

胀果甘草多糖 GiP-B1 通过 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路激活巨噬细胞 RAW 264.7

丛媛媛*, 依明·尕哈甫, 陈春丽, 娜迪热木·肖克拉提, 俞永婷

新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011

摘要:为研究胀果甘草多糖 GiP-B1 通过 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路对巨噬细胞 RAW 264.7 免疫功能的影响, 体外以 TLR4 干扰 RNA (TLR4-siRNA) 转染巨噬细胞 RAW 264.7 24 h, 用 100 μ g/mL GiP-B1 处理转染和未转染细胞, 12 h 后分别采用 CCK-8 和 ELISA 法检测 GiP-B1 对巨噬细胞 RAW 264.7 增殖和分泌炎症因子的影响, 并采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测 GiP-B1 对巨噬细胞 TLR4 及其信号通路下游基因 MyD88、NF- κ B p65、I κ B α 的 mRNA 和蛋白表达水平的影响。结果显示, 与空白对照组比较, GiP-B1 可显著提高巨噬细胞 RAW 264.7 的增殖, 促进白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的分泌, 上调 TLR4、MyD88、NF- κ B p65、I κ B α 的 mRNA 和蛋白表达量 ($P < 0.05$); 对各组进行 TLR4 基因沉默后, 与正常培养的 GiP-B1 组比较, 转染 TLR4-siRNA 可抑制 GiP-B1 诱导的巨噬细胞 RAW 264.7 的增殖、细胞因子的分泌以及 TLR4、MyD88、NF- κ B p65、I κ B α 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。以上结果表明, GiP-B1 可活化 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路, 促进相关基因表达, 使 NF- κ B 进入细胞核调控相关细胞因子的转录水平, 进而激活巨噬细胞的免疫功能。

关键词:胀果甘草多糖; 巨噬细胞; TLR4; MyD88; NF- κ B

中图分类号: 285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)12-2073-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.12.012

Polysaccharide GiP-B1 from *Glycyrrhiza inflata* activates RAW 264.7 by TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway

CONG Yuan-yuan*, YIMING·Gahafu, CHEN Chun-li, NADIREMU·Xiaokelati, YU Yong-ting

College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the acidic polysaccharide GiP-B1 from *Glycyrrhiza inflata* on activation of RAW 264.7 through TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway. RAW 264.7 were transfected with TLR4 interfering RNA (TLR4 siRNA) for 24 h *in vitro*, and then treated with GiP-B1 (100 μ g/mL) for 12 h. The effects of proliferation and secretion of inflammatory factors in RAW 264.7 were detected by CCK-8 and ELISA kits, respectively. RT-PCR and Western blot method was used to detect the effects of GiP-B1 on the mRNA and the protein expression levels of TLR4, MyD88, NF- κ B p65 and I κ B α . The results showed that compared with the blank control group, GiP-B1 could significantly increase the proliferation of RAW 264.7 and the secretion of interleukin 1 beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and significantly up-regulate the mRNA and protein expressions of TLR4, MyD88, NF- κ B p65 and I κ B α ($P < 0.05$). After TLR4 gene silencing was performed for each group, compared with the normal cultured GiP-B1 intervention group, the transfection group could inhibited the proliferation and cytokine secretion of RAW 264.7 induced by GiP-B1, which also inhibited the mRNA and protein expression levels of TLR4, MyD88, NF- κ B p65 and I κ B α ($P < 0.05$). In summary, GiP-B1 activates TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway to promote the expression of related genes, and finally promotes NF- κ B into the nuclear to regulate the transcription level of cytokines, and then regulates the macrophage immune function.

Key words: *Glycyrrhiza inflata* polysaccharides; macrophage; TLR4; MyD88; NF- κ B

收稿日期: 2021-04-28 接受日期: 2021-10-22

基金项目: 国家自然科学基金 (81360626, 81960702)

* 通信作者 Tel: 86-991-2110362; E-mail: congyxyj@126.com

天然免疫系统是机体抵抗病原体入侵的重要防线, 而 Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 以及表达 TLRs 的巨噬细胞、树突状细胞等抗原提呈细胞

是天然免疫系统的重要组成部分^[1,2]。有关 TLRs 参与巨噬细胞免疫识别、调控信号转导、启动免疫应答反应的研究表明,TLRs 家族中除了 TLR3 外的其他成员,都可以通过识别脂多糖(lipopolysacchride, LPS)等配体,结合髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88),招募相关激酶并激活核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)抑制物的激酶(inhibitor of NF- κ B kinases, IKK),使结合 NF- κ B 的 NF- κ B 抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, I κ B)发生磷酸化并解离,活化 NF- κ B 进入细胞核,启动或抑制靶基因的转录,进而调控天然免疫应答反应^[3-5]。

多糖作为一类有效的生物应答调节剂,激活巨噬细胞免疫应答的机制也与 TLRs/NF- κ B 信号通路转导有关。研究发现,许多植物多糖可与巨噬细胞表面的 TLR2/4 等受体特异性结合,激活 NF- κ B 信号通路,调控细胞因子的转录和吞噬细胞中共刺激分子的表达,并启动下级级联,激活先天性免疫与获得性免疫^[6-9]。

胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.)是新疆特色药用植物资源,其干燥根及根茎作为药材甘草已被《中国药典》收录,其粗多糖 GiP 及其纯化组分已被本课题组证实具有促进巨噬细胞和淋巴细胞增殖作用^[10-12],其中含量较高的纯化组分 GiP-B1 是一个具有聚 Rha-GalA 主链的酸性多糖,相对分子量大于 2.0×10^6 Da,糖醛酸含量为 16.8%,可显著促进巨噬细胞 RAW 264.7 的增殖和吞噬作用,提高巨噬细胞的 IL-1 β 和 TNF- α 分泌量,促进 NO 和 NOS 的生成。课题组进而采用单克隆抗体 anti-TLR4 干预巨噬细胞后发现,GiP-B1 诱导的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 NO 的分泌,以及 iNOS、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 mRNA 表达,都出现不同程度的抑制,提示 GiP-B1 激活巨噬细胞可能与 TLR4 及其相关信号通路有关。为了深入研究胀果甘草多糖 GiP-B1 激活巨噬细胞与 TLR4/NF- κ B 信号通路有关,本文在体外利用 TLR4 干扰 RNA(TLR4-siRNA)转染巨噬细胞 RAW 264.7,探讨 GiP-B1 干预后是否可通过 TLR4 介导的 NF- κ B 信号通路激活巨噬细胞,以期阐明 GiP-B1 激活巨噬细胞的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

