DOI:10.16016/j.1000-5404.202012225

青蒿琥酯对结合型胆汁酸诱导小鼠原代肝细胞 IL-6 产生的机制研究

廖 敏,李 璇,张樑君,师 盼,柴 进 400038 重庆 陆军军医大学第一附属医院消化内科胆汁淤积性肝病中心

[**摘要**] **目的** 探讨青蒿琥酯(Artesunate, AS)对结合型胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 表达水平的影响及机制。**方法** 体外培养小鼠原代肝细胞,并用 25 μmol/L 的结合型胆汁酸处理,CCK-8 法检测青蒿琥酯对小鼠原代肝细胞的毒性影响, RT-PCR 法检测细胞因子 IL-6 的 mRNA 表达水平,蛋白印迹法检测肝细胞 IL-6,p65, p-p65 的水平。**结果** 25 μmol/L 结合型胆汁酸处理小鼠原代肝细胞能够诱导小鼠原代肝细胞 IL-6 的 mRNA 和蛋白质表达;青蒿琥酯减轻了 TCA 诱导的 p65 磷酸化和 IL-6 的蛋白水平;进一步研究发现青蒿琥酯是通过抑制 p-p65(phosphorylated-p65)信号通路减轻小鼠原代肝细胞 IL-6 的表达。**结论** 青蒿琥酯通过抑制 p-p65 信号通路减轻结合型胆汁酸诱导的原代小鼠肝细胞 IL-6 的产生。

[**关键词**] 青蒿琥酯;结合型胆汁酸;胆汁淤积;小鼠原代肝细胞;IL-6
[**中图法分类号**] R654.3;R654.4;R931.6 [**文献标志码**] A

Artesunate reduces IL-6 production in primary mouse hepatocytes induced by conjugated bile acids through inhibiting p-p65 signaling pathway

LIAO Min, LI Xuan, ZHANG Liangjun, SHI Pan, CHAI Jin Center for Cholestatic Liver Diseases, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect and underlying mechanism of artesunate (AS) on the expression of interleukin-6 (IL-6) in mouse primary hepatocytes induced by conjugate bile acids. **Methods** Mouse hepatocytes were isolated and primarily cultured, and then treated with 25 μmol/L conjugated bile acids. CCK-8 assay was used to determine the toxic effects of AS on the liver cells. The mRNA level of IL-6 in the cells was measured by RT-qPCR, and the protein levels of IL-6, p-65 and phosphorylated-p65 (p-p65) were determined by Western blotting. **Results** Conjugated bile acids of 25 μmol/L significantly promoted the expression of IL-6 at mRNA and protein levels in mouse primary hepatocytes, while, AS reduced the taurocholic acid (TCA)-induced phosphorylation of p65 and IL-6 level. Further studies revealed that AS suppressed the IL-6 expression through inhibiting p-p65 signaling pathway in mouse primary hepatocytes. **Conclusion** AS reduces IL-6 expression in mouse primary hepatocytes induced by conjugate bile acids *via* inhibiting the p-p65 signaling pathway.

[**Key words**] artesunate; conjugated bile acids; cholestasis; primary mouse hepatocytes; IL-6

Supported by the National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (81922012). Corresponding author: CHAI Jin, E-mail:jin.chai@cldcsw.org

[**基金项目**] 国家自然科学基金优秀青年科学基金项目(81922012)
[**通信作者**] 柴 进,E-mail:jin.chai@cldcsw.org

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

青蒿琥酯(Artesunate,AS)为青蒿素的一种衍生物,是从菊科植物黄花蒿叶中提取分离到的一种具有过氧桥的倍半萜内酯类化合物,主要用于间日疟和轻至重度疟疾的治疗,具有高效、见效快、低毒、不易产生耐药性等突出优势[1-2]。新近的研究显示,青蒿琥酯在肺、肝、肾中都具有抗纤维化和抗炎的作用[3-8],此外还具有抗病毒、抗肿瘤及免疫抑制等疗效[1]。

胆汁酸是胆固醇在肝脏以 7α-羟化酶(CYP7A1)为关键酶合成的一种物质,是胆汁的主要成分。在生理浓度下具有重要的生理功能,可以促进脂肪代谢,帮助食物消化与吸收。胆汁酸在肝脏合成,在胆囊储存,经胆管排出十二指肠,在肠道微生物的作用下变成次级胆汁酸,在回肠末端通过门静脉返回肝脏,这个过程就是胆汁酸的肠肝循环,任何一个环节出现问题导致胆汁在肝内分泌及排泄障碍都会引起胆汁淤积[9-10]。胆汁酸在肝内淤积时其细胞毒性对肝细胞具有直接损伤作用,激活死亡受体使肝细胞凋亡,长期持续的胆汁酸刺激还会导致肝纤维化、肝硬化,甚至增加肝细胞癌和胆管细胞癌风险[11-12]。此外,胆汁酸还可诱导炎症反应,有研究发现中性粒细胞是胆汁淤积性肝损伤早期肝细胞毒性的主要原因[13-14]。中性粒细胞可以在各种炎性刺激因子的作用下产生 IL-6[15],炎症因子 IL-6 在肝脏生理病理中具有重要作用,不仅参与肝脏的再生,还参与肝脏的代谢功能[16-17],胆汁酸能否诱导肝细胞 IL-6 的产生目前研究尚不清楚。

