

丹参酮 II_A 体内外抗炎作用研究

宁 剑¹, 何春玲¹, 黄健军^{2*}

1. 南宁市中医医院, 广西 南宁 530012

2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200

摘要:目的 采用体内外炎症模型研究丹参酮 II_A 抗炎活性作用及其作用机制。方法 建立脂多糖 (LPS) 诱导巨噬细胞 RAW264.7 细胞体外炎症模型, 检测不同浓度丹参酮 II_A 对炎症因子水平、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧酶 2 (COX-2) 蛋白表达及其基因表达的影响。建立二甲苯致小鼠耳廓肿胀和角叉菜胶大鼠足跖肿胀炎症模型, 探讨不同浓度丹参酮 II_A 的体内抗炎作用。结果 丹参酮 II_A 对 RAW264.7 细胞无明显毒性。与 LPS 组比较, 丹参酮 II_A 剂量在 2.5~40 mg/L 呈明显剂量相关性地抑制一氧化氮 (NO)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和白细胞介素-6 (IL-6) 释放 ($P < 0.05, 0.01$)。与 LPS 组比较, 丹参酮 II_A 呈剂量相关性地抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 iNOS 和 COX-2 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。与 LPS 组比较, 丹参酮 II_A 呈剂量相关性地下调 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中的 iNOS、COX-2、IL-1 β 和 IL-6 基因表达 ($P < 0.05, 0.01$)。丹参酮 II_A 在 10~60 mg/kg 对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀有不同程度的抑制作用, 对角叉菜胶所致大鼠足跖肿胀有不同程度的抑制作用, 并呈剂量相关性 ($P < 0.05, 0.01$), 且当丹参酮 II_A 给药剂量达到 40 mg/kg 时, 其抗炎效果强于阿司匹林。结论 丹参酮 II_A 具有抗炎作用, 其作用机制可能与减少巨噬细胞炎症介质生成和释放、炎症基因 iNOS、COX-2、IL-1 β 和 IL-6 的表达密切相关。

关键词: 丹参酮 II_A; 抗炎作用; 巨噬细胞; 脂多糖; 炎症介质

中图分类号: R965; R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2019)02 - 0292 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.02.005

Anti-inflammatory effect of tanshinone II_A *in vitro* and *in vivo*

NING Jian¹, HE Chun-ling¹, HUANG Jian-jun²

1. Nanning Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530012, China

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: Objective To study the anti-inflammatory effect and its mechanism of tanshinone II_A by inflammation model *in vivo* and *in vitro*. **Methods** An inflammatory model *in vitro* of macrophages RAW264.7 induced by LPS was established to detect the effects of tanshinone II_A with different concentrations on the inflammatory cytokines levels, the expression of iNOS and COX-2 proteins, and the gene expressions. The models of xylene-induced mice ear edema and carrageenan-induced paw edema were established to investigate the anti-inflammatory effects of different concentrations of tanshinone II_A *in vivo*. **Results** There was no cytotoxicity of tanshinone II_A on RAW264.7 cells. Compared with LPS group, tanshinone II_A could significantly inhibit the NO, IL-1 β , and IL-6 in a dose-dependent manner at 2.5 — 40 mg/L ($P < 0.05, 0.01$). Compared with LPS group, tanshinone II_A could inhibit the expression of iNOS and COX-2 protein in RAW264.7 cells induced by LPS in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). Compared with LPS group, tanshinone II_A could down-regulate the levels of iNOS, COX-2, IL-1 β and IL-6 genes in RAW264.7 cells induced by LPS in a dose-dependent manner ($P < 0.05, 0.01$). Tanshinone II_A (10 — 60 mg/kg) could show different degree of inhibitory effect on ear edema of mice caused by xylene and paw edema of rats caused by carrageenan with a dose correlation ($P < 0.05, 0.01$). When the dose of tanshinone II_A reached 40 mg/kg, its anti-inflammatory effect was stronger than aspirin. **Conclusion** Tanshinone II_A has a direct anti-inflammatory effect, which is related to macrophage inflammatory mediator production and release and the genes expression of iNOS, COX-2, IL-1 β and IL-6.

