

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-12-1212-07

## 甘草查尔酮 A 对 THP-1 巨噬细胞促炎因子表达的影响 ——依赖于 TLR-4/NF- $\kappa$ B 炎症信号通路

龙小琴<sup>1</sup>, 戴应和<sup>1</sup>, 袁经权<sup>1,2</sup>, 易 蔚<sup>1</sup>

(1.广西中医药大学药学院,广西南宁市 530001;2.广西药用植物研究所,广西南宁市 530023)

[关键词] 甘草查尔酮 A; THP-1 细胞; Toll 样受体 4; 核因子  $\kappa$ B

[摘要] 目的 探讨甘草查尔酮 A(Lico A)对脂多糖(LPS)诱导的人急性单核细胞白血病细胞株(THP-1)巨噬细胞相关炎症因子表达的影响。方法 用 100  $\mu$ g/L 佛波酯(PMA)诱导 THP-1 细胞 48 h,使其分化为巨噬细胞后,分为空白组、LPS 组和 LPS + 不同浓度 Lico A 组(20、10、5 mg/L)。用酶联免疫吸附法检测细胞培养液中白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的含量,实时定量 PCR 检测 Toll 样受体 4(TLR-4)和核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) mRNA 水平,采用 Western blot 检测 TLR-4、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B 激酶(IKK $\alpha$ )、磷酸化 IKB- $\alpha$ (p-IKB- $\alpha$ )、环氧合酶 2(COX-2)和一氧化氮合酶(iNOS)蛋白表达水平。结果 LPS 诱导 THP-1 巨噬细胞后,IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高,Lico A 可降低 LPS 诱导引起的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达水平升高。LPS 刺激后 TLR-4 mRNA 及蛋白表达增加,NF- $\kappa$ B 活化,Lico A 可拮抗以上作用,阻止 NF- $\kappa$ B 活化。结论 Lico A 可通过 TLR-4/NF- $\kappa$ B 通路抑制 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞炎症反应。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effect of licochalcone A on expression of proinflammatory cytokines in THP-1 macrophages --Dependent on the TLR-4/NF- $\kappa$ B inflammatory signaling pathway

LONG Xiao-Qin<sup>1</sup>, DAI Ying-He<sup>1</sup>, YUAN Jing-Quan<sup>1,2</sup>, YI Wei<sup>1</sup>

(1.College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530001, China; 2.Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning, Guangxi 530023, China)

[KEY WORDS] Licochalcone A; THP-1 cells; Toll-like receptor-4; Nuclear factor kappa B

[ABSTRACT] Aim To investigate the effects of licochalcone A(Lico A)on the expression of inflammatory cytokines in macrophages of human acute monocytic leukemia cell line (THP-1) induced by lipopolysaccharide (LPS) in vitro.

Methods 100  $\mu$ g/L phorbol ester (PMA) was used to induce THP-1 cells for 48 hours, after the differentiation of THP-1 cells, which became macrophage, and cells were divided into control group, LPS group and LPS combined with concentration (20, 10, 5 mg/L) of Lico A. The levels of interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) were detected by ELISA. The levels of Toll like receptor-4(TLR-4) and nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) mRNAs were tested by real-time PCR. The levels of TLR-4, NF- $\kappa$ B, I kappa B kinase alpha (IKK $\alpha$ ), phosphorylated IKB-alpha (p-IKB- $\alpha$ ), cyclooxygenase-2 (COX-2) and isoform of nitric oxide synthase (iNOS) proteins were examined by Western blot.

Results The expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 were up-regulated in the v macrophages after stimulated by LPS, Lico A could reduce the elevated expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 induced by LPS. The expression of TLR-4 significantly increased after stimulated by LPS and NF- $\kappa$ B was activated. Lico A could reverse the above changes and prevent the activation of NF- $\kappa$ B.

Conclusion Lico A could inhibit LPS-induced inflammatory response in THP-1 macrophages via TLR-4/NF- $\kappa$ B pathway.

[收稿日期] 2017-04-13

[修回日期] 2017-06-16

[基金项目] 广西中药药效研究重点实验室开放项目(14-045-12)

[作者简介] 龙小琴,硕士研究生,研究方向为中药学中药药理,E-mail 为 longxiaoqin126@126.com。通讯作者袁经权,博士,研究员,研究方向为中药及天然药物。通讯作者易蔚,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向为中药与药膳的应用及开发,E-mail 为 1095706274@qq.com。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种多因素参与,且发病机制极为复杂的血管炎症性疾病<sup>[1]</sup>。研究表明,血管壁胆固醇蓄积和炎症反应是As发生发展的两个关键环节,也是造成冠状动脉疾病发病和死亡的主要原因<sup>[2]</sup>。近年来,研究发现巨噬细胞释放的白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-1 beta, IL-1 $\beta$ )、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )等炎症因子协同参与、相互诱导,促进As的发生发展,形成恶性循环<sup>[3]</sup>。炎症因子与As的发生和恶化有着密切的关系,因此,抑制炎症因子是改善As疾病恶化的重要途径。

