

硬紫草羟基萘醌提取物对炎症细胞因子表达的影响

邹茜茜, 宋巍薇, 王美瑜, 范华英, 车鑫, 刘珂*

烟台大学药学院, 山东 烟台 264005

摘要:目的 研究硬紫草羟基萘醌提取物对脂多糖(LPS)诱导的小鼠腹腔巨噬细胞RAW264.7细胞炎症因子的抑制作用和对苯磺酸(TNBS)诱导的炎症性肠病(IBD)大鼠结肠组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达的影响。方法 对硬紫草羟基萘醌提取物进行提取分离,采用ELISA法测定硬紫草羟基萘醌提取物对LPS诱导的RAW264.7细胞释放的TNF- α 和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的抑制作用;用TNBS法制备IBD大鼠模型,造模24 h后ig给药,连续给药7 d,于末次给药24 h后处死大鼠,采用免疫组织化学法检测大鼠结肠组织中TNF- α 的表达。结果 硬紫草羟基萘醌提取物对LPS诱导的RAW264.7细胞释放的TNF- α 和IL-1 β 具有抑制作用;与模型组相比,硬紫草羟基萘醌提取物可降低TNBS诱导的IBD大鼠结肠组织中TNF- α 的表达。结论 硬紫草羟基萘醌提取物对TNF- α 和IL-1 β 炎症因子具有不同程度的抑制作用,并可抑制TNBS诱导的肠道炎症反应,这种抑制作用是通过降低TNF- α 的表达来实现的。

关键词:硬紫草;羟基萘醌提取物;炎症性肠病;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素-1 β

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)13-1894-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.13.016

Effect of hydroxynaphthoquinone extract from *Lithospermum erythrorhizon* on inflammatory cytokines

ZOU Qian-qian, SONG Wei-wei, WANG Mei-yu, FAN Hua-ying, CHE Xin, LIU Ke

School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China

Abstract: Objective To study the effect of hydroxynaphthoquinone extract from *Lithospermum erythrorhizon* on the inflammatory cytokines in lipopolysaccharide (LPS)-induced peritoneal macrophage RAW264.7 cells of mice and on the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the TNBS-induced rat model of inflammatory bowel disease (IBD). **Methods** The hydroxynaphthoquinone fraction was extracted from *L. erythrorhizon*. The inhibition of hydroxynaphthoquinone on the inflammatory cytokines was tested by ELISA method. The IBD rat model was induced with TNBS. After 24 h of the model induction, the rats were ig administered for 7 d. After 24 h of the last administration, all rats were killed and the expression of TNF- α in colon tissues was evaluated by immunohistochemistry. **Results** The hydroxynaphthoquinone extract from *L. erythrorhizon* had the inhibition on TNF- α and interleukin-1 β (IL-1 β) in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Compared with the model group, the expression level of TNF- α in the colon tissue of IBD rats induced by TNBS was significantly lower in hydroxynaphthoquinone extract groups. **Conclusion** Hydroxynaphthoquinone extract from *L. erythrorhizon* has the inhibition on TNF- α and IL-1 β , which provides a support for the development of hydroxynaphthoquinone extract from *L. erythrorhizon* into a therapeutical agent.

Key words: *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.; hydroxynaphthoquinone extract; inflammatory bowel disease; tumor necrosis factor- α ; interleukin-1 β

硬紫草为紫草科多年生草本植物紫草 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. 的干燥根,主要分布在我国东北地区^[1],《中国药典》2000年版曾有收载。研究表明硬紫草中主要化学成分包

括萘醌类、生物碱类、脂肪酸类和酸性多糖类等^[2]。紫草具有凉血、活血、解毒透疹的功效,用于血热毒盛、斑疹紫黑、麻疹不透、疮疡、湿疹、水火烫伤。现代药理学研究表明,紫草具有较好的抗菌、

收稿日期: 2014-01-07

基金项目: 国家科技重大专项资助项目(2011ZX09102-006-04)

