

湖北金粟兰中倍半萜二聚体化合物(+)-chlorahupetenes B对脂多糖诱导的RAW264.7细胞的抗炎作用

胡蕴然^{1,2}, 庄鹏宇³, 柳航², 钱铭², 杨慧^{2*}, 葛卫红²

1. 中国药科大学 基础医学与临床药学院, 南京鼓楼医院 药学部, 江苏 南京 210008

2. 南京大学医学院附属鼓楼医院 药学部, 江苏 南京 210008

3. 华北理工大学 药学院, 河北 唐山 063210

摘要: 目的 评价湖北金粟兰中倍半萜二聚体化合物 (+)-chlorahupetenes B[(+)-CHB]对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 (RAW264.7) 炎症反应的影响及作用机制。方法 RAW264.7细胞分为对照组 (给予等体积DMSO)、模型组 (给予等体积DMSO)、地塞米松磷酸钠注射液 (Dex, 阳性对照, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组和 (+)-CHB 低、中、高浓度 ($5, 10, 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组。各组分别加入相应药物孵育细胞 1 h, 除对照组外, 其余组加入 LPS ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 诱导 24 h 造成炎症应答模型。细胞增殖检测法用于评估细胞活力; Griess 反应检测一氧化氮 (NO) 浓度; 酶联免疫分析检测炎症细胞因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)- 1β 、IL-6 的生成; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 IL- 1β 、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)、环氧合酶-2 (COX-2)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达; Western blotting 检测 Toll 样受体 4 (TLR4)、髓样分化因子 88 (MyD88)、核因子 κ B (NF- κ B) p65、p-NF- κ B p65、NLRP3、嘌呤能受体 (P2X7) 蛋白表达水平。结果 与模型组比较, (+)-CHB 减少了梭形细胞数量, 使大部分细胞恢复正常形态; 显著抑制 NO、TNF- α 、IL-6、IL- 1β 生成 ($P < 0.01$), 显著降低 COX-2、iNOS、IL-6、TNF- α 、NLRP3、IL- 1β mRNA 水平 ($P < 0.05, 0.01$); 显著降低 TLR4、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、NLRP3、P2X7 蛋白表达水平 ($P < 0.05, 0.01$)。结论 (+)-CHB 通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路和 P2X7/NLRP3/IL- 1β 炎症小体轴激活缓解 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应。

关键词: 金粟兰; 倍半萜二聚体化合物; (+)-Chlorahupetenes B; 抗炎; 巨噬细胞; Toll 样受体 4 (TLR4); 核因子 κ B (NF- κ B); 嘌呤能受体 (P2X7); NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 03-0505-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.03.007

Anti-inflammatory effect of a sesquiterpene dimer compound (+)-chlorahupetenes B from *Chloranthus henryi* var. *hupehensis* (Pamp.) K. F. Wu on lipopolysaccharides-stimulated RAW264.7 Cells

HU Yunran^{1,2}, ZHUANG Pengyu³, LIU Hang², QIAN Ming², YANG Hui², GE Weihong²

1. School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Department of Pharmacy, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210008, China

2. Department of Pharmacy, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China

3. School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

Abstract: Objective To evaluate the anti-inflammatory activity and mechanism of (+)-chlorahupetenes B, a natural eudesmane-type sesquiterpenoid dimer compound obtained from *Chloranthus henryi* var. *hupehensis*, in lipopolysaccharides (LPS) -induced RAW264.7 cell. **Methods** RAW264.7 cells were divided into control group (given equal volume of DMSO), model group (given equal volume of DMSO), dexamethasone sodium phosphate injection (Dex, positive control, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, and (+)-CHB low, medium, and high concentrations ($5, 10, 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) groups. Each group was incubated with corresponding drugs for 1 h. Except

收稿日期: 2023-10-31

基金项目: 国家自然科学基金青年资助项目 (82204720); 中央高校基本科研业务费资助项目 (3332022085)

第一作者: 胡蕴然 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为抗炎免疫药理学。E-mail: yunran923@outlook.com

*通信作者: 杨慧, 女, 药师, 主要研究方向为抗炎免疫药理学、临床药学。E-mail: yanghui@njglyy.com

for the control group, the other groups were induced with LPS ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 24 hours to create an inflammatory response model. Cell proliferation detection method was used to evaluate cell viability. Griess reaction was employed for determining nitric oxide (NO) concentration. Enzyme-linked immunosorbent assay was utilized for detecting inflammatory cytokines including tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , and IL-6. Real time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was performed to analyze *IL-1 β* , NOD like receptor heat protein domain associated protein 3 (*NLRP3*), cyclooxygenase-2 (*COX-2*), inducible nitric oxide synthase (*iNOS*), *IL-6*, and *TNF- α* mRNA expression. Western blotting detection was used to detect the expression levels of Toll like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), nuclear factor κB (NF- κB) p65, p-NF- κB p65, NLRP3, and purinergic receptor (P2X7) proteins. **Results** Compared with the model group, (+)-CHB reduced the number of spindle cells and restored most of the cells to their normal morphology, significantly inhibited NO and TNF- α , IL-6, IL-1 β generation ($P < 0.01$), significantly reduced COX-2, iNOS, IL-6, TNF- α , NLRP3, and IL-1 β mRNA levels ($P < 0.05, 0.01$), significantly reduced the expression levels of TLR4, MyD88, NF- κB p65, p-NF- κB p65, NLRP3, and P2X7 proteins ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** These findings suggested that (+)-CHB was an anti-inflammatory compound which could relieve LPS-stimulated macrophage inflammatory response partly by targeting TLR4/MyD88/NF- κB signal pathway and P2X7/NLRP3/IL-1 β inflammasome axis.

