

芪麝丸体外抗炎的机制

潘一峰¹, 杨晓露², 王建强¹, 章丹丹^{2*}

(1. 上海现代中医药股份有限公司, 上海 200050;

2. 上海中医药大学 穆拉德中药现代化研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的: 考察芪麝丸体外对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型的抗炎机制。方法: 干扰素 γ (1×10^4 U·mL⁻¹) 和脂多糖 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 协同诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞 ($1 \times 10^5/\text{mL}$) 24 h 造成炎症模型; Griess 反应测定细胞上清液中一氧化氮 (NO) 产量; Western blot 检测诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧合酶 (COX-2) 的蛋白表达及丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号转导通路的活化情况。结果: 芪麝丸 ($250, 500, 1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 呈剂量依赖性抑制细胞上清液中 NO 含量, 且无细胞毒性。较模型组, 经芪麝丸 $500, 1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量处理后, iNOS 蛋白表达从 (1.00 ± 0.06) 下调至 (0.61 ± 0.07) 和 (0.02 ± 0.15), ($P < 0.01$), COX-2 蛋白表达从 (0.56 ± 0.03) 下调至 (0.42 ± 0.02), (0.30 ± 0.03), ($P < 0.01$)。胞外信号调节激酶 (ERK) 磷酸化水平从 (1.04 ± 0.04) 下调至 (0.79 ± 0.06), (0.73 ± 0.10), ($P < 0.01$)。p38 磷酸化水平从 (0.51 ± 0.06) 下调至 (0.39 ± 0.07), (0.29 ± 0.15), ($P < 0.05$), c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 磷酸化水平从 (1.05 ± 0.03) 下调至 (0.65 ± 0.02), (0.66 ± 0.033), ($P < 0.01$)。结论: 芪麝丸部分通过抑制 MAPK 信号转导通路活化过程中关键蛋白胞外信号调节激酶 (ERK)、JNK 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38) 磷酸化, 下调 iNOS 基因和蛋白的表达从而减少 NO 的产量, 同时下调 COX-2 蛋白表达, 而发挥其抗炎效果。

[关键词] 炎症; 一氧化氮; 诱导型一氧化氮合酶; 芪麝丸; 分子机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0144-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1201.012.html>

[网络出版时间] 2012-7-11 12:01

Anti-inflammatory Mechanism of Qishe Pill *in vitro*

PAN Yi-feng¹, YANG Xiao-lu², WANG Jian-qiang¹, ZHANG Dan-dan^{2*}

(1. Shanghai SUNDISE Chinese Medicine Co. Ltd., Shanghai 200050, China;

2. Murad Research Institute for Modernized Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-inflammatory mechanism of Qishe pill on stimulated macrophage. **Method:** Interferon- γ (IFN- γ) plus lipopolysaccharide (LPS) stimulated RAW 264.7 macrophage was used as inflammatory experimental model. Griess reaction for nitric oxide production and Western blot for protein expression examination were performed. **Result:** Qishe pill inhibited nitric oxide (NO) production in a dose-dependent manner without cytotoxicity. The protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX-2) were also suppressed by Qishe pill treatment. Furthermore, phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and p38 protein was markedly inhibited. **Conclusion:** Qishe pill suppressed over production of NO and iNOS expression via inhibition of phosphorylation of ERK, JNK and p38/MAPK (mitogen-activated protein kinases) activated signalling pathway partly.

[收稿日期] 20111109(020)

[基金项目] 国家科技重大专项重大新药创制(2009ZX09311-003); 国家自然科学基金青年基金项目(81001666); 上海高校选拔培养优秀青年教师基金项目(SZY07029)

[第一作者] 潘一峰, 硕士, 工程师, 从事中药新药开发与质量标准化研究, E-mail: ipanyf@126.com

[通讯作者] * 章丹丹, 博士, 副研究员, 从事抗炎中药开发及机制分析, Tel: 021-51322534, E-mail: izhangdd@126.com

[**Key words**] inflammation; nitric oxide; inducible nitric oxide synthase; Qishe pill; molecular mechanism

芪麝丸由黄芪、人工麝香、川芎、青风藤、防己和人工牛黄六味药组成,是全国及上海名中医施杞根据“以气为主,以血为先,痰瘀兼顾”的辨证论治理论,经30余年临床和实验研究的总结结合现代工艺加工而成的新药,具有疏风活血,强筋壮骨、通络止痛的作用,对神经根型颈椎病的临床疗效确切。

