

芦荟及其复方提取物对 RAW264.7 细胞炎症因子的影响

潘苗苗, 刘学华*, 佟书娟, 詹臻, 董伟
(南京中医药大学基础医学院, 南京 210046)

[摘要] 目的: 观察芦荟及其复方提取物对小鼠巨噬细胞炎症因子的影响。方法: RAW264.7 细胞按 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 稀释, $100 \mu\text{L}$ /孔接种入 96 孔板, 药物质量浓度为 250, 125, 62.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 下采用噻唑蓝比色法 (MTT 法) 作用 4 h, 检测芦荟及其复方提取物对小鼠巨噬细胞的毒性作用; 药物质量浓度为 50, 25, 12.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 下采用硝酸还原酶法作用 24 h, 测定小鼠巨噬细胞一氧化氮 (NO) 含量, 并用酶联免疫吸附法 (ELISA 法) 测定其在单纯药物及脂多糖 (LPS) $1 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导情况下小鼠巨噬细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-10 (IL-10) 的含量。结果: 芦荟及其复方提取物具有促进巨噬细胞释放 NO 的作用, 并与药物浓度成正相关 ($P < 0.01$); 芦荟有促进 TNF- α 分泌 ($P < 0.01$) 和抑制 IL-10 分泌 ($P < 0.05$) 的作用, 其复方在 LPS 诱导下则对 TNF- α 和 IL-10 都有抑制作用 ($P < 0.01$)。结论: 芦荟在 250 ~ 7.8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 下对巨噬细胞无细胞毒性, 其复方则有一定毒性; 芦荟及其复方对小鼠巨噬细胞炎症因子的释放有一定影响。

[关键词] 炎症; 芦荟; 小鼠巨噬细胞; 细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0166-04

Effects of *Aloe vera* and Compound Extract of *Aloe vera* on Inflammatory Factors in RAW264.7 Cells

PAN Miao-miao, LIU Xue-hua*, TONG Shu-juan, ZHAN Zhen, DONG Wei

(Basic Medical College of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effect of the *Aloe vera* and its compound extract on inflammatory factors. **Method:** Cells diluted by $2 \times 10^5/\text{mL}$ were inoculated into 96-well plates, $100 \mu\text{L}$ per well, concentrations of druds was 250, 125, 62.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, MTT method was assay to test the toxic effects of macrophages. When the concentrations was 50, 25, 12.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ macrophage nitric oxide (NO) levels was measured. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to measure tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) levels in pure drug and lipopolysaccharide (LPS) -induced murine macrophage.

[收稿日期] 20110825(003)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI53B09); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 南京中医药大学中西医结合优势学科

[第一作者] 潘苗苗, 硕士研究生, 从事方剂配伍与临床应用研究, Tel: 15250987399, E-mail: pmm8352@126.com

[通讯作者] * 刘学华, 硕士, 教授, 从事方剂配伍与临床应用研究, Tel: 13851554047, E-mail: hx15312@163.com

弱; ②His 作用强度减弱, 标本自然恢复(空白对照血清接触 10 min 后, 解痉率达 28.19%)。综合考虑, 作者认为接触 5 min 最佳, 这为以后离体实验中, 药物与标本接触时间提供了参考。

[参考文献]

[1] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 821.

[2] 李仪奎, 吴建宇. 血清药理实验中采血时间的同法方案[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(6): 569.

[3] 黄坚, 陈长勋, 李仪奎. 用血清实验法观察小青龙汤对豚鼠气管平滑肌的作用[J]. 中药药理与临床, 1995(6): 12.

[4] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 443.

[责任编辑] 聂淑琴

Result: *Aloe vera* and its compound extract promoted releasing of NO, with a concentration dependent manner ($P < 0.01$); *Aloe vera* could promote TNF- α secretion ($P < 0.01$) and inhibition of IL-10 secretion ($P < 0.05$), the compound inhibited LPS induced releasing of TNF- α and IL-10 ($P < 0.01$). **Conclusion:** Aloe in 250-7.8 g · L⁻¹ concentration has non-cytotoxic macrophages, compound extract has a certain toxic action, and can exert some influence on release of inflammatory factors.

