

粉防己碱对脂多糖诱导下 RAW264.7 细胞炎症模型细胞因子的作用

罗福玲¹, 赵恒光¹, 李洪忠², 万敬员^{2*}, 周岐新²

1. 重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400016

2. 重庆医科大学 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016

摘要: **目的** 观察粉防己碱(tetrandrine, Tet)对脂多糖(LPS)诱导 RAW264.7 细胞炎症模型促炎细胞因子和抗炎细胞因子的影响。**方法** LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 刺激生长良好的 RAW264.7 细胞, 建立细胞炎症模型。四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测不同浓度 Tet 对 RAW264.7 细胞增殖的影响, 激光共聚焦显微镜观察 Tet 对细胞核因子- κB (NF- κB) 核转运的作用, 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞上清中白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-10 (IL-10) 的变化。**结果** 当 Tet 浓度 $<1 \mu\text{mol/L}$ 时, 单独或与 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 共培养, 均对 RAW264.7 细胞生长无影响; 而当 Tet 浓度 $>10 \mu\text{mol/L}$ 时, 单独或与 LPS 共培养均表现出明显的细胞生长抑制效应; Tet 可使 IL-6、TNF- α 的释放受到抑制, 相反可促进 IL-10 的表达。激光共聚焦显微镜观察 Tet 大剂量组细胞核红染的阳性细胞显著减少, 以阴性细胞(红染 p65 亚基主要集中在胞浆部位, 使胞浆染色较深, 胞核染色较浅, 整个细胞成空泡状)为主。**结论** Tet 可以抑制 LPS 所致的 RAW264.7 细胞炎症反应, 其抗炎作用与抑制 NF- κB 活化, 进一步减少炎性细胞因子 IL-6、TNF- α 的产生, 并促进抗炎细胞因子 IL-10 的表达等有关。**关键词:** 粉防己碱; 脂多糖; RAW264.7 细胞; 白细胞介素 10; 肿瘤坏死因子- α ; 核因子- κB

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0542-04

Effect of tetrandrine on cytokines in LPS-stimulated RAW264.7 cell

LUO Fu-ling¹, ZHAO Heng-guang¹, LI Hong-zhong², WAN Jing-yuan², ZHOU Qi-xin²

1. The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of tetrandrine (Tet) on expressions of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine in lipopolysaccharide(LPS)-stimulated RAW264.7 cells. **Methods** RAW 264.7 cells were cultured in media containing 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS and different doses of Tet. The proliferation of cells was examined by MTT assay, and nuclear translocation of NF- κB was detected and analyzed by the laser scanning confocal microscope (LSCM), and the levels of IL-6, TNF- α , and IL-10 were tested by ELISA. **Results** Compared with the control group, Tet had no influence on the proliferation of RAW264.7 cells no matter with LPS or not when its concentration lower than 1 $\mu\text{mol/L}$; But when its concentration higher than 10 $\mu\text{mol/L}$, Tet significantly inhibited the growth of the cells whether LPS existed or not. Meanwhile, Tet significantly decreased the levels of IL-6, and TNF- α induced by LPS, and upregulated IL-10 in supernatant. At the mean time, results from LSCM showed that in Tet 1 $\mu\text{mol/L}$ group, positive cells (dyeing-red p65 of NF- κB was translocated into nucleuses and made the nucleuses red) decreased significantly, while negative cells (dyeing-red p65 of NF- κB was collected in endochylema and nucleuses became vacant) were predominantly founded. **Conclusion** Tet has anti-inflammatory effect, which might be mediated by downregulating inflammatory factors IL-6, TNF- α through NF- κB signal pathway as well as increasing levels of anti-inflammatory factor IL-10.

