

◆ 中药民族药 ◆

岗松总黄酮对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症的影响^{*}邱宏聪^{1,2**}, 赖克道¹, 梁冰¹, 王丽¹, 黄艳^{1,2}, 刘布鸣^{1,2}

(1. 广西中医药研究院, 广西南宁 530022; 2. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022)

摘要:为探讨岗松总黄酮(GSH)的抗炎活性机制,通过NF- κ B信号通路,研究脂多糖(LPS)诱导RAW264.7细胞炎症的保护作用。实验采用噻唑蓝(MTT)法检测GSH对RAW264.7细胞增殖活性的影响,采用酶联免疫法(ELISA)检测GSH对白细胞介素(IL-1 β 、IL-8)及转化生长因子 β (TGF- β)的影响,采用蛋白印迹法(WB)检测细胞中I κ B α 蛋白相对表达,采用实时定量基因扩增荧光检测法(QPCR)检测细胞中NF- κ B p65的mRNA基因表达。研究表明,GSH处理细胞后,可促进RAW264.7细胞增殖($P < 0.05$),抑制IL-1 β 、IL-8、TGF- β 含量($P < 0.01$),上调I κ B α 蛋白的相对表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),抑制NF- κ B p65的mRNA基因表达($P < 0.01$)。推测岗松总黄酮抑制NF- κ B信号通路可能是其抗炎活性作用机制之一。

关键词:岗松总黄酮 脂多糖 RAW264.7 NF- κ B 抗炎

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2021)04-0396-06

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20211109.003

0 引言

免疫系统最重要的核转录因子(NF- κ B)广泛存在于多细胞有机体中,主要通过调控下游靶基因转录参与免疫炎症反应、细胞周期调控、细胞凋亡及细胞黏附等过程。NF- κ B信号通路的异常激活通常会介导多种慢性炎症的发生^[1,2],而通路相关蛋白的突变则会导致遗传性疾病的出现或免疫病变,因此开展NF- κ B信号通路的研究,在临床炎症的治疗中具有深刻的应用前景。

岗松富含槲皮素、杨梅素等黄酮组分^[3-7]。岗松总黄酮(GSH)为本课题组开发的专利产品^[8],对体外培养的宫颈癌SiHa细胞增殖、迁移、侵袭具有明显的抑制作用,并促进其凋亡^[9],且能显著抑制LPS诱导RAW264.7细胞中TNF- α 及IL-6含量,下调iNOS、COX-2蛋白表达^[10]。本研究将继续深入考察GSH对炎症因子IL-1 β 、IL-8、TGF- β ,以及NF- κ B信号通路中I κ B α 、NF- κ B p65表达的影响,探讨GSH抗炎活性可能的作用靶点。

收稿日期:2021-03-15

* 中国民族医药学会科研项目(2019KYXM-M246-46),广西自然科学基金项目(2014GXNSFBA118175)和广西中药质量标准研究重点实验室开放课题(桂中重开201303)资助。

【作者简介】

邱宏聪(1982-),男,主任药师,主要从事中药、民族医药研发,E-mail:qiu hongcong@163.com。

【**通信作者】

【引用本文】

邱宏聪,赖克道,梁冰,等.岗松总黄酮对脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症的影响[J].广西科学,2021,28(4):396-401.

QIU H C, LAI K D, LIANG B, et al. Effect of Total Flavonoids from *Baeckea frutescens* on LPS-induced RAW264.7 Cell Inflammation [J]. Guangxi Sciences, 2021, 28(4): 396-401.

