

金英黄归汤对 LPS 介导乳腺上皮细胞 TLR4 信号通路中相关因子的影响

李欣^{1,2}, 李中改^{1,2}, 张小艺^{1,2}, 周送桂^{1,3}, 王玉坤^{1,2}, 冯将^{1,2}, 易琼¹, 王鲁^{1*}

(1. 贵州大学 贵州省生化工程中心, 贵阳 550025; 2. 贵州大学 动物科学学院, 贵阳 550025; 3. 贵州大学 药学院, 贵阳 550025)

摘要: 为了评价金英黄归汤抗 LPS 致炎的作用机制, 作者采用 ELISA 法检测金英黄归汤对细胞分泌细胞因子 TNF- α 、IL-8 的影响, 采用 qPCR 法研究药物对 TLR4 通路中 IL-1 受体相关激酶-1 (IRAK-1)、肿瘤坏死因子受体 6 (TRAF-6)、转化生长因子激活激酶 (TAK-1)、NF- κ B 诱导激酶 (NIK)、抑制性 NF- κ B (I κ B) mRNA 的转录影响。结果显示, 金英黄归汤低剂量组 ($39.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中剂量组 ($391 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、高剂量组 ($3910 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 能显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 减少 LPS 介导的 TNF- α 和 IL-8 分泌; 能显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 减少 LPS 介导的 IRAK-1、TRAF-6、TAK-1、I κ B、NIK mRNA 的转录。结果提示, 金英黄归汤通过抑制小鼠 MECs 的 TLR4/NF- κ B 信号通路中 IRAK-1/TRAF-6/TAK-1/NIK 途径的活化来控制炎症因子的释放而发挥抗炎作用, 而不是通过 IRAK-1/TRAF-6/TAK-1/I κ B 途径实现的, 这可能是金英黄归汤的抗炎机制。

关键词: 金英黄归汤; LPS; 乳腺上皮细胞; TLR4 信号; mRNA 转录

中图分类号: S853.9

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)03-0609-06

Effects of Jin-Ying-Tang on Correlated Molecules of Toll-like Receptor 4 Signaling of LPS-Induced Mouse Mammary Epithelial Cells *in vitro*

LI Xin^{1,2}, LI Zhong-gai^{1,2}, ZHANG Xiao-yi^{1,2}, ZHOU Song-gui^{1,3},

WANG Yu-kun^{1,2}, FENG Jiang^{1,2}, YI Qiong¹, WANG Lu^{1*}

(1. Biochemistry Engineering Center of Guizhou Province, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

3. College of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The study was conducted to investigate the effects of Jin-Ying-Tang (JYT) on correlated molecules of TLR4/NF- κ B signaling of LPS-stimulated mouse mammary epithelial cells (MECs) *in vitro* and explore its underlying molecular mechanisms. ELISA was performed to detect changes of the content of IL-8 and TNF- α in the culture supernatants. The mRNA transcription of TLR4/NF- κ B signaling molecules such as IL-1 receptor-associated kinase-1 (IRAK-1), tumour necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF-6), Transforming Growth Factor activated kinase 1 (TAK-1), NF- κ B inducing kinase (NIK), Inhibitor of κ B (I κ B) were determined by qRT-PCR. The results showed that JYT could significantly decrease the expression of IL-8 and TNF- α in LPS-stimulated MECs ($P < 0.05$, $P < 0.01$); what's more, JYT could down-regulate the expression of IRAK-1, TRAF-6, TAK-1, I κ B, NIK mRNA activated by LPS ($P < 0.05$, $P < 0.01$). It is concluded that JYT attenuates LPS-induced inflammatory response in MECs by inhibiting the activation of IRAK-1/TRAF-6/TAK-1/NIK pathway, but not of IRAK-1/TRAF-6/TAK-1/I κ B pathway.

