

• 药理与临床 •

桑枝提取部位及其组合对巨噬细胞炎症介质的影响

章丹丹¹, 唐宁¹, 华晓东¹, 卞卡^{1,2*}

1. 上海中医药大学 穆拉德中药现代化研究中心, 上海 201203

2. 美国乔治华盛顿大学 生物化学与分子生物学系, 华盛顿特区 20052

摘要: **目的** 研究桑枝不同提取部位及其配比对脂多糖(LPS)协同 γ -干扰素(IFN- γ)刺激的巨噬细胞RAW264.7中炎症介质的影响。**方法** 采用有机溶剂萃取和大孔树脂富集的方法制备桑枝乙醇提取物不同萃取部位I~IV。各提取部位及不同部位组合分别作用于细胞后, Griess法测定RAW264.7细胞亚硝酸盐的量; MTT法检测细胞活力; 三价铁还原抗氧化能力测试(FRAP)法测定细胞抗氧化能力; 半定量PCR法测定炎症介质基因的表达; Western blotting法测定炎症介质蛋白的表达。**结果** 桑枝4个提取部位中, I和II以剂量相关方式抑制细胞悬液中亚硝酸盐的量, IC₅₀分别为145.23、152.14 mg/L。在I与II 3种配比(1:1、1:4、4:1)组合中, 1:1配比时抑制细胞上清液中亚硝酸盐量的IC₅₀值最低, 为110.31 mg/L, 且对细胞活力具有保护作用。与模型组相比, I和II在200 mg/L时显著下调白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、诱生型NO合酶(iNOS)、环氧合酶-2(COX-2)、核因子- κ B(NF- κ B)基因表达水平($P < 0.05$ 、 0.01), 同时上调血红素加氧酶(HO-1)和过氧化物酶增殖体受体(PPAR- γ)基因表达水平($P < 0.05$), 提高细胞抗氧化能力($P < 0.05$), 且抑制ERK蛋白的磷酸化($P < 0.05$)。I和II(1:1)组合对COX-2、IL-1 β 、HO-1、NF- κ B、PPAR- γ 的表达有一定的协同调控效果。**结论** 提取部位I和II是桑枝抗炎的活性部位, 其部分通过NF- κ B和ERK/MAPK信号转导通路调控炎症介质的表达, 其1:1配比组合对炎症中某些靶点均有较好的协同调控作用, 抗炎效果更佳。

关键词: 桑枝提取物; 巨噬细胞; 炎症介质; ERK/MAPK信号转导通路; 核因子- κ B**中图分类号:** R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)02-0186-07**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.02.014Effects of different extracting fractions from *Mori Ramulus* and their combinations on inflammatory mediators in macrophageZHANG Dan-dan¹, TANG Ning¹, HUA Xiao-dong¹, BIAN Ka^{1,2}

1. Murad Research Institute for Modernized Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, George Washington University, Washington DC 20052, USA

Abstract: Objective To investigate the effects of different extracting fractions from *Mori Ramulus* and their combinations on the inflammatory mediators in RAW264.7 macrophages stimulated with interferon- γ (IFN- γ) plus lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Organic solvent extraction, separation, and macroporous resin purification were performed to obtain the fractions I—IV from the ethanol extract of *Mori Ramulus*. After cells were treated with the different extracting fractions from *Mori Ramulus* and their combinations, Griess reaction for nitric oxide production, MTT assay for cell viability, and FRAP assay for anti-oxidant activity with trolox as control. RT-PCR for mRNA expression and Western blotting for protein expression examination were performed. **Results** The fractions I and II inhibited nitrite/nitrate of stimulated macrophage in a dose-dependent manner with IC₅₀ 145.23 and 152.14 mg/L, respectively. Among the three combinations of fractions I and II (1:4, 1:1, and 4:1), the lowest IC₅₀ (110.31 mg/L) for

