

【实验研究】

蒜薹正丁醇部位抑制 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

曾攀科, 王 湘, 李雪娇, 王立升*
广西大学医学院, 广西 南宁 530004

摘 要:目的 研究蒜薹 *Thlaspi arvense* 水提醇沉部位、正丁醇部位的抗炎活性以及正丁醇部位的作用机制。方法 将蒜薹水提物经过乙醇、正丁醇萃取后制得蒜薹水提醇沉部位、正丁醇部位。采用 MTT 法确定水提醇沉部位、正丁醇部位 (15.625、31.25、62.5、125、250、500、1 000 μ g/mL) 对 RAW264.7 细胞的毒性。采用脂多糖 (LPS) 1 μ g/mL 诱导 RAW264.7 细胞产生炎症反应, 建立体外炎症细胞模型。Griess 法检测水提醇沉部位、正丁醇部位 (7.812 5、15.625、31.25、62.5、125、250、500、1 000 μ g/mL) 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞后 NO 释放量的影响; ELISA 法检测水提醇沉部位、正丁醇部位 (125、250、500 μ g/mL) 对白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 释放量的影响; Western Blotting 法检测正丁醇部位 (125、250、500 μ g/mL) 对环氧合酶-2 (COX-2)、一氧化氮合酶 (iNOS)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、核因子- κ B (NF- κ B) p-P65、Toll 样受体 4 (TLR-4)、磷酸化 NF- κ B 抑制蛋白 (p-I κ B α) 蛋白表达的影响。结果 蒜薹水提醇沉部位、正丁醇部位质量浓度在 1 000 μ g/mL 以下时对 RAW264.7 细胞几乎无毒性作用。与模型组比较, 蒜薹水提醇沉部位、正丁醇部位 62.5、125、250、500、1 000 μ g/mL 组 NO 释放量显著下降 ($P < 0.01$); 蒜薹水提醇沉部位、正丁醇部位 125、250、500 μ g/mL 组 IL-6、TNF- α 的分泌量显著降低 ($P < 0.01$), 且正丁醇部位作用优于水提醇沉部位; 蒜薹正丁醇部位 500 μ g/mL 组的 iNOS 和 250、500 μ g/mL 组 COX-2、IL-1 β 、NF- κ B p-P65、TLR-4、p-I κ B α 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$), 作用均呈浓度相关性。结论 蒜薹正丁醇部位显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 的释放, IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的分泌以及 COX-2、iNOS 蛋白的表达, 其抗炎作用机制可能与抑制 TLR-4/NF- κ B 信号通路相关。

关键词: 蒜薹; 水提醇沉部位; 正丁醇部位; TLR-4/NF- κ B; 抗炎; 脂多糖; RAW264.7 细胞
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2021) 10-2148-07
DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.10.016

Effect of *Thlaspi arvense* *N*-butanol site on inhibition of TLR-4/NF- κ B signaling pathway against LPS-induced RAW264.7 cell inflammation

ZENG Panke, WANG Xiang, LI Xuejiao, WANG Lisheng
Medical College of Guangxi university, Nanning 530004, China

Abstract: Objective To study the anti-inflammatory activities of *Thlaspi arvense* water extraction and alcohol precipitation site and *N*-butanol site, and the mechanism of *N*-butanol site. **Methods** *Thlaspi arvense* water extracts were extracted by ethanol and *N*-butanol to obtain water extraction and alcohol precipitation site and *N*-butanol site. MTT assay was used to determine the toxicity of water extraction and alcohol precipitation site and *N*-butanol site (15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1 000 μ g/mL) to RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were induced by lipopolysaccharide (LPS) at 1 μ g/mL, and the inflammatory cell model was established *in vitro*. Griess method was used to detect the effects of water extraction and alcohol precipitation site and *N*-butanol site (7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1 000 μ g/mL) on NO release of RAW264.7 cells after LPS induction. ELISA method was used to detect the effects of water extraction and alcohol precipitation site and *N*-butanol site (125, 250, and 500 μ g/mL) on the release of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α). Western Blotting was used to detect the effects of *N*-butanol site (125, 250,

收稿日期: 2021-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(21262005); 广西科技重大专项项目(桂科 AA18242040)

