

解毒祛瘀滋阴方冻干粉和含药血清对小鼠单核巨噬细胞的影响

嵇丽娜, 刘 丹, 邓 贤, 李荣群*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘 要: **目的** 探讨解毒祛瘀滋阴方冻干粉与含药血清对脂多糖(LPS)诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 炎症信号通路的影响。**方法** 体外培养 RAW264.7 细胞, 随机分为对照组、LPS 组、解毒祛瘀滋阴方含药血清组、冻干粉组、LPS 加含药血清组及 LPS 加冻干粉组。干预 24 h 后, 采用 CCK-8 法筛选含药血清和冻干粉的最佳浓度并检测二者对细胞活力的影响; 采用 ELISA 法测定细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量; 采用 qRT-PCR 法检测核转录因子- κ B (NF- κ B)、TNF- α mRNA 的表达; 采用 Western blotting 法检测 NF- κ B 蛋白表达水平; 采用 LC-MS 检测解毒祛瘀滋阴方含药血清中的有效成分。**结果** 与对照组比较, LPS 刺激组 TNF- α 炎症因子水平、NF- κ B、TNF- α mRNA 表达水平和 NF- κ B 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 含药血清组 TNF- α 炎症因子水平、NF- κ B、TNF- α mRNA 表达水平和 NF- κ B 蛋白表达水平较冻干粉组降低明显 ($P < 0.05$); 与 LPS 组比较, LPS 加含药血清组 TNF- α 炎症因子水平、NF- κ B、TNF- α mRNA 表达水平和 NF- κ B 蛋白表达水平降低较 LPS 加冻干粉组明显 ($P < 0.05$); 解毒祛瘀滋阴方含药血清中检测到芍药苷和阿魏酸。**结论** 解毒祛瘀滋阴方冻干粉和含药血清均具有抑制炎症信号通路的作用。

关键词: 解毒祛瘀滋阴方; 冻干粉; 含药血清; 炎症信号通路; 芍药苷; 阿魏酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)16-3868-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.021

Effect of Jiedu Quyu Ziyin Prescription-treated freeze dried powder and drug-containing serum on mice monocyte-macrophage

Ji Li-na, LIU Dan, DENG Xian, LI Rong-qun

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To study the effects of Jiedu Quyu Ziyin Prescription (JQZP)-treated freeze dried powder and drug-containing serum on the inflammatory signal pathway of monocyte-macrophage induced by LPS (lipopolysaccharide) in mice. **Methods** Monocyte-macrophage cells were cultured *in vitro* and randomly divided into blank group, LPS stimulation group, drug-containing serum group, freeze dried powder group, LPS + drug-containing serum group, and LPS + freeze dried powder group. After 24 h intervention, the optimal concentrations of drug-containing serum and freeze dried powder were screened by CCK8 method and the cell viability was measured respectively. The content of tumor necrosis factor (TNF- α) in cell serum was measured by ELISA. Real-time PCR was employed to test the expression of TNF- α mRNA and nuclear transcription factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B). Western-blot was used to detect the expression of NF- κ B protein. The LC-MS was used to detect the active ingredients in the drug-containing serum. **Results** Compared with the blank group, the expression of TNF- α level, NF- κ B, TNF- α mRNA and NF- κ B protein in LPS stimulation group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the LPS stimulation group, the TNF- α level, NF- κ B, TNF- α mRNA and the expression of NF- κ B protein in the LPS plus serum group were significantly lower than those in the LPS plus freeze-dried powder group ($P < 0.05$). Paeoniflorin and ferulic acid were detected in the drug-containing serum. **Conclusion** JQZP freeze-dried powder and drug-containing serum all have the effect of inhibiting the inflammatory signaling pathway.

Key words: Jiedu Quyu Ziyin Prescription; freeze dried powder; drug-containing serum; inflammatory signal pathway; paeoniflorin; ferulic acid

收稿日期: 2018-02-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81673863); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY15H270007)