收稿日期: 2015-08-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260618; 31470128); 北京农学院兽医学 (中医药) 北京市重点实验室开放课题

作者简介: 李欣 (1991-), 男, 吉林通化人, 硕士生, 主要从事中药药理学研究, E-mail: 690079602@qq.com

* 通信作者: 王鲁 (1970-), 教授, 博士, 主要从事中兽医学及中药药理学研究, E-mail: wanglu7007@163.com

Key words: Jin-Ying-Tang; LPS; mammary epithelial cells; TLR4/NF- κ B signaling; mRNA expression

在免疫细胞研究中 Toll 样受体 (TLRs) 能启动和调节机体炎症和免疫反应^[1], 且 TLR4 是 TLRs 家族中研究最多的一种, 它在脂多糖 (LPS) 介导的 TLR4 的途径中有激活髓样分化因子 88 (MyD88)、IL-1 受体相关激酶-1 (IRAK-1)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF-6)、NF- κ B 抑制酶 (I κ B) 或 NF- κ B 诱导激酶 (NIK) 相关因子参与信号的传导^[2], 最终使 NF- κ B 转移至核内启动相关基因的转录, 细胞分泌前炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-8、IL-6 等。前期研究发现小鼠 MECs 细胞膜上存在 TLR2 和 TLR4 受体, TLR4 是小鼠 MECs 上 LPS 介导细胞因子 TNF- α 、IL-8 分泌的主要受体^[3]。

近年来有大量研究报道中药复方、中药提取物及中药有效成分对 TLR4/NF- κ B 信号通路具有调节作用, 并用以探讨中药对相关疾病治疗的分子基础^[4-6]。前期研究发现金英黄归汤具有良好的抗炎作用^[7], 对金黄色葡萄球菌所致乳房炎家兔血清及乳汁中 IL-6 和 TNF- α 的分泌也有显著的抑制作用^[8]。在此基础上, 本试验以 LPS 刺激小鼠 MECs, 研究金英黄归汤对 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响, 旨在研究金英黄归汤的抗炎机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 3 月龄的妊娠中期昆明小白鼠, 体重 $35 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$, 购自解放军第三军医大学实验动物中心 [动物许可证号: SCXK(渝) 2012-0003], 在贵州大学贵州省生化工程中心 SPF 级动物实验室 [动物许可证号: SYXK(黔) 2013-0001] 饲养。

1.2 主要药物

金英黄归汤中金银花、蒲公英、连翘、大黄、黄芪、当归、瓜蒌、芙蓉花 8 味中药, 购于贵阳市同济堂药店 (中药 GMP 认证号: 黔 J0190), 按文献^[8]制备成生药浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。4 °C 保存备用。

1.3 主要试剂

DMEM/F12 培养基、胎牛血清, Thermo scientific 公司; 小鼠表皮生长因子, SAB 公司; 胰岛素、霍乱毒素 CT、L-谷氨酰胺、LPS, Sigma 公司; I 型

胶原酶和 II 型胶原酶, Solarbio 公司; Trypsin-EDTA, Invitrogen 公司; Mouse TNF- α and IL-8 ELISA 试剂盒, IBL 公司。TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒, 北京 TIANGEN 生物技术有限公司; 动物组织/细胞 RNA 提取试剂盒, $2 \times \text{EsTaq}$ MasterMix, 北京康为世纪生物科技有限公司; Power SYBR Green PCR Master Mix, AB 公司; 注射用青霉素钠和硫酸链霉素, 华北制药股份有限公司; 氯化可的松, 天津药业焦作有限公司; 无水乙醇、氯仿、甲醛、异丙醇, 均为国产化学纯试剂。

1.4 主要实验仪器

ThermoFisher 8000 储水型 CO₂ 细胞培养箱, Thermo 公司; MultiskanGo 型全波段酶标仪, Thermo 公司; qTOWER 实时荧光定量 RT-PCR 仪, 德国 jena 公司; T100 Thermal Cycler 温度梯度 PCR 仪, GelDoc XR+ 凝胶成像系统, BIO-RAD 公司。