第一作者: 曾攀科, 硕士在读, 从事药理学研究。Tel: 17691357273 E-mail: j_hope_medicine@163.com

*通信作者: 王立升, 博士, 教授, 博士研究生导师, 从事新药设计与开发、中药提取分离。E-mail: w_lsheng@163.com

and 500 $\mu\text{g/mL}$) on the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), nitric oxide synthase (iNOS), interleukin 1 β (IL-1 β), NF- κ B p-P65, TLR-4 and p-I κ B α . **Results** *Thlaspi arvense* water extraction and alcohol precipitation site and *N*-butanol site had almost no toxicity to RAW264.7 cells when the concentration was less than 1 000 $\mu\text{g/mL}$. Compared with model group, the release of NO in *Thlaspi arvense* water extraction and alcohol precipitation site and *N*-butanol site of 62.5, 125, 250, 500 and 1 000 $\mu\text{g/mL}$ groups was significantly decreased ($P < 0.01$). The secretion levels of IL-6 and TNF- α were significantly decreased ($P < 0.01$) in *Thlaspi arvense* water extraction and alcohol precipitation site and *N*-butanol site of 125, 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$, and the effects of *N*-butanol were better than those of water extraction and alcohol precipitation site. The protein expression levels of iNOS in 500 $\mu\text{g/mL}$ and COX-2, IL-1 β , NF- κ B p-P65, TLR-4, and p-I κ B α in 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$ groups of *N*-butanol site decreased significantly ($P < 0.01$), and the effects were correlated with concentration. **Conclusion** *Thlaspi arvense* *N*-butanol site was almost non-cytotoxic, inhibited the release of RAW264.7 cell NO, inhibited the secretion of inflammatory factor IL-1 β , IL-6, TNF- α and the expression of COX-2, iNOS protein in a dose-dependent manner. The anti-inflammatory effect of extract may be mediated by inhibition of TLR-4/NF- κ B signaling pathway.

Key words: *Thlaspi arvense*; *N*-butanol site; water extraction and alcohol precipitation site; TLR-4/NF- κ B; anti-inflammatory; lipopolysaccharide; RAW264.7 cell

菥蓂 *Thlaspi arvense* L. 为十字花科 Cruciferae 菥蓂属 *Thlaspi* L. 一年生草本植物, 又名遏蓝菜、苦盖菜、苦芥子、瓜子草、洋辣罐、寨卡等, 原产地为欧洲, 现分布几乎遍布全国, 主要生长在山地路旁、沟边或村落附近^[1]。菥蓂子味辛、微温, 归肝、脾、肾经; 明目、祛风湿, 主治目赤肿痛、障翳胬肉、迎风流泪、风湿痹痛等^[2]。在临床使用中, 菥蓂可作为复方中成药组分用于炎症的治疗, 其中用途最为广泛的为十三味菥蓂丸^[3]。藏药十三味菥蓂丸可以用于前列腺炎的治疗, 改善患者的泌尿功能, 延缓病程的发展^[4]。研究发现, 菥蓂鲜全草水煎服用可治疗肾炎; 干全草水煎调红糖服用可用于治疗产后子宫内膜炎^[5]。近年来, 对菥蓂的研究主要集中在化学组成及药理作用, 研究表明菥蓂的化学成分主要为芥子油苷类、黄酮类化合物、挥发油、糖类和微量元素等^[6], 除抗炎外, 菥蓂还具抗氧化、抗痛风、抗肿瘤以及对老年痴呆、脑瘫等疾病的治疗作用^[7]。

巨噬细胞是机体内一种发挥免疫功能的特殊细胞, 在炎症、肿瘤以及自身免疫调节系统等方面都发挥着重要的生理作用^[8-9]。此外, 巨噬细胞也可以介导许多促炎物质的产生, 大量研究表明, 机体的许多炎症性疾病都与巨噬细胞有着密切的联系^[10]。巨噬细胞可被病原微生物等外界因素激活, 通过分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、一氧化氮 (NO)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 以及环氧化酶-2 (COX-2) 等, 最终导致局部或全身炎症反应的产生^[11]。

核转录因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 由 NF- κ B 基因进行编码, 是一类具有多向调节作用的转录调控因子家族, 在生物进程中可以调控许多

基因的转录和表达^[12]。近年来研究发现, NF- κ B 与自身免疫应答、细胞钙稳态、炎症反应、细胞分化、增殖和凋亡、肿瘤组织附近血管的生长以及肿瘤侵袭和转移等多个过程相关^[13]。在整个信号通路中 I κ B α 作为主要的 I κ B 蛋白, 在调控 NF- κ B 激活的经典途径中发挥了非常重要的作用^[14]。当受到外界刺激后, 细胞外信号经过膜受体 (Toll 样受体等) 传导到细胞膜内, 信号经一系列蛋白激酶和转化生长因子等接头蛋白激活后, 可以参与激活下游的 IKK 激酶, 诱导 I κ B 磷酸化、泛素化后, 经 26S 蛋白酶体降解, 可以使 NF- κ B 二聚体从细胞质进入细胞核, 与靶基因特异性位点结合, 从而启动炎症相关细胞因子转录与表达, 最终诱发机体产生炎症反应^[15]。

