

不同基原秦皮、香豆素单体以及不同指纹区样品对内毒素刺激单核-巨噬细胞株分泌炎症因子的影响

杨庆¹, 翁小刚¹, 聂淑琴¹, 孙建辉¹, 刘丽梅^{2*}, 王瑞海², 陈琳²

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究 4 种秦皮提取物、5 种香豆素单体、5 种单体混合物、苦枥白蜡树已知香豆素指纹区样品和未知成分指纹区样品对内毒素(LPS) 刺激小鼠单核-巨噬细胞株 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的影响。方法: 以 LPS 10 mg·L⁻¹ 刺激 RAW264.7 细胞, 加入不同浓度的待测样品, 24h 后, 取培养液上清测定肿瘤坏死因子- (TNF-) 及白介素-1 (IL-1) 含量。结果: 4 种基原秦皮提取物能显著抑制由 LPS 诱导巨噬细胞分泌 TNF- ($P < 0.05$)。5 种香豆素单体均能显著抑制由 LPS 诱导巨噬细胞分泌 IL-1; 除秦皮苷外其余 4 种单体, 能显著抑制由 LPS 诱导巨噬细胞分泌 TNF-, 其中秦皮甲素、秦皮素具有量效关系。苦枥白蜡树提取物, 5 种香豆素单体混合物, 苦枥白蜡树已知香豆素指纹区样品和未知成分指纹区样品能显著抑制由 LPS 诱导巨噬细胞分泌 TNF- ($P < 0.05$), 5 种香豆素单体混合物能显著抑制 LPS 诱导巨噬细胞产生 IL-1, 其他样品的作用没有显著性。结论: 在该测试系统中 4 种基原秦皮中尖叶白蜡树抗炎活性最强, 其他 3 个品种抗炎活性相近, 抗炎作用与秦皮已知香豆素含量没有直接的量效关系, 说明秦皮除已知香豆素外, 未知成分对炎症因子也有一定抑制作用; 5 种香豆素单体中秦皮乙素, 6,7-二甲氧基-8-羟基香豆素抗炎活性最强。

[关键词] 秦皮; 香豆素单体; 指纹区样品; 巨噬细胞; 炎症因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0127-05

Effect of Ash Bark from Different Origins and Coumarin Monomer on Inflammation Factors Released from RAW 264.7 Cells Induced by Lipopolysaccharide

YANG Qing¹, WENG Xiao-gang¹, NIE Shu-qin¹, SUN Jian-hui¹, LIU Li-mei^{2*}, WANG Rui-hai², CHEN Lin²

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Basic Theory Research Institute of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-inflammatory effects for a number of samples on RAW264 cell. The samples include: four kinds of origins of ash bark extract, five kinds of coumarin monomer, five kinds of monomer mixture, known coumarin fingerprint region sample and unknown component fingerprint region from *Fraxinus rhynchophylla* Hance. **Method:** RAW264.7 cell line was treated by 10 mg·L⁻¹ lipopolysaccharide (LPS), 24 hours later, the supernatant was collected and the inflammatory factors such as TNF- and IL-1 were measured. **Result:** Four kinds of origins ash bark extract could significantly inhibited the LPS-induced macrophages to produce TNF- ($P < 0.05$). Five kinds of coumarin monomer could significantly inhibit the LPS-induced macrophages produced IL-1. Except fraxin four kinds of monomers could significantly inhibit the LPS-induced macrophages to

[收稿日期] 20100305(004)

[基金项目] 北京市自然科学基金项目(7063084)

[通讯作者] * 刘丽梅, Tel: 010-64014411-2592, E-mail: liulimeih@ sina.com

produce TNF- α , including aesculin and fraxetol with dose-effect relationship. Only five kinds of coumarin monomer mixtures could significantly inhibit the LPS-induced macrophages produced levels of IL-1 β . Other samples was not significant. **Conclusion:** *F. chinensis* Roxb. var. *acuminata* Lingelsh. shows most powerful anti-inflammatory activity among 4 kinds of origins ash bark extract. The other 3 kinds of Origins ash bark extract is similar for anti-inflammatory activity. Aesculetin and 6, 7-dichomethoxyl-8-hydroxycoumarin show most powerful anti-inflammatory activity in 5 kinds of coumarin monomer.

