

## • 实验研究 •

## RAW 264.7 细胞炎症模型优化及异喹啉类生物碱抗炎活性研究

孔祥鹏<sup>1,2</sup>, 陈志从<sup>1,3</sup>, 夏英杰<sup>1,3</sup>, 董婷霞<sup>1,3</sup>, 詹华强<sup>1,3\*</sup>

1. 香港科技大学深圳研究院 深圳市可食用及药用资源研究重点实验室, 广东 深圳 518057

2. 山西中医药大学 中药与食品工程学院 王世民国医大师工作室, 山西 晋中 030619

3. 香港科技大学 生命科学部暨中药研发中心, 香港

**摘要:** **目的** 对 RAW 264.7 细胞炎症模型进行优化, 并考察异喹啉类生物碱的抗炎活性。**方法** 采用内毒素脂多糖 (LPS) 诱导 RAW264.7 细胞炎症反应, 以细胞上清液中炎症因子分泌水平为指标, 优化 LPS 诱导浓度、时间及阳性药地塞米松 (DEX) 孵育时间, 并考察异喹啉类生物碱的抗炎活性。**结果** RAW 264.7 细胞上清液中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 分泌水平随 LPS 诱导浓度、时间增加而升高, 但当 LPS 质量浓度超过 100 ng/mL、诱导时间超过 12 h 后, TNF- $\alpha$  分泌水平趋于平缓; LPS 为 20 ng/mL、诱导 12 h 的 TNF- $\alpha$  分泌水平明显升高。DEX 对 TNF- $\alpha$  分泌抑制作用随孵育时间延长而增强, 但孵育 4 h 后, TNF- $\alpha$  分泌抑制作用趋于平缓。异喹啉类生物碱呈现不同程度 TNF- $\alpha$  分泌抑制作用, 其抑制活性与其季胺型母核结构及 R 基团烷氧基取代等密切相关。**结论** LPS 为 20 ng/mL、诱导 12 h 能较好诱导 RAW 264.7 细胞炎症反应; 异喹啉类生物碱的 TNF- $\alpha$  分泌抑制作用与其季胺型母核结构、R 基团取代等密切相关。

**关键词:** RAW 264.7 细胞炎症模型; 异喹啉类生物碱; 抗炎活性; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ **中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2020)12-2293-07**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.12.001

## Optimization of RAW 264.7 cell inflammation model and anti-inflammatory activity of isoquinoline alkaloids

KONG Xiang-peng<sup>1,2</sup>, CHEN Zhi-cong<sup>1,3</sup>, XIA Ying-jie<sup>1,3</sup>, DONG Ting-xia<sup>1,3</sup>, ZHAN Hua-qiang<sup>1,3</sup>

1. Shenzhen Key Laboratory of Edible and Medicinal Bioresources, HKUST Shenzhen Research Institute, Shenzhen 518057, China

2. Institute of Pharmaceutical &amp; Food Engineering, Chinese Medicine Master Studio of Wang shimin, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

3. Division of Life Science and Center for Chinese Medicine, The Hong Kong University of Science and Technology, HongKong, China

**Abstract: Objective** To optimize the RAW 264.7 cell inflammation model and investigate the anti-inflammatory activity of isoquinoline alkaloids. **Methods** Endotoxin lipopolysaccharide (LPS) was used to induce an inflammatory response in RAW 264.7 cells, in which the induction concentration and time of LPS, and incubation time of positive drug dexamethasone (DEX) were optimized by determining the secretion level of inflammatory factors in cell supernatant. In addition, the anti-inflammatory activity of isoquinoline alkaloids were investigated. **Results** The secretion level of TNF- $\alpha$  in supernatant of RAW 264.7 cells increased with the inductive concentration and time of LPS induction, while the level of TNF- $\alpha$  tended to be flat when the induction concentration of LPS exceeded 100 ng/mL, or the induction time exceeded 12 h. In addition, the secretion level of TNF- $\alpha$  was higher when the induction concentration and time of LPS were 20 ng/mL and 12 h, respectively. Besides, the inhibitory effect of DEX on TNF- $\alpha$  increased with its incubation time, while the inhibitory effect of DEX on TNF- $\alpha$  secretion tended to be flat after incubation for 4 h. The anti-inflammatory results showed that the isoquinoline alkaloids exhibited different degrees of inhibition on TNF- $\alpha$  secretion, and the anti-inflammatory activity were closely correlated with their quaternary amine parent nucleus and alkoxy substitution of R group. **Conclusion** LPS at 20 ng/mL for 12 h incubation could better induce the inflammatory response in RAW 264.7 cells, and the inhibitory effect of isoquinoline

收稿日期: 2020-09-11

**基金项目:** 中国博士后科学基金项目 (2019M653087); 广东省深圳市科技计划项目 (JCYJ20170413173747440、20180306174903174、ZDSYS201707281432317、CKFW2016082916015476); 山西中医药大学科技创新能力培育计划项目 (2019PY-110、2020PY-YC-05)**作者简介:** 孔祥鹏, 讲师, 博士后, 研究方向为中药活性成分筛选。E-mail: xpkong@ust.hk**\*通信作者** 詹华强, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药学。E-mail: botsim@ust.hk

alkaloids on the secretion of TNF- $\alpha$  are closely related to their quaternary amine parent nucleus structure and R group substitution.