为进一步确定菥蓂的抗炎作用以及作用机制, 本研究通过对菥蓂地上部分进行水提、萃取、浓缩, 最终得到菥蓂水提醇沉部位、正丁醇部位, 以内毒素脂多糖 (LPS) 诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞建立体外炎症模型, 检测菥蓂水提醇沉部位、正丁醇部位对 RAW264.7 细胞的细胞存活率、NO 的释放量以及炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响, 采用 Western blotting 法检测其对 iNOS、COX-2、Toll 样受体 4 (TLR-4)/NF- κ B 通路蛋白表达情况的影响, 探究菥蓂的抗炎作用及作用机制, 为菥蓂作为临床抗炎药的开发提供参考。

1 材料

1.1 药材及主要试剂

菥蓂药材, 由广西花红药业股份有限公司提供, 经广西中医药大学辛宁教授鉴定为十字花科菥蓂 *Thlaspi arvense* L. 的全草。

DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血

清(FBS,杭州四季青公司);青链霉素混合液、PBS、胰酶(北京索莱宝科技有限公司);细胞培养板(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);LPS(美国 Sigma 公司);NO 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);MTT 试剂盒(美国 Sigma-Aldrich 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司);IL-1 β 、IL-6、TNF- α ELISA 检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司); β -actin、IL-1 β 、TLR-4、COX-2、iNOS 一抗,山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG(美国 Cell Signaling Technology 公司);蛋白 Marker(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 实验细胞系

小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7),由广西中医药大学科学实验中心提供。

1.3 主要仪器

AL-104 电子分析天平(上海越平科学仪器有限公司);HH-S2 数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);XMT-142 电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂);HR40-IIA2 生物安全柜(青岛海尔公司);Infinite F200 酶标仪(瑞士 TECAN 公司);371 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Centrifuge 5424R 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);蛋白电泳仪和转膜仪、凝胶显像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 蒜薹水提醇沉部位、正丁醇部位的制备

将蒜薹药材研磨成细小的粉末,称取一定量置圆底烧瓶中,加入去离子水,加热回流提取 3 h。提取完毕后,提取液滤过,浓缩后得到蒜薹水提取物。取蒜薹水提取物适量,加入 70% 乙醇,充分溶解搅拌后于 4 °C 下静置 24 h,然后经滤过,浓缩得到水提醇沉部位。再取水提醇沉部位,加入适量去离子水充分溶解;加入石油醚进行循环萃取,萃取到石油醚层无色为止;向水层中加入醋酸乙酯同样进行循环萃取至萃取液无色;向水层中加入饱和正丁醇再次进行循环萃取,萃取到萃取液无色为止。将正丁醇溶液减压浓缩后得到蒜薹正丁醇部位(黄酮苷类物质总质量分数 51.63%,经过分离鉴别,大波斯菊苷、木犀草苷、牡荆苷、荜草苷的质量分数之和为 4.23%)。

2.2 细胞培养

将 RAW264.7 细胞复苏于细胞培养瓶中,放在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱进行培养。当细胞密度生

长至 80%~90% 时进行传代。使用细胞刮刀将贴壁的细胞小心刮下,用巴氏滴管轻柔地将细胞充分的混悬,收集细胞悬液于 15 mL 离心管中,以 800 $\times$ g 离心 5 min,弃上清,加入适量培养基重悬,转移至新的培养瓶中,放在培养箱中培养。

2.3 细胞毒性检测

取对数生长期的鼠 RAW264.7 细胞,将密度调整为 1.0 $\times$ 10⁵/mL,按照每孔 100 μ L 均匀接种于 96 孔培养板中,37 °C、5% CO₂ 的条件下培养 24 h,待细胞完全贴壁后;以含千分之一 DMSO 的培养基为对照组,以不同质量浓度(15.625、31.25、62.5、125、250、500、1 000 μ g/mL)的蒜薹水提醇沉、正丁醇部位作为给药组;每组设 3 个复孔,各组细胞在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后更换培养基,每孔加入 MTT 溶液,继续培养 4 h 后弃上清,加入 DMSO 100 μ L,放在摇床上轻轻摇晃 15 min,酶标仪测定各孔 490 nm 处吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.4 NO 释放量检测

取对数生长期的鼠 RAW264.7 细胞,将密度调整为 1.0 $\times$ 10⁵/mL,按每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板。在 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养 24 h 后弃去原培养基,设置模型组(1 μ g/mL LPS)^[16]、对照组(10% FBS DMEM 培养基)、给药组(1 μ g/mL LPS + 7.812 5、15.625、31.25、62.5、125、250、500、1 000 μ g/mL 蒜薹水提醇沉/正丁醇部位)。每组 3 个复孔,继续培养 24 h 后,各组均吸取 50 μ L 上清液至新的 96 孔板中,然后加入等体积的 Griess 试剂,轻轻摇晃使其充分混匀,培养箱中放置反应 30 min 后用酶标仪在 540 nm 波长处测定 A 值。

