

粉防己碱对脂多糖诱导下 RAW264.7 细胞 COX-2/PGE₂、iNOS/NO 表达的影响

赵恒光, 罗福玲*

(重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400016)

摘要 本实验旨在观察粉防己碱(Tet)对脂多糖(LPS)诱导下 RAW264.7 细胞炎症模型的抗炎作用。采用 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 刺激生长良好的 RAW264.7 巨噬细胞建立细胞炎症模型。在不同浓度 Tet(1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} mol/L)作用下,用 Western blotting 检测各组细胞中环加氧酶-2(COX-2)和诱导性一氧化氮激酶(iNOS)的表达,用 NO 检测试剂盒检测细胞培养液中 NO 的含量,酶免疫分析法检测培养液中前列腺素 E₂(PGE₂)含量。结果显示 Tet 剂量依赖性地抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 PGE₂、NO 的表达,同时抑制其合成酶 COX-2 和 iNOS 的表达。表明 Tet 具有抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应的作用,其抗炎机制可能通过抑制 COX-2、iNOS 的表达,从而抑制其下游炎症介质 NO、PGE₂ 的表达有关。

关键词 粉防己碱;环加氧酶-2;诱导性一氧化氮激酶;一氧化氮;前列腺素 E₂

中图分类号 R965 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2011)02-0141-04

Effects of tetrandrine on COX-2/PGE₂, iNOS/NO expression in LPS-stimulated RAW264.7 cells

ZHAO Heng-guang, LUO Fu-ling*

The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract The effects of tetrandrine (Tet) on the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandin E₂ (PGE₂), inducible isoforms of nitric oxide synthetase (iNOS) and nitric oxide (NO) in LPS-stimulated RAW264.7 cells were investigated. RAW 264.7 cells were pretreated with LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to set up the cell inflammatory model; various concentrations (1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} mol/L) of Tet were administered to explore its effect on the expression of COX-2/PGE₂, iNOS/NO in these LPS-stimulated cells. Western blotting was applied to detect the expression of intracellular COX-2 and iNOS; special NO kit was used to detect the level of NO, and enzyme immunoassay (EIA) kit to that of PGE₂. The results showed that Tet significantly decreased the expression of PGE₂ and NO as well as COX-2 and iNOS synthetase in LPS-stimulated RAW264.7 cells in a dose-dependent manner. So it suggests that Tet can inhibit the inflammation response in LPS-stimulated RAW264.7 cell, which might be mediated by down-regulating the expression of PGE₂ and NO through the inhibition of COX-2 and iNOS synthetase.

Key words tetrandrine; COX-2; iNOS; NO; PGE₂

革兰阴性细菌感染发生败血症及败血症休克的原因是免疫细胞,特别是单核细胞、巨噬细胞过度应答引起的一种全身炎症反应综合征(SIRS),其病理生理改变并不是感染的病原体本身所致,而是由其诱导机体产生的大量失控炎症介质(如

TNF- α 、IL-6、PGE₂、NO等)所致,这些细胞因子引起炎症细胞聚集、毛细血管通透性升高及组织损伤,并可最终导致多器官功能衰竭甚至死亡^[1-2]。粉防己碱(tetrandrine, Tet)是传统中药粉防己的主要生物碱,为一双苜基异喹啉生物碱(6,6,7,12-四

甲氧基-2,2-二甲基小檗胺),很多研究表明其具有抗炎作用^[3-4],但具体机制不明确。本实验通过脂多糖(LPS)刺激 RAW264.7 细胞建立细胞炎症模型,观察 Tet 的抗炎作用及其与环加氧酶-2(COX-2)、诱导性一氧化氮激酶(iNOS)以及下游促炎因子 NO、PGE₂ 的关系。

1 材料

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 巨噬细胞株由第三军医大学药理学教研室周虹教授惠赠。粉防己碱(Tet,纯度 > 98%,浙江金华制药厂);脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司);RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司);小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司);COX-2、iNOS、 β -actin 一抗、辣根酶标记山羊抗兔 IgG(美国 Abcam 公司);PGE₂ EIA 检测试剂盒(美国 Cayman 公司);NO 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

实验中严格遵循无菌原则,所有塑料器材采用辐照去热原,玻璃器材经 250 °C 高温烘烤 1.5 ~ 3 h,各种溶液配制均使用超纯水。

2 方法

2.1 RAW264.7 细胞的培养及传代

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞加入含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和链霉素的 RPMI 1640 培养基,置含 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养。1 ~ 2 d 换液 1 次,3 ~ 4 d 后当细胞铺满瓶底的 80% ~ 90% 时传代 1 次。

