

参莲提取物对 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应的影响

刘思思¹, 李琦², 孙立东³, 李玉洁², 杨庆², 朱晓新^{2*}

(1. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
3. 安徽中医药大学, 合肥 230031)

[摘要] **目的:**探讨参莲(SL)提取物在炎症调节中发挥的治疗性作用及其机制。**方法:**分别以小鼠巨噬细胞 Raw264.7 和小鼠腹腔巨噬细胞为实验对象,利用脂多糖(LPS)诱导炎症模型,SL 提取物低、中、高剂量(5,10,20 mg·L⁻¹)药物处理24 h,另设空白组,使用酶联免疫吸附测定(ELISA)法及实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测小鼠 Raw264.7 及腹腔巨噬细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β)含量及 mRNA 表达;使用蛋白质免疫印迹法(Western blot)对小鼠 Raw264.7 核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路中的 p65 及磷酸化 p65(p-p65)蛋白表达情况进行检测,采用免疫荧光法对小鼠 Raw264.7 及腹腔巨噬细胞 NF- κ B p65 分子进行亚细胞定位观察 SL 提取物是否能够影响其入核。**结果:**与空白组比较,模型组小鼠 Raw264.7 及腹腔巨噬细胞 TNF- α ,IL-1 β 含量及 mRNA 表达均显著升高,小鼠 Raw264.7 p-p65/p65 蛋白表达显著升高($P < 0.01$),免疫荧光观察显示模型组 Raw264.7 及腹腔巨噬细胞均可见明显入核行为;与模型组比较,SL 提取物低、中、高剂量组明显降低小鼠 Raw264.7 及腹腔巨噬细胞 TNF- α ,IL-1 β 含量及 mRNA 表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),显著降低小鼠 Raw264.7 及 p-p65 蛋白($P < 0.01$),SL 提取物中剂量组可明显减弱 Raw264.7 及腹腔巨噬细胞入核行为。**结论:**SL 提取物能够抑制巨噬细胞的炎症反应,其机制可能与影响巨噬细胞炎症因子的分泌及 NF- κ B 信号通路有关。

[关键词] 参莲提取物; 核转录因子- κ B (NF- κ B); 炎症; 巨噬细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)10-0085-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017100085

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170308.0940.020.html>

[网络出版时间] 2017-03-08 9:40

Effects of Shenlian Extract on Lipopolysaccharide-induced Inflammation of Macrophages

LIU Si-si¹, LI Qi², SUN Li-dong³, LI Yu-jie², YANG Qing², ZHU Xiao-xin^{2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Capital Medical University, Beijing 100069, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
3. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the therapeutic effects and mechanism of Shenlian (SL) extract on inflammatory regulation. **Method:** The models of inflammation based on peritoneal macrophages and Raw264.7 cells were established by being induced by lipopolysaccharides (LPS). Treatment groups were given SL extract (5, 10, 20 mg·L⁻¹) for 24 h. The blank group was also set up. The protein and mRNA content of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and PCR (Real-time PCR); p65 in nuclear factor- κ B (NF- κ B) and phosphorylated p65 (p-p65) protein expression were detected by Western blot, and subcellular location of Raw264.7 cells and peritoneal macrophage NF- κ B-p65 was determined by immunofluorescence. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed significant increases in Raw264.7 and macrophage TNF- α , IL-1 β content and mRNA expressions, Raw264.7

[收稿日期] 20170119(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573649)

[第一作者] 刘思思,在读硕士,从事心血管药理研究,Tel:15010547980,E-mail:1263599856@qq.com

[通讯作者] *朱晓新,研究员,博士生导师,从事中药药理学研究,Tel:010-64093296,E-mail:xxzhu@icmm.ac.cn

p-p65/p65 protein expression ($P < 0.01$). According to the immunofluorescence assay, the model group showed obvious nuclear import of Raw264.7 cells and peritoneal macrophages. Compared with the model group, low, medium and high-dose SL extract groups showed significant decreases in Raw264.7 cells and peritoneal macrophage Raw264.7 and peritoneal macrophage TNF- α , IL-1 β content and mRNA expressions ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and Raw264.7 p-p65 protein expression ($P < 0.01$). And the medium-dose SL extract group showed an obvious weak nuclear import of Raw264.7 cells and peritoneal macrophages. **Conclusion:** SL extract can inhibit the inflammatory reaction of macrophages. Its mechanism may be related to the secretion of inflammatory cytokines and NF- κ B signaling pathways in macrophages.

