

基于 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路研究三叶香茶菜含药血清对枯否细胞活化的影响

周至品¹, 陈勇², 吴瑞胜², 王竞静², 覃乐², 黄桂东², 刘代华^{1*} [1.广西医科大学附属柳州市人民医院, 广西壮族自治区卫生健康委员会广西临床疾病生物技术研究重点实验室(柳州市人民医院), 柳州市胃肠道中成药工程技术研究中心, 广西 柳州 545006; 2.广西中医药大学, 南宁 530200]

摘要: 目的 研究三叶香茶菜含药血清(isodon ternifolius-containing serum, ITS)通过 Toll 样受体 4(TLR4)/核因子 κ B(NF- κ B)/NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)信号通路对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的大鼠原代肝枯否细胞(Kupffer cell, KC)活化的影响。方法 分离培养大鼠原代 KC, 将 LPS 诱导的大鼠原代 KC 分为空白对照组、模型对照组、空白血清组、阳性对照组(秋水仙碱含药血清组)、ITS 组、TLR4 阻断剂组、TLR4 阻断剂+ITS 组。MTT 法检测不同浓度 ITS 对 KC 增殖活性的影响; ELISA 法检测 KC 细胞上清液白介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18(IL-18)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)含量; 荧光定量聚合酶链反应(PCR)、Western blotting 和免疫荧光检测 KC 中 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路中 TLR4、核因子 κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)、半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)、NLRP3 mRNA 和 TLR4、I κ B α 、磷酸化 I κ B α (p-I κ B α)、Caspase-1、NLRP3、NF- κ Bp65 蛋白表达情况。结果 与模型对照组相比, 各药物组 KC 上清液中 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 和 IL-6 含量, 以及细胞中 TLR4、I κ B α 、Caspase-1、NLRP3 mRNA 和 TLR4、I κ B α 、p-I κ B α 、Caspase-1、NLRP3、NF- κ Bp65 蛋白的表达均下调或降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 TLR4 阻断剂组比较, TLR4 阻断剂+ITS 组上述多数指标的改善更加明显。结论 三叶香茶菜可能通过下调 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路抑制 KC 活化, 减少炎症因子的表达和释放, 从而减轻肝脏炎症损伤。

关键词: TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路; 枯否细胞; 三叶香茶菜; 含药血清

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)21-2917-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222838

引用本文: 周至品, 陈勇, 吴瑞胜, 等. 基于 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路研究三叶香茶菜含药血清对枯否细胞活化的影响[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(21): 2917-2925.

Research on the Effect of Isodon Ternifolia-containing Serum on the Activation of Kupffer Cells Based on TLR4/NF- κ B/NLRP3 Signal Pathway

ZHOU Zhipin¹, CHEN Yong², WU Ruisheng², WANG Jingjing², QIN Le², HUANG Guidong², LIU Daihua^{1*} [1.Liuzhou People's Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Guangxi Key Laboratory of Clinical Diseases Biotechnology Research of Guangxi Zhuang Autonomous Region Health Commission(Liuzhou People's Hospital), Liuzhou Gastrointestinal Chinese Patent Medicine Engineering and Technology Research Center, Liuzhou 545006, China; 2.Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of isodon ternifolia-containing serum(ITS) on the activation of rat primary hepatic Kupffer cell(KC) induced by lipopolysaccharide(LPS) through TLR4/NF- κ B/NLRP3 signal pathway. **METHODS** The primary KC of rats were isolated and cultured, and the primary KC induced by LPS were divided into blank control group, model control group, blank serum group, positive control group(colchicine containing serum group), ITS group, TLR4 blocker group and TLR4 blocker+ITS group. MTT assay was used to detect the effect of different concentrations of ITS on the proliferation activity of KC. The content of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-18(IL-18), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6(IL-6) in KC supernatant were detected by ELISA. Fluorescence quantitative polymerase chain reaction(PCR), Western blotting and immunofluorescence were used to detect the expression of TLR4, nuclear factor κ B inhibitor protein α (I κ B α), cysteine protease-1(Caspase-1), NLRP3 mRNA and TLR4, I κ B α , phosphorylated I κ B α (p-I κ B α), Caspase-1, NLRP3 and NF- κ Bp65 in KC. **RESULTS** Compared with the model control group, the contents of IL-1 β , IL-18, TNF- α and IL-6 in the supernatant of KC and the expression of TLR4, I κ B α , Caspase-1, NLRP3 mRNA and TLR4, I κ B α , p-I κ B α , Caspase-1, NLRP3,

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760751); 广西自然科学基金项目(2021GXNSFAA075020); 柳州市科技计划项目(2020NBAB0815); 柳州市人民医院引进高层次人才科研启动基金项目(LRYGCC202104)

作者简介: 周至品, 男, 博士, 主任药师 E-mail: gxzhouzhipin@126.com *通信作者: 刘代华, 女, 硕士, 主任药师 E-mail: 38353828@qq.com

NF- κ Bp65 protein in the supernatant of KC in all drug groups were down-regulated or decreased($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with TLR4 blocker group, the improvement of most of the above indexes in TLR4 blocker+ITS group was more obvious.

CONCLUSION Isodon ternifolia may inhibit the activation of KC and reduce the expression and release of inflammatory factors by down-regulating TLR4/NF- κ B/NLRP3 signal pathway, thus alleviating the inflammatory injury of liver.