收稿日期: 2012-05-06

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制(2009ZX09311-003); 国家自然科学基金青年基金资助项目(81001666); 上海市教育委员会科研创新项目(13YZ048); 上海高校选拔培养优秀青年教师基金资助项目(SZY07029)**作者简介:** 章丹丹(1980—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为中药新药开发及其机制研究。Tel: (021)51322534 E-mail: izhangdd@126.com***通信作者** 卞卡 E-mail: kaban3@gmail.com

the nitrite/nitrate inhibition was demonstrated and protective effect against cell viability was shown in 1 : 1 group. Fractions I and II (200 mg/L) suppressed the gene expression of IL-1 β , IL-6, iNOS, COX-2, and NF- κ B ($P < 0.05, 0.01$), while up-regulated HO-1 ($P < 0.05$), PPAR- γ ($P < 0.05$) expression and improved anti-oxidant activity ($P < 0.05$). The fractions also inhibited ERK protein phosphorylation ($P < 0.05$). The combination of fractions I and II (1 : 1) exhibited the coordinated expression on COX-2, IL-1 β , HO-1, NF- κ B, and PPAR- γ . **Conclusion** Fractions I and II of *Mori Ramulus* show the major anti-inflammatory activity which is partly through NF- κ B and ERK/MAPK signaling pathway to regulate the expression of inflammatory mediators. The combination of fractions I and II (1 : 1) shows the coordinated regulation towards some targets in the inflammation with better anti-inflammatory activity.

Key words: extracts from *Mori Ramulus*; macrophages; inflammatory mediators; ERK/MAPK signaling pathway; NF- κ B

炎症是心血管疾病、自身免疫性疾病、神经退行性疾病、肿瘤等共有的病理过程。一氧化氮(NO)及诱生型NO合酶(iNOS)参与炎症的发生、发展的关键步骤,因此对其调控有望成为治疗炎症的新策略^[1]。

桑枝是桑科植物桑 *Morus alba* L. 一年生干燥嫩枝,具祛风湿、利关节、行水气之功效^[2]。桑枝乙醇提取物对多种动物炎症模型表现抗炎活性,其石油醚、醋酸乙酯和正丁醇提取部位对二甲苯致小鼠耳肿胀和毛细血管通透性有不同的抑制作用^[3-5]。本实验采用有机溶剂萃取和大孔吸附树脂富集的方法制备桑枝乙醇提取物不同萃取部位 I~IV,以NO产量为考察指标,对抗炎有效部位及其组合进行抗炎作用多指标评价。

1 材料

1.1 药材与试剂

桑枝,购自上海养和堂中药饮片有限公司(批号 040707-8),由上海市食品药品检验所鉴定为桑 *Morus alba* L.的枝。芦丁对照品(质量分数 $\geq 98\%$),上海中药标准化研究中心,批号 05-1001; D-101、S-8树脂,天津南开大学化工厂; 732强酸性离子交换树脂,上海红星化工厂; RPMI 1640、胎牛血清, Gibco公司。二甲基亚砜(DMSO)、脂多糖(LPS)、Trizol RNA提取试剂、阳性对照药赖氨酸二氢氯化物(L-NIL)、2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)、Griess反应试剂、葡萄糖, Sigma公司; Bio-rad蛋白测定试剂、PVDF膜、100 bp DNA梯度标准品, Bio-rad公司; 鼠重组 γ -干扰素(IFN- γ), Chemicon公司; 蛋白梯度标准品, Progema公司; iNOS抗体, BD公司; p-细胞外信号调节激酶(p-ERK), Cell Signal公司和 Santa Cruz公司; β -actin抗体和二抗 Santa Cruz公司; 化学发光检测试剂盒(ECL)检测试剂, GE公司; RT-PCR试剂盒,北京博大泰克公司; 引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Rotavapor R-220旋转蒸发仪,瑞士Buchi公司; Modulyod-230冷冻干燥仪,美国Thermo公司; Spectra MAX190酶标仪,美国MD公司; D278532高速冷冻离心机,德国Hettich公司; UV21700紫外分光光度计,日本岛津公司; 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司; PCR扩增仪,德国Biometra公司; GIS凝胶图像分析系统,上海天能科技有限公司; 单向电泳系统,美国Bio-rad公司; sMPIC2600C自动X线胶片洗片机,上海申贝办公机械有限公司。

1.3 细胞

RAW264.7细胞,购自ATCC公司。

2 方法

2.1 提取物的制备

桑枝以75%乙醇、80℃下提取3次,每次2h,乙醇提取物用石油醚脱脂后分散于水中,醋酸乙酯萃取,醋酸乙酯部位经D-101树脂处理,收集70%乙醇洗脱液,浓缩干燥得部位I(总黄酮质量分数59.28%)。

