

nases contribute to insulin insufficiency in Zucker diabetic fatty rats[J]. *Diabetes*, 2005, 54(9): 2612-2619.

[11] 李成梅, 肖纫秋, 吴家祥, 等. 正常及糖尿病大鼠胰岛微循环三维构形的形态学[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2002, 18(5): 398.

[12] Hayden M R. Islet amyloid and fibrosis in the cardiometabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus[J]. *J Cardiometab Syndr*, 2007, 2(1): 70-75.

[13] 徐 倍, 吴国亭, 韩玉麒, 等. 2 型糖尿病 GK 大鼠病程进展与组织形态学改变[J]. 同济大学学报 (医学版), 2007, 28(5): 17-21, 25.

[14] 顾 迁, 高 鑫, 徐 平, 等. GK 糖尿病大鼠生物学特性观察[J]. 中国比较医学杂志. 2007, 17(12): 688-692.

[15] 张 莉, 朱德发, 李 艳, 等. 2 型糖尿病血管并发症与胰岛素抵抗及血脂异常的关系[J]. 安徽医科大学学报, 2004, 39(4): 290-291.

温通活血乳膏对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 TNF- α 、IL-6、NF- κ B 表达的影响

马 丽¹, 冯程程¹, 徐利娟², 郭诗韵², 康小龙¹, 王 晶¹, 白生宾^{3*}
(1. 新疆维吾尔自治区中医医院, 新疆 乌鲁木齐 830061; 2. 新疆医科大学研究生院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆医科大学基础医学院组胚教研室, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: **目的** 观察温通活血乳膏对脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 TNF- α 、IL-6、NF- κ B 表达的影响。**方法** 将 RAW264.7 细胞随机分为正常对照组、LPS 组、空白对照组、温通活血乳膏浓缩液高、中、低剂量组 (250、50、10 μ g/mL)。样品与细胞共同孵育 24 h 后, 进行相关检测。**结果** 不同剂量温通活血乳膏对细胞生长均无抑制作用, 细胞活力正常。与 LPS 组比较, 温通活血乳膏组能显著抑制 NO、ROS 产生及 TNF- α 、IL-6 水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并均呈量效关系; 也能显著抑制 LDH 释放 ($P < 0.05$), 但量效关系不明显。RAW264.7 细胞经 LPS 刺激后, p65、p-p65、IKK、p-IKK 细胞核区可见明显的绿色荧光表达, 与细胞核蓝色叠加, 其核内荧光强度显著高于正常对照组 ($P < 0.01$); 经温通活血乳膏干预后, p65 蛋白荧光强度显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** 温通活血乳膏能有效抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞释放炎症因子, 具有一定抗炎作用, 其机制可能与抑制 p65 蛋白核转位有关。

关键词: 温通活血乳膏; RAW264.7 巨噬细胞; LPS; TNF- α ; IL-6; NF- κ B

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2018)09-2058-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.037

糖尿病周围神经病变是糖尿病最常见的慢性并发症之一, 统计学分析表明, 初诊 2 型糖尿病患者中有糖尿病周围神经病变的约占 34.6%^[1], 其临床表现为对称性疼痛、感觉异常、间歇性或持续性发作, 是导致足部溃疡、感染、坏疽的主要危险因素。炎症学说认为, 糖尿病周围神经病变是细胞因子介导的炎症反应, 炎症在其发展过程中起着媒介作用。温通活血乳膏功效温经通络、活血散瘀、消肿止痛, 主要用于治疗消渴病引发痹症 (即糖尿病周围神经病变), 具有较好的抗炎、消肿、镇痛、改善微循环作用^[2], 临床应用 10 余年, 能明显缓解糖尿病周围神经病变导致的痛觉过敏现象。为了探讨温通活血乳膏对炎症因子的影响, 本实验观察了该方对 RAW264.7 巨噬细胞的体外抗炎作用。

1 材料

1.1 细胞系 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW264.7), 购自美国模式培养物集存库。

