

# 三黄方对 LPS 诱导 RAW264.7 炎症因子分泌的影响

李森,尹华\*,张成龙

(浙江中医药大学药学院,杭州 310053)

**[摘要]** 目的:观察三黄方对脂多糖(LPS)诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 分泌细胞因子的影响,探讨其抗炎作用机制。方法:CCK-8 法测定大黄、黄芩、黄柏及三黄方对 RAW264.7 细胞的毒性作用,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞上清液中的一氧化氮(NO)、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、前列腺素<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)、肿瘤坏死因子-1 $\alpha$ (TNF-1 $\alpha$ )的含量。结果:三黄方可抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放细胞炎症因子 NO,IL-1 $\beta$ ,PGE<sub>2</sub>,TNF-1 $\alpha$  的量,且三黄方的作用均强于各药单独使用。结论:三黄方及方中大黄、黄芩、黄柏在浓度范围 100~1.562 5 mg·L<sup>-1</sup>对 RAW264.7 细胞无显著毒性。三黄方通过抑制细胞因子 NO,IL-1 $\beta$ ,PGE-2,TNF-1 $\alpha$  释放发挥其抗炎作用的。

**[关键词]** 大黄;黄芩;黄柏;三黄方;细胞因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0213-03

**[doi]** 10.11653/syjf2013230213

## Study on the Anti-inflammatory Mechanism of Sanhuangfang Compound

LI Miao, YIN Hua\*, ZHANG Cheng-long

(Pharmacological College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Sanhuangfang compound on lipopolysaccharide (LPS) -induced production of inflammatory cytokine in RAW264.7 cell. **Method:** The cytotoxicity of *Rheum palmatum*, *Scutellaria baicalensis*, *Phellodendron chinense* and Sanhuangfang compound on RAW264.7 cells was detected by CCK8 method; Levels of nitric oxide (NO), interleukin (IL)-1 $\beta$ , prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in supernatant were assayed by ELISA. **Result:** Sanhuangfang compound inhibited the secretion of NO, IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> and TNF- $\alpha$  in LPS-induced RAW264.7 cells. **Conclusion:** *Rheum palmatum*, *Scutellaria baicalensis*, *Phellodendri chinensis* and Sanhuangfang compound in 100-1.562 5 mg·L<sup>-1</sup> concentration has non-cytotoxic macrophages. The anti-inflammatory effects of Sanhuangfang compound may be mediated in part by inhibiting the production of inflammatory mediators.

**[Key words]** *Rheum palmatum*; *Scutellaria baicalensis*; *Phellodendron chinense*; Sanhuangfang compound; inflammatory cytokine

**[收稿日期]** 20130716(020)

**[基金项目]** 浙江省科技厅重点科技计划项目(2007C23020);浙江省中药现代化专项资金项目(浙财企字[2008]268号);浙江省中医药科研基金项目(2006C038)资助项目

**[第一作者]** 李森,硕士研究生,从事中药质量标准、中药成分分析及中药新药研发,Tel:18658868693,E-mail:18658868693@163.com

**[通讯作者]** \*尹华,教授,博士生导师,从事中药质量标准、中药成分分析及中药新药研发,Tel:0571-86613604,Fax:0571-86613606,E-mail:maryyinhua@163.com

三黄方来源于浙江中医院的医院制剂——散瘀膏,系罗氏伤科祖传秘方研制而成,由大黄、黄芩和黄柏组成,具有活血化瘀,消肿止痛的功效。笔者前期的研究也表明三黄方可降低急性软组织损伤大鼠损伤局部组织的 PGE<sub>2</sub>,IL-1 $\beta$  的含量<sup>[1]</sup>。本文利用公认的体外炎症模型对三黄复方及方中单位药抗炎机制进行了初步的研究。

### 1 材料

**1.1 细胞株** 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 购自美国 ATCC 细胞库。

**1.2 受试药物** 大黄(批号 111018,甘肃,蓼科植

物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根及根茎); 黄芩 (批号 100824, 内蒙古, 唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 的干燥根); 黄柏 (批号 091029, 四川, 芸香科植物黄皮树 *Phellodendri chinensis* Schneid. 的干燥树皮) 等饮片购自浙江中医药大学饮片厂和华东医药有限公司。

**1.3 试剂** 脂多糖 (LPS, 美国 Sigma 公司, 批号 L2880); 小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素 (IL)- $1\beta$  ELISA 检测试剂盒 (杭州联科生物科技发展有限公司); 小鼠一氧化氮 (NO)、前列腺素  $E_2$  (PGE $_2$ ) ELSA 检测试剂盒 (DECO 生物科技有限公司); DMEM 高糖培养基, 胎牛血清, 胰蛋白酶 (美国 Hyclone 公司); 细胞活力测定盒 (CCK-8, 日本同仁化学公司)。

**1.4 仪器** 超净工作台 (上海上净净化设备有限公司); 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); CO $_2$  孵育箱、酶标仪 (美国 Thermo 公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** 取大黄、黄芩、黄柏各 25 g, 60% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 抽滤浓缩后冷冻干燥, 分别得大黄、黄芩、黄柏冻干粉; 另取大黄、黄芩、黄柏各 25 g, 大黄、黄芩合提, 黄柏单提, 60% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 抽滤浓缩后合并各浓缩液冷冻干燥, 得三黄方冻干粉。将冻干粉置于 -20 °C 备用。

