

• 药理与临床 •

溪黄草甲素对脂多糖诱导的炎症反应的作用及机制研究

孙礼芹^{1,2}, 李光霞^{1,2}, 王 瑞¹, 李医明¹, 钱 菲^{2*}, 贾 琦^{1*}

1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203

2. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203

摘要: 目的 研究溪黄草甲素对脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导的体内外炎症反应的作用及机制。方法 BALB/c 小鼠 ip LPS 建立急性炎症反应模型, 给予溪黄草甲素和地塞米松进行干预, 检测各组小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的水平。体外建立 LPS 诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型, 采用 XTT 法考察溪黄草甲素对 RAW264.7 细胞存活率的影响; 采用 Griess 法考察溪黄草甲素对 RAW264.7 细胞上清液中一氧化氮 (nitric oxide, NO) 水平的影响; 采用 ELISA 法考察溪黄草甲素对 RAW264.7 细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平的影响; 采用 Western blotting 法考察溪黄草甲素对 RAW264.7 细胞诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2)/信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路相关蛋白表达的影响。结果 溪黄草甲素显著抑制 LPS 诱导的急性炎症小鼠模型血清中 TNF- α 和 IL-6 水平 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。溪黄草甲素 ($\leq 5 \mu\text{mol/L}$) 对 RAW264.7 细胞存活率无明显影响; 溪黄草甲素显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 分泌和上清液中 TNF- α 、IL-6 水平, 以及 iNOS、磷酸化 JAK2 (p-JAK2) 和磷酸化 STAT3 (p-STAT3) 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 但对 NF- κ B 和 MAPK 信号通路相关蛋白表达无抑制作用。结论 溪黄草甲素能够抑制 LPS 诱导的体内外炎症反应, 其作用机制可能与抑制 JAK2/STAT3 信号通路有关。

关键词: 溪黄草甲素; RAW264.7 细胞; 脂多糖; 抗炎; JAK2/STAT3 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)15-4561-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.15.014

Effect and mechanism of rabdoserrin A on LPS-induced inflammatory response

SUN Li-qin^{1,2}, LI Guang-xia^{1,2}, WANG Rui¹, LI Yi-ming¹, QIAN Fei², JIA Qi¹

1. School of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: **Objective** To study the effect and mechanism of rabdoserrin A on lipopolysaccharides (LPS)-induced inflammatory response *in vivo* and *in vitro*. **Methods** BALB/c mice were ip LPS to establish an acute inflammatory response model, rabdoserrin A and dexamethasone were used for intervention, levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in serum of mice in each group were detected. LPS-induced inflammatory model of RAW264.7 cells was established *in vitro*, and XTT method was used to investigate the effect of rabdoserrin A on survival rate of RAW264.7 cells; Griess was used to investigate the effect of rabdoserrin A on nitric oxide (NO) level in supernatant of RAW264.7 cells; ELISA was used to investigate the effect of rabdoserrin A on levels of TNF- α and IL-6 in supernatant of RAW264.7 cells; Western blotting was used to investigate the effect of rabdoserrin A on expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS), Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway related protein in RAW264.7 cells. **Results**

收稿日期: 2021-02-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973458)

作者简介: 孙礼芹 (1995—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药活性成分研究。E-mail: aman1607@163.com

*通信作者: 贾 琦, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药活性成分研究。E-mail: q_jia@126.com

钱 菲, 副研究员, 主要从事中药抗炎与免疫研究。E-mail: qianfei0517@126.com

Rabdoserrin A significantly inhibited the levels of TNF- α and IL-6 in the serum of acute inflammation mice model induced by LPS ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Rabdoserrin A ($\leq 5 \mu\text{mol/L}$) had no significant effect on survival rate of RAW264.7 cells; Rabdoserrin A significantly inhibited NO secretion, levels of TNF- α and IL-6 in supernatant, expressions of iNOS, phosphorylated JAK2 (p-JAK2) and phosphorylated STAT3 (p-STAT3) in RAW264.7 cells induced by LPS ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), but had no inhibitory effect on expressions of NF- κ B and MAPK signaling pathways related protein. **Conclusion** Rabdoserrin A can inhibit the inflammatory response induced by LPS *in vivo* and *in vitro*, and its mechanism may be related to the inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway.