醋酸乙酯萃取后的水相用水饱和正丁醇萃取,正丁醇部位经D-101树脂处理后,收集70%乙醇洗脱液,浓缩干燥得部位II,主要含羽扇豆醇等皂苷类成分。

桑枝经乙醇提取后的药渣加水(液料比6:1),于80℃提取3次,每次2h,提取液浓缩后加入乙醇至乙醇质量分数为80%,4℃静置过夜,沉淀用80%乙醇洗涤3次,挥干乙醇,热水溶解沉淀后seavage法除去蛋白,上清液经S-8大孔吸附树脂处理,浓缩液加乙醇至乙醇质量分数为80%,4℃静置过夜,收集沉淀,依次用75%乙醇、丙酮、乙醚洗涤2~3次,浓缩干燥得部位III(总多糖质量分数为59.50%)。

桑枝饮片打粉后用0.1%盐酸溶液加热提取,滤过,滤液浓缩后加入等体积乙醇,离心除去沉淀,上清液经732强酸性离子交换树脂吸附后,用0.5

mol/L 氨水洗脱, 收集 Dragendorff 试验阳性部分, 浓缩冷冻干燥得部位 IV, 主要含 1-脱氧野尻霉素 (DNJ) 等生物碱类成分。以上各部位均在冷冻真空干燥后-80 °C 保存, 临用前配制。

2.2 细胞培养

RAW264.7 细胞株置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下于 CO₂ 培养箱中培养。

2.3 Griess 反应检测亚硝酸盐量的变化

用新鲜细胞培养液吹打细胞得细胞悬液, 以每孔 100 μL 约 1×10⁵ 个接种于 96 孔板, 培养过夜。对照组细胞用含 0.1% DMSO 的 RPMI 1640 培养; 模型组用 LPS (100 μg/L) 和 IFN-γ (1×10⁴ U/L) 协同刺激细胞。各给药组给药方式如下: 在用 LPS 和 IFN-γ 协同刺激细胞的同时, 给予提取部位 I~IV, 质量浓度均分别为 1、10、100 mg/L; 部位 I、II (50、100、200 mg/L) 分别在 LPS 和 IFN-γ 协同刺激细胞 6 h 后 (治疗给药)、0 h (同时)、6 h 前 (预防给药) 3 个时间点给予; 部位 I 与 II 以不同配比 (1:1、1:4、4:1) 加入细胞悬液后 6 h 以 LPS 和 IFN-γ 协同刺激细胞, 每组 6 个重复。LPS 和 IFN-γ 刺激维持 24 h 后, 吸取 96 孔板中的培养液 (简称待测培养液) 100 μL, 加入等体积的 Griess 反应试剂, 室温反应 10 min, 酶标仪测 540 nm 处吸光度 (A) 值, 计算各组细胞悬液中亚硝酸盐抑制率。

抑制率 = (模型组 A - 各给药组 A) / (模型组 A - 对照组 A)

2.4 MTT 法检测细胞活力

吸取“2.3”项下待测培养液 100 μL, 加入 MTT (用 PBS 溶解为 5 g/L) 溶液 10 μL, 37 °C 培养 4 h, 加入 50 μL 三联剂 (含 10% SDS、0.04 mol/L 异丙醇的 0.01 mol/L 盐酸) 过夜, 酶标仪测 570、630 nm 处 (后者为参比波长) A 值, 以对照组作为 100%, 计算各组细胞活力。

2.5 三价铁还原抗氧化能力测试法检测细胞抗氧化能力

RAW264.7 细胞培养于 30 mm 细胞培养皿中, 以部位 I、II (100、200 mg/L) 及 I 与 II (1:1) 组合或 1 mmol/L 的 Trolox 预处理 1 h 后, 用 IFN-γ 协同 LPS 处理细胞 6 h, 并设不给药的对照组, 于冰上取各组蛋白, 用裂解液破碎细胞后, 离心取蛋白上清液, 并用 Lowry 法测定蛋白。三价铁还原抗氧化能力测试 (FRAP) 溶液由 0.3 mol/L 醋酸盐缓冲

溶液 (pH 3.6)、10 mmol/L TPTZ (溶于 40 mmol/L HCl)、2 mmol/L FeCl₃ 以体积比 10:1:1 混合而成。取各组的蛋白上清液 5 μL, 分别加入 FRAP 溶液 245 μL, 静置 10 min 后, 酶标仪测 593 nm 处 A 值, 以 1 mmol/L Trolox 处理细胞后的抗氧化能力 [mmol/(L·g)] 为标准值, 计算各试药与其值的比值, 评价各试药对细胞抗氧化能力的影响。