由于炎症反应在胆汁淤积性肝损伤的早期扮演着重要角色,青蒿琥酯又具有抗炎的功效,我们推测青蒿琥酯能够抑制胆汁酸诱导的 IL-6 产生减轻炎症反应。为了验证该假设,我们在此次实验中运用体外胆汁淤积细胞模型,用 25 μmol/L 牛磺胆酸(TCA)和牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA)处理小鼠原代肝细胞,从 mRNA 水平和蛋白表达水平观察胆汁酸是否可以诱导肝细胞产生 IL-6,同时观察青蒿琥酯是通过何种信号通路抑制结合型胆汁酸诱导的 IL-6 产生。

1 材料和方法

1.1 实验动物

动物实验都是在研究方案获得第三军医大学实验动物福利和伦理委员会批准后进行,雄性 12 周龄 C57BL/6J 小鼠,平均体重 25 g,购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 试剂及仪器

DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(trypsin)购自 Gibco 公司;EGTA 购自 Sigma 公司;蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂购自 Roche 公司;BCA 试剂盒购自 Thermo 公司;CCK-8 试剂盒和乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒购购自碧云天;GAPDH 一抗购自 Proteintech 公司;p65,p-p65 和 IL-6 一抗购自 Abcam 公司;兔二抗购自 Sigma 公司;Trizol 购自 Invitrogen 公司;RNA 提取试剂盒购自美国 Promega 公司;逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司;6 孔细胞培养板和 96 孔细胞培养板购自美国 Costar 公司;CO_2 细胞培养箱购自美国 Thermo Scientific 公司;IL-6、GAPDH 探针购自美国 ABI 公司;BAY 11-7082 购自碧云天公司。

1.3 原代细胞分离与培养

小鼠经麻醉后从门静脉插管,剪断下腔静脉,DMEM 培养基驱除肝内血液后用胶原酶Ⅱ消化 10 min,分离得到原代肝细胞悬液。具体按照胆汁淤积肝病中心原代肝细胞分离与培养的标准 protocol 进行。收集得到的肝细胞悬液 4 ℃ 100×*g* 离心 5 min,弃上清,加入 5%FBS William E 培养基均匀铺到 6 孔板内,移至 37 ℃、5% CO_2 培养箱,原代肝细胞贴壁后更换培养基并加入 TCA、TCDCA,使其终浓度为 25 μmol/L,12 h 后收取总 RNA,24 h 后提取总蛋白。相同的原代肝细胞分离与培养,待小鼠原代肝细胞贴壁后更换新的培养基,用青蒿琥酯和 BAY 11-7082 预处理 30 min 后加入 TCA,使其终浓度为 25 μmol/L ,24 h 后提取总蛋白。相同的原代细胞分离与培养,收集得到的原代细胞悬液均匀得铺到 96 孔版中,待原代肝细胞贴壁后更换新的培养基,分别加入不同浓度青蒿琥酯和熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA),使青蒿琥酯终浓度分别为 0.125、0.5、2、8、32 mg/mL,使熊去氧胆酸终浓度分别为 0.125、0.25、0.5、2 μmol/L,24 h 后加入 CCK-8,移至 37 ℃、5% CO_2 培养箱继续培养,40 min 后检测吸光度。

1.4 实时定量荧光 PCR

细胞总 RNA 的提取步骤按照 Trizol 试剂盒说明书,逆转录步骤按照 TaKaRa 逆转录试剂盒说明书,将 RNA 逆转录为 cDNA 后进行 qRT-PCR 扩增,*Taq*Man-qPCR 体系(8 μL):0.2 μL 探针、1.8 μL 5×*Taq* 缓冲液、4 μL ddH_2O、2 μLcDNA 样品。反应条件如下:95 ℃ 1 min; 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s,72 ℃ 10 s, 49 个循环; 95 ℃ 10 s, 4 ℃ 5 min。探针信息:GAPDH ABI Cat# 4351370;IL-6 ABI Cat#433182。

1.5 蛋白免疫印迹反应

把收集到的细胞用预冷的 PBS 洗 3 次,加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液(Sigma 公司)裂解细胞 4 ℃ 1 200 r 离心 10 min,取上清用 BCA 法测定蛋白浓度。配置 5%浓缩胶和 10%分离胶,蛋白质上样量为每孔 40 μg ,浓缩胶 60V 电泳

30 min,然后 100V 恒压至溴酚蓝完全跑出凝胶。100V 转膜 60 min,5%脱脂奶粉 37 ℃摇床封闭 1 h,4 ℃冰箱孵育一抗过夜(IL-6:1∶1 000,p65:1∶2 000,p-p65:1∶1 000,GAPDH:1∶5 000),TBST 洗三次,二抗(山羊抗兔抗 1∶30 000) 37 ℃孵育 90 min,ECL 试剂显影。