[Key words] Shenlian extract; nuclear factor- κ B (NF- κ B); inflammation; macrophage

据 2015 年 WHO“心血管疾病实况报道”数据显示,2012 年在世界范围内约有 1 750 万人因心血管疾病 (cardiovascular diseases, CVD) 死亡,占全球死亡总数的 31%,是全球的头号死因,在 2030 年 CVD 的死亡人数预测将达到 2 330 万人^[1]。动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种主要发生在大、中动脉的慢性炎症反应性疾病^[2-3],是 CVD 的主要病理基础^[4]。巨噬细胞作为 As 疾病进程中的主要炎性细胞^[5],其具有的吞噬功能能够清除体内脂质^[6]。当巨噬细胞在受到血管壁沉积脂质刺激后能够激活分泌促炎介质,促使局部微环境炎症水平上调^[3],进一步促进了 As 的发展,因此抑制巨噬细胞介导的炎症水平的上调成为治疗 As 的有效靶点。LI 等^[7]研究结果显示,通过抑制巨噬细胞核转录因子- κ B (NF- κ B) 炎症信号通路传导具有抗 As 作用。而目前许多基于炎症抑制发挥抗 As 药效的临床药物诸如阿司匹林等长期服用多具有副作用,因此对巨噬细胞相关的炎症水平的调节同样是药物研发的热点,具有重要的治疗意义和应用前景。

参莲 (SL) 提取物是以丹参脂溶性部位、水溶性部位和穿心莲脂溶性部位以药材比例 15:9 配伍而成,具有活血、解毒的功效。在前期研究发现,SL 提取物能够减少 As 斑块面积,增加近心端血流量^[8],调节血脂,具有明确的抗 As 作用^[9];此外,还初步获得了 SL 提取物调节巨噬细胞极化的潜在活性提示^[10]。但是 SL 提取物对斑块内巨噬细胞促炎因子分泌的干预及其机制尚不明确,因此本实验以小鼠腹腔巨噬细胞和 Raw264.7 细胞作为实验对象,用 LPS 建立巨噬细胞炎症模型,同时加入 SL 提取物进行处理,观察该药物的抗炎作用是否是通过影响巨噬细胞炎症反应发挥作用,探索 SL 提取物抗 As 的潜在机制,为 SL 提取物抗炎进而抗 As 药理研究提供数据支持。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠,6~8 周龄,体重 25~27 g,中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK (军) 2012-0004。本研究所涉及的动物相关操作均在中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会的批准下进行。

1.2 药物及试剂 SL 提取物由丹参与穿心莲提取有效部位以药材比例 15:9 配伍组成,由中国中医科学院中药研究所化学室提供 (201609),含丹参酮 II_A (2.04%),丹酚酸 B (29.29%) 以及穿心莲内脂 (12.61%) 等成分。Raw264.7 细胞 (购自美国 ATCC 公司),脂多糖 (LPS,美国 Sigma 公司,批号 L2880),DMEM 培养基及谷氨酰胺 (美国 Gibco 公司,批号分别为 C11995500BT, 25030);胎牛血清 (FBS,兰州百灵生物科技有限公司,批号 20141002);RPMI-1640 培养基 (美国 Hyclone 公司,批号 ABA211779);噻唑蓝 (MTT,美国 Amresco 公司,批号 3293B07);cDNA 合成试剂盒 (美国 Thermo 公司,批号 00351597);实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 试剂盒 (北京天根生化科技公司,批号 P4919);小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测试剂盒 (达科为生物公司,批号分别为 E2720-1608-3, E2012-1608-1);兔抗 p-p65 多抗 (美国 CST 公司,货号 3033P93H1);兔抗 p65 多抗 (美国 CST 公司,货号 8242SD14E12);鼠抗 β -肌动蛋白 (β -actin) 单抗 (天津三箭生物科技有限公司,批号 AC415); β -actin, TNF- α , IL-1 β 引物由睿博兴科生物技术有限公司合成提供。

1.3 仪器 ELX800 Spectramax190 型连续波长酶标仪 (美国 MDC 公司),IX81 型倒置显微镜及 FV1000 型激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司),DYY-6D 型电泳仪 (北京市六一仪器厂),AC85V-265V 型 PCR 仪 (美国 Coyote Bio 公司),

