

毛酸浆果乙醇提取物抗炎作用及其机制研究

陈芳¹, 王宇晨³, 关雪娃¹, 庞志强², 路艳娇¹, 王国强¹, 郑敬彤¹, 朱海林², 王放^{1*}

1. 吉林大学基础医学院病原生物学教研室, 吉林 长春 130021

2. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130021

3. 吉林大学临床医学院, 吉林 长春 130021

摘要:目的 观察毛酸浆果乙醇提取物(AEFPP)的抗炎作用,并探索其作用机制。方法 取二甲苯涂于小鼠耳廓制备耳廓肿胀急性炎症模型,将棉花植入大鼠皮下构建棉球肉芽肿慢性炎症模型,观察 AEFPP 的在体抗炎作用;采用 MTT 法检测质量浓度为 0.25~20.00 mg/mL 的 AEFPP 对 RAW 264.7 细胞的细胞毒性;质量浓度为 0.625、1.250、2.500 mg/mL 的 AEFPP 预处理 3 h 后,脂多糖(LPS)作用于 RAW 264.7 细胞制备炎症模型,ELISA 法检测上清中肿瘤坏死因子(TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)的水平;实时定量 PCR(qRT-PCR)法检测 NF- κ B p65 mRNA 表达;western blotting 法测定 NF- κ B p65 蛋白表达。结果 0.8 g/kg AEFPP 可显著抑制小鼠耳廓肿胀率;0.1、0.2、0.4 g/kg 剂量组对大鼠棉球肉芽肿具显著的抑制作用,且表现出剂量依赖性;AEFPP 在 0~3 mg/mL 范围内对细胞无明显毒性;另外,0.625、1.250、2.500 mg/mL AEFPP 均可显著抑制 RAW 264.7 细胞上清液中的 TNF- α 和 IL-6 的水平;0.625、1.250 mg/mL AEFPP 显著抑制 NF- κ B p65 mRNA 及其蛋白的表达。结论 AEFPP 具备良好的抗炎活性,其作用机制可能与下调 p65 蛋白的表达和抑制炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的释放有关。

关键词:毛酸浆果;抗炎;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素-6;NF- κ B p65

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)05-0747-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.05.008

Anti-inflammatory effect and mechanism of *Physalis pubescens*

CHEN Fang¹, WANG Yu-chen³, GUAN Xue-wa¹, PANG Zhi-qiang², LU Yan-jiao¹, WANG Guo-qiang¹, ZHENG Jing-tong¹, ZHU Hai-lin², WANG Fang¹

1. Department of Pathogen Biology, School of Basic Medical Science, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. School of Pharmaceutical Science, Jilin University, Changchun 130021, China;

3. School of Clinical Medicine, Jilin University, Changchun 130021, China;

Abstract: **Objective** To investigate the anti-inflammatory effect of the alcohol extract from fruit of *Physalis pubescens* (AEFPP) and explore its mechanism. **Methods** To observe the anti-inflammatory effect of AEFPP *in vivo*, dimethylbenzene was daubed on mice auricle to replicate mouse ear edema acute inflammatory model, and cotton ball was sc implanted to establish rat cotton ball granuloma model. The cytotoxicity of 0.25—20.00 mg/mL AEFPP was examined with MTT method. Pretreatment with 0.625, 1.250, and 2.500 mg/mL AEFPP for 3 h, RAW 264.7 mononuclear macrophages cells were stimulated with lipopolysaccharides so as to build an inflammatory cell model. The culture supernatant of the cells was collected in order to determine tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) by ELISA. The expression of NF- κ B p65 and its anti-inflammatory activity were assayed by Western blotting and real-time quantitative PCR (qRT-PCR). **Results** High dose (0.8 g/kg) of AEFPP could diminish mouse ear edema, which had been induced by dimethylbenzene. Besides, all the three dosages of AEFPP (0.1, 0.2 and 0.4 g/kg) could markedly inhibit rats cotton ball granuloma. AEFPP was not toxic to the cells in the range of 0—3 mg/mL. Furthermore, the other three dosages of AEFPP (0.625, 1.250, and 2.500 mg/mL) significantly decreased the concentration of TNF- α and IL-6 in the culture supernatants. AEFPP of 0.625 and 1.25 mg/mL could markedly inhibit the expression levels of NF- κ B p65 mRNA and its protein. **Conclusion** AEFPP has a wonderful anti-inflammatory effect. The mechanism might be related with down-regulating the expression of

