

桑枝乙醇提取物通过 NF- κ B 和 MAPKs 信号通路对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的抗炎作用

朱君^{1,2}, 付立夏^{2,3}, 支青², 刘雄利^{2,3}, 陈琳^{1,2}, 田民义^{2,3}, 王慧娟^{2,3*}

(1. 贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院, 山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室, 山地生态与农业生物工程协同创新中心, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学西南药食两用资源开发利用技术国家地方联合工程研究中心, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 目的 研究桑枝乙醇提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型的影响, 并探究其分子作用机制。方法 通过回流提取法制备桑枝乙醇提取物, 并采用可见分光光度法检测样品中总黄酮的含量。采用 MTT 法检测桑枝乙醇提取物对 RAW264.7 细胞的毒性作用, 采用 Griess 法检测细胞上清液一氧化氮 (NO) 水平, ELISA 法检测细胞上清液白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平, DCFH-DA 荧光探针法检测细胞中活性氧 (ROS) 水平, 倒置荧光显微镜观察细胞形态变化, RT-qPCR 法检测细胞 *iNOS*、*COX-2*、*TNF- α* 、*IL-6*、*IL-1 β* 、*Arg-1*、*IL-10* mRNA 表达及细胞 M1/M2 表型的作用, Western blot 法检测细胞 *iNOS*、*COX-2*、NF- κ B、MAPKs 信号通路蛋白表达。结果 桑枝乙醇提取物中总黄酮含量为 (8.47 \pm 0.12)%。桑枝乙醇提取物能抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 能调控 RAW264.7 细胞由 M1 向 M2 表型的转化, 能下调促炎因子 mRNA 的转录表达和上调抑炎因子 mRNA 的转录表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 能下调 NF- κ B 信号通路细胞核 P65 蛋白表达、IKB α 磷酸化及 MAPKs 信号通路 p38、JNK 和 ERK 蛋白磷酸化 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 桑枝乙醇提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型具有较好的抗炎效果, 其内在的分子机制可能与下调 NF- κ B 和 MAPKs 信号通路有关。

关键词: 桑枝乙醇提取物; 抗炎; RAW264.7 细胞; M1/M2 表型; NF- κ B 信号通路; MAPKs 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)11-3648-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.11.044

炎症是宿主系统受病原体、损伤细胞或其它异物等刺激时所产生的一系列保护性免疫应答, 是抵抗自然感染和恢复体内稳态的天然手段。炎症是由各种炎症细胞因子和介质触发的, 这些炎症因子从诸如巨噬细胞等促炎细胞中释放出来^[1-2]。在正常情况下, 炎症对于机体的生理功能是有利的, 但过度和持续的炎症反应会导致机体受到损害, 如降低其对组织损伤、感染或疫苗接种等信号的感知和反应能力, 导致先天免疫反应失调^[3-4]。临床抗炎药物主要分为甾体抗炎药和非甾体抗炎药, 具有较多不良反应, 长期使用会对胃肠道、肝脏、泌尿系统、神经系统等造成损害^[5], 因此, 从天然药物中寻找新的抗炎药物有重要的意义。

桑科植物桑的干燥嫩枝入药为桑枝, 始载于《神农本草经》^[6], 具有祛风湿、利关节的功效。现代研究表明, 桑枝化学成分种类多样, 包括黄酮、生物碱和香豆素等, 具有抗炎、降血糖、抗氧化和抑菌等药理活性^[7-8]。目前,

关于桑枝乙醇提取物的抗炎活性及作用机制少有报道。本研究采用脂多糖 (LPS) 诱导 RAW264.7 细胞的体外炎症模型, 并基于核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 信号通路探究桑枝乙醇提取物的抗炎作用机制。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞株, 购自中国科学院昆明动物研究所细胞库。

1.2 试剂与药物 桑枝饮片 (产地安徽, 批号 200706), 购自贵州同济堂中药饮片有限公司。芦丁对照品 (批号 100080-202012, 含量 92.2%), 购自中国食品药品检定研究院; 噻唑蓝 (MTT, 批号 715F0510)、LPS (批号 818ED35)、地塞米松 (批号 320E051), 购自北京索莱宝科技有限公司; 高糖 DMEM 培养基 (批号 8121551), 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (批号 21090705), 购自浙江天杭生物科技股份有限公司; 一氧化氮 (NO) 检测试剂盒

