

1215-1220.

[7] Fajardo R J, Karim L, Calley V I, *et al.* A review of rodent models of type 2 diabetic skeletal fragility[J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(5): 1025-1040.

[8] 陆 洁, 刘 静, 裴天仙, 等. 自发性 2 型糖尿病模型 db/db 小鼠生物学特性研究[J]. *药物评价研究*, 2013, 36(5): 341-345.

[9] Aramwit P, Petcharat K, Supasyndh O. Efficacy of mulberry leaf tablets in patients with mild dyslipidemia[J]. *Phytother Res*, 2011, 25(3): 365-369.

[10] Park M Y, Lee K S, Sung M K. Effects of dietary mulberry, Korean red ginseng, and banaba on glucose homeostasis in relation to PPAR- α , PPAR- γ , and LPL mRNA expressions[J]. *Life Sci*, 2005, 77(26): 3344-3354.

[11] Muoio D M, Newgard C B. Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(3): 193-205.

[12] Yan F, Dai G, Zheng X. Mulberry anthocyanin extract ameliorates insulin resistance by regulating PI3K/AKT pathway in HepG2 cells and db/db mice[J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 36: 68-80.

[13] Thorens B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis [J]. *Diabetologia*, 2015, 58(2): 221-232.

[14] Wang Z Q, Yu Y, Zhang X H, *et al.* Chromium-insulin reduces insulin clearance and enhances insulin signaling by suppressing hepatic insulin-degrading enzyme and proteasome protein expression in KKAY mice[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, 5: 99.

雪荔方总黄酮对 LPS 致 RAW264.7 细胞炎症的保护作用

丛友权¹, 韩晶晶¹, 方 芸^{1,2*}, 陈 军³
(1. 南京中医药大学中西医结合鼓楼临床医学院, 江苏 南京 210008; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院, 江苏 南京 210008; 3. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 观察雪荔方总黄酮(紫花地丁、六月雪、车前草、荔枝草, TFXL)对脂多糖(LPS)致 RAW264.7 巨噬细胞的抗炎作用。**方法** 噻唑蓝(MTT)法检测不同浓度的雪荔方总黄酮对 RAW264.7 细胞活性的影响; NO 试剂盒检测雪荔方总黄酮对 LPS 致 RAW264.7 细胞的 NO 释放量; 酶联免疫吸附法(ELISA)检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)和白介素-10(IL-10)的分泌; 逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)检测诱导型一氧化氮合酶(*iNOS*)、*TNF- α* 、*IL6* 和 *IL10* mRNA 的表达; 免疫印迹法(Western blot)检测细胞 I κ B- α 、p65 蛋白表达。**结果** 与 LPS 模型组相比, 雪荔方总黄酮能显著降低 NO、TNF- α 和 IL-6 分泌, 增加 IL-10 分泌; 抑制 *iNOS*、*TNF- α* 、*IL6* mRNA 表达, 促进 *IL10* mRNA 表达; 抑制 I κ B- α 、p65 的磷酸化, 其高剂量组能抑制 I κ B- α 的降解。**结论** 本研究初步证实了雪荔方总黄酮对 LPS 致 RAW264.7 巨噬细胞炎症的保护作用, 其作用机制可能与 NF- κ B 信号通路有关。

关键词: 雪荔方; 总黄酮; 小鼠巨噬细胞系; 脂多糖; 抗炎

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)05-0890-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.05.002

Protective effects of total flavones from Xueli Formula on LPS-stimulated RAW264.7 cell inflammation

CONG You-quan¹, HAN Jing-jing¹, FANG Yun^{1,2*}, CHEN Jun³

(1. Drum Tower Clinical Medical College of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210008, China; 2. Drum Tower Hospital Affiliated to Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China; 3. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: **AIM** To observe the anti-inflammatory effects of total flavones from Xueli Formula (*Viola* *Herba*,

