

## 黄连解毒汤有效组分通过激活 Caspase-11 靶点抗脓毒症的研究

刘雨浓<sup>1</sup>, 张晓敏<sup>2</sup>, 崔晓英<sup>2</sup>, 郝东<sup>1</sup>, 孟营<sup>1</sup>, 陈桂荣<sup>1\*</sup>

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

2. 华北地质调查局五一四地质大队, 河北 承德 067000

**摘要:** 目的 探讨黄连解毒汤有效组分通过激活 Caspase-11 靶点抗脓毒症的作用机制。方法 实验分为脂多糖 (LPS) 组、对照组及黄连解毒汤上清液醇洗 (HLJDT-7) 40、80、120 mg/mL 组和黄连解毒汤沉淀水洗 (HLJDT-5) 40、80、120 mg/mL 组。MTT 实验检测各组对细胞活力的影响, Western blotting 检测 Caspase-1 和 Caspase-11 蛋白在黄连解毒汤组分各浓度中的相对表达量。结果 黄连解毒汤组分对 LPS 处理的 RAW264.7 细胞进行干预后能够明显的降低 LPS 对细胞的抑制。当 Caspase-11 和 Caspase-1 蛋白敲除后, HLJDT-7 120 mg/mL 组和 HLJDT-5 40、80、120 mg/mL 组对 Caspase-11 和 Caspase-1 蛋白表达水平具有明显的抑制作用 ( $P < 0.05, 0.01$ )。结论 黄连解毒汤有效组分可降低细胞内的 LPS, 进而抑制 Caspase-11, 降低 Caspase-11 介导的 Caspase-1 依赖的细胞焦亡作用。

**关键词:** 黄连解毒汤; HLJDT-7; HLJDT-5; Caspase-11; Caspase-1; LPS

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)01-0007-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.01.002

## Study on effective components of Huanglian Jiedu Decoction against sepsis by activating Caspase-11 target

LIU Yu-nong<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-min<sup>2</sup>, CUI Xiao-ying<sup>2</sup>, HAO Dong<sup>1</sup>, MENG Ying<sup>1</sup>, CHEN Gui-rong<sup>1</sup>

1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Medicine, Dalian 116600, China

2. 514 Brigade of North China Geological Exploration Bureau, Chengde 067000, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of effective components of Huanglian Jiedu Decoction against sepsis by activating Caspase-11 target. **Methods** The experiment was divided into LPS group, control group, HLJDT-7 40, 80, and 120 mg/mL groups, and water extract of Huanglian Jiedu Decoction 40, 80, and 120 mg/mL groups. The effect of each group on cell viability was detected by MTT assay. The relative expression levels of Caspase-1 and Caspase-11 proteins in various concentrations of Huanglian Jiedu Decoction were detected by Western blotting. **Results** The intervention of Huanglian Jiedu Decoction on LPS-treated RAW264.7 cells could significantly reduce the inhibition rate of LPS on cells. When Caspase-1 and Caspase-11 proteins were knocked out, expressions of Caspase-11 and Caspase-1 proteins in HLJDT-7 120 mg/mL group and HLJDT-5 40, 80, and 120 mg/mL groups were significantly inhibited ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** The effective component of Huanglian Jiedu Decoction can reduce LPS in cells and inhibit Caspase-11, and reduce the pyroptosis mediated by Caspase-11 and dependent on Caspase-1.

**Key words:** Huanglian Jiedu Decoction; HLJDT-7; HLJDT-5; Caspase-11; Caspase-1; LPS

研究表明 Caspase-11 的激活能够导致一种特殊的细胞死亡方式, 被称为细胞焦亡, 细胞焦亡在脓毒症的过度免疫中扮演十分重要的角色<sup>[1]</sup>。最新研究发现革兰阴性细菌的脂多糖 (LPS) 是激活

Caspase-11 的重要模式分子, 进入细胞质的 LPS 激活 Caspase-11, lipid A 是其激活的“单元”<sup>[2]</sup>。正常细胞中 Caspase-11 的表达水平非常低, 这说明细菌感染后, LPS 在引起 Caspase-11 介导的、Caspase-1

