

岭南山竹子醇提物对LPS致RAW264.7细胞炎性损伤的保护作用研究[△]

黄雷^{1,2*}, 刘美琼², 张小曼², 苏少锋², 邹小琴³, 钟小斌^{1#a}, 冯洁^{2#b}(1.广西医科大学附属琅东医院药学部, 南宁 530029; 2.广西医科大学药学院中药学教研室, 南宁 530021; 3.广西医科大学第一附属医院科研部, 南宁 530021)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)14-1719-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.14.11

摘要 目的:探讨岭南山竹子70%乙醇提取物(GOEE)对脂多糖(LPS)致RAW264.7细胞炎性损伤的保护作用及其潜在分子机制。方法:取岭南山竹子果皮用70%乙醇回流提取,制得GOEE。采用Folin-Ciocalteu法和紫外-可见分光光度法分别测定GOEE中总多酚和总黄酮的含量。采用MTT法检测不同剂量GOEE的细胞毒性;以LPS诱导小鼠单核巨噬细胞RAW264.7建立炎症模型,分别以地塞米松、*N*-乙酰基-*L*-半胱氨酸为阳性对照,采用Griess法和2',7'-二氯荧光素法检测细胞培养液中一氧化氮(NO)和细胞中活性氧(ROS)的含量;采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定细胞培养液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)和IL-1 β 水平;采用Western blotting法测定细胞中p65蛋白(p65)、磷酸化p65(p-p65)、核因子 κ B抑制蛋白 α (I κ B α)、磷酸化I κ B α (p-I κ B α)、血红素加氧酶-1(HO-1)以及细胞核内核因子E2相关因子2(NRF2)蛋白的表达水平。结果:GOEE中总多酚与总黄酮的含量分别为(20.191 \pm 1.264)、(12.571 \pm 0.020)mg/g。当剂量 \leq 500 μ g/mL时,GOEE对RAW264.7细胞存活率无显著影响($P > 0.05$)。与对照组比较,LPS模型组NO、ROS含量,TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平,p-p65/p65和p-I κ B α /I κ B α 比值以及NRF2蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与LPS模型组比较,阳性对照组和GOEE各处理组细胞NO(除GOEE 50 μ g/mL处理组外)、ROS含量,TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平以及p-p65/p65和p-I κ B α /I κ B α 比值均显著降低,HO-1、NRF2蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:GOEE可通过抑制炎症反应、抑制核因子 κ B通路磷酸化、促进NRF2蛋白入核等途径来减轻LPS诱导的小鼠巨噬细胞炎性损伤。

关键词 岭南山竹子;果皮;醇提物;抗炎作用;核因子 κ B;核因子E2相关因子2;小鼠巨噬细胞;RAW264.7

Study on Protective Effects of the Ethanol Extract of *Garcinia oblongifolia* on LPS-induced RAW264.7 Cell Inflammatory Injury

HUANG Lei^{1,2}, LIU Meiqiong², ZHANG Xiaoman², SU Shaofeng², ZOU Xiaoqin³, ZHONG Xiaobin¹, FENG Jie² (1. Dept. of Pharmacy, Langdong Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530029, China; 2. TCM Teaching and Research Section, School of Pharmaceutical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. Dept. of Scientific Research, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the anti-inflammatory activity of 70% ethanol extracts from *Garcinia oblongifolia* (GOEE) on LPS-induced RAW264.7 cells and its potential molecular mechanism. METHODS: GOEE was obtained after the fresh *G. oblongifolia* epicarp refluxed with 70% ethanol. The contents of total phenol and total flavonoids were determined by Folin-Ciocalteu assay and UV spectrophotometer. MTT assay was used to detect the cytotoxicity of different doses of GOEE. The inflammatory model was induced in RAW264.7 cells by lipopolysaccharide (LPS). Using dexamethasone and *N*-acetyl-*L*-cysteine as positive control, Griess assay and 2', 7'-dichloro-fluorescein assay were used to detect the contents of NO in cell culture medium and ROS in cells. The levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in cell culture medium were measured by ELISA. The protein expression of p65, p-p65, I κ B α , p-I κ B α , HO-1 in cells and NRF2 in nucleus were determined by using Western blotting assay. RESULTS: The contents of total phenol and flavonoids in GOEE were (20.191 \pm 1.264) and (12.571 \pm 0.020)mg/g, respectively.

[△] 基金项目:广西自然科学基金资助项目(No.2018GXNSFAA-294043);南宁市青秀区科技计划项目(No.2019025)

* 硕士研究生。研究方向:天然产物研发。电话:0771-5356154。E-mail:leihuang12345@163.com

#a 通信作者:主任药师,硕士生导师,硕士。研究方向:中药研发。E-mail:1878125675@qq.com

#b 通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:天然产物研发。电话:0771-5356154。E-mail:ezjiefeng@hotmail.com

At the concentration below 500 μ g/mL, GOEE had no significantly effect on survival rate of RAW264.7 cells ($P > 0.05$). Compared with control group, the contents of NO and ROS, the levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β , ratio of p-p65 to p65, ratio of p-I κ B α to I κ B α , protein expression of NRF2 were increased significantly in LPS model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with LPS model group, the contents of NO (except for GOEE 50 μ g/mL group) and ROS, the levels

of TNF- α , IL-6 and IL-1 β , ratio of p-p65 to p65 and ratio of p-I κ B α to I κ B α were decreased significantly in GOEE groups and positive control groups, while protein expression of HO-1 and NRF2 were increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: GOEE attenuates LPS-induced macrophages inflammation injury by inhibiting the inflammatory response and the phosphorylation of NF- κ B pathway, promoting NRF2 protein transportation to the nucleus.