1.6 CCK-8 法检测 AS 和 UDCA 对原代小鼠肝细胞的活性影响

把收集到的原代肝细胞悬液均匀得铺到 96 孔版中,待原代细胞贴壁后更换新的培养基,加入不同浓度的青蒿琥酯,使其终浓度分别为 0.125、0.5、2、8、32 mg/mL,24 h 后加入 CCK-8 溶液,每孔 10 μL,然后移至 37 ℃、5% CO_2 培养箱继续培养,40 min 后在 450 nm 测定吸光度。把收集到的原代肝细胞悬液均匀得铺到 96 孔版中,待原代细胞贴壁后更换新的培养基,加入不同浓度的 UDCA,使其终浓度分别为 0.125、0.25、0.5、2 μmol/L,24 h 后加入 CCK-8 溶液,每孔 10 μL,然后移至 37 ℃、5% CO_2 培养箱继续培养,40 min 后在 450 nm 测定吸光度。

1.7 免疫荧光

把收集到的原代肝细胞悬液均匀得铺到 6 孔版中,待原代细胞贴壁后更换新的培养基,加入 TCA、TCDCA,使其终浓度为 25 μmol/L。24 h 后吸出培养基,PBS 浸洗 3 次后加 4%多聚甲醛室温固定 20 min,之后换新的 PBS 浸洗 3 次,然后加入 0.5%Triton X-100 室温通透 20 min,换 PBS 浸洗 3 次,每次 5 min。封闭 2 h,一抗过夜(1∶250),PBS 洗 3 次,二抗,PBS 洗 3 次,DAPI 复染细胞核,PBS 洗 3 次,镜下观察。

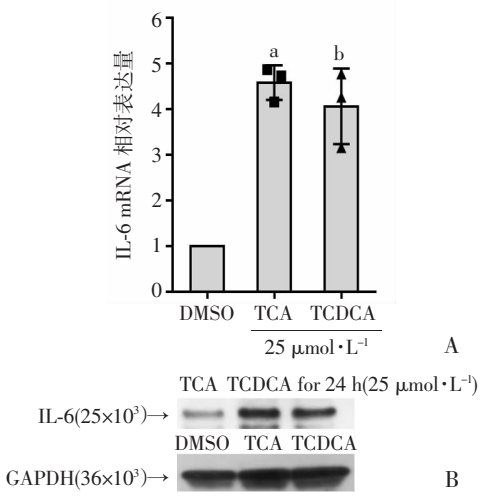
1.8 统计学处理

所有实验均重复 3 次,数据均使用 GraphPad 6 处理分析并作图,应用独立样本的 t 检验进行各组间的比较,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 结合型胆汁酸显著诱导小鼠原代肝细胞 IL-6 的表达

牛磺胆酸(TCA)和牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA)是动物体内胆汁酸的主要成分,胆汁淤积时可以激活炎症反应加重肝损伤。众所周知,IL-6 参与了肝脏急性反应和感染防御[16],目前尚无研究报道 TCA、TCDCA 能诱导肝细胞生成 IL-6。为了验证 TCA、TCDCA 是否可以诱导小鼠原代肝细胞 IL-6 的产生,我们体外建立了胆汁淤积的细胞模型,用 25 μmol/L 的胆汁酸处理小鼠原代肝细胞。研究结果表明,用 TCA 处理小鼠原代肝细胞后,能显著诱导 IL-6 的 mRNA 和蛋白水平(图 1A 和图 1B)。同时,用结合型胆汁酸 TCDCA 处理小鼠原代肝细胞后,也能观察到 IL-6 mRNA 和蛋白水平均显著升高(图 1A 和图 1B)。因此,我们的数据表明,结合型胆汁酸 TCA,TCDCA 可显著诱导小鼠原代肝细胞 IL-6 的表达。



A:结合性胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 mRNA 的表达水平,TCA 组与 DMSO 组比较增高 4.6 倍,a:$P<0.05$;TCDCA 组与 DMSO 组比较增高 4 倍,b:$P<0.05$。
B:合性胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 蛋白质的相对表达量,TCA 组与 DMSO 组比较增高 3.4 倍,a:$P<0.05$;TCDCA 组与 DMSO 组比较增高 3.4 倍,b:$P<0.05$(独立实验开展 3 次,$n=3$)

