

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

曾海燕¹, 方 勇², 曾高峰¹

(1. 南华大学附属第二医院心血管内科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学附属第二医院病理科)

摘要: **目的** 观察丹红注射液对脂多糖(LPS)诱导的 THP-1 巨噬细胞促炎因子分泌的影响,并探讨其机制。**方法** 160 nmol/L 佛波酯孵育 THP-1 巨噬细胞 24 h 后分为对照组、脂多糖组、丹红组和脂多糖 + 丹红组,酶联免疫吸附法检测培养液中促炎因子的含量,Western blot 检测核因子 κ B(NF- κ B)、p65 和 Toll 样受体 4(TLR4)的蛋白表达水平。**结果** 丹红注射液明显抑制 LPS 诱导的巨噬细胞肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)和白细胞介素 1 β (IL-1 β)释放,下调核因子 NF- κ B 和 TLR4 的表达。**结论** 丹红注射液抑制脂多糖诱导的炎症反应,可能与其抑制 TLR4 和 NF- κ B 的表达有关。

关键词: 丹红注射液; 促炎因子; 核因子 κ B; Toll 样受体 4; 动脉粥样硬化

中图分类号:R363.1 文献标识码:A

Effect and Mechanisms of Danhong Injection on Proinflammatory Cytokines Release from THP-1 Macrophages Induced by Lipopolysaccharides

ZENG Haiyan, FANG Yong, ZENG Gaofeng

(Department of Cardiovascular Medicine, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** This study was to investigate the effect of Danhong injection on proinflammatory cytokine release from lipopolysaccharide (LPS)-induced THP-1 macrophages. **Methods** Human THP-1 macrophages were induced using phorbol-12-myristate acetate (PMA, 160 nmol/L) for 24 h, then cells were divided into four groups: control group, LPS group, Danhong group and LPS + Danhong group. Secretion of proinflammatory cytokines, including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 and Toll-like receptor 4 (TLR4) were examined by Western blot. **Results** Danhong injection inhibited the release of TNF- α , IL-6 and IL-1 β induced by LPS, repressed the translocation of NF- κ B to the nucleus and TLR4 expression. **Conclusions** Danhong injection inhibited the release of inflammatory cytokine that induced by LPS, and the mechanisms may be related to the TLR4 and NF- κ B expressions.

Key words: Danhong injection; proinflammatory cytokines; nuclear factor- κ B; Toll-like receptor 4; atherosclerosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种以动

脉壁脂质蓄积为特征的慢性炎症疾病^[1]。各种炎症细胞和炎症因子参与 As 的发生和发展过程。研究证实,肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等炎症因子可通过相互诱导、相互协同共同参与 As 的发生与发展过程^[2]。丹红注射液由丹参和红花两种主要药效成分组成,功用为活血化瘀、通脉舒络,已用于临床治疗冠心

收稿日期:2014-03-20

基金项目:衡阳市科技局项目资助(2103K159)。

作者简介:曾海燕,硕士,主治医师,研究方向:心血管疾病的临床诊疗和动脉粥样硬化性疾病发病机制及防治, E-mail: 18973468460@189.cn. 通讯作者曾高峰,博士,主任医师,研究方向:心血管内科疾病的诊治和介入心脏病学研究, E-mail: qichingnudou@tom.com.

病、高血压和脑血栓形成等心血管疾病^[3]。研究表明,丹红注射液可抑制实验性兔 As 的形成,显著降低高脂诱导的家兔血浆总甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平,下调主动脉壁上的炎性因子^[4-5]。此外,静脉输注丹红注射液能有效治疗下肢 As 疾病^[6]。然而,丹红注射液的抗 As 机制还不甚清楚,为了进一步研究丹红注射液抗 As 的作用及可能机制,本研究用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激 THP-1 细胞源性巨噬细胞分泌 TNF- α 等促炎因子,再观察丹红注射液对促炎因子释放的影响,并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

THP-1 细胞购于中科院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞中心;RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司;丹红注射液购自菏泽步长制药有限公司(10 mL/支);佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)购自美国 Sigma 公司;小牛血清购自杭州四季青公司;TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒购自 R&D Systems 公司;核因子 κ B(NF- κ B)、p65 兔抗人一抗购自 Santa Cruz 公司;Toll 样受体 4(TLR4)兔抗人一抗购自 R&D Systems 公司; β -actin 鼠抗人一抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自武汉博士德公司。