Key words: *Chloranthus henryi* var. *hupehensis* (Pamp.) K. F. Wu; sesquiterpene dimer compound; (+)-chlorahupetenes B; anti-inflammatory; macrophages; Toll like receptor 4 (TLR4); nuclear factor κB (NF- κB); purinergic receptors (P2X7); NOD like receptor heat protein domain associated protein 3 (NLRP3)

炎症是引起细胞和组织损伤的关键因素,其通过诱导和加剧免疫功能障碍、代谢异常、内分泌紊乱、疼痛和肿瘤生长,参与几乎所有疾病的进展。炎症性疾病的发病率和死亡率占全球主导地位,已被公认为当今世界最重要的死亡原因,50%以上的死亡可归根于炎症相关疾病^[1]。因此,消除不必要的非感染性炎症是维持健康和疾病治疗的重要策略^[2]。炎症是一个复杂的过程,其特征是大量炎症细胞迁移和募集到炎症组织部位,而巨噬细胞在引发和维持炎症方面发挥着重要作用^[3]。巨噬细胞作为组织内单核吞噬细胞的主要群体,可以吞噬细菌并释放促炎和抗菌介质,在固有免疫和适应性免疫中发挥关键作用^[4]。巨噬细胞存在于几乎所有的身体组织中,是外来物质的直接作用和主要应答细胞^[5]。在感染或损伤等因素的刺激作用下,巨噬细胞通过释放促炎介质来对抗刺激,如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6、一氧化氮 (NO)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和环氧合酶-2 (COX-2) 等,然而这些炎症介质的长期分泌可引起组织损伤,最终导致局部性或全身性的炎症反应^[6-7]。因此,控制巨噬细胞炎症应答可能是防治炎症性疾病的可行策略。

Toll样受体4 (TLR4)是经典的天然免疫模式识别受体,介导急性和慢性炎症的发生发展^[8]。脂多糖 (LPS) 通常被用作 TLR4 激动剂来诱导巨噬细胞并刺激关键的促炎细胞因子的产生。TLR4 识别的信号随后通过髓样分化因子 88 (MyD88) 等适配器分子触发下游信号级联,随后激活核因子 κB (NF- κB)

p65 亚基,导致多种炎症基因的表达^[9-10]。嘌呤能受体 (P2X7) 是一种离子通道,参与细胞信号转导及细胞因子分泌,参与不同疾病中的慢性炎症^[11]。在巨噬细胞中,LPS 诱导腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 释放和 P2X7 受体激活,调节 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体的组装,并分泌促炎因子 IL-1 β ,从而加重炎症应答^[12]。因此,抑制 TLR4 炎症信号通路或调控炎症小体的激活有利于多种炎症性疾病的治疗。

湖北金粟兰 *Chloranthus henryi* var. *hupehensis* (Pamp.) K. F. Wu 是金粟兰科的一种中草药,具有抗炎、抗菌、抗肿瘤和抗病毒活性^[13]。湖北金粟兰含有萜类、酰胺类、甾体类和木脂素等多种成分,其中萜类(尤其是倍半萜)是其生物活性成分^[14-15]。在前期研究中,已从湖北金粟兰中获得 4 对独特的 eudesmane 型倍半萜二聚体对映体,具有抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞产生 NO 的作用,其中 (+)-chlorahupetene B [(+)-CHB] (图 1) 抑制 NO 的半数抑制浓度为 $12.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对于炎症性疾病的治疗具有良好的抗炎潜力和研究开发利用价值,但其具体抗炎作用及机制尚未完全阐明^[16]。因此,对 (+)-CHB 的抗炎作用和靶点进行深入研究,将有利于阐明湖北金粟兰中倍半萜二聚体的抗炎机制。

本研究将构建经典的 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞模型,评估 (+)-CHB 减少炎症介质和细胞因子 (NO、iNOS、COX-2、TNF- α 和 IL-6) 产生的作用,分析 (+)-CHB 对炎症信号通路蛋白 TLR4/MyD88/

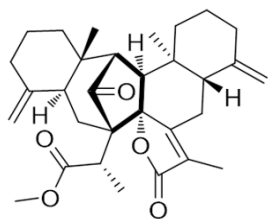


图1 (+)-CHB结构

Fig. 1 Structure of (+)-CHB

NF- κ B p65表达的调控,并确定(+)-CHB抑制P2X7/NLRP3/IL-1 β 轴激活的功能。本研究通过揭示(+)-CHB发挥抗炎作用的潜在机制,为湖北金粟兰中活性化合物的开发和应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