**Key words:** RAW 264.7 cell inflammation model; isoquinoline alkaloids; anti-inflammatory activity; TNF- $\alpha$

炎症是许多疾病的重要诱发因素和导致疾病进一步发展的主要原因, 基于常见疾病炎症反应, 筛选高效、低毒的抗炎活性先导化合物是目前热点之一<sup>[1-2]</sup>。小鼠单核巨噬细胞(RAW 264.7 细胞)是常用的免疫细胞, 内毒素脂多糖(LPS)诱导的RAW 264.7 细胞炎症模型被广泛应用于抗炎活性药物筛选及其机制研究<sup>[3]</sup>。然而由于造模过程中 LPS 诱导浓度、造模时间等条件因素差异较大, 致使RAW 264.7 细胞炎症模型不统一, 难以统一、有效地评价药物的抗炎活性。本研究选取 RAW 264.7 细胞, 考察 LPS 不同诱导浓度、孵育时间, 对 RAW 264.7 细胞炎症模型进行优化。在此基础上, 对源于中药的常见异喹啉类生物碱类成分的抗炎活性及构效关系进行初步研究, 为具抗炎活性先导化合物的筛选提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

十万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); GL-16G-II 离心机(上海安亭科学仪器厂); XW-80A 漩涡混合仪(苏州江东精密仪器有限公司); TH2-82B 气浴恒温振荡器(常州翔天实验仪器厂); Multiskan Fc 酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司); BPN-80CH CO<sub>2</sub> 培养箱(深圳威尔创恒科技有限公司); BSC-1300IIA2 生物安全柜超净工作台(苏州苏信环境科技有限公司); PDX-3 倒置显微镜(上海光学仪器厂); ZEISS AxioVert200 倒置荧光显微镜(上海精密仪器仪表有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

盐酸小檗碱(批号 SLBT0096)购于 Sigma-Aldrich 公司; 盐酸巴马汀(批号 S0805239)购于成都瑞芬斯生物科技有限公司; 非洲防己碱(批号 190528-009)、四氢巴马汀(批号 190718-331)、四氢小檗碱(批号 180127-065)、金罂粟碱(批号 180127-158)、四氢非洲防己碱(批号 190612-157)购于成都德思特生物技术有限公司; 甲基黄连碱、小檗红碱、药根碱、血根碱、氯化两面针碱由香港科技大学中药研发中心提供, 以上生物碱质量分数均在 98%以上。

小鼠腹腔巨噬细胞 RAW 264.7 细胞系来源于美国模式培养物保藏所(ATCC, No: TIB-71); DMEM

培养基、胎牛血清(FBS)及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )检测试剂盒购于优宁维上海科技有限公司; LPS、地塞米松(DEX)、溴化二甲噻唑二苯四氮唑(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)购于 Sigma-Aldrich 中国有限公司; 其余细胞培养相关试剂购于优宁维上海科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 药液的制备

准确称取甲基黄连碱、盐酸小檗碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、非洲防己碱、药根碱、四氢小檗碱、四氢巴马汀、四氢非洲防己胺、金罂粟碱、血根碱、氯化两面针碱适量, 用 DMSO 溶解至最大浓度(分别为 50、25、50、50、12、10、25、50、50、50、16、12 mmol/L), 并以 DMSO 梯度稀释至工作浓度。准确称取地塞米松粉末, 用 PBS 缓冲液溶解至 50 mmol/L, 并以 PBS 稀释至工作浓度。准确称取 LPS 粉末, 用 PBS 缓冲液溶解至 1 mg/mL 的母液, 并用 PBS 稀释至工作浓度。准确称取 MTT 粉末, 用 PBS 缓冲液溶解至 5 mg/mL。

### 2.2 RAW 264.7 细胞炎症模型的优化

**2.2.1 LPS 孵育质量浓度对 RAW 264.7 细胞炎症的诱导作用** 取 RAW 264.7 细胞株, 采用 DMEM 培养基(含 10% FBS, 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素)进行复苏。置 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养(75 cm<sup>2</sup> 培养皿), 2 d 传代 1 次, 传代 3 次后按 4 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/孔的细胞浓度接种于 24 孔细胞培养板, 设置对照组、LPS 不同孵育质量浓度组, 每组 3 个复孔, 置培养箱培养 24 h。细胞贴壁后弃去培养液, 根据细胞培养板的孔数分组, 加入含不同质量浓度 LPS 的 DMEM 培养基(含 1% FBS, 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素), 每孔 0.5 mL, 置培养箱培养 24 h。培养结束后, 收集上清培养液, 3 500 r/min 离心 10 min, 分取上清液, 采用 ELISA 试剂盒对上清液中 TNF- $\alpha$  水平进行检测与分析, 优化诱导 RAW 264.7 细胞炎症的 LPS 孵育质量浓度。