2.2 Tet 药液配制

精密称取 Tet 6.23 mg,用少量 0.01 mol/L HCl 充分溶解后,用 0.01 mol/L NaOH 滴定 pH 至 5.5,加入无血清培养基至 10 mL,配制成 0.01 mol/L 药液,针式滤器(0.22 μ m 微孔滤膜)过滤除菌,4 °C 保存备用。

2.3 Tet 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的影响

将细胞传代至 6 孔板中,待细胞生长至铺满板底的 80% ~ 90%,换用不含血清的 RPMI 1640 培养液(以避免血清中生物活性物质的干扰),按如下方式分组:①空白对照组:培养液中不含 LPS 及 Tet;②LPS 组:仅含终浓度为 1 μ g/mL 的 LPS;③Tet 低浓度组:含终浓度为 1 μ g/mL LPS + 1×10^{-8} mol/L Tet;④ Tet 中浓度组:含终浓度 1 μ g/mL

LPS + 1×10^{-7} mol/L Tet;⑤ Tet 高浓度组:含终浓度 1 μ g/mL LPS + 1×10^{-6} mol/L Tet。各组处理 12 h 后终止培养,进行实验。

2.4 Western blotting 检测各组细胞 COX-2 和 iNOS 蛋白表达

细胞总蛋白的提取:取出培养板,倒置显微镜观察细胞生长情况,吸去培养液。PBS 洗涤甩干,加入裂解液,4 °C 裂解 30 min,收集细胞碎片和裂解液至离心管,超声仪裂解 1 min。4 °C、13 400 r/min 离心 15 min,取上清液。按 BCA 法制备标准曲线,并检测总蛋白含量。将蛋白质样品水浴煮沸 5 min 后,加样至泳道。恒流(10 mA)电泳至指示剂到浓缩胶与分离胶交界处,改为恒压(100 V)电泳至溴酚蓝到凝胶底部,停止电泳。置硝酸纤维膜(NC),放入电转槽中,由负极向正极方向进行电转移,转移电压 100 V,转移时间 100 min。移膜至含封闭液的平皿中,室温下脱色摇床摇动封闭 1 h。加一抗,4 °C 过夜。洗涤后加二抗,室温孵育 1 h 后,再次洗涤。将洗好的膜于暗室中滴加显色剂,显色 5 min。X 线摄影暗匣中曝光,取出胶片,洗片拍照。

2.5 培养液 NO 的测定

取 6 孔板细胞培养液上清,用 NO 专用试剂盒,检测培养液中 NO 含量,按试剂盒说明操作。NO 含量(mol/L) = (测定管 A 值 - 空白管 A 值) / (标准管 A 值 - 空白管 A 值) \times 标准管浓度(20 mol/L) \times 样本测试管前稀释倍数。

2.6 培养液 PGE₂ 测定

取细胞培养液上清,用酶免疫分析法(enzyme immunoassay, EIA),检测培养液中 PGE₂ 含量。按试剂盒说明操作。

2.7 数据统计

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析。组内比较采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为显著性差异, *P* < 0.01 为极显著性差异。

3 结果

3.1 Tet 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞表达 COX-2、iNOS 的影响

Tet 和 LPS 处理 12 h 后收集细胞,提取蛋白,经 Western blotting 检测结果如图 1 所示,LPS 模型组的 COX-2 和 iNOS 蛋白表达明显高于空白对照

组($P < 0.01$);而 Tet 各组则剂量依赖性地抑制由 LPS 所诱导的 COX-2 和 iNOS 蛋白表达,其中 Tet 高剂量组(1×10^{-6} mol/L)及中剂量组(1×10^{-7} mol/L)与 LPS 组比较均具有极显著性差异($P < 0.01$)。

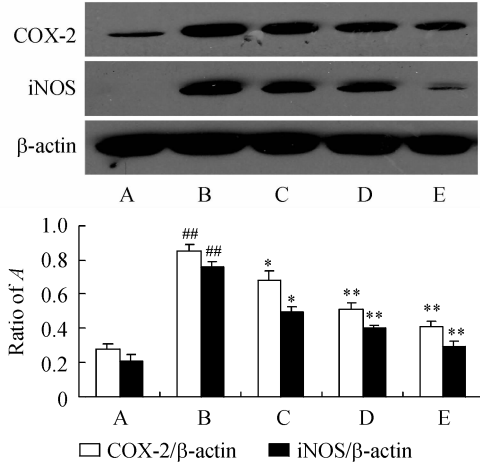


Figure 1 Effect of tetrandrine (Tet) on COX-2, iNOS expression of in LPS-treated RAW264.7 cells. $\bar{x} \pm s, n = 6$

