

穿心莲内酯对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症反应的抑制作用

苏楠^{1,2}, 马学琴^{2*}

1. 西安外国语大学 校医院, 陕西 西安 710061

2. 宁夏医科大学 回医药现代化省部共建教育部重点实验室, 宁夏 银川 750004

摘要: **目的** 探讨穿心莲内酯对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症反应的抑制作用及其作用机制。**方法** 采用噻唑蓝比色 (MTT) 法分析穿心莲内酯对 RAW264.7 细胞活力的影响。通过脂多糖处理 RAW264.7 细胞 24 h 建立细胞炎症模型, 造模前 1 h 用穿心莲内酯 2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 预处理。荧光定量 PCR 法检测 RAW264.7 细胞内相关抗氧化应激酶基因和 iNOS 水平。穿心莲内酯单独处理 RAW264.7 细胞 24 h, Western blotting 法检测 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白和 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白水平。免疫荧光检测转录因子 Nrf2 在胞质及核内的分布情况。**结果** 与对照组比较, 穿心莲内酯剂量相关性地抑制 RAW264.7 细胞活力, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。穿心莲内酯显著抑制脂多糖诱导 RAW264.7 细胞的 iNOS 水平 ($P < 0.001$), 增加相关抗氧化酶基因 HO-1、NQO1 mRNA 水平。穿心莲内酯抑制 Keap1 表达, 增加 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平的表达。**结论** 穿心莲内酯可抑制脂多糖诱导的炎症反应, 其作用机制可能与激活 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路从而调控抗氧化酶 HO-1、NQO1 mRNA 表达水平相关。

关键词: 穿心莲内酯; RAW264.7 细胞; 脂多糖; Keap1/Nrf2/HO-1; NQO1; iNOS

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)06-0978-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.06.004

Effect of andrographolide on inflammation suppression of RAW264.7 cell induced by lipopolysaccharide

SU Nan^{1,2}, MA Xue-Qin²

1. School Hospital of Xi'an International Studies University, Xi'an 710061, China

2. Key Laboratory of Hui Ethnic Medicine Modernization, Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Abstract: Objective To study the anti-inflammatory effect of andrographolide on inflammation suppression induced by lipopolysaccharide, and explore its mechanism. **Methods** Cell viability of RAW264.7 cells treated with andrographolide were analyzed by MTT assay. Cell inflammatory model was established with RAW264.7 cells treated with lipopolysaccharide for 24 h prior to incubation of 2.5, 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$ andrographolide for 1 h. Anti-oxidative enzymes and iNOS were evaluated by quantitative real-time polymerase chain reaction. RAW264.7 cells were treated with andrographolide for 24 h, and Keap1, Nrf2, and HO-1 expression were detected by Western blotting. Nrf2 distribution between cytosome and nucleus were analyzed by immunocytochemistry. **Results** Compared with the control group, cell survival rate of RAW264.7 cells were decreased treated by andrographolide in a dose-dependent manner ($P < 0.05$, 0.01 , and 0.001). Andrographolide could significantly inhibit iNOS levels in RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide ($P < 0.001$), and could increase the levels of related antioxidant enzymes genes HO-1, NQO1 and mRNA. Andrographolide inhibited the expression of Keap1 and increased the expression of Nrf2 and HO-1 protein levels. **Conclusion** Andrographolide can inhibit the inflammatory response induced by lipopolysaccharide, and its mechanism may be related to activation of Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway and regulation of expression levels of antioxidant enzymes HO-1 and NQO1 mRNA.

Key words: andrographolide; RAW264.7 cell; lipopolysaccharide; Keap1/Nrf2/ARE/HO-1; NQO1; iNOS

收稿日期: 2017-02-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360625)

作者简介: 苏楠 (1982—), 女, 主管药师, 从事临床药剂学研究。Tel: 13991237230 E-mail: sunan055@126.com

*通信作者 马学琴 (1980—), 女, 回族, 博士, 副教授, 从事药物分析工作。E-mail: maxueqin217@126.com

穿心莲内酯为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 的主要有效成分, 为二萜类内酯化合物。研究表明, 穿心莲内酯能显著减少醋酸所致小鼠扭体次数, 延长小鼠热板致痛反应时间, 且对二甲苯致小鼠耳廓肿胀有显著的抑制作用, 对鸡蛋清引起的小鼠足掌肿胀也有抑制作用, 提示穿心莲内酯具有较好的镇痛抗炎作用^[1]。另有报道穿心莲内酯能抑制活化的小鼠巨噬细胞增殖和 NO 的释放, 表明穿心莲内酯具有免疫抑制活性, 进而产生抗炎作用^[2]。临床上, 穿心莲内酯主要用于多种感染性疾病, 目前已有莲必治注射剂、喜炎平注射剂、穿琥宁注射剂、复方穿琥宁涂膜剂等制剂。近年来, 随着对其药理作用及其机制的研究越来越深入, 也推动穿心莲内酯的临床应用。因此, 本实验针对穿心莲内酯对脂多糖诱导的炎症反应的抑制作用及其机制进行了研究。