**2.2.2 LPS 孵育时间对 RAW 264.7 细胞炎症的诱导作用** 将传代 RAW 264.7 细胞以每孔 4 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞接种于 3 块 24 孔细胞培养板, 每块均设置对照组、LPS 不同孵育时间(6、12、24 h)组, 每组 3 个复孔。参考“2.2.1”项细胞培养方案进行细胞培养 24 h

后, 弃去细胞培养液, 除对照组外 (加入等体积的 DMEM 培养基), 根据分组加入相应含 LPS 的 DMEM 培养基, 每孔 0.5 mL, 置培养箱分别培养 6 h (板 1)、12 h (板 2)、24 h (板 3)。培养结束后, 收集上清培养液, 3 500 r/min 离心 10 min, 分取上清液, 采用 ELISA 试剂盒对上清液中 TNF- $\alpha$  水平进行检测与分析, 对诱导 RAW 264.7 细胞炎症模型的 LPS 孵育时间进行优化。

**2.2.3 DEX 孵育时间对 RAW 264.7 细胞炎症的抑制作用** 将传代 RAW 264.7 细胞以每孔  $4 \times 10^5$  个细胞接种于 24 孔细胞培养板, 设置对照组、LPS 组, DEX 不同孵育时间 (2、4、8、12 h) 组, 每组 3 个复孔。参考“2.2.1”项细胞培养方案将细胞培养 24 h 后, 弃去细胞培养液, 加入含 1% FBS 的 DMEM 培养基, 每孔 0.5 mL。于加入培养基 0、4、8、10 h, 分别向 DEX 孵育 12、8、4、2 h 组的培养孔加入 10 mmol/L DEX 药液 1  $\mu$ L (终浓度为 20  $\mu$ mol/L)。加入培养基 12 h 后, 在 LPS 孵育浓度、时间优化基础上, 除对照组外, 其余组培养孔加入适量质量浓度的 LPS 溶液, 置培养箱继续培养适当时间, 收集上清培养液, 3 500 r/min 离心 10 min, 分取上清液, 采用 ELISA 试剂盒对上清液中 TNF- $\alpha$  水平进行检测与分析, 对阳性药 DEX 抑制 RAW 264.7 细胞炎症的孵育时间进行优化。

## 2.3 异喹啉类生物碱抗炎活性评价

**2.3.1 异喹啉类生物碱细胞毒性评价** 将传代 RAW 264.7 细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔的细胞浓度接种于 96 孔细胞培养板, 细胞培养贴壁后, 弃去上清培养液, 除对照组 (加入不含生物碱药液的低牛血清培养基) 外, 其余组加入等体积含不同浓度生物碱的低牛血清培养基 (按照平行对照原则, 使各组细胞培养液中 DMSO 体积分数均为 0.5%)。将上述细胞培养板置细胞培养箱继续培养 24 h 后, 弃去细胞培养上清液。每孔加入 MTT 溶液 100  $\mu$ L, 置培养箱中继续孵育 4 h 后, 弃去细胞上清液, 每孔加入 DMSO 试剂 150  $\mu$ L, 震荡使结晶充分溶解, 并于 495 nm 检测各组吸光度 (A) 值。以给药组与对照组 A 值比值表示细胞活性。

**2.3.2 异喹啉类生物碱抗炎活性评价** 参考上述细胞培养方案, 将传代 RAW 264.7 细胞以  $4 \times 10^5$  个/孔的细胞浓度接种于 24 孔细胞培养板, 设置对照组、LPS 组、DEX 组及不同浓度梯度生物碱组 (每

个药物浓度为 3 个复孔), 细胞贴壁后弃去上清培养液, 加入等体积含无细胞毒性浓度生物碱的低牛血清培养基, 置培养箱孵育 4 h。基于 RAW 264.7 细胞炎症模型优化中 LPS 孵育浓度与时间, 除对照组外, 其余组各孔加入适宜浓度 LPS 溶液, 置培养箱孵育适宜时间后, 收集各组细胞培养液, 3 500 r/min 离心 10 min, 分取上清液, 采用 ELISA 法, 根据试剂盒说明, 测定各组细胞上清中 TNF- $\alpha$  水平, 评价异喹啉类生物碱对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子分泌的影响。

## 2.4 数据处理及统计学分析

采用 DPS 18.10 数据分析软件, 采用单因素方差分析模块对药物抗炎活性进行评价。各组统计数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 LPS 不同孵育质量浓度与时间对 RAW 264.7 细胞炎症的诱导作用