3020 酶标仪(Thermo Fisher公司);LightCycler 480 实时聚合酶链反应(PCR)仪(Roche公司);SW-CJ-2D超净工作台(苏州净化设备有限公司);5200 凝胶显微成像系统(上海天能生命科学有限公司);Centrifuge5424R 低温高速离心机(Eppendorf公司);XD-202 倒置荧光显微镜(江南永新生物公司);BG-verMINI 垂直电泳仪、BG-verBLOT 垂直转印仪(北京百晶生物技术有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

(+)-CHB 化合物由华北理工大学庄鹏宇教授制备,质量分数大于98%^[16]。DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco 公司);青霉素和链霉素(Biosharp 公司);细胞增殖检测 MTS 试剂盒(Promega 公司);地塞米松磷酸钠注射液(Dex)(国药集团容生制药有限公司);二甲基亚砜(DMSO)(索莱宝公司);LPS(Sigma 公司);TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(Biolegend 公司);TransZol Up Plus RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、Top Green qPCR SuperMix 试剂盒(Transgene 公司);蛋白酶抑制剂、蛋白磷酸酶抑制剂、蛋白裂解液(普利莱公司);聚偏氟乙烯膜(Millipore 公司);TLR4、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、NLRP3、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(CST 公司);P2X7 抗体(Abcam);生物素化抗兔 IgG(H+L)二抗、过氧化物酶标记的链霉亲和素三抗(Seracare 公司);增强化学发光(ECL)发光液(翊圣公司)。

1.3 细胞株

小鼠巨噬细胞系(RAW264.7 细胞)购于中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 RAW264.7 细胞培养

RAW264.7 细胞以 DMEM 培养基,加 10% 胎牛血清,加 100 U $\cdot$ mL⁻¹青霉素和 100 U $\cdot$ mL⁻¹链霉素培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中。细胞生长至对数生长期时用于实验。

2.2 细胞存活率检测

使用 DMSO 作为溶媒,配制浓度为 160 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的(+)-CHB 储备液,使用 DMSO 进行倍比稀释,得到浓度分别为 80、40、20、10、5、2.5 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的(+)-CHB 储备液。RAW 264.7 细胞(每孔 1 $\times$ 10⁵ 个)接种于 96 孔板,分为 8 组:对照组和(+)-CHB 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0、160.0 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 组,对照组加入等体积的 DMSO,孵育 24 h。加入 10% 体积的 MTS 溶液,避光孵育 4 h 后,酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{(+)-\text{CHB}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 RAW264.7 细胞分组及处理

为考察(+)-CHB 的药效学作用及作用机制,细胞分为 6 组:对照组(给予等体积 DMSO)、模型组(给予等体积 DMSO)、Dex(阳性对照,1 μ mol $\cdot$ L⁻¹)组和(+)-CHB 低、中、高浓度(5、10、20 μ mol $\cdot$ L⁻¹)组。各组分别加入相应药物孵育细胞 1 h,除对照组外,其余组加入 LPS(1 μ g $\cdot$ mL⁻¹)诱导 24 h 造成炎症应答模型。使用光学显微镜观察细胞形态。

2.4 NO 浓度测定

RAW264.7 细胞以每孔 1 $\times$ 10⁵ 个接种到 96 孔培养板,细胞分组、给药、造模、培养同“2.3”项。收集细胞培养上清液,加入等体积的 Griess 试剂(含 1% 磺胺的 2.5% 磷酸溶液和 0.1% 萘乙二胺二盐酸盐水溶液)。避光孵育 10 min 后,用酶标仪于 490 nm 处检测 A 值。

2.5 细胞因子生成水平检测

RAW264.7 细胞以每孔 2 $\times$ 10⁵ 个接种到 48 孔培养板,细胞分组、给药、造模、培养同“2.3”项。收集细胞培养上清液,使用 ELISA 试剂盒检测 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平。

2.6 炎症相关基因表达水平检测

RAW264.7 细胞以每孔 2 $\times$ 10⁶ 个接种到 6 孔培养板,细胞分组、给药、造模、培养同“2.3”项。采用 TransZol Up Plus RNA 提取试剂盒提取 RAW264.7 细胞的总 RNA,并将其反转录成 cDNA。使用 Top Green qPCR SuperMix 试剂盒,在实时 PCR 仪中进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析。扩增采用二

步法,条件如下:94 °C 预变性 30 s,1 个循环;94 °C 变性 5 s,60 °C 变性 30 s,共 40 个循环;在 95 °C 下熔化 5 s,在 60 °C 下熔化 1 min,最后在 50 °C 下冷却

30 s。以 *GAPDH* 作为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *IL-1 β* 、*NLRP3*、*COX-2*、*iNOS*、*IL-6* 和 *TNF- α* 的 mRNA 相对表达。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因	上游基因(5'→3')	下游基因(5'→3')
<i>IL-1β</i>	TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG	AGGTCCACGGGAAAGACACAGG
<i>NLRP3</i>	CCAACCAGAACTTCACACACC	TGTAGTTTACAGTCCGGGTGC
<i>COX-2</i>	CATCCCCTTCTGCGAAGTT	CATGGGAGTTGGGCAGTCAT
<i>iNOS</i>	ACTACTGCTGGTGGTGACAA	CCTGAAGGTGTGGTTGAGTTC
<i>TNF-α</i>	GTCCCCAAAGGGATGAGAAGT	TTTGCTACGACGTGGGCTAC
<i>GAPDH</i>	GTGGGAATGGGTCAGAAGGA	CTTCTCCATGTCGTCCCAGT