甘草作为中国传统中药,具有清热解毒,缓急止痛,补脾益气,祛痰止咳等功效。大量研究表明,甘草具有抑制平滑肌细胞增殖、保护血管内膜、稳定斑块、调节脂质、抗炎、抗氧化、调节免疫等作用<sup>[6]</sup>,常用于治疗包括As在内的各种炎症疾病<sup>[4-5]</sup>。甘草查尔酮A(licochalcone A, Lico A)是一种酚类查尔酮化合物,是甘草主要活性成分之一。目前国内外研究表明,Lico A具有抗炎<sup>[7]</sup>、抗氧化<sup>[8]</sup>、抗肿瘤<sup>[9]</sup>、免疫促进<sup>[10]</sup>等多种生物活性,对As的防治有益。然而,关于Lico A是否能抑制Toll样受体4(Toll like receptor-4, TLR-4),从而抑制核因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)信号通路减少炎症因子分泌,目前尚未明确。为了探讨甘草查尔酮A抑制THP-1巨噬细胞促炎因子表达是否依赖于TLR-4/NF- $\kappa$ B炎症信号通路,本研究用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激人急性单核细胞白血病(THP-1)细胞源性巨噬细胞分泌促炎因子(如IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ ),再观察Lico A对促炎因子释放的影响,并探讨其机制。

# 1 材料和方法

## 1.1 细胞株

人急性单核细胞白血病细胞株(THP-1细胞株),购自中国医学科学院基础研究所细胞中心。

## 1.2 主要试剂和仪器

高糖 RPMI 1640 培养基、青霉素链霉素混合液、PCR 试剂盒、RNA 提取试剂盒、cDNA 反转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司);胎牛血清(北京圣马元亨生物科技公司);佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、脂多糖(LPS)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(Sigma 公司);引物(上海生工生物工程有限公司)Tween 20(美国 Fluka 公司);IL-

1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、ELISA 检测试剂盒(武汉华美生物科技有限公司);高灵敏度化学发光检测试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、5 $\times$  loading buffer、BCA 蛋白定量试剂盒、哺乳动物组织蛋白抽提试剂、辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔抗体、辣根过氧化物酶偶联山羊抗小鼠抗体(北京康为世纪生物科技有限公司);PVDF 膜(美国 Millipore 公司);IKK $\alpha$ 、p-IkB- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、TLR-4 等抗体(美国 Santa Cruz 公司)。5410 型二氧化碳培养箱(NAPCO, 美国);MQX200 型酶标仪(Bio-Tek, 美国);BCN-1360 型生物洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司);CKX41 倒置荧光显微镜(Olympus, 日本);Labofuge 400R 离心机(Heraeus, 德国);EDC-810 PCR 扩增仪(东胜)。

## 1.3 THP-1 细胞培养

将 THP-1 细胞接种在含有 10%FBS RPMI 1640 完全培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养。根据文献[11]报道,将 THP-1 细胞重悬以  $1\times 10^5$  个/L 接种于 6 孔板内,每孔加入 1 mL,置于 37 $^{\circ}$ C 孵育箱分别培养 12 h 后,加入终浓度为 100  $\mu$ g/L PMA(用含有 10% FBS RPMI 1640 完全培养基稀释),作用 48 h 诱导分化为巨噬细胞。

## 1.4 受试药物

本实验所用 Lico A 由天津中兴新药有限公司提供,货号 58749-22-7,高效液相色谱含量分析和化学结构见图 1,纯度>98%。

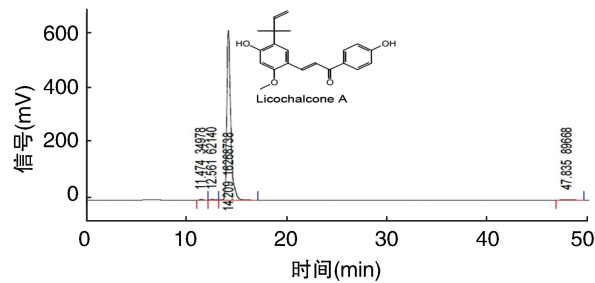


图 1. Lico A 化学结构及高效液相色谱含量分析  
Figure 1. Chemical structure of Lico A, purity above determined by HPLC

## 1.5 MTT 法检测不同浓度 Lico A 对 THP-1 分化的巨噬细胞增殖的影响

取 Lico A 原粉 10 mg 加 DMSO 4 mL 充分溶解(且 DMSO 的最终浓度不超过 19%),配制成 2500 mg/L 母液,密封后-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。离心收集对数生长期 THP-1 细胞,  $1\times 10^5$  个/孔接种于

