

· 经典名方 ·

泻心汤含药血清对 RAW264. 7 源性泡沫细胞 TLR9/MyD88/NF-κB p65 信号通路的影响

于红红, 俞琦, 蔡琨, 陈茜, 盛蒙, 许丽婷, 田维毅*
(贵州中医药大学, 贵阳 550002)

[摘要] **目的:** 通过体外细胞实验研究泻心汤对巨噬细胞源性泡沫细胞 Toll 样受体 9 (TLR9) 信号通路的影响, 探讨泻心汤抗动脉粥样硬化的作用机制。**方法:** 50 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为泻心汤低、中、高剂量组 (1.4, 4.2, 12.6 g·kg⁻¹·d⁻¹) 及正常组, 除正常组 20 只外, 其余每组 10 只, 正常组给予等体积的纯水灌胃, 各组连续灌胃 7 d, 末次给药 1 h 后, 分离血清, 制备泻心汤低、中、高剂量组含药血清及正常组血清。用氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 干预 RAW264.7 巨噬细胞分化为泡沫细胞。采用油红 O 染色法鉴定细胞泡沫化; 噻唑蓝 (MTT) 比色法观察含药血清对巨噬细胞源性泡沫细胞增殖的影响后, 选择各剂量浓度为 20% 的含药血清作用于泡沫细胞模型, 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测白细胞介素-1β (IL-1β), γ-干扰素 (INF-γ) 的含量; 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 及蛋白免疫印迹法 (Western blot) 分别测定 TLR9, 髓样分化因子 88 (MyD88), 核转录因子-κB (NF-κB) mRNA 及蛋白表达。**结果:** 油红 O 染色显示出 ox-LDL 干预后细胞内红色颗粒明显, 泡沫细胞模型制备成功; MTT 比色法结果显示, 与正常组血清比较, 泻心汤高剂量组含药血清在 10% ~ 30% 浓度范围内, 其细胞增殖差异无显著性。后续选择各剂量浓度为 20% 的含药血清干预经 ox-LDL 诱导的泡沫细胞, 与正常组比较, 模型组用 ox-LDL 干预后诱导了 TLR9, MyD88, NF-κB p65, IL-1β, INF-γ 的高表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 不同剂量组泻心汤含药血清干预后降低了 TLR9, MyD88, NF-κB p65, IL-1β, INF-γ 的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且部分干预作用呈现出剂量依赖性。**结论:** 泻心汤含药血清可抑制泡沫细胞 TLR9/MyD88/NF-κB p65 通路以及促炎因子 IL-1β, INF-γ 的转录和过表达, 这可能是泻心汤抗动脉粥样硬化重要作用机制之一。

[关键词] 泻心汤; 泡沫细胞; Toll 样受体 9; 动脉粥样硬化; 氧化低密度脂蛋白
[中图分类号] R2-0; R285.5; R289; R322.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)18-0024-06
[doi] 10.13422/j.cnki.syfxj.20191836
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190603.0910.001.html>
[网络出版时间] 2019-06-04 9:47

Effect of Xiexintang Containing Serum on Expression of TLR9/MyD88/NF-κB p65 Signal Pathway in Foam Cell

YU Hong-hong, YU Qi, CAI Kun, CHEN Xi, SHENG Meng, XU Li-ting, TIAN Wei-yi*
(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** The effect of Xiexintang on Toll like receptor 9 (TLR9) signaling pathway in macrophage derived foam cells was studied by *in vitro* cell experiments. **Method:** The fifty SPF male SD rats were randomly divided into low, medium and high dose groups (1.4, 4.2, 12.6 g·kg⁻¹·d⁻¹) and normal groups. Except 20 rats in the normal group, 10 rats in each group were given equal volume of pure water gavage in the blank group. After the last Administration for 7 days, serum was separated, and the serum containing drugs in the low, medium and high dose groups of Xiexintang was prepared. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) was

