

血必净对内毒素刺激的 THP-1 细胞的影响

蒋巍 张顺财[△]

(复旦大学附属中山医院消化内科 上海 200032)

【摘要】 目的 观察血必净对内毒素刺激的 THP-1 细胞的影响,并探究其是否具有诱导内毒素耐受的作用。方法 THP-1 细胞先以不同浓度的血必净(10,25,50 mg/mL)作用不同时间(4,12,24 h),再用内毒素进行刺激。用 ELISA 法测定上清液中 TNF- α 水平,Real time-PCR 技术检测 TLR4 和 IRAK-M mRNA 的表达差异。结果 不同浓度血必净不同时间作用下,各实验组细胞 TNF- α 分泌水平均无显著变化($P>0.05$)。在高浓度(50 mg/mL)血必净组,作用 24 h 时细胞 TLR4 表达上调,是 4 h 时的 1.547 倍($P<0.05$);在作用 24 h 后,50 mg/mL 血必净组 IRAK-M 表达上调,是对照组的 1.349 倍($P<0.05$);但其余各浓度及时间组细胞的 TLR4 和 IRAK-M mRNA 表达均无显著差异($P>0.05$)。结论 血必净不能阻断内毒素刺激的 THP-1 细胞 TNF- α 的分泌,不能诱导内毒素耐受;高浓度血必净长时间作用后虽可能上调 THP-1 细胞 TLR4 和 IRAK-M mRNA 表达,但确切含义仍不清楚。

【关键词】 血必净; 内毒素; 内毒素耐受; Toll 样受体 4; IL-1 受体相关激酶-M

【中图分类号】 R 285.5 **【文献标志码】** A

Effects of *Xuebijing* on the endotoxin-stimulated THP-1 cell line

JIANG Wei, ZHANG Shun-cai[△]

(Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 **Objective** To study the effect of *Xuebijing*, a Chinese traditional medicine injection, on the THP-1 cells challenged by endotoxin, and to explore whether it induces endotoxin tolerance. **Methods** The THP-1 cells were pretreated with *Xuebijing* in different concentrations (10, 25, 50 mg/mL) and times (4, 12, 24 hours), and then challenged by endotoxin. The level of TNF- α in culture supernatant was detected by ELISA assay, and the expression of TLR4 and IRAK-M mRNA were detected by Real time-PCR technique. **Results** There was no significant difference in TNF- α level among all the groups (pretreated with different concentrations of *Xuebijing* for different time) ($P>0.05$). Only in 50 mg/mL *Xuebijing* group, TLR4 mRNA was 1.547-fold increase in 24 h than in 4 h group ($P<0.05$). Only when pretreated for 24 h, IRAK-M mRNA was 1.349-fold increase in 50 mg/mL *Xuebijing* group than in control group ($P<0.05$). However, there was no significant difference among other groups ($P>0.05$). **Conclusions** *Xuebijing* can not block the release of TNF- α from the THP-1 cells challenged by endotoxin; and it does not induce endotoxin tolerance. When pretreated with high concentration of *Xuebijing* for long time, the expression of both TLR4 and IRAK-M mRNA is up-regulated, but its significance is not yet clear.

【Key words】 *Xuebijing*; endotoxin; endotoxin tolerance; Toll-like receptor 4; Interleukin-1 receptor-associated kinase-M

内毒素血症参与了临床多种疾病的发生、发展,严重时可导致脓毒性休克、弥漫性血管内凝血(dessiminated intiavascular coagulation, DIC)及多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)。目前认为,单核/巨噬细胞系统是内毒素作用的主要靶细胞,也是产生内毒素耐受的主要效应细胞。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)是内毒素信

号转导的关键受体,而 IL-1 受体相关激酶-M(interleukin-1 receptor-associated kinase-M, IRAK-M)则是信号传导途径中重要的负调节因子。血必净注射液由红花、赤芍、川芎、丹参、当归等活血化瘀中药提取而成。许多研究报道^[1-3],血必净能拮抗内毒素,减少内源性炎性介质失控性释放,有效降低脓毒症及其他原因所致 MODS 的死亡率,目前广泛用于脓毒症的治