KEYWORDS *Garcinia oblongifolia*; Epicarp; Ethanol extract; Anti-inflammatory effect; NF- κ B; NRF2; Mice macrophage; RAW264.7

炎症是机体抵御感染和组织损伤的一种防御机制,许多慢性炎症性疾病(如糖尿病、动脉粥样硬化等)可能是由于过度的炎症反应所引起的^[1]。当各种内在或外在的刺激导致巨噬细胞过度活化时,炎症细胞被激活并维持免疫反应。因此,调节巨噬细胞活化可能将有利于许多炎症性疾病的治疗。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁的内毒素,通常用于诱导小鼠单核巨噬细胞以建立炎症模型^[2]。LPS还可使核因子 κ B(NF- κ B)活化,活化的NF- κ B可进一步诱导促炎细胞因子的产生,包括肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)和IL-1 β 。而促炎细胞因子能够刺激机体产生过量的活性氧(ROS),从而打破机体内氧化与抗氧化之间的平衡,造成氧化应激^[3]。若机体长时间处于氧化应激状态,可进一步诱导细胞凋亡、组织坏死^[4]。核因子E2相关因子2(NRF2)是调节氧化应激的关键蛋白,有文献报道,激活NRF2可保护机体免受急性肺损伤、急性肝衰竭等各种炎症性疾病的侵害^[5-6]。因此,NRF2与NF- κ B一同作为炎症性疾病的潜在治疗靶标引起了学者的广泛关注^[7]。

岭南山竹子(*Garcinia oblongifolia* Champ. ex Benth.)属于藤黄科藤黄属植物,主要分布于我国广西、广东地区。据文献报道,从岭南山竹子的树皮中分离出来的Garcinone C、Griffipavixanthone、Oblongifolin M、Norcowanin等化合物具有抗肿瘤、抗糖尿病和抗病毒等活性^[8-11]。然而,国内外现有研究主要集中于岭南山竹子的树皮与树叶,且多为简单的活性成分研究。由于民间主要是以岭南山竹子的果皮入药以消炎镇痛,有关该药果皮化学成分的研究仅有1篇报道^[12],而有关其药理作用尤其是抗炎抗氧化活性的研究等尚未见相关报道。为此,本研究以LPS诱导小鼠单核巨噬细胞RAW264.7建立炎症细胞模型,通过检测一氧化氮(NO)、ROS的含量以及促炎细胞因子、炎症介质等炎症靶标表达水平的变化,初步探讨岭南山竹子70%乙醇提取物(GOEE)的抗炎活性及其潜在的分子机制,旨在为治疗炎症性疾病提供更多的候选药物。

1 材料

1.1 仪器

EL204型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);TV-1901型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);WIX-miniPRO4型迷你垂直电泳槽(北京韦克斯科技有限公司);Odyssey型双色红外激光成像系

统(美国LI-COR公司);SpectraMax Plus384型连续光谱扫描式酶标仪(美国Molecular Devices公司);Synergy™ H1多功能酶标仪(美国BioTek公司);R-1001N型旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司);ACB-4A1型超净工作台(新加坡ESCO公司);3111型CO₂培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.2 药品与试剂

新鲜岭南山竹子于2017年7月采集于广西壮族自治区北海市,经广西医科大学冯洁教授鉴定为藤黄科藤黄属岭南山竹子(*G. oblongifolia* Champ. ex Benth.)的新鲜果实。药材标本(编号:GB20170728)保存于广西医科大学药学院。

LPS(美国Sigma公司,批号:L2880);NO试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20181007);TNF- α 、IL-6、IL-1 β 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海源叶生物科技有限公司,批号:CK-E20220M、CK-E20012M、CK-E20533M);兔源磷酸化p65(p-p65)、磷酸化核因子 κ B抑制蛋白 α (p-I κ B α)多克隆抗体(美国ABclonal Technology公司,批号:AP0124、AP0614);兔源I κ B α 、p65、NRF2、血红素加氧酶1(HO-1)、核纤层蛋白B(Lamin B)多克隆抗体和小鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(美国Proteintech Group公司;批号:10268-1-AP、10745-1-AP、16396-1-AP、10701-1-AP、12987-1-AP、6004-1-1g);胎牛血清(美国Gemini公司,批号:A87F82H);高糖DMEM培养基(美国Gibco公司,批号:8118048);兔源免疫球蛋白G(IgG)(H+L)荧光二抗、小鼠源IgG(H+L)荧光二抗(美国CST公司,批号:5366P、5257P);N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)对照品(抗氧化剂,纯度: $\geq 99\%$);ROS试剂盒[含2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)等试剂]、胞核胞浆蛋白抽提试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、Loading Buffer上样缓冲液(碧云天生物技术研究所,批号:S0077、S0033、P0027、P0012、P0015);地塞米松磷酸钠注射液(DEX,阳性对照,国药集团容生制药有限公司,批号:1801207,规格:1 mL:2 mg);MTT、二甲亚砜(DMSO)、芦丁对照品(纯度: $\geq 99\%$)、青链霉素双抗(北京索莱宝科技有限公司,批号:M8180、D8370、YZ-10080、20180418);没食子酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110831-201906,纯度: $\geq 99\%$);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 细胞株