Chamge15500 型凝胶成像仪(美国 Sagecreation 公司), 7500 型 Real-time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 Raw264.7 的培养 Raw264.7 使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基,置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养,3 d 传代 1 次,传代比例为 1:10,传代次数不超过 30 代。使用时,将细胞刮下,加入培养基重悬,计数后,加入培养板各孔中。

2.2 小鼠腹腔巨噬细胞培养 C57BL/6J 雌性小鼠给予 3% 改良巯基乙醇酸盐肉汤(1 mL/只,腹腔注射)刺激 72 h 后处死,75% 乙醇浸泡 10 s 后取出,无菌条件下暴露小鼠腹腔,1640 培养基 10 mL 灌洗腹腔,取出灌洗液,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清,用 1640 培养基 1 mL 重悬细胞,调整细胞密度为 1 × 10⁷ 个/mL,加入培养板中,37 °C 5% CO₂ 培养箱中贴壁 45 min 后,洗去未贴壁细胞,37 °C 5% CO₂ 培养箱培养待用。

2.3 MTT 法检测巨噬细胞的增殖 Raw264.7 细胞以 8 × 10³ 个/孔,小鼠腹腔巨噬细胞以 2 × 10⁴ 个/孔细胞密度接种于 96 孔板内,24 h 后加入不同浓度的 SL 提取物溶液,使其终质量浓度为 0,5,10,20,40,80,160 mg·L⁻¹ 及空白组(仅含培养基未接种细胞)。分别在 0,24,48,72 h 后将 96 孔板内培养基吸去,每孔再分别加入不含血清的 DMEM 培养基 45 μL,MTT(5 g·L⁻¹)5 μL,在恒温培养箱中放置 4 h 后,弃去上清,每孔加入 DMSO 150 μL,震荡 10 min,570 nm 处检测吸光度 A,实验重复 3 遍。

2.4 Real-time PCR 法检测巨噬细胞 TNF-α, IL-1β mRNA 表达 将 Raw264.7 细胞以 5 × 10⁴ 个/孔,小鼠腹腔巨噬细胞以 1 × 10⁵ 个/孔细胞密度接种于 12 孔板内,分为空白组,LPS 0.1 μg·L⁻¹ 组,SL 提取物低、中、高剂量组(5,10,20 mg·L⁻¹),共 5 组,各给药组 SL 提取物与 LPS 同时加入细胞培养板内,作用 24 h 后吸取上清,细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,每孔再加入 Trizol 800 μL,静置 5 min 后转移至 1.5 mL 离心管内。每管加入三氯甲烷 200 μL,充分混匀后,13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 分层,用无 RNA 酶枪头吸取上层液体转移至无 RNA 酶离心管内,加入异丙醇 500 μL,13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 得白色沉淀,用 75% 冰乙醇清洗 2 遍后,室温静置使沉淀干燥,加无 RNA 酶水复溶,定量,加水补齐至 mRNA 浓度一致,按照逆转录试剂盒说明将 mRNA

逆转录成 cDNA,通过特异性引物对细胞中 TNF-α, IL-1β 及其内参基因 β-actin 进行扩增,基因引物序列为 β-actin (104 bp) 上游引物:5'-CTAAGGCCAACCCTGAAAAG-3',β-actin 下游引物:5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'; TNF-α (128 bp) 上游引物:5'-TCTTCTCATTCCTGCTTGTGG-3',TNF-α 下游引物:5'-GGTCTGGCCATAGAAGTGA-3'; IL-1β (75 bp) 上游引物:5'-AGTTGACGGACCC CAAAAG-3', IL-1β 下游引物:5'-AGCTGGATG CTCTCATCAGG-3'。在此反应中依照试剂盒说明采用 20 μL 实验体系,其中上下游引物各 0.6 μL,2 × Mix 10 μL,50 × Rox 0.4 μL,逆转录反应产物 0.8 μL,无 RNA 酶 H₂O 7.6 μL。进行 Real-time PCR 反应,其扩增程序设置为 95 °C 30 s,95 °C 30 s,60 °C 30 s,共 50 个循环,采用 2^{-ΔΔCt} 方法进行数据分析。实验重复 3 次。