1.2 细胞培养及分组

人 THP-1 单核细胞株培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中(37 °C、5% CO₂)。培养液中加 10 mmol/L 的羟乙基哌秦乙磺磺酸(HEPES)和青霉素、链霉素各 1.0×10^5 U/L。在每次实验前用 160 nmol/L 佛波酯(PMA)诱导 THP-1 细胞 12 h 使其诱导分化成巨噬细胞。细胞分为对照组、LPS 组、丹红组和 LPS + 丹红组。对照组不加任何干预;LPS 组为培养液中加入 LPS(10 ng/mL)培养 24 h;丹红组为培养液中加入丹红注射液(30 mL/L)培养 24 h;LPS + 丹红组为培养液中同时加入 10 ng/mL LPS 和 30 mL/L 的丹红注射液共培养 24 h。

1.3 ELISA 测定各组细胞培养上清液 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量

参考文献[7]方法;获取细胞培养上清液,离心去除沉淀,分装后 -20 °C 冷冻保存。建立标准曲线:设标准孔 8 孔,每孔加入样品稀释液 100 μ L,第

一孔加标准品 100 μ L,混匀后用加样器吸出 100 μ L,移至第 2 孔。如此反复作对倍稀释至第 7 孔,最后,从第 7 孔中吸出 100 μ L,第 8 孔为空白对照组;将反应板密封置于 22 °C ~ 25 °C 孵育 60 min;洗板后每孔中分别加入第一抗体工作液 100 μ L;重复孵育及洗板 1 次;每孔加酶标抗体工作液 100 μ L;再重复孵育及洗板 1 次;每孔加入 100 μ L TMB 底物工作液,置于 22 °C ~ 25 °C 孵育 15 min;每孔加入 100 μ L 终止液。在 5 min 内于 492 nm 处测吸光值。根据标准品光密度值,对应相应稀释度,以线性回归方程计算相应培养液细胞因子浓度。

1.4 Western blot 检测 NF- κ B p65 和 TLR4 蛋白表达

参考文献[8]方法,提取蛋白样品,然后加入适量 SDS 上样缓冲液和 10% β -巯基乙醇,100 °C 煮 10 min,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 4 h,分别加入 NF- κ B p65(1:200)、TLR4(1:1 000)和 β -actin(1:2 000)一抗孵育 4 ~ 8 h,TBST 缓冲液洗涤 30 min,换液 1 次/10 min。加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000)室温孵育 2 h,TBST 洗涤 30 min,换液 1 次/10 min。用 Western blot 荧光检测试剂盒显示于 X 光片。然后用 Labwork 凝胶图像分析系统对胶片进行扫描,以对照组的面积灰度值为 100% 与实验组进行半定量分析。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 丹红注射液抑制脂多糖诱导的炎症因子释放

THP-1 巨噬细胞与 LPS 共同孵育后,细胞上清液中促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量明显升高,再加入丹红注射液后,可有效抑制 LPS 诱导的促炎因子释放($P < 0.05$)(表 1)。

2.2 丹红注射液抑制核因子 NF- κ B 的核转位

与对照组比较,LPS 组细胞核内 NF- κ B p65 的蛋白表达明显增加,约为对照组的 4 倍($P < 0.05$);单独加入丹红注射液,对 NF- κ B p65 的核转位无明显影响;加入 LPS 和丹红注射液共处理细胞组,与 LPS 组比较,细胞核内 NF- κ B p65 的表达明显下降($P < 0.05$,图 1)。

表 1 丹红注射液对 LPS 诱导的巨噬细胞炎症因子释放的影响 (n=3)

分 组	TNF-α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1β (pg/mL)
对照组	25.17 ± 3.32	43.26 ± 8.17	15.36 ± 2.18
LPS 组	168.62 ± 15.78 ^a	205.38 ± 23.64 ^a	76.41 ± 8.32 ^a
丹红组	24.33 ± 6.18	38.35 ± 5.15	18.38 ± 1.97
LPS + 丹红组	73.51 ± 9.75 ^b	64.48 ± 13.66 ^b	39.12 ± 9.05 ^b