RAW 264.7 小鼠巨噬细胞株购自中科院上海细胞生物所,培养条件为 DMEM(高糖)培养基 +

10% FBS + 1% 双抗(青霉素 + 链霉素),37 °C,5% CO₂,饱和湿度。

1.1.2 胀果甘草多糖 GiP-B1

实验室自制,用 DMEM 完全培养液配成 20 mg/mL 样品母液,0.22 μ m 无菌滤器过滤,放于 4 °C 备用。

1.1.3 试剂

胎牛血清(FBS,批号:16000044)、DMEM 培养基(批号:C11965500BT)、胰酶(0.25% Trypsin-EDTA,批号:25200-056)购自美国 GIBCO 公司;CCK-8 试剂盒(批号:FC101-03)、Trans2K DNA Marker(批号:BM101)、TransZol Up(批号:ET111)、TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super-Mix(批号:AT311)购自北京全式金生物,QuantiNava SYBR Green PCR 试剂盒(批号:208054)购自德国 QIAGEN 公司;lipofectamine RNAiMAX(批号:13778-150)、Block-iT Alexa Fluor Red(批号:14750-100)、TLR4 siRNA(批号:MSS211922, MSS211923, MSS211924)、Negative Control(批号:452000)购自美国 Life Technologies 公司;Anti-I κ B α (批号:ab32518)、Anti-NF- κ B p65 单克隆抗体(批号:ab32536)购自英国 Abcam 公司;MyD88(批号:4283)、Phospho-I κ B α (批号:2859)、Phospho-NF- κ B p65(批号:3033)、TLR4 兔单克隆抗体(批号:14358)购自美国 CST 公司。

1.1.4 仪器

Smart Cell HF-90 CO₂ 细胞培养箱(上海力康仪器有限公司);Eclipse TS100-F 荧光倒置显微镜(日本尼康公司);xMarkTM 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);K5500 核酸蛋白定量仪(北京凯奥公司);2500 凝胶成像系统(上海天能公司);MyCycler Thermal Cycler PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);QuantStudio™ 6 Flex Real Time PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 不同浓度 GiP-B1 对 RAW 264.7 细胞活力的影响

取生长状态良好汇合率达 90% 的细胞,完全培养基制备成 2×10^5 个/mL 单细胞悬液,接种至 96 孔板中,37 °C、5% CO₂ 培养 24 h;加入 100 μ L 不同浓度(0、25、50、100、200、400、800 μ g/mL)的 GiP-B1 溶液,每组 5 个复孔。37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 后,每孔加入 10% 的 CCK8 溶液,继续培养 2 h;用酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值。

1.2.2 siRNA 转染条件确定和 TLR4-siRNA 的筛选

取 9 μ L lipofectamin RNAiMAX 试剂, 分别与 1.5 μ L 不同浓度 Block-iT Alexa Fluor Red 试剂 (0.01、0.1 μ mol/L) 混匀, 室温孵育 5 min, 静置 20 min。将细胞接种至 24 孔板培养孔中, 使转染时细胞密度达 70%, 在每孔细胞中加入 100 μ L 转染液, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 和 48 h 后, 于倒置荧光显微镜下观察荧光情况, 根据红色荧光数确定转染效率较好的转染条件。

3 条 TLR4 siRNA 和 Negative Control siRNA (与人类基因无同源性) 的序列见表 1。用无血清培养基稀释各 siRNA 至浓度 50 nmol/L, 取 7.5 μ L 与 45 μ L lipofectamin RNAiMAX 试剂混匀, 室温孵育 5 min, 静置 20 min。将细胞接种至 24 孔板培养孔中, 使转染时细胞密度达 70%, 在每孔细胞中加入 100 μ L 转染液, 37 $^{\circ}$ C 培养, 用 RT-PCR 法分别检测细胞各 TLR4 siRNA 表达量, 筛选出干扰效率最高的 siRNA 进行后续实验^[13-16]。

表 1 TLR4-siRNA 序列

Table 1 TLR4-siRNA sequences

名称 Name	序列(5'→3') Sequence(5'→3')
TLR4-siRNA1	CCUCCAUAGACUUCAAUUATT UAAUUGAAGUCUAUGGAGGTT
TLR4-siRNA2	GGACAGCUUAUAACCUAAATT UUAAGGUUAUAAGCUGUCCTT
TLR4-siRNA3	GCUAUAGCUUCUCCAAUUUTT AAAUUGGAGAAGCUAUAGCCTT
NC-siRNA	UUCUCGGAACGUGUCACGUTT ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.2.3 实验分组

将生长状态良好的 RAW 264.7 细胞接种至培养瓶中, 贴壁生长 24 h 后使其汇合率达 70%, 分为空白对照组 (不转染, blank control)、阴性对照组 (RAW 264.7 细胞与人类基因无同源性的 siRNA 转染, negative control, NC)、TLR4 小干扰 RNA 转染组 (TLR4-siRNA 组, si)、100 μ g/mL GiP-B1 组 (样品组)、100 μ g/mL GiP-B1 + TLR4-siRNA 组 (样品 + si 组)。

