

千金子制霜前后提取物通过调控脂筏介导 Caco-2 细胞中 TLR4 信号通路的作用机制研究

王慧楠, 魏晓彤, 石双慧, 王梦琳, 马思媛, 胡宇峰, 姜明瑞, 张婧秋, 王英姿*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: **目的** 探究千金子 *Euphorbiae Semen* 制霜前后提取物通过调控脂筏介导 Caco-2 细胞中 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 信号通路的作用机制。**方法** 将 Caco-2 细胞分为千金子生品低、中、高剂量 (50、200、800 $\mu\text{g/mL}$) 组及千金子霜品低、中、高剂量 (50、200、800 $\mu\text{g/mL}$) 组和对照组, 利用流式细胞术检测 Caco-2 细胞膜脂筏丰度; 采用激光共聚焦实验检测 Caco-2 细胞中 TLR4 与脂筏的共定位; 利用 Western blotting 检测 Caco-2 细胞中 TLR4、核因子- κB p65 (nuclear factor- κB p65, NF- κB p65)、p-NF- κB p65 和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 的蛋白表达; ELISA 检测 Caco-2 细胞上清液中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的含量; Caco-2 细胞转染 *TLR4* 后检测 IL-1 β 和 TNF- α 的含量变化。**结果** 与对照组比较, 千金子生品提取物可以显著增加 Caco-2 细胞膜脂筏的丰度 ($P < 0.01$), 促进 TLR4 向脂筏的募集 ($P < 0.01$), 提高 TLR4、NF- κB p65、p-NF- κB p65 和 NLRP3 的蛋白表达以及诱导 IL-1 β 和 TNF- α 的释放 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。相同剂量下, 与千金子生品提取物相比, 千金子霜品提取物对 Caco-2 细胞膜脂筏丰度、TLR4 向脂筏募集、TLR4 介导的信号通路传导和促炎因子分泌的影响均明显减弱 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。体外 *siTLR4* 转染试验结果进一步证实, Caco-2 细胞转染 *TLR4* 后 TNF- α 和 IL-1 β 的含量显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。**结论** 千金子制霜减毒的作用机制可能与通过调控脂筏丰度干扰 TLR4 向脂筏募集, 最终影响脂筏中包含的 TLR4 信号蛋白的传导有关。

关键词: 千金子; 制霜减毒; 脂筏; Toll 样受体 4; Caco-2 细胞; 千金子甾醇

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)22-7474-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.22.024

Mechanism of extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting mediating TLR4 signaling pathway in Caco-2 cells via regulating lipid rafts

WANG Hui-nan, WEI Xiao-tong, SHI Shuang-hui, WANG Meng-lin, MA Si-yuan, HU Yu-feng, JIANG Ming-rui, ZHANG Jing-qiu, WANG Ying-zi

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To study the mechanism of extracts from Qianjinzi (*Euphorbiae Semen*) and Qianjinzishuang (*Euphorbiae Semen Pulveratum*) mediating Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway in Caco-2 cells via regulating lipid rafts. **Methods** Caco-2 cells were divided into *Euphorbiae Semen* low-, medium- and high-dose (50, 200, 800 $\mu\text{g/mL}$) groups, *Euphorbiae Semen Pulveratum* low-, medium- and high-dose (50, 200, 800 $\mu\text{g/mL}$) groups and control group. Flow cytometry was used to detect the lipid rafts abundance of Caco-2 cells membrane. Confocal laser scanning microscope was used for studying the co-localization of TLR4 and lipid rafts in Caco-2 cells. Western blotting was applied to detect TLR4, nuclear factor- κB p65 (NF- κB p65), p-NF- κB p65 and NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) protein expressions in Caco-2 cells. Furthermore, ELISA was applied to determine the levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the supernatant of Caco-2 cells. And the levels of IL-1 β and TNF- α were detected in Caco-2 cells after transfection with *TLR4*. **Results** Compared with control group, *Euphorbiae Semen* extracts could increase the content of lipid rafts ($P < 0.01$), promote the recruitment of TLR4 to lipid rafts ($P < 0.01$), increase

收稿日期: 2023-07-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074021)

作者简介: 王慧楠 (1997—), 女, 博士研究生, 从事中药制剂新技术与中药炮制原理研究。E-mail: 2672667045@qq.com

*通信作者: 王英姿 (1975—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂新技术与中药炮制原理研究。

Tel: (010)84738615 E-mail: wangyzi@sina.com

the protein expressions of TLR4, NF- κ B p65, p-NF- κ B p65 and NLRP3, as well as induce the release of IL-1 β and TNF- α in Caco-2 cells ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). However, the effects of *Euphorbiae Semen Pulveratum* extracts on the abundance of lipid rafts, the recruitment of TLR4 to lipid rafts, the conduction of TLR4-mediated signaling pathways and the secretion of pro-inflammatory factors were significantly weaker than those of *Euphorbiae Semen* extracts at the same dose ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). In addition, the results of siTLR4 transfection *in vitro* further confirmed that the content of IL-1 β and TNF- α were significantly decreased after transfection of TLR4 in Caco-2 cells ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** The attenuation mechanism of processing for *Euphorbiae Semen* may be closely related to interfering the recruitment of TLR4 to lipid rafts by regulating lipid rafts abundance, and ultimately affecting the cascade of TLR4 signaling protein contained in lipid rafts.