收稿日期: 2016-04-18

基金项目: 吉林省科技厅科技发展计划-医药产业发展专项资金计划(20130727066YY); 长春市科技计划-重大科技攻关计划(14KG061)

作者简介: 陈芳(1991—),女,在读医学硕士,研究方向为微生物与呼吸道疾病。E-mail: 278778156@qq.com

*通信作者 王放,教授,博士研究生导师。Tel: (0431)85619574 E-mail: wf@jlu.edu.cn

p65 protein and inhibiting the release of inflammatory factors, such as TNF- α and IL-6.

Key words: fruit of *Physalis pubescens* L.; anti-inflammation; tumor necrosis factor- α ; interleukin 6; NF- κ B p65 protein

毛酸浆 *Physalis pubescens* L. 为茄科 (Solanaceae) 酸浆属 *Physalis* L. 的一年生草本植物, 始载于《神农本草经》, 列为中品。其带浆果的宿萼或全草称为灯笼草, 具有清热解毒、化痰利尿的作用, 是常用的清热解毒药^[1-2]。随着分离纯化技术的发展, 近年来对其化学成分的分析已经取得了长足的进步, 贾远敏等^[3]相继分离得到了 3, 7, 3'-三甲基槲皮素等多种单体化合物, 本课题组朱海林等^[4]分离得到反式对羟基肉桂酸乙酯等 9 个化合物。另有研究表明从毛酸浆中分离纯化得到的化合物 Physapubescin B 能够使肿瘤细胞复制停留在 G₂/M 期, 从而对人前列腺癌具有良好的抗肿瘤活性^[5]。

本课题组前期对毛酸浆的利尿及抗菌活性进行了探讨^[6-7], 但迄今为止未见毛酸浆果对于炎症反应影响作用的研究报道。因此, 本课题组建立了动物及细胞炎症模型, 观察毛酸浆果 80%乙醇提取物 (Alcohol Extract of the Fruit of *Physalis pubescens* L., AEFPP) 对小鼠离体巨噬细胞及炎症模型动物的抗炎作用, 并初步探讨其机制。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雄性 Balb/c 健康小鼠 50 只, 体质量 18~25 g; 清洁级雄性 Wistar 大鼠 50 只, 体质量 240~280 g; 均购自吉林大学白求恩医学部基础实验动物中心, 动物生产许可证号 SCXK (吉)-2013-0001。

1.2 细胞

小鼠 RAW 264.7 单核巨噬细胞, 吉林大学基础医学院生物化学实验室惠赠, 使用含 10%胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基, 置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中进行常规培养。

1.3 药物与主要试剂

AEFPP 由吉林大学药学院再生所新药研究室提供, 其带宿萼果实于 2014 年 9 月采摘自吉林省吉林市, 由吉林大学李平亚教授鉴定为茄科酸浆属植物毛酸浆 *Physalis pubescens* L. 的带宿萼果实。通过 10 倍体积的 80%乙醇室温浸泡 3 次后合并提取液, 通过真空干燥、粉碎得粉末。AEFPP 中含有大量的苷类成分, 通过定量测定, 其中木犀草苷质量分数为 0.1%。

蒲地蓝消炎片 (广东国医堂制药股份有限公司, 批号 150801); DMEM 培养液 (美国 Gibco 公司);

FBS (澳大利亚 Gibco 公司); 脂多糖 (LPS, 批号 032M4082V, 美国 Sigma 公司); TNF- α ELISA 试剂盒 (美国 Ray Biotech 公司); IL-6 ELISA 试剂盒 (联科生物技术有限公司); 逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); 实时定量 PCR (qRT-PCR) 试剂盒 (瑞士 Roche 公司); NF- κ B p65 抗体 (英国 abcam 公司); 其他化学试剂均为分析纯。