A: Normal; B: LPS; C: Tet (1×10^{-8} mol/L); D: Tet (1×10^{-7} mol/L); E: Tet (1×10^{-6} mol/L)

^{##} $P < 0.01$ vs normal group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs LPS group

3.2 Tet 对 LPS 诱导 RAW264.7 培养液 NO 的影响

处理 12 h 后收集培养液, NO 试剂盒检测 Tet 对 RAW264.7 细胞培养液 NO 表达的影响结果如图 2。表明未给 Tet 时, RAW264.7 细胞在 LPS 刺激后, 培养液中 NO 含量明显高于空白对照组, 而 Tet 可剂量依赖性地抑制 NO 的生成, 其中 Tet 高剂量组(1×10^{-6} mol/L)及中剂量组(1×10^{-7} mol/L)与 LPS 组比较均具有极显著性差异($P < 0.01$)。

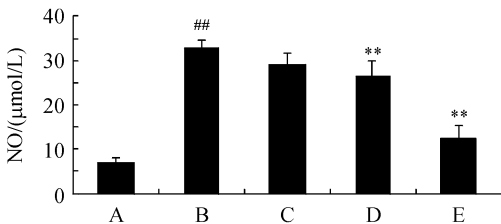


Figure 2 Effect of Tet on content of NO in media of LPS-treated RAW264.7 cells. $\bar{x} \pm s, n = 6$

A: Normal; B: LPS; C: Tet (1×10^{-8} mol/L); D: Tet (1×10^{-7} mol/L); E: Tet (1×10^{-6} mol/L)

^{##} $P < 0.01$ vs normal group; ^{**} $P < 0.01$ vs LPS group

3.3 Tet 对 LPS 诱导 RAW264.7 培养液 PGE₂ 的影响

如图 3 所示, LPS 作用 12 h 后培养液中 PGE₂

较空白对照组显著升高($P < 0.01$)。而 Tet 各剂量组培养液中 PGE₂ 含量有不同程度降低, 其中中剂量组(1×10^{-7} mol/L)与 LPS 组比较具有显著性差异($P < 0.05$), 而高浓度组(1×10^{-6} mol/L)与 LPS 组比较具有极显著性差异($P < 0.01$)。

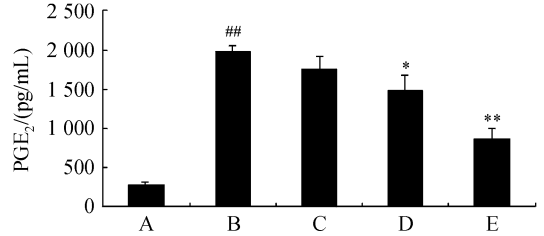


Figure 3 Effect of Tet on the content of PGE₂ in the media of LPS-treated RAW264.7 cells. $\bar{x} \pm s, n = 6$

A: Normal; B: LPS; C: Tet (1×10^{-8} mol/L); D: Tet (1×10^{-7} mol/L); E: Tet (1×10^{-6} mol/L)

^{##} $P < 0.01$ vs normal group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs LPS group

4 讨论

LPS 是革兰阴性菌细胞壁的一种成分, 是临床革兰阴性细菌引发败血症的主要原因。LPS 与之相应的模式识别受体(主要是 Toll 样受体)结合, 通过 MyD88 分子等途径激活 NF- κ B, 启动一系列细胞因子及其它生物活性分子如 TNF- α 、IL-6、PGE₂、NO 等的级联调整反应, 引发炎症事件^[5]。在体内, PGE₂、NO 均有强烈的促炎作用。NO 可以舒张血管增加炎症局部血流, 调节淋巴因子的产生和淋巴细胞的功能, 并参与免疫病理反应。PGE₂ 除增加血流和血管通透性外, 还是中枢性致热源和炎性疼痛因子。COX-2 和 iNOS 则是 PGE₂ 和 NO 合成的上游关键酶, 其表达丰度会直接限速下游 PGE₂ 和 NO 的产生; 此外还有报道, COX-2、iNOS 还可调节核因子白介素 6 (NF-IL6)、AP-1 和 NF- κ B 等转录因子的活性, 协同炎症作用的发生^[6-9], 且 COX-2 本身也可直接促进发热反应^[10]。本实验中发现, Tet 不仅呈剂量依赖性地抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 PGE₂ 和 NO 的产生, 还同时抑制了 COX-2 和 iNOS 的表达。这在一方面证实了 Tet 确切的抗炎作用, 还同时表明 Tet 对 PGE₂ 和 NO 等促炎细胞因子的表达可能是通过抑制其上游关键酶 COX-2 和 iNOS 来实现的, 为进一步的深入研究奠定基础。

