

· 药理 ·

基于PI3K/Akt信号通路探讨金骨莲提取物抑制脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症反应的作用及机制

李思翰¹, 练东银², 张广平², 陈颖², 李建荣², 叶祖光², 彭博^{2*}

(1. 贵州大学, 贵阳 550025; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:探讨金骨莲提取物(JGL)对炎症的抑制作用及其机制。方法:实验分为空白组(10%胎牛血清),脂多糖(LPS)模型组(0.5 mg·L⁻¹),JGL给药组(10, 20, 40, 60, 80, 120, 160, 200, 250, 300 mg·L⁻¹),JGL给药组同时给予LPS刺激(0.5 mg·L⁻¹),培养24 h进行后续检测。采用细胞增殖与检测试剂盒(CCK-8)试剂检测JGL对RAW264.7细胞增殖活性的影响;采用Griess法检测一氧化氮(NO)的释放;采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞因子白细胞介素-1 β (IL-1 β),IL-6,IL-10和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)释放;采用实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR)检测炎症相关因子诱导型一氧化氮合酶(iNOS),前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)/环氧合酶-2(COX-2)的表达及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)途径关键蛋白的活化。结果:与空白组比较,LPS(0.5 mg·L⁻¹)刺激24 h后能显著促进RAW264.7细胞增殖($P<0.01$),与模型组比较,JGL对细胞增殖无显著影响;与空白组比较,LPS(0.5 mg·L⁻¹)能显著增加NO,IL-1 β ,IL-6,IL-10和TNF- α 的释放($P<0.01$),与模型组比较,JGL(20~300 mg·L⁻¹)给药24 h后能剂量依赖性显著抑制NO的释放($P<0.01$);与模型组比较,JGL各剂量组IL-1 β ,IL-6,IL-10均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),但对TNF- α 的释放未见明显的抑制作用;与空白组比较,LPS(0.5 mg·L⁻¹)能显著诱导iNOS,PTGS2/COX-2基因表达($P<0.05$, $P<0.01$),与模型组比较,JGL各剂量组能下调iNOS,PTGS2/COX-2 mRNA的表达($P<0.05$, $P<0.01$);与空白组比较,LPS(0.5 mg·L⁻¹)组PI3K/Akt通路显著活化($P<0.01$),JGL(10, 20, 40, 80 mg·L⁻¹)显著降低PI3K p110和p-PI3K p85蛋白及Akt磷酸化水平($P<0.01$),抑制PI3K/Akt通路活化。结论:金骨莲提取物能明显抑制LPS诱导的RAW264.7细胞炎症反应,减少炎症因子的释放,其抗炎作用与抑制PI3K/Akt途径有关。

[关键词] 金骨莲提取物(JGL); 脂多糖(LPS); RAW264.7细胞; 炎症; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)14-0029-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211401

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210520.1540.007.html>

[网络出版日期] 2021-05-20 16:06

Inhibitory Effect and Mechanism of Jingulian Extract on LPS-induced RAW264.7 Cell Inflammatory Response Based on PI3K/Akt Signaling Pathway

LI Si-han¹, LIAN Dong-yin², ZHANG Guang-ping², CHEN Ying², LI Jian-rong²,
YE Zu-guang², PENG Bo^{2*}

(1. Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica,
China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the inhibitory effect and mechanism of Jingulian extract (JGL) on inflammation. **Method:** The following groups were set up in this study: a control group (10% fetal bovine serum), a lipopolysaccharide (LPS) model group (0.5 mg·L⁻¹), and JGL groups (10, 20, 40, 60, 80, 120,

[收稿日期] 20210317(007)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1708100,2018YFC1708105)

