

牡蒿对脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞炎症模型的抗炎作用及其机制

申文静^{1,2}, 郭容², 龚松², 向微¹, 张书环^{1,3}, 汪思齐^{1,3*}

1. 贵州中医药大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550055

2. 贵州中医药大学 药学院, 贵州 贵阳 550055

3. 贵州中医药大学 司法鉴定所, 贵州 贵阳 550000

摘要: **目的** 基于脂多糖诱导小鼠单核巨噬细胞 (RAW 264.7) 构建的体外细胞炎症模型, 探讨牡蒿 *Artemisia japonica* Thunb. 水提物的抗炎作用及其机制。 **方法** 通过 CCK-8 法检测牡蒿水提取物对 RAW 264.7 细胞活力的影响以筛选合适的牡蒿水提取物给药质量浓度。采用脂多糖 200 ng/mL 诱导 RAW 264.7 细胞建立体外炎症细胞模型。将细胞分为对照组、模型组和牡蒿水提取物 (240、480、960 $\mu\text{g/mL}$) 组, 用 Griess 试剂法检测 RAW 264.7 细胞一氧化氮 (NO) 释放水平, ELISA 法检测细胞白细胞介素 (IL) -6、IL-1 β 含量。采用 Western blotting 法检测诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS)、环氧合酶-2 (COX-2) 以及 Toll 样受体 4 (TLR4)/核因子- κB (NF- κB) 信号通路中 TLR4、核因子 κB 抑制蛋白 α (I $\kappa\text{B}\alpha$)、p-I $\kappa\text{B}\alpha$ 、p65 蛋白 (p65)、p-p65 蛋白相对表达量。 **结果** 牡蒿水提取物质量浓度为 0~960 $\mu\text{g/mL}$ 时对 RAW 264.7 细胞活力没有显著影响。与模型组相比, 牡蒿水提取物 480、960 $\mu\text{g/mL}$ 组能显著抑制 IL-6 的释放以及 COX-2 的蛋白相对表达量 ($P < 0.01$); 各质量浓度牡蒿水提取物均能显著抑制 NO、IL-1 β 的释放, iNOS、p-I $\kappa\text{B}\alpha$ 、p65、p-p65 蛋白的表达以及 I $\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白的降解 ($P < 0.01$)。 **结论** 牡蒿水提取物能抑制脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞炎症因子的分泌, 其作用机制与抑制炎症蛋白 iNOS 和 COX-2 的表达及 TLR4/NF- κB 信号通路的激活有关。

关键词: 牡蒿; 脂多糖; RAW 264.7 细胞; 白细胞介素-6、白细胞介素-1 β ; Toll 样受体 4/核因子 κB 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2025)01-0009-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.01.002

Anti-inflammatory effects and mechanisms of *Artemisia japonica* on lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages

SHEN Wenjing^{1,2}, GUO Rong², GONG Song², XIANG Wei¹, ZHANG Shuhuan^{1,3}, WANG Siqi^{1,3}

1. School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550055, China

2. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550055, China

3. Judicial Appraisal Center, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550000, China

Abstract: Objective To explore the effects and mechanisms of *A. japonica* water extract on lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages model. **Methods** CCK-8 colorimetric method was used to select the appropriate concentration of *A. japonica* on the activity of RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells were induced by lipopolysaccharide 200 ng/mL to establish *in vitro* inflammatory cell model. Cells were divided into control group, model group, and *A. japonica* (240, 480, and 960 $\mu\text{g/mL}$) groups. Griess assay was used to assess NO concentration, IL-1 β , and IL-6 content was measured by ELISA. The expression of iNOS, COX-2, and TLR4/NF- κB pathway-related proteins (TLR4, I $\kappa\text{B}\alpha$, p-I $\kappa\text{B}\alpha$, p65, p-P65) were detected by Western blotting. **Results** *A. japonica* had no significant effect on the viability of RAW 264.7 cells at the concentrations of 0 — 960 $\mu\text{g/mL}$. Compared with model group, *A. japonica* water extract 480 and 960 $\mu\text{g/mL}$ groups significantly inhibitory effects on the release of IL-6 and protein expression of COX-2 ($P < 0.01$). Each dose group of *A. japonica* water extract displayed favorable inhibitory decreased effects on release of NO and IL-1 β , expression of iNOS, p-I $\kappa\text{B}\alpha$, p65, and p-p65 proteins and degradation of I $\kappa\text{B}\alpha$. **Conclusion** *A. japonica* water extract could inhibit lipopolysaccharide-induced secretion of inflammatory factors in RAW 264.7 cells, the mechanism of which is related to