作者简介: 邹茜茜(1986—),女,硕士研究生,研究方向为中药药理作用。Tel: 15865357387 E-mail: dzouqian@126.com

*通信作者 刘珂 Tel: (0535)6706030-8013 E-mail: liuke@target-drug.com

抗肿瘤、抗病毒、抗炎、抗过敏、保肝降酶等作用,是一种药用价值很高的植物^[3]。国内外大量研究表明萘醌衍生物为紫草科多种药用植物抗炎的主要有效成分^[4-6]。炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种肠道内环境紊乱的慢性疾病,其发病因素至今尚不明确,主要包括溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)和克隆恩氏病(Crohn's disease, CD)。其典型症状主要包括腹泻、腹痛、便血、溃疡等^[7-8]。已经有报道称,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)在IBD病人的血清、粪便和肠组织被证实存在^[9-10], TNF- α 被用来作为导致人类IBD腹泻的一种调节因子^[11-12]。经对苯磺酸(TNBS)诱导后, TNF- α 成为肠道炎症损伤和肠壁黏膜损伤的一种重要的细胞因子^[13]。IBD的发病与TNF- α 的高水平表达息息相关^[14]。抑制TNF- α 的生物合成和信号传导通路成为治疗IBD的新型靶点。但是很多生物药都具有一定的副作用,增加了人们的感染率和复发率,并且这些新生物制品的高价格也限制了其使用^[15-16]。近年来,天然药用植物由于其自身所具有的高安全性越来越受到人们的关注,逐渐发展成为了一种新型的治疗药物。有文献报道,紫草素作为紫草羟基萘醌的一种活性成分被用于调节TNF- α 的表达,抑制体内TNF- α 的逆转录^[17]。因此,本实验通过提取得到了硬紫草中的羟基萘醌提取物,并研究硬紫草羟基萘醌提取物对TNBS诱导的IBD大鼠结肠组织中TNF- α 表达的影响,进一步探讨硬紫草羟基萘醌类化合物治疗IBD的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 岛津 UV-2550 型紫外分光光度仪, 旋转蒸发仪(上海禾汽玻璃仪器有限公司), RM2255 型石蜡切片机(德国 Leica 公司), PL303 电子天平(梅特勒-托利多有限公司), DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精密实验设备有限公司), 病理图像(IMAGE-PRO PLUS, 美国 Medical Cybentics 公司)。

1.2 试药与试剂

硬紫草由内蒙古药品检验所中药室赠送, 经烟台大学药学院生药室赵燕燕博士鉴定为紫草 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. 的干燥根, 标本存于烟台大学药学院。左旋紫草素对照品(批号 110769-200405)、 β 、 β' -二甲基丙烯酰阿卡宁对照品(批号 11689-200503)均购于中国食品药品

检定研究院, 薄层色谱硅胶和柱色谱硅胶(200~300目)购自烟台市化学工业研究所; TNF- α 、白细胞介素-1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 脂多糖(LPS)购自美国 Sigma 公司; 二甲基亚砜(DMSO)购自碧云天生物技术研究所; RPMI 1640 培养基购自 GenMed Scientifics Inc.; DAB 显色试剂盒购自索莱宝科技有限公司, 兔超敏二步法免疫组化检测试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 动物与细胞

雄性 SD 大鼠, 体质量(200 \pm 10)g, 购自北京大学医学部实验动物科学部, 许可证号 SCXK(京)2006~2008。小鼠巨噬细胞(RAW264.7)购自中国科学院上海细胞库(ATCC, TIB-71)。

2 方法

2.1 硬紫草羟基萘醌提取物的提取分离

2.1.1 提取工艺 取硬紫草 1 kg, 粉碎, 过 3 号筛, 用 95%乙醇冷浸提取, 10 倍量提取 3 次, 每次 1 h, 合并提取液, 滤过, 滤液于 50 $^{\circ}$ C 减压浓缩。将得到的硬紫草浸膏用石油醚-醋酸乙酯(8:1)进行柱色谱洗脱, 收集洗脱液, 50 $^{\circ}$ C 减压浓缩, 得到硬紫草羟基萘醌提取物, 采用 HPLC 方法进行测定。

2.1.2 紫草羟基萘醌提取物总色素测定 采用紫外-可见分光光度法在 516 nm 处测吸光度值, 以左旋紫草素的吸收系数为 242, 计算硬紫草羟基萘醌提取物中总色素的质量分数, 结果为 82.1%。

2.1.3 紫草羟基萘醌化合物定量测定 参考《中国药典》2010 年版方法^[18]以乙腈-水-甲酸(700:300:0.5)为流动相, UV 检测器, 检测波长 518 nm; 体积流量 1.0 mL/min, 色谱柱为 Phenomenex Luna C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 柱温 35 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。以 β 、 β' -二甲基丙烯酰阿卡宁为对照品计算各羟基萘醌化合物的质量分数。结果硬紫草羟基萘醌提取物中含有异丁酰紫草素 25.7%、紫草素 1.0%、乙酰紫草素 33.2%、 β 、 β' -二甲基丙烯酰紫草素 3.5%、异戊酰紫草素 18.0%、 β -羟基异戊酰紫草素 14.7%。

