

甘草次酸及其衍生物 TY501 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖的影响

靳如芳¹, 刘 静², 张金晓², 田义红^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津市新药安全评价中心, 天津 300193

摘要: 目的 探究甘草次酸及其衍生物 TY501 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖的影响。方法 以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为靶细胞, 设置空白组, 脂多糖 (LPS) 1 $\mu\text{g/mL}$ 处理组 (模型组), LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ 加 80、40、20、10 $\mu\text{g/mL}$ 药物处理组 (受试药物 TY501, 对照药物泼尼松龙、甘草次酸、吡罗昔康), 每组设置 4 个复孔在给药刺激 24 h 后按照 CCK-8 试剂盒说明测定各药物对细胞增殖抑制率。结果 TY501 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 233 $\mu\text{g/mL}$, 泼尼松龙 IC_{50} 为 1 571 $\mu\text{g/mL}$, 甘草次酸 IC_{50} 为 31 $\mu\text{g/mL}$, 吡罗昔康 IC_{50} 为 14 187 $\mu\text{g/mL}$ 。结论 甘草次酸对 RAW264.7 巨噬细胞的增殖具有明显的抑制作用, 甘草次酸衍生物 TY501 也可抑制小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的增殖, 在同等质量浓度条件下其对小鼠巨噬细胞增殖的抑制程度强于泼尼松龙, 弱于甘草次酸, 表明甘草次酸及其衍生物 TY501 对于小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖的抑制作用可能是其发挥抗炎作用的机制之一。

关键词: 甘草次酸; 甘草次酸衍生物; 抗炎; 细胞增殖; RAW264.7

中图分类号: R971.1 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 6376 (2011) 04 - 0255 - 03

Effect of glycyrrhetic acid and its derivative TY501 on the proliferation of murine macrophage RAW264.7

JIN Ru-fang¹, LIU Jing², ZHANG Jin-xiao², TIAN Yi-hong²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Centre for Drug Safety Assessment and Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To investigate the effect of glycyrrhetic acid and its derivative TY501 on the proliferation of murine macrophage RAW264.7. **Methods** Murine macrophage cells RAW264.7 were used as target cells, and the negative control group with only RAW264.7, model group with LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ treatment, and treatment groups with LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ plus 80, 40, 20, and 10 $\mu\text{g/mL}$ of each drug (test drugs TY501, control drug prednisolone, glycyrrhetic acid, and piroxicam) were set. Each group set four holes and after 24 h of administration, CCK-8 Kit was used for the determination of cell proliferation rates stimulated by different drugs. **Results** According to CCK-8 Kit determination results, half of the initial inhibition rate (IC_{50}) of the glycyrrhetic acid was 31 $\mu\text{g/mL}$, TY501 IC_{50} 233 $\mu\text{g/mL}$, Prednisolone 1 571 $\mu\text{g/mL}$, and Piroxicam 14 187 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** The glycyrrhetic acid has significantly inhibition on the proliferation of RAW264.7 as well as TY501, in a certain range of concentration, could inhibit the proliferation of murine macrophages RAW264.7. In the same degree of the concentration the inhibition of TY501 on cell proliferation is greater than those of Prednisolone and Piroxicam while less than that of glycyrrhetic acid, which indicates the inhibition of glycyrrhetic acid and its derivative TY501 on the proliferation of murine macrophage RAW264.7 may be one of the possible mechanisms of anti-inflammation.

Key words: glycyrrhetic acid; glycyrrhetic acid derivative; anti-inflammatory; cell proliferation; RAW264.7

甘草次酸是传统中药甘草发挥抗炎作用的主要药效成分。20 世纪 50 年代开始, 中外许多学者研究证明甘草次酸具有抗炎作用, 对多种急、慢性炎症均有明显的抑制作用。朱任之^[1]报道甘草次酸钠

多次 ig 使巴豆油诱发的小鼠耳肿减轻, 并抑制佐剂性关节炎大鼠足肿胀; 柯文娟等^[2]还研究了甘草次酸对白血病细胞的抑制作用。Anderso 和 Tillman 最早注意到甘草次酸在结构上同氢化可的松类似, 找