1.2.4 TLR4-siRNA 转染后 GiP-B1 对 RAW 264.7 细胞增殖的影响

按“1.2.2”项下方法培养细胞 24 h 后, 分组给

药; 100 μ L 用完全培养基配制的 Negative Control (与人类基因无同源性的 siRNA) 溶液、TLR4-siRNA 溶液、100 μ g/mL GiP-B1 溶液、100 μ g/mL GiP-B1 + TLR4-siRNA 溶液以及空白对照组, 每组 5 个复孔, 转染 24 h; 放入培养箱中培养 2 h 后, 每孔加入培养基总体积 10% 的 CCK-8 溶液, 继续培养 2 h, 用酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值。

1.2.5 TLR4-siRNA 转染后 GiP-B1 对 RAW 264.7 细胞炎症因子产生的影响

按“1.2.2”项下方法培养细胞 24 h 后, 分组给药; 500 μ L 用完全培养基配制的 Negative Control 溶液、TLR4-siRNA 溶液、GiP-B1 溶液、GiP-B1 + TLR4-siRNA 溶液以及空白对照组, 每组 5 个复孔, 转染 24 h; 分别吸取各组培养上清液 ELISA 法进行检测。

1.2.6 TLR4-siRNA 转染后 GiP-B1 对 RAW 264.7 细胞 NF- κ B 信号通路相关基因表达的影响

按“1.2.2”项下方法培养细胞 24 h 后, 分组给药, 每组 5 个复孔, 转染 24 h 后, 弃上清液, 按 Trizol 试剂说明书方法提取各组细胞总 RNA, 按 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 说明书方法逆转录成 cDNA。荧光定量 PCR 检测按 QuantiNava SYBR Green PCR Kit 说明书进行。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、72 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 40 个循环。引物序列见表 2。

表 2 引物序列表

Table 2 Primer sequences

引物名称 Primer name	序列 Sequence(5'→3')	引物大小 Primer size (bp)
mouse TLR4 F	ATGGCATGGCTTACACCACC	129
mouse TLR4 R	GAGGCCAATTTTGTCTCCACA	
mouse I κ B α F	ACCTAATGAAAGGACCACG	114
mouse I κ B α R	CACATGCCACTGAACACC	
mouse MYD88 F	ATCGCTGTCTTGAACCCCTCG	199
mouse MYD88 R	CTCAGCGTCTAACAAGGCCAG	
mouse P65 F	TGGATTCCGCTATAAATGCG	178
mouse P65 R	ACAAGTTCATGTGGATGAGGC	
mouse actin F	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	245
mouse actin R	GCCGGACTCATCTACTCC	

1.2.7 TLR4-siRNA 沉默 TLR4 基因后, 胀果甘草多糖对巨噬细胞 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响

按“1.2.2”项下方法培养细胞 24 h 后, 分组给

药,每组 5 个复孔,转染 24 h 后,弃上清液,加入 1 mL 胰酶消化细胞,参照文献提取细胞总蛋白和线粒体蛋白,用 BCA 法定测定蛋白浓度。每个样本上样总量为 50 μg ,蛋白质预染 Marker 上样量为 9 μL ,用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,转至 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉溶液(Tert)室温振摇封闭 1 h,然后加入 TLR4 一抗(1:1 000)、MyD88 一抗(1:1 000)、NF- κB p65 一抗(1:500)、P-NF- κB p65 一抗(1:500)、I κB 一抗(1:500)、P-I $\kappa\text{B}\alpha$ 一抗(1:500)、 β -actin 一抗(1:2 500),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗膜后加入相应二抗(1:10 000),室温孵育 1 h,TBST 洗膜 10 min \times 3 次。加入化学发光试剂,经显影、定影后,ChemiScope mini 化学发光仪检测、拍照。

1.2.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,多组间比较应用单因素方差分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度胀果甘草多糖(GiP-B1)对 RAW 264.7 细胞活力的作用

由图 1 可知,GiP-B1 干预细胞 24 h 后,50 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的 OD 值都明显高于对照组($P < 0.05$),其中 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的 OD 值最高,表明该浓度范围内 GiP-B1 无细胞毒性,可促进巨噬细胞增殖;随着

浓度增加,各组的 OD 值反而降低。因此后续实验 GiP-B1 干预浓度选择 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

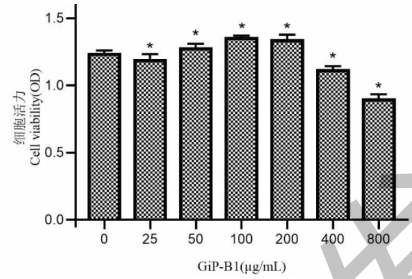


图 1 不同浓度 GiP-B1 对 RAW 264.7 细胞株干预 24 h 后的结果($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Results of different concentrations of GiP-B1 on RAW 264.7 cell line after 24 h of intervention ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$ 。Note: Compared with the blank control group,* $P < 0.05$ 。

2.2 siRNA 转染条件确定和 TLR4-siRNA 的筛选

不同浓度 siRNA 转染 RAW 264.7 细胞不同时间的荧光照片(见图 2)显示,只有转染成功的细胞才能在荧光显微镜下看到 Block-iT Alexa Fluor 指示剂的红色荧光,当 0.01 $\mu\text{mol}/\text{L}$ siRNA 转染细胞 24 h 时,红色荧光亮度及具有荧光细胞数较多,转染效率较好,故选择 siRNA 浓度为 0.01 $\mu\text{mol}/\text{L}$,转染时间 24 h 为正式实验的转染条件,用于以下目的基因的转染实验。