2.6 RT-PCR 法检测细胞相关炎症因子 mRNA 表达

RAW264.7 细胞培养于 30 mm 细胞培养皿中, 以部位 I、II (100、200 mg/L) 及 I 与 II (1:1) 组合预处理 1 h 后, IFN-γ 协同 LPS 刺激 4 h, 加 Trizol 试剂 1 mL, 按说明书提取 RNA, 所用 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 均在 1.8~2.0。按 RT 试剂盒说明逆转录合成模板 cDNA 后, 按 PCR 试剂盒说明、应用 PCR 仪进行聚合酶链反应。目的基因引物序列如下: iNOS 正向引物 5'-GCCTCATGCCTTGATTCAT-3', 反向引物 5'-GAGGGTGAATCCAGA-3'; 环氧合酶-2 (COX-2) 正向引物 5'-GATACGTGTTGACGTCCAGA-3', 反向引物 5'-GTCTGTCTAGAGTTCA-CCG-3'; 血红素加氧酶 (HO-1) 正向引物 5'-TGACCTCTCAGGGGTCAGGTCC-3', 反向引物 5'-AGTCGTGGTCAGTCAACATGGATGC-3'; 白细胞介素-1β (IL-1β) 正向引物 5'-CCTGTGGCCTTGGGCCTCA-A-3', 反向引物 5'-GGTGCTGATGTACCAGTTGG-G-3'; 肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 正向引物 5'-CCCTC-ACACTCAGATCATCTTCTCAA-3', 反向引物 5'-TCTAAGTACTTGGGCAGGTTGACCTC-3'; 白细胞介素-6 (IL-6) 正向引物 5'-TGAACAACGATGATG-CACTTGC-3', 反向引物 5'-CGTAGAGAACAACA-TAAGTC-3'; 核因子-κB (NF-κB) 正向引物 5'-CCA-CCTATGATGGGACTACACCTTCT-3', 反向引物 5'-TCAGAGATAGCAGTGGGCGTCTCC-3'; 过氧化物酶增殖体受体 (PPAR-γ) 正向引物 5'-GAGATGCCA-TTCTGGCCCACTTCCGG-3', 反向引物 5'-TAT-CATAAATAAGCTTCAATCGGATGGTTC-3'; β-actin 正向引物 5'-CCAAGGCCAACCGCCGC-3', 反向引物 5'-AGGGTACATGGTGCCGCC-3'。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后凝胶扫描仪观察拍照。

2.7 Western blotting 检测 iNOS 蛋白和 ERK 磷酸化水平

RAW264.7 细胞培养于 30 mm 细胞培养皿中, 以部位 I、II (100、200 mg/L) 及 I 与 II (1:1) 组合预处理 1 h 后, 用 IFN-γ 和 LPS 共同刺激 6 h 或 30

min, 冰 PBS 洗涤, 加入蛋白酶抑制剂后收集细胞, 超声破碎, 3 000×g、4 °C 下离心 15 min, 取蛋白上清液测定蛋白的量。每孔加入 25 μg 蛋白, 分别在 7.5%、12% 的 SDS-PAGE 凝胶中电泳, 蛋白转移至 PVDF 膜上, 10% 脱脂牛奶封闭, 分别用一抗 iNOS (1:1 000)、p-ERK (1:1 000)、β-actin (1:800) 与膜于 4 °C 孵育过夜, 聚山梨酯-80-磷酸缓冲液 (PBST) 溶液洗膜 3×15 min, IgG-HRP 二抗 (1:2 000~1:5 000) 与膜孵育 1 h, PBST 溶液洗膜 3×15 min, 膜控干后加 ECL 试剂, X 线显影、定影。

2.8 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计分析软件, 差异的显著性检验采用方差分析和 *t* 检验。

3 结果

3.1 桑枝各部位对细胞亚硝酸盐量和细胞活力的影响

桑枝 4 个提取部位中以部位 I 和 II 对 RAW 264.7 细胞悬液中亚硝酸盐量的抑制效果较强, IC₅₀ 分别为 145.23、152.14 mg/L, 且部位 I 和 II 对炎症损伤后的细胞活力降低有较强的恢复作用, 显示一定的细胞保护作用。结果见表 1。