收稿日期: 2022-02-12

基金项目: 贵州省科学技术基金项目 (黔科合基础-ZK [2021] 一般 520); 贵州大学引进人才科研项目 (贵大人基合字 [2019] 29 号); 贵州大学培育项目 (贵大培育 [2020] 52 号)

作者简介: 朱君 (1993—), 男, 硕士生, 研究方向为天然产物药理活性。Tel: 15508260798, E-mail: 1178230595@qq.com

* 通信作者: 王慧娟 (1981—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为新药研发及成药性评价。Tel: 13639022693, E-mail: 848668408@qq.com

(批号 120320210430)、BCA 总蛋白定量试剂盒 (批号 112720201223)、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒 (批号 041521210820)、活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (批号 112420201215), 购自上海碧云天生物技术有限公司; IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 A20611035)、TNF- α ELISA 试剂盒 (批号 A28210852), 购自杭州联科生物技术股份有限公司; 兔抗小鼠抗体 GAPDH (批号 2118S)、iNOS (批号 13220S)、COX2 (批号 12282S)、P65 (批号 8242S)、p-IKB α (批号 2859S)、IKB α (批号 4812S)、p38 (批号 9212S)、p-p38 (批号 9211S)、JNK (批号 9252S)、p-JNK (批号 9251S)、ERK (批号 4695T)、p-ERK (批号 4370T), 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 兔抗小鼠 PARP (批号 AB32138), 购自英国 Abcam 公司; 山羊抗兔二抗 (批号 ABS20002), 购自爱必信 (上海) 生物科技有限公司; Total RNA Kit (批号 R6834010002), 购自美国 BioTek 公司; RT Easy (批号 210401) 和 Real Time PCR Easy SYBR GREEN (批号 P210501), 购自成都福际生物技术有限公司。

1.3 仪器 RE-2000A 型旋转蒸发仪, 购自上海亚荣生化仪器厂; W-5200 型紫外可见分光光度计, 购自上海元析仪器有限公司; Varioskan LUX 型多功能酶标仪、3111 型 CO₂ 恒温恒湿培养箱, 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; DMi8 型倒置荧光相差显微镜, 购自德国徕卡公司; XPE205 型十万分之一电子天平, 购自瑞士 Mettler Toledo 公司; ChemiDoc™ Touch Imaging System 型 V3 蛋白免疫印迹系统、CFX Connect™ Real-Time System 型三通道梯度荧光定量 PCR 分析仪, 购自美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 桑枝乙醇提取物的制备 取适量桑枝饮片粉碎, 加 10 倍量 70% 乙醇回流提取, 提取 2 次, 每次 1.5 h, 合并提取液, 抽滤, 减压浓缩, 冷冻干燥后得到干燥粉末, 提取率为 6.60%。

2.2 桑枝乙醇提取物中总黄酮含量检测

2.2.1 标准曲线的绘制 精密称定芦丁对照品 15.32 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加适量 70% 乙醇超声处理使之溶解, 放冷, 70% 乙醇定容至刻度, 摇匀备用。精密量取芦丁对照品溶液 1、2、3、4、5、6 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 各加蒸馏水至 6 mL, 加 5% 亚硝酸钠 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 10% 硝酸铝 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加氢氧化钠试液 10 mL, 加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以相应的试剂为空白, 采用紫外可见分光光度计于 500 nm 波长处检测吸光度值。以吸光度 (A) 为纵坐标, 质量浓度 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程。

2.2.2 样品检测 称取桑枝乙醇提取物 125 mg, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 70% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 按“2.2.1”项下标准曲线的制备方法, 自“加蒸馏

水至 6 mL”起, 依法检测吸光度, 同时精密量取续滤液 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 作为空白溶液。通过标准曲线计算供试品溶液中芦丁的含量, 并计算样品中总黄酮的含量。

2.3 细胞培养 RAW264.7 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基 (加 100 μ g/mL 双抗和 2 mmol/L 谷氨酰胺), 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.4 MTT 法检测细胞活性 将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板, 密度为 6.25×10^4 /mL, 随机分为对照组和实验组, 分别设置 3 个复孔, 实验组细胞接种 24 h 后加入不同质量浓度桑枝乙醇提取物 (3.9、7.8、15.6、31.2、62.5、125、250、500、1 000 μ g/mL) 继续培养 24 h, 然后加入 10 μ L 5 mg/mL MTT, 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 150 μ L DMSO, 振荡后于 490 nm 波长处检测吸光度值, 计算细胞存活率。