1.4 主要仪器

SW-CJ-2F 细胞超净工作台 (苏净集团安泰空气技术有限公司); SANYO MCO-18AIC CO₂ 培养箱 (武汉爱斯佩科学仪器有限公司); TECAN SUNRIS 微孔板分光光度计 (北京早稻田生物科技发展有限公司); ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 生物公司); EPS 300 电泳仪 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 小鼠耳廓肿胀实验

取雄性 Balb/c 小鼠 50 只, 适应性饲养 3 d 后禁食 12 h 后称体质量, 按体质量随机分为 5 组: 模型组 (双蒸水), AEFPP 低、中、高剂量 (0.2、0.4、0.8 g/kg, 参照《中国药典》^[8]中关于对毛酸浆同属植物锦灯笼的推荐给药剂量, 同时结合预实验结果设置) 组和蒲地蓝消炎片 (阳性药, 1.5 g/kg) 组, 每组 10 只。每天 ig 给药 1 次, 连续给药 7 d, 给药体积均为 20 mL/kg。末次给药前 12 h 禁食, 称体质量。并于末次给药 1 h 后, 定量汲取二甲苯 20 μ L, 滴加在小鼠右耳外侧面耳廓的中央, 让其自由扩散, 左耳作为对照。30 min 后, 将小鼠颈椎脱臼处死, 用 9 mm 直径打孔器在耳廓相同部位打孔, 电子天平称两耳片质量, 以两耳质量之差为耳廓肿胀度, 计算耳肿胀抑制率。

耳廓肿胀度 = 右耳片质量 - 左耳片质量

耳肿胀抑制率 = (模型组肿胀度 - 给药组肿胀度) / 模型组肿胀度

2.2 大鼠棉球肉芽肿实验

取雄性 Wistar 大鼠 50 只, 适应性饲养 3 d 禁食 12 h 后称体质量。3%戊巴比妥钠溶液 ip 麻醉 (45 mg/kg), 用剃毛器剃去大鼠两侧腹股沟处的毛, 酒精棉消毒, 在无菌条件下切开大鼠两侧腹股沟皮肤后植入 20 mg 已干燥灭菌的紧致小棉球, 缝合切口。

术后随机分5组:模型组(双蒸水),AEFPP高、中、低剂量(0.1、0.2、0.4 g/kg)组和蒲地蓝消炎片(0.9 g/kg)组,每组10只。从手术当天开始ig给药7 d,每天1次,给药体积均为20 mL/kg。第7天禁食,次日,称体质量后断颈处死大鼠,在原缝合处剪开皮肤,取出棉球剔除脂肪组织,置于60℃恒温干燥箱,3 h后称重。将称得的质量减去棉球原质量即得肉芽肿质量,计算肉芽肿抑制率。

肉芽肿抑制率=(模型组肉芽肿质量-给药组肉芽肿质量)/模型组肉芽肿质量

2.3 细胞培养

RAW 264.7 单核巨噬细胞,用含10% FBS的DMEM培养液于37℃、5% CO₂条件下传代培养,取对数生长期细胞进行实验。

2.4 MTT 法检测细胞毒性

收集对数生长期 RAW 264.7 细胞,调整密度为每孔 1×10^5 个,接种于96孔培养板中,每孔100 μ L。待细胞贴壁后,吸弃各孔培养液,更换用DMEM维持液稀释的AEFPP,质量浓度分别为20.00、15.00、10.00、5.00、4.00、3.00、2.00、1.00、0.50、0.25 mg/mL,对照组加入DMEM维持液,空白组为不含细胞的DMEM维持液,每孔100 μ L,每组设置10个平行孔。培养21 h后,每孔加入5 mg/mL MTT 10 μ L,37℃、5% CO₂条件下继续孵育4 h后,吸弃孔内液体,每孔加入100 μ L DMSO,震荡10 min,使细胞内结晶充分溶解,微孔板分光光度计于490 nm波长处检测各孔吸光度(A)值,计算细胞活性以评价细胞毒性。

细胞活性=(AEFPP组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值)