收稿日期: 2011-04-06

作者简介: 靳如芳 (1985-) 女, 天津中医药大学硕士研究生, 主要从事药理毒理学方面的研究。E-mail: jinrufang008@163.com

*通讯作者 田义红, 男, 研究员, 硕士生导师。E-mail: tianyihong@163.com

到了其抗炎作用的理论依据。付玉杰等^[3]采用超临界萃取法提取甘草中的甘草次酸。由天津药物研究院合成并提供的新型 11-脱氧甘草次酸-30-酰胺衍生物 (TY501), 经过前期一系列动物体内药效学实验发现其有很强的抗炎作用^[4], 本实验以离体培养的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为靶细胞, 观察甘草次酸及 TY501 对巨噬细胞增殖的抑制作用, 初步探索甘草次酸及 TY501 的可能抗炎作用机制。

1 材料

1.1 试验药物

受试药物甘草次酸 (白色结晶性粉末, 质量分数 98.5%, 批号 20100114, 西安富捷药业有限公司)、TY501 (类白色粉末, 质量分数 97.8%, 批号 20100512, 天津药物研究院化学制药部); 对照药物泼尼松龙 (白色结晶粉末, 质量分数 98.2%, 批号 PL100107, 天津天药业股份有限公司)、吡罗昔康 (微黄绿色结晶粉末, 质量分数 99.0%, 批号 200912048, 开封制药集团有限公司)。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基 (Gibco LOT8110130), 胎牛血清 FBS (Gibco LOT737443), Pen-Strep (Gibco LOT730839), 0.25%胰酶 (Gibco LOT774748), 脂多糖 (LPS) (Sigma Escherichiacoil 055: 05), CCK-8 试剂盒 (日本同仁化学研究所), 二甲基亚砜 (DMSO) (天津凯立信化学工业有限公司)。

NIKON eclipse TS100—F 倒置成像显微镜, 三洋 MCO—19AIC 二氧化碳培养箱, 飞鸽牌 KA—1000 低速台式离心机, SUNRISE 酶标仪。

1.3 靶细胞

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 (购自中国科学院上海细胞研究所)。

2 方法

2.1 细胞培养及收获

RAW264.7 用含 10%胎牛血清、1%双抗的高糖培养基传代, 在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 取对数生长期的细胞, 用 0.25%胰酶 - EDTA 消化, 制备分散均匀的单细胞悬液, 计数并调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL。

2.2 RAW264.7 给药处理

实验设置空白对照组, LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组 (模型组), LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加不同质量浓度 (80、40、20、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的各药物处理组 (受试药物甘草次酸衍生物 TY501, 对照药物泼尼松龙、甘草次酸、吡罗

昔康), 每组设置 4 个复孔。取两块 48 孔板, 各孔加入上述细胞悬液 900 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 放置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 12 h 使之贴壁, 然后小心吸弃各孔细胞培养液, 除空白对照组外其余各孔均加入 LPS 300 μL , 各药物组分别加入各质量浓度的受试药物 600 μL , 模型组加入 600 μL 空白培养液。空白对照组加入 900 μL 培养液。

2.3 CCK-8 测定药物对细胞增殖的影响

在给药刺激 24 h 后按照 CCK-8 试剂盒说明步骤向各孔依次加入 CCK-8 试剂, 放置培养箱继续孵育 4 h, 将上述培养板各孔溶液依次转入 96 孔板 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 酶标仪 450 nm 波长处测定各孔吸光度 (A) 值。计算药物对细胞增殖抑制率: 抑制率 = (1 - 试验孔 A 值/模型对照孔 A 值)。

2.4 数据统计处理

所有数据均用 SPSS11.5 统计软件处理, 各组数据统计以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用组间 t 检验, 各给药组与模型对照组之间进行差异性比较。

3 结果

酶标仪测定各孔吸光度值, 实验结果见表 1。

依据公式抑制率 = (1 - 试验孔 A 值/模型对照孔 A 值) 计算药物对细胞增殖抑制率。以给药浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标绘制曲线, 见图 1。

