

蛇葡萄素 F 对脂多糖致炎模型细胞的抗炎作用及其机制研究^Δ

梁晓玲*, 马利, 赖月花, 侯连兵[#](南方医科大学南方医院药学部, 广州 510515)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)14-1927-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.14.13

摘要 目的:研究蛇葡萄素 F(AMPF)对脂多糖(LPS)致炎模型细胞的抗炎作用及其机制。方法:以 RAW264.7 细胞为模型细胞,采用 CCK-8 法测定不同质量浓度(100、40、20、10、5 μg/mL)的 AMPF 处理不同时间(24、48、72 h)后的细胞活性。设正常对照组、模型组和 AMPF 高、中、低剂量组(40、20、10 μg/mL),分别未加药物处理或加入相应质量浓度的 AMPF 溶液处理后培养 24 h[除正常对照组外,其余各组均在培养 1 h 时加入 LPS(1 μg/mL)致炎造模]。测定各组细胞中白细胞介素 1β(IL-1β)、IL-6、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)和一氧化氮(NO)的含量,以及环氧合酶 2(COX-2)和一氧化氮合酶(iNOS)的蛋白表达水平。结果:当培养时间为 24 h 时,AMPF 各质量浓度组(100、40、20、10、5 μg/mL)细胞存活率均高于 90%,AMPF 未对细胞产生明显毒性。与模型组比较,AMPF 高、中、低剂量组细胞中 IL-1β 的含量和 iNOS 的蛋白表达水平均显著降低,高剂量组细胞中 IL-6、TNF-α、NO 的含量均显著降低,高、中剂量组细胞中 COX-2 的蛋白表达水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),并呈现一定的剂量依赖性。结论:AMPF 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症具有显著的抑制作用,其机制可能与 AMPF 调控 COX-2 和 iNOS 的表达,进而抑制 NO 的释放,降低 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的含量有关。

关键词 蛇葡萄素 F; RAW264.7 细胞; 脂多糖; 炎症; 炎症因子

Study on Anti-inflammatory Effect of Ampelopsin F on Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Model Cells and Its Mechanism

LIANG Xiaoling, MA Li, LAI Yuehua, HOU Lianbing (Dept. of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the anti-inflammatory effect of ampelopsin F (AMPF) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory model cells and its mechanism. METHODS: Using RAW264.7 cell as model cell, CCK-8 assay was used to determine the activity of cell after treated for different duration (24, 48, 72 h) with different concentration (100, 40, 20, 10, 5 μg/mL) of AMPF. Then the cells were divided into control group, model group and AMPF high-dose, medium-dose and low-dose groups (40, 20, 10 μg/mL). They were cultured without or with relevant AMPF solution for 24 h [Except for normal control group, other groups received LPS (1 μg/mL) to induce inflammatory model after cultured for 1 h]. The contents of IL-1β, IL-6, TNF-α and NO, the protein expression of COX-2 and iNOS were detected in cell culture supernatant. RESULTS: After cultured for 24 h, survival rates of cells in AMPF groups (100, 40, 20, 10, 5 μg/mL) were all higher than 90%, showing no obvious cytotoxicity of AMPF. Compared with model group, the content of IL-1β and the protein expression of iNOS were decreased significantly in AMPF high-dose, medium-dose and low-dose groups; the contents of IL-6, TNF-α and NO were decreased significantly in AMPF high-dose group; the protein expression of COX-2 were decreased significantly in AMPF high-dose and medium-dose groups, with statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), in dose-dependent manner. CONCLUSIONS: AMPF shows significant anti-inflammatory effect on LPS-induced RAW264.7 cell inflammation, the mechanism of which may be associated with regulating the expression of COX-2 and iNOS, inhibiting the release of NO and decreasing the contents of IL-1β, IL-6, TNF-α and NO.

KEYWORDS Ampelopsin F; RAW264.7 cells; Lipopolysaccharide; Inflammation; Inflammatory factor

[12] 李宇璐, 马国需, 袁经权, 等. 不同产地金樱子根 UPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国药师, 2017, 20(3): 409-412.

[13] 冯阳, 陈玉梅, 辛华. 广西金樱子 HPLC 指纹图谱[J]. 中国

Δ 基金项目: 广东省社会发展领域科技计划项目(No. 粤科规财字 [2014]116 号-2013B021800150)

* 硕士研究生。研究方向: 抗炎药物。E-mail: A2166806@qq.com

通信作者: 主任药师, 教授, 博士生导师。研究方向: 天然药物设计与药理学评价。电话: 020-62787163。E-mail: hlianbing@163.com

实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 79-83.

