多种致病微生物(如肺炎衣原体、巨细胞病毒、幽门螺杆菌)和革兰氏阴性杆菌及其脂多糖等各种 As 危险因子,都可以导致血管内皮

表 2 黄芩苷对巨噬细胞肿瘤坏死因子  $\alpha$  生成的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

分 组	肿瘤坏死因子 $\alpha$ (ng/L)
对照组	249.17 $\pm$ 69.02
黄芩苷组	303.33 $\pm$ 59.22
脂多糖组	7707.33 $\pm$ 582.16 <sup>a</sup>
脂多糖 + 低剂量黄芩苷组	6611.83 $\pm$ 414.36 <sup>b</sup>
脂多糖 + 中剂量黄芩苷组	5535.00 $\pm$ 543.87 <sup>b</sup>
脂多糖 + 高剂量黄芩苷组	3250.00 $\pm$ 269.15 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ ,与脂多糖组比较。

损伤,刺激巨噬细胞、内皮细胞活化,产生 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素 1 (IL-1)、血管内皮舒张因子 (NO)、前列腺素 (PG) 等多种炎症介质,促进 As 斑块的形成和发展<sup>[7,8]</sup>。天然免疫受体 TLR4 是 ox-LDL 和脂多糖的主要受体之一,在 As 相关炎症反应中发挥重要作用。TLR4 主要分布在血管内皮细胞、单核巨噬细胞和树突状细胞表面,在 As 斑块局部 TLR4 表达增加<sup>[9]</sup>。体外研究证实 ox-LDL 和脂多糖可以上调 TLR4 的表达,同时作为 TLR4 的配体激活 TLR4,通过一系列胞内信号转导过程,启动多种与炎症反应相关的基因转录,促进 As 的形成<sup>[5]</sup>。脂多糖还可以通过 TLR4 诱导基质金属蛋白酶 9 和蛋白水解酶表达,降解细胞外基质,引发 As 斑块不稳定<sup>[10]</sup>。动物实验发现激动 TLR4 可以刺激大鼠 As 斑块的形成和血管外膜重构<sup>[4]</sup>,而 TLR4 基因突变的 C3H/HeJ 小鼠高脂饮食不能诱发 As 斑块<sup>[3]</sup>。来自流行病学的研究进一步证实了 TLR4 在 As 中的作用,具有 Asp299Gly TLR4 基因多态性的人 As 发生率降低,其 IL-6、血管细胞黏附因子 1 (VCAM-1) 等炎症因子表达降低,说明 TLR4 介导的炎症反应在 As 中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。TLR4 激活后主要通过 MyD88 依赖的途径活化核因子  $\kappa$ B 引起炎症因子分泌。在无外界刺激情况下核因子  $\kappa$ B 与其抑制蛋白 I- $\kappa$ B 结合,使核因子  $\kappa$ B 以无活性三聚体形式存在于细胞浆。当 TLR4 激活后,可以激活 I- $\kappa$ B 激酶,降解 I- $\kappa$ B,核因子  $\kappa$ B 被活化进入细胞核,引起下游炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 表达,从而促进 As 的形成。本实验中显示脂多糖可以上调巨噬细胞 RAW 264.7 TLR4 信号分子表达,导致 I- $\kappa$ B 降解,从而活化核因子  $\kappa$ B 信号引起 TNF- $\alpha$  表达增加,与其他研究者结果一致<sup>[12]</sup>。

黄芩苷是清热解毒中药黄芩的主要药效成分,对脓毒症休克小鼠和急性肺损伤大鼠有保护效果,具有抗炎、抗氧化、抗病毒和抑制变态反应等作

用<sup>[13]</sup>。我们发现黄芩苷具有抗As效应,可以降低肺炎衣原体感染的高脂饮食小鼠As斑块面积,提高斑块稳定性,并证实其作用与保护血管内皮细胞有关<sup>[1,14]</sup>。马珺等<sup>[2]</sup>在家兔As模型中也得到了类似的结果,并推测调节血脂和抑制炎症反应与黄芩苷抗As作用有关。本研究中我们观察了黄芩苷对巨噬细胞TLR4和其下游信号分子I-κB以及效应分子TNF-α表达的影响,结果表明黄芩苷可以抑制脂多糖介导的TLR4表达增高,同时减弱脂多糖诱导的TLR4信号途径激活,抑制I-κB降解,降低TNF-α表达,因此我们推测黄芩苷可能通过影响TLR4/I-κB-核因子κB信号途径,抑制炎症反应,从而发挥抗As作用。

#### [参考文献]

- [1] 刘煜德, 吴伟, 王嵩, 等. 肺炎衣原体对主动脉粥样硬化斑块的形成及稳定性的影响及黄芩苷的干预作用 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17 (2): 2377-379
- [2] 马珺, 吴晓东. 黄芩苷对动脉粥样硬化家兔的保护作用及其机制 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13 (2): 188-194
- [3] Shi W, Haberland ME, Jien ML, et al. Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice [J]. *Circulation*, 2000, 102 (1): 75-81
- [4] Vink A, Schoneveld AH, van deMeer JJ, et al. In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions [J]. *Circulation*, 2002, 106 (15): 1985-990
- [5] 耿小勇, 陈一文, 秦明照. Toll样受体4在动脉粥样硬化中的作用研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (1): 78-80
- [6] Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease [J]. *Am Heart J*, 1999, 138 (5 Pt 2): S419-420
- [7] 陈瑗, 周玫. 氧化应激-炎症在动脉粥样硬化发生发展中作用研究的新进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (10): 757-762
- [8] 陈鹏, 戴敏. 脂多糖对动脉粥样硬化血管内皮细胞及其信号转导通路的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (6): 495-498
- [9] Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, et al. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation [J]. *Circulation*, 2002, 105 (10): 1158-161
- [10] Grenier D, Grignon L. Response of human macrophage-like cells to stimulation by *Fusobacterium nucleatum* ssp. *nucleatum* lipopolysaccharide [J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2006, 21 (3): 190-196
- [11] Boekhout SM, Agema WR, Peters RJ, et al. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events [J]. *Circulation*, 2003, 107 (19): 2416-421
- [12] Yang H, Young DW, Gusovsky D, et al. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4 MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1 [J]. *J Bio Chem*, 2000, 275 (27): 20861-866
- [13] Huang KL, Chen CS, Hsu CW, et al. Therapeutic effects of baicalin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats [J]. *Am J Chin Med*, 2008, 36 (2): 301-311
- [14] 黄玲, 朱锦锦, 邝枣园, 等. 黄芩苷对TNF-α诱导血管内皮细胞损伤的影响 [J]. 中药药理与临床, 2008 (2): 13-16

(此文编辑 许雪梅)