[Key words] ash bark; coumarin monomer; fingerprint region sample; macrophage; inflammation factors

2005 年版《中国药典》一部秦皮项下规定秦皮为木犀科植物苦枥白蜡树 *Fraxinus rhynchophylla* Hance, 白蜡树 *F. chinensis* Roxb., 尖叶白蜡树 *F. chinensis* Roxb. var. *acuminata* Lingelsh., 宿柱白蜡树 *F. stylosa* Lingelsh. 的干燥枝皮或干皮。具有清热燥湿, 收涩, 明目的功能。用于热痢、泄泻、赤白带下、目赤肿痛、目生翳膜。秦皮主要含有香豆素类成分秦皮甲素(aesculin)、秦皮乙素(aesculetin)、秦皮苷(fraxoside)、秦皮素(fraxetol)、6, 7-二甲基-8-羟基香豆素(6, 7-dichomethoxyl-8-hydroxycoumarin)^[1-2]; 现代药理研究表明秦皮有抗炎作用, 以往主要报道了秦皮乙素对大鼠蛋清性及右旋糖酐足肿这 2 种病理模型的作用较水杨酸钠强; 秦皮甲素能显著抑制组胺引起的毛细血管通透性增高、显著抑制角叉菜胶、右旋糖酐、5-羟色胺、甲醛及组织胺引起的足爪肿胀, 显著抑制棉球所致大鼠肉芽组织增生; 秦皮苷可抑制交叉菜胶、右旋糖酐、甲醛、组织胺所致足肿, 比秦皮甲素抑制作用更显著, 对抑制 5-羟色胺和缓激肽所致的足肿的作用弱于秦皮甲素; 秦皮乙素和秦皮甲素对紫外线照射豚鼠背部引起的红斑反应均有抑制作用, 前者比后者更强^[3], 而对秦皮素和 6, 7-二甲基-8-羟基香豆素的抗炎作用未见报道。该研究系统地考察了 4 种基原秦皮提取物、5 种香豆素单体、5 种单体混合物、苦枥白蜡树已知香豆素及未知成分指纹区样品, 对内毒素(LPS) 刺激小鼠单核-巨噬细胞株 RAW264.7 细胞的活性及炎症因子水平表达的影响, 旨在阐明不同基原秦皮、香豆素单体、已知成分及未知成分抗炎作用的差异, 为客观地评价秦皮质量, 指导临床用药提供科学依据。

1 材料

1.1 药物 4 种基原秦皮: 苦枥白蜡树、尖叶白蜡树、白蜡树、宿柱白蜡树树皮提取物; 5 种香豆素单体: 秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、6, 7-二甲基-8-羟基香豆素(均为自制, 纯度 >98%); 以苦枥

白蜡树为代表的秦皮提取物, 5 种香豆素单体混合物(按苦枥白蜡树提取物中各单体的含量: 秦皮甲素 2.08%、秦皮乙素 0.14%, 秦皮苷 0.84%, 秦皮素 0.37%, 6, 7-二甲基-8-羟基香豆素 0.03% 混合而成), 苦枥白蜡树已知香豆素指纹区样品, 未知成分指纹区样品, 上述样品以 DMSO 溶解, 实验前配制。

1.2 试剂 RPMI-1640 GIBCOBRL lot 1285082, MTT Sigma M2128, 由北京思语医药有限公司提供, LPS Sigma L-2880, lot 56H4096。小鼠肿瘤坏死因子- α (Mouse TNF- α)、小鼠白细胞介素-1 (Mouse IL-1) ELISA Kit 法, R&D Systems 公司, 由北京吉泰科联生物科技发展中心提供。批号 0704164, 0704164。

