

岭南山竹子提取物 oblongifolins A 的体外抗炎作用及机制研究[△]

李雪珊^{1*}, 覃癸铭², 石慧颖¹, 邹小琴³, 冯洁⁴, 钟小斌^{1#}(1. 广西医科大学第二附属医院药学部, 南宁 530007; 2. 南宁市第二人民医院药物临床试验机构办公室, 南宁 530031; 3. 广西医科大学第一附属医院科研部, 南宁 530021; 4. 广西医科大学药学院中药学教研室, 南宁 530021)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)10-1209-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.10.10



摘要 目的 研究岭南山竹子提取物 oblongifolins A(OA)的体外抗炎作用及机制。方法 以RAW264.7细胞为研究对象,将细胞分为对照组(0.5%二甲基亚砜),脂多糖(LPS)组(1 μg/mL),地塞米松(DEX)组(10 μmol/L DEX+1 μg/mL LPS),OA低、中、高浓度组(7.5、15、30 μmol/L OA+1 μg/mL LPS)。除对照组外,其余各组细胞先用LPS刺激1 h后,再与药物混合培养24 h。观察各组细胞形态变化,检测各组细胞中一氧化氮(NO)、活性氧(ROS)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素6(IL-6)、IL-1β、IL-4和IL-10含量,TNF-α、IL-6、IL-1β mRNA表达水平,核因子κB(NF-κB)和核转录因子红系2相关因子2(Nrf2)通路相关蛋白的表达水平以及对照组、LPS组、OA高浓度组细胞中NF-κB p65和Nrf2蛋白的核易位情况。**结果** 与LPS组比较,OA各浓度组纺锤形和不规则细胞逐渐减少,细胞中NO、ROS(OA低浓度组除外)、TNF-α、IL-6、IL-1β含量,TNF-α、IL-6(OA低浓度组除外)、IL-1β mRNA表达水平,磷酸化NF-κB p65(p-NF-κB p65)、磷酸化核因子κB抑制蛋白α(p-IκBα)、Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$);IL-4、IL-10含量,IκBα、Nrf2(OA低、中浓度组除外)、血红素加氧酶1(HO-1)(OA低浓度组除外)、醌NADH脱氢酶1(NQO1)蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$);高浓度OA可抑制NF-κB p65蛋白核易位,促进Nrf2蛋白核易位。**结论** OA能够抑制LPS诱导的RAW264.7细胞炎症,其作用机制可能与抑制NF-κB通路、激活Nrf2通路、减少ROS和炎症因子的过度释放有关。

关键词 oblongifolins A; 炎症; NF-κB通路; Nrf2通路

Study on *in vitro* anti-inflammatory effects and mechanisms of oblongifolins A extracted from *Garcinia oblongifolia*

LI Xueshan¹, QIN Guiming², SHI Huiying¹, ZOU Xiaojin³, FENG Jie⁴, ZHONG Xiaobin¹(1. Dept. of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, China; 2. Drug Clinical Trial Facility Office, the Second Nanning People's Hospital, Nanning 530031, China; 3. Dept. of Scientific Research, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 4. TCM Teaching and Research Section, School of Pharmaceutical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To investigate the *in vitro* anti-inflammatory effects and mechanisms of oblongifolins A (OA) extracted from *Garcinia oblongifolia*. **METHODS** RAW264.7 cells were used as the research subject and divided into control group (0.5% DMSO), lipopolysaccharide (LPS) group (1 μg/mL), DEX group (10 μmol/L DEX+1 μg/mL LPS), and low-, medium-, and high-concentration groups of OA (7.5, 15, 30 μmol/L OA+1 μg/mL LPS). Except for the control group, the remaining groups were first stimulated with LPS for 1 hour and then mixed with drugs for 24 hours. The morphological changes of cells were observed in each group. The contents of nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), IL-1β, IL-4 and IL-10 were detected in cells of each group; mRNA expression levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β were measured. The expression of key proteins in the nuclear factor κB (NF-κB) and nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathways in each group, as well as the nuclear translocation of NF-κB p65 and Nrf2 proteins in control group, LPS group and OA high-concentration group, were detected. **RESULTS** Compared to the LPS group, the number of spindle-shaped and irregular cells gradually decreased in OA groups, the contents of NO, ROS (except for OA low-concentration group), TNF-α, IL-6 and IL-1β, the mRNA expressions of TNF-α, IL-6 (except for OA low-concentration group) and IL-1β as well as the protein expressions of phosphorylated NF-κB p65 (p-NF-κB p65), p-IκBα, and Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) were decreased significantly ($P<0.05$). The contents of IL-4 and IL-10, protein expressions of IκBα, Nrf2 (except for OA low- and medium-concentration groups), HO-1 (except for OA low-concentration group) and NQO1 were all increased

[△]基金项目 广西自然科学基金项目(No.2023GXNSFAA026233); 广西中医药适宜技术开发与推广项目(No.GZSY22-64)

*第一作者 硕士研究生。研究方向:中药新药研发。E-mail: 1029492357@qq.com

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

significantly ($P < 0.05$). OA of high concentration could inhibit NF- κ B p65 protein nuclear translocation and promote Nrf2 protein nuclear translocation. **CONCLUSIONS** OA can suppress LPS-induced inflammation in RAW264.7 macrophages. The underlying molecular mechanism likely entails the inhibition of the NF- κ B signaling pathway, the activation of the Nrf2 signaling pathway and the reduction of ROS and inflammatory factor release.

