

青心酮抑制脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞凋亡的机制探讨

李 钢¹, 吴 萍^{2*}, 张代娟², 叶笃筠², 李 锋³

(1. 华中科技大学同济医学院附属梨园医院 外科, 湖北 武汉 430070; 2. 华中科技大学同济医学院 病理生理学系, 湖北 武汉 430030; 3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 阐明青心酮对脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞凋亡抑制作用的可能机制。方法 采用LPS刺激小鼠RAW264.7巨噬细胞株为炎症模型,采用RT-PCR检测血红素氧合酶-1(HO-1)mRNA,血红蛋白结合法测定一氧化碳(CO)的相对水平,流式细胞仪结合细胞形态学检测观察细胞凋亡。结果 1×10^{-5} mol/L青心酮作用24h,在增加细胞HO-1 mRNA及CO水平的同时,可使LPS诱导的巨噬细胞凋亡率显著下降($P < 0.01$);加入牛血红蛋白清除CO后,青心酮对LPS所致细胞凋亡的抑制率由 $(63.2 \pm 3.8)\%$ 降低为 $(45.1 \pm 5.3)\%$,差异显著($P < 0.01$)。结论 青心酮可抑制LPS所致的小鼠RAW264.7巨噬细胞的凋亡,此作用部分由HO-1/CO系统所介导。

关键词:青心酮; 细胞凋亡; 巨噬细胞; 血红素氧合酶-1

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)12-1835-04

Mechanism of inhibition of 3, 4-dihydroxyacetophenone on LPS-induced apoptosis of RAW264.7 macrophage in mice

LI Gang¹, WU Ping², ZHANG Dai-juan², YE Du-yun², LI Feng³

(1. Department of Surgery, Affiliated Liyuan Hospital of Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430070, China; 2. Department of Pathophysiology, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, China; 3. Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To investigate the potential mechanism of inhibition of 3, 4-dihydroxyacetophenone (DHAP) on the LPS-induced apoptosis of RAW264.7 macrophage. **Methods** RAW264.7 macrophage line in mice was induced by LPS to set up the inflammatory model. Heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA was measured by RT-PCR. The relative concentration of carbon monoxide (CO) was detected in hemoglobin binding test. Apoptosis was studied by flow cytometric assay with cytomorphology. **Results** Treated with 1×10^{-5} mol/L DHAP for 24 h, LPS-induced macrophage apoptosis was decreased ($P < 0.01$), while the level of HO-1 mRNA and CO in cells was increasing. When CO was eliminated with bovine hemoglobin, the inhibitory rate of DHAP on LPS-induced apoptosis was decreased from $(63.2 \pm 3.8)\%$ to $(45.1 \pm 5.3)\%$ to show the significant effect ($P < 0.01$). **Conclusion** DHAP could inhibit LPS-induced apoptosis of RAW264.7 macrophage in mice. This effect is partly mediated by HO-1/CO system.

Key words: 3,4-dihydroxyacetophenone (DHAP); apoptosis; macrophage; heme oxygenase-1(HO-1)

青心酮,又名3,4-二羟苯基乙酮(3,4-dihydroxyacetophenone, DHAP),是从秃毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. et Arn. var. *glaber* Chang 叶中提取的有效成分^[1,2]。将青心酮用于妊娠高血压综合征和胎儿宫内发育迟缓等疾患的治疗,临床已取得满意疗效^[3]。青心酮调节血栓烷 $A_2(TXA_2)$ 与前列腺素 $I_2(PGI_2)$ 的平衡,进而舒张血管、抑制血小板的聚集曾视为其活血化瘀作用的重要机制之一^[4]。本课题组最近证实青心酮能明显抑制经脂多糖

(LPS)活化的小鼠巨噬细胞的凋亡^[5]。基于近期发现血红素氧合酶-1(HO-1)及一氧化碳(CO)能抑制细胞凋亡^[6],本研究以小鼠RAW264.7巨噬细胞株为观察对象,研究青心酮抗细胞凋亡作用是否与其调控HO-1/CO系统有关。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:青心酮(质量分数 $>99.8\%$),北京制药三厂产品。RT-PCR相关试剂(GibcoBr1),LPS、碘化丙啶(PI)、Hoechst 33258染色试剂盒、

收稿日期:2005-03-22

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100226)

