

system, DESCURAINIAE SEMEN LEPIDII SEMEN significantly reduced the activity frequency of rats and prolonged sleep time ($P < 0.01$), while EPHEDRAE HERBA increased activity frequency to some extent and shortened sleep time. Regarding the circulatory system, DESCURAINIAE SEMEN LEPIDII SEMEN had a protective effect on heart function, significantly increasing stroke volume, fractional shortening, ejection fraction, and cardiac output ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) and reducing blood pressure in rats with pulmonary edema ($P < 0.01$). EPHEDRAE HERBA significantly increased stroke volume and fractional shortening ($P < 0.01$) and increased renal blood flow ($P < 0.01$). After the administration of the GnRH antagonist Cetrorelix, the improvement effect of EPHEDRAE HERBA disappeared ($P < 0.01$), while the effect of DESCURAINIAE SEMEN LEPIDII SEMEN remained unaffected. **Conclusion:** DESCURAINIAE SEMEN LEPIDII SEMEN improves pulmonary edema through Xieshuizhuyin (泻水逐饮) and Cufeisuijiang (促肺肃降), which reflects its Chenjiang property, and its action is not influenced by GnRH, indicating that the Chenjiang property of DESCURAINIAE SEMEN LEPIDII SEMEN is unrelated to GnRH. EPHEDRAE HERBA can improve cough and asthma symptoms of pulmonary edema, which may be related to Xuanfeipingchuan (宣肺平喘), reflecting its Shengfu property. Its effect is antagonized by GnRH, indicating a relationship between the Shengfu property of EPHEDRAE HERBA and GnRH.

Key words EPHEDRAE HERBA, DESCURAINIAE SEMEN LEPIDII SEMEN Shengfu (升浮) medicine, Chenjiang (沉降) medicine, Shengfuchenjiang (升浮沉降), GnRH, Pulmonary edema

(责任编辑:李兴平;英文摘要编辑:陈茜)

基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路探讨刺芒柄花素对 LPS 诱导的大鼠子宫内膜上皮细胞损伤的影响*

季晓黎, 杨成成, 黄利, 张永青, 宋晓庆
(成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

摘要 目的:探讨刺芒柄花素通过调控 Toll 样受体 4(TLR4)/髓样分化因子 88(MyD88)/核转录因子 κ B(NF- κ B) 信号通路对脂多糖(LPS)诱导的大鼠子宫内膜上皮细胞损伤的影响。方法:以 LPS 诱导大鼠子宫内膜上皮细胞损伤,采用 CCK8 法检测细胞活性;采用 RT-qPCR 法检测 TLR4 过表达效率;流式细胞术检测细胞凋亡;ELISA 法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和 IL-6 含量;Western Blot 法检测 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路相关蛋白的表达。结果:与空白对照组比较,模型对照组细胞抑制率、细胞凋亡率、炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的含量明显增加, p-P65/P65、p-I κ B α /I κ B α 、MyD88 和 TLR4 蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型对照组相比,刺芒柄花素 12 μ mol/L 组细胞抑制率、细胞凋亡率、炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的含量明显降低, p-P65/P65、p-I κ B α /I κ B α 、MyD88 和 TLR4 蛋白表达明显下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);TLR4 过表达对刺芒柄花素作用的影响结果显示,与刺芒柄花素+Ov-NC 组相比,刺芒柄花素+Ov-TLR4 组细胞抑制率、细胞凋亡率、炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量明显增加, p-P65/P65、p-I κ B α /I κ B α 、MyD88 和 TLR4 蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:刺芒柄花素能够抑制 TLR4 的表达,从而抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的激活,以减轻 LPS 诱导的大鼠子宫内膜上皮细胞凋亡及炎症损伤。

关键词 刺芒柄花素;子宫内膜上皮细胞;脂多糖;Toll 样受体 4/髓样分化因子 88/核转录因子 κ B 信号通路

盆腔炎性疾病(Pelvic Inflammatory Disease, PID)是包括输卵管炎、盆腔腹膜炎、子宫内膜炎、等女性生殖器官常见疾病^[1]。由于流产、感染及刮宫等诱因导致患者出现白带增多、盆腔疼痛及月经失调等症状,给患者的生活及健康带来威胁^[2]。临床上主要采用抗生素进行治疗,但是由于 PID 病程长且易复发的特点,易导致机体耐药性的产生,给 PID 的治疗带来困难^[3]。近年来中成药因其副作用小、疗效好等特点,在 PID 的治疗中得到广泛应用。刺芒柄花素是从红车轴草中提取的一种物质,众多研究表明其具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、等作用,研究证实刺芒柄花素能治疗女性生殖系统疾病,包括促进卵巢