由图 1-A 可知, LPS 能够较好地诱导 RAW 264.7 细胞发生炎症反应, 但 LPS 质量浓度对细胞炎症诱导作用差异较大: 固定 LPS 孵育时间为 24 h 时, 在 2~100 ng/mL 内, 随着 LPS 质量浓度的增加, RAW 264.7 细胞上清液中 TNF- $\alpha$  分泌水平逐渐升高; 当 LPS 质量浓度超过 100 ng/mL 时, 细胞上清液中 TNF- $\alpha$  分泌水平趋于平缓。进一步的研究表明 (图 1-B), LPS 诱导质量浓度为 10、20、40 ng/mL 时, 随着其孵育时间的延长 (6、12、24 h), 细胞上清液中 TNF- $\alpha$  分泌水平逐渐升高, 但当诱导时间超过 12 h 后, 细胞上清液中 TNF- $\alpha$  分泌水平趋于平缓; 且 LPS 质量浓度为 20、40 ng/mL 时, 细胞上清中 TNF- $\alpha$  分泌水平明显高于 10 ng/mL。综上, 采用 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症反应, LPS 质量浓度为 20~40 ng/mL、孵育时间为 12 h 时, 能够较好诱导 RAW 264.7 细胞分泌 TNF- $\alpha$  炎症因子, 灵敏度高。

### 3.2 DEX 孵育时间对 RAW 264.7 细胞炎症的抑制作用

药物的孵育时间与其抑制 RAW 264.7 细胞分泌炎症因子作用具有一定相关性。在 RAW 264.7 细胞炎症模型诱导过程中 LPS 孵育质量浓度 (20 ng/mL) 与时间 (12 h) 优化基础上, 对阳性药 DEX 孵育时间进行考察, 由图 2-A 结果可知, DEX 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症反应具有较好的抑制作用, 固定 DEX 浓度 (20  $\mu$ mol/L), DEX 对细胞上清液中 TNF- $\alpha$  分泌抑制作用随着 DEX 孵育时间的

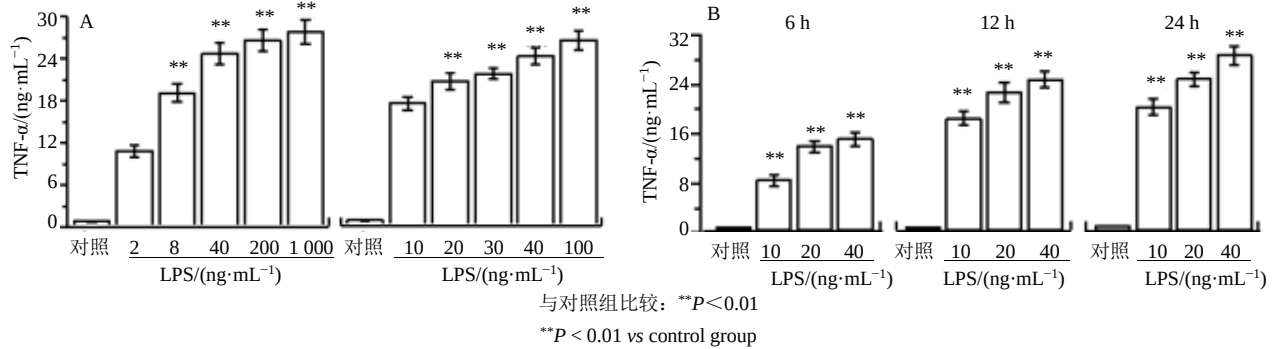


图1 LPS孵育质量浓度(A)和时间(B)对RAW 264.7细胞炎症诱导作用

Fig. 1 The inflammatory induction of LPS incubated concentration (A) and time (B) on RAW264.7 cells

延长而增加,但当孵育时间超过4 h时,DEX对TNF- $\alpha$ 分泌抑制作用趋于平缓。采用倒置荧光显微镜对DEX孵育4 h时细胞形态变化进行观察,由图2-B结果可知,对照组细胞形态呈圆形、无分支,细胞培养液澄清;模型组细胞呈现长条状、分支状等不规则状,且细胞培养液出现一定的浑浊现象;DEX组细胞为类圆形、少分支。综上,DEX孵育4 h时,其对RAW 264.7细胞分泌炎症因子具有较好的抑制作用。

### 3.3 异喹啉类生物碱的抗炎活性

异喹啉类生物碱是黄连、黄柏、三颗针等清热

泻火中药所含的代表性有效成分<sup>[4-5]</sup>,已有的研究表明,这些中药及其所含有效成分多具有不同程度的抗炎活性<sup>[6]</sup>,但由于炎症模型不统一、测定指标或条件差异大等因素,难于对其抗炎活性进行统一的比较。本研究选取来源于中药的甲基黄连碱、盐酸小檗碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、非洲防己碱、药根碱、四氢小檗碱、四氢巴马汀、四氢非洲防己胺、金罂粟碱、血根碱、氯化两面针碱等代表性异喹啉类生物碱,采用LPS诱导的RAW 264.7细胞炎症模型,以细胞上清液中炎症因子分泌水平为指标,对异喹啉类生物碱的抗炎活性进行评价。