2.5 ELISA 法检测巨噬细胞上清中 TNF-α, IL-1β 含量 收集 2.4 项中 SL 药效实验细胞培养上清,按照试剂盒说明进行操作,在 450 nm 波长检测 A。实验重复 3 次。

2.6 Western blot 法检测 Raw264.7 细胞 NF-κB p65, p-p65 蛋白表达水平 取对数生长期 Raw 264.7 细胞,以 5 × 10⁴ 个/孔细胞密度接种于 12 孔板中,培养 24 h 后,各组分别加入设定的 LPS 和 SL 提取物处理,24 h 后弃去上清,细胞用预冷 PBS 清洗 3 遍,各孔加入 RIPA 冰上裂解细胞 30 min,使细胞裂解完全,转移至离心管内,13 000 × g 离心 5 min,吸取上清,BCA 试剂盒定量并且统一稀释到同一浓度。每孔上样 13 μL,SDS-PAGE 分离蛋白,湿转法转移至 PVDF 膜上,5% BSA 封闭 1 h,加入一抗,4 °C 过夜,TBST 洗膜 3 次,加入二抗,室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,发光。实验重复 3 次,统计灰度值。

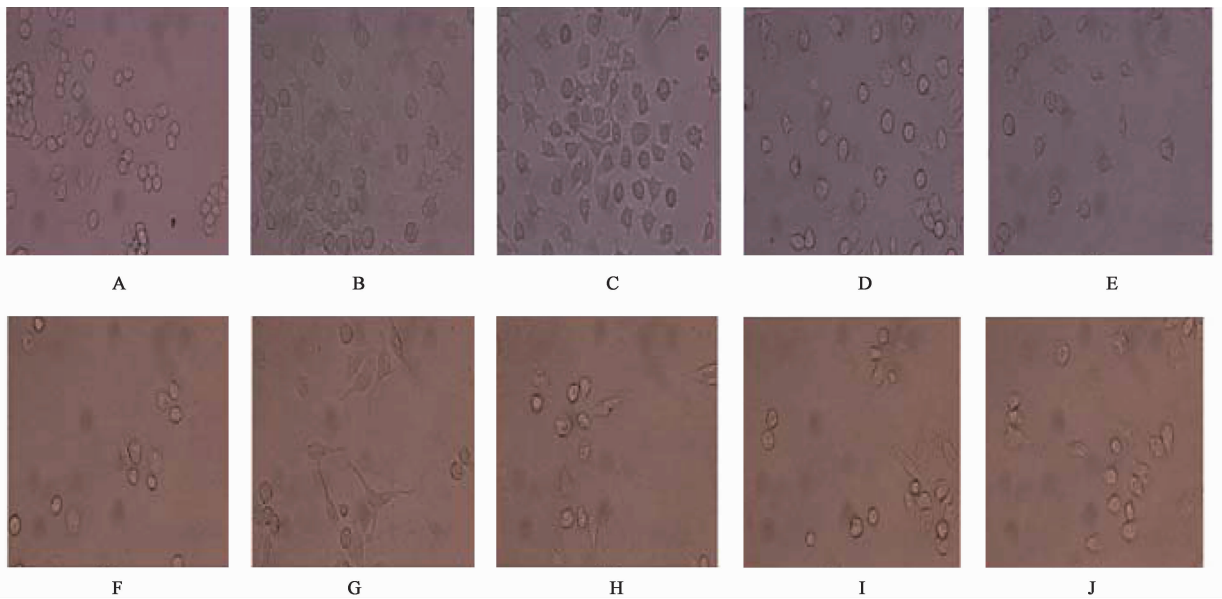
2.7 免疫荧光法检测 Raw264.7 细胞 NF-κB p65 核转位 将 Raw264.7 细胞以 5 × 10⁴ 个/孔,小鼠腹腔巨噬细胞以 1 × 10⁵ 个/孔细胞密度接种于共聚焦小皿内,分为空白组,模型组(LPS 0.1 μg·L⁻¹) 及给药组(SL 10 mg·L⁻¹),分别刺激 2 h 后,用预冷的 PBS 清洗 2 遍,加入 4% 甲醛固定 30 min,用预冷的 PBS 洗涤 3 遍后,加入 0.05% Triton-X100 打孔 15 min,PBS 清洗 3 遍,1% FBS 封闭 30 min,再加入兔抗 p-p65(1:200 稀释)4 °C 孵育过夜,PBS 清洗 3 遍后加入 FITC 标记二抗(1:400)孵育 1 h,PBS 清洗 3 遍后,DAPI(1:1 万)孵育 1 min,最后用 PBS 清洗 3 遍,在激光共聚焦显微镜下观察。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 SL 提取物作用浓度选择 与空白组比较,Raw264.7 细胞与小鼠腹腔巨噬细胞各给药组 SL 提取物在 $0 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度内,细胞生长和增殖并未受到明显影响,随着剂量增加,SL 提取物在 $30 \sim 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质量浓度,显示出一定的细胞增殖抑制现象,并且呈现明显剂量依赖性。因此,在后续实验中,将 SL 提取物高、中、低质量浓度设定为 20, 10, 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 对 LPS 诱导的小鼠 Raw264.7 和腹腔巨噬细胞炎症反应形态的影响 经前期 LPS 剂量摸索试验后,发现 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 诱导炎症效果明显,因此在后续实验中采用此剂量作为造模剂量。利用倒置显微镜观察发现,空白组 Raw264.7 细胞和小鼠腹腔巨噬细胞为圆形,给予 LPS 有效刺激后,Raw264.7 和小鼠腹腔巨噬细胞体积变大,形态从较为均一的圆形转变为梭形或多角形,伪足数目明显增多,细胞黏附状态明显改变。而在给予不同剂量 SL 提取物干预 24 h 后,可见细胞形态随着用药剂量的增加,出现不同程度的逆转,伪足数目减少,细胞形态逐渐趋向正常。见图 1。