Key words: tanshinone II_A; anti-inflammatory effect; macrophage; LPS; inflammatory mediator

收稿日期: 2018-05-17

作者简介: 宁 剑 (1985—), 男, 药师, 硕士, 研究方向为临床药学。E-mail: njian8@163.com

*通信作者 黄健军 (1981—), 讲师, 从事中药民族药学的研究与开发。E-mail: hjun7514@163.com

丹参酮是从传统中药丹参根中提取到的一类脂溶性二萜类成分,是丹参中主要有效部位,具有抗肿瘤、抗菌消炎、抑制血小板聚集、保护心脑血管等作用^[1-3]。丹参酮类成分包括丹参酮 I、丹参酮 II_A、丹参酮 II_B、隐丹参酮、异隐丹参酮等 10 余种化合物。其中丹参酮 II_A 是其中主要有效成分之一,并被《中国药典》2015 年版一部选为丹参质量控制的指标性成分。研究发现,总丹参酮具有显著的抗炎活性^[4-5]。因此,本研究采用体外脂多糖诱导巨噬细胞炎症模型和体内二甲苯、角叉菜胶致肿胀模型对丹参酮 II_A 的抗炎作用及其作用机制进行研究,以期得到高效、低毒的丹参酮类抗炎先导化合物。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

FA (N) /JA (N) 系列 MINQI \ / O 电子天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司); ELx800 通用酶标仪 (美国 BioTek 公司); Multiskan Ascent 酶标仪 (美国 Thermo Electron 公司); 超净工作台 (北京半导体设备一厂); BB16/BB5060 仪器 CO₂ 培养箱 (上海力创科学仪器有限公司); CKX31 型倒置显微镜 (奥林巴斯公司), PCR 扩增仪、电泳仪系统 (美国 Biorad 公司)。

丹参酮 II_A (百灵威科技有限公司, 质量分数 ≥ 98%, 货号 T2987)。在体外实验中, 取 5 mg 丹参酮 II_A 用 5 mL 二甲基亚砷 (DMSO) 溶解后, 再用培养基稀释成 2.5、5、10、20、30、40 mg/L, 备用; 在动物体内实验中, 取 100 mg 丹参酮 II_A, 根据实验动物的体质量, 用生理盐水首先配制 60 mg/mL, 再用生理盐水稀释成 10、20、30、40、50、60 μg/mL, 备用。

Trizol 试剂盒 (北京百奥森泰生物技术有限公司, 货号 B131905); 总蛋白提取试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, 货号 P0033); NO 检测试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, 货号 S0021); TNF-α ELISA 检测试剂盒 (北京达科为生物技术有限公司, 货号 EA-0203); IL-1β ELISA 检测试剂盒 (北京达科为生物技术有限公司, 货号 432601); IL-6 ELISA 检测试剂盒 (北京达科为生物技术有限公司, 货号 KOA0227), Western blotting 试剂 (Sigma 公司, 货号 V900301); Realtime-PCR 检测试剂盒 (美国 Invitrogen 公司, 货号 K1213); iNOS 单克隆抗体 (美国 Cell Signal 公司, 货号 13120); COX-2 单克隆抗体 (美国 Cell Signal 公司, 货号 4842); PCR 引物

由上海生物工程服务有限公司合成, DMEM 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司; 二甲基亚砷等其他试剂均为分析纯。

昆明种小鼠, 体质量 19~22 g; SD 大鼠, 体质量 200~250 g, 雌雄各半, 由广西医科大学实验动物中心提供, 动物使用许可证号 SCXK (桂) 2009-0002。小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购自武汉大学细胞典藏中心。

1.2 丹参酮 II_A 对 RAW264.7 细胞活力的影响

取对数生长期的 RAW264.7 细胞铺至 96 孔板中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 12 h, 加入 2.5、5、10、20、30、40 mg/L 丹参酮 II_A 溶液, 对照组加入培养基 100 μL, 空白组加入 PBS 100 μL, 继续培养 24 h 后, 每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL, 继续培养 4 h, 使用酶标仪在 450 nm 处测定每孔的吸光度 (A) 值, 计算抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.3 丹参酮 II_A 对脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW264.7 的细胞释放 NO、TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的影响