作者简介:李 钢(1973—),男,湖北武汉人,在职研究生,主治医师,研究方向为骨损伤及骨感染。

Tel: (027) 62231750 E-mail: lg30003000@yahoo.com.cn

*通讯作者 吴 萍 Tel: (027) 83692625 E-mail: wpingwp@yahoo.com.cn

RNase (美国 Sigma), 牛血红蛋白 (凌飞科技公司), 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养及分组: 小鼠 RAW264.7 巨噬细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所。以 DMEM 完全培养基 (含 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素) 在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度下培养。细胞分为 A 组: 空白对照; B 组, 500 ng/mL LPS (经预实验证实该质量浓度为引起细胞凋亡而不导致坏死的有效质量浓度) 作用 24 h; C 组, 500 ng/mL LPS 及 1×10⁻⁵ mol/L 青心酮^[7]共同作用 24 h; D 组, 500 ng/mL LPS 作用 6 h 后, 给予 10 μmol/L 血红蛋白共同孵育 18 h; E 组, 500 ng/mL LPS 及 1×10⁻⁵ mol/L 青心酮作用 6 h 后, 给予 10 μmol/L 血红蛋白共同孵育 18 h。

1.3 RT-PCR 检测 HO-1 mRNA: 按试剂说明, 用 Trizol 提取细胞 (A、B、C 组) 总 RNA, 利用紫外分光光度计定量后, 取同量总 RNA, 进行逆转录。PCR 产物由上海博亚生物工程技术有限公司合成。目的基因 HO-1 上游引物 5'-CACCAGCCA-CACAGCACTAC-3', 下游引物 5'-CACCCACCC-CTCAAAGACA-3'。内参照 β-actin 上游引物 5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCCA-3', 下游引物 5'-GAGCACCCCTGTGCTGCTCACCCCTAGC-3'^[8]。产物大小分别为 460 和 310 bp。每个反应体系为 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 5 μmol/L 上游引物 1 μL, 5 μmol 下游引物 1 μL, 1 U TaqDNA 聚合酶, H₂O 15 μL, cDNA 3 μL。扩增条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 最后一次延伸 10 min; 目的基因扩增 32 个循环, 内参扩增 25 个循环。扩增产物用含 EB 的 1.6% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下观察照相。经图像分析系统软件 (ID 软件) 处理, 以 HO-1 与内参 β-actin 的平均吸光度比值进行半定量分析。

1.4 CO 水平测定: 按试剂说明书, 采用血红蛋白结合法测定巨噬细胞株 (A、B、C 组) 中 CO, 分别测定 420 nm 和 432 nm 两种波长的吸光度值, 按比尔定律建立综合方程式, 计算 CO 相对水平。

1.5 细胞凋亡率测定: 收集各组细胞, 80% 冰乙醇固定后将细胞数调至 1×10⁵/mL, 加入 0.33 μg/mL PI 及 100 μg/mL RNase 混合液, 室温避光染色 30 min。流式细胞仪测定。

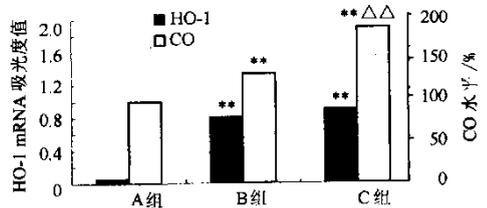
1.6 细胞形态学观察: 按 Hoechst 33258 染色试剂盒说明, 将待观察的细胞制成爬片, 经不同条件处理

后弃去培养基, 用 PBS 洗 2 遍, 于室温下用固定液固定 5 min, 2.5 mg/mL Hoechst 33258 染色 5 min, 洗片后封片, 荧光显微镜下观察。

1.7 统计分析: 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 *t* 检验分析组间差异。

2 结果

2.1 青心酮对巨噬细胞株 HO-1 mRNA 及 CO 水平的影响: 由图 1 可见, 空白对照细胞几乎不表达 HO-1 mRNA, 经 500 ng/mL LPS 刺激后, 其表达明显增加; 同时 CO 的水平亦明显高于空白对照组 (*P*<0.01); C 组细胞同时加入 LPS 与 1×10⁻⁵ mol/L 青心酮后, 与 B 组 (单用 LPS) 相比, HO-1 mRNA 及 CO 的水平进一步升高, CO 的增高差异显著 (*P*<0.01)。