收稿日期: 2016-09-29
基金项目: 江苏省中医药管理局项目(HZ1016KY)
作者简介: 丛友权(1992—), 男, 硕士生, 从事制剂技术与生物药剂学研究。E-mail: cyqcong1992@sina.com
* **通信作者:** 方 芸(1959—), 女, 主任药师, 从事生物药剂学与药代动力学研究。Tel: (025) 83105581, E-mail: njglfy@163.com

Serissa japonica, *Plantaginis Herba* and *Salvia plebeia*, TFXL) on LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. **METHODS** The effects of different concentrations of TFXL on RAW264.7 cell viability were examined by MTT assay. The NO kit assay was adopted to detect the NO release amount of TFXL on LPS-stimulated RAW264.7 cells. The secretions of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) were tested by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine the expressions of inducible nitric oxide synthase (*iNOS*), *TNF- α* , *IL6* and *IL10* mRNA. The protein expressions of I κ B- α and p65 were tested by Western blot. **RESULTS** Compared with the LPS model group, TFXL could significantly reduce the secretions of NO, TNF- α and IL-6; increase the secretion of IL-10; inhibit the expressions of *iNOS*, *TNF- α* and *IL6* mRNA; promote the expression of *IL10* mRNA; inhibit the phosphorylations of I κ B- α and p65. The TFXL high-dose group could inhibit the degradation of I κ B- α . **CONCLUSION** This study preliminarily proves the protective effects of TFXL on LPS-stimulated RAW264.7 cell inflammation, whose action mechanism may be related to NF- κ B signal pathway. **KEY WORDS**: Xueli Formula; total flavones; mice macrophage system; LPS; anti-inflammation

炎症是伴随很多疾病状态的一种共有的病理现象,如急慢性阑尾炎、尿路感染、肝纤维化、动脉粥样硬化等,均与炎症反应有关。巨噬细胞是主要的炎性细胞,当其受到外界抗原刺激时(如LPS)会释放白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- α)等一系列炎性细胞因子,从而促进炎症反应和组织损伤^[1]。雪荔方是南京鼓楼医院的医院制剂,由荔枝草、车前草、六月雪、紫花地丁4味中药组成,前期研究表明黄酮类成分是雪荔方的主要有效部位^[2],具有清热解毒、利尿通淋的功效^[3],临床用于治疗泌尿系统感染、肾盂肾炎等^[4-5]。基于此,本研究建立LPS致小鼠巨噬细胞系RAW264.7炎症模型,探讨雪荔方总黄酮(TFXL)的抗炎效果,为雪荔方的开发和利用提供理论基础。