Key words: rabdoserrin A; RAW264.7 cells; lipopolysaccharides; anti-inflammation; JAK2/STAT3 signaling pathway

炎性反应是机体应对病原体、感染或组织损伤的保护性反应,但失控的炎性反应会对机体造成损伤^[1],因此控制体内炎性反应的动态平衡至关重要。巨噬细胞及其释放的炎性介质在炎性反应的发生过程中扮演着重要的角色^[2]。除具有吞噬功能外,巨噬细胞还可以在脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)等刺激物的诱导下被激活,从而诱导合成并释放大量肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、一氧化氮(nitric oxide, NO)等炎性介质,进而引起炎性反应^[3-5]。因此,抑制巨噬细胞的过度活化对抑制炎性反应具有重要意义。溪黄草 *Rabdosia serra* (Maxim.) Hara 为唇形科香茶菜属植物,别名熊胆草、风血草、黄汁草等,具有清热利湿、退黄、凉血散瘀的功效^[6-7]。现代药理学研究表明,溪黄草具有抗炎、抗肿瘤、抑菌、增强免疫及保肝利胆等作用。溪黄草甲素是溪黄草中重要的二萜类成分之一,目前仅发现其对宫颈癌细胞 HeLa 的增殖具有显著的抑制作用^[8],但对其抗炎作用方面的研究鲜有报道。本研究采用 LPS 诱导小鼠建立急性炎性反应模型,并诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞建立体外炎性细胞模型,探究溪黄草甲素的抗炎作用及机制,为临床抗炎药物的开发提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 45 只,6 周龄,体重 20~22 g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(浙)2020-0002。动物饲养于上海中医药大学动物实验楼,温度 20~26 °C、相对湿度 40%~60%,光照明暗交替各 12 h,自由进食饮水。动物实验经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 PZSHUTCM200904008)。

1.2 细胞

RAW264.7 细胞为本课题组保存。

1.3 药品与试剂

溪黄草甲素(质量分数 $\geq 98\%$)为本课题组自

制;DMEM 高糖培养基(批号 8120449)购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(批号 17M483)、LPS(批号 078M4039V)、二甲基亚砜(DMSO,批号 RNBH5492)购自美国 Sigma 公司;XTT 试剂盒(批号 32141000)购自德国 Roche 公司;TNF- α ELISA 试剂盒(批号 227846-005)、IL-6 ELISA 试剂盒(批号 234277-003)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;蛋白酶抑制剂(批号 410064)、磷酸酶抑制剂(批号 510033)购自美国 Selleck 公司;RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 PMSF、细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂(批号 020617170522)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号 080919190917)购自上海碧云天生物技术有限公司;诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抗体、c-Jun 氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)抗体、磷酸化 JNK(p-JNK)抗体、细胞外调节蛋白激酶 1/2(extracellular regulated protein kinase 1/2, ERK1/2)抗体、p-ERK1/2 抗体、p38 抗体、p-p38 抗体、p65 抗体、Janus 酪氨酸蛋白激酶 2(Janus kinase 2, JAK2)抗体、p-JAK2 抗体、信号转导子与转录激活子蛋白 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)抗体、p-STAT3 抗体、核因子- κ B 抑制蛋白 α (inhibitor nuclear factor- κ B α , I κ B α)抗体、p-I κ B α 抗体购自美国 CST 公司;小鼠源重组 IL-6、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 DJ18)、Histone H3 抗体(批号 A25J)、HRP 标记的山羊抗兔 IgE 抗体(批号 AS007)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgE 抗体(批号 AS006)购自爱必信生物科技有限公司;ECL 发光液(批号 1916102)购自美国 Millipore 公司。

1.4 仪器

HEPA CLASS 100 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);超净工作台(美国 Labconco 公司);YC-1 型层析实验冷柜(北京德天佑科技发展有限公司);5424R 型高速冷冻离心机

(德国 Eppendorf 公司); 全波长酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); 042BR 型蛋白质电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司); VE-186 系列转移电泳槽 (上海天能科技有限公司); 5200 系列全自动凝胶图像分析系统 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组及溪黄草甲素低、高剂量 (50、100 mg/kg) [9-10] 组和地塞米松 (5 mg/kg) 组, 每组 9 只。以 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 作为助溶剂并进行研磨, 将溪黄草甲素配制成质量浓度为 2.5、5.0 mg/mL 的混悬液, 将地塞米松配制成质量浓度为 0.25 mg/mL 的混悬液。各给药组 ig 相应药物 (20 mL/kg), 对照组和模型组 ig 0.5% CMC-Na, 1 次/d, 连续 2 d。LPS 溶于 0.9% 氯化钠溶液配制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液, 末次给药 1 h 后, 模型组和各给药组 ip LPS (10 mL/kg) 刺激 6 h 建立急性炎性小鼠模型, 对照组 ip 等体积 0.9% 氯化钠溶液。