KEYWORDS oblongifolins A; inflammation; NF- κ B signaling pathway; Nrf2 signaling pathway

炎症是机体对损伤刺激的防御反应^[1]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁外壁的主要成分,可刺激巨噬细胞引发炎症反应,导致许多促炎因子,如一氧化氮(nitric oxide, NO)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 大量产生^[2]。促炎因子过度 and 持续地释放可导致严重的组织损伤和病理变化,致使炎症出现进展和恶化。因此,靶向失调的炎症过程和调节炎症因子成为了控制炎症性疾病的有效治疗手段。目前,甾体类抗炎药在炎症性疾病的治疗中应用最广泛,但长期大量使用此类药物会对胃肠道、肝脏、神经系统、心血管系统等造成损害^[3-4]。因此,从天然药物中寻找安全有效的抗炎药物具有重要意义。

岭南山竹子 *Garcinia oblongifolia* Champ. ex Benth. 为藤黄科藤黄属植物,主要分布在广东、广西、海南等地,其果实、树皮、树叶均可作为药材,具有消炎止痛、收敛生肌的作用,常外用于治疗烧烫伤、下肢溃烂、湿疹等^[5]。已有研究表明,岭南山竹子中可分离出多种化合物,包括苯甲酮类、咕吨酮类、甾体类及萜类等^[6]。苯甲酮类化合物是岭南山竹子的主要成分,也是藤黄属植物的特征性化合物,大多数该类化合物具有良好的抗炎活性^[7]。oblongifolins A(OA)是从岭南山竹子中提取分离得到的多异戊烯基取代的苯甲酮类化合物,本课题组前期研究发现,OA具有良好的抗炎活性。为进一步研究OA的抗炎作用机制,本研究拟利用LPS诱导RAW264.7巨噬细胞构建体外炎症细胞模型,分别从基因水平、细胞因子水平和蛋白水平方面探讨OA的体外抗炎作用和机制,旨在为OA治疗相关炎症性疾病提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括XS205DU型电子分析天平(美国Mettler Toledo公司)、f5810R型高速冷冻离心机(美国Eppendorf公司)、3111型CO₂恒温培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)、Odyssey型双色红外激光成像仪(美国LI-COR公司)、CFX96型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司)、Synergy™ H1型全功能酶标仪(美国Bio-Tek公司)、Accuri® C6 Plus型流式细胞分析仪(美国BD公司)、DMi8型倒置荧光显微镜(德国Leica公司)等。

1.2 主要药品与试剂

OA(纯度>98%)由本课题组从岭南山竹子果皮中提取、分离并纯化;地塞米松(DEX)磷酸钠注射液(阳性

对照药,批号2209205,规格1 mL:5 mg)购自国药集团容生制药有限公司;LPS(批号L2880)购自美国Sigma公司;TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-4、IL-10酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号分别为G202412M、G203049M、G203063M、G203051M、G203075M)均购自泉州市睿信生物科技有限公司;NO试剂盒(批号20220628)购自南京建成生物工程研究所;活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒(批号S0033)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;山羊抗兔IgG(H+L)荧光二抗(批号WA320972)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;兔源 β -肌动蛋白(β -actin)、核因子 κ B p65(nuclear factor κ B p65, NF- κ B p65)、核因子 κ B抑制蛋白 α (inhibitor of NF- κ B α , I κ B α)、Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)、醌NADH脱氢酶1[NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, NQO1]、血红素加氧酶1(heme oxygenase-1, HO-1)、核转录因子红系2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)抗体和CoraLite 594山羊抗兔二抗(批号分别为20536-1-AP、10745-1-AP、10268-1-AP、10503-2-AP、11451-1-AP、10701-1-AP、16396-1-AP、SA00013-4)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔源磷酸化NF- κ B p65(phosphorylated NF- κ B p65, p-NF- κ B p65)、p-I κ B α 抗体(批号分别为TP56371、TP56280)均购自艾比玛特医药科技(上海)有限公司;YF®488山羊抗兔二抗(批号Y6105L)购自上海百赛生物技术股份有限公司;胎牛血清(批号A11HOOK)购自美国Gemini公司;高糖DMEM培养基(批号8122356)购自美国Gibco公司;MTT试剂(批号M8180)购自北京索莱宝科技有限公司;总RNA提取试剂盒(批号17921KD1)购自美国Axygen公司;Perfect Real Time试剂盒、TB Green® premix Ex Taq™ II(批号分别为RR047A、RR420A)均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 细胞株