小鼠单核巨噬细胞RAW264.7购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 GOEE的制备

取新鲜岭南山竹子果皮(80 g)切成片,用70%乙醇(0.8 L)回流提取3次,每次2.5 h。将提取液过滤并减压浓缩后,冷冻干燥,即得到GOEE冻干品5.26 g,得率为6.58%。

2.2 GOEE中总多酚与总黄酮的含量测定

采用Folin-Ciocalteu法^[13]测定GOEE中的总多酚含量,以没食子酸为指标,结果以没食子酸含量表示;采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 法^[14]测定GOEE中总黄酮的含量,以芦丁为指标,使用紫外-可见分光光度计在500 nm波长处检测样品含量,方法学考察内容及其结果见相关文献^[13-14]。每样品均重复测定3次。

2.3 细胞培养

将对数生长期的细胞接种于含10%胎牛血清、1%青链霉素双抗的高糖DMEM培养基中,并置于5%CO₂、37℃的培养箱中培养(培养条件下同)。

2.4 GOEE对LPS诱导RAW264.7细胞的毒性研究

采用MTT法检测。取对数生长期的RAW264.7细胞以 5×10^4 个/mL接种于96孔板中,每孔100 μL。将细胞随机分为对照组(0.5%DMSO)、LPS模型组(1 μg/mL,剂量设置参考前期预试验结果,下同)和GOEE处理组(15.625、31.25、62.5、125、250、500、1 000 μg/mL GOEE+1 μg/mL LPS,GOEE以生药量计,剂量设置参考前期预试验结果),每组设4个复孔。除对照组外,其余各组均与LPS共孵育30 min后,再与药物混合培养。培养24 h后,每孔加入MTT溶液(5 mg/mL)20 μL,培养4 h,吸弃上清液,每孔加入DMSO 150 μL,避光振荡10 min,采用连续光谱扫描式酶标仪在490 nm波长处测量各孔的吸光度值,并计算各组细胞的存活率:细胞存活率(%)=试验组吸光度值/对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。上述试验重复3次。

2.5 NO含量检测

采用Griess法检测。取对数生长期的RAW264.7细胞以 4×10^5 个/mL接种于96孔板中,每孔100 μL。将细胞随机分为对照组(0.5%DMSO)、LPS模型组(1 μg/mL)、DEX处理组(阳性对照,0.2 μg/mL DEX+1 μg/mL LPS,DEX剂量设置参考前期预试验结果,下同)和GOEE处理组(50、100、150、200、300 μg/mL GOEE+1 μg/mL LPS,GOEE剂量参考“2.4”项下结果),每组设4个复孔。按“2.4”项下方法培养24 h后,收集各孔细胞培养液,以1 000 r/min离心5 min,取上清液,采用连续光谱扫描式酶标仪于550 nm波长处检测细胞培养液中NO的含量。严格按照试剂盒说明书操作,上述试验重复3次。

2.6 ROS含量检测

采用2',7'-二氯荧光素(DCF)法检测。取对数生长期的RAW264.7细胞以 4×10^5 个/mL接种于96孔板中,每孔100 μL。将细胞随机分为对照组(0.5%DMSO)、LPS模型组(1 μg/mL)、NAC处理组(抗氧化剂,10 mmol/L NAC+1 μg/mL LPS,NAC剂量设置参考前期预试验结果)和GOEE处理组(50、100、150、200、300 μg/mL GOEE+1 μg/mL LPS),每组设4个复孔。按“2.4”项下方法培养24 h后,吸弃培养液,将细胞与DCFH-DA(10 mmol/L)100 μL孵育30 min,采用全功能酶标仪于激发波长488 nm、发射波长525 nm处检测ROS与DCFH-DA反应产物(DCF)的荧光强度,并以此表示ROS的含量。严格按照试剂盒说明书操作,上述试验重复3次。