2.2 溪黄草甲素对 LPS 诱导的急性炎性小鼠模型血清中 TNF- α 和 IL-6 水平的影响

各组小鼠眼眶取血后, ip 戊巴比妥钠处死, 分离并得到血清, 按 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 TNF- α 和 IL-6 水平。

2.3 细胞培养

RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 当细胞融合度达到 50% 时, 采用一次性细胞刮刀进行脱壁并传代, 待细胞透明、边界清晰后进行实验。

2.4 溪黄草甲素对 RAW264.7 细胞存活率的影响

RAW264.7 细胞以 2.5×10^5 /mL 接种于 96 孔板中, 于培养箱中培养。设置对照组、溪黄草甲素 (0.312 5、0.625 0、1.250 0、2.500 0、5.000 0 μ mol/L) 组, 溪黄草甲素溶于 DMSO, 配制成 25 mmol/L 的母液, 使用时以培养基稀释至相应浓度。各给药组加入相应药物, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h; 每孔加入 50 μ L XTT, 培养 4 h, 振荡 30 s, 采用酶标仪测定 492、690 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

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

2.5 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液中 NO 水平的影响

RAW264.7 细胞以 5×10^5 /mL 接种于 96 孔板

中, 于培养箱中培养。设置对照组、模型组、溪黄草甲素 (0.312 5、0.625 0、1.250 0、2.500 0、5.000 0 μ mol/L) 组。各给药组加入溪黄草甲素预处理 30 min, 模型组和各给药组再加入 LPS (0.5 μ g/mL) 刺激 24 h, 对照组加入不含药物的培养基。采用 Griess 法检测细胞上清液中 NO 水平。

2.6 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 iNOS 蛋白表达的影响

RAW264.7 细胞以 5×10^5 /mL 接种于 100 mm 细胞培养皿中, 于培养箱中培养。设置对照组、模型组、溪黄草甲素 (1.25、2.50、5.00 μ mol/L) 组。按“2.5”项下方法进行处理, 收集细胞, 加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度, 于 95 °C 水浴加热 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 分别加入 iNOS、GAPDH 抗体, 4 °C 孵育过夜; TBST 洗涤 5 次, 5 min/次, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgE 抗体, 室温孵育 1 h, TBST 洗涤后, 加入 ECL 发光液显影, 采用 Image J 分析条带灰度值。

2.7 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平的影响

RAW264.7 细胞以 5×10^5 /mL 接种于 96 孔板中, 于培养箱中培养。按“2.6”项下方法进行分组和处理, 收集细胞上清液, 按试剂盒说明书测定细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平。

2.8 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响

RAW264.7 细胞以 5×10^5 /mL 接种于 100 mm 细胞培养皿中, 于培养箱中培养。按“2.6”项下方法进行分组, 各给药组加入溪黄草甲素预处理 30 min, 模型组和各给药组再加入 LPS (0.5 μ g/mL) 刺激 4 h, 对照组加入不含药物的培养基。收集细胞, 按“2.6”项下方法检测细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达情况。

2.9 溪黄草甲素对 IL-6 诱导的 RAW264.7 细胞 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响

RAW264.7 细胞以 5×10^5 /mL 接种于 100 mm 细胞培养皿中, 于培养箱中培养。按“2.6”项下方法进行分组, 各给药组加入溪黄草甲素预处理 30 min, 模型组和各给药组再加入 IL-6 (3 ng/mL) 刺激 30 min, 对照组加入不含药物的培养基。收集细胞

胞,按“2.6”项下方法检测细胞 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达情况。

2.10 溪黄草甲素对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞不同时间后的上清液中 IL-6 水平的影响