Key words: tetrandrine (Tet); lipopolysacchride (LPS); RAW264.7 cells; IL-10; TNF- α ; NF- κB

近年来大量广谱、高效抗生素的应用为临床治疗感染性疾病提供了有力的措施, 但由于内毒素与机体相互作用引起全身失控性炎症反应往往难以控

制。抗生素虽然能抑制和杀灭细菌, 却不能拮抗内毒素, 而且可能在杀灭细菌的同时引起内毒素释放^[1]。此外, 某些抗生素如头孢菌素类还能抑制抗炎细胞

收稿日期: 2010-07-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500463)

作者简介: 罗福玲 (1975—), 女, 硕士, 药师, 从事免疫和神经药理研究。Tel: (023)89012418 E-mail: luofuling623@163.com

*通讯作者 万敬员 Tel: (023)68485038

因子白细胞介素-10 (IL-10) 的表达, 从而进一步加重炎症反应^[2]。因此, 研究脂多糖(lipopolysacchride, LPS) 所致炎症过程中药物的抗炎机制, 寻求有效的抗内毒素药物成为基础医学和临床医学领域的重要任务之一。粉防己碱(tetrandrine, Tet) 是从中药防己科植物粉防己中提取的主要生物碱, 为传统抗风湿药。目前虽然有一些其抗炎作用相关文献报道, 但机制仍然不清楚。本实验通过 LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞建立细胞炎症模型, 观察 Tet 的抗炎作用。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 巨噬细胞株由第三军医大学药理教研室周虹教授惠赠。Tet (质量分数 > 98%) 购自浙江金华制药厂, LPS 购自 Sigma 公司, 核因子- κ B (NF- κ B) 检测试剂盒购自碧云天生物技术研究; IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-10 ELISA 检测试剂盒购自 Cayman 公司。严格遵循无热原原则, 玻璃器材经 250 °C 高温烘烤 1.5~3 h, 塑料器材采用辐照去热原, 各种溶液配制均使用超纯水, 以避免内毒素污染。

1.2 方法

1.2.1 RAW264.7 细胞的培养及传代 小鼠 RAW264.7 巨噬细胞加入含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和链霉素的 RMPI 1640 培养基, 置于含 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养。细胞生长至 70%~80% 融合后进行传代, 1~2 d 换液 1 次, 4~6 d 传代 1 次。

1.2.2 Tet 药液配制 精确称 Tet 6.23 mg, 少量 0.01 mol/L HCl 充分溶解后, 0.01 mol/L NaOH 滴定至 pH 5.5, 加入无血清培养基至 10 mL, 配制成 0.01 mol/L 药液, 针式滤器 (0.22 μ m 微孔滤膜) 滤过除菌, 4 °C 保存备用。

1.2.3 MTT 法检测 Tet 对细胞生长的影响 调整细胞浓度至 5×10^4 /mL, 接种于 96 孔细胞培养板内, 每孔加 100~200 μ L 培养液, 置于含 5% CO₂ 和 95% 空气的 37 °C 增湿孵箱中培养 2~3 h, 细胞贴壁后, 分别加入 Tet 0、0.01、0.1、1、10、100 μ mol/L, 同时均设加入或不加入 LPS (1 μ g/mL) 两种对照。溶剂对照组均不加入 Tet 及 LPS, 但加入 0.1% 的二甲基亚砜 (DMSO)。每组 8 个复孔。继续培养 24 h 后, 每孔加入终质量浓度 0.5 mg/mL 的 MTT, 置孵箱中继续培养 4 h, 500 $\times$ g 离心 10 min, 弃上清, 每孔加入 DMSO 100 μ L 水平震荡 10 min, 酶标仪

570 nm 检测吸光度。

1.2.4 Tet 对促炎细胞因子 IL-6、IL-10、TNF- α 的影响 根据 MTT 检测结果, 实验分为 5 组, 分别为空白对照组, LPS 模型组和 Tet 低、中、高剂量 (0.01、0.1、1 μ mol/L) 组。将 RAW264.7 细胞悬液调整浓度为 1×10^6 /mL, 加入 6 孔板内, 每孔 1 mL, 每组 6 个复孔, 置 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养。各组处理方法: ①空白对照组, 完全无血清培养基培养; ②LPS 模型组, 培养基中加入终质量浓度为 1 μ g/mL LPS 培养; ③Tet 低、中高剂量组, 培养基中分别加入终质量浓度为 1 μ g/mL LPS 和 0.01、0.1、1 μ mol/L Tet 共培养。培养 12 h 后检测 IL-6、TNF- α , 培养 24 h 后检测 IL-10。均取上清液采用 ELISA 法, 按试剂盒说明操作。

