

甘草总皂苷抗炎作用机制研究

李晓红, 齐云*, 蔡润兰, 刘彬, 宋杨, 谢忱
(中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 目的: 采用体外炎症模型研究甘草总皂苷抗炎作用机制。方法: 建立脂多糖(LPS)诱导巨噬细胞系 RAW264.7 细胞体外炎症模型, 检测不同浓度甘草总皂苷对炎症因子生成与释放及花生四烯酸代谢通路中与前列腺素 E₂(PGE₂) 生成有关的关键酶的影响。结果: 甘草总皂苷能显著降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞一氧化氮(NO)、白细胞介素-1(IL-1) 及肿瘤坏死因子-α(TNF-α) 的释放, 并通过抑制磷脂酶 A₂(PLA₂) 酶活性及环氧合酶-2(COX-2) 表达而降低 PGE₂ 的合成。结论: 甘草总皂苷抗炎作用与其减少巨噬细胞炎症介质生成与释放、抑制花生四烯酸代谢途径 PGE₂ 合成的关键酶密切相关。

[关键词] 甘草总皂苷; 一氧化氮; 肿瘤坏死因子-α; 白细胞介素-1; 前列腺素 E₂; 环氧合酶-2; 磷脂酶 A₂

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010) 05-0110-04

Studies on the Anti-inflammatory Mechanism of Total Saponins of Radix Glycyrrhiza in Vitro

LI Xiao-hong, QI Yun*, CAI Run-lan, LIU Bin, SONG Yang, XIE Chen
(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences /PUMC, Beijing 100094, China)

[Abstract] Objective: The inflammatory model in vitro was used to evaluate the anti-inflammatory

[收稿日期] 2009-09-27
[基金项目] 国家自然科学基金(30672659)及北京市自然科学基金资助项目(7042039)
[通讯作者] * 齐云, Tel: (010) 62829207; E-mail: yunqichai@sohu.com

而持久; PRD 可有效降低餐后血糖, 增强糖耐量; 降低糖化血清蛋白含量; 增高血清胰岛素含量, 提高胰岛素敏感性, 修复 T2DM 大鼠大血管内皮损伤(病理学实验结果将陆续报道)。

[参考文献]

[1] Kennedy DM, Johnson AB, Hill PG. A comparison of automated fructosamine and HbA1c methods for monitoring diabetes in pregnancy [J]. Ann Clin Biochem, 1998, 35(pt2): 283.

[2] Batg JD. Analysis of fatty acids as their anthry methyl esters by high performance liquids chrom atography with fluorescence defeetion[J]. J cheomatage, 1987, 395: 403.

[3] 肴绍琴, 邓君, 传良, 等. 探讨 2 型糖尿病患者血清 GSP 和 FFA 的变化及临床意义[J]. 四川医学, 2002,

23(9): 890.

[4] Zhang YF, Hong J, Zhan WW, et al. Hyperglycaemia after glucose loading is a major predictor of preclinical atherosclerosis in nondiabetic subjects [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2006, 64(2): 153.

[5] Temelkova-Kurktschiev TS, Koehler C, Henkel E, et al. Postchallenge plasma glucose and glycemic spikes are more strongly associated with atherosclerosis than fasting glucose or HbA1c level. Diabetes Care, 2000, 23: 1830.

[6] 庞宗然, 贾春华, 刘宝山. 菩人丹胶囊治疗 2 型糖尿病 38 例疗效观察[J]. 山东中医杂志, 2003, 22(3): 137.

[7] 贾春华, 赵和琮, 王海林, 等. 参葛仙丹治疗糖尿病合并冠心病的临床研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(6): 42.

mechanism of total saponins of Radix Glycyrrhiza. **Method:** RAW264.7 macrophage line in mice was induced by LPS to set up the inflammatory model. To detect the effect of total saponins of Radix Glycyrrhiza on the release of inflammation factors and the key enzymes for arachidonic acid (AA) metabolism in synthesizing PGE₂. **Result:** The total saponins of Radix Glycyrrhiza could significantly reduce the release of NO, IL-1 and TNF- α in LPS-induced RAW264.7 macrophage line, and obviously decrease the synthesis of PGE₂ by inhibiting PLA₂ activity and the expression of COX-2. **Conclusion:** The anti-inflammatory mechanism of total saponins of Radix Glycyrrhiza may be related to reducing the release of inflammation factors in macrophage cell and inhibiting the key enzymes for AA metabolism pathway in synthesizing PGE₂.