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 细胞及培养

小鼠 RAW264.7 单核巨噬细胞(购自中国科学院细胞库), 接种于含 10% 胎牛血清、100 U · mL⁻¹ 青/链霉素的 dMEM 培养基中, 然后置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养。

1.1.2 药品与试剂

岗松药材采收于广西北海市, 经广西中医药研究院姜平川研究员鉴定为岗松(*Baeckea frutescens* L.) 的干燥茎叶。MTT (SIGMA), IL-1 β 、IL-8、TGF- β ELISA 试剂盒 (RB 公司), TRIZOL、TAQ、RNASE INHIB.、dNTP 试剂 (Life 公司), β -actin 抗体 (江苏康为世纪生物科技股份有限公司), RIPA 细胞裂解液 (Thermo 公司), PBS、蛋白酶抑制剂 (Solarbio 公司), 预染蛋白 marker (Formentas 公司); I κ B α 抗体 (CST 公司), 碱性磷酸酶标记的马抗小鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司), 碱性磷酸酶显色试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 超纯水; 其他试剂为分析纯。

1.1.3 仪器

酶标仪 (Thermo 公司), QPCR (ROCHE 公司), 离心机 (Eppendorf 公司), Fastprep 破碎仪 (Mpbio 公司), 电泳仪 (BIO-RAD 公司), 半干转膜仪 (BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 GSH 的制备^[11-12]

将岗松茎叶用 70% 乙醇(固液比 1 : 16) 进行 3 次提取, 每次提取时间为 60 min, 过滤合并滤液并浓缩, 使岗松提取药液的生药含量为 0.3 g · mL⁻¹。用 AB-8 型大孔吸附树脂填充柱子, 将岗松提取药液上柱(1 BV · h⁻¹ 流速、3 BV 体积), 用 50% 乙醇洗脱(2 BV · h⁻¹ 流速、5 BV 用量), 浓缩, 干燥, 即得岗松总黄酮(GSH)。将 GSH 用 DMSO 溶解, 配制成 50, 100, 200 μ g · mL⁻¹ 溶液, 备用于细胞试验。

1.2.2 细胞分组及处理

取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 经 0.25 g · L⁻¹ 胰蛋白酶 EDTA 消化细胞后, 调节细胞浓度至 1 × 10⁶ 个 · mL⁻¹, 并接种于细胞培养瓶中。设置实验组分别为空白对照组(以无血清 DMEM 孵育); LPS 模型组(加入 0.1 μ g · mL⁻¹ LPS 孵育 24 h); GSH 组(设置 GSH 含量为 50, 100, 200 μ g · mL⁻¹ 3

个剂量组, 即 GSH₅₀、GSH₁₀₀、GSH₂₀₀), 先 GSH 预处理细胞 2 h 后, 再加入 0.1 μ g · mL⁻¹ LPS 孵育 24 h, 待测。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖活性

分组处理后的细胞, 首先置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中继续培养 24 h, 弃上清液; 接着向每孔加入终质量浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的 MTT 溶液 100 μ L, 并将 96 孔板移至培养箱中继续孵育 4 h 后终止培养, 吸弃上清液; 然后, 每孔加入 200 μ L DMSO 溶液, 置摇床上 50 r/min 震荡 10 min; 最后, 于酶标仪上 490 nm 波长处测定各孔的吸光度。

1.2.4 ELISA 法测定细胞中 IL-1 β 、IL-8、TGF- β 含量

取预处理后的细胞上清液, 参照 ELISA 试剂盒说明书的要求操作, 测定 IL-1 β 、IL-8、TGF- β 的含量。

1.2.5 WB 法检测细胞中 I κ B α 蛋白的相对表达量

分组处理后的细胞用冰 PBS 洗涤, 加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂并收集细胞, 经超声破碎后离心处理 15 min (12 000 r · min⁻¹, 4℃), 取上清液待用。采用电泳分离, 每孔加 25 μ g 上清液进行上样, 分离后的蛋白转移到聚偏氟乙烯膜上, 脱脂牛奶封闭, 分别用一抗(I κ B α 、 β -actin) 孵育过夜, 洗膜后, 接着用二抗孵育, 再次洗膜, 显影。通过密度分析测定蛋白含量, 目的蛋白的相对含量 = 目的蛋白密度/ β -actin 的密度。