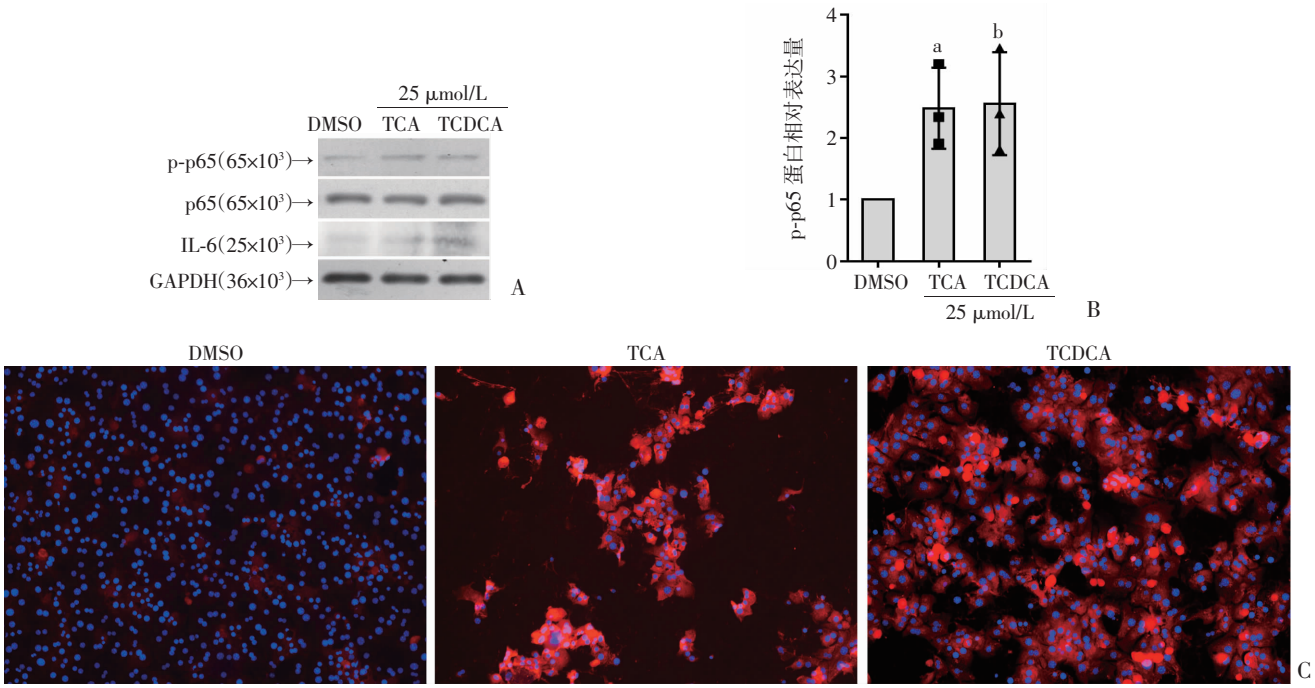
图 1 结合型胆汁酸对原代小鼠肝细胞 IL-6 的影响

2.2 结合型胆汁酸可显著诱导小鼠原代肝细胞 NF-KB 的磷酸化和细胞因子 IL-6 表达

前面的研究表明结合型胆汁酸 TCA、TCDCA 可以诱导小鼠原代肝细胞 IL-6 的表达,但是其机制尚不清楚。众所周知,IL-6 是 NF-κB 的下游基因,有文献报道 NF-κB 信号通路是肝脏损伤和炎症过程中较为重要的激活途径之一[18],P65 和 p-p65 是 NF-κB 家族的重要成员,为了研究结合型胆汁酸诱导小鼠原代肝细胞 IL-6 产生的机制,我们用 25 μmol/L 的 TCA 和 TCDCA 处理小鼠原代肝细胞,24 h 后检测 p65 和 p-p65 的蛋白质的表达含量以及 p-p65 在小鼠原代肝细胞的免疫荧光表达情况,研究结果显示在 TCA、TCDCA 组 IL-6 和 p-p65 的蛋白水平明显升高,用 TCA、TCDCA 处理后小鼠原代肝细胞的细胞核 p-p65 水平也明显增高,至此我们可以确定结合型胆汁酸 TCA、TCDCA 可以诱导小鼠原代肝细胞 IL-6 和 p-p65 的蛋白表达(图 2)。

2.3 青蒿琥酯对原代小鼠肝细胞的毒性研究

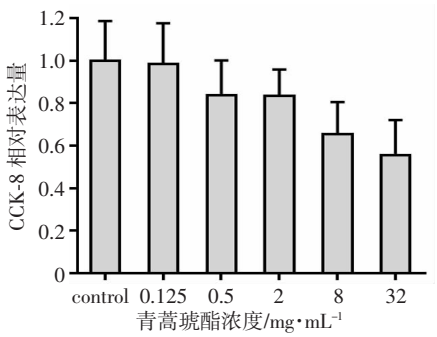
青蒿琥酯在肝肺肾等疾病研究中都表现出具有抗炎的功效[3,5,8],炎症反应是胆汁淤积性肝损伤的重要环节,我们推测青蒿可以减轻胆汁酸诱导的炎症反应。



A:结合性胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6、p65、p-p65 的蛋白表达水平。B:合性胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞 p-p65 的蛋白质的相对表达量,TCA 组与 DMSO 组比较增高 2.5 倍,a:$P<0.05$;TCDCA 组与 DMSO 组比较增高 2.6 倍,b:$P<0.05$(独立实验开展 3 次,$n=3$)。C:结合性胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞 p-p65 的免疫荧光表达情况

