

毛蕊花苷对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症模型的作用及其机制研究

王琴琴^{1,2}, 韩 珊^{1,2}, 李新星^{1,2}, 高红伟^{1,2*}, 杨世林^{1,2}

1. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530020

2. 广西优势中成药与民族药开发工程技术中心, 广西 南宁 530020

摘要:目的 采用脂多糖(LPS)诱导 RAW264.7 细胞的炎症模型, 考察炎症相关指标, 探讨毛蕊花苷的抗炎作用及其机制。方法 用 MTT 比色法检测毛蕊花苷对 RAW264.7 细胞活性的影响; Griess 法检测 NO 的含量; Western blotting 检测核转录因子- κ B (NF- κ B) 通路相关蛋白的表达, ELISA 试剂盒检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 的释放, 流式细胞仪检测细胞内活性氧 (ROS)、一氧化氮 (NO)、 Ca^{2+} 的释放情况。结果 毛蕊花苷浓度为 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 时对 RAW264.7 细胞没有毒性。不同浓度的毛蕊花苷对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞导致的 NO、TNF- α 、IL-6 的释放, 细胞内 ROS、NO、 Ca^{2+} 释放的增加均有很好的抑制效果, 对诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧酶-2 (COX-2)、p-IKK α/β 、p-p65、p-I κ B α 蛋白的表达也有抑制作用。结论 毛蕊花苷具有明显的抗炎作用, 其作用机制是通过抑制 NF- κ B 信号通路而发挥抗炎作用。

关键词: 毛蕊花苷; RAW264.7 细胞; 脂多糖; 抗炎作用; NF- κ B 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)16-4217-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.015

Anti-inflammatory effect and mechanism of verbascoside on LPS-induced RAW264.7 cells

WANG Qin-qin^{1,2}, HAN Shan^{1,2}, LI Xin-xing^{1,2}, GAO Hong-wei^{1,2}, YANG Shi-lin^{1,2}

1. Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530020, China

2. Guangxi Superior Chinese Patent Medicine and National Medicine Development Engineering Technology Center, Nanning 530020, China

Abstract: Objective To investigate the anti-inflammatory effects and mechanism of verbascoside in LPS-stimulated RAW264.7 cells. **Methods** MTT assay was used to determine cytotoxicity of verbascoside in RAW264.7 cells. Griess assay was employed to detect nitrite level in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The protein expressions of iNOS, COX-2, p-IKK α/β , p-p65, and p-I κ B α were detected by Western blotting. The release of TNF- α and IL-6 was detected by ELISA. The levels of intracellular ROS, NO, and Ca^{2+} were detected by a flow cytometry. **Results** Mullein glycoside (20, 40, and 80 $\mu\text{mol/L}$) displayed no significant cytotoxicity in RAW264.7 cells. The nitrite level, TNF- α and IL-6 release, and intracellular ROS, NO, and Ca^{2+} level were significantly decreased by Mullein glycoside (20, 40, and 80 $\mu\text{mol/L}$). In addition, verbascoside also inhibited the protein expressions of iNOS, COX-2, p-IKK α/β , p-p65, and p-I κ B α . **Conclusion** Verbascoide showed an obvious anti-inflammatory effect via the NF- κ B signaling pathway.

Key words: verbascoside; RAW264.7 cells; lipopolysaccharide; anti-inflammatory effect; NF- κ B pathway

巨噬细胞是机体内一种重要的免疫细胞, 在抗炎、抗肿瘤、机体免疫调节等方面发挥着重要的生理作用^[1-2], 此外, 巨噬细胞在介导炎症介质的产生中起着非常重要的作用, 大量的研究表明多种炎症性疾病的发生与发展与巨噬细胞及其释放的炎症介质有密切的联系^[3]。病原微生物可激活相关的炎症

细胞, 这些细胞通过分泌细胞因子、炎性介质等生物活性物质如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)、一氧化氮 (NO)、活性氧 (ROS)、环氧酶-2 (COX-2) 等, 导致相关组织微环境氧化/抗氧化失衡^[4], 众多的炎症细胞和炎症因子形成恶性肿瘤, 引起组织损伤, 在损伤的同时, 也引起下游相关

收稿日期: 2020-01-22

基金项目: 国家青年科学基金项目 (81803807); 广西壮族自治区青年科学基金项目 (2018JJB140265); 广西高校引进海外高层次人才“百人计划”项目 (05018064); 广西科技基地和人才专项 (2018AD19034)