96 孔板 (100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ), 重复 5 孔, 加入 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  PMA 孵育 THP-1 细胞 48 h, 使其分化为巨噬细胞; 去除培养上清, 加入 RPMI 1640 培养基洗涤 2 次, 洗去未贴壁 THP-1 细胞, 然后加入用 RPMI1640 完全培养液溶解 Lico A (5、10、20、40、80  $\text{mg}/\text{L}$ ), 每个浓度设 5 个复孔。在培养 24 h 后, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  5  $\text{g}/\text{L}$  MTT, 继续孵育 4 h, 弃上清液, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  DMSO, 轻振荡混匀, 10 min 后, 酶标仪测定每孔在 540 nm 处的吸光度 (OD 值), 观察 Lico A 对 THP-1 分化的巨噬细胞增殖的影响。

#### 1.6 ELISA 检测不同浓度、不同时效 Lico A 对 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞炎症因子分泌的影响

根据 MTT 检测结果将细胞分为 5 组: 空白组、模型组 (LPS 1  $\text{mg}/\text{L}$ )、低 Lico A 组 (Lico A 5  $\text{mg}/\text{L}$  + LPS 1  $\text{mg}/\text{L}$ )、中 Lico A 组 (Lico A 10  $\text{mg}/\text{L}$  + LPS 1  $\text{mg}/\text{L}$ )、高 Lico A 组 (Lico A 20  $\text{mg}/\text{L}$  + LPS 1  $\text{mg}/\text{L}$ )。离心收集对数生长期 THP-1 细胞,  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 96 孔板 (100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ), 重复 5 孔, 加入 160  $\mu\text{g}/\text{L}$  PMA 孵育 THP-1 细胞 48 h, 使其分化为巨噬细胞; 去除培养上清, 加入 RPMI 1640 培养基洗涤 2 次, 洗去未贴壁 THP-1 细胞, 然后加入用在上述各组药物, 空白对照加等量的 RPMI1640 完全培养液。在培养 12、24、48 h 后, 收集细胞上清液,  $-80^\circ\text{C}$  冰箱储存备用。每次检测前从冰箱前取出样本, 置于室温环境中充分冻融混匀, 严格参照 ELISA 试剂盒操作说明测定 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量。

#### 1.7 实时定量 PCR 检测 Lico A 对 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞 TLR-4、NF- $\kappa\text{B}$ mRNA 表达水平的影响

将 THP-1 巨噬细胞接种于培养瓶中, 同 1.6 方法分组处理后, 对细胞总 RNA 提取并反转录合成 cDNA, 扩增。严格按照试剂步骤进行实验操作。TLR-4 引物序列上游: 5'-TAA CGG ATT CCG GAA TCC CTG A-3', 下游: 5'-CGA TTA AGG TAA AGT CCA GA-3'; NF- $\kappa\text{B}$  引物序列上游: 5'-TCA AGC CTA AGG CCT TAA GG-3', 下游: 5'-GAA CCT GGC AAT CCT GAA GA-3'<sup>[12]</sup>。依照操作步骤在每孔依次加入 1  $\mu\text{L}$  cDNA, 25  $\mu\text{L}$   $2 \times \text{Mix}$ 、3' 和 5' 端引物 (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$  以及无菌水 19  $\mu\text{L}$ 。通过 PCR 仪进行反应, 每组 5 个平行样品。反应条件:  $95^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $97^\circ\text{C}$  30 s,  $65^\circ\text{C}$  20 s,  $72^\circ\text{C}$  30 s, 35 个循环;  $72^\circ\text{C}$  延伸 7 min。采用实时定量 PCR 实验中样本基因的 Ct 值。通过  $\beta\text{-actin}$  的 Ct 值均一化, 即  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{样本}} - \text{Ct}_{\text{内参}}$ , 而样本基因 mRNA 相对丰度值以  $\Delta\Delta\text{Ct}$  值表示,  $\Delta\Delta\text{Ct} = 2^{-\Delta\text{Ct}}$ 。

#### 1.8 Lico A 对 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞中 TLR-4、NF- $\kappa\text{B}$ 、IKK $\alpha$ 、p-IKB- $\alpha$ 、COX-2 和 iNOS 蛋白表达水平的影响

参照文献[13], 同 1.6, 将 5 组细胞诱导分化、加药处理, 培养 24 h, 收集处理好的细胞, 加细胞裂解液,  $4^\circ\text{C}$  低温 12000  $\text{r}/\text{min}$  离心 10 min。对裂解的细胞总蛋白上清液, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 将各组蛋白浓度调到同一水平。制备 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离胶, 每孔加蛋白样品, 经电泳后通过半干式电转仪将分离的蛋白转到硝酸纤维素滤膜上。将膜用 5% 脱脂牛奶含有 0.1% 吐温 20 (TBST) 在摇床上封闭 2 h, 加入一抗后  $4^\circ\text{C}$  下孵育过夜, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min; 加入二抗之后, 放在摇床孵育 2 h, 用 TBST 洗 3 次, 每次 15 min, 后加入发光显色剂 ECL 显色, 应用凝胶成像系统扫描分析蛋白条带灰度, 计算各蛋白条带与内参  $\beta\text{-actin}$  的比值。