1 材料

1.1 细胞

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 购于中国科学院上海细胞库。

1.2 试剂与耗材

DMEM 培养基干粉 (Gibco, 货号 12800017)、0.25% 胰蛋白酶溶液 (Gibco, 货号 25200-056)、磷酸盐缓冲盐 (PBS, Invitrogen)、胎牛血清 (FBS, Gibco, 货号 16000-044)、噻唑蓝 (MTT, Sigma)、二甲基亚砜 (DMSO, Sigma, USA)、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen), 穿心莲内酯 (质量分数 $\geq 98\%$)、脂多糖、莱菔硫烷均购于 Sigma 公司, Trizol, PCR 96 孔板, PCR 96 孔板膜均购于 Invitrogen 公司, cDNA 试剂盒、SybGreen 购于 Roche, 100 mm 细胞培养皿、6 孔板、96 孔板 (丹麦 NUNC)。

1.3 仪器

Thermo 3111 型 CO₂ 培养箱; Infinite M200 PRO 读板仪; Olympus 倒置荧光显微镜; Nanodrop UV 分光光度仪 (Thermo); 荧光定量 PCR 仪 (Roche)。

2 方法

2.1 细胞培养

RAW264.7 细胞培养在 DMEM 培养液 (含 10% FBS, 1% 双抗), 放置在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。去除旧的培养基, 0.25% 胰酶消化 2 min, 用含 10% FBS 的 DMEM 中止消化, 离心后去上清, 加入细胞培养液重悬细胞, 按 1:10 的比例接种至

新的培养皿中, 进行细胞传代。

2.2 细胞活力检测 (MTT 实验)

取对数生长期的细胞, 去除旧的培养基, PBS 洗 1 遍, 0.25% 胰酶消化 2 min, 用含 10% FBS 的 DMEM 中止消化, 离心后去上清, 加入细胞培养液重悬细胞, 细胞计数后将细胞悬液稀释至 5×10^4 /mL, 以每孔 100 μ L 种于 96 孔板中, 放置在 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h, 分别加入 0、10、25、50、100 μ mol/L 穿心莲内酯继续培养 24 h, 每孔加入 10 μ L MTT, 孵化 4 h, 去除上清, 每孔加入 100 μ L DMSO, 混匀 10 min, 在 490 nm 波长, 用酶标仪读取吸光度 (A) 值。实验重复 3 次, 计算穿心莲内酯对细胞活力的影响。采用 Graphpad Prism 5.0 软件统计分析作图。

2.3 荧光定量 PCR 法

取对数生长期的细胞, 按上述方法收集细胞, 以 5×10^5 个/mL, 每孔 2 mL 种于 6 孔板, 通过脂多糖处理 RAW264.7 细胞 24 h 建立细胞炎症模型, 造模前 1 h 给予穿心莲内酯预处理, 用预冷的 PBS 洗 2 遍, 每孔加入 Trizol 1 mL, 静置 5 min, 转移到 1.5 mL 试管。加入 200 μ L 氯仿, 置于旋转混匀器混匀 15 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 小心取出上清 450 μ L, 注意不要取到中间层白色沉淀。加入等体积即 450 μ L 异丙醇, 置于旋转混匀器混匀 15 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 倒出上清, 沉淀即为总 mRNA, 用 75% 乙醇清洗 2 遍, 去除乙醇, 放置通风橱晾干, 用 RNA-free 水溶解, 并在 260/280 nm 处检测总 RNA 含量。按 DNA 反转录 Kit 说明书操作, 将 mRNA 反转成 DNA, 见表 1, 再按 Q-PCR 说明书操作, 检测各目的基因表达水平。

表 1 小鼠 iNOS、HO-1、NQO1 基因上、下游引物
Table 1 Forward and reverse primers of iNOS, HO-1, NQO1 and β -actin in rats