RAW264.7 细胞以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 96 孔板中,于培养箱中培养。设置模型组和溪黄草甲素 ($5 \mu\text{mol/L}$) 组,给药组加入溪黄草甲素预处理 30 min,模型组和给药组再加入 LPS ($0.5 \mu\text{g/mL}$) 分别刺激 1、2、3、4、6、8、12、16、24 h,收集细胞上清液,按 ELISA 试剂盒说明书测定各时间点细胞上清液中 IL-6 水平。

2.11 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NF- κ B 与 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响

RAW264.7 细胞以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 100 mm 细胞培养皿中,于培养箱中培养。按“2.6”项下方法进行分组,各给药组加入溪黄草甲素预处理 30 min,模型组和各给药组再加入 LPS ($0.5 \mu\text{g/mL}$) 刺激 30 min,对照组加入不含药物的培养基。收集

细胞,加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,或采用细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂提取细胞核与胞质蛋白,按“2.6”项下方法检测细胞 p-I κ B α 、p65、p-JNK、p-ERK1/2、p-p38 蛋白表达情况。

2.12 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计,采用单因素方差分析和 t 检验进行差异比较。

3 结果

3.1 溪黄草甲素对 LPS 诱导的急性炎症小鼠模型血清中 TNF- α 和 IL-6 水平的影响

如图 1 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,各给药组血清中 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001),溪黄草甲素 (100 mg/kg) 组和地塞米松组血清中 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001),表明溪黄草甲素对 LPS 诱导的小鼠急性炎症反应具有抑制作用。

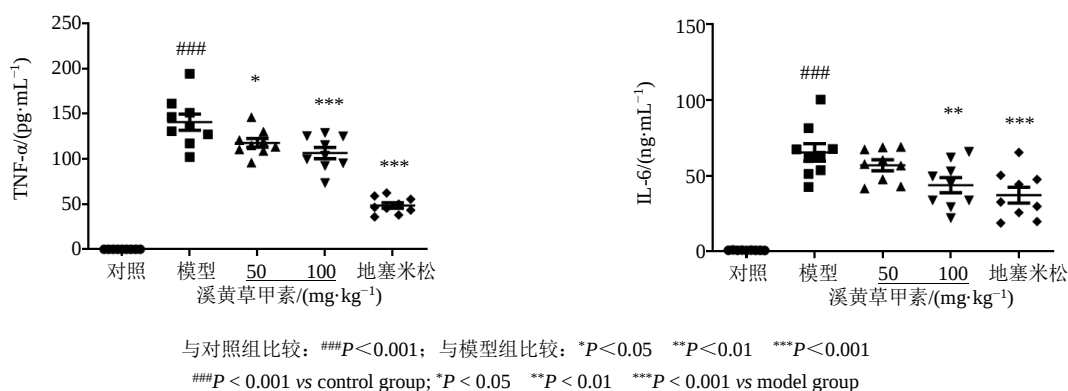


图 1 溪黄草甲素对 LPS 诱导的急性炎症小鼠模型血清中 TNF- α 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Fig. 1 Effect of rabdoserrin A on TNF- α and IL-6 levels in serum of acute inflammation mice model induced by LPS ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

3.2 溪黄草甲素对 RAW264.7 细胞存活率的影响

如图 2 所示,与对照组比较,各剂量溪黄草甲素对 RAW264.7 细胞存活率均无显著影响。

3.3 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液中 NO 水平的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组细胞上清液中 NO 水平显著升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,溪黄草甲素 (0.625 、 1.250 、 2.500 、 5.000 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞上清液中 NO 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001),呈剂量相关性,其半数抑制浓度 (50% concentration of inhibition, IC_{50}) 值为 $2.68 \mu\text{mol/L}$ 。

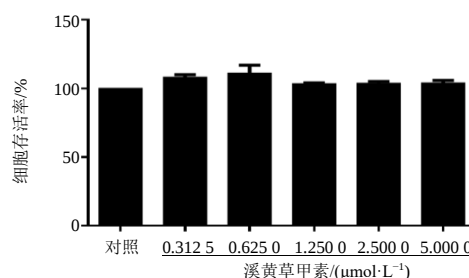
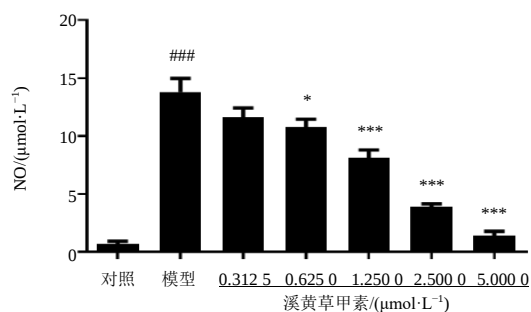