称取 6.9 mg NaNO₂ 加入一级水, 定容至 25 mL, 其浓度为 4 mmol/L; 将其稀释成 40、20、10、5、2.5、1.25 μmol/L。在 96 孔板中每孔加入上述 100 μL 不同浓度的 NaNO₂ 溶液, 平行进行 3 个复孔, 随即每孔再加入 Griess 试剂 100 μL, 震荡 1 min 后在酶标仪上 540 nm 波长处测定每孔 A 值, 绘制标准曲线, 得线性方程 $Y = 0.0104 X + 0.0498 (r = 0.9994)$ 。取对数生长期的 RAW 264.7 细胞铺至 96 孔板中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 12 h, 弃掉培养基, 每孔加入浓度为 2.5、5、10、20、30、40 mg/L 丹参酮 II_A 和 10 mg/mL LPS 100 μL, 对照组加入培养基 100 μL, 平行进行 3 个复孔, 继续培养 24 h, 每孔再加入 100 μL Griess 试剂, 震荡 1 min 后在酶标仪上 540 nm 波长处测定每孔 A 值。将测得 A 值根据线性方程计算 NO 含量。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{LPS}} - A_{\text{对照}})$$

在反应板中孔板加入 100 μL 31.25、62.5、125、250、500 ng/L TNF-α、31.25、62.5、125、250、500 ng/L IL-1β 和 62.5、125、250、500、1 000 ng/L IL-6 对照品, 避光 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1.5 h, 洗板 3 次; 每孔加入生物素化工作液 100 μL, 避光 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h, 洗板 3 次; 每孔再加入酶结合工作液 100 μL, 避光 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 0.5 h, 洗板 3 次; 每孔再加入 100 μL

显色底物, 避光 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 15 min; 每孔加入 100 μL 终止液, 混匀后在酶标仪上 490 nm 波长处测定每孔 A 值, 绘制标准曲线。其中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的线性方程分别为 $Y=0.0018X+0.0532$ ($r=0.9996$), $Y=0.0013X+0.0905$ ($r=0.9996$), $Y=0.0021X+145$ ($r=0.9998$)。将对数生长期的 RAW 264.7 细胞铺至 96 孔板中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 12 h, 弃掉培养基, 每孔加入 2.5、5、10、20、30、40 mg/L 丹参酮 II_A 和 10 mg/mL LPS 100 μL, 对照组加入 100 μL 培养基, 平行进行 3 个复孔, 继续培养 24 h, 收集细胞, 在 1 500 r/min 离心 5 min 后, 取上清液于 1.5 mL 离心管中; 再按照标准曲线的操作方法, 将上清液加入到反应板中; 其中 IL-1β 上清液在反应板中孵育 4.5 h, IL-6 孵育 1.5 h, TNF-α 将上清液稀释 15 倍后再孵育 1.5 h。平行进行 3 个复孔, 接着按照绘制曲线的后续操作测定 A 值, 计算 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的含量和抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{LPS}} - A_{\text{对照}})$$

1.4 丹参酮 II_A 对 iNOS、COX-2 蛋白水平的影响

在 NO、TNF-α、IL-1β 和 IL-6 测试中发现, 丹参酮 II_A 在 10 mg/L 对 NO、IL-1β 和 IL-6 有较好的抑制率, 因此在检测丹参酮 II_A 对 iNOS、COX-2 蛋白水平时使用 10、20 mg/L 进行测试, 其中不加 LPS 诱导和丹参酮处理的为对照组, 只加 LPS 诱导不加丹参酮处理的为阳性对照组。

取对数生长期的 RAW264.7 细胞铺至 6 孔板中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 12 h, 加入 0、10、20 mg/L 丹参酮 II_A 和 10 mg/mL LPS, 其中对照组不加丹参酮 II_A 和 LPS, 继续培养 48 h, 弃去培养基, PBS 洗涤, 加入 1 mL 裂解液裂解细胞, 收集裂解液和细胞碎片离心, 取上清液。将蛋白质样品煮沸 5 min, 加样至泳道, 在 SDA-PAGE 凝胶中电泳, 蛋白转至 PVDF 膜, 将 PVDF 膜置含有 5% 脱脂奶粉的封闭液中, 摇床摇动封闭 1 h。加一抗, 4 °C 过夜, 洗涤后加二抗孵育, 洗膜, 显影。