[14] 汪海斌, 石岩, 李芳, 等. 中药黄芪指纹图谱的研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(33): 4749-4752.

[15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 7-8.

[16] 于爱平, 张丹, 郭喜红. 紫外分光光度法测定洋葱提取物中总黄酮的含量[J]. 中国药房, 2005, 16(19): 1498-1499.

(收稿日期: 2018-02-27 修回日期: 2018-05-18)

(编辑: 陈宏)

金刚藤又名菝葜,为百合科植物菝葜(*Smilax china* L.)的根茎,具有祛风、活血、解表、收敛止血等功效^[1];其相关制剂用于慢性盆腔炎的临床治疗效果也得到了证实^[2]。本课题组前期研究发现,金刚藤总黄酮提取物对慢性盆腔炎模型大鼠具有良好的药效^[3-4]。Jin Q等^[5]从金刚藤总黄酮提取物中分离出多个单体成分,蛇葡萄素F(Ampelopsin F, AMPF)作为其中具有抗慢性盆腔炎作用的单体化合物之一,已被证实具有抗氧化活性。但关于AMPF的药理药效学等方面的研究报道甚少。小鼠腹腔巨噬细胞系RAW264.7具有免疫调节作用,常作为免疫相关研究的模型细胞系^[6]。为探索金刚藤的抗炎药效物质基础,本课题组根据文献^[7]方法以RAW264.7细胞构建脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞炎症模型,考察AMPF的抗炎作用,并通过细胞中炎症蛋白环氧合酶2(COX-2)和一氧化氮合酶(iNOS)的表达变化探索AMPF的抗炎作用机制,以期深入开发传统中药材中的有效抗炎单体。

1 材料

1.1 仪器

Tanon-5200型电化学分析仪(上海天能科技有限公司);PowerPac系列Bio-Rad电泳仪(美国伯乐公司);SpectraMax M5型多功能酶标仪(美国MDS公司);1285型CO₂细胞培养箱(美国Thermo Electron公司)。

1.2 药品与试剂

AMPF标准品(武汉天植生物技术有限公司,批号:CFS201701,纯度:98%);CCK-8细胞增殖毒性检测试剂盒(美国Bimake公司);LPS(美国Sigma公司);胎牛血清(FBS)、胰酶、DMEM高糖培养基(美国Gibco公司);白细胞介素1 β (IL-1 β ,批号:CSB-E08054m)、IL-6(批号:CSB-E04639m)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α ,批号:CSB-E08054m)、酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司;总蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号:20170112);一氧化氮(NO)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:20170211);其余试剂均为市售分析纯,水为双蒸水。

1.3 细胞

小鼠腹腔巨噬细胞系RAW264.7购自中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

RAW264.7细胞采用含10%FBS的DMEM高糖培养基,于37℃、5%CO₂培养箱中培养,细胞隔天进行一次传代。待细胞生长至对数生长期后,经胰酶消化后,加入含10%FBS的DMEM高糖培养基吹打均匀,配制成细胞悬液,调整细胞密度为1 \times 10⁵个/mL,待用。

2.2 AMPF溶液配制

取AMPF标准品5mg,以500 μ L甲醇溶解制成10mg/mL的母液;取AMPF标准品母液适量,用含10%FBS的DMEM高糖培养基稀释,制成终质量浓度分别为

100、40、20、10、5 μ g/mL的AMPF溶液,用于后续试验。

2.3 AMPF对细胞活性的影响考察

取“2.1”项下RAW264.7细胞悬液接种于96孔板,每孔100 μ L,设AMPF不同质量浓度组[AMPF终质量浓度分别为100、40、20、10、5、0(空白) μ g/mL],每个质量浓度组设3个复孔,分别加入相应质量浓度的AMPF溶液,于37℃、5%CO₂条件下分别培养24、48、72h。弃去上清液,每孔加入CCK-8试剂10 μ L、含10%FBS的DMEM高糖培养基90 μ L,避光继续培养1h。采用酶标仪,在450nm波长处测定各孔的吸光度(OD),计算细胞存活率[细胞存活率(%)=(OD_{样品}-OD_{空白})/OD_{空白} \times 100%]。