Key words: *Euphorbiae Semen*; attenuating toxicity of frosting; lipid rafts; Toll-like receptor 4; Caco-2 cells; euphobiasteroid

千金子为大戟科植物续随子 *Euphorbia lathyris* L. 的干燥成熟种子, 具有泻下逐水、破血消癥之效, 可用于水肿、二便不通、痰饮、积滞胀满、血瘀经闭, 历代多采用去油制霜法炮制以降低毒性、缓和泻下作用^[1-2]。脂筏是细胞膜内富含脂质以及蛋白质的动态微结构域, 主要由胆固醇、鞘磷脂和脂筏连接信号蛋白构成, 在物质运输和细胞内信号转导中扮演着重要的角色^[3-4]。研究表明, 胆固醇外流是调控脂筏的主要途径, 胆固醇从胞内流出的变化会极大地改变脂筏的丰度, 影响脂筏中包含的 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 下游的信号通路传导^[5]。课题组前期研究结果显示, 千金子制霜后可能通过肝 X 受体 α (liver X receptor α , LXR α) - 腺苷三磷酸结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 途径调控人结肠腺癌 Caco-2 细胞胆固醇外流^[6]。体内实验进一步发现, 千金子制霜后对 TLR4/核因子- κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65) /NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 通路传导及促炎因子分泌的上调作用弱于生品^[7], 提示千金子制霜减毒的作用机制可能与通过 LXR α -ABCA1 途径调节胆固醇外流, 以及干预 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路有关, 但胆固醇外流调控的细胞微区脂筏是否参与千金子制霜减毒的过程, 以及其与 TLR4 介导的信号通路之间的关联性有必要深入研究。因此, 鉴于膜脂成分胆固醇、动态微结构域脂筏与 TLR4 下游信号通路之间的密切联系, 本研究拟采用流式细胞术、免疫荧光、Western blotting、ELISA、TLR4 基因沉默等技术, 系统探讨千金子制霜前后提取物通过调控脂筏丰度对 Caco-2 细胞中 TLR4 通路传导的影响差异, 以期从分子水平解析千金子制霜减毒的作用机制, 为其临床安全有效应用奠定科学依据。

1 材料

1.1 药材

千金子饮片(批号 1203070692)购自安徽亳州, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定为大戟科续随子 *E. lathyris* L. 的干燥成熟种子; 千金子霜由同一批千金子饮片按《中国药典》2020 年版制霜法(通则 0213)制得, 经测千金子脂肪油质量分数为 48.61%, 千金子霜脂肪油质量分数为 19.21%。

1.2 细胞

Caco-2 细胞(批号 BNCC350769)购自北纳生物 BNCC。

1.3 药品与试剂

PBS 溶液(批号 C10010500BT)、DMEM 高糖培养基(批号 C11995500BT)、0.25%胰酶-EDTA(批号 25200-056)购自美国 Gibco 公司; 重组霍乱毒素亚基 B (CT-B)、AlexaFluor™ 488 偶联物(批号 C22841)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒(批号 EMC102a)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 试剂盒(批号 EMC001b)购自北京欣博盛生物科技有限公司; Lipo8000™ 转染试剂(批号 C0533FT)购自上海碧云天生物技术有限公司; DAPI 染色液(批号 r20276-10mL)购自上海源叶生物科技有限公司; TLR4 单抗(批号 66350-1-Ig)、NF- κ B p65 单抗(批号 66535-1-Ig)购自美国 Proteintech 公司; p-NF- κ B p65 抗体(批号 ab76302)、NLRP3 单抗(批号 ab263899)、Alexa Fluor® 594 IgG 抗体(批号 ab150080)购自英国 Abcam 公司; β -actin 单抗(批号 AH11286487)、HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(批号 BJ08079044)、TLR4 多抗(批号 bs-20379R)购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.4 仪器

Heracell™ VIOS 160i 型 CO₂ 培养箱、Attune

NxT 型流式细胞仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SpectraMax i3x 型酶标仪(美国 MD 公司); Tanon 1600 型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司); Countstar® RigelS5 型智能图像流式细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司); TCS SP8 STED 型激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司); Direct-Q3 型超纯水仪(德国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 千金子生品与千金子霜品提取物的制备

