

# 培养雪莲总黄酮对巨噬细胞炎性介质一氧化氮和前列腺素 E<sub>2</sub> 的影响

杨伟鹏, 王怡薇, 王彦礼, 李涛, 周钟鸣\*  
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究培养雪莲总黄酮对炎性介质一氧化氮(NO), 前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 分泌以及一氧化氮合酶(iNOS), 环氧酶-2(COX-2) mRNA 表达的影响, 探讨其抗炎机制。方法: 用 Griess 法测定培养雪莲总黄酮对 Raw264.7 细胞 NO 的影响, 放射免疫法测定培养雪莲总黄酮对 Raw264.7 细胞 PGE<sub>2</sub> 含量; 逆转录聚合酶链式反应方法检测 Raw264.7 细胞 iNOS, COX-2 mRNA 表达情况。结果: 培养雪莲总黄酮可明显降低 Raw264.7 细胞上清中 NO, PGE<sub>2</sub> 含量, 同时, 降低 iNOS, COX-2 mRNA 表达。结论: 培养雪莲总黄酮的抗炎作用与抑制炎性介质 NO, PGE<sub>2</sub> 分泌有关, 抑制 iNOS, COX-2 mRNA 表达从而降低炎性介质 NO, PGE<sub>2</sub> 分泌可能是培养雪莲总黄酮的抗炎作用的机制之一。

[关键词] 雪莲总黄酮; 一氧化氮; 前列腺素 E<sub>2</sub>; 一氧化氮合酶; 环氧酶-2

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)18-0157-03

雪莲中黄酮类化合物和多糖等有明显的活性和治疗作用<sup>[1]</sup>, 而培养雪莲总黄酮的抗炎作用与野生雪莲提取物的抗炎作用没有显著性差异<sup>[2]</sup>, 野生雪莲及培养雪莲总黄酮对致炎大鼠血清中 IL-1, NO, PGE<sub>2</sub> 均有明显的抑制作用<sup>[3]</sup>, 且培养雪莲总黄酮对巨噬细胞 TNF- $\alpha$ , IL-6 有抑制作用<sup>[4]</sup>; 为深入探讨培养雪莲总黄酮的抗炎作用机制, 我们拟从与炎症发生密切相关的炎性介质 NO, PGE<sub>2</sub> 以及 iNOS, COX-2 mRNA 表达的影响进行研究。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** Raw264.7 细胞, 购自中国医学科学院细胞库。培养雪莲总黄酮(水母雪莲红色系固体培养细胞)的碱洗部分(纯度 82%, 中国科学院植物所赵德修研究员提供); 胰酶(Sigma); RPMI 1640(Gibco); 胎牛血清(Hyclon); PGE<sub>2</sub> 放免试剂盒, 中国人民解放军总医院科技开发中心; Trizol(Gibco), iNOS, COX-2 引物序列购自北京中山生物公司;

DEPC 水, 随机引物, dNTPs (20 mmol·L<sup>-1</sup>), 5 × Buffer, MMLV, 10 × Buffer, Taq 酶, 琼脂糖, DNA Marker 均购自北京夏斯生物技术公司; 数码凝胶成像分析系统(Kodak EDAS290), 紫外分析仪(Beckman DU640)。

## 1.2 方 法

**1.2.1 MTT 法测定培养雪莲总黄酮对 Raw264.7 细胞毒性的影响** Raw264.7 细胞传代培养, 用 5% 胰酶消化 5 min, 调整细胞相对密度为 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL, 向 96 孔板中加雪莲总黄酮, 质量浓度依次为 4.166 7, 2.083, 1.041 7, 0.520 8, 0.260 4, 0.130 2, 0.065 1, 0.032 5, 0.016 27, 0.008 138, 0 g·L<sup>-1</sup> 各 3 孔, 200  $\mu$ L/孔, 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h, 加 5  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> MTT 20  $\mu$ L/孔, 酶标仪检测。