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞RAW264.7购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

2 方法

2.1 细胞培养

将RAW264.7细胞接种于含有10%胎牛血清、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 μ g/mL)的DMEM培养基的培养瓶中,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的恒温培养箱中培养,待细胞长至培养瓶底面70%~80%时进行传代,然后进行后续实验。

2.2 OA干预浓度的筛选

采用MTT法检测。取对数生长期的RAW264.7细胞,以 5×10^4 个/mL接种到96孔板中,每孔100 μ L。待细胞贴壁后加入不同浓度的OA,在无LPS刺激和有LPS刺激条件下分别测定细胞存活率,考察不同浓度OA对RAW264.7细胞增殖的影响。设置对照组[0.5%二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)]、无LPS刺激的OA组、单用LPS刺激组、有LPS刺激的OA组。无LPS刺激的OA组细胞培养24 h后,加入不同浓度OA(7.5、15、30、60、80 μ mol/L,浓度根据预实验结果设置),有LPS刺激的OA组细胞先用1 μ g/mL LPS刺激1 h后,再加入不同浓度OA(0、7.5、15、30 μ mol/L,浓度根据无LPS刺激的OA组MTT实验结果设置),每个浓度设3个复孔,混合培养24 h。另设不含细胞、不含OA,仅含0.5% DMSO的空白组。每孔加入MTT溶液20 μ L,继续培养4 h,吸弃上清液,随后每孔中再加入DMSO 150 μ L,避光振荡10 min,用酶标仪在490 nm波长处测定各孔的光密度(optical density, OD)值,并计算细胞存活率:细胞存活率(%) = $(OD_{\text{给药组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.3 细胞中NO和ROS含量的检测

采用Griess法和流式细胞术检测。将RAW264.7细胞以 1×10^6 个/mL接种到6孔板中,每孔1 mL。设置对照组(0.5% DMSO)、LPS组(1 μ g/mL LPS)、DEX组(10 μ mol/L DEX+1 μ g/mL LPS,浓度根据预实验结果设置)和OA低、中、高浓度组(7.5、15、30 μ mol/L OA+1 μ g/mL LPS,浓度根据“2.2”项下结果设置),每组设3个复孔。除对照组外,其余各组先用LPS刺激1 h后,再与药物混合培养24 h。收集各组细胞上清液100 μ L,按照试剂盒说明书方法检测NO含量。收集各组细胞,加入10 μ mol/L 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯工作液1 mL,37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,加入PBS 500 μ L重悬细胞,然后立即用流式细胞仪检测ROS含量。

2.4 细胞形态的观察与细胞中炎症因子含量的检测

细胞分组及给药方法同“2.3”项。各组细胞经药物作用24 h后,将细胞培养板置于倒置显微镜下,拍照并分析各组细胞形态的变化情况。随后收集各组细胞上清液,根据ELISA试剂盒说明书方法检测上清液中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-4和IL-10含量。

2.5 细胞中TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA表达的检测

采用实时荧光定量PCR法检测。细胞分组及给药方法同“2.3”项。各组细胞经药物作用24 h后,收集各组细胞,根据试剂盒提取总RNA,测定其浓度,对RNA进行定量后反转录成cDNA,然后进行PCR扩增。PCR扩增条件为95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性5 s,60 $^{\circ}$ C退火延伸30 s,共循环40次。以 β -actin为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$

法计算细胞中TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA表达水平。各目的基因引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司根据设计合成,引物序列及产物大小见表1。

表1 引物序列及产物大小

基因	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')	产物大小/bp
TNF- α	GGACTAGCCAGGAGGAGAACAG	GCCAGTGAGTGAAAGGGACAGAAC	103
IL-6	ACTTCCATCCAGTTGCCCTTCTGG	TAAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGG	141
IL-1 β	TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG	TGCTCATGTCCTCATCTGGAAGG	118
β -actin	GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG	ATGCCACAGGATTCATACC	174

2.6 细胞中NF- κ B、Nrf2通路相关蛋白表达的检测

采用蛋白免疫印迹法检测。细胞分组及给药方法同“2.3”项。各组细胞经药物作用24 h后,收集各组细胞,加入含有蛋白酶抑制剂的裂解液冰浴解裂提取细胞总蛋白,定量蛋白浓度,煮沸变性后,通过10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜;用无蛋白快速封闭液封闭15 min后,分别加入 β -actin、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Keap1、NQO1、HO-1、Nrf2一抗(稀释比例均为1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜;用TBST缓冲液洗膜3次,加入荧光二抗(稀释比例为1:10 000),室温下避光孵育1 h, TBST缓冲液洗涤后,用双色红外激光成像仪成像。用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.7 细胞中NF- κ B p65和Nrf2蛋白定位观察