2.5 细胞上清液 NO、IL-6、TNF- α 水平检测 将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板, 密度为 6.25×10^4 /mL, 随机分为对照组、模型组、阳性组和桑枝乙醇提取物组, 分别设置 3 个复孔, 细胞接种 24 h 后, 对照组换用 DMEM 高糖培养基; 模型组换用含 LPS (1 μ g/mL) 的 DMEM 高糖培养基; 阳性组换用含 LPS (1 μ g/mL) + 地塞米松 (20 μ g/mL) 的 DMEM 高糖培养基; 桑枝乙醇提取物组换用含 LPS (1 μ g/mL) + 桑枝乙醇提取物 (40、80、160 μ g/mL) 的 DMEM 高糖培养基, 继续培养 24 h, 吸取各组上清培养基, 按照 NO 检测试剂盒说明书采用 Griess 法检测各组细胞上清液 NO 水平, 按照相应 ELISA 试剂盒说明书检测各组细胞上清液 IL-6、TNF- α 水平。

2.6 DCFH-DA 荧光探针法检测细胞中 ROS 水平 将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板, 密度为 6.25×10^4 /mL, 按照“2.5”项下方法分组培养 24 h 后, 弃培养基, PBS 润洗 2 次, 每孔加 1 mL 稀释液 (用无血清 DMEM 高糖培养基按 1:1 000 比例稀释 DCFA-DA), 于培养箱内孵育 20 min, 用无血清 DMEM 高糖培养基洗涤 3 次, 于倒置荧光显微镜下设置激发波长 460~500 nm, 发射波长 512~542 nm 进行荧光拍摄。拍摄完成后, 加胰酶消化, 每孔加入 900 μ L PBS 制成细胞悬液, 取 200 μ L 加入 96 孔板 (每组 3 个复孔), 避光静置 30 min, 在激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm 条件下检测荧光强度。

2.7 RT-qPCR 法检测细胞相关炎症因子 mRNA 表达 将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板, 密度为 6.25×10^4 /mL, 按照“2.5”项下方法分组培养 24 h 后, 收集细胞, 按照 Total RNA Kit 试剂盒说明书提取总 RNA。反应体系按照 Real Time PCR Easy SYBR GREEN 试剂盒说明书配制, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 共循环 40 次。以 β -actin 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算相关基因 mRNA 表达。引物序列见表 1。

表1 引物序列

基因	正向序列(5'→3')	反向序列(5'→3')
<i>iNOS</i>	TCGGGTGAAGTGGTATGC	GAGGCCAGTGTGTGGGTCT
<i>COX-2</i>	GATGACTGCCCAACTCCCA	TGAACCCAGGTCCYCGGTT
<i>TNF-α</i>	CCAGACCTCACACTCAGA	GACAAGTACAACCCATCG
<i>IL-6</i>	ACAACCAGGCCTTCCCTACTT	TTTCTCATTCCAGGATTCC
<i>IL-1β</i>	CATTGTGGCTGTGGAGAAG	TGAAGAAAAGAAGGTGCT
<i>Arg-1</i>	ACGGTCTGTGGGAAAG	TCAGGGGAGTGTGATGTC
<i>IL-10</i>	GCCCTTGTCTATGGTCTC	TCTCCCTGGTTCTCTTCC
<i>β-actin</i>	CTGTCCTGTATGCCTCT	ATGTCACGCACGATTCC

2.8 Western blot 法检测炎症相关通路蛋白表达 将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板, 密度为 $6.25 \times 10^4/\text{mL}$, 按照“2.5”项下方法分组培养 24 h 后, 收集细胞, 采用 RIPA 裂解液(含 1% 蛋白酶抑制剂)提取总蛋白, 再按照细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒进行胞浆蛋白和核蛋白的提取, 采用 BCA 总蛋白定量试剂盒检测各样品中蛋白浓度。蛋白先进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 再将目的蛋白转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶封闭 1 h, TBST 洗膜, 加一抗 4 °C 孵育过夜, 次日 TBST 洗膜, 加二抗(羊抗兔)孵育 1 h, ECL 法显色, 并于显影仪上显影曝光。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理, 数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多组间比较应用单因素方差分析, 两两比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 桑枝乙醇提取物中总黄酮的含量 如图 1 所示, 芦丁对照品溶液在 11.30~67.80 mg/L 范围内线性关系良好, 回归方程为 $A = 0.00958X - 0.0233$ ($R^2 = 0.999$)。参照芦丁对照品吸光度值计算得桑枝乙醇提取物中总黄酮含量为 $(8.47 \pm 0.12)\%$ 。