泼尼松龙对 RAW264.7 细胞增殖具有抑制作用, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 1 517 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $r=0.946 6$ 。吡罗昔康对 RAW264.7 细胞增殖的抑制作用不明显, 特别是在 20、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量下不仅对 RAW264.7 细胞增殖不产生抑制, 反而表现出一定的促进作用。甘草次酸对 RAW264.7 细胞增殖具有明显抑制作用, IC₅₀ 为 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $r=0.982 2$ 。TY501 对 RAW264.7 细胞增殖具有明显抑制作用, IC₅₀ 为 233 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $r=0.940 8$, 从 IC₅₀ 数据看, TY501 对 RAW264.7 细胞增殖的抑制作用强于泼尼松龙, 弱于甘草次酸。

4 讨论

炎症的发生机制有很多, 其中巨噬细胞是一种吞噬细胞, 位于组织内, 源自于骨髓中的前体细胞, 在体内参与先天性免疫和细胞免疫, 在组织发生慢性炎症时, 巨噬细胞会释放出致炎物质, 如肿瘤坏死因子 TNF- α , 从而活化核因子 NF- κB 的基因。随后, 基因表达的 NF- κB 会进入肿瘤细胞核并启动多种可以停止细胞凋亡及促进细胞增生及致炎蛋白质的产生, 通常会被作为探究药物抗炎作用机制的体

表1 各组药物的吸光度(A)值

Table 1 Concentrations and absorbance values (A) of different groups

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A 值	组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A 值
空白对照	-	1.247±0.036	模型组	-	1.881±0.169
甘草次酸	10	1.833±0.096	泼尼松龙	10	1.662±0.084
	20	1.419±0.080**		20	1.614±0.174
	40	0.633±0.039***		40	1.513±0.142*
	80	0.227±0.007***		80	1.356±0.069**
TY501	10	1.509±0.083*	吡罗昔康	10	1.957±0.079
	20	1.439±0.094*		20	1.933±0.069
	40	1.215±0.073**		40	1.853±0.071
	80	1.156±0.064**		80	1.646±0.081

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

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

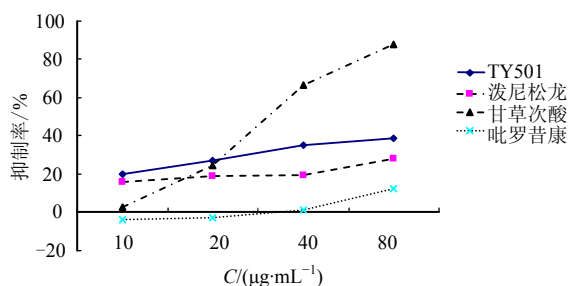


图1 各药物对 RAW264.7 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of different drugs on proliferation of murine macrophage RAW26407

外试验研究的靶细胞。RAW264.7 细胞来自于小鼠白血病病毒所致的肿瘤,属于小鼠巨噬细胞系。甘草次酸衍生物 TY501 在一定质量浓度范围内可抑

制小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的增殖,在同等质量浓度下其对细胞增殖的抑制程度大于泼尼松龙和吡罗昔康却小于甘草次酸,其可能作用机制还需要大量的理论和实验进行深入的研究。

参考文献

- [1] 朱任之. 甘草次酸钠口服给药的抗炎及免疫调节作用 [J]. 中国药理学通报, 1996, 12(6): 121-123.
- [2] 柯文娟, 刘新月, 陈燕, 等. 甘草次酸对 K562 细胞增殖抑制作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 714-718.
- [3] 付玉杰, 祖元刚, 李春英, 等. 超临界 CO_2 萃取甘草中甘草次酸的工艺研究 [J]. 中草药, 2003, 34(1): 31-33.
- [4] 汤立达, 王建武, 雍建平, 等. 新型 11-脱氧甘草次酸-30-酰胺衍生物的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(1): 20-25.

中草药杂志社 4 种期刊为允许刊载处方药广告的医药专业媒体

根据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知, 中草药杂志社编辑出版的《中草药》、Chinese Herbal Medicines (CHM)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊作为第一批医药专业媒体, 允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话: (022)27474913 23006821 传真: 23006821 联系人: 陈常青

网址: www.中草药杂志社.中国; www.tiprpress.com E-mail:zcy@tiprpress.com