

中图分类号: R913; R965 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)20-0082-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.20.018



鱼腥草素钠对脂多糖诱导单核巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应的抑制作用*

胡学洋^{1,2}, 黄鹏¹, 吴陈亮^{3△}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 江苏省南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 3. 上海欧米尼医药科技有限公司, 上海 201203)

摘要:目的 探讨鱼腥草素钠(SH)对脂多糖(LPS)诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应的抑制作用及其机制。方法 实验分为空白对照组(等体积培养基),模型组(等体积培养基),SH低、中、高剂量组(1.25, 5, 10 μmol/L),以含不同浓度SH的常规培养基培养细胞2h,后4组细胞加入LPS继续培养24h。收集细胞上清液,测定一氧化氮(NO)水平,采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素6(IL-6)及前列腺素E₂(PGE₂)的水平;提取细胞总蛋白,采用Western blot法检测诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶2(COX-2)蛋白及核因子-κB(NF-κB)通路相关蛋白(NF-κB-P-P65蛋白和P-IκB-α蛋白)的表达水平。结果 与模型组比较,SH中、高剂量组细胞NO水平显著降低,SH低、中、高剂量组细胞TNF-α,IL-6,PGE₂水平和COX-2,NF-κB-P-P65,P-IκB-α蛋白表达水平均显著降低,SH中、高剂量组细胞iNOS蛋白表达水平显著降低(P<0.01)。结论 SH能抑制LPS诱导的RAW264.7细胞炎症因子的分泌,其作用机制与抑制炎症蛋白iNOS和COX-2的表达及NF-κB通路相关蛋白的磷酸化有关。

关键词:鱼腥草素钠;脂多糖;单核巨噬细胞 RAW264.7;炎症因子;核因子-κB

Inhibitory Effect of Sodium Houttuynonate on Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in Mononuclear Phagocyte RAW264.7

HU Xueyang^{1,2}, HUANG Peng¹, WU Chenliang³

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230012; 2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong, Jiangsu, China 226133; 3. Shanghai OMNI Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai, China 201203)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect and mechanism of sodium houttuynonate (SH) on the lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in mononuclear phagocyte RAW264.7 of mice. **Methods** RAW264.7 cells were divided into the blank control group (equal volume medium), the model group (equal volume medium), the SH low-, medium- and high-dose groups (1.25, 5, 10 μmol/L). Cells were cultured in conventional medium containing different concentrations of SH for 2 h, and then LPS was added into the last four groups for induction (24 h). Cell supernatant was collected to detect the nitric oxide (NO) level, and tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and prostaglandin E₂ (PGE₂) levels were detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Total cell proteins were extracted, and the expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and nuclear factor-κB (NF-κB) pathway-related proteins (NF-κB-P-P65 and P-IκB-α) were detected by the Western blot. **Results** Compared with those in the model group, the NO level in the SH medium- and high-dose groups was significantly lower, the TNF-α, IL-6, PGE₂ levels, COX-2, NF-κB-P-P65 and P-IκB-α expression levels in the SH low-, medium- and high-dose groups were significantly lower, and the iNOS expression level in the SH medium- and high-dose groups was significantly lower (P<0.01). **Conclusion** SH can inhibit the secretion of LPS-induced inflammatory factors in RAW264.7 cells, its mechanism is related to the inhibition of the expression of inflammatory proteins (iNOS and COX-2) and the phosphorylation of NF-κB pathway-related proteins.

Key words: sodium houttuynonate; lipopolysaccharide; mononuclear phagocyte RAW264.7; inflammatory factor; nuclear factor-κB