1.5 丹参酮 II_A 对 iNOS、COX-2、IL-1β 和 IL-6 基因表达的影响

将 RAW264.7 细胞培养在 30 mm 细胞培养皿中, 加入 2.5、5、10、20、30、40 mg/L 丹参酮 II_A 孵育 40 min 后, 加入 LPS 继续孵育 1.5 h, 再加入 Trizol 试剂, 按照试剂盒的说明书提取 RNA, 所用的 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.0。按照 RT 试剂盒说

明书用 PCR 进行聚合酶链反应, 确认 RT-PCR 的扩增曲线和融解曲线, 计算出反应体系中待测样本 cDNA 达到设定阈值的循环数 (Ct), 再根据 Ct 值比较出基因的表达式。其中 iNOS, COX-2、IL-1β 和 IL-6 的基因引物序列分别为: iNOS 上游引物 5'-G CCTCATGCCTTGATTCAT-3', 下游引物 5'-GAGG GTGAATTCCAGA-3'; COX-2 上游引物 5'-GATAC GTGTTGACGACGTCCAGA-3', 下游引物 5'-GTCT GTCTAGAGTTTCACCG-3'; IL-1β 上游引物 5'-CCT GTGGCCTTGGGCCTCAA-3', 下游引物 5'-GGTGC TGATGTACCAGTTGGG-3'; IL-6 上游引物 5'-TTC CCTACTTCACAAGTC-3', 下游引物 5'-ACTAGGT TTGCCGAGTAG-3'。

1.6 丹参酮 II_A 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响

小鼠的临床等效量按照成人每日临床用量 20 mg 药物计算, 为 20 mg × 70 kg × 0.02 = 24 mg/kg; 以此临床等效量作为小鼠的给药低剂量, 并以此剂量的 3 倍作试验时的最高剂量; 因此将给药剂量定在 10~60 mg/kg。取 100 mg 丹参酮 II_A, 根据实验动物的质量, 用生理盐水首先配制成 60 mg/kg, 再用生理盐水稀释成 10、20、30、40、50、60 mg/kg。

取昆明种小鼠 80 只, 雌雄各半, 按体质量随机分为 8 组, 每组 10 只。对照组 ig 等体积的生理盐水, 阿司匹林组 ig 阿司匹林 0.5 mg/kg, 丹参酮 II_A 组 ig 10~60 mg/kg 丹参酮 II_A, 给药体积均为 0.4 mL, 1 次/d, 连续给药 3 d。于末次给药 30 min 后, 用二甲苯 50 μL/只均匀地涂抹小鼠右耳致炎, 左耳作对照, 致炎 1 h 后将小鼠处死, 用 9 mm 打孔器在两耳相同位置打下耳片, 称定质量, 计算各组小鼠的耳片肿胀度和抑制率^[6]。

$$\text{耳片肿胀度} = \text{致炎侧耳片质量 (右耳)} - \text{对照侧耳片质量 (左耳)}$$

$$\text{抑制率} = 1 - \text{给药组肿胀度} / \text{对照组肿胀度}$$

1.7 丹参酮 II_A 对角叉莱胶致大鼠足跖肿胀的影响

为了在研究中统一剂量, 大鼠的给药剂量与小鼠的一致。丹参酮 II_A 的 50% 肿胀抑制率的剂量为 20~30 mg/kg。因此, 在大鼠实验中丹参酮 II_A 的剂量也采用 10、20、30、40、50、60 mg/kg。取 SD 大鼠 80 只, 雌雄各半, 按照二甲苯致小鼠耳廓肿胀试验项下方法进行分组和给药。于末次给药后 1 h 给每只大鼠左后足跖 sc 1% 角叉莱胶溶液 0.05 mL, 致炎后 30 min 和 1、2、4、5、6 h 观察并测量大鼠两后肢足跖厚度, 计算足跖相对肿胀度和肿胀抑制