作者简介: 嵇丽娜 (1992—), 女, 硕士, 主要从事中医药治疗免疫风湿病的机制和临床研究工作。E-mail: jilinasmile@126.com

*通信作者 李荣群, 副教授, 博士。E-mail: lirongqun@163.com

巨噬细胞是参与机体固有免疫的主要细胞之一,是研究细胞吞噬、细胞免疫和分子免疫的重要对象,在介导宿主防御、炎症反应和适应性免疫应答的启动和调节等方面发挥重要作用^[1]。巨噬细胞通过细胞表面的模式识别受体识别外来的病原体,实现其自身的活化、增殖和分化,完成其免疫防御等一系列生物学功能。其中 Toll 样受体-4 (TLR4) 的表达与多种炎症反应疾病相关,因此,严格调控 TLR4 的表达十分重要^[2]。脂多糖 (LPS) 经细菌释放进入宿主体内后激活巨噬细胞炎症信号通路,诱导大量炎症因子的合成及释放,如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 等,进而导致机体出现一系列的炎症反应^[3]。课题组前期研究了解毒祛瘀滋阴方对巨噬细胞 TLR4 信号通路的调控作用^[4]。本实验采用 LPS 诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7,激活炎症信号通路中的核转录因子- κ B (NF- κ B),以进一步明确解毒祛瘀滋阴方的抗炎作用及机制。此外,本实验通过比较解毒祛瘀滋阴方含药血清和冻干粉对炎症信号通路的影响,为进一步的实验选择更有效的制剂,也为解毒祛瘀滋阴方的深度开发提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 动物与细胞

20 只雄性 SD 大鼠,清洁级,6~8 周龄,体重(200 $\pm$ 20) g,由浙江中医药大学动物实验中心购进,动物合格证号 SYXK2008-0115,实验动物使用许可证号 SYXK(浙)2013-0184。RAW264.7 细胞,购于中国科学院上海生命科学院。

1.2 药物

解毒祛瘀滋阴方由干地黄 15 g、炙鳖甲 12 g、青蒿 12 g、白花蛇舌草 15 g、积雪草 15 g、赤芍 12 g、丹皮 12 g、佛手 9 g、升麻 9 g、生甘草 6 g 组成,由浙江中医药大学中药饮片厂提供。经浙江中医药大学中药资源研究所黄真教授鉴定:干地黄为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根、炙鳖甲为鳖科鳖属动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲、青蒿为菊科蒿属植物青蒿 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分、白花蛇舌草为茜草科耳草属植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的干燥全草、积雪草为伞形科积雪草属植物积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urb. 的干燥全草、赤芍为毛茛科芍药属植物川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根、丹皮为毛茛科芍药属植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮、佛手为芸香科柑桔

属植物佛手 *Citrus medica* L. 的干燥果实、升麻为毛茛科升麻属植物升麻 *Cimicifuga foetida* L. 的干燥根茎、生甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。上述中药材以单蒸水 800 mL 先浸泡 20 min,煎煮 1 h,共煎 2 次,将 2 次的中药水煎剂混合,旋转蒸发浓缩成生药质量浓度为 2 g/mL (经 HPLC 法测定含芍药苷 64.16 mg/g、阿魏酸 4.22 mg/g)。

1.3 试剂及仪器

胎牛血清 (Gemini 公司); DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司); LPS (Sigma 公司); C0043 增强型 CCK-8 试剂盒 (碧云天生物技术公司); Mouse/Rat TNF- α Valukine ELISA Kit (R & D 公司); PrimeScriptTM RT Master Mix、Trizol 试剂 (TaKaRa 公司); RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术公司); 鼠抗 NF- κ B (Cell Signaling Technology 公司); β -actin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 公司); 羊抗鼠二抗 (Licor 公司); 对照品芍药苷 (批号 110736-201640,质量分数 $\geq$ 95.2%)、阿魏酸对照品 (批号 110773-201614,质量分数 $\geq$ 99.0%),中国食品药品检定研究院。Christ ALPHA 1-2 LD plus 冷冻干燥机 (Christ 公司); ThermoFisher 3111 二氧化碳培养箱 (Thermo Fisher 公司); Varioskan Flash 酶标仪 (Thermo Scientific Varioskan Flash 公司); LightCycler[®] 96 SW 1.1 型定量 PCR 仪 (美国 Roche 公司); Odessey 双色红外激光成像系统 (Licor 公司)。

2 方法

2.1 RAW264.7 细胞培养

从液氮罐中取出 RAW264.7 细胞,复苏,用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。培养 48 h 后,显微镜下观察细胞生长情况,待细胞融合至 80%时传代。