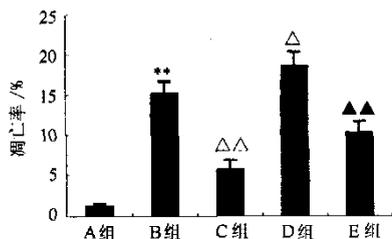
与 A 组比较: ** *P*<0.01 与 B 组比较: $\Delta\Delta$ *P*<0.01
** *P*<0.01 vs group A $\Delta\Delta$ *P*<0.01 vs group B

图 1 青心酮对 RAW264.7 巨噬细胞株 HO-1 及 CO 水平的影响 (n=8)

Fig. 1 Effect of DHAP on level of HO-1 and CO in RAW264.7 macrophages line (n=8)

2.2 流式细胞术测定结果: 见图 2。A 组正常细胞凋亡率为 (1.19±0.4)%, 500 ng/mL LPS 刺激后, B 组细胞凋亡率为 (15.2±1.5)%, 较空白对照组有显著性增高 (*P*<0.01)。C 组细胞同时加入 500 ng/mL LPS 和 1×10⁻⁵ mol/L 青心酮后, 凋亡率降为 (5.6±1.2)%, 较单用 LPS 组明显降低 (*P*<0.01), 青心酮对凋亡的抑制率为 (63.2±3.8)%。加入 CO 的清除剂血红蛋白, LPS 诱导凋亡的作用则被进一步增强, D 组细胞凋亡率为 (18.5±1.8)%, 与 B 组比较有显著增高 (*P*<0.05), 相反, 在 LPS 与青心酮共同作用的 E 组, 加入血红蛋白后, 青心酮对凋亡的抑制作用则被减弱, 细胞凋亡率为 (10.2±1.5)%, 与 C 组比较有显著增高 (*P*<0.01), 此时青心酮对凋亡的抑制率为 (45.1±5.3)%, 与未加血红蛋白前的抑制率相比显著降低 (*P*<0.01)。

2.3 细胞形态学分析结果: A 组巨噬细胞荧光染色后, 核黄绿色, 呈均匀弥散状; 其余各组均可见凋亡



与 A 组比较: ** $P < 0.01$ 与 B 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ 与 C 组比较: $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs group A $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs group B
 $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs group C

图 2 青心酮对 RAW264.7 巨噬细胞株凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Effects of DHAP on apoptosis rate of RAW264.7 macrophage line ($\bar{x} \pm s, n=5$)

的巨噬细胞,表现为核浓缩、靠边、核碎裂及凋亡小体的形成。随机选取视野计数 300 个细胞,各组凋亡细胞数所占比率分别是 A 组(2.16 ± 0.6)%, B 组(17.9 ± 1.8)%, C 组(7.7 ± 1.3)%, D 组(20.5 ± 0.9)%, E 组(11.2 ± 1.1)%。C 组与单用 LPS 的 B 组相比有显著降低($P < 0.01$), D 组、E 组与未加血红蛋白的 B 组、C 组相比,凋亡率明显增高($P < 0.01$)。

3 讨论

巨噬细胞在炎症的启动过程中起着非常关键的作用,它通过激活机体的免疫系统,释放细胞因子、具有生物活性的脂类介质及活性氧等参与炎症反应^[9]。目前,抗炎的主要策略仍以抑制炎症的启动和促炎因子生成为主^[10]。但临床和实验室的大量相关资料提示:有效调动机体自身抗炎力量,促进炎症的消退不失为一种有效抗炎手段。如适度地促进炎症细胞的凋亡可加速急性炎症的缓解^[11,12]。反之,细胞凋亡反应的不足则可导致急性炎症向慢性炎症的转化^[13]。抗炎药物特别是抗炎中药是否通过调节细胞凋亡进而发挥其抗炎作用尚无文献报道。

本实验发现,经 LPS 活化的巨噬细胞,细胞凋亡增加的同时,HO-1 和 CO 水平明显高于空白对照组;在 LPS 活化的细胞中加入青心酮后,HO-1 和 CO 的水平进一步增加,而细胞凋亡率反而明显降低;当用牛血红蛋白清除细胞中的 CO 后,青心酮对 LPS 诱导的凋亡的抑制作用则明显减弱。由此可见,对 LPS 活化的巨噬细胞,青心酮能抑制其凋亡的发生,同时增加细胞中 HO-1 和 CO 的水平,当 CO 被清除后,青心酮抑制凋亡的作用则被部分阻断。因此,推测青心酮对 LPS 所致的小鼠巨噬细胞的凋亡的抑制作用部分由 HO-1/CO 系统所介导,