1.2 药物 温通活血乳膏浓缩液为自制, 每 1 mL 相当于 1 g 生药, 批号 20141026, 冷藏保存。

1.3 试剂 细胞活力试剂盒 (MTS) (批号 0000125533)、乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒 (批号 0000129806)、Griess 试剂盒 (批号 0000131725) (美国 Promega 公司); 双抗 (美国 Hyclone 公司, 批号 J140027); 脂多糖 (LPS) (美国 Biosharp 公司, 批号 L-2880); 小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号 E09479-1647)、小鼠白介素-6 (IL-6) ELISA 试剂盒 (批号 E09362-1655) (美国 eBioscience 公司); Hoechst 33342 (美国 Sigma 公司, 批号

收稿日期: 2017-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81360529)

作者简介: 马 丽 (1974—), 女, 博士, 从事内分泌相关疾病研究。Tel: 13699983028, E-mail: lvgangxj@163.com

* 通信作者: 白生宾 (1973—), 男, 副教授。Tel: 15199131718, E-mail: bsbxx@126.com

B8040); p-NF-κB p65 (批号 0014)、IκB 激酶 (IKK-α) (批号 0005)、p-IKK-α/β (批号 0016) (美国 Cell Signaling Technology 公司); 荧光二抗 (美国 Invitrogen 公司, 批号 8214084)。

1.4 仪器 BPN-CH 型 CO₂ 培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); DSY2000X 型倒置荧光显微镜 (重庆澳浦光电技术有限公司); TDZ5-WS 型多管架自动平衡离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司); SpectraMax M2 多功能酶标仪 (美国美谷分子仪器有限公司); TCS SP8 型激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 细胞处理 RAW264.7 细胞于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度环境下培养于含 10% 胎牛血清的 1 640 培养基中, 取对数生长期细胞悬液接种于 96 孔培养板内, 孵育 18 ~ 24 h 后进行实验。

2.2 细胞分组及加药 将 RAW264.7 细胞随机分为正常对照组 [以含 10% 胎牛血清的 1640 培养基继续培养, 终体积补充至 200 μL (补充液与样品溶液相同)]、LPS 组 [加 10 μL LPS, 终体积补充至 200 μL (补充液与样品溶液相同)]、空白对照组 (加无细胞的培养基 200 μL)、温通活血乳膏组 (每孔加入药物浓缩液、LPS 各 10 μL, 终体积补充至 200 μL, 浓缩液质量浓度分别为 250、50、10 μg/mL), 样品与细胞共同孵育 24 h 后进行相关检测。

2.3 细胞活性检测 孵育 24 h 后, 每孔加入 10 μL MTS 混合液, 继续培养 4 h 后显色, 于 490 nm 波长处检测吸光度 (A), 计算细胞存活率, 公式为存活率 = $\left[\frac{(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})} \right] \times 100\%$ 。

2.4 一氧化氮 (NO) 测定 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 调节细胞密度为 6×10^5 /mL, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔平底细胞培养板中培养 24 h, 待其贴壁后弃去上清液, 按“2.2”项下方法处理, 孵育 24 h, 于 540 nm 波长处检测吸光度, Griess 试剂盒测定 NO 含量。

2.5 LDH 测定 以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板中, 按“2.2”项下方法处理, 培养 24 h。取细胞培养液 120 μL, 加入 60 μL LDH 检测液, 室温下避光孵育 30 min, 于 560 nm 波长处检测所生成甲瓞的吸光度; 在相同条件下, 检测 LDH 对照品 0、10、25、40、100、200、400 μg/L 偶联催化底物所生成甲瓞的吸光度, 标准曲线法计算 LDH 含量。

2.6 TNF-α 测定 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 调节细胞密度为 6×10^5 /mL, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔平底细胞培养板中培养 24 h, 待其贴壁后弃去上清液, 按“2.2”项下方法处理, 孵育 24 h 后, 于 450 nm 波长处检测吸光度, ELISA 试剂盒测定 TNF-α 含量。