[第一作者] 李思翰,在读硕士,从事类风湿性关节炎研究,E-mail:1656150948@qq.com

[通信作者] *彭博,博士,研究员,从事中药药理学和毒理学研究,Tel:010-84252805-2308,E-mail:bpeng@icmm.ac.cn

160, 200, 250, 300 mg·L⁻¹ + 0.5 mg·L⁻¹ LPS). The RAW264.7 cells were cultured for 24 hours. Cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Nitric oxide (NO) release was detected by Griess assay. The release of cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor (TNF)- α was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and intraprostaglandin peroxidase synthase 2 (PTGS2)/cyclooxygenase-2 (COX-2) was measured by real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and the activation of key proteins in the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway by Western blot. **Result:** Compared with the control group, LPS (0.5 mg·L⁻¹) could promote the proliferation of RAW264.7 cells after stimulation for 24 hours ($P < 0.01$). Compared with the model group, JGL had no significant effect on cell proliferation. Compared with the control group, LPS (0.5 mg·L⁻¹) increased the release of NO, IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α ($P < 0.01$). Compared with the model group, JGL (20-300 mg·L⁻¹) inhibited the release of NO in a dose-dependent manner after stimulation for 24 hours ($P < 0.05$) and reduced IL-1 β , IL-6, and IL-10 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but no obvious inhibition on the release of TNF- α was observed. LPS (0.5 mg·L⁻¹) could induce the expression of iNOS and PTGS2/COX-2 genes as compared with the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). JGL could down-regulate the mRNA expression of iNOS and PTGS2/COX-2 genes as compared with the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). LPS (0.5 mg·L⁻¹) could activate the PI3K/Akt pathway ($P < 0.01$) as compared with the control group, while JGL (10, 20, 40, and 80 mg·L⁻¹) decreased the expression of PI3K-p110, p-p85, and p-Akt ($P < 0.01$), and inhibited the activation of PI3K/Akt pathway. **Conclusion:** JGL extract could significantly inhibit the inflammatory response and activation of the PI3K/Akt pathway induced by LPS in RAW264.7 cells. The anti-inflammatory effect was related to the inhibition of the PI3K/Akt pathway.

[Keywords] Jingulian extract (JGL); lipopolysaccharide (LPS); RAW264.7 cell; inflammation; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway

炎症是临床中最常见的病症之一,是人体免疫有害刺激并进行组织修复的一种防御手段。据流行病学和临床资料显示,包括关节炎、心血管疾病、癌症及2型糖尿病等慢性疾病的发生、发展过程中都伴随有炎症反应,炎症反应已经成为促进病程的重要致病因素^[1-2]。类风湿性关节炎(RA)是慢性、炎症性、多发性、侵袭性,以关节滑膜炎病变和关节外病变为主要病理特点的自身免疫性疾病^[3],其发病机制复杂、具有渐进和反复性发作的特点。临床主要使用非甾体抗炎药和糖皮质激素治疗RA,但以上治疗具有无法延缓病情进展、不良反应严重、治疗周期长、价格高昂等缺陷,目前尚无特效治疗方法^[4]。中药复方在中医传统辨证思想指导下,具有多靶点多疗效的特点,治疗RA卓有疗效^[5]。因此,进一步研究炎症机制,在中药复方中寻找安全有效的RA炎症治疗措施尤为重要。

经典苗药复方金骨莲早在《本草图经》《滇南本草》中有记载,由金铁锁、八角枫、汉桃叶、大血藤、透骨香5味中药组成,具有镇痛、抗炎等作用,治疗RA疗效显著,本次实验所用金骨莲提取物(JGL)系贵州益佰制药股份有限公司生产提供。已有研究

证明JGL中主要成分,金铁锁总皂苷能抑制一氧化氮的合成、血小板聚集与花生四烯酸的合成^[6];大血藤通过抑制中性粒细胞介导的炎症反应,从而减轻RA患者的滑膜炎^[7];八角枫醇提物与八角枫总碱可以减小佐剂型关节炎大鼠的足肿胀,减轻关节滑膜增生及血管翳形成^[8]。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)通路在RA滑膜炎中起重要作用,RA患者常伴有滑膜血管新生、促炎因子增多等慢性炎症,且白细胞介素(IL)-1 β , IL-6的异常升高与关节病变程度相关。由此提示,JGL可能通过抑制PI3K/Akt通路的活化,减少炎症因子的表达起到治疗RA滑膜炎的效果。前期课题组实验证明JGL可以有效抑制二甲苯所致的小鼠耳肿胀炎症反应,但对JGL抗炎作用机制尚未完全阐明。