2.7 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平检测

采用ELISA法检测。取对数生长期的RAW264.7细胞以 2×10^5 个/mL接种于6孔板中,每孔1 mL。将细胞随机分为对照组(0.5%DMSO)、LPS模型组(1 μg/mL)、DEX处理组(0.2 μg/mL DEX+1 μg/mL LPS)和GOEE处理组(100、200、300 μg/mL GOEE+1 μg/mL LPS,GOEE剂量参考前文结果,下同),每组设4个复孔。按“2.4”项下方法培养24 h后,收集各孔细胞培养液,以1 000 r/min离心5 min,取上清液,采用ELISA法以连续光谱扫描式酶标仪于450 nm波长处检测细胞培养液中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平。严格按照试剂盒说明书操作,上述试验重复3次。

2.8 相关蛋白表达水平检测

采用Western blotting法检测。取对数生长期的RAW264.7细胞以 4×10^5 个/mL接种于96孔板中,每孔100 μL。将细胞随机分为对照组(0.5%DMSO)、LPS模型组(1 μg/mL)、DEX处理组(0.2 μg/mL DEX+1 μg/mL LPS;检测NRF2信号通路相关蛋白HO-1、NRF2表达时不设该组)和GOEE处理组(100、200、300 μg/mL GOEE+1 μg/mL LPS),每组设4个复孔。培养1 h后,吸弃培养液。分别按试剂盒说明书提取细胞总蛋白(用以检测p-p65、p65、p-I κ B α 、I κ B α 、HO-1蛋白的表达)和细胞核蛋白(用以检测NRF2蛋白的表达),用BCA蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定,以磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)稀释至相应浓度。取上述蛋白,加入5 \times Loading Buffer上样缓冲液适量,煮沸变性;取变性蛋白样品50 μg,于80 V条件下行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后于100 mA下湿法转膜,用5%脱脂奶粉室温封闭1 h,然后分别加入p-p65抗体(1:500)、p-I κ B α 抗体(1:500)、p65抗体(1:1 000)、I κ B α 抗体(1:1 000)、NRF2抗体(1:500)、HO-1抗体(1:1 000)、Lamin B抗体(1:1 000)、GAPDH抗体(1:3 000),4℃孵育过夜;用TBST溶液清洗10 min \times 3次,加入相应二抗(除GAPDH为小鼠源二抗外,其余均为兔源二抗,稀释度均为

1:10 000), 室温下避光孵育 1 h, 以 TBST 溶液清洗 10 min×3 次。于双色红外激光成像系统上成像, 并通过 Image J2 v5.2.5 软件分析, 以 p-p65 和 p65、p-IκBα 和 IκBα 灰度值的比值 (p-p65/p65、p-IκBα/IκBα 比值) 来表示 p65、IκBα 的磷酸化水平, 以目标蛋白与内参 (HO-1 以 GAPDH 为内参, NRF2 以 Lamin B 为内参) 的灰度值比值来表示其表达水平。上述试验重复 3 次。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行多组间比较, 采用 LSD-*t* 检验进行组间两两比较。P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 总多酚和总黄酮的含量测定结果

以没食子酸当量计算 GOEE 中总多酚的含量, 根据标准曲线方程 $Y=0.111 6X+0.018 0 (R^2=0.999 0)$ 计算出总多酚含量为 $(20.191 \pm 1.264) \text{ mg/g} (n=3)$ 。以芦丁当量计算 GOEE 中总黄酮的含量, 根据标准曲线方程 $Y=0.012 7X-0.017 6 (R^2=0.999 4)$ 计算出总黄酮含量为 $(12.571 \pm 0.020) \text{ mg/g} (n=3)$ 。

3.2 GOEE 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞存活率的影响

LPS 模型组细胞存活率与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与对照组比较, GOEE 1 000 μg/mL 组细胞存活率显著降低 ($P<0.01$), 而当 GOEE 剂量 ≤ 500 μg/mL 时, 各剂量组细胞存活率与对照组比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 详见表 1。根据上述结果, 本研究选择 GOEE 剂量范围为 0~500 μg/mL 进行后续试验。

表 1 不同剂量 GOEE 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Effects of different doses of GOEE on survival rate of LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量, μg/mL | 存活率, % |
|----------|-----------|----------------|
| 对照组 | | 100 |
| LPS 模型组 | 1 | 97.60 ± 2.82 |
| GOEE 处理组 | 15.625 | 94.76 ± 2.92 |
| | 31.25 | 94.32 ± 9.26 |
| | 62.5 | 96.37 ± 7.80 |
| | 125 | 96.41 ± 4.86 |
| | 250 | 98.87 ± 5.57 |
| | 500 | 97.77 ± 2.99 |
| | 1 000 | 75.58 ± 4.93** |

注: 与对照组比较, **P<0.01

Note: vs. control group, **P<0.01

3.3 GOEE 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO、ROS 含量的影响

LPS 模型组细胞培养液中 NO 的含量约为对照组的 6.09 倍, 组间比较差异有统计学意义 ($P<0.01$); 与 LPS

模型组比较, DEX 处理组和 GOEE 100、150、200、300 μg/mL 处理组细胞培养液中 NO 的含量均显著降低 ($P<0.05$), 且随着剂量的增加, NO 含量有减少的趋势。与对照组比较, LPS 模型组细胞中 ROS 的含量显著升高 ($P<0.01$); 与 LPS 模型组比较, NAC 处理组与 GOEE 各处理组 ROS 的含量均显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 详见表 2。