2.5 ELISA 法检测细胞中 TNF- α 、IL-6 水平

收集对数生长期 RAW 264.7 细胞,调整密度为 1×10^6 个/孔,接种于6孔培养板中,每孔2 mL,待细胞贴壁后,吸弃各孔培养液,更换为DMEM维持液,随机分为5组:模型组(加入终质量浓度为1 mg/L的LPS溶液),AEFPP高、中、低剂量组(加入终质量浓度分别为0.625、1.250、2.500 mg/mL的AEFPP溶液预处理3 h后加入1 mg/L LPS溶液)和对照组(加入等量的DMEM维持液2 mL),每孔设10个平行孔。继续培养18 h后,收集各孔中的RAW 264.7细胞上清液,检测TNF- α 和IL-6水平,严格按照ELISA试剂盒说明书操作,根据标准曲线,计算各组上清液TNF- α 和IL-6水平。

2.6 qRT-PCR 法检测 NF- κ B p65 mRNA 表达

取“2.5”项已收集上清后的细胞,采用Trizol法提取各组细胞中的总RNA,使用PrimeScript™ RT Reagent Kit试剂盒逆转录为cDNA,然后使用Fast Start Universal SYBR Green Master试剂盒,采用qRT-PCR法检测NF- κ B p65 mRNA的表达水平。记录反应后的C_t值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的表达水平。引物序列设计见表1。

表1 Real Time-PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences of Real Time-PCR

基因	引物序列(5'-3')
NF- κ B p65	正向引物 AGCTCAAGATCTGCCGAGTAA
	反向引物 CAGCCTGGTCCCGTGAAAT
β -actin	正向引物 CGCTGCGCTGGTCTGCT
	反向引物 CATACCCAAGAAGGAAGGCT

2.7 Western blotting 法检测 NF- κ B p65 蛋白表达

取“2.5”项已收集上清后的RAW 264.7细胞,加入RIPA细胞裂解液充分裂解细胞,BCA法测定蛋白浓度。SDS-PAGE凝胶电泳分离样品,电转移至PVDF膜,5% BSA液封闭2 h,一抗4℃孵育过夜,洗膜,二抗室温孵育2 h,再次洗膜、显影,以目的条带与 β -actin A值的比值作为蛋白表达相对水平。采用Image J2x 2.1.4.7软件进行灰度值分析。

2.8 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 21.0软件进行统计分析,两组间均数进行t检验,多组间均数进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 对大鼠、小鼠体质量的影响

根据表2、3中数据,单因素方差分析多个实验组之间的体质量差异,表明各组实验鼠初始体质量之间差异不显著,显示分组的随机性良好;实验结束时,各组体质量增长基本相似;对各剂量组大鼠、小鼠体质量及其增长值进行方差齐性检验,满足方差齐的要求;单因素方差分析表明,各组大鼠、小鼠末期体质量及体质量增长值之间差异不显著,表明不同的给药剂量不会对大鼠、小鼠的体质量造成影响。

3.2 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响

与模型组比较,AEFPP高剂量组显著抑制二甲苯致小鼠耳廓肿胀($P < 0.05$),而低、中剂量组耳廓肿胀差异不显著;蒲地蓝消炎片对二甲苯致小鼠耳

表2 AEFPP对小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effects of AEFPP on the body weight of the mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	初始体质量/g	末期体质量/g	增长值/g
模型	—	22.1±2.0	23.2±2.0	1.1±0.5
AEFPP	0.2	21.4±1.9	22.1±1.5	1.1±0.6
	0.4	22.0±2.0	23.2±2.5	1.2±1.0
	0.8	22.0±2.0	23.1±1.7	1.1±0.4
	1.5	21.7±1.9	22.9±2.1	1.2±0.7
蒲地蓝消炎片	1.5	21.7±1.9	22.9±2.1	1.2±0.7

表3 AEFPP对大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effects of AEFPP on the body weight of the rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	初始体质量/g	末期体质量/g	增长值/g
模型	—	267.0±10.9	301.7±18.1	34.7±8.0
AEFPP	0.1	263.4±8.2	299.8±16.1	36.4±13.9
	0.2	265.0±10.5	305.8±20.2	40.8±12.5
	0.4	265.0±6.5	302.7±13.1	37.7±10.7
	0.9	264.3±9.4	299.5±17.4	35.2±11.6
蒲地蓝消炎片	0.9	264.3±9.4	299.5±17.4	35.2±11.6