巨噬细胞是机体内重要的炎性细胞,其通过参与炎症反应的启动,分泌大量的炎性介质和炎性因子,促炎因子的过量表达会进一步增强和放大炎症反应,在

炎症疾病的发生发展过程中发挥重要作用^[1-2]。鱼腥草为三白草科植物蕺菜的干燥地上部分,在我国南方多有种植,《中国药典》记载其有清热解毒、消痈排脓、利

*基金项目:安徽省高校自然科学基金项目[KJ2020A0422]。

第一作者:胡学洋,男,硕士,助理工程师,研究方向为新药研发,(电子信箱)hxxy1212@163.com。

△通信作者:吴陈亮,男,博士,高级工程师,研究方向为新药研发,(电子信箱)clwu@omni-pharma.com。

尿通淋的作用^[3]。成分中以鱼腥草挥发油的药用活性价值较高^[4],其有效成分主要为鱼腥草素,但结构不稳定。目前使用的主要是鱼腥草素和亚硫酸氢钠的加合物鱼腥草素钠(SH),该化合物保留了鱼腥草素的主要药理活性,且比鱼腥草素更稳定^[5-6]。SH(分子式为 $C_{12}H_{23}NaO_5S$)为白色的针状结晶性粉末,在水或乙醇中微溶,在氯仿或苯中几乎不溶。SH有抗炎^[7]、抗菌^[8]、止咳平喘^[9]、抗过敏^[9]、抗肿瘤^[10]作用,但其对脂多糖(LPS)诱导小鼠单核巨噬细胞RAW264.7的作用及机制尚不明确。因此,本研究中采用LPS诱导RAW264.7细胞以复制体外炎症模型,探讨SH抑制炎症反应的作用机制,为SH的应用与开发提供理论依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器:BL310/BL21S型分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司,精度为0.01 mg);HF100型CO₂培养箱(上海力申科学仪器有限公司);CMax Plus型酶标仪(美国Molecular Devices公司);HR/T16MM型高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司);PowerPac型电泳仪/转膜仪(美国Bio-Rad公司);Focus化学发光凝胶成像仪(杭州申花科技有限公司)。

试剂:SH(湖北诺纳科技有限公司,批号为2022082502);LPS(美国Sigma公司,批号为L2630);DMEM高糖培养基(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号为KGM12800-500);噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司,批号为M2003);一氧化氮(NO)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号为S0023);前列腺素E₂(PGE₂)检测试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,批号为JM-02345M2);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)检测试剂盒(批号为RK00027),白细胞介素6(IL-6)检测试剂盒(批号为RK00008),均购自武汉爱博泰克公司;诱导型一氧化氮合酶(iNOS)抗体、Rabbit β -Actin(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为BA0362,81115-1-RR);核因子- κ B(NF- κ B)P65抗体(美国proteintech公司,批号为10745-1-AP);NF- κ B-P-P65抗体、P-I κ B- α 抗体(美国Zen-Bio公司,批号分别为310052,R24671);环氧合酶2(COX-2)抗体(美国Abcam公司,批号为ab32510);BCA蛋白浓度检测试剂盒(美国Perhor公司,批号为PH70013);胎牛血清(美国Excell Bio公司,批号为12J079)。

细胞系:小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7(南京普皓生物技术有限公司,批号为778194)。

1.2 方法

细胞培养:取RAW264.7细胞,加入含10%胎牛血

清的DEME高糖培养基,在37℃、5%CO₂培养箱中培养。每2~4天传代1次。

NO水平:取对数生长期RAW264.7细胞,调整密度为 1×10^6 个/mL,以每孔2 mL加入6孔板中,置37℃、5%CO₂培养箱中培养。实验分为空白对照组(等体积培养基)、模型组(等体积培养基)及SH低、中、高剂量组(1.25, 5, 10 μ mol/L)。以含不同浓度SH的常规培养基培养细胞2 h,加入LPS置37℃、5%CO₂培养箱继续培养24 h。使用酶标仪测定540 nm波长的吸光度(A)值并计算NO含量。

TNF- α , IL-6, PGE₂水平:取对数生长期RAW264.7细胞,同法分组、给药、培养。采用酶链免疫吸附法检测TNF- α , IL-6, PGE₂水平。

iNOS、COX-2及NF- κ B通路相关蛋白表达水平:取对数生长期RAW264.7细胞,同法分组、给药、培养,提取细胞总蛋白,用BCA试剂盒对样品蛋白进行定量。采用Western blot法检测iNOS, COX-2, β -actin及NF- κ B P65, NF- κ B-P-P65, P-I κ B- α , β -actin蛋白的表达水平。

1.3 统计学处理

采用Graphpad Prism 9统计学软件分析。组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

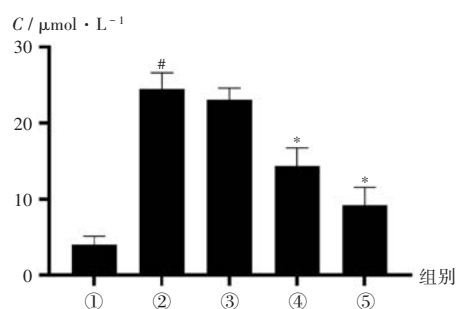
2 结果

2.1 NO水平

与空白对照组比较,模型组细胞NO水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,SH中、高剂量组细胞NO水平显著降低($P < 0.01$)。详见图1。

2.2 细胞TNF- α , IL-6, PGE₂水平

与空白对照组比较,模型组细胞TNF- α , IL-6及PGE₂水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,SH低、



注:①-⑤分别为空白对照组、模型组及SH低、中、高剂量组。与①组比较,* $P < 0.01$;与②组比较,* $P < 0.01$ 。图2至图4同。

图1 细胞NO水平($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Note:①-⑤ refers to blank control group, model group, SH low-, medium- and high-dose groups, respectively. Compared with those in the ①,* $P < 0.01$; compared with those in the ②,* $P < 0.01$ (for Fig. 1-4).