2.2 对 LPS 诱导的巨噬细胞 TNF- α 和 IL-1 β 的影响

细胞株 RAW264.7 使用含 10%胎牛血清、10 μ g/mL 链霉素及 100 U/mL 青霉素的 RPMI 1640 培养液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 隔日传代, 贴壁生长的 RAW264.7 细胞使用 0.25%胰蛋白酶消化, 待细胞处于生长期时进行实验。

取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 调整细胞密度为 5×10^5 /mL, 将细胞悬液加入 96 孔培养板中 (200 μ L/孔), 放入 CO₂ 培养箱中培养 1 h 后, 加入 1 μ g/mL 的 LPS 和质量浓度分别为 0.15、0.30、0.60、1.20、2.40 μ g/mL 的硬紫草羟基萘醌提取物 (以 DMSO 溶解), 将 96 孔培养板放入 CO₂ 培养箱中培养 6 h, 取细胞上清, 用 TNF- α 和 IL-1 β ELISA 试剂盒测定细胞上清液中 TNF- α 和 IL-1 β 的水平。

2.3 对 TNBS 诱导的 IBD 大鼠结肠组织中 TNF- α 表达的影响

2.3.1 TNBS 诱导 IBD 大鼠模型制备

参考文献方法^[19-20]制备 IBD 大鼠模型, 动物按体质量随机分为 5 组: 对照组, 模型组, 硬紫草萘醌提取物低、中、高剂量 (2.5、5.0、10.0 mg/kg) 组。造模前禁食 24 h, 记录体质量, 戊巴比妥钠 30 mg/kg ip 麻醉。麻醉后, 大鼠头部朝下、肛门朝上倒置, 用 16 号灌胃针缓慢插入大鼠结肠部 (深度为距肛门 8 cm 处), 缓慢注入灌肠液, 推注耗时约 1 min。推注完毕后缓慢抽出灌胃针, 捏住大鼠肛门倒置 2 min 后, 将大鼠放归笼中, 保持大鼠体位为头低臀高状态, 于大鼠肛门处放干净棉签, 待自然清醒。对照组灌肠给予生理盐水, 其余各组灌肠给予 80 mg/kg TNBS-50% 乙醇溶液, 灌肠体积 4 mL/kg。造模 24 h 后即出现肉眼血便或黏液便, 体质量也有不同程度的下降, 并伴有精神萎靡、蜷卧、少动、毛耸、进食减少等症状, 随机处死造模的 2 只大鼠, 取结肠段观察其病理改变, 发现表现为黏膜充血、水肿、黏膜下层有大量炎性细胞浸润, 确定造模成功。造模 24 h 后各组开始 ig 给药, 连续给药 7 d。对照组和模型组给予等体积的 CMC-Na。每日观察记录动物体质量、

体征和粪便情况。

2.3.2 标本处理

大鼠于末次给药 24 h 后 ip 10% 水合氯醛麻醉, 剖腹观察大鼠腹腔, 观察结肠大体形态改变及腹腔粘连等情况; 取出肛门至盲肠末端的整个结肠和直肠段, 沿肠系膜剪开肠腔, 用冰的生理盐水冲洗掉肠内容物, 将结肠分为 2 个部分: 一部分用 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 3 μ m 连续切片, HE 染色用作病理检测; 剩余的部分称质量后用锡箔纸包好于液氮中或 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

2.3.3 结肠组织中 TNF- α 表达的测定

采用免疫组织化学法对 TNF- α 表达测定。DAB 显色后, 以细胞质出现棕黄色颗粒为阳性。利用 IMAGE-PRO PLUS 病理图像分析系统对阳性染色进行积分吸光度测定。每例每个指标取 10 个高倍视野 ($\times 400$), 通过病理图像分析系统处理, 记录 TNF- α 表达值。

2.4 数据统计方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据, 组间比较行方差分析, S-N-K 方法统计。

3 结果

3.1 对 LPS 诱导的巨噬细胞 TNF- α 和 IL-1 β 的影响

经 1 μ g/mL LPS 刺激 6 h 后, RAW264.7 细胞均释放大量的 TNF- α 和 IL-1 β , 与对照组比较差异非常显著 ($P < 0.01$)。不同质量浓度的硬紫草羟基萘醌提取物均可明显抑制 LPS 诱导的巨噬细胞释放 TNF- α 和 IL-1 β , 并呈现出良好的剂量关系, IC₅₀ 值分别为 0.67、0.85 μ g/mL。见表 1。