分泌黄体酮,增强黄体酮信号,缓解子宫肌瘤和子宫内膜异位症等疾病的症状^[4-5],鉴于其强大的抗炎作用,那么其对 PID 是否亦有治疗作用呢?子宫内膜炎指子宫内膜发生炎症,是 PID 的常见类型之一,本研究采用子宫内膜上皮细胞建立 PID 模型。而脂多糖(LPS)常用于建立子宫内膜上皮细胞损伤模型,其能够增强大肠杆菌毒力,诱导炎症产生^[6]。本研究通过体外细胞实验,筛选出刺芒柄花素对子宫内膜上皮细胞的最佳浓度,探究刺芒柄花素对 LPS 诱导的大鼠子宫内膜上皮细胞损伤的作用机制,为 PID 的治疗提供理论依据。

* 基金项目:四川省科技计划项目(编号:2022YFS0396);四川省中医药管理局科学技术研究专项项目(编号:2021MS287)。

作者简介:季晓黎,硕士,副主任医师,研究方向:中医药防治妇科炎症、痛症疾病的研究, E-mail: jxl1030@aliyun.com。

1 材料与方法

1.1 试验药物 刺芒柄花素,批号:A0232,质量分数≥98%,购自上海雅吉生物科技有限公司。

1.2 细胞 大鼠子宫内膜上皮细胞(批号:CP-R049),购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3 试剂 TLR4(批号:A5258)、MyD88(批号:A0980)、P65(批号:AP0123)、p-P65(批号:AP0123)、IkBα(批号:AP0707)、p-IkBα(批号:AP0707)等兔克隆抗体,Abclonal公司;脂多糖(批号:SMB00704,美国sigma公司);Molpure® Cell/Tissue Total RNA Kit(批号:19221ES50),翌圣生物科技股份有限公司;ribo-SCRIPT™ mRNA/lncRNA qRT-PCR Starter Kit(批号:C11030-1,锐博生物科技有限公司);TNF-α(批号:ZC-35733)、IL-1β(批号:ZC-32420)、IL-6(批号:ZC-32446)ELISA试剂盒,上海茁彩生物科技有限公司;CCK8试剂盒(批号:Ab228554,Abcam公司)。

1.4 仪器 荧光定量PCR仪(型号:QuantStudio™3,美国ThermoFisher仪器有限公司);酶标仪(型号:SpectraMAX Plus384,美谷分子仪器有限公司);蛋白电泳仪(型号:JY-SCZ4+,北京君意东方电泳设备有限公司);流式分析仪(型号:Cytoflex,美国Beckman公司)。

1.5 方法

1.5.1 细胞分组及给药 将大鼠子宫内膜上皮细胞复苏后,放入CO₂培养箱,待其至生长对数期后用于后续试验。将0、3、6、12、24 μmol/L的刺芒柄花素分别加入CP-R049中孵育12 h后收集细胞,用CCK-8法筛选出12 μmol/L为最大无毒浓度用于后续试验研究。分为空白对照组、模型对照组、刺芒柄花素12 μmol/L组,根据文献报道^[7],选择5 μg/mL浓度的LPS建立子宫内膜上皮细胞损伤模型,模型对照组加入5 μg/mL的LPS,孵育12 h;刺芒柄花素组在加入5 μg/mL的LPS孵育12 h后,弃掉上清,加入12 μmol/L的刺芒柄花素,孵育24 h。为了证明TLR4过表达对刺芒柄花素作用的影响,将实验分为空白对照组、模型对照组、刺芒柄花素组、刺芒柄花素+Ov-NC组和刺芒柄花素+Ov-TLR4组共5组,模型对照组、刺芒柄花素组处理同上,刺芒柄花素+Ov-NC组、模型+刺芒柄花素+Ov-TLR4组在LPS建模和刺芒柄花素给药后,分别将慢病毒及慢病毒包装的过表达载体转染进细胞。

1.5.2 细胞活性测定 用CCK-8法检测细胞活性,在96孔板中加入100 μL细胞悬液,贴壁后弃上清,各组加入100 μL的试剂,孵育2 h;加入10 μL的CCK-8混匀并孵育2 h;用酶标仪测定450 nm波长下的吸光度,计算细胞的增殖抑制率。增殖抑制率(%)=(1-实验组吸光度/对照组吸光度)×100%。

1.5.3 实时荧光定量-PCR鉴定TLR4转染效率 收集Ov-NC组和Ov-TLR4组的细胞,提取样本RNA,用反转录试剂盒将RNA逆转录成cDNA;反应条件:95℃预变性10 min,95℃变性15 s,57℃退火20 s,72℃延伸1 min,共40个循环。以Bactin为内参基因,采用2^{-ΔΔCt}分析结果。引物信息见表1^[8]。

表1 荧光定量PCR引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
Tlr4	GGTTTACACGTCATCGGTT	99
	GTCACATCACATAGTCCTCCCA	
Bactin	CTGAGAGGGAATCGTGCCT	208
	CCACAGGATTCATACCCAAGA	

1.5.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集待检细胞,加入PBS重悬后进行细胞计数;取5万重悬细胞,离心后弃上清,加入195 μL Annexin V-FITC结合液后孵育15 min;加入5 μL碘化丙啶染色液后孵育5 min;用流式细胞仪检测。