1.2.5 激光共聚焦显微镜检测 NF- κ B 的活化 将去热原处理后的盖玻片置于清洁无菌 6 孔板中, 然后取生长良好 RAW264.7 细胞, 用 0.25% 胰酶消化后, 调整细胞浓度至 $0.5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^4$ /mL, 接种于该 6 孔板中培养, 待细胞贴壁 30%~40% 即可按分组方法给予药物干预, 2 h 后按照 NF- κ B 检测试剂盒说明书步骤操作处理细胞, 激光共聚焦显微镜下观察 NF- κ B 的主要亚基 p65 的激活情况。

1.2.6 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS12.0 软件进行统计学分析。组内比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 Tet 对细胞生长的影响

当 Tet 浓度 < 1 μ mol/L 时, 无论单独或与 1 μ g/mL LPS 共培养, 均对 RAW264.7 细胞生长无影响; 而当 Tet 浓度 > 10 μ mol/L 时, 则无论单独或与 LPS 共培养均表现出明显的细胞生长抑制效应, 表明高浓度的 Tet 具有一定的抑制细胞生长作用。结果见表 1。为了避免该作用引发的系统误差, 在接下来的实验中选择 Tet 浓度为 0.01、0.1、1 μ mol/L 3 个浓度梯度进行。

2.2 Tet 对 IL-6、IL-10、TNF- α 分泌的影响

空白对照组中 RAW264.7 细胞上清液 IL-6、TNF- α 水平较低, 给予 1 μ g/mL LPS 刺激 12 h 后, IL-6、TNF- α 水平均显著增加; 而在有 Tet 药物存在时, IL-6、TNF- α 的释放则受到明显抑制, 并呈现一定的剂量依赖性关系。相反, 在空白对照组中 IL-10 表达量较低, 在给予 LPS 刺激 24 h 后表达增加, 而在 Tet 存在的情况下, 其表达反而更加明显,

表 1 Tet 对 RAW264.7 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1 Effect of Tet on growth of RAW264.7 cell
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组 别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	吸光度
对照	—	0.57 ± 0.06
Tet	0.01	0.57 ± 0.05
	0.10	0.56 ± 0.04
	1.00	0.55 ± 0.03
	10.00	$0.08 \pm 0.02^{**}$
	100.00	$0.07 \pm 0.01^{**}$
Tet+LPS	$0.00 + 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.54 ± 0.03
	$0.01 + 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.57 ± 0.04
	$0.10 + 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.57 ± 0.05
	$1.00 + 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.56 ± 0.05
	$10.00 + 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$0.08 \pm 0.03^{**}$
	$100.00 + 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$0.06 \pm 0.02^{**}$

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs control group

表 2 Tet 对 RAW264.7 细胞 IL-6、IL-10、TNF- α 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Tet on secretion of IL-6, IL-10, and TNF- α in LPS-treated RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL-6/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TNF- α /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-10/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白	—	6.36 ± 3.07	256.40 ± 41.77	30.58 ± 3.75
模型	$1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$29.26 \pm 3.63^{##}$	$2\ 014.46 \pm 130.57^{##}$	$79.56 \pm 4.70^{##}$
Tet	0.01	21.59 ± 3.80	$1\ 851.75 \pm 199.51$	83.60 ± 4.52
	0.10	$17.17 \pm 3.73^{*}$	$1\ 416.68 \pm 267.23^{*}$	$96.53 \pm 4.83^{**}$
	1.00	$9.45 \pm 1.45^{**}$	$468.80 \pm 113.18^{**}$	$116.13 \pm 6.06^{**}$

与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$; 与空白对照组比较: $^{##}P < 0.01$

$^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group; $^{##}P < 0.01$ vs blank control group

