

豨莶草水洗脱部位对人肺纤维细胞的毒性与药效作用

樊青, 关建红*

(山西中医药大学, 山西 晋中 030619)

[摘要] 目的:检测不同浓度豨莶草水洗脱部位(SWEF)对MRC-5人肺纤维细胞的毒性作用及对MRC-5细胞 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7nAChR$)表达与炎症因子的影响,从而发现豨莶草毒效与药效作用物质基础。方法:以MRC-5细胞为研究对象,采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法结合流式细胞术、台盼蓝染色判定SWEF(1, 6, 10, 20, 50 $g \cdot L^{-1}$)对MRC-5细胞的毒效作用;通过测定沉默基因前后 $\alpha 7nAChR$ 的表达及炎症因子水平的变化探讨SWEF对MRC-5细胞的药效作用。结果:SWEF($\geq 6 g \cdot L^{-1}$)显著降低MRC-5细胞的存活率($P < 0.01$),促进MRC-5细胞凋亡与坏死($P < 0.01$),其半数抑制浓度(IC_{50})为6.03 $g \cdot L^{-1}$;MRC-5细胞 $\alpha 7nAChR$ 表达与炎症因子检测显示SWEF含有 $\alpha 7nAChR$ 激动剂样物质,该物质可增高 $\alpha 7nAChR$ 基因和蛋白的表达($P < 0.05, P < 0.01$),降低炎症因子水平($P < 0.05, P < 0.01$),SWEF下调炎症因子的作用可能与其上调 $\alpha 7nAChR$ mRNA表达有关,二者呈负相关($P < 0.01$)。结论:SWEF($\geq 6 g \cdot L^{-1}$)对MRC-5细胞具有显著的毒性作用,药效作用研究证实SWEF含有 $\alpha 7nAChR$ 激动剂样物质,该物质可增高 $\alpha 7nAChR$ 的表达,降低炎症因子水平,推测过量的 $\alpha 7nAChR$ 激动剂样物质可能为豨莶草的毒性成分之一。

[关键词] 豨莶草;水洗脱部位;MRC-5人肺纤维细胞; $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7nAChR$);炎症因子;细胞毒性;基因表达

[中图分类号] R22;R28;R445.2;C37 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)11-0076-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211192

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210329.1539.002.html>

[网络出版日期] 2021-3-30 14:08

Toxicity and Efficacy of Water-eluted Fraction from Siegesbeckiae Herba Against Human Embryonic Lung Fibroblasts

FAN Qing, GUAN Jian-hong*

(Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the toxicity of water-eluted fraction from Siegesbeckiae Herba (SWEF) at different concentrations against MRC-5 human embryonic lung fibroblasts and its impacts on the expression of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7nAChR$) and inflammatory factors, so as to figure out the active components responsible for toxicity and efficacy. **Method:** The toxicities of SWEF at 1, 6, 10, 20, and 50 $g \cdot L^{-1}$ against MRC-5 cells were determined by cell counting kit-8 (CCK-8) assay combined with flow cytometry and Trypan blue staining. The changes in $\alpha 7nAChR$ expression and inflammatory factor levels before and after $\alpha 7nAChR$ gene silencing were detected to reveal the pharmacodynamic effect of SWEF on MRC-5 cells. **Result:** SWEF ($\geq 6 g \cdot L^{-1}$) obviously inhibited the viability of MRC-5 cells ($P < 0.01$) and promoted their apoptosis and necrosis ($P < 0.01$), with the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) being 6.03 $g \cdot L^{-1}$. The determination of $\alpha 7nAChR$ expression and inflammatory factor levels in MRC-5 cells showed that SWEF contained $\alpha 7nAChR$ agonist-like substance, which enhanced $\alpha 7nAChR$ mRNA and protein expression ($P < 0.05$,

[收稿日期] 20210116(009)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673687);山西中医药大学创新团队项目(2019TD-005)

[第一作者] 樊青, 硕士, 从事中药毒理学研究, E-mail: 925557972@qq.com

[通信作者] *关建红, 教授, 从事中药毒理学研究, Tel: 0351-3179735, E-mail: gjh1688@sina.com

$P < 0.01$) and decreased the inflammatory factor levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$). SWEF down-regulated the inflammatory factors possibly by re-regulating $\alpha 7nAChR$ mRNA expression, exhibiting a negative correlation between them ($P < 0.01$). **Conclusion:** SWEF ($\geq 6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) is highly toxic to MRC-5 cells. Pharmacodynamic studies have confirmed that $\alpha 7nAChR$ agonist-like substance contained in SWEF was responsible for the elevated $\alpha 7nAChR$ expression and reduced inflammatory cytokines. It is inferred that excessive $\alpha 7nAChR$ agonist-like substance may trigger the toxicity of Siegesbeckiae Herba.