收稿日期: 2024-10-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32260925); 贵州省科技计划项目 (黔科合基础-ZK[2022]一般 507); 贵州中医药大学大学生创新创业训练计划项目 [贵中医大创合字 (2021) 84 号]

作者简介: 申文静, 本科, 研究方向为抗炎中药药理。E-mail: 1749734474@qq.com

***通信作者:** 汪思齐, 博士, 讲师, 研究方向为抗炎中药药理。E-mail: 332598280@qq.com

inhibiting the expression of inflammatory proteins iNOS and COX-2 and inhibiting the activation of TLR4/NF- κ B signaling pathway.

Key words: *Artemisia japonica*; lipopolysaccharide; RAW 264.7 cell; IL-6; IL-1 β ; TLR4/NF- κ B signaling pathway

蒿属是菊科中物种最丰富且分布最广泛的种属之一,约有 500 种。蒿属植物富含糖类、萜类及黄酮类等多种化学成分。从蒿属植物中提取的青蒿素、蛔蒿素、侧柏酮、苦艾素等成分已广泛用于治疗寄生虫、疟疾和新型冠状病毒感染等疾病,蒿属植物具有重要的药用开发潜力和经济价值^[1-2]。牡蒿 *Artemisia japonica* Thunb. 是蒿属植物的一种,在我国有着悠久的药用和食用历史。牡蒿始载于《名医别录》,又名齐头蒿、水辣菜、土柴胡等。牡蒿具有清热、凉血、清肝火、解暑、健胃、止血等功效,临床上可用于治疗夏季感冒、肺结核潮热、咯血、小儿疳热、衄血、便血、崩漏、带下、黄疸型肝炎、丹毒、毒蛇咬伤等^[3-4]。安全性评价实验表明牡蒿水提物安全性高,无明显急性毒性和生殖毒性^[4-5]。牡蒿中含有的酚酸类、黄酮类和萜类化合物,具有较好的抗氧化和抗炎作用^[6-7]。研究表明牡蒿对二甲苯引起的小鼠耳肿胀有显著的抑制作用,对小鼠胶原性关节炎也有显著的缓解作用^[3, 8]。

炎症是机体面对外界有害刺激做出的一种防御反应,在正常情况下炎症对于机体是有益的,但过度和持续的炎症反应会导致机体受到损害。大量的研究表明多种炎症性疾病的发生与发展与巨噬细胞及其释放的炎症介质有密切的联系^[9-10]。本研究拟通过脂多糖诱导小鼠单核巨噬细胞(RAW 264.7)建立体外炎症模型,观察牡蒿水提物对 Toll 样受体 4 (TLR4)/核因子- κ B (NF- κ B) 通路及多项炎症因子的调控作用,进一步探究牡蒿的抗炎作用机制,为牡蒿资源的开发和利用提供科学依据。

1 实验材料

1.1 细胞株

RAW 264.7 (CL-0190) 购于武汉普诺赛生物技术有限公司。RAW 264.7 细胞用 10% FBS+1% 双抗+DMEM 高糖培养基在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2 药物与试剂