#### 1.9 统计学分析

应用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 各组数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用单因素方差分析, 两组间比较用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 PMA 诱导单核细胞分化巨噬细胞的结果

图 2 显示, 单核细胞 THP-1 未诱导前是悬浮细胞, 经 PMA 诱导 24 h 后, 细胞有伪足伸出, 并贴壁生长, 形状圆形变成椭圆形或梭型, 与文献[11]一致。

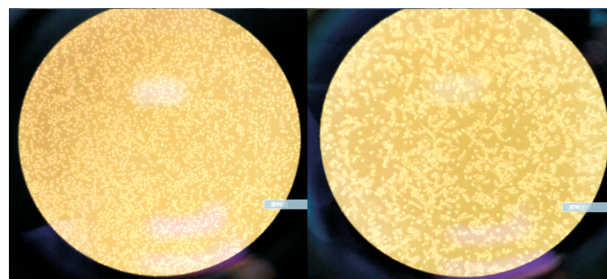


图 2. PMA 诱导单核细胞分化巨噬细胞的形态观察 ( $\times 40$ )

Figure 2. Morphological observation of macrophages induced by PMA in monocytes ( $\times 40$ )

#### 2.2 Lico A 对 THP-1 分化的巨噬细胞增殖的影响

由图 3 可知, Lico A 浓度在 5~20  $\text{mg}/\text{L}$  内对 THP-1 细胞的增殖均无抑制作用, 浓度  $\geq 40$   $\text{mg}/\text{L}$  时有一定抑制作用 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。故选择 Lico A 浓度 5~20  $\text{mg}/\text{L}$  用于后续试验研究。

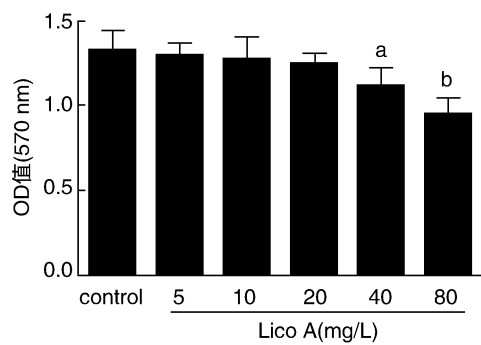


图 3. 不同浓度 Lico A 对 THP-1 分化的巨噬细胞增殖的影响 a 为  $P<0.05$ , b 为  $P<0.01$ , 与空白组比较。

Figure 3. Effect of different concentrations of Lico A on the proliferation of THP-1 differentiated macrophages

2.3 不同浓度 Lico A 作用不同时间对 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞炎症因子分泌的影响

由图 4 可知,与空白组比较,模型组 IL-1 $\beta$ 、IL-6

和 TNF- $\alpha$  水平明显升高 ( $P<0.01$ ),其含量随着时间的增加而增加 ( $P<0.01$ );与模型组比较,不同浓度 Lico A 组 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平均有所下降 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),且 Lico A 浓度越大,下降越明显,且 Lico A 处理时间越长,下降越明显。提示 Lico A 不仅可呈浓度依赖性抑制 THP-1 巨噬细胞炎症因子的分泌,也呈时间依赖性抑制 THP-1 巨噬细胞炎症因子的分泌。

2.4 Lico A 对 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞 TLR-4、NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平的影响

从图 5 可知,与空白组比较,模型组 TLR-4、NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平明显升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,不同浓度 Lico A 组 TLR-4、NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平均有所下降 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。提示 Lico A 可以抑制 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞 TLR-4、NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平。