采用细胞免疫荧光法检测。将RAW264.7细胞以 1.5×10^5 个/mL接种到24孔板内的无菌盖玻片上,待24 h细胞贴壁后,分为对照组(0.5% DMSO)、LPS组(1 μ g/mL)、OA高浓度组(30 μ mol/L OA+1 μ g/mL LPS),每组设3个复孔。除对照组外,其余各组细胞先用LPS刺激1 h后,再与药物混合培养24 h。收集各组细胞,用4%多聚甲醛固定30 min,随后用0.5% Triton X-100通透20 min,并用10%山羊血清室温封闭1 h,加入NF- κ B p65、Nrf2一抗(稀释比例分别为1:3 000、1:200),4 $^{\circ}$ C孵育过夜;用PBS洗涤3次,加入相应的荧光二抗(稀释比例均为1:250),室温避光孵育1 h;用PBS洗涤3次,加入4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)避光孵育10 min,用PBS洗涤后,封片,在荧光显微镜下观察并拍照(NF- κ B p65蛋白呈绿色荧光,Nrf2蛋白呈红色荧光,细胞核呈蓝色荧光)。

2.8 统计学方法

采用SPSS 27.0软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较时,若方差齐采用LSD- t 检验,若方差不齐则采用Dunnett's T_3 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 OA干预浓度的筛选结果

与对照组比较,在无LPS刺激条件下,60、80 μ mol/L OA均能显著降低细胞存活率($P < 0.05$),而7.5、15、30

μmol/L OA 均对细胞存活率无显著影响 ($P>0.05$); 在 1 μg/mL LPS 刺激条件下, 单用 LPS 和联用 7.5、15、30 μmol/L OA 均对细胞存活率无显著影响 ($P>0.05$), 结果见表 2。因此, 本研究选用 7.5、15、30 μmol/L 分别作为 OA 的低、中、高浓度进行后续实验。

表 2 各组细胞存活率检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞存活率/%	组别	细胞存活率/%
对照组	100	无 LPS 刺激的 OA 80 μmol/L 组	56.24 ± 5.95 ^a
无 LPS 刺激的 OA 7.5 μmol/L 组	101.91 ± 2.39	单用 LPS 刺激组	102.33 ± 2.97
无 LPS 刺激的 OA 15 μmol/L 组	100.82 ± 3.88	有 LPS 刺激的 OA 7.5 μmol/L 组	101.36 ± 7.21
无 LPS 刺激的 OA 30 μmol/L 组	102.84 ± 6.60	有 LPS 刺激的 OA 15 μmol/L 组	98.81 ± 1.39
无 LPS 刺激的 OA 60 μmol/L 组	72.36 ± 1.36 ^a	有 LPS 刺激的 OA 30 μmol/L 组	101.84 ± 7.11

a: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

3.2 OA 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中 NO 和 ROS 的影响

与对照组比较, LPS 组细胞中 NO 和 ROS 含量均显著升高 ($P<0.05$); 与 LPS 组比较, DEX 组和 OA 各浓度组细胞中 NO 和 ROS (OA 低浓度组除外) 含量均显著降低 ($P<0.05$)。结果见表 3。

表 3 各组细胞中 NO 和 ROS 含量检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	NO/(μmol/L)	ROS/%	组别	NO/(μmol/L)	ROS/%
对照组	4.54 ± 0.19	0.33 ± 0.04	OA 低浓度组	22.12 ± 1.25 ^b	48.20 ± 2.55
LPS 组	26.15 ± 0.55 ^a	59.90 ± 3.53 ^a	OA 中浓度组	16.92 ± 0.58 ^b	41.00 ± 0.59 ^b
DEX 组	17.12 ± 0.38 ^b	40.20 ± 1.65 ^b	OA 高浓度组	9.97 ± 0.44 ^b	31.50 ± 4.90 ^b

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与 LPS 组比较, $P<0.05$ 。

3.3 OA 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞形态的影响

对照组细胞呈圆形, 形态较均一。LPS 组出现大量伪足变的纺锤形和不规则细胞。与 LPS 组比较, DEX 组和 OA 各浓度组的纺锤形和不规则细胞逐渐减少, 圆形细胞增多。结果见图 1。

