

[药 理]

## 紫金龙氯仿-甲醇组分对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症的抑制作用

刘 亭<sup>1</sup>, 张煜彬<sup>1,2</sup>, 陆定艳<sup>1,2</sup>, 宋 菲<sup>1,2</sup>, 张晓红<sup>3</sup>, 王爱民<sup>3</sup>, 王永林<sup>1</sup>, 李勇军<sup>3</sup>,  
杨 畅<sup>1\*</sup>

(1. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室/药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550004;  
2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心,  
贵州 贵阳 550004)

**摘要:** 目的 探讨紫金龙氯仿-甲醇组分对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症的抑制作用。方法 脂多糖刺激 RAW264.7 细胞建立体外炎症模型后, 加入不同质量浓度 (50、100、200、400 mg/L) 紫金龙氯仿-甲醇组分, ELISA 法或比色法检测白介素-6 (IL-6)、白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、一氧化氮 (NO)、前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 含量, Western blot 法测定诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧化酶-2 (COX-2) 蛋白表达, 以及核转录因子  $\kappa$  转抑制蛋白  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ )、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38)、c-Jun 氨基端激酶 (JNK)、细胞外调节蛋白激酶 1/2 (Erk1/2) 磷酸化水平。结果 紫金龙氯仿-甲醇组分可显著抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、NO、PGE<sub>2</sub> 释放 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 下调 iNOS、COX-2 蛋白水平 ( $P < 0.01$ ), 降低 p38、JNK、Erk1/2、I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论 紫金龙氯仿-甲醇组分可有效抑制脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症, 其机制可能与抑制 NF- $\kappa$ B、MAPKs 信号通路激活、减少炎症因子释放有关。

**关键词:** 紫金龙; 氯仿-甲醇组分; 脂多糖; RAW264.7 细胞; 炎症

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)10-2117-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.10.001

## Inhibition effects of *Aconitum vilmorinianum* var. *altifidum* chloroform-methanol component on lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 cells

LIU Ting<sup>1</sup>, ZHANG Yu-bin<sup>1,2</sup>, LU Ding-yan<sup>1,2</sup>, SONG Fei<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-hong<sup>3</sup>,  
WANG Ai-min<sup>3</sup>, WANG Yong-lin<sup>1</sup>, LI Yong-jun<sup>3</sup>, YANG Chang<sup>1\*</sup>

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory for Pharmaceuticals/State Key Laboratory for Function and Application of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 3. Ministry of Education Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

**ABSTRACT: AIM** To investigate the inhibition effects of *Aconitum vilmorinianum* Kom var. *altifidum* W. T. Wang chloroform-methanol components (AVCM) on lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 cells.

**METHODS** The *in vitro* inflammatory models established by stimulating RAW264.7 cells with lipopolysaccharide were treated with different concentrations of AVCM (50, 100, 200, 400 mg/L). The contents of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), nitric oxide (NO) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) were detected either by ELISA or colorimetric method. And the protein expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), as well as the phosphorylation levels of inhibitor nuclear fac-

收稿日期: 2018-05-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81760699); 贵州省科学技术厅人才团队项目 (黔科合平台人才 [2016] 5613/5677); 贵州省教育厅项目 (黔教合协同创新字 [2013] 04)

作者简介: 刘 亭, 博士, 副教授, 从事中药药理学研究。Tel: 14785563829, E-mail: t-liu@163.com

\* 通信作者: 杨 畅, 副教授, 从事药剂学研究。Tel: (0851) 86908468, E-mail: clare\_yangchang@163.com

tor kappa B alpha ( $I\kappa B\alpha$ ), p38 mitogen-activated protein kinase (p38), c-Jun-N-terminal kinase (JNK) and extracellular signal-regulated kinase1/2 (Erk1/2) were determined by Western blot. **RESULTS** AVCM significantly inhibited the release of TNF- $\alpha$ , NO and PGE<sub>2</sub> ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), down-regulated the protein levels of iNOS and COX-2 ( $P < 0.01$ ), and reduced the phosphorylation levels of p38, JNK, Erk1/2 and  $I\kappa B\alpha$  ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** The effective inhibition of AVCM on lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 cells may be related to its inhibition on the activation of MAPKs and NF- $\kappa B$  pathways, and the release of inflammatory factors.