[Key words] Siegesbeckiae Herba; water-eluted fraction; human embryonic lung fibroblasts; $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7nAChR$); inflammatory factors; cytotoxicity; gene expression

菊科植物豨莶草为临床常用祛风湿中药,广泛生长于全国各地,2015年版《中华人民共和国药典》^[1]记载其无毒,但本课题组对豨莶草进行多年研究发现豨莶草为有毒中药^[2],且急性毒性实验重复性好,与相关研究报道一致^[3];亚急性毒性实验表明豨莶草所致的小鼠肺损伤呈可逆性改变^[4];对该药的毒性物质进行追踪研究证实豨莶草的毒性成分在水洗脱部位^[5],毒性反应与水煎剂一致^[6]。

豨莶草水煎剂对小鼠肺毒性研究表明,小鼠灌胃($3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)21 d后,呈现间质性肺炎的病理改变,停药2周后趋于恢复^[7];肺损伤时,致病因子激活多种炎症细胞,释放白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等一系列炎症因子,这些炎症因子可再度激活炎症细胞,释放更多的细胞因子,导致炎症反应的瀑布式级联反应^[8];而炎症因子水平与 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7nAChR$)的表达密切相关,当肺组织产生炎症时,迷走神经刺激巨噬细胞释放乙酰胆碱(Ach),增高 $\alpha 7nAChR$ 的表达,降低IL-6, TNF- α 等促炎因子的活性,炎症损伤减轻,反之亦然^[9];因此课题组推测豨莶草引起的可逆性肺损伤可能与 $\alpha 7nAChR$ 的表达及IL-6, TNF- α 等炎症因子水平有关,故本实验以MRC-5人肺纤维细胞为研究对象,应用分子生物学技术观测豨莶草水洗脱部位(SWEF)对MRC-5细胞的毒性作用及对 $\alpha 7nAChR$ 表达与炎症因子水平的影响,为系统研究豨莶草的毒性与药效成分打下基础,为豨莶草的合理应用提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞 MRC-5人肺纤维细胞(浙江杭州赫贝科技有限公司,批号CM-H015)。

1.2 药品 豨莶草饮片(国药集团山西有限公司,经安徽中医药大学周建理教授鉴定为菊科植物腺梗豨莶 *Siegesbeckia pubescens* 的干燥地上部分),按文献中相关提取工艺制备SWEF^[10],每1 g SWEF相当于生药26.95 g。

1.3 试剂 DMEM培养基,胎牛血清(FBS,美国Gibco公司,批号分别为C11875500BT,10099141);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒,凋亡试剂盒,台盼蓝试剂盒,内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗小鼠(Ig)G二抗(上海联科生物公司,批号分别为5366842, 70-CCK801, 70-T0021, ab5465100, GAM007);IL-6酶联免疫吸附测定试验(ELISA)试剂盒, TNF- α ELISA试剂盒(美国USCN公司,批号分别为SEA079Hu, SEA133Hu);高纯总RNA快速提取试剂盒(上海Generay公司,批号1703G01);逆转录试剂盒,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂(南京Vazyme公司,批号分别为7E092G6, 7E092H6);增强化学发光(ECL)Plus发光试剂盒,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液($5\times$),蛋白免疫印迹法(Western blot)及IP细胞裂解液,苯甲基磺酰氟(PMSF),聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒,脱脂奶粉(武汉赛维尔生物公司,批号分别为G2014, G2013, G2002, G2008, G2026, G5002); $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)(pH 8.8), $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH 6.8), Tris碱,十二烷基硫酸钠(SDS),过硫酸铵(AP)(武汉博士德生物公司,批号分别为AR1162, AR1163, T8060, AR0138, AR1166); $0.2 \mu\text{m}$ 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国密理博公司,批号ISEQ00010);30%亚甲基双丙烯酰胺溶液(Acr-Bis),甘氨酸(北京索莱宝科技公司,批号分别为AR1161, G8200); $\alpha 7nAChR$ 抗体(上海艾博抗公司,批号ab10096)。