A ~ E 组为 Raw264.7 细胞;A. 空白组;B. LPS $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;C. SL 提取物 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;D. SL 提取物 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;E. SL 提取物 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; F ~ J 组为小鼠腹腔巨噬细胞;F. 空白组;G. LPS $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;H. SL 提取物 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; I. SL 提取物 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; J. SL 提取物 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 1 SL 提取对 Raw264.7 和小鼠腹腔巨噬细胞细胞形态影响(倒置显微镜, $\times 400$)

Fig.1 Effect of SL extract on phenotype of Raw264.7 cell and peritoneal macrophages(inverted microscope, $\times 400$)

3.3 对小鼠 Raw264.7 和腹腔巨噬细胞 TNF- α , IL-1 β mRNA 表达的影响 与空白组比较,Raw264.7 细胞和小鼠腹腔巨噬细胞模型组 TNF- α , IL-1 β mRNA 表达水平显著增高 ($P < 0.01$);与模型组比较,SL 提取物各剂量组均能显著降低 IL-1 β mRNA 表达水平 ($P < 0.01$),SL 提取物中、高剂量组均显著降低 TNF- α mRNA 的表达水平 ($P < 0.01$)。见表 1,2。

3.4 对小鼠 Raw264.7 和腹腔巨噬细胞培养上清中 TNF- α , IL-1 β 含量的影响 与空白组比较, $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 作用于巨噬细胞后能显著增加细胞培养上清中 IL-1 β , TNF- α 的含量 ($P < 0.01$);与模型

表 1 SL 提取物对 Raw264.7 细胞 TNF- α , IL-1 β mRNA 表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of SL extract on TNF- α , IL-1 β mRNA expression levels of Raw264.7 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-1 β	TNF- α
空白	-	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
LPS	0.1	73.44 \pm 5.47 ²⁾	14.78 \pm 0.80 ²⁾
SL	5	8.23 \pm 0.14 ⁴⁾	9.49 \pm 0.45 ⁴⁾
	10	4.07 \pm 0.15 ⁴⁾	9.00 \pm 0.02 ⁴⁾
	20	4.32 \pm 0.31 ⁴⁾	8.10 \pm 0.13 ⁴⁾

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 2 ~ 5 同)。

表 2 SL 提取物对小鼠腹腔巨噬细胞 TNF- α , IL-1 β mRNA 表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of SL extract on TNF- α , IL-1 β mRNA expression levels of peritoneal macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	IL-1 β	TNF- α
空白	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
LPS	0.1	1 269.64 ± 29.87 ²⁾	75.48 ± 2.99 ²⁾
SL	5	339.90 ± 35.59 ⁴⁾	82.95 ± 2.03 ⁴⁾
	10	84.19 ± 1.36 ⁴⁾	31.47 ± 0.65 ⁴⁾
	20	112.09 ± 0.49 ⁴⁾	35.04 ± 0.58 ⁴⁾

组比较,SL 提取物高、中、低剂量组均能不同程度地降低巨噬细胞培养上清中 IL-1 β , TNF- α 含量 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3,4。