作者简介: 王琴琴 (1994—), 女, 中药学硕士。Tel: 18329759158 E-mail: 18329759158@163.com

*通信作者 高红伟, 博士, 副研究员, 主要研究方向为中药抗炎活性及抗肿瘤活性研究。Tel: 18077022216 E-mail: gaohongwei06@126.com

信号传导通路的激活。在炎症引起疾病发病机制越来越复杂及其导致死亡率越来越高的情况下,全面了解炎症引起疾病的发病机制,对其治疗具有重要意义。

广西毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. et Arn. var. *kwangsiensis* Hand. -Mazz. 为冬青科 (Aquifoliaceae) 冬青属 *Ilex* L. 植物,是本属植物毛冬青 *I. pubescens* Hook. et Arn. var. 的变种,其味微苦、涩、性凉,归心、肺经,具有活血通脉、热解毒的作用^[5],主治胸痹心痛、中风瘫痪、脉闭不通、外感风热、肺热咳嗽、咽痛乳蛾、目疾视昏、痈疽丹毒、烧伤烫伤、跌打肿痛等。近代药理学研究表明^[6],广西毛冬青具有抗氧化、抗炎、神经保护、抗肿瘤、抗病毒等生物活性。研究发现广西毛冬青中含有毛蕊花苷较多,其化学本质是苯乙醇苷^[7]。目前研究发现^[8],苯乙醇苷类化合物在自然界的分布相当广泛,几乎分布在各个科属种且药理作用较强,由于苯乙醇苷是一类具有很强药理活性的化合物,具有明显的抗炎、抗菌、抗氧化、保肝等一系列药理作用^[9],且在广西毛冬青中的含量较高,因而研究其药理作用对广西毛冬青产业化发展具有深远意义。

为进一步确定毛蕊花苷的抗炎作用及机制,本研究以脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为体外炎症模型,检测毛蕊花苷对炎症因子及诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、COX-2、p-IKK α / β 、p-p65、I κ B α 、p-I κ B α 蛋白表达情况的影响,探讨毛蕊花苷的抗炎作用及机制,为毛蕊花苷在临床抗炎药效的开发提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞、药物与试剂

RAW264.7 细胞 (中国科学院上海生科院细胞资源中心);毛蕊花苷 (课题组自制,质量分数 > 98%);DMEM 培养基、胎牛血清、PBS (美国 Gibco 公司);LPS 试剂、MTT 试剂盒 (美国 Sigm-Aldrich 公司);BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo 公司);ELISA 试剂盒 (欣博盛生物科技有限公司);iNOS、COX-2、p-IKK α / β 、IKK- α 、IKK- β 、p-p65、p65、I κ B α 、p-I κ B α 、GAPDH 抗体 (美国 CST 公司);DCFH₂-DA、Fluo-3AM、DAF-DA (美国 Sigm-Aldrich 公司)。

1.2 仪器

BSC-1004IIA2 生物安全柜 (苏州安泰空气技术有限公司);37℃CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司);MPR-440F 医用冷藏冷冻箱 (松下冷链有限公司);HH-6 数显恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司);Centrifuge 5424R 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公

司);TD5Z 离心机 (湖南凯达科学仪器有限公司);SYNERGYH1 多功能微孔板检测仪 (美国伯腾仪器有限公司);BILL-10B 恒温金属浴 (上海比郎仪器制造有限公司);PowerPac HC 蛋白电泳仪和转膜仪、1708197 凝胶显微成像系统 (美国 Bio-Rad 公司);QL-902 涡旋机 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司);LSR Fortessa 流式细胞分析仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

将 RAW264.7 细胞接种于 10 cm² 的培养瓶中,放在 37℃、5% CO₂ 条件下的培养箱中进行培养。细胞生长于融合度 70%~80% 时,对细胞进行传代培养。贴壁的 RAW264.7 细胞用细胞刮轻轻刮下,用巴氏滴管轻轻吹打细胞使其完全脱落。收集细胞悬液于离心管中,以 800 r/min 离心 5 min,弃上清,加 1 mL 培养液用枪把细胞吹散,放在培养箱中传代培养。