[**Key words**] Inflammation; *Aloe vera*; mouse macrophage cells; cytokines

芦荟是一种传统中药,药用历史悠久,古方中记载其具有清肝、通便、消疳、散结消痞、杀虫、疗癣、消疹生肌等作用^[1],现代研究表明芦荟具有泻下通便、抗菌消炎、调节免疫、抗肿瘤、保肝、促进消化、镇痛、镇静等作用^[2],广泛应用于治疗多种内、外科疾病,尤其是对于各种感染所致的炎症有很好的治疗作用。现代研究发现很多疾病的发病机制都涉及炎症反应,作者前期的芦荟药理实验结果表明,芦荟对二甲苯所致的小鼠耳廓肿胀有抑制作用,芦荟及其复方制剂对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠菌、病毒等均有抑制作用。临床研究亦表明芦荟具有明显的抗炎、抗感染作用。RAW264.7 小鼠巨噬细胞模型被广泛应用于炎症反应的研究,本实验通过芦荟及其复方对 RAW264.7 细胞释放一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-10(IL-10)等炎症因子影响的观察研究,探讨芦荟及其复方提取物的抗炎作用机制。

1 材料

1.1 细胞株与细胞培养液 小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 细胞购于中国科学院上海细胞库,DMEM 高糖培养基、10%胎牛血清购于 GIBCO 公司。

1.2 受试药物 芦荟原汁为百合科植物库拉索芦荟(*Aloe barbadensis* Miller)叶片经压榨获得的汁液;芦荟复方提取物 1 号(芦荟复方 1 号)为芦荟、白及等药物水煎液,水浴浓缩至质量浓度为 1 g · L⁻¹供实验;芦荟复方提取物 2 号(芦荟复方 2 号)为芦荟、白芷、虎杖等药物水煎液,水浴浓缩至质量浓度为 1 g · L⁻¹供实验。

1.3 试剂和仪器 脂多糖(LPS, *E. coli* 055:B5, L2880, Sigma 公司,批号 2012/08),96 孔板、24 孔板、细胞培养瓶为 CORNING 公司产品,MTT (Genebase 公司,批号 10/2012),0.22 μ m 一次性滤器(MIINSTART 公司产品),NO 试剂盒(南京建成科技有限公司产品,批号 20110427),小鼠 IL-10 及 TNF- α ELISA 试剂盒(R&D 公司产品,批号 20110501A)。酶标仪(Bio-Teck 公司),超净工作台(苏州净化设备公司),二氧化碳培养箱和 -70 °C 低

温冰箱(Thermo 公司)。

2 方法

2.1 药物处理 取芦荟原汁、芦荟复方 1 号与 2 号,用无血清 DMEM 培养基和药液混合,1 000 r · min⁻¹离心除去药液沉淀,取上清过滤除菌,4 °C 保存备用。药物使用时加入胎牛血清至 10%。

2.2 药物对细胞的毒性作用 将 RAW264.7 细胞按 2×10^5 /mL 稀释,100 μ L/孔接种入 96 孔细胞培养板,37 °C 5% CO₂ 培养 16 ~ 18 h,弃去上清,将含不同浓度药物的细胞培养液 0.2 mL 加入细胞板,设无药物的正常细胞对照,每组 4 个复孔,37 °C 5% CO₂ 培养 72 h,每孔加入 20 μ L 5 g · L⁻¹的 MTT 溶液,继续培养 4 h,弃去上清,加入 0.2 mL DMSO 充分溶解,酶标仪 490 nm 测吸光度(A),计算药物半数细胞毒性浓度(TC₅₀)。以最大无毒浓度为起始浓度,倍比稀释 3 个质量浓度进行实验。

2.3 实验分组 实验共分为芦荟原汁及芦荟复方 1 号、2 号高、中、低浓度组;正常细胞组,每个浓度 4 复孔。

2.4 对 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响 将 RAW264.7 细胞按 2×10^5 /mL 稀释,100 μ L/孔接种入 96 孔细胞培养板,37 °C 5% CO₂ 培养 16 ~ 18 h,弃去上清,将芦荟原汁、芦荟复方 1 号与 2 号分别加入培养板,刺激 24 h,设正常细胞对照各 4 复孔。收获细胞上清,3 000 r · min⁻¹离心 10 min,吸取上清液 -70 °C 保存。按 NO 检测试剂盒说明(硝酸还原酶法)测定各组 NO 含量。

