

紫金龙乙醇组分对脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞分泌炎症因子的影响

张晓红¹, 董莉¹, 杨雅欣², 刘星星¹, 廖尚高², 董永喜², 李勇军², 王爱民^{2*}

(1. 贵阳医学院药学院贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004;

2. 贵阳医学院民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

[摘要] 目的:研究紫金龙乙醇组分(AVEC)对脂多糖(LPS)诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 分泌炎症因子的影响。方法:用脂多糖($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)刺激生长良好的 RAW 264.7 细胞 24 h 建立体外细胞炎症模型,以 MTT 法测定不同浓度 AVEC 对 RAW 264.7 细胞的毒性作用,Griess 试剂法检测一氧化氮(NO)含量,ELISA 法检测细胞上清液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白介素 6(IL-6)含量。结果:AVEC 在低于 $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对 RAW 264.7 细胞无毒性作用。与空白对照组相比,LPS 可以明显诱导 RAW 264.7 细胞分泌炎症因子 TNF- α ,IL-6 和 NO($P < 0.01$);与模型组相比, $100 \sim 400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AVEC 可明显下调 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞释放炎症因子 TNF- α ,IL-6 和 NO($P < 0.05, P < 0.01$),并呈现良好的剂量依赖关系。结论:AVEC 可以抑制脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞炎症反应,其抗炎作用可能与减少炎症因子 TNF- α ,IL-6 和 NO 有关。

[关键词] 紫金龙; 脂多糖; 肿瘤坏死因子 α ; 白介素 6

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0149-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210149

Effects of Ethanol Componentons from *Aconitum vilmorinianum* on Inflammatory Cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 Cell

ZHANG Xiao-hong¹, DONG Li¹, YANG Ya-yin², LIU Xing-xing¹, LIAO Shang-gao²,
DONG Yong-xi², LI Yong-jun², WANG Ai-min^{2*}

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 2. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of ethanol componentons from *Aconitum vilmorinianum* (AVEC) on inflammatory cytokines in lipopolysaccharide (LPS) -stimulated macrophage model. **Method:** The *in vitro* model of inflammation model based on the growth of well RAW 264.7 cells was established by treating with LPS ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h. The activities of macrophages were detected by MTT assay. The production of nitric oxide (NO) was assayed by Griess reagent. ELISA were used to assay the production of inflammatory mediators, such as tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) in cell supernatant. **Result:** The cell viability was not significantly affected by up to $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of AVEC. Compared with the control group, LPS could induce RAW 264.7 cells to secrete inflammatory mediators like TNF- α , IL-6 and NO ($P < 0.01$). Compared with the

[收稿日期] 20140607(003)

[基金项目] 国家科技支撑计划课题(2013BAI11B01);贵州省中药现代化项目(黔科合中药字[2011]5028号;黔科合中药字[2013]5062号);贵州省科技计划课题(黔科合LG字[2012]017号)

[第一作者] 张晓红,硕士,从事中药药效物质基础及质量控制研究,Tel:18785057811,E-mail:zhangxh619@gmail.com

[通讯作者] *王爱民,教授,硕士生导师,从事中药民族药药效物质基础及质量控制研究,Tel:0851-6908468,E-mail:gywam100@gmail.com

model group, 100-400 mg·L⁻¹ of AVEC in LPS-stimulated RAW 264.7 cells greatly inhibited the production of inflammatory mediators, such as TNF- α and IL-6 in a good dose dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

Conclusion: AVCE can inhibit LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells, and its anti-inflammatory effect may be related to reducing the inflammatory cytokines like TNF- α , IL-6 and NO.

[**Key words**] *Aconitum vilmorinianum*; lipopolysaccharide; tumor necrosis factor α ; interleukin 6

紫金龙为毛茛科植物深裂黄草乌的干燥块根^[1],收载于《贵州省中药材、民族药质量标准》2003 年版,味辛、苦,性温,具有驱风除湿,温经止痛之效,用于跌扑损伤,腰膝疼痛,疮毒,是贵州省苗族自治县习用药材。然而,到目前为止,对紫金龙的研究报道甚少。化学部分仅有张嘉岷等利用硅胶柱色谱对紫金龙提取物进行分离纯化,分离得到 3 个化合物,分别为二萜类生物碱,其中 1 个为 C-19 骨架类型,另 2 个为 C-20 骨架类型^[2]。丁立生等从黄草乌中分离得到 C-19 二萜类生物碱黄草乌碱^[3]。而且关于紫金龙药理方面的相关研究还未见报道。因此,本研究以脂多糖(LPS)刺激的小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 为炎症模型,观察紫金龙乙醇组分(AVEC)对炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白介素 6(IL-6)和一氧化氮(NO)的影响,在细胞水平上探讨 AVEC 的抗炎活性,以期为紫金龙的深度开发提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞 小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 细胞株(中科院上海细胞库)。