率^[6]。

足趾相对肿胀度 = (左足趾厚度 - 右足趾厚度) / 右足趾厚度

足趾肿胀抑制率 = 1 - 给药组足趾相对肿胀度 / 阴性足趾相对肿胀度

1.8 统计学分析

实验全部统计数据使用 SPSS 19.0 软件包进行统计分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差检验。

2 结果

2.1 丹参酮 II_A 对 RAW264.7 细胞活力的影响

CCK-8 测试结果表明, 丹参酮 II_A 在浓度达到 40 mg/L, 与巨噬细胞 RAW264.7 作用 24 h 时, 对 RAW264.7 细胞活性仍然没有明显的影响。因此选取的丹参酮 II_A 剂量 2.5~40 mg/L 与对照组比较对 RAW264.7 细胞无明显毒性, 是安全剂量。见表 1。

2.2 丹参酮 II_A 对 LPS 诱导的 RAW264.7 的细胞释放 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 影响

与对照组比较, LPS 组 RAW264.7 细胞释放 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平显著增加 ($P < 0.05$),

这说明 LPS 能够诱导 RAW264.7 释放出大量的炎症介质。与 LPS 组比较, 丹参酮 II_A 在 2.5~40 mg/L 呈剂量相关性地抑制 NO、IL-1 β 和 IL-6 的释放 ($P < 0.05, 0.01$), 但对 TNF- α 的影响较小, 即使在 40 mg/L 时也仅展现出了轻微的抑制作用, 见表 2。

表 1 丹参酮 II_A 对 RAW264.7 细胞的细胞毒性作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of tanshinone II_A on cytotoxicity of RAW 264.7 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/(mg L ⁻¹)	A 值	抑制率/%
对照	—	1.297 ± 0.027	—
丹参酮 II _A	2.5	1.319 ± 0.063	-1.7
	5	1.324 ± 0.099	-2.1
	10	1.315 ± 0.122	-1.4
	20	1.308 ± 0.086	-0.87
	30	1.263 ± 0.105	2.7
	40	1.258 ± 0.071	3.1

表 2 丹参酮 II_A 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of tanshinone II_A on the NO, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in RAW264.7 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ (mg L ⁻¹)	NO		TNF- α		IL-1 β		IL-6	
		浓度/(μ mol L ⁻¹)	抑制率/%	浓度/(ng L ⁻¹)	抑制率/%	浓度/(pg L ⁻¹)	抑制率/%	浓度/(ng L ⁻¹)	抑制率/%
对照	—	3.01 ± 0.41	—	20.08 ± 1.25	—	18.95 ± 1.06	—	298 ± 15	—
LPS	10	23.69 ± 2.12 [#]	—	126.95 ± 7.64 [#]	—	112.86 ± 9.39 [#]	—	4 306 ± 207 [#]	—
丹参酮 II _A	2.5	19.82 ± 1.58 [*]	18.7	124.84 ± 11.27 [*]	2.0	91.53 ± 4.25 [*]	22.7	3 672 ± 195 [*]	15.8
	5	16.35 ± 1.36 [*]	20.6	124.17 ± 8.59 [*]	2.6	77.28 ± 5.61 [*]	37.9	2 951 ± 183 [*]	33.8
	10	11.71 ± 1.15 [*]	34.8	122.35 ± 9.93 ^{**}	4.3	53.04 ± 2.97 [*]	63.7	2 144 ± 168 [*]	53.9
	20	8.83 ± 0.86 ^{**}	33.1	121.62 ± 10.31 ^{**}	5.0	41.76 ± 3.05 ^{**}	75.7	1 869 ± 151 ^{**}	60.8
	30	5.58 ± 0.39 ^{**}	55.8	121.19 ± 8.58 ^{**}	5.4	35.19 ± 2.72 ^{**}	82.7	1 653 ± 112 ^{**}	66.2
	40	3.04 ± 0.26 ^{**}	98.8	115.81 ± 9.77 ^{**}	10.4	27.35 ± 2.48 ^{**}	91.1	1 385 ± 98 ^{**}	72.9