1.5.5 ELISA法检测TNF-α、IL-1β和IL-6含量 收集每组培养的细胞,按照ELISA试剂盒的操作方式检测TNF-α、IL-1β和IL-6的含量。

1.5.6 Western Blot法检测相关蛋白表达 收集每组培养的细胞,使用蛋白试剂盒提取总蛋白,用BAC蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,通过SDS-凝胶电泳、转膜、封闭,后加入稀释后的一抗(TLR4:1:1 000、MyD88:1:1 000、P65:1:2 000、p-P65:1:2 000、IkBα:1:2 000、p-IkBα:1:2 000、β-actin:1:10 000),4℃孵育过夜,加入二抗[生物素化山羊抗兔IgG(H+L):1:5 000],室温孵育2 h~3 h,ECL显色试剂盒显色后用凝胶成像仪拍照,分析其灰度值。以β-actin作为内参,计算目的蛋白的相对表达量。目的蛋白相对表达量=目的蛋白积分光密度值(IOD)/内参积分光密度值(IOD)。

1.5.7 统计学方法 试验数据采用SPSS 17.0软件分析,计量资料用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用T检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 表示两组差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 刺芒柄花素对LPS诱导CP-R049细胞损伤的影响

2.1.1 刺芒柄花素对CP-R049细胞损伤模型中细胞抑制率的影响 当刺芒柄花素的浓度为12 μmol/L时是细胞的最大无毒浓度,故本研究选取12 μmol/L浓度的刺芒柄花素用于后续试验研究。LPS刺激细胞后结果显示,与空白对照组相比,模型对照组的细胞抑制率显著升高($P < 0.01$);与模型对照组相比,刺芒柄花素12 μmol/L组的细胞抑制率显著降低($P < 0.01$)。见表2、3。

表2 不同浓度的刺芒柄花素对CP-R049细胞抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

分组	剂量/(μmol/L)	细胞抑制率/(%)
刺芒柄花素	0	0±0
刺芒柄花素	3	0.86±0.05
刺芒柄花素	6	0.32±0.05
刺芒柄花素	12	1.24±0.01
刺芒柄花素	24	13.32±0.04**

与0 μmol/L刺芒柄花素组相比** $P < 0.01$ 。

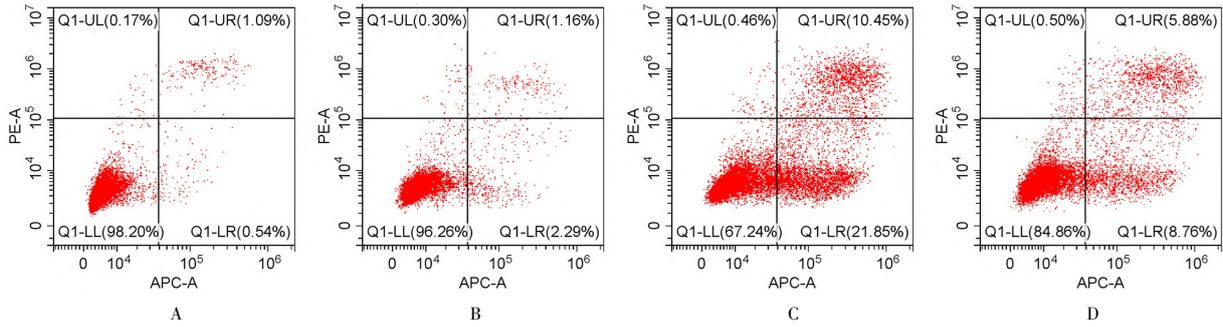
表3 刺芒柄花素对LPS诱导CP-R049细胞损伤模型细胞抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

分组	剂量/(μmol/L)	细胞抑制率/(%)
空白对照	0	0±0**
空白+刺芒柄花素	12	2.80±0.03**
模型对照	0	36.97±0.01
刺芒柄花素	12	15.86±0.02**

与模型对照组比较** $P < 0.01$ (下同)。

2.1.2 刺芒柄花素对CP-R049细胞损伤模型细胞凋亡的影响

子宫内膜上皮细胞凋亡是子宫内膜炎的特征之一,故本研究采用流式细胞术检测细胞凋亡情况。与空白对照组比较,模型对照组子宫内膜上皮细胞的细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$);与模型对照组比较,刺芒柄花素12 μmol/L组细胞凋亡率显著降低($P < 0.01$)。见图1、表4。



A: 空白对照; B: 空白+刺芒柄花素 12 μmol/L; C: 模型对照; D: 刺芒柄花素 12 μmol/L (下同)。

图1 刺芒柄花素对 CP-R049 细胞损伤模型细胞凋亡的影响

表4 刺芒柄花素对 LPS 诱导 CP-R049 细胞损伤模型细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	剂量/(μmol/L)	细胞凋亡率/(%)
空白对照	0	2.0±0.3**
空白+刺芒柄花素	12	3.3±0.4**
模型对照	0	30.9±1.4
刺芒柄花素	12	15.6±0.8**

2.1.3 刺芒柄花素对 CP-R049 细胞损伤模型中炎症因子含量的影响 与空白对照组比较,模型对照组细胞中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 含量显著增加($P<0.01$);与模型对照组比较,刺芒柄花素组细胞中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的含量显著降低($P<0.01$)。见表5。