1.4 仪器 3111型二氧化碳培养箱,微量加样器(美国Thermo公司);Spectra Plus 384型全波长酶标仪(美国MD公司);IX73型倒置显微镜(日本Olympus公司);80-2型台式低速离心机(上海医疗器械有限公司);细胞培养皿(美国Fisher Scientific公司);ACCURI C6型流式细胞仪(美国BD公司);

SMA4000型吸光度A测量仪器(北京Merinton公司);CFX connect型Real-time PCR仪,电泳系统,凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);QL-861型涡旋振荡仪(海门其林贝尔仪器制造公司);H1650R台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪公司);DYY-6C型电泳仪(北京六一仪器厂);Trans-Blot Turbo全能型蛋白转印系统;GelDoc型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及实验分组 取人肺纤维细胞株MRC-5置于细胞培养瓶中,加入DMEM培养液(含10%FBS,100 U·mL⁻¹青霉素),并放在37℃5%CO₂饱和湿度培养箱中培养,当细胞密度达80%时,弃培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后,用0.25%的胰酶消化液消化,加培养基吹打均匀,按适当比例进行传代,所有实验均采用第3~8代的细胞。

细胞毒性检测, α 7nAChR基因表达实验根据预实验结果分为空白组(CK组)和不同浓度药物组; α 7nAChR基因沉默实验分为CK组,阴性组(NC组),小干扰RNA(siRNA)组,CK+SWEF组,NC+SWEF组,siRNA+SWEF组。

2.2 细胞毒性检测 为明确不同浓度SWEF对MRC-5细胞的毒性作用,采用CCK-8法检测SWEF对MRC-5细胞存活率的影响,并计算半数抑制浓度(IC₅₀),通过流式细胞术与台盼蓝染色观测不同浓度药物作用下MRC-5细胞凋亡坏死率的变化。

2.2.1 CCK-8法检测SWEF对MRC-5细胞存活率的影响 取对数生长期的MRC-5细胞,用0.25%的胰酶消化液消化,离心收集细胞并制备细胞悬液,以每孔5×10³个细胞接种在96孔板中,常规培养24 h;待细胞贴壁后,每孔加入不同质量浓度(1,6,10,20,50 g·L⁻¹)SWEF的10倍工作液10 μL继续培养,另设空白孔,每孔设置5个复孔,实验重复3次;溶剂组的细胞接种和给药方式同上,只加入相应药物浓度下的溶剂;24 h后,各孔加入CCK-8检测液10 μL,37℃避光反应1.5 h,采用酶标仪测定450 nm波长下吸光度A,按照公式计算细胞存活率和IC₅₀,细胞存活率=(A_{实验组}/A_{不加药组})×100%,IC₅₀=Xm-I(ΣP-(3-Pm-Pn)/4)(Xm.最大剂量对数值;I.相邻两组高低剂量比值对数;ΣP.阳性反应率总和;Pm.最大阳性反应率;Pn.最小阳性反应率)。

2.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡与坏死 取处于对数生长期的MRC-5细胞株制备细胞悬液,以每孔2×10⁴个细胞铺于6孔板中;待细胞贴壁24 h后,加入含SWEF的培养基,质量浓度分别为1,6,10,20,

50 g·L⁻¹,作用24 h后终止;收集各培养皿细胞,预冷的PBS洗涤细胞2次,用500 μL Binding Buffer悬浮细胞,在细胞悬浮液中加入Annexin V-FITC 5 μL和PI 10 μL,轻轻混匀后于4℃避光条件下孵育5 min,用流式细胞仪检测各组细胞凋亡与坏死率。

2.2.3 台盼蓝染色观测细胞凋亡与坏死 将对数生长期的MRC-5细胞株以2×10⁴个/孔铺于6孔板中,细胞贴壁后,弃原培养基,加入新的含不同浓度(1,6,10,20,50 g·L⁻¹)SWEF培养基作用24 h,离心收集细胞(包括贴壁细胞和已漂浮的细胞),PBS(4℃提前预冷)洗涤细胞2次(1500 r·min⁻¹,离心时间5 min,离心半径6.5 cm),收集细胞,用500 μL PBS悬浮细胞,细胞悬液与0.4%台盼蓝溶液以9:1的比例混匀,染色3~5 min,吸取少量细胞染色液,显微镜下观察拍照。