廓肿胀抑制作用显著($P < 0.05$)。进行相关性分析表明,小鼠耳廓肿胀抑制率与给药剂量之间存在良好的线性相关关系($P < 0.05, R^2 = 0.9271$),结果见表4。

3.3 对大鼠棉球肉芽肿的影响

与模型组比较,AEFPP中、高剂量均能显著抑制大鼠棉球肉芽肿增生($P < 0.05, 0.01$)。蒲地蓝消炎片对大鼠棉球肉芽肿也具有显著抑制作用($P < 0.01$)。结果见表5。

3.4 对RAW 264.7细胞毒性作用

MTT细胞毒性实验结果显示,在上述10个不同质量浓度中,0.25、0.50、1.00、2.00、3.00 mg/L的AEFPP的水溶液作用于RAW 264.7细胞21 h后,细胞活性与对照组比较差异不显著。表明AEFPP在0~3 mg/mL对细胞无明显毒性。结果见表6。

表4 AEFPP对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Effects of AEFPP on ear edema induced by dimethyl benzene in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	耳廓肿胀度/mg	抑制率/%
模型	—	11.10±3.08	—
AEFPP	0.2	10.70±3.56	3.61
	0.4	9.64±2.95	13.15
	0.8	6.58±2.85*	40.72
	1.5	5.31±2.47*	52.16
蒲地蓝消炎片	1.5	5.31±2.47*	52.16

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

表5 AEFPP对大鼠棉球肉芽肿的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Effects of AEFPP on granuloma induced by cotton pellet implantation ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肉芽肿净量/g	抑制率/%
模型	—	0.265±0.72	—
AEFPP	0.1	0.203±0.61	23.40
	0.2	0.175±0.43*	33.96
	0.4	0.159±0.40**	34.34
	0.9	0.141±0.39**	46.80
蒲地蓝消炎片	0.9	0.141±0.39**	46.80

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

选取0.625、1.250、2.500 mg/L的AEFPP作为细胞实验给药浓度。

3.5 对LPS作用下RAW 264.7细胞中TNF- α 、IL-6水平的影响

与对照组比较,模型组细胞培养液中的TNF- α 、IL-6水平均显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,AEFPP各剂量组细胞中TNF- α 、IL-6水平均显著降低($P < 0.01, 0.001$)。结果见表7。

3.6 对LPS作用下RAW 264.7细胞NF- κ B p65 mRNA的表达水平的影响

与对照组比较,模型组细胞NF- κ B p65 mRNA表达显著上调($P < 0.001$);与模型组比较,AEFPP低、中、高剂量组均能显著抑制NF- κ B p65基因的表达($P < 0.001$)。结果见图2。

表 6 不同浓度 AEFPP 对 RAW 264.7 细胞活性的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 6 Effects of different concentration of AEFPP on the cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	浓度/(mg·mL ⁻¹)	细胞活性/%
对照	—	100.00
AEFPP	0.25	103.50 ± 7.16
	0.50	102.76 ± 10.14
	1.00	101.51 ± 12.34
	2.00	98.78 ± 12.62
	3.00	90.90 ± 10.08
	4.00	79.75 ± 7.89 ^{###}
	5.00	63.60 ± 5.04 ^{###}
	10.00	28.84 ± 3.87 ^{###}
	15.00	10.28 ± 1.38 ^{###}
	20.00	3.27 ± 0.35 ^{###}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$

^{###} $P < 0.001$ vs control group

表 7 AEFPP 对细胞上清液 TNF- α 、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 7 Effects of AEFPP on the content of TNF- α and IL-6 in the supernatant ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	浓度/(mg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	769.18 ± 39.95	8.43 ± 1.70
模型	—	2 147.46 ± 38.98 ^{###}	56.71 ± 5.51 ^{###}
AEFPP	2.500	1 267.70 ± 16.19 ^{***}	19.18 ± 3.23 ^{***}
	1.250	1 568.16 ± 10.46 ^{***}	20.48 ± 0.28 ^{***}
	0.625	1 759.03 ± 5.87 ^{**}	41.92 ± 3.64 ^{**}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