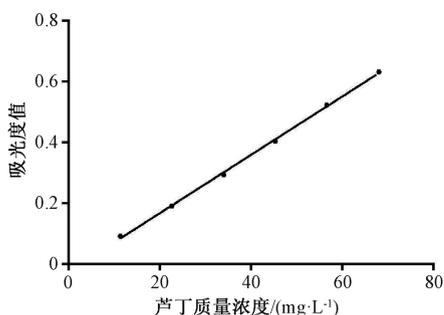
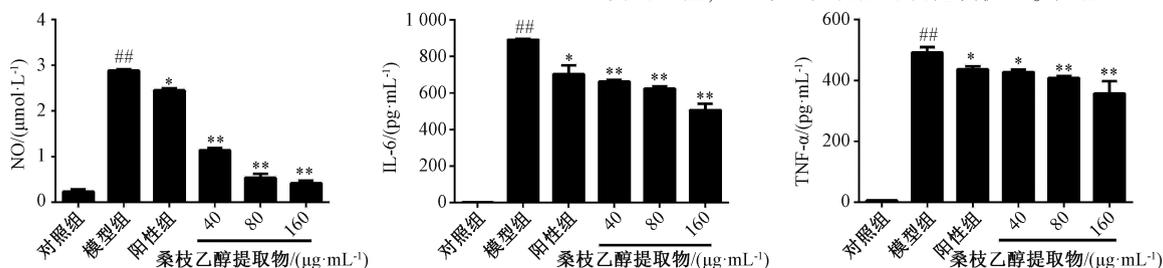


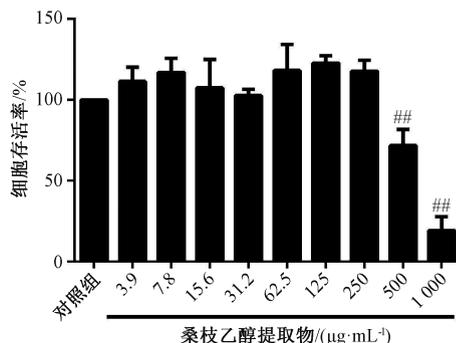
图1 标准曲线图



注: 与对照组比较, $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

图3 桑枝乙醇提取物对 RAW264.7 细胞上清液 NO、TNF-α、IL-6 水平的影响 $(\bar{x} \pm s, n = 3)$

3.2 桑枝乙醇提取物对 RAW264.7 细胞存活率的影响 如图 2 所示, 与对照组比较, 桑枝乙醇提取物在 3.9~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围内对 RAW264.7 细胞存活率无明显影响 ($P > 0.05$), 500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 桑枝乙醇提取物组细胞存活率降低 ($P < 0.01$)。因此, 本研究选择 40、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度进行后续实验。