Fig. 1 NO level in cells ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

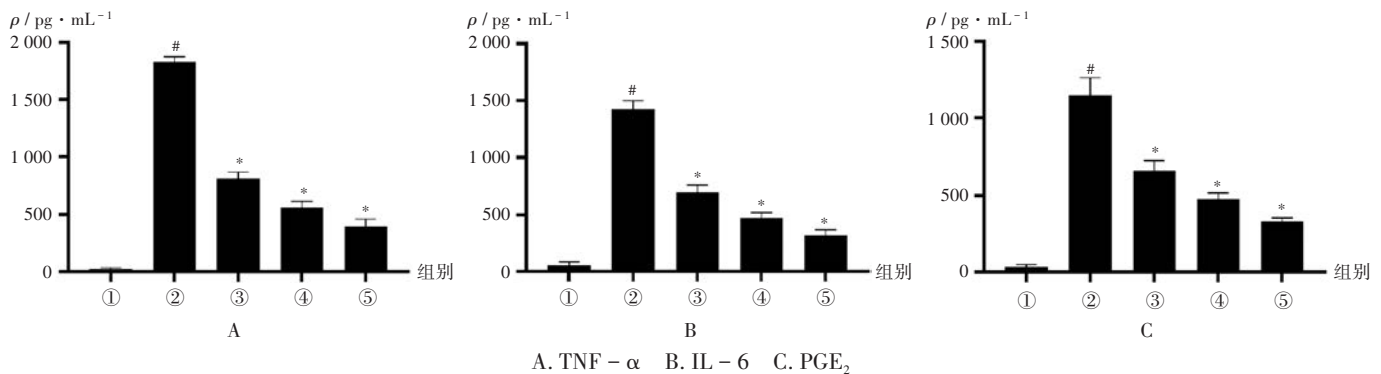


图2 细胞TNF-α,IL-6,PGE₂水平(̄X ± s, n = 3)

Fig. 2 TNF-α, IL-6 and PGE₂ levels in cells (̄X ± s, n = 3)

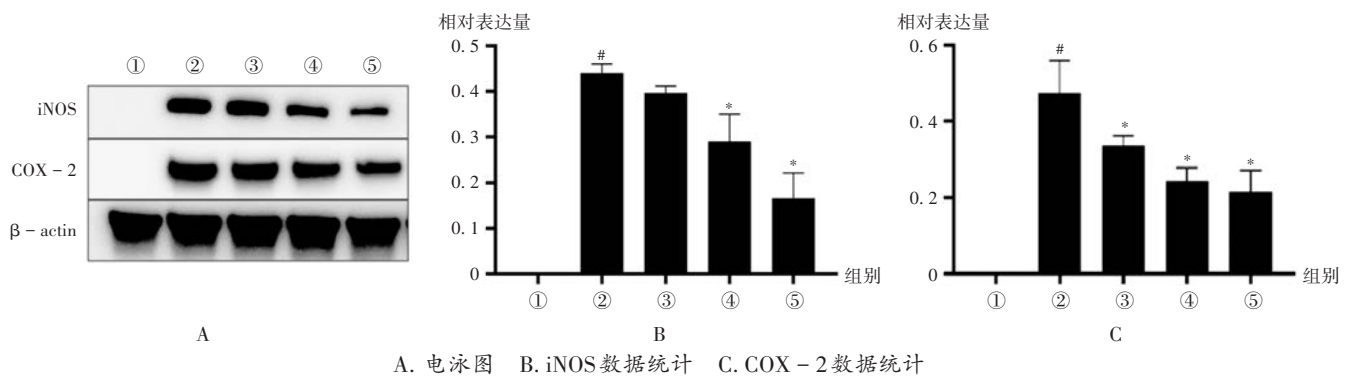


图3 细胞iNOS和COX-2蛋白表达水平(̄X ± s, n = 3)

A. Electropherogram of protein expression B. Data statistics of iNOS expression C. Data statistics of COX-2 expression

Fig. 3 Expression levels of iNOS and COX-2 proteins in cells (̄X ± s, n = 3)