2.5 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 TNF- α , IL-10 的影响 将 RAW264.7 细胞按 2×10^5 /mL 稀释,1 mL/孔接种入 24 孔细胞培养板,37 °C 5% CO₂ 培养 18 h,弃去上清,将芦荟原汁、芦荟复方 1 号、2 号分别加入培养板,作用 2 h,再加入 LPS 至终质量浓度为 1 mg · L⁻¹,设正常细胞对照和模型对照,每浓度 4 复孔。刺激 24 h 后收获细胞上清,3 000 r · min⁻¹离心 10 min,吸取上清液 -70 °C 保存。按小鼠 TNF- α , IL-10 ELISA 试剂盒测定。

2.6 统计学分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用

SPSS 11.0 统计软件对实验结果进行 F 及 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠巨噬细胞的毒性作用 芦荟原汁在 $250 \sim 7.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 终质量浓度下没有细胞毒性, 实验

选择 $250 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为其起始质量浓度, 倍比稀释为 $125, 62.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 分 3 个质量浓度进行实验。芦荟复方 1, 2 号有一定的细胞毒性, 选择 $50, 25, 12.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个终质量浓度进行实验。见表 1。

表 1 芦荟复方提取物对 RAW267.4 细胞的毒性作用 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

提取物	各质量浓度下细胞存活率/%						
	$100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$12.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$6.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$3.125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$1.563 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
芦荟复方 1 号	59.7 ± 4.0	72.5 ± 5.9	82.6 ± 10.1	84.3 ± 15.0	93.5 ± 4.1	88.9 ± 5.0	82.1 ± 8.4
芦荟复方 2 号	15.5 ± 6.1	13.0 ± 4.7	79.0 ± 11.4	90.2 ± 14.4	114.1 ± 5.8	99.7 ± 14.1	92.1 ± 12.0

3.2 对小鼠巨噬细胞释放 NO 的影响 由芦荟原汁、芦荟复方 1, 2 号在高、中、低终质量浓度作用于 RAW264.7 均可以直接引起细胞产生 NO 增多, 差异显著, 并与药物浓度成正相关。见表 2。

表 2 芦荟及其复方提取物对小鼠巨噬细胞释放 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	终质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	5.16 ± 2.92
芦荟复方 1 号	50	$489.69 \pm 6.07^{1)}$
	25	$265.46 \pm 15.74^{1)}$
	12.5	$161.86 \pm 11.17^{1)}$
芦荟复方 2 号	50	$202.58 \pm 6.16^{1)}$
	25	$119.59 \pm 2.06^{1)}$
	12.5	$76.80 \pm 10.70^{1)}$
芦荟原汁	250	$2\ 064.43 \pm 135.75^{1)}$
	125	$1\ 423.71 \pm 93.82^{1)}$
	62.5	$932.99 \pm 47.11^{1)}$

注: 与正常细胞组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞释放 TNF- α , IL-10 的影响 由表 3 可见, 单纯芦荟复方 1 号, 2 号药物组对 RAW264.7 细胞释放 TNF- α , IL-10 没有直接作用, 仅芦荟原汁中、低剂量组有促进细胞释放 TNF- α 的作用, 以及中剂量组有减少细胞释放 IL-10 的作用。

表 4 可见, 小鼠巨噬细胞经 LPS 诱导后, 芦荟复方提取物 1 号, 2 号均可引起细胞释放 TNF- α , IL-10 明显减少, 但芦荟原汁组增加细胞释放 TNF- α 而减少 IL-10 的释放。

4 讨论

由上述实验结果可知, 芦荟及其复方提取物具有促进巨噬细胞释放 NO 的作用, 尤其是芦荟原汁,

表 3 芦荟及其复方提取物对小鼠巨噬细胞释放 TNF- α , IL-10 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- α	IL-10
正常	-	86.64 ± 1.56	47.34 ± 1.18
芦荟复方 1 号	50	90.11 ± 3.78	50.41 ± 2.75
	25	90.67 ± 5.69	46.23 ± 1.31
	12.5	81.59 ± 7.65	50.30 ± 4.45
芦荟复方 2 号	50	87.36 ± 2.82	49.48 ± 3.90
	25	75.11 ± 6.78	$43.87 \pm 1.96^{1)}$
	12.5	84.04 ± 2.62	47.51 ± 3.87
芦荟原汁	250	$101.85 \pm 4.52^{2)}$	50.05 ± 4.14
	125	$100.78 \pm 6.40^{2)}$	$44.76 \pm 0.64^{1)}$
	62.5	88.99 ± 3.14	$42.34 \pm 1.19^{1)}$