2.2 解毒祛瘀滋阴方冻干粉及含药血清的制备

2.2.1 冻干粉制备 将解毒祛瘀滋阴方水煎剂-40 $^{\circ}$ C 制冷,-20 $^{\circ}$ C 保存 2 h,置于冷冻干燥机制成冻干粉,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.2.2 含药血清制备 将 20 只 SD 大鼠随机分为对照组和给药组,每组 10 只。对照组的大鼠 ig 给予蒸馏水,给药组大鼠 ig 解毒祛瘀滋阴方水煎剂。按临床成人等效剂量,根据大鼠的体质量计算出大鼠每日最大给药量为 20 mL/kg,每日 2 次,给药 3 d。于末次给药 1 h 后,大鼠心脏取血,室温静置 4 h,

以 3 000 r/min 离心 15 min, 吸取血清(出现溶血的弃去不用), 0.22 μm 微孔滤膜除菌, 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min, 分装置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冻存。

2.3 细胞分组及给药

取生长状态良好的 RAW264.7 细胞, 计数后按 1×10^5 个/mL 铺板, 分为对照组(900 μL DMEM 高糖培养基+100 μL 胎牛血清)、LPS 组(900 μL DMEM 高糖培养基+100 μL 胎牛血清+1 $\mu\text{g/mL}$ LPS)、解毒祛瘀滋阴方含药血清组(简称含药血清组, 975 μL DMEM 高糖培养基+25 μL 含药血清)、解毒祛瘀滋阴方冻干粉组(简称冻干粉组, 1 mL DMEM 高糖培养基+0.01 mg/mL 冻干粉)、LPS+含药血清组(975 μL DMEM 高糖培养基+25 μL 含药血清+1 $\mu\text{g/mL}$ LPS)、LPS+冻干粉组(1 mL DMEM 高糖培养基+0.01 mg/mL 冻干粉+1 $\mu\text{g/mL}$ LPS)。以上为每毫升细胞悬液给药量。

2.4 CCK-8 法检测细胞活力

取对数生长期 RAW264.7 细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 培养 24 h 后分别将不同体积分数的含药血清(0、2.5%、5%、10%、15%、20%、30%)和冻干粉(10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1 mg/mL)作用于细胞, 将加了相应量培养基和 CCK-8 溶液但没有加入细胞的孔作为对照组, 每组 6 个复孔。培养 24 h 后每孔加入 10 μL 增强型 CCK-8 溶液。继续孵育 1 h, 用酶标仪检测 450 nm 处吸光度(A)值, 并计算细胞活力, 筛选出合适的给药浓度。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

取对数生长期 RAW264.7 细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 培养 24 h 后按“2.3”项下分组给药, 每组 6 个复孔。培养 24 h 后每孔加入 10 μL 增强型 CCK-8 溶液。继续孵育 1 h, 用酶标仪检测 450 nm 处吸光度(A)值, 并计算细胞活力。

2.5 ELISA 法检测细胞 TNF- α 水平

取对数生长期的细胞, 按 1×10^5 个/mL 浓度接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μL , 培养 24 h 后按“2.3”项下分组给药, 每组 3 个复孔。24 h 后取上清液, 根据试剂盒说明书测定 TNF- α 含量, 于 450 nm 处测定 A 值, 根据标准曲线在回归方程上计算出对应的样品浓度, 实验重复 3 次。

2.6 qRT-PCR 检测 NF- κB 、TNF- α 基因表达水平

取对数生长的细胞, 按 1×10^5 个/mL 浓度接种

于 12 孔板中, 每孔加 1 mL 细胞悬液, 培养 24 h 后按“2.3”项下分组给药。给药 24 h 后收集细胞, 用 TRIzol 提取总 RNA, 应用 qRT-PCR 方法测定 NF- κB 、TNF- α 基因表达。逆转录条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min; 85 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 以 GAPDH 为内参。引物根据 Primer 5.0 引物设计软件设计, 再由生工生物工程(上海)有限公司合成, 引物序列: NF- κB 上游 5'-GCC-GTGGAGTACGACAA-3', 下游 5'-CGGTTTCCCA-TTTAGTATGT-3'; TNF- α 上游 5'-ACCAGACAC-CTCAGGGCTAA-3', 下游 5'-TGTTGGGGAGA-AGGAGAATG-3'。

