

紫菀酮对脂多糖诱导巨噬细胞释放 IL-1 β , TNF- α 及 NO 的影响

王芳^{1,2}, 任刚², 熊永爱¹, 赵海平^{2*}, 杨明^{2*}

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] 目的:探讨紫菀酮的体外抗炎作用及其机制分析。方法:利用脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞建立细胞炎症反应模型,通过紫菀酮对其进行干预,采用 SunBio™ Am-Blue 细胞增殖与活性检测试剂检测紫菀酮对 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响;Griess 法检测细胞培养上清液中 NO 含量;ELISA 法检测细胞培养上清液中白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量。结果:与空白组比较,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 紫菀酮组 RAW264.7 巨噬细胞的增殖抑制率明显高于空白组,0.1,1,10,20,30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 紫菀酮组 RAW264.7 巨噬细胞的增殖抑制率无显著性差异;10,30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 紫菀酮组 NO 释放量均显著低于脂多糖组;1,10,30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 紫菀酮组 IL-1 β 和 TNF- α 释放量均显著低于脂多糖组。结论:紫菀酮呈剂量依赖性抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症细胞因子 IL-1 β ,TNF- α 及 NO 的释放,具有体外抗炎作用。

[关键词] 紫菀酮;脂多糖;RAW264.7 巨噬细胞;抗炎机制

[中图分类号] R285.5;R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0123-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240123

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151028.1110.020.html>

[网络出版时间] 2015-10-28 11:10

Effect of Shionone on IL-1 β , TNF- α and NO Release of Macrophages Induced by Lipopolysaccharide
WANG Fang^{1,2}, REN Gang², XIONG You-ai¹, ZHAO Hai-ping^{2*}, YANG Ming^{2*} (1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China; 2. Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore anti-inflammatory mechanism *in vitro* of Shionone. **Method:** Cellular inflammatory reaction model of RAW264.7 macrophages was induced by lipopolysaccharide, this model was intervened by shionone, effect of shionone on proliferation of RAW264.7 macrophages was detected by SunBio™ Am-Blue cell proliferation and active detection reagent. The content of NO in cell culture supernatants was assessed by Griess reaction, levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were measured by commercially available ELISA kit. **Result:** Compared with the blank group, proliferation inhibition rate of RAW264.7 macrophages in the 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ shionone group significantly increased, but this parameter in other shionone groups had no obvious change. Compared with the lipopolysaccharide group, releases of NO in 10, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ shionone group significantly decreased, levels of TNF- α , IL- β in 1, 10, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ shionone group significantly decreased. **Conclusion:** Inhibition of shionone on release of TNF- α , IL-1 β and NO shows dose-dependent. Shionone has anti-inflammatory activity *in vitro*.

[Key words] shionone; lipopolysaccharide; RAW264.7 macrophages; anti-inflammatory mechanism

内毒素的化学本质为脂多糖,是革兰氏阴性菌 细胞壁外膜的结构成分之一。脂多糖是自然界中广

[收稿日期] 20150813(001)

[基金项目] 江西省科技支撑项目(20111BBG70005-4);江西中医药大学青年基金项目(Y027);江西中医药大学重点学科青年教师培养项目(2015jzdxk012)

[第一作者] 王芳,讲师,博士,从事现代中药新药研究,Tel:0791-87118645,E-mail:cat689apple@163.com

[通讯作者] *赵海平,副教授,从事现代中药新药创制研究,Tel:0791-87118985,E-mail:cdzhp3690098@163.com;

*杨明,教授,博士生导师,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:13870608983,E-mail:574825214@qq.com

泛存在的致病原,具有高度活性,主要由疏水性脂质 A、亲水性核心多糖及 O-特异性多糖共 3 部分组成,其中疏水性脂质 A 是内毒素的毒力中心,也是脂多糖结构中最稳定部分,无种属特异性。脂多糖能激活单核-巨噬细胞系统,导致白细胞介素-1 β (IL-1 β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等促炎介质大量释放,引起全身炎症反应综合征,进而发展为多器官功能障碍综合征多器官功能衰竭^[1]。

红管药为菊科属植物三褶脉马兰 *Aster ageratoides* 的干燥全草,具有祛痰镇咳、清热解毒、凉血止血等功效,主治感冒发热、支气管炎、痈肿疔毒等,曾被定为全国 18 种防治慢性气管炎有效药物之一。研究表明紫菀酮为红管药的祛痰主要有效成分之一^[2]。该成分能显著抑制小鼠咳嗽反应^[3-4],但目前尚无关于该成分抗炎镇咳作用机制的相关报道。本实验拟采用脂多糖诱导建立小鼠 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型,探讨紫菀酮对炎性细胞因子 IL-1 β ,TNF- α 和 NO 的作用,为该成分的体外抗炎作用机制研究提供参考。