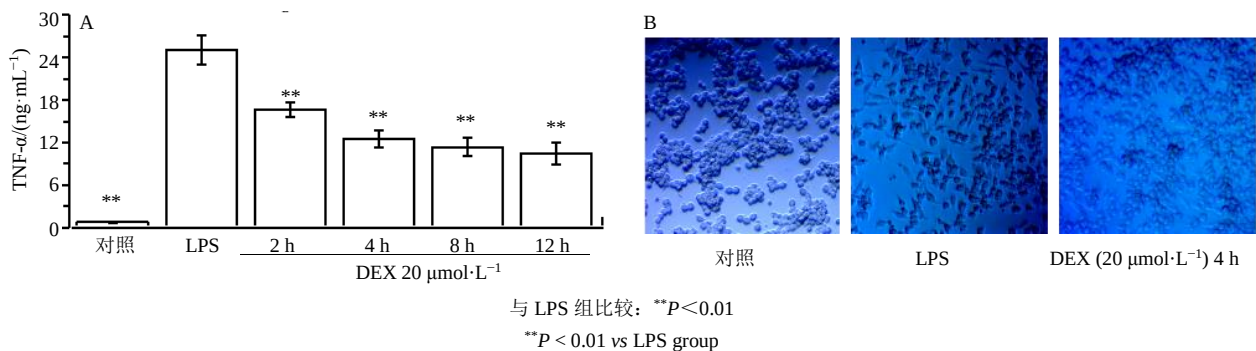


图2 DEX孵育时间对RAW 264.7细胞炎症的抑制作用(A)及对细胞形态的影响(B, ×200)

Fig. 2 The inflammatory inhibition of DEX incubated time on RAW 264.7 cells and effect on cell morphology (B, ×200)

采用MTT法对上述异喹啉类生物碱的细胞毒性进行评价,由图3结果可知,甲基黄连碱、小檗碱、小檗红碱、巴马汀、非洲防己碱、药根碱等小檗碱型异喹啉类生物碱在浓度为40、10、80、25、30、30  $\mu\text{mol/L}$ 及以下时,对RAW 264.7细胞无明显毒性;金罂粟碱、四氢小檗碱、四氢巴马汀、四氢非洲防己碱等原小檗碱型异喹啉类生物碱在浓度为30、90、120、60  $\mu\text{mol/L}$ 及以下时,对RAW 264.7细胞无明显毒性;血根碱、氯化两面针碱等苯菲啶

型异喹啉类生物碱在浓度为10  $\mu\text{mol/L}$ 及以下时,对RAW 264.7细胞无明显毒性。

在RAW 264.7细胞炎症模型优化及异喹啉类生物碱细胞毒性测定基础上,加入相应无细胞毒性浓度的异喹啉类生物碱进行共孵育,以各组细胞上清TNF- $\alpha$ 分泌水平为指标,对异喹啉类生物碱化合物进行抗炎活性评价。由图4实验结果可知,多数异喹啉类生物碱对LPS诱导的RAW 264.7细胞炎症因子TNF- $\alpha$ 分泌表现出不同程度的抑制作用:血根碱