图 2 溪黄草甲素对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effect of rabdoserrin A on survival rate of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

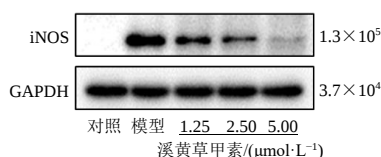


与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as belows

图3 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液中 NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of rabdoserrin A on NO level in supernatant of RAW264.7 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



因此, 选取 1.25、2.50、5.00 $\mu\text{mol/L}$ 3 个浓度展开后续实验。

3.4 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 iNOS 蛋白表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 iNOS 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 溪黄草甲素 (2.50、5.00 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞 iNOS 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.5 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各剂量溪黄草甲素组上清液中 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.001$), 溪黄草甲素 (2.50、5.00 $\mu\text{mol/L}$) 组上清液中 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、

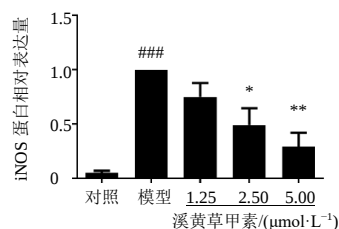


图4 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 iNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of rabdoserrin A on iNOS expression of RAW264.7 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

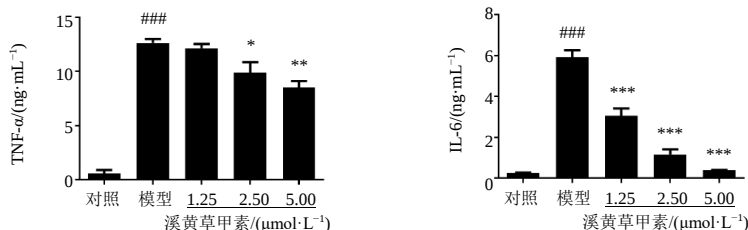


图5 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of rabdoserrin A on TNF- α and IL-6 levels of RAW264.7 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

0.01), 且呈剂量相关性, 表明溪黄草甲素能够抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的炎症反应。

3.6 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001); 与模型组比较, 各剂量溪黄草甲素组 p-STAT3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 溪黄草甲素 (2.50、5.00 $\mu\text{mol/L}$) 组 p-JAK2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 且呈剂

量相关性。

3.7 溪黄草甲素对 IL-6 诱导的 RAW264.7 细胞 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响

JAK2/STAT3 的激活可以促进 IL-6 的产生, IL-6 能够与胞膜上的受体结合, 进一步激活 JAK2/STAT3 信号通路。如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组 p-STAT3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 溪黄草甲素 (2.50、5.00 $\mu\text{mol/L}$) 组 p-STAT3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$), 且呈剂量相关性。

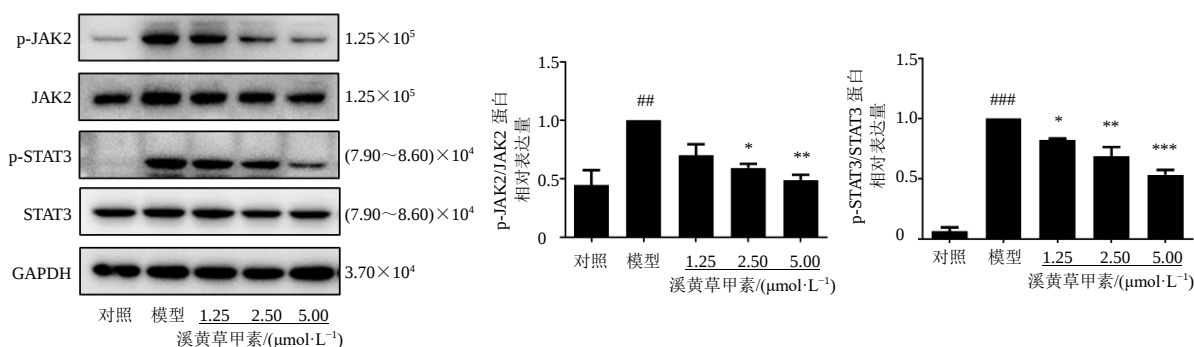


图 6 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of rabsdoserrin A on expressions of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 of RAW264.7 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