1.2.6 QPCR 检测细胞中 NF- κ B p65 的 mRNA 基因表达

分组处理后的细胞采用 Trizol 一步法抽提总 RNA, 经反转录合成 cDNA, 其中, 总 RNA 5 μ L、50 μ mol · L⁻¹ Oligo(dT) 0.5 μ L、10 μ mol dNTP 1 μ L、DEPC 水 1 μ L。 β -actin 引物序列: 正向引物 5'-CATTGTCACCAACTGGGACGATA-3', 反向引物 5'-GGATGGCTACGTACATGGCTG-3'; NF- κ B p65 引物序列: 正向引物 5'-CACCAAGGATCCAC-CTCACC-3', 反向引物 5'-AATGGCTTGCTCCAG-GTCTC-3'。PCR 扩增体系为 20 μ L, 反应条件为 95℃ 30 s, 40 个扩增循环(95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 70℃ 45 s), 循环完成后测定 NF- κ B p65 的 mRNA 表达水平。采用相对定量研究分析法, 以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 比较各组之间 NF- κ B p65 mRNA 表达的差异。

1.2.7 统计学方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理采用单因素方差检验法。

2 结果与分析

2.1 细胞增殖活性的检测

由表 1 可见, LPS 组细胞存活率显著低于空白对照组, 表明 LPS 对 RAW264.7 细胞具有抑制作用。不同浓度的 GSH 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞

表 1 GSH 对细胞增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of GSH on cell proliferation activity ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	剂量 Dosage ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞存活率 Cell survival rate (%)
空白对照 Blank control	-	100.0 \pm 2.14 **
LPS	0.1	63.28 \pm 5.07
GSH	50	83.68 \pm 4.13 *
	100	95.07 \pm 3.81 *
	200	89.38 \pm 6.56 *

注: 与 LPS 组比较, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$

Note: Compared with LPS group, * indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$

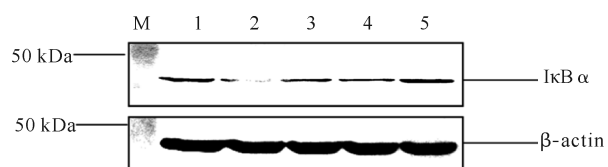
表 2 GSH 对 IL-1 β 、IL-8、TGF- β 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of GSH on IL-1 β 、IL-8、TGF- β ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	剂量 Dosage ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-1 β ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-8 ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TGF- β ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白对照 Blank control	-	82.14 \pm 12.61 **	76.59 \pm 12.46 **	52.50 \pm 9.06 **
LPS	0.1	102.07 \pm 22.14	139.37 \pm 11.84	71.53 \pm 10.11
GSH	50	69.54 \pm 16.32 **	98.42 \pm 15.53 **	39.81 \pm 7.43 **
	100	51.16 \pm 13.78 **	84.16 \pm 14.71 **	27.35 \pm 9.72 **
	200	46.52 \pm 11.09 **	79.39 \pm 17.83 **	22.67 \pm 10.09 **

注: 与 LPS 组比较, ** 表示 $P < 0.01$

Note: Compared with LPS group, ** indicates $P < 0.01$



M: 预染蛋白 Marker Pre-stained protein marker; 1: 空白对照组 Blank control group; 2: LPS 组 LPS group; 3: GSH₅₀; 4: GSH₁₀₀; 5: GSH₂₀₀

图 1 GSH 对 I κ B α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effects of GSH on the expression of I κ B α ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

胞具有显著的保护作用, 细胞存活率均有提高。

2.2 IL-1 β 、IL-8、TGF- β 含量的测定

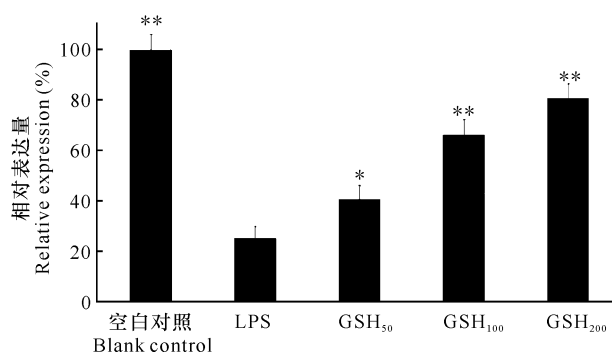
由表 2 可见, 正常 RAW264.7 细胞上清液的 IL-1 β 、IL-8、TGF- β 含量较低, 给予 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 刺激后, IL-1 β 、IL-8 以及 TGF- β 含量均显著增加, 而用 50-200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 岗松总黄酮预处理细胞后, IL-1 β 、IL-8 以及 TGF- β 均受到明显抑制 ($P < 0.01$)。