2.7 Western blotting 检测 NF- κB 蛋白表达水平

取对数生长期的细胞, 按 1×10^5 个/mL 浓度接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔 2 mL 培养, 24 h 后按“2.3”项下分组给药。分组给药 24 h 后收集细胞, 加入细胞裂解液, 收集总蛋白, BCA 法测定总蛋白含量。总蛋白样品 30 μg 进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上, 室温封闭 1 h 后, 加入一抗(NF- κB 1:1 000, β -actin 1:500)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 加入二抗(1:10 000)室温避光孵育 1.5 h。将膜置于红外激光成像系统中进行红外激光扫描, 用 Odessey V3.0 软件对图像进行光密度分析。以 β -actin 为内参, 以目的蛋白的相对表达量为参数进行半定量统计分析。

2.8 LC-MS 检测大鼠含药血清中阿魏酸和芍药苷的量

2.8.1 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷和阿魏酸对照品适量, 加甲醇制成含芍药苷和阿魏酸各 100 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液, 即得。

2.8.2 色谱条件 色谱柱为 Inertsustain C18 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)。流动相为乙腈(A)-2 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%甲酸)(B)。洗脱程序: 0~9 min, 15%~50% A; 9~11 min, 50%~90% A; 11~17 min, 90% A; 17~19 min, 90%~15% A; 19~20 min, 15% A。体积流量 0.5 mL/min。柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。进样量 10 μL 。

2.8.3 质谱条件 离子源: ESI。离子化模式: 正负离子切换模式。定量模式: 多反应监测模式(MRM)。离子源电压: 4 500、5 500 V。离子源温度: 550 $^{\circ}\text{C}$ 。芍药苷去簇电压(DP)、碰撞能(CE)为 23、25 V。阿魏酸 DP、CE 为 30、18 V。定量离子对为芍药苷 m/z 479.15 $\rightarrow$ 121.05, 阿魏酸 m/z 193.05 $\rightarrow$ 134.10。

2.8.4 线性关系考察 取配制好的 6 份不同质量浓

度的对照品溶液, 分别进样 10 μL , 测定。以芍药苷和阿魏酸的质量浓度为横坐标 (X), 以峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得到芍药苷线性回归方程为 $Y=6\,474.49 X$, $r^2=0.999\,2$; 阿魏酸线性回归方程为 $Y=10\,536.8 X$, $r^2=0.999\,6$, 线性关系良好。

2.8.5 样品测定 取“2.2.2”项下给药组和对照组大鼠血清各 50 μL 置于离心管中, 加入 3 倍量甲醇, 涡旋离心后取上清液, N_2 吹干, 加入 150 μL 甲醇溶解涡旋, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 进样检测, 通过标准曲线计算各组大鼠血清中阿魏酸和芍药苷的量。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计处理, GraphPad

Prism 5.0 软件对结果进行统计分析和作图, 采用单因素方差分析及独立样本 t 检验, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 解毒祛瘀滋阴方含药血清和冻干粉对 RAW264.7 细胞增殖的影响

结果如图 1 所示, 不同体积分数的 (0、2.5%、5%、10%、15%、20%、30%) 含药血清和冻干粉 (10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1 mg/mL) 对 RAW264.7 细胞作用 24 h 后, 与对照组比较, 含药血清的体积分数为 2.5% 时和冻干粉的质量浓度为 0.01 mg/mL 时, 其促进 RAW264.7 细胞增殖的作用最为明显 ($P < 0.05$), 可作为后续实验的给药浓度。如图 2 所示,

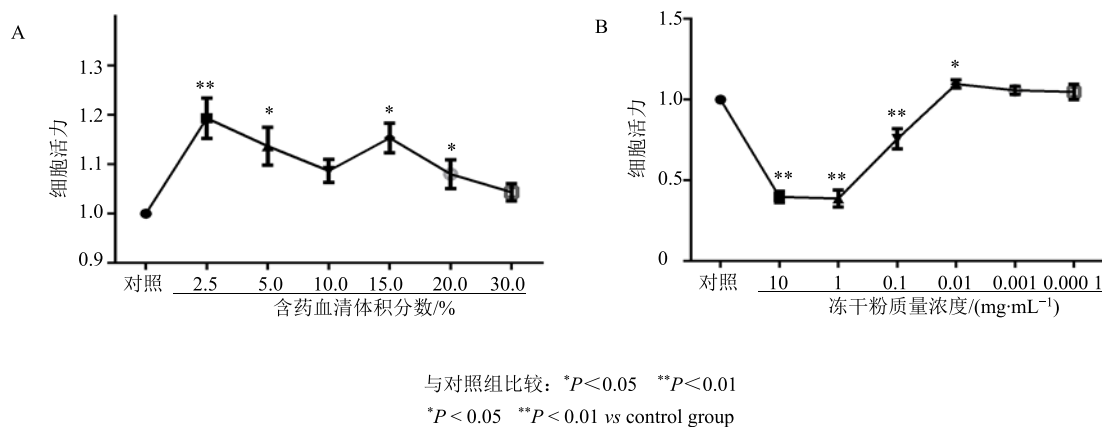
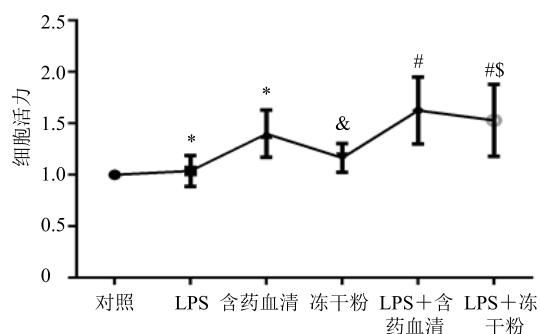