KEYWORDS: TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway; Kupffer cell; isodon ternifolia; drug-containing serum

枯否细胞(Kupffer cell, KC)又名肝巨噬细胞,是一种驻留于肝窦内组织的非实质细胞。KC在调节机体免疫反应和宿主防御中发挥关键作用,一方面能清除细菌及毒素发挥抗感染作用,另一方面通过释放各种炎性介质导致肝损伤^[1-2]。肝纤维化是多种慢性肝脏疾病的共同病理基础,涉及多种因素的持续性肝损伤和随后的炎症反应^[3]。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是细胞外基质的主要细胞来源,其活化是肝纤维化形成过程的中心事件。损伤相关的分子模式(damage-associated molecular pattern, DAMPs)可诱导 KC 活化并产生促炎和促纤维细胞因子,进而促进 HSC 活化和肝纤维化^[4]。位于细胞膜上 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)是一种模式识别受体,能结合细菌内毒素(脂多糖, lipopolysaccharide, LPS)上调其表达促进 KC 活化,诱导和放大对肝脏的炎症损伤^[5]。研究表明, LPS 和 DAMPs 介导的 TLR 信号可激活 KC 中的 NLRP3 炎症小体,并通过分泌炎性细胞因子促进 HSC 活化^[6]。

三叶香茶菜[*Isodon ternifolia* (D.Don) Kudo]是广西瑶族药材,味甘、微苦、性凉,具有清热解毒,利湿疏肝作用,用于急慢性肝炎和早期肝硬化等疾病的治疗^[7]。前期研究证实三叶香茶菜含药血清(isodon ternifolius-containing serum, ITS)减轻 CCl₄ 所致大鼠慢性肝损伤及纤维化与下调 TLR4 信号通路活化有关^[8-9]。进一步研究发现,ITS 可通过抑制 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路活化,减少炎症因子的表达与释放,减轻肝脏炎症损伤,从而发挥抗肝纤维化作用^[10]。然而,其调控 TLR4/NF- κ B/NLRP3 途径的确切机制尚不明确,有待进一步研究。KC 作为促使肝脏炎症微环境的重要炎性细胞,笔者猜测其通过 TLR4/NF- κ B/ NLRP3 信号通路参与了肝脏炎症和纤维化过程。因此,本实验采用 LPS 激活的大鼠原代 KC 为模型,体外观察 ITS 对 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路的影响,进一步揭示三叶香茶菜抗肝炎及纤维化作用机制。

1 材料

1.1 药物和动物

三叶香茶菜药材根茎于 2019 年 10 月份购自

广西仙荣中药科技有限公司(批号: 20190501, 产地: 广西),由广西中医药大学药用植物教研室梁子宁教授鉴定为三叶香茶菜[*I.ternifolia* (D.Don) Kudo]。秋水仙碱(广东彼迪药业有限公司,批号: 20180804;规格: 每片 0.5 mg)。

SPF 级 SD 雄性大鼠 45 只,体质量 200~250 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[质量合格证号: 430727221101474321;实验动物生产许可证号: SCXK(湘)2019-0004],实验动物使用许可证号: SYXK(桂)2019-0001,动物实验经广西中医药大学动物实验福利伦理委员会批准,伦理批准号: DW20190329-05。动物饲养于广西中医药大学实验动物中心动物房,大鼠自由进食和饮水,室内保持通风、干燥、洁净,适应 7 d 后开始实验。

1.2 试剂

LPS、MTT 试剂盒、高效 RIPA 组织/细胞裂解液、Trizol reagent、4×Buffer、细胞固定液(4%多聚甲醛)、PBST 缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 L8880, M1020, R0010, R1100, P1016, P1110, P1031); TLR4 阻断剂(TAK-242)(美国 Selleck 生物科技有限公司,批号: S7455); Fetal Bovine Serum(澳大利亚赛默飞世尔科技公司,批号: 10099141C); Antibiotic-Antimycotic(100×)、RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号分别为 15240062, 11965092); 白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)检测试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司,批号分别为 JYM0646Ra, JYM0635Ra); 白细胞介素-18(IL-18)、白介素-1 β (IL-1 β)检测试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司,批号分别为 SEA064Ra, SEA563Ra); PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)、TB Green™ Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)[Takara 宝生物工程(大连)有限公司,批号分别为 RR036A, RR820A]; Anti-TLR4 抗体、Anti-I κ B α 抗体、Anti-phospho-I κ B I κ B α (Ser32) 抗体、Anti-Caspase-1 p20 抗体、Anti- NALP3/CIAS1 抗体、Anti-beta-Actin(Loading Control)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 bs-20595R, bs-1287R, bsm-52169R, bs-10743R, bs-10021R,

bs-0061R); goat anti-rabbit(艾博抗贸易有限公司, 批号: ab-6721, 1 : 4 000)。

1.3 仪器

FilterMax F3 多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]; FC-1100 超微量核酸检测仪(杭州遂真生物技术公司); AriaMx 实时荧光定量 PCR 仪(Agilent 科技有限公司); PowerPac Basic 电泳仪、Mini Trans-Blot Cell 蛋白转印模块(美国 Bio-Rad 仪器有限公司); Tanon 5200 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司); HWS-28 金属恒温水浴锅(上海齐欣科学仪器有限公司); 5418R 低温离心机(德国 Eppendorf 公司); ZWYR-2102C 台式恒温培养振荡器摇床(上海智诚分析仪器制造有限公司); TD4 普通离心机(上海卢湘仪实验仪器有限公司); Eclipse Ts2 倒置相差荧光显微镜(日本尼康仪器有限公司)。

2 方法

2.1 三叶香茶菜浸膏和含药血清的制备

采用水提醇沉法制备三叶香茶菜浸膏, 称取 6 kg 三叶香茶菜, 加 10 倍量水浸泡 30 min, 煮沸后保持微沸 60 min, 过 350 目尼龙筛收集滤液, 再重复 2 次。将 3 次煎煮得到的药液浓缩至原药重比例 1 : 1 即可(即 1 000 g 原药材要浓缩到 1 000 mL), 加入 95%乙醇使其终末浓度为 70%, 冷藏静置 24 h。药液抽滤后水浴回收乙醇, 浓缩得到浸膏 297.5 g(得膏率为 5.0%, 即 1 g 浸膏相当于 20 g 生药), 冷藏保存。取 200~250 g SD 雄性大鼠 35 只, 随机分成 3 组: 空白血清组 10 只, 阳性对照组[秋水仙碱含药血清(colchicine-containing serum group, CCS)组]10 只, ITS 组 15 只。空白血清组灌胃给予生理盐水, 阳性对照组灌胃给予秋水仙碱 0.2 mg·kg⁻¹, ITS 组按 80 g·kg⁻¹ 剂量(以生药量计)给予三叶香茶菜提取物, 每天早晚灌胃 2 次, 连续 7 d, 最后 1 次给药后 1 h 腹主动脉真空管取血 5 mL, 静置 2 h 后低温 1 000 ×g 离心 15 min 后分离血清, 同组血清混合均匀, 于 56 °C 恒温水浴灭活 30 min, 0.22 μm 微孔滤膜除菌, 即为体外试验用含药血清, -20 °C 保存备用。