1.2 药材 紫金龙 *Aconitum vilmorinianum* 药材购于贵州省贵阳市,后经贵阳医学院生药学教研室龙庆德副教授鉴定。考察抗炎药效的 AVEC 由本实验室自制提供,以二甲基亚砜(DMSO)溶解、-20℃保存备用。使用前稀释至指定浓度。

1.3 试剂 DMEM 高糖培养基(Gibco 公司,批号 8113383),胎牛血清(Hyclone 公司,批号 NWCO388),LPS(批号 102M4017V)、MTT(批号 M1959,Sigma 公司),磺胺(批号 30172216),*N*-(1-萘基)-乙二胺(批号 80088013),均为国药集团;DMSO(批号 20100803,天津市科密欧化学试剂有限公司),小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒(批号 20140324、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(批号 20140324,上海蓝基生物科技有限公司)。

1.4 仪器 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo scientific 公司),相差显微观察系统(Nikon 公司),低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司),超低温冰箱

(Thermo Fisher 公司),680 型酶标仪(上海伯乐生命医学产品有限公司),数显立式压力蒸气灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗仪器厂),超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 样品制备 取紫金龙药材粗粉 9.5 kg,用其 8 倍量乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,药液减压回收乙醇至无醇味,而后加小体积水混悬,上 D101 大孔吸附树脂,分别用 2 倍柱体积水、4 倍柱体积 60% 乙醇、3 倍柱体积 90% 乙醇梯度洗脱,经液相色谱检测,因所含化学成分相近,将 60% 乙醇段与 90% 乙醇段合并即为本实验检测组分,得率为 5.61%。采用高效液相色谱法测定其中含黄草乌碱丁 0.25%。

2.2 细胞培养及传代 小鼠单核巨噬细胞用含 10% 胎牛血清,100 mg·L⁻¹ 链霉素,1 × 10⁵ U·L⁻¹ 青霉素的 DMEM 培养液于 37℃,CO₂ 培养箱中常规培养,隔天传代。

2.3 AVEC 对 RAW 264.7 细胞活力的影响 取对数生长期的 RAW 264.7 细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基制成含 2 × 10⁵/mL 的单细胞悬液,接种于 96 孔细胞培养板(每孔 100 μ L),将培养板置 37℃,5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。实验分为正常对照组(CON)和加药组(AVEC 组)。正常对照组每孔加入 100 μ L DMEM 培养液;药物组:将 AVEC 稀释至不同体积比质量浓度(25,50,100,200,400,800,1 200 mg·L⁻¹),每孔加入 100 μ L,作用 RAW 264.7 细胞 24 h 后每孔加入 2.5 g·L⁻¹ MTT 溶液 10 μ L,培养 4 h 后吸走培养液,每孔加入 100 μ L DMSO,震荡 5 min,使其溶解,在酶标仪上于 490 nm 波长测定吸光度(A)。每个浓度平行 5 孔,实验重复 3 次。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{样品组 A 的平均值}}{\text{对照组 A 的平均值}} \times 100\%$$

2.4 AVEC 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 生成的影响 实验方法同 2.2 项,不同的是加药组分为模型组、阳性药物组和药物组,模型组为终浓度 10 μ g·L⁻¹ 的 LPS 溶液,阳性药物组为终浓度为

50 mg·L⁻¹的地塞米松(DEXA)和 10 μg·L⁻¹的 LPS 的混合液,药物组为 100,200,400 mg·L⁻¹的紫金龙稀释液,置 37 ℃培养箱中培养 24 h 后,吸取培养液上清 50 μL 至酶标板中,加入等体积的 Griess 试剂,室温反应 10 min 后于 540 nm 出测定其 A。用浓度为 1.56,3.12,6.25,12.5,25,50 μmol·L⁻¹ NaNO₂ 溶液绘制标准曲线,根据 NaNO₂ 标准曲线计算细胞培养上清液中 NO₂⁻ 的浓度以及对 NO 释放的抑制率。抑制率计算公式为:

$$\text{NO 生成抑制率} = [1 - (\text{给药孔 A} - \text{对照孔 A}) / \text{对照孔 A}] \times 100\%$$