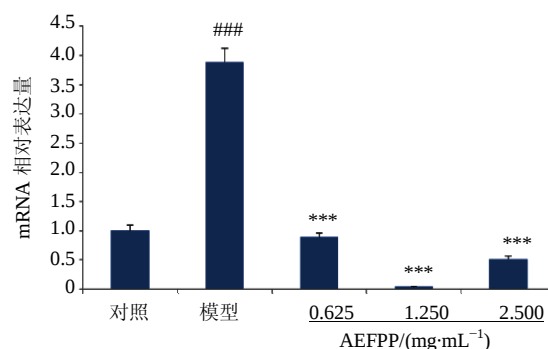
^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

3.7 对 LPS 作用下 RAW 264.7 细胞 NF- κ B p65 蛋白的表达水平的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组 NF- κ B p65 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,AEFPP 低、中剂量组 NF- κ B p65 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$),而高剂量组没有显著变化。

4 讨论

毛酸浆果实作为一种新型的药用食品,近来已越来越成为关注的热点^[9-11]。并且以毛酸浆为原料加工生产出的果汁、罐头、果冻、果酱和果脯受到日、韩等国及国内消费者的青睐,市场发展前景广

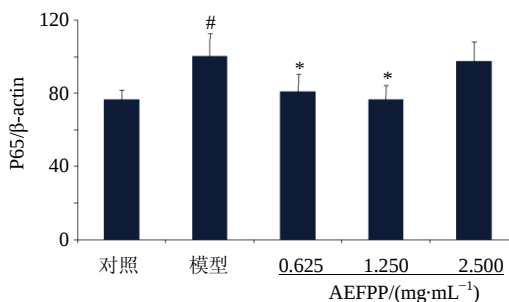
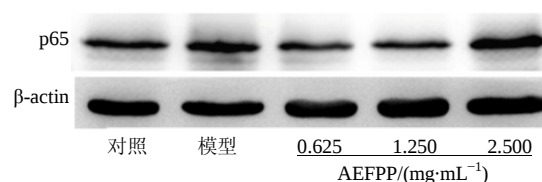


与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{***} $P < 0.001$

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{***} $P < 0.001$ vs model group

图 2 AEFPP 对 LPS 作用下 RAW 264.7 细胞 NF- κ B p65 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 2 Effects of AEFPP on the expression levels of NF- κ B p65 mRNA in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)



与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

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

图 3 AEFPP 对 LPS 作用下 RAW 264.7 细胞 NF- κ B p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3 Effects of AEFPP on the expression levels of NF- κ B p65 protein in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

阔^[12]。然而作为中国东北地区的道地药材,民间广泛用于治疗咽喉肿痛的毛酸浆,在抗炎机制方面鲜有研究。故本研究通过复制炎症模型,观察 AEFPP 的抗炎作用并初步探讨其机制。

在众多细胞炎症模型中,小鼠单核巨噬细胞株 RAW 264.7 是最常用的细胞株^[13-14]。LPS 是革兰阴性菌的细胞壁主要组成成分,单核巨噬细胞受到

LPS 刺激后, 激活 MAPK 和 NF- κ B 等信号转导通路, 进而促进 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 等炎症细胞因子的表达, 引起炎症反应^[15-16]。p65 蛋白作为 NF- κ B 通路中的关键组分, 在炎症的发生发展过程中发挥着重要的作用^[17]。本研究结果显示, AEFPP 可以显著抑制 p65 蛋白的表达, 降低 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的释放, 提示 AEFPP 可能通过下调 NF- κ B p65 蛋白的表达、减少这些炎症因子的释放, 进而发挥抗炎作用。同时, 实验结果显示, 高剂量组与低、中剂量组比较, 其抗炎作用效果不佳, 推测可能是因为此时对于 NF- κ B 通路的作用已经达到饱和, 同时还激活了其他未知的信号通路或者同时产生了其他方面的显著影响, 造成抗炎作用减弱, 但其具体机制尚有待于进一步研究。