2.7 IL-6 测定 按“2.2”项下方法处理, 孵育 24 h 后, 于 450 nm 波长处检测吸光度。

2.8 ROS 测定 孵育 24 h 后, 加入 DCFH-DA 试剂 (终浓度 10 μmol/L), 37 ℃下避光负载 40 min, 于 488 nm 激发

波长、525 nm 发射波长处检测各孔 CDF 荧光强度。

2.9 荧光强度测定 RAW264.7 细胞于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度环境下培养于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中, 取对数生长期的细胞悬液, 接种于激光共聚焦培养皿中, 孵育 18 ~ 24 h 后进行实验。将 RAW264.7 细胞随机为正常对照组 [以含 10% 胎牛血清的 1640 培养基继续培养, 终体积补充至 2 mL (补充液与样品溶液相同)]、LPS 组 [加 100 μL LPS, 终体积补充至 2 mL (补充液与样品溶液相同)]、空白对照组 (加无细胞的培养基 2 mL)、温通活血乳膏组 (每孔加入浓缩液 100、LPS 各 100 μL, 终体积补充至 2 mL, 浓缩液质量浓度分别为 250、50、10 μg/mL), 样品与细胞共同孵育 4 h 后加一抗, 4 ℃下孵育过夜, 再加入荧光二抗, Hoechst 33342 进行免疫荧光检测, Image Pro Plus 软件分析图片, 计算平均荧光强度。

2.10 统计学分析 所有数据均通过 SPSS 22.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 多组比较采用方差分析, 组间比较采用 *q* 检验; 非正态计量资料采用非参数检验 (检验水准 α = 0.05)。

3 结果

3.1 对细胞活力的影响 不同剂量温通活血乳膏对细胞生长均无抑制作用, 细胞活力均正常, 存活率趋近于 100%。见表 1。

表 1 对细胞活力、NO 产生的影响 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	剂量/ (μg·mL ⁻¹)	细胞存活率/ %	NO/ (μmol·L ⁻¹)
正常对照组	—	100.0 ± 0.0	2.38 ± 0.35
LPS 组	—	100.0 ± 9.3	7.51 ± 0.61 **
温通活血乳膏组	250	100.0 ± 1.1	2.86 ± 0.21 ▲▲
温通活血乳膏组	50	100.0 ± 2.0	4.28 ± 0.05 ▲▲
温通活血乳膏组	10	100.0 ± 3.7	6.07 ± 0.26 ▲

注: 与正常对照组比较, ** *P* < 0.01; 与 LPS 组比较, ▲ *P* < 0.05, ▲▲ *P* < 0.01

3.2 对 NO 产生的影响 与 LPS 组比较, 温通活血乳膏组能显著抑制 NO 产生 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), 并呈量效关系。见表 1。

3.3 对 TNF-α、IL-6、LDH、ROS 的影响 与 LPS 组比较, 温通活血乳膏组能显著抑制 TNF-α、IL-6 水平和 ROS 产生 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), 并呈量效关系; 也能显著抑制 LDH 释放 (*P* < 0.05), 但量效关系不明显。见表 2。

3.4 对蛋白荧光表达的影响 RAW264.7 细胞经 LPS 刺激后, p65、p-p65、IKK、p-IKK 细胞核区可见明显的绿色荧光表达, 与细胞核蓝色叠加, 其核内荧光强度显著高于正常对照组 (*P* < 0.01); 与 LPS 组比较, p65 蛋白荧光强度显著降低 (*P* < 0.01)。见表 3、图 1 ~ 4。

4 讨论与结论

炎症反应是一种重要的机体防御过程, 涉及机体活动的多个环节, 其中免疫细胞激活是炎症反应的启动环节。巨噬细胞是炎症反应的重要效应细胞, RAW264.7 细胞为其中一种, 在 LPS 等外界因素刺激后能产生炎症介质, 被广泛应用于相关研究中^[3]。LPS 作为炎症强激活剂, 可激

表 2 对 TNF-α、IL-6、LDH、ROS 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	TNF- α / $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	IL-6/ $(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$	LDH	ROS
正常对照组	—	112.78 $\pm$ 17.74	21.75 $\pm$ 3.17	3 574.34 $\pm$ 564.89	55.88 $\pm$ 0.74
LPS 组	—	1 900.27 $\pm$ 34.70 **	74.60 $\pm$ 1.67 **	4 096.04 $\pm$ 130.38	179.24 $\pm$ 4.81 **
温通活血乳膏组	250	833.97 $\pm$ 65.11 ▲▲	38.67 $\pm$ 2.79 ▲▲	3 737.80 $\pm$ 110.62 ▲	129.18 $\pm$ 7.02 ▲
温通活血乳膏组	50	1 426.20 $\pm$ 85.78 ▲	51.25 $\pm$ 8.69 ▲	3 834.18 $\pm$ 91.28 ▲	137.38 $\pm$ 8.42 ▲
温通活血乳膏组	10	1 725.54 $\pm$ 76.68	66.39 $\pm$ 4.31	3 744.93 $\pm$ 123.85 ▲	157.76 $\pm$ 20.28