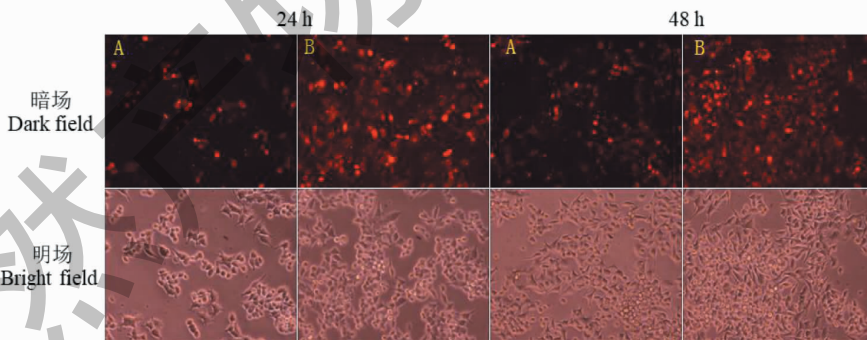


图 2 RAW 264.7 细胞转染荧光图片($\times 100$)

Fig. 2 Fluorescence image of RAW 264.7 cell transfection ($\times 100$)

注:A:0.01 $\mu\text{mol}/\text{L}$;B:0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$

3 对 TLR4-siRNA 转染 RAW 264.7 细胞 24 h 后,TLR4 mRNA 表达水平由 RT-PCR 法检测,结果显示(见图 3),3 组 TLR4-siRNA 都能有效沉默相应 mRNA 的表达($P < 0.05$),其中 TLR4-siRNA1 组与空白对照组相比,TLR4 的 mRNA 表达水平下调了 68.4%,沉默效果最为明显,因此后续实验选用

TLR4-siRNA1 进行转染。

2.3 TLR4-siRNA 沉默后 GiP-B1 对 RAW 264.7 巨噬细胞增殖的影响

选择沉默效率最高的 TLR4-siRNA1 转染 24 h 后,CCK-8 法检测 GiP-B1 对巨噬细胞增殖中的作用。结果显示(见图 4),与空白组相比,TLR4-siR

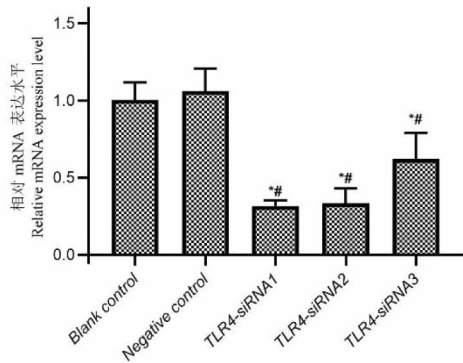


图3 不同 TLR4-siRNA 转染细胞后 TLR4 的 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Relative expression of TLR4 mRNA in cells transfected with different TLR4 siRNA ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与阴性对照组相比, # $P < 0.05$ 。Note: Compared with the blank control group, * $P < 0.05$; Compared with the negative control group, # $P < 0.05$ 。

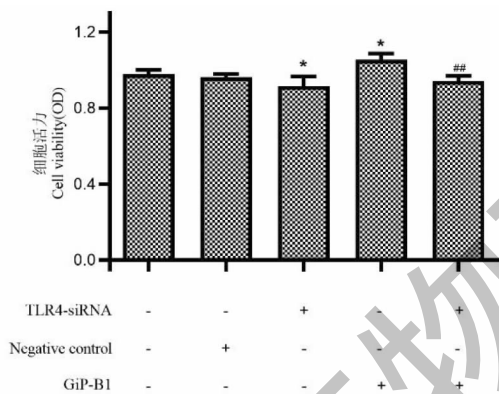


图4 TLR4 沉默后 GiP-B1 对 RAW 264.7 细胞增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of GiP-B1 on the proliferative activity of RAW 264.7 cells after TLR4 silencing ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与 GiP-B1 组比较, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with the blank control group, * $P < 0.05$; Compared with GiP-B1 group, ## $P < 0.01$ 。

NA 组巨噬细胞增殖率显著降低 ($P < 0.05$), 说明 TLR4-siRNA 干扰模型成立; 100 μg/mL GiP-B1 组巨噬细胞增殖率显著提高 ($P < 0.05$); GiP-B1 + TLR4-siRNA 组巨噬细胞的增殖作用则受到抑制, 与 GiP-B1 组差异显著 ($P < 0.01$), 提示 GiP-B1 可通过 TLR4 促进巨噬细胞的增殖。

2.4 TLR4-siRNA 沉默后 GiP-B1 对巨噬细胞 RAW 264.7 分泌炎症因子的影响

TLR4-siRNA1 转染 24 h 后, ELISA 法检测 GiP-B1 影响巨噬细胞分泌炎症因子的结果显示 (见图

5), 与空白组相比, 100 μg/mL 的 GiP-B1 则可促进巨噬细胞分泌 IL-1β、IL-6 及 TNF-α, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); GiP-B1 + TLR4-siRNA1 组巨噬细胞分泌 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 的含量均相应减少, 与 GiP-B1 组差异均显著 ($P < 0.05$), 提示 GiP-B1 可通过 TLR4 促进巨噬细胞分泌 IL-1β、IL-6 及 TNF-α。

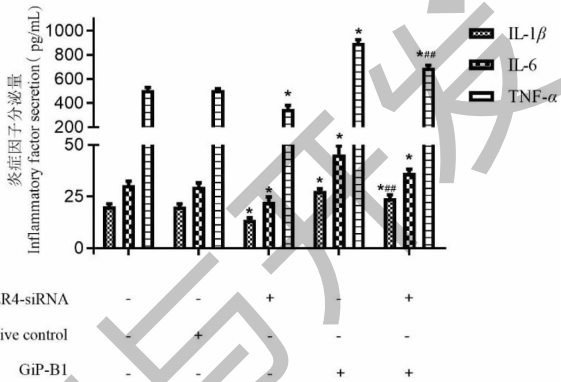


图5 TLR4 沉默后 GiP-B1 对巨噬细胞 RAW 264.7 分泌 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Effects of GiP-B1 on the secretion of IL-1β, IL-6 and TNF-α in macrophage RAW 264.7 cells after TLR4 silencing ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与 GiP-B1 组比较, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with the blank control group, * $P < 0.05$; Compared with GiP-B1 group, ## $P < 0.01$ 。