**KEY WORDS:** *Aconitum vilmorinianum* Kom var. *altifidum* W. T. Wang; chloroform-methanol component; lipopolysaccharide; RAW264.7 cells; inflammatory

紫金龙为毛茛科乌头属植物深裂黄草乌 *Aconitum vilmorinianum* Kom var. *altifidum* W. T. Wang 的干燥块根,是贵州省习用苗药,具有驱风除湿、温经止痛的效果,收录于《贵州省中药材、民族药质量标准》<sup>[1]</sup>。目前,以紫金龙为原料开发的制剂主要有风湿跌打酊,临床上常用于治疗风湿性关节炎和挫伤、扭伤引起的关节、腰腿和筋肌疼痛<sup>[2]</sup>,年销售额达上亿元,但迄今为止相关报道较少,药理作用机制也不明确,从而限制了该药材的应用。前期课题组对紫金龙进行了重金属和有机农残<sup>[2]</sup>、成分<sup>[3]</sup>、抗炎作用<sup>[4-5]</sup>研究,发现其氯仿-甲醇组分抗炎效果最佳,能显著降低小鼠炎症组织中 TNF- $\alpha$ 、NO、PGE<sub>2</sub> 水平<sup>[5-6]</sup>。本实验通过脂多糖刺激小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 构建体外炎症模型,研究紫金龙氯仿-甲醇组分 (AVCM) 对各炎症因子水平及相关调控蛋白表达的影响,以探究其抗炎作用通路,为该药材进一步开发提供理论基础。

## 1 材料

1.1 细胞 RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞购自中国科学院上海细胞库。

### 1.2 试药

1.2.1 氯仿-甲醇组分<sup>[3]</sup> 紫金龙购自贵州省贵阳市,经贵州医科大学生药学教研室龙庆德副教授鉴定为毛茛科乌头属植物深裂黄草乌 *Aconitum vilmorinianum* Kom var. *altifidum* W. T. Wang 的干燥块根。药材干燥粉碎后,60%乙醇回流提取3次,每次2h,用量分别为药材质量的8、6、6倍,合并提取液,加压浓缩,回收溶剂得浸膏,加水溶解后,用D101大孔树脂吸附,依次用水、60%乙醇、95%乙醇洗脱。合并60%乙醇、95%乙醇洗脱液,中性氧化铝吸附,氯仿-甲醇(1:1)洗脱,即得(由贵州省药物制剂重点实验室制备)。

1.2.2 试剂 胎牛血清、DMEM培养基、胰蛋白

酶(美国Gibco公司,批号分别为1217513、8117251、1745751);LPS(美国Sigma公司,批号L4391);IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NO、PGE<sub>2</sub> ELISA试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20160618、20160813、20160730、20160903、20160610);SDS-PAGE凝胶制备、BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝公司,批号分别为20170112、20170115);羊抗鼠、羊抗兔、抗iNOS、抗COX-2、抗 $I\kappa B\alpha$ 、抗p- $I\kappa B\alpha$ 、抗 $\beta$ -actin抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab205719、ab205718、ab15323、ab15191、ab32518、ab133462、ab8226);抗P38、抗p-P38、抗Erk1/2、抗p-Erk1/2、抗JNK、抗p-JNK抗体(美国GST公司,批号分别为9212、4631、8544、4374、9252、9257);BeyoECL Plus化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0018A)。其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 G:BOXChemiXL1.4凝胶成像仪(英国Sysgene公司);PowerPac Basic电泳仪、Model 680酶标仪、Trans-Blot Turbo转膜仪、Mini-Sub Cell GT垂直电泳槽(美国Bio-Rad公司);EL204电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);Forma 311二氧化碳(CO<sub>2</sub>)培养箱、Biomate 3S蛋白核酸分析仪(美国Thermo Scientific公司)。