3.4 OA 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中炎症因子的影响

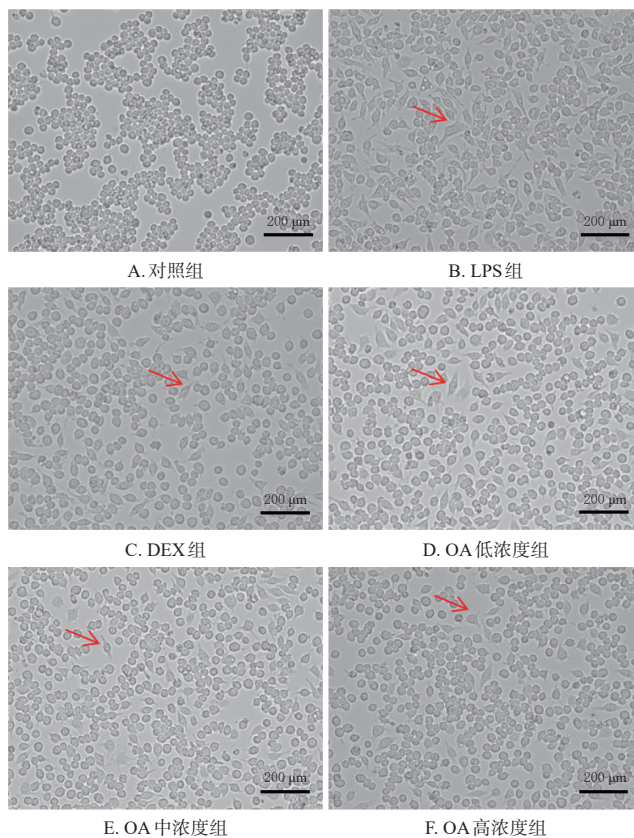
与对照组比较, LPS 组细胞中 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-4 和 IL-10 含量均显著升高 ($P<0.05$); 与 LPS 组比较, DEX 组和 OA 各浓度组细胞中促炎因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 含量均显著降低 ($P<0.05$), 抗炎因子 IL-4 和 IL-10 含量均显著升高 ($P<0.05$)。结果见表 4。

3.5 OA 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中 TNF-α、IL-6、IL-1β mRNA 表达的影响

与对照组比较, LPS 组细胞中 TNF-α、IL-6、IL-1β mRNA 表达水平均显著升高 ($P<0.05$); 与 LPS 组比较, DEX 组和 OA 各浓度组细胞中 TNF-α、IL-6 (OA 低浓度组除外)、IL-1β mRNA 表达水平均显著降低 ($P<0.05$)。结果见表 5。

3.6 OA 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中 NF-κB 通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较, LPS 组细胞中 p-NF-κB p65 和 p-IκBα



箭头: 纺锤形和不规则细胞。

图 1 OA 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞形态的影响

表 4 各组细胞中 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-4 和 IL-10 含量检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TNF-α/(ng/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-1β/(pg/mL)	IL-4/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)
对照组	8.39 ± 0.57	2.52 ± 0.10	25.59 ± 11.28	9.45 ± 0.38	5.34 ± 1.32
LPS 组	240.61 ± 3.98 ^a	75.37 ± 3.62 ^a	4 493.70 ± 145.04 ^a	25.98 ± 1.19 ^a	32.34 ± 1.33 ^a
DEX 组	116.27 ± 2.57 ^b	31.06 ± 0.76 ^b	1 485.38 ± 45.89 ^b	44.35 ± 1.10 ^b	68.89 ± 1.65 ^b
OA 低浓度组	144.42 ± 4.97 ^b	52.35 ± 2.36 ^b	2 016.04 ± 42.03 ^b	40.91 ± 2.48 ^b	59.76 ± 1.23 ^b
OA 中浓度组	101.25 ± 7.26 ^b	41.86 ± 0.78 ^b	1 577.59 ± 38.93 ^b	50.65 ± 0.87 ^b	97.75 ± 2.62 ^b
OA 高浓度组	76.04 ± 1.36 ^b	33.34 ± 1.29 ^b	806.18 ± 25.73 ^b	55.35 ± 1.68 ^b	110.51 ± 4.10 ^b

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与 LPS 组比较, $P<0.05$ 。

表 5 各组细胞中 TNF-α、IL-6、IL-1β mRNA 表达水平检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TNF-α mRNA	IL-6 mRNA	IL-1β mRNA
对照组	1.04 ± 0.35	1.09 ± 0.56	1.01 ± 0.15
LPS 组	15.88 ± 1.75 ^a	1 412.27 ± 126.68 ^a	2 909.47 ± 242.93 ^a
DEX 组	7.78 ± 1.31 ^b	225.74 ± 23.54 ^b	579.45 ± 35.84 ^b
OA 低浓度组	11.69 ± 1.96 ^b	1 185.65 ± 223.25	1 839.08 ± 448.66 ^b
OA 中浓度组	10.38 ± 1.08 ^b	782.34 ± 156.41 ^b	1 710.47 ± 314.78 ^b
OA 高浓度组	5.49 ± 1.14 ^b	627.29 ± 105.19 ^b	988.20 ± 128.80 ^b