2.3 I κ B α 蛋白相对表达的检测

空白 RAW264.7 细胞 I κ B α 表达较高, 给予 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 刺激后, I κ B α 表达明显降低, 用不同浓度的 GSH 预处理细胞后, 与 LPS 组比较, I κ B α 表达显著回升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明 GSH 能有效上调炎症细胞中 I κ B α 的表达 (图 1 和图 2)。

2.4 NF- κ B p65 扩增曲线和溶解曲线

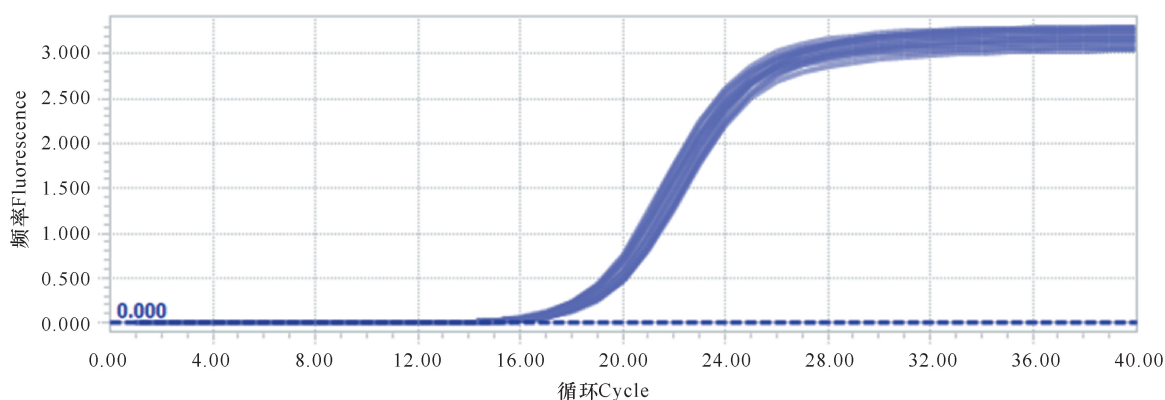
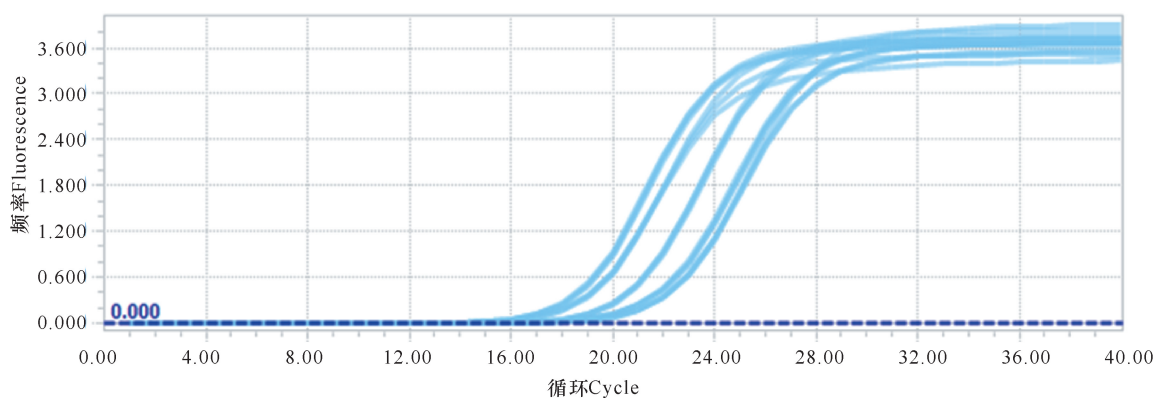
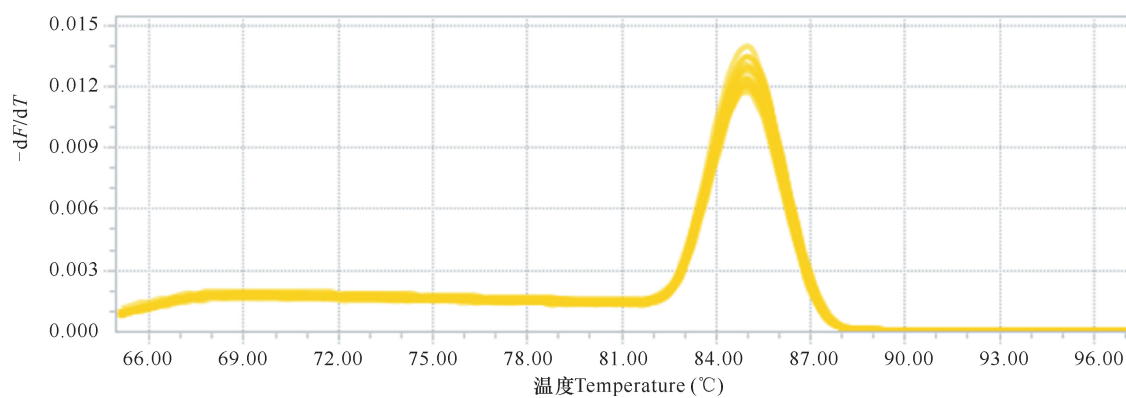
扩增曲线和溶解曲线见图 3-6。从扩增曲线可以看出, 荧光强度和初始拷贝数呈良好的线性关系。溶解曲线峰值单一, 没有杂峰, 表明 QPCR 产物纯度较高, 反应具有良好的特异性。