[收稿日期] 20190319(003)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860779, 81860776); 贵州省国内一流建设学科项目(GNYL[2017]008 号); 贵州省普通高等学校工程研究中心项目(黔教合 KY 字[2015]337 号)
[第一作者] 于红红, 硕士, 实验师, 从事动脉粥样硬化的基础研究, E-mail: 731319210@qq.com
[通信作者] * 田维毅, 博士, 教授, 从事动脉粥样硬化的基础研究, E-mail: tianweiyi1972@sina.com

used to intervene the differentiation of RAW264. 7 macrophages into foam cells. The cell foam was identified by oil red O staining. After observing the effect of drug containing serum on the proliferation of macrophage derived foam cells by methye thiazolye telrazlium (MTT) method, the serum containing 20% concentration of each drug was selected to act on the foam cell model. The expression of interleukin (IL)-1 β and interferon (INF)- γ was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR). TLR9, myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and nuclear factor (NF)- κ B were detected by Western blot. **Result:** Oil red O staining showed that the red particles were obvious after ox-LDL intervention. The foam cell model was successfully prepared. MTT results showed that there was no significant difference in cell proliferation between the high dose group of Xiexintang in the 10% ~ 30% concentration range and the normal group serum. Follow up selection of the serum containing 20% concentration of each dose intervened the foam cells induced by ox-LDL. Compared with the normal group, the model group after ox-LDL intervention induced the high expression of TLR9, MyD88, NF- κ B p65, IL-1 β , INF- γ ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, the serum of Xiexintang containing different dosage groups reduced the expression of TLR9, MyD88, NF- κ B p65, IL-1 β , INF- γ ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and part of the intervention was dose-dependent. **Conclusion:** Xiexintang containing serum can inhibit ox-LDL-induced RAW264. 7 macrophage foaming, and its mechanism may involve regulation of TLR9/MyD88/NF- κ B p65 signaling pathway and inhibition of IL-1 β and INF- γ overexpression. This may be one of its mechanisms of against atherosclerosis.

[**Key words**] Xiexintang; foam cells; Toll like receptor 9; atherosclerosis; oxidized low density lipoprotein

动脉粥样硬化(AS)是动脉管壁的一种慢性炎症性血管病变,是人体血管衰老的标志,以血管壁产生粥样斑块为特征,亦是许多心脑血管疾病的共同病理基础,近年在我国发病率呈上升趋势,发病率高且严重危害健康^[1-2]。Toll 样受体参与了多种慢性炎症性疾病和心脑血管疾病的研究,为 AS 的防治提供了新的靶点^[3]。研究资料显示,Toll 样受体 9(TLR9)在 AS 的起始、发展、斑块不稳定乃至斑块破裂等不同阶段都发挥了重要作用,其介导的信号转导通路影响着 AS 进程,是 AS 发病机制的重要靶点^[4-6]。

泻心汤出自《金匱要略》,由大黄、黄连片、黄芩片组成,具有泻火燥湿之功效。现代药理研究证实泻心汤具有抗炎、抗 AS 及稳定斑块等药理作用,相关研究已发现泻心汤抗 AS 的作用可能与抑制血管平滑肌细胞增殖、抑制血管内皮细胞凋亡、抑制炎症因子的表达、调脂及抗氧化应激有关^[7-9],但目前泻心汤抗 AS 的分子机制尚不完全清楚。中药能通过多途径、多靶点整合起效防治 AS,泻心汤能否通过调控泡沫细胞表现出抗 AS 效应,国内外尚未见相关文献报道。结合前期课题组动物实验证实,泻心汤可抑制 AS 斑块形成及进展,可能与抑制炎症因子过表达、减少相关活性物质分泌有关。本研究采用氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导 RAW264. 7 巨噬细胞分化为泡沫细胞,采用血清药理学方法观

察泻心汤对巨噬细胞源性泡沫细胞 TLR9,髓样分化因子 88(MyD88),核转录因子- κ B(NF- κ B)p65 mRNA 及蛋白的表达及细胞上清中的白细胞介素-1 β (IL-1 β), γ -干扰素(INF- γ)含量,探讨泻心汤含药血清对 TLR9 介导的信号转导通路的影响,以寻求泻心汤可能的抗 AS 作用机制,为临床应用泻心汤防治 AS 等慢性炎症性疾病提供科学依据。