2.7 炎症通路蛋白表达水平检测

RAW264.7 细胞以每皿 2×10^7 个接种到培养皿,细胞分组、给药、造模、培养同“2.3”项。收集 RAW264.7 巨噬细胞,加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液,提取细胞总蛋白。配制 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶与 5% 浓缩胶,加入 $1 \times$ 三羟甲基氨基甲烷-甘氨酸电泳缓冲液,上样后进行电泳,并转移至聚偏氟乙烯膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,4 °C 过夜孵育一抗 TLR4、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、NLRP3、P2X7、GAPDH;室温孵育二抗 2 h;室温孵育三抗 1 h。使用 ECL 发光液和化学发光成像仪显影成像,应用 Image J 软件对目的蛋白和内参蛋白条带进行灰度分析。

2.8 统计分析

使用 GraphPad Prim 9.0 软件分析,数据表示为 $\bar{x} \pm s$,两组间数据比较采用 Student's *t*-test 法进行分析,多组间数据比较采用单因素方差分析。

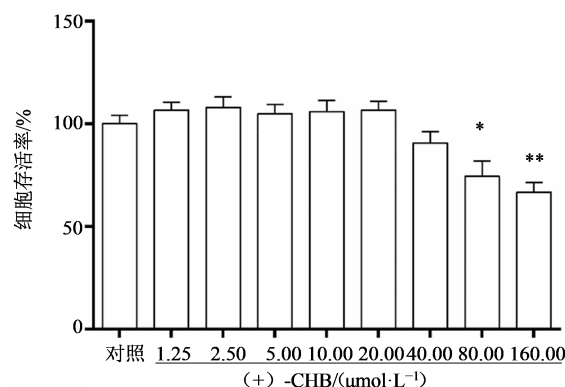
3 结果

3.1 (+)-CHB 对 RAW264.7 细胞存活率的影响

如图 2 所示,与对照组相比,(+)-CHB 浓度在 $1.25 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 RAW264.7 细胞存活率未见显著影响,当(+)-CHB 浓度为 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞存活率有降低趋势,但未见统计学差异,当(+)-CHB 浓度大于 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞存活率显著降低($P < 0.05, 0.01$)。故选择无毒剂量 5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为后续研究的低、中、高剂量组。

3.2 (+)-CHB 对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞形态的影响

使用光学显微镜记录细胞形态的变化,如图 3



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

图 2 RAW264.7 细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Viability of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

所示,对照组细胞呈饱满圆形,而 LPS 刺激的模型组部分细胞呈长梭形极化状态,形成伪足,触角分明;与模型组相比,(+)-CHB 处理减少了梭形细胞数量,大部分细胞恢复正常形态。结果表明,(+)-CHB 可减轻 LPS 对巨噬细胞的刺激,改善极化状态,缓解细胞炎症反应。

3.3 (+)-CHB 对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞炎症介质生成的影响

对 RAW264.7 细胞炎症介质分泌及 mRNA 表达进行检测,如图 4 所示,与对照组相比,模型组 NO 生成和 *iNOS*、*COX-2* mRNA 表达均显著增加($P < 0.01$);与模型组相比,(+)-CHB 各浓度显著抑制 NO 生成($P < 0.01$),显著降低 *COX-2* mRNA 水平($P < 0.01$),10 和 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理显著降低 *iNOS* mRNA 表达水平($P < 0.05$)。结果表明,(+)-CHB 可浓度相关性抑制体外 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中促炎介质分泌及 mRNA 表达。