- 1 材料
- 1.1 试剂
- DMEM 高糖培养基 (E500003)、胎牛血清 FBS(E600001)、MTT (A100793)、胰蛋白酶细胞消化液 (E607001)、PBS (E607008)、青霉素-链霉素溶液 (E607011)、二甲基亚砜 DMSO (A100231)、Trizol (B511311)、M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒 (B532435) 均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司;脂多糖 LPS B5: O55 (Sigma 公司, 110M4086V); IL-6 (E0049Mo)、TNF- α (E0117Mo)、IL-10 (E0022Mo) ELISA 试剂盒 (上海晶天生物科技有限公司); 30% 丙烯酰胺溶液 (161-0156) 购自伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司;一氧化氮检测试剂盒 (S0021)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) (P0010) 购自碧云天生物研究所;一抗 p65 (CST#3034)、p-p65 (CST#3033) (美国 Cell Signaling Technology 公
- 司);一抗 I κ B- α (ab32518)、p-I κ B- α (ab12135) (英国 Abcam 公司); β -Actin (美国 Santa Cruz 公司, SC-47778); PVDF 转印膜 (美国 Millipore 公司, IPVH00010); 细胞总蛋白抽提试剂盒 (89900); ECL 试剂盒 (34075) (美国 Thermo Pierce 公司);二抗 Goat anti-Mouse IgG (H + L) 和 Goat anti-Rabbit IgG (H + L) (美国 Thermo Pierce 公司, 31160 和 31210)。PCR 引物由上海生工合成,引物序列如下: β -actin 正向 5'-CACAC-CCGCCACCAGTTCGC-3', 反向 5'-TTTGCACATGC-CGGAGCCGT-3'; *IL6* 正向 5'-TAGTCCTTCCTAC-CCCAATTTCC-3', 反向 5'-TTGGTCCTTAGCCACTC-CTTC-3'; *TNF- α* 正向 5'-GGGGATTATGGCT-CAGGGTC-3', 反向 5'-CGAGGCTCCAGTGAAT-TCGG-3'; *IL10* 正向 5'-TCCTTAATGCAGGACTTTA-AGGG-3', 反向 5'-GGTCTTGGAGCTTATTAATAAT-3'; *iNOS* 正向 5'-CGGCAAACATGACTTCAGGC-3', 反向 5'-GCACATCAAAGCGGCCATAG-3'。
- 1.2 仪器
- 2424-2 型二氧化碳培养箱 (SHEL-LAB); CKX41SF 型显微镜 (日本奥林巴斯公司); SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台 (苏州净化); YXQ. SG41. 280 型手提式压力蒸气灭菌器 (上海华线医用核子仪器有限公司); ELx800 光吸收酶标仪 (Bio Kit); UV-2450 紫外分光光度计 (Shimadzu); DW-86L626 型超低温冰箱 (青岛海尔特种电器有限公司); KH5200B 型超声波清洗仪 (昆山禾创超声仪器有限公司); AG-245 型万分之一电子分析天平 (Mettler Toledo); SH03014 低温高速离心机 (美国科俊仪器公司); Mini-PROTEAN 电泳系统及 Mini Trans-Blot 转印系统 (美国 Bio-Rad 公司);

HY-4 多用脱色摇床 (江苏金坛市正基仪器厂); 2720 型 PCR 扩增仪 (AB Applied Biosystems); LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche)。

1.3 药材 荔枝草 (南京同仁堂乐家老铺药事服务有限公司中药饮片厂, 批号 120605)、车前草 (南京松龄中药饮片有限公司, 批号 140321)、六月雪 (南京松龄中药饮片有限公司, 批号 131209)、紫花地丁 (南京松龄中药饮片有限公司, 批号 140731) 经南京中医药大学陈建伟教授鉴定, 紫花地丁为堇菜科植物光瓣堇菜 *Viola yedoensis* Makino 的全草、六月雪为茜草科植物六月雪 *Serissa japonica* (Thunb.) Thunb 的全株、车前草为车前科植物车前 *Plantago asiatica* L. 的全草、荔枝草为唇形科植物荔枝草 *Salvia plebeia* R. Br. 的全草。

2 方法

2.1 雪荔方总黄酮提取纯化 按质量比 2 : 2 : 2 : 1 称取荔枝草、车前草、六月雪、紫花地丁, 10 倍量水加热回流提取 2 h, 过滤, 再加 8 倍量水加热回流提取 2 h, 过滤, 滤液浓缩至相当于原药材 1 g/mL, 加 95% 乙醇使药液含醇量达 60%, 醇沉液静置 72 h 后抽滤, 滤液浓缩至相当于原药材 1 g/mL^[6]。滤液上大孔树脂柱, 上样体积与树脂体积比为 1 : 1, 上样体积流量为 1 BV/h。上样后, 将药液流过大孔树脂以使其吸附, 重复上述吸附过程 1 次, 静置过夜。分别用 4 BV 蒸馏水、4 BV 25% 乙醇除杂, 再用 6 BV 60% 乙醇洗脱, 体积流量 2 BV/h, 收集洗脱液, 浓缩烘干, 即得^[7], 总黄酮含量为 (62.85 ± 1.18)%。实验前, 用培养基配制所需质量浓度。

2.2 细胞培养 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞 (中国科学院上海细胞库) 用 DMEM 高糖培养基 (含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素), 放置在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 取对数生长期细胞用于实验。