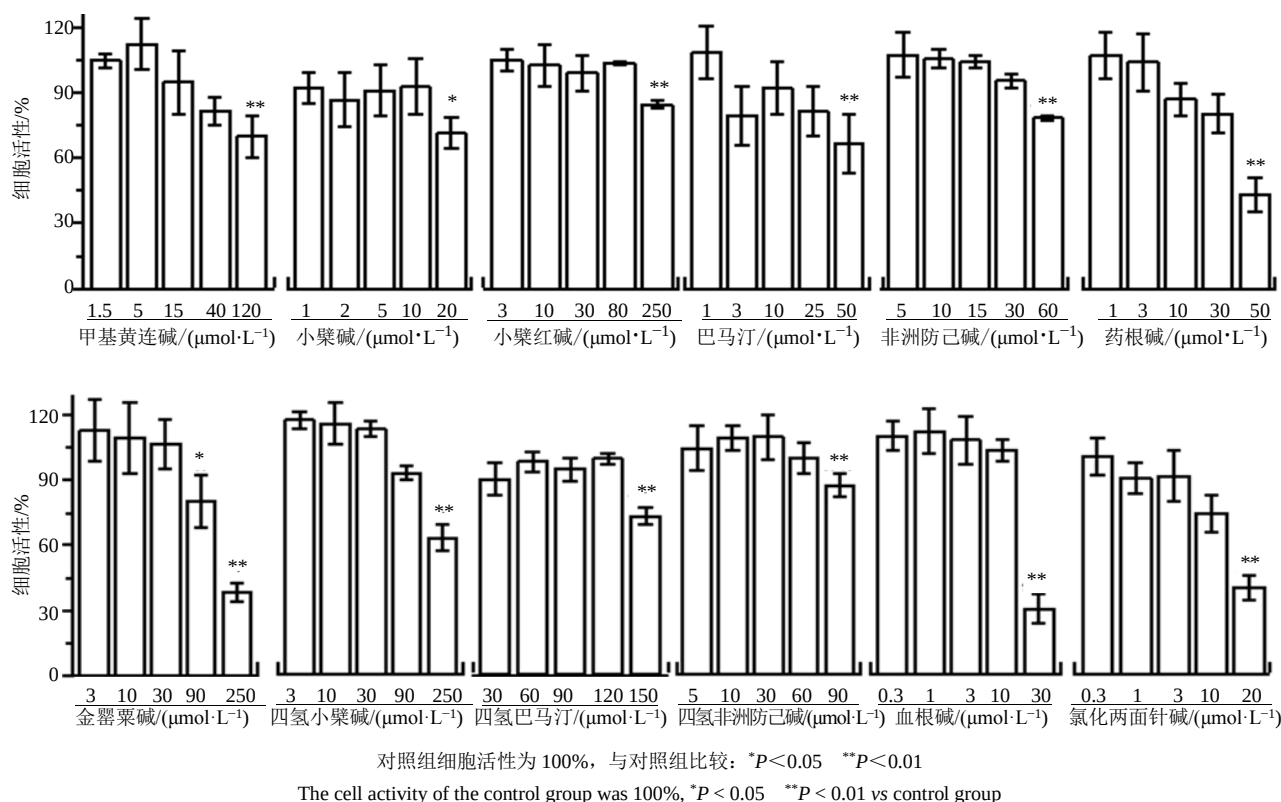


图 3 异喹啉类生物碱对 RAW 264.7 细胞的毒性作用  
 Fig. 3 Cytotoxicity of isoquinoline alkaloids on RAW 264.7 cells

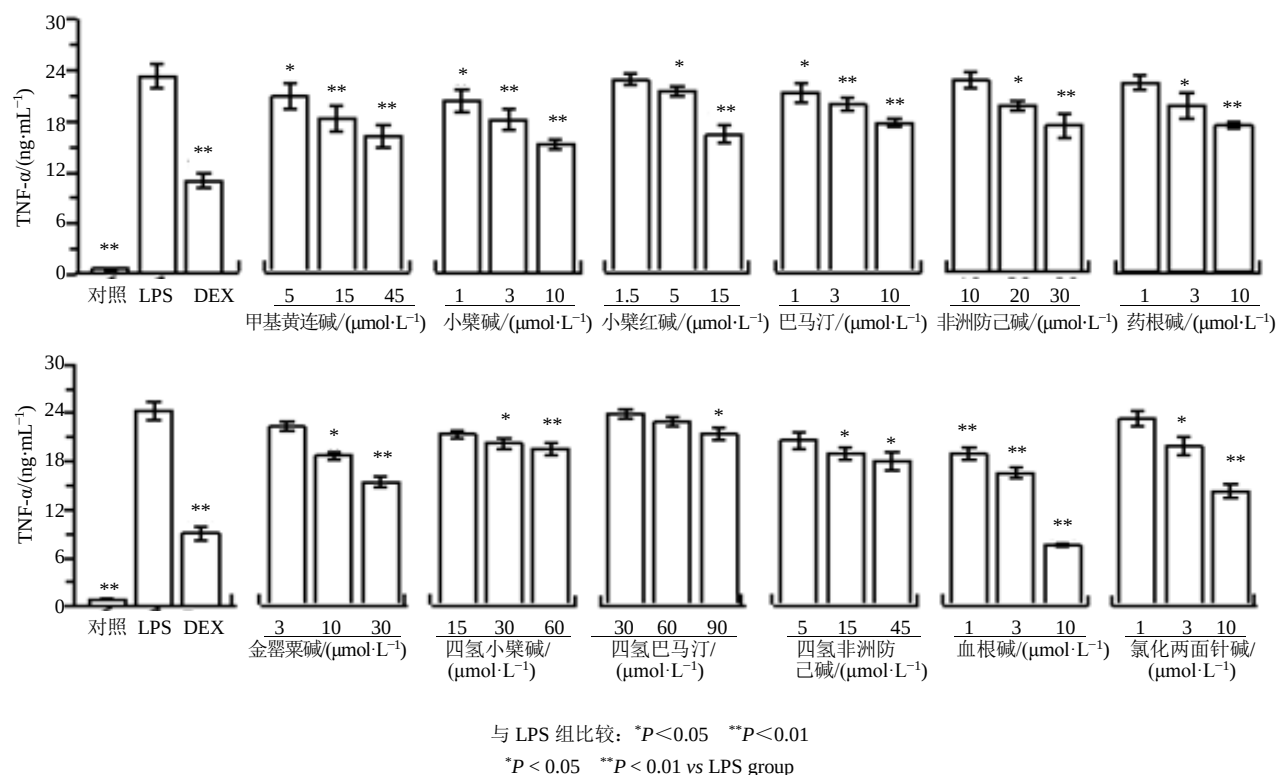


图 4 异喹啉类生物碱对 RAW 264.7 细胞炎症因子分泌抑制作用  
 Fig. 4 The inflammatory factor inhibition of isoquinoline alkaloids on RAW264.7 cells