图 1 解毒祛瘀滋阴方含药血清 (A) 和冻干粉 (B) 作用于 Raw264.7 细胞最佳浓度筛选 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Best concentration of Jiedu Quyu Ziyin Prescription-treated drug-containing serum and freeze dried powder for Raw264.7 cells proliferation ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$; 与含药血清组比较: & $P < 0.05$; 与 LPS+含药血清组比较: \$ $P < 0.05$, 下同
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs LPS group; & $P < 0.05$ vs drug-containing serum group; \$ $P < 0.05$ vs freeze dried powder group, same as below

图 2 解毒祛瘀滋阴方含药血清和冻干粉对 RAW264.7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 2 Effect of Jiedu Quyu Ziyin Prescription-treated drug-containing serum and freeze dried powder on proliferation of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

与对照组比较, 含药血清能够显著促进细胞增殖 ($P < 0.05$)。与 LPS 组比较, LPS+含药血清能促进细胞增殖 ($P < 0.05$)。

3.2 解毒祛瘀滋阴方对 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 的影响

结果如图 3 所示, 与对照组比较, LPS 能刺激 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α , 含药血清和冻干粉能够显著降低细胞 TNF- α 水平, 且含药血清组降低更显著 ($P < 0.05$); 与 LPS 组相比, LPS+含药血清组、LPS+冻干粉组细胞 TNF- α 水平显著降低, 且含药血清作用优于冻干粉 ($P < 0.05$)。

3.3 解毒祛瘀滋阴方对 RAW264.7 细胞 NF- κB 、TNF- α mRNA 表达的影响

如表 1 所示, 与对照组比较, LPS 组细胞 NF- κB 、TNF- α mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 含药血清组细胞 NF- κB 、TNF- α mRNA 和冻干粉组细胞 TNF- α mRNA 表达水平显著降低 ($P <$

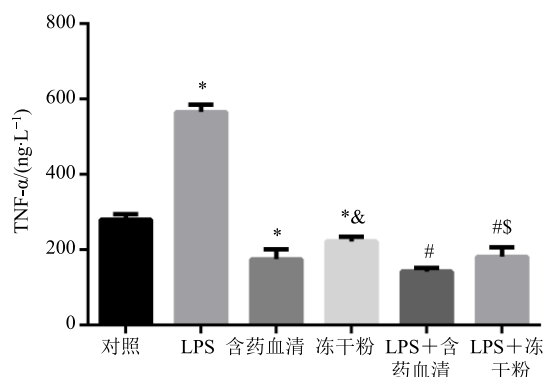


图 3 解毒祛瘀滋阴方含药血清和冻干粉对 RAW264.7 细胞释放 TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of Jiedu Quyu Qiyin Prescription-treated drug-containing serum and freeze dried powder on TNF- α release from RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 1 解毒祛瘀滋阴方含药血清和冻干粉对 RAW264.7 细胞 NF- κ B、TNF- α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of Jiedu Quyu Ziyin Prescription-treated drug-containing serum and freeze dried powder on NF- κ B and TNF- α mRNA expression in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	mRNA 相对表达量	
	NF- κ B	TNF- α
对照	1.000	1.000
LPS	1.673 $\pm$ 0.177*	3.687 $\pm$ 0.505*
含药血清	0.640 $\pm$ 0.015*	0.353 $\pm$ 0.049*
冻干粉	0.770 $\pm$ 0.051	0.713 $\pm$ 0.074*
LPS+含药血清	1.009 $\pm$ 0.119 [#]	1.250 $\pm$ 0.192 [#]
LPS+冻干粉	1.380 $\pm$ 0.220 ^{#\$}	1.493 $\pm$ 0.097 ^{#\$}