基因	引物序列	种属
iNOS	forward: 5'-GTGGTGACAAGCACATTTGG-3' reverse: 5'-GGCTGGACTTTTCACTCTGC-3'	小鼠
HO-1	forward: 5'-CCCACCAAGTCAAACAGCTC-3' reverse: 5'-AGGAAGGCGGTCTTAGCCTC-3'	小鼠
NQO1	forward: 5'-TTCTGTGGCTTCCAGGTCTT-3' reverse: 5'-AGGCTGCTTGGAGCAAAATA-3'	小鼠
β -actin	forward: 5'-TGCTCGAGATGTCATGAAGG-3' reverse: 5'-TTGCGCTCATCGTAGGCTTT-3'	小鼠

2.4 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法

蛋白收集: 取对数生长期的细胞, 按上述方法收集细胞, 以 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$, 每孔 2 mL 种于 6 孔板, 用穿心莲内酯处理 RAW264.7 细胞 24 h 后, 用预冷的 PBS 洗 2 遍, 每孔加入 RIPA (含蛋白酶抑制剂) 100 μL , 在冰上裂解 10 min, 用细胞刮刀刮下细胞, 转移至 1.5 mL 试管, 12 000 r/min 离心 15 min, 上清液为细胞裂解液, 取上清进行 Bradford 比色法定量蛋白, loading dye 与蛋白裂解液上清液按 1:4 比例充分混匀, 沸水浴中煮 10 min。

(1) SDS 凝胶电泳: 取相同质量的细胞裂解液上样到 SDS 凝胶中, 电泳 (浓缩胶 80 V, 30 min, 分离胶 120 V, 120 min)。(2) 转膜 (300 mA, 120 min)。(3) 封闭: 有 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。(4) 一抗孵育: Keap1, Nrf2, HO-1, β -actin 等一抗按抗体说明书配制, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵化过夜。(5) 二抗孵育: 用 5% 脱脂牛奶按抗体说明书配制兔抗, 鼠抗, 室温孵育 2 h。(6) ECL 显色: 以 NRF2 信号通路的激活剂 SFN 作为阳性药, ECL 显色法检测 Keap1、Nrf2、HO-1、 β -actin 等蛋白水平。

2.5 免疫细胞化学

取对数生长期的细胞, 按上述方法收集细胞, 以 $5 \times 10^4/\text{mL}$, 每空 2 mL 种于 6 孔板, 用穿心莲内酯处理 RAW264.7 细胞 24 h 后, 去除旧的培养基, 用预冷的 PBS 洗 3 遍, 用 4% PFA 室温孵育 15 min。用预冷的 PBS 洗 3 遍, 0.1% Triton X-100 室温孵育 5 min, 预冷的 PBS 洗 3 遍, Nrf2 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 预冷的 PBS 洗 3 遍, 二抗孵育 2 h, DAPI 室温孵育 30 min。在荧光显微镜下拍照。

2.6 统计学分析

采用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计分析, 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较, 方差齐时采用单因素方差分析, 方差不齐时采用非参数数据检验。

3 结果

3.1 不同浓度穿心莲内酯对 RAW264.7 细胞活力的影响

在穿心莲内酯为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞没有死亡。但是当浓度达 50~100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞出现显著死亡, 表明显著的细胞毒性 ($P < 0.001$)。因此穿心莲内酯浓度确定为 2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$, 见表 2。与对照组比较, 穿心莲内酯剂量相关性地抑制 RAW264.7 细胞活力, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

表 2 穿心莲内酯对 RAW264.7 细胞活力影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effects of andrographolide on RAW264.7 cells viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞存活率/%
对照	—	104.3 $\pm$ 3.0
穿心莲内酯	2.5	94.0 $\pm$ 4.2
	5	81.3 $\pm$ 8.7*
	10	78.3 $\pm$ 6.0*
	20	73.8 $\pm$ 9.5**
	25	35.0 $\pm$ 2.0***
	50	23.3 $\pm$ 2.1***
	100	22.3 $\pm$ 2.1***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

3.2 穿心莲内酯抑制脂多糖诱导 RAW264.7 细胞内 iNOS 基因水平

脂多糖诱导 RAW264.7 细胞内 iNOS 水平升高, 与细胞内炎症反应的发生有着密切关系。通过 Q-PCR 实验检测穿心莲内酯对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞内 iNOS 基因水平的影响, 结果见表 3。结果表明, 穿心莲内酯能显著抑制脂多糖诱导 RAW264.7 细胞内 iNOS mRNA 水平 ($P < 0.001$)。

表 3 穿心莲内酯对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞内 iNOS mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 3 Effects of andrographolide on iNOS mRNA stimulated by LPS in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	iNOS mRNA 表达
对照	—	1.0 $\pm$ 0.0
模型	—	8.4 $\pm$ 0.7***
穿心莲内酯	2.5	5.1 $\pm$ 0.4###
	5	3.5 $\pm$ 0.7###
	10	1.1 $\pm$ 0.3###
	20	0.7 $\pm$ 0.3###