2.5 TLR4-siRNA 干扰下 GiP-B1 对巨噬细胞 NF-κB 信号通路相关基因表达的影响

RT-PCR 检测结果见图 6, 与空白组相比, GiP-B1 干预组的 TLR4 mRNA 表达显著上调, 表达量增加 93.2%, 该组经 TLR4-siRNA1 转染 24 h 后, TLR4 的 mRNA 显著下调, 表达量降低 44.2%, 与未转染组相比表达量降低 71.1%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 在 GiP-B1 的干预下, MyD88、P65、IκBα 的 mRNA 水平明显上调, 在 TLR4-siRNA1 转染后则都显著下调, 表达量分别降低 44.2%、54.6%、50.89%, 与未转染组差异均极显著 ($P < 0.01$)。该结果表明, 干扰 TLR4 基因表达后, TLR4/NF-κB 信号通路的表达被干扰, 100 μg/mL GiP-B1 诱导的巨噬细胞 TLR4/NF-κB 信号通路下游基因 MyD88、p65、IκBα 的 mRNA 表达量被显著抑制, 说明 TLR4/NF-κB 信号通路与 GiP-B1 激活巨噬细胞有关。

2.6 TLR4-siRNA 干扰下 GiP-B1 对巨噬细胞 NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响

Western blot 检测结果见图 7, 与空白组相比,

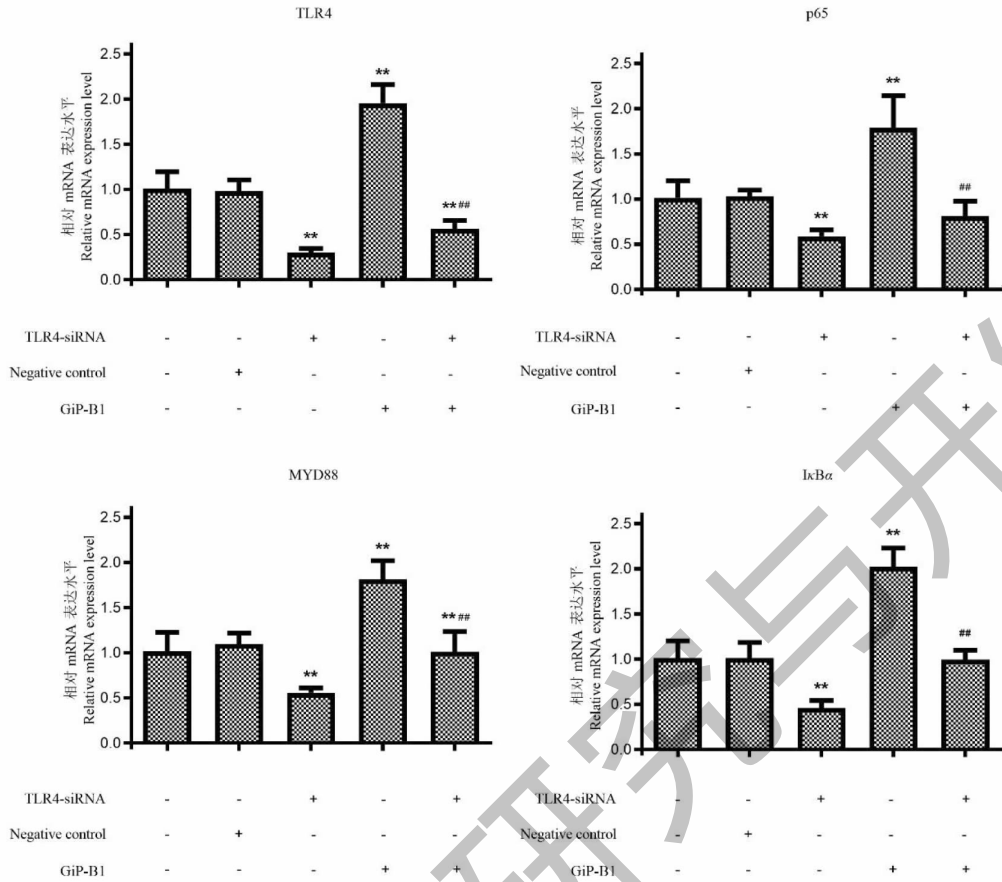


图6 TLR4 沉默后 GiP-B1 对 RAW 264.7 细胞 mRNA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effect of GiP-B1 on the relative expression of mRNA in RAW 264.7 cells after TLR4 silencing($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注:与空白对照组相比, ** $P < 0.01$; 与 GiP-B1 组相比, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with the blank control group, ** $P < 0.01$; Compared with GiP-B1 group, ## $P < 0.01$ 。

GiP-B1 干预组的 TLR4、MyD88 蛋白表达显著上调, 表达量分别增加 55.9% 和 43.2%, 该组经 TLR4-siRNA1 转染 24 h 后, TLR4、MyD88 的蛋白则显著下调, 与未转染组相比表达量分别降低 33.9% 和 30.9%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 在 GiP-B1 的干预下, IκBα、NF-κB p65 的蛋白表达水平几乎没有改变, 但 p-p65、p-IκBα 的蛋白表达水平明显上调 ($P < 0.05$); 而当 TLR4-siRNA1 转染后, p-p65、p-IκBα 的蛋白则都相应显著下调, 表达量分别降低 32.4%、30.4%, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 TLR4-siRNA 沉默 TLR4 基因后, GiP-B1 激活 NF-κB 信号通路的作用减弱。该结果提示 GiP-B1 可通过 TLR4 上调 NF-κB p65 磷酸化水平, 诱导 p-IκBα 磷酸化降解, 促进 NF-κB 入核, 从而启动 NF-κB 信号通路, 激活巨噬细胞的免疫应答反应。