2.3 细胞活力检测 调整 RAW264.7 细胞悬液密度为 6 × 10⁴/mL, 接种于 96 孔板内, 每孔 200 μL。分别设置调零孔、空白对照孔 (细胞 + 培养基)、TFXL 药物组 (给药质量浓度为 10、20、40、80、100、200 μg/mL), 每组 5 个复孔。加药后, 将 96 孔板放置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 弃上清, 向每孔加入终质量浓度为 1 mg/mL 的 MTT 溶液 100 μL。将 96 孔板移至培养箱中继续孵育 4 h 后, 终止培养, 吸弃孔内的上清液, 然后每孔加入

150 μL DMSO 溶液, 置于摇床上低温震荡 15 min, 使结晶充分溶解。酶标仪上 490 nm 波长处测定各孔的吸光度 *A*。

2.4 NO 和细胞因子检测 RAW264.7 细胞悬液接种于 48 孔板内, 细胞密度为 1 × 10⁵/mL, 每孔 500 μL, 置细胞培养箱中培养过夜, 细胞贴壁后同时加入 TFXL 溶液 (药物质量浓度 80、20、5 μg/mL) 和 1 μg/mL LPS, 设为正常组、LPS 组、LPS + TFXL 组, 每组 4 个复孔, 24 h 后用 NO 试剂盒检测上清 NO 分泌情况, 用 ELISA 试剂盒检测细胞上清液中 TNF-α、IL-6、IL-10 分泌情况。

2.5 RT-PCR 检测 mRNA 的表达情况 RAW264.7 细胞悬液接种于 6 孔板内, 细胞密度为 5 × 10⁵/mL, 每孔 3 mL, 置细胞培养箱中培养过夜, 细胞贴壁后同时加入 TFXL 溶液 (药物质量浓度 80、20、5 μg/mL) 和 1 μg/mL LPS, 设为正常组、LPS 组、LPS + TFXL 组, 继续置于细胞培养箱中培养 24 h 后, 按 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 然后扩增为 cDNA。扩增条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 10 s, 57 ℃ 退火 20 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 40 循环。溶解曲线扩增条件: 95 ℃ 5 s, 65 ℃ 1 min, 97 ℃ 0.11 ℃/s。实时荧光定量 PCR 仪检测 mRNA 表达情况。

2.6 Western blot 检测 NF-κB 信号通路蛋白表达 RAW264.7 细胞悬液接种于 6 孔板, 细胞密度为 5 × 10⁵/mL, 每孔 3 mL, 置细胞培养箱中培养过夜, 细胞贴壁后同时加入 TFXL 溶液 (药物质量浓度 80、20、5 μg/mL) 和 1 μg/mL LPS, 设为正常组、LPS 组、LPS + TFXL 组, 继续置于细胞培养箱中培养 24 h 后, 提取细胞总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量法检测各组细胞蛋白浓度, 99 ℃ 灭活蛋白 10 min, SDS-PAGE 凝胶电泳, 湿法转至 PVDF 膜, 37 ℃ 下用封闭液封闭 2 h 后, 加入一抗 4 ℃ 孵育过夜, 洗脱一抗, 与二抗 37 ℃ 下孵育 1 h, ECL 显色, 放入成像仪曝光, 保存图片。

2.7 数据统计分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 RAW264.7 细胞活力的影响 雪荔方总黄酮对 RAW264.7 细胞的 IC₅₀ 为 250 μg/mL。由表 1 可知, 当药物质量浓度 ≤ 80 μg/mL 时, 对 RAW264.7 细胞生长无影响; 当药物质量浓度 ≥ 100 μg/mL 时, 与正常组相比, 细胞活力明显下降

($P < 0.01$), 表明高质量浓度的 TFXL 对细胞生长具有一定抑制作用。

3.2 对细胞 NO、IL-6、TNF- α 和 IL-10 分泌的影响 结果如表 2 所示。正常组细胞上清液中 NO、IL-6、TNF- α 分泌较少, 给予 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 24 h 后, NO、IL-6、TNF- α 分泌均显著增加 ($P < 0.01$), TFXL 药物组中 NO、IL-6、TNF- α 的分泌则受到明显抑制 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并呈现一定的剂量依赖性关系。相反, 正常组中 IL-10 分泌较少, 在给予 LPS 刺激 24 h 后分泌增加 ($P < 0.01$), 而在 TFXL 存在的情况下, 其分泌增加反而更加明显 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 也存在一定剂