2.4 AMPF对LPS致炎细胞中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量的影响考察

采用ELISA法测定IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量。取“2.1”项下RAW264.7细胞悬液接种于6孔板,每孔2mL,设正常对照组、模型组和AMPF高、中、低剂量组(AMPF终质量浓度分别为40、20、10 μ g/mL),正常对照组与模型组未加入药物处理,在37℃、5%CO₂条件下培养24h[除正常对照组外,其余各组均在培养1h时加入LPS溶液(LPS终质量浓度为1 μ g/mL)以诱导细胞炎症]。取各组细胞上清液,采用IL-1 β 、IL-6和TNF- α 检测试剂盒,按照说明书步骤操作进行含量测定。

2.5 AMPF对LPS致炎细胞中COX-2和iNOS蛋白表达水平的影响考察

采用Western blot法测定COX-2和iNOS蛋白表达水平。按“2.4”项下方法进行细胞接种、分组、给药、造模、培养。取各组细胞上清液,提取COX-2和iNOS总蛋白,具体操作均按照总蛋白提取试剂盒说明书步骤进行。所得蛋白置于100℃水浴5~10min灭活后,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,转膜,电化学分析仪拍照。通过Image J 1.8.0软件分析蛋白电泳条带的灰度值并与内参(GADPH)灰度值比较,计算得相对灰度值用以表示相关蛋白表达水平。

2.6 AMPF对LPS致炎细胞中NO含量的影响考察

按“2.4”项下方法进行细胞接种、分组、给药、造模、培养。取各组细胞上清液,采用NO检测试剂盒,按照说明书步骤操作进行含量测定。

2.7 统计学方法

采用GraphPad Prism 5.01软件处理试验数据。计量资料以平均值表示,采用单因素方差分析进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

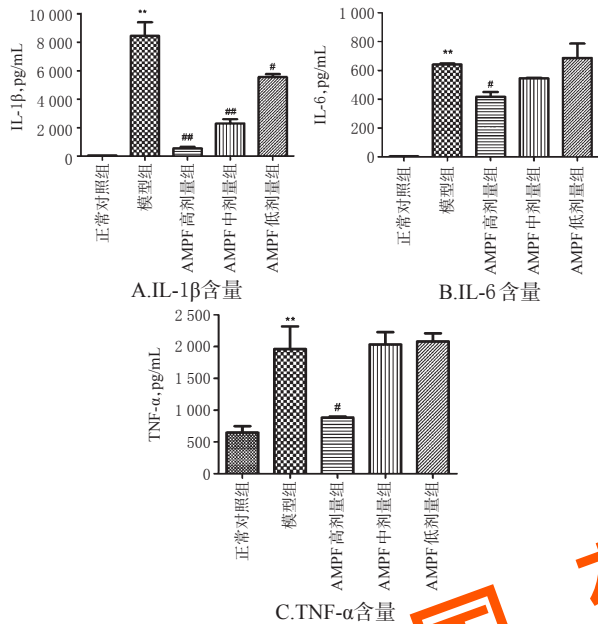
3 结果

3.1 各组细胞存活率测定结果

细胞活性考察结果显示,当培养时间为24h时,AMPF各质量浓度组(100、40、20、10、5 μ g/mL)细胞存活率均高于90%,表明细胞活性较好。本课题组选择中间3个质量浓度梯度(40、20、10 μ g/mL)进行后续试验。

3.2 各组细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量测定结果

与正常对照组比较,模型组细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,AMPF 高、中、低剂量组细胞中 IL-1 β 的含量均显著降低,AMPF 高剂量组细胞中 IL-6、TNF- α 的含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量比较见图 1。



注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$
 Note: vs. normal control group,** $P < 0.01$; vs. model group,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

图 1 各组细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量比较
 Fig 1 Comparison of the contents of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in each group

3.3 各组细胞中 COX-2 和 iNOS 的蛋白表达水平测定结果

与正常对照组比较,模型组细胞中 COX-2 和 iNOS 的蛋白表达水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,AMPF 高、中剂量组细胞中 COX-2 的蛋白表达水平均显著降低,AMPF 高、中、低剂量组细胞中 iNOS 的蛋白表达水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组细胞中 COX-2 和 iNOS 的蛋白表达电泳图见图 2,蛋白表达水平比较见图 3。

3.4 各组细胞中 NO 的含量测定结果

与正常对照组比较,模型组细胞中 NO 的含量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,AMPF 高剂量组细胞中 NO 的含量显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组细胞中 NO 的含量比较见图 4。