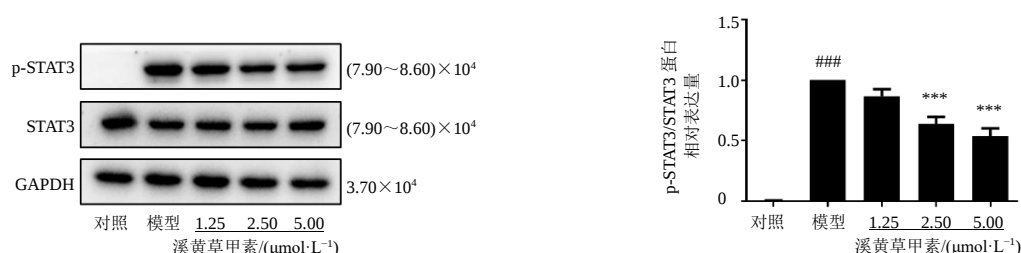


图 7 溪黄草甲素对 IL-6 诱导的 RAW264.7 细胞 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of rabsdoserrin A on expressions of STAT3 and p-STAT3 of RAW264.7 cells induced by IL-6 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.8 溪黄草甲素对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞不同时间后的上清液中 IL-6 水平的影响

如图 8 所示, LPS 诱导 RAW264.7 细胞 4 h 时, IL-6 未显著释放, 而溪黄草甲素已经能够显著抑制 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达水平, 表明 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 4 h, 溪黄草甲素对 JAK2/STAT3 的下调与 IL-6 分泌无关。

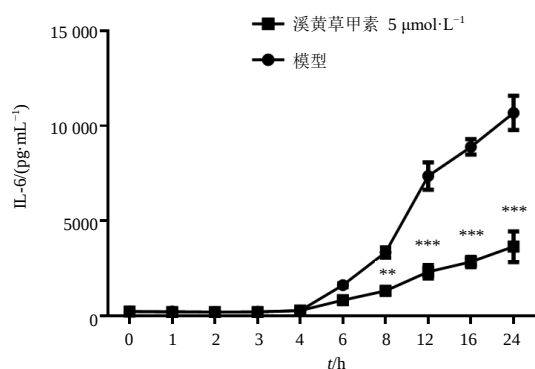


图 8 溪黄草甲素对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞不同时间后的上清液中 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effect of rabsdoserrin A on IL-6 level of RAW264.7 cells induced by LPS for different time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.9 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NF-κB 与 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 9、10 所示, LPS 诱导 RAW264.7 细胞 30 min 时, 与对照组比较, 模型组 p-IκBα、胞核 p65、p-JNK、p-ERK1/2、p-p38 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 各给药组对 NF-κB 与 MAPK 信号通路相关蛋白表达水平无明显影响。

4 讨论

巨噬细胞在炎症反应的发展中发挥着重要的作用^[11]。LPS 可以促使巨噬细胞分泌 NO、TNF-α、IL-6 等多种促炎介质, 引起炎症反应的发生与发展^[12]。本研究结果显示, 0.312 5、0.625 0、1.250 0、2.500 0、5.000 0 μmol/L 溪黄草甲素对 RAW264.7 细胞的活力无明显抑制作用, 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液中 NO 水平的 IC₅₀ 值为 2.68 μmol/L。因此, 后续选择 1.25、2.50、5.00 μmol/L 进行研究。溪黄草甲素显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO 合成关键酶 (iNOS)^[13] 蛋白表达水平。TNF-α 和 IL-6 是 2 种重要的促炎细胞因子, LPS 可以诱导其大量分泌, 而溪黄草甲素可以显著抑制二者的产生, 在 LPS 诱导的急性炎性小鼠