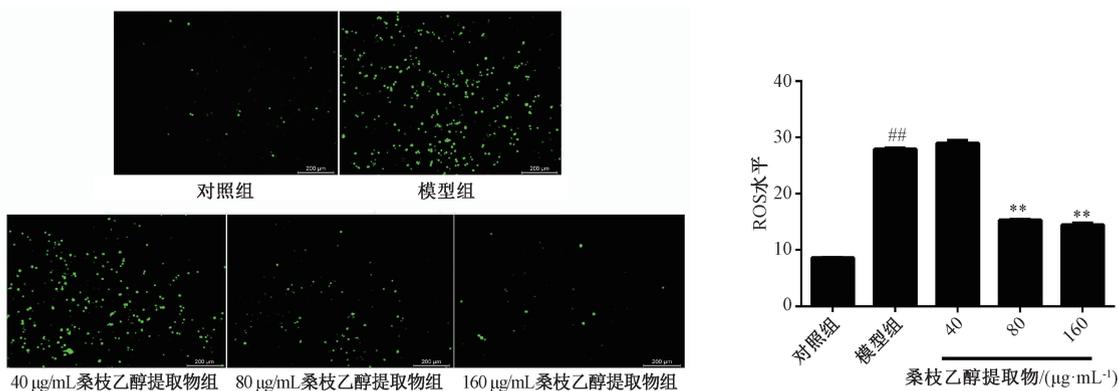


注: 与对照组比较, $^{##}P < 0.01$ 。

图2 桑枝乙醇提取物对 RAW264.7 细胞存活率的影响 $(\bar{x} \pm s, n = 3)$

3.3 桑枝乙醇提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞上清液 NO、TNF-α、IL-6 水平的影响 如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中 NO、TNF-α、IL-6 水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 桑枝乙醇提取物组可以抑制 RAW264.7 细胞 NO、TNF-α、IL-6 的释放 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示, 桑枝乙醇提取物对 LPS 诱导的炎症因子水平升高具有抑制作用, 表现出较好的剂量依赖性。

3.4 桑枝乙醇提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 ROS 水平的影响 炎症反应的发生伴随着氧化应激, 当机体发生氧化应激会产生大量的 ROS 并抑制氧自由基清除剂 SOD 等酶的活性, 最终导致细胞的氧化损伤^[9]。如图 4 所示, 与



注：与对照组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图4 桑枝乙醇提取物对 RAW264.7 细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

对照组比较，模型组 RAW264.7 细胞在 LPS 的刺激下，ROS 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，桑枝乙醇提取物干预后，细胞 ROS 水平降低 ($P<0.01$)，表明桑枝乙醇提取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 ROS 水平上调具有抑制作用。

3.5 桑枝乙醇提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症因子及 M1/M2 型标志物 mRNA 表达的影响 如图 5 所示，对照组 RAW264.7 细胞呈圆形；模型组细胞主要为梭形；而桑枝乙醇提取物组细胞随着干预剂量的增加，梭形和不规则细胞

逐渐减少，圆形细胞增多。如图 6 所示，与对照组比较，模型组细胞 *COX-2*、*iNOS*、*TNF- α* 、*IL-6* mRNA 表达升高 ($P<0.01$)，*Arg-1*、*IL-10* mRNA 表达降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，桑枝乙醇提取物组细胞 *COX-2*、*iNOS*、*TNF- α* 、*IL-6*、*IL-1 β* mRNA 表达降低 ($P<0.01$)，*Arg-1*、*IL-10* mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。提示，桑枝乙醇提取物可以降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子 mRNA 表达，并且可以调控 LPS 引起的 RAW264.7 细胞由 M1 型（标志物 *iNOS*、*TNF- α* 、*IL-6*、*IL-1 β* ）向 M2 型（标志物 *Arg-1*、*IL-10*）的转化。