2.2 毛蕊花苷的细胞毒性检测

收集对数生长期的细胞沉淀,调整细胞的密度为 5×10^4 个/mL,然后在 96 孔细胞培养板中每孔加入 100 μ L 的细胞悬液。放在培养箱中过夜培养。实验分组为对照组、LPS 组、加药组。药物组分别加入不同浓度的毛蕊花苷 (20、40、80 μ mol/L) 预处理 1 h,然后加入 LPS (1 μ g/mL) 刺激细胞共孵育 18 h,每组重复 5 孔。24 h 后,以 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清,每孔加 100 μ L DMSO,放在摇床上轻轻摇晃 15 min,使紫色结晶二甲肼完全溶解后,在 570 nm 波长处测定其吸光度 (*A*) 值。计算细胞存活率。

$$\text{存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 毛蕊花苷对 NO 释放的影响

收集对数生长期的细胞沉淀,调整细胞的密度为 1.5×10^5 个/mL,然后在 24 孔细胞培养板中每孔加入 500 μ L 的细胞悬液。放在培养箱中过夜培养。实验分组为对照组、LPS 组、加药组。药物组分别加入不同浓度的毛蕊花苷 (20、40、80 μ mol/L) 预处理 1 h,然后加入 LPS (1 μ g/mL) 刺激细胞共孵育 18 h,每组重复 5 孔。18 h 后,各组吸取 50 μ L 上清液至 96 孔细胞培养板中,然后加入 50 μ L 的 Griess 试剂,轻轻摇晃使其充分混匀,37℃放置反应 30 min 后用酶标仪中于 540 nm 波长测定 *A* 值。

2.4 毛蕊花苷对 TNF- α 、IL-6 炎症因子释放的影响

收集对数生长期的细胞沉淀,调整细胞的密度为 6×10^5 个/mL,然后在 6 孔细胞培养板中每孔加入 2 mL 的细胞悬液。放在 37℃、5% CO₂ 条件下

的培养箱中进行培养。实验分组为对照组、LPS 组、加药组。药物组分别加入不同浓度的毛蕊花苷 (20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 1 h, 然后加 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 刺激细胞共孵育 18 h。18 h 后取上清培养液, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测毛蕊花苷对 TNF- α 、IL-6 释放的影响。

2.5 毛蕊花苷对 ROS/NO/ Ca^{2+} 产生的影响

收集对数生长期的细胞沉淀, 调整细胞的密度为 1.5×10^5 个/mL, 然后在 6 孔细胞培养板中每孔加入 2 mL 的细胞悬液。放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下的培养箱中进行培养。实验分组为对照组、LPS 组、加药组。药物组分别加入不同浓度的毛蕊花苷 (20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 1 h, 加 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 刺激细胞共孵育 8 h。8 h 后, 检测 ROS 用探针 DCFH₂-DA (10 $\mu\text{g/mL}$) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下的培养箱中孵 30 min; 检测 NO 用探针 DAF-FM (5 $\mu\text{g/mL}$) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下的培养箱中孵 1 h, 检测 Ca^{2+} 用探针 Fluo-3AM (5 $\mu\text{g/mL}$) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下的培养箱中孵育 1 h。弃上清培养液, 用冰的 PBS 洗 2 遍, 每孔加 100 μL 胰酶消化 1 min, 用 400 μL 冰 PBS 将细胞冲下来, 收集细胞至流式管中, 用流式细胞仪检测 ROS/NO/ Ca^{2+} 产生量。

2.6 毛蕊花苷对 iNOS/COX-2 蛋白表达的影响

收集对数生长期的细胞沉淀, 调整细胞的密度为 6×10^5 个/mL, 然后在 6 孔细胞培养板中每孔加入 2 mL 的细胞悬液。放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下的培养箱中进行培养。实验分组为对照组、LPS 组、加药组。药物组分别加入不同浓度的毛蕊花苷 (20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 1 h, 加 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 刺激细胞共孵育 18 h。弃掉上清培养液, 收集细胞并进行蛋白的提取。细胞蛋白提取后, 用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定, 计算蛋白上样量。然后, 采用 Western blotting 法对相关蛋白 (iNOS、COX-2、GAPDH) 进行检测。

2.7 毛蕊花苷对核转录因子- κB (NF- κB) 通路的影响

收集对数生长期的细胞沉淀, 调整细胞的密度为 6×10^5 个/mL, 然后在 6 孔细胞培养板中每孔加入 2 mL 的细胞悬液。放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下的培养箱中进行培养。实验分组为对照组、LPS 组、加药组。药物组分别加入不同浓度的毛蕊花苷 (20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 1 h, 加 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 刺激细胞共孵育 18 h。弃掉上清培养液, 收集细胞并

进行蛋白的提取。细胞蛋白提取后, 用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定, 计算蛋白上样量。然后, 采用 Western blotting 法对相关蛋白 NF- κB p65 (p65)、NF- κB p65 磷酸化蛋白 (p-p65)、IKK α 、IKK β 、IKK α/β 磷酸化蛋白 (p-IKK α/β)、I $\kappa\text{B}\alpha$ 、I $\kappa\text{B}\alpha$ 磷酸化蛋白 (p-I $\kappa\text{B}\alpha$)、GAPDH 进行检测。