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs LPS group

2.3 丹参酮 II_A 对 iNOS、COX-2 蛋白水平的影响

与对照组比较, 在 LPS 的刺激下 RAW264.7 细胞诱导的 iNOS 和 COX-2 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$)。与 LPS 组比较, 丹参酮 II_A 呈现剂量相关性地抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 iNOS 和 COX-2 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 见图 1、表 3。

2.4 丹参酮 II_A 对 iNOS、COX-2、IL-1 β 和 IL-6 基因表达的影响

在正常的 RAW264.7 细胞中, iNOS、COX-2、IL-1 β 和 IL-6 的基因水平均低表达, 而经 LPS 刺激

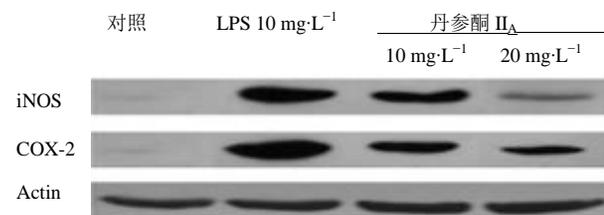


图 1 丹参酮 II_A 对 RAW264.7 细胞的 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of tanshinone II_A inhibited iNOS and COX-2 expression in LPS-induced RAW264.7 cells

表3 丹参酮 II_A对 RAW264.7 细胞的 iNOS 和 COX-2 蛋白的相对表达量的影响

Table 3 Effect of tanshinone II_A on the relative expression of iNOS and COX-2 proteins in RAW264.7 cells

组别	浓度/ (mg L ⁻¹)	相对表达量/%	
		iNOS	COX-2
对照	—	2.6±0.65	3.2±1.03
LPS	10	89.2±6.46 [#]	94.4±3.88 [#]
丹参酮 II _A	10	58.2±5.17 ^{**}	64.6±5.82 ^{**}
	20	24.6±2.12 ^{**}	32.3±2.58 ^{**}

与对照组比较: [#]P<0.05; 与 LPS 组比较: ^{**}P<0.01

[#]P < 0.05 vs control group; ^{**}P < 0.01 vs LPS group

后 RAW264.7 细胞中的炎症因子表达均上调 (P<0.05); 与 LPS 组比较, 丹参酮 II_A 呈剂量相关性地

下调 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中的炎症基因水平 (P<0.05、0.01), 见表 4。

2.5 丹参酮 II_A对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀的影响

丹参酮 II_A在 10~60 mg/kg 的剂量下对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀呈剂量相关性抑制作用 (P<0.05、0.01)。当丹参酮 II_A 给药剂量达到 40 mg/kg 时, 其抗炎效果与阿司匹林相当, 见表 5。

2.6 丹参酮 II_A对角叉菜胶所致大鼠足跖肿胀的影响

丹参酮 II_A在 10~60 mg/kg 的剂量下对角叉菜胶所致的大鼠足跖肿胀有不同程度的抑制作用, 并呈剂量相关性抑制作用 (P<0.05、0.01)。当丹参酮 II_A 的给药剂量达到 40 mg/kg 时, 其抗炎效果强于阿司匹林, 见表 6。

表4 丹参酮 II_A对 RAW264.7 细胞 iNOS, COX-2, IL-1β和 IL-6 基因表达的影响 (x̄ ± s, n = 3)

Table 4 Effect of tanshinone II_A on iNOS, COX-2, IL-1β, and IL-6 expression in RAW264.7 cells (x̄ ± s, n = 3)

组别	浓度/(ng mL ⁻¹)	iNOS	COX-2	IL-1β	IL-6
对照	—	0.002±0.002	0.006±0.005	0.001±0.002	0.003±0.001
LPS	10	1.000±0.067 [#]	1.000±0.084 [#]	1.000±0.091 [#]	1.000±0.055 [#]
丹参酮 II _A	2.5	0.854±0.024 [*]	0.792±0.051 [*]	0.853±0.027 [*]	0.884±0.076 [*]
	5	0.702±0.069 [*]	0.645±0.073 [*]	0.804±0.074 [*]	0.791±0.064 [*]
	10	0.523±0.045 [*]	0.517±0.044 [*]	0.717±0.070 [*]	0.605±0.059 [*]
	20	0.467±0.071 [*]	0.463±0.036 ^{**}	0.652±0.057 ^{**}	0.548±0.052 ^{**}
	30	0.339±0.036 ^{**}	0.378±0.045 ^{**}	0.541±0.041 ^{**}	0.412±0.031 ^{**}
	40	0.285±0.028 ^{**}	0.306±0.019 ^{**}	0.428±0.033 ^{**}	0.346±0.029 ^{**}