2.2 原代 KC 的分离、纯化和培养

参照李亮等^[11]的研究方法: 大鼠经腹腔注射 3.5%水合氯醛(40 mg·kg⁻¹)麻醉后取出肝脏, PBS 冲洗后转移至超净工作台, 切除结缔组织后, 使用无菌手术刀片将组织切碎, 70 μm 细胞筛过滤细

胞液, 再使用 IV 型胶原酶(采用 HBSS 配制, 含 0.1%链霉菌蛋白酶 E 和 0.005% DNaseI), 37 °C 摇床消化 30 min, 1 000 ×g 离心 5 min, 弃上清, 使用 PBS 重置细胞, 重复洗涤细胞 3 次。取 15 mL 离心管, 依次加入 50% Percoll, 25% Percoll, 细胞悬液, 1 800 ×g 离心 20 min, 缓升缓降。取中间层细胞, 加入 PBS 重置后, 离心弃上清, 使用 1640 培养基重置, 接种于培养皿中, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养, 培养 3 h 后, 进行换液操作, 吸弃未贴壁细胞, 保留下层贴壁细胞, 即得到纯化 KC, 将纯化得到的 KC 进行培养。

2.3 KC 的分组及处理

KC 铺满瓶底 90%左右, 用 0.25%胰酶-EDTA 消化, 传代培养后待其处于对数生长期且形成单层后分组处理, 每个浓度设 3 个平行孔。空白对照组: 加无血清 RPMI-1640 培养基; 模型对照组: 加含 50 ng·mL⁻¹ LPS 100 μL 的 RPMI-1640 培养基; 空白血清组: 空白血清预处理 24 h 后, 弃药液, 加含 LPS 的 RPMI-1640 完全培养基; CCS 组: CCS 预处理 24 h 后, 弃药液, 加含 LPS 的 RPMI-1640 完全培养基; ITS 组: ITS 预处理 24 h 后, 弃药液, 加含 LPS 的 RPMI-1640 完全培养基; TLR4 阻断剂组: TLR4 阻断剂预处理 24 h 后, 弃阻断剂 TAK-242(10 μmol·L⁻¹), 加含 LPS 的 RPMI-1640 完全培养基; TLR4 阻断剂+ITS 组: TLR4 阻断剂 TAK-242 预处理 24 h 后, 弃阻断剂, 加 ITS 处理 24 h 后, 弃药液, 再加入含 LPS 的 RPMI-1640 完全培养基继续培养。各组分别于处理完毕后, 收集细胞及细胞上清液, 检测相应的指标。

2.4 MTT 法检测 ITS 对 KC 活性的影响

取胰酶消化对数期细胞, 终止后离心收集, 制成细胞悬液。细胞铺于 96 孔板中, 轻轻混匀, 每孔加入 100 μL。放入培养箱中培养, 至细胞单层铺满孔底, 贴壁 24 h 后加入浓度梯度的药物, 每孔 100 μL, 设 3 个复孔。5%CO₂, 37 °C 孵育 16~48 h, 倒置显微镜下观察药物的作用效果。每孔加入 10 μL MTT 溶液(5 mg·mL⁻¹, 即 0.5%MTT), 继续培养 4 h。加入 MTT 培养 4 h 后, 结晶可充分形成。随后将上清去掉, 加入 10 μL Formazan 溶解液充分溶解。使用酶标仪在波长 490 nm 处测量各孔的吸光值(A 值), 计算不同浓度含药血清对 KC 的抑制率。以药品的浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标

作图, 然后得到达 50%抑制率时的药品浓度, 即半抑制浓度 IC_{50} 。设置空白对照组及 1%, 5%, 15%, 45%, 75% ITS 组, 检测不同浓度 ITS 对 LPS 诱导 KC 活化的影响, 并确定 15% ITS 为最佳给药浓度。

2.5 实时荧光定量 PCR 检测 TLR4、I κ B α 、Caspase-1、NLRP3 mRNA 的表达

将细胞置于 Trizol 裂解液中, 提取总 RNA 沉淀, 按照逆转录试剂盒说明书进行去除基因组 DNA 及逆转录操作, 得到 cDNA 置于 -20 °C 保存待用。并用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 TLR4、I κ B α 、Caspase-1、NLRP3 的相对表达水平。程序设置, 预处理 95 °C: 30 s; PCR 循环(40 循环)为 95 °C: 5 s, 60 °C: 20 s, 72 °C: 15 s; 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物信息

Tab. 1 PCR primer information

基因	引物序列	产物长度/bp
TLR4	正向 5'-ATGCCTCTCTTGCATCTGGC-3'	272
	反向 5'-ATTGTCTCAATTCACACCTGGA-3'	
I κ B α	正向 5'-CTCAAGAAGGAGCGGTTGGT-3'	184
	反向 5'-CCAAGTGCAGGAACGAGTCT-3'	
Caspase-1	正向 5'-GGAGCTCAGTCAGGTCCAT-3'	139
	反向 5'-CTTGAGGGAACCACTCGGTC-3'	
NLRP3	正向 5'-CTGCAGAGCCTACAGTTGGG-3'	228
	反向 5'-ACCCTACACTAAAAGCGCCC-3'	

2.6 Western blotting 检测 TLR4、I κ B α 、p-I κ B α 、Caspase-1、NLRP3 蛋白的表达

收集各组细胞, 预冷的 PBS 冲洗 2 次, 将样本放入 2 mL 离心管置于冰盒上, 用适量的 RAPI 细胞裂解液裂解约 30 min, 21 000 \times g 离心 5 min, 取上清采用 BCA 法测定蛋白含量后调整蛋白浓度, 然后进行电泳, 半干转膜, 将膜放入封闭液中封闭 3 h。将膜放入稀释后的一抗中 4 °C 孵育 12 h, 洗膜 3 次, 将膜放入按 1:4 000 比例稀释的二抗中 37 °C 孵育, 2 h 后用 ECL 显色剂对膜进行显色, 于凝胶成像仪中进行曝光成像。

