

蓝刺头总黄酮体外抗炎活性及对 NF- κ B 通路的调控作用

罗爱勤¹, 曹颖男^{1*}, 邱锦墙¹, 钟志勇², 黄 晓², 林春晓²

1. 广州新华学院, 广东 广州 510520

2. 珠海百试通生物科技有限公司, 广东 珠海 519040

摘 要: 目的 探讨蓝刺头总黄酮(EL-TF)的体外抗炎活性及对核因子- κ B(NF- κ B)通路的调控作用。方法 MTT 法检测 EL-TF (0.024、0.098、0.390、0.780、1.563、3.125、6.250 mg·mL⁻¹) 对 HeLa 细胞的毒性;用肿瘤坏死因子(TNF)- α 诱导 HeLa 细胞建立 NF- κ B 通路激活模型, Western blotting 检测 EL-TF 对 I κ B- α 磷酸化的影响; MTT 法检测 EL-TF (0.098、0.195、0.200、0.390、0.780、1.563、3.125、6.250 mg·mL⁻¹) 对 RAW264.7 细胞的毒性;建立 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型, ELISA 法检测 EL-TF 对 TNF- α 和 IL-6 分泌的影响。结果 质量浓度在 0.024 mg·mL⁻¹ 以下的 EL-TF 对 HeLa 细胞无明显毒性作用; EL-TF 可剂量相关性抑制 TNF- α 诱导的 HeLa 细胞 I κ B- α 磷酸化($P < 0.05$ 、 0.01)。质量浓度在 0.200 mg·mL⁻¹ 以下的 EL-TF 对 RAW264.7 细胞无明显毒性, LPS 刺激 RAW264.7 细胞 6 h 后, 细胞上清中的 TNF- α 显著升高($P < 0.01$)、IL-6 因子水平增加;与模型组比较, EL-TF (0.2 mg·mL⁻¹) 作用 4、6 h 后 TNF- α 和 IL-6 水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 EL-TF 能够抑制 I κ B- α 磷酸化, 通过调控 NF- κ B 通路减轻细胞炎症反应, 并减少巨噬细胞炎症因子释放, 具有明确体外抗炎活性。

关键词: 蓝刺头总黄酮; 抗炎活性; 核因子- κ B(NF- κ B) 通路; 炎症因子; HeLa 细胞; RAW264.7 细胞

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)07-2356-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.07.009

Anti-inflammatory activity of total flavonoids from *Echinops Latifolius* and its regulatory effect on NF- κ B pathway *in vitro*

LUO Aiqin¹, CAO Yingnan¹, QIU Jinqiang¹, ZHONG Zhiyong², HUANG Xiao², LIN Chunxiao²

1. Guangzhou Xinhua University, Guangzhou 510520, China

2. Zhuhai BesTest Bio-Tech Co., Ltd., Zhuhai 519040, China

Abstract: Objective To investigate the *in vitro* anti-inflammatory activity of total flavonoids from *Echinops latifolius* Tausch. (EL-TF) and its regulatory effect on the NF- κ B pathway. **Methods** The cytotoxicity of EL-TF (0.024, 0.098, 0.390, 0.780, 1.563, 3.125, 6.250 mg·mL⁻¹) on HeLa cells was assessed using the MTT assay. HeLa cells were induced with tumor necrosis factor (TNF)- α to establish an NF- κ B pathway activation model, and the effect of EL-TF on I κ B- α phosphorylation was detected by Western blotting. The cytotoxicity of EL-TF (0.098, 0.195, 0.200, 0.390, 0.780, 1.563, 3.125, 6.250 mg·mL⁻¹) on RAW264.7 cells was assessed using the MTT assay. An LPS-induced inflammation model was established in RAW264.7 cells, and the effects of EL-TF on the secretion of TNF- α and IL-6 were detected by ELISA. **Results** EL-TF at concentrations below 0.024 mg·mL⁻¹ showed no significant cytotoxic effect on HeLa cells. EL-TF dose-dependently inhibited TNF- α -induced I κ B- α phosphorylation in HeLa cells ($P < 0.05$, 0.01). EL-TF at concentrations below 0.200 mg·mL⁻¹ showed no significant cytotoxicity on RAW264.7 cells. After 6 hours of LPS stimulation, the levels of TNF- α in the cell supernatant significantly increased ($P < 0.01$), and the levels of IL-6 also increased. Compared with the model group, EL-TF (0.2 mg·mL⁻¹) significantly reduced the levels of TNF- α and IL-6 after 4 and 6 hours of treatment ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** EL-TF can inhibit I κ B- α phosphorylation, alleviate cellular inflammation by regulating the NF- κ B pathway, and reduce the release of inflammatory factors from macrophages, demonstrating clear *in vitro* anti-inflammatory activity.

