

姜黄素通过抑制 TLR4 信号通路下调脂多糖诱导的肺巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-6 和 IL-8*

文秀芳, 陈霞, 邬海桥[△]

(重庆市第三人民医院, 重庆 400014)

摘要: 目的 研究姜黄素对原代培养的肺巨噬细胞表达 TLR4 mRNA 及分泌 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的影响。方法 用脂多糖(LPS)建立体外肺巨噬细胞体外炎症损伤模型,用 ELISA 观察肺巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 和用 RT-PCR、western blot 观察肺巨噬细胞 TLR4 的表达。结果 LPS 明显诱导肺巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 增加及 TLR4 的增量表达($P < 0.01$),姜黄素可抑制这种作用($P < 0.05$),且与姜黄素药物浓度有关($P > 0.05$)。结论 姜黄素对肺巨噬细胞的抗炎机制可能是通过抑制 TLR4 的表达,通过脂多糖-TLR4 信号传导通路,从而减少炎性细胞因子的释放;姜黄素有可能作为一种有研究潜力的抗感染治疗的中药。

关键词: 姜黄素; TLR4 mRNA; 肿瘤坏死因子; 脂多糖

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)06-0022-04

姜黄素是从姜黄中提取的一种植物酚,无毒,作为食品色素被广泛应用,现代研究认为姜黄素是一种安全有效的抗癌,抗氧化等多种药理作用的中药药物。近年来相关研究发现姜黄素对多种外科及炎症性疾病所导致炎性反应均具有一定的作用。Zuccotti GV 等研究表明:反复呼吸道感染的健康儿童口服乳铁蛋白和姜黄素后,显著延迟 CD4⁺淋巴细胞的成熟及 CD14⁺细胞中 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 的表达下降,TLR2 的表达升高,而起免疫调节作用^[1]。但是在细菌所致肺炎的发生过程中姜黄素是否通过对肺巨噬细胞相关功能的调控而产生抗炎作用还不完全清楚,目前国内也无相关研究的报道。

本研究拟通过离体实验探讨姜黄素在脂多糖诱导的炎症反应中对肺巨噬细胞的 TLR4 蛋白的表达以及炎症介质释放的调控作用,为革兰氏阴性细菌所致的肺部感染的治疗提供新的中药药物选择和治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料

成年 SD 大鼠(重庆医科大学动物实验中心);姜黄素(武汉来福赛斯生物科技有限公司);大肠杆菌 LPS (美国 Sigma 公司);TLR4 抗体购自 Santa Cruz 公司;TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的 ELISA 试剂盒(晶美生物工程有限公司);MTG2000 图象分析测量系统。

1.2 大鼠巨噬细胞的原代培养及鉴定

取 SD 大鼠(雌雄不拘),耳缘静脉注射 10 mL 空气处死动物。仰卧固定,消毒胸部,剪开胸壁。小心从环状软骨下方剪下气管,分离心脏和血管,取出肺,剪去脂肪和结缔组织。用无菌纱布小心擦净肺表面。用夹子夹住气管,使肺悬空。向气管中注射 40 mL 无菌的冷生理盐水,让生理盐水进入全部肺泡。用镊子提起气管,从夹子下面剪断气管,将肺中的液体倒入离心管中。再用同样方法,用 40 mL 无菌冷生理盐水冲洗肺泡,收集浸出液,置 4℃ 备用。取出肺泡巨噬细胞后,剪去气管,将肺组织放在冷 RPMI-1640 培养液的平皿中。平皿置冰上,用吸满冷 RPMI-1640 培养液的 20 mL 注射器接 23 号针头,一边灌注一边用针头梳离肺组织,直到肺组织

* 基金项目: 重庆市自然科学基金计划项目(NO: cstc2013jcyjA1062)

收稿日期: 2013-10-22 修回日期: 2013-10-30

作者简介: 文秀芳(1971~),女,四川营山人,副主任医师,主要从事气道炎症发生机制及防治研究,呼吸内科工作。

[△]通信作者: 邬海桥, E-mail: 20571380@qq.com

与支气管树全部分离。使肺组织通过 100 目的钢丝网,分离单细胞。然后离心 200 $\times$ g 10min,去上清液。轻弹试管,悬浮细胞,加入 10mL 低渗液(20mmol/L Tris, 0.75%氯化铵, pH7.4), 37 $^{\circ}$ C 处理 3~5min,溶解红细胞。将上述细胞悬液离心 200 $\times$ g 10min,去上清液。再用 RPMI-1640 培养液洗涤细胞一次。将细胞悬液加在淋巴细胞分离液(比重 1.077)上,离心 400 $\times$ g 20min,收集交界面的巨噬细胞。弃去沉淀的死细胞和红细胞。用 RPMI-1640 培养液洗涤巨噬细胞 2 次。台盼蓝染色检测细胞活力和细胞数,将细胞配成所需浓度,以 2.5×10^6 /mL 接种,置 37 $^{\circ}$ C CO₂ 温箱中培养备用。