**2.2 对 RAW264.7 细胞的毒性作用** 将 RAW264.7 细胞按每  $1 \times 10^4$ /孔接种于 96 孔细胞培养板中, 37 °C 5% CO $_2$  培养过夜, 弃去上清, 将含不同药物浓度的细胞培养液 200  $\mu$ L 每孔加入细胞培养板中, 正常细胞对照组中加入无药物的细胞培养液, 每组 4 复孔, 37 °C 5% 培养 24 h 后, 每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 继续培养 3 h, 酶标仪 450 nm 测定吸光度 (A)。计算细胞存活率。

**2.3 细胞分组** 取对数期生长状态良好的细胞随即分为空白组, LPS 模型组 (LPS 质量浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 大黄高、中、低剂量组, 黄芩高、中、低剂量组, 黄柏高、中、低剂量组、三黄方高、中、低剂量组。共 14 个实验组。

**2.4 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放炎症因子的影响** 将 RAW264.7 细胞按  $5 \times 10^4$ /孔接种于 24 孔细胞培养板中, 37 °C 5% CO $_2$  培养过夜, 弃上清, 分别将含不同质量浓度受试药物的细胞培养液 1 mL/孔加入细胞培养板中, 作用 2 h, 再加入终浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS, 设正常细胞对照组和模型细胞

对照组。每个浓度设 4 复孔。刺激 24 h 后收获细胞上清液,  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 收集上清液 -20 °C 保存。按小鼠 NO, IL- $1\beta$ , PGE $_2$ , TNF- $\alpha$  ELISA 检测试剂盒测定。

**2.5 统计学分析** 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据分析采用单因素方差分析, 组间比较采用 SNK 法。统计学数据用 SPSS 12.0 软件分析处理,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 药物对 RAW264.7 细胞的毒性作用** CCK-8 实验表明三黄复方、大黄、黄芩以及黄柏在浓度  $< 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时均无明显的细胞毒性, 因此选择 100, 50, 25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  3 个质量浓度进行实验。

**3.2 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响** LPS 可诱导 RAW264.7 细胞释放 NO 量增加, 与正常细胞对照组相比具有显著差异 ( $P < 0.01$ ); 三黄方 3 个浓度组以及大黄中、低浓度组, 黄芩高、低浓度组, 黄柏中、低浓度组可显著抑制细胞释放 NO 的量 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

**3.3 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 PGE $_2$  的影响** LPS 可诱导 RAW264.7 细胞释放 PGE $_2$  量增加, 与正常细胞对照组相比具有显著差异 ( $P < 0.01$ ); 三黄方 3 个浓度组以及大黄中、低浓度组, 黄芩高浓度组, 黄柏高、中、低浓度组均可显著抑制细胞释放 PGE $_2$  的量 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。见表 1。

**3.4 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 TNF- $\alpha$  的影响** LPS 可诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF- $\alpha$  量增加, 与正常细胞对照组相比具有显著差异 ( $P < 0.01$ ); 三黄方 3 个浓度组以及大黄高浓度组均可显著抑制细胞释放 TNF- $\alpha$  的量 ( $P < 0.01$ ), 大黄中浓度组, 黄芩高、中浓度组, 黄柏中浓度组可抑制 TNF- $\alpha$  释放的量 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**3.5 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 IL- $1\beta$  的影响** LPS 可诱导 RAW264.7 细胞释放 IL- $1\beta$  量增加, 与正常细胞对照组相比具有显著差异 ( $P < 0.01$ ); 三黄方 3 个浓度组, 大黄高浓度组, 黄芩中浓度组可抑制 IL- $1\beta$  的释放 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。见表 1。

## 4 讨论

LPS 可诱导细胞产生一系列的炎症反应<sup>[2]</sup>, 巨噬细胞在受到 LPS 激活后可产生大量的细胞因子, 包括 NO, PGE $_2$ , TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$  等。其中 NO 在炎症反应的过程中对组织有损伤和保护双向作用, NO 的过量生成与炎症反应有着密切的关系<sup>[3]</sup>, 可导致