中、高剂量组细胞TNF-α,IL-6,PGE₂表达水平均显著降低($P < 0.01$)。详见图2。

2.3 细胞iNOS和COX-2蛋白表达水平

与空白对照组比较,模型组细胞iNOS、COX-2蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,SH中、高剂量组细胞iNOS蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$),SH低、中、高剂量组细胞COX-2蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。详见图3。

2.4 细胞NF-κB信号通路相关蛋白表达水平

与空白对照组比较,模型组细胞NF-κB-P-P65、P-IκB-α蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,SH低、中、高剂量组细胞NF-κB-P-P65和P-IκB-α蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$)。详见图4。

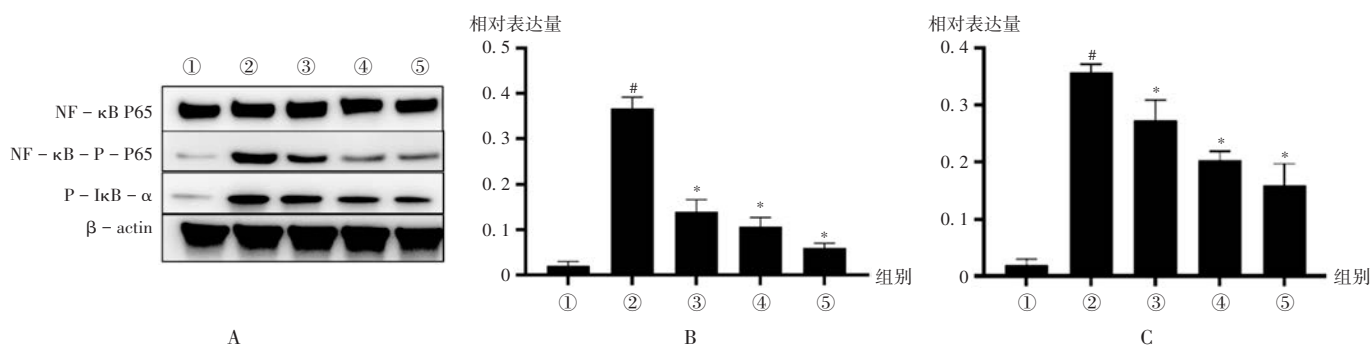
3 讨论

预试验中采用MTT法,检测了SH对细胞活性的影响,结果SH浓度在0~20 μmol/L之间对RAW264.7细胞增殖无明显抑制作用,故本研究中选择SH浓度为1.25,5,10 μmol/L开展后续实验。在炎症发生发展过程中,巨噬细胞会产生过量的PGE₂,NO,TNF-α,IL-6等炎性介质,继而引发一系列炎症反应。NO为重要的

炎性介质,过量NO能损伤DNA,抑制线粒体中的呼吸作用,进而促进炎症反应发生^[11-12]。PGE₂为重要促炎因子,其与受体结合后可加速炎症反应^[13]。促炎因子TNF-α是早期炎症的标志物,能介导炎症、免疫反应及组织损伤,多种炎症相关疾病均呈现高水平TNF-α^[14]。IL-6为免疫调节因子,与TNF-α共同参与调节炎症反应,为反映机体炎症程度的重要指标^[14]。本研究中,SH可显著抑制LPS诱导的RAW264.7细胞NO,PGE₂,TNF-α,IL-6的分泌,说明其抗炎作用与抑制炎症因子和炎性介质的分泌有密切联系。

iNOS酶是NO合成酶,它的表达直接决定NO释放量^[15]。COX-2酶可催化花生四烯酸生成前列腺素前体,在正常细胞中几乎不表达,当受到外源刺激后表达水平会迅速升高,是反映炎症严重程度的重要标志酶^[16]。本研究中,RAW264.7细胞经LPS刺激后,iNOS和COX-2蛋白表达水平显著升高,SH能显著降低iNOS和COX-2蛋白的表达水平,该结果与细胞上清液中测定的NO和PGE₂水平变化相一致,说明SH可通过抑制iNOS和COX-2蛋白的表达抑制炎症因子分泌。

NF-κB通路作为经典的炎症通路,在正常情况下,IκB-α与NF-κB以无活性复合物的形式存在于



A. 电泳图 B. NF-κB-P-P65 数据统计 C. P-IκB-α 数据统计

图4 细胞NF-κB信号通路蛋白表达水平($\bar{X} \pm s, n = 3$)

A. Electropherogram of protein expression B. Data statistics of NF-κB-P-P65 expression C. Data statistics of P-IκB-α expression

Fig. 4 Expression levels of NF-κB signaling pathway proteins in cells ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