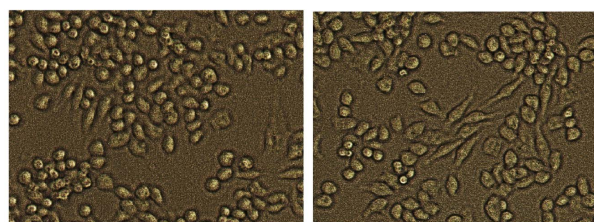
2.8 统计学分析

数据采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计学分析, 通过单因素方差分析进行组间比较。

3 结果

3.1 细胞生长情况

RAW264.7 细胞在 DMEM 细胞培养液中生长速度较快, 喜欢群居生长, 而堆与堆之间是有空隙的, 而不是连为片。RAW264.7 细胞进行传代后还没有贴壁时, 细胞呈圆形, 其细胞质有一环“光圈”, 折光度高, 透明光亮 (图 1)。RAW264.7 细胞传代后可在很短的时间即可以贴壁, 一般 1 h 后就可以牢固贴壁, 贴壁后也呈圆形生长。LPS 组给予 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后, 细胞变为类似多边形或梭形, 伸出伪足等 (图 1)。



对照

LPS

图 1 RAW264.7 细胞状态

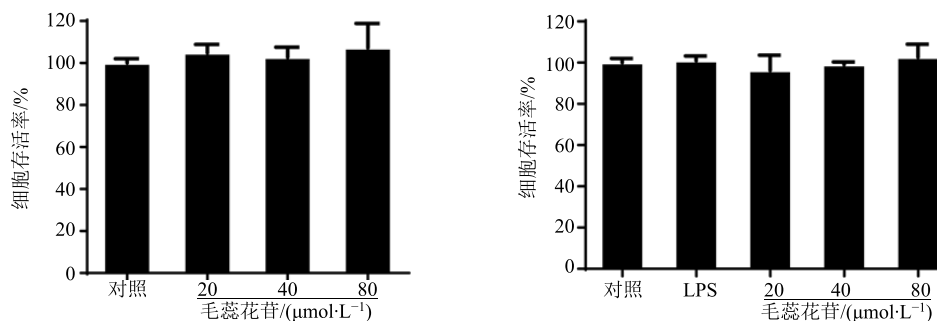
Fig. 1 Morphology of RAW264.7 cells

3.2 毛蕊花苷对 RAW264.7 细胞活性的影响

通过 MTT 实验来评估毛蕊花苷对细胞活性的影响, RAW264.7 细胞分别加入浓度为 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的毛蕊花苷单独作用 (图 2), 或先加入 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 预处理 1 h 后, 再加入浓度为 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的毛蕊花苷共同作用 (图 2) 18 h 后用 MTT 法检测细胞的存活率, 发现细胞的存活率均大于 90%, 说明毛蕊花苷在 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对细胞均没有毒性作用。