表 2 不同剂量 GOEE 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO、ROS 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Effects of different doses of GOEE on the contents of NO and ROS in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量 | NO, μmol/L | ROS, a.u. |
|----------|-----------|---------------------------|---------------------|
| 对照组 | | 4.58 ± 0.88 | 1 061.33 ± 121.48 |
| LPS 模型组 | 1 μg/mL | 27.89 ± 1.89** | 6 404.33 ± 377.47** |
| DEX 处理组 | 0.2 μg/mL | 18.73 ± 0.88** | |
| NAC 处理组 | 10 mmol/L | | 2 890.67 ± 187.58** |
| GOEE 处理组 | 50 μg/mL | 27.64 ± 1.30 | 3 638.00 ± 150.69** |
| | 100 μg/mL | 25.56 ± 1.51 [†] | 2 988.33 ± 87.84** |
| | 150 μg/mL | 21.64 ± 0.50** | 2 883.00 ± 315.93** |
| | 200 μg/mL | 15.82 ± 0.29** | 2 452.67 ± 309.07** |
| | 300 μg/mL | 13.74 ± 0.63** | 1 920.00 ± 290.99** |

注: 与对照组比较, **P<0.01; 与 LPS 模型组比较, [†]P<0.05, [‡]P<0.05

Note: vs. control group, **P<0.01; vs. LPS model group, [†]P<0.05, [‡]P<0.05

3.4 GOEE 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平的影响

与对照组比较, LPS 模型组细胞培养液中 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平均显著升高 ($P<0.05$)。与 LPS 模型组比较, DEX 处理组和 GOEE 各处理组细胞培养液中 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平均显著降低 ($P<0.05$), 详见表 3。

表 3 不同剂量 GOEE 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Effects of different doses of GOEE on the levels of TNF-α, IL-6 and IL-1 β in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量, μg/mL | TNF-α, pg/mL | IL-6, pg/mL | IL-1 β, pg/mL |
|----------|-----------|------------------|----------------|------------------|
| 对照组 | | 158.48 ± 18.90 | 41.08 ± 1.29 | 35.63 ± 15.50 |
| LPS 模型组 | 1 | 481.47 ± 18.24** | 84.42 ± 2.09** | 110.25 ± 13.02** |
| DEX 处理组 | 0.2 | 271.03 ± 20.43** | 53.40 ± 7.22** | 74.14 ± 4.15** |
| GOEE 处理组 | 100 | 254.17 ± 12.71** | 54.89 ± 7.06** | 73.39 ± 11.57** |
| | 200 | 226.91 ± 13.95** | 49.22 ± 3.87** | 69.70 ± 10.9** |
| | 300 | 199.80 ± 16.62** | 41.98 ± 1.12** | 48.25 ± 14.40** |

注: 与对照组比较, **P<0.01; 与 LPS 模型组比较, [†]P<0.01

Note: vs. control group, **P<0.01; vs. LPS model group, [†]P<0.01

3.5 GOEE 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NF-κB 活化的影响

与对照组比较, LPS 模型组细胞中 p-p65/p65 和 p-IκBα/IκBα 比值均显著升高 ($P<0.01$); 与 LPS 模型组比较, DEX 处理组和 GOEE 各处理组细胞中 p-p65/p65

和p-IκBα/IκBα比值均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图1A、表4。

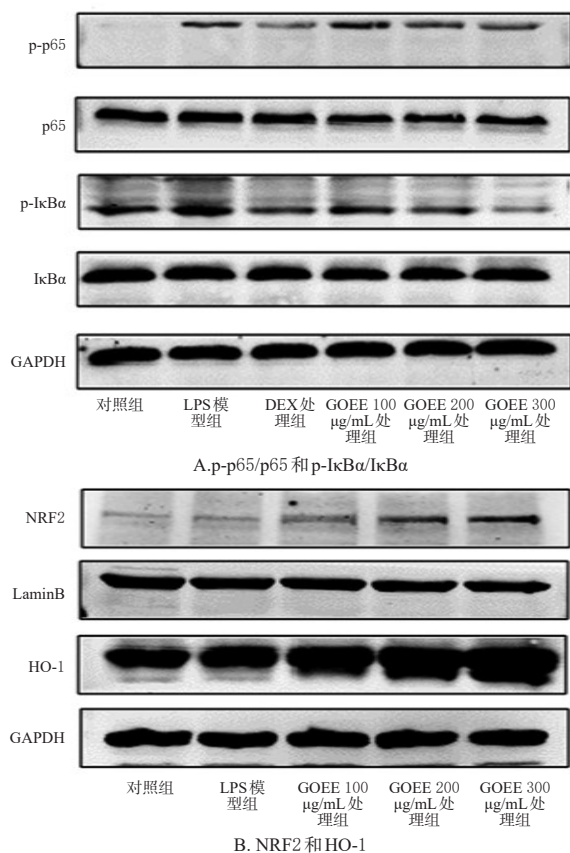


图1 不同剂量GOEE对LPS诱导RAW264.7细胞中p65、p-p65、IκBα、p-IκBα、NRF2、HO-1蛋白表达影响的电泳图

Fig 1 Electrophoresis of the effects of different doses of GOEE on protein expression of p65, p-p65, IκBα, p-IκBα, pNRF2 and HO-1 in LPS-induced RAW264.7 cells