**1.2.2 Griess 法测定 Raw264.7 细胞上清液中 NO 含量** 将 Raw264.7 细胞传代培养, 用 RPMI 1640 培养基调整细胞相对密度为 1.2 × 10<sup>6</sup> 个/mL。将细胞接种于 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 在 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 后, 向培养板中加入培养雪莲总黄酮(45, 22.5, 11.2, 5.6, 2.8  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>), 再加入 LPS(质量浓度 5  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>), 在培养箱中 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h。

**Griess 试剂配制:** 准确称取磺胺 1.0 g, N1-苯乙二胺盐酸盐 0.1 g 加适量双蒸水溶解, 再取 2.94 mL 磷酸(85%)加入溶液中, 用双蒸水定容至 100 mL, 置于棕色瓶中, 4  $^{\circ}$ C 贮存备用。NaNO<sub>2</sub> 标准液制备:

[收稿日期] 2010-09-27

[基金项目] 国家中医药管理局科技专项(06-07EP47); 国家自然科学基金项目(30171202)

[第一作者] 杨伟鹏, 副研究员, 博士, 研究方向: 中药复方的物质基础、作用机制及药代动力学, Tel: 010-64046469, E-mail: hrbywp@sina.com

[通讯作者] \* 周钟鸣, 研究员, 研究方向: 中药药理学及药代动力学, Tel: 010-64046469, E-mail: bjzhouzm@163.com

称取 6.9 mg NaNO<sub>2</sub> 加入 100 mL 双蒸水溶解, 配成 1 mmol·L<sup>-1</sup>, 分别稀释成 100, 80, 60, 40, 20, 0 μmol·L<sup>-1</sup>, 取 96 孔板, 标准曲线和样品不同浓度各 3 孔, 每孔 100 μL, 再加入 Griess 试剂 100 μL, 混匀, 室温放置 10 min, 在酶标仪上 620 nm 参考波长, 570 nm 测定波长, 测定 A

**1.2.3 放免法测定培养雪莲总黄酮对 Raw264.7 细胞分泌 PGE<sub>2</sub> 含量** 细胞传代培养同 1.2.2, 收集上述各组细胞的培养上清液, 测定严格按 PGE<sub>2</sub> 试剂盒说明书方法进行。

**1.2.4 RT-PCR 测定培养雪莲总黄酮对 iNOS, COX-2 mRNA 表达的影响**

**1.2.4.1 提取细胞的总 RNA** 细胞培养同 1.2.2, 设空白组、DMSO 对照组、LPS 模型组、LPS + 雪莲细胞培养物总黄酮 (45, 22.5, 4.5, 2.25, 0.45, 0.045 μg·mL<sup>-1</sup>) 组。每组分别取 Raw264.7 细胞 2 × 10<sup>6</sup> 个, 加入 1 mL Trizol 试剂, 室温放置 5 min; 将裂解液转移至 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入 0.2 mL 氯仿, 振摇 15 s, 室温放置 2 ~ 3 min, 4 12 000 ×g 离心 15 min; 小心吸取上层水相移至另一无 RNA 酶的 Eppendorf 管中, 加 0.5 mL 异丙醇, 振荡 15 ~ 20 s, 室温放置 10 min, 4 12 000 ×g 离心 10 min; 弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇 (用去 DEPC 水配制), 充分混匀, 洗涤沉淀, 4 7 500 ×g 离心 5 min; 弃乙醇, 置超净台中吹干, 用 25 μL 去 DEPC 水溶解 RNA, -20 保存待用, 稀释 RNA (4.5 μL 至 450 μL), 用紫外分析仪测定 RNA 含量。

$$\text{RNA} (\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}) = A_{260} \times 40 \times \text{核酸稀释倍数} / 1000$$

**1.2.4.2 逆转录合成 cDNA** 配制逆转录反应体系, 反应体系中包括: 4 μg 模板 RNA 溶液 (3 ~ 5 μL)、1 μL 随机引物、1 μL dNTPs (20 mmol·L<sup>-1</sup>), ddH<sub>2</sub>O (3 ~ 5 μL, 现算) 70 5 min, 4 5 min, 4 μL 5 × Buffer, 2 μL ddH<sub>2</sub>O, 轻弹管壁混匀, 37 2 min, 再加入 1 μL MMLV, 37 60 min, 70 15 min, 4 。

