

竹节参醇提物对 LPS 诱导 RAW264. 7 细胞炎症的保护作用

代艳文^{1,2}, 杨莉¹, 万静枝¹, 袁丁¹, 王婷^{1*}

(1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002; 2. 三峡大学化学与生命科学学院, 湖北 宜昌 443002)

[摘要] 目的:观察竹节参醇提物对脂多糖(LPS)刺激小鼠单核巨噬白血病细胞 RAW264. 7 细胞炎症保护作用的初步探讨。方法:用不同质量浓度的竹节参醇提物处理 RAW264. 7 细胞, 噻唑蓝(MTT)法检测细胞活性;检测 LPS 刺激的 RAW264. 7 细胞一氧化氮(NO)释放量以及竹节参醇提物干预后 RAW264. 7 细胞 NO 释放量;酶联免疫吸附(ELISA)法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素 1 β (IL-1 β)分泌;聚合酶链反应(PCR)法检测诱导型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA 的表达;免疫印迹(Western blot)法检测胞浆核转录因子- κ B(NF- κ B)蛋白表达。结果:竹节参醇提物作用 RAW264. 7 细胞的安全范围 <100 mg·L⁻¹; LPS 的用药质量浓度为 1 mg·L⁻¹;与 LPS 模型组相比,竹节参醇提物 0. 1, 1, 10, 40 mg·L⁻¹能有效抑制 NO 释放(抑制率分别为 31. 2% , 41% , 46. 1% , 55. 2%)和抑制 TNF- α , IL-1 β 的分泌($P < 0. 05$ 或 $P < 0. 01$);竹节参醇提物 10, 40 mg·L⁻¹能下调 LPS 模型组 iNOS mRNA 表达且抑制 NF- κ B 的核移位。结论:竹节参醇提物对 LPS 刺激的 RAW264. 7 细胞炎症具有保护作用,其保护机制可能与调控 NF- κ B 通路,进而抑制 NO 的释放,降低 TNF- α , IL-1 β , iNOS 表达有关。

[关键词] 竹节参醇提物; RAW264. 7 细胞; 脂多糖; 抗炎; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素 1 β ; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

[中图分类号] R285. 5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)02-0163-04

[doi] 10. 11653/syjf2014020163

Protective Effect of *Panax japonicus* Ethanol Extract on the Inflammation of RAW264. 7 Cells Induced by LPS

DAI Yan-wen^{1,2}, YANG Li¹, WAN Jing-zhi¹, YUAN Ding¹, WANG Ting^{1*}

(1. Medical College of China Three Gorge University, Yichang 443002, China;
2. Chemistry and life science College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effect of *Panax japonicus* ethanol extract on the inflammation of mice mononuclear macrophage RAW264. 7 cells induced by lipopolysaccharide (LPS). **Method:** The RAW264. 7 cells were treated with different concentration of *P. japonicus* ethanol extract, cell viability was determined with MTT method; the nitric oxide (NO) release of RAW264. 7 cells stimulated by LPS and treated with LPS and *P. japonicus* ethanol extract was detected with Griess. ELISA were used to detect the expression of Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β); nitric oxide synthase mRNA (iNOS mRNA) and neclear factor- κ B (NF- κ B) was tested by PCR and Western bolt respectively. **Result:** The safe range of ethanol extract of *P. japonicus* is less than 100 mg·L⁻¹; Concentration of LPS was 1 mg·L⁻¹; Compared with the LPS model group, *P. japonicus* ethanol extract 0. 1, 1, 10, 40 mg·L⁻¹ could inhibit the of NO effectively, the inhibition rates were 31. 2% , 41% , 46. 1% , 55. 2% , and inhibit the release of TNF- α , IL-1 β , with significant difference ($P < 0. 05$ or $P < 0. 01$); *P. japonicus* ethanol extract 10, 40 mg·L⁻¹ could down-regulate the expression of iNOS mRNA and inhibit NF- κ B nuclear translocation. **Conclusion:** *P. japonicus* ethanol extract has protective effects on RAW264. 7 cells stimulated by LPS, the mechanism of *P. japonicus* ethanol extract may be

[收稿日期] 20130606(025)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81100957);湖北省自然科学基金项目(2010CDB10703);三峡大学博士启动基金项目(KJ2009B077)

[第一作者] 代艳文,在读硕士,从事中药药理研究,Tel:0717-6397466,E-mail:dyw891122@163.com

[通讯作者] * 王婷,医学博士,副教授,从事中药药理研究,Tel:0717-6397466,E-mail:tingting0301@126.com

related to its regulation on NF- κ B signal pathway, thereby inhibiting the release of NO and reducing the expression of TNF- α , IL-1 β and iNOS.

