

毛樱桃总黄酮对LPS诱导的RAW264.7 细胞抗炎作用研究

刘园园¹ 赵冬双¹ 庄文越² 陈曦³ 张成义^{1*}

(¹北华大学药学院, 吉林 132013; ²北华大学医学检验学院, 吉林 132013; ³北华大学基础医学院, 吉林 132013)

摘要 利用LPS诱导的RAW264.7的细胞炎症模型, 该研究检测了毛樱桃总黄酮对IL-6、IL-1 β 、PGE₂生成的影响, 同时, 检测了毛樱桃总黄酮对COX-1和COX-2表达的影响。结果显示, 当浓度为0.4、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 毛樱桃总黄酮对LPS诱导的RAW264.7生成IL-6、IL-1 β 及PGE₂均有显著抑制作用($P < 0.05$); 当浓度为40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 毛樱桃总黄酮对LPS诱导的RAW264.7的COX-1表达无明显影响; 对LPS诱导的RAW264.7的COX-2表达具有明显的抑制作用。结果表明, 毛樱桃总黄酮可以显著抑制细胞炎症因子IL-6、IL-1 β 、PGE₂的生成, 并且可以明显抑制COX-2表达, 而对COX-1表达影响不明显。

关键词 毛樱桃总黄酮; 免疫调节; 炎症; 环氧酶

Anti-Inflammatory Effect of *Prunus tomentosa* Thunb Total Flavones on LPS Induced RAW264.7 Cell Inflammation

Liu Yuanyuan¹, Zhao Dongshuang¹, Zhuang Wenyue², Chen Xi³, Zhang Chengyi^{1*}

(¹College of Pharmacy, Beihua University, Jilin 132013, China; ²College of Laboratory Medicine, Beihua University, Jilin 132013, China; ³School of Basic Medicine, Beihua University, Jilin 132013, China)

Abstract This work was aimed to explore the anti-inflammatory mechanism of *Prunus tomentosa* thunb total flavones (PTTTF) on LPS induced RAW264.7 cell inflammation. By using RAW264.7 cell inflammation model induced by LPS, the effects of PTTTF on the generation of IL-6, IL-1 β , and PGE₂, and the expressions of COX-1 and COX-2 were examined. The PTTTF at concentration of more than 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ significantly inhibited the generation of IL-6, IL-1 β and PGE₂ ($P < 0.05$); whereas, when PTTTF at concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, it could inhibit the expression of COX-1, but not that of COX-2. PTTTF can significantly inhibit the generation of cell inflammatory factors IL-6, IL-1 β and PGE₂, and the expression of COX-2, but have no significant effect on the expression of COX-1.

Keywords *Prunus tomentosa* thunb total flavones (PTTTF); immunoregulation; inflammation; COX

毛樱桃中含有多糖、维生素、氨基酸、黄酮等物质。黄酮是一种广泛存在于植物中的天然物质, 黄酮类化合物具有抗肿瘤、抗氧化、抗菌、抗

病毒等作用^[1-3]。但目前对毛樱桃总黄酮抗炎作用机制的研究尚不深入。有研究表明, 炎症也是一种过度免疫反应, 免疫系统中的巨噬细胞、白细胞等

收稿日期: 2017-08-05 接受日期: 2017-11-24

吉林省科技发展计划项目(批准号: 20150311024YY)和吉林省卫生技术创新项目(批准号: 2016J087)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0432-64608279, E-mail: zhchyjl@163.com

Received: August 5, 2017 Accepted: November 24, 2017

This work was supported by Jilin Province Science and Technology Development Project (Grant No.20150311024YY) and Jilin Province Health Technology Innovation Project (Grant No.2016J087)

*Corresponding author. Tel: +86-432-64608279, E-mail: zhchyjl@163.com

网络出版时间: 2018-01-29 17:34:33 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180129.1734.020.html>

在免疫反应中发挥着重要作用^[4]。本文通过使用脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导小鼠RAW264.7细胞建立炎症细胞模型, 研究毛樱桃总黄酮(*Prunus tomentosa* thunb total flavones, PTTTF)抗炎作用机制, 为毛樱桃抗炎药物的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