其确切机制有待深入研究。

HO 是催化血红素降解的限速酶,从而生成胆绿素、游离铁和一氧化碳,以往的研究表明,它们不仅能清除机体的活性氧;HO-1 还能抑制多种促炎介质的产生,促进多种抗炎介质的表达,并且拮抗一些炎症介质的细胞毒效应^[14]。近来,越来越多的资料提示,HO-1/CO 在调节细胞的增殖与凋亡中亦起到关键的作用,如 Poss 等发现 HO-1 基因缺失的小鼠身长和体重明显低于对照的野生鼠^[15],而 HO-1 的过度表达则会抑制内皮细胞的凋亡^[16]。HO-1/CO 抑制凋亡的机制目前仍不十分清楚,但有证据表明这一作用可能与其能清除细胞的活性氧,增加丝裂原激活的蛋白激酶,抑制促凋亡的蛋白 p53 的表达,阻止线粒体释放细胞色素 C 等因素有关^[6]。而笔者还发现青心酮能降低巨噬细胞中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)^[7],这似乎提示青心酮增加 LPS 激活的巨噬细胞 HO-1/CO 的表达,抑制炎症因子及活性氧的释放,使细胞的炎症过程得以部分缓解,正是导致细胞凋亡减弱的原因之一。

本研究首次证明了青心酮抑制 LPS 激活的巨噬细胞凋亡系由促进 HO-1/CO 表达所致。青心酮抗炎作用机制的这一新发现不仅为青心酮等抗炎中药的药理作用机制研究开辟了新途径,同时也为临床抗炎策略的制定提供了重要线索。

References:

- [1] Wu X R, Li Y, Yang D S, et al. The utero-placental circulation, eugenics and the prevention and treatment of high risk pregnancies [J]. *Acta Univ Med Tongji* (同济医科大学学报), 1994, 14(1): 1-6.
- [2] Wu P, Huang Y P, Ye D Y. Progress in studies on mechanism of promoting blood circulation and removing blood stasis of 3, 4-dihydroxyacetophenone [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(3): 277-279.
- [3] Huang Y P, Ma T Y. Effect of 3, 4-dihydroxyacetophenone treatment on intrauterine growth retardation [J]. *Chin J Obstet Gynecol* (中华妇产科杂志), 1993, 28(6): 333-336.
- [4] Yang D S. Effects of 3, 4-dihydroxyacetophenone on the biosynthesis of TXA₂ and PGI₂ in human placental villus and umbilical artery segments *in vitro* [J]. *Prostaglandins*, 1989, 38(4): 497-504.
- [5] Wu P, Ye D, Zhang D, et al. Dual effect of 3, 4-dihydroxyacetophenone on LPS induced apoptosis in RAW264.7 Cells by modulating the production of TNF- α [J]. *J Huazhong Univ Sci Tech, Med Sci*, 2005, 25(2): 131-134.
- [6] William D. Heme oxygenase-1 in growth control and its clinical application to vascular disease [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 195: 373-382.
- [7] Zhang D J, Wu P, Pan X, et al. Effects of DHAP on expression of hemeoxygenase-mRNA/carbon monoxide and TNF- α in activated RAW264.7 cell line [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2004, 24(6): 257-260.
- [8] Suzuki H, Kanamaru K, Tsunoda H, et al. Heme oxygenase-1 gene induction as an intrinsic regulation against delayed cerebral vasospasm in rats [J]. *J Clin Invest*, 1999,

104(1); 59-66.

[9] Hortelano S, Castrillo A, Alvarez A M, *et al.* Contribution of cyclopentenone prostaglandins to the resolution of inflammation through the potentiation of apoptosis in activated macrophages [J]. *J Immunol*, 2000, 165(11); 6525-6531.

[10] Karin M, Lin A. NF-kappa B at the crossroads of life and death [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3; 221-227.

[11] Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation [J]. *J Leukoc Biol*, 1997, 61(4); 375-380.

[12] Haslett C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease [J]. *Br Med Bull*, 1997, 53; 669-683.

[13] Pope R M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2; 527-535.