3.3 毛蕊花苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响

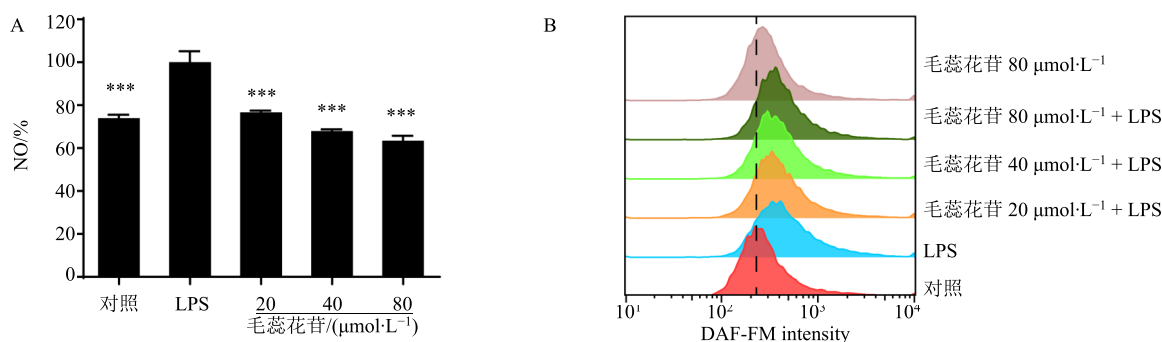
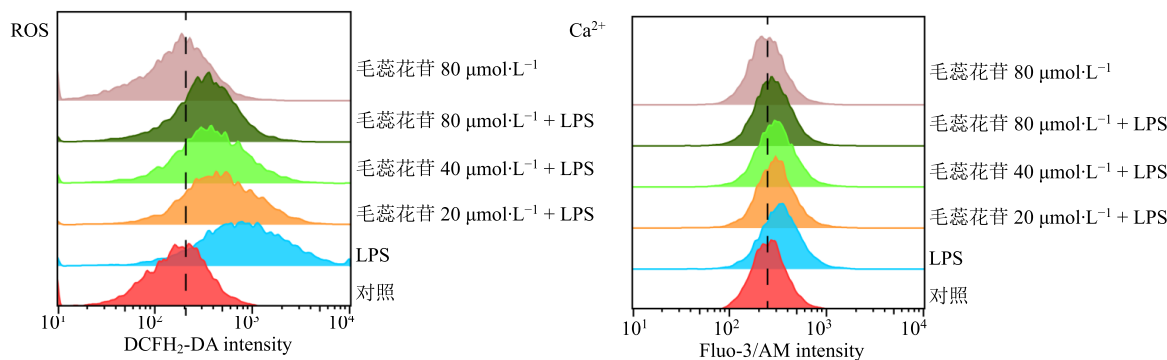
通过 Griess 实验结果可知, 正常 RAW264.7 细胞中 NO 释放量较低, 加入 LPS 作用后, 细胞培养

图 2 毛蕊花苷对 RAW264.7 细胞的毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 2 Cytotoxicity of MRHG in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

上清液中 NO 含量显著增加, 说明已成功构建 RAW264.7 细胞炎症模型。毛蕊花苷和 LPS 共同刺激细胞 18 h 后, 毛蕊花苷低、中、高浓度组 NO 的释放量明显低于 LPS 组 (图 3-A), 说明毛蕊花苷能够降低炎症巨噬细胞 NO 的释放。流式细胞分析结果显示, LPS 显著增加 NO 的释放量, 而毛蕊花苷显著抑制了 LPS 诱导的 NO 的产生, 并且呈浓度依赖性 (图 3-B)。

3.4 毛蕊花苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 ROS/Ca²⁺ 的影响

通过流式细胞分析结果 (图 4) 可知, 正常状态下 RAW264.7 细胞的 ROS 和 Ca²⁺ 的释放量都比较低, 用 1 μg/mL 的 LPS 诱导后, ROS 和 Ca²⁺ 的释放量都明显增加, 说明已成功构建 RAW264.7 细胞炎症反应模型。低、中、高浓度的毛蕊花苷均可有效抑制这种现象, 并且呈浓度依赖性, 说明毛蕊花苷能够

与 LPS 组比较: *** $P < 0.001$ *** $P < 0.001$ vs LPS group图 3 毛蕊花苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effect of MRHG on nitrite level and NO release in LPS-stimulated RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 4 毛蕊花苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 ROS/Ca²⁺ 的影响Fig. 4 Effect of MRHG on ROS generation and Ca²⁺ level in LPS-stimulated RAW264.7 cells

降低 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的 ROS 和 Ca^{2+} 的释放。

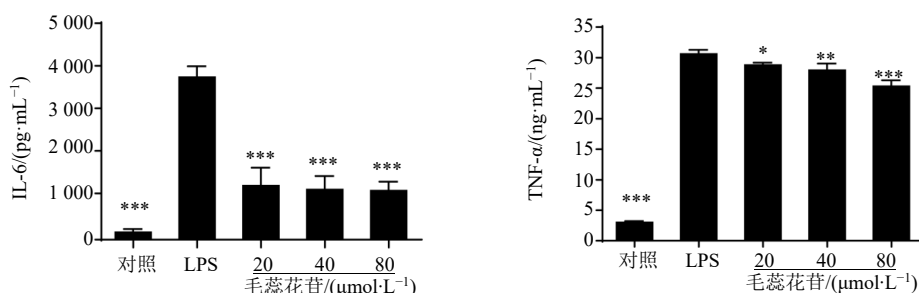
3.5 ELISA 检测毛蕊花苷对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌 IL-6、TNF- α 的影响

通过 ELISA 实验结果可知, 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 诱导 RAW264.7 细胞后, 细胞炎症因子 IL-6、TNF- α 的分泌水平明显高于对照组, 说明已成功构建 RAW264.7 细胞炎症模型。毛蕊花苷和 LPS 共同刺激细胞 18 h 后, 与 LPS 组比较, 毛蕊花苷低、中、高浓度组的 IL-6、TNF- α 分泌量明显降低 (图 5), 说明毛蕊花苷能够抑制炎症巨噬细胞中炎症因子