收稿日期: 2026-02-09

基金项目: 广东省 2021 年普通高校特色创新项目(2021KTSCX168); 中山大学新华学院 2020 年校级重点学科项目(2020XZD03); 广州新华学院 2022 年教学质量与改革工程建设项目课程教研室专项(2022JYS002); 广东省 2021 年重点建设学科科研能力提升项目(2021ZDJS143)

作者简介: 罗爱勤(1980—), 女, 研究方向为中药与天然药物、药物制剂及药物质量标准研究。E-mail: 28179418@qq.com

***通信作者:** 曹颖男(1983—), 女, 教授, 研究方向为天然药物抗肿瘤活性成分及机制研究。E-mail: 85394092@qq.com

Key words: total flavonoids in *Echinops Latifolius* Tausch.; anti-inflammatory activity; NF- κ B pathway; inflammatory factors; HeLa cells; RAW264.7 cells

炎症反应是机体抵御感染和组织损伤的核心防御机制^[1],其过度激活可引发类风湿性关节炎、动脉粥样硬化等多种慢性炎症相关病理损伤^[2],严重威胁人类健康。核因子 κ B (NF- κ B) 通路在炎症调控网络中占中枢地位,可被肿瘤坏死因子 (TNF) - α 、脂多糖 (LPS) 等多种刺激因子激活,进而介导 TNF- α 、白细胞介素 (IL) -6 等关键炎症因子的级联释放^[3],形成炎症放大循环。当前临床抗炎药物 (如非甾体抗炎药) 因不良反应及成瘾风险应用受限,亟需开发高效低毒的替代方案^[4]。蓝刺头 *Echinops latifolius* Tausch., 蒙药名“扎日阿-乌拉”,作为传统蒙医治疗骨折、骨热和疮疡的核心药材^[5-6],其黄酮类成分 (如芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷) 已被证实具有显著抗炎活性:动物实验显示其可抑制小鼠耳廓肿胀、降低骨关节炎模型中的基质金属蛋白酶 (MMP) -13 表达^[7-8],且同类黄酮化合物 (如山香圆总黄酮) 可通过抑制 NF- κ B 通路减少炎症因子释放^[9];然而,现有研究集中于动物模型和粗提物药效等^[10-12],针对蓝刺头总黄酮 (EL-TF) 的体外抗炎活性、细胞水平作用靶点及对 NF- κ B 通路的精准调控机制尚未明确。本研究首次采用双细胞模型策略:通过 TNF- α 诱导 HeLa 细胞建立 NF- κ B 通路激活模型 (聚焦 I κ B- α 磷酸化环节),以 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞建立炎症因子释放模型,运用 MTT 法、Western blotting 和 ELISA 技术系统评价 EL-TF 的体外抗炎活性,初步解析其通过调控 NF κ B 通路发挥抗炎作用的分子机制,为蒙药蓝刺头的抗炎机制阐释与活性成分开发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

311 型 CO₂ 培养箱 (赛默飞世尔科技有限公司); XD 倒置显微镜 [舜宇光学科技 (集团) 有限公司]; epoch2 全自动酶标仪 (美国伯腾公司); SW-CJ-2FD 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); TG16WS 离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 实验细胞

HeLa 人宫颈癌细胞、RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞,均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3 药材及主要试剂

蓝刺头药材购自保定仙德中药销售公司,批号 100210301,经广州新华学院药学系欧晓华教师鉴定为菊科植物蓝刺头 *Echinops Latifolius* Tausch. 的干燥头状花序;TNF- α (货号 222021, MCE 公司); PBS (货号 8120221, Gibco 公司); 细菌 LPS (货号 L2880, Sigma 公司); Mouse TNF- α Elisa Kit (96T) (货号 AD230314, AndyGene Co., Ltd.); Mouse IL-6 Elisa Kit (96T) (货号 AD230312, AndyGene Co., Ltd.); 二甲基亚砜 (DMSO, 货号 196055, MP Biomedicals); MTT 粉末 (货号 298-93-1, mym biological technology); DMEM 培养基 (货号 2305003, 北京索莱宝生物科技有限公司); 胎牛血清 (FBS, 货号 SA201126, 武汉普诺赛生命科技有限公司); 双抗 (链霉素+青霉素) (货号 J220009, 思拓凡生物科技有限公司); Anti-I κ B α (phospho S32) antibody (abcam 公司, 货号 ab92700); Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)、Mouse/Human ads- α HRP (southern biotech, 货号 4050-05)。