0.05)。与 LPS 组比较, LPS+含药血清组和 LPS+冻干粉组细胞 NF- κ B、TNF- α mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05$)。

3.4 解毒祛瘀滋阴方对 RAW264.7 细胞 NF- κ B 蛋白表达的影响

如图 4 所示,与对照组比较, LPS 组细胞 NF- κ B 蛋白表达水平显著 ($P < 0.05$)。与 LPS 组比较, LPS+含药血清组细胞 NF- κ B 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$)。

3.5 解毒祛瘀滋阴方含药血清中阿魏酸和芍药苷的含量

阿魏酸与芍药苷离子全扫描质谱图见图 5, 含药血清、空白血清和对照品的离子流色谱图见图 6, 其中含药血清中芍药苷的质量浓度为 (2.384 $\pm$ 0.329) ng/mL, 阿魏酸的质量浓度为 (0.157 $\pm$ 0.025)

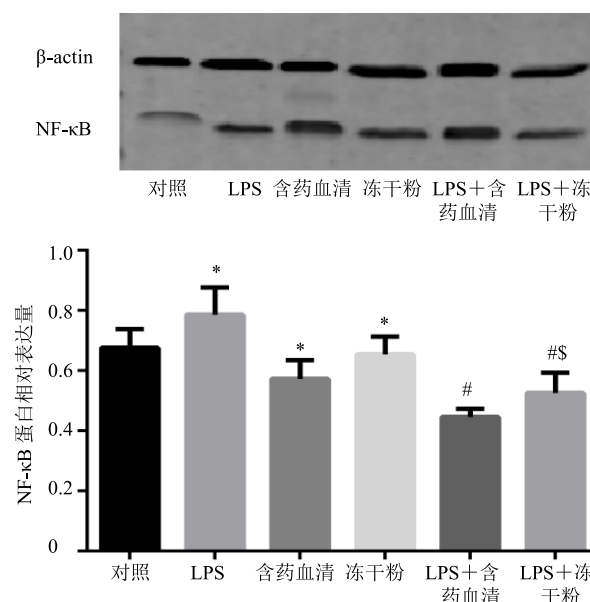


图 4 解毒祛瘀滋阴方含药血清和冻干粉对 RAW264.7 细胞 NF- κ B 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Jiedu Quyu Ziyin Prescription-treated drug-containing serum and freeze dried powder on NF- κ B protein expression in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

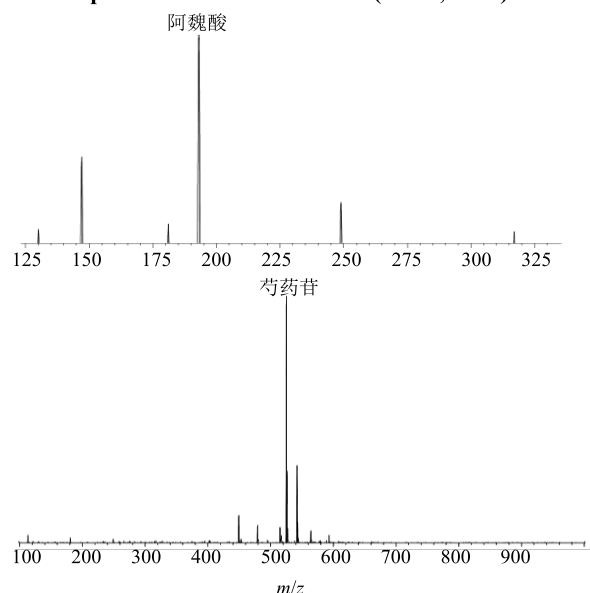


图 5 阿魏酸和芍药苷质谱图

Fig. 5 MS spectra of ferulic acid and paeoniflorin ng/mL, 空白血清中未检测到芍药苷和阿魏酸。

4 讨论

解毒祛瘀滋阴法是首届全国名中医范永升教授提出中医治疗系统性红斑狼疮的基本法则^[5], 为此课题组筛选出干地黄、炙鳖甲、升麻、白花蛇舌草、积雪草、赤芍、丹皮、佛手、升麻、生甘草 10 味中药组成解毒祛瘀滋阴方^[6]。经临床研究表明, 解