收稿日期: 2019-09-18

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81303205); 辽宁省高等学校创新人才计划项目 (LR2017002); 沈阳市中青年科技创新人才支持计划项目 (RC170344); 沈阳市科技计划项目 (18-013-078)

作者简介: 刘雨浓 (1997—), 男, 硕士, 研究方向为中药药效物质基础与作用机制。E-mail: 15566705005@163.com

\*通信作者 陈桂荣 (1980—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质与作用机制。E-mail: cgr800404@sohu.com

依赖的细胞焦亡中起到了关键作用。从现代医学来看,脓毒症的产生多为革兰阴性菌侵入人体,产生大量的 LPS,并进一步诱导细胞产生大量炎症因子及肿瘤坏死因子、白介素等细胞因子,从而引发炎症反应。结合前期本课题组研究结果黄连解毒汤的有效成分能够与 lipid A 结合起到中和 LPS 作用,降低脓毒症小鼠死亡率,对脓毒症的脏器损伤具有明显的保护作用<sup>[3]</sup>,这提示黄连解毒汤可能通过抑制细胞 LPS 识别受体 Caspase-11 介导的细胞焦亡信号通路,进而发挥抗脓毒症的作用。本文以 Caspase-11 为靶点对与 lipid A 高亲和力黄连解毒汤的有效组分进行体外活性研究,阐明其抗脓毒症的药效物质和作用机制。

## 1 实验材料

### 1.1 药物

黄连、黄芩、黄柏和栀子 4 味药材均经辽宁中医药大学中药鉴定教研室李峰教授鉴定为正品。

### 1.2 细胞

RAW264.7 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养。

### 1.3 试剂

DMEM 培养基 (Gibco 公司,货号 12100-038); 胎牛血清 (Hyclone 公司,货号 SH30084.03); PBS (上海双螺旋生物科技有限公司,货号 P10033); MTT (万类生物科技有限公司,货号 WLA021a); DMSO (上海碧云天生物技术有限公司,货号 ST038); LPS (索莱宝生物科技有限公司,货号 L2880); 全蛋白提取试剂盒 (万类生物科技有限公司,货号 WLA019); PVDF 膜 (密理博有限公司,货号 IPVH00010); Caspase-1/cleaved Caspase-1 (万类生物科技有限公司,货号 WL03325); Caspase-11/cleaved Caspase-11 (Cell Signaling Technology Inc,货号 14340), 羊抗大鼠 IgG-HRP (上海碧云天生物技术有限公司,货号 A0192), 羊抗兔 IgG-HRP (万类生物科技有限公司,货号 WLA023)。

### 1.4 仪器

超纯水系统 (香港 Heal Force 生物医疗科技邮箱公司); 超速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); CO<sub>2</sub> 培养箱 (上海力申科学仪器有限公司); 超净工作台 (苏州净化设备有限公司); 酶标仪 (美国 BIOTEK 仪器有限公司); 水平摇床 (北京六一生物科技有限公司); 电泳仪 (北京六一生物

科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 有效组分的制备

药材的提取及各组分群的制备参照文献<sup>[4]</sup>进行。全方药材的提取及上清、沉淀组分群的制备按处方<sup>[5]</sup>配比黄连-黄芩-黄柏-栀子 (3:2:2:3) 称取药材,10 倍溶剂水提两次,每次 1 h。合并两次水提液,静置,离心得上清液和沉淀两部分。上清液减压浓缩,沉淀部分干燥。采用大孔吸附树脂柱色谱法对上清液组分进行分离,分别以水和 50% 乙醇为流动相洗脱树脂柱,得黄连解毒汤上清液醇洗 (HLJDT-7) 2.32 g。取沉淀样品进行聚酰胺干法上样,分别以水为流动相洗脱聚酰胺柱,得到沉淀水洗,得黄连解毒汤沉淀水洗 (HLJDT-5) 0.89 g。HLJDT-7 和 HLJDT-5 的质控标准见本课题组前期研究<sup>[6]</sup>。