2.5 ELISA 实验

取对数生长期小鼠 RAW264.7 细胞,将密度调整为 1.0 $\times$ 10⁶/mL,按照每孔 2 mL 的量将其接种于 6 孔培养板中。放在 37 °C、5% CO₂ 条件下的培养箱中进行培养待细胞完全贴壁。设置模型组(1 μ g/mL LPS)^[16]、对照组(10% FBS DMEM 培养基)、给药组(1 μ g/mL LPS + 125、250、500 μ g/mL 蒜薹水提醇沉/正丁醇部位)。继续培养 24 h 后,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 的含量。

2.6 对 COX-2、iNOS、IL-1 β 、NF- κ B p-P65、TLR-4、p-I κ B α 蛋白的影响

细胞接种、给药操作同“2.5”项,继续培养 36 h

后弃去上清液,收集细胞并提取细胞总蛋白。细胞蛋白提取后,用BCA试剂盒测定蛋白浓度,计算蛋白上样量,电泳、转膜、封闭、孵育一抗、二抗后显影。对蛋白条带使用Image J进行灰度分析。

2.7 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用GraphPad Prism 6.0软件进行统计学分析,两组数据间差异用 t 检验。

3 结果

3.1 细胞生长状态以及培养基变化

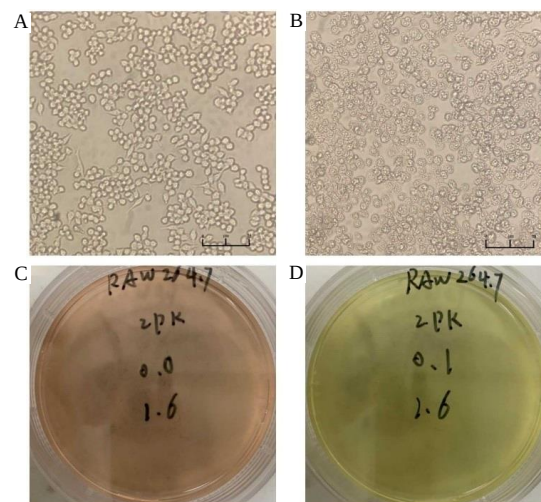
RAW264.7细胞在DMEM细胞培养液中生长速度较快,喜欢群居生长,而堆与堆之间是有空隙的,不是连为片,细胞贴壁后呈圆形(图1-A),培养24 h后培养基维持原始颜色(图1-C)。模型组给予1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS刺激后,细胞变为类似多边形或梭形,伸出伪足等(图1-B),培养24 h后培养基变为透明黄色(图1-D)。

3.2 对RAW264.7细胞活力影响

与对照组比较,药物质量浓度为15.625、31.25、62.5、125、250、500、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞的存活率均大于90%,说明蒜薹水提醇沉部位、正丁醇部位质量浓度在1 000 $\mu\text{g/mL}$ 以下时对细胞几乎无毒性作用,结果见图2。

3.3 对RAW264.7细胞释放NO的影响

如Griess实验结果所示,正常RAW264.7细胞(对照组)中NO释放量较低,加入LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ (模型组)作用后,细胞培养上清液中NO含量显著增加($P < 0.01$),说明已成功构建RAW264.7细胞



A-无LPS刺激细胞状态; B-1 $\mu\text{g/mL}$ LPS刺激细胞的状态; C-无LPS刺激细胞的培养基颜色; D-LPS刺激细胞的培养基颜色
A-state of cells without LPS stimulated; B-tate of cells with 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS stimulated; C-medium color of no LPS-stimulated cells; D-medium color of LPS-stimulated cells

图1 RAW264.7细胞状态以及培养基颜色

炎症模型。与模型组比较,蒜薹水提醇沉部位、正丁醇部位62.5、125、250、500、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 组NO含量显著下降($P < 0.01$),并且呈浓度相关。见图3。

3.4 对细胞因子TNF- α 、IL-6的影响

如ELISA实验结果所示,1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS诱导RAW264.7细胞后,细胞炎症因子IL-6、TNF- α 的分泌水平显著高于对照组($P < 0.01$),说明已成功构建RAW264.7细胞炎症模型。与模型组比较,蒜薹水提醇沉部位、正丁醇部位125、250、500 $\mu\text{g/mL}$ 组IL-6、TNF- α 的分泌量显著降低($P < 0.01$),结果见图4。结果表明,蒜薹水提醇沉部位、正丁醇部位能够