## 2 方法

2.1 细胞培养 RAW264.7细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养液于37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中静置培养,当细胞达到80%~90%汇合度后,胰蛋白酶消化传代。

2.2 对细胞存活率的影响 RAW264.7细胞孵育24h后,设置正常对照组和紫金龙氯仿-甲醇组(终质量浓度分别为10、25、50、100、200、400、800mg/L),后者作用于细胞24h后,MTS法检测细胞活性,每个质量浓度平行5孔,重复3次。根

据细胞存活率决定给药浓度，计算细胞活力，公式为细胞活力 =  $[(A_{\text{样品组}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{正常对照组}} - A_{\text{空白孔}})] \times 100\%$  ( $A_{\text{样品组}}$ 、 $A_{\text{空白孔}}$ 、 $A_{\text{正常对照组}}$  分别为样品组、空白孔、正常对照组吸光度)。

**2.3 细胞造模及分组** RAW264.7 细胞培养至对数生长期后，培养基调整细胞密度为  $3 \times 10^4$ /孔，接种于 96 孔培养板中；或以  $1 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔培养板中。培养 24 h 后，将细胞分为正常对照组、模型组、紫金龙氯仿-甲醇组，其中模型组加入 0.1 mg/L 脂多糖，紫金龙氯仿-甲醇组加入 0.1 mg/L 脂多糖和相应组分（终质量浓度分别为 50、100、200、400 mg/L）。细胞给药后培养 24 h，进行后续试验。

**2.4 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NO、PGE<sub>2</sub> 水平测定**  
给药结束后，收集各组细胞培养上清液，ELISA 试剂盒检测上清液中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub> 分泌量，比色法试剂盒测定上清中 NO 分泌量，每个质量浓度平行 5 孔，重复 3 次。

**2.5 iNOS、COX-2 蛋白表达水平，p38、JNK、Erk1/2、I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化水平测定** 给药后，收集各组细胞并提取蛋白，BCA 试剂盒测定蛋白浓度，取 30  $\mu$ g 上样，SDS-PAGE 凝胶电泳分离。电泳结束后，于 2.5 A 恒流条件下转膜 10 min，将蛋白转印至 PVDF 膜，转膜结束后洗膜 3 次，5% 牛血清白蛋白 (BSA) 4  $^{\circ}$ C 下封闭过夜。分别加入抗 iNOS 抗体 (1:2 000)、抗 COX-2 抗体 (1:2 000)、抗 p-p38 抗体 (1:1 000)、抗 p38 抗体 (1:2 000)、抗 p-JNK 抗体 (1:1 000)、抗 JNK 抗体 (1:2 000)、抗 p-I $\kappa$ B 抗体 (1:500)、抗 I- $\kappa$ B 抗体 (1:10 000)、抗 p-Erk1/2 抗体 (1:500)、抗 Erk1/2 抗体 (1:1 000)、抗  $\beta$ -actin 抗体 (1:5 000)，室温下振荡孵育 2 h，洗膜 3 次后，加入相应二抗 (1:5 000) 孵育 2 h，洗膜 3 次后加 ECL 试剂反应，凝胶成像系统成像。然后，通

过 Gene Tools 软件分析灰度值，计算 iNOS/ $\beta$ -actin、COX-2/ $\beta$ -actin、p-p38/p-p38、p-JNK/JNK、p-I $\kappa$ B/I $\kappa$ B、(p-Erk1/2) / (Erk1/2)，每个质量浓度平行 5 孔，重复 3 次。

**2.6 统计学分析** 通过 SPSS 18.0 软件进行统计学处理，数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，组间差异用两两独立样本 *t* 检验分析，多组间差异采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 紫金龙氯仿-甲醇组分对细胞存活率的影响** 表 1 显示，当质量浓度在 400 mg/L 以下时，紫金龙氯仿-甲醇组分作用 24 h 后对 RAW264.7 细胞增殖无明显抑制作用 (*P* > 0.05)。结合预试验结果，选择 50、100、200、400 mg/L 质量浓度进行后续实验。