在 10  $\mu\text{mol/L}$  浓度下对 TNF- $\alpha$  分泌抑制率约为 70%，小檗碱、氯化两面针碱在 10  $\mu\text{mol/L}$  浓度下对 TNF- $\alpha$  分泌抑制率为 35%~40%，甲基黄连碱、小檗红碱、金罂粟碱在 45、15、30  $\mu\text{mol/L}$  浓度下对 TNF- $\alpha$  分泌抑制率约为 30%，巴马汀、非洲防己碱、药根碱、四氢非洲防己碱在 10、30、10、45  $\mu\text{mol/L}$  浓度下对 TNF- $\alpha$  分泌抑制率约为 25%，四氢小檗碱在 60  $\mu\text{mol/L}$  浓度下对 TNF- $\alpha$  分泌抑制率约为 20%，四氢巴马汀在 90  $\mu\text{mol/L}$  浓度下对 TNF- $\alpha$  分泌抑制率为 10%~15%。

#### 4 讨论

炎症是许多疾病如脑卒中、阿尔茨海默病、帕金森病等及类风湿性关节炎等自身免疫性疾病的重要诱发因素和导致疾病进一步发展的主要原因<sup>[1-2]</sup>。机体发生炎症反应时，免疫细胞内核因子  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) 等相关的炎症信号转导通路被激活，并进一步诱导免疫细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素 6(IL-6) 等大量炎症因子，导致组织细胞炎症浸润、病理性改变等发生<sup>[1,3]</sup>。目前现代临床多采用阿司匹林等非甾体类抗炎药及布地奈德等糖皮质激素制剂对炎症信号通路中相关蛋白进行抑制，但由于作用靶点选择性差，致使上述药物在抑制免疫细胞炎症同时，亦多存在毒副作用大、停药反弹性高及耐药性等不足<sup>[7-8]</sup>。中医药对慢性炎症性疾病具有较好的治疗效果，其在缓解免疫细胞炎症反应引起的临床症状、改善炎症疾病患者生活质量等方面具有整体、综合的治疗作用<sup>[9]</sup>。因此，基于炎症靶标，从中药中筛选高效低毒的抗炎活性先导化合物具有重要意义。生物碱是中药中所含有的一类重要抗炎活性成分，已有的研究表明，源于黄连、黄柏、三颗针等清热泻火中药的异喹啉类生物碱有效成分（如小檗碱、巴马汀、氯化两面针碱等）能够作用于炎症过程中相关靶点而发挥不同程度抗炎活性<sup>[10-12]</sup>。然而，由于炎症模型不统一、测定条件差异大等因素，难于对其抗炎活性进行统一比较。本实验在 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症模型优化基础上，对代表性中药异喹啉类生物碱的抗炎活性进行测定。

由结果可知，异喹啉生物碱多具有不同程度抗炎活性，且其抗炎活性强弱与其异喹啉母核结构类型呈现一定相关性：如血根碱、氯化两面针碱等苯菲啶型异喹啉类生物碱对 RAW 264.7 细胞上清炎症因子 TNF- $\alpha$  分泌抑制作用强于甲基黄连碱、小檗碱等小檗碱型异喹啉类生物碱；对于小檗碱型、原小

檗碱型生物碱而言，季胺型生物碱（小檗碱、非洲防己碱、巴马汀）对 TNF- $\alpha$  分泌抑制作用强于母核氢化后的叔胺型生物碱（四氢小檗碱、四氢非洲防己碱、四氢巴马汀）。此外，异喹啉类生物碱抗炎活性与其母核  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$  官能团取代类型亦呈现一定相关性：如母核上连有  $\text{R}_1\text{-O-CH}_2\text{-O-R}_2$  或  $\text{R}_3\text{-O-CH}_2\text{-O-R}_4$  基团的异喹啉类生物碱对 TNF- $\alpha$  分泌抑制作用强于不含亚甲二氧基基团的生物碱，如小檗碱对 TNF- $\alpha$  分泌抑制作用强于巴马汀、非洲防己碱、药根碱，血根碱对 TNF- $\alpha$  分泌抑制作用强于氯化两面针碱，金罂粟碱对 TNF- $\alpha$  分泌抑制作用强于四氢小檗碱、四氢巴马汀、四氢非洲防己碱； $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$  为甲氧基取代小檗碱型生物碱的抗炎活性强于羟基取代的母核类生物碱，如小檗碱的 TNF- $\alpha$  分泌抑制作用强于小檗红碱，巴马汀的 TNF- $\alpha$  分泌抑制作用强于非洲防己碱。