1 材料

BS323S 型电子天平(德国 Sartorius 公司),3110 型水套系列 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司),SynergyN1 型多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司),TS-2 型水平脱色摇床(海门其林贝尔仪器制造有限公司)。RAW264.7 巨噬细胞株(中科院上海生命科学研究院细胞库),胎牛血清(上海玉博生物科技有限公司),脂多糖(美国 Sigma 公司,批号 100M4095),紫菀酮(中国食品药品检定研究院,批号 MUST-10030711);肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β),NO 试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司。

2 方法与结果

2.1 细胞处理 取生长状态良好的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 进行消化,加含 10% 胎牛血清的无酚红 DMEM 高糖培养基制成细胞悬液,稀释至 4 × 10⁴ 个/mL,接种至 96 孔培养板上,每孔 200 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 的孵箱中培养。培养过夜后,受试药物组加入 0.1,1,10,20,30,50 μ mol·L⁻¹ 的紫菀酮;BAY11-7082 组(NF- κ B 抑制剂);加入 10 μ mol·L⁻¹ BAY11-7082,空白组加入等体积空白培养基,在 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 的条件下继续培养 24 h。

2.2 RAW264.7 巨噬细胞增殖检测 细胞培养 24 h 后每孔加入 SunBio™ Am-Blue 细胞增殖与活性检测试剂 10 μ L,于培养箱中孵育 2 ~ 6 h。当培养

基的颜色由靛青蓝变成粉红色后,利用荧光酶标仪测定各孔相对荧光单位(RFU),激发光波长 560 nm,发射光波长 590 nm。根据所测得的 RFU,按增殖抑制率 = (1 - RFU_{试验组}/RFU_{对照组}) × 100% 计算 RAW264.7 巨噬细胞增殖抑制率。

2.3 NO, TNF- α 和 IL-1 β 含量的检测 分别采用 Griess 法和 Elisa 法对个试验组细胞上清液中 NO, TNF- α 和 IL-1 β 含量进行检测。采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数间比较采用 One-Way ANOVA 检验,方差齐则采用 LSD 检验,方差不齐则采用 Tamhane's T₂ 检验;等级资料采用非参数检验进行组间比较;检验以 P < 0.05 时认为其组间差异有显著性。

2.4 对 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响 50 μ mol·L⁻¹ 紫菀酮组 RAW264.7 巨噬细胞的增殖抑制率显著高于空白组,表明 50 μ mol·L⁻¹ 紫菀酮对 RAW264.7 巨噬细胞增殖有明显抑制作用;与空白组相比,0.1,1,10,20,30 μ mol·L⁻¹ 紫菀酮组 RAW264.7 巨噬细胞的增殖抑制率无显著性差异,表明它们对 RAW264.7 巨噬细胞的增殖无明显影响。

2.5 对脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞释放 NO 的影响 见表 1。结果表明与空白组比较,脂多糖组 NO 释放量显著高于空白组;与脂多糖组比较,10 μ mol·L⁻¹ 紫菀酮组和 30 μ mol·L⁻¹ 紫菀酮组 RAW264.7 巨噬细胞 NO 释放量显著减少。

表 1 紫菀酮对脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞释放 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of shionone on NO release of RAW264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	NO 浓度/ μ mol·L ⁻¹
空白	-	5.78 \pm 0.12
脂多糖	1 mg·L ⁻¹	49.58 \pm 3.1
NF- κ B 抑制剂	10 μ mol·L ⁻¹	22.49 \pm 3.47 ¹⁾
紫菀酮	1 μ mol·L ⁻¹	52.33 \pm 6.72
	10 μ mol·L ⁻¹	43.41 \pm 1.68 ¹⁾
	30 μ mol·L ⁻¹	35.82 \pm 2.56 ¹⁾

注:与脂多糖组比较¹⁾ P < 0.05(表 2 同)。

2.6 对 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞释放 TNF- α , IL-1 β 的影响 结果见表 2。与空白组相比,脂多糖组 RAW264.7 巨噬细胞的 IL-1 β 及 TNF- α 含量显著增高;与脂多糖组比较,紫菀酮各剂量组 RAW264.7 巨噬细胞的 TNF- α 和 IL-1 β 含量均显著降低。