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与 LPS 组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$

表 3 对蛋白荧光表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	p65	p-p65	IKK	p-IKK
正常对照组	—	51.665 $\pm$ 6.124	50.421 $\pm$ 9.106	42.277 $\pm$ 7.814	53.169 $\pm$ 5.685
LPS 组	—	75.778 $\pm$ 5.136 **	68.013 $\pm$ 5.384 **	67.685 $\pm$ 7.636 **	64.495 $\pm$ 3.268 **
温通活血乳膏组	250	42.016 $\pm$ 6.783 ▲▲	69.456 $\pm$ 6.206	62.922 $\pm$ 6.157	59.251 $\pm$ 3.698
温通活血乳膏组	50	41.512 $\pm$ 2.548 ▲▲	65.019 $\pm$ 3.575	72.821 $\pm$ 5.596	64.507 $\pm$ 7.567
温通活血乳膏组	10	49.055 $\pm$ 3.437 ▲▲	68.541 $\pm$ 4.869	65.834 $\pm$ 9.626	60.967 $\pm$ 5.096

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与 LPS 组比较,▲▲ $P<0.01$

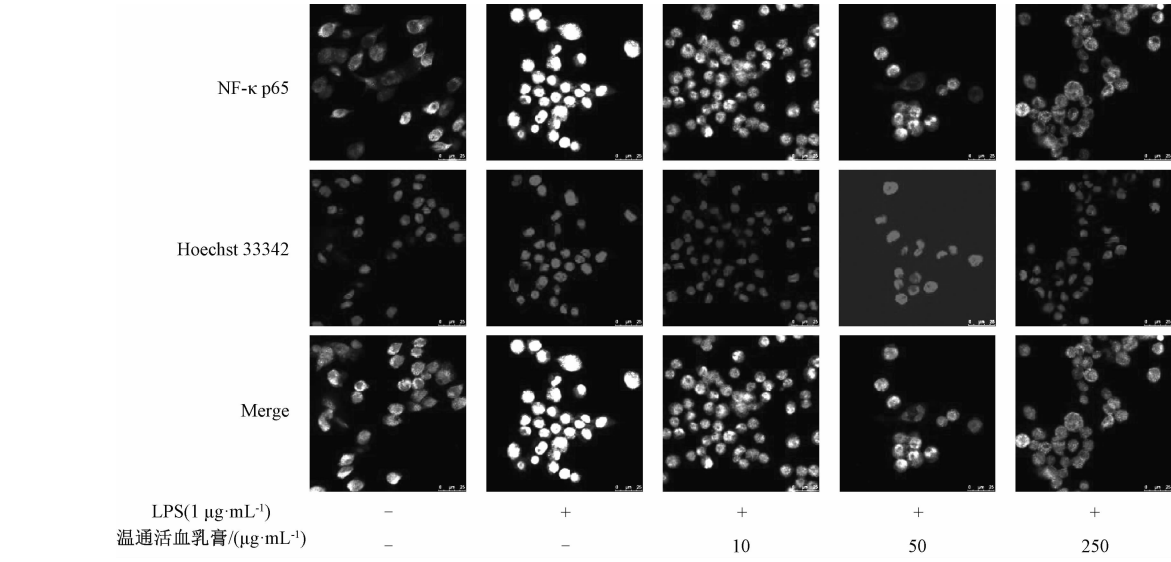


图 1 NF-κ p65 蛋白荧光表达

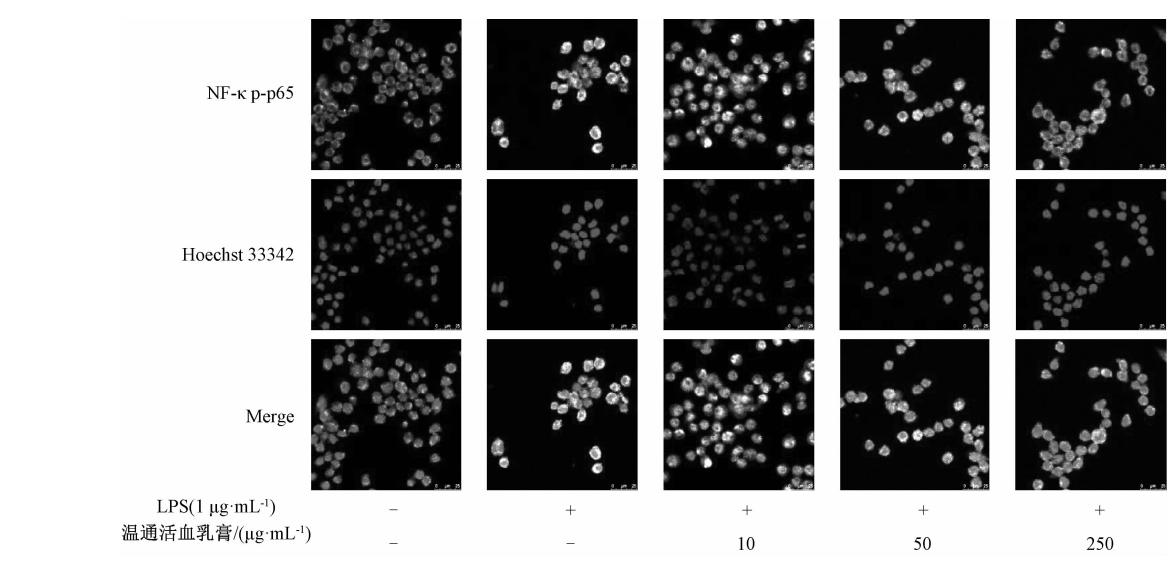


图 2 NF-κ p-p65 蛋白荧光表达

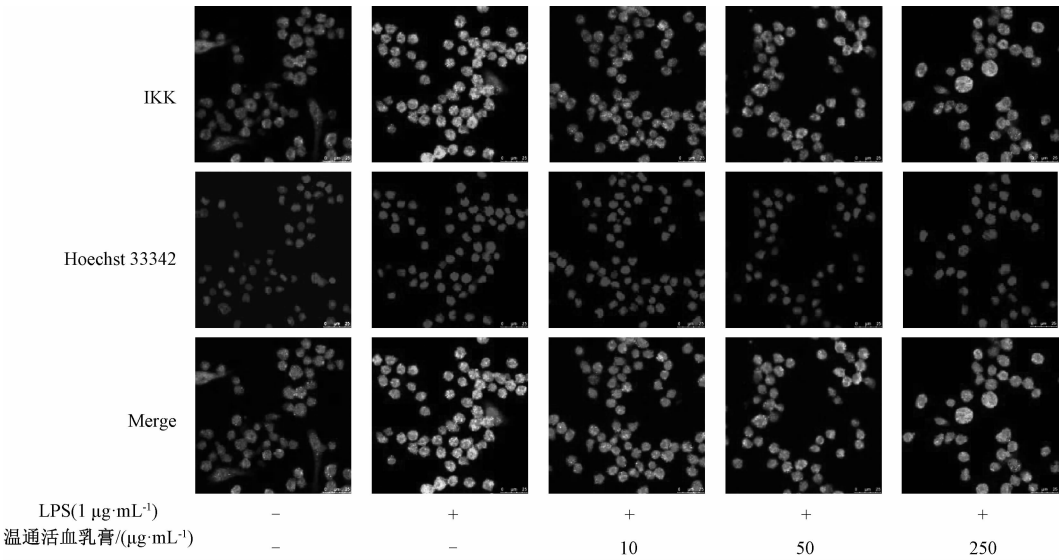


图 3 IKK 蛋白荧光表达

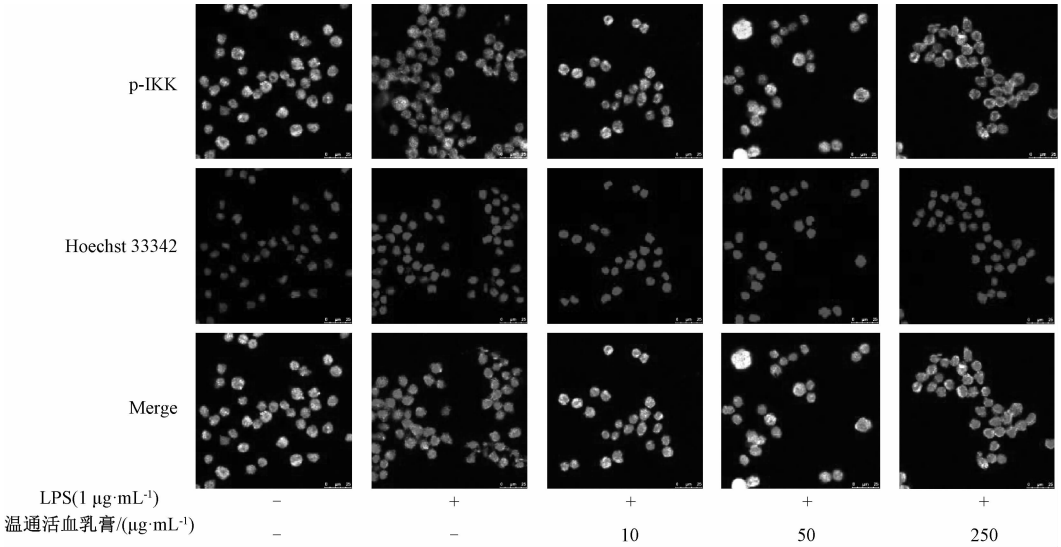


图 4 p-IKK 蛋白荧光表达

活巨噬细胞产生大量炎症细胞因子（如 NO、TNF- α 等），从而导致炎症反应发生^[4-5]；NO 是具有生物活性的气体分子，其大量生成与炎症密切相关，在急性炎症部位会通过细胞毒性效应引起细胞损伤，进而引起炎症相关疾病的发生和发展；TNF- α 是一种由多种免疫或非免疫细胞产生的细胞因子，具有很强的炎症损伤作用，在机体内是最强炎症介质之一^[6-7]；与 TNF- α 相似，IL-6 也是重要的促炎症介质，为反映机体炎症程度的重要指标。

细胞膜通透性变化是细胞损伤的共同特点，LDH 作为标记酶，是反映细胞死亡的常用生化指标，膜外 LDH 水平上升，则细胞膜受损程度高^[8]。活性氧 ROS 属于活性较高的自由基，是生物体内产生的超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基等活性含氧化合物的总称，可激活单核细胞、巨噬细胞等多种免疫细胞释放大量炎症因子，引起全身炎症反应^[9-10]。本实验发现，RAW264.7 细胞在 LPS 诱导下，NO、