**1.2.4.3 PCR 扩增** 在 PCR 管内配制 PCR 反应体系, 反应体系包括: 4 μL RT 产物, 14 μL ddH<sub>2</sub>O, 2.5 μL 10 × Buffer, 2 μL dNTPS (各 2.5 mmol·L<sup>-1</sup>), 0.5 μL Antisense Primer (25 pmol·L<sup>-1</sup>), 0.5 μL Sense Primer (25 pmol·L<sup>-1</sup>), 0.5 μL Taq 酶, 94 变性, 72 延伸, 其退火温度, 循环次数、引物序列见表 1。

**1.2.4.4 琼脂糖凝胶电泳** 将扩增后的 DNA 样品

与上样缓冲液混合后, 加入含 0.5 μg·mL<sup>-1</sup> 溴化乙的 2% 琼脂糖凝胶样品槽中, 同时加 DNA Marker, 浸没在电泳缓冲液中。80V 电泳 40 ~ 60 min, 用紫外凝胶成像系统照相。

表 1 各引物序列及 PCR 反应条件

引物	序列	长度 /bp	解链温度 /	循环数
GAPDH sense	5-CAGGGCCATCCACAGICTTC-3	358	59	30
anti-sense	5-CATCACCATCTCCAGGACCG-3			
iNOS sense	5-TCACTCGCACACACACAAT-3	499	59	30
anti-sense	5-TGIGTICGAGATIGTCTCA-3			
COX-2 sense	5-GAACCAGGTCCTCGCTT-3	244	58	30
anti-sense	5-CGAAGCCTCTCCAACC-3			

**1.3 统计学处理** 各组数据用 ̄x±s 表示, 采用单因素方差分析进行检验, 用 SPSS 11.5 for windows 统计软件处理。P < 0.05 有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 培养雪莲总黄酮对 Raw264.7 细胞毒性的影响** 培养雪莲总黄酮的 IC<sub>50</sub> = 0.899 9 g·L<sup>-1</sup> (图 1)。

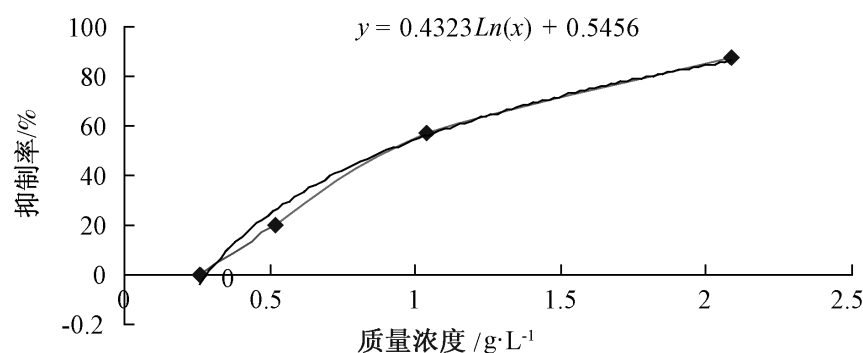


图 1 MTT 法测定培养雪莲总黄酮的 IC<sub>50</sub>

**2.2 培养雪莲总黄酮对 Raw264.7 细胞分泌 NO 含量的影响** 加入 LPS 5 μg·mL<sup>-1</sup> 后培养 24 h, 可明显诱导巨噬细胞产生 NO, 培养雪莲总黄酮 11.2 ~ 45 μg·mL<sup>-1</sup> 对细胞产生 NO 有明显抑制作用, P < 0.01 或 < P < 0.05, 见表 2。

表 2 培养雪莲总黄酮对 Raw264.7 细胞分泌 NO 含量的影响 (̄x±s, n = 3)

组别	给药剂量 / μg·mL <sup>-1</sup>	NO / μmol·L <sup>-1</sup>	抑制率 / %
正常	-	5.94 ± 0.33	-
LPS	5	11.46 ± 0.98	-
培养雪莲总黄酮	45	7.23 ± 0.59 <sup>1)</sup>	36.9
	22.5	7.99 ± 0.48 <sup>2)</sup>	30.3
	11.2	9.11 ± 0.77 <sup>2)</sup>	20.5
	5.6	11.58 ± 1.73	
	2.8	11.65 ± 0.59	