为进一步观察 AEFPP 的动物个体抗炎作用, 本研究建立了二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀模型和大鼠棉球肉芽肿模型。二甲苯可促进组胺和激肽等炎症介质释放, 引起炎症细胞浸润, 造成耳部急性渗出性炎症水肿^[18]。棉球刺激可引起结缔组织的增生, 造成炎症。研究结果显示, AEFPP 高剂量组可显著抑制小鼠耳廓肿胀率, 高、中、低剂量均能显著抑制大鼠棉球肉芽肿增生, 且具有一定的剂量依赖性。表明 AEFPP 具有较好的抗炎作用。

综上所述, AEFPP 具有较好的抗炎活性, 作用机制可能与下调 NF- κ B p65 基因和蛋白的表达以及抑制炎症因子 IL-6、TNF- α 的释放有关, 但其具体作用机制还有待进一步完善。

参考文献

- [1] 梁慧, 才谦. 锦灯笼果实化学成分的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(8): 1677-1678.
- [2] 许亮, 王荣祥. 中国酸浆属植物药用资源研究 [J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(1): 21-23.
- [3] 贾远敏, 陈重, 许琼明, 等. 毛酸浆果的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1086-1089.
- [4] 朱海林, 王振洲, 郑炳真, 等. 毛酸浆果实的化学成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 732-735.
- [5] Ding W, Hu Z, Zhang Z, et al. Physapubescins B exhibits potent activity against human prostate cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *J. Agric Food Chem*, 2015, 63(43): 9504-9512.
- [6] 王放, 张斯文, 李平亚, 等. 毛酸浆果醇提物对大鼠的利尿和抗肾盂肾炎作用的研究 [J]. 特产研究, 2004, (4): 35-38.
- [7] 郑敬彤, 时景伟, 王放, 等. 毛酸浆果提取物的抑菌活性研究 [J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(6): 796-797.
- [8] 中国药典 [S]. 一部, 2015.
- [9] Sharma J, Gairola S, Gaur R D, et al. The treatment of jaundice with medicinal plants in indigenous communities of the Sub-Himalayan region of Uttarakhand, India [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(1): 262-291.
- [10] El Sheikh A F, Condur A, Métayer I, et al. Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: preliminary application to Physalis fruits from Egypt [J]. *Yeast*, 2009, 26(10): 567-573.
- [11] Pinto Mda S, Ranilla L G, Apostolidis E, et al. Evaluation of antihyperglycemia and antihypertension potential of native Peruvian fruits using *in vitro* models [J]. *J Med Food*, 2009, 12(2): 278-291.
- [12] 王晓英, 刘长娇, 段连海, 等. 毛酸浆开发利用的研究进展 [J]. 中国酿造, 2014, 33(2): 5-8.
- [13] Nguyen P H, Zhao B T, Lee J H, et al. Isolation of benzoic and cinnamic acid derivatives from the grains of Sorghum bicolor and their inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells [J]. *Food Chem*, 2015, 168: 512-519.
- [14] Zhu J, Zhang Y, Wu G, et al. Inhibitory effects of oligochitosan on TNF- α , IL-1 β and nitric oxide production in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(1): 729-733.
- [15] Kim B H, Lee K H, Chung E Y, et al. Inhibitory effect of chroman carboxamide on interleukin-6 expression in response to lipopolysaccharide by preventing nuclear factor- κ B activation in macrophages [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 543(1-3): 158-165.
- [16] Cao Q, Mak K M, Lieber C S. Dilinoleoylphosphatidylcholine decreases LPS-induced TNF- α generation in Kupffer cells of ethanol-fed rats: respective roles of MAPKs and NF- κ B [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 294(4): 849-853.
- [17] Liu D, Perkins J T, Petriello M C. Exposure to coplanar PCBs induces endothelial cell inflammation through epigenetic regulation of NF- κ B subunit p65 [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 289(3): 457-465.
- [18] 杨巧芳, 孟庆刚. 炎症动物模型探要 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(3): 516-517.