1.5 金英黄归汤对 LPS 介导小鼠 MECs 分泌 IL-8 和 TNF- α 的影响

参照文献方法^[3]制备小鼠 MECs, 将 $500 \mu\text{L} \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液加入 24 孔板中, 在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 及时换液, 当 MECs 生长融合成单层细胞时, 随机分为 5 组: 空白对照组、LPS 刺激组、金英黄归汤低剂量组、金英黄归汤中剂量组、金英黄归汤高剂量组。各组分别以下列方法干预: 空白对照组: 只加 MECs 培养液 $500 \mu\text{L}$ 。LPS 刺激组: 含有 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS (终质量浓度) MECs 培养液 $500 \mu\text{L}$ 。金英黄归汤低剂量组: 加入含有 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS + $39.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (终质量浓度) 金英黄归汤的 MECs 培养液 $500 \mu\text{L}$ 。金英黄归汤中剂量组: 加入含有 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS + $391 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (终质量浓度) 金英黄归汤的 MECs 培养液 $500 \mu\text{L}$, 金英黄归汤高剂量组: 加入含有 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS + $3910 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (终质量浓度) 金英黄归汤的 MECs 培养液 $500 \mu\text{L}$ 。在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后收集细胞。取每孔上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书方法分别测定其 IL-8 和 TNF- α 的分泌量。

1.6 金英黄归汤对 LPS 介导小鼠 MECs 中 IRAK-1、TRAF-6、TAK-1、NIK、I κ B mRNA 转录的影响

按上述方法制备细胞及给药, 在 37 °C, 5% CO₂

培养箱中培养 24 h 后收集细胞。使用动物组织/细胞 RNA 提取试剂盒提取各组细胞的 RNA,并检测其纯度与浓度,检测合格后,尽快用 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒将提取的 RNA 逆转录,并于 -80°C 保存备用。IRAK-1、TRAF-6、TAK-1、NIK、I κ B 基因序列从 GenBank 获得,使用 Primer 5.0 设计引物(表 1),由上海生工合成。以 GAPDH 为内参基因,采用梯度 PCR 技术检测各基因的最佳退火温度(表 1)。

表 1 qPCR 的引物序列及退火温度

Table 1 Primer sequence and annealing temperature of qPCR

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	预期扩增长度/bp Amplifying fragment length	退火温度/°C Annealing temperature	基因序列号 Gene sequence number
IRAK-1	CATTCCTGGCACTTGACTCC CCTGGGCTACTCCTCACACT	110	61	NM_008363
TRAF-6	TGACGGTAAAGTGCCCAAT CACAAGAAACCTGCCTCCTG	180	60.5	NM_009424
NIK	ATGATTCTACCTCGGGACCA TGGCTGGCTCACTTTCTACA	120	60.5	NM_016896
TAK-1	ACCAGCACAGGCTCATTC TGACTCCAAGCGTTTAATAGTG	150	58.3	NM_172688
I κ B	CAACAGAGATGAGGGCGATG ATCAGGAAGAGGTTTGGATGC	100	59.1	NM_010907
GAPDH	GCAACTCCCACTCTTCCA GTCCAGGGTTTCTTACTCC	158	-	NM_008084

1.7 统计学处理

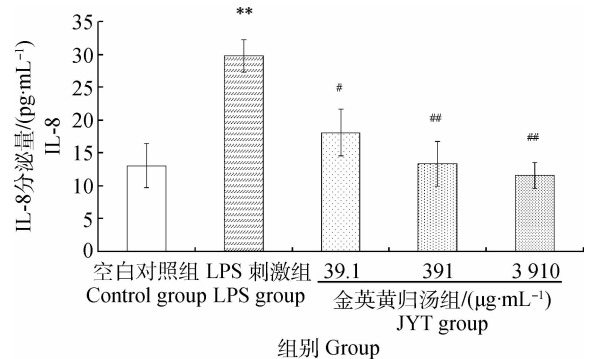
数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行处理,组间数据比较采用单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 金英黄归汤对 LPS 介导小鼠 MECs 分泌 IL-8 和 TNF- α 的影响

试验结果显示,与空白组相比,LPS 刺激组的 IL-8 分泌量极显著升高($P < 0.01$),金英黄归汤低、中、高剂量组 IL-8 的分泌量差异不显著($P > 0.05$);与 LPS 刺激组比较,金英黄归汤低、中、高剂量组 IL-8 的分泌量分别显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)降低,且细胞分泌 IL-8 的分泌量与中药浓度呈一定的量效关系,随着中药浓度的增加而减少,并回到空白组水平,结果见图 1。