3.6 GOEE对LPS诱导RAW264.7细胞NRF2、HO-1蛋白表达的影响

与对照组比较,LPS模型组细胞核中NRF2蛋白的表达水平显著升高($P < 0.05$);与LPS模型组比较,GOEE各处理组细胞中HO-1蛋白和细胞核中NRF2蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图1B、表4。

4 讨论

岭南山竹子是一种民间传统用药,主要用于炎症性不适。其相关文献报道多集中于其树皮及树叶,但民间多用果皮入药。为此,本文主要研究了GOEE在LPS诱导RAW264.7细胞中的抗炎药理活性及其潜在分子机制。

炎症反应通常由NO、ROS和炎症细胞因子(包括TNF-α、IL-1β和IL-6)等介导,而炎症细胞因子受NF-κB信号通路的调节。在正常情况下,NF-κB以异二聚体形

表4 GOEE对LPS诱导的RAW264.7细胞中p65、p-65、IκBα、p-IκBα、NRF2、HO-1蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Effects of GOEE on the protein expression of p65, p-65, IκBα, p-IκBα, NRF2 and HO-1 in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量, μg/mL | p-p65/p65 | p-IκBα/IκBα | NRF2 | HO-1 |
|---------|-----------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 对照组 | | 0.24 ± 0.09 | 0.46 ± 0.26 | 0.30 ± 0.06 | 1.10 ± 0.56 |
| LPS模型组 | 1 | 1.28 ± 0.15** | 1.33 ± 0.38** | 0.49 ± 0.04* | 1.29 ± 0.23 |
| DEX处理组 | 0.2 | 0.84 ± 0.22# | 0.64 ± 0.34# | | |
| GOEE处理组 | 100 | 0.92 ± 0.18# | 0.80 ± 0.36# | 0.78 ± 0.12## | 2.41 ± 0.55* |
| | 200 | 0.69 ± 0.12## | 0.65 ± 0.23# | 1.05 ± 0.11## | 3.22 ± 0.58## |
| | 300 | 0.55 ± 0.06## | 0.38 ± 0.06## | 1.16 ± 0.11## | 4.01 ± 0.91## |

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

Note: vs. control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. LPS model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

式与IκBα结合于细胞质中;LPS能够激活NF-κB信号通路,导致IκBα降解,之后NF-κB易位至细胞核诱导炎症^[15]。因此,通过抑制IκBα降解来下调NF-κB的表达可能是抗炎药物的研究路线之一。据报道,NRF2信号通路与NF-κB通路具有交叉效应,炎症产生的过量ROS会导致氧化应激,而NRF2信号通路是抗氧化应激反应中最重要的途径,该通路被激活后可诱导抗氧化蛋白HO-1等产生,以对抗机体的氧化应激,从而保护正常细胞免受氧化应激的损害^[16]。

NO是炎症反应中传递信号的信息分子,是与炎症疾病有关的炎症介质之一^[17]。本研究结果表明,GOEE显著抑制了NO的产生,表明了GOEE能够通过阻断炎症信号的传递来发挥抗炎作用。在LPS诱导的RAW264.7细胞炎症模型中,包括TNF-α、IL-1β和IL-6在内的促炎细胞因子的水平均显著升高,提示其促进了炎症的发展。因此抑制促炎细胞因子的产生是治疗炎症性疾病的主要策略之一,这些炎症因子的表达主要受NF-κB转录因子调控。本研究首先通过MTT法筛选出安全剂量范围,从此范围中根据预试验结果设置给药剂量,并以DEX作为抗炎研究的阳性对照,以NAC作为ROS测定的阳性对照。由于DEX对NRF2信号通路无影响,因此在进行抗氧化研究时未设DEX组。本研究结果表明,GOEE可抑制NF-κB中的关键蛋白IκBα和p65的磷酸化,从而抑制NF-κB信号通路的表达及其在下游转录的促炎细胞因子表达。有研究表明,在LPS诱导的肺部炎症中,NRF2基因敲除小鼠的TNF-α、IL-1β和IL-6的表达高于未敲除小鼠;进一步研究表明,NRF2基因敲除小鼠的NF-κB p65与DNA有更强的结合活性^[18]。说明NRF2编码基因的缺失能够加重炎症反应。HO-1的上调会促进其衍生代谢产物(如CO、胆红素等)的产生,这些代谢产物不仅具有抗氧化活性,还具有抗