3.2 对 TNBS 诱导的 IBD 大鼠结肠组织中 TNF- α 表达的影响

光镜下, 在对照组结肠组织中, TNF- α 在肠黏

表 1 硬紫草羟基萘醌提取物对巨噬细胞 TNF- α 和 IL-1 β 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Inhibition of hydroxynaphthoquinone extract from *L. enythrorhizon* on TNF- α and IL-1 β in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	TNF- $\alpha / (\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$	TNF- α 抑制率 / %	IL-1 $\beta / (\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$	IL-1 β 抑制率 / %
对照	—	75.6 \pm 0.5	—	13.1 \pm 0.2	—
LPS	1	1 362.1 \pm 99.8 ^{##}	—	815.6 \pm 1.2 ^{###}	—
LPS+硬紫草羟基萘醌 提取物	1+0.15	976.5 \pm 11.5	11.3	705.6 \pm 39.1	15.6
	1+0.30	856.0 \pm 22.5	32.5	657.9 \pm 49.8	29.3
	1+0.60	687.5 \pm 25.6	45.6	487.1 \pm 73.6 ^{**}	45.6
	1+1.20	452.3 \pm 35.6 ^{**}	58.9	430.2 \pm 40.5 ^{**}	63.9
	1+2.40	312.4 \pm 18.5 ^{***}	95.6	256.3 \pm 35.6 ^{***}	85.6

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与 LPS 组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$
^{###} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs LPS group

膜上皮、大肠腺上皮呈现低表达或不表达，而在肌层中表达呈阴性。在模型组结肠组织中，TNF- α 在肠黏膜上皮、肌层中呈现强烈的表达，在炎性细胞也有强烈的表达。在硬紫草羟基萘醌提取物高、中、

低剂量组，TNF- α 在肠黏膜上皮、肌层中的表达均比模型组中的弱，可见不同程度的表达，其中低剂量组中 TNF- α 中度表达，中、高剂量组中 TNF- α 中低度表达。见图 1 和表 2。

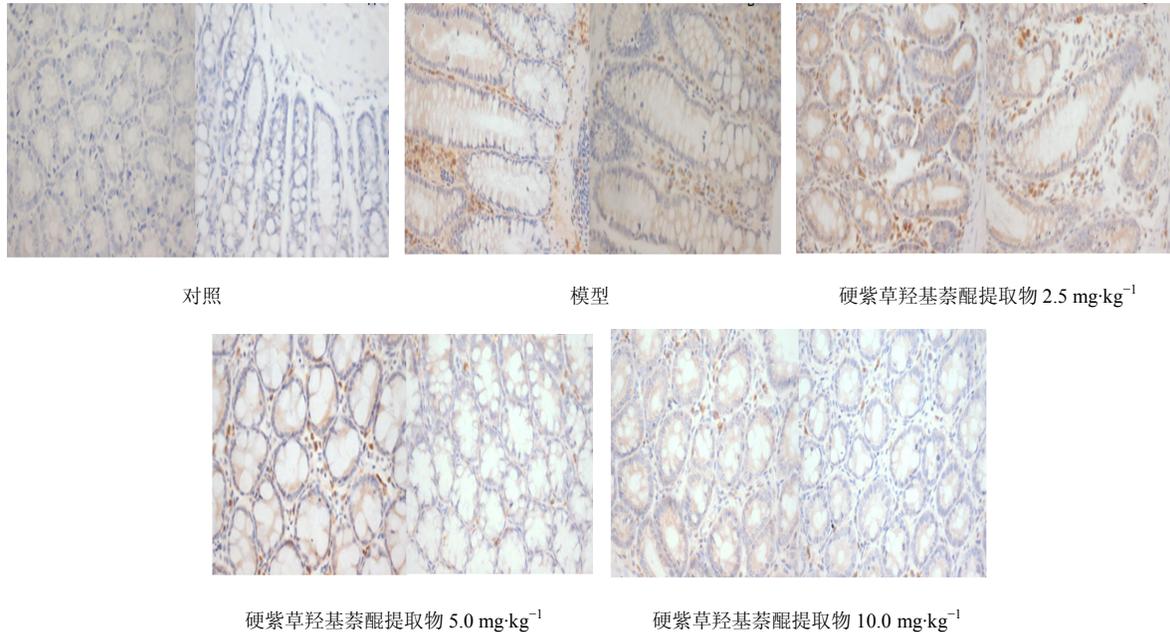


图 1 各组大鼠结肠组织中 TNF- α 的免疫组织化学染色结果

Fig. 1 Immunohistochemical staining of TNF- α in colon tissue of rats in each group