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group

3.3 穿心莲内酯抑制脂多糖诱导 RAW264.7 细胞内 iNOS 蛋白水平

脂多糖诱导 RAW264.7 细胞内 iNOS 水平升高, 与细胞内炎症反应的发生有着密切关系。通过 Q-PCR 实验检测穿心莲内酯对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞内 iNOS 蛋白水平的影响, 结果见图 1。结果表明, 穿心莲内酯能显著抑制脂多糖诱导 RAW264.7 细胞内 iNOS 蛋白水平。

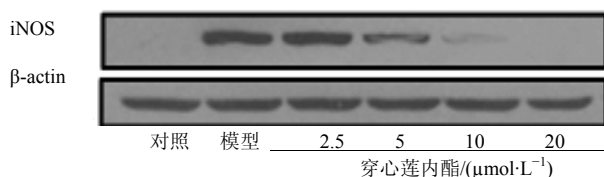


图 1 穿心莲内酯对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞内 iNOS 蛋白水平的影响

Fig. 1 Effects of andrographolide on iNOS stimulated by LPS in RAW264.7 cells

3.4 穿心莲内酯抑制脂多糖诱导 RAW264.7 细胞内抗氧化酶基因水平

抗氧化酶水平升高可能与细胞内抗炎活动有关。穿心莲内酯抑制脂多糖诱导的 iNOS 可能是通过调控抗氧化酶 HO-1 和 NQO1 水平来实现。通过 Q-PCR 实验检测穿心莲内酯对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞内 HO-1 和 NQO1 基因水平的影响, 结果见表 4。结果表明, 穿心莲内酯具有增加 HO-1 和 NQO1 mRNA 水平的趋势, 但比较的差异无显著性。

表 4 穿心莲内酯对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞内 HO-1 和 NQO1 mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Effects of andrographolide on HO-1 and NQO1 mRNA stimulated by LPS in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	HO-1 mRNA	NQO1 mRNA
		表达	表达
对照	—	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1
模型	—	12.5 ± 8.4	1.3 ± 0.6
穿心莲	2.5	14.8 ± 10.8	1.5 ± 0.9
内酯	5	15.8 ± 9.1	2.4 ± 2.0
	10	20.9 ± 13.0	7.3 ± 6.6
	20	32.3 ± 22.0	29.0 ± 17.0

3.5 穿心莲内酯激活 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路

抗氧化酶 HO-1、NQO1 的表达受 Keap1/Nrf2 信号调控。穿心莲内酯增加 HO-1 和 NQO1 基因水平表达可能是通过调控 Keap1/Nrf2 信号通路来实现。因此, 通过 Western blotting 实验检测穿心莲内酯对 Keap1/Nrf2 信号通路的影响, 结果见图 2。结果表明, 穿心莲内酯能显著抑制 Keap1 表达, 增加 Nrf2 和 HO-1 的表达。

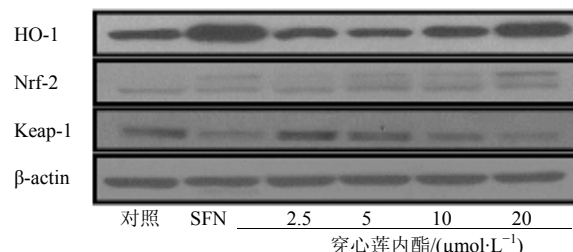


图 2 穿心莲内酯对 Keap1、Nrf2 和 HO-1 蛋白水平的影响
Fig. 2 Effects of andrographolide on Keap1, Nrf2 and HO-1 in RAW264.7 cells

3.6 穿心莲内酯增加 Nrf2 的细胞核分布

Nrf2 作为一个核转录因子, 入核后才能调控下游抗氧化酶, 如 HO-1、NQO1 基因水平。穿心莲内酯增加 HO-1 和 NQO1 基因水平表达可能是通过调控增加 Nrf2 的核分布来实现, 因此, 通过免疫细胞化学实验检测穿心莲内酯对 Nrf2 的胞浆与核分布的影响, 结果见图 3。结果表明, 穿心莲内酯能显著增加 Nrf2 在核内的表达。