1.3 姜黄素对 LPS 作用下肺巨噬细胞功能的作用

1.3.1 实验分组及处理

对照组、模型组,姜黄素干预组(50、100、150、200 μ g/mL)。原代培养的肺巨噬细胞以 2×10^5 /孔接种在 6 孔板。实验时对照组不给予任何处理,LPS 组则加入 1 μ g/mL LPS 刺激 12h,姜黄素干预组,则分别以 50、100、150、200 μ g/mL 预处理 2h 后在加入 1 μ g/mL LPS 刺激 12h。

1.3.2 巨噬细胞分泌功能的测定

取各组上清液 50 μ L,利用酶联免疫吸附法(ELISA)测定培养细胞上清液中 TNF- α 、IL-6、IL-8 的含量(按酶联免疫吸附试剂盒说明书操作)。

1.3.3 RT-PCR 检测表达 TLR4 的 mRNA

分别提取各组细胞内的总 RNA。总 RNA 提取后保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱,以两步法行 RT-PCR。管家基因 β -actin 扩增引物:上游 5'-GACGATATCGCT-GCGCTG-3',下游 5'-GTACGACCAGAGGCAT-ACAGG-3'。检测 TLR4 扩增引物:上游 5'-TG-GAAGTTGAACGAATGGAATGTG-3',下游 5'-ACCAGAACTGCTACAACAGATACT-3'。管家基因 GAPDH 扩增引物:上游 5'-GGATGATGC-

CTCTCTTGCAT-3',下游 5'-TGATCCATGCATTG-GTAGGTAA-3'。反应条件设置:预变性(95 $^{\circ}$ C, 4min),PCR 扩增反应(94 $^{\circ}$ C 30sec;60 $^{\circ}$ C 30sec;72 $^{\circ}$ C 60sec;30 循环)。产物经凝胶电泳鉴定基因片段,目的基因(147bp)管家基因(348bp)的积分光密度比值作为目的基因 mRNA 的相对含量。

1.3.4 Western blot 检测 TLR4 蛋白的表达

取各组细胞,使用细胞裂解液,提取各组培养瓶的总蛋白,后加入样品处理液(5 $\times$ SDS),经高温加热,使蛋白质完全变性、解聚,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。各组样品上样量为 30 μ g,7.5%SDS-PAGE 凝胶恒压电泳,浓缩胶 80V,分离胶 120V,予 PVDF 转膜,恒流 250mA 转膜 1h,脱脂奶粉封闭,加相应一抗 TLR4,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加二抗孵育 2h,ECL 化学发光显影并用凝胶处理系统分析目标条带和内参条带的净光密度值及其比值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件包分析,检测结果均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较行方差分析,如差异有统计学意义,再进行组间的两两比较(t 检验)。

2 结果

2.1 各组细胞培养上清 TNF- α 、IL-6、IL-8 含量

ELISA 结果:在对照组中 12h 肺巨噬细胞培养上清中只有极少量的 TNF- α 、IL-6、IL-8 的分泌,且无差异;经 LPS 刺激后的细胞培养上清中 TNF- α 、IL-6、IL-8 的量明显增加,与对照组比较,两组间有明显差异($P < 0.01$);不同浓度姜黄素干预组细胞培养上清中 TNF- α 、IL-6、IL-8 的量较模型组均明显减少,均与模型组间有明显差异($P < 0.01$),但与对照组比较 TNF- α 、IL-6、IL-8 的量均有明显增加;各组间 TNF- α 、IL-6、IL-8 的量有明显差异($P < 0.05$),与姜黄素剂量呈负相关即姜黄素抑制上皮细胞分泌 TNF- α 的量呈剂量依赖性。见表 1。