表 3 SL 提取物对 Raw 264.7 细胞培养上清 TNF- α , IL-1 β 含量影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Effect of SL extract on content of TNF- α , IL-1 β in Raw 264.7 cell ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	IL-1 β	TNF- α
空白	-	12.59 ± 0.63	66.97 ± 9.86
LPS	0.1	17.90 ± 2.17 ²⁾	183.66 ± 5.34 ²⁾
SL	5	14.71 ± 1.14 ³⁾	143.59 ± 8.91 ⁴⁾
	10	11.98 ± 1.09 ⁴⁾	104.68 ± 12.34 ⁴⁾
	20	10.86 ± 2.25 ⁴⁾	60.24 ± 21.00 ⁴⁾

表 4 SL 提取物对小鼠腹腔巨噬细胞培养上清 TNF- α , IL-1 β 含量影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 Effect of SL extract on content of TNF- α , IL-1 β in peritoneal macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	IL-1 β	TNF- α
空白	-	2.46 ± 0.42	3.58 ± 0.91
LPS	0.1	6.42 ± 0.38 ²⁾	227.95 ± 9.35 ²⁾
SL	5	3.46 ± 1.23 ⁴⁾	184.82 ± 16.45 ⁴⁾
	10	3.17 ± 1.02 ⁴⁾	149.45 ± 6.99 ⁴⁾
	20	3.69 ± 0.60 ⁴⁾	115.02 ± 21.50 ⁴⁾

3.5 对小鼠 Raw264.7 细胞 NF- κ B p-p65/p65 蛋白表达影响 与空白组比较,模型组在给予 LPS 刺激后能够引起 Raw264.7 细胞 NF- κ B p-p65/p65 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,不同剂量 SL 提取物均能够显著降低 p-p65/p65 蛋白水平 ($P < 0.01$)。见图 2,表 5。

3.6 对小鼠 Raw264.7 和腹腔巨噬细胞 NF- κ B p65 核转位的影响 在正常的 Raw 264.7 细胞和小鼠腹

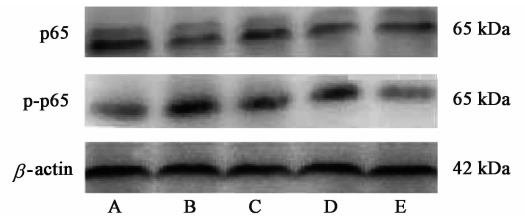


图 2 各组 Raw264.7 NF- κ B p65, p-p65 蛋白的表达
Fig. 2 Protein expression of Raw264.7 NF- κ B p65, p-p65 in each groups

表 5 SL 提取物对 Raw264.7 NF- κ B p65, p-p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of SL extract on Raw264.7 NF- κ B p65, p-p65 protein expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	p-p65/p65
空白	-	0.322 ± 0.004
LPS	0.1	0.614 ± 0.004 ²⁾
SL	5	0.365 ± 0.001 ⁴⁾
	10	0.407 ± 0.002 ⁴⁾
	20	0.334 ± 0.021 ⁴⁾

腔巨噬细胞,绿色荧光标记的 p65 蛋白主要分布在细胞胞浆内,细胞核内几无分布。与空白组比较,模型组巨噬细胞均可见明显入核行为,在细胞核内可见明显被荧光标记的 p-p65 蛋白;在给予 10 mg·L⁻¹ 的 SL 提取物后,可见核定位信号减弱,p65 蛋白主要分布在胞浆内,少有 p-p65 蛋白被定位在细胞核。见图 3。

4 讨论

巨噬细胞与 As 疾病进程的所有阶段发展息息相关。受局部微环境因素影响,巨噬细胞可极化成不同的亚型,根据其功能的不同进行分类,主要分为经典活化巨噬细胞 M1 型和替代活性巨噬细胞 M2 型。在生理状态下,M2 型巨噬细胞通常与组织修复和促炎症消散功能相关,分泌转化生长因子- β (TGF- β),血管内皮生长因子 (VEGF) 等细胞因子。而 M1 型巨噬细胞主要由 γ -干扰素 (IFN- γ),LPS 以及氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导形成,以分泌 TNF- α ,IL-1 β 等促炎因子为主,发挥促炎功能,通常被认为能够驱动疾病进展^[11]。在 As 疾病进程中,存在着炎症介质的持续释放和炎症消散的缺失问题^[12],促使血管局部微环境中 TNF- α ,IL-1 β 等促炎细胞因子持续升高^[13],从而使 As 进入一个持续性