本研究以LPS刺激小鼠巨噬细胞RAW264.7细胞为体外炎症模型,基于PI3K/Akt信号通路探讨金骨莲提取物对细胞炎症反应的影响,为金骨莲的抗炎作用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠单核巨噬细胞RAW264.7细胞,购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中

心(资源编号3131C0001000800013)。

1.2 药品及试剂 JGL的制备,JGL提取物浸膏由贵州益佰制药股份有限公司提供(生产日期20190321,质检号201603-30JGLZ),以富马酸计含量为 $0.46 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,所得浸膏经冻干处理为粉末,每克药粉含生药 15.29 g ;DMEM高糖培养基(北京博奥森生物技术有限公司,批号C7076);细胞增殖与活性检测试剂盒(CCK-8)试剂盒,一氧化氮(NO)检测试剂盒(碧云天生物技术研究,批号分别为073020201106,090420201021);IL-1 β ,IL-6,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(达科为生物技术股份有限公司,批号分别为1210122,1210602,1217202);引物[英潍捷基(上海)公司合成,批号HG2011179039];RNeasy Plus Mini Kit试剂盒(德国Qiagen公司,批号151047738);cDNA反转录试剂盒(加拿大Fermentas公司,批号O10903);SYBR Green Master(瑞士Roche公司,批号50837000);PI3K p110,磷酸化(p)-PI3K p85, p-Akt, Akt抗体(美国Cell Signaling公司,批号分别为4249S, B6501, 4060S, 4685S);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(北京兰博利德生物技术有限公司,批号G0100);辣根过氧化物酶(HRP)山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号131879);BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo公司,批号QG219579)。

1.3 仪器 HERAcell 240i型二氧化碳恒温培养箱(美国Thermo公司);5L41139型倒置显微镜(日本Olympus公司);SpectraMax i3x型酶标仪(美国Molecular Devices公司);LightCycler 480 II型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(瑞士Roche公司);Mini-PROTEAN型电泳系统,Mini Trans-Blot PowerPac通用型转移系统(美国Bio-Rad公司);Tanon 5200型化学发光成像系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 RAW264.7细胞置于10%胎牛血清、青霉素 $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,链霉素 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DMEM培养基 37°C 5% CO_2 的培养箱内培养,隔天换液,细胞90%左右胰酶消化传代。

2.2 药物处理 称取金骨莲提取物粉末 100 mg ,用DMEM培养基充分溶解配置成 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 母液,经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, -20°C 保存备用。

2.3 指标检测方法

2.3.1 细胞活力检测 RAW264.7细胞以每孔 $2\times$

10^4 个接种于96孔板,贴壁培养过夜,加入10, 20, 40, 60, 80, 120, 160, 200, 250, 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ JGL和LPS($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)共培养24 h后,每孔加入CCK-8溶液 $10 \mu\text{L}$, 37°C 孵育2 h,酶标仪450/650检测吸光度 A 。以空白组 A 为100%细胞活力,其余各组 A 分别与空白组相除后 $\times 100\%$ 为各组细胞活力。