表 1 桑枝不同提取部位对 RAW264.7 细胞悬液中亚硝酸盐量和细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of different extracting fractions from *Mori Ramulus* on nitrite content and cell survival rate in RAW264.7 cell suspension ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	亚硝酸盐抑制率 / 细胞存活率 /	
		%	%
对照	-	-	100.00
模型	-	-	16.77
部位 I	1	5.18	33.64
	10	8.61	86.50
	100	51.84	175.49
部位 II	1	16.50	34.75
	10	16.14	40.01
	100	44.59	119.92
部位 III	1	6.96	25.01
	10	3.50	35.50
	100	7.02	49.88
部位 IV	1	-3.82	15.99
	10	1.08	19.28
	100	7.84	31.57

3.2 部位 I 和 II 不同配比组合对细胞亚硝酸盐量的影响

部位 I 和 II 以 1:4、1:1、4:1 配比组合对细胞亚硝酸盐产量的 IC₅₀ 值分别为 112.08、110.31、127.90 mg/L, 显示以等比 (1:1) 配比的抑制效果最好。结果见表 2。

表 2 桑枝提取部位 I 和 II 不同配比组合对 RAW264.7 细胞悬液亚硝酸盐量和细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of different combinations of extracting fractions I and II from *Mori Ramulus* on nitrite content and cell survival rate in RAW264.7 cell suspension ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	亚硝酸盐 / 细胞存活率 /	
		($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	%
对照	-	1.90±0.00	-
模型	-	77.04±0.03 ^{##}	-
I+II (1:4)	50	65.19±0.03 ^{**}	15.76
	100	41.47±0.07 ^{**}	47.34
	200	20.69±0.02 ^{**}	74.99
I+II (1:1)	50	68.53±0.04 ^{**}	11.32
	100	36.50±0.02 ^{**}	53.95
	200	19.20±0.03 ^{**}	76.97
I+II (4:1)	50	66.27±0.05 ^{**}	14.34
	100	53.32±0.06 ^{**}	31.57
	200	21.38±0.05 ^{**}	74.08

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

3.3 部位 I 和 II 不同给药方式对细胞亚硝酸盐量和细胞活力的影响

部位 I 和 II 以质量浓度相关方式抑制 RAW 264.7 细胞悬液中亚硝酸的量, 在 3 种给药方式中, 以给药与 IFN-γ+LPS 刺激同时进行时的 IC₅₀ 值最低 (部位 I 和 II 的 IC₅₀ 值分别为 143.07、205.32 mg/L)。部位 I 和 II 对炎症损伤后的细胞活力具有时间和质量浓度相关方式的保护作用, 但对静息细胞中的亚硝酸盐的量没有影响, 且有促进细胞增殖的作用。结果见表 3。

3.4 部位 I 和 II 及其等比组合对细胞总抗氧化能力的影响

经 LPS+IFN-γ 干预后, RAW264.7 细胞的总抗氧化能力从 43.01±11.57 降至 29.21±6.28 (*P*<0.05)。与模型组相比, 部位 I 100、200 mg/L 给药后, 细

表 3 桑枝提取部位 I 和 II 不同给药方式对 RAW264.7 细胞悬液中亚硝酸盐量和细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
 Table 3 Effects of different extracting fractions I and II from *Mori Ramulus* by various administration methods on nitrite content and cell survival rate in RAW264.7 cell suspension ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\text{IC}_{50} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	亚硝酸盐 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	亚硝酸盐产生抑 制率 / %	细胞存活率 / %
对照	—		1.05 ± 0.08	—	100
模型	—		68.75 ± 0.01 ^{##}	—	14.60
部位 I 预防给药	50	4 072.36	60.23 ± 0.03 ^{**}	12.90	40.10
	100		58.23 ± 0.04 ^{**}	15.80	51.77
	200		54.32 ± 0.01 ^{**}	21.40	52.02
部位 I 同时给药	50	143.07	57.31 ± 0.01 ^{**}	16.80	30.80
	100		47.51 ± 0.02 ^{**}	31.30	62.38
	200		24.33 ± 0.04 ^{**}	65.60	162.26
部位 I 治疗给药	50	171.14	51.48 ± 0.03 ^{**}	15.90	45.83
	100		50.43 ± 0.02 ^{**}	17.60	96.16
	200		22.78 ± 0.02 ^{**}	64.30	193.60
部位 I (对静息细胞)	50		2.75 ± 0.00	—	129.20
	100		2.56 ± 0.00	—	211.00
	200		3.44 ± 0.00	—	252.10
部位 II 预防给药	50	485.52	61.63 ± 0.07 [*]	10.88	33.32
	100		57.05 ± 0.02 ^{**}	17.51	55.99
	200		47.75 ± 0.05 ^{**}	30.99	69.18
部位 II 同时给药	50	205.32	56.97 ± 0.01 ^{**}	17.39	27.70
	100		47.18 ± 0.01 ^{**}	31.86	47.45
	200		35.61 ± 0.01 ^{**}	48.95	136.22
部位 II 治疗给药	50	323.16	51.98 ± 0.02 ^{**}	15.08	54.01
	100		49.27 ± 0.01 ^{**}	19.64	69.09
	200		36.47 ± 0.01 ^{**}	41.26	201.68
部位 II (对静息细胞)	50		2.13 ± 0.00	—	138.55
	100		2.24 ± 0.01	—	190.59
	200		2.77 ± 0.01	—	238.84
L-NIL	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		49.22 ± 0.01 ^{**}	35.20	36.20