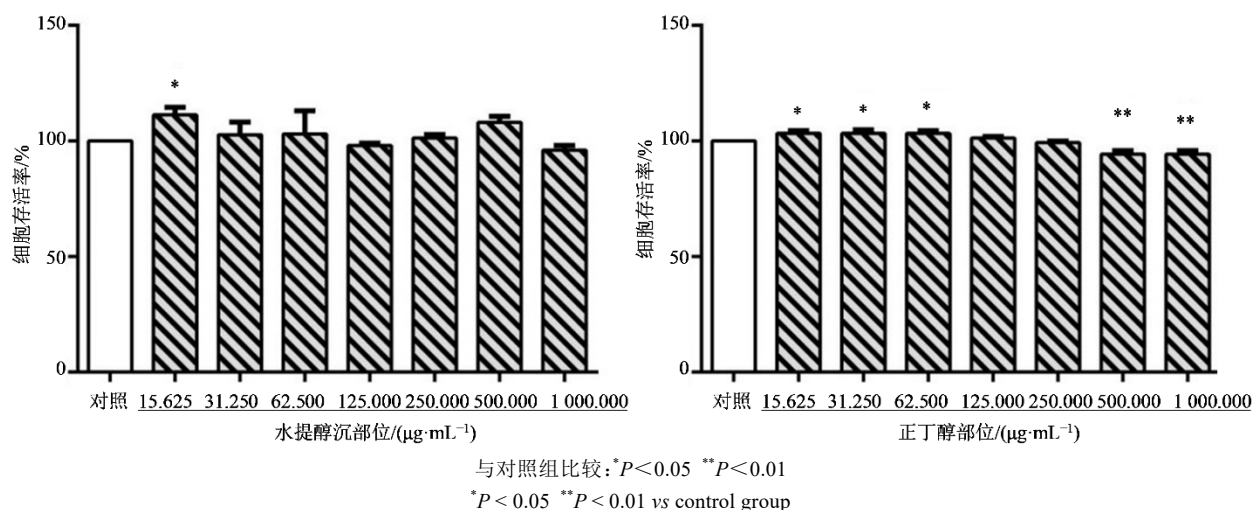
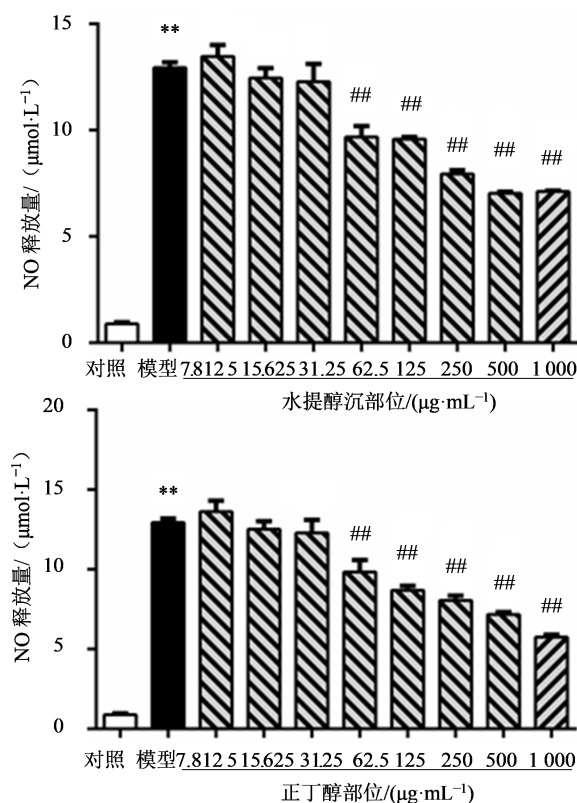


图2 蒜薹水提醇沉部位、正丁醇部位对RAW264.7细胞的毒性($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effect of *Thlaspi arvense* water extraction and alcohol precipitation site and *N*-butanol site on viability of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



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

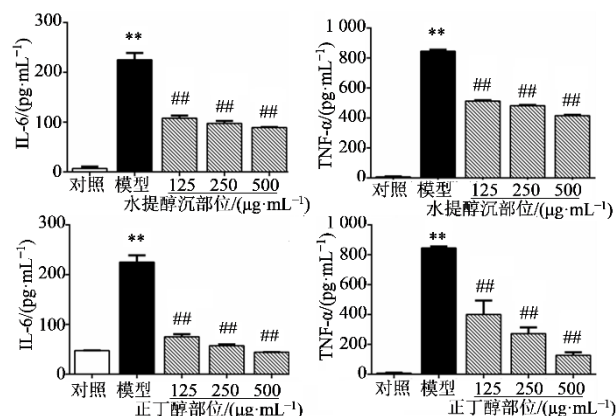
图3 荜蕒水提醇沉部位、正丁醇部位对LPS诱导的RAW264.7细胞释放NO的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.3 Effect of *Thlaspi arvense* water extraction and alcohol precipitation and *N*-butanol site on NO release in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