1 材料

1.1 动物及细胞 雄性 SD 大鼠 50 只,SPF 级,体质量 180 ~ 220 g,购自长沙市天勤生物科技有限公司,合格证号 SCXK(湘) 2014-0010。动物饲养于相对温度(23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(50 $\pm$ 10)%的环境中,饲养管理均严格按照实验动物的要求及规则,实验前适应性饲养 3 d。动物实验经贵州医科大学动物伦理委员会批准进行,实验动物符合伦理委员会规定,伦理委员会编号 NO1503018。小鼠 RAW264. 7 巨噬细胞由贵州省疾病预防控制中心慢性病防治研究所馈赠,稳定传至 4 ~ 5 代。

1.2 药物及试剂 泻心汤按《金匱要略》原方配伍比例(大黄 6 g,黄连片 3 g,黄芩片 3 g),饮片购自北京同仁堂贵阳店,并经贵州中医药大学药学院王祥培教授鉴定为正品。按照常规方法水煎煮制备水煎液^[10],并将其加热浓缩至含生药 1 g $\cdot$ mL⁻¹,4 $^{\circ}$ C 保存备用。胎牛血清及 DMEM 高糖培养基(美国

HyClone 公司,批号分别为 SH30071.03, SH30243.01B); Accutase 细胞消化液(美国 eBioscience 公司,批号 00-4555); trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 15596-026); 逆转录试剂盒, *Taq* 酶(大连 Takara 公司,批号分别为 6110A, R500A); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号 A045-1); TLR9, MyD88, NF- κ B p65 及 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 13674, 4283, 8242, 4970); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(北京中杉金桥公司,批号 ZB-2301); 超敏 ECL 化学发光试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 B2160738); IL-1 β , INF- γ 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(联科生物科技有限公司,批号分别为 EK101B2, EK1802); 油红 O 染色液(美国 Sigma 公司,批号 1320065); ox-LDL(北京协生生物科技公司,批号 20140109); 噻唑蓝(MTT,碧云天生物技术研究所以,批号 C0009)。

1.3 仪器 CLASS 100 型 CO₂ 培养箱, MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司); NU-440-400E 型生物安全柜(美国 Nuair 公司); DMI3000B 型倒置相差显微镜(德国 Leica 公司); ABI7500 型全自动实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司); 3-18K 型低温离心机(德国 Sigma 公司); 165-8001 型垂直电泳槽, 170-3930 型转印槽, GelDoc 2000 型凝胶成像分析仪, ChemiDocXRS 型化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司); vx-55 型高压灭菌锅(德国 Systec 公司)。

2 方法

2.1 泻心汤含药血清制备 将大鼠适应性喂养 3 d,取 50 只 SD 大鼠随机分为 4 组,分别为正常组、泻心汤低、中、高剂量组。正常组 20 只,其余各组每组 10 只。参照大鼠与人等剂量换算公式得出大鼠灌胃用量^[11],以成人(体质量以 60 kg 计)每日用药量的等效剂量(按 7 倍用药量换算大鼠等效剂量)为泻心汤低剂量,泻心汤低、中、高剂量组分别按 1.4, 4.2, 12.6 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,给药体积为 1 mL·100 g⁻¹(大鼠体质量);正常组给予等体积纯净水灌胃。每天灌胃 1 次,连续 7 d。末次给药 1~2 h 内股动脉取血,3 000 r·min⁻¹离心 10 min 后制备各组血清,水浴灭活,微孔滤器过滤后-80℃冰箱保存备用。

2.2 RAW264.7 巨噬细胞的培养 复苏 RAW264.7 巨噬细胞后,用含 10% 胎牛血清的

DMEM 高糖培养基于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中恒温孵育。细胞生长至 80%~90% 融合度时用 Accutase 细胞消化液按 1:2 或 1:3 的比例进行传代,置 CO₂ 培养箱中恒温培养,取对数生长期的细胞用于后续实验。