[Key words] total saponins of Radix Glycyrrhiza; NO; TNF- α ; IL-1; PGE₂; COX-2; PLA₂

甘草 (Radix Glycyrrhiza) 是豆科甘草属 (Glycyrrhiza) 植物的干燥根和根茎, 具有抗炎、抗溃疡、祛痰、抗过敏、抗肿瘤、调节免疫及抗氧化等多种药理活性, 是中医临床应用最广泛的中药。同属不同种多种甘草及甘草中单体成分如甘草酸、甘草次酸等抗炎作用明显^[1~2]。我们前期的研究也显示甘草总皂苷体内给药具显著的抗炎活性^[3], 但其抗炎机制未见报道。本文利用公认体外炎症模型对甘草总皂苷抗炎机制进行了初步的研究。

1 材料

1.1 实验动物与细胞株 Balb/c 小鼠, 体重 (18 ~ 20) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物合格证号 SCXK(京) 2005-0006。RAW264.7 细胞株由中国中医科学院中药研究所李兰芳老师惠赠, L929 细胞株由中国典型培养物保藏中心提供。

1.2 药品与试剂 甘草粗提物(甘草霜) 购自甘肃兰特植物化学有限公司(甘草酸含量为 23.1%), 将甘草霜上大孔树脂(AB-8), 吸附完成后以去离子水洗至 Molish 反应阴性, 以 70% 乙醇洗脱, 回收乙醇得甘草总皂苷(皂苷含量 69.74%)。脂多糖(LPS)、磷脂酶 A₂(PLA₂)、花生四烯酸(AA)、刀豆蛋白 A, Sigma 公司; 放线菌素 D, Amresco 公司; 前列腺素 E₂(PGE₂) 检测试剂盒, 苏州大学血栓与止血研究室; RPMI 1640 培养基, Gibco 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器 Multiskan Ascent 酶标仪, 美国 Thermo Electron 公司; 雷磁 PHS-3B 型精密 pH 计, 上海精密科学仪器有限公司; Napco 5410 型二氧化碳孵箱, 美国 NAPCO 公司; BCN-1360 型超净工作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; XDS-1B 倒置显微镜, 重庆光电仪器公司。

2 方法

2.1 甘草总皂苷对 RAW264.7 细胞的细胞毒作用

RAW264.7 细胞按 1×10^5 /孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 弃上清, 加入不同浓度的甘草总皂苷, 37[°], 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h, 每孔加入 MTT (5 g·L⁻¹, PBS 配制) 20 μ L, 继续孵育 4 h, 弃去上清, 每孔加入 100 μ L DMSO, 震荡 10 min, 于 540 nm 波长处测定吸光度。药物对细胞生长的抑制作用以死亡率%表示, 死亡率% = [1 - (药物反应孔吸光度 - 药物对照孔吸光度) / (空白反应孔吸光度 - 空白对照孔吸光度)] $\times 100\%$, 死亡率越高, 表明药物毒性越强。

2.2 甘草总皂苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO, PGE₂, TNF- α 和 IL-1 的影响

RAW264.7 细胞按 $1 \sim 2 \times 10^5$ /孔接种于 96 孔板中, 同时加入不同浓度的甘草总皂苷药液和终浓度为 10 mg·L⁻¹ 的 LPS, 培养箱中孵育 24 h, 收集上清, 按文献方法分别测定上清中 NO^[4], TNF- α ^[5] 及 IL-1^[6], 按 PGE₂ 检测试剂盒测定上清中 PGE₂ 含量。

2.3 甘草总皂苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 COX-2 表达及活性的影响

2.3.1 COX-2 表达测定^[7] RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中, 同时加入甘草总皂苷药液和 LPS 孵育 20 h, Hanks 液洗涤 3 次后, 加入底物 AA 温孵 20 min, 按 ELISA 试剂盒说明书测定上清中 PGE₂ 量。用 PGE₂ 生成量表示 COX-2 表达量。以给药组引起的 PGE₂ 生成减少百分率(抑制率)反映药物对 COX-2 表达的抑制作用。