炎作用^[19-21]。本研究结果表明,GOEE抑制了ROS和NO的产生。本研究检测了细胞核内NRF2的表达情况,发现LPS能够诱导NRF2入核,GOEE能进一步促进NRF2入核,并且上调NRF2调控的抗氧化酶HO-1的表达。这表明GOEE还能通过上调NRF2与HO-1抑制了LPS诱导的巨噬细胞炎症反应。同时,本研究通过测量GOEE中总黄酮与总多酚的含量发现,GOEE中总多酚的含量远高于总黄酮的含量。酚羟基中的邻位酚羟基易被氧化,是良好的抗氧化剂;同时,酚羟基还可以提供活泼氢,使活性氧等自由基灭活,本身被氧化形成含有邻二酚结构的自由基而稳定存在^[22]。因而推测可能是GOEE中多酚类物质发挥了抗氧化与抗炎作用,但有待后续研究予以确证。

如今,NF- κ B已成为炎症性疾病治疗研究的热点。抑制该靶标能够抑制许多下游促炎细胞因子表达,在许多疾病的治疗中起重要作用。NRF2信号通路的激活可以减轻炎症并保护机体,因此NRF2也是治疗炎症性疾病的重要靶标。本试验结果表明,GOEE具有抗炎活性,可能是通过NF- κ B与NRF2信号通路发挥抗炎作用,具体的作用物质及机制尚有待进一步研究。

综上所述,本试验通过LPS诱导的RAW264.7细胞炎症模型研究GOEE抗炎药理学活性及其可能的机制。结果显示,GOEE有良好的抗炎作用,其机制可能是减少NO产生、抑制NF- κ B信号通路中关键蛋白p65和I κ B α 的磷酸化,从而进一步下调其下游促炎细胞因子TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达;与此同时,GOEE还可增加NRF2向核转运,并显著上调HO-1的表达,从而清除炎症产生的过量ROS。本研究结果表明GOEE可以作为治疗炎症性疾病候选药物,但还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] LIU JX, TANG JS, ZUO YH, et al. Stauntoside B inhibits macrophage activation by inhibiting NF- κ B and ERK MAPK signalling[J]. *Pharmacol Res*, 2016. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.06.022.
- [2] KAUFMANN S, ILG K, MASHAGHI A, et al. Supported Lipopolysaccharide Bilayers[J]. *Langmuir*, 2012, 28 (33): 12199-12208.
- [3] OGAWA H, MUKAI K, KAWANO Y, et al. Th2-inducing cytokines IL-4 and IL-33 synergistically elicit the expression of transmembrane TNF- α on macrophages through the autocrine action of IL-6[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420 (1): 114-118.
- [4] 李涛, 邓放明, 覃思, 等. Nrf2-ARE介导的黄酮类化合物抗氧化应激的研究进展[J]. *食品与机械*, 2016, 32 (6): 201-207.
- [5] LEI JJ, WEI YL, SONG PC, et al. Cordycepin inhibits LPS-induced acute lung injury by inhibiting inflammation and oxidative stress[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.10.029.
- [6] WANG W, WU LL, LI Q, et al. Madecassoside prevents acute liver failure in LPS/D-GalN-induced mice by inhibiting p38/NF- κ B and activating Nrf2/HO-1 signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.04.162.
- [7] BOUTTEN A, GOVEN D, ARTAUD-MACARI E, et al. NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Trends Mol Med*, 2011, 17 (7): 363-371.
- [8] XIA YD, LIU X, ZOU CL, et al. Garcinone C exerts antitumor activity by modulating the expression of ATR/Stat3/4EBP1 in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39 (3): 1485-1493.
- [9] MA YC, WANG Y, SONG B. Griffipavixanthone induces apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells in vitro[J]. *Breast Cancer*, 2019, 26 (2): 190-197.
- [10] WANG MJ, DONG Q, WANG H, et al. Oblongifolin M, an active compound isolated from a Chinese medical herb *Garcinia oblongifolia*, potently inhibits enterovirus 71 reproduction through downregulation of ERp57[J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (8): 8797-8808.
- [11] TRINH BT, QUACH TT, BUI DN, et al. Xanthones from the twigs of *Garcinia oblongifolia* and their antidiabetic activity[J]. *Fitoterapia*, 2017. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.03.003.
- [12] 黎平, 郭志永, 谷荣辉, 等. 岭南山竹子果实的化学成分分离与确定[J]. *食品科学*, 2016, 37 (6): 132-136.
- [13] LI Y, FENG J, MO YQ, et al. Concordance between cardioprotective effect on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia and phenolic content of different extracts of *Curcuma aromatica*[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2016, 54 (12): 1-6.
- [14] 陆应彩, 卯明霞, 彭霞, 等. 肾茶总黄酮的含量测定[J]. *中国民族民间医药*, 2018, 27 (11): 41-45.
- [15] KIM J, KIM H, CHOI H, et al. Anti-inflammatory Effects of a *Stauntonia hexaphylla* fruit extract in lipopolysaccharide-activated RAW-264.7 macrophages and rats by carrageenan-induced hind paw swelling[J]. *Nutrients*, 2018, 10 (1): 110-121.
- [16] LI W, KHOR TO, XU CJ, et al. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF- κ B-inflammatory response and elicits apoptosis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76 (11): 1485-1489.
- [17] COLEMAN JW. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation[J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 129 (1): 4-10.
- [18] THIMMULAPPA RK, LEE H, RANGASAMY T, et al. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis[J]. *J Clin Invest*,