表5 刺芒柄花素对 CP-R049 细胞损伤模型中炎症因子含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3, \text{pg/mL}$)

分组	药物剂量/(μmol/L)	IL-6	IL-1β	TNF-α
空白对照	0	24.0±1.1**	6.95±0.08**	60.9±2.3**
空白+刺芒柄花素	12	22.1±1.1**	6.53±0.60**	59.6±1.7**
模型对照	0	34.8±1.2	9.17±0.17	87.4±1.8
刺芒柄花素	12	27.5±1.0**	7.54±0.05**	71.9±2.6**

2.1.4 刺芒柄花素对 CP-R049 细胞损伤模型中 TLR4/MyD88/NF-κB 通路相关蛋白表达的影响 与空白对照组比较,模型对照组子宫内膜上皮细胞中 p-P65/P65、p-IκBα/IκBα、MyD88、TLR4 蛋白表达显著上调($P<0.01$);与模型对照组比较,刺芒柄花素 12 μmol/L 组子宫内膜上皮细胞中 p-P65/P65、p-IκBα/IκBα、MyD88 和 TLR4 蛋白表达明显下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见图2、表6。

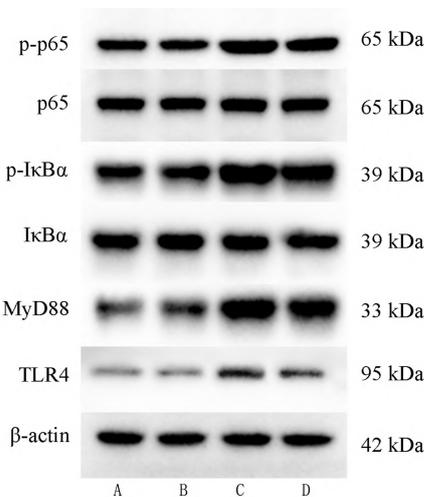


图2 刺芒柄花素对 CP-R049 细胞损伤模型中 TLR4/MyD88/NF-κB 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表6 刺芒柄花素对 CP-R049 细胞损伤模型中 p-P65/P65、p-IκBα/IκBα、MyD88 和 TLR4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	药物剂量/(μmol/L)	p-P65/P65	p-IκBα/IκBα	MyD88/β-actin	TLR4/β-actin
空白对照	0	1.00±0.12**	1.01±0.16**	1.0±0.4**	1.00±0.22**
空白+刺芒柄花素	12	0.97±0.07**	1.05±0.14**	1.2±0.6**	0.99±0.17**
模型对照	0	2.03±0.15	1.87±0.23	4.0±1.3	2.39±0.35
刺芒柄花素	12	1.55±0.12**	1.45±0.03**	2.1±0.4*	1.69±0.22*

与模型对照组相比 * $P<0.05$ (下同)。

2.2 TLR4 过表达对刺芒柄花素作用 CP-R049 细胞损伤模型的影响

2.2.1 荧光定量 PCR 检测 *Tlr4* 过表达效率 与 Ov-NC 组比较,Ov-TLR4 组的 *Tlr4* 的 mRNA 表达显著上调($P<0.01$)。见表7。

表7 荧光定量 PCR 检测 *Tlr4* 的 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	<i>Tlr4</i> /2 ^{-ΔΔCt}
Ov-NC	1.00±0.02
Ov-TLR4	72.83±14.80**

与 Ov-NC 组比较 ** $P<0.01$ 。

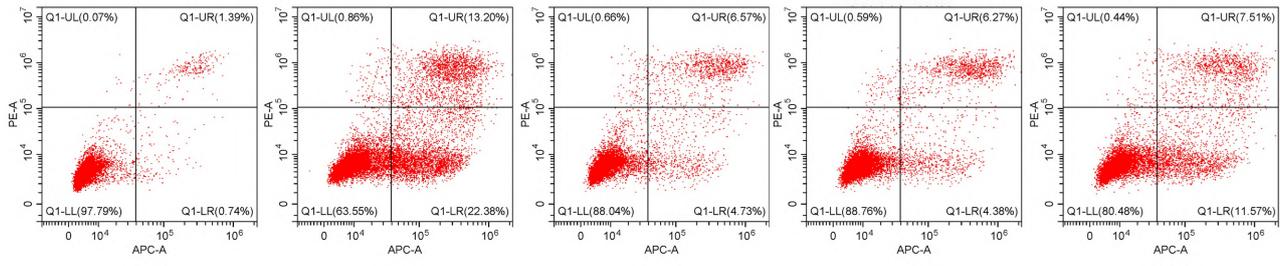
2.2.2 TLR4 过表达对刺芒柄花素作用细胞损伤模型中细胞抑制率的影响 与空白对照组比较,模型对照组细胞抑制率显著增加($P<0.01$);与模型对照组比较,刺芒柄花素 12 μmol/L 组细胞抑制率显著降低($P<0.01$);与刺芒柄花素 12 μmol/L +ov-NC 组比较,刺芒柄花素 12 μmol/L +Ov-TLR4 组细胞抑制率显著增加($P<0.01$)。见表8。