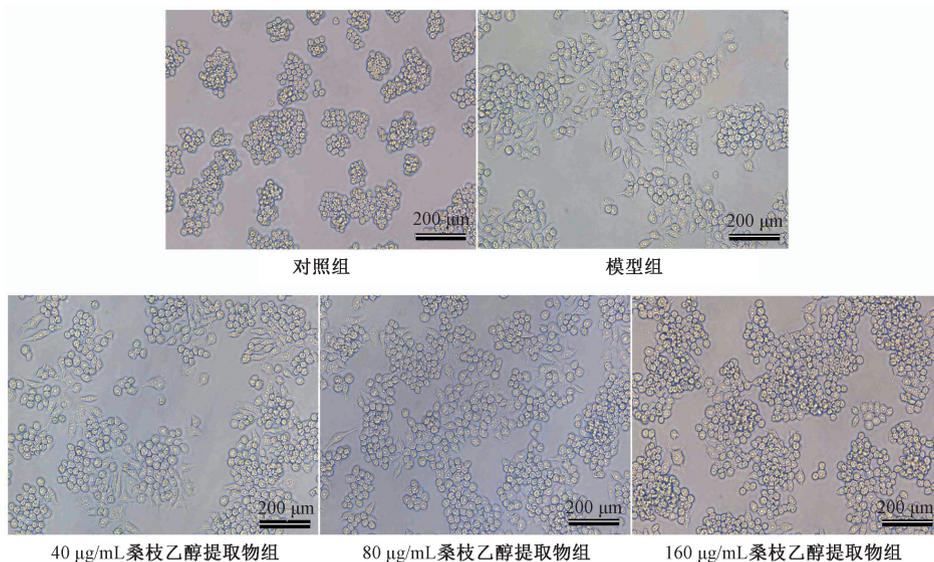


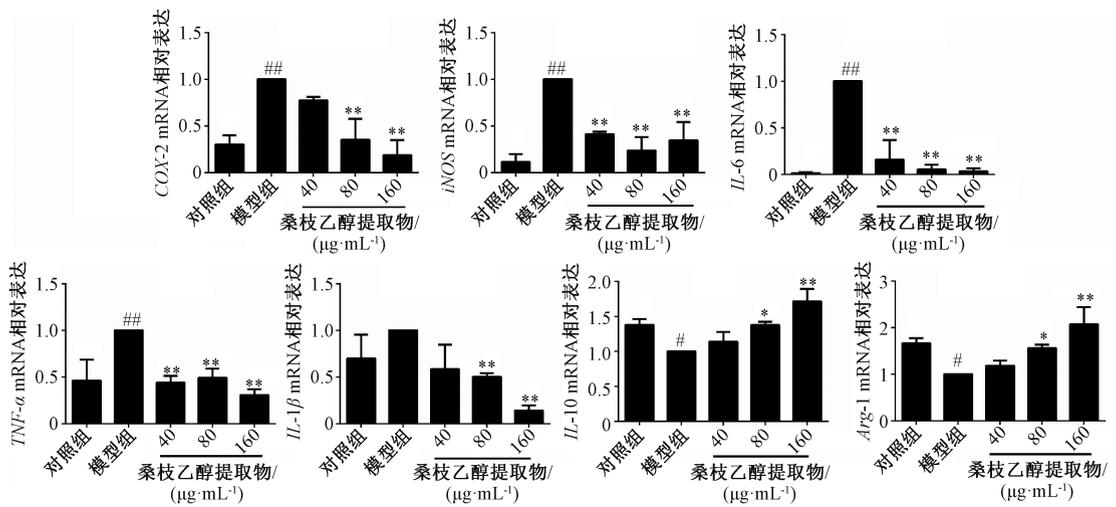
图5 各组 RAW264.7 细胞的形态学变化

3.6 桑枝乙醇提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 iNOS、COX-2 蛋白及 NF- κ B、MAPKs 信号通路相关蛋白表达的影响 如图 7 所示，与对照组比较，模型组细胞 iNOS、COX-2 蛋白、细胞核 P65/胞浆 P65 蛋白比值及 IKK α 、p38、JNK、ERK 蛋白磷酸化表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组比较，桑枝乙醇提取物干预后，细胞 iNOS、COX-2 蛋白、细胞核 P65/胞浆 P65 蛋白比值及 IKK α 、p38、JNK、ERK 蛋白磷酸化表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。提示，桑枝乙醇提取物可能通过调节 NF- κ B 和 MAPKs 这 2 条