2.7 免疫荧光法检测 I κ B α 、p-I κ B α 、Caspase-1、NLRP3、NF- κ Bp65 蛋白的表达

细胞培养完成后, 吸弃细胞上清液, 使用 PBS 洗涤细胞 3 次。室温下在 4%多聚甲醛中孵育细胞 10 min。用冰 PBS 洗涤 3 次, 用含有 1% BSA、22.52 mg \cdot mL $^{-1}$ 甘氨酸的 PBST(PBST+0.1% Tween 20)孵育 30 min, 非特异性结合进而封闭抗体。室

温下, 用稀释抗体在湿盒中孵育细胞, 4 °C 过夜孵育。倒出溶液, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 5 min。室温下, 用二抗避光孵育 1 h, PBS 避光洗涤细胞 3 次后, 用 Hoechst 孵育 1 min, 随后使用荧光显微镜拍照。

2.8 ELISA 检测 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 和 IL-6 的含量

KC 上清液 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 和 IL-6 均采用 ELISA 测定。实验开始前将细胞上清液离心: 2 000 \times g 离心 20 min, 4 °C, 上清液转移至新离心管中待用。按照各细胞因子 ELISA 试剂盒说明书要求进行检测。

2.9 统计学处理

数据处理采用 SPSS 24.0 进行统计数据整理分析, 计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 原代 KC 分离培养及鉴定结果

分离提取的大鼠原代 KC, 换液后呈椭圆形, 部分形状出现不规则改变, 伸出伪足。培养 48 h 后, 细胞明显向周围伸展开来, 形态大小还是呈不规则改变, 伸出的伪足增多。原代 KC 吞噬墨汁 6 h 后, 显微镜下可观察到细胞胞质内有大量被吞噬的墨汁。结果表明分离培养的大鼠原代 KC 具有正常的巨噬细胞吞噬功能。结果见图 1~2。

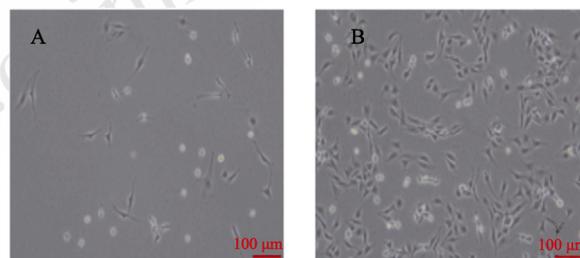


图 1 大鼠原代 KC 显微镜下表现
A-换液后 KC(100 \times); B-分离培养 48 h 的 KC(100 \times)。

Fig. 1 Performance of primary KC in rats under microscope A-KC(100 \times) after changing liquid; B-KC(100 \times) isolated and cultured for 48 h.

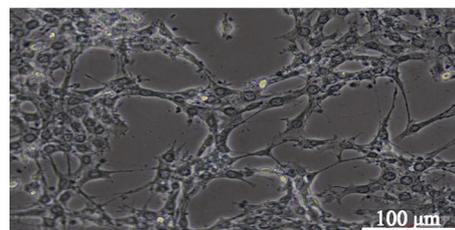


图 2 大鼠原代 KC 吞噬墨汁 6 h 后表现(100 \times)

Fig. 2 Performance of primary KC in rats after phagocytosis of ink for 6 h(100 \times)

3.2 ITS 对大鼠原代 KC 的活力影响

为评估 ITS 对 KC 活力的影响,采用一系列不同浓度(1%, 5%, 15%, 45%, 75%)的 ITS 干预 KC。MTT 结果显示, ITS 对 KC 抑制率 IC₅₀ 为 18.88%, 在不影响细胞活性的情况下, 选择 15% 含药血清为最佳给药浓度。结果见表 2。

表 2 不同浓度 ITS 对大鼠原代 KC 增殖活力的影响

Tab. 2 Effects of different concentrations of ITS on the proliferation vitality of primary KC in rats

ITS 浓度/%	KC 增殖率/%	IC ₅₀ /%
1	87.8	
5	73.5	
15	60.9	18.88
45	37.5	
75	11.9	

3.3 ITS 对 KC 中 TLR4、IκBα、Caspase-1、NLRP3 mRNA 表达的影响

与空白对照组相比, 模型对照组 TLR4、IκBα、Caspase-1、NLRP3 mRNA 表达明显升高($P<0.01$); 与模型对照组相比, 空白血清组 TLR4、IκBα、Caspase-1、NLRP3 mRNA 表达差异无统计学意义; 与模型对照组相比, ITS 组、TLR4 阻断剂组、TLR4 阻断剂+ITS 组和 CCS 组 TLR4、IκBα、Caspase-1、NLRP3 mRNA 的表达明显降低($P<0.01$); 与 TLR4 阻断剂组比较, ITS 组 TLR4、IκBα、Caspase-1、NLRP3 mRNA 表达差异无统计学意义, TLR4 阻断剂+ITS 组 TLR4、Caspase-1 mRNA 表达显著降低($P<0.05$), IκBα mRNA 表达降低($P<0.01$)。结果见表 3。