称取 50 g 千金子生品, 加入 300 mL 95%乙醇加热回流提取 3 次, 每次提取 2 h, 合并 3 次提取液, 减压回收乙醇, 再用等体积石油醚萃取 3 次, 减压回收, 即得千金子生品提取物; 称取 50 g 千金子霜品, 重复上述操作, 即得千金子霜品提取物, 4 °C 保存备用。实验时稀释, 最终得到生药质量浓度为 3.17 g/mL 的千金子生品和千金子霜品提取物。经 HPLC 检测千金子生品和千金子霜品提取物中千金子甾醇的质量分数分别为 (3.81±0.03)、(2.03±0.01) mg/g。

2.2 细胞培养

Caco-2 细胞接种于培养瓶中, 用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 待细胞密度达到 80%~90%时传代。根据课题组前期千金子制霜前后提取物对 Caco-2 细胞存活率影响的结果^[6], 本研究选择 50、200、800 μg/mL 作为后续实验质量浓度。

2.3 流式细胞术检测 Caco-2 细胞膜脂筏丰度

取对数生长期的细胞, 以 1×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中, 培养至细胞贴壁, 设置千金子生品 (50、200、800 μg/mL) 组, 千金子霜品 (50、200、800 μg/mL) 组和对照组, 每组设 3 个复孔, 孵育 48 h 后, 收集细胞, 4 °C、1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 AlexaFluor™ 488 标记的 CT-B 染色液 (1 μg/mL) 冰上避光染色 10 min, 4 °C、1000 r/min 离心 4 min, 弃上清, 加入 400 μL PBS 分散细胞, 使用流式细胞仪检测荧光, 对细胞膜上的脂筏进行定量分析。

2.4 激光共聚焦实验检测 Caco-2 细胞中 TLR4 与脂筏的共定位

取对数生长期的细胞, 以 1×10⁵ 个/孔接种于共聚焦小皿中, 培养至细胞贴壁, 设置千金子生品 (800 μg/mL) 组、千金子霜品 (800 μg/mL) 组和对照组, 每组设 3 个复孔, 孵育 48 h 后, 用 AlexaFluor™

488 标记的 CT-B 染色液 (1 μg/mL) 冰上避光染色 10 min, 随后加入 4%多聚甲醛冰上固定 15 min, 加入 5%牛血清白蛋白室温封闭 1 h; 然后滴加 TLR4 抗体 (1:200), 4 °C 孵育过夜, 再滴加 Alexa Fluor® 594 标记的二抗 (1:1000), 避光孵育 1 h 后, 加入 DAPI 溶液避光染色 5~10 min; 随后滴加少量甘油, 使用激光共聚焦显微镜拍照获取图像, 其中 AlexaFluor™ 488 标记为绿色荧光, Alexa Fluor® 594 标记为红色荧光, DAPI 标记为蓝色荧光; 使用 Image J 软件中的 Coloc2 插件进行 TLR4 与脂筏的共定位分析。

2.5 Western blotting 检测 Caco-2 细胞中 TLR4、NLRP3、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达

将对数生长期的细胞, 按 2×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中, 培养至细胞贴壁, 设置千金子生品 (50、200、800 μg/mL) 组, 千金子霜品 (50、200、800 μg/mL) 组和对照组, 每组设 3 个复孔, 孵育 48 h 后, 吸弃上清, 加入细胞裂解液裂解, 收集细胞, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, BCA 法进行蛋白定量。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5%脱脂牛奶, 室温封闭; TBST 洗涤后, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜; TBST 洗涤后, 加入二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗涤后, 采用凝胶成像系统显色, 使用 Image J 软件分析 Caco-2 细胞中 TLR4、NLRP3、NF-κB p65、p-NF-κB p65 的蛋白表达。

2.6 ELISA 检测 Caco-2 细胞上清液中 IL-1β 和 TNF-α 水平

取对数生长期的细胞, 以 2×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中, 培养至细胞贴壁, 设置千金子生品 (50、200、800 μg/mL) 组, 千金子霜品 (50、200、800 μg/mL) 组和对照组, 每组设 2 个复孔, 孵育 48 h 后, 收集细胞上清液, 4 °C、3000 r/min 离心 25 min, 按照试剂盒说明书检测细胞上清液中 IL-1β 和 TNF-α 水平。

2.7 TLR4 转染后检测 Caco-2 细胞上清液中 IL-1β 和 TNF-α 水平

将对数生长期的细胞, 以 2×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中, 培养至细胞贴壁, 实验所用的 TLR4 siRNA (上游引物 5'-CCAAGUAGUCUAGCUUUCUUAdTd-3', 下游引物 5'-UAAGAAAGCUAGACUACUUGGAdTd-3') 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 按照脂质体转染试剂说明书进行转染。转染 24 h 后, 设置千金子生品 (50、200、800 μg/mL) 组, 千金

子霜品 (50、200、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组和对照组, 每组设 2 个复孔, 孵育 48 h 后, 收集细胞上清液, 按照“2.6”项下方法检测 Caco-2 细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 水平。

2.8 统计学分析

采用 SAS 8.2 软件进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若符合正态分布, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD 检验; 若不足正态性, 采用非参数检验。