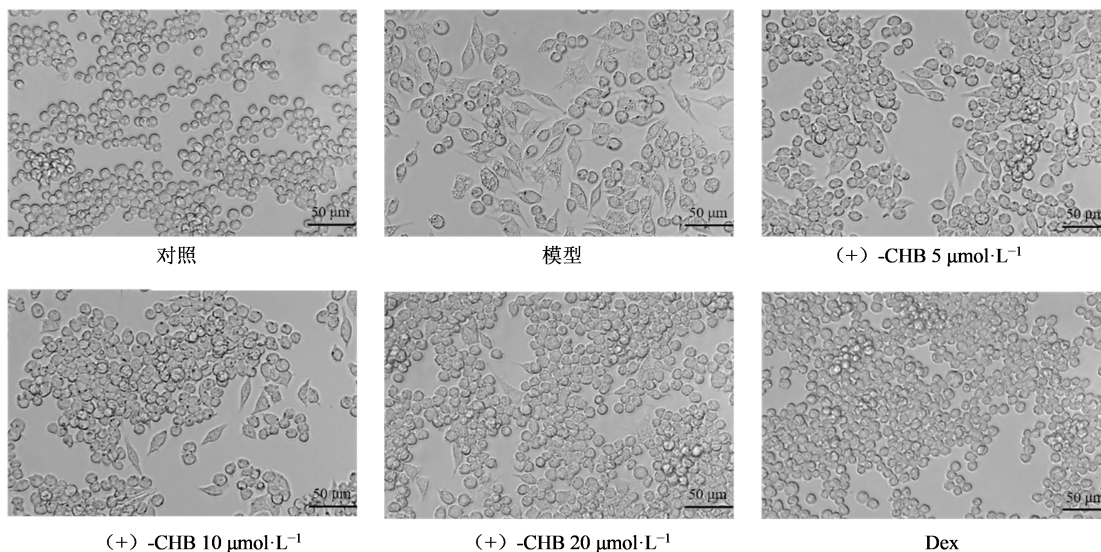
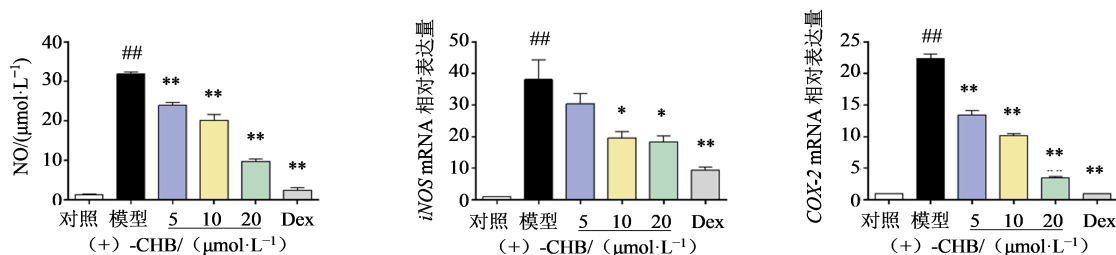


图3 RAW264.7细胞形态变化

Fig. 3 Morphological variation of RAW 264.7 macrophages

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4 RAW264.7细胞炎症介质水平($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Level of inflammatory mediators of RAW 264.7 macrophages ($\bar{x} \pm s, n=3$)

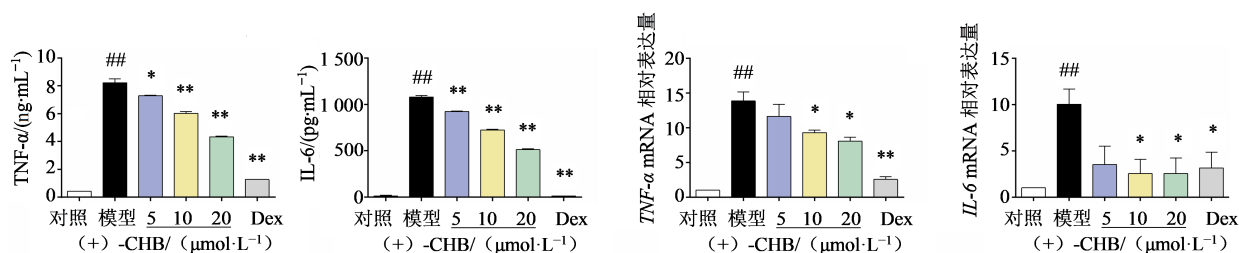
3.4 (+)-CHB对LPS刺激的RAW264.7细胞炎症细胞因子水平的影响

如图5所示,模型组的TNF- α 、IL-6的上清分泌水平和mRNA水平显著高于对照组($P < 0.01$);与模型组比较,各浓度(+)-CHB和Dex处理均显著减少了TNF- α 和IL-6分泌($P < 0.05, 0.01$),中、高浓度(+)-CHB和Dex处理显著减少TNF- α 和IL-6

mRNA水平($P < 0.05, 0.01$)。结果表明, (+)-CHB通过抑制LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞中炎症细胞因子的过度表达发挥抗炎作用。

3.5 (+)-CHB对LPS刺激的RAW264.7细胞中TLR4/MyD88/NF- κ B炎症通路的影响

对细胞中TLR4及其下游炎症通路信号蛋白表达进行检测,如图6所示,与对照组相比,LPS诱导

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 RAW264.7细胞炎症细胞因子水平($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 5 Level of inflammatory cytokines of RAW 264.7 macrophages ($\bar{x} \pm s, n=3$)

的模型组中炎症通路中关键信号分子TLR4、MyD88、NF- κ B p65和p-NF- κ B p65蛋白的表达均显著增加($P<0.01$);与模型组相比,(+)-CHB显著降低TLR4、MyD88、NF- κ B p65和p-NF- κ B p65蛋白的表达($P<0.05, 0.01$)。结果表明,(+)-CHB可能通过抑制TLR4/MyD88/NF- κ B炎症信号通路而发挥抗炎作用。

3.6 (+)-CHB对LPS刺激的RAW264.7细胞P2X7/NLRP3/IL-1 β 炎症小体轴激活的影响

对细胞炎症小体及其上下游分子表达进行检测,如图7的Western blotting结果所示,与对照组相比,模型组P2X7蛋白的表达显著增加($P<0.01$);与模型组比较,(+)-CHB以剂量相关的方式显著抑制LPS诱导的P2X7蛋白表达($P<0.05, 0.01$)。