表 2 TFXL 对 NO、IL-6、TNF- α 和 IL-10 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)
Tab. 2 Effects of TFXL on NO, IL-6, TNF- α and IL-10 expressions ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL-6/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TNF- α /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-10/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
正常组	—	3.49 $\pm$ 0.57	19.90 $\pm$ 10.30	90.95 $\pm$ 4.57	267.75 $\pm$ 26.58
LPS 组	1	13.90 $\pm$ 0.73 ^{##}	199.12 $\pm$ 20.88 ^{##}	197.45 $\pm$ 7.46 ^{##}	715.25 $\pm$ 13.77 ^{##}
TFXL 组	5	11.96 $\pm$ 0.69 ^{**}	150.14 $\pm$ 8.57 [*]	186.95 $\pm$ 5.32	762.75 $\pm$ 23.23 [*]
TFXL 组	20	10.29 $\pm$ 1.07 ^{**}	100.55 $\pm$ 9.76 ^{**}	170.20 $\pm$ 7.05 ^{**}	846.50 $\pm$ 33.04 ^{**}
TFXL 组	80	7.10 $\pm$ 0.73 ^{**}	78.58 $\pm$ 8.56 ^{**}	156.45 $\pm$ 4.50 ^{**}	962.75 $\pm$ 31.98 ^{**}

注: 与正常组比较,^{##} $P < 0.01$; 与 LPS 组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

3.3 对 *iNOS*、*IL6*、*TNF- α* 和 *IL10* mRNA 表达的影响 与正常组相比, LPS 组的 *iNOS*、*IL6*、*TNF- α* 和 *IL10* mRNA 均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 TFXL 药物组能够降低 *iNOS*、*IL6*、

表 3 TFXL 对 *iNOS*、*IL6*、*TNF- α* 和 *IL10* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Tab. 3 Effects of TFXL on *iNOS*, *IL6*, *TNF- α* and *IL10* mRNA expressions ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	<i>iNOS</i>	<i>IL6</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL10</i>
正常组	—	0.47 $\pm$ 0.15	0.79 $\pm$ 0.15	0.37 $\pm$ 0.11	0.36 $\pm$ 0.07
LPS 组	1	2.45 $\pm$ 0.27 ^{##}	4.31 $\pm$ 0.40 ^{##}	2.18 $\pm$ 0.13 ^{##}	1.04 $\pm$ 0.20 [#]
TFXL 组	5	1.70 $\pm$ 0.16 [*]	3.07 $\pm$ 0.41 [*]	1.74 $\pm$ 0.24	1.43 $\pm$ 0.12
TFXL 组	20	1.56 $\pm$ 0.24 [*]	2.18 $\pm$ 0.35 ^{**}	1.33 $\pm$ 0.21 [*]	1.81 $\pm$ 0.25 [*]
TFXL 组	80	0.81 $\pm$ 0.06 ^{**}	0.98 $\pm$ 0.12 ^{**}	0.98 $\pm$ 0.15 ^{**}	2.19 $\pm$ 0.09 ^{**}

注: 与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$; 与 LPS 组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

3.4 对 NF- κ B 信号通路蛋白表达的影响 图 1 表明, 与正常组相比, LPS 组细胞 p-I κ B- α 的蛋白表达极显著增加 ($P < 0.01$); 与 LPS 组相比, TFXL 给药组能抑制 p-I κ B- α 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 从而抑制 I κ B- α 蛋白的磷酸化, 并呈现一定的剂量依赖性关系。与正常组相比, LPS 组细胞 I κ B- α 的蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$), TFXL 高剂量组能显著增加 I κ B- α 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 低、中剂量组对 I κ B- α 蛋白表达没有显著影响 ($P > 0.05$)。