IL-6、TNF- α 的分泌。

3.6 毛蕊花苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 iNOS、COX-2 蛋白表达的影响

通过 Western blotting 实验结果可知, 与对照组比较, 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 作用于 RAW264.7 细胞 18 h 后, iNOS、COX-2 的蛋白表达量显著提高, 说明已成功构建 RAW264.7 细胞炎症模型。与 LPS 组比较, 毛蕊花苷低、中、高浓度组的 iNOS、COX-2 蛋白的表达量随逐渐减少 (图 6), 说明毛蕊花苷能够降低 iNOS、COX-2 蛋白的表达。



与 LPS 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs LPS group, same as following figure

图 5 毛蕊花苷对 LPS 诱导巨噬细胞 RAW264.7 分泌 IL-6、TNF- α 影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of MRHG on IL-6 and TNF- α release in LPS-stimulated RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

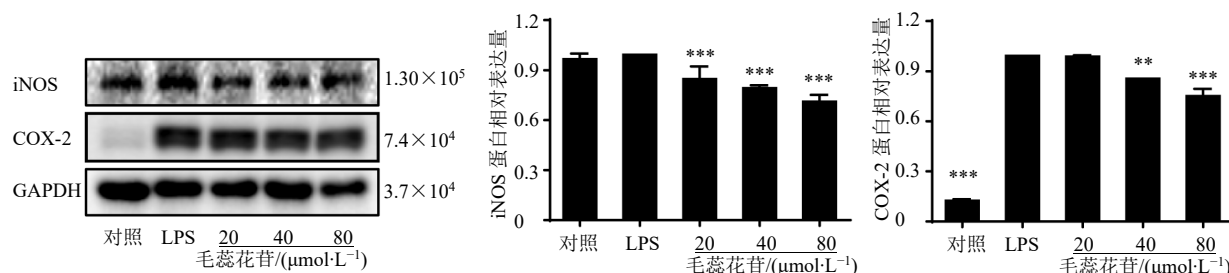


图 6 毛蕊花苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 iNOS、COX-2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of MRHG on iNOS and COX-2 proteins expression in LPS-stimulated RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

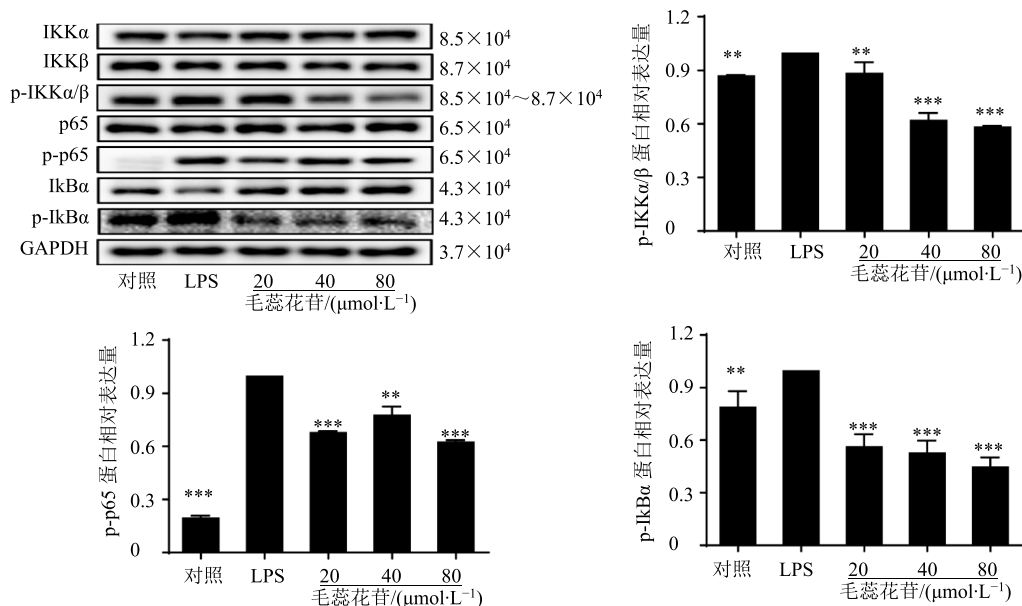
3.7 毛蕊花苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 信号通路的影响