表 2 硬紫草羟基萘醌提取物对 TNBS 诱导的 IBD 大鼠结肠组织中 TNF- α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of hydroxynaphthoquinone extract from *L. enythrorrhizon* on TNF- α expression in colon tissue of IBD rats induced by TNBS ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	TNF- α
对照	—	282.93 ± 10.55***
模型	—	974.81 ± 4.06
硬紫草羟基萘醌提取物	2.5	733.83 ± 1.04***
	5.0	657.91 ± 0.19***
	10.0	628.09 ± 2.67***

与模型组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs model group

4 讨论

本实验结果表明硬紫草羟基萘醌提取物对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 释放的 TNF- α 和 IL- β 具有抑制作用，并呈现出良好的剂量关系。通过光镜下观察 TNBS 诱导的 IBD 大鼠结肠中 TNF- α 的免疫组织化学染色图可以发现，与模型组相比，给药组结肠组织中 TNF- α 的表达明显降低，而且发现硬紫草羟基萘醌提取物降低结肠组织 TNF- α 的

表达呈一定的剂量依赖性。实验结果显示硬紫草羟基萘醌提取物能够降低结肠中 TNF- α 的表达，因此，可初步说明硬紫草羟基萘醌提取物能够抑制 TNBS 诱导的肠道炎症反应，这种抑制作用是通过降低 TNF- α 的表达来实现的。

参考文献

- [1] 辛玲, 孙辉. 硬紫草研究概况 [J]. 中国医药技术经济与管理, 2008, 11(2): 63-68.
- [2] 宋艳华, 孙辉, 张爱华, 等. 紫草的研究进展 [J]. 中医药学报, 2013, 41(4): 985-987.
- [3] 李治建, 周凡, 斯拉甫·艾白, 等. 紫草药理作用研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(11): 110-113.
- [4] 黄志纾, 张敏, 马林, 等. 紫草的化学成分及其药理活性研究概况 [J]. 天然产物研究与开发, 1999, 12(1): 73-81.
- [5] Papageorgiou V P, Assimopoulou A N, Sammanidou I N, et al. Recent advances in chemistry, biology and biotechnology of alkannin and shikonins [J]. *Curr Org Chem*, 2006, 10(16): 2123-2142.
- [6] Papageorgiou V P, Assimopoulou A N, Couladouros E A, et al. The chemistry and biology of alkannin, shikonin,

- and related naphthazarin natural products [J]. *Angew Chem (Int Ed Engl)*, 1999, 38(3): 270-301.
- [7] Ghia J E, Blennerhassett P, Deng Y, *et al.* Ghia, Reactivation of inflammatory bowel disease in a mouse model of depression [J]. *Gastroenterology*, 2009, 7(137): 2280-2288.
- [8] Keohane J, Mahony C, Mahony L, *et al.* Irritable bowel syndrome type symptoms in patients with inflammatory bowel disease: a real association or reflection of occult inflammation [J]. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105: 1789-1794.
- [9] Braegger C P, Nicholls S, Murch S H, *et al.* Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation [J]. *Lancet*, 1992, 339(8785): 89-91.
- [10] Reimund J M, Wittersheim C, Dumont S, *et al.* Increased production of tumor necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease [J]. *Gut*, 1996, 39(5): 684-689.
- [11] Bischo V, Lorentz A, Schwengberg S, *et al.* Mast cells are an important cellular source of tumor necrosis factor α in human intestinal tissue [J]. *Gut*, 1999, 44: 643-652.
- [12] Evans R C, Clarke L, Heath P, *et al.* Treatment of ulcerative colitis with an engineered human anti-TNF-alpha antibody CDP571 [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 1997, 11: 1031-1035.
- [13] Yuan H, Ji W S, Wu K X, *et al.* Anti-inflammatory effect of diammonium glycyrrhizinate in a rat model of ulcerative colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12: 4578-4581.
- [14] Rutgeerts P, Vermeire S, van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases [J]. *Gastroenterology*, 2009,7(136): 1182-1197.
- [15] Harpaz N, Polydorides A D. Colorectal dysplasia in chronic inflammatory bowel disease: pathology, clinical implications, and pathogenesis [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2010, 134(6): 876-895.
- [16] De Silva S, Devlin S, Panaccione R. Optimizing the safety of biologic therapy for IBD [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(2): 93-101.
- [17] Staniforth V, Wang S Y, Shyur L F, *et al.* Shikonins, phytochemicals from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor α promoter *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 7(279): 5877-5885.
- [18] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [19] Morris G P, Beck P L, Herridge M S, *et al.* Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon [J]. *Gastroenterology*, 1989, 96: 795-803.
- [20] Shorter R G, Huizenga K A, Spencer R J. A working hypothesis for the etiology and pathogenesis of nonspecific inflammatory bowel disease [J]. *Am J Dig Dis*, 1972, 17: 1024-1032.