表 1 各组不同时间 TNF- α 、IL-6、IL-8 (ng/mL) 的浓度 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	对照组	模型组	C50 组	C100 组	C150 组	C200 组
IL-6	0.41 $\pm$ 0.028 ¹	1.86 $\pm$ 0.05 ^{1,2}	1.40 $\pm$ 0.02 ^{2,3}	1.05 $\pm$ 0.06 ^{2,3}	0.86 $\pm$ 0.02 ^{2,3}	0.65 $\pm$ 0.06 ^{2,3}
IL-8	0.16 $\pm$ 0.017 ¹	1.61 $\pm$ 0.01 ^{1,2}	1.13 $\pm$ 0.06 ^{2,3}	0.87 $\pm$ 0.03 ^{2,3}	0.66 $\pm$ 0.06 ^{2,3}	0.41 $\pm$ 0.03 ^{2,3}
TNF- α	0.35 $\pm$ 0.025 ¹	1.75 $\pm$ 0.02 ^{1,2}	1.26 $\pm$ 0.02 ^{2,3}	1.03 $\pm$ 0.05 ^{2,3}	0.72 $\pm$ 0.02 ^{2,3}	0.56 $\pm$ 0.05 ^{2,3}

注:模型组与对照组比较 ¹ $P < 0.01$;干预组与模型组比较 ² $P < 0.01$;干预组间相比 ³ $P < 0.05$

2.2 各组 TLR4mRNA 及 TLR4 蛋白的结果

TLR4mRNA 结果:TLR4mRNA 电泳结果见

图 1。LPS 刺激肺巨噬细胞 24h 后 TLR4mRNA 的表达水平明显增强,与对照组相比 ($P < 0.001$) 差

别有统计学意义。给予不同浓度姜黄素干预后,均明显降低了 TLR4 mRNA 表达水平(各干预组与模型组相比分别 $P<0.01$),C50,C100,C150,C200 组间 TLR4mRNA 含量有明显差异(各干预组间相比 $P<0.05$),大剂量姜黄素组 TLR4mRNA 下降更明显。见表 2。

TLR4 蛋白的结果:TLR4 蛋白 westren 印迹结

果见图 2。LPS 刺激肺巨噬细胞 24h 后 TLR4 蛋白的表达水平明显增强,与对照组相比($P<0.001$)差别有统计学意义。给予不同浓度姜黄素干预后,均明显降低了 TLR4 蛋白表达水平(各干预组与模型组相比分别 $P<0.01$),C50,C100,C150,C200 组间 TLR4 蛋白含量有明显差异(各干预组间相比 $P<0.05$),大剂量姜黄素组 TLR4 蛋白下降更明显。

表 2 各组 TLR4mRNA 及 TLR4 蛋白比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	对照组	模型组	C50 组	C100 组	C150 组	C200 组
TLR4 mRNA(灰度比值)	0.864 $\pm$ 0.15 ¹	1.799 $\pm$ 0.108 ^{1,2}	0.834 $\pm$ 0.12 ^{2,3}	0.598 $\pm$ 0.09 ^{2,3}	0.432 $\pm$ 0.08 ^{2,3}	0.197 $\pm$ 0.11 ^{2,3}
TLR4 蛋白	1.912 $\pm$ 0.15 ¹	4.701 $\pm$ 0.108 ^{1,2}	3.95 $\pm$ 0.10 ^{2,3}	3.101 $\pm$ 0.02 ^{2,3}	2.360 $\pm$ 0.18 ^{2,3}	1.071 $\pm$ 0.03 ^{2,3}