图 2 表明, 与正常组相比, LPS 组细胞 p-p65

表 1 TFXL 对 RAW264.7 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)
Tab. 1 Effect of TFXL on the viability of RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	吸光度
正常组	—	0.409 $\pm$ 0.015
TFXL 组	10	0.408 $\pm$ 0.012
TFXL 组	20	0.406 $\pm$ 0.012
TFXL 组	40	0.400 $\pm$ 0.016
TFXL 组	80	0.399 $\pm$ 0.014
TFXL 组	100	0.339 $\pm$ 0.013 ^{**}
TFXL 组	200	0.230 $\pm$ 0.017 ^{**}

注: 与正常组比较,^{**} $P < 0.01$

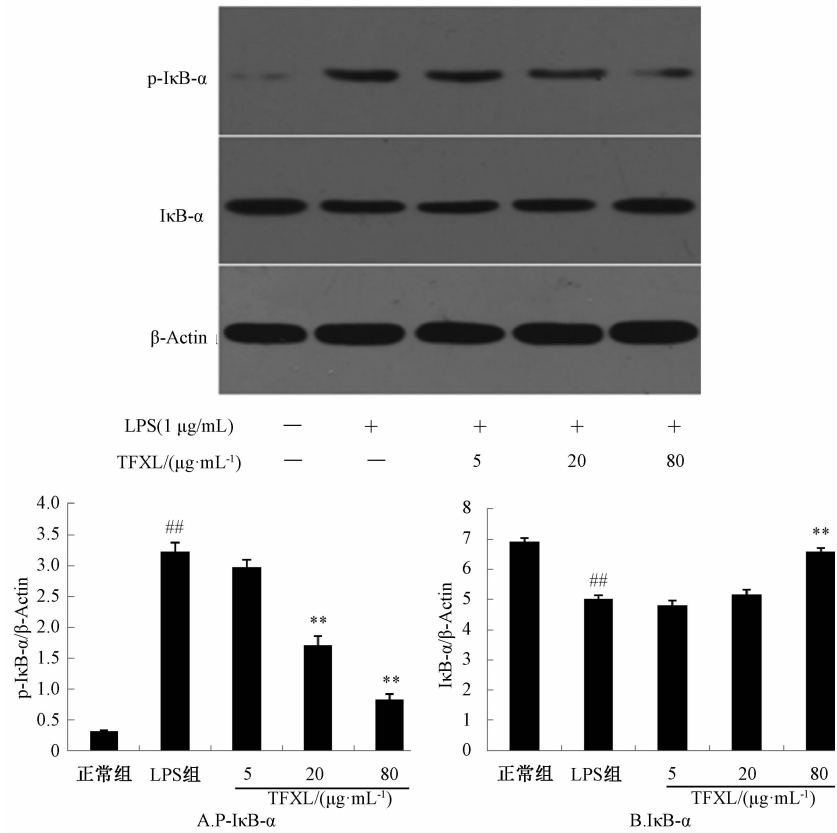
量依赖性关系。

TNF- α mRNA 表达, 增加 *IL10* mRNA 表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 这与 ELISA 的实验结果相符, 见表 3。

的蛋白表达极显著增加 ($P < 0.01$); 与 LPS 组相比, TFXL 给药组能抑制 p-p65 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 从而抑制 p65 蛋白的磷酸化, 并呈现一定的剂量依赖性关系。与正常组相比, LPS 组以及 TFXL 给药组对 p65 蛋白表达没有显著影响 ($P > 0.05$)。