RAW264.7细胞由吉林大学药学院提供。RPMI 1640培养基购自Hyclone公司。标准胎牛血清购自天津灏洋有限公司。PBS、二甲基亚砷(DMSO)、噻唑蓝(MTT)、脂多糖(LPS)均购自Sigma公司。PGE₂、IL-6、IL-1 β ELISA试剂盒购自南京建成生物工程研究所。醋酸地塞米松购自中国食品药品检定研究院。PTTTF由北华大学药学院自制。

680型酶标仪购自Bio-Rad公司。PCR仪(Mastecycler gradient 5331型)购自Eppendorf公司。凝胶成像分析系统(GelDoc XR+型)购自Bio-Rad公司。5810R多功能台式冷冻离心机购自Eppendorf公司。SW-CJ-2G型超净工作台购自苏州净化设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PTTTF的分离与纯化 取干燥后的毛樱桃200 g, 破碎, 按料液比1:8加入容积分数为95%乙醇共1 600 mL, 回流提取2 h, 合并3次提取液, 过滤, 取滤液旋蒸干燥, 得到浸膏。将浸膏以蒸馏水溶解, 导入大孔吸附树脂的层析柱中, 待24 h后, 分别以5倍柱体积的40%、60%、80%甲醇水溶液梯度洗脱、合并、干燥, 得到PTTTF。

1.2.2 PTTTF对LPS诱导的RAW264.7细胞IL-6、IL-1 β 、PGE₂含量的影响 取对数期RAW264.7细胞, 调整细胞浓度为4 \times 10⁵/mL, 后接种于96孔板培养, 每孔200 μ L。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养24 h后, PTTTF组给药浓度分别为0.4 μ g/mL、4 μ g/mL、40 μ g/mL。醋酸地塞米松组给药终浓度为0.869 μ g/mL(2 μ mol/L), 给药

干预4 h, 每孔加入LPS终浓度为1 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂继续培养24 h后取上清液, 按照ELISA试剂盒说明书分别检测IL-6、IL-1 β 、PGE₂的含量。

1.2.3 PTTTF对LPS诱导的RAW264.7细胞COX-1、COX-2表达的影响 取对数期RAW264.7细胞, 调整细胞浓度为4 \times 10⁵/mL后, 接种于6孔板培养, 每孔1 mL, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂在孵箱中培养24 h后, PTTTF组给药终浓度分别为0.4 μ g/mL、4 μ g/mL、40 μ g/mL。醋酸地塞米松组给药终浓度为0.869 μ g/mL(2 μ mol/L), 给药干预4 h, 每孔加入LPS终浓度为1 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂继续培养24 h后取上清液, 然后按照试剂盒操作提取总RNA。

利用PCR仪将总RNA逆转录成cDNA, 逆转录条件为: 72 $^{\circ}$ C、5 min; 45 $^{\circ}$ C、50 min。逆转录完成后, 再次利用PCR仪按照试剂盒操作扩增所得的cDNA产物, *GAPDH*扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 30 s; 55 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共3个循环。*COX-1*、*COX-2*扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s; 58 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共30个循环。将扩增后的产物用2%琼脂糖和Gelred电泳1 h, 凝胶成像分析系统观察结果。RT-PCR所用引物见表1。

1.3 统计分析

所得数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。所有统计分析均采用SPSS 17.0软件进行, 用*t*检验比较实验组与对照组间的显著性差异。各组间的显著性差异用单因素方差显著性分析。