与 LPS 组比较, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$
Compared with LPS group, * indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$

图 2 I κ B α 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Relative expression of I κ B α ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

图3 β -actin 扩增曲线Fig. 3 Amplification curve of β -actin图4 NF- κ B p65 扩增曲线Fig. 4 Amplification curve of NF- κ B p65图5 β -actin 溶解曲线Fig. 5 Solubility curve of β -actin

2.5 NF- κ B p65 的 mRNA 表达水平的检测

GSH 对 NF- κ B p65 mRNA 表达水平的影响结果见表 3 及图 7。结果表明,空白 RAW264.7 细胞 NF- κ B p65 表达较低,给予 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 刺激

后,表达明显增强;用不同浓度的 GSH 预处理细胞后,与 LPS 组比较,表达受到明显的抑制 ($P < 0.01$),表明 GSH 能有效抑制炎症细胞中 NF- κ B p65 的过度表达。

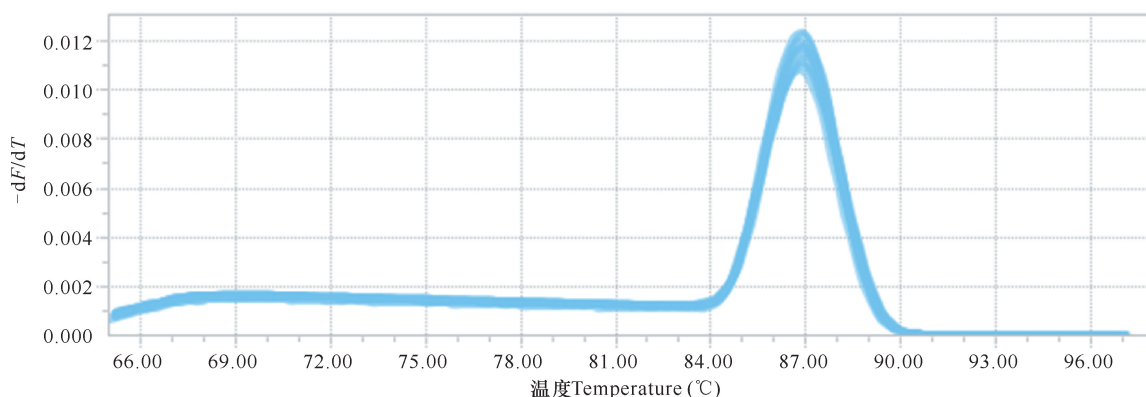
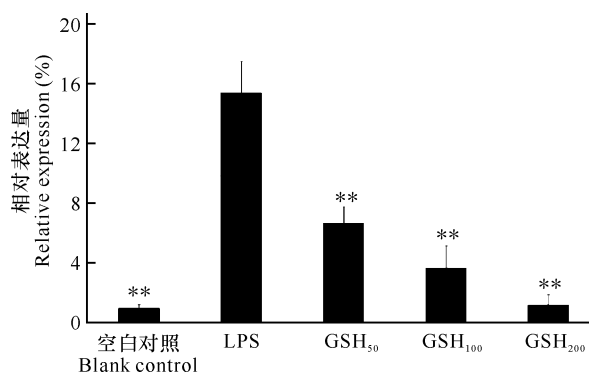


图6 NF-κB p65 溶解曲线

Fig. 6 Solubility curve of NF-κB p65

表3 GSH对NF-κB p65 mRNA表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Table 3 Effects of GSH on NF-κB p65 mRNA expression ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别 Group	剂量 Dosage ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	NF-κB p65	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
空白对照 Blank control	-	$20.28 \pm 1.83^{**}$	$1.00 \pm 0.26^{**}$
LPS	0.1	16.44 ± 2.15	15.39 ± 2.10
GSH	50	$17.36 \pm 2.62^{**}$	$6.65 \pm 1.12^{**}$
	100	$18.29 \pm 1.91^{**}$	$3.71 \pm 1.48^{**}$
	200	$19.90 \pm 1.66^{**}$	$1.19 \pm 0.72^{**}$