2.3.2 检测NO释放 给药方法同上,取细胞上清按NO试剂盒说明检测NO释放。

2.3.3 ELISA检测 RAW264.7分泌IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α 的含量 给药方法同上,取细胞上清按ELISA试剂盒说明检测不同细胞因子的释放。

2.3.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定 相关蛋白表达情况 给药24 h后收集细胞,加入Lysis buffer,冰上裂解3~5 min,收集蛋白,BCA试剂盒测蛋白浓度。取适量蛋白样品,加入Loading Buffer, 95°C 变性5 min,然后加入样品 $30\sim 50 \mu\text{g}$ 在10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中分离,转移至PVDF膜上,室温5%脱脂乳TBST孵育2 h,将膜置于抗体PI3K p110(1:1 000), p-PI3K p85(1:1 000), p-Akt(1:1 000), Akt(1:1 000)中, 4°C 孵育过夜,TBST洗涤4次(15 min/次),然后用山羊抗兔(1:2 000)二抗5%的脱脂牛奶中孵育1 h,TBST洗涤4次(15 min/次),ECL化学发光试剂盒显色检测,Tanon5200型全自动化学发光图像分析系统采集图像,以GAPDH为内参,以目的蛋白灰度值/内参灰度值表示蛋白相对表达量。

2.3.5 Real-time PCR检测 炎症因子基因表达 给药方法同上,收集细胞提取mRNA,利用逆转录试剂盒制备cDNA。以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参进行Real-time PCR扩增,检测各组细胞诱导型一氧化氮合酶(iNOS),前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)/环氧合酶-2(COX-2)的mRNA表达水平。引物序列见表1。反应条件为 50°C 预处理30 s循环1次; 95°C 变性10 s, 60°C 退火20 s, 72°C 延伸30 s,共循环40次。各组均设3个复孔。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法表示各目的基因的相对表达量。

2.4 统计学方法 采用Graphpad Prism 6.0软件分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用One-way ANOVA Dunnet's检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对LPS诱导的RAW264.7细胞增殖活性的影响 与空白组比较,LPS($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)给药24 h后能显著促进RAW264.7细胞增殖($P<0.01$)。与模型组

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
iNOS	上游 GGAGCGAGTTGTGGATTGTC	123
	下游 GTGAGGGCTTGGCTGAGTGAG	
COX-2	上游 GAAAGCCCTCTACAGTGACATC	111
	下游 GGTGCTCCAAGCTCTACCAT	
β -actin	上游 AGAGGGAAATCGTGCCTGAC	138
	下游 CAATAGTGATGACCTGGCCGT	

比较, 10~300 mg·L⁻¹ JGL处理24 h后, 对RAW264.7细胞未见明显毒性, 细胞增殖的抑制率为-1.0%~14.6%。见表2。

表2 JGL对LPS刺激下RAW264.7细胞活力的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 effect of JGL on viability of RAW264.7 cells stimulated by LPS ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞活力/%
空白		100.00±4.49
模型		178.76±3.39 ²⁾
JGL	10	180.58±6.28
	20	182.95±2.41
	40	183.79±0.99
	60	183.59±3.07
	80	176.59±5.94
	120	170.25±10.98
	160	160.39±11.97
	200	159.70±12.96
	250	152.59±12.56
	300	170.04±2.78

注: 与空白组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组比较³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ (表3~6同)。

表4 JGL对LPS诱导RAW264.7细胞炎症因子释放的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of JGL on release of inflammatory cytokines induced by LPS in RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	IL-6/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-1 β /ng·L ⁻¹	IL-10/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF- α / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
空白		0.000±0.009	0.000±0.691	2.173±0.064	0.240±0.031
模型		1.969±0.158 ²⁾	85.954±17.499 ²⁾	43.825±0.515 ²⁾	15.463±0.301 ²⁾
JGL	10	1.796±0.170	88.695±14.557 ³⁾	41.575±0.549 ³⁾	13.095±0.451
	40	1.654±0.106 ³⁾	73.190±8.134 ⁴⁾	40.847±0.782 ³⁾	12.728±0.362
	80	1.471±0.226 ³⁾	73.109±9.959 ⁴⁾	36.649±0.445 ⁴⁾	11.687±0.284
	160	1.463±0.037 ⁴⁾	97.213±14.613 ⁴⁾	27.108±0.494 ⁴⁾	12.813±0.165
	200	1.226±0.001 ⁴⁾	64.603±6.771 ⁴⁾	16.761±0.173 ⁴⁾	12.399±0.378
	250	0.888±0.019 ⁴⁾	56.681±6.425 ⁴⁾	12.908±0.419 ⁴⁾	12.691±0.511
	300	0.593±0.101 ⁴⁾	47.431±2.194 ⁴⁾	9.013±0.139 ⁴⁾	13.907±0.092