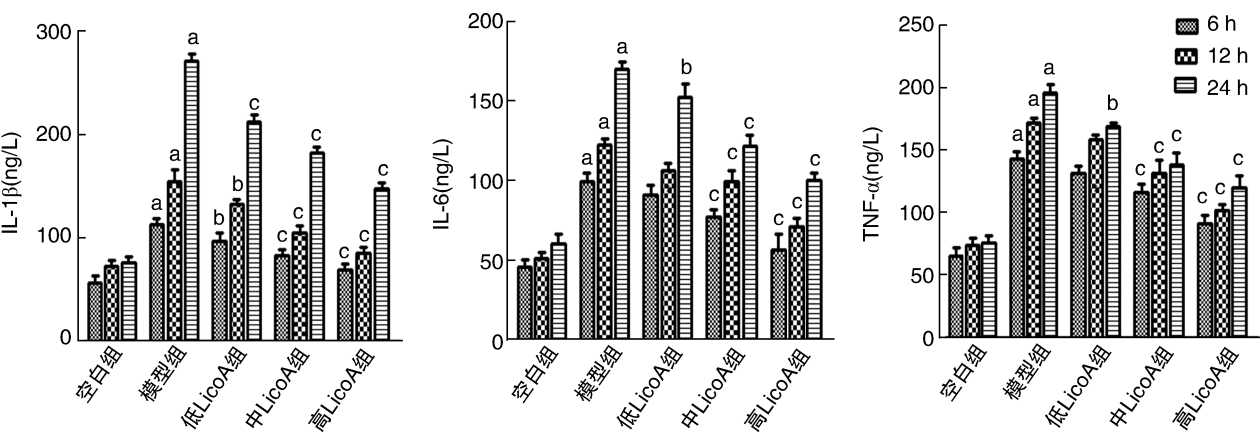


图 4. Lico A 对脂多糖诱导 THP-1 巨噬细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量的影响 ( $n=5$ ) a 为  $P<0.01$ , 与空白组比较; b 为  $P<0.05$ , c 为  $P<0.01$ , 与模型组比较。

Figure 4. Content of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in supernatant of LPS induced THP-1 macrophages by Lico A ( $n=5$ )

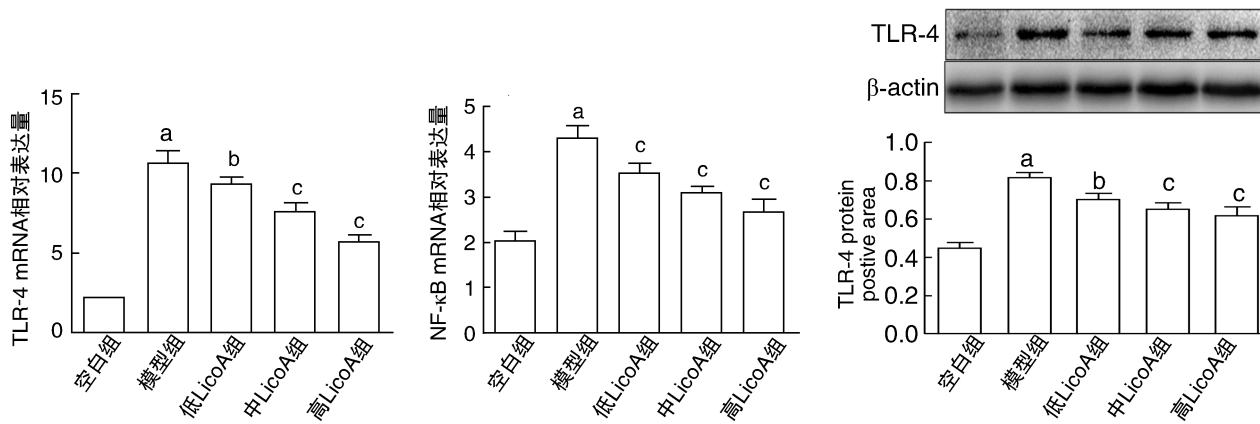


图 5. Lico A 对 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞 TLR-4 mRNA、NF- $\kappa$ B mRNA 和 TLR-4 蛋白表达水平的影响 ( $n=5$ ) a 为  $P<0.01$ , 与空白组比较; b 为  $P<0.05$ , c 为  $P<0.01$ , 与模型组比较。

Figure 5. Effects of Lico A on the expression of TLR-4 mRNA, NF- $\kappa$ B mRNA, and TLR-4 protein in THP-1 macrophages induced by LPS ( $n=5$ )

### 2.5 Lico A 对 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞 TLR-4 蛋白表达水平的影响

图 5 表明,与空白组比较,模型组 TLR-4 蛋白表达明显增加 ( $P<0.01$ );与模型组比较,不同浓度 Lico A 组能够降低 TLR-4 蛋白表达 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),提示 Lico A 可抑制 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞中 TLR-4 蛋白表达水平。

### 2.6 Lico A 对 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞 NF- $\kappa$ B、IKK $\alpha$ 、p-IKB- $\alpha$ 、COX-2 和 iNOS 蛋白表达水平的影响

图 6 表明,与空白组比较,模型组 NF- $\kappa$ B、IKK $\alpha$ 、p-IKB- $\alpha$ 、COX-2 和 iNOS 蛋白表达明显增加 ( $P<0.05$ );与模型组比较,不同浓度 Lico A 组能够降低 NF- $\kappa$ B、IKK $\alpha$ 、p-IKB- $\alpha$ 、COX-2 和 iNOS 蛋白表达 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),高剂量十分明显 ( $P<0.01$ ),提示 Lico A 可抑制 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞炎症性蛋白的表达。