细胞质中。当细胞受到LPS刺激时,IκB-α会迅速磷酸化降解,NF-κB亚单位从细胞质转移到细胞核内,启动炎性细胞因子转录,诱发炎症^[16-18]。本研究中,RAW264.7细胞经LPS刺激后,细胞中P-IκB-α蛋白的表达水平显著升高,但经SH处理后,P-IκB-α蛋白表达水平的降低呈剂量依赖性,可能的机制是IκB-α与P65二聚体在细胞质内水解,使NF-κB亚单位解离出来,然后转入细胞核,调控基因表达,产生有关炎性因子和介质,而SH进入细胞后可能抑制了IκB-α与P65二聚体在细胞质内水解,蛋白磷酸化水平显著下降,从而抑制了NF-κB信号通路的表达,进而抑制炎症的发生与发展。

综上所述,SH可抑制细胞炎性因子的分泌,其机制与抑制炎性蛋白iNOS和COX-2的表达及调控NF-κB通路有关。

参考文献

[1] 马钦海,陈瑞晗,雷标,等. 基于NF-κB通路探讨六神胶囊对脂多糖诱导巨噬细胞RAW264.7炎症反应的影响[J]. 中医杂志,2022,63(4):362-369.
[2] 杨莺,姚新月,李海波. 山楂叶金丝桃苷对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症反应的抑制作用[J]. 中国中医基础医学杂志,2021,27(6):944-949.
[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:224.
[4] 吴文英,李露,尹术华,等. 鱼腥草挥发油提取、成分分析及应用的研究进展[J]. 食品科技,2020,45(3):224-229.
[5] 兰玉梅,黄红,韩璐,等. 新鱼腥草素钠结构确证的波谱学研究[J]. 中国药房,2012,23(19):1777-1779.
[6] 黄晨凤,李森. 鱼腥草素钠对中性粒细胞哮喘小鼠炎性细胞因子和黏蛋白表达的影响[J]. 中国医科大学学报,2022,51(11):970-974.
[7] 于立婷,金毅,杨莉萍,等. 鱼腥草抗炎药理作用的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(17):1935-1938.
[8] HAJLEH MNA, KHLEIFAT KM, ALQARALEH M, et al.

Antioxidant and Antihyperglycemic Effects of Ephedra foeminea Aqueous Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats[J]. Nutrients, 2022, 14(11):2338.

[9] 肖娟,向安萍,张年凤. 鱼腥草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2022,31(11):1563-1567.
[10] CHEN H, FENG XJ, GAO L, et al. Inhibiting the PI3K / AKT / mTOR signalling pathway with copper oxide nanoparticles from Houttuynia cordata plant: attenuating the proliferation of cervical cancer cells [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2021, 49(1):240-249.
[11] 郭静,尚海,马丽炎,等. 芦荟大黄素衍生物AE-YJ通过PI3K-Akt/NF-κB和MAPK/NF-κB途径抑制LPS诱导RAW264.7细胞炎症介质的释放[J]. 中国药理学通报,2021,37(12):1700-1708.
[12] 秦慧真,林思,张森,等. 基于NF-κB/Akt信号通路探讨犁头草醇提取物对LPS诱导RAW264.7细胞的抗炎作用[J]. 中成药,2022,44(12):3811-3817.
[13] DAS UN. Essential Fatty Acids and Their Metabolites in the Pathobiology of Inflammation and Its Resolution [J]. Biomolecules, 2021, 11(12):1873.
[14] 黄莉,王兴,罗黎霞,等. 银黄解毒消肿胶囊对急性咽炎模型鼠的抗炎止痛作用[J]. 中国药业,2022,31(2):32-35.
[15] ZHU H, BAI Y, WANG G, et al. Hydoxycholeic acid inhibits lipopolysaccharide-induced microglia inflammatory responses through regulating TGR5 / AKT / NF-κB signaling pathway[J]. J Psychopharmacol, 2022, 36(7):849-859.
[16] 王君. 鱼腥草注射液对急性咽炎治疗作用的实验研究[J]. 中国药业,2016,25(3):35-37.
[17] SHEN J, CHENG J, ZHU S, et al. Regulating effect of baicalin on IKK / IKB / NF-κB signaling pathway and apoptosis-related proteins in rats with ulcerative colitis [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 73:193-200.
[18] 戴兵,徐俐,金海东,等. 橄榄苦苷对IL-1β诱导的大鼠软骨细胞损伤的作用及机制研究[J]. 中国病理生理杂志,2015,31(9):1667-1672.

(收稿日期:2023-04-06;修回日期:2023-07-16)