3 讨论与结论

巨噬细胞是机体先天性免疫的重要执行者, 作

为专职性组织吞噬细胞, 通过其表面表达的 TLRs 等模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR), 可以识别病原微生物表面保守的病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), 通过下游的信号途径, 调节各种免疫反应基因的表达从而清除病原体^[17]。研究表明, 许多天然植物多糖可作为 TLR4 的配体, 通过 MyD88 依赖和非依赖两条途径进行巨噬细胞内信号传递, 促进 NF-κB 进入细胞核并与 DNA 启动子上特定识别序列结合, 介导细胞因子 IL-1、IL-6、TNF-α 等的表达, 同时这些细胞因子又作为 NF-κB 的刺激剂, 可进一步活化 NF-κB 造成持续的炎症反应, 激活适应性免疫应答^[18-22]。

胀果甘草作为中药甘草的一种基源植物, 其主要药效物质除了具有抗癌活性的查尔酮类外, 还包括具有抗氧化、抑制 α-葡萄糖苷酶活性、免疫调节活性的多糖类^[10-12, 23-25]。前期本课题组研究发现,

胀果甘草粗多糖 GiP 及其纯化组分具有促进巨噬细胞和淋巴细胞增殖作用,其中含量较高的纯化组分 GiP-B1 对巨噬细胞 RAW 264.7 的增殖、吞噬、分泌细胞因子的功能具有显著促进作用。前期课题组利用 anti-TLR4 处理细胞并加样干预后发现,其作用机制与激活 TLR4/NF-κB 信号通路有关。本文利用

siRNA 技术,通过 TLR4-siRNA 沉默 TLR4 基因,发现 GiP-B1 促进巨噬细胞 RAW 264.7 增殖、分泌细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的作用被抑制,说明 TLR4 参与了 GiP-B1 对巨噬细胞 RAW 264.7 增殖、分泌细胞因子的作用,即 GiP-B1 激活巨噬细胞与 TLR4 相关,这与前期抗体封闭实验的结果是一致的。另

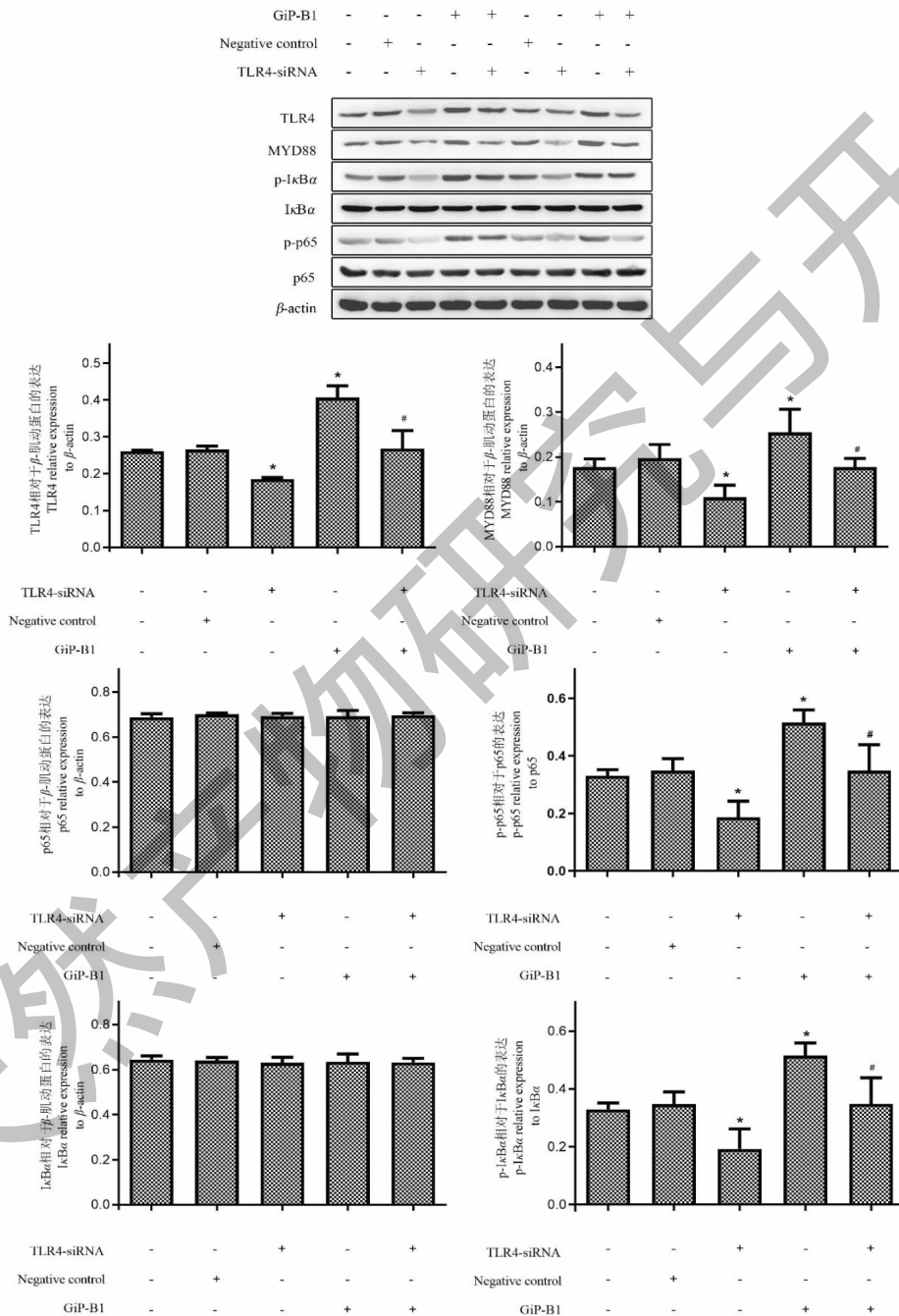


图 7 TLR4 基因沉默后, GiP-B1 对 RAW 264.7 细胞 NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 7 Effects of GiP-B1 on the expression of proteins related to NF - κB signaling pathway in RAW 264.7 cells after TLR4 gene silencing ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与 GiP-B1 组相比, # $P < 0.05$ 。Note: Compared with the blank control group, * $P < 0.05$; Compared with GiP-B1 group, # $P < 0.05$.