牡蒿购于成都市恒立成生物科技有限公司,产地四川,经贵州中医药大学基础医学院形态教研室向微讲师鉴定为菊科蒿属牡蒿 *A. japonica* Thunb. 的干燥全草。PBS 缓冲液(美国 Hyclone 公司);胰酶消化液(美国 Hyclone 公司); DMED 高糖培养

基(美国 Gibco 公司);青霉素链霉素双抗(美国 Hyclone 公司);脂多糖试剂(北京索莱宝科技有限公司);CCK-8 试剂(美国 MedChem Express 公司);Griess 试剂(碧云天生物技术有限公司);白细胞介素(IL)-6、IL-1 β ELISA 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);一氧化氮合成酶(iNOS)、环氧化酶-2(Cox-2)、p-p65 蛋白(p65)、p-核因子 κ B 抑制蛋白 α (p-I κ B α)、I κ B α 、 β -肌动蛋白(β -actin) 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);p65 抗体(美国 Invitrogen 公司);Goat anti-Rabbit IgG 抗体、Goat anti-Mouse IgG 抗体(成都正能生物技术有限责任公司)。

1.3 仪器

旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器场);冷冻干燥机(上海舜制仪器制造有限公司);低温离心机(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司);隔水式电热恒温培养箱(苏州威尔实验用品有限公司);超纯水机(重庆华创水处理工程有限公司);Mini-P4 型电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);转移电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);酶标仪(北京普朗医疗设备有限公司);显影仪(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 药物制备

将牡蒿生药材打碎,加入 6 倍体积水浸泡 1 h 后,煎煮 0.5 h,滤过,残渣加 6 倍体积水继续煎煮 0.5 h,合并 2 次滤液,得牡蒿水煎液。浓缩后冷冻干燥,得到粉末,1 g 冻干粉末相当于 8.3 g 牡蒿生药材,其提取率约为 12%。使用时用培养基溶解粉末,0.22 μ m 孔径滤膜过滤除菌。

2.2 CCK-8 法检测细胞活力

取对数生长期的 RAW 264.7 细胞接种于 96 孔细胞培养板,接种密度为 2×10^4 个细胞/mL。细胞培养 24 h 后弃上清液,进行给药处理。设置对照组和药物组,每组 5 个重复。对照组加入完全培养基,药物组加入含牡蒿冻干粉末的培养基,使冻干粉的终质量浓度分别为 60、120、240、480、960 μ g/mL,处理 24 h。在 96 孔板中加入 10 μ L CCK-8 溶液混匀,然后置于 37 °C 培养箱孵育 2 h,用酶标仪测定

在 450 nm 处的吸光度 (A)，计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{给药组}} / A_{\text{对照组}}$$

2.3 细胞形态观察及 Griess 法检测细胞上清 NO 水平

取对数生长期的 RAW 264.7 细胞悬液 (密度为 2×10^4 个细胞/mL) 接种于 6 孔细胞培养 24 h，弃上清液，牡蒿水提取物组分别加入 240、480、960 $\mu\text{g/mL}$ 牡蒿水提取物溶液 2 mL 的完全培养基，对照组和模型组加入等体积完全培养基，每组 3 个重复，培养 2 h，除对照组外其他组均加入终质量浓度为 200 ng/mL 的脂多糖处理 24 h。将细胞置于倒置显微镜下拍照记录各组细胞形态。吸取 50 μL 细胞上清培养液至 96 孔细胞培养板中，依次加入 50 μL Griess 试剂 1 和 50 μL Griess 试剂 2，混匀，在常温下放置 10 min。用酶标仪在 540 nm 波长处测定 A 值，并计算 NO 的含量。

2.4 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 水平

按照 2.3 项下描述方法分组和收集细胞上清液，按照相应 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-1 β 、IL-6 的含量。