2.3 细胞分组及干预 实验设为 5 个组,分别为正常组、模型组及泻心汤低、中、高剂量组。除正常组外,其余各组均建立泡沫细胞模型,即在用泻心汤含药血清干预前每孔均加入终质量浓度为 80 mg·L⁻¹ 的 ox-LDL 于培养箱中孵育 24 h,光学显微镜镜下观察细胞形态。

2.4 油红 O 染色鉴定泡沫细胞 弃去细胞上清液,用 PBS 液洗涤 3 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,用油红 O 试剂盒染色,光学显微镜下观察细胞泡沫化程度并拍照。

2.5 MTT 比色法检测泡沫细胞增殖的情况 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液调整细胞密度为 1×10⁵ 个/mL,于 96 孔板中加入 100 μ L/孔细胞悬液,按正常组血清、泻心汤高剂量组含药血清分别加入 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 和 60% 质量分数的正常血清和含药血清,全部加样均设 8 个复孔。置 CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后每孔加入 MTT 培养 4 h,后加入 Formazan 溶解液,在酶标仪 570 nm 处测定吸光度 *A*。

2.6 ELISA 测定细胞上清液中 IL-1 β 和 INF- γ 的含量 将各组 RAW264.7 巨噬细胞以 5×10⁶ 个/mL 的密度接种于 96 孔板中,每孔加入 100 μ L 细胞悬液,泡沫细胞模型诱导成功后,正常组及模型组分别予 20% 浓度的大鼠正常血清共孵育 24 h;泻心汤低、中、高剂量组分别予质量分数为 20% 的泻心汤低、中、高剂量的含药血清共培养 24 h。分别收集各孔细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书检测细胞上清液中 IL-1 β , INF- γ 的表达。

2.7 Real-time PCR 检测细胞 TLR9, MyD88, NF- κ B mRNA 的表达 PCR 引物按 NCBI 中 Primer-BLAST 设计,并委托北京鼎国昌盛生物科技有限公司进行引物序列合成(表 1),以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参。分别收集各组细胞,采用 trizol 试剂提取细胞总 RNA,并逆转录合成 cDNA。采用 Real-time PCR 仪进行扩增,PCR 反应扩增条件: 95℃ 30 s, 1 个循环; 95℃ 5 s, 55℃ 10 s, 扩增 40 个循环。检测各目的基因,并采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法对结果进行分析,计算其表达量。

表 1 引物序列

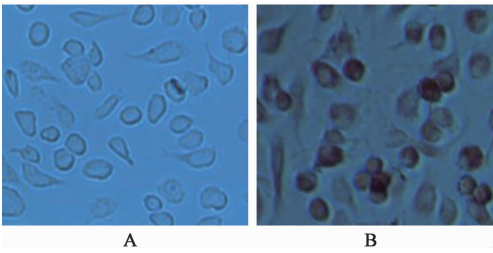
Table 1 Primer sequences		
引物	序列	长度/bp
TLR9	上游 5'-TTCTCAAGACGGTGGATC-3'	412
	下游 5'-GGCGCAGTCGCACATAG-3'	
MyD88	上游 5'-ATAGGCACCAGCATGCAC-3'	181
	下游 5'-TAGGCTCCTTACCAGGTA-3'	
NF-κB	上游 5'-AAAATGCCCCACGGTTATG-3'	134
	下游 5'-ATTTCGCTTTGCCTTCCTCC-3'	
GAPDH	上游 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3'	123
	下游 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞 TLR9, MyD88, NF-κB p65 蛋白的表达 分别收集各组细胞, 加入细胞裂解液收集蛋白, 采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶进行蛋白电泳, 分离后恒定电流转至 PVDF 膜上。室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后加入相应的一抗, β-actin 一抗 (1 : 4 000), TLR9, MyD88, NF-κB p65 一抗 (1 : 1 000), 4 ℃ 孵育过夜, 洗涤后加入 HRP 标记的二