10 μL 反应体系中,加入 5 μL SYBR Green,2 μL 模板 cDNA,0.8 μL 引物,用无 RNase 的水补充体积至 10 μL 。然后进行 PCR 反应和荧光测定。荧光定量 RT-PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预热 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火温度(表 1)30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,自变性开始三步为一个循环,共设 40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,使产物延伸完全。反应结束后自 50 $^{\circ}\text{C}$ 至 95 $^{\circ}\text{C}$ 绘制溶解曲线。测定结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算得到各组 mRNA 的转录量。



** . 与空白组相比, $P < 0.01$; #, ## . 与 LPS 组相比, $P < 0.05$, $P < 0.01$ 。下同

** . Compared with control, $P < 0.01$; #, ## . Compared with LPS, $P < 0.05$, $P < 0.01$. The same as below

图 1 金英黄归汤对 MECs 分泌 IL-8 的影响

Fig. 1 Influence of JYT on IL-8 of MECs culture supernatants

试验结果显示,与空白组相比,LPS 刺激组 TNF- α 的分泌量显著升高($P < 0.05$),金英黄归汤低、中、高剂量组 TNF- α 的分泌量差异不显著($P >$

0.05);与LPS刺激组比较,金英黄归汤低、中、高剂量组 TNF- α 的分泌量则分别极显著($P < 0.01$)或显著($P < 0.05$)降低,且也回到空白组水平,结果见图2。

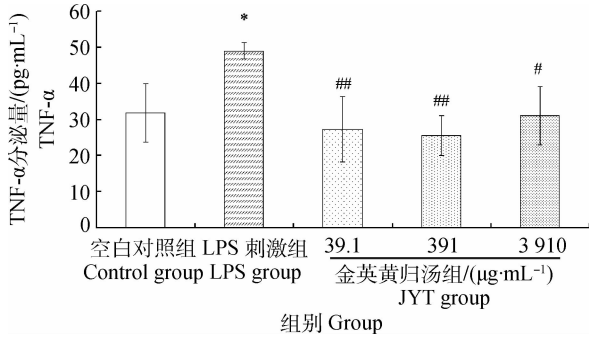


图2 金英黄归汤对 MECs 分泌 TNF- α 的影响

Fig.2 Influence of JYT on TNF- α of MECs culture supernatants

2.2 金英黄归汤对 LPS 导致小鼠 MECs 中 IRAK-1 mRNA 转录的影响

与空白组相比,LPS刺激组 IRAK-1 mRNA 转录量极显著上升($P < 0.01$),金英黄归汤低剂量组的转录量也显著上升($P < 0.05$),但金英黄归汤中、高剂量组的转录量下降,且差异不显著($P > 0.05$);与LPS刺激组相比,金英黄归汤各剂量组均极显著下调 IRAK-1 的转录($P < 0.01$),IRAK-1 mRNA 的转录量与中药浓度呈一定的量效关系,随着中药浓度的增加而减少,且回到空白组水平,结果见图3。

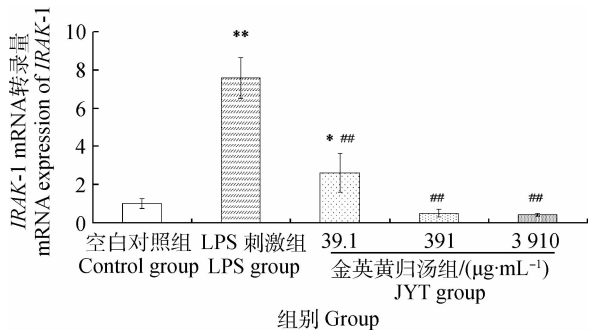


图3 金英黄归汤对 MECs IRAK-1 mRNA 转录的影响

Fig.3 Influence of JYT on IRAK-1 mRNA expression in MECs

2.3 金英黄归汤对 LPS 导致小鼠 MECs 中 TRAF-6 mRNA 转录的影响

与空白组相比,LPS刺激组 TRAF-6 mRNA 转录量极显著上升($P < 0.01$),金英黄归汤低浓度组的转录量也极显著上升($P < 0.01$),但金英黄归