2.5 AVEC 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 TNF-α, IL-6 生成的影响 取对数生长期的 RAW 264.7 细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基制成 1 × 10⁷/mL 的单细胞悬液,接种于 96 孔细胞培养板(每孔 100 μL),将培养板置 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。实验分为正常对照组、加药组。正常对照组每孔加入 100 μL 完全 DMEM 培养液,加药组:紫金龙药材组分稀释至不同浓度,每孔加入 100 μL 不同质量浓度(100,200,400 mg·L⁻¹) AVEC 和 LPS(10 μg·L⁻¹)的混合液,并设模型组(10 μg·L⁻¹的 LPS)和阳性药物组(50 mg·L⁻¹的 DEXA 和 10 μg·L⁻¹的 LPS 的混合液)于培养箱中继续培养 24 h 后收集细胞上清液,按照相应的 ELISA 试剂盒说明书方法进行测定,根据标准曲线计算各组培养上清中 TNF-α, IL-6 的浓度。

2.6 统计方法 所得数据采用 SPSS 17.0 统计软件处理,组间比较采用单因素方差分析,P < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 RAW 264.7 细胞活力的影响 细胞活力试验结果显示,随着药物浓度的增加,RAW 264.7 细胞被抑制的效果越明显。与空白组(CON)细胞存活率为(100 ± 3)% 相比,药物质量浓度为 10 ~ 400 mg·L⁻¹时,细胞存活率为(97 ± 2)% ~ (100 ± 2)%,差异无统计学意义。镜下观察细胞状态良好,无显著差异,表明在此浓度范围内 AVEC 无明显细胞毒性作用。

3.2 对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞释放 NO 的抑制作用 空白组细胞上清中检测到的 NO 浓度非常低,仅为 1.42 μmol·L⁻¹。在 10 μg·L⁻¹的 LPS 刺激下,巨噬细胞能释放出大量的 NO(17.0 μmol·L⁻¹),两组间比较有显著差异(P < 0.01)。与模型组相比,经

AVEC 作用的 RAW 264.7 细胞上清液中,NO 的含量明显减少,随着用药浓度的增高,NO 的含量逐渐降低,呈现出良好的剂量依赖关系(P < 0.05, P < 0.01)。

3.3 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 TNF-α 活性的影响 如表 1 所示,空白对照组细胞上清液中 TNF-α 的质量浓度为 699 ng·L⁻¹,经过 10 μg·L⁻¹的 LPS 刺激 24 h 后,细胞释放大量的 TNF-α,此时上清液中 TNF-α 的浓度为 5 076 ng·L⁻¹,两组比较有显著性差异(P < 0.01)。与模型组相比,AVEC 高、中、低剂量组均可以显著抑制 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞释放 TNF-α,但其活性均弱于阳性药物 DEXA 组(50 mg·L⁻¹, P < 0.05)。

表 1 AVEC 对 LPS 10 μg·L⁻¹诱导 RAW 264.7 细胞释放 NO, TNF-α 的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	NO /μmol·L ⁻¹	TNF-α /ng·L ⁻¹	抑制率 /%
空白对照	-	1.4 ± 0.1	699 ± 15	-
LPS 模型 ⁴⁾	-	17.0 ± 1.2 ¹⁾	5 076 ± 155 ¹⁾	-
DEXA ⁴⁾	50	6.1 ± 0.5 ²⁾	2 519 ± 132 ²⁾	44
AVEC ⁴⁾	100	15.0 ± 1.0	3 729 ± 341 ^{2,3)}	23
	200	11.6 ± 0.6 ²⁾	3 166 ± 302 ^{2,3)}	33
	400	8.1 ± 0.5 ²⁾	2 963 ± 107 ²⁾	36

注:与对照组比较¹⁾ P < 0.01;与 LPS 模型组比较²⁾ P < 0.01;与 DEXA 组比³⁾ P < 0.05;⁴⁾ LPS 10 μg·L⁻¹诱导(表 2 同)。

3.4 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 IL-6 活性的影响 如表 2 所示,空白对照组细胞上清液中 IL-6 的质量浓度为 322 ng·L⁻¹,经过 10 μg·L⁻¹的 LPS 刺激 24 h 后,细胞释放大量的 IL-6(4 884 ng·L⁻¹),两组相比较有显著性差异(P < 0.01)。而与模型组相比,AVEC 高、中、低剂量组均可以显著抑制 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞释放 IL-6(P < 0.05)。

表 2 AVEC 对 LPS 10 μg·L⁻¹诱导 RAW 264.7 细胞释放 IL-6 的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	IL-6 /ng·L ⁻¹	抑制率 /%
空白对照	-	323 ± 111	-
LPS 模型 ⁴⁾	-	4 884 ± 203 ¹⁾	-
DEXA ⁴⁾	50	1 077 ± 108 ²⁾	50
AVEC ⁴⁾	100	3 930 ± 578 ^{2,3)}	12
	200	2 998 ± 272 ^{2,3)}	25
	400	2 072 ± 432 ^{2,3)}	37