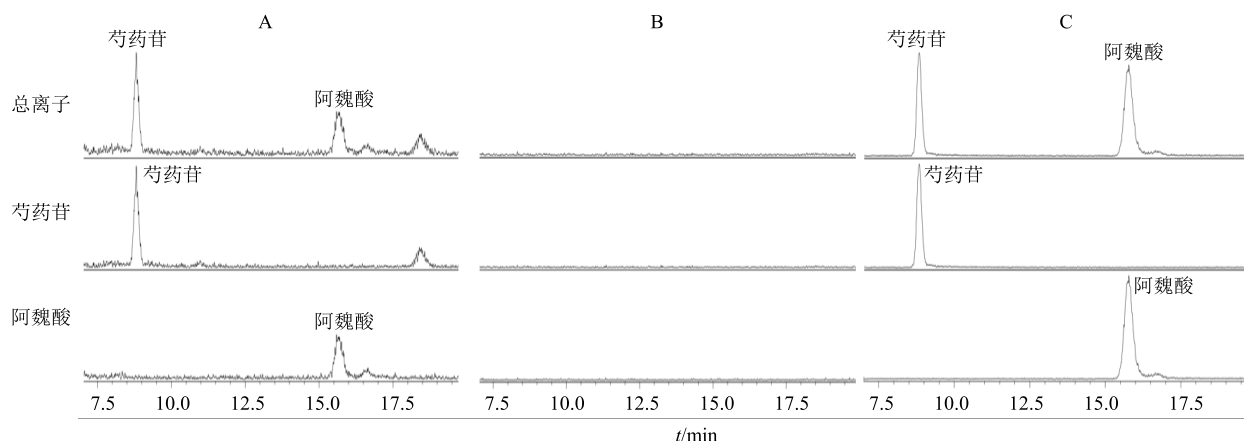


图 6 含药血清 (A)、空白血清 (B) 和对照品 (C) 的离子流图

Fig. 6 Ion flow chromatograms of drug-containing serum (A), blank serum (B), and reference substance (C)

毒祛瘀滋阴方具有一定的抗炎止痛的作用^[7],但其具体的作用机制及有效的剂型目前尚不明确。

以 LPS 诱导 RAW264.7 细胞是目前公认的体外炎症细胞模型,可用于抗炎药物的筛选。研究表明异常的固有免疫在系统性红斑狼疮中发挥重要作用, Toll 样受体又是巨噬细胞表达的模式识别受体重要成员之一,巨噬细胞表面主要表达 TLR2/4,而 TLR4 可识别革兰阴性细菌的 LPS。本实验在解毒祛瘀滋阴方对巨噬细胞作用的基础上通过 LPS 诱导炎症细胞模型证明解毒祛瘀滋阴方的抗炎效果,并进一步选择其发挥抗炎作用的最佳剂型。

TLR4 通过其下游 MyD88 转导通路诱导白细胞介素 1 (IL-1) 受体相关激酶 (IRAKs) 磷酸化,激活胞浆内的肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF-6)。活化后的 TRAF-6 通过转化生长因子激酶 1 (TAK1) 与核转录因子- κ B 抑制蛋白激酶 (IKK) 信号级联,使核转录因子- κ B 抑制蛋白 (I- κ B) 磷酸化而降解,最终激活 NF- κ B,引起促炎细胞因子基因的转录和表达,诱发各种炎症反应,由此介导早期的天然免疫反应^[8]。NF- κ B 作为信号通路中重要的下游分子,具有强大的核转录调节功能^[9]。当细胞在上游刺激因子(如 IL-1、TNF- α 、病毒、细菌 LPS 等)的作用下,I κ B 在激酶复合物 IKK 的作用下被磷酸化,并迅速降解,使 NF- κ B 的核定位序列暴露出来,进入细胞核,与其靶基因 5' 端特异的启动子序列 (GGGACTTT-CC) 相结合,从而启动靶基因的转录和翻译,包括促炎性细胞因子 (TNF- α)、趋化因子 [IL-8、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 等]、黏附分子 [细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管内皮细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 等]、IL-1 及 IL-6 等,进而导致弥漫性炎症损伤^[10]。