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

胞总抗氧化能力相对值分别提高至 46.30 ± 8.50 、 68.98 ± 1.22 ($P < 0.05$ 、 0.01)；部位 II 在相同质量浓度则分别提高至 56.55 ± 21.37 、 65.64 ± 19.01 ($P < 0.05$)；部位 I 与 II (1:1) 组合 100、200 mg/L 对 RAW264.7 总抗氧化能力具上调的趋势，其相对值提高至 60.53 ± 21.63 ， 120.65 ± 30.01 。

3.5 部位 I 和 II 及其等比组合对相关炎症因子基因表达的影响

与模型组相比，部位 I 和 II 等比组合 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

组中 IL-1 β 表达下调 27.62% ($P < 0.01$)，显示协同作用；部位 I、II 质量浓度分别为 200 mg/L，使 IL-1 β 表达分别下调 24.40%、16.24% ($P < 0.01$)。部位 I、II 均可下调 IL-6 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)，等比组合也具有一定的协同下调 IL-6 表达的作用。上述试药对 TNF- α 影响均不大。

与模型组相比，部位 I 以 100、200 mg/L 给药后，使 iNOS 表达分别下调 2.60%、47.26% ($P < 0.01$)，相同质量浓度的部位 II 使 iNOS 表达分别下

调 2.29%、10.52% ($P < 0.01$)；相同质量浓度的部位 I 和 II 等比组合给药后，效果为单用时的加和。与模型组相比，部位 I、II 200 mg/L 给药后，使 COX-2 表达分别下调 7.22%、9.73% ($P < 0.01$)，而部位 I 和 II 等比组合 200 mg/L 给药后，使其下调 24.40% ($P < 0.01$)。部位 I 对 HO-1 表达的影响不明显；部位 II 100、200 mg/L 时则使其分别上调 8.17%、6.43% ($P < 0.05$)；等比组合在相同质量浓度时，使 HO-1 表达分别上调 9.06%、10.16% ($P < 0.05$)。