图 2 结合型胆汁酸可以诱导 p-p65 和 IL-6 的蛋白质表达

高浓度的青蒿琥酯对肝细胞具有毒性作用,为了找到合适的治疗浓度,我们分别采用了 0.125 mg/mL、0.5 mg/mL、2 mg/mL、8 mg/mL、32 mg/mL 的青蒿琥酯处理小鼠原代肝细胞,24 h 后加入 CCK-8 试剂,研究结果显示青蒿琥酯浓度在 8 mg/mL、32 mg/mL 时具有细胞毒性,在 0.125 mg/mL、0.5 mg/mL、2 mg/mL 时与 control 组比无明显差异(图 3),以上研究表明 0.125 mg/mL、0.5 mg/mL、2 mg/mL 浓度的青蒿琥酯可以用于后续研究。

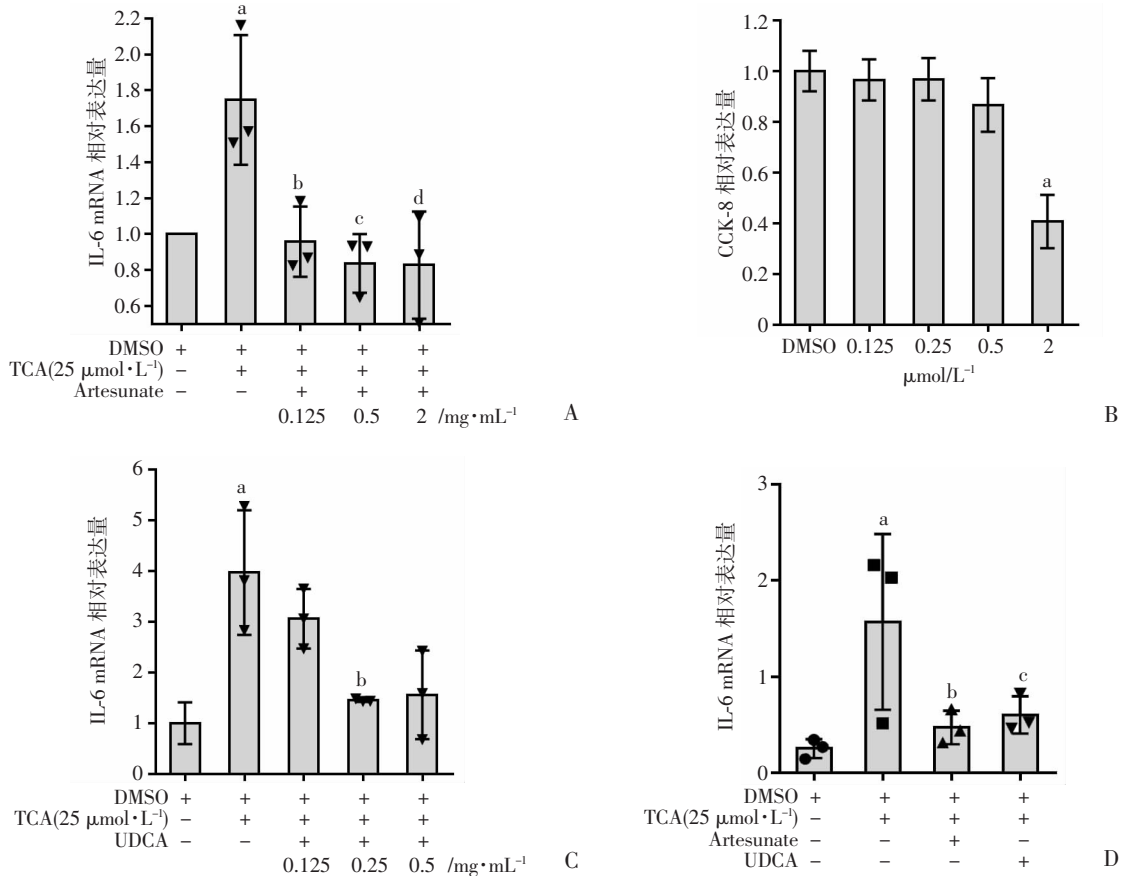


青蒿琥酯 8 mg/mL 组与 control 组比较下降了 0.3 倍,a:$P<0.05$;青蒿琥酯 32 mg/mL 组与 control 组比较下降了 0.4 倍,b:$P<0.05$(独立实验开展 3 次,$n=3$)

图 3 青蒿琥酯对小鼠原代肝细胞的毒性影响

2.4 青蒿琥酯显著抑制了 TCA 诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 mRNA 表达

青蒿琥酯在许多疾病研究中都具有一定的抗炎功效,但目前尚无研究报道青蒿琥酯对胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 的影响,为了验证青蒿琥酯是否可以减轻胆汁酸诱导的肝细胞 IL-6 的产生,我们选择了 0 mg/mL 、0.125 mg/mL、0.5 mg/mL、2 mg/mL 浓度的青蒿琥酯预处理小鼠原代肝细胞,然后加入终浓度为 25 μmol/L 的 TCA,12 h 后检测各组 IL-6 mRNA 水平,研究表明青蒿琥酯能够抑制结合型胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 的 mRNA 水平,并且呈现剂量依赖性(图 4A)。UDCA 是治疗肝内胆汁淤积最成熟的药物[19],我们分别采用了 0.125 μmol/L、0.25 μmol/L、0.5 μmol/L、2 μmol/L 的 UDCA 处理小鼠原代肝细胞,24 h 后加入 CCK-8 试剂,研究结果显示 UDCA 浓度在 2 μmol/L 时具有细胞毒性(图 4B)。我们分别用 2 mg/mL 的青蒿琥酯和 0.5 μmol/L 的 UDCA 处理小鼠原代肝细胞,加入终浓度 25 μmol/L 的 TCA,12 h 后检测各组 IL-6 mRNA 水平,结果显示用青蒿琥酯处理后 TCA 诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 mRNA 水平与 UDCA 组比较下降更为明显(图 4C)。