4 讨论

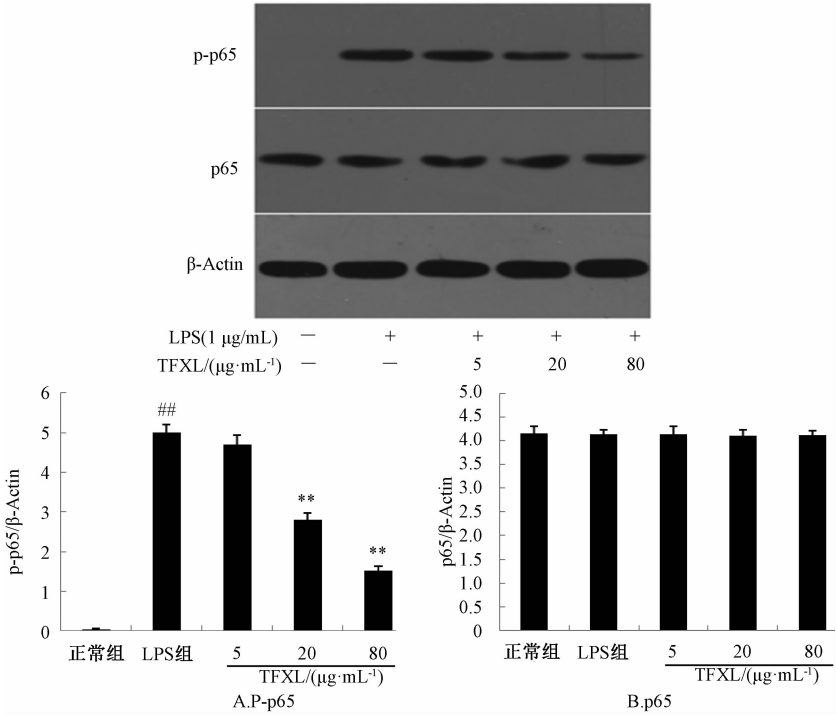
内毒素所致炎症反应是复杂的病理生理过程, 多细胞因子通过调节促炎和抗炎系统之间的平衡而参与炎症发生、发展过程^[8]。NO 是一种简单却不



注：与正常组比较，^{##}*P* < 0.01；与 LPS 组比较，^{**}*P* < 0.01

图 1 TFXL 对 IκB-α 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of TFXL on IκB-α protein expression



注：与正常组比较，^{##}*P* < 0.01；与 LPS 组比较，^{**}*P* < 0.01

图 2 TFXL 对 p65 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of TFXL on p65 protein expression

稳定的自由基,参与多种生理和病理过程。在体内 NO 是由一氧化氮合酶(NOS)催化 L-精氨酸(L-Arg)产生^[9]。iNOS 主要是在炎症和免疫刺激下表达,进而催化 NO 持续生成,过量的 NO 则会促进炎症性疾病的发生和发展^[10-11]。LPS 通过与细胞膜表面受体 TLR4 (Toll 样受体 4) 的结合,通过激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和 NF- κ B 信号通路,介导单核巨噬细胞、内皮细胞等细胞的激活,诱导多种细胞因子如 IL-1 β 、IL-6、TNF 等的合成和释放^[12-13]。本实验采用 LPS 刺激小鼠 RAW264.7 巨噬细胞成功构建炎症细胞模型,首先观察 TFXL 对细胞上清液中 NO、TNF- α 和 IL-6 分泌的影响,结果发现,TFXL 剂量依赖性抑制炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 NO 的分泌。然后,又采用 PCR 法检测细胞中 iNOS、TNF- α 、IL6 mRNA 表达,发现 TFXL 有显著抑制作用。

炎症的产生是促炎和抗炎两方面失衡的结果^[8],因此还观察了 TFXL 对抗炎细胞因子 IL-10 的影响。IL-10 是公认的抗炎细胞因子,研究表明它可下调巨噬细胞的激活,抑制包括 TNF- α 、IL-6 等炎症细胞因子的分泌^[14],也能间接抑制免疫细胞的活性,目前已认为其是一个重要的抗内毒素致炎过程的作用靶点^[15]。结果发现,TFXL 能明显促进 IL-10 的分泌和 IL10 mRNA 的表达。