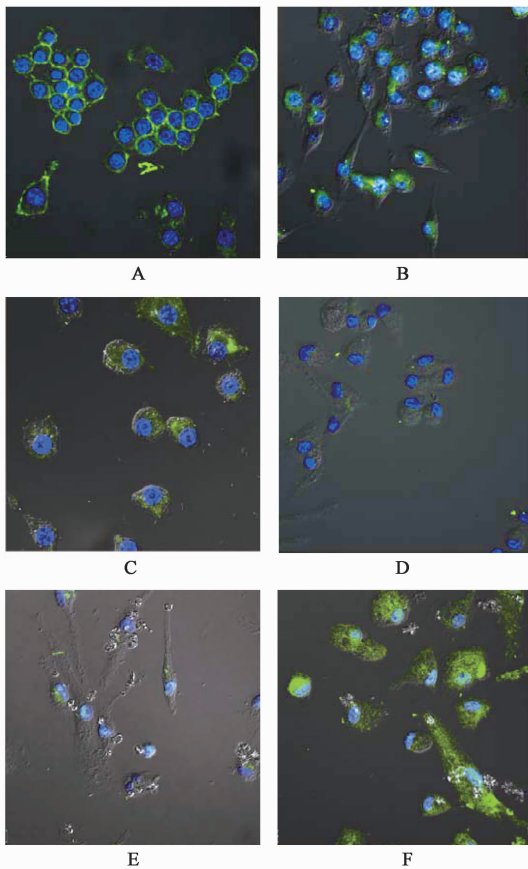


图 3 SL 提取物对 NF- κ B p65 入核的影响(免疫荧光, $\times 400$)
A~C 组为 Raw264.7 细胞: A. 空白组; B. LPS $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. SL 提取物 $10 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。D~F 组为小鼠腹腔巨噬细胞: D. 空白组; E. LPS $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; F. SL 提取物 $10 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 3 SL 提取物对 NF- κ B p65 入核的影响(免疫荧光, $\times 400$)
Fig. 3 Effect of SL extract on NF- κ B p65 nuclear translocation (IF, $\times 400$)

的慢性炎症过程,因此从巨噬细胞炎症调节角度研究药物抗 As 的作用成为药效研究一个重要的切入点。

本实验选择较为公认常用的 LPS 作为巨噬细胞炎症模型的诱导剂^[14],具有强度可控,快速明显的炎症模型构造优点。实验结果可见,巨噬细胞在给予 LPS 有效刺激后,其形态发生明显变化,促炎因子 TNF- α , IL-1 β 的基因和蛋白表达水平均显著上调;SL 提取物能够有效逆转 LPS 引起的巨噬细胞炎症表型变化以及基因和蛋白表达水平的上调,说明 SL 提取物对巨噬细胞炎症反应水平具有负向调节作用,此结果为 SL 提取物通过抑制血管局部微环境炎症从而影响 As 疾病进展提供了进一步的证据支持。

同时,笔者对 SL 提取物抑制巨噬细胞炎症反应的作用机制进行了初步探讨。巨噬细胞与炎症相关的受体为 Toll 样受体(TLRs),是细胞表面识别病原

相关分子识别受体^[11],巨噬细胞识别 LPS 后,TLR4/TLR6 二聚体和 CD36 共同激活 NF- κ B 信号通路,进而促进了促炎相关细胞因子分泌^[15]。基于此笔者观察了 SL 提取物对 NF- κ B 炎症通路重要节点 p65 蛋白表达水平的影响,结果提示不同剂量的 SL 提取物均能显著抑制 NF- κ B p65 蛋白表达及其活化水平。

NF- κ B 作为核转录因子,在细胞核内才能发挥其生物学效应。笔者采用 FITC 荧光(绿色荧光)标记 p65 蛋白,DAPI(蓝色荧光)标记细胞核的方法,鉴于激光共聚焦不能定量荧光强度,选择 $10 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为 SL 提取物代表剂量,观察对细胞内 p65 及细胞核定位影响。结果显示,在给予 LPS 刺激后,巨噬细胞内的 p65 发生了明显的核转位,而 SL 提取物能够有效抑制 NF- κ B p65 核转位,此结果与 p65 蛋白活化水平结果相符,进一步为 SL 提取物可能的巨噬细胞炎症反应水平调节机制提供了更深层次的依据。