通过 Western blotting 结果可知, 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 作用于 RAW264.7 细胞 8 h 后, p-p65、p-IKK α / β 、p-I κ B α 的表达量显著提高, 与 LPS 组比较, 低、中、高浓度的毛蕊花苷均可以显著降低磷酸化蛋白的表达水平 (图 7)。这说明毛蕊花苷能在一定程度上降低炎症 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 信号通路磷酸化蛋白的表达, 且不同浓度的毛蕊花苷能够抑制 I κ B α 总蛋白的降解。

4 讨论

炎症是机体对外界刺激的一种防御性反应, 但是慢性炎症又会损伤机体, 因此要保持体内炎症的

动态平衡^[10]。巨噬细胞是人体先天性免疫反应的重要效应细胞, 经由 LPS 诱导后能够分泌多种促炎性细胞因子 (IL-6、IL-12、IL-23、TNF- α 等)、趋化因子以及 iNOS、COX-2 等^[11]。促炎因子 TNF- α 是早期炎症的标志物, 能够介导炎症、免疫反应及组织损伤。过量的 TNF- α 会诱导其他细胞因子的产生, 从而加重炎症损伤, 多种炎症相关疾病均呈现出高水平的 TNF- α ^[12]。IL-6 既是一种促炎因子, 同时也是一种抗炎因子, 当机体内 IL-6 浓度较低的时候, 它能够增强机体的免疫防御反应; 当机体内 IL-6 浓度较高时, 会引起一系列的炎症反应, 会对组织、器官造成一定的损害, 是各种慢性和急性炎症反应

图 7 毛蕊花苷对 NF-κB 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 7 NF-κB pathway participated into MRHG's anti-inflammatory process ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

的最重要介质之一^[13-14]。NO 是一种重要的炎症介质，在炎症发生初期可以清除病原体为机体提供保护措施，但过量的 NO 会与超氧阴离子反应生成过氧化亚硝酸盐，导致局部组织损伤促进炎症疾病的发生^[15-16]。本研究发现，不同浓度的毛蕊花苷处理 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞后，NO、TNF-α 和 IL-6 的分泌受到显著抑制，表明毛蕊花苷可以通过抑制巨噬细胞 NO、TNF-α 和 IL-6 的释放来发挥其抗炎作用。

COX 有 3 种同工酶：COX-1、COX-2、COX-3，其中 COX-2 为诱导酶，催化 AA 裂解为前列腺素等致炎介质的关键酶，与炎症的关系非常密切^[17]。因而，通过降低或抑制 COX-2 的活化，从而调节炎症介质 iNOS、NO 的合成和释放，能够有效控制炎症的发生。本研究通过对 COX-2 在蛋白水平上进行检测，发现 LPS 刺激可显著提升 COX-2 的表达水平，而用毛蕊花苷预处理后，其表达量随药物浓度的增加而逐渐降低，抗炎效果显著。

NF-κB 是一个家族的核转录因子，具有多种生物活性，能够在转录水平快速调节细胞内多种基因的表达，进而调控细胞和机体的多种生命活动^[18-19]。与此同时，NF-κB 容易被一些刺激性的物质所诱导而激活，它通过特异性地结合启动基因的位点，启动下游基因的转录与促进蛋白的表达，由此促进炎症相关因子的合成、分泌等，导致机体内发生一系列的变化，介导相关疾病的发生^[20]。本研究通过对 NF-κB 通路蛋白进行检测，发现 LPS 刺激可显著提升相关磷酸化蛋

白的表达水平，而用毛蕊花苷预处理后，其表达量随药物浓度的增加而逐渐降低，抗炎效果显著。

综上所述，毛蕊花苷具有良好的抗炎作用，并且是通过 NF-κB 通路来发挥其抗炎作用，但其具体的作用靶点还需进一步研究。

参考文献

- [1] 陈卓. 从 TLR4/MyD88/NF-κB 通路探讨丹参酮 II_A 干预动脉粥样硬化易损斑块的抗炎及免疫调节机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [2] Gao H W, Cui Y K, Kang N X, *et al.* Isoacteoside, a dihydroxyphenylethyl glycoside, exhibits anti-inflammatory effects through blocking toll-like receptor 4 dimerization [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(17): 2880-2896.
- [3] Rebollohernanz M, Zhang Q Z, Aguilera Y, *et al.* Phenolic compounds from coffee by-products modulate adipogenesis-related inflammation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance in adipocytes, via insulin/PI3K/AKT signaling pathways [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, doi: 10.1016/j.fct.2019.110672.
- [4] 姜华, 闫宜青, 江维, 等. NLRP3 炎症小体活化、调控机制及相关疾病机制 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2017, 47(1): 125-131.
- [5] 张泉修, 刘艳丽, 李笑然, 等. 广西毛冬青的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(9): 1730-1734.
- [6] 杨詹詹, 付蓉. 毛冬青的药理活性研究进展 [J]. *山东化工*, 2017, 46(24): 77-78.
- [7] 张泉修. 广西毛冬青的化学成分研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2017.