注: 与模型组相比<sup>1)</sup> P < 0.01, <sup>2)</sup> P < 0.05 (表 3 同)。

**2.3 培养雪莲总黄酮对 Raw264.7 细胞分泌 PGE<sub>2</sub> 含量的影响** LPS 刺激组 PGE<sub>2</sub> 含量显著高于对照, 各给药组同模型组相比, 均能降低炎症因子 PGE<sub>2</sub> 含量, 45, 22.5 μg·mL<sup>-1</sup> 组同模型组相比有显著性差异。见表 3。

表 3 培养雪莲总黄酮对 Raw264.7 细胞分泌 PGE<sub>2</sub> 含量的影响 (x̄±s, n=3)

组别	给药剂量 / μg·mL <sup>-1</sup>	PGE <sub>2</sub> / pg·mL <sup>-1</sup>	抑制率 / %
正常	-	1 328.05 ±386.46	-
LPS	5	2 535.17 ±167.08	-
培养雪莲总黄酮	45	2 001.0 ±130.52 <sup>2)</sup>	21.1
	22.5	1 700.23 ±291.20 <sup>2)</sup>	32.9
	11.2	1 789.3 ±473.54	29.4
	5.6	2 176.3 ±323.55	14.2
	2.8	2 186.8 ±325.36	13.8

**2.4 培养雪莲总黄酮对 Raw264.7 细胞 iNOS, COX-2 mRNA 表达的影响** LPS 刺激组明显增加 iNOS, COX-2 mRNA 的表达, 各给药组同模型组相比, 对 iNOS, COX-2 mRNA 表达有降低的趋势, 但无明显的量效关系。结果见图 2, 3。

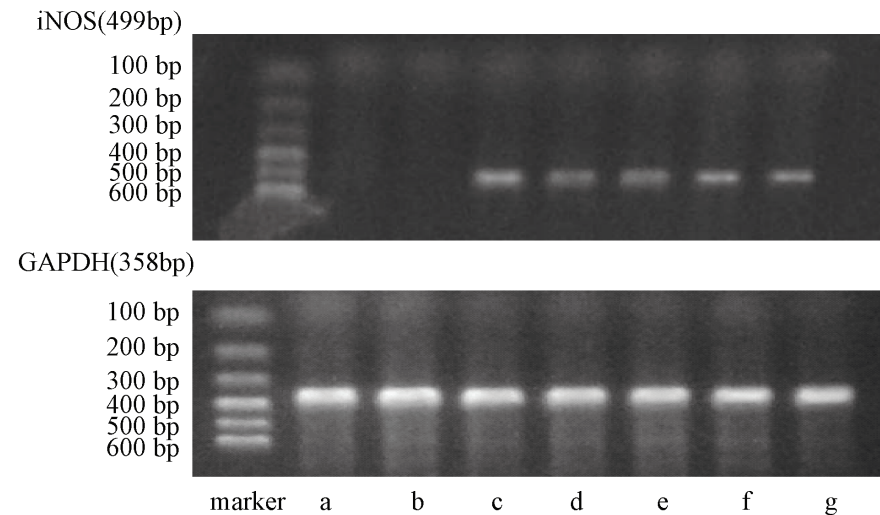


图 2 雪莲细胞培养物总黄酮对 Raw264.7 细胞 iNOSmRNA 表达的影响

a. 空白组; b. DMSO 对照组; c. LPS 刺激组; d. 雪莲总黄酮 45 μg·mL<sup>-1</sup>; e. 雪莲总黄酮 4.5 μg·mL<sup>-1</sup>; f. 雪莲总黄酮 0.45 μg·mL<sup>-1</sup>; g. 雪莲总黄酮 0.045 μg·mL<sup>-1</sup>