表 1 紫金龙氯仿-甲醇组分对 RAW264.7 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3)

Tab. 1 Effect of AVCM on proliferation of RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3)

组别	剂量/(mg·L <sup>-1</sup> )	细胞增殖率/%
正常对照组	—	100.00 ± 0.79
紫金龙氯仿-甲醇组	10	100.45 ± 1.24
紫金龙氯仿-甲醇组	25	99.98 ± 1.03
紫金龙氯仿-甲醇组	50	99.60 ± 1.66
紫金龙氯仿-甲醇组	100	99.60 ± 1.40
紫金龙氯仿-甲醇组	200	99.47 ± 0.90
紫金龙氯仿-甲醇组	400	99.67 ± 2.50
紫金龙氯仿-甲醇组	800	42.91 ± 1.17*

注：与正常对照组比较，\* *P* < 0.05

**3.2 紫金龙氯仿-甲醇组分对 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NO、PGE<sub>2</sub> 水平的影响** 表 2 显示，与正常对照组比较，模型组 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NO、PGE<sub>2</sub> 释放量显著增高 (*P* < 0.01)；与模型组比较，紫金龙氯仿-甲醇组可呈浓度依赖性地显著减少上述因子释放 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。

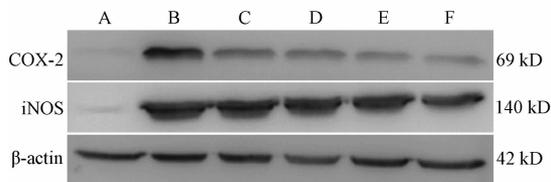
表 2 紫金龙氯仿-甲醇组分对 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NO、PGE<sub>2</sub> 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3)

Tab. 2 Effects of AVCM on levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NO and PGE<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3)

组别	剂量/(mg·L <sup>-1</sup> )	IL-6/( $\mu$ g·L <sup>-1</sup> )	IL-1 $\beta$ /( $\mu$ g·L <sup>-1</sup> )	TNF- $\alpha$ /( $\mu$ g·L <sup>-1</sup> )	NO/( $\mu$ mol·L <sup>-1</sup> )	PGE <sub>2</sub> /( $\mu$ g·L <sup>-1</sup> )
正常对照组	—	0.327 ± 0.111	0.697 ± 0.186	0.713 ± 0.059	2.714 ± 0.563	0.064 ± 0.010
模型组	—	4.884 ± 0.203**	5.530 ± 0.230**	5.443 ± 0.235**	14.382 ± 1.294**	0.501 ± 0.049**
紫金龙氯仿-甲醇组	50	4.609 ± 0.117	5.063 ± 0.350 <sup>#</sup>	4.906 ± 0.276 <sup>#</sup>	12.36 ± 1.250 <sup>#</sup>	0.477 ± 0.039
紫金龙氯仿-甲醇组	100	3.937 ± 0.299 <sup>##</sup>	4.387 ± 0.193 <sup>##</sup>	4.556 ± 0.285 <sup>##</sup>	10.534 ± 1.516 <sup>##</sup>	0.401 ± 0.043 <sup>##</sup>
紫金龙氯仿-甲醇组	200	2.967 ± 0.343 <sup>###</sup>	3.577 ± 0.300 <sup>###</sup>	3.633 ± 0.190 <sup>###</sup>	9.160 ± 1.071 <sup>###</sup>	0.319 ± 0.034 <sup>###</sup>
紫金龙氯仿-甲醇组	400	2.181 ± 0.263 <sup>###</sup>	3.120 ± 0.256 <sup>###</sup>	3.116 ± 0.203 <sup>###</sup>	6.715 ± 1.312 <sup>###</sup>	0.220 ± 0.07 <sup>###</sup>