注:模型组与对照组比较 ¹ $P<0.001$;干预组与模型组比较 ² $P<0.01$;干预组间相比 ³ $P<0.05$

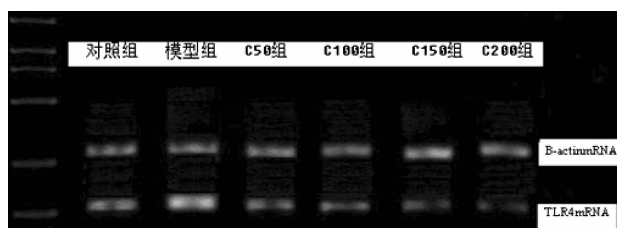


图 1 各组 TLR4mRNA 电泳结果

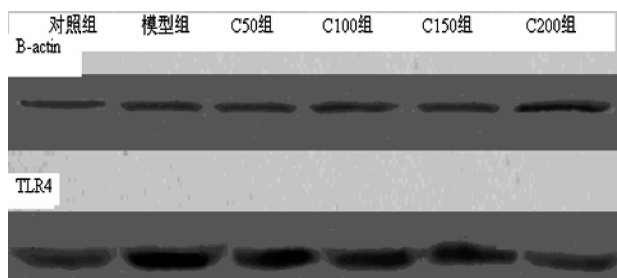


图 2 westren 印迹检测各组 TLR4 蛋白表达

3 讨论

TLR4 广泛表达在单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞等 CD14 阳性以及内皮细胞和上皮细胞等 CD14 阴性细胞上。姜黄素和乳铁蛋白可使 CD14 阳性细胞表达 TLR4 下降^[1]。脂多糖是 TLR4 主要配体。在 LPS 刺激人单核细胞分泌 TNF- α 中,存在 TLR4 抗体时,LPS 刺激作用被抑制^[2]。由此可见 TLR4 是将 LPS 信号由胞外转向胞内的关键信号分子,TLR4 在炎症反应中的表达变化对机体的炎症反应具有重要的调控作用。在配体(LPS)作用下,TLR4 至少能启动两条信号转导途径^[3-4]。一条是通过依赖性的 MyD88/非依赖 MyD88 途径导致核转录因子 NF- κ B 的激活,促进基因转录,使多种炎症因子如 IL-6、TNF- α 的瀑链式释放而产生生物学

效应^[5];另一条导致 MAPK 信号通路激活,如 c-Jun 氨基末端激酶/应激激活蛋白激酶,P38 的 MAPK 信号通路激活。由此可见 TLR4 是将 LPS 信号由胞外转向胞内的关键信号分子,TLR4 在炎症反应中的表达变化对机体的炎症反应具有重要的调控作用,因此可作为抗炎药物治疗新的靶点。Meng Z 等研究中:姜黄素通过抑制 TLR4-MAPK/NF- κ B 信号通路抑制脂多糖诱导鼠血管平滑肌细胞过度表达炎症细胞因子分泌^[6]。在四氯化碳诱导的鼠肝纤维化模型中,姜黄素可明显下调 TLR4、TNF- α 、IL-6 的表达^[7]。三硝基苯磺酸诱导的鼠结肠炎模型中,姜黄素明显减少 TLR4 蛋白含量,明显下调 NF- κ B 的表达^[8]。姜黄素可有效抑制心肺分流术后 24h 肺组织中 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 的高表达^[9]。国内研究:姜黄素对小鼠肾小管上皮细胞体外再灌注损伤具有保护作用,其机制可能与抑制细胞内 TLR4 表达并减轻 TLR4 所激发的炎症损伤有关^[10]。上述研究表明姜黄素可通过抑制不同组织细胞内 TLR4 表达及通过 TLR4 信号通路而减少多种疾病过程中相关炎症分子的分泌从而减轻机体的炎症反应。

本研究也证明在离体实验中,在脂多糖诱导的气道上皮细胞炎症模型中,LPS 明显诱导气道上皮细胞表达 TLR4mRNA 及 TLR4 蛋白,分泌 TNF- α 、IL-6、IL-8 的水平显著增高;在姜黄素的干预下,LPS 诱导气道上皮细胞表达 TLR4 的水平及分泌 TNF- α 、IL-6、IL-8 的水平明显下降。姜黄素抑制 LPS 诱导气道上皮细胞表达 TLR4 和分泌 TNF- α 、IL-6、IL-8 效果与本实验所用姜黄素的浓度有关,呈剂量依赖性。除通过抑制 TLR4 的表达,其它研究

表明一定浓度的姜黄素可以抑制 LPS 诱导后 THP-1 细胞 TRAF6、IRAK1、NF- κ B 的 mRNA 的表达,表明姜黄素对 TLR4 信号传导通路中相关因子 mRNA 水平有调节作用^[1]。结合 Meng Z 等研究中:姜黄素减轻脂多糖诱导鼠血管平滑肌细胞过度表达炎性细胞因子,其机制是通过抑制 TLR4-MAPK/NF- κ B 信号通路^[6]。故可以推测出姜黄素针对革兰氏阴性菌的抗炎机制是通过抑制 TLR4 及其信号传导通路相关因子的表达,从而减少炎性细胞因子的释放。尽管抗生素的发现已有半个多世纪,并已在临床上得到广泛应用,为人类作出巨大贡献,但革兰氏阴性菌尤其耐药细菌感染仍然有较高的发病率和死亡率,研发新抗生素难以突破,寻找抑制或减轻细菌感染对机体的损伤和影响的药物是紧迫的。随着进一步探讨姜黄素在革兰氏阴性细菌感染所致的急性炎症中体内、外研究和有效安全的药物浓度及药物制剂,姜黄素有可能作为一种有价值、有潜力、价廉的抗感染药物。