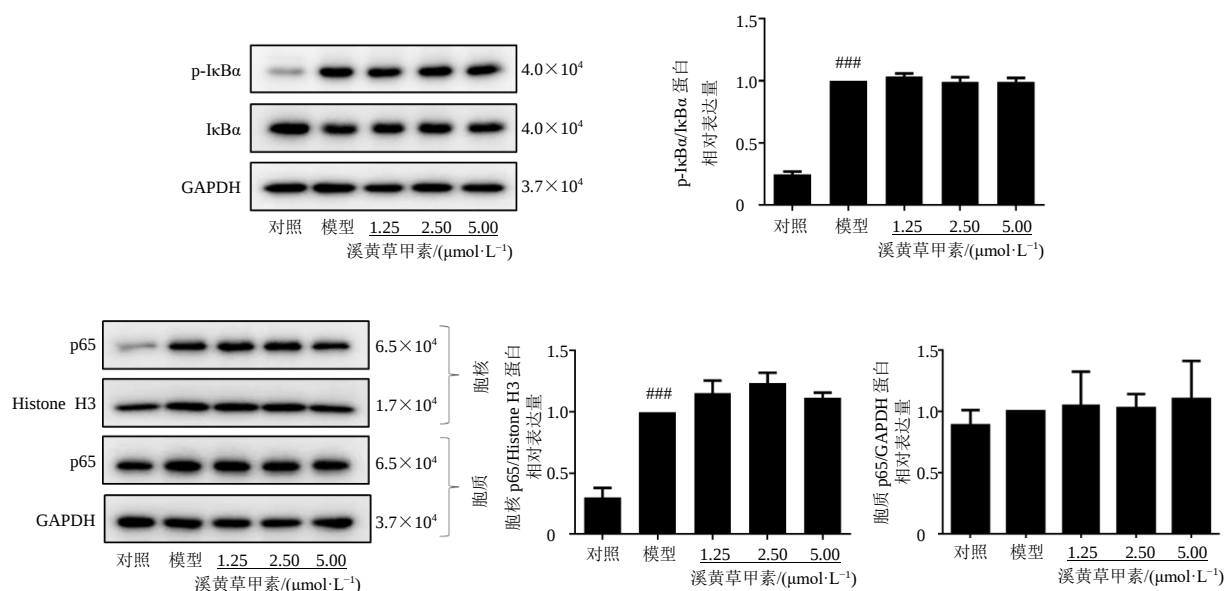


图 9 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effect of radoserrin A on NF-κB signaling pathway related protein expressions of RAW264.7 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

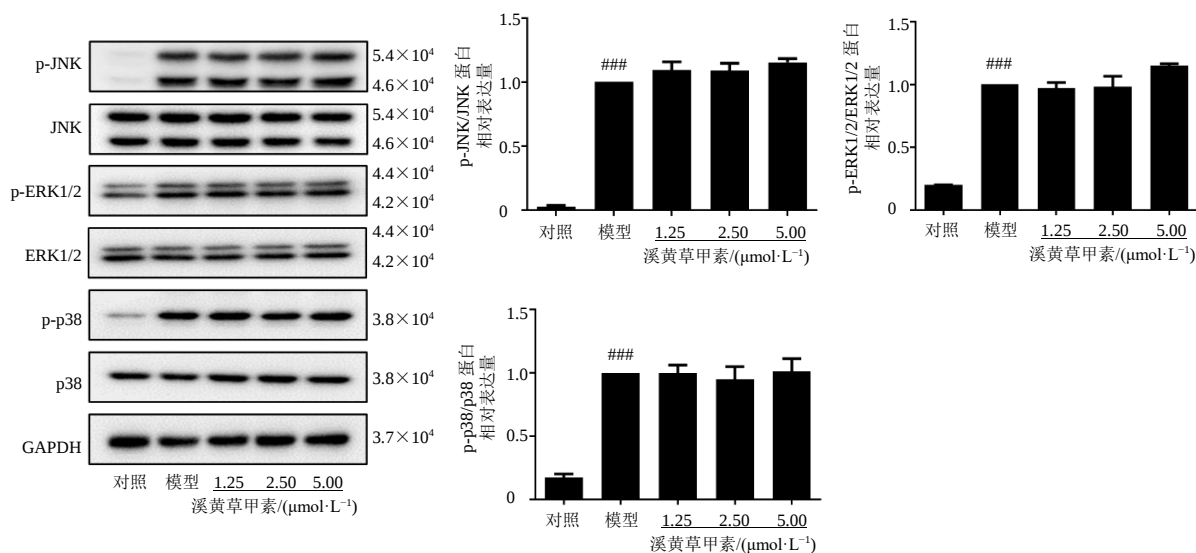


图 10 溪黄草甲素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Effect of radoserrin A on MAPK signaling pathway related protein expressions of RAW264.7 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