[Key words] *Panax japonicus* ethanol extract; RAW264.7 cells; LPS; anti-inflammatory; TNF- α ; IL-1 β ; NO; iNOS

竹节参是我国名贵中草药,具有滋补强壮、散瘀止痛、止血祛痰等多种药效。竹节参醇提物主要以齐墩果烷型皂苷为主,尚有少量达玛烷型皂苷,另含有竹节参多糖、挥发油等。药理研究显示,竹节参及其活性成分具有抗炎等多种药理作用。基于此,本研究拟建立 LPS 致小鼠单核白血病巨噬细胞株 RAW264.7 炎症模型,探讨竹节参醇提物的抗炎效果,为竹节参的研究及开发利用提供理论基础。

1 材料

1.1 药品与试剂 竹节参采自湖北恩施椿木营竹节参种植基地,经三峡大学湖北省天然产物研究与重点实验室邹坤教授鉴定为五加科人参属植物 *Panax japonicus* C. A. Mey. 醇提物干粉在本实验室提得,取竹节参干燥根茎粗粉,加入 60% 乙醇加热回流 3 次,合并滤液后浓缩干燥,得竹节参醇提物粉末,得率 25.8%,实验前用 PBS 溶解配成 1 000 mg·L⁻¹ 的母液,再用培养基稀释至所需质量浓度;小鼠 RAW264.7 细胞,细胞系购于中国科学院上海细胞库。DMEM 高糖培养基 (Gibico 公司,批号 884684);胎牛血清 (杭州四季清公司,批号 100607);脂多糖 (LPS, Sigma 公司,批号 110M4086V);Trizol, DEPC, PCR 扩增试剂盒 [生工生物工程 (上海) 有限公司,批号 A7107-1, SJ0312B4013J 和 12091564F]; PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser [宝生物工程 (大连) 有限公司,批号 BK401];一氧化氮 (NO) 试剂盒 (碧云天生物公司,批号 S0021-3);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素 1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒 (上海欣博盛生物科技有限公司,批号 M121015-12a、M121029-07a);NF- κ B 抗体 (Cell Signaling Technology 公司,批号 L8F6); β -actin、一氧化氮合酶 (iNOS) 引物 (上海生工合成,批号 8302054112、830254113 和 830205114、830254115);MTT (武汉博士德生物公司,批号 AR1156);ECL 试剂盒 (武汉科瑞生物有限公司,批号 P1010);胞浆核蛋白提取试剂盒和 BCA 蛋白定量试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司,批号 P1200、P1511)。

1.2 仪器 NU-4750E 型二氧化碳培养箱 (Nu Aire 公司), CKX41 倒置显微镜 (日本, Olympus 公司) SW-4T-2F 洁净工作台 (上海博讯实业有限公司医疗

设备厂), CT15RT 高速冷冻离心机 (上海天美生化仪器设备有限公司), Thermo 全波长酶标仪 (芬兰, Tecan Inpinifetm 200), 9902 型 PCR 扩增仪 (新加坡 AB Applied Biosystems), Gene Genius 凝胶分析系统 (英国 Syngne 公司), 165-1801 型 PCR 及 Western 电泳仪 (美国 Bio-Rad)。

2 方法

2.1 细胞培养 RAW264.7 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱内培养。取对数生长期细胞用于实验。

2.2 对细胞活力的影响 取对数期 RAW264.7 (调整细胞密度为 10⁵ 个/mL) 细胞悬液接种于 96 孔板,每孔 100 μ L, 4~6 h 贴壁后,设调零孔、空白对照组 (细胞 + 培养基)、竹节参醇提物 5, 10, 20, 40, 80, 100, 200 mg·L⁻¹ 组,每组 4 个复孔, 24 h 后吸取上清液,每孔加入含 MTT 的培养液,继续培养 4 h,弃上清,每孔加 150 μ L 二甲基亚砷 (DMSO),置摇床上低速震荡 10 min,使结晶充分溶解,在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度 (A)。