3.2 对LPS诱导的RAW264.7细胞NO释放的影响

与空白组比较, 加入LPS(0.5 mg·L⁻¹)24 h后能显著增加NO的释放($P<0.01$)。与模型组比较, 给予20~300 mg·L⁻¹ JGL能剂量依赖性抑制LPS诱导的RAW264.7细胞NO释放($P<0.01$), 抑制率为9.5%~86.6%。见表3。

表3 JGL对LPS诱导RAW264.7细胞NO释放的影响($n=8$)

Table 3 Effect of JGL on NO release in LPS-induced RAW264.7 cells ($n=8$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	NO浓度($\bar{x}\pm s$)/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率/%
空白		0.00±0.01	
模型		2.06±0.06 ²⁾	
JGL	10	2.03±0.01	1.47
	20	1.86±0.02 ⁴⁾	9.55
	40	1.75±0.02 ⁴⁾	14.79
	60	1.62±0.03 ⁴⁾	21.04
	80	1.44±0.03 ⁴⁾	30.16
	120	1.10±0.02 ⁴⁾	46.57
	160	0.80±0.01 ⁴⁾	61.03
	200	0.62±0.02 ⁴⁾	69.94
	250	0.46±0.02 ⁴⁾	77.32
	300	0.27±0.02 ⁴⁾	86.61

3.3 对LPS诱导的RAW264.7细胞炎症因子释放的影响

与空白组比较, 加入LPS(0.5 mg·L⁻¹)24 h后能显著增加IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α 的释放($P<0.01$); 与模型组比较, JGL干预后IL-1 β , IL-6, IL-10释放呈剂量依赖下降($P<0.05, P<0.01$)。但JGL对LPS诱导的TNF- α 的释放没有明显的抑制作用, 差异无统计学意义。见表4。

3.4 对LPS诱导的RAW264.7细胞iNOS, PTGS2/COX-2 mRNA表达的影响 与空白组比较, LPS诱导24 h后能显著促进RAW264.7细胞的iNOS, PTGS2/COX-2的mRNA表达($P<0.01$)。与LPS组比较, 给予20~300 mg·L⁻¹ JGL, iNOS基因表达明显下降($P<0.05, P<0.01$), 作用呈现剂量依赖性。与LPS组比较, 给予40~300 mg·L⁻¹ JGL后, PTGS2/COX-2基因表达明显下调($P<0.05, P<0.01$)。见表5。

表5 JGL对LPS诱导RAW264.7细胞iNOS, PTGS2/COX-2 mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Effect of JGL on expression of iNOS and PTGS2/COX-2 mRNA in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	质量浓度/ mg·L ⁻¹	iNOS	PTGS2/COX-2
空白		1.01±0.15	1.01±0.14
模型		2 1871.50±2 285.00 ²⁾	459.32±27.33 ²⁾
JGL	20	17 368.25±1 642.40 ³⁾	420.96±18.39
	40	17 321.55±1 502.38 ³⁾	395.68±22.66 ³⁾
	80	16 485.63±1 989.97 ³⁾	266.79±68.44 ⁴⁾
	120	14 996.64±2 070.83 ⁴⁾	332.18±35.75 ³⁾
	200	12 476.12±263.31 ⁴⁾	338.23±8.298 ³⁾
	300	8 297.17±99.96 ⁴⁾	257.57±27.97 ⁴⁾

3.5 对PI3K/Akt通路中p110, p85, Akt蛋白含量的影响 与空白组比较, LPS刺激后PI3K p110, p-PI3K p85, p-Akt表达显著上调($P<0.01$); 与模型组比较, 不同浓度JGL能剂量依赖性明显下调PI3K-p110, p-PI3K p85, p-Akt的表达($P<0.05, P<0.01$)。图1, 表6。