3 结果

3.1 千金子制霜前后提取物对 Caco-2 细胞膜脂筏丰度的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 千金子生品与霜品提取物均可显著提高 Caco-2 细胞膜中脂筏丰度 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 且呈剂量相关性; 相同质量浓度下, 与千金子生品组比较, 千金子霜品可显著减轻对 Caco-2 细胞膜中脂筏丰度的上调作用 ($P <$

0.05、0.01)。

3.2 千金子制霜前后提取物对 Caco-2 细胞中 TLR4 与脂筏共定位的影响

采用激光共聚焦显微镜对 Caco-2 细胞中 TLR4 与脂筏的共定位进行观察, 结果如图 2 和表 1 所示, 与对照组比较, 千金子生品提取物可使 Caco-2 细胞中 TLR4 与脂筏的共定位显著增加 ($P < 0.01$); 千金子霜品提取物作用于 Caco-2 细胞后, TLR4 与脂筏的共定位程度略有增加, 但与对照组相比无统计学意义; 与千金子生品组相比, 千金子霜品组对 Caco-2 细胞中 TLR4 与脂筏的共定位的影响显著减轻 ($P < 0.01$)。

3.3 千金子制霜前后提取物对 Caco-2 细胞中 TLR4、NLRP3、NF- κB p65、p-NF- κB p65 蛋白表达的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 各剂量的千金子生品提取物能够显著提高 Caco-2 细胞中 TLR4 和

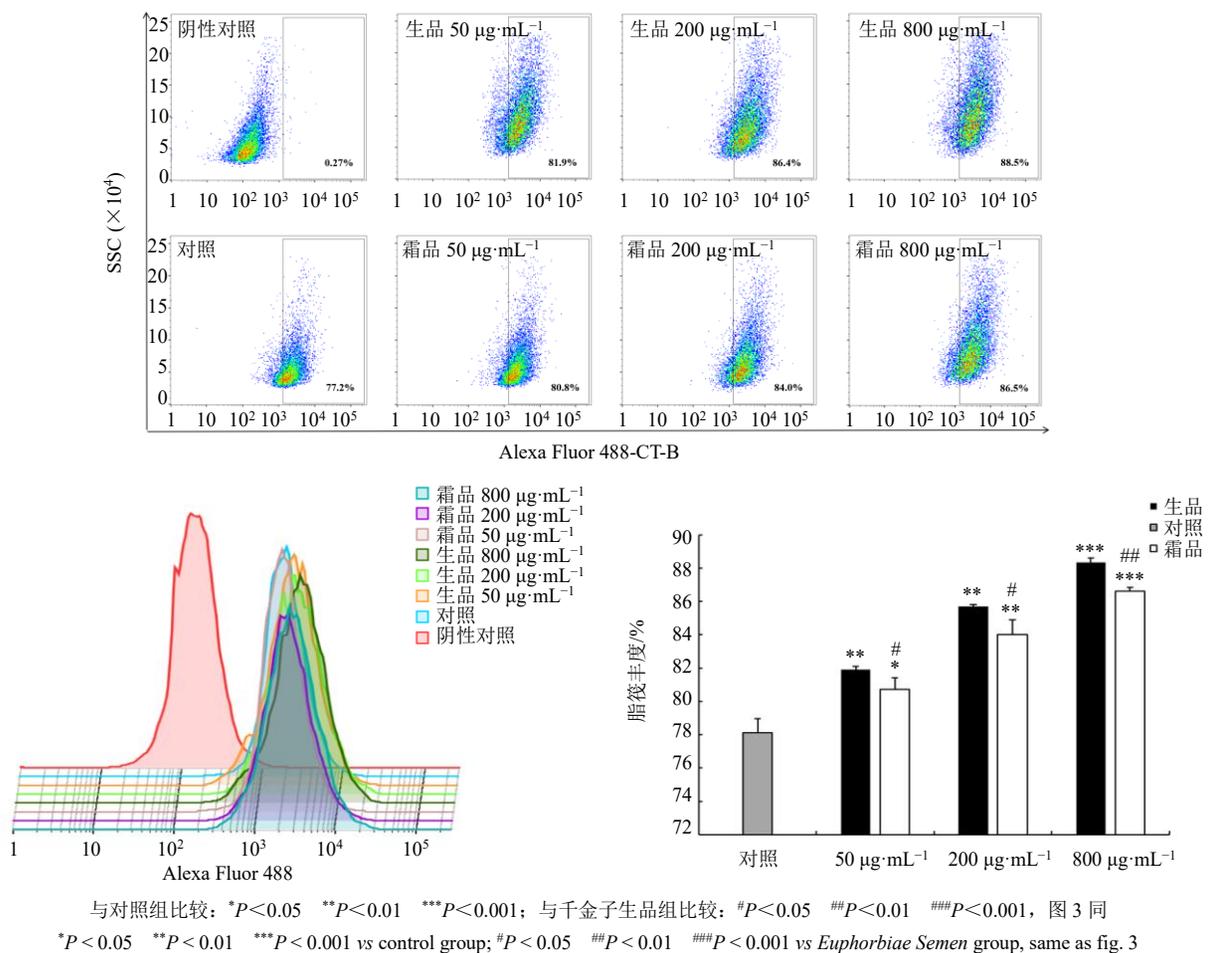
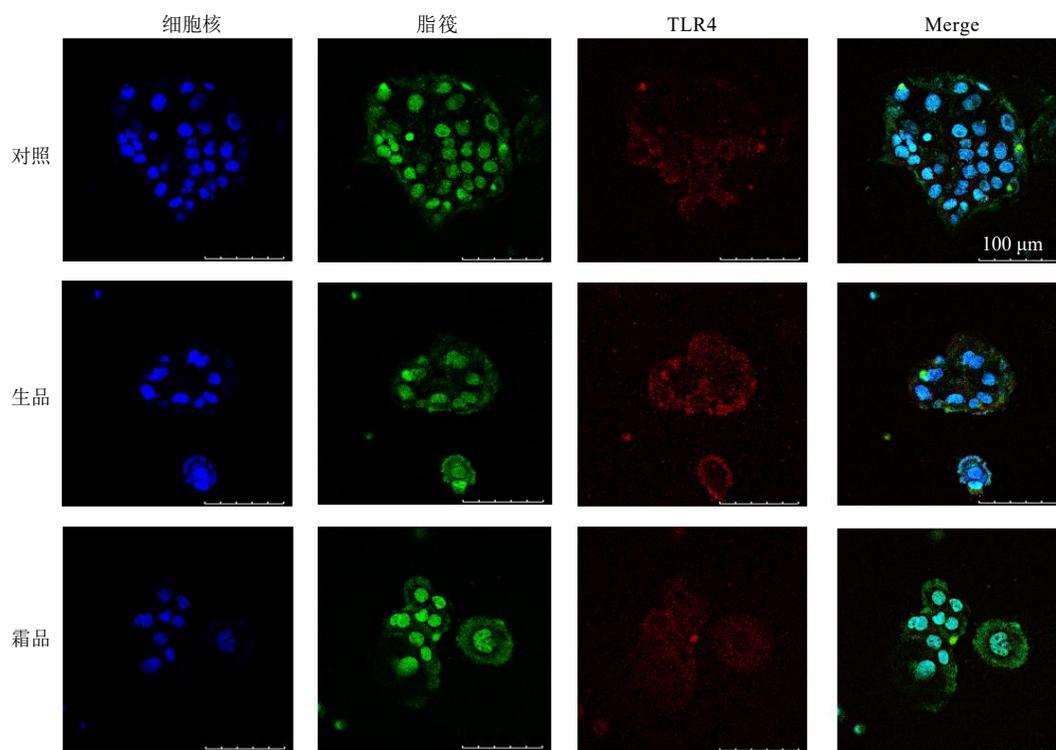