2.3 SWEF对MRC-5细胞 α 7nAChR基因表达与炎症因子的影响

2.3.1 Real-time PCR法检测SWEF对MRC-5细胞 α 7nAChR mRNA表达的影响 取对数生长期的MRC-5细胞,以每孔2×10⁵个细胞铺于6孔板中,培养过夜,换以含1,6,10,20,50 g·L⁻¹SWEF的10倍工作液继续培养24 h;trizol-离心柱法提取细胞总RNA,变性凝胶电泳验证RNA的完整性,用去除基因组DNA的逆转录试剂盒将其反转录为cDNA(50℃15 min,85℃2 min)后完成PCR荧光定量(95℃30 s;95℃10 s,60℃30 s,40个循环)。以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参基因,根据2^{-ΔΔC_t}方法计算各组miRNA相对表达量。所用引物均由上海桑尼生物科技有限公司合成、纯化,引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 TGACGTGGACATCCGCAAAG	205
	下游 CTGGAAGGTGGACAGCGAGG	
α 7nAChR	上游 CGGCAAGAGGAGTGAAAGGT	104
	下游 GGTTGAGGCCATAGTAGAGCGT	
TNF- α	上游 CGAGTGACAAGCCTGTAGCC	171
	下游 TGAAGAGGACCTGGGAGTAGAT	
IL-6	上游 5'-GTCCAGTTGCTTCTCCC	171
	下游 5'-GCCTCTTGCTGCTTCA	

2.3.2 IL-6, TNF- α 含量检测 取处于对数生长期的MRC-5细胞株制备细胞悬液,以每孔2×10⁴个细胞铺于6孔板中;待细胞贴壁24 h后,加入含SWEF

的培养基,质量浓度分别为1,6,10,20,50 g·L⁻¹,作用24 h后终止;收集各组细胞培养液上清,按ELISA试剂盒检测步骤检测。

2.4 沉默α7nAChR及加入SWEF对MRC-5细胞α7nAChR mRNA,蛋白表达与炎症因子的影响

2.4.1 α7nAChR,IL-6,TNF-α mRNA检测 α7nAChR基因沉默(siRNA)实验采用安全药物浓度4 g·L⁻¹。预实验筛选出α7nAChR最佳siRNA,将对数生长期的MRC-5细胞株1 000 r·min⁻¹离心3 min(离心半径6 cm),每孔2×10⁵个细胞铺于6孔板中,转染后48 h加入4 g·L⁻¹ SWEF处理24 h,按trizol-离心柱法提取样本总RNA,进行RNA纯度的测定和RNA的定量,用去除基因组DNA的逆转录试剂盒将其反转录为cDNA(50 °C 15 min,85 °C 2 min)后完成PCR荧光定量(95 °C 30 s;95 °C 10 s,55 °C 30 s,45个循环)。所用引物序列设计见表1。

2.4.2 α7nAChR蛋白检测 细胞转染后48 h加入4 g·L⁻¹ SWEF,作用24 h后收集各组细胞,使用IP蛋白裂解液在冰上裂解30 min,离心(4 °C,12 000 r·min,离心半径8.5 cm)10 min后,收集上清液,BCA法测定蛋白浓度;每组用等量蛋白样品进行SDS-PAGE分离,电转法转移目的蛋白条带至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉室温封闭2 h,分别加入α7nAChR一抗(1:1 000),4 °C孵育过夜,洗涤后,加入二抗(1:1 000),37 °C孵育1 h,再次洗涤后使用ECL化学发光剂显色;最后,在凝胶成像仪上曝光显影,照片以TIFF格式导出。

2.5 统计学分析 本文所有试验均重复3次以上,计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,并予正态分布与方差齐性检验,采用独立样本T检验(Student's t test)进行两组间比较,采用双变量Pearson检验进行相关性分析,应用Graphpad Prism7.0软件进行统计分析及制图。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 SWEF对MRC-5细胞的毒性作用 CCK-8检测显示,SWEF可明显降低MRC-5细胞的存活率,药物质量浓度为6 g·L⁻¹时,细胞存活率约为70%,10 g·L⁻¹及以上浓度的细胞存活率低于10%,与空白组比较具有统计学意义($P<0.01$),其IC₅₀为6.03 g·L⁻¹,溶剂组无明显变化。见表2。