LPS 与 TLR4 结合引起 NF- κ B 激活,参与多种炎症细胞因子的转录,在炎症反应的复杂细胞因子网络中可能是一个中心环节^[16]。静息条件下,p50/p65 与 I κ B 形成不具有活性的三聚体复合物,在 LPS 刺激下,I κ B 被磷酸化,释放出有活性的 p50/p65 二聚体进入细胞核,从而调节特异基因的转录^[8]。研究表明,p65 是 NF- κ B 的转录活性形式^[16]。本实验采用 Western blot 法检测细胞 I κ B- α 蛋白和 p65 蛋白的表达,结果显示,TFXL 剂量依赖性抑制 RAW264.7 细胞 I κ B- α 蛋白和 p65 蛋白的磷酸化,即抑制 NF- κ B 通路的激活;TFXL 对 p65 蛋白表达没有影响,且高剂量组能显著增加 I κ B- α 蛋白的表达,即能抑制 I κ B- α 的降解。

上述实验结果表明,TFXL 对炎症过程中促炎和抗炎系统之间的平衡起着重要的调节作用,对 LPS 刺激的 RAW264.7 巨噬细胞炎症具有一定的保护作用,其保护机制可能与 TFXL 能够抑制 NF- κ B 通路的激活、进一步减少炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 iNOS 的表达、促进抗炎细胞因子 IL-10 的表达有关。

参考文献:

[1] 代艳文,袁 丁,万静枝,等. 竹节参总皂苷通过 NF- κ B 通路对 LPS 致 RAW264.7 细胞炎症的保护作用研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(11):2076-2080.

[2] 方 芸. 雪荔组方活性部位及制剂:中国,CN103285175A,201310245641. 9[P]. 2013-09-11.

[3] 吴正红,裴云萍,方 芸,等. 高效液相色谱法测定复方荔枝草颗粒剂中高车前苷含量[J]. 药物分析杂志,2000,20(6):388-390.

[4] Peng M M, Fang Y, Hu W, *et al.* The pharmacological activities of Compound Salvia Plebeia Granules on treating urinary tract infection [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 129 (1): 59-63.

[5] 胡 巍,方 芸,彭苗苗. 雪荔复方中高车前苷在大鼠各组织中的分布研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(10):156-160.

[6] 胡 巍,陈明磊,方 芸. 雪荔组方水提醇沉液的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 药学与临床研究,2012,20(5):476-478.

[7] 孙启文. 雪荔组方有效部位药效学研究及其片剂的制备[D]. 南京:南京中医药大学,2014.

[8] 罗福玲,赵恒光,李洪忠,等. 粉防己碱对脂多糖诱导下 RAW264.7 细胞炎症模型细胞因子的作用[J]. 中草药,2011,42(3):542-545.

[9] 代艳文,杨 莉,万静枝,等. 竹节参醇提物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(2):163-166.

[10] 杨晓露,章丹丹,唐 宁,等. 诱导型一氧化氮合酶的调控机制及其抑制剂的研究进展[J]. 中国药房,2011,22(39):3728-3732.

[11] 孙世学,李运曼. NO 在类风湿性关节炎中的作用及相关药物研究进展[J]. 药学与临床研究,2007,15(3):175-178.

[12] Ionita M G, Arslan F, Kleijn D P D, *et al.* Endogenous inflammatory molecules engage Toll-like receptors in cardiovascular disease[J]. *J Innate Immun*, 2010, 2(4):307-315.

[13] Drexler S K, Foxwell B M. The role of Toll-like receptors in chronic inflammation[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(4):506-518.

[14] 朱春甲,朱红涛,汪 坤,等. 异丙肾上腺素对脂多糖诱导的大鼠肺泡巨噬细胞分泌 TNF- α 和 IL-10 及吞噬功能影响的研究[J]. 安徽医学,2009,30(6):656-658.

[15] Chon H, Choi B, Lee E, *et al.* Immunomodulatory effects of specific bacterial components of *Lactobacillus plantarum* KF-CC11389P on the murine macrophage cell line RAW264.7[J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 107(5):1588-1597.

[16] Giuliani C, Napolitano G, Bucci I, *et al.* NF- κ B transcription factor: role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune, and neoplastic diseases and therapy implications[J]. *Clin Ter*, 2001, 152(4):249-253.