4 讨论

炎症是一种伴随多种疾病状态的病理现象,巨噬细胞

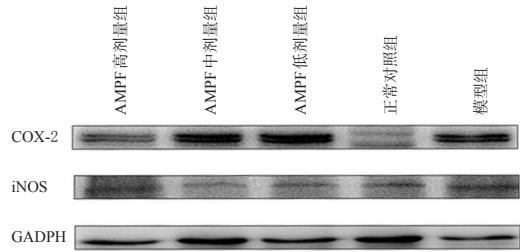
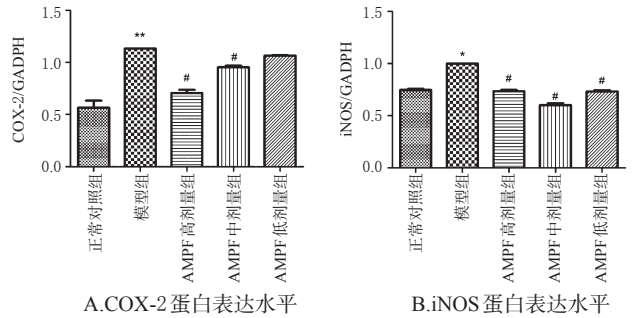
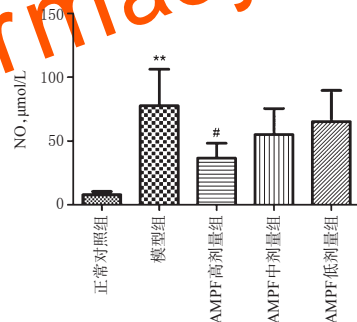


图 2 各组细胞中 COX-2 和 iNOS 的蛋白表达电泳图
 Fig 2 Electrophoresis chart of the protein expression of COX-2 and iNOS in each group



注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$
 Note: vs. normal control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; vs. model group,# $P < 0.05$

图 3 各组细胞中 COX-2 和 iNOS 的蛋白表达水平比较
 Fig 3 Comparison of the protein expression levels of COX-2 and iNOS in each group



注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$
 Note: vs. normal control group,** $P < 0.01$; vs. model group,# $P < 0.05$

图 4 各组细胞中 NO 的含量比较

Fig 4 Comparison of NO content in each group

是机体主要的炎症细胞之一。有研究发现,当巨噬细胞受到外界抗原(如 LPS)刺激时,会释放 NO、IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子,它们可促进炎症反应和组织损伤^[8-9]。RAW264.7 细胞属于小鼠巨噬细胞系,常被应用于炎症反应的研究。本试验采用不同质量浓度的 AMPF(100、40、20、10、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作用于 RAW264.7 细胞,以考察 AMPF 对细胞活性的影响。结果发现,上述不同质量浓度的 AMPF 作用于细胞 24 h 后,细胞存活率均高于 90%,表明细胞活性较好,AMPF 未对细胞产生明显毒性,因此选择 40、20、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个质量浓度梯度的 AMPF 进行后续试验。

IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 是机体早期炎症标志物,由单核-巨噬细胞系统和内皮细胞分泌产生,其主要生物学特性是介导炎症反应^[10-11]。本试验采用 ELISA 法测定 LPS 致炎细胞经 AMPF (40、20、10 $\mu\text{g/mL}$) 处理后培养上清液中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量,结果显示, AMPF 能够抑制细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的释放,并呈现一定的剂量依赖性,其中 40、20、10 $\mu\text{g/mL}$ 的 AMPF 能显著抑制 IL-1 β 的释放,40 $\mu\text{g/mL}$ 的 AMPF 能显著抑制 IL-6 和 TNF- α 的释放。

在生理状态下,COX-2 在绝大多数组织细胞中不表达,只有在细胞受到各种刺激(包括生长因子和细胞因子、血清、促癌剂、癌基因、NO 等)时才诱导性表达^[12-13]。NO 作为炎症发展过程中的促炎因子,参与多种生理和病理过程:在体内,iNOS 主要是在炎症和免疫刺激下表达,进而催化 L-精氨酸生成 NO,过量的 NO 则会促进炎症性疾病的发生和发展^[14]。本试验分别用不同质量浓度的 AMPF 处理 LPS 致炎细胞,结果发现 40 $\mu\text{g/mL}$ 的 AMPF 能显著抑制细胞中 NO 的释放。通过 Western Blot 法测定各组细胞中 COX-2 和 iNOS 的蛋白表达水平,结果显示 40、20 $\mu\text{g/mL}$ 的 AMPF 能显著抑制细胞中 COX-2 的蛋白表达,40、20、10 $\mu\text{g/mL}$ 的 AMPF 能显著抑制 iNOS 的蛋白表达。本研究结果显示,当细胞受到 LPS 刺激后,胞内 COX-2 和 iNOS 的蛋白表达均显著增强,表明炎症通路被激活;而 AMPF 能够抑制 COX-2 和 iNOS 的蛋白表达,这可能是其抗炎作用的机制之一。