基于UHPLC-Q-TOF-MS/MS技术鉴定藤梨根的化学成分^Δ

陈方超^{1,2*},高守红³,王志鹏³,杨宏³,顺庆生²,宋新华⁴,徐一新^{2#}(1.上海中医药大学研究生院,上海201213;2.上海健康医学院药学院,上海201318;3.海军军医大学附属长征医院药学部,上海200003;4.宜春学院化学与生物工程学院,江西宜春336000)

中图分类号 R282;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)14-1725-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.14.12

摘要 目的:快速鉴定藤梨根的化学成分,为该药材后续的物质基础和质量控制等研究提供参考。方法:运用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱技术(UHPLC-Q-TOF-MS/MS)进行藤梨根的化学成分检测。色谱柱为Waters XSelect HSS T3,流动相为0.1%甲酸乙腈溶液-0.1%甲酸水溶液(梯度洗脱),柱温为40℃,流速为0.3 mL/min,进样量为3 μL;采用电喷雾离子源,以负离子模式采集数据,扫描范围为 m/z 50~1 500,干燥气温度为350℃,雾化气压力为45 psi,毛细管电压为3 500 V,鞘气温度为350℃。根据准分子离子和二级碎片离子信息,结合相关文献以及对照品的保留时间和质谱裂解规律对检出的化学成分进行结构鉴定。结果与结论:共鉴定出58个化学成分,包括16个五环三萜类化合物(如羟基积雪草酸、积雪草酸、山楂酸、科罗索酸、齐墩果酸、熊果酸等)、12个黄酮类化合物(如芦丁、槲皮苷、木犀草苷、紫云英苷等)、17个有机酸类化合物(如隐绿原酸、绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸C等)等,有9个化合物(如原花青素B₁、B₂、木犀草素等)为首次从藤梨根中鉴定出来。UHPLC-Q-TOF-MS/MS技术可快速鉴定藤梨根中的化学成分。

关键词 藤梨根;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱技术;化学成分;鉴定

Identification of Chemical Components in *Actinidia chinensis* Root by UHPLC-Q-TOF-MS/MS

CHEN Fangchao^{1,2}, GAO Shouhong³, WANG Zhipeng³, YANG Hong³, SHUN Qingsheng², SONG Xinhua⁴, XU Yixin²(1. Graduate School, Shanghai University of TCM, Shanghai 201213, China; 2. School of Pharmacy, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China; 3. Dept. of Pharmacy, Changzheng Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai 200003, China; 4. College of Chemistry and Bio-engineering, Yichun University, Jiangxi Yichun 336000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To identify chemical components of *Actinidia chinensis* root rapidly, and to provide reference for further material basis and quality control study of the crude medicine. METHODS: UHPLC-Q-TOF-MS/MS technique was used to detect chemical components of *A. chinensis* root. The separation was performed on Waters XSelect HSS T3 column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid acetonitrile solution-0.1% formic acid water solution (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was set at 40 °C, and sample size was 3 μL. Electrospray ion source was adopted, the data was collected under negative ion mode; the scanning range was m/z 50-1 500; the drying gas temperature was 350 °C, the atomizing air pressure was 45 psi, the capillary voltage was 3 500 V, and sheath gas temperature was 350 °C. According to the information of excimer ion and secondary fragment ion, the chemical components were identified by combining with the relevant literature, the

2006, 116 (4):984-995.

[19] SUN BW, ZOU XQ, CHEN YL, et al. Preconditioning of carbon monoxide releasing molecule-derived CO attenuates LPS-induced activation of HUVEC[J]. *Int J Biol Sci*, 2008, 4 (5):270-278.

[20] LILLJEBJORN LV, CSIZMADIA E, HEDBLUM A, et al.

Δ 基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目(No.1741-1972400)

* 硕士研究生。研究方向:中药分析。电话:021-51322403。E-mail: jiankonglingyuan@163.com

通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:天然活性成分。电话:021-65886698。E-mail: xuyx@sumhs.edu.cn

A role of the heme degradation pathway in shaping prostatic inflammatory responses and lipid metabolism[J]. *Am J Pathol*, 2020. DOI: 10.1016/j.ajpath.2019.12.008.

[21] YAO Q, HUANG ZW, ZHAI YY, et al. Localized controlled release of bilirubin from β-cyclodextrin-conjugated ε-polylysine to attenuate oxidative stress and inflammation in transplanted islets[J]. *ACS Appl Mater Interface*, 2020, 12 (5):5462-5475.

[22] 李佩儒,周春阳,张译,等.洋葱醇提取物总多酚含量及其抗氧化活性研究[J]. *中国药业*, 2019, 28(9):21-24.

(收稿日期:2019-12-13 修回日期:2020-05-13)

(编辑:罗 瑞)