(下转第 4250 页)

- Med*, 2016, 194(1): 84-96.
- [11] Wei Y, Kim T J, Peng D H, *et al.* Fibroblast-specific inhibition of TGF- β 1 signaling attenuates lung and tumor fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(10): 3675-3688.
- [12] 甘文华, 黄 凯, 吕紫薇, 等. 吡非尼酮和尼达尼布体外抗肺纤维化作用 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(10): 1370-1375.
- [13] Shimbori C, Upagupta C, Bellaye P S, *et al.* Mechanical stress-induced mast cell degranulation activates TGF- β 1 signalling pathway in pulmonary fibrosis [J]. *Thorax*, 2019, 74(5): 455-465.
- [14] Angelov S N, Hu J H, Wei H, *et al.* TGF- β (transforming growth factor- β) signaling protects the thoracic and abdominal aorta from angiotensin ii-induced pathology by distinct mechanisms [J]. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(11): 2102-2113.
- [15] Vivekanandhan S, Mukhopadhyay D. Genetic status of KRAS influences transforming growth factor-beta (tgf- β) signaling: An insight into neuropilin-1 (NRP1) mediated tumorigenesis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 54(1): 72-79.
- [16] Koo H Y, El-Baz L M, House S, *et al.* Fibroblast growth factor 2 decreases bleomycin-induced pulmonary fibrosis and inhibits fibroblast collagen production and myofibroblast differentiation [J]. *J Pathol*, 2018, 246(1): 54-66.
- [17] Karsdal M A, Genovese F, Madsen E A, *et al.* Collagen and tissue turnover as a function of age: Implications for fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(1): 103-109.
- [18] Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF- κ B system [J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2016, 8(3): 227-241.
-
- (上接第 4222 页)
- [8] 薛 景, 王英爱, 贾献慧, 等. 苯乙醇苷类化合物的分类及研究进展 [J]. 药学研究, 2018, 37(5): 282-290.
- [9] 宋光西, 马玲云, 魏 锋, 等. 苯乙醇苷的分布及药理活性研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2011, 7(4): 169-171.
- [10] Ye L, Mao S, Fang S R, *et al.* Increased serum Romol was correlated with lung function, inflammation, and oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Inflammation*, 2019, 42(5): 1555-1560.
- [11] 刘 博. 小鼠巨噬细胞 TLR2、TLR4 及 RP105 在金黄色葡萄球菌感染中的天然免疫应答机制 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [12] 周 平, 罗 云, 邢 娜, 等. 肿瘤坏死因子 α 介导动脉粥样硬化发生机制的研究进展 [J]. 世界中医药, 2015, 10(8): 1163-1168.
- [13] 程海燕, 陈先国, 徐元宏. 白细胞介素 6 与自身免疫性疾病关系的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(9): 1285-1287.
- [14] 张伟洁, 郑 宏. IL-6 介导免疫炎症反应作用及其与疾病关系的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(5): 699-703.
- [15] 王筱婧, 左艳敏, 王东兴, 等. 一氧化氮介导的中药及其活性成分的抗炎作用研究进展 [J]. 免疫学杂志, 2015, 31(5): 435-440.
- [16] 赵洪伟, 车 楠, 黄 超, 等. Notch1 信号激活核因子 κ B (NF- κ B) 参与小鼠 RAW264.7 巨噬细胞炎症介质释放 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(10): 1310-1315.
- [17] 毛近隆, 李晓宇, 孙 蓉. 环氧合酶(COX-2)抑制剂提高心血管安全性的抗炎机制探讨 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(20): 4054-4059.
- [18] 李 航, 熊 璟, 周全荣. 中药调控核因子- κ B 活化的研究进展 [J]. 中医药学报, 2007, 35(2): 54-56.
- [19] Yuan R, Huang L T, Du L J, *et al.* Dihydroartemisinin exhibits an anti-inflammatory effect *in vitro* and *in vivo* through blocking TLR4 dimerization [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 142: 102-114.
- [20] 王 青, 刘正兴, 赵永明. TNF- α 干预内皮细胞后 MAPK 与 NF- κ B 之间关系的研究 [J]. 大理学院学报: 综合版, 2010(6): 22-25.