信号通路的蛋白表达来发挥抗炎作用。

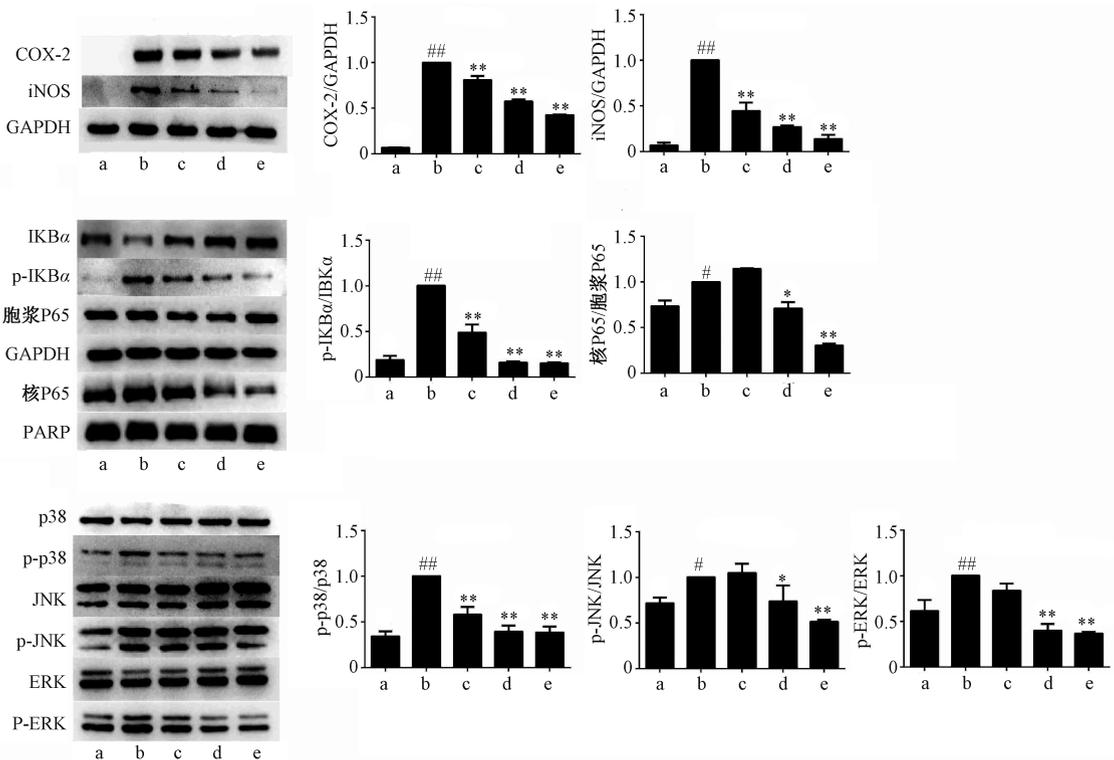
4 讨论

脂多糖是在革兰氏阴性细菌细胞壁中发现的细菌内毒素，已被广泛用于体内和体外引起各种免疫细胞的免疫应答，包括巨噬细胞的活化^[10]。RAW264.7 小鼠巨噬细胞是巨噬细胞的一种，常用作体外炎症模型^[11]。受 LPS 激活的 RAW264.7 细胞会产生大量的炎症因子，引起炎症反应和组织损伤。其中，iNOS 作为一种前促炎因子，在体内可以催化 *L-Arg* 产生 NO，而 NO 在高水平状态下，可以诱导



注：与对照组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图6 桑枝乙醇提取物对RAW264.7细胞炎症因子及M1/M2型标志物mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)



注：a~e分别为对照组、模型组及40、80、160 $\mu\text{g/mL}$ 桑枝乙醇提取物组。PARP为核蛋白内参。与对照组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图7 桑枝乙醇提取物对RAW264.7细胞iNOS、COX-2蛋白及NF- κ B、MAPKs信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

TNF- α 、IL-6和IL-1 β 等促炎因子的产生^[12-13]。COX-2是合成体内前列腺素E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂)的一种限速酶，主要由MAPKs信号通路中的ERK入核调控表达，而PGE₂在炎症反应中可以促进炎症的发生和作为诱导疼痛的炎性介质^[14]。本研究发现，桑枝乙醇提取物可以抑制LPS诱导的RAW264.7细胞炎症因子NO、TNF- α 和IL-6水平，还能降低LPS诱导的ROS水平，提示桑枝乙醇提取物对

LPS诱导的炎症具有抑制作用。

巨噬细胞的表型转化在病理进程中发挥着重要作用，M1型巨噬细胞主要发挥促炎、吞噬病原体的作用，M2型巨噬细胞主要发挥促进组织重塑、损伤修复等作用^[15-16]。本研究发现，桑枝乙醇提取物可以减少LPS诱导的梭形和不规则RAW264.7细胞形态，下调由LPS诱导的M1型标志物，同时促进M2型标志物的表达。上述结果提示，桑枝

乙醇提取物能抑制 LPS 诱导的巨噬细胞向 M1 型分化表达, 促进巨噬细胞向 M2 型分化。

CD14 是一种在髓样细胞表面上发现的相对分子量为 53 kDa 的糖蛋白^[17]。作为 LPS 受体, 它具有识别 LPS 并能与之结合, 介导 LPS 诱导的细胞信息反应。CD14 可以向受体复合物 MD-2/TLR4 发出信号以呈递 LPS, 并进一步激活 NF- κ B 和 MAPKs 信号通路^[18-19]。NF- κ B 通常以 P65-P50 这种异二聚体的形式存在于细胞质。当细胞处于静息状态时, NF- κ B 在细胞质与抑制物 I κ B α 结合, 处于非活化状态; 当细胞受到外界信号刺激, I κ B α 被磷酸化降解, 并将 P65 转位入核与 DNA 结合, 促进炎症因子 IL-6、TNF- α 等大量表达^[20-21]。本研究发现, 桑枝乙醇提取物可减少 P65 蛋白抑制物 I κ B α 磷酸化, 同时降低转运入细胞核 P65 蛋白表达。MAPKs 是真核细胞内一类家族蛋白的统称, 其信号通路的活化, 与 ERK、JNK 和 p38 的级联激活有关, 被活化的 MAPK 信号通路从细胞表面传递到细胞核, 促进了炎症因子的表达, 并触发多种生理反应^[22]。本研究发现, 桑枝乙醇提取物可以下调 p38、JNK 和 ERK 蛋白的磷酸化。