与对照组比较, a: $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, b: $P < 0.05$

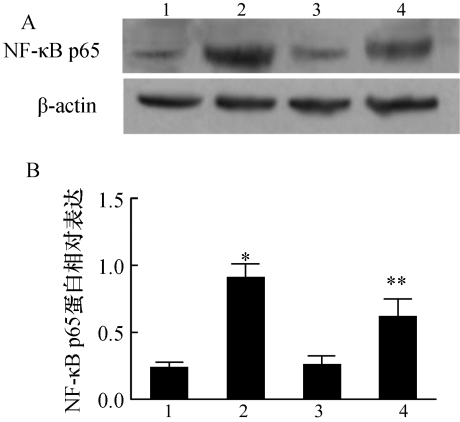


图 1 丹红注射液对巨噬细胞 NF-κB p65 核转位的影响 (n=3) A: Western blot 检测 NF-κB p65 蛋白表达; B: 半定量分析图. 1: 对照组; 2: LPS 组; 3: 丹红组; 4: LPS + 丹红组. 与对照组比较, *: $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, **: $P < 0.05$

2.3 丹红注射液抑制巨噬细胞 TLR4 表达

加入 LPS 后,与对照组比较,巨噬细胞 TLR4 蛋白的表达明显增加 ($P < 0.05$);用 LPS 和丹红注射液共处理巨噬细胞后,与 LPS 组比较,TLR4 的蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$) (图 2)。

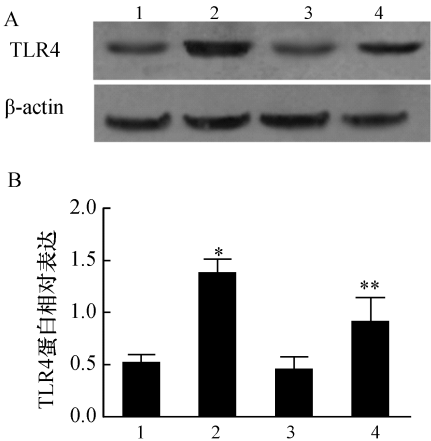


图 2 丹红注射液对巨噬细胞 TLR4 蛋白表达的影响 (n=3) A: Western blot 检测 TLR4 蛋白表达; B: 半定量分析图. 1: 对照组; 2: LPS 组; 3: 丹红组; 4: LPS + 丹红组. 与对照组比较, *: $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, **: $P < 0.05$

3 讨 论

As 是一种慢性炎症性疾病,单核/巨噬细胞参与了 As 病理进程中的多个环节。巨噬细胞通过清道夫受体如 SR-A、CD-36 摄取氧化脂质导致泡沫细胞形成,是 As 斑块始发与进程中的关键环节^[9]。巨噬细胞的增殖和凋亡对 As 斑块易损性和不稳定性均有很重要的影响。巨噬细胞产生的因子如 TNF-α、IL-6 和 IL-1β,可增强炎症反应而促进 As 进程。单核/巨噬细胞自身活动的相关领域以及它们在斑块部位与其他细胞的相互作用成为动脉粥样硬化新兴的治疗靶点^[10]。THP-1 细胞源性巨噬细胞已广泛被应用于巨噬细胞相关的多种病理过程和疾病的研究^[11]。本研究对其进行研究发现,丹红注射液处理巨噬细胞后,可明显抑制 LPS 所诱导的促炎因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的释放,说明丹红注射液的抗 As 作用很可能与其抑制炎症的作用有关。

史卫国等^[12]研究发现,丹红注射液对择期经皮冠状动脉术后患者的 IL-6、纤溶酶原激活物抑制剂 1 (PAI-1) 等物质的活性有明显抑制作用;对家兔的研究表明,丹红注射液可下调体内炎症因子诱导性一氧化氮合酶 (iNOS) 和环氧合酶-2 (COX-2) 表达^[4];细胞实验中,丹红注射液可降低巨噬细胞上清中趋化因子配体 16 (CXCL16)、基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 的表达^[13]。最新的研究表明,小鼠腹膜内注射 LPS (1 mg/kg) 建造全身性炎症反应综合征 (SIRS) 模型,然后在用丹红注射液处理,可明显减轻小鼠体内 IL-6 等促炎因子的表达水平^[14]。这些结果与本研究结果一致,都说明丹红注射液具有明确的抗炎效应。

NF-κB 是一种具有基因转录多项调控作用的转录因子,能与靶基因的启动子或增强子部位的 κB 位点结合,启动基因的转录。NF-κB 参与了炎症过程中多种信号的转导途径并且与 As 关系密切^[15-16]。多种涉及机体炎症反应的基因,包括 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 等,在其基因的启动子和增强子中存在一个或多个 κB 序列,因此,NF-κB 激活往往是这些基因活化的前提^[17]。本研究发现,丹红注射液处理细胞后,与 LPS 组比较,核内 NF-κB p65 的表达明显下降,说明丹红注射液能有效抑制 NF-κB 的激活,进而下调巨噬细胞促炎因子的释放。