颈椎病是导致外周神经退行性变的常见疾病,近年研究发现,颈椎病的发病和进展同炎症密切相关^[1-2]。动物实验表明该方能够抑制动-静脉失衡性颈椎间盘退变模型大鼠椎间盘中炎症介质的含量,降低退变椎间盘自身免疫反应;对小鼠耳廓肿胀有显著的抑制作用;通过大鼠甩尾试验和小鼠热板试验显示有明显的止痛作用。该方中的人工麝香可抑制免颈椎病模型的退变椎间盘中组胺、5-羟色胺、PGE₂及6-酮-PGF_{1α}含量^[3],在大鼠椎间盘退行模型和体外终板软骨培养实验中通过抑制MAPK通路活化而下调众多炎症介质的表达,如白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF-α)等^[4]。但全方的抗炎机制尚未深入研究。

本研究考察芪麝丸对激活巨噬细胞中炎症介质的影响及其分子机制,包括巨噬细胞炎症模型中一氧化氮(NO)产量,炎症中关键酶类诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶(COX-2)的蛋白表达,同时检测丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路中c-Jun氨基末端激酶(JNK)、胞外信号调节激酶(ERK)和p38蛋白磷酸化水平的变化来探讨其可能的抗炎机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 芪麝丸由上海黄海制药有限责任公司提供(批号100603,0.15 g/丸,含生药量为1.022 6 g),用DMSO配成200 g·L⁻¹母液,-80℃保存,临用前稀释成所需浓度,DMSO终浓度<0.1%。RPMI 1640(批号1046188,Gibco公司),胎牛血清(批号ASM31065,HyClone公司),二甲基亚砷(批号RNBC0311)、脂多糖(批号050M4014)、Griess反应试剂(010M1473V、109K0086)、L-N⁶-亚氨基乙基-赖氨酸[L-N⁶-(1-Iminoethyl) lysine hydrochloride, L-NIL,批号019K265V, Sigma公司]; Trizol RNA提取试剂(批号36004,购自Life technologies公司),鼠重组干扰素(IFN-γ,批号NMM1645447),ECL检测试剂(批号1122002)购自

Millipore公司。蛋白梯度对照品(批号00030127, Fermentas公司),iNOS(610332)抗体(BD Biosciences公司),COX-2(P35354),p-ERK(P27361),p-JNK(P45983),p-p38(Q16539),β-actin抗体和二抗(Cell Signaling Technology公司和Santa Cruz公司),蛋白含量测定试剂盒购自碧云天公司;PVDF膜购自伯乐公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 Spectra MAX190酶标仪(美国MD公司),超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),单向电泳系统(美国Bio-rad公司),sMPIC2600C自动X射线胶片洗片机(上海申贝公司)。

1.3 细胞株 RAW264.7细胞购自美国模式培养物集存库ATCC(American type culture collection)公司。

2 方法

2.1 细胞培养 RAW 264.7细胞株培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,置于CO₂培养箱中,在37℃和5%CO₂条件下培养。

2.2 芪麝丸干预前后激活细胞上清液中亚硝酸盐含量的变化 细胞悬液接种于96孔板,培养过夜。空白对照组采用含0.1% DMSO的RPMI 1640培养细胞,模型组采用LPS(100 μg·L⁻¹)和IFN-γ(1×10⁴ U·L⁻¹)协同刺激细胞,阳性对照组用iNOS选择性抑制剂L-NIL,50 μmol·L⁻¹处理细胞。芪麝丸采用250,500,1 000 mg·L⁻¹3个剂量处理细胞。刺激维持24 h后,吸取96孔板中的培养液100 μL,加入等体积的Griess反应试剂,室温反应10 min,酶标仪540 nm处读取吸光度(A)。计算芪麝丸各剂量对细胞上清液中亚硝酸盐抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{模型组A} - \text{各剂量干预组A}) / (\text{模型组A} - \text{空白对照组A}) \times 100\%$$

2.3 对静息细胞增殖能力的影响 细胞悬液接种于96孔板,培养过夜。空白对照组采用含0.1% DMSO的RPMI 1640培养细胞,芪麝丸采用250,500,1 000 mg·L⁻¹3个剂量处理细胞,24 h后加入MTT溶液(PBS溶解,5 g·L⁻¹)20 μL,继续培养4 h后,弃上清,加入DMSO 150 μL,于490 nm读取A,以空白对照组的细胞活力为100%对照,计算芪麝丸各剂量处理组对细胞增殖能力的影响。