2 方法

2.1 EL-TF 的制备

取蓝刺头药材,粉碎通过 60 目筛,精密称取药材粉末 1 g, 60%乙醇 50 mL 回流提取 2 次,每次 1 h,合并提取液,浓缩至无乙醇,加水使稀释至 10 mL, 4 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min,取上清液通过装有 10 g AB-8 大孔树脂的玻璃柱,分别用水 100 mL 和 80%乙醇 50 mL 洗脱树脂柱,收集 80%乙醇洗脱液,浓缩蒸干,即得蓝刺头总黄酮 (得率 3.25%)。经紫外分光光度法测定 (平行 3 次),含总黄酮 (65.63 $\pm$ 0.60) %。

2.2 EL-TF 对 HeLa 细胞中 TNF- α 激活 NF- κ B 通路的影响

2.2.1 细胞培养 将 HeLa 细胞接种于含 10% FBS、1%双抗的 DMEM 细胞培养基中,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下进行细胞培养,待细胞长至培养皿 80%时,按 1:3 (体积比) 进行传代培养,取生长状态良好的对数期细胞进行实验^[13]。

2.2.2 MTT 法检测 EL-TF 对 HeLa 细胞的毒性 将对数期 HeLa 细胞悬液 (1 $\times$ 10⁴ 个 $\cdot$ mL⁻¹) 接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、96%相

对湿度 (RH) 条件下培养 24 h。设对照组、阳性对照 (10% DMSO) 组和 EL-TF (0.024、0.098、0.390、0.780、1.563、3.125、6.250 mg·mL⁻¹) 组, 加药后继续培养 24 h, 于倒置显微镜观察细胞生长形态, 吸出旧培养基, 每孔加入 20 μ L 含 MTT (5 mg·mL⁻¹) 的 PBS 溶液, 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 加入异丙醇 150 μ L, 混匀, 使用酶标仪在 570 nm 下测出每孔的吸光度 (A) 值, 参考波长 630 nm, 计算细胞增殖率 ($A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}$), 并确定 EL-TF 对 HeLa 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值^[14-15]。

2.2.3 TNF- α 诱导 HeLa 细胞 NF- κ B 通路激活模型的建立及其对 IkB- α 表达的影响 HeLa 细胞以密度为 $2.0 \times 10^4 \cdot \text{cm}^{-2}$ 接种于 24 孔板中, 每孔 0.5 mL, 培养 48 h, 无血清化 12 h, 使细胞进入生长静止期, 取 0.6、0.8、1.0、2.0 ng·mL⁻¹ TNF- α 分别作用于细胞 30 min 后, 提取细胞总蛋白, 用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 将洗涤后细胞总蛋白置 6 孔板, 每孔加入 RIPA 细胞裂解液 200 μ L, 于冰浴上静置 5 min, 用塑料细胞刮刮下贴壁细胞, 移液器吸至 EP 管中, 吹打均匀、振摇 15 min (4 $^{\circ}$ C), 离心 30 min (4 $^{\circ}$ C、12 000 r·min⁻¹), 弃沉淀, 取上清液转移至新的 EP 管, Western blotting 检测 IkB- α 磷酸化的表达情况。

2.2.4 Western blotting 法检测 EL-TF 对于 TNF- α 刺激 HeLa 细胞引起 IkB- α 表达的影响 细胞接种方法同“2.2.3”项, 分为对照组、模型组、EL-TF (0.005、0.010、0.020 mg·mL⁻¹) 组, 对照组: DMEM 完全培养基+HeLa 细胞作用 30 min; 模型组: DMEM 完全培养基+TNF- α 预孵 60 min+HeLa 细胞作用 30 min; EL-TF 低、中、高浓度组: DMEM 完全培养基+TNF- α +EL-TF 预孵 60 min+HeLa 细胞作用 30 min, 每组 3 个复孔。

提取细胞总蛋白, 用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 将洗涤后细胞总蛋白置 6 孔板, 每孔加入 RIPA 细胞裂解液 200 μ L, 于冰浴上静置 5 min, 用塑料细胞刮刮下贴壁细胞, 移液器吸至 EP 管中, 吹打均匀、振摇 15 min (4 $^{\circ}$ C), 离心 30 min (4 $^{\circ}$ C、12 000 r·min⁻¹), 弃沉淀, 取上清液转移至新的 EP 管, Western blotting 检测 IkB- α 蛋白的磷酸化水平。

2.3 EL-TF 对 LPS 刺激小鼠 RAW264.7 细胞释放炎症因子的影响

2.3.1 细胞培养 将 RAW264.7 细胞接种于含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 细胞培养基中, 同