[14] Willis D, Moore A R, Frederick R, *et al.* Hemeoxygenase; a novel target for the modulation of the inflammatory response [J]. *Nat Med*, 1996, 2(1); 87-90.

[15] Poss K D, Tonegawa S. Heme oxygenase-1 is required for mammalian iron utilization [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 20; 10919-10924.

[16] Soares M P, Lin Y, Anrather J, *et al.* Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival [J]. *Nat Med*, 1998, 4; 1073-1077.

沙苑子黄酮对 CCl₄及 D-氨基半乳糖致急性肝损伤的保护作用

刘春宇¹, 顾振纶¹, 韩蓉¹, 朱路佳¹, 周文轩², 郭次仪²

(1. 苏州大学医学院 药理教研室, 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007; 2. 香港保健协会, 香港)

摘要:目的 探讨沙苑子黄酮 (FAC) 对肝损伤的保护作用。方法 采用 0.1% CCl₄(10 mL/kg)、D-氨基半乳糖 (D-Gal, 700 mg/kg) 分别 ip 造成小鼠急性肝损伤模型, 并 ig 不同剂量的 FAC, 测定血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 活性, 观察肝组织病理改变; 用 CCl₄损伤原代培养大鼠肝细胞, 测定细胞培养液 ALT、AST 活性, MTT 法测定肝细胞增殖活性。结果 FAC 能显著降低小鼠 CCl₄和 D-Gal 损伤原代培养大鼠肝细胞模型 ALT 和 AST 活性 (P<0.01), 病理学观察显示, FAC 明显减轻肝组织损伤程度 (P<0.01)。FAC 显著提高肝细胞活性, 促进肝细胞增殖。结论 FAC 具有显著的保肝作用。

关键词:沙苑子; 黄酮; CCl₄; D-氨基半乳糖; 肝损伤

中图分类号:R286.55 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)12-1838-04

Protection of flavonoids from *Astragalus complanatus* seed on acute liver injury induced by carbon tetrachloride and D-galactosamine

LIU Chun-yu¹, GU Zhen-lun¹, HAN Rong¹, ZHU Lu-jia¹, ZHOU Wen-xuan², GUO Ci-yi²

(1. Department of Pharmacology, Suzhou Institute of Chinese Meteria Medica, Medical College of Suzhou University, Suzhou 215007, China; 2. The Hong Kong Association for Health Care, Hong Kong, China)

Key words: the seed of *Astragalus complanatus* R. Br.; flavone; CCl₄; D-Gal; hepatic injury

沙苑子系豆科植物扁茎黄芪 *Astragalus complanatus* R. Br. ex Bunge 的种子, 是补益肝肾的传统中药, 主要含有黄酮类、三萜苷类、有机酸、氨基酸、多肽、蛋白质、鞣质、甾醇、微量元素等^[1]。前期实验结果表明沙苑子醇提取物具有明显的保肝作用^[2], 为了进一步研究沙苑子保肝有效成分, 本课题组从醇提取物中分离出黄酮成分, 采用 CCl₄、D-氨基半乳糖 (D-Gal) 致小鼠急性肝损伤模型和 CCl₄ 损伤原代培养大鼠肝细胞模型, 观察沙苑子黄酮 (FACS) 的保肝作用。

1 材料

1.1 药物: 沙苑子黄酮 (FACS, 含黄酮 70%) 自

制, 临用时用生理盐水溶解。联苯双酯片 (江苏鹏鹞药业有限公司), 临用时碾成细粉加生理盐水制成混悬液。

1.2 试剂: CCl₄ 分析纯 (南京化学试剂厂), 以橄榄油稀释成 0.1% 溶液; D-Gal (Sigma 公司), 临用前蒸馏水溶解稀释成 70 mg/mL 溶液; 四甲基偶氮唑盐 (MTT, Amerso 分装); 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 测定试剂盒 (上海科欣生物技术研究所)。

1.3 动物: 昆明种小鼠, 雄性, SPF 级, 18~24 g; Wistar 大鼠, 雄性, 250~300 g, 均由苏州大学实验动物中心提供。

收稿日期: 2005-03-22

基金项目: 香港保健协会研究项目 (ZHK00200009)

作者简介: 刘春宇 (1961—), 女, 江苏人, 副教授, 主要从事中药有效成分及药理作用研究。

Tel: (0512) 65125280 E-mail: chunyu998@msn.com