流式细胞术、台盼蓝染色结果表明,6 g·L⁻¹质量浓度作用下发生明显的细胞凋亡和坏死(凋亡率约13%,凋亡+坏死率约21%),10,20,50 g·L⁻¹质量浓度作用下,细胞凋亡和坏死比例超过80%,与

表2 不同质量浓度SWEF对MRC-5细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of different concentrations of water elution section of SWEF on survival rate of MRC-5 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$) %

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	药物处理组细胞存活率	溶剂组细胞存活率
CK		100.00±1.81	100.00±1.12
SWEF	1	98.23±1.28	104.74±3.42
	6	70.76±1.64 ²⁾	111.08±3.18
	10	8.02±0.89 ²⁾	108.29±4.33
	20	6.79±0.47 ²⁾	111.21±2.66
	50	6.51±1.82 ²⁾	106.33±0.51

注:与CK组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表3~6同)。

CCK-8检测结果一致($P<0.01$)。表明药物的安全质量浓度在6 g·L⁻¹之内。见表3,图1。

表3 不同质量浓度SWEF对MRC-5细胞凋亡与坏死率的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of different concentrations of SWEF on apoptosis and necrosis of MRC-5 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$) %

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	凋亡率	凋亡率+坏死率
CK		5.71±1.56	8.09±1.68
SWEF	1	5.70±1.26	9.36±1.17
	6	13.18±1.05 ²⁾	21.51±1.31 ²⁾
	10	34.11±0.99 ²⁾	83.20±2.06 ²⁾
	20	31.33±1.56 ²⁾	87.14±0.81 ²⁾
	50	29.61±1.50 ²⁾	87.71±1.27 ²⁾

3.2 SWEF对MRC-5细胞α7nAChR mRNA,IL-6,TNF-α的影响 PCR与ELISA检测结果显示,SWEF不同质量浓度(1,6,10,20,50 g·L⁻¹)组MRC-5细胞α7nAChR mRNA表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),而相应浓度下的溶剂组仅在50 g·L⁻¹浓度下(最高浓度)α7nAChR mRNA表达升高($P<0.01$)。见表4。

SWEF各剂量组可明显降低IL-6,TNF-α水平($P<0.05$, $P<0.01$)。见表5。表明SWEF下调炎症因子的作用可能与其上调α7nAChR mRNA表达有关,二者呈负相关($P<0.01$)。见图2,3。

3.3 α7nAChR基因沉默实验证实SWEF含有α7nAChR激动剂样物质 α7nAChR基因沉默(siRNA)实验采用安全药物质量浓度4 g·L⁻¹。沉默α7nAChR基因后,α7nAChR mRNA及蛋白表达明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),炎症因子水平无明显变化;加入SWEF后,α7nAChR mRNA及蛋白表达上升($P<0.05$, $P<0.01$),炎症因子水平明显下降

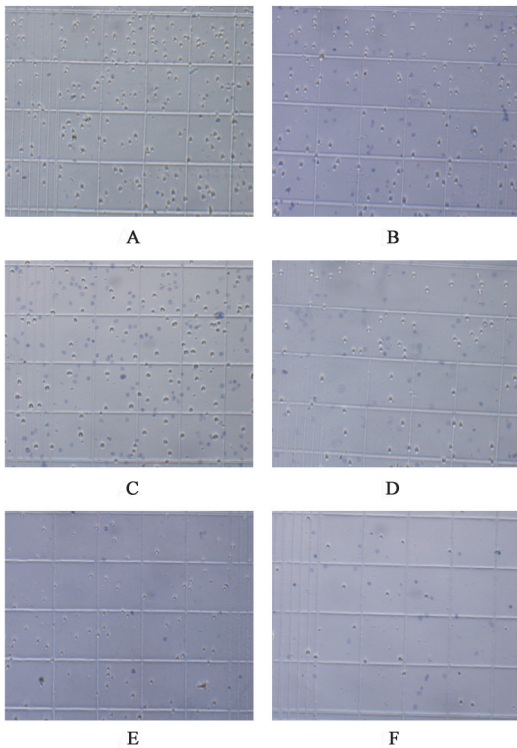


图1 SWEF对MRC-5细胞凋亡与坏死率的影响(台盼蓝染色, ×200)

Fig. 1 Effect of SWEF on apoptosis and necrosis rate of MRC-5 cells (Trypan Blue staining, ×200)

表4 SWEF对MRC-5细胞α7nAChR mRNA表达的影响(̄x±s, n=6)