注：与正常对照组比较，\*\* *P* < 0.01；与模型组比较，<sup>#</sup>*P* < 0.05，<sup>##</sup>*P* < 0.01

3.3 紫金龙氯仿-甲醇组分对 iNOS、COX-2 蛋白表达的影响 图 1、表 3 显示,与正常对照组比较,模型组 iNOS、COX-2 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,紫金龙氯仿-甲醇组可呈浓度依赖性地显著下调两者表达 ( $P < 0.01$ )。



注: A 为正常对照组, B 为模型组, C 为紫金龙氯仿-甲醇组 (50 mg/L), D 为紫金龙氯仿-甲醇组 (100 mg/L), E 为紫金龙氯仿-甲醇组 (200 mg/L), F 为紫金龙氯仿-甲醇组 (400 mg/L)

图 1 iNOS、COX-2 蛋白表达

Fig. 1 Protein expressions of iNOS and COX-2

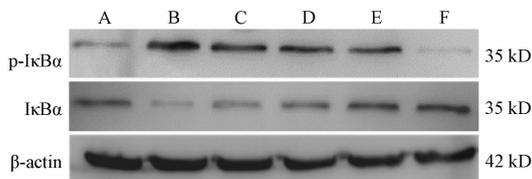
表 3 紫金龙氯仿-甲醇组分对 iNOS、COX-2 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab. 3 Effects of AVCM on protein expressions of iNOS and COX-2 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	iNOS/ $\beta$ -actin	COX-2/ $\beta$ -actin
正常对照组	—	0.13 ± 0.03	0.10 ± 0.08
模型组	—	1.96 ± 0.26 **	1.52 ± 0.20 **
紫金龙氯仿-甲醇组	50	1.59 ± 0.35	0.51 ± 0.21 ##
紫金龙氯仿-甲醇组	100	1.15 ± 0.07 ##	0.38 ± 0.13 ##
紫金龙氯仿-甲醇组	200	0.99 ± 0.12 ##	0.27 ± 0.06 ##
紫金龙氯仿-甲醇组	400	0.74 ± 0.17 ##	0.19 ± 0.05 ##

注:与正常对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, ##  $P < 0.01$

3.4 紫金龙氯仿-甲醇组分对 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化的影响 图 2、表 4 显示,与正常对照组比较,模型组 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化程度显著增加 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,紫金龙氯仿-甲醇组可呈浓度依赖性地显著拮抗 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化 ( $P < 0.01$ )。



注: A 为正常对照组, B 为模型组, C 为紫金龙氯仿-甲醇组 (50 mg/L), D 为紫金龙氯仿-甲醇组 (100 mg/L), E 为紫金龙氯仿-甲醇组 (200 mg/L), F 为紫金龙氯仿-甲醇组 (400 mg/L)

图 2 I $\kappa$ B- $\alpha$  磷酸化水平

Fig. 2 Phosphorylation level of I $\kappa$ B- $\alpha$

3.5 紫金龙氯仿-甲醇组分对 p38、JNK、Erk1/2 磷酸化的影响 图 3、表 5 显示,与正常对照组比较,模型组 p38、JNK、Erk1/2 蛋白磷酸化程度显

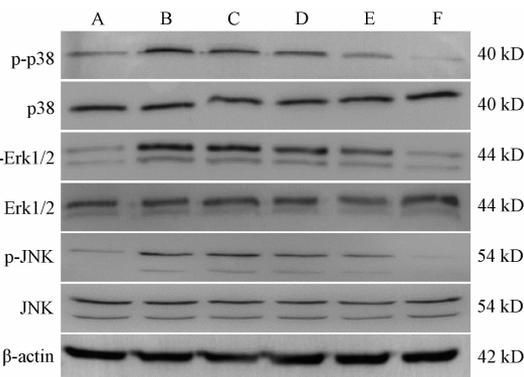
表 4 紫金龙氯仿-甲醇组分对 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab. 4 Effect of AVCM on phosphorylation level of I $\kappa$ B $\alpha$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$
正常对照组	—	0.35 ± 0.08
模型组	—	2.17 ± 0.17 **
紫金龙氯仿-甲醇组	50	1.54 ± 0.18 ##
紫金龙氯仿-甲醇组	100	0.99 ± 0.20 ##
紫金龙氯仿-甲醇组	200	0.49 ± 0.19 ##
紫金龙氯仿-甲醇组	400	0.19 ± 0.07 ##