Tet 作为传统抗风湿药, 目前关于其抗炎机制的其他报道还有: 能抑制中性白细胞的活化, 增强

肾上腺皮质功能和抑制炎症白细胞磷酸二酯酶^[11]或磷脂酶 A₂^[12]等。Tet 可能是一种具有多途径抗炎机制的中药,其抗炎效能是广泛的、协同的。因此,对其进行深入的理论机制和临床应用研究十分必要。

参考文献

- [1] Xu XJ, Reichner JS, Mastrofrancesco B, *et al.* Prostaglandin E2 suppresses lipopolysaccharide-stimulated IFN- β production [J]. *J Immunol*, 2008, **180**(4): 2125 - 2131.
- [2] Ziegeler S, Raddatz A, Hoff G, *et al.* Antibiotics modulate the stimulated cytokine response to endotoxin in a human *ex vivo*, *in vitro* model [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2006, **50**(9): 1103 - 1110.
- [3] Steiner AA, Ivanov AI, Serrats J, *et al.* Cellular and molecular bases of the initiation of fever [J]. *PLoS Biol*, 2006, **4**(9): 284.
- [4] Tavares E, Minano FJ, Maldonado R, *et al.* Endotoxin fever in granulocytopenic rats: evidence that brain cyclooxygenase-2 is more important than circulating prostaglandin E2 [J]. *J Leukocyte Biol*, 2006, **80**(6): 1375 - 1387.
- [5] Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance [J]. *Trends Immunol*, 2009, **30**(10): 475 - 487.
- [6] Oh PS, Lee SJ, Lim KT. Glycoprotein isolated from *Rhus vernici-flua* Stokes inhibits inflammation-related protein and nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, **30**(1): 111 - 116.
- [7] Kim MH, Shin HM, Lee YR, *et al.* Suppressive effects of furonaphthoquinone NFD-37 on the production of lipopolysaccharide-inducible inflammatory mediators in macrophages RAW 264.7 [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, **28**(10): 1170 - 1176.
- [8] Giuliani C, Napolitano G, Bucci I, *et al.* NF- κ B transcription factor: role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune, and neoplastic diseases and therapy implications [J]. *Clin Ter*, 2001, **152**(4): 249 - 253.
- [9] Liu J, Wang ZT, Ji LL, *et al.* Inhibitory effects of neoandrographolide on nitric oxide and prostaglandin E(2) production in LPS-stimulated murine macrophage [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, **298**(1/2): 49 - 57.
- [10] Tavares E, Miñano FJ, Maldonado R, *et al.* Endotoxin fever in granulocytopenic rats: evidence that brain cyclooxygenase-2 is more important than circulating prostaglandin E(2) [J]. *J Leukoc Biol*, 2006, **80**(6): 1375 - 1387.
- [11] 张乐之 (Zhang LZ), 何华美 (He HM), 李新芳 (Li XF), 等. 粉防己碱的抗炎作用与炎症白细胞 cAMP 的关系 [J]. *中国药理学通报 (Chin Pharmacol Bull)*, 2003, **19**(7): 791 - 796.
- [12] Wang B, Yang L, Yan HL, *et al.* Effect of tetrandrine on calcium-dependent tumour necrosis factor- α production in glia-neurone mixed cultures [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2005, **97**(4): 244 - 248.

· 企业介绍 ·

瑞孚信集团有限公司

瑞孚信集团有限公司创建于 1992 年,公司前身为浙江省化学原料药基地台州市椒江化工六厂,并于 2004 年相继组建了台州明翔、港边、融丰、江海化工有限公司和江苏宇翔化工有限公司,是业内领先的医药化学品及原料药开发、生产和销售一体的高新技术企业。自创建至今,公司一如继往地以研发为首任,以客户为中心,向全球制药企业提供一系列的医药中间体和原料药的研发、生产服务,并能根据客户要求提供创新药物的产品开发。

譬道之在天下,犹川谷之于江海。创业近二十年来,公司秉承汇聚点滴成就江海的企业经营理念,与客户诚信合作,与员工群策群力,同舟共济,开拓创新,共同发展。公司现已成为业内抗感染药、心血管药、抗艾滋病药和胃药等领域的医药中间体及原料药专业生产企业。公司高度重视科技创新,不断加大科技投入,通过创建省级高新技术研发中心,来完善原料药及中间体产业链。企业现为“浙江省科技型企业”和“浙江省高新技术企业”,并被列入“国家级火炬计划产业化项目”实施企业。公司严格执行 ISO9001、ISO14001、OHSAS18001 体系,按照 GMP 和高新技术企业的要求运行,本着“优质产品,真诚服务”的原则,更好地为国内外新老客户服务,与中外客商共建“互惠、互利、共赢”的长期友好合作关系。