1.3 细胞株 RAW264.7 小鼠单核-巨噬细胞株, 购自上海细胞生物研究所。

1.4 仪器 伯乐 680 型酶标仪(美国产); CO₂ 培养箱(SANYO MCO-20AIC, 日本产); 离子机(Anke TGL-16G, 上海安亭科学仪器厂); 倒置显微镜(XSED 型, 重庆光学仪器厂); 超净工作台(SW-CJ-2FD 型, 苏州空气净化设备有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养方法^[4] RAW264.7 细胞用含 10% 新生牛血清的 1640 完全培养基(NaHCO₃, 2 g, 100 U \cdot mL⁻¹青霉素, 100 mg \cdot L⁻¹链霉素)培养, 37 \pm 5% CO₂ 培养箱中培养至细胞覆盖率 80%~90% 以上时传代, 生长状态良好的细胞用于实验研究。

2.2 受试药物浓度 苦枥白蜡树, 尖叶白蜡树, 白蜡树, 宿柱白蜡树树皮提取物干膏粉; 5 种香豆素单体混合物, 苦枥白蜡树已知香豆素指纹区样品、未知成分指纹区样品终质量浓度按生药量计分别设为 2.5, 0.625, 0.156 g \cdot L⁻¹ 3 个浓度; 秦皮甲素, 秦皮乙素, 秦皮苷, 秦皮素, 6, 7-二甲基-8-羟基香豆素终质量浓度设 62.5, 15.625, 3.906 mg \cdot L⁻¹ 3 个浓度。

2.3 对正常 RAW264.7 细胞活性的影响 取生长

状态良好的 RAW264.7 细胞, 以无血清 1640 轻轻吹洗细胞, 收集细胞经 $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min 离心, 弃上清, 以无血清 1640 吹洗细胞 2~3 次, 加入 10% 新生牛血清 1640 完全培养基, 计数, 调整细胞密度为 $1.0 \times 10^6 / \text{mL}$, 轻轻吹匀, 接种于 96 孔板, 0.1 mL/孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱贴壁培养 2 h。弃上清, 以无血清 1640 洗去未贴壁细胞, 10 min 后加入样品, 受试样品设 3 个浓度, 另设溶剂对照组、培养基对照组, 每个浓度设 3 复孔, 加样完毕后, 继续培养 24 h, 以 MTT 法测定巨噬细胞活性。

2.4 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞分泌细胞因子的影响 方法同 2.2, 以无血清 1640 洗去未贴壁细胞后, 加入 LPS $200\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 50 μL /孔, 10 min 后加入样品, 另设 LPS + 溶剂对照组及溶剂对照组、培养基

对照组, 每个浓度设 3 复孔, 加样完毕后, 继续培养 24 h, 取上清液 3 份, 150 μL /份, 冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。用于测定 IL-1, TNF- α 。

2.5 统计方法 采用统计软件 SPSS 12.0, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析并进行多组间检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

抑制率 = [(LPS + 溶剂对照组细胞因子含量) - (LPS + 受试样品细胞因子含量)] / (LPS + 溶剂对照组细胞因子含量) $\times 100\%$ 。