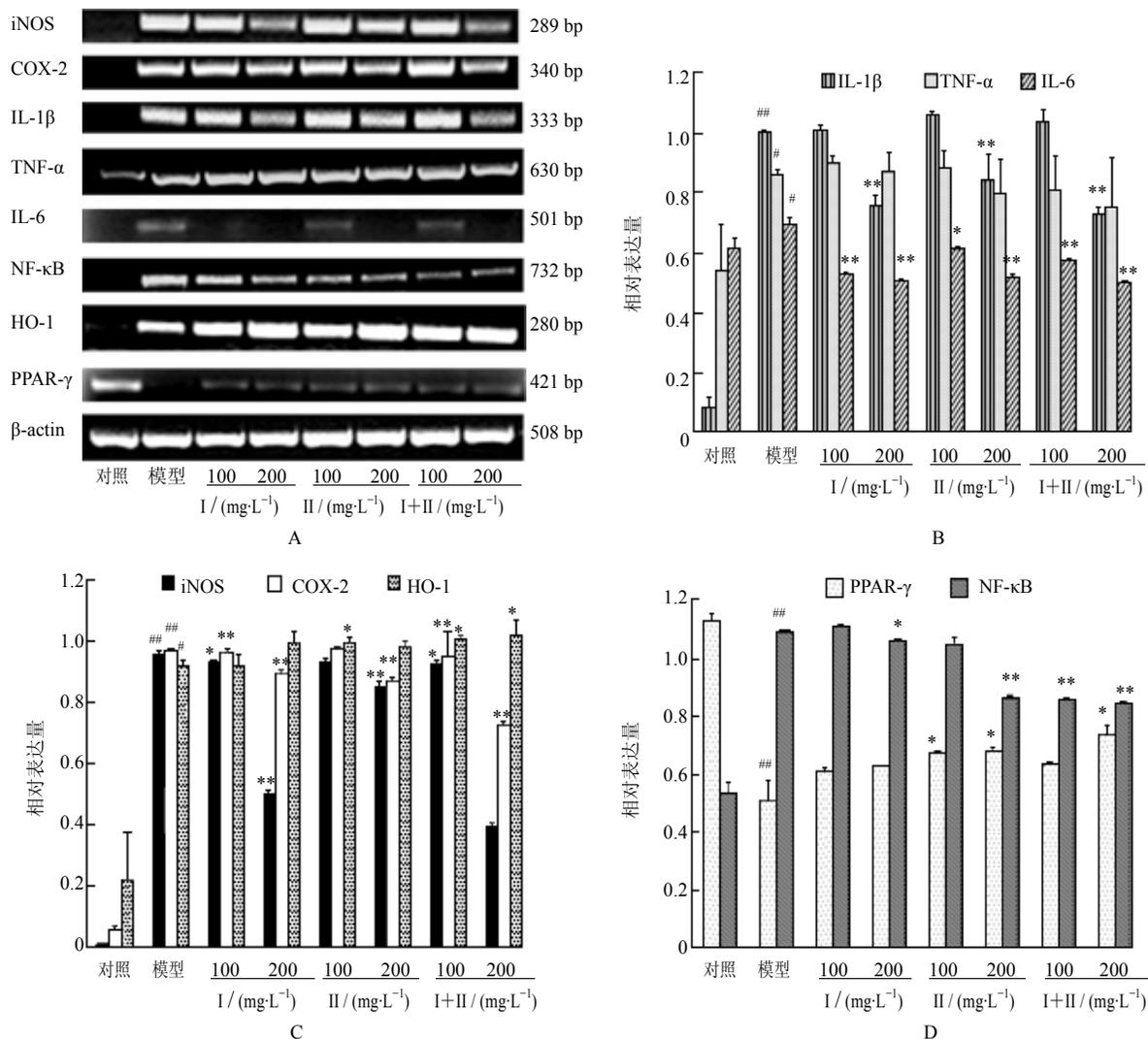
与模型组相比，部位 I 对 NF- κ B 抑制效果不明显，部位 II 则以质量浓度相关方式下调其表达

($P < 0.01$)，部位 I 和 II 的等比配比组合 100、200 mg/L 时使其分别下调 21.22%、22.65% ($P < 0.01$)。

与模型组相比，部位 II 对 PPAR- γ 表达具一定的上调作用 ($P < 0.05$)，部位 I 和 II 等比配比组合在 200 mg/L 时协同上调 PPAR- γ 的表达 ($P < 0.05$)。结果见图 1。

3.6 部位 I 和 II 及其等比组合对 iNOS 和 p-ERK 蛋白水平的影响

与对照组相比，模型组 RAW264.7 细胞经 LPS + FN- γ 刺激后，iNOS 蛋白高表达 ($P < 0.01$)；部位 I、II 及其等比配比组合对 iNOS 蛋白高表达具有

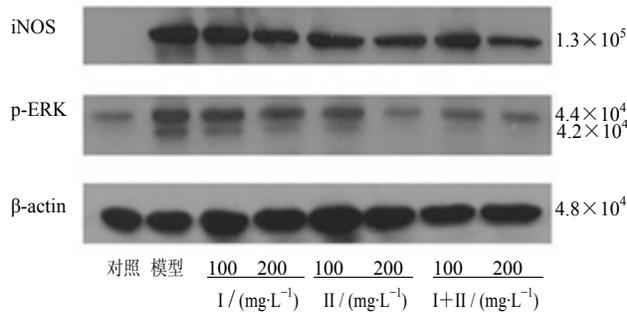


与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 下表同
 $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ vs control group; $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group; same as below

图 1 桑枝有效部位 I 和 II 及等比组合对炎症介质 (A)、细胞因子 (B)、诱生型合酶基因 (C) 及核因子 (D) 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of extracting fractions I and II, and their combination on gene expression of inflammatory medium (A), cytokines (B), inducible synthases (C), and nucleus factors (D) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

下调趋势，但与模型组相比无显著差异。模型组中 p-ERK 表达也上调 ($P < 0.05$)；部位 II 在 100、200 mg/L 时使 p-ERK 表达分别下调 7.19%、19.41%