“2.2.1”项下方法操作, 取生长状态良好的对数期细胞进行实验。

2.3.2 MTT 法检测 EL-TF 对 RAW264.7 细胞的毒性 将对数期 RAW264.7 细胞悬液 (1×10^4 个·mL⁻¹) 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 同“2.2.2”项下方法操作, 药物与细胞接触培养 24 h 后, 于倒置显微镜观察细胞生长形态, MTT 法测定并计算细胞增殖率, 确定 EL-TF 对 RAW264.7 细胞的 IC₅₀ 值。

2.3.3 LPS 刺激小鼠 RAW264.7 细胞炎症反应引起 TNF- α 和 IL-6 分泌的细胞模型的建立 RAW264.7 细胞以密度为 2.0×10^4 个·cm⁻² 接种于 24 孔板中, 每孔 0.5 mL, 培养 48 h, 无血清化 12 h, 使细胞进入生长静止期, 加入 100 ng·mL⁻¹ LPS 作用 6 h, 收集细胞上清液, ELSIA 试剂盒检测炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的浓度。

2.3.4 ELISA 法检测不同浓度 EL-TF 对 LPS 刺激小鼠 RAW264.7 细胞释放 TNF- α 和 IL-6 水平的影响 取经处理进入生长静止期的 RAW264.7 细胞, 分成对照组、模型组和 EL-TF 低、中、高浓度 (0.05、0.10、0.20 mg·mL⁻¹) 组, 每组 3 个复孔。对照组: 不加 LPS 和 EL-TF; 模型组: 加入 100 ng·mL⁻¹ LPS, LPS 刺激 30 min 后不加入药物干预; EL-TF 低、中、高浓度组: 加入 100 ng·mL⁻¹ LPS, LPS 刺激 30 min 后加入 EL-TF 干预。各组均采用 ELISA 法检测 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 h 时细胞上清中 TNF- α 和 IL-6 的浓度。

2.4 数据分析

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析; 计量资料数据方差齐, 或数据经转换后方差齐, 则采用组间两两比较的单因素方差分析方法; 若数据经转换后方差仍不齐, 采用秩和检验进行统计分析。百分率的比较采用秩和检验进行统计分析。

3 结果

3.1 EL-TF 对 HeLa 细胞中 TNF- α 激活 NF- κ B 通路的影响分析结果

3.1.1 EL-TF 对 HeLa 细胞培养 24 h 毒性分析结果 EL-TF 对 HeLa 细胞的毒性实验结果如表 1 所示, 随着质量浓度升高 (0.024~6.250 mg·mL⁻¹), 细胞圆缩/溶解比例增加 (8%~60%), MTT 法检测得 HeLa 细胞的增殖率下降 (91.32%~39.90%), 通过 Graphpad prism 软件得出 IC₅₀ 值为 2.478 mg·mL⁻¹。

表 1 EL-TF 对 HeLa 细胞的体外细胞毒性分析结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 *In vitro* cytotoxicity analysis results of EL-TF on HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	A 值	细胞增殖 率/%	镜检	毒性分 级
对照	—	1.142±0.070	100.00±0.06	细胞形态正常，贴壁生长良好，胞浆内有离散颗粒， 无细胞溶解	0
10% DMSO	—	0.340±0.125	29.76±10.93	细胞层几乎完全破坏	4
EL-TF	0.024	1.043±0.036	91.32±3.13	8%左右细胞呈圆形，疏松贴壁，偶可见细胞溶解	1
	0.098	0.959±0.049	83.95±4.27	16%左右细胞呈圆形，疏松贴壁，偶可见细胞溶解	1
	0.390	0.858±0.114	75.16±9.94	24%左右细胞呈圆形，疏松贴壁，偶可见细胞溶解	2
	0.780	0.764±0.072	66.93±6.32	33%左右细胞呈圆形，疏松贴壁，偶可见细胞溶解	2
	1.563	0.580±0.049	50.78±4.30	49%左右细胞呈圆形，疏松贴壁，偶可见细胞溶解	2
	3.125	0.536±0.036	46.93±3.16	53%左右细胞呈圆形，疏松贴壁，偶可见细胞溶解	3
	6.250	0.456±0.036	39.90±3.18	60%左右细胞呈圆形，疏松贴壁，偶可见细胞溶解	3

结果表明，浓度在 0.024 mg·mL⁻¹ 以下的 EL-TF 对 HeLa 细胞无明显毒性作用，由此拟定 EL-TF 进一步对 HeLa 细胞的低、中、高浓度分别为 0.005、0.010、0.020 mg·mL⁻¹。