Table 4 Effect of SWEF on expression of α7nAChR mRNA in MRC-5 cells (̄x±s, n=6)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	药物处理组	
		α7nAChR/β-actin	溶剂组 α7nAChR/β-actin
CK		0.03±0.01	0.29±0.01
SWEF	1	0.08±0.01 ¹⁾	0.65±0.04
	6	0.83±0.02 ²⁾	0.40±0.02
	10	20.51±1.54 ²⁾	0.58±0.06
	20	25.41±2.04 ²⁾	0.43±0.06
	50	6.20±0.61 ²⁾	2.09±0.05 ²⁾

($P<0.05$, $P<0.01$), 见表6, 图4。表明SWEF含有α7nAChR激动剂样物质, 该物质具有增高α7nAChR表达、降低炎症因子水平的作用。

4 讨论

长期研究表明,《中华人民共和国药典》中无毒的中药豨莶草实际为有毒中药,可造成小鼠肺脏的可逆性损伤^[7],通过查阅相关文献课题组推测豨莶草引起的可逆性肺损伤可能与α7nAChR的表达及

表5 SWEF对MRC-5细胞炎症因子水平的影响(̄x±s, n=6)

Table 5 Effect of SWEF on the level of inflammatory cytokines in MRC-5 cells (̄x±s, n=6)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	ng·L ⁻¹	
		IL-6	TNF-α
CK		1.92±0.22	86.67±8.29
SWEF	1	1.44±0.04 ¹⁾	60.40±9.81 ¹⁾
	6	0.64±0.11 ²⁾	36.86±3.58 ²⁾
	10	0.42±0.08 ²⁾	34.32±9.76 ²⁾
	20	0.49±0.06 ²⁾	35.21±7.05 ²⁾
	50	0.56±0.13 ²⁾	37.53±6.75 ²⁾

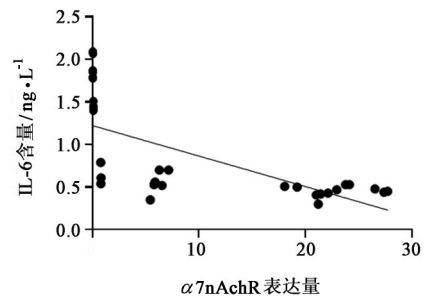


图2 MRC-5细胞α7nAChR mRNA表达量与致炎因子IL-6间的相关性

Fig. 2 Correlation between α7nAChR mRNA expression and proinflammatory factor IL-6 in MRC-5 cells

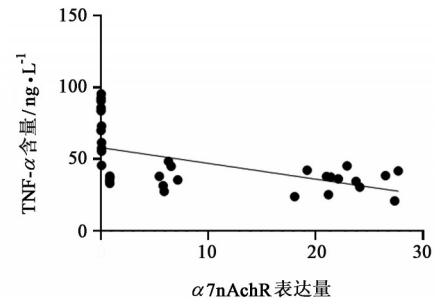


图3 MRC-5细胞α7nAChR mRNA表达量与致炎因子TNF-α间的相关性

Fig. 3 Correlation between α7nAChR mRNA expression and proinflammatory factor TNF-α in MRC-5 cells

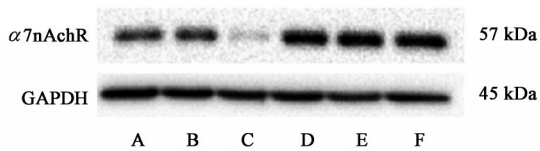
IL-6, TNF-α等炎症因子水平有关^[8-9],在此基础上课题组进行了体外细胞实验研究。α7nAChR是烟碱样乙酰胆碱受体家族的一员,早在1914年, Ewins首次在非神经细胞中发现了ACh^[11], α7nAChR激动剂是依据ACh化学结构设计开发的,与α7nAChR结合后可增强α7nAChR功能,降低炎症因子水平,故特异性α7nAChR激动剂的研发是治疗炎症的重要发展方向^[12],迄今为止尚未发现其他中药水煎剂或提取物中含有α7nAChR激动剂的报道。

体外细胞毒性实验结果表明, SWEF对MRC-5细胞具有明显的毒性作用; CCK-8检测显示, 6 g·L⁻¹浓度时细胞存活率约为70%, 10 g·L⁻¹及以上的细胞