2 结果

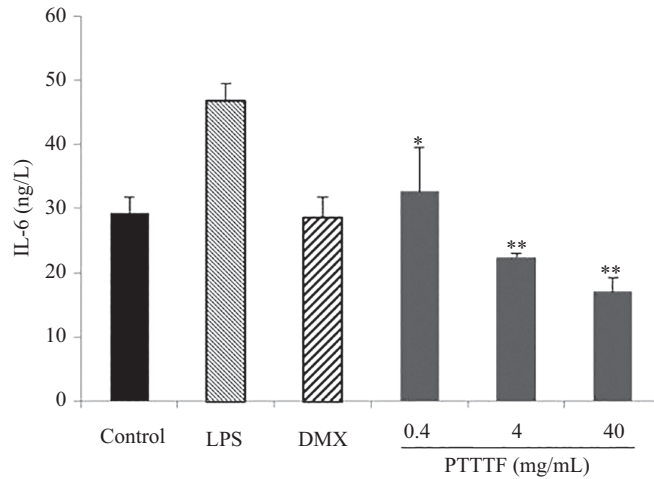
2.1 PTTTF对LPS诱导的RAW264.7细胞IL-6表达的影响

本实验采用ELISA法来检测了经LPS诱导后RAW264.7细胞中IL-6的表达水平。结果显示, 与模型组(LPS组)相比, PTTTF能明显抑制RAW264.7细胞中IL-6的表达, 并且随PTTTF量的增加, IL-6表达量降低, 且当给PTTTF浓度为4 μ g/mL、40 μ g/mL时($P<0.01$)能显著抑制IL-6的表达(图1)。

表1 RT-PCR所用引物序列

Table 1 The primer sequences of RT-PCR

目标基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	长度(bp)
Target genes	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Length (bp)
<i>GAPDH</i>	GAG GGG CCA TCC ACA GTC TTC	CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG	357
<i>COX-1</i>	CAC TCG CCT CAT CCT TAT AG	AGT TCA CCA GCA TAG AAG T	257
<i>COX-2</i>	CCA TTG ACC AGA GCA GAG	CCA GTA TTG AGG AGA ACA GAT	284

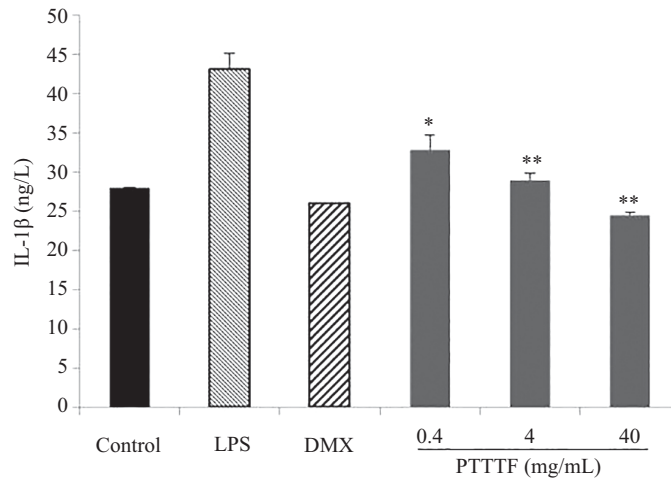


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与LPS组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs LPS group.

图1 PTTTF对LPS诱导的RAW264.7细胞IL-6表达的影响

Fig.1 The effect of PTTTF on the content of IL-6 in LPS-induced RAW264.7 cells



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与LPS组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs LPS group.

图2 PTTTF对LPS诱导的RAW264.7细胞IL-1β表达的影响

Fig.2 The effect of PTTTF on the content of IL-1β in LPS-induced RAW264.7 cells

2.2 PTTTF对LPS诱导的RAW264.7细胞IL-1β表达的影响

本实验采用ELISA法检测了经LPS诱导后RAW264.7细胞中IL-1β的表达水平。结果显示,与模型组比较,PTTTF能明显抑制RAW264.7细胞中IL-1β的表达,并且随着PTTTF浓度的增加,IL-1β的表达量降低,且当给PTTTF浓度为4 μg/mL、40 μg/mL时,能显著降低IL-1β的表达($P < 0.01$)(图2)。

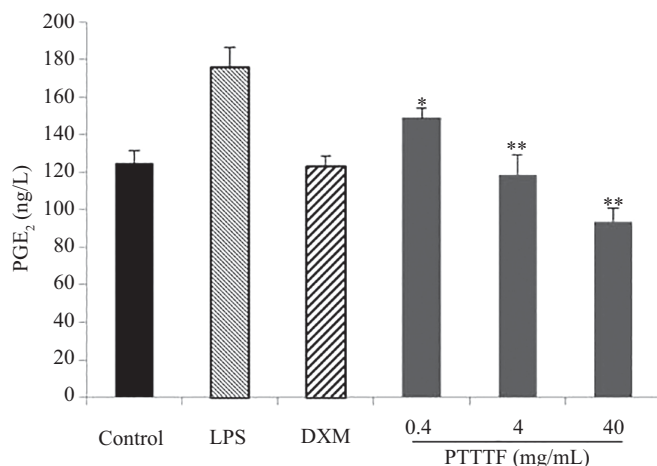
2.3 PTTTF对LPS诱导的RAW264.7细胞PGE₂(prostaglandin E₂)表达的影响