A:不同浓度的青蒿琥酯(0.125 mg/mL,0.5 mg/mL,2 mg/mL)处理 TCA 诱导的小鼠原代肝细胞的 IL-6 mRNA 水平表达情况,TCA 组 DMSO 组相比较,a:$P<0.05$,青蒿琥酯组与 TCA 组相比较,b,c,d $P<0.05$。图 B:UDCA 对原代小鼠干细胞的毒性研究,UDCAa $P<0.05$。C:不同浓度的 UDCA 对 TCA 诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 的影响,TCA 组 DMSO 组相比较,a:$P<0.05$,UDCA 组与 TCA 组相比较,b:$P<0.05$。D:分别使用青蒿琥酯和 UDCA 处理 TCA 诱导的小鼠原代肝细胞的 IL-6 mRNA 水平表达情况,青蒿琥酯组与 TCA 组比较,b:$P<0.05$;UDCA 组与 TCA 组比较,c:$P<0.05$,TCA 组与 DMSO 组比较,a:$P<0.05$(独立实验开展 3 次,$n=3$)

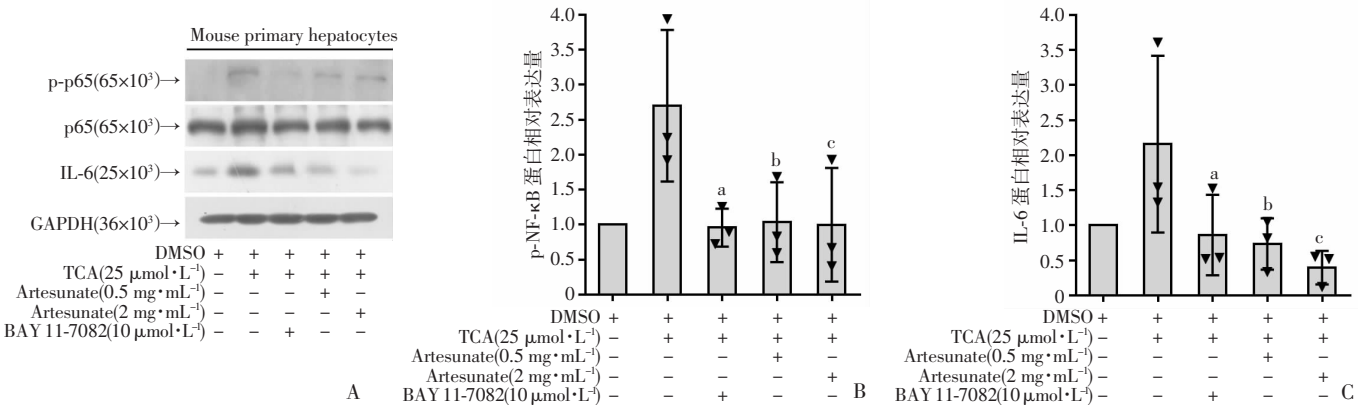
图 4 青蒿琥酯对 TCA 诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 表达的影响

2.5 青蒿琥酯明显抑制结合型胆汁酸 TCA 诱导的小鼠原代肝细胞 p65 的磷酸化和 IL-6 的表达

前面研究已经证实 TCA、TCDCA 可以诱导小鼠原代肝细胞 IL-6 的表达,青蒿琥酯可以抑制 TCA 诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 和 p-p65 的蛋白水平,但是青蒿琥酯抑制 IL-6 的产生其机制是否通过 p-p65 信号通路尚不清楚。为了解决这个问题,我们用 NF-κB 的抑制剂 BAY 11-7082 作为阳性参照,选择 0.5 mg/mL、2 mg/mL 浓度的青蒿琥酯分别预处理小鼠原代肝细胞,然后加入终浓度为 25 μmol/L 的 TCA,24 h 后检测各组 IL-6 和 p-p65 的蛋白表达水平。结果显示使用 BAY 11-7082 后的小鼠原代肝细胞 IL-6 的蛋白表达和 p-p65 的蛋白表达均明显减少;使用青蒿琥酯处理后,TCA 诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 和 p-p65 的蛋白水平也明显减少(图 5),因此我们推测青蒿琥酯抑制 p-p65 信号通路减轻 TCA 诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 的产生。