体内，溪黄草甲素也具有同样的抑制作用。以上结果表明溪黄草甲素具有良好的抗炎作用，提示溪黄草甲素是溪黄草发挥抗炎作用的物质基础之一。

STAT3 是一种关键调节因子，在炎症反应中发挥着重要的作用^[14]。JAK2/STAT3 信号的激活由 IL-6 识别细胞膜表面受体并与之结合，诱导 gp130

形成同源二聚体，进一步激活 JAK，激活后的 JAK 会使 gp130 胞内结构域上的酪氨酸残基磷酸化，从而招募 STAT3，这种激酶级联使 STAT3 磷酸化后形成二聚体并转移到细胞核，进而调控炎症细胞因子的表达，促进 IL-6 等炎症因子分泌至胞外^[15]。溪黄草甲素显著抑制 RAW264.7 细胞 p-JAK2、p-STAT3

蛋白表达水平,表明溪黄草甲素可能通过 JAK2/STAT3 途径发挥抗炎作用。IL-6 可以介导 JAK2/STAT3 的激活^[16-17],本研究采用 IL-6 作为刺激剂对 RAW264.7 细胞进行诱导,发现溪黄草甲素显著抑制 IL-6 诱导的 RAW264.7 细胞中 p-STAT3 蛋白表达水平。STAT3 的磷酸化可以调控 LPS 诱导的巨噬细胞中 IL-6 的产生^[18],而 IL-6 又可以通过 gp130/JAK/STAT 途径调节 p-STAT3 蛋白表达^[17]。为了确定溪黄草甲素对 p-STAT3 蛋白表达与 IL-6 分泌抑制作用的先后关系,本研究通过检测 LPS 刺激 RAW264.7 细胞不同时间的 IL-6 分泌,发现 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 4 h 时,IL-6 还未显著释放,但此时溪黄草甲素已经显著抑制 p-STAT3 蛋白表达水平,表明溪黄草甲素通过抑制 JAK2/STAT3/IL-6 信号通路,从而发挥抗炎作用。

综上所述,本研究发现溪黄草甲素能够抑制 LPS 诱导的体内外炎性反应,其作用机制与抑制 JAK2/STAT3 信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Nagata M. Inflammatory cells and oxygen radicals [J]. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005, 4(4): 503-504.
- [2] de Las Casas-Engel M, Corbí A L. Serotonin modulation of macrophage polarization: Inflammation and beyond [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 824: 89-115.
- [3] Shapiro H, Lutaty A, Ariel A. Macrophages, meta-inflammation, and immuno-metabolism [J]. *Sci World J*, 2011, 11: 2509-2529.
- [4] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3): 787-795.
- [5] Murray P J, Wynn T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11): 723-737.
- [6] 全国中草药汇编组. 全国中草药汇编 (上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 860-861.
- [7] 江苏新医学院. 中药大辞典 (下册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 5641-5642.
- [8] 金人玲, 程培元, 徐光漪. 溪黄草甲素的结构研究 [J]. *药学报*, 1985, 20(5): 366-371.
- [9] Yang H H, Lv H, Li H J, et al. Oridonin protects LPS-induced acute lung injury by modulating Nrf2-mediated oxidative stress and Nrf2-independent NLRP3 and NF- κ B pathways [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 62.
- [10] Zhao G, Zhang T, Ma X F, et al. Oridonin attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells and acute lung injury [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 68153-68164.
- [11] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6425-6440.
- [12] Rossol M, Heine H, Meusch U, et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages [J]. *Crit Rev Immunol*, 2011, 31(5): 379-446.
- [13] Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(11): 2357-2363.
- [14] Hillmer E J, Zhang H, Li H S, et al. STAT3 signaling in immunity [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 31: 1-15.
- [15] Moresi V, Adamo S, Berghella L. The JAK/STAT pathway in skeletal muscle pathophysiology [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 500.
- [16] Lokau J, Schoeder V, Haybaeck J, et al. Jak-stat signaling induced by interleukin-6 family cytokines in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancers*, 2019, 11(11): E1704.
- [17] Lokau J, Garbers C. Activating mutations of the gp130/JAK/STAT pathway in human diseases [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2019, 116: 283-309.
- [18] Samavati L, Rastogi R, Du W J, et al. STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(8/9): 1867-1877.

[责任编辑 李亚楠]