3.1.2 HeLa 细胞炎症反应模型对 IκB-α 表达的影响 TNF-α 刺激 HeLa 细胞会触发 IκB-α 磷酸化，从而使 NF-κB 信号转导通路被激活，激活后可调控 TNF-α、IL-1 等细胞因子的产生，这些细胞因子增多进一步促进 NF-κB 的激活，形成 NF-κB 通路活化的正反馈调节^[16]。结果如图 1 和表 2 所示，与对照组比较，TNF-α 以 2.0、1.0、0.8、0.6 ng·mL⁻¹ 作用于 HeLa 细胞 30 min 后的 IκB-α 磷酸化逐渐增加，且 2 ng·mL⁻¹ TNF-α 有统计学差异 ($P<0.05$)，因此，选用此浓度用于后续研究。

3.1.3 EL-TF 对于 TNF-α 刺激 HeLa 细胞引起 IκB-α 磷酸化的影响 结果如图 2 和表 3 所示，与对照组相比，模型组 IκB-α 磷酸化显著增加 ($P<0.01$)；与模型组相比，0.02、0.01 mg·mL⁻¹ EL-TF 组的 IκB-α 磷酸化水平显著降低 ($P<0.05、0.01$)。

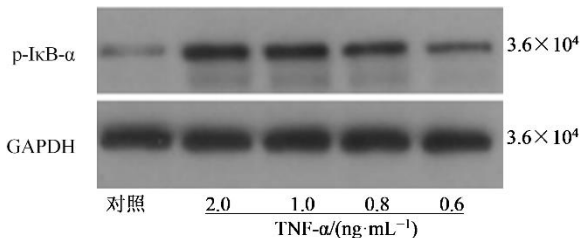


图 1 TNF-α 刺激 HeLa 细胞对 p-IκBα 蛋白表达的影响
Fig. 1 Effect of TNF-α stimulation on p-IκBα protein expression in HeLa cells

表 2 TNF-α 刺激 HeLa 细胞引起 IκB-α 蛋白磷酸化结果
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Result of TNF-α stimulating HeLa cells leading to phosphorylation of IκB-α protein ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TNF-α/(ng·mL ⁻¹)	p-IκBα/GAPDH
对照	—	1 164±378
TNF-α	2.0	2 853±150*
	1.0	2 463±275
	0.8	1 987±200
	0.6	1 529±153

与对照组比较：* $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group.

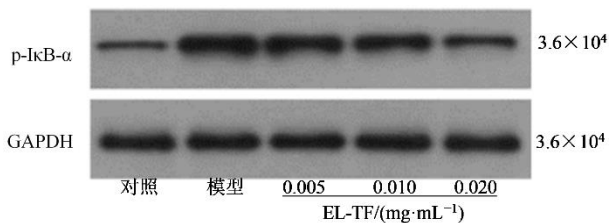


图 2 EL-TF 对 TNF-α 刺激 HeLa 细胞引起 IκB-α 蛋白磷酸化的影响

Fig. 2 Effect of EL-TF on phosphorylation of IκB-α protein induced by TNF-α stimulation in HeLa cells

3.2 EL-TF 对 LPS 刺激小鼠 RAW264.7 细胞释放炎症因子的影响

3.2.1 EL-TF 对 RAW264.7 细胞培养 24 h 毒性分析结果 EL-TF 对 RAW264.7 细胞的毒性实验结果如表 4 所示，随着质量浓度升高 (0.098~6.250 mg·mL⁻¹)，细胞损伤逐渐加重，圆缩/溶解比例增加 (0%~78%)，MTT 法检测得 24 h 细胞的增殖率下降

表 3 EL-TF 对于 TNF- α 刺激 HeLa 细胞引起 I κ B- α 蛋白磷酸化的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of EL-TF on phosphorylation of I κ B- α protein induced by TNF- α stimulation in HeLa cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	p-I κ B α 蛋白灰度值
对照	—	1 124 $\pm$ 350
模型	—	3 311 $\pm$ 481**
EL-TF	0.020	1 432 $\pm$ 470##
	0.010	2 111 $\pm$ 655#
	0.005	2 667 $\pm$ 568

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.