本研究在前期研究基础上进一步深化,以炎症抑制为切入点,对 SL 提取物发挥抗 As 药效的分子基础和可能作用的机制进行了探索,证明了 SL 提取物对 As 炎症的治疗性作用与 NF- κ B 信号通路之间的相互关系及其潜在的分子机制。但此工作还需进一步进行充实,在后续研究过程中,笔者将采用与 As 相关性更强的炎症造模剂 ox-LDL 作为诱导剂,并从巨噬细胞极化角度开展深入研究,以期发现 SL 提取物通过抗炎治疗 As 性疾病潜在的分子机制。

[参考文献]

[1] 世界卫生组织. 媒体中心: 心血管疾病 [EB/OL]. [2015-01]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/zh/>

[2] ZHENG X X, ZHOU T, WANG X A, et al. Histone deacetylases and atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 240(2): 355-366.

[3] Salisbury D, Bronas U. Inflammation and immune system contribution to the etiology of atherosclerosis: mechanisms and methods of assessment [J]. *Nurs Res*, 2014, 63(5): 375-385.

[4] Takx R A, Partovi S, Ghoshhajra B B. Imaging of atherosclerosis [J]. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2016, 32(1): 5-12.

[5] Tuttolomondo A, Raimondo D Di, Pecoraro R, et al. Atherosclerosis as an inflammatory disease [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2012, 18(28): 4266-4288.

- [6] Thorp E, Subramanian M, Tabas I. The role of macrophages and dendritic cells in the clearance of apoptotic cells in advanced atherosclerosis [J]. Eur J Immunol, 2011, 41(9): 2515-2518.
- [7] Li K, Ching D, Luk F S, et al. Apolipoprotein E enhances microRNA-146a in monocytes and macrophages to suppress nuclear factor-kappaB-driven inflammation and atherosclerosis [J]. Circ Res, 2015, 117(1): e1-e11.
- [8] 郭琰. 基于炎症消散的参莲提取物抗 As 作用的机理研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2015.
- [9] 李玉洁, 朱晓新, 杨庆, 等. 参莲提取物对 As 家兔血管病理形态和脂质代谢的影响 [J]. 中草药, 2011, 18(4): 760-764.
- [10] 周冰冰, 李玉洁, 李琦, 等. 参莲提取物对 M1 巨噬细胞的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 2086-2090.
- [11] 阎雨, 何阳阳, 方莲花, 等. 巨噬细胞在动脉粥样硬化中的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(1): 7-10.
- [12] Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis—A matter of unresolved inflammation [J]. Semin Immunol, 2015, 27(3): 184-193.
- [13] Wolfs I M, Donners M M, Winther M P. Differentiation factors and cytokines in the atherosclerotic plaque micro-environment as a trigger for macrophage polarisation [J]. Thromb Haemost, 2011, 106(5): 763-771.
- [14] 喻思扬, 曾高峰, 刘洋, 等. 阿托伐他汀对脂多糖诱导的 THP-1 巨噬细胞炎症因子分泌的影响及机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(7): 663-667.
- [15] Pateras I, Giaginis C, Tsigris C, et al. NF-kappa B signaling at the crossroads of inflammation and atherogenesis: searching for new therapeutic links [J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2014, 18(9): 1089-1101.

[责任编辑 周冰冰]

《中国实验方剂学杂志》简介

《中国实验方剂学杂志》主编为吴以岭院士,由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中华中医药学会共同主办。以报道、介绍中医药研究为主旨的专业性学术期刊,创刊于1995年10月,目前为半月刊。

随着中医药政策扶持力度的加大和中医药科技创新的振兴,在中医药事业蓬勃发展的进程中,《中国实验方剂学杂志》也进入快速发展阶段! 以下是本刊在各权威数据库中的最新评价数据及收录情况:

①中国知网《中国学术期刊影响年报》(2016年版):影响力指数(CI)学科排序3/122(中医药类122本期刊中排第3名);复合影响因子1.319,学科排序9/122;

②万方数据《中国科技期刊引证报告(扩刊版)》: H 指标为16,总被引频次15 664,复合影响因子1.620,在中医药类122本期刊中排序分别为第2,2,11名;

③入选“中国科学引文数据库来源期刊”(CSCD 2015—2016);

④入选最新版《北大中文核心期刊要目总览》(2014年版);

⑤入选“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊2016年版);

⑥被评为“RCCSE 中国权威学术期刊(A+)”(《中国学术期刊评价研究报告(武大版)(2017—2018)》)。