图 1 千金子制霜前后提取物对 Caco-2 细胞膜脂筏丰度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting on abundance of lipid rafts in Caco-2 cells membrane ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



脂筏富集区表现为绿色荧光，TLR4 表现为红色荧光，细胞核表现为蓝色荧光
lipid rafts showed green fluorescence, TLR4 showed red fluorescence and nucleus showed blue fluorescence

图 2 千金子制霜前后提取物对 Caco-2 细胞中 TLR4 与脂筏共定位的影响 (×400)

Fig. 2 Effect of extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting on colocalization of TLR4 and lipid rafts in Caco-2 cells (× 400)

表 1 Caco-2 细胞中 TLR4 与脂筏的共定位系数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Colocalization coefficient of TLR4 and lipid raft in Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Pearson 相关系数
对照	0.427 ± 0.015
千金子生品	0.607 ± 0.035**
千金子霜品	0.457 ± 0.015###

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与千金子生品组比较: ### $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.01$ vs *Euphorbiae Semen* group

NLRP3 的蛋白表达 ($P < 0.05, 0.001$), 低、高剂量的千金子生品提取物能够显著提高 Caco-2 细胞中 NF- κ B p65 的蛋白表达 ($P < 0.001$), 中、高剂量的千金子生品提取物能够显著提高 Caco-2 细胞中 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 的蛋白表达 ($P < 0.001$); 相同剂量下, 与千金子生品提取物比较, 千金子霜品提取物对 Caco-2 细胞中 TLR4、NLRP3、NF- κ B p65 和 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达水平的调控作用均明显减轻 ($P < 0.01, 0.001$)。

3.4 千金子制霜前后提取物对 Caco-2 细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 分泌的影响

如图 4 所示, 千金子制霜前后提取物干预 Caco-

2 细胞 48 h 后, 与对照组 (NC) 比较, 千金子生品和霜品各剂量组均可显著上调 Caco-2 细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 的含量 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 且呈剂量相关性; 相同剂量下, 与千金子生品比较, 千金子霜品提取物对上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 含量的上调作用明显减弱 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.5 TLR4 基因沉默后对 Caco-2 细胞 IL-1 β 和 TNF- α 分泌的影响