2.4 对iNOS,COX-2蛋白表达和MAPK中ERK,

JNK, P38 蛋白磷酸化的影响 细胞悬液接种于 30 mm 细胞培养皿, 培养过夜。空白对照组和模型组同上, 芪麝丸采用 500, 1 000 mg·L⁻¹ 2 个剂量预处理 1 h 后, 加入刺激剂, 共同孵育 4 h 或 30 min 后, 细胞用冰 PBS 洗涤 2 遍, 加入蛋白酶抑制剂后收集细胞, 超声破碎并离心, 取蛋白上清液进行蛋白含量测定。每孔加入 50 μg 的蛋白上样, 在 7.5% 和 12% 的 SDS-PAGE 凝胶中电泳, 蛋白转移到 PVDF 膜上, 10% 脱脂牛奶封闭, 分别用一抗 iNOS (1:1 000), COX-2 (1:1 000), p-ERK (1:1 500), p-JNK (1:500), p-p38 (1:1 000), β-actin (1:800) 与膜 4 ℃ 孵育过夜, PBST 溶液洗膜 3 × 15 min, IgG-HRP 二抗 (1:2 000 ~ 1:5 000) 与膜孵育 1 h, PBST 溶液洗膜 3 × 15 min, 膜控干后加 ECL 试剂, X 线显影、定影。

2.5 统计学方法 使用统计软件 SPSS 10.0 版本进行数据分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 差异显著性检验采用 *t* 检验。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 芪麝丸对细胞上清液中 NO 产量的影响

IFN-γ 和 LPS 协同诱导 RAW264.7 产生大量的 NO, 细胞上清中 NO 产物亚硝酸盐含量显著提高 (P < 0.01)。芪麝丸呈剂量依赖性抑制激活巨噬细胞上清液中亚硝酸盐的积累 (P < 0.01)。见表 1。

表 1 芪麝丸对激活巨噬细胞中 NO 产量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	亚硝酸盐量/μmol·L ⁻¹	抑制率/%
对照	-	4.42 ± 0.01	-
模型	-	62.17 ± 0.04 ¹⁾	-
芪麝丸	250	35.55 ± 0.00 ³⁾	46.10
	500	27.18 ± 0.13 ³⁾	60.60
	1 000	10.74 ± 0.04 ³⁾	89.05
L-NIL	50 μmol·L ⁻¹	49.22 ± 0.01 ³⁾	35.2

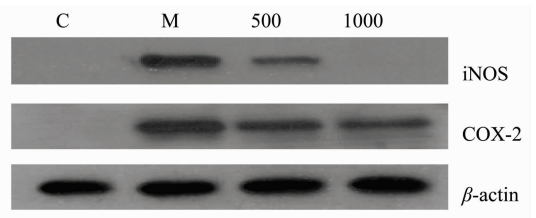
注: 与对照组比较¹⁾ P < 0.01, ²⁾ P < 0.05; 与模型组比较³⁾ P < 0.01, ⁴⁾ P < 0.05 (表 2~4 同)。

3.2 芪麝丸对静息巨噬细胞增殖能力的影响 静息态巨噬细胞的增殖能力随芪麝丸剂量的提高而提升 (P < 0.01), 芪麝丸对巨噬细胞无细胞毒性且能提高巨噬细胞的增殖能力 (表 2)。

表 2 芪麝丸对巨噬细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞活力/%
对照	-	100 ± 0.04
芪麝丸	250	92.21 ± 0.00
	500	117.37 ± 0.01 ²⁾
	1 000	142.06 ± 0.05 ¹⁾

3.3 芪麝丸对 iNOS, COX-2 蛋白及 MAPK 信号通路的影响 如图 1 和表 3 所示, 静息态巨噬细胞 iNOS 和 COX-2 蛋白表达近不可测得, 经诱导物刺激后, iNOS 和 COX-2 蛋白表达至 (1.00 ± 0.06) 和 (0.56 ± 0.03) (P < 0.01)。芪麝丸 2 个剂量干预后, iNOS 蛋白下调至 (0.61 ± 0.07) 和 (0.02 ± 0.15) (P < 0.01), COX-2 蛋白下调至 (0.42 ± 0.02) 和 (0.30 ± 0.03) (P < 0.01)。



C. 空白对照组; M. 模型组; 500. 芪麝丸 500 mg·L⁻¹ 处理组; 1 000. 芪麝丸剂量 1 000 mg·L⁻¹ 处理组 (图 2 同)

图 1 芪麝丸对 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响

表 3 芪麝丸对 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	与内参表达的相对值/%	
		iNOS	COX-2
对照组	-	0.10 ± 0.05	0.00 ± 0.04
模型组	-	1.00 ± 0.06 ¹⁾	0.56 ± 0.03 ¹⁾
芪麝丸	500	0.61 ± 0.07 ³⁾	0.42 ± 0.02 ³⁾
	1 000	0.02 ± 0.15 ³⁾	0.30 ± 0.03 ³⁾