2.3.2 COX-2 活性测定^[7] 实验基本与 COX-2 表达测定方法相同。甘草总皂苷于 LPS 刺激 20 h 后再加入并孵育 30 min, 最终以上清中 PGE₂ 含量判断药物对酶活性的作用。

2.4 甘草总皂苷对无细胞体系 PLA₂ 活性的影响

实验按照文献进行^[8]。以氯丙 为阳性对照药,甘草总皂苷对酶抑制率% = (ΔA_{对照} - ΔA_{甘草总皂苷}) / ΔA_{对照} ×100%。

2.5 统计方法 所有数据以 珠±s 表示,以 Student ' s-t 检验进行统计分析。

3 结果

3.1 甘草总皂苷对 RAW264. 7 细胞的细胞毒作用 MTT 结果表明,甘草总皂苷浓度低于 819. 2 mg·L⁻¹时,对细胞无明显毒性(本研究细胞试验甘草总皂苷浓度均在 500 mg·L⁻¹或以下进行)。当浓度高于1 000 mg·L⁻¹时,随浓度升高细胞死亡率明显增加(图 1)。

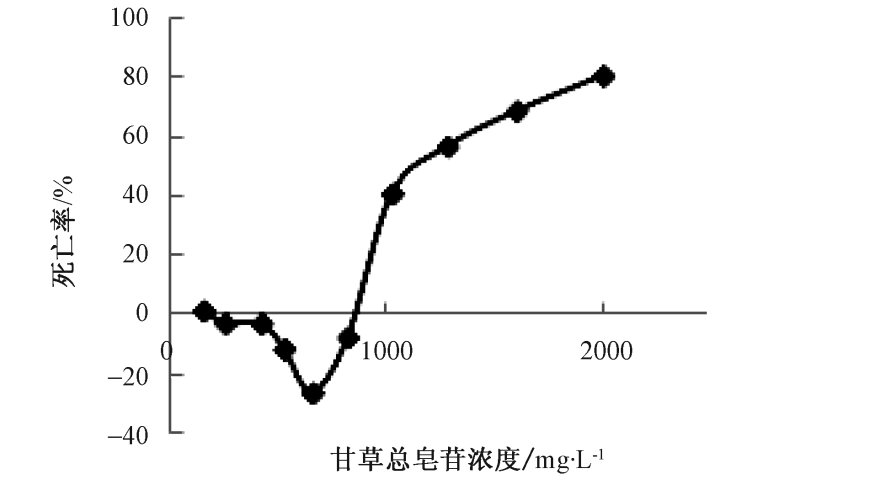


图 1 甘草总皂苷对 RAW 264. 7 细胞的细胞毒作用

表 1 甘草总皂苷对 LPS 诱导的 RAW 264. 7 细胞释放 NO, PGE₂, TNF- α 及 IL-1 的影响(珠±s, n = 3)

组别	药物浓度 / mg·L ⁻¹	NO	PGE ₂	TNF- α	IL-1
		NO/nmol·L ⁻¹ (抑制率 / %)	PGE ₂ /ng·L ⁻¹ (抑制率 / %)	A _{540 nm} (L929 细胞死亡率 / %)	A _{540 nm} (抑制率 / %)
对照	—	1153. 8 ±283. 1 ²⁾ (-)	258. 6 ±24. 6 ²⁾ (-)	0. 852 ±0. 019 ²⁾ (-)	0. 25 ±0. 01 ²⁾ (-)
LPS	10. 0	2403. 8 ±272. 0 (-)	428. 1 ±44. 7 (-)	0. 705 ±0. 002 (17. 33)	1. 69 ±0. 01 (-)
甘草总苷	31. 2	2307. 7 ±543. 9 (4. 0)	332. 2 ±30. 2 ¹⁾ (22. 4)	0. 714 ±0. 008 (16. 27)	1. 67 ±0. 02 (0. 93)
	62. 5	2211. 5 ±272. 0 (8. 0)	277. 7 ±10. 5 ²⁾ (35. 1)	0. 712 ±0. 050 (16. 51)	1. 50 ±0. 01 ²⁾ (11. 03)
	125. 0	2019. 2 ±136. 0 ¹⁾ (16. 0)	273. 7 ±21. 0 ²⁾ (36. 1)	0. 716 ±0. 009 (15. 97)	1. 37 ±0. 07 ²⁾ (18. 82)
	250. 0	1586. 5 ±68. 0 ²⁾ (34. 0)	262. 0 ±26. 2 ²⁾ (38. 8)	0. 738 ±0. 001 ²⁾ (13. 51)	1. 28 ±0. 04 ²⁾ (23. 98)
	500. 0	7. 3 ±1. 6 ²⁾ (99. 7)	159. 1 ±15. 1 ²⁾ (62. 8)	0. 830 ±0. 013 ²⁾ (2. 67)	1. 13 ±0. 05 ²⁾ (32. 74)