参考文献

- [1] Zuccotti GV, Trabattini D, Morelli M, et al. Immune modulation by lactoferrin and curcumin in children with recurrent respiratory infections [J]. Biol Regul Homeost Agents, 2009, 23(2): 119-23.
- [2] Lagoumintzis G, Xaplanteri P, Dimitracopoulos G, et al. TNF- α induction by Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide or slime-glycolipoprotein in human monocytes is regulated at the level of Mitogen-activated Protein Kinase activity: a distinct role of Toll-like receptor 2 and 4 [J]. Scand J Immunol, 2008, 67(2): 193-203.
- [3] Seewan K, Young E J. The Aflavin Inhibits LPS-Induced IL-6, MCP-1, and ICAM-1 Expression in Bone Marrow-Derived Macrophages Through the Blockade of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways [J]. Chonnam Med, 2011, 47(2): 104-110.
- [4] Lai TY, Wu SD, Tsai M, et al. Transcription of Tnfaip3 Is Regulated by NF- κ B and p38 via C/EBP β in Activated Macrophages [J]. HPLoS One, 2013, 8(9): e73153.
- [5] Yang YX, Li GY. Progression of lipopolysaccharide signal pathway [J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2006, 31(1): 141-145.
- [6] Meng Z, Yan C, Deng Q, et al. Curcumin inhibits LPS-induced inflammation in rat vascular smooth muscle cells in vitro via ROS-related TLR4-MAPK/NF- κ B pathways [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(7): 901-11.
- [7] Tu CT, Yao QY, Xu BL, Wang JY et al. Protective effects of curcumin against hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride: modulation of high-mobility group box 1, Toll-like receptor 4 and 2 expression [J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(9): 3343-51.
- [8] Zeng Z, Zhan L, Liao H, et al. Urcumin improves TNBS-induced colitis in rats by inhibiting IL-27 expression via the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Thromb Haemost, 2013, 109(4).
- [9] Liu K, Shen L, Wang J, et al. The preventative role of curcumin on the lung inflammatory response induced by cardiopulmonary bypass in rats [J]. Surg Res, 2012, 174(1): 73-82.
- [10] 吴迪英, 郭闻渊, 张豪杰, 等. 姜黄素对小鼠肾小管上皮细胞体外再灌注损伤的保护作用及机制 [J]. 第二军医大学学报, 2011, 31(8): 874-878.
- [11] 彭立新, 李新宇, 宋莎莎, 等. 姜黄素对 THP-1 细胞 Toll 样受体 4 信号传导通路中相关因子 mRNA 水平的影响 [J]. 中华皮肤科杂志, 2010, 43(7): 493-496.

(编辑:徐建平)

Curcumin Attenuated TNF- α IL-6 and IL-8 Levels in Pulmonary Macrophage Stimulated by LPS via Cross Talk Toll-like Receptor-4 Signaling

WEN Xiu-fang, CHEN Xia, WU Hai-qiao

(The Third People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014, China)

ABSTRACT: **Objective** To study the influence of Curcumin on the expressions of TLR4 and TNF- α , IL-6, IL-8 release in pulmonary macrophage. **Methods** The experiments were performed in culture of LPS induced pulmonary macrophage in vitro, the TNF- α , IL-6, IL-8 release was detected with ELISA and the expressions of TLR4 was detected with RT-PCR and western blot. **Results** Pulmonary macrophage was stimulated with LPS and the expressions of TLR4 and TNF- α , IL-6, IL-8 release was increased ($P < 0.01$), but it was inhibited by Curcumin ($P < 0.05$), and dose dependence ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of Curcumin's antiinflammatory may be reduce cytokine release, by inhibits expressions of TLR4 and via Cross talk toll-like receptor-4 signaling; Curcumin may be used as a kind of anti-infective drug.

KEY WORDS: Curcumin; TLR4 mRNA; TNF- α ; LPS