PGE₂是一种重要的细胞生长和调节因子,是花生四烯酸环氧合酶代谢产物,为二十碳不饱和脂肪

酸。由图3可见,与LPS组相比,PTTTF能明显地降低PGE₂的表达,并且PGE₂表达随给药浓度的增加而减少,当PTTTF浓度为4 μg/mL($P < 0.01$)、40 μg/mL($P < 0.01$)时能显著降低PGE₂表达。

2.4 PTTTF对LPS诱导的RAW264.7细胞COX-1、COX-2表达的影响

环氧酶(COX)是花生四烯酸生成前列腺素的关键酶,COX-1在大多数组织呈结构性表达,而COX-2在炎症过程中表达。本实验采用RT-PCR检测了经LPS诱导后细胞内COX-1和COX-2的表达情况。结果显示,与LPS组相比,PTTTF对COX-1的表达未见明显影响,PTTTF可以明显抑制COX-2的表达(图4)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与LPS组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs LPS group.

图3 PTTTF对LPS诱导的RAW264.7细胞PGE₂表达的影响

Fig.3 The effect of PTTTF on the content of PGE₂ in LPS-induced RAW264.7 cells

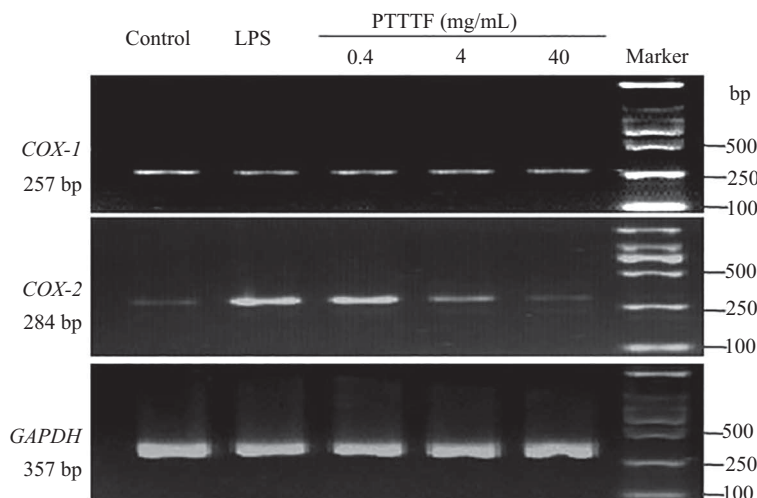


图4 PTTTF对LPS诱导的RAW264.7细胞COX-1和COX-2表达的影响

Fig.4 Effects of PTTTF on the expression of COX-1 and COX-2 in LPS-induced RAW264.7 cells

3 讨论

炎症是含有血管系统的组织受到生物因素、物理因素、化学因素等刺激或损伤后机体发生的防御反应。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分, LPS可以通过诱导体内免疫细胞, 使其合成并释放多种细胞因子和炎症介质。RAW264.7是小鼠单核巨噬细胞白血病细胞, 巨噬细胞是炎症反应中的重要调节细胞。

经LPS诱导的巨噬细胞能产生iNOS(inducible nitric oxide synthase)、PGE₂及炎症因子[如TNF- α (tumor necrosis factor- α)、IL-6、IL-1 β]^[5-6]。IL-1 β

是一种致炎细胞因子, 在炎性疼痛中主要介导炎性痛敏^[7]。IL-1 β 由激活的单核巨噬细胞分泌, 内毒素能够诱导其产生, 是机体炎症早期的标志物, 主要生物学特性是介导炎症反应, 还能诱导炎症因子(如IL-6、IL-8等)的产生^[8]。IL-6是一种与炎症调节有关的多功能因子, 机体在正常状态下会表达一定低浓度的IL-6, 以维持正常生理功能^[9], 如参与机体免疫、调节神经系统功能等作用。本文通过ELISA法测定RAW264.7细胞中的IL-6、IL-1 β 的含量, 可见经LPS诱导后, 细胞中IL-6、IL-1 β 含量明显上升; PTTTF给药后细胞中IL-6、IL-1 β 含量显著下降, 且