2.3 LPS 致炎浓度的确定 取对数期 RAW264.7 细胞悬液接种 96 孔板,细胞密度为 10⁵ 个/mL,每孔 100 μ L, 4~6 h 贴壁后加入 LPS 刺激,设置调零孔、空白对照组、LPS 组, LPS 刺激质量浓度为 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200 mg·L⁻¹, 每组 4 个复孔。24 h 后用 Griess 法检测细胞上清液 NO 含量。

2.4 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 NO, TNF- α , IL-1 β 的影响 取对数期 RAW264.7 细胞悬液接种 24 孔板,细胞密度为 5 $\times$ 10⁵ 个/mL,每孔 1 mL, 4~6 h 贴壁后,同时加入竹节参醇提物 0.1, 1, 10, 40 mg·L⁻¹ 和 LPS 1 mg·L⁻¹ 作用,设调零孔、空白对照组、LPS 组、LPS + 竹节参醇提物组,每组 4 个复孔, 24 h 后,用 Griess 法检测上清 NO 释放量, ELISA 试剂盒检测上清 TNF- α , IL-1 β 分泌情况。

2.5 iNOS mRNA 表达的检测 采用 PCR 法。取对数期 RAW264.7 细胞悬液接种 6 孔板,细胞密度为 10⁶ 个/mL,每孔 2 mL, 4~6 h 贴壁后,先加入竹节参醇提物 10, 40 mg·L⁻¹ 保护 12 h,再加入 LPS 1 mg·L⁻¹ 刺激 12 h,设为调零孔、空白对照组、LPS 组、LPS + 竹节参醇提物组, 12 h 后,按 Trizol 试剂盒提取总 RNA,反转录为 cDNA,然后扩增 iNOS 基因。

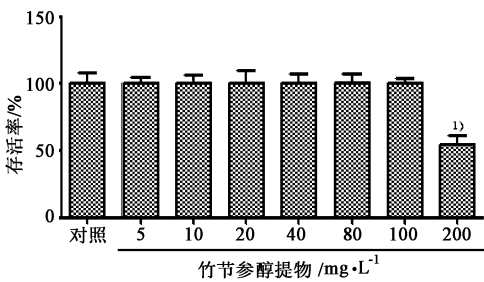
iNOS 引物上游:5'-GCCCTGCTTTGTGCGAAG-3';下游:5'-GCCCTTTGTGCTGGGAGTC-3',扩增条件 94℃ 5 min,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 40 s,GOTO2,34 次,72℃ 5 min,产物 500 bp;内参 β -actin 引物上游:5-CGTGCGTGACATCAAAGAGAA-3',下游:5'-TGGATGCCACAGGATTCCAT-3',扩增条件 94℃ 5 min,94℃ 30 s,58℃ 40 s,72℃ 10 s,GOTO2,34 次,72℃ 5 min,产物 201 bp,琼脂糖凝胶电泳检测 iNOS 表达情况。

2.6 RAW264.7 胞浆胞核 NF- κ B 蛋白表达检测
采用 Weestern blot 法。分组剂量同 2.5。取对数期 RAW2647 细胞悬液(调细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$,接种 6 孔板,每孔 2 mL,4.6 h 贴壁后,先加入竹节参总提物 10,40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,保护 20 h,再加入 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 刺激 4 h,2 h 后,提取胞浆胞核蛋白,检测细胞 NF- κ B 蛋白表达情况,采用 BCA 蛋白定量法检测各组细胞胞浆胞核浓度,95℃ 灭活蛋白 5~10 min,SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,ECL 显色。

2.7 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 软件,PCR 与 Western 数据采用 Image J 软件分析,组间用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对细胞活力的影响 竹节参醇提物 5~100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对细胞活力无明显影响,200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,与空白对照组相比,细胞活力明显下降至 54.8% ($P < 0.01$)。见图 1。



与空白对照组比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (图 2 同)

图 1 竹节参醇提物对 RAW264.7 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.2 LPS 致炎浓度的确定 LPS 能有效诱导 RAW264.7 细胞释放 NO,与空白对照组相比,1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放 NO 是正常组的 2.4 倍 ($P < 0.01$),并呈剂量依赖性。见图 2。