2.5 Western blotting 法检测细胞 iNOS、COX-2、p65、p-P65、I κ B α 、p-I κ B α 蛋白表达

按照 2.4 项下描述的方法分组和处理细胞，去除细胞上清后，收集细胞，加适量细胞裂解液，冰上裂解 15 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min。用 BCA 法测定蛋白浓度，加入蛋白上样缓冲液后 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min 使蛋白变性。每个样品蛋白上样量为 25 μg ，经 10% SDS-PAGE 电泳分离后，恒压 100 V 转膜 90 min，5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h，加入对应稀释的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，用 TBST 溶液洗涤后，加入二抗溶液于室温条件下孵育 1 h，洗涤后 ECL 显色。使用 Image J 软件对条带进行灰度值

分析，结果以目的蛋白相对表达量表示。

目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白积分光密度值 / 内参积分光密度值

2.6 统计学分析

实验数据采用 Prism 8.0 (GraphPad) 统计软件进行分析，结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

3 结果

3.1 牡蒿水提取物对 RAW 264.7 细胞活力的影响

如图 1 所示，与对照组相比，60、120、240、480、960 $\mu\text{g/mL}$ 牡蒿水提取物溶液对 RAW 264.7 细胞活力均没有显著影响，后续实验设置牡蒿水提取物给药浓度为 240、480、960 $\mu\text{g/mL}$ 。

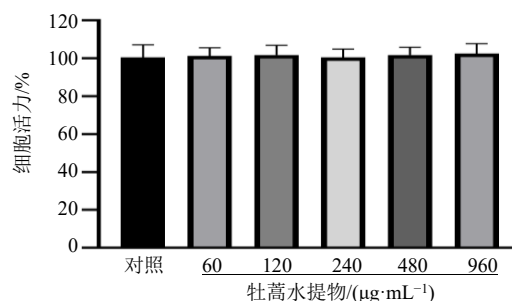


图 1 牡蒿水提取物对 RAW 264.7 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 1 Effects of *A. japonica* water extract on RAW 264.7 cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.2 牡蒿水提取物对 RAW 264.7 细胞形态的影响

如图 2 所示，对照组 RAW 264.7 细胞为饱满圆形，无伪足；模型组 RAW 264.7 细胞形态发生显著变化，大部分细胞由圆形变成长梭形极化状态，细胞伪足明显增多；经牡蒿水提取物各质量浓度组处理后，随着给药质量浓度增大，细胞伪足变短、消失，圆形细胞逐渐增多。