表 1 三黄方及组成药味对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞释放炎症因子的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PGE <sub>2</sub> / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- $\alpha$ / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-1 $\beta$ / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	8.92 ± 0.18 <sup>2)</sup>	72.86 ± 5.57 <sup>2)</sup>	98.94 ± 5.11 <sup>2)</sup>	16.78 ± 0.74 <sup>2)</sup>
LPS	-	26.85 ± 3.5	224.95 ± 20.26	187.71 ± 12.94	26.68 ± 2.61
LPS + 三黄方	25	19.21 ± 2.43 <sup>2)</sup>	159.94 ± 8.54 <sup>2)</sup>	147.26 ± 15.39 <sup>2)</sup>	17.99 ± 3.28 <sup>1)</sup>
	50	17.09 ± 1.25 <sup>2)</sup>	162.29 ± 11.62 <sup>2)</sup>	161.93 ± 14.42 <sup>2)</sup>	20.71 ± 5.29 <sup>1)</sup>
	100	15.96 ± 1.16 <sup>2)</sup>	131.19 ± 3.60 <sup>2)</sup>	165.80 ± 9.46 <sup>2)</sup>	22.87 ± 2.55 <sup>2)</sup>
LPS + 大黄	25	15.61 ± 0.66 <sup>2)</sup>	167.30 ± 9.98 <sup>2)</sup>	174.53 ± 23.44	27.64 ± 6.11
	50	15.12 ± 1.10 <sup>2)</sup>	168.77 ± 8.19 <sup>2)</sup>	170.43 ± 12.73 <sup>1)</sup>	25.57 ± 3.43
	100	26.05 ± 4.37	226.10 ± 30.64	163.14 ± 10.17 <sup>2)</sup>	19.21 ± 2.93 <sup>1)</sup>
LPS + 黄芩	25	19.66 ± 2.67 <sup>2)</sup>	225.08 ± 14.50	179.60 ± 8.40	26.90 ± 3.20
	50	25.95 ± 7.37	210.08 ± 26.72	173.18 ± 12.59 <sup>1)</sup>	22.99 ± 2.16 <sup>1)</sup>
	100	23.71 ± 1.49 <sup>1)</sup>	181.99 ± 15.83 <sup>2)</sup>	171.40 ± 11.72 <sup>1)</sup>	18.25 ± 1.52 <sup>2)</sup>
LPS + 黄柏	25	16.67 ± 1.20 <sup>2)</sup>	190.50 ± 23.87 <sup>1)</sup>	184.38 ± 23.91	24.94 ± 2.69
	50	18.18 ± 1.48 <sup>2)</sup>	167.44 ± 10.89 <sup>2)</sup>	167.93 ± 14.39 <sup>1)</sup>	25.28 ± 7.22
	100	26.07 ± 6.52	171.43 ± 14.22 <sup>2)</sup>	182.54 ± 23.79	29.94 ± 4.71

注:与 LPS 组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

发生炎症的部位渗出和水肿。PGE<sub>2</sub> 是炎症反应中的重要介质,可以引起血管的扩张、疼痛和发热反应。TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  均是炎症的发生过程中的重要介质。实验结果表明,三黄复方中的有效成分可能正是通过抑制巨噬细胞释放的炎症介质而起到抗炎作用的。

本实验针对三黄方及方中的单味药对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  细胞因子的影响进行了研究,结果表明三黄方中 3 味中药合用时其抑制细胞炎症介质释放的能力最大且最稳定,而方中的 3 味中药单用时虽然也会对其中的某些炎症介质有抑制作用,然而均不如合用时的抑制作用显著。这说明中药复方是通过多成分,多靶点来发挥其多效性的优势的。有研究表明,大黄中的主要药效物质为蒽醌类成分,其中游离性蒽醌类成分大黄素、大黄酸、芦荟大黄素均有一定的抗炎作用<sup>[4-6]</sup>,而黄芩中的黄酮类成分以及黄柏中的小檗碱等生物碱类成分亦具有消炎的作用<sup>[7-9]</sup>。将中药中的有效组分进行配伍规律的研究,有助于中药研发出成分清楚,药效最佳,机制明确以及质量安全可控的中药方剂,而且中药组分如要可提高载药量,改良中药剂型。

综上所述,三黄方抗炎作用,其机制可能与抑制活化的巨噬细胞释放细胞因子有关,并且其抗炎作用可能是多靶点起效的。但其抗炎作用的主要起效组分还需进一步的实验研究来证明。

## [参考文献]

- [1] 章建华,尹华,刘云飞,等. 三黄散瘀巴布剂对急性软组织损伤大鼠的治疗作用[J]. 中华中医药杂志, 2012,27(7):216.
- [2] Abreu M T, Ardit M. Innate immunity and toll-like receptors: clinical implication of basic research [J]. Pediatric,2004,144,421.
- [3] Lala P K, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour ptoression[J]. Lancet Oncol, 2001,2(3):149.
- [4] 李建生,刘敬霞,张伟宇,等. 大黄素抗大鼠脑缺血损伤及对炎性因子反应的影响[J]. 中国中药杂志, 2005,30(24):1939.
- [5] 吕敏,周媛媛,马向华. 大黄酸对白细胞介素-6 诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 现代生物医学进展,2009,9(16):3075.
- [6] 李晓红,齐云,蔡润兰,等. 芦荟大黄素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 生成及 iNOS 表达的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(4):488.
- [7] 祝双来,黄洪林. 黄芩黄酮类化合物抗炎作用机制研究进展[J]. 江西中医学院学报,2010,22(3):97.
- [8] 侯小涛,戴航,周江煜. 黄柏的药理研究进展[J]. 时珍国医国药,2007,18(2):498.
- [9] 尚文斌,刘佳,于希忠,等. 小檗碱对肥胖小鼠炎症因子分泌和炎症信号通路的作用[J]. 中国中药杂志, 2010,35(11):1474

[责任编辑 聂淑琴]