TNF- α 、IL-6、ROS 明显增加，而温通活血乳膏能有效地抑制上述炎症因子的释放和含有量，具有明显抗炎作用，同时还可抑制 LDH 释放及细胞膜通透性增加，改善细胞膜受损程度。

持续性的高血糖将导致核转录因子 NF- κ B 介导作用^[11]，它是调控基因转录的重要因子，在机体免疫应答及炎症反应中具有十分重要的地位，其信号转导途径参与了炎症、细胞凋亡、免疫反应、肿瘤等病理过程^[12-13]。在静息状态下，NF- κ B 与 I κ B 结合，以无活性的复合物形式存在于胞质中；在 LPS 等多种因素的刺激下，可引起 I κ B 磷酸化降解，使 NF- κ B 与其解离后由细胞浆转位至细胞核，激活靶基因的转录，导致多种细胞因子及趋化因子的表达^[14]。本实验发现，RAW264.7 细胞经 LPS 刺激后，p65、p-p65、IKK、p-IKK 细胞核区可见明显的绿色荧光，处于激活状态；温通活血乳膏干预后，p65 细胞核内平均荧光

强度减弱，表明其表达减弱，核转位被抑制。

综上所述，温通活血乳膏可有效抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放炎症因子，具有抗炎作用，其机制可能与抑制 p65 蛋白核转位有关。

参考文献：

[1] 王生龙. 初诊 2 型糖尿病患者微血管病变与相关危险因素分析[J]. 慢性病学杂志, 2010, 12(3): 196-198.