[△]Corresponding author E-mail: doctorzhangsc@163.com

疗。本研究试图通过观察血必净对内毒素刺激的 THP-1 细胞的影响,探究其是否具有诱导内毒素耐受的作用,为血必净用于内毒素血症的治疗寻找实验基础和理论依据。

材料和方法

细胞培养 人单核细胞株 THP-1(中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库)。该细胞为悬浮型生长,培养于含 4.5 g/L 葡萄糖的高糖 RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μ g/mL)中,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中孵育生长,每 2~3 天换液 1 次,待细胞长至 $(1\sim 3)\times 10^6$ 个/mL 时及时传代。

血必净干预及内毒素刺激 取对数生长期的细胞,调整细胞数为 1×10^6 个/mL 接种于六孔培养板中,每孔细胞数为 5×10^6 个。根据实验分组,于低、中、高剂量血必净组各孔分别加入不同浓度的血必净注射液(天津红日药业),使其终浓度分别为 10、25、50 mg/mL,对照组加入等量培养液,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 中分别孵育 4、12、24 h。随后弃去培养液及血必净,各孔重新加入 RPMI 1640 培养液,各组分别加入终浓度为 10 ng/mL 的脂多糖(Sigma 公司),于培养箱内孵育刺激 4 h 后 2 000 r/min 离心 15 min,收集细胞和上清液。细胞用于抽提总 RNA,上清液保存于

-20 $^{\circ}$ C 用于测定 TNF- α 。

ELISA 法测定 TNF- α 应用人 TNF- α 定量 EIA 试剂盒(R&D 公司),采用双抗体夹心 ABC-EIASA 法测定上清液中 TNF- α 含量。操作按使用说明进行,反应终止后用酶标仪测定 D_{450} ,同时绘制标准曲线,得出各样品浓度。

细胞总 RNA 抽提及实时定量 PCR 检测 TLR4 和 IRAK-M mRNA 表达 按 Trizol 法(Invitrogen 公司)操作说明抽提 THP-1 细胞总 RNA。应用 SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa 公司)及 iQ5 荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD 公司),以 $\beta 2$ -microglobulin (B2M)为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[4],进行各样本 TLR4 和 IRAK-M 基因表达的相对定量分析。PCR 引物(表 1)由 TaKaRa 公司设计、上海生工生物技术有限公司合成。反应参数如下,反转录反应:37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s;Real time-PCR 反应:预变性 95 $^{\circ}$ C 10 s;再按变性 95 $^{\circ}$ C 5 s,退火/延伸 60 $^{\circ}$ C 30 s 循环 40 次进行 PCR 扩增;最后按 60 $^{\circ}$ C 10 s,每个循环加 0.5 $^{\circ}$ C,循环 71 次进行熔解曲线分析。PCR 产物 2.5% 琼脂糖凝胶电泳下行产物大小及特异性确认。不同浓度血必净组间的目标基因表达差异通过不同浓度处理的样本相对于对照组样本的倍数来表示;而不同时相的基因表达差异,则以血必净孵育 4 h 的样本作为参照因子。

表 1 Real time-PCR 引物序列

Tab 1 Primer Sequences used for Real time-PCR

Gene	Primer Sequence (5' to 3')	Fragment size (bp)
TLR4	Forward: TTGAGCAGGTCTAGGGTGATTGAAC	143
	Reverse: ATGCGGACACACACTTTCAAATA	
IRAK-M	Forward: TCGGTCATCTGTGGCAGTATATCAA	150
	Reverse: ATGTTTACTGCTGCTGCTGGTCA	
B2M	Forward: CGGGCATTCTGAAGCTGA	194
	Reverse: GGATGGATGAAACCCAGACACATAG	