外,从 GiP-B1 通过 TLR4 激活巨噬细胞分泌的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等细胞因子的类型上看,提示 GiP-B1 激活巨噬细胞后可诱导其向 M1 型极化,M1 型巨噬细胞除了促进炎症反应外,还具有抗原提呈能力,能够激活 T 细胞的适应性免疫反应,诱导 Th1 细胞免疫反应,对病原体和肿瘤细胞可发挥宿主免疫清除功能^[26,27]。前期研究也发现,GiP-B1 也具有一定的体外抗肿瘤作用,其作用机制是否与 GiP-B1 促进巨噬细胞极化有关,是否可以通过调节肿瘤微环境中的巨噬细胞促进机体的抗肿瘤免疫作用还需要进一步深入研究。

为了进一步证明 GiP-B1 激活巨噬细胞与 TLR4/NF- κ B 通路有关,本实验还对 TLR4-siRNA 干预下 GiP-B1 对巨噬细胞 NF- κ B 通路上游调控基因 TLR4、依赖性分子 MyD88、受体下游基因 NF- κ Bp65、I κ B α 等的 mRNA 和蛋白表达变化进行了研究。结果发现由于 TLR4 基因被沉默,TLR4 mRNA 表达量降低,细胞核内游离 NF- κ Bp65 含量显著减少,激活 NF- κ B 通路的作用也随之降低;而 GiP-B1 不仅可提高正常状态下巨噬细胞中 TLR4 基因的表达,上调 TLR4 信号依赖分子 MyD88 及下游基因 NF- κ Bp65、p-I κ B α 的 mRNA 和蛋白表达量,而且还可上调因 RNA 干扰导致的 TLR4 及 MyD88、NF- κ Bp65、p-I κ B α 的 mRNA 和蛋白的表达下降,进一步证明 GiP-B1 可作为 TLR4 配体之一,可活化依赖 MyD88 的 TLR4/NF- κ B 信号通路,使 NF- κ B 家族中的核转录因子 p65 被活化,导致 I κ B 发生磷酸化降解而与 NF- κ B 解离,促进 NF- κ B 从细胞质移位到细胞核,与 DNA 特定序列结合,调节炎症细胞因子、细胞增殖(抗凋亡)等基因的转录,参与炎症反应、免疫应答等。GiP-B1 通过 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路激活巨噬细胞的调控方式,与上述研究中多糖的作用通路几乎一致^[20-22]。

综上所述,GiP-B1 可通过 TLR4/NF- κ B 信号通路调控巨噬细胞 RAW 264.7 免疫功能,其调控作用主要是通过 MyD88 依赖途径实现的。本实验为胀果甘草多糖激活巨噬细胞的作用研究提供了实验依据,有助于阐明胀果甘草多糖在炎症反应、免疫应答等方面的作用机制。

参考文献

1 Gambuzza M, Licata N, Palella E, et al. Targeting toll-like receptors: Emerging therapeutics for multiple sclerosis management[J]. J Neuroimmunol, 2011, 239(1-2): 1-12.

2 Abdelsadik A, Trad A. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity[J]. Hum Immunol, 2011, 72: 1188-1193.

3 Paul-Clark MJ, George PM, Gatheral T, et al. Pharmacology and therapeutic potential of pattern recognition receptors[J]. Pharmacol Therapeut, 2012(135): 200-215.

4 Rauta PR, Samanta M, Dash HR, et al. Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: signaling pathways, expressions and immune responses[J]. Immunol Lett, 2014, 158(1/2): 14-24.

5 Richard G, Belta C, Julius AA, et al. Controlling the outcome of the Toll-like receptor signaling pathways[J]. Plos One, 2012, 7(2): e31341.

6 Yu Q, Nie SP, Li WJ, et al. Macrophage immunomodulatory activity of a purified polysaccharide isolated from *Ganoderma atrum*[J]. Phytother Res, 2013, 27(2): 186-191.

7 LI JW, Zhou CL. Immunomodulatory activity of polysaccharide and research progresses of polysaccharide medicine[J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2016, 36(4): 24-28.

8 Cong YY, Mumisa DLXT, Mirenscha YKF, et al. Effects of *Fomes officinalis* polysaccharide and its purified constituent on mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling pathway in RAW 264.7 macrophages[J]. Chin J Microbiol Immunol(中华微生物学和免疫学杂志), 2019, 39: 333-339.

9 Wu XP, Li J, Hao YY, et al. Regulation and mechanism of macrophages by plant polysaccharides[J]. J Cell Mol Immunol(细胞与分子免疫学杂志), 2019, 35: 473-478.

10 Remila MJT, Cong YY, Palida ABLZ, et al. Effect of Polysaccharide from *Glycyrrhiza inflata* on spleen lymphocytes proliferation and induction of cytokine in mice[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2016, 34: 1647-1649.

11 Chen C, Palida ABLZ, Mirenscha YKF, et al. Isolation, purification, structural analysis and immune activity determination of acid polysaccharides from *Glycyrrhiza inflata* Bat[J]. J Food Safe Qual(食品安全质量检测学报), 2017, 8: 4651-4658.

12 Cong YY, Remila MJT, Palida ABLZ, et al. Effects of Polysaccharide from *Glycyrrhiza inflata* on immune function of RAW 264.7 macrophage cell line[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2018, 36: 1043-1047.

13 Luan H, Zhang Q, Wang L, et al. OM85-BV induced the productions of IL-1 β , IL-6, and TNF- α via TLR4- and TLR2-mediated ERK1/2/NF- κ B pathway in RAW 264.7 cells[J]. J Interferon Cytokine Res, 2014, 34: 526-36.