4 讨论

LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要组成成分之一,其在细菌死亡解体后释放出来,是革兰阴性菌主要的致病物质,也是导致严重炎症感染的直接原因^[4]。巨噬细胞是体内启动炎症介质产生的中心细胞,是调控炎症反应的主要细胞。活化的巨噬细胞是炎症反应中的 IL-1 β ,IL-6,IL-10 等细胞因子的重要来源^[5]。因此,深入研究 LPS 刺激的巨噬细胞抗炎性细胞因子的变化规律,有助于进一步加深对炎症反应机制的认识。造模实验结果显示,10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 作用 RAW 264.7 细胞 24 h,细胞存活率为 99.93%,表明其对细胞不产生毒性作用,并且 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 作用 RAW 264.7 细胞 24 h 后,检测 NO 释放量为 15.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,TNF- α 的浓度为 4 998 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$,与空白组比较均有显著性差异 ($P < 0.01$),因此本实验采用的造模条件为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 作用 RAW 264.7 细胞 24 h。

NO 是一种毒性很强的气体自由基,其在体内由一氧化氮合酶(NOS)催化左旋精氨酸而产生,具有广泛的生物学功能,但大量的 NO 会通过抑制线粒体呼吸抑制,活性氮等细胞毒性效应介导细胞和组织的损伤,进而参与某些炎症性疾病的发生^[6]。因此抑制 NO 的过量表达已经成为预防炎症反应和疾病的研究靶点。故本文采用 LPS 刺激生长良好的 RAW 264.7 细胞建立细胞炎症模型,以此考察紫金龙组分对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞释放炎症介质 NO 的影响。结果表明,10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 刺激巨噬细胞能释放出大量的 NO(14.30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),与空白对照组相比有显著差异($P < 0.01$);100 ~ 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AVEC 能以一种剂量依赖式方式下调 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞释放炎症介质,与模型组相比有显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$)。

TNF- α 是一种由多种活化的免疫和非免疫细胞产生的促炎症细胞因子,可被 LPS、病毒、超抗原等多种刺激因子所诱导,同时 TNF- α 的分泌可诱发 IL-6 以及继发性炎症介质 NO 的释放^[7];IL-6 是一种多功能细胞因子,具有抗炎和致炎的双向功能,其作用与组织中的含量有关,正常水平的 IL-6 对机体有利,产生过多会引起一系列炎症损伤。因此本文通过考察炎症模型中两个细胞因子的含量来评价 AVEC 的抗炎活性^[8]。结果表明,10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 刺激巨噬

细胞能释放出大量的 TNF- α ,IL-6,与空白对照组相比有显著差异($P < 0.01$);而与模型组相比,100 ~ 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AVEC 能以一种剂量依赖式方式下调 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞分泌 TNF- α ,IL-6 等炎症因子,具有显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$)。

综上所述,紫金龙乙醇组分可以抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症反应,其抗炎作用可能与减少炎症因子 TNF- α ,IL-6 和 NO 有关,其更深入的机制尚有待于进一步的研究,本文仅为紫金龙药材的深度开发提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药质量标准(2003年版)[S].贵州:贵州科技出版社,2003:368.
- [2] 张嘉岷,吴凤镗,王明奎,等.深裂黄草乌二萜生物碱研究[J].植物学报,1997,39(6):582.
- [3] 丁立生,陈耀祖.黄草乌中的新二萜生物碱[J].化学学报,1992,50(4):405.
- [4] A L Alvarez Perez Gil, L Barbosa Navarro, M Patipo Vera, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanolic extract of *Bougainvillea xbutiana*[J]. J Ethnopharmacol,2012,144(31):712.
- [5] Deok Jeong, Woo Seok Yang, Jae Youl Cho, et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory effect of *Rhodomyrtus tomentosa* methanol extract [J]. J Ethnopharmacol, 2013,146(4):205.
- [6] Yue Lu, Seok-Jong Suh, Choong-Hwan Kwak et al. Saucerneol F, a new lignan, inhibits iNOS expression via MAPKs, NF- κ B and AP-1 inactivation in LPS-induced RAW 264.7 cells [J]. Int Immunopharmacol, 2012,12(7):175.
- [7] Pan Ma, Hong-Tao Liu, Peng Wei, et al. Chitosan oligosaccharides inhibit LPS-induced over-expression of IL-6 and TNF- α in RAW 264.7 macrophage cells through blockade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3K/Akt signaling pathways [J]. Carbohydrate Polymers,2011,84(1):1391.
- [8] Sz-jie Wu, Jong-Yi Fang, Chang-Chai Ng, et al. Anti-inflammatory activity of Lactobacillus-fermented adlay-soymilk in LPS-induced macrophages through suppression of NF- κ B pathways [J]. Food Research International, 2013,52(2):262.

[责任编辑 聂淑琴]