表 2 不同质量分数泻心汤含药血清对泡沫细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of different concentrations of Xiexintang containing serum on foam cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 8$)							
组别	剂量/g·kg ⁻¹	10%	20%	30%	40%	50%	60%
正常	—	0.284 ± 0.027	0.296 ± 0.030	0.298 ± 0.018	0.306 ± 0.021	0.285 ± 0.019	0.298 ± 0.027
泻心汤	12.6	0.289 ± 0.018	0.306 ± 0.025	0.293 ± 0.019	0.257 ± 0.017 ¹⁾	0.201 ± 0.018 ¹⁾	0.198 ± 0.025 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。



A. 巨噬细胞; B. ox-LDL 诱导后的泡沫细胞

图 1 巨噬细胞、泡沫细胞形态 (油红 O, ×200)

Fig. 1 Macrophage and foam cell morphology (Oil red O ×200)

3.3 对泡沫细胞 IL-1β 和 INF-γ 含量的影响 与正常组比较, 模型组用 ox-LDL 诱导 RAW264.7 源性泡沫细胞后 IL-1β, INF-γ 的表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 泻心汤含药血清各剂量组干预后能明显下调 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 源性泡沫细胞上清液中 IL-1β, INF-γ 的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

抗 (1 : 5 000) 室温孵育 1 h。洗涤后 ECL 显影液显影, 用 ChemiDocXRS 成像系统显色、曝光采图, Image J 软件分析各目的条带灰度值。

2.9 统计分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据分析用 t 检验或单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 油红 O 染色鉴定泡沫细胞 未经 ox-LDL 刺激的巨噬细胞内无染色阳性细胞; 经 ox-LDL 诱导巨噬细胞 24 h 后, 细胞质内红色脂滴明显, 呈现出典型的泡沫细胞形态。见图 1。

3.2 对 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞增殖的影响 正常组血清随着血清浓度的增加泡沫细胞增殖变化无显著性差异。与正常组比较, 泻心汤高剂量组含药血清在质量分数为 10%, 20%, 30% 时, 其泡沫细胞增殖变化差异无显著性。根据含药血清对泡沫细胞数量的影响, 选择对细胞数量稳定的血清质量分数范围 (30% 以下) 进行后续实验, 在本实验中统一采用文献常用的质量分数 20% 的血清加样检测相关指标。见表 2。

表 3 泻心汤含药血清对泡沫细胞 IL-1β, INF-γ 影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Xiexintang containing serum on levels of IL-1β and INF-γ releasing from foam cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)				ng·L ⁻¹
组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1β	INF-γ	
正常	—	2 235.48 ± 95.67	1 520.34 ± 90.52	
模型	—	2 876.31 ± 103.24 ¹⁾	2 351.25 ± 106.49 ¹⁾	
泻心汤	1.4	2 537.52 ± 80.39 ²⁾	2 130.45 ± 73.28	
	4.2	2 260.51 ± 60.86 ³⁾	1 956.59 ± 61.34 ³⁾	
	12.6	2 384.27 ± 72.53 ³⁾	1 751.46 ± 54.76 ³⁾	

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 4, 5 同)。

3.4 对泡沫细胞 TLR9, MyD88, NF-κB mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组用 ox-LDL 诱导 RAW264.7 源性泡沫细胞后 TLR9, MyD88, NF-κB mRNA 的表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 泻心汤各剂量组含药血清干预后能明显降低 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 源性泡沫细胞 TLR9,

MyD88, NF- κ B mRNA 的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

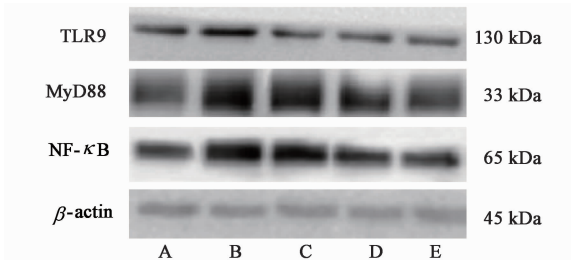
表 4 泻心汤含药血清对泡沫细胞 TLR9, MyD88, NF- κ B mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Xiexintang containing serum on TLR9, MyD88 and NF- κ B mRNA expression of foam cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TLR9	MyD88	NF- κ B
模型	—	2.87 ± 0.13 ¹⁾	3.24 ± 0.08 ¹⁾	2.95 ± 0.07 ¹⁾
泻心汤	1.4	2.49 ± 0.07 ²⁾	2.87 ± 0.10 ²⁾	2.81 ± 0.05
	4.2	2.32 ± 0.09 ³⁾	2.15 ± 0.09 ³⁾	1.87 ± 0.08 ³⁾
	12.6	1.81 ± 0.08 ³⁾	2.24 ± 0.07 ³⁾	1.53 ± 0.10 ³⁾

