

番茄叶水提物对急性炎症氧化应激的拮抗作用

卫智权, 邓家刚, 阎莉*

(广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**探讨番茄叶水提物对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的急性炎症所致氧化应激的拮抗作用。**方法:**50只SD大鼠随机分为正常组、模型组与番茄叶水提物3.19, 1.59, 0.80 g·kg⁻¹·d⁻¹组,连续灌胃给药10 d,每天1次。末次给药后以腹腔注射LPS(4 mg·kg⁻¹)建立急性炎症模型。酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清铜锌超氧化物歧化酶(CuZn-SOD),谷胱甘肽过氧化物酶1(GSH-Px-1)和肿瘤坏死因子α(TNF-α),白细胞介素-6(IL-6),以逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测外周血白细胞CuZn-SOD, GSH-Px-1基因表达水平。**结果:**3.19, 1.59 g·kg⁻¹·d⁻¹番茄叶水提物可明显提高急性炎症大鼠外周血白细胞CuZn-SOD, GSH-Px-1基因表达以及血清CuZn-SOD, GSH-Px-1水平,显著降低血清TNF-α, IL-6水平。**结论:**番茄叶水提物可显著抑制LPS诱导的大鼠急性炎症及其所致氧化应激。

[关键词] 番茄叶水提物; 急性炎症; 脂多糖; 氧化应激; 基因表达

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0131-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060131

Effects of Tomato Leaf Aqueous Extract Against Oxidative Stress Induced by Acute Inflammatory
WEI Zhi-quan, DENG Jia-gang, YAN Li* (Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** This research was aimed to study effects of tomato leaf aqueous extract (TLAE) against oxidative stress induced by acute inflammatory. **Method:** Fifty SD rats were randomly divided into control group, model group and three TLAE treated groups of different dose (3.19, 1.59, 0.80 g·kg⁻¹·d⁻¹). The TLAE was orally given once a day within 10 days. Acute inflammation was induced by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (4 mg·kg⁻¹) after the end of gavage administration. The levels of CuZn-superoxide dismutase (CuZn-SOD), glutathione peroxidase 1 (GSH-Px-1), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF-α) in serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Gene expressions of CuZn-SOD and GSH-Px-1 in peripheral blood leucocyte were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** TLAE at 3.19, 1.59 g·kg⁻¹·d⁻¹ enhanced either the gene expressions of CuZn-SOD, GSH-Px-1 or the levels of them in serum. Furthermore, the decreased levels of TNF-α and IL-6 in serum were detected. **Conclusion:** The orally given TLAE can markedly restrain the oxidative stress accompanied with the LPS-induced acute inflammatory.

[Key words] tomato leaves aqueous extract; acute inflammation; lipopolysaccharide; oxidative stress; gene expression

近年来的研究表明,脂多糖(LPS)相关急性炎症是导致氧化应激的主要机制之一。LPS在体内可促进生成超氧阴离子、羟自由基和过氧化氢等氧化

物,并且活化炎症细胞释放多种内源性氧化剂^[1-2]。氧化应激可促进白细胞在微循环中的滞留、募集和活化^[3],激活核转录因子κB(NF-κB),显著增加白

[收稿日期] 20140725(002)

[基金项目] 广西高校壮医药基础与应用研究重点实验室项目(桂教科研[2014]6号);广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划资助项目(桂教人[2014]7号);广西中医学院自然科学研究课题项目(P2008105)

[第一作者] 卫智权,博士,讲师,从事天然药物活性成分的药理研究, Tel:0771-3946492, E-mail:wzq01067@163.com

[通讯作者] *阎莉,硕士,副教授,从事天然药、民族药的活性成分筛选和研发工作, Tel:0771-3134025, E-mail:mimaotoo@163.com

细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等多种炎症介质的生成和释放^[4]。活化的白细胞与业已存在的急性炎症均可导致更多的氧自由基的释放,体内氧化-抗氧化机制失衡进一步恶化,两者事实上形成相互促进的恶性循环。因此,恢复体内氧化-抗氧化失衡进而终止此恶性循环,可能成为 LPS 相关急性炎症治疗的重要选择。

番茄叶为茄科多年生草本植物番茄的叶,其化学成分复杂,迄今为止对其化学成分较为系统的研究报道非常有限,初步研究的结果显示番茄叶水或乙醇提取物含有皂苷、黄酮类、酚类、生物碱等成分^[5]。对番茄叶进行的抗炎活性研究表明,番茄叶水提物具有较明显的抑制 LPS 相关急性炎症的作用,而其对于不同的炎性细胞因子其作用强度可能存在差别^[6]。然而,番茄叶水提物是否能够抑制 LPS 相关急性炎症病理过程中的氧化应激损伤则未见文献报道。本研究以 LPS 诱导急性炎症大鼠为研究对象,观察番茄叶水提物对白细胞铜锌超氧化物歧化酶(CuZn-SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶 1(GSH-Px-1)的影响,初步评估番茄叶水提物抗急性炎症氧化应激损伤的作用。