如图 4 所示, 用 TLR4 siRNA-1772 转染 Caco-2 细胞 24 h 后, 给予千金子生品与霜品提取物刺激 48 h, 与对照组 (TLR4-siRNA) 比较, 千金子生品各剂量组及霜品中、高剂量组均可促进 Caco-2 细胞分泌 TNF- α 和 IL-1 β ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); 相同剂量下, 与千金子生品比较, 千金子霜品提取物可以显著减弱对 TNF- α 和 IL-1 β 含量的上调 ($P < 0.05, 0.01$), 这与 TLR4 沉默前千金子制霜前后提取物对 Caco-2 细胞 IL-1 β 和 TNF- α 含量的影响趋势一致。与相同剂量下的未转染组 (NC) 比较, 沉默 TLR4 后, Caco-2 细胞上清液中 TNF- α 和 IL-1 β 的含量显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。

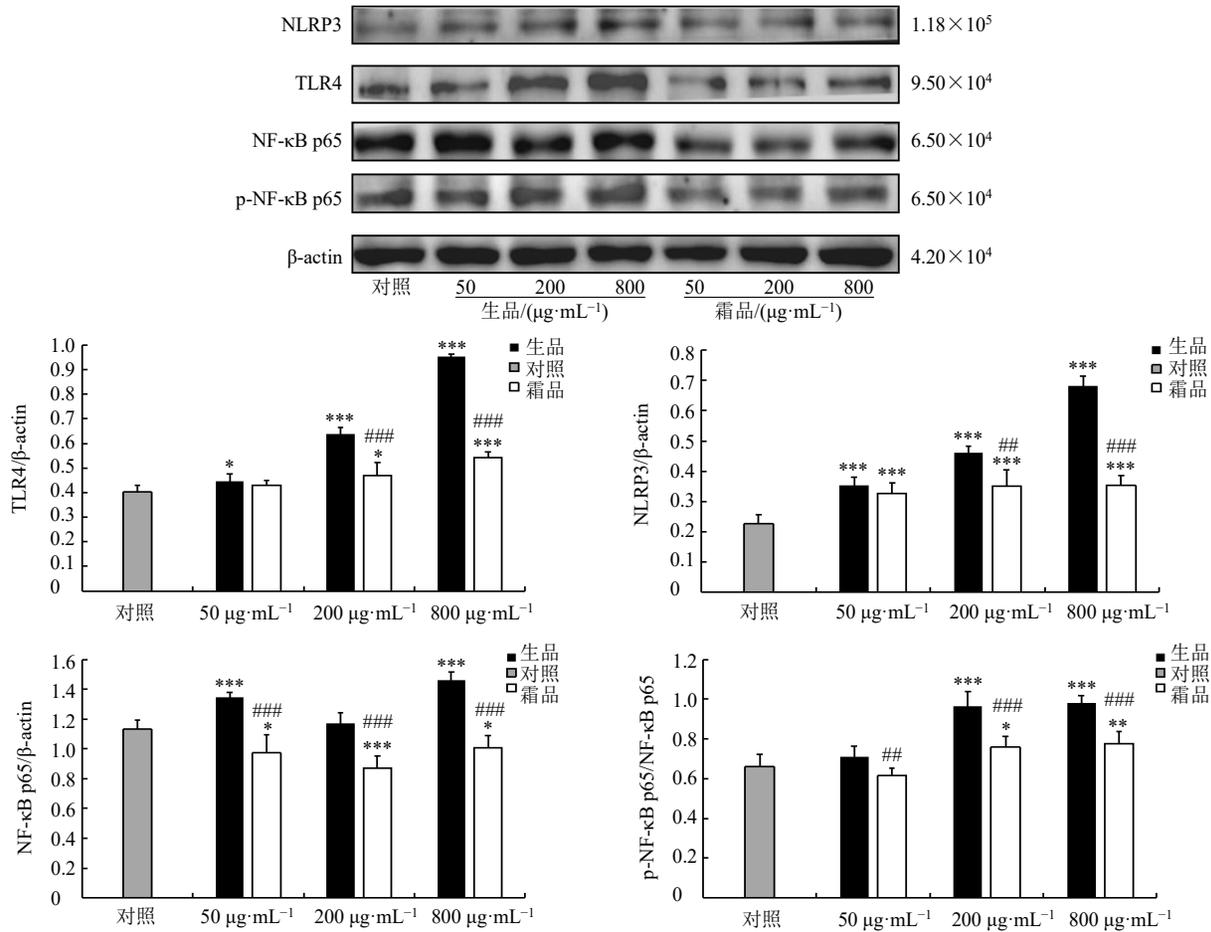
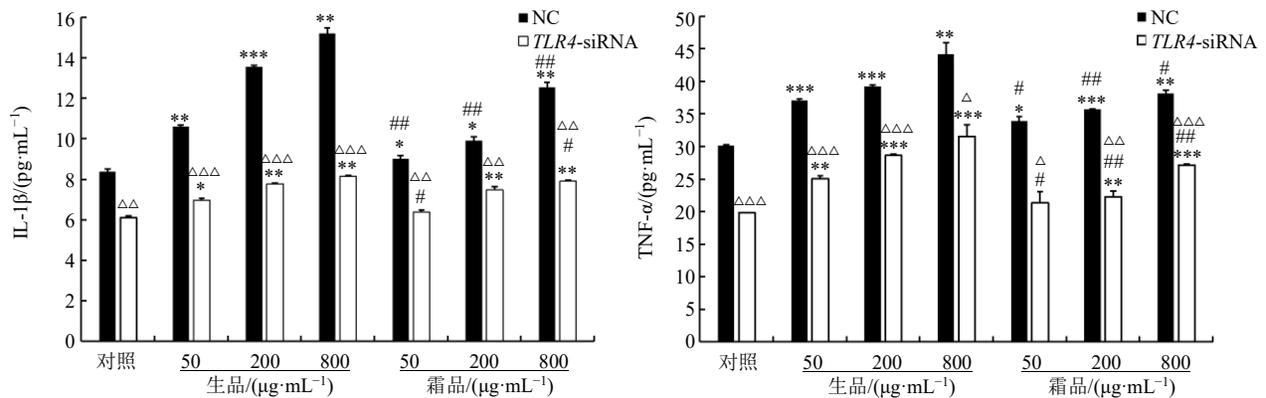