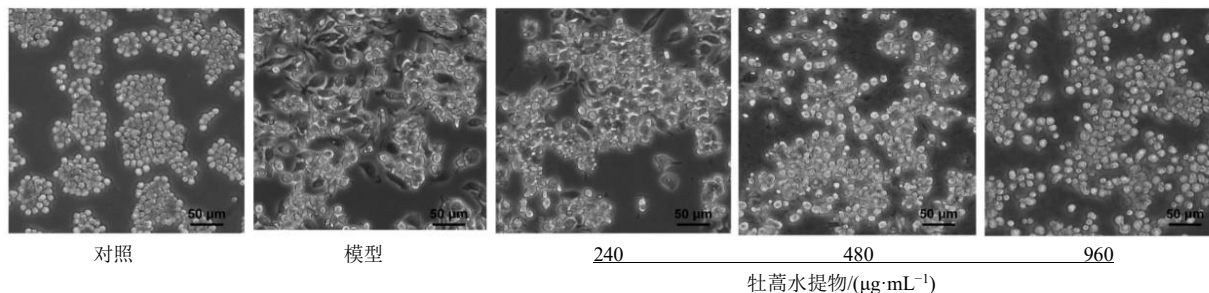


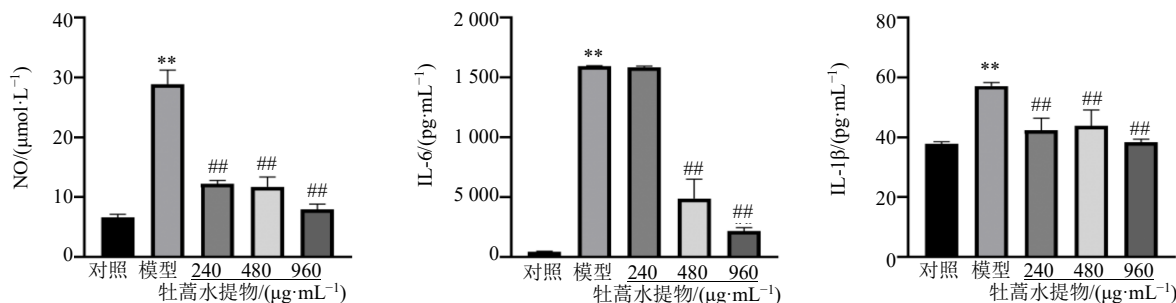
图 2 牡蒿水提取物对 RAW 264.7 细胞形态的影响

Fig. 2 Effect of *A. japonica* water extract on cell morphology of RAW 264.7

3.3 牡蒿水提取物对脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞上清液 NO、IL-6、IL-1 β 含量的影响

如图 3 所示,与对照组相比,模型组 RAW 264.7 细胞上清液中 NO、IL-6、IL-1 β 含量显著升高 ($P < 0.01$)

);与模型组相比,牡蒿水提取物各质量浓度组细胞上清液中 NO 和 IL-1 β 含量均显著下降 ($P < 0.01$),牡蒿水提取物 480、960 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞上清液中 IL-6 含量显著下降 ($P < 0.01$)。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

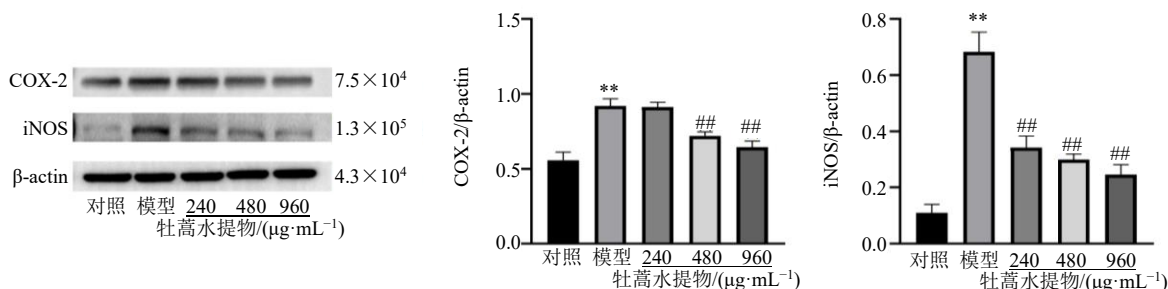
图 3 牡蒿水提取物对 RAW 264.7 细胞上清液 NO、IL-6、IL-1 β 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Effects of *A. japonica* water extract on the contents of NO, IL-6 and IL-1 β in RAW 264.7 cell supernatant ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4 牡蒿水提液对脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞 COX-2 和 iNOS 蛋白表达的影响

如图 4 所示,与对照组相比,模型组 COX-2 和 iNOS 蛋白相对表达量均显著升高 ($P < 0.01$);与

模型组相比,牡蒿水提取物 480、960 $\mu\text{g/mL}$ 组的 COX-2 蛋白相对表达量均显著下降,牡蒿水提取物各质量浓度组 iNOS 蛋白相对表达量均显著下降 ($P < 0.01$)。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 4 牡蒿水提取物对 RAW 264.7 细胞 COX-2 和 iNOS 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effects of *A. japonica* water extract on the relative expression of COX-2 and iNOS proteins in RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