如图 2 和表 4 所示, MAPK 通路关键蛋白 ERK, p38, JNK 经诱导后的磷酸化水平提高至 (1.04 ± 0.04), (0.51 ± 0.06) 和 (1.05 ± 0.03) (P < 0.05, P < 0.01)。芪麝丸 2 个剂量处理后, 较模型组 ERK 磷酸化水平下调至 (0.79 ± 0.06) 和 (0.73 ± 0.10) (P < 0.01)。p38 磷酸化水平下调至 (0.39 ± 0.07) 和 (0.29 ± 0.15) (P < 0.05), p-JNK 下调至 (0.65 ± 0.02) 和 (0.66 ± 0.03) (P < 0.01)。

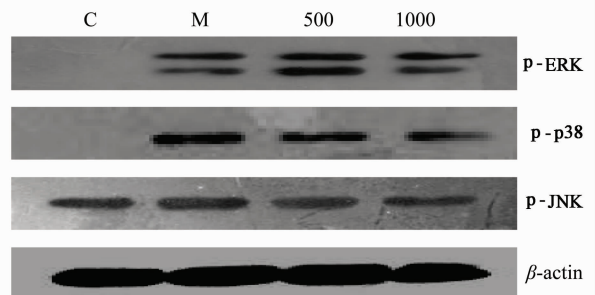


图 2 芪麝丸对 p-ERK, p-p38, p-JNK 蛋白磷酸化水平的影响

表4 芪麝丸对 p-ERK, p-p38, p-JNK 蛋白磷酸化水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	蛋白表达相对值/%		
		p-ERK	p-p38	p-JNK
对照	-	0.40 ± 0.03	0.06 ± 0.05	0.91 ± 0.04
模型	-	1.04 ± 0.04 ²⁾	0.51 ± 0.06 ¹⁾	1.05 ± 0.03 ¹⁾
芪麝丸	500	0.79 ± 0.06 ³⁾	0.39 ± 0.07 ⁴⁾	0.65 ± 0.02 ³⁾
	1 000	0.73 ± 0.10 ³⁾	0.29 ± 0.15 ⁴⁾	0.66 ± 0.03 ³⁾

4 讨论

临床数据表明颈椎病患者突出椎间盘周围组织内存在慢性炎症反应,炎症浸润细胞多为单核-巨噬细胞及淋巴细胞,在患者突出的颈椎间盘组织中NO和前列腺素(PGE₂)显著增高^[5]。炎症,或通过炎症组织的直接压迫,或通过炎症介质分泌刺激髓核物质而间接诱发髓核的免疫反应,已被认为与颈、腰痛的产生密切相关^[6-7]。

巨噬细胞作为人体主要的免疫应答细胞,是炎症递质分泌的主要来源。MAPK信号转导通路包括细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38/MAPK)3条通路,参与细胞增殖、分化和炎症、疼痛等多种生理病理过程^[9]。炎症中MAPK信号转导通路激活使iNOS和COX-2表达上调,产生大量的NO和PGE₂,NO已被证实参与颈椎间盘退变的病理过程^[8]。芪麝丸能抑制iNOS蛋白表达,呈剂量依赖性抑制NO稳定产物亚硝酸盐含量,对COX-2蛋白表达也具抑制作用。同时下调ERK, p38, JNK的磷酸化水平。

综上所述,芪麝丸通过抑制MAPK信号通路中关键蛋白磷酸化而阻止其活化,抑制其下游iNOS

和COX-2的蛋白表达,进而控制NO产量,部分阐明了芪麝丸抗炎的作用机制。

[参考文献]

- [1] Roberts S, Butler R C. Inflammatory mediators as potential therapeutic targets in the spine [J]. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005, 4(2):257.
- [2] Podichetty V K. The aging spine; the role of inflammatory mediators in intervertebral disc degeneration [J]. *Cell Mol Biol*, 2007, 53(5):4.
- [3] 施杞, 彭宝淦. 人工麝香对退变颈椎间盘炎症抑制作用的实验研究 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 1997, 5(3):1.
- [4] Liang Q Q, Zhang M, Zhou Q, et al. Muscone protects vertebral end-plate degeneration by antiinflammatory property [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468(6):1600.
- [5] 王少波, 王圣林, 钟延丰, 等. 颈椎病患者突出椎间盘周围的炎症反应及临床意义 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2005, 15(6):345.
- [6] Kang J D, Georgescu H I, McIntyre L A, et al. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinase, nitric oxide, interleukin-6 and prostaglandin E₂ [J]. *Spine*, 1995, 20(22):2373.
- [7] Murrel G A, Dolan M M, Jang D, et al. Nitric oxide: an important articular free radical [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1996, 78(2):265.
- [8] Olmarker K, Blomquist J, Stromberg J, et al. Inflammatory properties of nucleus pulposus [J]. *Spine*, 1995, 20(6):665.
- [9] Studer R K, Gilbertson L G, Georgescu H, et al. p38 MAPK inhibition modulates rabbit nucleus pulposus cell response to IL-1 [J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(7):991.

[责任编辑 聂淑琴]