3 讨论

本实验采用 SunBio™ 和 Am-Blue 法检测紫菀酮

表 2 紫菀酮对 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞释放 TNF- α 和 IL-1 β 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of shionone on TNF- α and IL-1 β release of RAW264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹
空白	-	34.13 ± 8.24	29.25 ± 5.39
脂多糖	1 mg·L ⁻¹	512.54 ± 14.28	189.67 ± 9.68 ¹⁾
NF- κ B 抑制剂	10 μ mol·L ⁻¹	382.41 ± 18.14 ¹⁾	146.47 ± 10.62 ¹⁾
紫菀酮	1 μ mol·L ⁻¹	458.66 ± 2.75 ¹⁾	152.40 ± 6.42 ¹⁾
	10 μ mol·L ⁻¹	409.62 ± 5.48 ¹⁾	127.40 ± 1.67 ¹⁾
	30 μ mol·L ⁻¹	345.69 ± 9.65 ¹⁾	100.36 ± 0.57 ¹⁾

对脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响, 结果表明 0.1, 1, 10, 20, 30 μ mol·L⁻¹ 紫菀酮组对 RAW264.7 巨噬细胞增殖无明显影响, 无细胞毒作用, 均可用于试验。

机体被革兰氏阴性菌感染时, 脂多糖作用于细胞膜表面的模式识别受体, 通过细胞内信号转导级联使细胞内信号分子表达发生变化, 从而活化巨噬细胞、中性粒细胞等诱导 TNF- α , IL-1 β 等致炎细胞因子和 NO 的合成与释放^[5-7]。

TNF- α 主要由激活的单核巨噬细胞分泌^[8-10], 是炎性介质复合网络的中心环节, 是脂多糖所致失控性释放的关键炎症因子^[11-13]。其还能诱导其他细胞因子的产生和释放^[14-15], 这些炎症因子可使炎症信号进一步放大和加强, 产生“级联放大”作用^[4]。IL-1 β 是 IL-1 基因家族成员之一, 可由脂多糖直接刺激产生, 也可由 TNF- α 诱导产生, 是一种典型的促炎因子, 能诱导 IL-6, TNF 及其自身的分泌, 并和 TNF 相互促进对方的释放, 在炎症反应中起协同作用。本文研究表明紫菀酮可明显降低炎性巨噬细胞 TNF- α 和 IL-1 β 的释放量, 抑制作用与 NF- κ B 抑制剂相似, 且与其抑制 NO 释放一样, 呈剂量依赖效应。

[参考文献]

[1] Harrison D A, Welch C A, Eddleston J M. The epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004; secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database[J]. Crit Care, 2006, 10(2): 42.

[2] 赵海平, 康林之, 杨明, 等. 基于红管药祛痰止咳有效组分的最佳配比研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 163-166.

[3] 卢艳花, 戴岳, 王峥涛, 等. 紫菀祛痰镇咳作用及其有

效部位和有效成分[J]. 中草药, 1999, 30(5): 360-362.

[4] Ade J, Kusuhara M, Ulevitch R J, et al. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase[J]. J Biol Chem, 1996, 271(28): 16586-16590.

[5] Noola S, Nicole S H, Daniel J L, et al. Essential role for TAX1BP1 in the termination of TNF- α , IL-1 and LPS mediated NF and JNK signaling[J]. EMBO J, 2007, 26(17): 3910-3922.

[6] Kim J H, Park Y M, Shin J S, et al. Fraxinellone inhibits lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by negatively regulating nuclear factor- κ B in RAW264.7 macrophages cells[J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(6): 1062-1068.

[7] Pitchal B, Manjeet S. Anti-tumour necrosis factor- α therapy in heart failure; future directions[J]. Basic Clin Pharmacol, 2006, 99(6): 391-397.

[8] Brown D L, Hibbs M S, Kearney M, et al. Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina [J]. Circulation, 1995, 91(8): 2125-2131.

[9] Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and-9 are elevated in patients with acute coronary syndromes[J]. J Am Coll Cardiol, 1998, 32(2): 368-372.

[10] Cohen P. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells [J]. Trends Cell Biol, 1997, 7(9): 353-361.

[11] Kyriakis J M, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation[J]. Physiol Rev, 2001, 81(2): 807-869.

[12] Lee S J, Lim K T. Inhibitory effect of 30-kDa phytylglycoprotein on expression of TNF- α and COX-2 via activation of PKC α and ERK1/2 in LPS-stimulated RAW264.7 cells[J]. Mol Cell Biochem, 2008, 317(1/2): 151-159.

[13] Luedde T, Trautwein C. Intracellular survival pathways in the liver[J]. Liver Int, 2006, 26(10): 1163-1174.

[14] Khalil A A, Hall J C, Aziz F A, et al. Tumour necrosis factor: implications for surgical patients [J]. ANZ J Surg, 2006, 76(11): 1010-1016.

[15] Wouter M, Kooloos D J. Potential role of pharmacogenetics in anti-TNF treatment of rheumatoid arthritis and crohn's disease [J]. Drug Discov Today, 2007, 12(3/4): 125-131.

[责任编辑 刘德文]