注:与 LPS 处理组相比¹⁾ P < 0. 05, ²⁾ P < 0. 01(下同)

3.2 甘草总皂苷对 LPS 诱导的 RAW264. 7 细胞释放 NO, PGE₂, TNF- α 及 IL-1 的影响 表 1 结果显示,在 10 mg·L⁻¹的 LPS 刺激下,RAW264. 7 细胞释放 NO, PGE₂, TNF- α 及 IL-1 的量增加,与对照组相比, P < 0. 01,表明 LPS 能明显诱导 RAW264. 7 细胞释放大量炎症介质。而甘草总皂苷可不同程度地抑制 NO, PGE₂, TNF- α 及 IL-1 的生成与释放,并呈良好的剂量依赖关系。

3.3 甘草总皂苷对 LPS 诱导的 RAW264. 7 细胞 COX-2 表达及活性的影响 与对照组相比, LPS 组 PGE₂ 生成显著增加,甘草总皂苷各浓度组对 PGE₂ 有不同程度抑制作用。结果显示,甘草总皂苷在 250. 0 mg·L⁻¹时即可显著抑制 COX-2 表达(P < 0. 01),而其剂量达到 500. 0 mg·L⁻¹时才显著抑制 COX-2 活性(P < 0. 05),且具量效关系,结果见表 2。

3.4 甘草总皂苷对 PLA₂ 活性抑制作用 图 2 结果显示,甘草总皂苷在 500 ~4 000 mg·L⁻¹可显著抑制 PLA₂ 活性,且具有量效关系,2 000 mg·L⁻¹甘草总皂苷抑制率与阳性药 500 μmol·L⁻¹氯丙 接近。

表 2 甘草总皂苷对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞
COX-2 表达及活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	药物浓度 /mg·L ⁻¹	COX-2 表达		COX-2 活性	
		PGE ₂ 产生量	抑制率	PGE ₂ 产生量	抑制率
		/ng·L ⁻¹	/%	/pg·L ⁻¹	/%
对照	—	90.8 ±15.8 ²⁾	—	231.5 ±16.4 ²⁾	—
LPS	10.0	388.3 ±53.8	—	308.9 ±15.7	—
甘草总苷	62.5	359.5 ±42.9	7.4	304.3 ±15.9	1.5
	125.0	297.6 ±36.8	23.3	298.6 ±30.7	3.3
	250.0	189.9 ±41.6 ²⁾	51.1	278.0 ±18.0	10.0
	500.0	151.7 ±11.1 ²⁾	60.9	247.3 ±20.4 ¹⁾	19.9