表 4 EL-TF 对 RAW264.7 细胞的体外毒性 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 *In vitro* toxicity of EL-TF on RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(mg·mL ⁻¹)	A 值	相对增殖率/%	镜检	毒性 分级
对照	—	2.129 $\pm$ 0.091	109.40 $\pm$ 4.66	细胞形态正常, 贴壁生长良好, 胞浆内有离散颗粒, 无细胞溶解	0
10% DMSO	—	0.381 $\pm$ 0.021	19.60 $\pm$ 1.10	细胞层几乎完全破坏	4
EL-TF	0.098	2.003 $\pm$ 0.091	102.90 $\pm$ 4.66	细胞形态正常, 贴壁生长良好, 胞浆内有离散颗粒, 无细胞溶解	0
	0.195	1.765 $\pm$ 0.153	90.69 $\pm$ 7.86	9%左右细胞呈圆形, 疏松贴壁, 偶可见细胞溶解	1
	0.200	1.749 $\pm$ 0.122	90.51 $\pm$ 3.46	9%左右细胞呈圆形, 疏松贴壁, 偶可见细胞溶解	1
	0.390	1.595 $\pm$ 0.115	81.96 $\pm$ 5.91	18%左右细胞呈圆形, 疏松贴壁, 偶可见细胞溶解	1
	0.780	1.396 $\pm$ 0.036	71.71 $\pm$ 1.83	28%左右细胞呈圆形, 疏松贴壁, 偶可见细胞溶解	2
	1.563	1.088 $\pm$ 0.071	55.88 $\pm$ 3.62	44%左右细胞呈圆形, 疏松贴壁, 偶可见细胞溶解	2
	3.125	0.798 $\pm$ 0.058	40.99 $\pm$ 2.98	59%左右细胞呈圆形, 疏松贴壁, 偶可见细胞溶解	3
	6.250	0.427 $\pm$ 0.124	21.92 $\pm$ 6.35	78%左右细胞呈圆形, 疏松贴壁, 偶可见细胞溶解	4

表 5 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 6 h 对细胞上清 TNF- α 、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 5 Effect of LPS stimulation on levels of TNF- α and IL-6 in supernatant of RAW264.7 cells after 6 h of stimulation ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	IL-6/(pg·L ⁻¹)
对照	—	218.6 $\pm$ 7.66	51.19 $\pm$ 4.89
LPS	100	237.9 $\pm$ 8.22*	55.34 $\pm$ 8.33

与对照组比较: * $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group.

清中的 TNF- α 增加有统计学差异 ($P<0.05$), IL-6 因子水平增加无统计学意义。

3.2.3 EL-TF 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞释放炎症因子的影响 结果如表 6 所示, 与对照组比较, 100 ng·mL⁻¹ LPS 刺激 RAW264.7 细胞 0.5、1.0、

(102.9%~21.92%), 通过 Graphpad prism 软件得出 IC₅₀ 值为 1.986 mg·mL⁻¹。结果表明, 质量浓度在 0.200 mg·mL⁻¹ 以下的 EL-TF 对 RAW264.7 细胞无明显毒性, 细胞增殖率在 90%以上, 由此拟定 EL-TF 进一步对 RAW264.7 细胞的低、中、高质量浓度分别为 0.05、0.10、0.20 mg·mL⁻¹。

3.2.2 LPS 刺激 RAW264.7 细胞释放炎症因子的模型 LPS 是细菌细胞壁的重要成分, 可通过激活免疫反应诱导炎症因子 TNF- α 、IL-6 等分泌^[17]。结果如表 5 所示, 与对照组相比, 100 ng·mL⁻¹ LPS 刺激 RAW264.7 细胞 6 h 后触发细胞免疫反应, 细胞上

2.0、4.0 h 后, 细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 含量增加但无统计学差异, 而作用 6 h 后会触发细胞免疫反应, 细胞上清液中的 TNF- α 显著增加 ($P<0.01$), IL-6 水平增加但无统计学意义。与模型组相比, 0.2 mg·mL⁻¹ EL-TF 作用 0.5、1.0、2.0 h 后, 细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 含量降低但无统计学差异; 作用 4、6 h 后细胞上清液中的 TNF- α 降低有统计学差异 ($P<0.05$), IL-6 因子水平降低有统计学差异 ($P<0.05$ 、0.01); 0.1 mg·mL⁻¹ EL-TF 作用 0.5、1.0、2.0、4.0 h 后, 细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 含量降低但无统计学差异 ($P>0.05$), 作用 6 h 后细胞上清液中的 TNF- α 降低但无统计学差异 ($P>0.05$), IL-6 因子水平降低有统计学差异 ($P<0.05$); 0.05 mg·mL⁻¹ EL-TF 作用 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 h 后, 细胞上清液 TNF- α 、IL-6 含量降低但无统计学差异 ($P>0.05$)。结果表明 EL-TF 的抗炎作用具有明显的浓度和时间相

表 6 EL-TF 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞作用不同时间后释放炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 6 Effect of EL-TF on release of inflammatory factors from RAW264.7 cells after different time periods of LPS stimulation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