表8 TLR4 过表达对刺芒柄花素作用 CP-R049 细胞损伤模型中细胞抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

分组	剂量/(μmol/L)	细胞抑制率/(%)
空白对照	0	0±0**
模型对照	0	38.58±0.02
刺芒柄花素	12	14.41±0.02**
刺芒柄花素+ov-NC	12 +ov-NC	15.36±0.04**
刺芒柄花素+ov-TLR4	12 +ov-TLR4	23.07±0.03 ^{△△}

与刺芒柄花素+ov-NC 组比较^{△△} $P<0.01$ (下同)。

2.2.3 TLR4 过表达对刺芒柄花素作用 CP-R049 细胞损伤模型中细胞凋亡的影响 与空白对照组比较,模型对照组的细胞凋亡率显著增加($P<0.01$);与模型对照组比较,刺芒柄花素 12 μmol/L 组细胞凋亡率显著降低($P<0.01$);与刺芒柄花素 12 μmol/L+ov-NC 组比较,刺芒柄花素 12 μmol/L +Ov-TLR4 组细胞凋亡率显著增加($P<0.01$)。见图3、表9。



A: 空白对照; B: 模型对照; C: 刺芒柄花素 12 μmol/L; D: 刺芒柄花素 12 μmol/L + ov-NC; E: 刺芒柄花素 12 μmol/L + ov-TLR4 (下同)。

图3 TLR4 过表达对刺芒柄花素作用 CP-R049 细胞损伤模型中细胞凋亡的影响

表9 TLR4 过表达对刺芒柄花素作用 CP-R049 细胞损伤模型中细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	剂量/(μmol/L)	细胞凋亡率/(%)
空白对照	0	2.5 ± 0.6 **
模型对照	0	34.3 ± 1.4
刺芒柄花素	12	12.0 ± 2.4 **
刺芒柄花素 + ov-NC	12 + ov-NC	11.2 ± 0.9 **
刺芒柄花素 + ov-TLR4	12 + ov-TLR4	18.7 ± 0.6 *△△

2.2.4 TLR4 过表达对刺芒柄花素作用 CP-R049 细胞损伤模型中炎症因子含量的影响 与空白对照组比较,模型对照组细胞中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 含量显著增加 ($P < 0.01$);与模型对照组相比,刺芒柄花素 12 μmol/L 组细胞中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 含量显著降低 ($P < 0.01$);与刺芒柄花素 + ov-NC 组相比,刺芒柄花素 + Ov-TLR4 组细胞中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 含量明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 10。

表10 TLR4 过表达对刺芒柄花素作用 CP-R049 细胞损伤模型中炎症因子含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3, \text{pg/mL}$)

分组	剂量/(μmol/L)	IL-6	IL-1β	TNF-α
空白对照	0	23.9 ± 0.8 **	7.04 ± 0.10 **	61.5 ± 0.4 **
模型对照	0	35.0 ± 0.9	9.01 ± 0.18	89.8 ± 2.2
刺芒柄花素	12	26.8 ± 0.7 **	7.24 ± 0.09 **	69.3 ± 2.6 **
刺芒柄花素 + ov-NC	12 + ov-NC	27.8 ± 0.8 **	7.35 ± 0.07 **	69.9 ± 2.8 **
刺芒柄花素 + ov-TLR4	12 + ov-TLR4	30.7 ± 1.4 *△△	8.36 ± 0.12 *△△	75.3 ± 2.6 *△

2.2.5 TLR4 过表达对刺芒柄花素作用 CP-R049 细胞损伤模型中 TLR4/MyD88/NF-κB 通路相关蛋白表达的影响 与空白对照组比较,模型对照组子宫内膜上皮细胞 p-P65/P65、p-IκBα/IκBα、MyD88 和 TLR4 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$);与模型对照组比较,刺芒柄花素 12 μmol/L 组细胞中 p-P65/P65、p-IκBα/IκBα、MyD88 和 TLR4 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$);与刺芒柄花素 12 μmol/L + ov-NC 组比较,刺芒柄花素 12 μmol/L + Ov-TLR4 组细胞中 p-P65/P65、p-IκBα/IκBα、MyD88 和 TLR4 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$)。见图 4、表 11。