注:与LPS组比较,**表示 $P < 0.01$ Note:Compared with LPS group,** indicates $P < 0.01$ 与LPS组比较,**表示 $P < 0.01$ Compared with LPS group,** indicates $P < 0.01$ 图7 NF-κB p65的mRNA相对表达量($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Fig. 7 Relative expression of NF-κB p65 mRNA ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3 讨论

本课题组通过建立LPS刺激RAW264.7细胞体外模型^[13-15],评价GSH对RAW264.7细胞增殖活

性的影响,采用ELISA、Western blotting等方法,分析GSH对相关炎症因子(IL-1、IL-6、TGF-β、TNF-α等)和蛋白(iNOS和COX-2等)表达水平的影响。前期实验已证明GSH能显著抑制LPS诱导RAW264.7巨噬细胞中TNF-α及IL-6含量^[10],本研究进一步验证:50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量的GSH已经能显著抑制IL-1β、IL-8、TGF-β等炎症因子,并能够显著上调IκBα蛋白表达,表明GSH具有良好的抗炎活性。本实验β-actin和NF-κB p65溶解峰都为单峰,说明本实验的PCR扩增为特异性扩增;同时,定量检测结果显示,GSH能够抑制LPS诱导RAW264.7巨噬细胞中NF-κB p65 mRNA表达。

综上,GSH可促进RAW264.7细胞增殖($P < 0.05$),抑制LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞中IL-1β、IL-8、TGF-β含量,上调IκBα蛋白表达,抑制NF-κB p65 mRNA表达,表明GSH可能通过抑制NF-κB信号通路,抑制下游炎症因子的表达,从而发挥抗炎活性作用。因此,抑制NF-κB信号通路可能是GSH发挥抗炎活性的一个作用靶点。然而,其具体的作用机制还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] COURTOIS G, GILMORE T D. Mutations in the NF-kappa B signaling pathway: Implications for human disease [J]. Oncogene, 2006, 25(51): 6831-6843.
- [2] NAUGLER W E, KARIN M. NF-kappa B and cancer-identifying targets and mechanisms [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2008, 18(1): 19-26.
- [3] 牙启康, 卢文杰, 刘布鸣, 等. 岗松化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(5): 827-829, 835.
- [4] 卢文杰, 牙启康, 陈家源, 等. 岗松中的一个新黄酮醇苷类化合物[J]. 药学学报, 2008, 43(10): 1032-1035.