此外有研究发现,LPS 作用于 Toll 样受体后,能激活核因子- κB (NF- κB) 信号通路进而激活 COX-2/前列腺素 E₂ (PGE₂) 信号通路,使炎症细胞释放促炎因子和细胞毒性物质,如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NO、PGE₂ 等^[15]。NF- κB 是早期核转录因子,对参与免疫反应各阶段的许多分子都具有调控作用。在炎症相关蛋白 COX-2 和 iNOS 的上游,是否存在与 AMPF 抗炎作用密切相关的关键靶点如 NF- κB ,仍有待进一步研究。

综上所述,AMPF 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症具有显著的抑制作用,其机制可能与 AMPF 能调控 COX-2 和 iNOS 的蛋白表达,进而抑制 NO 的释放,降低 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量有关。但其明确的作用机制仍有待后续深入研究证实。

参考文献

[1] 罗艳琴,马云,宋路瑶,等. 菝葜有效成分及其药理作用概述[J]. 中药材,2013,36(3):502-504.
[2] 唐晓容. 金刚藤胶囊治疗慢性盆腔炎疗效观察[J]. 中国保健营养,2013,23(2):355.
[3] 罗艳琴,马云,宋路瑶,等. 菝葜活性成分对慢性盆腔炎大鼠子宫组织肿瘤坏死因子 α 和白介素 4 的影响[J]. 南方医科大学学报,2014,34(2):236-240.

[4] SONG L, TIAN L, MA Y, et al. Protection of flavonoids from Smilax China L. rhizome on phenol mucilage-induced pelvic inflammation in rats by attenuating inflammation and fibrosis[J]. *J Funct Foods*, 2017, 28: 194-204.
[5] JIN Q, HAN XH, HONG SS, et al. Antioxidative oligostilbenes from Caragana sinica[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(2): 973-976.
[6] LIU F, ZHANG X, LING P, et al. Immunodulatory effects of xanthan gum in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages[J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 169: 65-74.
[7] DONG J, LI J, CUI L, et al. Cortisol modulates inflammatory responses in LPS-stimulated RAW264.7 cells via the NF- κB and MAPK pathways[J]. *BMC Vet Res*, 2018. DOI: 10.1186/s12917-018-1360-0.
[8] WENG L, ZHANG H, LI X, et al. Ampelopsin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response through the inhibition of the NF- κB and JAK2/STAT3 signaling pathways in microglia[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 44: 1-8.
[9] AIGHAMDI AS, FOSTER DN, CARLSON CS, et al. Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2005, 53(5): 230-237.
[10] LI D, REN Y, FAN H. The classification of macrophages and their regulatory functions[J]. *Chinese Bulletin of Life Science*, 2011, 23(3): 249-254.
[11] ABDALLAH HM, ABDEL-NAIM AB, ASHOUR OM, et al. Anti-inflammatory activity of selected plants from Saudi Arabia[J]. *Z Naturforsch C*, 2014, 69(1/2): 1-9.
[12] AMARAVANI M, PRASAD NK, RAMAKRISHNA V. COX-2 structural analysis and docking studies with gallic acid structural analogues[J]. *Springer Plus*, 2012. DOI: 10.1186/2193-1801-1-58.
[13] KOSIK-BOGACKA DI, BARANOWSKA-BOSIACKA I, KOLASA-WOŁOSIUK A, et al. The inflammatory effect of infection with Hymenolepis diminuta via the increased expression and activity of COX-1 and COX-2 in the rat jejunum and colon[J]. *Exp Parasitol*, 2016, 169: 69-76.
[14] 代艳文,袁丁,万静枝,等. 竹节参总皂苷通过 NF- κB 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.
[15] ECHIZEN K, HIROSE O, MAEDA Y, et al. Inflammation in gastric cancer: interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways[J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(4): 391-397.

(收稿日期:2017-11-14 修回日期:2018-05-22)

(编辑:段思怡)