注:与正常对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, ##  $P < 0.01$

著增加 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,紫金龙氯仿-甲醇组可呈浓度依赖性地显著降低三者磷酸化水平 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。



注: A 为正常对照组, B 为模型组, C 为紫金龙氯仿-甲醇组 (50 mg/L), D 为紫金龙氯仿-甲醇组 (100 mg/L), E 为紫金龙氯仿-甲醇组 (200 mg/L), F 为紫金龙氯仿-甲醇组 (400 mg/L)

图 3 p38、JNK、Erk1/2 磷酸化水平

Fig. 3 Phosphorylation levels of p38, JNK and Erk1/2

表 5 紫金龙氯仿-甲醇组分对 p38、JNK、Erk1/2 磷酸化水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab. 5 Effects of AVCM on phosphorylation levels of p38, JNK and Erk1/2 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	p-p38/ p38	p-JNK/ JNK	(p-Erk1/2)/ (Erk1/2)
正常对照组	—	0.06 ± 0.03	0.08 ± 0.05	0.09 ± 0.04
模型组	—	0.69 ± 0.13 **	0.91 ± 0.08 **	0.88 ± 0.02 **
紫金龙氯仿-甲醇组	50	0.67 ± 0.03	0.85 ± 0.06	0.82 ± 0.06
紫金龙氯仿-甲醇组	100	0.44 ± 0.00 ##	0.79 ± 0.03 #	0.62 ± 0.13 #
紫金龙氯仿-甲醇组	200	0.33 ± 0.03 ##	0.67 ± 0.13 ##	0.48 ± 0.09 ##
紫金龙氯仿-甲醇组	400	0.21 ± 0.05 ##	0.44 ± 0.08 ##	0.25 ± 0.03 ##

注:与正常对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

## 4 讨论

促炎细胞因子是一类由单核-巨噬细胞分泌的小糖蛋白或多肽类信使因子,在炎症发生发展中起到了重要作用<sup>[7]</sup>。其中, TNF- $\alpha$  可诱导成纤维细胞表达黏附分子,使白细胞在炎症部位聚集,从而

促进炎症发展,此外还能诱导其他细胞因子(如IL-1 $\beta$ 、IL-6等)分泌<sup>[8]</sup>;IL-1 $\beta$ 可启动免疫应答和炎症反应,同时还能上调炎性因子(如IL-6、IL-8等)表达<sup>[9]</sup>;IL-6是一种多效应炎症性细胞因子,具有抗炎与致炎的双向功能,当其产生过多时,会引起一系列炎性损害<sup>[9]</sup>;NO是一种经一氧化氮合酶(NOS)催化合成的神经递质。过量时可加剧炎症反应,而iNOS表达量直接决定了NO分泌量<sup>[10]</sup>;PGE<sub>2</sub>是COX-2催化花生四烯酸而生成的一种重要炎症介质,不仅能介导发热及疼痛发生,还可刺激IL-6释放<sup>[11]</sup>。

本实验发现,脂多糖刺激RAW264.7细胞后,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平显著升高,而紫金龙氯仿-甲醇组分可下调其水平,还能抑制NO、PGE<sub>2</sub>、iNOS、COX-2合成,表明它具有抑制TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6等细胞因子分泌的作用,并且可能通过下调iNOS、COX-2的表达来减少NO、PGE<sub>2</sub>的合成,从而降低促炎细胞因子水平,发挥抗炎作用。