汤中、高浓度组的转录量差异不显著($P > 0.05$);与LPS刺激组相比,金英黄归汤各剂量组均极显著下调 TRAF-6 的转录($P < 0.01$),TRAF-6 mRNA 的转录量与中药浓度呈一定的量效关系,随着中药浓度的增加而减少,且回到空白组水平,结果见图4。

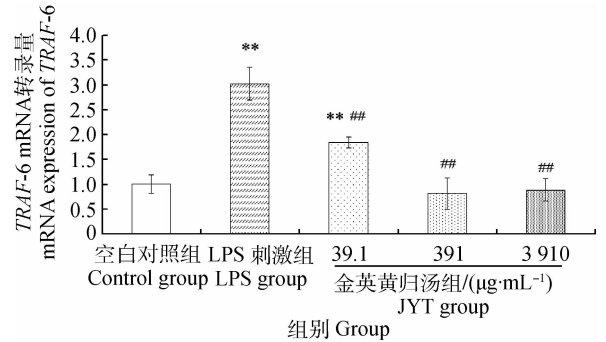


图4 金英黄归汤对 MECs TRAF-6 mRNA 转录的影响

Fig.4 Influence of JYT on TRAF-6 mRNA expression in MECs

2.4 金英黄归汤对 LPS 导致小鼠 MECs 中 TAK-1 mRNA 转录的影响

与空白组相比,LPS刺激组 TAK-1 mRNA 转录量极显著上升($P < 0.01$),金英黄归汤低剂量组的转录量差异不显著($P > 0.05$),但金英黄归汤中、高浓度组的转录量极显著下调($P < 0.01$);与LPS刺激组相比,金英黄归汤各剂量组均极显著的下调 TAK-1 的转录($P < 0.01$),TAK-1 mRNA 的转录量与中药浓度呈一定的量效关系,结果见图5。

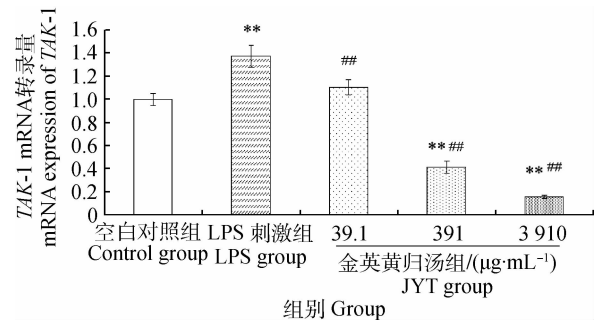


图5 金英黄归汤对 MECs TAK-1 mRNA 转录的影响

Fig.5 Influence of JYT on TAK-1 mRNA expression in MECs

2.5 金英黄归汤对 LPS 导致小鼠 MECs 中 NIK mRNA 转录的影响

与空白组相比,LPS刺激组 NIK mRNA 转录量极显著上升($P < 0.01$),金英黄归汤低剂量组的转录量也极显著上升($P < 0.01$),但金英黄归汤中、高浓度组的转录量显著($P < 0.05$)或极显著($P <$

0.01)下调;与LPS刺激组相比,金英黄归汤低浓度组则极显著上调 *NIK* 的转录($P < 0.01$),而中、高浓度组均极显著下调 *NIK* 的转录($P < 0.01$)。 *NIK* mRNA 的转录量与中药浓度呈一定的量效关系,结果见图 6。

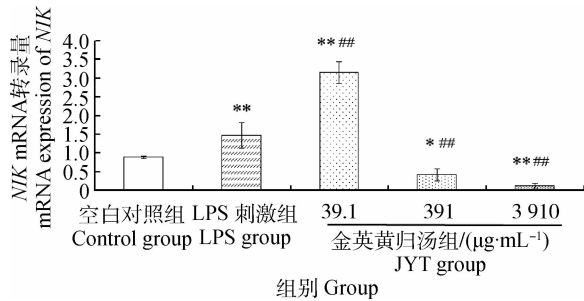


图 6 金英黄归汤对 MECs *NIK* mRNA 转录的影响

Fig. 6 Influence of JYT on *NIK* mRNA expression in MECs

2.6 金英黄归汤对 LPS 导致小鼠 MECs 中 *IκB* mRNA 转录的影响

与空白组相比,LPS 刺激组、金英黄归汤各浓度组 *IκB* mRNA 转录呈极显著下调($P < 0.01$),与 LPS 刺激组相比,金英黄归汤各浓度组均显著或极显著的下调 *IκB* 的转录($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果详见图 7。