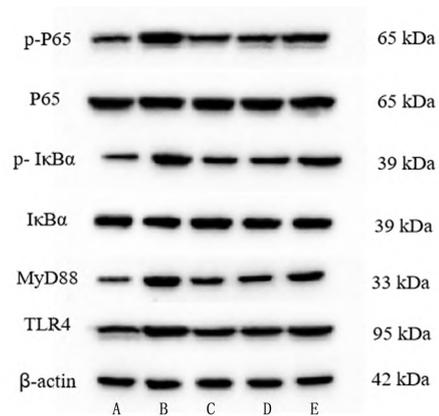


图4 TLR4 过表达对刺芒柄花素作用 CP-R049 细胞损伤模型中 TLR4/MyD88/NF-κB 通路相关蛋白表达的影响

表11 TLR4 过表达对刺芒柄花素作用 CP-R049 细胞损伤模型中 p-P65/P65、p-IκBα/IκBα、MyD88 和 TLR4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	药物剂量/(μmol/L)	p-P65/P65	p-IκBα/IκBα	MyD88/β-actin	TLR4/β-actin
空白对照	0	1.00 ± 0.06 **	1.00 ± 0.12 **	1.00 ± 0.14 **	1.000 ± 0.083 **
模型对照	0	3.47 ± 0.21	3.68 ± 0.11	5.48 ± 0.12	2.124 ± 0.048
刺芒柄花素	12	1.54 ± 0.06 **	1.68 ± 0.10 **	3.09 ± 0.24 **	1.316 ± 0.023 **
刺芒柄花素 + ov-NC	12 + ov-NC	1.49 ± 0.06 **	1.72 ± 0.18 **	3.169 ± 0.19 **	1.359 ± 0.037 **
刺芒柄花素 + ov-TLR4	12 + ov-TLR4	2.52 ± 0.16 *△△	2.98 ± 0.11 *△△	4.27 ± 0.23 *△△	1.721 ± 0.021 △△

3 讨论

盆腔炎是由细菌感染引起妇女生殖器官炎症的一种常见疾病,常见致病菌有大肠杆菌、葡萄球菌等,故常用抗生素对其进行治疗,但在用药过程中,因为抗生素使用不当,对药物产生耐药性,导致治疗效果不佳,给疾病的治疗带来困难^[2,9]。研究表明,近年来中药治疗盆腔炎已取得较好的进展,能够有效控制盆腔炎的发生发展且不良作用较少,刺芒柄花素作为盆炎康复汤的有效成分,在抑制细胞凋亡、抗肿瘤及炎症反应等方面有一定作用^[10-11]。当机体遇到刺激时,适度的炎症反应利于机体抵抗感染,但过度的炎症会导致损伤。研究表明,LPS 能与受体结合,刺激炎性细胞因子如 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 的分泌,导致机体炎症的产生^[12]。本研究结果显示,与模型对照组相比,刺芒柄花素组子宫内膜上皮细胞中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 等炎症因子的含量显著降低。表明刺芒柄花素能够有效抑制 LPS 诱导大鼠子宫内膜上皮细胞的炎症反应。

TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路被认为是调控疾病发展的重要通路。其中 TLR4 作为第一个被人类发现的 Toll 家族的成员,能够诱导机体发生免疫反应来抵御病原菌的侵入^[13]。MyD88 作为 TLRs 的接头蛋白,可通过 IL-1 受体相关激酶激活 NF- κ B 通路^[14]。NF- κ B 在未激活时以 P65 的形式与 I κ B 结合,当 NF- κ B 通路受外界刺激激活时,使 P65 与 I κ B 分离并发生磷酸化反应,能够调节机体炎症反应^[15]。TLR4 可经 LPS 活化后激活 MyD88,并通过 IL-1RI 激酶最终激活 NF- κ B 信号通路^[16]。许多研究表明,TLR4 过表达会导致机体炎症发展,导致疾病加重。Shaukat 等^[17]通过 LPS 诱导的小鼠模型中发现,抑制 TLR4 表达对子宫内膜炎具有治疗效果。本研究结果显示,与模型对照组相比,刺芒柄花素组的细胞抑制率和细胞凋亡率降低,p-P65/P65、p-I κ B α /I κ B α 、MyD88 和 TLR4 蛋白表达量下调,表明刺芒柄花素能够抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路而减轻 LPS 造成的子宫内膜上皮细胞损伤。而与刺芒柄花素+ov-NC 组相比,刺芒柄花素+ov-TLR4 组的细胞抑制率、细胞凋亡率及炎症因子表达增加,p-P65/P65、p-I κ B α /I κ B α 、MyD88 和 TLR4 蛋白表达上调,表明刺芒柄花素通过抑制 TLR4 通路的表达,抑制炎症反应。

4 结论

综上所述,刺芒柄花素可能通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路的激活,降低子宫内膜上皮细胞 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量,从而减轻大鼠子宫内膜上皮细胞损伤和炎症反应。本试验为刺芒柄花素在临床上治疗盆腔炎症性疾病提供实验依据。但本研究从 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路探究刺芒柄花素对大鼠子宫内膜上皮细胞损伤的作用机制,未能进行体内试验进行验证,后续试验将进一步进行探究。

参考文献

- [1] Taira T, Broussard N, Bugg C. Pelvic inflammatory disease: diagnosis and treatment in the emergency department [J]. *Emerg Med Pract*, 2022, 24(12):1-24.
- [2] Siegenthaler F, Krause E, Mueller M D. Management of pelvic inflammatory disease [J]. *Ther Umsch*, 2020, 77(4):164-170.
- [3] 王磊, 刘娅, 杨静, 等. 甲连盆腔胶囊对盆腔炎症后遗症大鼠子宫病

理形态及 TLR2、TLR4-NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(2):138-144.