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 50 只,体重 220~240 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号 SCXK(湘)2009-0004。

1.2 药品及试剂 番茄叶 *Lycopersicon esculentum* 来源于广西百色国家农业科技园区优质无公害蔬菜产业化示范园。干燥、粉碎后经水提取、浓缩 3 次后得到流浸膏(每 1 mL 相当于原生药 3.226 g),备用。戊巴比妥钠(北京化学试剂公司),脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,血清型 O55:B5,批号 L2880)。CuZn-SOD,GSH-Px-1,TNF- α ,IL-6 的 ELISA 试剂盒(均为美国 R&D 公司)。RNAPrep Pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒,TIANScrip cDNA 第一链合成试剂盒,2 \times Taq Plus PCR MasterMix(均为北京天根生化公司),目的基因特异性引物(由上海生工公司合成)。

1.3 仪器 Multiskan MK3 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),T-gradient Thermoblock 型梯度 PCR 仪(德国 Biometra 公司),PowerPac Basic 型电泳仪,Mini Sub Cell GT 型水平电泳槽,T-2A 型凝胶成像分析仪(均为美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组给药及标本采集与处理 50 只大鼠均分为正常组、模型组和番茄叶水提取物(TLAE)高、中、低剂量组(3.19 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,TLAE-H;1.59 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,TLAE-M;0.80 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,TLAE-L)^[6],每组 10 只,均 ig 给药。给药第 10 天,ip LPS(4 mg \cdot kg⁻¹)建立急性炎症动物模型。12 h 后以戊巴比妥钠 40 mg \cdot kg⁻¹ ip 麻醉,下腔静脉穿刺取血,其中 1 mL 加入红细胞裂解液 3 mL 混匀,静置 5 min,4 $^{\circ}$ C 离心(10 000 r \cdot min⁻¹,1 min),收集白细胞,冻存于 -70 $^{\circ}$ C 供提取总 RNA 进行 RT-PCR 之用;其余血液室温静置 30 min 后于 4 $^{\circ}$ C 离心(4 000 r \cdot min⁻¹,5 min)获得血清,分装冻存于 -70 $^{\circ}$ C 用于检测血清 CuZn-SOD,GSH-Px-1,TNF- α ,IL-6。

2.2 血清 CuZn-SOD,GSH-Px-1,TNF- α ,IL-6 水平 ELISA 检测 采用 CuZn-SOD,GSH-Px-1 和 TNF- α ,IL-6 的 ELISA 检测试剂盒,严格按照试剂盒说明书操作。以 Expert Curve 1.3.8 曲线拟合软件计算标准曲线的直线回归方程,分别计算样品浓度。

2.3 检测白细胞 CuZn-SOD,GSH-Px-1 基因表达 按照 RNAPrep Pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒说明书操作步骤,提取白细胞总 RNA,以总 RNA 为模板,OligodT 为引物合成 cDNA。CuZn-SOD,GSH-Px-1 基因和内参 β -actin 基因 PCR 的引物序列、扩增产物长度、退火温度见表 1。每个 PCR 反应体系内容如下:2 \times Taq Plus PCR Master Mix 25 μ L,上下游引物各 2 μ L,cDNA 2 μ L,ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,总共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 最终延伸 10 min。PCR 反应结束,取目的基因与内参基因扩增产物各 5 μ L 混匀,上样于 1% 琼脂糖凝胶进

表 1 引物序列、扩增产物长度、退火温度

Table 1 Primer sequences, amplification products and annealing temperature

基因	引物 5'-3'		产物长度 /bp	退火温度 / $^{\circ}$ C
	上游	下游		
CuZn-SOD	GGCTTCTGTCGTCTCCTTGC	CTTCTTCATTTCCACCTTTGC	472	56
GSH-Px-1	GGCACAGTCCACCGTGTATG	TCCGCAGGAAGGTAAGAGGC	359	58
β -actin	CACCCGGAGTACAACCTTC	CCCATACCCACCATCACACC	207	60.4

行水平电泳 ($5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1} \times 60 \text{ min}$), 凝胶成像分析仪测定目的基因与内参基因条带灰度并计算二者的比值, 作为 CuZn-SOD, GSH-Px-1 基因的相对表达量。