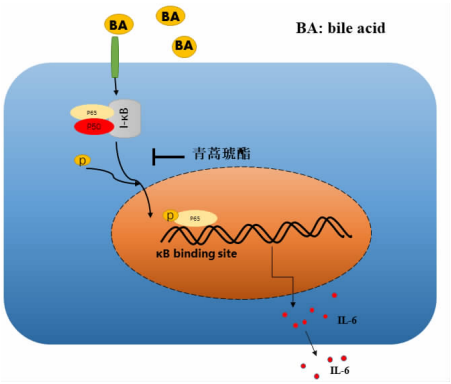
3 讨论

青蒿琥酯作为一种抗疟药,有文献报道具有抗炎、抗纤维化、抗癌的作用,在高糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞损伤模型中,有研究发现青蒿琥酯可以抑制 p-p65 信号通路的表达[8],但是在胆汁淤积性肝病领域中,尚无研究报道青蒿琥酯是否对该疾病具有潜在的影响。在本次研究中我们发现结合型胆汁酸 TCA、TCDCA 能够诱导小鼠原代肝细胞 IL-6 的表达,青蒿琥酯能够抑制 p65 的磷酸化减轻结合型胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 的产生(图 6)。



A:BAY 11-7082 组、青蒿琥酯组、DMSO 组及 TCA 组的小鼠原代肝细胞 IL-6、p65、p-p65 的蛋白表达水平。B:BAY 11-7082 组、青蒿琥酯组、DMSO 组及 TCA 组的小鼠原代肝细胞 p-p65 的蛋白质的相对表达量, BAY 11-7082 组与 TCA 组相比下降了 2.8 倍, a: $P<0.05$;青蒿琥酯(0. 5 mg/mL)组与 TCA 组相比下降了 2.6 倍,b: $P<0.05$;青蒿琥酯(2 mg/mL)组与 TCA 组相比下降了 2.7 倍,c: $P<0.05$。C: BAY 11-7082 组、青蒿琥酯组、DMSO 组及 TCA 组的小鼠原代肝细胞 IL-6 的蛋白质的相对表达量,BAY 11-7082 组与 TCA 组相比下降了 2.5 倍,a: $P<0.05$;青蒿琥酯(0.5 mg/mL)组与 TCA 组相比下降了 2.9 倍,b: $P<0.05$;青蒿琥酯(2mg/mL)组与TCA组相比下降了5.4倍,
c: $P<0.05$。(独立实验开展 3 次,$n=3$)

图 5 青蒿琥酯抑制 TCA 诱导的小鼠原代肝细胞 p65 的磷酸化和 IL-6 的表达



青蒿琥酯抑制 p65 的磷酸化减轻结合型胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 的表达

图 6 青蒿琥酯抑制胆汁酸诱导的肝细胞产生 IL-6 机制示意图

结合型胆汁酸 TCA,TCDCA 是动物体内的主要胆汁酸成分,胆汁酸在肝内淤积可以激活一系列炎症反应损伤肝细胞[20],但尚无研究报道结合型胆汁酸可以诱导肝细胞 IL-6 的产生。在本次研究中,我们体外模拟了胆汁淤积时的细胞环境,用 25 μmol/L 的 TCA,TCDCA 处理小鼠原代肝细胞,研究结果表明结合型胆汁酸 TCA,TCDCA 可以诱导小鼠原代肝细胞 IL-6 的表达。为了验证青蒿琥酯是否可以抑制胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 的产生,我们选择了不同浓度的青蒿琥酯预处理小鼠原代肝细胞,发现青蒿琥酯能够抑制 TCA 诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 的 mRNA 水平,并且呈现剂量依赖性。为了进一步探讨青蒿琥酯减轻结合型胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 产生的机制,我们选择了 NF-κB 的抑制剂 BAY 11-7082 作为阳性对照,p65 和 p50 是 NF-κB 家族的重要亚基,p65 亚基负责 NF-κB 的启动转录,p50 亚基仅在 DNA 结合中起辅助作用,因此我们检测了 IL-6 上游 p-p65 的信号通路[21]。研究发现使用 BAY 11-7082 预处理后小鼠原代肝细胞 IL-6 和 p-p65 蛋白水平明显减少,用青蒿琥酯预处理后 p-p65 蛋白表达水平和 IL-6 的蛋白表达水平也明显减轻。

此次研究我们在小鼠原代细胞上证实了结合性胆汁酸 TCA、TCDCA 能够诱导肝细胞 IL-6 的产生,青蒿琥酯可以抑制结合型胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 和 p-p65 的蛋白水平表达。但是由于此研究目前全部只在体外进行,尚无动物实验进一步体内验证,下一步计划我们将设计动物实验,体内验证青蒿琥酯是否可以减轻胆汁淤积性肝病的炎症反应。胆汁酸可以诱导许多炎症因子的表达,青蒿琥酯是否也可以减轻胆汁酸诱导的其他炎症因子的产生也有待进一步研究。

综上所述,我们首次发现青蒿琥酯能够通过 p-p65 信号通路抑制结合型胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞 IL-6 的产生。这不仅为胆汁酸在肝细胞内聚集导致肝细胞损伤的发病机制提供了理论基础,还为胆汁淤积性肝病的治疗提供了潜在的治疗靶点。

参考文献:

[1] 岑彦艳, 赵祷博, 李攀, 等. 青蒿琥酯的药代动力学以及相关药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(19): 3970-3978. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20180726.010.
CEN Y Y, ZAO Y B, LI P, *et al*. Research progress on pharmacokinetics and pharmacological activities of artesunate [J]. China J Chin Materia Medica, 2018, 43(19): 3970-3978. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20180726.010.