### 3 讨论

NO 是重要的炎症介质, 巨噬细胞 NO 的产生主要受到诱导型 iNOS 的调节, 一般地说, 组织中 iNOS 在炎症反应中被诱导产生, 生成大量 NO, 促进炎症反应, 诸如血管扩张充血、水肿、细胞毒性以及细胞

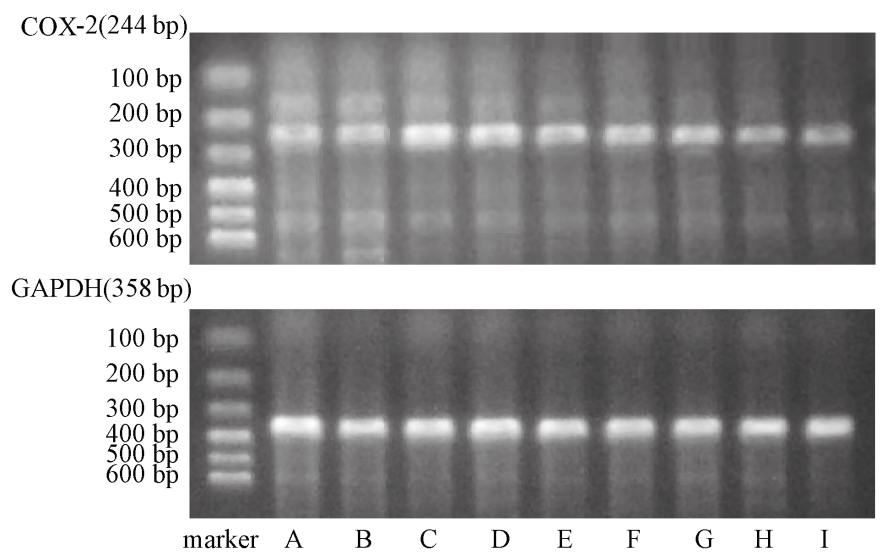


图 3 雪莲细胞培养物总黄酮对 Raw264.7 细胞 COX-2mRNA 表达的影响

A. 空白组; B. DMSO 对照组; C. LPS 刺激组; D. 45 μg·mL<sup>-1</sup>; E. 22.5 μg·mL<sup>-1</sup>; F. 4.5 μg·mL<sup>-1</sup>; G. 2.25 μg·mL<sup>-1</sup>; H. 0.45 μg·mL<sup>-1</sup>; I. 0.045 μg·mL<sup>-1</sup>

因子依赖过程的中介作用等。PGE<sub>2</sub> 是炎症反应中一类活性很强的炎症介质, 由环氧化酶催化花生四烯酸合成, 它参与炎症、癌变的发生, 生理状况下活性很低, 当受到某些因子刺激后, 在炎症细胞中高表达, 水平急剧增加, 进而引起炎症部位 PGE<sub>2</sub> 由等产物大量增加, 促进炎症反应及组织损伤。我们的实验结果表明, 在 LPS 刺激下, 巨噬细胞产生大量 NO 和 PGE<sub>2</sub>, iNOS 及 COX-2mRNA 表达增加, 培养雪莲总黄酮能显著抑制 NO 和 PGE<sub>2</sub> 的产生, 抑制 iNOS, COX-2mRNA 的表达, 我们推测, 其抗炎机制可能与抑制 iNOS, COX-2mRNA 表达, 进而抑制 NO 和 PGE<sub>2</sub> 分泌有关。

### [参考文献]

- [1] 李君山, 蔡少青. 雪莲花类药材的化学和药理研究进展[J]. 中国药学杂志, 1998; 33(8): 449.
- [2] 杨伟鹏, 周钟鸣, 熊玉兰, 等. 野生雪莲和培养雪莲总黄酮主要药效作用比较研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 1: 32.
- [3] 杨伟鹏, 林娜, 刘春芳, 等. 水母雪莲总黄酮和水母雪莲细胞培养物总黄酮对致炎大鼠血清中炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(6): 41.
- [4] 杨伟鹏, 周钟鸣, 王彦礼, 等. 培养雪莲总黄酮对体外培养巨噬细胞 TNF-、IL-6 的影响[J]. 中国中医药科技, 2005, 12(5): 329.

[责任编辑 何伟]