与对照组相比,模型组NLRP3蛋白和mRNA表

达显著增加($P<0.01$);与模型组相比,(+)-CHB 10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理显著下调NLRP3的蛋白和mRNA表达($P<0.05, 0.01$)。

qRT-PCR和ELISA结果显示,与对照组相比,模型组IL-1 β mRNA的表达和分泌显著增加($P<0.05, 0.01$);与模型组比较,(+)-CHB处理后IL-1 β mRNA表达和分泌水平显著降低($P<0.05, 0.01$)。结果提示,(+)-CHB能抑制P2X7/NLRP3/IL-1 β 炎症小体轴激活。

4 讨论

炎症在心血管疾病、癌症、哮喘、关节炎和糖尿病等多种疾病的发生和发展中起着至关重要的作用,开发新型抗炎药物已成为目前特别重要的研究方向。而来自植物或传统草药的天然产物构成了新型药物研究开发的宝库,许多具有独特疗效的天

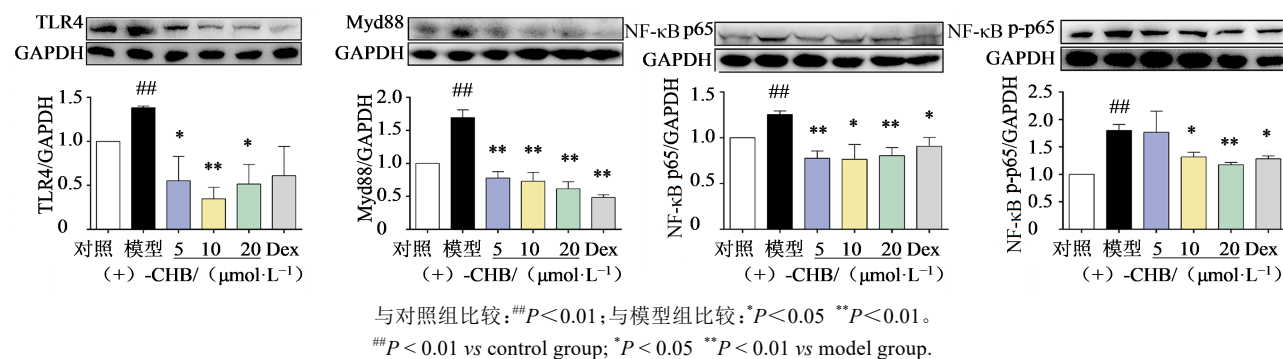


图6 RAW264.7细胞中关键炎症信号分子蛋白表达水平($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 6 Protein expression of key signal molecules of RAW 264.7 macrophages ($\bar{x}\pm s, n=3$)

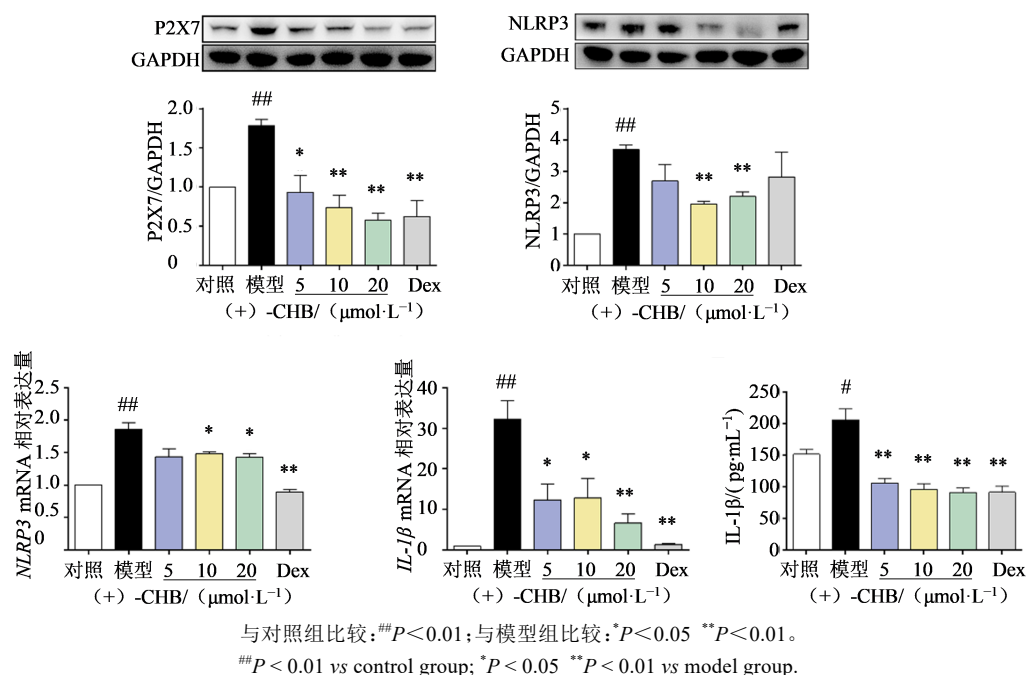


图7 RAW264.7细胞中P2X7/NLRP3/IL-1 β 炎症小体轴表达水平($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 7 Expression of P2X7/NLRP3/IL-1 β in RAW 264.7 macrophages ($\bar{x}\pm s, n=3$)