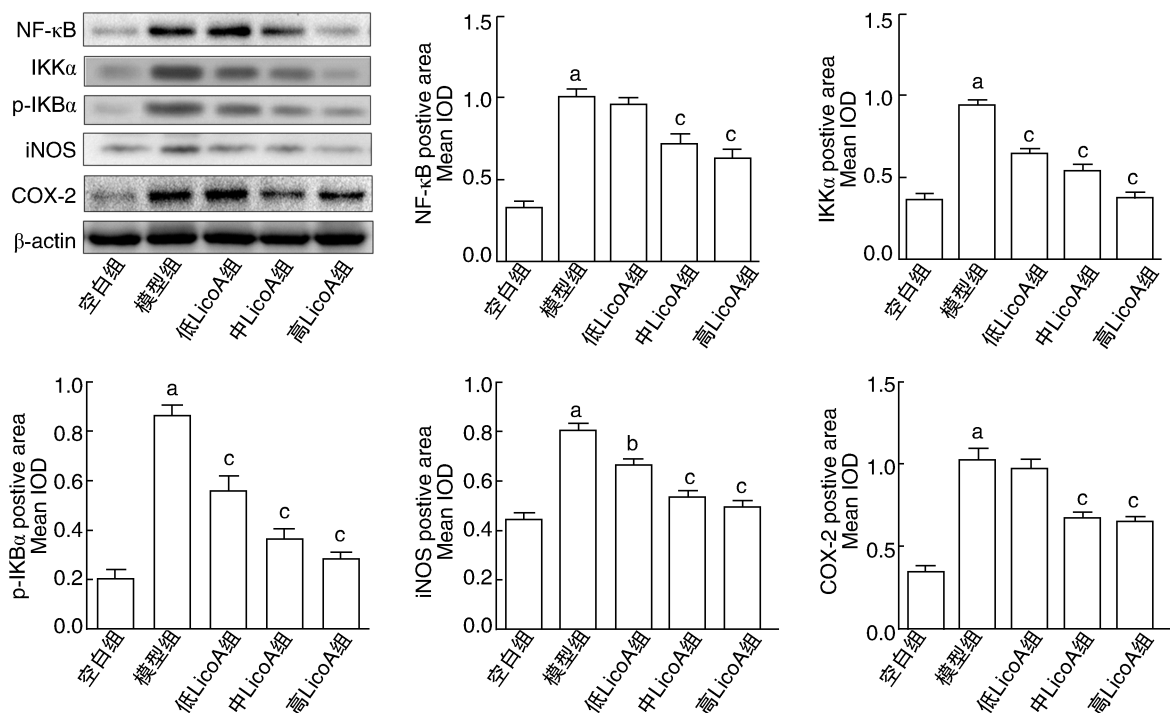


图 6. Lico A 对 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞中 NF- $\kappa$ B、IKK $\alpha$ 、p-IKB- $\alpha$ 、COX-2 和 iNOS 蛋白表达水平的影响 ( $n=3$ ) a 为  $P<0.01$ ,与空白组比较; b 为  $P<0.05$ , c 为  $P<0.01$ ,与模型组比较。

Figure 6. Effect of Lico A on the expression of NF- $\kappa$ B, IKK alpha, p-IKB alpha, COX-2 and iNOS in LPS induced macrophages ( $n=3$ )

## 3 讨论

As 形成的最常见因素就是炎症细胞, Ross<sup>[14]</sup> 提出“As 是一种炎症性疾病”。单核-巨噬细胞是机体主要的免疫细胞,是构成 As 斑块重要部分,同时也是易损斑块形成的重要病理生理学基础<sup>[15]</sup>。As 斑块中的单核-巨噬细胞能够分泌的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等炎症细胞因子,能促进单核细胞聚集、巨噬细胞的增殖以及平滑肌细胞的迁移、增殖,使 As 斑块不断进展<sup>[16]</sup>。IL-1 $\beta$  能协同刺激抗原递呈细胞,间接影响嗜中性白细胞到达炎症部位释放氧自由基<sup>[17-18]</sup>。IL-6 既能促进细胞毒性 T 细胞成熟,又能

促进 B 细胞分化并产生免疫球蛋白<sup>[19]</sup>。TNF- $\alpha$  能够诱导其他炎症因子,比如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子以及粘附分子的产生<sup>[20-21]</sup>,在调节炎症反应中起关键作用。研究表明,动脉粥样硬化斑块中的单核细胞受刺激后可分泌的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  炎症因子,通过与靶细胞表面的受体特异结合后,从而可促进炎症反应的发生,在冠心病的血管损伤和急性心肌缺血中发挥着关键作用。

LPS 是诱导炎症因子如白介素、单细胞趋化蛋白、氧自由基等大量表达,易导致促进炎症和抵抗炎症系统之间失衡,从而产生炎症的细菌内毒素。THP-1 细胞是人类急性单核细胞白血病细胞株,具