亦有研究表明，免疫细胞中有多种神经递质或受体表达，一些神经递质及它们相应受体是神经系统及炎症反应共同的介导体。通过锚定蛋白 PRiMA 分布于免疫细胞膜上的乙酰胆碱酯酶 (AChE) 能够作为神经、免疫、炎症的共同作用靶点<sup>[13]</sup>，在炎症条件下，机体内免疫细胞 AChE 表达增加，且 AChE 能反馈性提高炎症因子水平，参与 NF- $\kappa\text{B}$  炎症信号转导通路激活，进而影响炎症发生、发展过程<sup>[14-15]</sup>。而通过降低 AChE 表达或活性，能够一定程度上抑制炎症因子的释放水平<sup>[16-17]</sup>。更进一步的，多数异喹啉类生物碱在发挥抗炎活性同时，亦表现出较好的 AChE 抑制作用<sup>[18]</sup>。异喹啉类生物碱的抗炎及其 AChE 抑制活性呈现一定相关性，如季胺型异喹啉类生物碱及异喹啉母核氢化后的叔胺型生物碱的抗炎活性与其 AChE 抑制活性呈现正相关性。异喹啉类生物碱对免疫细胞炎症调控作用与 AChE 靶点结合、 $\alpha 7\text{nAChR}$  相互作用等情况亦存在一定相关性<sup>[15]</sup>，其抗炎活性、构效关系及相关作用机制仍需进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] Baker R G, Hayden M S, Ghosh S. NF- $\kappa\text{B}$ , inflammation, and metabolic disease [J]. *Cell Metab*, 2011, 13(1): 11-22.
- [2] Amor S, Puentes F, Baker D, et al. Inflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Immunology*, 2010, 129(2): 154-169.
- [3] 杨锡强. 单核巨噬细胞活化在炎症性疾病发病机制中的作用 [J]. 国际儿科学杂志, 2006, 33(6): 361-363.
- [4] 程轩轩, 王冬梅, 杨得坡. 异喹啉类生物碱的生物活性

- 和构效关系研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1900-1904.
- [5] 施 瑶, 李定祥, 李光平, 等. HPLC 法同时测定两面针中 5 种生物碱 [J]. 中草药, 2006, 37(1): 129-131.
- [6] 刘 璐, 吴立军, 杨春娟. 紫堇属植物中异喹啉类生物碱的化学结构和生物活性的研究进展 [J]. 实用药物与临床, 2016, 19(3): 371-380.
- [7] 刘世萍. 左氧氟沙星与阿司匹林合用致神经系统毒性一例 [J]. 中国药物与临床, 2010, 10(7): 758.
- [8] 魏志军. 糖皮质激素在儿科疾病应用中的毒副作用 [J]. 中国基层医药, 2001, 8(2): 140.
- [9] Zheng X, Wu F, Lin X, *et al.* Developments in drug delivery of bioactive alkaloids derived from traditional Chinese medicine [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 398-416.
- [10] Zhang H, Shan Y, Wu Y, *et al.* Berberine suppresses LPS-induced inflammation through modulating Sirt1/NF- $\kappa$ B signaling pathway in RAW264.7 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 52: 93-100.
- [11] Liu X H, Hu Z L, Shi Q R, *et al.* Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of compounds from *Tinospora sagittata* (Oliv.) Gagnep [J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33(7): 981-987.
- [12] Li W F, Huang H M, Zhang Y M, *et al.* Anti-inflammatory effect of tetrahydrocoptisine from *Corydalis impatiens* is a function of possible inhibition of TNF- $\alpha$ , IL-6 and NO production in lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages through inhibiting NF- $\kappa$ B activation and MAPK pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 715(1/3): 62-71.
- [13] Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, *et al.* Expression and function of the cholinergic system in immune cells [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1085.
- [14] 刘 芬, 江 榕, 李 勇, 等. 乙酰胆碱酯酶在脂多糖诱导肺泡巨噬细胞中的变化 [J]. 中华急诊医学杂志, 2014, 23(8): 871-875.
- [15] Liu Y L, Xia Y J, Kong X P, *et al.* Interacting with  $\alpha 7$  nAChR is a new mechanism for AChE to enhance the inflammatory response in macrophages [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, doi: 10.1016/j.apsb.2020.05.005.
- [16] Setoguchi D, Yatsuki H, Sadahiro T, *et al.* Effects of a peripheral cholinesterase inhibitor on cytokine production and autonomic nervous activity in a rat model of sepsis [J]. *Cytokine*, 2012, 57(2): 238-244.
- [17] Pavlov V A, Parrish W R, Rosas-Ballina M, *et al.* Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. *Brain Behav Immun*, 2009, 23(1): 41-45.
- [18] Lin Y, Guo H C, Kuang Y, *et al.* AChE inhibitory alkaloids from *Coptis Chinensis* [J]. *Fitoterapia*, 2020, 141: 104464.