与对照组比较: [#]P<0.05; 与 LPS 组比较: ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01

[#]P < 0.05 vs control group; ^{*}P < 0.05 ^{**}P < 0.01 vs LPS group

表5 丹参酮 II_A对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响 (x̄ ± s, n = 10)

Table 5 Effects of tanshinone II_A on xylenen-induced ear edema in mouse (x̄ ± s, n = 10)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	相对肿胀度/mg	抑制率/%
模型	—	20.63±2.25	—
阿司匹林	0.5	10.04±0.97 [*]	51.33
丹参酮 II _A	10	17.16±1.39 [*]	16.82
	20	15.32±1.15 [*]	25.74
	30	13.04±1.42 [*]	36.79
	40	9.98±0.86 ^{**}	51.62
	50	8.65±1.34 ^{**}	58.07
	60	7.51±1.18 ^{**}	63.59

与对照组比较: ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01

^{*}P < 0.05 ^{**}P < 0.01 vs control group

表6 丹参酮 II_A 对角叉莱胶致大鼠足跖肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 6 Effects of tanshinone II_A on carrageenan-induced paw edema in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	相对肿胀度/mg	抑制率/%
模型	—	0.84±0.04	—
阿司匹林	0.5	0.26±0.01**	69.04
丹参酮 II _A	10	0.64±0.11*	23.81
	20	0.57±0.03*	32.14
	30	0.32±0.07**	61.90
	40	0.24±0.02**	71.43
	50	0.17±0.06**	79.76
	60	0.12±0.04**	85.71

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

炎症是机体对损伤性刺激的一种防御反应,是感染和许多疾病最基本的病理过程。当机体受到炎性刺激时,活化的巨噬细胞诱导合成并释放大量炎症介质 NO、TNF- α ,并进一步诱导 IL-1 β 、IL-6 等炎症因子的产生,从而导致机体产生一系列炎症反应,严重的炎症反应会使得机体出现中毒性休克,多器官功能衰竭等症状^[7]。

NO 是一种生物活性气体分子,它不仅能够传递细胞间信息,还参与介导细胞免疫和炎症毒性反应。其中过量产生 NO 与炎症有着密切的关系^[8]。在急性炎症部位,致炎物质和炎症介质将诱导并增加 NO 的合成与释放。NO 不仅本身就具有细胞毒性,还能与一些游离基团例如氧自由基反应生成 ONOO-等毒性更强的分子,从而进一步促进炎症部位渗出和水肿^[9]。在活化的巨噬细胞中,诱生型 iNOS 水平对 NO 的产生起着主要作用。因此,调节 NO 的合成或 iNOS 表达是治疗炎症的有效靶点。本研究发现,丹参酮 II_A 在 2.5~40 mg/L 对 LPS 诱导巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 具有显著的抑制作用,并对巨噬细胞 iNOS 表达也有明显的抑制作用,在转录水平上对 iNOS 基因表达具有负向调节作用,这些结果说明丹参酮 II_A 具有双重抑制 NO 合成的机制,一方面通过直接抑制 NO 的合成,另一方面通过抑制 iNOS 表达来减少 NO 的合成。

在炎症反应中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等细胞因子的释放也可促进炎症反应和组织损伤^[10]。TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 作为一类起始的促炎因子,它们作用于血管内皮细胞,使之表达黏附分子并分泌趋化性细胞因子,参与血管内皮黏附,刺激中性粒细胞和