($P < 0.05$)，而部位 I 的作用不大；部位 I 和 II 等比配比组合有下调 p-ERK 蛋白表达的趋势。结果见图 2。

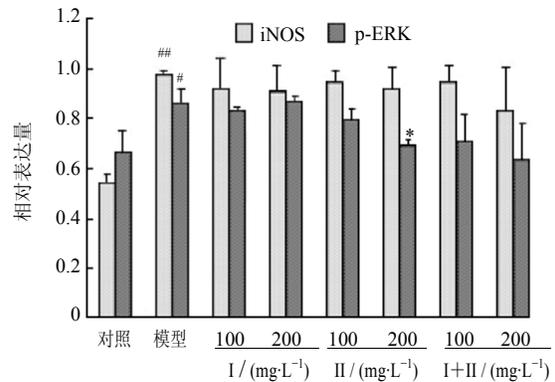


图 2 桑枝提取部位 I 和 II 及其等比组合对 iNOS 和 p-ERK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of extracting fractions I and II, and their combination (1 : 1) on iNOS and p-ERK protein expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

LPS 和 IFN- γ 刺激巨噬细胞后，通过 Toll 样受体激活 NF- κ B 和 JAK2/STAT1 信号转导通路，其中 NF- κ B 抑制蛋白 I κ B 经磷酸化泛素化降解，NF- κ B 活性二聚体入核^[6]，同时 STAT 经磷酸化 JAK2 活化后也入核^[7]，表达大量炎症靶基因，如 iNOS^[8]、COX-2、IL-1 β 、IL-6 等，从而产生大量的 NO 和 PGE₂。在有氧情况下，NO 和氧结合形成强氧化剂-过氧亚硝酸阴离子，导致蛋白质硝基化，影响其功能^[9]，各类炎症介质推动炎症的级联瀑布反应，促进炎症发展，而 HO-1 在氧化应激诱导下产生，其产物胆红素、铁蛋白和 CO 具有抗炎作用，它们通过细胞外信号调节激酶 (ERK)^[10]对 iNOS 表达进行负反馈，降低 NO 过量产生^[11]，因此胆红素铁蛋白和 CO 等的上调能保护细胞免受氧化应激损害。而 PPAR- γ 对炎症具有调控作用。

桑枝提取部位 I (总黄酮) 和 II (总皂苷) 是其抗炎的活性部位，它们一方面通过下调致炎系统中 iNOS 和 COX-2、炎性介质 IL-1 β 和 IL-6 的表达；另一方面上调抗炎系统中 HO-1 和 PPAR- γ 的表达，使细胞内环境趋向致炎和抗炎体系的平衡，这些效应部分是通过抑制 NF- κ B 基因表达和 p-ERK 的磷酸化而影响 NF- κ B 和 ERK/MAPK 信号转导途径而起作用的。部位 I 和 II 等比配比组合对炎症中多个靶点均有较好的协同调控作用，进而发挥更佳抗炎效果。

参考文献

- [1] Bryan N S, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development [J]. *Front Biosci*, 2009, 14: 1-18.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 刘明月, 牟英, 李善福, 等. 桑枝 95%乙醇提取物抗炎作用的试验研究 [J]. *山西中医学院学报*, 2003, 4(2): 13-14.
- [4] 王蓉, 卢笑丛, 王有为. 桑枝提取物及抗炎作用研究 [J]. *武汉植物学研究*, 2002, 20(6): 467-469.
- [5] 陈福君, 林一星, 许春泉, 等. 桑的药理研究——桑叶桑枝桑白皮抗炎药理作用的初步比较研究 [J]. *沈阳药科大学学报*, 1995, 64(3): 222-223.
- [6] Iwai K. Diverse ubiquitin signaling in NF- κ B activation [J]. *Trends Cell Biol*, 2012, 22(7): 355-364.
- [7] O'Shea J J, Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease [J]. *Immunity*, 2012, 36(4): 542-550.
- [8] Kleinert H, Pautz A, Linker K, et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 500(1/3): 255-266.
- [9] Bian K, Ke Y, Kamisaki Y, et al. Proteomic modification by nitric oxide [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 101(4): 271-279.
- [10] Chen K, Maines M D. Nitric oxide induces heme-oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38 [J]. *Cell Mol Biol*, 2000, 46(3): 609-617.
- [11] Bian K, Murad F. Nitric oxide (NO)-biogenesis, regulation, and relevance to human diseases [J]. *Front Biosci*, 2003, 8: d264-d278.