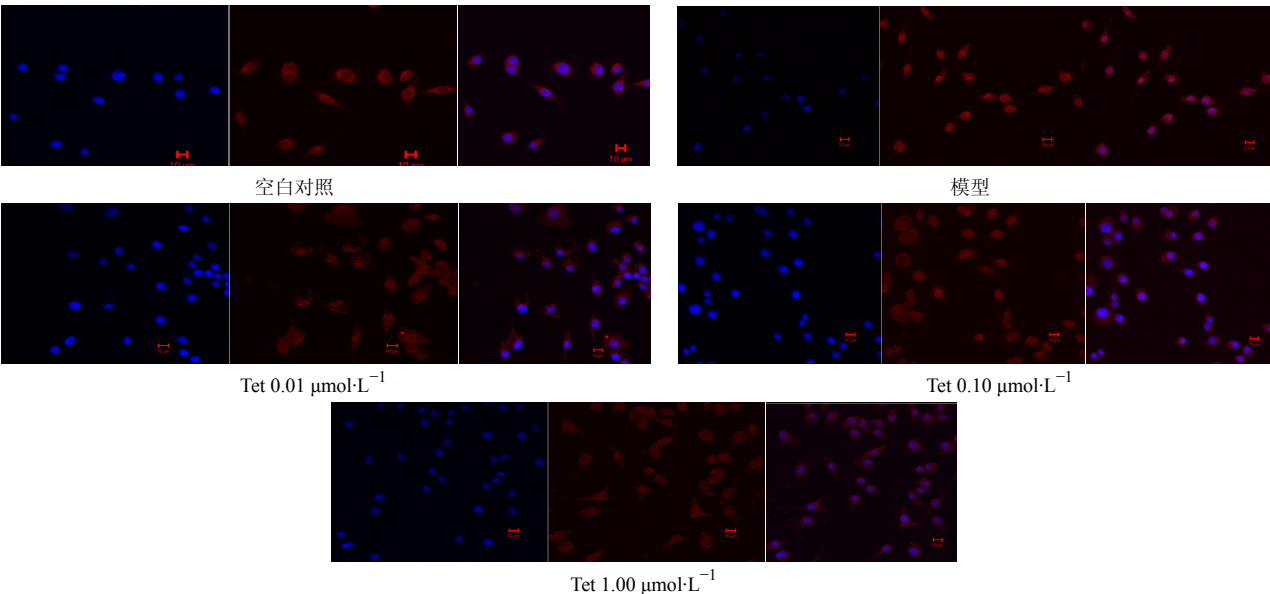


图 1 激光共聚焦显微镜下观察 Tet 对 RAW264.7 细胞 NF- κ B p65 亚基核转位的影响

Fig. 1 Effect of Tet on NF- κ B p65 translocation in RAW264.7 cells observed under LSCM

也存在一定剂量关系 (表 2)。

2.3 Tet 对 NF- κ B p65 亚基核转位的影响

如图 1 所示, 染成蓝色的是细胞核 (第 1 张图), 染成红色的为 p65 (第 2 张图), 各组第 3 张图片均为前两张重合的结果。空白对照组, 几乎所有细胞为阴性细胞 (红染 p65 亚基主要集中在胞浆部位, 使胞浆染色较深, 胞核染色较浅, 整个细胞成空泡状); 模型组, 可见大量阳性细胞 (红染 p65 亚基主要集中在胞核部位, 胞核红染明显, 胞浆相对较浅); Tet 小剂量组, 阳性细胞略少于模型组; Tet 中剂量组, 阳性细胞明显少于模型组; Tet 大剂量组, 阳性细胞更加显著减少, 以阴性细胞为主。

3 讨论

内毒素所致炎症反应是复杂的病理生理过程多细胞因子通过调节促炎和抗炎系统之间的平衡而参与炎症发生、发展过程。IL-6、TNF- α 是最重要促炎细胞因子, 其中 IL-6 可促进 B 细胞分化, 活化丝

裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK), 激活信号转导子和转录激活子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 而加重炎症反应过程^[3-4]; TNF- α 则可使黏附的中性粒细胞产生呼吸爆发, 并同时促进其他多种促炎细胞因子包括 IL-6 的表达; 它们在 LPS 的致病过程中相互促进。本实验中采用 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 刺激小鼠 RAW264.7 巨噬细胞成功建立炎症细胞模型, 首先观察 Tet 对 IL-6、TNF- α 作用, 结果发现, 在 LPS 作用早期 (12 h), Tet 剂量依赖性抑制 RAW264.7 细胞炎性细胞因子 IL-6、TNF- α 的释放。由此, 推测 Tet 抗炎效应与抑制炎性细胞因子产生有关。