4 讨论

炎症反应是机体对任何有害刺激的生理防御反应。慢性炎症的特点是成纤维细胞的增殖和血管新生以及炎症细胞和促炎因子的增多, 如中性粒

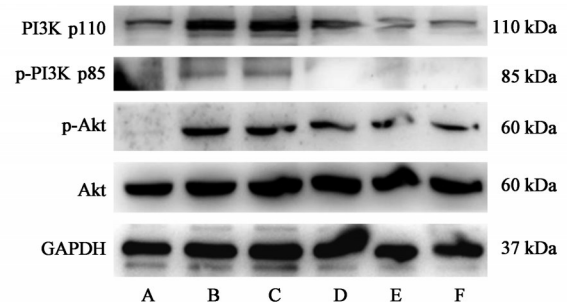


图1 各组PI3K/Akt通路中PI3K p110, p-PI3K p85, Akt蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of JGL on protein content of p110, p85 and Akt in PI3K/Akt pathway

Figure 1 shows the Western blot analysis of PI3K/Akt pathway proteins (p110, p85, Akt) and GAPDH in RAW264.7 cells across six groups: A (blank), B (model), C (TGL 10 mg/L), D (TGL 20 mg/L), E (TGL 40 mg/L), and F (TGL 80 mg/L). Molecular weights are indicated on the right: PI3K p110 (110 kDa), p-PI3K p85 (85 kDa), p-Akt (60 kDa), Akt (60 kDa), and GAPDH (37 kDa).

细胞、血浆细胞和巨噬细胞等, 促炎细胞因子或趋化因子进一步刺激淋巴细胞并触发适应性免疫^[9]。RA的本质是滑膜炎, 在滑膜组织生成血管翳, 伴随局部渗出、肿胀及疼痛^[10-11], 炎症反应在其疾病进程中起关键作用。已有文献报道^[12], IL-1 β 体内表达水平与关节病变严重程度呈正相关, 上调IL-1 β 基因能够抑制软骨细胞中正常分子发挥生理作用, 促使软骨细胞衰老; IL-6是由单核巨噬细胞、成纤维细胞产生的一种多效应细胞因子, 在RA患者血清中明显升高, 进而促进关节处滑膜细胞增生和大量炎性细胞浸润^[13]; 关节炎中, 过量NO促进超氧阴离子反应产生过氧化亚硝酸盐, 刺激COX-2释放, 造成软骨损伤加重RA病情^[14]。JGL可以有效降低兔体内IL-1 β 表达量, 对兔膝关节软骨产生一定保护作用^[15]。此外, 复方中主要成分也具有较好的抗炎作用。金铁锁总皂苷对NO合成有抑制作用, 同时可抑制血小板的聚集, 减少花生四烯酸的合成^[6], 大血藤能够抑制完全弗式佐剂(FCA)诱导的AA大鼠滑膜细胞分泌基质金属蛋白酶(MMP)-2, MMP-9, 减轻滑膜组织损伤, 阻止关节软骨病变^[16]。八角枫醇提物与八角枫总碱可以缓解佐剂型关节炎大鼠的足肿胀, 减轻关节滑膜炎^[8]。因此, 本研究采用LPS

表6 JGL对LPS诱导RAW264.7细胞中PI3K/Akt途径蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of JGL on expression of PI3K/Akt pathway markers in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	p-Akt/Akt	PI3K p110/GAPDH	p-PI3K p85/GAPDH
空白		0.036±0.020	0.529±0.440	0.145±0.195
模型		0.686±0.109 ²⁾	1.053±0.417 ²⁾	0.749±0.421 ²⁾
JGL	10	0.593±0.104 ³⁾	1.104±0.400	0.757±0.390
	20	0.459±0.076 ⁴⁾	1.243±0.203	0.625±0.610 ³⁾
	40	0.326±0.051 ⁴⁾	0.377±0.252 ⁴⁾	0.409±0.525 ⁴⁾
	80	0.266±0.025 ⁴⁾	0.516±0.051 ⁴⁾	0.123±0.162 ⁴⁾