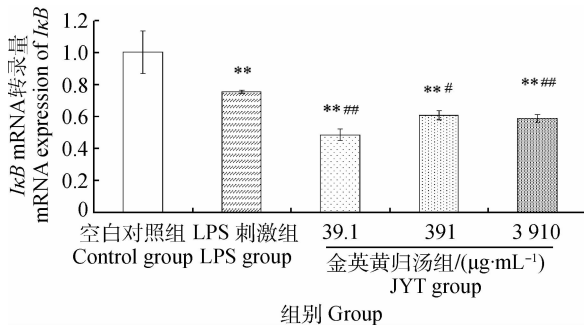


图 7 金英黄归汤对 MECs *IκB* mRNA 转录的影响

Fig. 7 Influence of JYT on *IκB* mRNA expression in MECs

3 讨论

MECs 在病原微生物侵入乳腺时,能分泌细胞调节因子,如 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α ^[9-10],这些活性成分对乳腺炎的发生与病程发展起重要作用,它们能趋化中性粒细胞进入乳腺感染区,抵抗病原菌的感染^[11],这对疾病的控制是有利的,但细胞受致炎因子刺激,机体过度活化后影响了其正常的功能,从这角度来说对机体是不利的,所以减少致炎因

子所致细胞因子分泌更具有科学意义。本试验结果进一步证实了 LPS 可以导致小鼠 MECs 分泌 IL-8 和 TNF- α ^[3],更重要的是发现适宜浓度的金英黄归汤可抑制 LPS 所致小鼠 MECs 分泌 IL-8 和/或 TNF- α ,这为金英黄归汤对抗 LPS 的生物活性提供了数据,为进一步研究金英黄归汤在 LPS 导致信号通路的研究打下基础。

LPS 是 TLR4 的天然配体,在免疫细胞上的 TLR4 接受 LPS 刺激后,将信号转到细胞内,可激活 MyD88 依赖和非依赖的 TLR4 信号通路^[2],MyD88 依赖途径是 MyD88 和 MyD88 样接头蛋白(MAL)聚集到 TLR4 形成受体复合体。IRAK-1 和 IRAK-4 与该受体复合物结合后,引起 IRAK-1 的磷酸化,使其从受体复合体上解离,并结合活化 TAK-1 结合蛋白 1(TAB1)和 TAB2 以及 TRAF-6 并使其活化。活化的 TRAF-6 激活 NF- κ B 转移至核内启动相关基因的转录最终细胞分泌前炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-8、IL-6 等。前期研究发现金英黄归汤能降低 LPS 刺激小鼠 MECs 后 *TLR4*、*MyD88* 的 mRNA 的转录^[12]。为了进一步研究金英黄归汤对 TLR4 信号通路中从 MyD88 之后起至 NF- κ B 段相关因子的影响,设计了本试验。试验结果显示,LPS 刺激小鼠 MECs 后,*IRAK-1*、*TRAF-6*、*TAK-1*、*NIK* 都极显著的升高,*IκB* 极显著的降低,说明小鼠 MECs 的 TLR4 信号传导与免疫细胞的信号传导途径是一致的,这为 TLR4 信号通路的研究增加了 MECs 的研究数据。结果还显示,金英黄归汤能降低 LPS 刺激小鼠 MECs 后 *IRAK-1*、*TRAF-6*、*TAK-1*、*NIK* 的 mRNA 的转录,这说明金英黄归汤抑制 LPS 所致小鼠 MECs 分泌 IL-8 和/或 TNF- α 的机制之一可能是抑制 TLR4 信号通路中 *IRAK-1*、*TRAF-6*、*TAK-1*、*NIK* 的转录。