3.4 ITS 对 KC 中 TLR4、IκBα、p-IκBα、Caspase-1、NLRP3 蛋白表达的影响

与空白对照组相比, 模型对照组 TLR4、IκBα、p-IκBα、Caspase-1、NLRP3 蛋白表达明显升高

表 3 ITS 对 KC 中 TLR4、IκBα、Caspase-1、NLRP3 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 3 Effect of ITS on the expression of TLR4, IκBα, Caspase-1, NLRP3 mRNA in KC ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	TLR4	IκBα	Caspase-1	NLRP3
空白对照组	1.01±0.16 ¹⁾	1.01±0.17 ¹⁾	1.01±0.13 ¹⁾	1.00±0.08 ¹⁾
模型对照组	4.64±1.26	3.26±0.84	4.67±1.10	5.05±1.36
空白血清组	4.37±1.11	3.02±0.35	4.58±1.14	4.61±1.27
CCS 组	1.73±0.24 ¹⁾	1.46±0.32 ¹⁾	1.80±0.39 ¹⁾	1.88±0.62 ¹⁾
ITS 组	2.58±0.85 ¹⁾	2.10±0.39 ¹⁾	2.48±0.68 ¹⁾	2.64±1.00 ¹⁾
TLR4 阻断剂组	2.35±0.43 ¹⁾	2.08±0.51 ¹⁾	2.44±0.54 ¹⁾	2.59±0.90 ¹⁾
TLR4 阻断剂+ITS 组	1.48±0.37 ¹⁾²⁾	1.48±0.30 ¹⁾³⁾	1.60±0.48 ¹⁾²⁾	1.77±0.34 ¹⁾

注: 与模型对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 TLR4 阻断剂组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with TLR4 blockers group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

($P<0.01$); 与模型对照组相比, 空白血清组 TLR4、IκBα、p-IκBα、Caspase-1、NLRP3 蛋白表达差异无统计学意义; ITS 组 TLR4、p-IκBα 蛋白表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); TLR4 阻断剂组 TLR4、IκBα、p-IκBα 蛋白表达降低($P<0.05$); TLR4 阻断剂组 TLR4、IκBα、p-IκBα 蛋白表达降低($P<0.05$), CCS 组 IκBα、p-IκBα、Caspase-1 蛋白表达明显降低($P<0.01$), TLR4、NLRP3 蛋白表达降低($P<0.05$), TLR4 阻断剂+ITS 组 TLR4、IκBα、p-IκBα、Caspase-1、NLRP3 蛋白表达明显降低($P<0.01$)。与 TLR4 阻断剂组相比, ITS 组 TLR4、IκBα、p-IκBα、Caspase-1、NLRP3 蛋白表达差异无统计学意义, TLR4 阻断剂+ITS 组 p-IκBα、NLRP3 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。结果见表 4 和图 3。

3.5 免疫荧光分析 KC 中 IκBα、p-IκBα、NF-κBp65、NLRP3、Caspase-1 蛋白的表达情况

与空白对照组相比, 模型对照组 IκBα、p-IκBα、NF-κBp65、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达

表 4 ITS 对 KC 的 TLR4、IκBα、p-IκBα、Caspase-1、NLRP3 蛋白表达水平作用($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 4 Effect of ITS on the protein expression levels of TLR4, IκBα, p-IκBα, Caspase-1, NLRP3 of KC($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	TLR4	IκBα	p-IκBα	Caspase-1	NLRP3
空白对照组	0.32±0.20 ²⁾	0.16±0.03 ²⁾	0.30±0.08 ²⁾	0.20±0.09 ²⁾	0.33±0.07 ²⁾
模型对照组	0.82±0.20	1.13±0.16	0.88±0.13	0.98±0.06	1.17±0.11
空白血清组	0.86±0.18	1.47±0.38	0.72±0.16	1.15±0.19	1.34±0.07
CCS 组	0.43±0.07 ¹⁾	0.53±0.10 ²⁾	0.49±0.18 ²⁾	0.60±0.12 ²⁾	0.61±0.11 ¹⁾
ITS 组	0.46±0.14 ¹⁾	0.77±0.14	0.65±0.12 ²⁾	0.78±0.24	0.77±0.09
TLR4 阻断剂组	0.43±0.07 ¹⁾	0.67±0.09 ¹⁾	0.63±0.10 ¹⁾	0.79±0.12	0.89±0.23
TLR4 阻断剂+ITS 组	0.25±0.07 ²⁾	0.56±0.13 ²⁾	0.37±0.10 ²⁾³⁾	0.27±0.09 ²⁾	0.46±0.07 ²⁾³⁾

注: 与模型对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 TLR4 阻断剂组比较, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with TLR4 blockers group, ³⁾ $P<0.01$.

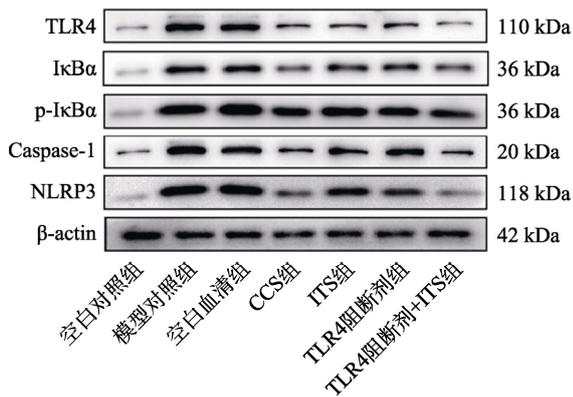


图3 ITS对KC的TLR4、IκBα、p-IκBα、Caspase-1、NLRP3蛋白表达影响

Fig. 3 Effect of ITS on the expression of TLR4, IκBα, p-IκBα, Caspase-1, NLRP3 protein in KC

显著上升($P<0.01$);与模型对照组相比,空白血清组 IκBα 蛋白表达降低($P<0.05$), p-IκBα、Caspase-1、NLRP3、NF-κBp65 蛋白表达有所降低, ITS 组 IκBα、p-IκBα、Caspase-1、NLRP3、NF-κBp65 蛋白表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), TLR4 阻断剂组、CCS 组和 TLR4 阻断剂+ITS 组 IκBα、p-IκBα、Caspase-1、NLRP3、NF-κBp65 蛋白表达均显著降低($P<0.01$)。与 TLR4 阻断剂组相比, ITS 组和 TLR4