3 结果

3.1 4 种基原秦皮提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的影响 苦枋白蜡树、尖叶白蜡树、白蜡树、宿柱白蜡树对 LPS 诱导巨噬细胞产生 TNF- α 有明显抑制作用 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 4 种基原秦皮提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	药物终质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-1 / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率 / %	TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率 / %
空白对照	-	15.17 \pm 4.20 ²⁾	-	52.96 \pm 9.06 ¹⁾	-
溶剂对照	-	15.81 \pm 2.36 ²⁾	-	53.82 \pm 6.17 ¹⁾	-
LPS + 溶剂对照	-	44.73 \pm 7.97	-	91.43 \pm 12.82	-
LPS + 苦枋白蜡树	0.156	43.84 \pm 18.91	1.99	77.98 \pm 5.84	14.71
	0.625	27.85 \pm 8.98	37.73	67.84 \pm 13.28	25.80
	2.50	33.33 \pm 18.01	25.49	57.47 \pm 1.38 ¹⁾	37.15
LPS + 尖叶白蜡树	0.156	28.90 \pm 10.29	35.39	58.83 \pm 15.61 ¹⁾	35.66
	0.625	33.41 \pm 14.90	25.31	63.86 \pm 6.84 ¹⁾	30.16
	2.50	31.41 \pm 14.29	29.77	64.45 \pm 4.23 ¹⁾	29.51
LPS + 白蜡树	0.156	32.79 \pm 18.14	26.70	62.31 \pm 14.31 ¹⁾	31.85
	0.625	39.50 \pm 5.58	11.69	68.95 \pm 3.87 ¹⁾	24.59
	2.50	31.90 \pm 10.55	28.69	83.45 \pm 8.89	8.73
LPS + 宿柱白蜡树	0.156	42.54 \pm 21.64	4.90	61.76 \pm 5.71 ¹⁾	32.46
	0.625	33.59 \pm 14.15	24.91	79.98 \pm 20.31	12.53
	2.50	30.41 \pm 16.68	32.01	65.03 \pm 12.93 ¹⁾	28.88

注: 与 LPS + 溶剂对照组比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; LPS 的质量浓度为 $10\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 2~3 同)。

3.2 5 种单体对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的影响 秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素、秦皮苷、6,7-二甲氧基-8-羟基-香豆素能显著抑制 LPS 诱导巨噬细胞产生 IL-1 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素、6,7-二甲氧基-8-羟基-香豆素能显著抑制由 LPS 诱导巨噬细胞产生 TNF- α ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 秦皮苷对 LPS 诱导巨噬细胞产

生 TNF- α 含量无明显抑制作用。结果见 2。

3.3 苦枋白蜡树提取物及不同提取部位对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的影响 按苦枋白蜡树所含 5 种香豆素类单体比例混合的混合物对 LPS 诱导巨噬细胞产生 IL-1 有明显抑制作用 ($P < 0.05$)。苦枋白蜡树树皮提取物、5 种香豆素类单体混合物、苦枋白蜡树已知香豆素指纹区部分, 未知成

表 2 5 种单体样品对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞分泌炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物	药物终质量浓度 /mg·L ⁻¹	IL-1 /ng·L ⁻¹	抑制率 /%	TNF- /ng·L ⁻¹	抑制率 /%
空白	-	12.09 ±6.68 ²⁾	-	51.52 ±12.42 ¹⁾	-
溶剂	-	15.40 ±1.09 ²⁾	-	52.83 ±10.52 ¹⁾	-
LPS + 溶剂对照	-	47.87 ±7.66	0	79.41 ±15.64	-
LPS + 秦皮甲素	3.906	38.60 ±3.98 ¹⁾	19.39	73.28 ±16.05	7.72
	15.625	30.40 ±16.52	36.52	69.16 ±24.96	12.92
	62.5	30.33 ±16.27	36.66	58.30 ±6.11 ¹⁾	26.60
LPS + 秦皮乙素	3.906	28.71 ±3.15 ²⁾	40.05	110.20 ±33.30	- 38.80
	15.625	22.52 ±7.05 ¹⁾	52.98	54.46 ±7.29 ¹⁾	31.42
	62.5	26.81 ±12.73	44.00	57.46 ±6.59 ¹⁾	27.65
LPS + 秦皮素	3.906	43.57 ±2.73	9.00	65.82 ±16.67	17.13
	15.625	30.42 ±7.95 ¹⁾	36.46	59.61 ±3.92 ²⁾	24.95
	62.5	26.20 ±13.21	45.30	61.71 ±6.70 ¹⁾	22.30
LPS + 秦皮苷	3.906	25.32 ±1.37 ²⁾	47.13	120.00 ±12.32	- 51.10
	15.625	36.94 ±1.56 ²⁾	22.85	73.34 ±13.08	7.66
	62.5	24.65 ±10.26 ¹⁾	48.52	78.88 ±19.89	0.678
LPS + 6,7-二 甲氧基-8-羟 基-香豆素	3.906	26.19 ±8.81 ¹⁾	45.30	59.23 ±1.41 ¹⁾	25.42
	15.625	28.77 ±9.92	39.92	50.93 ±8.67 ²⁾	35.87
	62.5	38.42 ±22.84	19.77	39.33 ±16.28 ¹⁾	50.48