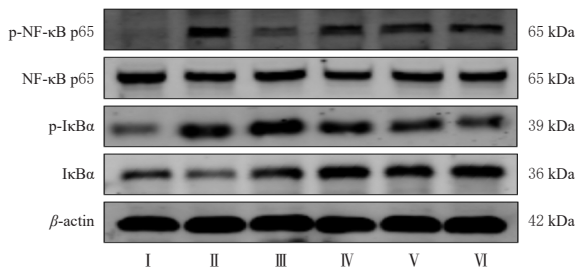
a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与 LPS 组比较, $P<0.05$ 。

蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.05$), IκBα 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与 LPS 组比较, DEX 组和 OA 各浓度组细胞中 p-NF-κB p65 和 p-IκBα 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$), IκBα 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.05$)。结果见表 6、图 2。

表6 各组细胞中NF-κB通路相关蛋白表达水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p-NF-κB p65/β-actin	NF-κB p65/β-actin	p-IκBα/β-actin	IκBα/β-actin
对照组	0.023 ± 0.002	0.535 ± 0.043	0.420 ± 0.008	0.738 ± 0.060
LPS组	0.212 ± 0.020 ^a	0.513 ± 0.030	0.622 ± 0.024 ^a	0.474 ± 0.034 ^a
DEX组	0.082 ± 0.010 ^b	0.518 ± 0.033	0.518 ± 0.024 ^b	0.791 ± 0.097 ^b
OA低浓度组	0.153 ± 0.011 ^b	0.475 ± 0.027	0.486 ± 0.033 ^b	0.919 ± 0.095 ^b
OA中浓度组	0.132 ± 0.023 ^b	0.506 ± 0.019	0.439 ± 0.014 ^b	0.855 ± 0.121 ^b
OA高浓度组	0.113 ± 0.018 ^b	0.483 ± 0.004	0.404 ± 0.021 ^b	1.060 ± 0.129 ^b

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与LPS组比较, $P < 0.05$ 。



I: 对照组; II: LPS组; III: DEX组; IV: OA低浓度组; V: OA中浓度组; VI: OA高浓度组。

图2 各组细胞中NF-κB通路相关蛋白表达的电泳图

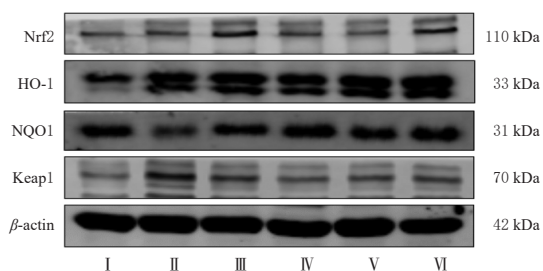
3.7 OA对LPS诱导RAW264.7细胞中Nrf2通路蛋白表达的影响

与对照组比较, LPS组细胞中HO-1和Keap1蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$), NQO1蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$); 与LPS组比较, DEX组和OA各浓度组细胞中Keap1蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$), Nrf2(OA低、中浓度组除外)、HO-1(OA低浓度组除外)、NQO1蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见表7、图3。

表7 各组细胞中Nrf2通路相关蛋白表达水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Nrf2/β-actin	HO-1/β-actin	NQO1/β-actin	Keap1/β-actin
对照组	0.267 ± 0.054	0.127 ± 0.043	0.433 ± 0.057	0.257 ± 0.050
LPS组	0.211 ± 0.041	0.318 ± 0.006 ^a	0.192 ± 0.019 ^a	0.624 ± 0.065 ^a
DEX组	0.417 ± 0.059 ^b	0.452 ± 0.039 ^b	0.363 ± 0.055 ^b	0.396 ± 0.066 ^b
OA低浓度组	0.223 ± 0.036	0.380 ± 0.019	0.313 ± 0.025 ^b	0.408 ± 0.073 ^b
OA中浓度组	0.287 ± 0.055	0.451 ± 0.062 ^b	0.327 ± 0.029 ^b	0.325 ± 0.012 ^b
OA高浓度组	0.400 ± 0.060 ^b	0.541 ± 0.038 ^b	0.418 ± 0.022 ^b	0.296 ± 0.037 ^b