- [4] Lee J H, Dean M, Austin J R, et al. Irlone from red clover (trifolium pratense) potentiates progesterone signaling [J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(9):1962-1967.
- [5] Halabalaki M, Alexi X, Aligiannis N, et al. Estrogenic activity of isoflavonoids from onobrychis ebenoides [J]. *Planta Med*, 2006, 72(6):488-493.
- [6] JIANG K, YANG J, XUE G, et al. Fisetin ameliorates the inflammation and oxidative stress in lipopolysaccharide-induced endometritis [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14:2963-2978.
- [7] 邢晓娟. 丹参水提物对 LPS 诱导子宫内膜上皮细胞炎症的抗炎机制研究 [D]. 中国农业科学院, 2015.
- [8] 易丽贞, 刘欣, 吴雪芬, 等. 妇科千金片对盆腔炎大鼠 TLR4、PI3K、AKT 表达的影响 [J]. *中国处方药*, 2021, 19(1):31-34.
- [9] Mitchell C, Prabhu M. Pelvic inflammatory disease: current concepts in pathogenesis, diagnosis and treatment [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2013, 27(4):793-809.
- [10] Lima C R, de Souza S J, Belo N R, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 173:127-133.
- [11] JIA C, HU F, LU D, et al. Formononetin inhibits IL-1 β -induced inflammation in human chondrocytes and slows the progression of osteoarthritis in rat model via the regulation of PTEN/AKT/NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113(Pt A):109309.
- [12] CAO S Y, WANG W, NAN F F, et al. Asiatic acid inhibits LPS-induced inflammatory response in endometrial epithelial cells [J]. *Microb Pathog*, 2018, 116:195-199.
- [13] Romagne F. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors [J]. *Drug Discov Today*, 2007, 12(1-2):80-87.
- [14] LIU M, WU Q, WANG M, et al. Lactobacillus rhamnosus GR-1 limits escherichia coli-induced inflammatory responses via attenuating MyD88-Dependent and MyD88-Independent pathway activation in bovine endometrial epithelial cells [J]. *Inflammation*, 2016, 39(4):1483-1494.
- [15] HU N, WANG C, DAI X, et al. Phillygenin inhibits LPS-induced activation and inflammation of LX2 cells by TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 248:112361.
- [16] ZHANG H, WU Z M, YANG Y P, et al. Catalpol ameliorates LPS-induced endometritis by inhibiting inflammation and TLR4/NF- κ B signaling [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2019, 20(10):816-827.

Formononetin Ameliorates LPS-Induced Endometrial Epithelial Cell Injury in Rats via TLR4/MyD88/NF- κ B Signaling Pathway*

Ji Xiaoli, YANG Chengcheng, HUANG Li, ZHANG Yongqing, SONG Xiaoqing
(Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072)

Objective: To investigate the effect of formononetin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endometrial epithelial cell injury in rats by regulating the Toll-like receptor 4 (TLR4)/myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway. **Methods:** LPS was used to establish the rat model of endometrial epithelial cell injury. The Cell Counting Kit-8 (CCK8) assay was employed to examine the cell viability. TLR4 overexpression efficiency was detected by real-time PCR (RT-qPCR). Cell apoptosis was detected by flow cytometry. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to determine the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , and IL-6. Western blotting was employed to determine the expression of TLR4/MyD88/NF- κ B pathway-related proteins. **Results:** Compared with the normal control group, the model control group showed increased cell inhibition rate and apoptosis rate, elevated levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6, and up-regulated protein levels of p-p65/p65, p-I κ B α /I κ B α , MyD88, and TLR4 ($P <$

0.05 or $P < 0.01$). Compared with the model control group, formononetin (12 $\mu\text{mol/L}$) decreased the cell inhibition rate and apoptosis rate, lowered the levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6, and down-regulated the protein levels of p-p65/p65, p-I κ B α /I κ B α , MyD88, and TLR4 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model+formononetin+Ov-NC group, the model+formononetin+Ov-TLR4 group demonstrated increased cell inhibition rate and apoptosis rate, risen levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6, and up-regulated protein levels of p-p65/p65, p-I κ B α /I κ B α , MyD88, and TLR4 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Formononetin can down-regulate the expression of TLR4 to inhibit the activation of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway, thereby reducing LPS-induced apoptosis and ameliorating inflammatory injury of endometrial epithelial cells in rats.