### 2.2 分组

实验分为对照组、LPS 组及 HLJDT-7 低、中、高浓度 (40、80、120 mg/mL) 组和 HLJDT-5 低、中、高浓度 (40、80、120 mg/mL) 组。HLJDT-7 和 HLJDT-5 组的剂量经预试验确定。

### 2.3 MTT 实验检测黄连解毒汤有效组分对细胞活力的影响

RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养。按实验分组将细胞接种于 96 孔板中,每孔细胞量  $5 \times 10^3$  个,每组设置 5 个复孔,待细胞贴壁后进行细胞加药。加入不同的化合物预处理 2 h,然后再加入浓度为 100 ng/mL 的 LPS 继续处理 24 h。将达到特定时间的各组细胞弃去培养基,更换成浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 混合液,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 4 h。4 h 后小心吸去上清,加入 150 μL DMSO 以溶解细胞形成的紫色结晶,避光静置 10 min 后在酶标仪上测定其在 570 nm 处吸光度 (A) 值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

### 2.4 Western blotting 法检测黄连解毒汤有效组分对 Caspase-11 和 Caspase-1 蛋白表达的影响

RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养,加入不同药物预处理 2 h,然后再加入浓度为 100 ng/mL 的 LPS 继续处理 24 h, PBS 冲洗两次,加入裂解液使细胞裂解,离心提取上清液,用 BCA 法测蛋白浓

度。在 10% SDS-PAGE 凝胶中进行电泳，在 4 °C 80 V 电压条件下行电转膜 150 min。PBS 清洗 PVDF 膜，PVDF 膜和 5% 脱脂奶粉室温下培育 1 h。PVDF 膜和含一抗 Caspase-1/cleaved Caspase-1 (1 : 500)、一抗 Caspase-11/cleaved Caspase-11 (1 : 1 000) 的 5% 脱脂奶粉在 4 °C 下轻柔震荡过夜，TBST 洗膜 (5 min × 4 次)。PVDF 膜和含 HRP 标记的抗兔 IgG 二抗 Caspase-1/cleaved Caspase-1 (1 : 5 000)、二抗 Caspase-11/cleaved Caspase-11 (1 : 2 000) 的 5% 脱脂奶粉，37 °C 下轻柔震荡 45 min，TBST 洗膜 (5 min × 6 次)。将发光剂均匀滴加在 PVDF 膜上，待条带发光后用 X 胶片曝光显像，观察拍照。实验重复 3 次。将胶片进行扫描，用凝胶图象处理系统 (Gel-Pro-Analyzer 软件) 分析目标条带的光密度值。

### 3 结果

#### 3.1 黄连解毒汤有效组分对细胞活力的影响

LPS 组对 RAW264.7 细胞的抑制率明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。HLJDT-7 40、80、120 mg/mL 组和 HLJDT-5 40、80、120 mg/mL 组对 LPS 处理的 RAW264.7 细胞进行干预后能够较明显的降低 LPS 对细胞的抑制率 ( $P < 0.05$ )，表明黄连解毒汤有效组分能够抑制 LPS 活性，进而提高细胞活力。黄连解毒汤有效组分对细胞活力的影响见表 1。

#### 3.2 黄连解毒汤有效组分对 Caspase-11 和 Caspase-1 蛋白表达的影响

与对照组比较，LPS 组 Caspase-11 和 Caspase-1 蛋白的表达没有变化；与 LPS 组比较，HLJDT-7、40、

80、120 mg/mL 组和黄连解毒汤水提物 40、80、120 mg/mL 组 Caspase-11 和 Caspase-1 蛋白的表达几乎没有变化。但是当这两种蛋白敲除后，LPS 组 Caspase-11、Caspase-1 蛋白表达水平明显高于对照组；HLJDT-7 120 mg/mL 组和 HLJDT-5 40、80、120 mg/mL 组对 Caspase-11 和 Caspase-1 蛋白表达水平具有明显的抑制作用 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，结果表明 HLJDT-7 和 HLJDT-5 可以抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 Caspase-11 和 Caspase-1 蛋白磷酸化。Western blotting 法检测黄连解毒汤有效组分对 Caspase-11 和 Caspase-1 蛋白表达的影响见表 2 和图 1、2。