刺激诱导RAW264.7细胞炎症模型,对金骨莲提取物的抗炎作用和机制进行研究。LPS能刺激巨噬细胞诱发炎症反应,促进IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1等细胞因子以及前列腺素 PEG2的释放;促进NO合成关键酶iNOS mRNA表达,导致NO分泌增多^[17]。本实验发现,JGL能剂量依赖性下调iNOS, PTGS2/COX-2 mRNA表达,降低NO分泌;减少细胞因子IL-1 β , IL-6的表达,但是对LPS诱导的RAW264.7细胞的TNF- α 释放未见显著的抑制作用。另一种在炎症中起重要作用的细胞因子为IL-10, PENA等^[18]研究证明LPS能促进巨噬细胞向M1型极化,从而抑制M2型细胞因子IL-10的分泌,从而发挥抗炎作用;BRENNER等^[19]和HICKEY等^[20]的研究证明LPS能通过调节巨噬细胞环磷腺苷(cAMP)水平;蛋白激酶A(PKA)介导的环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)磷酸化,以上调IL-10的表达。本研究中LPS刺激RAW264.7细胞后能明显增加细胞因子IL-10释放,JGL能显著降低IL-10释放。

PI3K/Akt通路是细胞内重要的信号转导通路之一,参与细胞增殖、抑制细胞凋亡,影响血管生成与免疫功能以及炎症反应等^[21-23]。PI3K通过由催化亚基p110和调节亚基p85组成具有类脂激酶和蛋白激酶双重活性的异源二聚体,激活Akt参与下游信号因子的调控,此通路在RA患者滑膜炎症和滑膜细胞的迁移侵袭密切相关^[24-25]。RA患者B淋巴细胞可以激活巨噬细胞 γ 干扰素(IFN- γ), IL-33, 诱导炎症因子IL-6, IL-8的分泌,从而诱导PI3K通路激活,参与RA滑膜炎症反应^[26-27]。本研究中Western blot检测发现LPS刺激后RAW264.7细胞PI3K/Akt通路高度活化,JGL可以抑制此通路活化,主要表现在下调PI3K p110蛋白表达,降低PI3K p85和Akt磷酸化水平。提示JGL的抗炎作用可能与抑制PI3K/Akt途径活化有关。

综上所述,JGL可以抑制LPS刺激RAW264.7细胞的炎症反应,抗炎作用与降低PI3K/Akt通路的活化水平,降低下游炎症相关iNOS, PTGS2/COX-2 mRNA表达,抑制炎症因子IL-6, IL-1 β , IL-10的生成有关,从而达到治疗RA的效果,为金骨莲提取物治疗RA提供实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] LIN W W, KARIN M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer

[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(5): 1175-1183.