NF- κ B 激活的经典途径是抑制 *IκB* 而实现,NF- κ B 激活的非经典途径通过 *NIK* 实现的^[13]。试验结果证实了 LPS 能导致小鼠 MECs 的 *IκB* 的 mRNA 转录极显著下降,*NIK* 的 mRNA 转录极显著上升,这可推断 LPS 是通过 *IκB* 途径和或 *NIK* 途径活化 NF- κ B。试验结果发现金英黄归汤能显著促进 LPS 介导小鼠 MECs 的 *IκB* 的 mRNA 转录下降,极显著抑制的 *NIK* mRNA 转录上升,我们推测金英黄归汤可能是从 *NIK* 途径而不是从 *IκB* 途径减少 NF- κ B 活化,最终降低细胞分泌细胞因子。NF- κ B 是核转录因子,由于影响其活性及活化有多

条途径,金英黄归汤对 NF- κ B 活性及活化如何有待进一步深入研究。

4 结 论

MECs 在病原微生物侵入乳腺时,能分泌细胞调节因子,如 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α ,这对乳腺炎的发生与病程发展起重要作用,中药复方金英黄归汤可抑制 LPS 所致小鼠 MECs 分泌 IL-8 和/或 TNF- α ,其机制是抑制 LPS 介导的 TLR4 信号通路中 IRAK-1、TRAF-6、TAK-1、NIK 的 mRNA 转录。并可能从 NIK 途径而不是从 I κ B 途径减少 NF- κ B 活化,最终降低细胞分泌细胞因子。

参考文献 (References):

- [1] HIGGS R, CORMICAN P, CAHALANE S, et al. Induction of a novel chicken Toll-like receptor following *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(3):1692-1698.
- [2] KAWAI T, AKIRA S. Toll-like receptor downstream signaling[J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(1):12-19.
- [3] HE C L, YI Q, LI Y F, et al. Toll-like receptor-4, but not toll-like receptor-2 mediates secretion of tumour necrosis factor α and interleukin-8 in lipopolysaccharide-stimulated mouse mammary epithelial cells[J]. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2013, 57(3):393-397.
- [4] ZHU H, ZHANG Y, HU X, et al. The effects of high-dose qinggan huoxue recipe on acute liver failure induced by d-galactosamine in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013:905715.
- [5] LI H L, CHEN H I, LI H, et al. Regulatory effects of emodin on NF-kappaB activation and inflammatory cytokine expression in RAW 264. 7 macrophages[J]. *Int J Mol Med*, 2005, 16(1):41-47.
- [6] SINTARA K, THONG-NGAM D, PATUMRAIJ S, et al. Curcumin suppresses gastric NF- κ B activation and macromolecular leakage in *Helicobacter pylori*-infected rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(32):4039-4046.
- [7] 覃英克, 郭庆, 肖纯刚, 等. 8 个中药组方抗炎活性的筛选[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011(11):126-127. TAN Y K, GUO Q, XIAO C G, et al. Screening of eight Chinese medicine prescription in anti-inflammatory activity[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2011(11):126-127. (in Chinese)
- [8] WANG L U, HE C L, HE B K, et al. Effects of Jin-Ying-Tang on *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in rabbit [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2012, 34(5):786-793.
- [9] PAREEK R, WELLNITZ O, VAN DORP R, et al. Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells[J]. *J Appl Genet*, 2005, 46(2):171-177.
- [10] WELLNITZ O, KERR D E. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 101(3-4):191-202.
- [11] PAAPE M, MEHRZAD J, ZHAO X, et al. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002, 7(2):109-121.
- [12] 李圆方. “金英黄归汤”对小鼠乳腺上皮 TLR4 信号转导的影响[D]. 贵州: 贵州大学, 2013. LI Y F. Regulated effects of Jin-Ying-Huang-Gui decoction on the TLR4 signaling of mouse mammary epithelial cells *in vitro* [D]. Guizhou: Guizhou University, 2013. (in Chinese)
- [13] SUN S C. The noncanonical NF- κ B pathway[J]. *Immunol Rev*, 2012, 246(1):125-140.

(编辑 白永平)