注: 设正常组 TLR9, MyD88, NF- κ B mRNA 相对表达为 1。

3.5 对泡沫细胞 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组用 ox-LDL 诱导 RAW264.7 源性泡沫细胞后 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 蛋白的表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 泻心汤各剂量组含药血清干预后能明显降低 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 源性泡沫细胞 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 蛋白的表达水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2, 表 5。



A. 正常组; B. 模型组; C. 泻心汤低剂量组; D. 泻心汤中剂量组; E. 泻心汤高剂量组

图 2 泡沫细胞 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of TLR9, MyD88 and NF- κ B p65 protein expression of foam cells

4 讨论

在 AS 形成及发展过程中, 血液中的单核细胞迁移入内膜下转变为巨噬细胞, 受损血管内膜巨噬细胞吞噬 ox-LDL, 致使细胞内脂质堆积, 进而形成巨噬细胞源性泡沫细胞, 其大量积聚从而引发进一步的炎症免疫反应, 形成脂质条纹乃至脂质斑块^[12]。泡沫细胞是 AS 斑块内出现的特征性病理细胞, 亦是 AS 粥样斑块形成的主要标志。研究资料显示, 在 AS 早期通过抑制泡沫细胞的形成和积聚可起到延缓 AS 发展进程的作用^[13]。

表 5 泻心汤含药血清对泡沫细胞 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Xiexintang containing serum on TLR9, MyD88 and NF- κ B p65 protein expression of foam cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TLR9 / β -actin	MyD88 / β -actin	NF- κ B p65 / β -actin
模型	—	3.12 ± 0.13 ¹⁾	2.42 ± 0.10 ¹⁾	2.85 ± 0.12 ¹⁾
泻心汤	1.4	2.76 ± 0.09 ²⁾	2.26 ± 0.08	2.54 ± 0.08 ²⁾
	4.2	2.23 ± 0.10 ³⁾	1.69 ± 0.07 ³⁾	2.10 ± 0.10 ³⁾
	12.6	1.65 ± 0.07 ³⁾	1.72 ± 0.11 ³⁾	1.83 ± 0.06 ³⁾

注: 设正常组 TLR9, MyD88, NF- κ B 蛋白相对表达为 1。

Toll 样受体可以识别病原微生物, 激活免疫反应, 参与了多种慢性炎症性疾病和心脑血管疾病的研究, 是 AS 研究的热点, 为 AS 的防治研究提供了新的靶点^[14]。TLR9 是 Toll 样受体家族中的重要一员, 参与了 AS 的发生发展各个环节, 并通过多种信号转导途径影响着 AS 进程^[4]。TLR9 信号通路主要通过 MyD88 信号依赖型途径活化免疫细胞, 通过 NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径介导信号传导, 从而启动促炎细胞因子的转录和表达, 如 IL-1 β , 白细胞介素-6 (IL-6), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 等, 级联式放大炎症反应, 从而诱导血管损伤, 最终导致 AS 的发生^[4]。因此抑制 TLR9 信号通路及其下游 IL-1 β , INF- γ 等促炎因子的转录和表达对于防治 AS 等慢性炎症性疾病具有重要作用。