表 1 黄连解毒汤有效组分对细胞活力的影响

Table 1 Effects of effective components of Huanglian Jiedu Decoction on cell activity

组别	剂量/(mg·mL <sup>-1</sup> )	细胞存活率/%
对照	—	83.6
LPS	1 × 10 <sup>-4</sup>	47.7 <sup>##</sup>
HLJDT-7	40	59.1 <sup>*</sup>
	80	55.5 <sup>*</sup>
	120	52.4 <sup>*</sup>
HLJDT-5	40	65.6 <sup>*</sup>
	80	60.5 <sup>*</sup>
	120	56.3 <sup>*</sup>

与对照组比较：<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与 LPS 组比较：<sup>\*</sup> $P < 0.05$

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group；<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs LPS group

表 2 黄连解毒汤有效组分对 Caspase-11 和 Caspase-1 蛋白表达的影响

Table 2 Effects of effective components of Huanglian Jiedu Decoction on expressions of Caspase-11 and Caspase-1 proteins

组别	剂量/(mg·mL <sup>-1</sup> )	Caspase-1		Caspase-11	
		Caspase-1/β-actin	cleaved Caspase-1/β-actin	Caspase-11/β-actin	cleaved Caspase-11/β-actin
对照	—	1.03	0.36	0.40	0.28
LPS	1 × 10 <sup>-4</sup>	1.06	2.39 <sup>##</sup>	0.37	2.06 <sup>##</sup>
HLJDT-7	40	1.04	2.11	0.39	1.61 <sup>*</sup>
	80	1.03	2.15	0.38	1.59 <sup>*</sup>
	120	1.02	1.18 <sup>**</sup>	0.41	0.82 <sup>**</sup>
HLJDT-5	40	1.03	0.91 <sup>**</sup>	0.40	0.52 <sup>**</sup>
	80	1.01	1.16 <sup>**</sup>	0.39	0.53 <sup>**</sup>
	120	1.00	1.12 <sup>**</sup>	0.40	0.80 <sup>**</sup>

与对照组比较：<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与 LPS 组比较：<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group；<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs LPS group

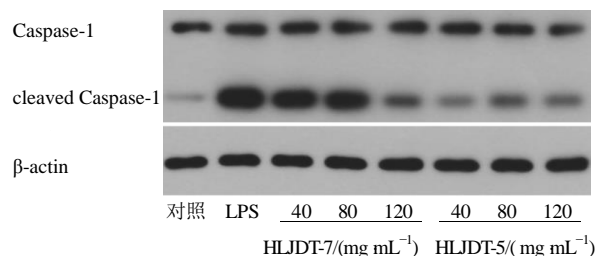


图 1 黄连解毒汤有效组分对 Caspase-1 蛋白表达的影响  
Fig. 1 Effects of effective components of Huanglian Jiedu Decoction on expression of Caspase-1 protein

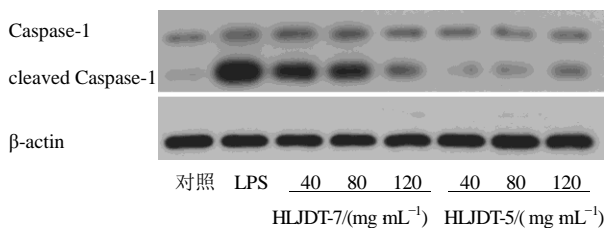


图 2 黄连解毒汤有效组分对 Caspase-11 蛋白表达的影响  
Fig. 2 Effects of effective components of Huanglian Jiedu Decoction on expression of Caspase-11 protein