然产物已被批准用于疾病的临床治疗,例如抗疟药青蒿素、抗肿瘤药长春碱,或免疫调节性药物 fingolimod 等^[17-19]。充分表征天然产物的结构功能和生物活性,将有助于发现具有独特价值的新型药物候选物^[20]。本课题组前期研究发现,(+)-CHB 作为湖北金粟兰的活性化合物之一,具有潜在的抗炎作用,但其确切作用和机制尚不清楚^[16]。本研究建立了 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型,以确定(+)-CHB 的抗炎活性并研究其药理机制。

众所周知,LPS 能够激活单核细胞/巨噬细胞并促进关键炎症介质的产生^[21-22],故 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型常用于评价药物的疗效并研究其作用机制。活化的巨噬细胞在 LPS 诱导下触发促炎反应,引起 NO、iNOS 和 COX-2 的表达,以及 TNF- α 和 IL-6 的产生,最终导致炎症性疾病的进展和恶化^[23]。iNOS 和 COX-2 是负责产生 NO 和前列腺素 E2 的促炎酶,介导炎症损伤过程的启动和进展^[24]。TNF- α 主要由巨噬细胞产生,参与抗原提呈和免疫细胞激活^[25],而 IL-6 参与白细胞浸润^[26]。因此,上述炎症介质和细胞因子水平的下调可作为研究药物抗炎活性的策略。本研究发现(+)-CHB 可以降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO、iNOS 和 COX-2 的表达水平,以及减少炎症细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的产生,表明(+)-CHB 通过抑制巨噬细胞炎症介质和细胞因子的产生来发挥抗炎活性。

TLR4 信号通路在感染、慢性和急性炎症性疾病的固有免疫反应中发挥关键作用,协助巨噬细胞识别病原体并触发一系列防御机制^[8]。TLR4 激活后启动 2 种独特的信号通路:MyD88 依赖性信号通路和 MyD88 非依赖性信号通路。LPS 通常被视为 TLR4 激动剂,其触发的促炎反应是 MyD88 依赖性的^[9]。TLR4/MyD88 是 LPS 诱发炎症的关键信号通路,激活的 TLR4/MyD88 导致下游核转录因子 NF- κ B 的磷酸化,调节各种炎症介质的表达,包括 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、NLRP3、iNOS 和 COX-2^[10, 22]。因此,抑制 TLR4 及其下游途径已被认为是一种有效的抗炎方法。本研究发现(+)-CHB 抑制了 TLR4、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 的表达,表明(+)-CHB 的抗炎活性与阻断 TLR4 信号通路有关。

此外,NLRP3 炎症小体是一种天然免疫系统的多蛋白复合物,也被认为是巨噬细胞炎症反应的关键指标^[27]。活化的 NLRP3 炎症小体在多种疾病中发挥致病作用,如哮喘、阿尔茨海默病和心血管疾

病^[28]。在炎症过程中,LPS 激活 TLR4/NF- κ B,促进 NLRP3 和 IL-1 β 前体转录,这些转录在翻译后以非活性形式停留在细胞质中;而 LPS 或 ATP 通过激活 P2X7 受体,诱导无活性 NLRP3 炎症小体的组装和过度激活,进一步促进 IL-1 β 成熟并释放到细胞外环境,最终并引起广泛的免疫反应^[29-30]。在本研究中,(+)-CHB 不仅负调控 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路,也降低了 P2X7 和 NLRP3 的表达水平,下调 IL-1 β mRNA 表达且抑制其胞外分泌,表明(+)-CHB 的抗炎活性还与抑制 P2X7/NLRP3/IL-1 β 轴激活有关。

湖北金粟兰中活性化合物(+)-CHB 可通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路及 P2X7/NLRP3/IL-1 β 轴来缓解 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞的炎症反应。本研究将为(+)-CHB 在炎症控制领域的应用奠定实验基础,并为其在免疫紊乱和炎症相关疾病中的深入研究提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Furman D, Campisi J, Verdin E, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span [J]. Nat Med, 2019, 25(12): 1822-1832.
- [2] Chen L L, Deng H D, Cui H M, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs [J]. Oncotarget, 2018, 9(6): 7204-7218.
- [3] Watanabe S, Alexander M, Misharin A V, et al. The role of macrophages in the resolution of inflammation [J]. J Clin Invest, 2019, 129(7): 2619-2628.
- [4] Hirayama D, Iida T, Nakase H. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis [J]. Int J Mol Sci, 2017, 19(1): 92.
- [5] Xu R Q, Ma L, Chen T, et al. Sphorolipid suppresses LPS-induced inflammation in RAW_{264.7} cells through the NF- κ B signaling pathway [J]. Molecules, 2022, 27(15): 5037.
- [6] Chen Y N, Hu M R, Wang L, et al. Macrophage M1/M2 polarization [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 877: 173090.
- [7] Murray P J, Wynn T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets [J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(11): 723-737.
- [8] Kuzmich N N, Sivak K V, Chubarev V N, et al. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis [J]. Vaccines, 2017, 5(4): 34.
- [9] Shirvani H, Mirnejad R, Soleimani M, et al. Swimming exercise improves gene expression of PPAR- γ and downregulates the overexpression of TLR4, MyD88, IL-6, and TNF- α after high-fat diet in rat skeletal