阻断剂+ITS 组中 IκBα、p-IκBα、Caspase-1、NLRP3、NF-κBp65 蛋白表达差异无统计学意义。结果见表 5 和图 4~8。

3.6 ITS 对 KC 中 IL-1β、IL-18、TNF-α 和 IL-6 含量的影响

与空白对照组相比,模型对照组 IL-1β、IL-18、TNF-α 和 IL-6 含量升高($P<0.01$)。与模型对照组相比,空白血清组 IL-1β、IL-18、TNF-α 和 IL-6 含量差异无统计学意义, CCS 组和 TLR4 阻断剂+ITS 组 IL-18、TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量均显著降低($P<0.01$), ITS 组和 TLR4 阻断剂组 IL-18、TNF-α 和 IL-6 含量显著降低($P<0.01$), IL-1β 的含量降低($P<0.05$)。与 TLR4 阻断剂组相比, ITS 组 IL-1β、IL-18、TNF-α 和 IL-6 含量差异无统计学意义, TLR4 阻断剂+ITS 组 IL-1β、IL-18 含量降低($P<0.05$), TNF-α 和 IL-6 含量差异无统计学意义。结果见表 6。

4 讨论

炎症是导致肝纤维化和肝硬化等大多数慢性肝脏疾病的共同因素,其特征是先天免疫细胞被激活产生促炎细胞因子^[12]。KC 作为一种肝脏中的

表5 ITS对KC中IκBα、p-IκBα、NF-κBp65、NLRP3、Caspase-1蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 5 Effect of ITS on the expression of IκBα, p-IκBα, NF-κBp65, NLRP3, Caspase-1 protein in KC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	IκBα	p-IκBα	Caspase-1	NLRP3	NF-κBp65
空白对照组	1.00±0.27 ²⁾	1.00±0.37 ²⁾	1.00±0.26 ²⁾	1.00±0.37 ²⁾	1.00±0.29 ²⁾
模型对照组	4.39±0.27	3.86±0.44	4.00±0.52	4.19±0.55	4.77±0.11
空白血清组	3.38±0.60 ¹⁾	3.48±0.52	3.88±0.75	3.96±0.64	4.17±0.64
CCS 组	1.04±0.26 ²⁾	0.98±0.16 ²⁾	1.14±0.26 ²⁾	1.12±0.19 ²⁾	1.35±0.29 ²⁾
ITS 组	1.09±0.17 ²⁾	1.31±0.17 ²⁾	1.15±0.29 ¹⁾	1.21±0.21 ¹⁾	1.50±0.26 ¹⁾
TLR4 阻断剂组	2.55±0.11 ²⁾	2.51±0.63 ²⁾	2.64±1.10 ²⁾	2.80±1.06 ²⁾	3.66±0.97 ²⁾
TLR4 阻断剂+ITS 组	2.71±0.30 ²⁾	2.53±0.23 ²⁾	2.85±0.43 ²⁾	2.73±0.32 ²⁾	3.06±0.44 ²⁾

注:与模型对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

表6 ITS对KC中IL-1β、IL-18、TNF-α和IL-6含量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 6 Effect of ITS on the contents of IL-1β, IL-18, TNF-α and IL-6 in KC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	IL-1β	IL-18	TNF-α	IL-6
空白对照组	1 106.63±229.67 ²⁾	347.90±203.22 ²⁾	279.28±186.92 ²⁾	82.86±16.68 ²⁾
模型对照组	2 995.19±320.72	1 857.38±235.23	1 602.65±170.84	353.78±46.51
空白血清组	2 964.24±476.63	1 670.31±246.05	1 543.99±225.93	279.11±38.73
CCS 组	1 169.45±116.18 ²⁾	412.92±213.10 ²⁾	302.95±161.47 ²⁾	166.51±25.45 ²⁾
ITS 组	2 059.71±417.99 ¹⁾	660.83±235.48 ²⁾	546.03±160.41 ²⁾	200.45±45.58 ²⁾
TLR4 阻断剂组	2 138.32±711.52 ¹⁾	834.16±144.61 ²⁾	609.99±315.32 ²⁾	139.67±63.40 ²⁾
TLR4 阻断剂+ITS 组	1 278.00±460.37 ²⁾³⁾	259.15±200.90 ²⁾³⁾	278.46±124.66 ²⁾	87.06±50.99 ²⁾

注:与模型对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$;与TLR4阻断剂组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with TLR4 blockers group, ³⁾ $P<0.05$.

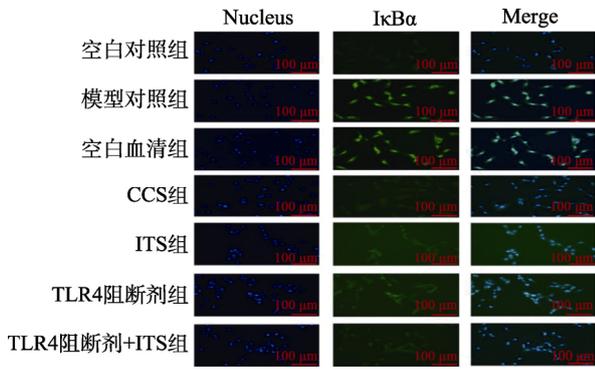


图 4 IκBα 蛋白在 KC 中的表达情况
DAPI 染色蓝色代表细胞核, 绿色代表目标蛋白。

Fig. 4 Expression of IκBα protein in KC
DAPI staining blue represented the nucleus, green represented the target protein.

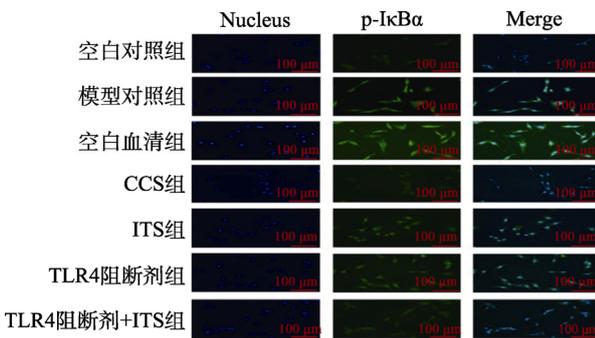


图 5 p-IκBα 蛋白在 KC 中的表达情况
DAPI 染色蓝色代表细胞核, 绿色代表目标蛋白。

Fig. 5 Expression of p-IκBα protein in KC
DAPI staining blue represented the nucleus, green represented the target protein.