图 3 千金子制霜前后提取物对 Caco-2 细胞中 TLR4、NLRP3、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 3 Effect of extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting on expressions of TLR4, NLRP3, NF-κB p65 and p-NF-κB p65 protein in Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与千金子生品组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与未转染 (NC) 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$
 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs *Euphorbiae Semen* group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs non-transfection (NC) group

图 4 TLR4 信号通路对千金子制霜前后提取物引起的 Caco-2 细胞上清液中炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 水平变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

Fig. 4 Effect of TLR4 signaling pathway on levels of IL-1β and TNF-α in Caco-2 cell supernatant induced by extracts from *Euphorbiae Semen* before and after frosting ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

4 讨论

课题组前期研究发现, 千金子制霜前后提取物可通过 LXR α -ABCA1 影响 Caco-2 细胞中胆固醇外流^[6]。由于胆固醇是脂筏的主要组成成分, 其在脂筏的形成中发挥关键作用, 脂筏的含量受细胞胆固醇外流途径的高度调节^[8-9]。因此, 本研究采用流式细胞术进一步考察千金子制霜前后对 Caco-2 细胞膜脂筏丰度的影响, 结果表明千金子制霜前后提取物均可显著增加 Caco-2 细胞膜脂筏丰度, 而制霜后对 Caco-2 细胞膜脂筏含量的上调作用较生品减弱, 说明千金子制霜前后可能通过 LXR α -ABCA1 途径调节胆固醇外流, 进而影响脂筏的丰度及其功能, 制霜后可以减轻对 Caco-2 细胞膜脂筏丰度的影响。

脂筏作为质膜上的重要功能平台, 在 TLR4 介导的信号转导和靶向促炎因子表达中扮演关键角色^[10-11]。脂筏含量的增加会导致 TLR4 受体在脂筏中占据时间变长、信号增强, 进而引起炎症^[12-15]。为探究千金子制霜前后是否会通过调控 Caco-2 细胞膜脂筏丰度影响 TLR4 向脂筏的募集, 本研究应用激光共聚焦显微镜考察千金子制霜前后对 TLR4 和脂筏共定位的影响, 结果显示千金子制霜前后提取物均可促进 TLR4 向脂筏的募集; 而制霜后对 Caco-2 细胞中 TLR4 向脂筏中募集的促进作用明显弱于生品。此结果进一步表明, 千金子制霜减毒作用是通过调控细胞膜微区脂筏丰度影响 Caco-2 细胞中 TLR4 向脂筏的募集实现的。

此外, 课题组前期研究结果还表明, 千金子制霜减毒的作用机制与致炎能力下降以及干预小鼠结肠组织中 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路有关^[7]。为了更深入地研究千金子制霜前后是否能够通过影响 TLR4 向脂筏募集进一步干扰 Caco-2 细胞中 TLR4 下游信号通路传导, 本研究利用 Western blotting 和 ELISA 分别检测千金子制霜前后提取物对 TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、NLRP3 蛋白表达和 IL-1 β 、TNF- α 释放的影响, 结果表明千金子生品可以提高 Caco-2 细胞脂筏中所含有的 TLR4、NLRP3、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达, 促进 IL-1 β 和 TNF- α 的释放; 而制霜后可不同程度地逆转千金子诱导的 TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、NLRP3、IL-1 β 和 TNF- α 水平的增高, 与体内实验结果一致, 提示千金子生品可以促进 TLR4 向脂筏的募集, 诱导 TLR4 复合物进入细胞质中, 使得 NF- κ B p65 从细胞质转移到细胞核, 并提高 NLRP3 蛋白和炎症