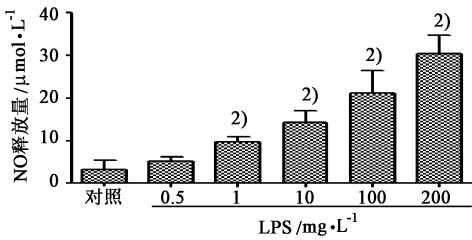
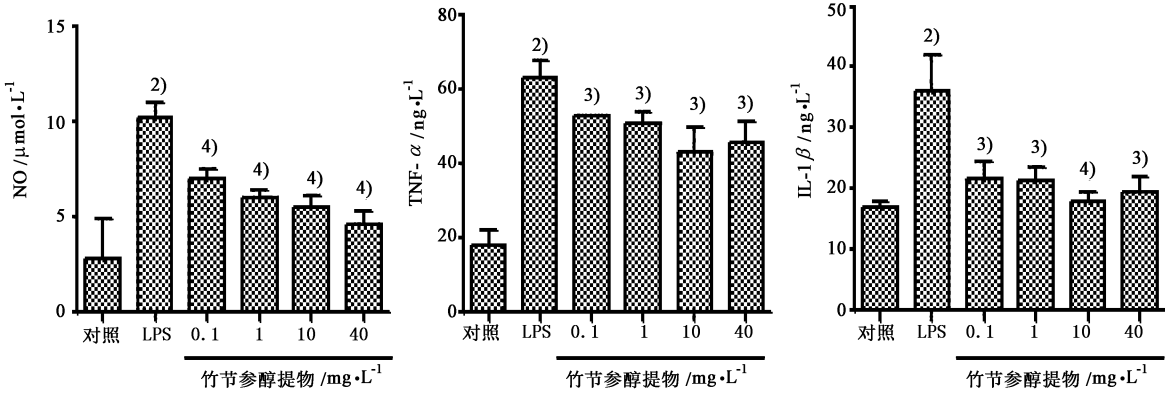


图 2 LPS 致 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.3 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 NO, TNF- α , IL-1 β 的影响 与空白对照组相比,LPS 组处理后,NO, TNF- α ,IL-1 β 释放量显著升高;与 LPS 组相比,竹节参醇提物各组均能显著抑制 NO(0.1,1,10,40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的抑制率为 31.2%,41%,46.1%,55.2%),TNF- α ,IL-1 β 释放量。见图 3。



与空白对照组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (图 4-5 同)

图 3 竹节参醇提物对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 NO, TNF- α , IL-1 β 释放量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.4 对 iNOS mRNA 表达的影响 与空白对照组相比,LPS 模型组 iNOS mRNA 表达显著升高;与 LPS 组相比,竹节参醇提物各剂量组均能显著抑制 iNOS mRNA 表达。见图 4。

3.5 对胞浆胞核 NF- κ B 蛋白表达的影响 与空白对照组相比,LPS 模型组胞浆内 NF- κ B 蛋白表达降低,胞核内 NF- κ B 蛋白表达升高;与 LPS 组相比,竹

节参醇提物能升高胞浆内 NF- κ B 蛋白表达,降低胞核内 NF- κ B 蛋白表达。见图 5。

4 讨论

体内有数十种炎症介质参与了炎症反应,其中 NO, IL-1 β , TNF- α 是重要的炎症细胞因子,均可促进炎症反应和组织损伤^[2]。研究发现,竹节参及其活性成分具有抗炎等多种药理活性^[3-4]。本实验发

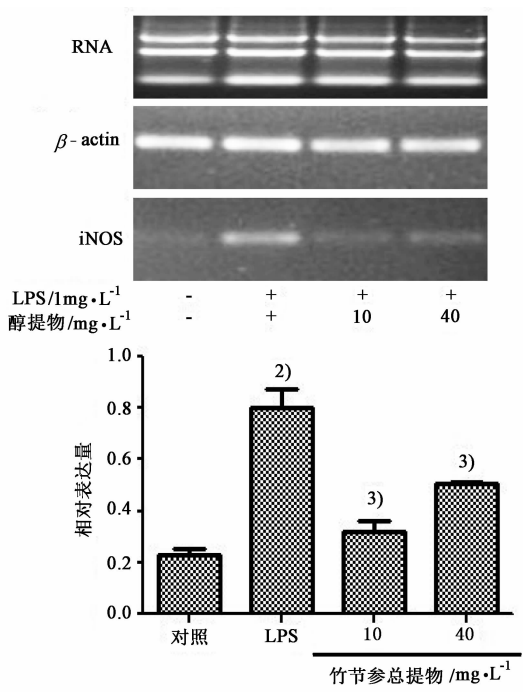


图 4 竹节参醇提取物对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 iNOS mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