统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.5 统计分析软件。标准曲线采用相关回归分析。符合正态分布且方差齐性者采用单因素方差分析,两两比较用 q 检验(S-N-K 法);非正态性分布及方差不齐者采用 Kruskal-Wallis 秩和检验,两两比较用 t 检验。以下结果中除特别标注为 Kruskal-Wallis 秩和检验外,均采用 ANOVA 单因素方差分析。

结 果

血必净对 THP-1 细胞 TNF- α 分泌的影响 由

表 2 可见,随着孵育时间的延长,对照组 TNF- α 分泌水平无明显差别($P>0.05$),说明孵育本身对实验结果影响极小。而随着血必净浓度的增加,以及作用时间的延长,各实验组细胞 TNF- α 分泌水平均无显著变化($P>0.05$),说明血必净对内毒素刺激的 THP-1 细胞 TNF- α 分泌无影响。

血必净干预后 THP-1 细胞 TLR4 mRNA 的表达 由图 1 可见,血必净干预 4 h 及 12 h 后,随着药物浓度的增加,TLR4 表达变化不明显,各实验组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$);而至 24 h 后,随着血必净浓度的增加,TLR4 表达略有上调,但与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 血必净干预后 THP-1 细胞 TNF- α 分泌水平的变化
Tab 2 Level of TNF- α secreted by THP-1 cell after Xuebijing's prevention ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group (mg/mL)	TNF- α (pg/mL)			P
	4 h	12 h	24 h	
Control	38.32 \pm 1.96	39.39 \pm 1.23	39.86 \pm 0.91	0.197
10	40.12 \pm 1.82	39.47 \pm 1.75	40.30 \pm 1.44	0.673
25	38.85 \pm 1.06	39.86 \pm 1.24	40.66 \pm 1.45	0.074
50	39.18 \pm 1.56	39.47 \pm 1.39	41.03 \pm 1.09	0.068
P	0.309	0.938	0.423	

P value was obtained by variance analysis among the groups in every row or column in table.

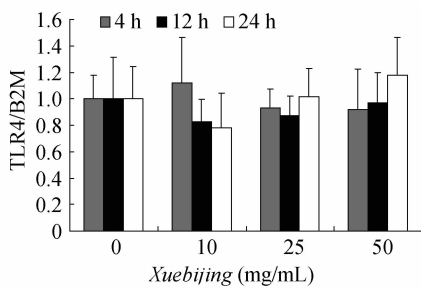


图 1 不同浓度血必净作用相同时间后 TLR4 的相对表达差异
Fig 1 Expression of TLR4 mRNA in different concentrations of Xuebijing for same time ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

For 4 h, $P = 0.429$ (Kruskal-Wallis Test); For 12 h, $P = 0.524$; For 24 h, $P = 0.087$.

由图 2 可见,在对照组,随着孵育时间的延长,TLR4 表达无明显差异($P > 0.05$),说明孵育本身对结果影响极小。随着作用时间的延长,在 10 mg/mL 血必净组,TLR4 表达无明显差异($P > 0.05$);在 25 mg/mL 血必净组,TLR4 表达略有上调,但差异无统计学意义($P > 0.05$);而在 50 mg/mL 血必净组,TLR4 表达呈上调趋势,24 h 时是 4 h 时的 1.547 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

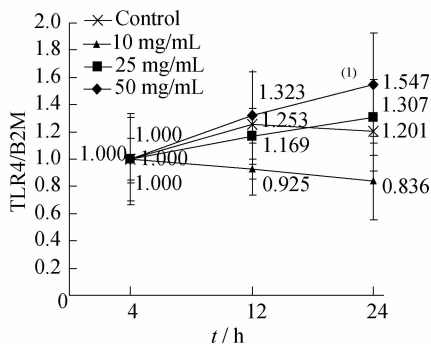


图 2 同浓度血必净不同作用时间 TLR4 的相对表达差异
Fig 2 Expression of TLR4 mRNA at different times in the same concentration of Xuebijing ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Control group: $P = 0.333$; 10 mg/mL Xuebijing group: $P = 0.577$; 25 mg/mL Xuebijing group: $P = 0.083$; 50 mg/mL Xuebijing group: $P = 0.046$ (⁽¹⁾24 h vs 4 h, $P < 0.05$)