表 3 苦枥白蜡树提取物、5 种单体混合物、已知香豆素指纹区样品和未知成分指纹样品
对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞分泌炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	生药终质量 浓度 /g·L ⁻¹	IL-1 /ng·L ⁻¹	抑制率 /%	TNF- /ng·L ⁻¹	抑制率 /%
空白对照	-	15.17 ±4.20 ¹⁾	-	52.96 ±9.06 ¹⁾	-
溶剂对照	-	15.81 ±2.36 ¹⁾	-	53.82 ±6.17 ¹⁾	-
LPS + 溶剂对照	-	44.73 ±7.97	-	91.43 ±12.82	-
LPS + 苦枥白蜡树	0.156	50.53 ±1.62	- 12.95	63.56 ±3.13 ¹⁾	30.43
	0.625	48.92 ±6.89	- 9.37	64.55 ±4.15 ¹⁾	29.40
	2.50	43.63 ±3.65	2.47	80.78 ±18.69	11.65
LPS + 5 种单体混合	0.156	33.65 ±6.73 ¹⁾	24.78	70.18 ±25.94	23.25
	0.625	30.3 ±2.12 ²⁾	32.21	60.94 ±12.40 ¹⁾	33.35
	2.50	34.26 ±6.46	23.40	79.99 ±29.22	12.52
LPS + 香豆素部分	0.156	39.06 ±5.23	12.68	66.89 ±12.29	26.85
	0.625	35.97 ±12.06	19.59	50.61 ±13.96 ¹⁾	44.65
	2.50	35.60 ±9.88	20.41	67.26 ±11.36 ¹⁾	26.44
LPS + 未知部分	0.156	35.38 ±6.78	20.90	63.51 ±8.47 ¹⁾	30.54
	0.625	34.59 ±2.92	22.67	89.28 ±14.16	2.35
	2.50	35.06 ±4.57	21.63	77.66 ±12.21	15.06

分指纹区部分对 LPS 诱导巨噬细胞产生 TNF- 有
明显抑制作用($P < 0.05$)。结果见表 3。

3.4 无明显细胞毒性的药物终质量浓度 4 种基
原秦皮、苦枥白蜡树已知香豆素指纹区样品,未知成

分指纹区样品在 2.5 g 生药/L 以下剂量、5 种香豆素单体在 4 g/L 以下质量浓度对 RAW264.7 细胞活性无明显影响,无细胞毒作用。

4 讨论

TNF- 主要由 LPS 激活的单核细胞、巨噬细胞分泌产生,属于炎症细胞因子。IL-1 主要是由单核-巨噬细胞产生,是全身性炎症反应综合征发生过程中的重要炎症介质之一^[5]。巨噬细胞分泌的细胞因子(TNF- , IL-1)在炎症反应过程中起到了关键性的作用^[6]。