- muscle cells [J]. Gene, 2021, 775: 145441.
- [10] Xu J J, Lu C J, Liu Z J, et al. Schizandrin B protects LPS-induced sepsis via TLR4/NF- κ B/MyD88 signaling pathway [J]. Am J Transl Res, 2018, 10(4): 1155-1163.
- [11] Sun S C, Gong D F, Liu R Q, et al. Puerarin inhibits NLRP3-caspase-1-GSDMD-mediated pyroptosis via P2X7 receptor in cardiomyocytes and macrophages [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(17): 13169.
- [12] Kong H, Zhao H R, Chen T R, et al. Targeted P2X7/NLRP3 signaling pathway against inflammation, apoptosis, and pyroptosis of retinal endothelial cells in diabetic retinopathy [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(4): 336.
- [13] 曹聪梅, 彭勇, 肖培根. 金粟兰属植物的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(13): 1509-1515.
Cao C M, Peng Y, Xiao P G. Advance in on chemical constituent and bioactivity research of genus *Chloranthus* [J]. China J Chin Mat Med, 2008, 33(13): 1509-1515.
- [14] Zhang T, Liu S, Zhang Z M. Chemical constituents of *Chloranthus henryi* var. *hupehensis* (in Chinese) [J]. J Chin Med Mat [J]. 2023, 46(4): 882-885.
- [15] Sun G P, Feng S H, Yan C. Research progress in chemical components and pharmacological action of *Chloranthus* plants (in Chinese)[J]. Guizhou Sci, 2021, 39(2): 26-34.
- [16] Zhang D Y, Zhou J J, Yang H, et al. Chlorahupetenes A-D, four eudesmane-type sesquiterpenoid dimer enantiomers with two unusual carbon skeletons from *Chloranthus henryi* var. *hupehensis* [J]. J Org Chem, 2022, 87(13): 8623-8632.
- [17] Saito M, McGready R, Tinto H, et al. Pregnancy outcomes after first-trimester treatment with artemisinin derivatives versus non-artemisinin antimalarials: A systematic review and individual patient data meta-analysis [J]. Lancet, 2023, 401(10371): 118-130.
- [18] Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, et al. Fingolimod (FTY720): Discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis [J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(11): 883-897.
- [19] Toupin N, Steinke S J, Nadella S, et al. Photosensitive Ru (II) complexes as inhibitors of the major human drug metabolizing enzyme CYP3A4 [J]. J Am Chem Soc, 2021, 143(24): 9191-9205.
- [20] Abdallah M H, Abu Lila A S, Shawky S M, et al. Experimental design and optimization of nano-transfersomal gel to enhance the hypoglycemic activity of silymarin [J]. Polymers, 2022, 14(3): 508.
- [21] Li L, Xu W J, Luo Y Z, et al. *Aloe* polymeric acemannan inhibits the cytokine storm in mouse pneumonia models by modulating macrophage metabolism [J]. Carbohydr Polym, 2022, 297: 120032.
- [22] Tang H Q, Yang D, Zhu L, et al. Paeonol interferes with quorum-sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and modulates inflammatory responses *in vitro* and *in vivo* [J]. Front Immunol, 2022, 13: 896874.
- [23] Arora S, Dev K, Agarwal B, et al. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases [J]. Immunobiology, 2018, 223(4/5): 383-396.
- [24] Bian M, Zhen D, Shen Q K, et al. Structurally modified glycyrrhetic acid derivatives as anti-inflammatory agents [J]. Bioorg Chem, 2021, 107: 104598.
- [25] Jang D I, Lee A H, Shin H Y, et al. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2719.
- [26] Wang T T, He C Q. TNF- α and IL-6: The link between immune and bone system [J]. Curr Drug Targets, 2020, 21(3): 213-227.
- [27] Zhang J, Liu X Q, Wan C Y, et al. NLRP3 inflammasome mediates M1 macrophage polarization and IL-1 β production in inflammatory root resorption [J]. J Clin Periodontol, 2020, 47(4): 451-460.
- [28] Hu Y S, Zhou Q L, Liu T L, et al. Coixol suppresses NF- κ B, MAPK pathways and NLRP3 inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells [J]. Molecules, 2020, 25(4): 894.
- [29] Xu S L, Lin Y, Liu W, et al. The P2X7 receptor mediates NLRP3-dependent IL-1 β secretion and promotes phagocytosis in the macrophage response to *Treponema pallidum* [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 82: 106344.
- [30] Shao B Z, Xu Z Q, Han B Z, et al. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: A review [J]. Front Pharmacol, 2015, 6: 262.

[责任编辑 兰新新]