Key words Formononetin, Rat endometrial epithelial cells, Lipopolysaccharide, TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway

(责任编辑:李兴平;英文摘要编辑:田媛)

秦巴硒菇提取物联合多柔比星抗白血病 K562/ADR 细胞多药耐药的机制研究*

王东萍¹,葛万文²,董莉³,孙延庆^{1**}

(¹甘肃中医药大学中西医结合学院,甘肃省人民医院,兰州 730000;²兰州大学第二医院
萃英生物医学研究中心,兰州 730030;³甘肃省人民医院,兰州 730000)

摘要 目的:探讨秦巴硒菇提取物 FA-2-b- β 联合多柔比星(Adriamycin,ADR)抗白血病 K562/ADR 细胞多药耐药的协同抗肿瘤机制。方法:通过转录组测序分析筛选白血病敏感细胞 K562 和耐药细胞 K562/ADR 中的差异表达基因,分析可能的信号通路;CCK-8 法检测 K562/ADR 细胞的耐药表型及 FA-2-b- β 对多柔比星的增敏作用;流式细胞术检测不同药物干预后各组细胞的凋亡比例、细胞内多柔比星的荧光强度变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测耐药蛋白、凋亡相关蛋白以及 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白的表达。结果:与敏感细胞 K562 相比,K562/ADR 细胞的耐药性明显增加,耐药倍数为 26.88 倍。试验结果表明,与空白对照组相比,FA-2-b- β 协同多柔比星对 K562/ADR 细胞的增殖有明显抑制作用,可显著诱导 K562/ADR 细胞凋亡,并提高细胞内多柔比星的荧光强度;上调促凋亡蛋白 BAD 的表达,明显下调耐药蛋白 P-gp、抗凋亡蛋白 BCL-XL 以及 p-PI3K、p-AKT 和 p-mTOR 蛋白的表达($P < 0.05$)。结论:秦巴硒菇提取物 FA-2-b- β 联合多柔比星有协同抗肿瘤作用,可能是通过促进 K562/ADR 细胞凋亡、减少细胞内化疗药物外排并抑制耐药蛋白而发挥作用,其作用机制可能与调控 PI3K/AKT/mTOR 通路有关。

关键词 秦巴硒菇提取物;多柔比星;白血病;耐药;磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶/雷帕霉素

慢性粒细胞白血病(Chronic myeloid leukemia,CML)是一种以造血干细胞恶性克隆性增殖为特征的骨髓增殖性疾病,9 号和 22 号染色体长臂之间相互易位形成费城染色体,95% 的 CML 患者存在费城染色体。这种染色体导致 BCR/ABL 融合基因的出现,该基因产物具有酪氨酸激酶活性。CML 的发病率为每年 1-2 万/10 万,占成年人白血病的 15%。患者的平均年龄为 45 岁~55 岁,男女比例是 3:2^[1]。酪氨酸激酶抑制剂(Tyrosine kinase inhibitors,TKIs)靶向疗法显著提高了患者的生存率^[2],但 TKIs 并不能治愈所有的 CML 患者,在治疗过程中有 20%~30% 的患者出现耐药,耐药的出现导致治疗失败和疾病复发^[3]。有研究表明,化疗耐药涉及药物转运泵的表达和凋亡通路的改变等多种机制^[4]。有文献报道,ATP 结合盒家族蛋白(ATP-binding cassette,ABC)过表达导致肿瘤细胞内药物外排增加,细胞内药物浓度降低,如 P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp),其是由多药耐药基因编码的 170 kDa 的一种 ATP 依赖性的具有药物泵出功能的有机阳离子泵,在多药耐药白血病细胞中高水平表

达,P-gp 过度表达是多药耐药的主要原因,其表达水平与白血病的治疗呈负相关^[5]。

随着提取纯化技术的发展,对肿瘤细胞具有抑制作用的天然化合物受到广泛关注,被认为是很有前途的抗癌药物^[6]。秦巴硒菇又称姬松茸,是一种已人工栽培的食药兼用的珍贵食用菌。其含有麦角甾醇、硒多糖^[7]等多种活性成分,具有抗氧化,抗炎,抗菌,免疫调节,抑制肿瘤细胞生长和抗糖尿病等多种作用^[8]。FA-2-b- β 是从秦巴硒菇中提取出的酸性 RNA 蛋白质复合物,本课题组前期研究显示,FA-2-b- β 可以抑制白血病 K562 及 CML 原代细胞的增殖并诱导细胞凋亡,具有较强的体外抗白血病作用^[9]。FA-2-b- β 联合 3'-叠氮-3'-脱氧胸腺核苷可有效发挥对胃癌 MKN45 细胞的协同抗肿瘤作用^[10]。前期的研究结果为本研究进一步探索 FA-2-b- β 对多药耐药白血病细胞 K562/ADR 的协同抗肿瘤机制奠定了一定的理论基础。基于此本研究将 FA-2-b- β 与抗 CML 药物多柔比星联合用药,探讨 FA-2-b- β 能否协同增强多柔比星对 K562/ADR 细胞的抑制作用,并探

* 基金项目:国家自然科学基金(编号:81560670);甘肃省自然科学基金(编号:20JR10RA376,21JR11RA196);兰州市科技发展指导性计划项目(编号:2020-ZD-56);兰州大学第二医院“萃英科技创新”计划项目(编号:CY-2019-QN15);甘肃省高等学校创新基金项目(编号:2020B-040)。

** 通信作者:孙延庆,主任医师,教授,研究方向:中西医结合血液病研究,E-mail:40yanqingfang@gszy.edu.cn; 作者简介:王东萍,主治医师,研究方向:中西医结合血液病研究,E-mail:wangdp0831@gszy.edu.cn。