抑制炎症巨噬细胞中炎症因子IL-6、TNF- α 的分泌,并且正丁醇部位的抗炎活性优于水提醇沉部位,后续选择正丁醇部位做进一步的机制研究。

3.5 对LPS诱导的RAW264.7细胞中iNOS、COX-2、IL-1 β 蛋白的影响

如Western blotting实验结果所示,模型组与对照组比较,1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS作用于RAW264.7细胞36 h后,iNOS、COX-2、IL-1 β 的蛋白表达量显著提高($P < 0.01$),说明已经成功构建RAW264.7细胞炎



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 荜蕒水提醇沉部位、正丁醇部位对LPS诱导巨噬细胞RAW264.7分泌IL-6、TNF- α 影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.4 Effect of *Thlaspi arvense* water extraction and alcohol precipitation and *N*-butanol site on IL-6 and TNF- α secretion in RAW264.7 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

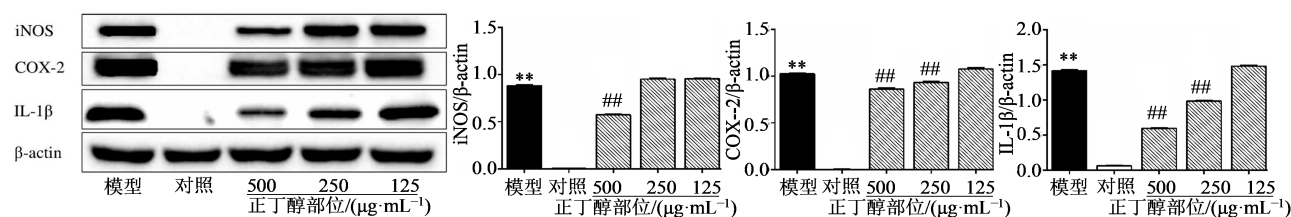
症模型。与模型组比较,荜蕒正丁醇部位500 $\mu\text{g/mL}$ 组的iNOS和250、500 $\mu\text{g/mL}$ 组COX-2、IL-1 β 蛋白表达量显著降低($P < 0.01$)。结果表明,荜蕒正丁醇部位可以降低iNOS、COX-2、IL-1 β 蛋白的表达量。结果见图5。

3.6 对LPS诱导的RAW264.7细胞中TLR-4/NF- κ B信号通路的影响

模型组与对照组比较,1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS刺激RAW264.7细胞36 h后,TLR-4、NF- κ B p-P65、p-I κ B α 的蛋白表达量显著提高($P < 0.01$)。与模型组比较,250、500 $\mu\text{g/mL}$ 的荜蕒正丁醇部位可显著抑制NF- κ B p-P65、TLR-4、p-I κ B α 蛋白表达($P < 0.01$),且随浓度增加表达量降低。结果表明荜蕒正丁醇部位发挥抗炎作用是通过抑制TLR-4/NF- κ B通路来实现的。结果见图6。

4 讨论

炎症是生物体内一种重要的免疫防御反应,其可以帮助机体抵抗病原微生物的感染,但炎症反应

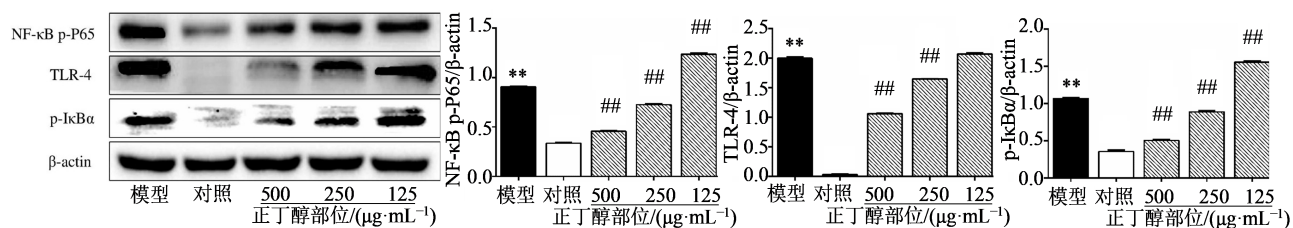


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

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

图5 荜蕒正丁醇部位对LPS诱导的RAW264.7细胞iNOS、COX-2、IL-1 β 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.5 Effect of *Thlaspi arvense* *N*-butanol site on iNOS, COX-2, and IL-1 β expression of LPS induced by RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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6 菥蓂正丁醇部位对LPS诱导的RAW264.7细胞NF-κB p-P65、TLR-4、p-IκBα表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 6 Effect of *Thlaspi arvense* N-butanol site on NF-κB p-P65, TLR-4, and p-IκBα expression of LPS induced by RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