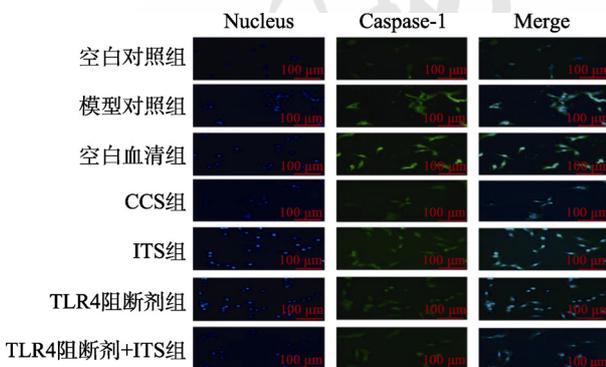


图 6 Caspase-1 蛋白在 KC 中的表达情况
DAPI 染色蓝色代表细胞核, 绿色代表目标蛋白。

Fig. 6 Expression of Caspase-1 protein in KC
DAPI staining blue represented the nucleus, green represented the target protein.

先天免疫细胞, 在调节机体免疫应答、拮抗病原体感染、介导炎症方面具有重要作用。越来越多证据表明, KC 在慢性肝损伤发病机制中起到核心作用, KC 活化产生的炎症因子促进肝脏炎症和纤维化, 被认为是抗肝纤维化的潜在靶点^[13-14]。LPS 可通过活化 KC 参与肝损伤病理过程, 降低 TLR4

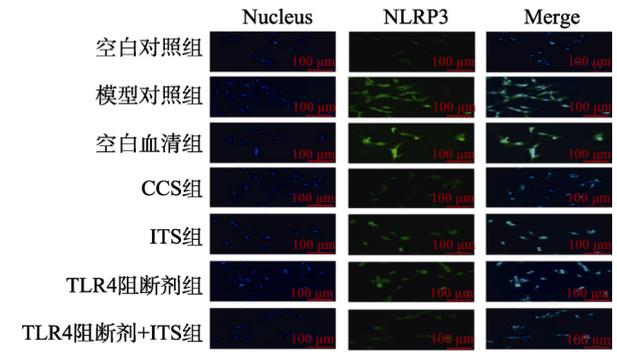


图 7 NLRP3 蛋白在 KC 中的表达情况
DAPI 染色蓝色代表细胞核, 绿色代表目标蛋白。

Fig. 7 Expression of NLRP3 protein in KC
DAPI staining blue represented the nucleus, green represented the target protein.

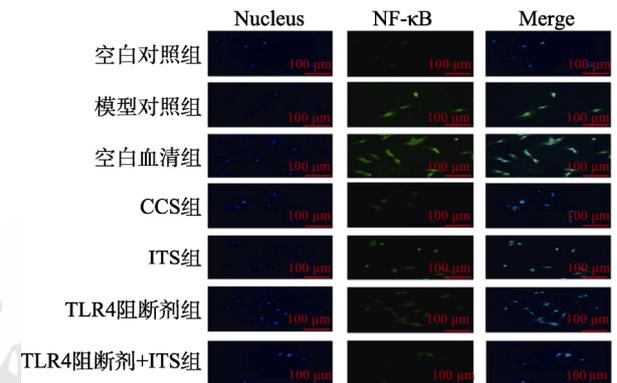


图 8 NF-κBp65 蛋白在 KC 中的表达情况
DAPI 染色蓝色代表细胞核, 绿色代表目标蛋白。

Fig. 8 Expression of NF-κBp65 protein in KC
DAPI staining blue represented the nucleus, green represented the target protein.

的表达能缓解肝损伤动物肝脏炎症和坏死, 这可能与抑制 KC 活化减少促炎细胞因子表达有关^[15]。

笔者所在课题组前期研究证实三叶香茶菜减轻 CCl₄ 诱导的大鼠慢性肝损伤与 TLR4/NF-κB 信号通路密切相关。最近研究^[16]发现, 三叶香茶菜可通过下调 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路活化减轻肝脏慢性损伤, 从而抑制 CCl₄ 所致的大鼠肝纤维化。笔者猜测 KC 作为炎性细胞在促进肝脏炎症过程中发挥了关键作用, 为进一步探究三叶香茶菜在进入体内对 KC 活化的影响, 采取血清药理学方法, 选择 ITS 作为实验样品干预 KC, 阐明三叶香茶菜通过 TLR4/NF-κB/NLRP3 信号通路抑制 KC 活化, 从而减轻肝脏炎症及纤维化。

炎症是肝纤维化发展的核心因素, KC 的活化在肝脏炎症反应的启动、纤维化的发展和消退方面发挥着重要作用^[17]。Toll 样受体 TLR4 是病原体相关分子模式(PAMP)的识别受体, 可检测到病原体并启动保护性先天免疫应答^[18]。TLR4 受体受到

胞外炎性信号刺激后激活 I κ B 激酶(IKK), 促进 I κ B α (NF- κ B 抑制蛋白)磷酸化后降解^[19], 进而激活 NF- κ B 促进各种炎性细胞因子基因(如 *TNF- α* 和 *IL-6*)的表达^[20]。降低核内 p-NF- κ Bp65 的表达可抑制炎症基因转录, 从而减少 LPS 诱导的活化 KC 过量分泌 TNF- α 、IL-6 等炎症因子^[21]。NLRP3 炎症小体[由核苷酸寡聚化结构域样受体 3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、Caspase-1 前体 pro-caspase-1 组成]是一种多蛋白复合物, 是机体先天免疫系统的重要组成部分^[22]。KC 中 NLRP3 炎症小体激活会促进 Caspase-1 的表达, 并释放炎性因子 IL-1 β 和 IL-18, 导致肝脏炎性疾病^[23]。NF- κ B 在 NLRP3 炎症小体的启动过程中起着关键作用, NF- κ Bp65(NF- κ B 亚单位)能结合 NLRP3 启动子中的 NF- κ B 序列增强 NLRP3 的表达^[24-25]。抑制 NLRP3 炎症小体激活能降低 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-8 的表达增加, 从而抑制 LPS 诱导的 KC 活化^[26-27]。本研究发现 ITS 可降低大鼠原代 KC 中 TLR4、I κ B α 、NF- κ Bp65、NLRP3、Caspase-1 的表达, 抑制 I κ B α 蛋白磷酸化及 NF- κ Bp65 蛋白核转位, 减少 IL-1 β 、IL-18、IL-6 和 TNF- α 的表达和释放, 表明 ITS 减轻肝脏炎症在于通过下调 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路抑制 KC 活化。此外, 相比于 TLR4 阻断剂组, ITS 组 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路中相关分子表达无显著性差异, TLR4 阻断剂+ITS 组中 TLR4、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ Bp65、NLRP3、Caspase-1 表达降低, 炎症因子释放减少, 提示三叶香茶菜与 TLR4 阻断剂具有协同作用, 三叶香茶菜可能除了阻断 TLR4 受体外, 还可能作用与其他信号途径或靶点分子抑制 KC 活化。