[2] 陈茜, 王卫群, 李凯利. 温通活血乳膏的抗炎消肿、镇痛及改善微循环作用实验研究[J]. 中国民康医学, 2006, 18(13): 565-566.

[3] Alvarez Perez Gil A L, Barbosa Navarro L, Patipo Vera M, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanolic extract of *Bougainvillea xbuttiana*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(31): 712-719.

[4] Riabov V, Gudima A, Wang N, et al. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis[J]. *Front Physiol*, 2014, 5: 75.

[5] Moore K J, Sheedy F J, Fisher E A. Macrophages in atherosclerosis: adynamic balance[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(10): 709-721.

[6] Sclavons C, Burtua C, Boutry S, et al. Phage display screening

for tumor necrosis factor- α -binding peptides: detection of inflammation in a mouse model of hepatitis[J]. *Int J Pept*, 2013, 2013: 348409.

[7] David B, Robert E, Igor E, et al. Pain and analgesia: the value of salience circuits[J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 104: 93-105.

[8] Albers J W, Pop-Busui R. Diabetic neuropathy: mechanisms, emerging treatments, and subtypes[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2014, 14(8): 473.

[9] Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer[J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(1): 54-74.

[10] 赵杰, 黄总军, 杨金玉, 等. 鸡骨香醇提物的抗炎作用[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(2): 57-59.

[11] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications[J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 813-820.

[12] Johnsen B, Fuglsang-Frederiksen A. Electrodiagnosis of polyneuropathy[J]. *Neurophysiol Clin*, 2000, 30(6): 339-351.

[13] Boulton A J, Malik R A, Arezzo J C, et al. Diabetic somatic neuropathies[J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(6): 1458-1486.

[14] 叶开和, 王小康, 吕艳青, 等. 番石榴叶总三萜改善糖尿病周围神经病变[J]. 中成药, 2016, 38(5): 961-966.

3 种姜汁炮制后厚朴对大鼠胃黏膜损伤的抑制作用

钟凌云, 谭玲龙, 何平平
(江西中医药大学, 江西 南昌 330004)

摘要：目的 比较 3 种姜汁炮制后厚朴对大鼠胃黏膜损伤的抑制作用。**方法** 将 36 只大鼠随机分为空白组、模型组、生品组、生姜榨汁组、干姜煮汁组、生姜煮汁组，每组 6 只。然后，进行胃组织切片，测定胃黏膜损伤指数及血浆 IL-8、TNF- α 、6-keto-PGF1 α 含量。**结果** 与模型组比较，生品组、姜汁炮制组胃黏膜损伤均有所减轻，指数均显著降低 ($P < 0.05$)，炮制品抑制作用均强于生品，以生姜榨汁组最明显。姜汁炮制组 TNF- α 、IL-8 含量均有所降低，其中除生姜煮汁组外，其他 2 组 6-keto-PGF1 α 含量均有所升高。**结论** 姜汁制厚朴可抑制大鼠胃黏膜损伤，以生姜榨汁效果最理想，故炮制厚朴时可考虑以其为辅料。

关键词：厚朴；姜汁炮制；胃黏膜损伤

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2018)09-2062-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.038

厚朴是木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 或凹叶厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils. 的干燥干皮、根皮及枝皮^[1]，味苦、辛，性微温，归脾、胃、肺、大肠经，能行气燥湿、降逆平喘，对湿滞伤中、脘痞吐泻、食积气滞、痰饮喘咳有很

好的疗效^[2]。但未炮制过的厚朴辛味峻烈，服用时会刺激咽喉，而经姜汁炮制后能达到不刺激咽喉的效果，并能使其宽中和胃作用得到增强^[3]。

厚朴主要化学成分厚朴酚、和厚朴酚具有明显的抗炎、抗菌、抗溃疡、抗氧化、抗肿瘤、激素调节等药理作用^[4]，