发生失调也会导致组织器官损伤,从而严重威胁人体的健康。有研究表明,慢性炎症反应在许多重大疾病的发生发展进程中均存在,因此了解炎症反应的发生机制可能为疾病治疗提供新的策略^[17]。巨噬细胞是一种具有特殊功能的细胞群体,在不同微环境下可以发生不同方向的分化,并且有多种生物功能,其中M1型巨噬细胞通过IFN- γ 和LPS活化,产生促炎因子(IL-1 β 、IL-6),进而引发免疫反应,同时可激活炎症相关酶类(iNOS、COX-2),加剧炎症的发生过程^[18-19]。Toll样受体是介导天然免疫的重要模式识别受体,其参与的信号通路在产生炎症反应的过程中尤为重要^[20]。研究表明,LPS介导的免疫反应完全依赖于TLR-4,而TLR-4作为识别LPS的关键识别受体,控制着LPS炎症信号NF-κB的激活,以及众多炎症因子的释放^[21]。研究表明,TLR-4/NF-κB信号通路在LPS大鼠急性肺损伤模型的发展过程中起重要作用,TLR-4的激活可引起NF-κB的磷酸化入核^[22]。在正常的生理状态下,NF-κB蛋白是以复合体的形式存在于细胞质中,当机体被LPS或炎症因子刺激时,可导致该蛋白磷酸化后易位至细胞核中,从而控制炎症介质基因的转录和翻译。

本研究结果显示,菥蓂水提醇沉部位、正丁醇部位对小鼠巨噬细胞RAW264.7几乎无细胞毒性,证明了其安全性。给予不同浓度的水提醇沉部位、正丁醇部位后,可减轻LPS诱导的RAW264.7细胞对NO的释放,并且不同程度的降低细胞上清液中炎症因子(IL-6、TNF- α)的水平,其中高剂量组(500 $\mu\text{g/mL}$)效果最好,在NO释放和ELISA实验中发现菥蓂正丁醇部位的抗炎活性大于水提醇沉部位,因此Western blotting实验选择正丁醇部位进行。Western blotting数据显示,正丁醇部位可以显著降低iNOS、COX-2、IL-1 β 3种蛋白的表达量。LPS激活RAW264.7细胞的TLR-4,从而促进NF-κB p65的磷酸化活化入核,最终导致炎症的产生。正

丁醇部位通过抑制膜受体蛋白TLR-4的表达,抑制NF-κB p65、IκB α 的磷酸化。从而发挥抑制炎症因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)以及抑制介导前列腺素分泌的相关蛋白酶(COX-2)的产生。

本研究结果表明,菥蓂正丁醇部位在一定程度上可以抑制LPS诱导的小鼠巨噬细胞RAW264.7产生的炎症反应,其机制可能与降低COX-2、iNOS酶蛋白的表达,以及抑制TLR-4/NF-κB信号通路相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第33卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1978: 78-84.
Editorial Committee of the Chinese Florary of the Chinese Academy of Sciences. *The Chinese Florary: Volume 33* [M]. Beijing: Science Press, 1987: 78-84
- [2] 许晓燕, 余梦瑶, 魏巍, 等. 菥蓂子乙醇提取物对H₂O₂诱导PC12细胞损伤的保护作用 [J]. 四川中医, 2016, 34(7): 58-61.
Xu X Y, Yu M Y, Wei W, et al. Protective effect of *Thlaspi arvense* L. seed ethanol extract on damage PC12 cell induced by H₂O₂ [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2016, 34(7): 58-61.
- [3] 张宁, 杨晓宏, 马晓帆. HPLC法测定十三味菥蓂胶囊中大叶茜草素的含量 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(9): 1475-1477.
Zhang N, Yang X H, Ma X F. HPLC determination of mollugin in Shisanwei Ximing Capsules [J]. Chin J Pharm Anal, 2007, 27(9): 1475-1477.
- [4] 拉玛阿拉. 分析十三味菥蓂丸治疗前列腺炎的临床疗效 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(85): 184.
La M A L. Analysis of the clinical effect of Thirteen Imu Pill in prostatitis [J]. World Late Med Inf, 2017, 17(85): 184.
- [5] 林珊如, 伊岱旭. 扶正祛邪治疗慢性子宫内膜炎40例疗