作用时间/h	组别	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	TNF-α/(ng·L ⁻¹)	IL-6/(pg·L ⁻¹)
0.5	对照	—	234±16.0	34.2±6.64
	模型	—	249±34.1	36.1±4.03
	EL-TF	0.20	244±9.15	38.1±4.37
		0.10	238±27.9	37.3±2.77
		0.05	248±4.29	36.3±1.72
1.0	对照	—	249±10.6	40.5±7.76
	模型	—	262±50.9	39.6±1.93
	EL-TF	0.20	258±6.72	39.0±3.91
		0.10	261±20.1	40.3±1.37
		0.05	271±17.2	43.6±9.45
2.0	对照	—	270±3.73	42.3±6.54
	模型	—	296±37.8	46.6±5.86
	EL-TF	0.20	279±20.7	42.3±1.80
		0.10	282±15.2	48.6±2.35
		0.05	297±26.6	47.0±1.14
4.0	对照	—	286±14.1	48.3±8.60
	模型	—	325±23.7	52.2±1.24
	EL-TF	0.20	283±7.35 [#]	47.0±1.51 [#]
		0.10	298±9.23	54.6±8.60
		0.05	305±32.5	55.8±3.24
6.0	对照	—	295±7.62	59.3±12.4
	模型	—	366±21.8 ^{**}	65.7±2.88
	EL-TF	0.20	303±12.5 [#]	55.3±2.01 ^{##}
		0.10	329±42.1	60.3±1.01 [#]
		0.05	346±6.02	64.2±4.11

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.

关性, 其中 0.2 mg·mL⁻¹ 在作用 4~6 h 时展现出最佳的抑制炎症因子释放效果。

4 讨论

炎症反应过度激活与类风湿性关节炎、动脉粥样硬化等多种慢性疾病密切相关^[2], NF-κB 通路是调控炎症信号的核心通路, 其激活依赖于 IκB-α 的磷酸化与降解, 进而促进下游炎症因子转录释放^[18]。寻找高效低毒的天然来源 NF-κB 通路调节剂, 是当前抗炎药物研发的重要方向^[4]。蓝刺头作为传统蒙药, 在炎症相关病症治疗中应用广泛^[6], 但其总黄酮在细胞水平的抗炎机制尚不明确。

本研究选用 HeLa 细胞建立 NF-κB 通路激活模型, 该模型基于 TNF-α 可促进 IκB-α 磷酸化, 进而激活 NF-κB 通路的原理建立, 通过检测 p-IκBα 水

平反映通路激活程度。HeLa 细胞 NF-κB 通路对 TNF-α 刺激响应灵敏、背景干扰低, 适合快速验证 IκB-α 磷酸化调控; 以 RAW264.7 巨噬细胞作为炎症因子释放验证模型, 2 者互为补充, 提升结论可靠性。实验证实, EL-TF 在 0.005~0.020 mg·mL⁻¹ 可显著抑制 TNF-α 诱导的 HeLa 细胞 IκB-α 磷酸化, 且该浓度远低于其细胞毒性 IC₅₀, 排除细胞死亡干扰, 说明 EL-TF 可调控 NF-κB 通路关键环节。同时, EL-TF 可显著降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 TNF-α、IL-6, 作用呈浓度与时间相关性, 以 0.2 mg·mL⁻¹ 作用 4~6 h 效果最显著, 提示 EL-TF 可有效阻断炎症级联放大循环。