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与LPS组比较, $P < 0.05$ 。



I: 对照组; II: LPS组; III: DEX组; IV: OA低浓度组; V: OA中浓度组; VI: OA高浓度组。

图3 各组细胞中Nrf2通路相关蛋白表达的电泳图

3.8 OA对LPS诱导RAW264.7细胞中NF-κB p65和Nrf2蛋白核易位的影响

对照组细胞中NF-κB p65蛋白未与细胞核重叠, 而Nrf2蛋白与细胞核重叠; 与对照组比较, LPS组细胞中NF-κB p65蛋白与细胞核重叠, Nrf2蛋白与细胞核部分重叠; 与LPS组比较, OA高浓度组细胞中NF-κB p65蛋白与细胞核部分重叠, Nrf2蛋白与细胞核重叠。结果见图4、图5。

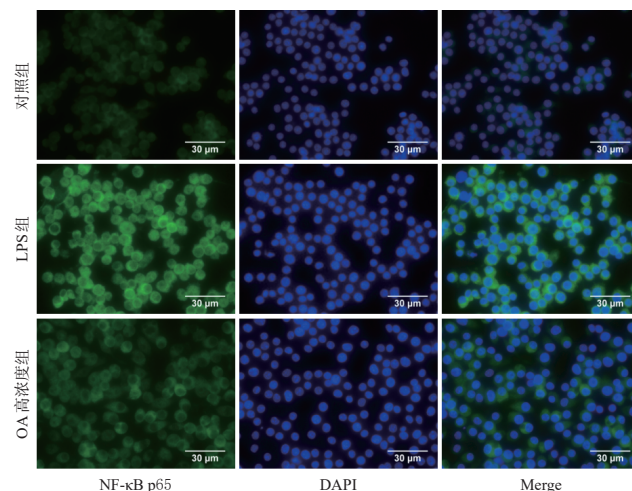


图4 OA对LPS诱导RAW264.7细胞中NF-κB p65蛋白核易位的影响

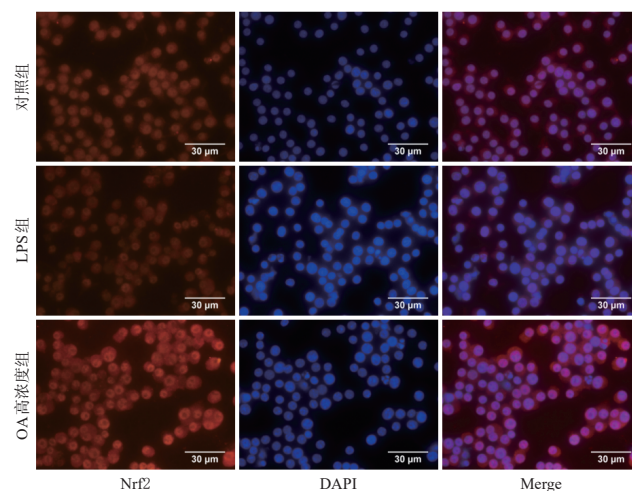


图5 OA对LPS诱导RAW264.7细胞中Nrf2蛋白核易位的影响

4 讨论

巨噬细胞参与了机体免疫反应, 当受到LPS刺激时巨噬细胞通过激活Toll样受体介导的细胞内信号通路(如NF-κB), 来释放大量的NO、TNF-α、IL-1β、IL-6等炎症因子, 从而加重机体的炎症反应^[2]。NO是一种多效自由基信使分子, 主要由NO合成酶催化产生, 其过量生成与炎症反应密切相关^[8]。IL-4和IL-10为抗炎因子, 在免疫系统中扮演着平衡和调节免疫反应的重要角色, 有助于维持机体内的稳态^[9]。TNF-α、IL-6和IL-1β为促炎因子, 能促进炎症反应, 可导致疼痛、发热、血管舒张、通透性增强、白细胞渗出等炎症反应发生^[10]。因此, 抑制炎

症因子的产生,尤其是抑制促炎因子的分泌,可以减轻炎症反应。本研究结果显示,LPS刺激RAW264.7细胞能显著升高NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量,表明体外炎症模型建立成功;经OA处理后能够显著促进IL-4、IL-10释放,降低NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量并能抑制TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA表达。这些结果表明OA能抑制LPS诱导RAW264.7细胞的炎症反应,具有良好的抗炎活性。

NF- κ B通路是LPS诱导炎症因子表达的关键通路,在细胞中主要以p50/p65异源二聚体形式存在;在LPS刺激下,p50/p65二聚体易位到细胞核引起下游多种基因的表达^[11]。p65是调控炎症反应的关键蛋白,因此抑制NF- κ B p65是治疗炎症性疾病的关键靶点和有效治疗策略。本研究结果显示,OA能够显著抑制LPS诱导的RAW264.7细胞中NF- κ B p65、I κ B α 蛋白磷酸化表达和I κ B α 蛋白降解,且抑制NF- κ B p65核易位,表明OA可能通过抑制NF- κ B通路对LPS诱导的RAW264.7细胞发挥抗炎作用。