表6 沉默 $\alpha 7nAChR$ 基因及加入 $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SWEF对MRC-5细胞 $\alpha 7nAChR$, IL-6, TNF- α mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effects of silencing $\alpha 7nAChR$ gene and adding $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SWEF on the expression of $\alpha 7nAChR$, IL-6 and TNF- α mRNA in MRC-5 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$\alpha 7nAChR/\beta\text{-actin}$	IL-6/ $\beta\text{-actin}$	TNF- $\alpha/\beta\text{-actin}$
CK		0.50±0.21	1.13±0.23	1.08±0.22
NC		0.46±0.04	1.08±0.32	1.12±0.15
siRNA		0.11±0.07 ¹⁾	1.22±0.10	1.03±0.23
CK+SWEF	4	1.05±0.46 ¹⁾	0.16±0.06 ²⁾	0.21±0.06 ²⁾
NC+SWEF	4	0.91±0.14 ²⁾	0.13±0.04 ²⁾	0.18±0.02 ²⁾
siRNA+SWEF	4	0.80±0.22 ¹⁾	0.54±0.12 ¹⁾	0.50±0.04 ¹⁾



A. CK组; B. NC组; C. siRNA组; D. CK+ $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SWEF组; E. NC+ $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SWEF组; F. siRNA+ $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SWEF组

图4 沉默 $\alpha 7nAChR$ 基因及加入 $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SWEF后MRC-5细胞 $\alpha 7nAChR$ 蛋白电泳

Fig. 4 Electrophoresis of silencing $\alpha 7nAChR$ gene and adding $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SWEF on expression of $\alpha 7nAChR$ protein

存活率低于10%,其 IC_{50} 为 $6.03\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,表明药物的安全剂量浓度在 $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之内,流式细胞术、台盼蓝染色显示与CCK-8检测结果一致。课题组前期反复对豨莶草的毒性物质进行追踪证实其毒性成分存在于水洗脱部位,SWEF灌胃给药后小鼠在10 min至3 h内死亡,并出现静止俯卧、颜面青紫、蜷缩、间歇性惊厥、震颤等表现^[13],这些反应与Ach在体内蓄积的烟碱样(N样)症状相似^[14],研究报道 $\alpha 7nAChR$ 激动剂具有Ach样作用^[15],MRC-5细胞基因沉默实验证实SWEF含有 $\alpha 7nAChR$ 激动剂样物质,故课题组推测过量的 $\alpha 7nAChR$ 激动剂样物质可能是豨莶草的毒性成分之一,有待进一步研究。

目前已开发出的 $\alpha 7nAChR$ 激动剂有GST-21, EVP-6124, TC-1698等化合物^[16],研究表明, $\alpha 7nAChR$ 激动剂具有拟胆碱作用,与 $\alpha 7nAChR$ 结合后可激活胆碱能抗炎通路(CAP),是机体调节炎症反应的一个重要的机制^[17]。文献报道, $\alpha 7nAChR$ 激动剂(PNU 282987)降低了中性粒细胞和支气管肺泡灌洗液中炎症因子水平^[18],改善了肺损伤小鼠的肺功能;同时,阻断 $\alpha 7nAChR$ 可使肺损伤加重,IL-6, TNF- α 水平升高^[19];WANG等^[20]研究表明, $\alpha 7nAChR$ 激动剂(GST-21)可通过减少肺巨噬细胞相关的促炎因子水平对肺损伤起保护作用。本研究通过 $\alpha 7nAChR$ 基因沉默实验表明,沉默

$\alpha 7nAChR$ 基因后, $\alpha 7nAChR$ mRNA及蛋白表达下降,加入SWEF后, $\alpha 7nAChR$ mRNA及蛋白表达上升,炎症因子水平下降,提示SWEF含有 $\alpha 7nAChR$ 激动剂样物质,该物质可增高 $\alpha 7nAChR$ 基因表达,降低炎症因子水平,呈显著的负相关性,与上述文献报道相一致,其作用是否与CAP有关,有待于进一步研究。