在脂多糖介导炎症的过程中,NF- $\kappa$ B、MAPKs是2条重要的信号通路。本实验发现,紫金龙氯仿-甲醇组分能明显拮抗脂多糖诱导的I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白磷酸化,由于I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化后会发生降解,使NF- $\kappa$ B活化并迁移至细胞核内,启动TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、COX-2等基因转录,导致炎症发生及加剧<sup>[12]</sup>,故其机制可能是通过抑制NF- $\kappa$ B通路来起到抗炎作用。p38、JNK、Erk1/2是MAPKs通路的3个关键蛋白<sup>[13]</sup>,其中活化后的p38可促进I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化,进而激活NF- $\kappa$ B通路<sup>[14-15]</sup>;磷酸化后的JNK和Erk1/2在炎症反应中起着关键作用,可调节多种炎症蛋白基因的表达,使巨噬细胞分泌一系列活性分子<sup>[16-17]</sup>,脂多糖诱导后RAW264.7细胞中三者磷酸化程度增加,而紫金龙氯仿-甲醇组分可明显抑制其磷酸化,进而抑制MAPKs通路激活。

综上所述,紫金龙氯仿-甲醇组分可能通过下调I $\kappa$ B $\alpha$ 、p38、JNK、Erk1/2蛋白的磷酸化来抑制NF- $\kappa$ B、MAPKs通路,从而降低TNF- $\alpha$ 、COX-2、iNOS等蛋白表达,减少促炎症因子分泌来发挥抗炎作用。

#### 参考文献:

[1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准(2003年版)[S]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 366.

[2] 董永喜,王霞,陈思颖,等. 黔产紫金龙药材重金属含量及有机氯农药残留量分析[J]. 中国药业, 2016, 25(19): 26-30.

[3] 杨雅欣,刘俊宏,李勇军,等. 紫金龙低极性部位的生物碱成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(4): 613-616, 603.

[4] 张晓红,董莉,杨雅欣,等. 紫金龙乙醇组分对脂多糖诱导的RAW264.7细胞分泌炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(21): 149-152.

[5] 董永喜,王霞,张晓红,等. 紫金龙氯仿-甲醇组分对急性实验性炎症的作用及机制研究[J]. 中外医疗, 2016, 35(15): 161-163.

[6] Chen L L, Zhang H J, Chao J, et al. Essential oil of *Artemisia argyi* suppresses inflammatory responses by inhibiting JAK/STATs activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 204: 107-117.

[7] Li Y H, Cao Y, Xu J, et al. Esculentoside A suppresses lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory molecule production partially by casein kinase 2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198: 15-23.

[8] 苗雨露,张雯霞,王玉娥,等. 清热解暑类中药抗炎机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9): 228-234.

[9] 李利生,史源泉,龚其海. 淫羊藿苷抗尿酸钠诱导的大鼠急性痛性关节炎作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 134-138.

[10] 阮洪生,牟晋珠. 表儿茶素对脂多糖诱导RAW264.7细胞分泌炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 159-163.

[11] 刘思远,李志鹏,彭召云,等. 花青素对肺癌细胞相关炎症因子信号转导通路作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 219-225.

[12] 董永喜,王霞,董莉,等. 辛芍组方对缺血再灌注损伤后神经细胞氧化应激及NF- $\kappa$ B信号通路的影响[J]. 山东医药, 2016, 56(42): 5-8.

[13] 左芳,韦婷,童东,等. 基于MAPK通路研究五味甘露药浴散加减方治疗类风湿关节炎的药效机制[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1245-1250.

[14] 郭晴,何振华. p38MAPK信号通路与肺纤维化[J]. 微生物学免疫学进展, 2016, 44(4): 58-64.

[15] 宋洪娟,黄正桥,黄笑,等. 清金化痰汤通过p38MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路改善大鼠急性气道炎症的作用和机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(13): 104-110.

[16] 江泽波,李思明,赵晋,等. 猪苓多糖对LPS诱导的J774炎症模型的抗炎作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(3): 156-159.

[17] 章丹丹,聂绪强,潘会君,等. 黑种草子总皂苷对炎症介质及ERK/MAPK信号转导通路的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(19): 2594-2598.