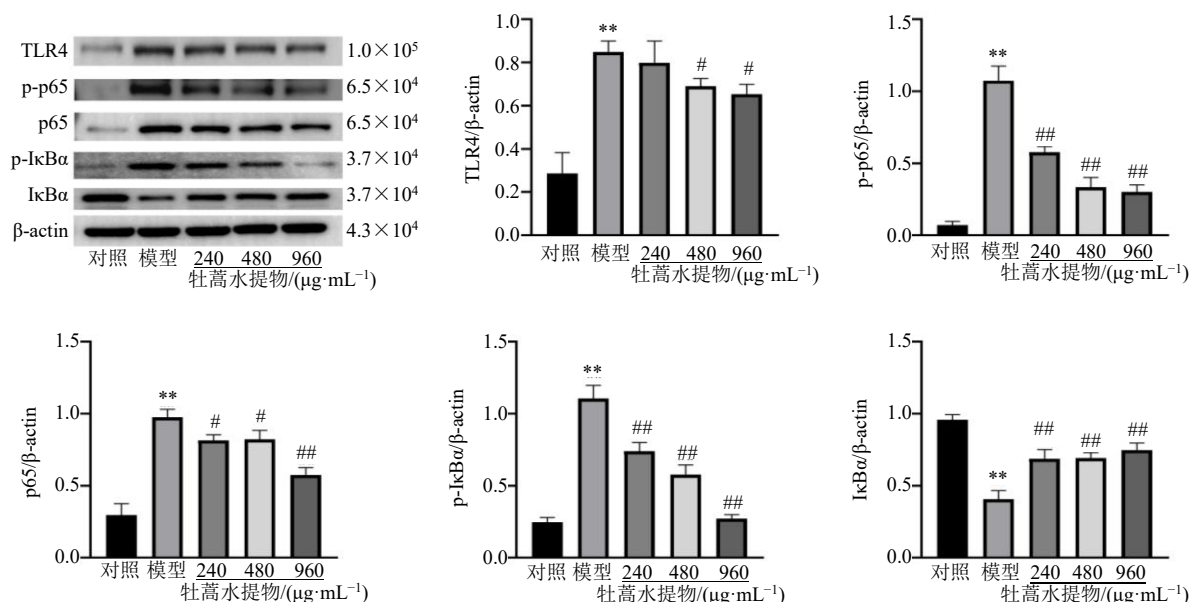
3.5 牡蒿水提液对 TLR4/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 5 所示,与对照组相比,模型组 TLR4/NF- κ B 信号通路中 TLR4、p-p65、p65、p-I κ B α 蛋白相对表达量显著上升, I κ B α 的表达量显著下降 ($P < 0.01$);与模型组相比,牡蒿水提取物各质量浓度组 p-p65、p65、p-I κ B α 的蛋白相对表达量显著下降, I κ B α 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01),牡蒿水提取物 480、960 $\mu\text{g/mL}$ 组 TLR4 蛋白相对表达量显著下降 ($P < 0.05$)。

4 讨论

脂多糖是构成革兰阴性细菌细胞壁的重要成

分,是巨噬细胞强有力的活化剂,能诱导巨噬细胞产生炎症因子如 IL-1 β 、IL-6、一氧化氮(NO)、iNOS、COX-2 等,由脂多糖诱导的 RAW 264.7 是一种经典的体外细胞炎症模型,广泛用于抗炎药物的筛选和机制研究^[10]。TLR4 是细胞识别脂多糖的关键受体,可将脂多糖信号由胞外转向胞内,许多研究表明,脂多糖可以通过 TLR4 激活下游 NF- κ B 信号通路^[11-12]。在 NF- κ B 信号通路中起主要调控作用之一的是 p65 亚基,正常情况下, NF- κ B p65 与其抑制剂 I κ B α 结合,处于非活化状态。当细胞受到各种炎性刺激时, NF- κ B 的抑制剂 I κ B α 会被磷酸化,继而被泛素化后降解,随着抑制剂 I κ B α 的降解 NF- κ B