单核细胞活化释放出炎症介质,从而引起炎症反应。同时,在 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 基因的启动子和增强子中存在一个或多个 κ B 序列。NF- κ B 的活化对于 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达是必需的,并且 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 在其活化级联中的各个点调节 NF- κ B。活化的 NF- κ B 入核后与 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 基因启动子区的特异位点结合调节 LPS 刺激下 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 基因的表达^[11]。因此,抑制致炎物质的产生释放,则会产生抗炎效应。在本实验中,丹参酮 II_A 能够显著地抑制 IL-1 β 和 IL-6 的产生和释放,在转录水平上对 IL-1 β 和 IL-6 基因表达也具有负向调节作用,这些结果说明丹参酮 II_A 也能够通过抑制细胞因子 IL-1 β 和 IL-6 来发挥抗炎作用。然而丹参酮 II_A 对 TNF- α 的影响并不明显,只有在高浓度下才表现出一定的抑制作用。这可能是由于细胞因子之间是一个复杂的网络样结构,在抑制 NO、IL-1 β 、IL-6 因子产生的同时也可能会促进了 TNF- α 因子的表达。事实上, TNF- α 除了与 IL-1 β 、IL-6 有着共同的信号通路外,它还有与转录因子 PLS 诱导的 TNF- α 因子的调节有关。

此外,前列腺素 (PGE₂) 是炎症的重要介质之一,具扩张血管、致痛等活性,并加强组胺、缓激肽的效应以增强血管通透性、加强其他趋化因子的作用,使白细胞向炎区聚集,从而引起水肿、局部红斑等炎症反应^[12]。PGE₂ 是巨噬细胞在炎症刺激下通过环氧合酶尤其是 COX-2 合成,因此抑制 COX-2 表达可减少 PGE₂ 合成,起到抗炎作用。本研究发现,丹参酮 II_A 还可通过抑制 COX-2 表达,从而减少 PGE₂ 合成起到抗炎作用,这可能是丹参

酮 II_A 抗炎的另一主要作用机制。

通过二甲苯致小鼠耳廓肿胀和角叉莱胶大鼠足跖肿胀炎症模型研究发现, 丹参酮 II_A 在体内也具有明显的抗炎效果。而当丹参酮 II_A 给药剂量达到 40 mg/kg 时, 其抗炎效果强于阳性药物阿司匹林。

综上所述, 丹参酮 II_A 具有抗炎作用, 在体内外均具有良好的抗炎效果, 其抗炎作用与减少巨噬细胞生成和释放炎症介质、抑制花生四烯酸代谢途径 PGE₂ 合成的关键酶 COX-2 有密切关系。

参考文献

- [1] 蔡丽萍, 习志刚, 杨 红. 丹参酮的药理作用和临床研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2008, 24(3): 321-324.
- [2] 郝文慧, 赵文文, 陈修平. 丹参酮类抗肿瘤作用与机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(8): 1041-1044.
- [3] Cui Z T, Liu J P, Wei W L. The effects of tanshinone II_A on hypoxia /reoxygenation-induced myocardial microvascular endothelial cell apoptosis in rats via the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016(83): 1116-1126.
- [4] 张 坤, 陈纪宝, 秦 丽, 等. 丹参抗炎分子靶点的计算机虚拟筛选和抗炎实验研究 [J]. 上海医学, 2015, 38(11): 835-838.
- [5] Feng J, Li S, Chen H. Tanshinone II_A inhibits myocardial remodeling induced by pressure overload via suppressing oxidative stress and inflammation: Possible role of silent information regulator 1 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016(791): 632-639.
- [6] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 272-273.
- [7] 邱海波. 多器官功能衰竭综合征与全身炎症反应综合征 [J]. 辽宁医学杂志, 2002, 16(3): 113-115.
- [8] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 428-435.
- [9] Crosswhite P, Sun Z. Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension [J]. *J Hypertens*, 2010, 28(2): 201-212.
- [10] 林海珊, 欧 敏. 诱导型一氧化氮合成酶及其相关分子的研究进展 [J]. 现代医学, 2015, 43(5): 644-647.
- [11] Krappmann D, Wegener E, Sunami Y, et al. The IkappaB kinase complex and NF-kappaB act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(14): 6488-6500.
- [12] 薛 瑞, 苗一非, 杨吉春, 等. 前列腺素 E₂ 对免疫细胞及炎症相关疾病的调控作用 [J]. 生理学进展, 2011, 42(3): 165-168.