- [2] COHEN J. The immunopathogenesis of sepsis [J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 885-891.
- [3] 陈晓俊,王健英,金素安,等. 中药影响类风湿性关节炎信号通路的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(7): 1735-1739.
- [4] 于倩文,韦雨颂,李芬. 类风湿关节炎治疗药物的机制研究进展[J]. *中国医学前沿杂志:电子版*, 2020, 12(11): 4-8.
- [5] 李伟平,倪忠根. RA的中医治法探讨[J]. *北京联合大学学报*, 2016, 30(4): 74-77.
- [6] 田均勉. 中药金铁锁的系统化学成分研究[D]. 上海:第二军医大学, 2011.
- [7] 黄淑凤,孟建国,孙鑫,等. 大血藤对苯酚胶浆致盆腔炎模型大鼠血清PGI₂, TXA₂的影响[J]. *陕西中医学院学报*, 2012, 35(5): 69-70.
- [8] 张威,徐红梅,任娜,等. 八角枫对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用及毒性[J]. *合肥工业大学学报:自然科学版*, 2012, 35(6): 832-836.
- [9] ZAMORA R, VODOVOTZ Y, BILLIAR T R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases[J]. *Mol Med*, 2000, 6(5): 347-373.
- [10] 孙莹,邱新萍,孙颂歌. Wnt/ β -catenin信号通路在类风湿关节炎中的表达[J]. *世界中医药*, 2019, 14(3): 761-765.
- [11] 唐希文,杨莉,侯昱. 温和艾灸治疗寒湿痹阻型类风湿关节炎的疗效及对免疫学的影响[J]. *世界中医药*, 2019, 14(2): 481-485.
- [12] ASHRAF S, CHA B H, KIM J S, et al. Regulation of senescence associated signaling mechanisms in chondrocytes for cartilage tissue regeneration [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(2): 196-205.
- [13] NARAZAKI M, TANAKA T, KISHIMOTO T. The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2017, 13(6): 535-551.
- [14] 潘书涵,王永萍,张阳. 基于TNF- α -HIF-1 α -iNOS-NO信号通路探讨大黄素对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞的影响[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(4): 817-820.
- [15] 曾乐,刘毅,熊华章,等. 金骨莲胶囊对兔膝关节骨关节炎保护作用的实验研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2016, 24(7): 7-11.
- [16] 付钰,王光义. 中药大血藤对佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞MMP-2, MMP-9的影响[J]. *贵州医药*, 2009, 33(12): 1097-1099.
- [17] LINGHU K G, MA Q S, ZHAO G D, et al. Leocarpinolide B attenuates LPS-induced

- inflammation on RAW264.7 macrophages by mediating NF- κ B and Nrf2 pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 868: 1728-54.
- [18] PENA O M, PISTOLIC J, RAJ D, et al. Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells [J]. *J Immunol*, 2011, 186(12): 7243-7254.
- [19] BRENNER S, PRÖSCH S, SCHENKE-LAYLAND K, et al. cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(8): 5597-5604.
- [20] HICKEY F B, BRERETON C F, MILLS K H G. Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* inhibits TLR-induced IRF-1 and IRF-8 activation and IL-12 production and enhances IL-10 through MAPK activation in dendritic cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 84(1): 234-243.
- [21] MARKMAN B, DIENSTMANN R, TABERNERO J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway-beyond rapalogs [J]. *Oncotarget*, 2010, 1(7): 530-543.
- [22] 刘小虎, 赵志慧, 周玥, 等. PI3K/Akt/mTOR自噬通路
在人参皂苷 Rg₁ 延缓 D-gal 诱导的卵巢早衰小鼠模型
卵巢早衰中的作用 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45
(24): 6036-6042.
- [23] 王丽萍, 刘彦琦, 崔洁, 等. 基于 miR-198 调控 PI3K-
Akt 信号通路探讨姜黄素治疗急性胰腺炎的机制
[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(15): 3707-3712.
- [24] 汪丹丹. CP-25 抑制 GRK2 转膜下调 CXCR4-G β γ -
PI3K/Akt 介导的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞迁
移 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2020.
- [25] MABUCHI S, KURODA H, TAKAHASHI R, et al.
The PI3K/Akt/mTOR pathway as a therapeutic target
in ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 137(1):
173-179.
- [26] 赵耀东, 徐文东. 强骨胶囊联合柳氮磺吡啶治疗类风
湿性关节炎并发骨质疏松的临床效果 [J]. *世界中医
药*, 2019, 14(2): 438-441.
- [27] 万磊, 刘健, 黄传兵, 等. 基于 CD19⁺ B 细胞调控 FAK/
CAPN/PI3K 通路研究新风胶囊改善类风湿关节炎机
制 [J]. *中国中药杂志*, 2021, doi: 10.19540/j.cnki.
cjcm.20201120.501.

[责任编辑 周冰冰]