呈一定剂量依赖性。

COX分为COX-1和COX-2两种亚型, COX-1广泛分布于各种组织中, 正常组织和炎症组织中COX-1的表达基本相同, 其催化产生的前列腺素(prostaglandin, PG)与维持机体正常生理功能相关。与COX-1相反, COX-2在正常组织和细胞中很少表达, 而当机体或组织受到生物、物理、化学等因素刺激时, 可引起COX-2的大量表达, 并催化花生四烯酸(arachidonic acid, AA)生成前列腺素在炎症反应中发挥着重要作用^[10-11]。本研究发现, PTTTF可以显著地降低PGE₂的含量, 明显地抑制COX-2的表达, 但不影响COX-1的表达。由此推断, PTTTF可选择抑制COX-2而减少PGE₂的生成, 从而抑制炎症反应的发生, 因此, 在有效抗炎的同时, 胃肠道、血液系统及肾功能等不良反应较轻。

综上, PTTTF可通过降低细胞分泌IL-6来调控炎症反应, 通过选择性地抑制COX-2的表达从而抗炎同时减少了传统的抗炎药物的不良反应。总之, PTTTF通过多途径参与机体免疫与炎症的调控, 并可能成为一种克服了传统不良反应的选择性COX-2抑制剂, 对天然抗炎新药的开发具有重大意义。

参考文献 (References)

- 1 Shalini V, Bhaskar S, Kumar KS, Mohanlal S, Jayalekshmy A, Helen A. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of the flavonoid, tricetin from Njavara rice (*Oryza sativa* L.) in human peripheral blood mononuclear cells: possible role in the inflammatory signaling. *Int Immunopharmacol* 2012; 14(1): 32-8.
- 2 Coelho PC, Oliveira MN, da Silva AB, Pitanga BP, Silva VD, Faria GP, *et al.* The flavonoid apigenin from *Croton betulaster* Mull inhibits proliferation, induces differentiation and regulates the inflammatory profile of glioma cells. *Anticancer Drugs* 2016; 27(10): 960-9.
- 3 Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52(4): 673-751.
- 4 Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
- 5 李丹, 任亚娜, 范华骅. 巨噬细胞的分类及其调节性功能的差异. *生命科学(Li Dan, Ren Yana, Fan Huaye. The classification of macrophages and their regulatory functions. Chinese Bulletin of Life Science)* 2011; 23(3): 249-54.
- 6 Abdallah HM, Abdel-Naim AB, Ashour OM, Shehata IA, Abdel-Sattar EA. Anti-inflammatory activity of selected plants from *Saudi Arabia*. *Z Naturforsch C* 2014; 69(1/2): 1-9.
- 7 宋明娟, 俞瑾, 吴根诚. 白介素-1受体拮抗剂的抗炎性疼痛作用. *国外医学(生理、病理科学与临床分册)*[Song Mingjuan, Yu Jin, Wu Gencheng. Anti-inflammatory pain effects of interleukin-1 receptor antagonists. *Foreign Medical Sciences (Pathophysiology and Clinical Medicine)*] 2004; 24(3): 386-8.
- 8 代艳文, 杨莉, 万静枝, 袁丁, 王婷. 竹节参醇提物对LPS诱导RAW264.7细胞炎症的保护作用. *中国实验方剂学杂志(Dai Yanwen, Yang Li, Wan Jingzhi, Yuan Ding, Wang Ting. Protective effect of *Scutellaria barbata* on inflammation induced by LPS in RAW264.7 cells. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*)* 2014; 20(2): 163-6.
- 9 Savale L, Tu L, Rideau D, Izziki M, Maitre B, Adnot S, *et al.* Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir Res* 2009; 10: 6.
- 10 Amaravani M, Prasad NK, Ramakrishna V. COX-2 structural analysis and docking studies with gallic acid structural analogues. *Springerplus* 2012; 1(1): 58.
- 11 Kosik-Bogacka DI, Baranowska-Bosiacka I, Kolasa-Wołoskiuk A, Lanocha-Arendarczyk N, Gutowska I, Korbecki J, *et al.* The inflammatory effect of infection with *Hymenolepis diminuta* via the increased expression and activity of COX-1 and COX-2 in the rat jejunum and colon. *Exp Parasitol* 2016; 169: 69-76.