4 种基原秦皮抗炎作用抑制 TNF- 的对比综合评价:尖叶白蜡树抗炎活性最强(平均抑制率 31.78%,下同),苦枥白蜡树(25.89%)、白蜡树(21.72%)、宿柱白蜡树(24.62%)抗炎活性相近,均弱于尖叶白蜡树。本研究对 4 种秦皮药材总香豆素含量进行了测定^[7],分别是苦枥白蜡树 2.9733%,尖叶白蜡树 3.1419%,白蜡树 2.4562%,宿柱白蜡树 5.0617%,可以看出抗炎作用与 4 种基原秦皮已知香豆素含量没有直接的量效关系,说明秦皮除已知香豆素外,未知成分对炎症因子有抑制作用。

5 种香豆素单体抗炎作用的对比:秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素、秦皮苷、6,7-二甲氧基-8-羟基香豆素均能显著抑制由 LPS 诱导巨噬细胞产生 IL-1 的水平。在作用强度上,如将每个药物各剂量组的抑制率相加,得出平均抑制率的数值大小顺序^[8],依次为:秦皮乙素(平均抑制率 45.68%,下同) > 秦皮苷(39.5%) > 6,7-二甲氧基-8-羟基香豆素(34.99%) > 秦皮甲素(30.86%) > 秦皮素(30.25)。秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素、6,7-二甲氧基-8-羟基香豆素能显著抑制由 LPS 诱导巨噬细胞产生 TNF- 的水平,在作用强度上,依次为:6,7-二甲氧基-8-羟基香豆素(37.26%) > 秦皮素(21.46%) > 秦皮乙素(19.69%) > 秦皮甲素(15.75%) > 秦皮苷(2.78%)。综合评价以秦皮乙素、6,7-二甲氧基-8-羟基香豆素抗炎活性最强。

秦皮提取物、单体混合物、已知成分与未知成分

指纹区抗炎作用的对比:对由 LPS 诱导巨噬细胞产生 TNF- 的水平作用:已知香豆素指纹区样品抗炎作用(抑制率 32.65%)大于苦枥白蜡树提取物抗炎作用(抑制率为 23.83%),表明已知香豆素指纹区部分是秦皮的主要活性部位,其原因可能为已知香豆素指纹区部分是药材提取物经 30% EtOH 洗脱而得,去掉了一部分杂质,其活性成分的含量比药材高。已知香豆素指纹区部分抗炎作用(抑制率 32.65%)大于 5 种香豆素单体的抗炎作用(抑制率 24.24%),表明在这个指纹区中,除已知 5 种香豆素以外,还有一些未知成分也有抗炎作用。未知成分指纹区部分小剂量抑制率具有显著性,但 3 个剂量没有量效关系。对 IL-1 水平的影响:5 种香豆素单体混合物能显著抑制由 LPS 诱导巨噬细胞产生 IL-1 的水平($P < 0.05$)。

[参考文献]

- [1] 刘丽梅,陈琳,王瑞海,等.秦皮化学成分的研究() [J] 中草药,2001,32(12):1073.
- [2] 刘丽梅,王瑞海,陈琳,等.秦皮化学成分的研究() [J] 中草药,2003,34(10):889.
- [3] 郑虎占.中药现代研究与应用[M].第四卷.北京:学苑出版社,1998:3571.
- [4] 赵保胜,霍海如,李兰芳,等.桂枝汤对小鼠巨噬细胞株分泌炎症因子的影响[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(10):23.
- [5] 张顺财.内毒素基础与临床[M].北京:北京科学出版社,2003.
- [6] 邱海波,周韶霞,陈德昌.白介素-1对肺泡巨噬细胞致炎效应的调节作用[J].中国危重病急救医学,2000,12(6):353.
- [7] 陈琳,刘丽梅,王瑞海.HPLC 法测定不同品种秦皮药材中香豆素类成分[J].中国中药杂志,2008,33(23):2858.
- [8] 姜廷良,霍海如,李兰芳,等.15 种中西药物含药血清对大鼠成骨细胞增殖成熟的影响[J].中国骨质疏松杂志,2002,8(4):342.

[责任编辑 聂淑琴]