血必净干预后 THP-1 细胞 IRAK-M mRNA 的表达 由图 3 可见,血必净干预 4 h 及 12 h 后,随着药物浓度的增加,IRAK-M 表达变化不明显,各实验组间比较均无统计学差异($P > 0.05$);而至 24 h 后,随着血必净浓度的增加,IRAK-M 表达有所上调,至 50 mg/mL 浓度时 IRAK-M 表达与对照组、10 mg/mL 及 25 mg/mL 浓度组比较均有统计学差异($P < 0.05$)。

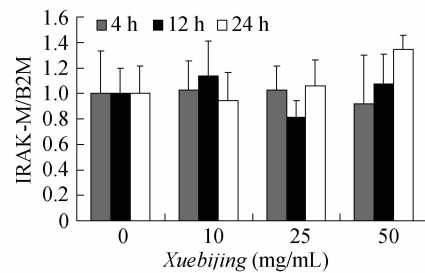


图 3 不同浓度血必净作用相同时间后 IRAK-M 的相对表达差异

Fig 3 Expression of IRAK-M mRNA in different concentrations of Xuebijing for same time ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

For 4 h, $P = 0.901$; For 12 h, $P = 0.080$; For 24 h, $P = 0.007$ (50 mg/mL vs control group, $P < 0.05$; 50 mg/mL group vs 10 mg/mL group, $P < 0.01$; 50 mg/mL group vs 25 mg/mL group, $P < 0.05$).

由图 4 可见,在对照组,随着孵育时间的延长,IRAK-M 表达无明显差异($P > 0.05$),说明孵育本身对结果影响极小。随着血必净作用时间的延长,在 10 mg/mL 和 25 mg/mL 浓度组,IRAK-M 表达无明显差异($P > 0.05$);在 50 mg/mL 浓度组,IRAK-M 表达略有上调,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

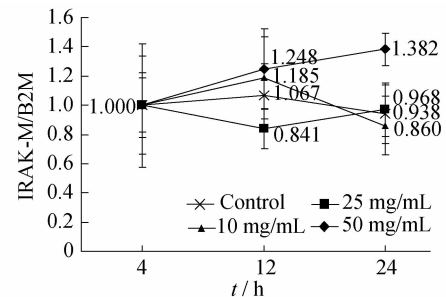


图 4 同浓度血必净不同作用时间 IRAK-M 的相对表达差异

Fig 4 Expression of IRAK-M mRNA at different times in the same concentration of Xuebijing ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Control group: $P = 0.690$; 10 mg/mL Xuebijing group: $P = 0.091$; 25 mg/mL Xuebijing group: $P = 0.267$; 50 mg/mL Xuebijing group: $P = 0.202$ (Kruskal-Wallis Test)

讨 论

内毒素是革兰阴性菌细胞壁外膜上的脂多糖成分,参与临床多种疾病的发生和发展。内毒素进入机体后,可直接对细胞的生物膜产生毒性,但更为重要的是通过单核/巨噬细胞介导的细胞毒性作用使机体产生多种炎症介质,从而影响细胞的代谢,最后导致细胞死亡,影响脏器功能和屏障功能的完整性。

TLR4 在哺乳动物内分布广泛,主要包括单核巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、肠道上皮细胞以及内皮细胞等^[5]。已知内毒素为 TLR4 的天然配体。研究发现,C3H/HeJ 及 C57BL/10ScCr 小鼠 TLR4 发生突变,从而对内毒素表现为天然耐受。同样,人为敲除 TLR4 基因亦可诱导内毒素耐受的产生^[6],说明 TLR4 为内毒素信号转导的关键受体。内毒素进入机体后,由脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)递呈至免疫细胞膜上与 mCD14、TLR4 及 MD-2 相结合。TLR4 则通过胞内结构的构象改变,促使下游一系列衔接蛋白与其 TIR 结构结合,由此介导进一步的胞内信号传导^[7](包括 MyD88 依赖途径和 MyD88 非依赖途径),通过引发多个酶学级联反应,从而激活转录因子 NF- κ B、AP-1 等转录因子,促使 TNF- α 、IL-1、IL-6 等基因表达。因此,TLR4 结构与功能的完好及必要的表达量是保证 LPS 信号转导完成的关键,反之可能产生耐受。