以往中医学多从“痰、瘀、虚”着手辨证治疗 AS, 而近年来对 AS 的认识加深, 人们开始重视“热、毒”在 AS 发病中的作用。中医将各种自身衰老及死亡细胞、炎症介质、致病微生物等视为“毒邪”, 临床上常配用清热解毒类方药进行治疗, 如黄芩、黄连、泻心汤、黄连解毒汤等^[15]。研究资料显示, 泻心汤具有良好的抗 AS 作用, 但其防治 AS 的机制尚不明确。本实验研究泻心汤含药血清对 TLR9/MyD88/NF- κ B p65 信号转导通路及下游 IL-1 β , INF- γ 等促炎因子的影响, 研究其抗 AS 的作用机制。结果表明, 经 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞 24 h 后, 细胞质内红色脂滴明显, 表现出典型的泡沫细胞形态。与正常组比较, 用 ox-LDL 诱导 RAW264.7 源性泡沫细胞后, TLR9 的表达显著上调, 并激活下游 MyD88 通路, 呈现出 MyD88, NF- κ B p65 表达上调; 以及下游促炎因子 IL-1 β , INF- γ 的表达亦明显增加。与模型组比较, 用不同剂量组泻心汤含药血

清诱导 RAW264.7 源性泡沫细胞后,降低了 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 的表达,下调了 IL-1 β 及 INF- γ 的表达,且部分干预作用呈现出剂量依赖性。这说明泻心汤含药血清对 ox-LDL 诱导的泡沫细胞 TLR9/MyD88/NF- κ B p65 信号通路有显著的抑制作用,且对下游 IL-1 β 及 INF- γ 同样有显著的抑制作用。

综上所述,泻心汤含药血清可抑制 ox-LDL 刺激的巨噬细胞泡沫化,可能与调控 TLR9/MyD88/NF- κ B p65 转导通路,下调 IL-1 β , INF- γ 的表达相关,这可能是其防治 AS 及慢性炎症性疾病的重要作用机制之一。

[参考文献]

[1] Conti P, Shaik-Dasthagirisheb Y. Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease mediated by mast cells [J]. Cent Eur J Immunol, 2016, 40(3):380-386.

[2] Moriya J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis [J]. J Cardiol, 2019, 73(1):22-27.

[3] Hovland A, Jonasson L, Garred P, et al. The complement system and toll-like receptors as integrated players in the pathophysiology of atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2015, 241(2):480-494.

[4] Koulis C, CHEN Y C, Hausding C, et al. Protective role for toll-like receptor-9 in the development of atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(3):516-525.

[5] Krogmann A O, Lüsebrink E, Steinmetz M, et al. Proinflammatory stimulation of toll-like receptor 9 with high dose CpG ODN 1826 impairs endothelial regeneration and promotes atherosclerosis in mice [J]. PLoS One, 2016, 11(1):e0146326.

[6] Hirata Y, Kurobe H, Higashida M, et al. HMGB1 plays a critical role in vascular inflammation and lesion formation via toll-like receptor 9 [J]. Atherosclerosis, 2013, 231(2):227-233.

[7] 殷小杰, 马晓静, 王岚, 等. 三黄泻心汤活血化瘀优势方抗动脉粥样硬化的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22):83-88.

[8] 吴智春, 吴凯, 王浩, 等. 金匱泻心汤抗动脉粥样硬化的实验研究 [J]. 中国老年学杂志, 2003, 23(7):461-462.

[9] 苗婷婷. 三黄泻心汤研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(3):190-192.

[10] 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, 30(1):53-56.

[11] 张君涛, 王平, 刘爱峰, 等. 中药含药血清制备方法的研究概述 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(11):4006-4009.

[12] HU J, XI D, ZHAO J, et al. Crosstalk between high-density lipoprotein and inflammation and its significance to atherosclerosis [J]. Am J Med Sci, 2016, 352(4):408-415.

[13] Hegyi L, Skepper J N, Cary N R, et al. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis [J]. J Pathol, 2015, 180(4):423-429.

[14] Falckhansen M, Kassiteridi C, Monaco C. Toll-like receptors in atherosclerosis [J]. Biochem Soc T, 2007, 35(6):1453-1455.

[15] 于红红, 吴玛莉, 冷冷, 等. 自噬与动脉粥样硬化的关系及中药的干预作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(7):736-740.

[责任编辑 孙丛丛]