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 5 牡蒿水提液对 RAW 264.7 细胞 TLR4/NF-κB 信号通路蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effect of *A. japonica* water extract on TLR4/NF-κB signaling pathway protein expression in RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

p65 亚基会被磷酸化, 并迁移到细胞核中, 识别并特异性结合靶基因上的 κB 位点从而激活 NF-κB 信号通路^[13-14]。目前 TLR4/NF-κB 信号已成为治疗炎症性疾病的关键靶点。

本实验利用脂多糖诱导的细胞 RAW 264.7 对牡蒿水提物的抗炎作用及其抗炎作用机制进行研究。结果表明经脂多糖处理后 RAW 264.7 中炎症介质以及炎症相关蛋白 NO、IL-6、IL-1β、iNOS、COX-2 的表达量显著上升。牡蒿水提液处理能显著降低脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞炎症因子 NO、IL-6、IL-1β 的释放以及促炎酶 COX-2、iNOS 的表达。牡蒿水提液对 TLR4/NF-κB 信号通路的调控作用研究显示牡蒿水提物能抑制脂多糖诱导的 TLR4 表达来抑制炎症信号的接收和胞内传导, 抑制 IκBα 的磷酸化和降解, 进而抑制 P65 的表达及磷酸化, 最终抑制 NF-κB 信号通路的激活。

综上所述牡蒿水提物抗炎作用机制与抑制 TLR4/NF-κB 炎症信号通路的激活从而抑制多种炎症因子的表达和释放密切相关。本研究为牡蒿资源的开发和利用提供一定的参考和理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Ur Rashid M, Alamzeb M, Ali S, *et al.* The chemistry and

pharmacology of alkaloids and allied nitrogen compounds from *Artemisia* species: A review [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(10): 2661-2684.

[2] 李海波, 石丹枫, 刘冬娴, 等. 青蒿中咖啡酰奎宁酸类成分研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(16): 5386-5397.

[3] 马媛媛, 赵洁, 姚默, 等. 牡蒿药理学研究概况 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(34): 20986-20987.

[4] 黄婷慧, 卢先明, 陈素兰, 等. 民间药“牡蒿”的安全性评价及药效学研究 [J]. *成都中医药大学学报*, 2010, 33(2): 77-79.

[5] 张德华, 程鹏飞, 凌玲. 牡蒿提取物抗氧化作用和遗传毒性研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2011, 23(1): 39-42.

[6] 张宽朝, 徐晨阳, 余佳琪, 等. 牡蒿总黄酮的提取、纯化及抗氧化活性分析 [J]. *天然产物研究与开发*, 2023, 35(2): 281-290.

[7] Ye Y Y, Li X M, Chen M, *et al.* The extracts derived from *Artemisia japonica* Thunb. leaves mitigate oxidative stress and inflammatory response induced by LPS in RAW264.7 cells through modulation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Molecules*, 2024, 29(6): 1375.

[8] Li N, Shi C C, Shi S S, *et al.* An inulin-type fructan isolated from *Artemisia japonica* and its anti-arthritis effects [J]. *J Funct Foods*, 2017, 29: 29-36.

[9] Megha K B, Joseph X, Akhil V, *et al.* Cascade of immune mechanism and consequences of inflammatory disorders

- [J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153712.
- [10] 罗静, 朱华, 张淼, 等. 蝙蝠草醇提取物对脂多糖所致 RAW 264.7 细胞炎症反应的抑制作用 [J]. 中成药, 2024, 46(8): 2763-2768.
- [11] 曾攀科, 王湘, 李雪娇, 等. 茛菪正丁醇部位抑制 TLR-4/NF- κ B 信号通路抗脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应作用研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(10): 2148-2154.
- [12] Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(4): 1233-1261.
- [13] Fitzgerald K A, Kagan J C. Toll-like receptors and the control of immunity [J]. *Cell*, 2020, 180(6): 1044-1066.
- [14] 王晓晨, 吉爱国. NF- κ B 信号通路炎症反应 [J]. 生理科学进展, 2014, 45(1): 68-71.

[责任编辑 高源]