本实验得到以下结论,①SWEF($\geq 6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)对MRC-5细胞有显著的毒性作用;②SWEF含有 $\alpha 7nAChR$ 激动剂样物质,该物质在安全剂量范围内能使 $\alpha 7nAChR$ mRNA表达增高,致炎因子(IL-6, TNF- α)水平降低,这一发现对于治疗炎症因子增高的多种疾病[如新型冠状病毒肺炎(COVID-19), H9N2流感病毒,艾滋病毒(HIV)等造成的炎症风暴]具有广阔的应用前景,拓宽了豨莶草的药理作用;③结合之前进行的动物急性毒性实验结果课题组推测过量的 $\alpha 7nAChR$ 激动剂样物质可能是豨莶草的毒性成分之一^[13],其结论有待于进一步研究证实。课题组多年对豨莶草毒性成分追踪研究发现豨莶草成分复杂,毒性化合物提纯极为困难,目前课题组正与相关科研单位合作,寻找新的提纯方法提取毒性成分,若能破解SWEF的毒性化合物,可以控制其剂量,减小或消除豨莶草的毒性,为临床应用提供依据。

本研究尚未明确SWEF的抗炎机制,检测与CAP相关的主要通路因子(如核转录因子- κB , Janus活化激酶2等)是课题组下一步需研究的内容之一。总之,安全剂量的SWEF可以起到抑制肺组织炎症因子的作用,过量时会产生肺毒性作用,该发现对于更加全面的认识和安全使用豨莶草有重要的参考意义。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:368.
- [2] 关建红,薛征,任晋斌. 豨莶草水煎醇沉剂口服小鼠急性毒性[J]. 中国中药杂志,2005,30(21):72-73.
- [3] 高南南,杨润梅,潘瑞乐,等. 不同物种豨莶草急性毒性的比较[J]. 毒理学杂志,2008,22(5):405-406.
- [4] 关建红,薛征,任晋斌. 豨莶草水煎剂小鼠急性毒性及亚急性毒性的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(11):49-51.
- [5] 关建红,裴香萍,刘秉成. 豨莶草不同提取部位毒性比较研究[J]. 山西中医学院学报,2009,10(1):15-16.
- [6] 关建红,刘炳辰,裴香萍,等. 豨莶草活性炭洗脱水溶部位的急性毒性研究[J]. 山西中医学院学报,2012,13(1):13-14.
- [7] 关建红,薛征,刘炳辰,等. 豨莶草水煎粉剂对小鼠肺毒性研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(23):101-103.
- [8] 李玉梅,卫洪昌. ALI/ARDS抗炎治疗研究的策略与展望[J]. 中国病理生理杂志,2009,25(4):813-816,825.
- [9] 宁斌元,杨霞. 胆碱能抗炎通路在急性肺损伤中的作用研究进展[J]. 中国现代医学杂志,2020,30(7):69-71.
- [10] 李杰,樊青,关建红. 基于¹H-NMR代谢组学的豨莶草水洗脱部位致大鼠肺损伤作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(19):204-209.
- [11] TANESY E M. Henry dale and the discovery of acetylcholine[J]. C R Biol,2006,329(5/6):419-425
- [12] YOUNG J W, GEYER M A. Evaluating the role of the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in the pathophysiology and treatment of schizophrenia [J]. Biochem Pharmacol,2013,86(8):1122-1132.
- [13] 付帅,关建红. 豨莶草与苍耳子毒效实验研究[J]. 世界中西医结合杂志,2015,10(4):493-495,498.
- [14] 韩庆月,胡卓莹,刘高阳,等. 浅谈犬急性有机磷农药中毒[J]. 中国工作犬业,2018(7):24-26.
- [15] 尤启东,孙铁民,郭丽. 药物化学[M]. 8版. 北京:人民卫生出版社,2017:127-128.
- [16] XIE B X, ZHANG G S, ZHANG L R. Advances on α 7nAChR as targets for drug development [J]. Chin J Med Chem,2015,25(4):313-323.
- [17] 吴娟,金曼,黎笔熙. 胆碱能抗炎通路在炎症疾病中的应用研究进展[J]. 医学综述,2020,26(7):1343-1348.
- [18] PINHEIRO N M, SANTANA F P R, ALMEIDA R R, et al. Acute lung injury is reduced by the α 7nAChR agonist PNU-282987 through changes in the macrophage profile [J]. FASEB J, 2017, 31(1):320-332.
- [19] LI X, XU Y, CHENG Y, et al. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor contributes to the alleviation of lung ischemia reperfusion injury by transient receptor potential vanilloid type 1 stimulation [J]. J Surg Res, 2018,230(1):164-174.
- [20] WANG J, LI R, PENG Z, et al. GTS-21 Reduces inflammation in acute lung injury by regulating M1 polarization and function of alveolar macrophages [J]. Shock,2019,51(3):389-400.

[责任编辑 王鑫]