因子的表达; 千金子制霜后可通过调控细胞膜微区脂筏丰度影响 TLR4 向脂筏的募集, 进而干预脂筏中包含的 TLR4 信号级联, 降低 Caco-2 细胞体外毒性。体外 siRNA 沉默 TLR4 技术显示 Caco-2 细胞转染 TLR4 后, IL-1 β 和 TNF- α 的含量显著降低, 进一步证实千金子制霜前后对 Caco-2 细胞中 IL-1 β 和 TNF- α 含量的上调作用与 TLR4 信号通路有关。但除了 TLR4 介导的 NF- κ B/NLRP3 途径外, TLR4 还可介导丝裂原活化蛋白激酶、磷脂酰肌醇 3-激酶/丝苏氨酸激酶、干扰素调节因子 3 等多种信号途径^[16], 本研究结果尚不能揭示千金子制霜前后提取物对其他途径的调控作用, 后续将对 TLR4 介导的其他炎症信号通路开展研究。

综上, 本研究发现千金子生品可以显著改善 Caco-2 细胞脂筏丰度, 促进 TLR4 向脂筏募集, 从而诱导 TLR4/NF- κ B/NLRP3 途径的激活和 TNF- α 和 IL-1 β 的释放, 而制霜后对脂筏丰度、TLR4 向脂筏募集、TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路传导以及下游促炎因子分泌的影响均明显减弱, 提示千金子制霜减毒的作用机制可能与影响细胞膜微区脂筏丰度从而干扰 Caco-2 细胞中 TLR4 信号通路传导有关, 此结果可为深入探讨千金子制霜减毒机制提供重要依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 36-37.
- [2] 朱娟娟, 辛义周, 马传江. 千金子炮制减毒机理的研究进展 [J]. 药学研究, 2020, 39(3): 153-155.
- [3] 郭均, 黄燕燕, 刘冬梅, 等. 植物乳杆菌 DMDL 9010 制剂调控 SD 大鼠脂质水平的研究 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(8): 285-290.
- [4] 陈岚, 许彩民, 袁建刚, 等. 脂筏的结构与功能 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(1): 54-59.
- [5] Morgan P K, Fang L H, Lancaster G I, et al. Hematopoiesis is regulated by cholesterol efflux pathways and lipid rafts: Connections with cardiovascular diseases [J]. *J Lipid Res*, 2020, 61(5): 667-675.
- [6] 王佩华, 岳珠珠, 魏晓彤, 等. 千金子制霜前后提取物通过肝 X 受体-腺苷三磷酸结合盒转运体 A1 信号通路对 Caco-2 细胞中胆固醇外流的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(2): 201-205.
- [7] 王慧楠, 姜明瑞, 王志成, 等. 千金子制霜前后提取物对 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路的影响研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(6): 780-789.
- [8] Pattnaik G P, Chakraborty H. Cholesterol alters the inhibitory efficiency of peptide-based membrane fusion

- inhibitor [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Biomembr*, 2019, 1861(12): 183056.
- [9] Biswas A, Kashyap P, Datta S, *et al.* Cholesterol depletion by M β CD enhances cell membrane tension and its variations-reducing integrity [J]. *Biophys J*, 2019, 116(8): 1456-1468.
- [10] Fu J L, Shi Q, Song X F, *et al.* From the cover: Tetrachlorobenzoquinone exerts neurological proinflammatory activity by promoting HMGB1 release, which induces TLR4 clustering within the lipid raft [J]. *Toxicol Sci*, 2016, 153(2): 303-315.
- [11] Sun M L, Han X D, Zhou D I, *et al.* BIG1 mediates sepsis-induced lung injury by modulating lipid raft-dependent macrophage inflammatory responses [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2021, 53(8): 1088-1097.
- [12] Wei X C, Song H W, Yin L, *et al.* Fatty acid synthesis configures the plasma membrane for inflammation in diabetes [J]. *Nature*, 2016, 539(7628): 294-298.
- [13] Gajate C, Mollinedo F. Lipid raft isolation by sucrose gradient centrifugation and visualization of raft-located proteins by fluorescence microscopy: The use of combined techniques to assess Fas/CD95 location in rafts during apoptosis triggering [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2187: 147-186.
- [14] Li B R, Qin Y, Yu X J, *et al.* Lipid raft involvement in signal transduction in cancer cell survival, cell death and metastasis [J]. *Cell Prolif*, 2022, 55(1): e13167.
- [15] Mollinedo F, Gajate C. Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: Implications in tumor progression and therapy [J]. *J Lipid Res*, 2020, 61(5): 611-635.
- [16] 陈俊利, 裴明, 周豪坤, 等. Toll 样受体 4 信号通路在纤维化中的研究进展 [J]. *河北医药*, 2022, 44(13): 2044-2048.

[责任编辑 李亚楠]