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

表 4 芦荟及其复方提取物对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞释放 TNF- α , IL-10 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	质量浓度	TNF- α	IL-10
LPS	-	88.99 ± 3.14	51.94 ± 3.56
LPS + 芦荟复方 1 号	50	$78.58 \pm 1.83^{2)}$	$46.41 \pm 2.78^{1)}$
	25	$78.33 \pm 3.16^{2)}$	$44.09 \pm 2.44^{1)}$
	12.5	$74.81 \pm 2.83^{2)}$	47.66 ± 2.27
LPS + 芦荟复方 2 号	50	85.93 ± 6.06	49.09 ± 3.92
	25	$76.80 \pm 4.86^{2)}$	$44.51 \pm 0.55^{2)}$
	12.5	$79.91 \pm 1.60^{2)}$	46.34 ± 3.67
LPS + 芦荟原汁	250	$102.15 \pm 5.99^{1)}$	48.94 ± 2.06
	125	$102.31 \pm 4.70^{1)}$	$45.16 \pm 1.07^{1)}$
	62.5	$95.21 \pm 3.69^{1)}$	46.34 ± 7.12

注: 与 LPS $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

效应明显且没有细胞毒性。首先, NO 作为一种炎症因子, 参与炎症反应的过程, 对机体有损伤和保护

双向作用。大量生成的 NO 有清除病原微生物、调节免疫、扩张血管维持组织血流灌注、抑制血小板聚集等作用^[3]。有实验表明大鼠脑缺血再灌注后脑组织的 NO 显著升高^[4]。此外,巨噬细胞是机体免疫系统的重要组成部分,活化后的巨噬细胞能分泌多种活性物质参与机体的免疫调节和炎症反应,对于机体早期抗感染免疫具有重要作用。研究表明,活化后的巨噬细胞可大量分泌 NO,起到杀伤多种病原体的作用^[5]。芦荟及其复方中的有效成分可能正是通过激活巨噬细胞,增强其吞噬能力,从而增强机体的免疫调节功能,起到抗炎的作用。

单用芦荟复方对 TNF- α 和 IL-10 均没有影响,但经 LPS 诱导后对其分泌均有抑制作用。TNF- α 属促炎细胞因子,但 TNF- α 在某些情况下也表现出抗炎效应,实验中芦荟原汁组无论在药物单独作用还是 LPS 诱导的情况下都有促进 TNF- α 分泌的作用,这可能与 TNF- α 在感染和自身免疫反应中,可激活吞噬细胞杀灭病原体以及诱导巨噬细胞分泌其他细胞因子及生物活性物质,对抗细菌感染有关^[6]。而 IL-10 属于炎症负调节细胞因子,可能由于炎症早期抗炎细胞因子的作用不占主导,且各种细胞因子并不能绝对的划分抗炎或促炎,关键在于整个炎症过程中炎症因子的平衡^[6]。

综上所述,芦荟及其复方提取物 1,2 号有较好的抗炎作用,其机制可能与促进巨噬细胞活化以及影响炎症因子的释放有关。与以往众多其他有抗炎

作用药物的研究结果不同,芦荟抗炎作用的靶点并非在于抑制 NO 等炎症介质,或单纯抑制或促进某一类炎症因子的释放,而是发挥一种保护性的抗炎作用。这与临床观察中芦荟对某些炎症性疾病表现出的治疗作用是相吻合的,例如痤疮,芦荟在抗炎的同时,可通过这一机制,发挥促进机体组织修复的作用。另外,实验中单纯芦荟组与芦荟复方组之间的差异,是否是由于复方中存在某些其他的成分,尚有待进一步深入的研究。

[参考文献]

- [1] 潘苗苗,刘兴华. 芦荟的本草考源及其在古方中功用初探[J]. 江苏中医药,2011,43(2):75.
- [2] 潘苗苗,刘兴华. 芦荟在皮肤科的临床应用研究[J]. 中医药信息,2011,28(3):136.
- [3] 陈昶. 一氧化氮在脓毒症中的双向作用及治疗应用[J]. 金陵医院学报,1996,9(4):339.
- [4] 吴红彦,展学孔,马爱红,等. 参参康心滴丸对实验性脑缺血再灌注损伤大鼠一氧化氮、内皮素、血栓素 B₂ 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(9):81.
- [5] 黄迪南,侯敢,祝其锋. 香菇多糖对小鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮生成的影响及其机理[J]. 基础医学与临床,1999,19(2):68.
- [6] 石云峰. 炎症细胞因子在细菌感染中的作用[J]. 国际内科学杂志,2009,36(2):112.

[责任编辑 聂淑琴]