2.4 统计学处理 所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 SPSS 13.0 统计软件进行多组间均数比较, 方差齐性数据采用单因素方差分析 LSD 检验, 方差不齐数据采用 Kruskal Wallis 秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 番茄叶水提物对血清 CuZn-SOD, GSH-Px-1 水平和白细胞 CuZn-SOD, GSH-Px-1 基因表达的影响 腹腔注射 LPS 后, 模型组大鼠血清 CuZn-SOD 和 GSH-Px-1 水平均明显降低而显著低于正常组, 与正常组比较其差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。与模型组比较, TLAE-H 组, TLAE-M 组血清 CuZn-SOD, GSH-Px-1 水平均明显高于模型组, 其差异均

有统计学意义 ($P < 0.01, P < 0.05$)。TLAE-L 组血清 CuZn-SOD 水平高于模型组, 其差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 GSH-Px-1 水平虽然高于模型组, 但其差异无统计学意义。见表 2。

与正常组比较, 模型组 CuZn-SOD, GSH-Px-1 基因表达显著下调 ($P < 0.01$)。与模型组比较, $3.19, 1.59 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的 TLAE 可明显抑制 LPS 引起的 CuZn-SOD, GSH-Px-1 基因表达下调 ($P < 0.01$); $0.80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的 TLAE 可抑制 CuZn-SOD 的表达下调 ($P < 0.05$)。图 1, 表 2。

3.2 番茄叶水提物对血清 TNF- α , IL-6 水平的影响 腹腔注射 LPS 后, 模型组大鼠血清 TNF- α , IL-6 水平显著升高, 与正常组比较其差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。与模型组比较, TLAE-H 组, TLAE-M 组血清 TNF- α , IL-6 水平显著低于模型组 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 2 TLAE 对大鼠血清 CuZn-SOD, GSH-Px-1 水平和白细胞中 CuZn-SOD, GSH-Px-1 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Influence of TLAE on levels of serum CuZn-SOD, GSH-Px-1, and gene expressions of CuZn-SOD and GSH-Px-1 in peripheral blood leucocyte ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	CuZn-SOD/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	GSH-Px-1/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	CuZn-SOD	GSH-Px-1
正常	-	45.2 ± 4.2	220.2 ± 17.4	2.29 ± 0.41	2.79 ± 0.33
模型	-	37.9 ± 4.8 ¹⁾	186.4 ± 17.7 ¹⁾	1.10 ± 0.18 ¹⁾	1.66 ± 0.18 ¹⁾
TLAE	3.19	42.7 ± 4.3 ²⁾	216.0 ± 18.1 ²⁾	1.66 ± 0.12 ²⁾	2.65 ± 0.42 ²⁾
	1.59	42.3 ± 3.8 ²⁾	212.5 ± 17.3 ²⁾	1.45 ± 0.18 ²⁾	2.36 ± 0.37 ²⁾
	0.80	41.2 ± 5.4 ³⁾	200.0 ± 18.2	1.36 ± 0.16 ³⁾	1.76 ± 0.18

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

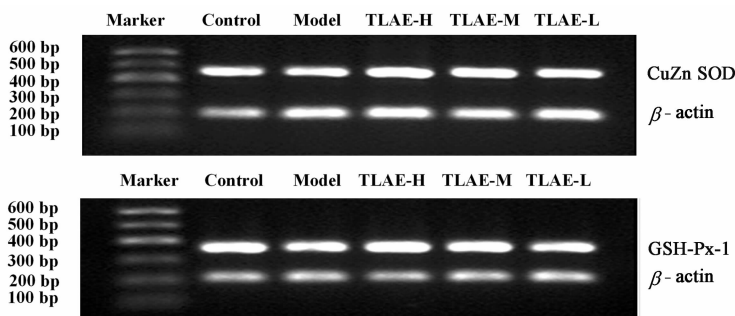


图 1 各组大鼠 CuZn-SOD, GSH-Px-1 基因表达琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis images of rat CuZn-SOD and GSH-Px-1 gene expressions in each group

4 讨论

由于抗生素、免疫抑制剂的广泛使用以及免疫缺陷疾病患者人群的日益增多, 无论是医院内感染还是社区获得性感染, 革兰阴性菌感染的发生率近年来均有显著上升^[7]。革兰阴性菌外膜的 LPS 是导致感染性炎症损伤的关键性致病原, LPS 可活化单核-巨噬细胞等炎症细胞, 产生 IL-6, TNF- α 等细

胞因子, 趋化中性粒细胞浸润炎症病灶部位, 中性粒细胞可释放氧自由基, 适量的氧自由基有利于清除病原微生物, 过量则造成氧化应激损伤^[8]。

CuZn-SOD 是抗氧化防御体系中一类非常重要的金属酶, GSH-Px-1 则是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶, 两者均可清除超氧化物自由基^[9-10]。超氧化物是细胞中主要的活性氧自由基之