本实验结果表明,LPS 刺激小鼠单核巨噬细胞后,炎症信号通路 NF- κ B 及 TNF- α 基因和蛋白表达都明显升高,这也佐证了 LPS 与 TLR4 的特异性结合后,使该信号通路异常活化,诱发各种炎症反应。解毒祛瘀滋阴方含药血清及冻干粉均可有效地抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应,通过降低 TNF- α 与 NF- κ B 的表达,证明其抗炎作用与抑制细胞炎症信号通路有关。

课题组前期发现解毒祛瘀滋阴方中含有芍药苷、阿魏酸等成分^[11-12],其中芍药苷能抑制 TLR4 炎症通路的激活,通过调节细胞因子缓解炎症反应^[13];阿魏酸可以通过抑制 NF- κ B 途径,减少自由基生成,降低黏附分子表达和细胞损伤及凋亡^[14]。本实验发现在解毒祛瘀滋阴方含药血清中同样含有这 2 种抗炎有效成分,为其质量控制提供依据。近年来含药血清的方法广泛应用于中药的基础研究,其主要是通过体外的药理效应来反映药物在机体内的作用^[15],含药血清可以较好地反映重要的药效^[16]。有研究通过分析大量的中药药理学实验,提出一种制备含药血清通行的方案,即每天给药 2 次,连续 3 d,末次给药后 1 h 采血,称为“通法”。因此本实验参照这种通法制备大鼠含药血清。基于前期的研究结果和文献报道,含药血清更适合用于解毒祛瘀滋阴方对小鼠单核巨噬细胞炎症信号通路作用的研究,在今后的细胞实验中可以首选含药血清,但其具体的抗炎作用机制还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 张莘莘,李文娟,聂少平,等.黑灵芝多糖对体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J].中国药理学通报,2010,26(9):1139-1141.

- [2] Akira S. Toll-like receptor signaling [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(40): 38105-38108.
- [3] 张智伟, 蔡琨, 于红红, 等. 紫花地丁含药血清对巨噬细胞炎症因子分泌的影响 [J]. 免疫学杂志, 2014(1): 53-56.
- [4] 谢冠群, 季巾君, 范永升. 解毒祛瘀滋阴方对强的松治疗的 MRL/lpr 狼疮鼠肺、脾、腹腔巨噬细胞 TLR4 信号通路的影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2017, 41(4): 318-322.
- [5] 范永升, 温成平, 李学铭. 激素并用解毒祛瘀滋阴方治疗系统性红斑狼疮的临床疗效观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(10): 626-627.
- [6] 李荣群, 刘文洪, 侯晓丽, 等. 解毒祛瘀滋阴方对 MRL/lpr 狼疮小鼠 CD4⁺ T 细胞 MeCP2 信号通路的影响 [J]. 中医杂志, 2018(4): 321-324.
- [7] 温成平, 范永升, 唐晓颇, 等. 解毒祛瘀滋阴药对系统性红斑狼疮患者性激素水平的调节作用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2003, 4(10): 580-582.
- [8] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(5): 979-987.
- [9] Hoesel B, Schmid J A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer [J]. *Mol Cancer*, 2013, doi: 10.1186/1476-4598-12-86.
- [10] Feng G, Jiang Z Y, Sun B, *et al.* Fisetin alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway in rats [J]. *Inflammation*, 2016, 39(1): 148-157.
- [11] 涂继方. 解毒祛瘀滋阴方对 T 淋巴细胞凋亡以及 ER α / β 的调节作用研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2013.
- [12] 吕惠卿, 张小平, 涂继方, 等. 双波长 RP-HPLC 测定解毒祛瘀滋阴方阿魏酸、异阿魏酸和芍药苷的含量 [J]. 中华中医药学刊, 2013(6): 1245-1247.
- [13] Ying Z, Wang L L, Yan W, *et al.* Paeoniflorin attenuates hippocampal damage in a rat model of vascular dementia [J]. *Exper Ther Med*, 2016, 12(6): 3729-3734.
- [14] 沈涛, 朱玉萍, 阮杨, 等. 阿魏酸通过抑制核因子 κ B 信号途径降低肿瘤坏死因子 α 诱导的人血管内皮细胞氧化应激及黏附分子表达 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(5): 385-390.
- [15] 刘建勋, 韩笑, 孙宇扬. 含药血清药理作用强度与体内给药的量效、时效关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 829-831.
- [16] 詹红生. 含药血清实验方法及其在中药新药研制中的应用展望 [J]. 浙江中医药大学学报, 2000, 24(2): 79-81.