- 效观察 [J]. 福建中医药, 1998, 29(5): 14.
- Lin S R, Yin D X. Observation on the effect of positive treatment in 40 cases of chronic intrauterine it is [J]. Fujian J Tradit Chin Med, 1998, 29(5): 14.
- [6] 于金英, 王云红, 刘国强, 等. HPLC-ESI-MS/MS 分析鉴定蒺藜中黄酮类成分 [J]. 中成药, 2015, 37(3): 556-561.
- Yu J Y, Wang Y H, Liu G Q, et al. Identification of flavonoids from *Thlaspi arvense* L. by HPLC-ESI-MS / MS [J]. Chin Tradit Pat Med, 2015, 37(3): 556-561.
- [7] 刘静果, 张宝山, 张玉红, 等. 中草药蒺藜的研究现状及展望 [J]. 江苏农业科学, 2020, 48(22): 15-21.
- Liu J G, Zhang B S, Zhang Y H, et al. Research status and prospect of *Thlaspi arvense* L. [J]. Jiangsu Agric Sci, 2020, 48(22): 15-21.
- [8] 陈卓. 从TLR4/MyD88/NF- κ B通路探讨丹参酮IIA干预动脉粥样硬化易损斑块的抗炎及免疫调节机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- Chen Z. Study on anti-inflammatory and immune regulation mechanism of danangenone A from TLR4/MyD88/NF- κ B pathway [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2016.
- [9] Feng H X, He Y L, La L, et al. The flavonoid-enriched extract from the root of *Smilax china* L. inhibits inflammatory responses via the TLR-4-mediated signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 256: 112785.
- [10] Rebollo-Hernanz M, Zhang Q Z, Aguilera Y, et al. Phenolic compounds from coffee by-products modulate adipogenesis-related inflammation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance in adipocytes, via insulin/PI3K/AKT signaling pathways [J]. Food Chem Toxicol, 2019, 132: 110672.
- [11] 姜华, 闫宜青, 江维, 等. NLRP3炎症小体活化、调控机制及相关疾病机制 [J]. 中国科学: 生命科学, 2017, 47(1): 125-131.
- Jiang H, Yan Y C, Jiang W, et al. NLRP3 inflammatory small body activation and regulation mechanism and the mechanism of related diseases [J]. Chin Sci: Life Sci, 2017, 47(1): 125-131.
- [12] Zhang Q, Lenardo M J, Baltimore D. 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology [J]. Cell, 2017, 168(1/2): 37-57.
- [13] Marinucci L, Balloni S, Fettucciari K, et al. Nicotine induces apoptosis in human osteoblasts via a novel mechanism driven by H₂O₂ and entailing glyoxalase 1-dependent MG-H1 accumulation leading to TG2-mediated NF- κ B desensitization: Implication for smokers-related osteoporosis [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 117: 6-17.
- [14] Chen S X, Maini R, Bai X G, et al. Incorporation of phosphorylated tyrosine into proteins: *In vitro* translation and study of phosphorylated I κ B- α and its interaction with NF- κ B [J]. J Am Chem Soc, 2017, 139(40): 14098-14108.
- [15] Ivanenkov Y A, Balakin K V, Lavrovsky Y. Small molecule inhibitors of NF- κ B and JAK/STAT signal transduction pathways as promising anti-inflammatory therapeutics [J]. Mini Rev Med Chem, 2011, 11(1): 55-78.
- [16] 毛鑫, 古淑尹, 叶艺璐, 等. 罗浮山百草油抗炎作用机制及活性组分筛选研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(16): 1606-1611.
- Mao X, Gu S Y, Ye Y L, et al. Anti-inflammatory mechanism testing and active ingredient screening of Luofushan herb oil [J]. Chin J Hosp Pharm, 2021, 41(16): 1606-1611.
- [17] 蒋瑜香. 中科大等学者揭示人体炎症发生机制 [N]. 合肥晚报, 2017-08-10 (A02).
- Jiang Y X. University of Science and Technology and other scholars reveal the mechanisms of human inflammation [N]. Hefei Evening News, 2017-08-10 (A02).
- [18] Chen X H, Fu E H, Lou H H, et al. IL-6 induced M1 type macrophage polarization increases radiosensitivity in HPV positive head and neck cancer [J]. Cancer Lett, 2019, 456: 69-79.
- [19] Liu Q, Yang C G, Wang S Y, et al. Wnt5a-induced M2 polarization of tumor-associated macrophages via IL-10 promotes colorectal cancer progression [J]. Cell Commun Signal, 2020, 18(1): 51.
- [20] Zhu Y G, Qu J M. Toll like receptors and inflammatory factors in *Sepsis* and differential expression related to age [J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(1): 56-61.
- [21] Li K P, He Z R, Wang X, et al. Apigenin C-glycosides of *Microcos paniculata* protects lipopolysaccharide induced apoptosis and inflammation in acute lung injury through TLR4 signaling pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 124: 163-175.
- [22] 伍振辉, 孟娟, 胡佳伟, 等. TLR4-MyD88-NF- κ B信号通路与肝炎-肝纤维化-肝癌轴相关性研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(5): 396-401.
- Wu Z H, Meng X, Hu J W, et al. Research progress on the correlation between TLR4-MyD88 -NF- κ B signaling pathways and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis [J]. J Int Phar Res, 2017, 44(5): 396-401.