综上所述, 桑枝乙醇提取物能够较好地抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应, 其分子机制可能与抑制 NF- κ B 和 MAPKs 信号通路有关。

参考文献:

[1] 李鸿洋. 大蒜素的抗炎活性及其对 TLR4/NF- κ B/MAPKs 信号通路的影响[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2021.

[2] Kim Y S, Shin W B, Dong X, *et al.* Anti-inflammatory effect of the extract from fermented *Asterina pectinifera* with *Cordyceps militaris* mycelia in LPS-induced RAW264.7 macrophages[J]. *Food Sci Biotechnol*, 2017, 26(6): 1633-1640.

[3] Le H T T, Cho Y C, Cho S. Methanol extract of *Guettarda speciosa* Linn. inhibits the production of inflammatory mediators through the inactivation of Syk and JNK in macrophages[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3): 1783-1791.

[4] 李 静, 金倫喆. 三黄四物汤对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的抗炎作用[J]. 免疫学杂志, 2021, 37(7): 560-567.

[5] 李纪伟, 姬树青, 董雅楠. 非甾体抗炎药口服制剂治疗膝骨性关节炎[J]. 继续医学教育, 2021, 35(9): 158-160.

[6] 李顺祥, 佟志远, 颜新培, 等. 桑的药理研究及应用[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(8): 60-63.

[7] 杨 爽, 王宝莲, 李 燕. 植物桑的药理研究进展[J].

药学报, 2014, 49(6): 824-831.

[8] 徐 立. 桑树植物化学成分及活性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2006.

[9] 李泽林, 代红丽, 沈晓静, 等. 表儿茶素对急性肺损伤小鼠抗氧化应激和抗炎作用研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2021, 36(5): 848-854.

[10] Ulmer A J, Flad H, Rietschel T, *et al.* Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS) [J]. *Toxicology*, 2000, 152(1-3): 37-45.

[11] Park B S, Lee J O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes[J]. *Exp Mol Med*, 2013, 45(12): e66.

[12] 王炫瓔, 裴莉昕, 纪宝玉, 等. 山柽乙酸酯部位对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的影响[J]. 中药材, 2021, 44(9): 2205-2209.

[13] 李金牛, 乔晋琳. 一氧化氮与软组织损伤的研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2008, 30(5): 60-64.

[14] 黄 莉, 戴卫波, 赵汝运, 等. 双果喉乐汤通过调控 ERK1/2-COX-2-PGE2 信号通路对急性咽炎模型大鼠的影响[J]. 新中医, 2021, 53(15): 1-6.

[15] 张卫萍, 刘超永, 周 娟. 淫羊藿苷对脂蛋白多糖诱导的巨噬细胞 RAW264.7 细胞 M1/M2 炎症表型转化的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(10): 4239-4242.

[16] 华 荣, 陈 瑶. 益母草碱抑制 NLRP3 炎症小体过度激活调控巨噬细胞 M1/M2 表型分化[J]. 药学实践杂志, 2021, 39(2): 143-147.

[17] Miyake K. Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors [J]. *J Endotoxin Res*, 2006, 12(4): 195-204.

[18] Wright S D, Ramos R A, Tobias P S, *et al.* CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein[J]. *Science*, 1990, 249(4975): 1431-1433.

[19] Frey E A, Miller D S, Jahr T G, *et al.* Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide [J]. *J Exp Med*, 1992, 176(6): 1665-1671.

[20] Hayden M S, Ghosh S. Signaling to NF- κ B [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(18): 2195-2224.

[21] Tak P P, Firestein G S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(1): 7-11.

[22] Zhang X, Wang Y, Xiao C, *et al.* Resveratrol inhibits LPS-induced mice mastitis through attenuating the MAPK and NF- κ B signaling pathway[J]. *Microb Pathog*, 2017, 107: 462-467.