14 Nguyen CT, Kim EH, Luong TT, et al. TLR4 mediates pneumolysin-induced ATF3 expression through the JNK/p38 pathway in streptococcus pneumoniae-infected RAW 264.7 cells[J]. Mol Cells, 2015, 38(1): 58-64.

- 15 Yang RH, Liu BJ. Inhibitory effect of crocetin on the TLR4/NF- κ B pathway in RAW 264.7 macrophage and its mechanism [J]. Shandong Med J(山东医药), 2015, 55(9): 15-17.
- 16 Cai JY, Shao YX, Wang K, et al. Paeoniflorin inhibits activation of RAW 264.7 macrophages induced by high glucose via JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2019, 35(1): 56-62.
- 17 Geng H, Yuan XL. Progress in macrophage research [J]. Inter J Immunol(国际免疫学杂志), 2013, 36: 450-454.
- 18 Yi Y, Cao Y, Zhang MW. Immunostimulating mechanisms of polysaccharides on Macrophages [J]. Chin J Cell Bio(中国细胞生物学学报), 2011, 33: 1267-1277.
- 19 Wei W, Xiao HT, Bao WR, et al. TLR4 may mediate signaling pathways of *Astragalus* polysaccharide RAP-induced cytokine expression of RAW264.7 cell [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 179: 243-252.
- 20 Sun HX, Zhang J, Chen FY, et al. Activation of RAW 264.7 macrophages by the polysaccharide from the roots of *Actinidia eriantha* and its molecular mechanisms [J]. Carbohydr Polym, 2015, 121: 388-402.
- 21 Lu CL, Zhu W, Wang M, et al. Polysaccharides from *Smilax glabra* inhibit the pro-inflammatory mediators via ERK1/2 and JNK pathways in LPS-induced RAW 264.7 cells [J]. Carbohydr Polym, 2015, 122: 428-436.
- 22 Ji CF, Chen JR, Zhang ZY. Research progress of receptors of plant polysaccharides [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2019, 54: 1766-1772.
- 23 Sun Y, Qing DG, Zhang J, et al. The effect of chalcones in *Glycyrrhiza inflata* on colon cancer [J]. J Med Pharm Chin Minorities(中国民族医药杂志), 2029, 26(1): 29-31.
- 24 Li CP, Yong MZ, Zhen YZ, et al. Chemical structure and effects of antioxidation and against α -glucosidase of natural polysaccharide from *Glycyrrhiza inflata Batalin* [J]. Intern J Bio Macromolecu, 2020, 155: 560-571.
- 25 Zhang XJ, Kong XR, Hao YL, et al. Chemical structure and inhibition on α -glucosidase of polysaccharide with alkaline-extracted from *Glycyrrhiza inflata* residue [J]. Intern J Bio Macromolecu, 2020, 147: 1125-1135.
- 26 Jiang ZB, Huang RY, Zhang X, et al. Regulatory effects of polyporus polysaccharide on the expressions of cytokines released from M1 macrophages [J]. J Cell Mol Immunol(细胞与分子免疫学杂志), 2014, 30: 1030-1034.
- 27 Domínguez-Soto A, de las Casas-Engel M, Bragado R, et al. Intravenous immunoglobulin promotes antitumor responses by modulating macrophage polarization [J]. J Immunol, 2014, 193: 5181-5189.

新型化合物 FLZ 通过微生物群-肠-脑轴缓解鱼藤酮诱发的帕金森疾病

帕金森病(PD)是第二常见的神经退行性疾病,但由于对发病机制的了解有限,目前治疗都不能阻止 PD 的发展。在 PD 发展中,受肠道微生物群影响的大脑和胃肠系统之间的信号传导被称为微生物群-肠-脑轴。然而,微生物群失调在 PD 发展中的明确机制尚未得到很好的阐明。FLZ (*N*-[2-(4-羟基苯基)-乙基]-2-(2,5-二甲氧基苯基)-3-(3-甲氧基-4-羟基苯基)-丙烯酰胺)是从中药中提取的一种新型角鲨胺衍生物,已被证明对许多 PD 模型有效,目前正在中国进行治疗 PD 的 I 期临床试验。前期研究显示,肠道微生物群可以调节 FLZ 在体内的吸收。那么,FLZ 是否能够通过影响肠道菌群来抑制 PD 的发展呢?

来自中国医学科学院和北京协和医科大学的张丹及其团队评估了 FLZ 治疗对 PD 的保护作用,并以 FLZ 为工具进一步探索了 PD 对微生物群的相关影响机制。在目前的研究中,该团队通过灌胃小鼠鱼藤酮来诱导并模拟 PD 的病理过程。结果显示,FLZ 治疗可以缓解小鼠胃肠功能紊乱、运动症状和鱼藤酮刺激小鼠的多巴胺能神经元死亡。16S rRNA 测序发现,由鱼藤酮诱导的 PD 相关微生物群的改变被 FLZ 治疗所逆转。值得注意的是,FLZ 减轻了肠道炎症和肠道屏障的破坏,并抑制了系统性炎症。最终,FLZ 治疗恢复了血脑屏障结构,并通过抑制黑质(SN)中星形胶质细胞和小胶质细胞的激活来抑制神经炎症。进一步的机制研究表明,FLZ 治疗抑制了 SN 和结肠中的 TLR4/MyD88/NF- κ B 途径。此外,该研究还证明了微生物群-肠-脑轴在帕金森病发病机制中的重要性,表明其作为帕金森病治疗的一个新的治疗靶点。相关研究发表在《Acta Pharmaceutica Sinica B》杂志上。

胡乃华编译自: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8463270>

原文标题: Novel compound FLZ alleviates rotenone-induced PD mouse model by suppressing TLR4/MyD88/NF- κ B pathway through microbiota-gut-brain axis