- [5] 陈家源,牙启康,卢文杰,等. 岗松化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发,2008,20(5):827-829,835.
- [6] 陈明生,刘布鸣,林霄,等. 岗松中杨梅素的含量测定[J]. 时珍国医国药,2010,21(11):2771-2772.
- [7] 林霄,刘布鸣,陈明生. 高效液相色谱法测定岗松中槲皮素的含量[J]. 时珍国医国药,2009,20(1):102-103.
- [8] 刘布鸣,邱宏聪,黄艳,等. 岗松总黄酮的制备及其检测方法;CN201310022966.0 [P]. 2013-04-17.
- [9] 马秀珍,卢艳,赵冰冰,等. 岗松总黄酮对宫颈癌 SiHa 细胞迁移、侵袭及凋亡的影响[J]. 国际肿瘤学杂志,2021,48(4):206-211.
- [10] 邱宏聪,张伟,赵冰冰,等. 岗松总黄酮体内外抗炎作用研究[J]. 中药材,2015,38(8):1710-1713.
- [11] 邱宏聪,刘布鸣. 星点设计-效应面法优选岗松总黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(12):46-49.
- [12] 邱宏聪,刘布鸣,孙翠. 岗松总黄酮的纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):34-36.
- [13] 刘燕芳,刘丹,刘兰,等. 应用于天然产物抗炎活性研究的主要细胞模型[J]. 天然产物研究与开发,2020,32(5):874-881.
- [14] 邵紫君,李志满,于鹏程,等. 氨基酸转化三七花中稀有人参皂苷及提取液对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞活性的影响[J]. 中草药,2021,52(3):702-710.
- [15] 余玲,康倩,刘霞,等. 雷公藤红素与吲哚美辛对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞的协同抗炎作用研究[J]. 中南药学,2020,18(11):1807-1813.

Effect of Total Flavonoids from *Baeckea frutescens* on LPS-induced RAW264.7 Cell Inflammation

QIU Hongcong^{1,2}, LAI Kedao¹, LIANG Bing¹, WANG Li¹, HUANG Yan^{1,2}, LIU Buming^{1,2}

(1. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning, Guangxi, 530022, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning, Guangxi, 530022, China)

Abstract: In order to investigate the anti-inflammation activity mechanism of total flavonoids from *Baeckea frutescens* (GSH), the protective effect of LPS-induced RAW264.7 cells was studied by NF- κ B signaling pathway. MTT method was used to detect the effect of GSH on the proliferation activity of RAW264.7 cells. The effect of GSH on interleukin (IL-1 β , IL-8) and transforming growth factor β (TGF- β) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The relative expression of I κ B α protein in cells was detected by Western blotting (WB). The mRNA expression of NF- κ B p65 in cells was detected by real-time quantitative gene amplification fluorescence assay (QPCR). The results show that after treated by GSH, the proliferation of RAW264.7 cells was promoted ($P < 0.05$), the content of IL-1 β , IL-8 and TGF- β were inhibited significantly ($P < 0.01$), the I κ B α protein expression was enhanced significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the NF- κ B p65 mRNA expression was inhibited significantly ($P < 0.01$). It is speculated that the inhibition of NF- κ B signaling pathway by total flavonoids may be one of the anti-inflammatory mechanisms.

Key words: total flavonoids from *Baeckea frutescens*, LPS, RAW264.7, NF- κ B, anti-inflammation

责任编辑:陆雁



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxxk@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxxk.ijournal.cn/gxxk/ch>