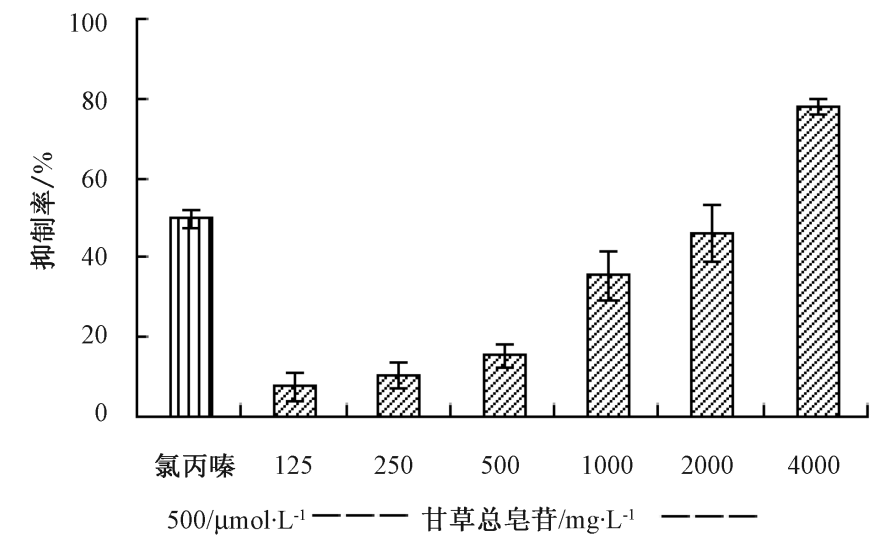


图 2 甘草总皂苷对 PLA₂ 活性的抑制作用

4 讨论

巨噬细胞是炎症过程的重要效应细胞,广泛参与机体的炎症反应,当受某些因素激活后会产生大量的 NO 和 TNF-α,并进一步诱导 IL-1 等炎症细胞因子的产生。脂多糖(LPS) 是介导系统性炎症反应综合症的主要启动因子,其主要通过促使巨噬细胞、内皮细胞、中性粒细胞等释放大量的细胞因子,使病变得以发展。本实验针对甘草总皂苷对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO, TNF-α 及 IL-1 等炎症因子的影响进行了研究,结果表明甘草总皂苷能显著抑制 NO, TNF-α 及 IL-1 的生成与释放。由此可以推测甘草总皂苷可能通过调节巨噬细胞产生 NO, TNF-α 及 IL-1 等炎症因子来发挥抗炎作用。

PGE₂ 是炎症的重要介质之一。研究表明,巨噬细胞在各种炎症刺激下会合成大量 PGE₂,另外炎症局部也具有高浓度的 PGE₂,与炎症引起的水肿、毛细血管通透性增加等密切相关。本文表明甘草总皂苷明显降低经 LPS 刺激的巨噬细胞合成 PGE₂ 的量,提示甘草总皂苷的抗炎机理至少部分是通过抑制 PGE₂ 产生的。PLA₂ 和环氧合酶(COX) 是前列腺素合成过程中的关键酶。PLA₂ 受内毒素等致病

因素刺激后被活化并表达,从而产生花生四烯酸, COX(尤其是 COX-2) 可将花生四烯酸代谢成各种前列腺素产物(特别是 PGE₂)。本文发现,甘草总皂苷可通过抑制 PLA₂ 活性和 COX-2 表达,从而减少 PGE₂ 合成,这可能是甘草总皂苷抗炎的另一主要作用机制。

有研究表明,皮下注射乌拉尔甘草^[1] 或黄甘草^[2] 水提物,对巴豆油引起的小鼠耳廓炎症,ip 冰醋酸引起小鼠腹腔渗出性炎症及棉球肉芽肿皆有明显的抑制作用,而对去肾上腺小鼠,甘草水提物失去抗炎作用^[11],说明甘草抗炎作用与垂体肾上腺皮质功能有关。但本研究却显示甘草总皂苷体外有直接的抗炎作用,并不依据于糖皮质激素,这一结果也与国外关于甘草甜素抗炎作用的研究报道^[9] 一致。本实验结果显示,甘草总皂苷具直接抗炎作用,其抗炎作用与减少巨噬细胞炎症介质生成与释放、抑制花生四烯酸代谢途径 PGE₂ 合成的关键酶密切相关。

[参考文献]

[1] 张宝恒,曾路. 乌拉尔甘草的抗炎症作用[J]. 中草药, 1991,22(10): 542.

[2] 张宝恒. 黄甘草的抗炎作用[J]. 中药药理与临床, 1991,7(特刊): 14.

[3] 刘彬,齐云,宋杨,等. 甘草皂苷与桔梗皂苷合用的时间协同研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(4): 28.

[4] Shin KM, Kim YH, Park WS, et al. Inhibition of methanol extract from the fruits of Kochia scoparia on lipopolysaccharide-induced nitric oxide, prostaglandin E₂, and tumor necrosis factor-α production from murine macrophage RAW264.7 cells [J]. Boil Pharm Bull, 2004, 27(4): 538.

[5] Shahan TA, Siegel PD, Sorenson WG, et al. A sensitive new bioassay for tumor necrosis factor[J]. J Immunol Methods, 1994, 175(2): 181.

[6] Vandenabeele P, Declercq W, Libert C, et al. Development of a simple, sensitive and specific bioassay for interleukin-1 based on the proliferation of RPMI 1788 cells. Comparison with other bioassays for IL-1 [J]. J Immunol Methods, 1990, 135(1-2): 25.

[7] 胡玉芳,程桂芳. 环氧酶选择性抑制剂筛选模型的建立[J]. 药学学报, 2000, 35(5): 343.

[8] 刘彬,齐云,王敏,等. 一种磷脂酶 A₂ 抑制剂体外筛选方法的建立[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(7): 890.

[9] Matsui S, Matsumoto H, Sonoda Y, et al. Glycyrrhizin and related compounds down-regulate production of inflammatory chemokines IL-8 and eotaxin 1 in a human lung fibroblast cell line [J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(13): 1633.