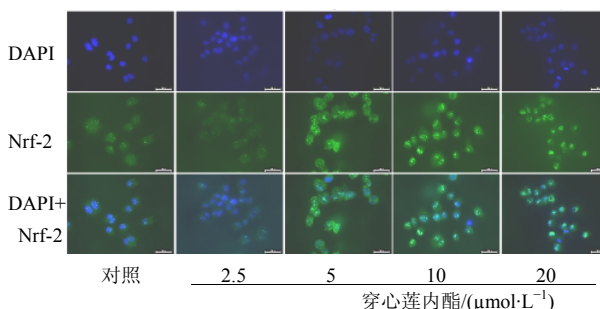


图 3 穿心莲内酯对 Nrf2 胞浆与核分布的影响
Fig. 3 Effects of andrographolide on Nrf2 distribution between cytoplasm and nucleus

4 讨论

炎症与免疫总是相伴相随, 同时, 炎症与免疫与诸多疾病密切相关, 如类风湿性关节炎^[3]、动脉粥样硬化^[4]、二型糖尿病^[4]和癌症^[5]。巨噬细胞在炎症与免疫中起着重要的作用。巨噬细胞在一些内毒素, 如脂多糖, 或白介素, 如 IFN- γ 存在的情况下, 非常容易被激活, 一旦激活后, 会分泌许多炎症因子, 如诱导型一氧化氮合成酶 iNOS, 环氧合酶 COX-2 等。这些炎症因子又会进一步引起炎症反应的加强, 如产生的 iNOS 会进一步生成 NO 和 PGE₂, 进而加强炎症反应^[6]。这些炎症因子, 如 iNOS 受许多因素的调控, 如 NF- κ B, AP-1 等, 近年来, 有

新的研究报道表明一些抗氧化酶,如血红素氧合酶-1(HO-1),参与 iNOS 的调控过程,而 HO-1 是 Keap1/Nrf2 (NF-E2-related factor 2) 信号通路的下游蛋白,主要受核转录因子 Nrf2 的调控,因此,Keap1/Nrf2/HO-1 在 iNOS 的调控中,可能起着重要作用^[7-8]。关于 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路,在未激活的情况下,胞浆中的 Nrf2 主要以与 Keap1 结合,进而被泛素化降解,一旦受外界因素影响,如压力,或氧化应激条件,被激活后,Nrf2 会进入核内,从而调控下游抗氧化相关酶基因的表达^[9-10]。

在本研究中,建立的脂多糖诱导 RAW264.7 细胞内 iNOS 高表达的炎症模型中,过表达的 iNOS 产生过量 NO,导致炎症的进一步产生。通过 MTT 法确定穿心莲内酯对 RAW264.7 细胞的安全有效剂量,进一步验证在该剂量下,穿心莲内酯是否具有较好的抗炎效果。Q-PCR 及 western blotting 结果表明穿心莲内酯显著脂多糖诱导 RAW264.7 细胞内炎症相关因子 iNOS mRNA 及蛋白的表达,从而发挥抗炎作用。由于 HO-1 参与 iNOS 的调控过程,Q-PCR 及 Western blotting 测定结果表明穿心莲内酯通过增加 HO-1, NQO1 等抗氧化酶来下调 iNOS。而 HO-1 受 Keap1/Nrf2 信号调控,进一步 Western blotting 结果表明穿心莲内酯通过抑制 Keap1,释放出 Nrf2,释放出的 Nrf2 入核,促进其下游抗氧化因子的表达。

综上所述穿心莲内酯可能通过激活 Keap1/Nrf2 信号,促进抗氧化酶 HO-1, NQO1 表达从而抵抗脂多糖诱导 RAW264.7 细胞产生的炎症,该作用可能与其增强细胞抗氧化酶系统有关。

参考文献

- [1] 夏东利,徐志立,张莹,等.穿心莲内酯对小鼠镇痛抗炎作用的实验研究[J].儿科药学杂志,2013,19(4):1-4.
- [2] 刘峻,王峥涛.新穿心莲内酯对体外活化小鼠巨噬细胞的影响[J].中国天然药物,2005,3(5):308-311.
- [3] Choy E H, Panayi G S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(12): 907-916.
- [4] O'byrne P M, Postma D S. The many faces of airway inflammation: asthma and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 159 (supplement 2): S41-S63.
- [5] Donath M Y, Shoelson S E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(2): 98-107.
- [6] Mantovani A. Tumor-associated macrophages in cancer-related inflammation [J]. *Immunotherapy*, 2017, 3(4s): 21-22.
- [7] Lee A K, Sung S H, Kim Y C, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by saquinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation [J]. *Br J Pharmacol*. 2003, 139(1): 11-20.
- [8] Naito Y, Takagi T, Higashimura Y. Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 564: 83-88.
- [9] Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi M M, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(11): 1603-1616.
- [10] Jaiswal A K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36(10): 1199-1207.