IRAK-M 为 IRAK/Pelle 家族的一员,起源于单核细胞,结构同 IRAK1、IRAK2 相似,N 端为死亡域,有一中心激酶域,但无激酶活性。Kobayashi 等^[8]研究发现,IRAK-M 对 TLRs 介导的信号转导起负性调节作用,并与内毒素耐受的形成功有关。这一结论也得到后来更多研究的支持^[9-11]。研究表明,IRAK-M 可能通过促进 IRAK-1、IRAK-4 与 MyD88 的结合,并抑制 IRAK-1 的磷酸化及防止其与受体复合物分离,进而对 TLRs 介导的信号通路起抑制作用^[5]。

许多国内研究表明,血必净具有拮抗内毒素,减少内源性炎性介质失控性释放,改善微循环,减轻内皮细胞损伤的功能。本研究发现,预先给予血必净不能降低 THP-1 细胞受内毒素刺激后 TNF- α 的分泌,不能诱导内毒素耐受。而进一步对内毒素信号转导通路中相关调控基因表达的研究表明,只有在长时间高浓度(50 mg/mL)血必净的作用下 TLR4 和 IRAK-M mRNA 表达才略微有所上调,但这种

浓度却远高于目前临床用于患者的推荐剂量。

综上所述,我们推断血必净体外不能阻断内毒素刺激的 THP-1 细胞 TNF- α 的分泌,不能诱导内毒素耐受。考虑低、中浓度的血必净可能对内毒素信号转导无任何影响;而高浓度血必净长时间作用虽可能上调 TLR4 和 IRAK-M 基因表达,然而这两者分别为内毒素信号转导途径的正、负调节因子,最终未对 TNF- α 的分泌水平产生影响。

尽管不能诱导内毒素耐受,但血必净能否增强其他内毒素中和或拮抗剂的疗效,或者能否促进内毒素清除则有待进一步探讨和研究。

参 考 文 献

- [1] 雪琳. SIRS 和 MODS 防治新对策的实验研究——血必净的药效学观察[J]. 中国危重病急救医学,1997,9(12):720-722.
- [2] 王今达,雪琳. 细菌、内毒素、炎性介质并治——治疗重症脓毒症的新对策[J]. 中国危重病急救医学,1998,10(6):323-325.
- [3] 高红梅,常文秀,曹书华. “血必净”注射液对内毒素刺激的内皮细胞的影响[J]. 中国急救医学,2005,25(6):437-438.
- [4] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*,2001,25(4):402-408.
- [5] Zhang GL, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity[J]. *J Clin Invest*,2001,107(1):13-19.
- [6] Bihl F, Lariviere L, Qureshi ST, et al. LPS-hyporesponsiveness of mnd mice is associated with a mutation in Toll-like receptor 4[J]. *Genes Immun*,2001,2(1):56-59.
- [7] Foster SL, Medzhitov R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response[J]. *Clin Immunol*,2009,130(1):7-15.
- [8] Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling[J]. *Cell*,2002,110(2):191-202.
- [9] Escoll P, Fresno CD, Garcia L, et al. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2003,311(2):465-472.
- [10] Nakayama K, Okugawa S, Yanagimoto S, et al. Involvement of IRAK-M in peptidoglycan-induced tolerance in macrophages[J]. *J Biol Chem*,2004,279(8):6629-6634.
- [11] van't Veer C, van den Pangaart PS, van Zoelen MA, et al. Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model[J]. *J Immunol*,2007,179(10):7110-7120.

(收稿日期:2009-06-22;编辑:王蔚)