#### 4 讨论

研究表明革兰阴性菌外膜结构的主要成分 LPS 是介导脓毒症的病原体相关分子模式<sup>[7]</sup>。脓毒症是病原微生物侵入机体所致的全身炎症反应综合征，是机体对感染性因素的反应，可引起多器官功能障碍综合征，是危重急救医学着重解决的难题。细胞焦亡是新发现的一种程序性细胞死亡方式，细胞焦亡通过识别激活信号后，活化 Caspase 水解酶而引起细胞死亡<sup>[8]</sup>。细胞焦亡是一种依赖致炎性 Caspases 的程序性细胞死亡方式，在感染性疾病、自发性炎症性疾病、自身免疫性疾病和相关癌症等疾病中扮演着重要的角色，常伴随炎性小体和 Caspase-1/ Caspase-11 激活<sup>[9]</sup>。最新研究发现革兰阴性菌的 LPS 是激活 Caspase-11 的重要模式分子，进入细胞质的 LPS 激活 Caspase-11，lipid A 是其激活的“单元”。正常细胞中 Caspase-11 的表达水平非常低，这说明细菌感染后，LPS 在引起 Caspase-11 介导的、Caspase-1 依赖的细胞焦亡中起到了关键作用。

黄连解毒汤源自于《外台秘要》，由黄连、黄柏、黄芩、栀子 4 味药材组成，研究结果表明其具有明显的解毒作用，并且抗内毒素的作用是以破坏、降解内毒素形态的直接作用方式，而不是对内毒素活

性的暂时性抑制。本课题组研究表明黄连解毒汤的有效组分通过与 LPS 的活性中心 Lipid A 结合，中和体内外 LPS，进而抑制 LPS 诱导的炎症因子肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素 (IL)-6 的释放和表达，起到抗脓毒症的作用。但是其作用的靶点和通路尚未明确，需要进一步对其抗脓毒症的药效物质和作用机制进行研究。因此本课题以 Caspase-11 介导的 Caspase-1 依赖的细胞焦亡为研究对象，对与 lipid A 高亲和力黄连解毒汤的有效组分进行抗细胞焦亡研究。研究发现在正常 RAW264.7 巨噬细胞中蛋白 Caspase-11 和 Caspase-1 表达较低，一旦 LPS 激活后，LPS 组中两种蛋白表达大大增强，而黄连解毒汤有效组分不同浓度都表现出抑制两种蛋白的表达，特别是 HLJDT-7 120 mg/mL 组和 HLJDT-5 40、80、120 mg/mL 组显著抑制两种蛋白的表达。结合课题组前期研究结果，黄连解毒汤醇提物主要含有生物碱类、黄酮类和环烯醚萜类成分，黄连解毒汤水提物组分主要含有生物碱类成分，结合本研究可以推断出生物碱类成分在低浓度条件下就能够较好的抑制两种蛋白的表达。在总结前期研究的基础之上结合本实验的研究，表明黄连解毒汤的有效组分特别是生物碱类成分可能通过与 lipid A 相结合中和 LPS，降低细胞内的 LPS 进而抑制进入细胞质的 LPS 激活 Caspase-11，降低细菌感染后 LPS 激活 Caspase-11 介导的、Caspase-1 依赖的细胞凋亡作用，本研究为黄连解毒汤抗脓毒症的药效物质和作用机制研究奠定基础。

#### 参考文献

- [1] Rathinam V A, Vanaja S K, Waggoner L, *et al.* TRIF licenses Caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by Gram-negative bacteria [J]. *Cell*, 2012, 150(3): 606-619.
- [2] Hagar J A, Powell D A, Aachoui Y, *et al.* Cytoplasmic LPS activates Caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock [J]. *Science*, 2013, 341: 1250-1253.
- [3] Chen G R, Zhang G, Li MY, *et al.* The effective components of Huanglian Jiedu Decoction against sepsis evaluated by a lipid a-based affinity biosensor[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 186(20): 369-376.
- [4] 李冀. 方剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 75-76.
- [5] 朱静. 黄连解毒汤抗疱疹病毒物质基础研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2002.
- [6] 陈桂荣, 李明玉, 解世全, 等. 黄连解毒汤及其各部位

- 群抗炎物质基础 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(1): 98-102.
- [7] Lin W J, Yeh W C. Implication of toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock [J]. *Shock*, 2005, 24(3): 206-209.
- [8] Eldridge M J, Shenoy A R. Antimicrobial inflammasomes: unified signalling against diverse bacterial pathogens [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2015(23): 32-41.
- [9] Yi Y S. Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical sensor of intracellular lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses [J]. *Immunology*, 2017, 152(2): 207-217.