[2] ROUSSEL C, CAUMES E, THELLIER M, *et al*. Artesunate to treat severe malaria in travellers: review of efficacy and safety and practical implications[J]. J Travel Med. 2017, 24(2). DOI: 10.1093/jtm/taw093.

[3] LIU Z, ZHANG J, LI S, *et al*. Artesunate inhibits renal ischemia reperfusion-stimulated lung inflammation in rats by activating HO-1 pathway[J]. Inflammation, 2018, 41(1): 114-121. DOI: 10.1007/s10753-017-0669-3.

[4] LIU Y, HUANG G, MO B, *et al*. Artesunate ameliorates lung fibrosis via inhibiting the Notch signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(1): 561-566. DOI: 10.3892/etm.2017.4573.

[5] QIAN P, ZHANG YW, ZHOU Z H, *et al*. Artesunate enhances γδ T-cell-mediated antitumor activity through augmenting γδ T-cell function and reversing immune escape of HepG2 cells[J]. Immuno- pharmacol Immunotoxicol, 2018, 40(2): 107-116. DOI: 10.1080/08923973.2017.1386212.

[6] KONG Z, LIU R, CHENG Y. Artesunate alleviates liver fibrosis by regulating ferroptosis signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 2043-2053. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.11.030.

[7] CAO J, WANG W, LI Y, *et al*. Artesunate attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis by regulating the expressions of bone morphogenetic protein-7 and uterine sensitization-associated gene-1 in rats[J]. Int Urol Nephrol, 2016, 48(4): 619-629. DOI: 10.1007/s11255-016-1232-0.

[8] SUN Z, MA Y, CHEN F, *et al*. Artesunate ameliorates high glucose-induced rat glomerular mesangial cell injury by suppressing the TLR4/NF-κB/NLRP3 inflammasome pathway [J]. Chem Biol Interact, 2018, 293: 11-19. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.07.011.

[9] CHIANG J Y L, FERRELL J M. Bile acid metabolism in liver pathobiology[J]. Gene Expr, 2018, 18(2): 71-87. DOI: 10.3727/105221618x15156018385515.

[10] TAYLOR S A, GREEN R M. Bile acids, microbiota and metabolism[J]. Hepatology, 2018, 68(4): 1229-1231. DOI: 10.1002/hep.30078.

[11] ATTILI A F, ANGELICO M, CANTAFORA A, *et al*. Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids[J]. Med Hypotheses, 1986, 19(1): 57-69. DOI: 10.1016/0306-9877(86)90137-4.

[12] JIA W, XIE G, JIA W. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(2): 111-128. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.119.

[13] LI M, CAI S Y, BOYER J L. Mechanisms of bile acid mediated inflammation in the liver[J]. Mol Aspects Med, 2017, 56: 45-53. DOI: 10.1016/j.mam.2017.06.001.

[14] CAI S Y, BOYER J L. The role of inflammation in the mechanisms of bile acid-induced liver damage[J]. Dig Dis, 2017, 35(3): 232-234. DOI: 10.1159/000450916.

[15] 宋传旺. 中性粒细胞产生 IL-6 的研究概述[J]. 泸州医学院学报, 2002, 25(6): 535-538.
SONG C W. Overview of studies on the production of IL-6 by neutrophils[J]. J Luzhou Med Coll, 2002, 25(6): 535-538.

[16] SCHMIDT-ARRAS D, ROSE-JOHN S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy[J]. J Hepatol, 2016, 64(6): 1403-1415. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.02.004.

[17] GEIER A, JAHN D, HERMANNS H M. Interleukin-6: the dark side of liver regeneration in chronic liver disease[J]. Hepatology, 2017, 66(2): 667-668. DOI: 10.1002/hep.29136.

[18] HE G, KARIN M. NF-κB and STAT3-key players in liver inflammation and cancer[J]. Cell Res, 2011, 21(1): 159-168. DOI: 10.1038/cr.2010.183.

[19] BEUERS U, TRAUNER M, JANSEN P, et al. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: from UDCA to FXR, PXR and beyond[J]. J Hepatol, 2015, 62(1 suppl): S25-S37. DOI:10.1016/j.jhep.2015.02.023.

[20] CAI S Y, BOYER J L. Studies on the mechanisms of bile acid initiated hepatic inflammation in cholestatic liver injury [J]. Inflamm Cell Signal. 2017, 4(2): e1561.

[21] SCHMITZ M L, BAEUERLE P A. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B[J]. EMBO J, 1991, 10(12): 3805-3817. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb04950.x.

(收稿:2020-12-28;修回:2021-03-29)
(编辑 邓强庭)