IL-6 和 TNF- α 都是转录因子 NF- κ B 参与调控的细胞因子。LPS 与 TLR4 结合引起 NF- κ B 激活, NF- κ B 参与多种炎性细胞因子的转录, 在炎症反应的复杂细胞因子网络中可能是一个中心环节^[5]。哺乳动物 NF- κ B 有 5 个成员: p65(RelA)、RelB、C-Rel、p50/p105 (NF- κ B1)、p52/p100 (NF- κ B2)。常见的形式是由 p50 和 p65 组成的异源二聚体, 静息条件下, p50/p65 与 I κ B 形成不具有活性的三聚体复合物, 在 LPS 等外界刺激下, I κ B 被磷酸化, 释放出有活性的 p50/p65 二聚体, 二聚体进入细胞核从而调节特异基因的转录。大量研究资料表明, p65 是 NF- κ B 的转录活性形式^[5]。因此本实验通过检测 p65 核转位来间接评价 NF- κ B 的激活。结果发现, Tet 各剂量组则不同程度抑制 p65 亚基核转位, 提示 Tet 抗炎效应可能通过抑制 NF- κ B 转录活性, 从而抑制促炎细胞因子表达而发挥作用。

炎症的产生是促炎和抗炎两方面失衡的结果。既然 Tet 能够抑制促炎细胞因子的释放, 那么其对抗炎细胞因子是否也有作用呢? IL-10 是公认的抗炎细胞因子, 可在一定程度上抑制 LPS 的炎症反应程度。在感染性疾病恢复阶段, 其浓度往往比正常机体高。研究表明它可下调巨噬细胞的激活, 阻断包括 TNF- α 、IL-6 等在内的细胞因子的合成, 也能间接抑制免疫细胞的活性, 目前已认为其是一个

重要的抗内毒素致炎过程的作用靶点, 对败血症患者具有保护意义^[6]。因此, 本实验还观察了 Tet 对抗炎因子 IL-10 的影响, 结果发现 Tet 在抑制促炎细胞因子的同时, 还明显促进 IL-10 的表达。

上述实验结果表明, Tet 对炎症过程促炎和抗炎系统之间的平衡起重要的调节作用, 既可以抑制炎性细胞因子的表达, 同时又促进抗炎因子的产生而发挥有效抗炎作用。其对促炎细胞因子的抑制和抗炎细胞因子的诱导作用为进一步研究粉防己碱抗 LPS 机制打下良好基础, 也为 Tet 进一步开发应用提供了理论依据。

参考文献

- [1] Morrison D C, Bucklin S E. Evidence for antibiotic-mediated endotoxin release as a contributing factor to lethality in experimental gram-negative sepsis [J]. *Scand J Infect Dis Suppl*, 1996, 101: 3-8.
- [2] Ziegeler S, Raddatz A, Hoff G, *et al*. Antibiotics modulate the stimulated cytokine response to endotoxin in a human *ex vivo*, *in vitro* model [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2006, 50(9): 1103-1110.
- [3] Hodge D R, Hurt E M, Farrar W L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(16): 2502-2512.
- [4] Adams J L, Czuprynski C J. Mycobacterial cell wall components induce the production of TNF-alpha, IL-1, and IL-6 by bovine monocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7 [J]. *Microb Pathog*, 1994, 16(6): 401-411.
- [5] Giuliani C, Napolitano G, Bucci I, *et al*. NF- κ B transcription factor: role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune, and neoplastic diseases and therapy implications [J]. *Clin Ter*, 2001, 152(4):249-253.
- [6] Chon H, Choi B, Lee E, *et al*. Immunomodulatory effects of specific bacterial components of *Lactobacillus plantarum* KFCC11389P on the murine macrophage cell line RAW 264.7 [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 107(5): 1588-1597.