表3 TLAE对大鼠血清中IL-6, TNF- α 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 3 Influence of TLAE on levels of serum IL-6, TNF- α of rat in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹
正常	-	594.8 ± 263.5	61.9 ± 14.1
模型	-	1 304.8 ± 162.7 ¹⁾	119.5 ± 10.2 ¹⁾
TLAE	3.19	632.0 ± 148.6 ²⁾	62.8 ± 9.7 ²⁾
	1.59	833.9 ± 190.9 ²⁾	69.0 ± 10.9 ²⁾
	0.80	1 169.0 ± 263.4	113.8 ± 9.1

一,因此CuZn-SOD, GSH-Px-1发挥了关键的抗氧化作用,对于保护细胞免受氧化损伤、维持细胞内环境稳态具有非常重要的意义^[11]。在本研究中,大鼠接受LPS注射之后均出现了显著的血清IL-6, TNF- α 水平升高,提示LPS成功诱导了大鼠的急性炎症;白细胞CuZn-SOD, GSH-Px-1基因表达显著下调,伴血清CuZn-SOD, GSH-Px-1水平明显降低,提示白细胞内部的氧化/抗氧化体系的生理平衡被打破,剧烈的炎症反应造成了显著的细胞呼吸爆发,可导致氧化应激损伤,如细胞膜脂质过氧化、蛋白质与核酸损伤等,并且CuZn-SOD, GSH-Px-1异常低表达是其抗氧化防御能力低下的重要原因。若能有效提升CuZn-SOD, GSH-Px-1的表达,也许可以在很大程度上恢复其氧化-抗氧化平衡,有利于终止氧化-抗氧化失衡与LPS诱导的急性炎症间的恶性循环。

前期的研究显示番茄叶水提物具有明确的抑制LPS介导的急性炎症的药理效应^[6],本研究的研究结果则进一步提示番茄叶水提物也同时能够明显拮抗急性炎症伴随的氧化应激损伤,并且其作用强度呈现某种剂量的剂量依赖性。本研究结果显示,较低剂量的番茄叶水提物仍然可以有效地拮抗急性炎症时的CuZn-SOD基因表达下调,但对于GSH-Px-1基因表达下调无明显效果,提示其对不同的抗氧化酶可能存在差异作用,其具体原因有待更多的实验研究加以揭示。

番茄是中国广泛种植的主要农作物之一,每年收获大量的番茄果实,但更大量的番茄叶则几乎均作为农业废弃物处置而不能充分利用。对番茄叶进行抗炎活性研究,有助于农业废弃物的开发利用,变废为宝,有利于农业的可持续发展。

[参考文献]

[1] Told R, Palkovits S, Schmidl D, et al. Retinal hemodynamic effects of antioxidant supplementation in an endotoxin-induced model of oxidative stress in humans [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(4): 2220-2227.

[2] Cowan E A, Taylor J L, Oldham C D, et al. Cellular antioxidant activity of phenylaminoethylselenides as monitored by chemiluminescence of peroxalate nanoparticles and by reduction of lipopolysaccharide-induced oxidative stress [J]. Enzyme Microb Technol, 2013, 53(6/7): 373-377.

[3] Sterner J B, Zanders T B, Morris M J, et al. Inflammatory mediators in smoke inhalation injury [J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2009, 8(1): 63-69.

[4] 孟莹, 余常辉, 李婷, 等. Toll样受体4在烟熏和脂多糖联合烟熏所致肺损伤大鼠中的表达及意义[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(28): 2230-2234.

[5] 梁臣艳, 邓家刚, 冯旭, 等. 番茄叶化学成分的初步研究[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(4): 26-28.

[6] 阎莉, 邓家刚, 卫智权. 番茄叶水提物急性毒性及其对急性炎症的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(2): 819-821.

[7] Torres A, Ferrer M, Badia J R. Treatment guidelines and outcomes of hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia [J]. Clin Infect Dis, 2010, 51 (Suppl 1): S48-53.

[8] Zhang Z H, Yu Y, Wei S G, et al. Centrally administered lipopolysaccharide elicits sympathetic excitation via NAD(P)H oxidase-dependent mitogen-activated protein kinase signaling [J]. J Hypertens, 2010, 28(4): 806-816.

[9] 李霏, 黄金兰, 崔雯, 等. 积雪草乙酸乙酯提取物对A β ₍₂₅₋₃₅₎片段所致的PC12细胞损伤模型及SAMP8小鼠脑内SOD, GSH-Px的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 111-114.

[10] 左巧云, 陶丽群, 罗秀, 等. 玉郎伞多糖抗鸭乙型肝炎病毒及保护肝细胞作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 222-226.

[11] Kancheva V D, Kasaikina O T. Bio-antioxidants-a chemical base of their antioxidant activity and beneficial effect on human health [J]. Curr Med Chem, 2013, 20 (37): 4784-4805.

[责任编辑 聂淑琴]