有单核细胞特性,能够被 LPS 等诱导致炎,细胞增殖状态良好,且能培养传代,是研究单核细胞功能的常用载体<sup>[22]</sup>。Toll 样受体 (TLRs) 是介导先天免疫和炎症反应的主要受体,研究证实了 TLR-4 与人类动脉粥样硬化的关系最为密切<sup>[23-25]</sup>。NF- $\kappa$ B 是经典的炎症通路,NF- $\kappa$ B 未被激活时和 I $\kappa$ B- $\alpha$  形成一个复合物 I $\kappa$ B 激酶 (IKK) 存在于细胞浆中。当细胞受到刺激时,IKK 被激活,使 I $\kappa$ B 被磷酸化,I $\kappa$ B 从 NF- $\kappa$ B 上脱落并被泛素化,NF- $\kappa$ B 由抑制状态被激活,使 I $\kappa$ B- $\alpha$  磷酸化形成 p-I $\kappa$ B- $\alpha$ ,从而直接参与机体对炎症及免疫反应的调控<sup>[26]</sup>。NF- $\kappa$ B 在 As 形成中炎症反应中发挥枢纽作用,与 As 疾病的发生、发展有密切关系<sup>[27]</sup>。革兰阴性菌的胞壁成分 LPS 主要是通过识别细胞膜上 TLR-4 受体,进而通过经典途径、旁路途径和非典型途径直接激活下游 NF- $\kappa$ B,引起 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等多种炎症因子的增加,从而引起炎症反应的扩大和慢性炎症的持续<sup>[28-29]</sup>。以 TLR-4 为靶位,抑制或激活 TLR-4 表达或调控 TLR-4/NF- $\kappa$ B 炎症信号通路,是 As 新的治疗策略<sup>[30]</sup>。

本实验中,以 THP-1 巨噬细胞为模型,用 LPS 刺激其分泌炎症因子,再观察 Lico A 抑制 THP-1 巨噬细胞促炎因子表达的影响。结果发现,Lico A 能够显著下降 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量,且随 Lico A 浓度的增加下降越明显。在模型组中 TLR-4、NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平明显升高,表明 LPS 可能是通过 TLR-4 受体使 NF- $\kappa$ B 活化,并促进炎症因子的分泌;实验中发现,Lico A 组中 TLR-4、NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平均降低。为了进一步研究 Lico A 抑制 THP-1 巨噬细胞促炎因子表达的影响是否依赖于 TLR-4/NF- $\kappa$ B 炎症信号通路,采用 Western blot 检测 TLR-4、NF- $\kappa$ B、IKK $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B- $\alpha$ 、COX-2 和 iNOS 蛋白表达水平,结果发现,与空白组比较,LPS 模型组的 TLR-4、NF- $\kappa$ B、IKK $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B- $\alpha$ 、COX-2 和 iNOS 蛋白表达明显增加;与模型组比较,不同浓度 Lico A 组能够降低 TLR-4、NF- $\kappa$ B、IKK $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B- $\alpha$ 、COX-2 和 iNOS 蛋白表达,从而验证了 Lico A 抑制 THP-1 巨噬细胞促炎因子表达的影响依赖于 TLR-4/NF- $\kappa$ B 炎症信号通路。关于使用上调 TLR-4/NF- $\kappa$ B 通路的激动剂后对于 LPS 诱导的巨噬细胞炎症因子分泌是否增加,体内效果如何? 仍需进一步研究。

综上所述,本研究不仅验证了 Lico A 的能够抑制 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  炎症因子的分泌,还从分子学角度出发,探讨了 Lico A 抑制 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞中炎症因子表达的分子机制,即其可能是

通过下调 TLR-4 表达,并抑制 TLR-4/NF- $\kappa$ B 炎症信号通路的活化,减少促进炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的分泌。另外,间接揭示了 Lico A 抑制 TLR-4/NF- $\kappa$ B 炎症信号通减少促进炎症因子与 As 的关系,为 Lico A 在治疗 As 新药的开发提供一定依据。