结果表明, EL-TF 在无明显细胞毒性的安全剂量范围内, 通过抑制 IκB-α 磷酸化调控 NF-κB 通

路,减少炎症因子释放,从而发挥体外抗炎活性,研究为蒙药蓝刺头的抗炎机制解析与开发利用提供了实验基础。

但本研究仅检测 IkB- α 磷酸化水平,未深入探讨丝氨酸特异的蛋白激酶(IKK)复合物、NF- κ B p65 磷酸化与核转位,也未拓展丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (NLRP3) 等相关炎症通路,仍属于初步机制探讨。后续可进一步开展 p65 磷酸化与核转位、IKK 激酶活性、MAPK 通路及 NLRP3 炎症小体等研究,并通过动物模型验证体内抗炎效果,为蓝刺头总黄酮开发为抗炎候选药物提供更充分的科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lee H S, Kwon Y J, Seo E B, et al. Anti-inflammatory effects of *Allium cepa* L. peel extracts via inhibition of JAK-STAT pathway in LPS-stimulated RAW264.7 cells [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 317: 116851.
- [2] Suzuki K. Chronic inflammation as an immunological abnormality and effectiveness of exercise [J]. Biomolecules, 2019, 9(6): 223.
- [3] 夏丽娟, 陈飞虎. 核因子 κ B 的分子生物学特性及其在炎症反应中的作用 [J]. 安徽医药, 2005, 9(3): 162-164.
Xia L J, Chen F H. The characters of NF- κ B in molecular biology and its effect on inflammatory reaction [J]. Anhui Med Pharm J, 2005, 9(3): 162-164.
- [4] 王晓明. 非甾体抗炎药临床应用及不良反应观察 [J]. 中国农村卫生, 2020, 12(16): 46.
Wang X M. Clinical application of non-steroidal anti-inflammatory drugs and observation of adverse reactions [J]. China Rural Health, 2020, 12(16): 46.
- [5] 中华人民共和国卫生部药品标准蒙药分册 [S]. 1998: 51.
Drug Standards of the Ministry of Health of the People's Republic of China-Mongolian Medicine Volume [S]. 1998: 51.
- [6] 谢友良, 赖小平, 易智彪. 蒙药蓝刺头研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(12): 22-24.
Xie Y L, Lai X P, Yi Z B. Research progress of Mongolian medicine *Echinops latifolius* Tausch. [J]. Asia Pac Tradit Med, 2019, 15(12): 22-24.
- [7] 花晓薇. 蓝红胶囊质量标准及蓝刺头指纹图谱研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2014.
Hua X W. Study on Quality standards of Lanhong Capsules and fingerprint spectrum of *Echinops Multiflorus* [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2014.
- [8] 孔令跃, 胡永成, 韩长旭. 蒙药蓝刺头治疗膝骨关节炎模型兔的软骨损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(17): 2649-2653.
Kong L Y, Hu Y C, Han C X. *Echinops latifolius*, a Mongolian medicine, for treating cartilage injury in a rabbit model of knee osteoarthritis [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(17): 2649-2653.
- [9] 王思佳. 山香圆总黄酮抗慢性咽炎作用及其机制研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2020.
Wang S J. Study on the anti-chronic pharyngitis effect and mechanism of total flavonoids from shanxiangyuan [D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [10] 郝记睿, 任逸众, 贾岩波. 蒙医药治疗骨关节炎的研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2025, 31(6): 65-70.
Hao J R, Ren Y Z, Jia Y B. Research progress in the treatment of osteoarthritis with Mongolian medicine [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2025, 31(6): 65-70.
- [11] 凌小松, 刘岩. 蒙药蓝刺头防治绝经后骨质疏松的研究进展 [J]. 中医临床研究, 2024, 16(31): 117-121.
Ling X S, Liu Y. A review on Mongolian medicine Lancitou in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. Clin J Chin Med, 2024, 16(31): 117-121.
- [12] 杨嘉琳. 基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨蒙药蓝刺头含药血清对去卵巢绝经后骨质疏松症模型大鼠 BMSCs 成骨分化的影响 [D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2023.
Yang J L. Exploring the effect of Mongolian medicine *Echinops multicaulis* drug-containing serum on osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells (BMSCs) in post-menopausal osteoporosis model rats after ovariectomy based on the Wnt/ β -catenin signaling pathway [D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2023.
- [13] 姜斯琪, 张劲松, 冯杰, 等. 灵芝 β -葡聚糖体外抗炎活性及机制探究 [J]. 菌物学报, 2024, 43(7): 101-110.
Jiang S Q, Zhang J S, Feng J, et al. Anti-inflammatory activities and mechanism of *Ganoderma lingzhi* β -glucooligosaccharide *in vitro* [J]. Mycosystema, 2024, 43(7): 101-110.
- [14] 张琪, 刘宇峻, 庄喜兵, 等. 附子提取物对肺癌 A549 细胞增殖抑制及放射增敏作用的研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2022, 34(3): 227-232.
Zhang Q, Liu Y J, Zhuang X B, et al. Study on the inhibitory effect of aconite extract on the proliferation of lung cancer A549 cells and its radiosensitizing effect [J].

- Carcinog, Terat, Mut, 2022, 34(3): 227-232.
- [15] 庞晓军, 黎东旺, 刘春芳. 中药有效成分对人肺泡 II 型肺泡细胞 ACE2 作用的研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(13): 1321-1325, 1344.
- Pang X J, Li D W, Liu C F. Study on the effects of active ingredients of traditional Chinese medicine on ACE2 of human alveolar type II cells [J]. Chin J Hosp Pharm, 2022, 42(13): 1321-1325, 1344.
- [16] Sharma V K, Prateeksha P, Singh S P, et al. Nyctanthes arbor-tristis bioactive extract ameliorates LPS-induced inflammation through the inhibition of NF- κ B signalling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 320: 117382.
- [17] 樊华. 补肾中药沙苑子总黄酮对斑马鱼及 RAW264.7 巨噬细胞模型抗炎作用机制的研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- Fan H. Study on the anti-inflammatory mechanism of total flavonoids from *Astragalus complanatus*, a kidney-tonifying Chinese herb, in zebrafish and RAW264.7 macrophage models [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [18] Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, et al. *In vivo* stimulation of I κ B phosphorylation is not sufficient to activate NF- κ B [J]. Mol Cel Biol, 1995, 15(3):1294-1301.

[责任编辑 兰新新]