综上所述, 本实验结果显示, ITS 能够抑制 LPS 诱导的大鼠原代肝 KC 活化, 显著下调 *TLR4*、*I κ B α* 、*NF- κ B*、*NLRP3*、*Caspase-1* 基因表达, 抑制 NF- κ Bp65 蛋白核转位, 降低 IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α 的表达。因此, 本研究表明 ITS 可抑制 KC 活化, 减轻肝脏炎症, 其作用机制可能与下调 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路活化, 减少炎症因子的大量表达从而改善肝脏炎症微环境有关。本研究从细胞水平证实了 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路参与了三叶香茶菜抑制 KC 活化过程, 但三叶香茶菜如何通过影响 KC 中 NLRP3 炎症小体抑制 HSC 活化, 仍需进一步研究, 为了阐明三叶香茶

菜肝纤维化详细作用机制, 下一步将探讨体外 ITS 对 KC 和 HSC 交互作用的影响。

REFERENCES

- [1] KOLIOS G, VALATAS V, KOUROUMALIS E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(46): 7413-7420.
- [2] DIXON L J, BARNES M, TANG H, et al. Kupffer cells in the liver[J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(2): 785-797.
- [3] CHENG D, CHAI J, WANG H W, et al. Hepatic macrophages: Key players in the development and progression of liver fibrosis[J]. *Liver Int*, 2021, 41(10): 2279-2294.
- [4] KRENKEL O, TACKE F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(5): 306-321.
- [5] HUA J, QIU D K, LI J Q, et al. Expression of Toll-like receptor 4 in rat liver during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(6): 862-869.
- [6] ROEHLEN N, CROUCHET E, BAUMERT T F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875.
- [7] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区瑶药材质量标准(第一卷)[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2014.
- [8] XIA X, QIN H H, WANG Q, et al. Study on therapeutic mechanism of *Rabdosia ternifolia* on rat hepatic fibrosis[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2013, 19(19): 238-241.
- [9] ZHOU Z P, XIAO X Q, WANG Q, et al. Effect of herba isodonis ternifoliae on toll-like receptor 4 pathway in rats with hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride[J]. *Tradit Chin Drug Res & Clin Pharmacol(中药新药与临床药理)*, 2017, 28(2): 183-186, 262.
- [10] NONG R N. HIT against CCL₄ liver fibrosis in rats through inhibiting TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway[D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2020.
- [11] LI L, PENG Q, DAI F. Improvement of isolation and cultivation of liver Kupffer cells of SD rats[J]. *Anhui Med J(安徽医学)*, 2015, 36(3): 262-265.
- [12] SZABO G, CSAK T. Inflammasomes in liver diseases[J]. *J Hepatol*, 2012, 57(3): 642-654.
- [13] TACKE F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(6): 1300-1312.
- [14] TACKE F, ZIMMERMANN H W. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2014, 60(5): 1090-1096.
- [15] HE G X, CHEN H G, DENG Q F, et al. Research progress of hepatoprotective mechanism of flavonoids[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2019, 36(12): 1583-1591.
- [16] ZHOU Z P, QIN L, NONG R N, et al. Effects of *Isodon ternifolia* on NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling pathway in rats with hepatic fibrosis induced by CCl₄[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床)*, 2021, 37(4): 96-101.
- [17] ALEGRE F, PELEGRIN P, FELDSTEIN A E. Inflammasomes in liver fibrosis[J]. *Semin Liver Dis*, 2017,

- 37(2): 119-127.
- [18] WEI Q, MU K, LI T, et al. Deregulation of the NLRP3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression[J]. *Lab Invest*, 2014, 94(1): 52-62.
- [19] NONG R N, WANG J J, WU Y C, et al. Effect of traditional Chinese medicine on hepatic disease by inhibiting TLR4 signaling pathway[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2019, 25(16): 201-212.
- [20] LAWRENCE T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(6): a001651.
- [21] ZHAO H P, WANG S C, HU Y W, et al. Influence of part chemical components in Wuling capsules on the expression of ERK and NF- κ B signal pathway in kupffer cells induced by lipopolysaccharide[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2011, 28(10): 890-895.
- [22] MANGAN M S J, OLHAVA E J, ROUSH W R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(9): 688.
- [23] CAI C, ZHU X W, LI P Z, et al. NLRP3 deletion inhibits the non-alcoholic steatohepatitis development and inflammation in kupffer cells induced by palmitic acid[J]. *Inflammation*, 2017, 40(6): 1875-1883.
- [24] YU X, LAN P X, HOU X B, et al. HBV inhibits LPS-induced NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β production via suppressing the NF- κ B pathway and ROS production[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(4): 693-702.
- [25] QIAO Y, WANG P, QI J N, et al. TLR-induced NF- κ B activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(7): 1022-1026.
- [26] BUDAI M M, VARGA A, MILESZ S, et al. *Aloe vera* downregulates LPS-induced inflammatory cytokine production and expression of NLRP3 inflammasome in human macrophages[J]. *Mol Immunol*, 2013, 56(4): 471-479.
- [27] GUO X L, GAO M Q, QIN Y. Research progress in nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome in depression[J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2023, 32(14): 1438-1445.
- 收稿日期: 2022-10-21
(本文责编: 李艳芳)