#### [参考文献]

- [1] 严春琳,杨静,韩际宏,等. 中药抗动脉粥样硬化机制研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28 (6): 904-913.
- [2] 赵国军,汤石林,田国平,等. 肝 X 受体激动剂 T0901317 对脂多糖诱导的 THP-1 巨噬细胞炎症因子释放的影响及其机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (7): 594-598.
- [3] 曾海燕,方勇,曾高峰. 丹红注射液对脂多糖诱导 THP-1 巨噬细胞促炎因子分泌的影响及机制[J]. 中南医学科学杂志, 2014, 42(5): 443-446.
- [4] 张明发,沈雅琴. 甘草抗动脉粥样硬化和抗血栓形成研究进展[J]. 西北药学杂志, 2011, 26(3): 222-226.
- [5] 杨晓露,刘朵,卞卡,等. 甘草总黄酮及其成分体外抗炎活性及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(1): 99-104.
- [6] 格桑曲珍,喻红. 甘草抗动脉粥样硬化的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(9): 1358-360.
- [7] Kwon HS, Park JH, Kim DH, et al. Licochalcone A isolated from licorice suppresses lipopolysaccharide-stimulated inflammatory reactions in RAW264.7 cells and endotoxin shock in mice[J]. Springer Verlag, 2008 (86): 1287-295.
- [8] 方诗琦,冷康,段金廛,等. 甘草药渣中黄酮类成分及其抗氧化活性的研究[J]. 中成药, 2015, 37(11): 2443-448.
- [9] Xiao XY, Hao M, Yang X. Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis[J]. Elsevier, 2011, 302(1): 69-75.
- [10] 杨林伟,宋新波,张丽娟,等. 甘草查尔酮 A 制备方法及其药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(11): 85-87.
- [11] Kong F, Ye B, Cao J, et al. Curcumin represses NLRP3 inflammasome activation via TLR-4/MyD88/NF- $\kappa$ B and P2X7R signaling in PMA-induced macrophages[J]. Front Pharmacol, 2016, 7(266): 369-379.
- [12] Huang L, Wang C, Naren G, et al. Effect of geniposide on LPS-induced activation of TLR-4-NF- $\kappa$ B pathway in RAW264.7 macrophage cell line[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2013, 29(10): 1012-014.
- [13] 赵国军,汤石林,田国平,等. PDTC 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积和胆固醇流出的影响[J].

- 中南医学科学杂志, 2013, 41(3): 225-228.
- [14] ROSS R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *New Engl J of Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [15] 李锋进. 西洛他唑对脂多糖诱导的人 THP-1 单核细胞分泌 IL-6 影响及机制探讨 [D]. 南方医科大学, 2013: 1-62.
- [16] 王炎炎, 宋志秀, 杨立刚, 等. 二十碳五烯酸对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响及机制 [J]. *食品科学*, 2016, 37(5): 162-166.
- [17] Planck SR, Woods A, Clowers JS, et al. Impact of IL-1 signalling on experimental uveitis and arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(5): 753-760.
- [18] Qin Y, Ekmekcioglu S, Liu P, et al. Constitutive aberrant endogenous interleukin-1 facilitates inflammation and growth in human melanoma [J]. *Molecular Cancer Research Mcr*, 2011, 9(11): 1 537-550.
- [19] Hirano T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir [J]. *Proc Japan Academy*, 2010, 86(7): 717-730.
- [20] 潘灵辉. 细胞因子平衡在炎症反应中作用的研究进展 [J]. *医学综述*, 2005, 11(9): 775-777.
- [21] 茅苏萍, 程凯灵, 周韵芬. 黄芪对单疱病毒性角膜炎患者 Th1/Th2 细胞因子的调节作用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2004, 24(2): 121-123.
- [22] 江子欣. MiR-142-3p 对 THP-1 细胞释放炎症因子的调控作用 [D]. 广州医学院, 2012: 180-183.
- [23] Balogh S, Kiss I, Csaszar A. Toll-like receptors: link between “danger” ligands and plaque instability [J]. *Current Drug Targets*, 2009, 10(6): 513-518.
- [24] 杨波, 林珮, 宗文霞, 等. Toll 样受体 4 和核因子- $\kappa$ B 信号通路在溶血磷脂酸致动脉粥样硬化中的作用 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2014, 16(1): 69-72.
- [25] Elsenberg EH, Hillaert MA, den Ruijter HM, et al. Toll-like receptor induced CD11b and L-selectin response in patients with coronary artery disease [J]. *Plos One*, 2013, 8(4): e60467.
- [26] Wang WC, Xia YM, Yang B, et al. Protective effects of tyrosol against LPS-induced acute lung injury via inhibiting NF- $\kappa$ B and AP-1 activation and activating the HO-1/Nrf2 Pathways [J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(5): 583-593.
- [27] 王锡煌, 王挹青. 血管生成素 1 通过 NF- $\kappa$ B 传导通路影响内皮祖细胞炎症反应中黏附分子的表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 18(3): 237-237.
- [28] Ye HY, Jin J, Jin LW, et al. Chlorogenic acid attenuates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by inhibiting TLR-4/NF- $\kappa$ B signal pathway [J]. *Inflammation*, 2017, 40(2): 1-7.
- [29] Miao J, Zheng L, Zhang J, et al. The effect of taurine on the toll-like receptors/nuclear factor kappa B (TLRs/NF- $\kappa$ B) signaling pathway in *Streptococcus uberis*-induced mastitis in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(11): 1 740-746.
- [30] 王平忠, 白雪帆, 黄长形, 等. Toll 样受体介导的抗病毒天然免疫 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(5): 539-541.
- (此文编辑 朱雯霞)