Toll 样受体 (TLRs) 是参与非特异性免疫 (天然

免疫)的一类重要蛋白质分子,Toll样受体4(TLR4)是对LPS敏感的TLRs家族成员之一,研究表明As斑块中TLR4的表达明显上调,且主要表达在巨噬细胞,被认为是与人类As关系最为密切的Toll样受体之一^[18]。LPS主要是通过识别细胞膜上TLR4受体,进而通过经典途径、旁路途径和非典型途径激活NF- κ B,引起多种促炎相关基因表达的变化^[19]。本研究选择TLR4做为观察指标,进一步探讨丹红注射液抑制NF- κ B活化及促炎因子分泌的原因,结果发现,丹红注射液能有效抑制LPS所诱导的巨噬细胞TLR4表达,说明丹红注射液是通过调节TLR4-NF- κ B途径发挥其抗炎作用的。

总之,本研究研究发现丹红注射液能有效抑制巨噬细胞促炎因子TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的分泌,其作用机制与丹红注射液调控TLR4-NF- κ B信号途径有关。丹红注射液也有降低血脂和调节体内应激水平的作用^[4],这些发现都为丹红注射液在临床As性疾病的临床应用提供了一定的理论依据。深入探讨丹红注射液的抗炎机制,有助于进一步发现治疗炎症相关性疾病的新策略。

参考文献:

- [1] Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Pecoraro R, et al. Atherosclerosis as an inflammatory disease [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(28):4266-4288.
- [2] Roubille F, Kritikou EA, Roubille C, et al. Emerging Anti-Inflammatory Therapies For Atherosclerosis [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(33):5840-5849.
- [3] 管高峰, 华先平, 王琳, 等. 丹红注射液对动脉粥样硬化家兔脂代谢及血管内皮功能的影响[J]. *临床心血管病杂志*, 2007, 23(4):304-306.
- [4] 付婷婷, 王昌俊, 闵存云, 等. 丹红注射液抗实验性兔动脉粥样硬化的作用及其机制[J]. *中药材*, 2009(11):1720-1722.
- [5] 管高峰, 华先平, 王琳, 等. 丹红注射液对动脉粥样硬化家兔血管壁炎症的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2006, 4(10):884-886.
- [6] 郭桂萍, 王宝亮. 丹红注射液治疗高脂血症合并下肢动脉粥样硬化30例[J]. *辽宁中医杂志*, 2013, (6):1146.
- [7] 欧志兵, 黄庆勇, 孙科, 等. LXR α 通过下调IRF3、

- GRIP1负性调控Kupffer细胞中LPS诱导的炎症反应机制[J]. *南方医科大学学报*, 2009, (5):848-851.
- [8] 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.
- [9] Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(10):709-721.
- [10] 阎雨, 何阳阳, 方莲花, 等. 巨噬细胞在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. *中国药学杂志*, 2014(01):7-10.
- [11] Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221(1):2-11.
- [12] 史卫国, 孙学玉, 渠莉, 等. 丹红注射液对经皮冠状动脉介入治疗后心肌炎症反应及冠状动脉血流的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17(5):288-291.
- [13] 周清, 张倩, 严激. 丹红注射液对巨噬细胞CXCL16、MMP-1、MMP-9分泌的影响[J]. *临床输血与检验*, 2011, (3):222-225.
- [14] Gao LN, Cui YL, Wang QS, et al. Amelioration of Danhong injection on the lipopolysaccharide-stimulated systemic acute inflammatory reaction via multi-target strategy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149(3):772-782.
- [15] Van der Heiden K, Cuhlmann S, Luong LA, et al. Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010, 118(10):593-605.
- [16] 徐佳杨, 蔡辉. NF- κ B与动脉粥样硬化的研究进展[J]. *四川医学*, 2011, 32(2):271-273.
- [17] Gonzalez-Ramos R, Defrere S, Devoto L. Nuclear factor-kappaB: a main regulator of inflammation and cell survival in endometriosis pathophysiology [J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(3):520-528.
- [18] 赵国军, 唐朝克. 固有免疫应答与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40(5):406-415.
- [19] 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.

(此文编辑:朱雯霞)