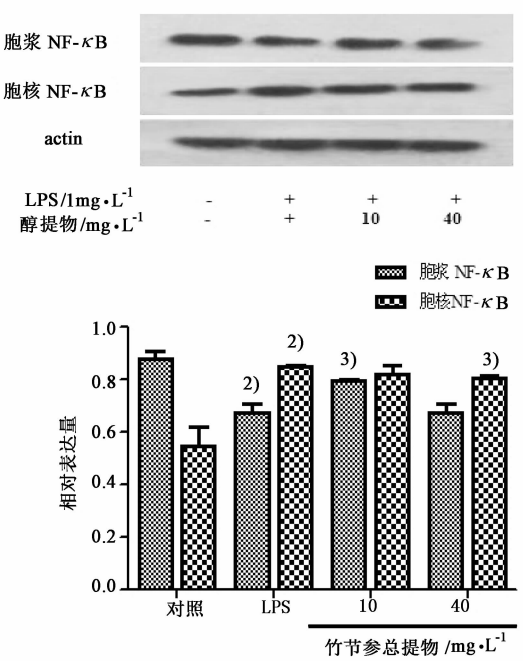


图 5 竹节参醇提取物对 LPS 刺激 RAW264.7 胞浆胞核 NF-κB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

现,当竹节参醇提取物在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下时对细胞无明显影响,提示其安全用药范围在 $\leq 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。NO 参与多种生理和病理过程。在体内 NO 是由 NOS 催化 L-精氨酸 (L-Arg) 产生。NOS 主要包括神经型 (nNOS)、内皮型 (eNOS) 和诱导型 (iNOS) 3 种,其中 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 NO 则会促进炎症性疾病

的发生和发展^[5-6]。竹节参醇提取物各剂量均能有效抑制 LPS 组 NO 的释放。TNF-α 在机体的免疫中发挥着重要作用。IL-1β 由激活的单核和巨噬细胞分泌,内毒素能够诱导其产生,是机体早期炎症的标志物,主要生物学特性是介导炎症反应,此外还能诱导炎症因子如 IL-6,IL-8 等的产生^[7-8]。本实验发现,竹节参各剂量组均能显著抑制 TNF-α 和 IL-1β 释放及 iNOS mRNA 表达。NF-κB 是早期核转录因子,参与免疫反应的早期和炎症反应各阶段的许多分子都受 NF-κB 的调控,在静息状态下,NF-κB 和 IκB 形成复合体存在于胞浆中。当受到刺激后,IκB 激酶复合体 (IκB kinase, IKK) 活化将 IκB 磷酸化,使 NF-κB 与 IκB 解离,游离的 NF-κB 迅速移位到细胞核,诱导相关基因转录。本实验结果显示,当 RAW264.7 细胞受到 LPS 刺激后,NF-κB 发生了核移位,而竹节参醇提取物能抑制 NF-κB 的核移位。

综上,竹节参醇提取物对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞炎症具有一定的保护作用,其保护机制可能与其能调控 NF-κB 通路,进而抑制 NO 的释放、降低 iNOS,TNF-α 和 IL-1β 表达有关。但调控 NF-κB 的上游分子很多,竹节参醇提取物如何通过上游分子调控 NF-κB 仍需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 赵晖,张秋霞,穆阳.竹节参总皂苷对脑缺血损伤大鼠海马一氧化氮合酶的影响[J].中国中药杂志,2008,33(5):557.
- [2] 李艳丽,胡彦武.紫花地丁抗炎作用及机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(24):244.
- [3] 敖明章.竹节参皂苷抗炎抗风湿作用及机理研究[D].湖北:华中科技大学,2012:1.
- [4] 袁丁,姚琦,张长城.竹节参总皂苷对佐剂关节炎大鼠血清 TNF-α 和 IL-1β 表达的影响[J].山东医药,2009,49(19):4.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 朱明琼,邝国平.白介素-1 与眼底病变[J].现代医药卫生,2013,29(2):235.
- [8] 姚艳敏,徐彤彤,武琦,等.兔急性肺血栓栓塞症血清 TNF-α,IL-1β 和 IL-4 的变化[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(8):222.

[责任编辑 李玉洁]