已有研究表明,内源性自由基如ROS在宿主防御中起关键作用,但过量的ROS可引发和促进炎症性疾病^[12]。ROS还可和NO协同作用,增强氧化应激和损伤^[13]。本研究结果表明,OA显著抑制LPS诱导的RAW264.7细胞中ROS的积累。Nrf2是细胞介导抗氧化应激反应的关键转录因子,生理条件下Nrf2与Keap1在细胞质中联合;应激状态下Nrf2被活化,Nrf2就会从Keap1中解离并转移到细胞核中,激活其下游HO-1、NQO1等多种抗氧化因子的表达,启动抗氧化,快速清除ROS,从而减轻氧化损伤^[14]。HO-1是一种细胞保护酶,具有限速酶的作用,其受Nrf2调控,并催化血红素降解为胆绿素、碳氧化物和铁^[15]。本研究结果显示,OA能够显著抑制Keap1蛋白表达,增加Nrf2、HO-1和NQO1蛋白表达水平,并促进Nrf2向细胞核易位,表明OA能够通过激活Nrf2通路发挥抗炎、抗氧化的作用。

综上所述,OA能够抑制LPS诱导的RAW264.7细胞炎症,其作用机制可能与抑制NF- κ B通路、激活Nrf2通路、减少ROS和炎症因子的过度释放有关。

参考文献

[1] ZHEN D, XUAN T Q, HU B Q, et al. Pteryxin attenuates LPS-induced inflammatory responses and inhibits NLRP3 inflammasome activation in RAW264.7 cells[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 284: 114753.

[2] JAYAKUMAR T, HUANG C J, YEN T L, et al. Activation of Nrf2 by esculetin mitigates inflammatory responses through suppression of NF- κ B signaling cascade in RAW264.7 cells[J]. Molecules, 2022, 27(16): 5143.

[3] IDE J, SHOAIBI A, WAGNER K, et al. Patterns of comorbidities and prescribing and dispensing of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) among patients with osteoarthritis in the USA: real-world study[J]. Drugs Aging, 2024, 41(4): 357-366.

[4] ALKANDARI F M, MOHAMED H S, AHMED S A, et

al. Protective effects of propolis and chitosan nanoparticles against ibuprofen-induced hepatotoxicity in albino rats[J]. Diseases, 2024, 12(3): 49.

- [5] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准: 第二册[M]. 南京: 广西科学出版社, 1996: 20-21.
- Department of Health of Guangxi Zhuang Autonomous Region. Guangxi traditional Chinese medicine standards: volume 2[M]. Nanning: Guangxi Science Press, 1996: 20-21.
- [6] WU Z N, DAI X Y, WANG W Z, et al. Polyprenylated benzophenones and tocotrienol derivatives from the edible fruits of *Garcinia oblongifolia* champ. ex Benth. and their cytotoxicity activity[J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(34): 10506-10520.
- [7] SUKANDAR E R, KAENNAKAM S, WONGSUWAN S, et al. Schomburginones A-J, geranylated benzophenones from the leaves of *Garcinia schomburgkiana* and their cytotoxic and anti-inflammatory activities[J]. Phytochemistry, 2023, 211: 113701.
- [8] YANG X X, LIU Z G, FANG M Y, et al. Novel pterostilbene derivatives ameliorate heart failure by reducing oxidative stress and inflammation through regulating Nrf2/NF- κ B signaling pathway[J]. Eur J Med Chem, 2023, 258: 115602.
- [9] LIU W, YU M Y, XIE D, et al. Melatonin-stimulated MSC-derived exosomes improve diabetic wound healing through regulating macrophage M1 and M2 polarization by targeting the PTEN/Akt pathway[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 259.
- [10] YANG F M, FAN D, YANG X Q, et al. The artemisinin analog SM934 alleviates dry eye disease in rodent models by regulating TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling[J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(4): 593-603.
- [11] YU H, LIN L B, ZHANG Z Q, et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 209.
- [12] HAN X X, JU L, SAENGOW C, et al. Nano oxygen chamber by cascade reaction for hypoxia mitigation and reactive oxygen species scavenging in wound healing[J]. Bioact Mater, 2024, 35: 67-81.
- [13] HOORELBEKE D, DECROCK E, SMET M D, et al. Cx43 channels and signaling via IP₃/Ca²⁺, ATP, and ROS/NO propagate radiation-induced DNA damage to non-irradiated brain microvascular endothelial cells[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(3): 194.
- [14] LI Y, FENG Y F, LIU X T, et al. Songorine promotes cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2 induction during sepsis[J]. Redox Biol, 2021, 38: 101771.
- [15] SAHA S, BUTTARI B, PANIERI E, et al. An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation[J]. Molecules, 2020, 25(22): 5474.

(收稿日期: 2024-01-10 修回日期: 2024-04-25)

(编辑: 邹丽娟)