



· 药理 ·

芒果苷对慢性炎症 MAPK 信号通路的影响

卫智权¹, 阎莉², 邓家刚^{2*}, 邓静³

(1. 广西医科大学, 广西南宁 530021; 2. 广西中医学院, 广西南宁 530001;
3. 哈佛大学医学院 Dana-Farber 癌症研究所, 美国 马萨诸塞州 波士顿 02115)

[摘要] 目的:探讨芒果苷调控 MAPK 信号通路而抑制脂多糖(LPS)诱导慢性炎症的机制。方法:60 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、阳性药泼尼松 5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹组与芒果苷 200, 100, 50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹组。以 LPS 间断尾静脉注射建立慢性炎症模型,进行大鼠全血白细胞计数,ELISA 测定血清肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素 6(IL-6)、可溶性细胞间黏附分子 1(sICAM-1);RT-PCR 检测白细胞 MAPK 信号通路 p38, ERK, JNK 基因表达。结果:与模型组比较,芒果苷 200 mg · kg⁻¹组全血白细胞总数与血清 TNF-α, IL-6, sICAM-1 水平明显降低($P < 0.05$),白细胞 ERK, JNK 基因表达下调($P < 0.05$), p38 基因表达无统计学差异。结论:芒果苷显著抑制 LPS 诱导慢性炎症的作用机制与其下调 MAPK 信号通路中 ERK, JNK 基因表达而降低炎症因子水平有关。

[关键词] 芒果苷;慢性炎症;MAPK 信号通路;基因表达

芒果叶为漆树科植物芒果 *Mangifera indica* L. 的叶,芒果苷(mangiferin)是芒果叶中的主要活性成分,是一种天然多酚类化合物,在多项研究中被证实具有较好的抗炎活性^[1-2]。革兰阴性菌外膜的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是介导感染性炎症损伤的最主要的病原分子之一,许多疾病与 LPS 活化丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路导致的持续亚临床炎症密切相关^[3-4],芒果苷对此类炎症的有效性尚不明确。本研究以 LPS 间断尾静脉注射建立的大鼠慢性炎症模型为研究对象,考察不同剂量芒果苷对此慢性炎症的抗炎作用,并初步探讨其调控 MAPK 信号通路基因表达而发挥抗炎效应的可能机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 60 只,体重 220 ~ 240 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号 SCXK(湘)2009-0004。

1.2 药品及试剂 芒果苷由广西中医学院药效研

究重点实验室提供,纯度为 98.6%,批号 20081217。戊巴比妥钠(北京化学试剂公司);醋酸泼尼松片(浙江仙琚制药股份有限公司);大肠杆菌脂多糖(美国 Sigma 公司,血清型 O55:B5);白细胞稀释液(南京建成公司);白细胞介素 6(IL-6),肿瘤坏死因子 α(TNF-α),可溶性细胞间黏附分子 1(sICAM-1)的 ELISA 试剂盒均为美国 R&D 公司产品(201004)。红细胞裂解液、总 RNA 提取试剂盒、Qucant cDNA 第 1 链合成试剂盒、2 × Taq Plus PCR MasterMix 试剂盒均为北京天根生化公司产品。NF-κB 基因 PCR 引物由上海生工公司设计、合成。

1.3 仪器设备 细胞计数板(上海求精医疗仪器公司);Multiskan MK3 酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);T-gradient Thermoblock 梯度 PCR 仪(德国 Biometra 公司);PowerPac Basic 电泳仪,Mini Sub Cell GT 水平电泳槽,T-2A 凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、慢性炎症模型的建立及给药 大鼠随机分为正常组(生理盐水)、模型组、泼尼松组(5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)与芒果苷高、中、低剂量组(200, 100, 50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)^[2],每组 10 只。模型组、泼尼松组与芒果苷各剂量组每周尾静脉注射 1 次 LPS (200 μg · kg⁻¹),正常组注射等量无菌生理盐水,共

[稿件编号] 20101020009

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973916);广西科技厅自治区重点实验室培育项目(09320005)

[通信作者] * 邓家刚, Tel: (0771) 3137555, Fax: (0771) 3137555, E-mail: dengjg@tom.com

[作者简介] 卫智权,博士研究生, Tel: (0771) 3943296



4周。首次注射LPS后次日开始灌胃给药,共4周。

2.2 标本采集与处理 实验第4周末,以2%戊巴比妥钠 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉,下腔静脉穿刺取血6 mL,其中1 mL用于全血白细胞计数;1 mL加入红细胞裂解液3 mL混匀,静置5 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心1 min,收集白细胞,冻存于 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 供RT-PCR用;其余4 mL室温静置30 min后于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min获得血清,分装冻存于 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 备用血清TNF- α , IL-6, sICAM-1。

2.3 全血白细胞计数 取全血20 μL ,加白细胞稀释液380 μL ,充分混匀后充入细胞计数板进行白细胞计数。

2.4 RT-PCR检测白细胞 p38, ERK, JNK 基因表达

按照试剂盒说明书操作步骤,提取白细胞总RNA,以总RNA为模板、Oligo dT为引物合成cDNA。所用目的基因与内参基因 β -actin 的引物序列、扩增产物长度、退火温度见表1。PCR反应体系: $2 \times \text{Taq Plus PCR MasterMix } 25 \text{ } \mu\text{L}$, 上下游引物各 $2 \text{ } \mu\text{L}$, cDNA $2 \text{ } \mu\text{L}$, ddH₂O $19 \text{ } \mu\text{L}$ 。PCR反应条件: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性5 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性45 s, 退火45 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸1 min, 30个循环, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 最终延伸5 min。PCR反应结束,取目的基因与内参基因扩增产物各 $5 \text{ } \mu\text{L}$, 混匀,上样于3%琼脂糖凝胶进行水平电泳 ($5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1} \times 60 \text{ min}$),凝胶成像分析仪测定扩增产物条带灰度并计算二者的比值作为基因的相对表达量。

表1 PCR引物信息

基因	引物序列		产物长度 /bp	退火温度 / $^\circ\text{C}$
	上游	下游		
p38	CGAGACCGTTTCAGTCCATCAT	CAGTCTTCATTCACAGCGAGGTT	319	56
ERK	CTCTGTCAATGCCACCA	ATCCACTCTCCATCTCCAT	387	56
JNK	CTCGGAACACCTTGTCCTGAA	CCATTCTTAGTTCGCTCCTCC	389	54
β -actin	CACCCGCGAGTACAACCTTC	CCCATACCCACCATCACACC	207	60.4

2.5 血清 TNF- α , IL-6, sICAM-1 检测 采用 IL-6, TNF- α , sICAM-1 的 ELISA 检测试剂盒,按照试剂盒说明书操作。以 Expert Curve 1.3.8 曲线拟合软件计算标准曲线的直线回归方程,分别计算样品浓度。

2.6 统计学处理 所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 13.0 统计软件进行多个样本间均数比较。方差齐性数据采用单因素方差分析 LSD 检验,方差不齐数据采用 Kruskal Wallis 秩和检验,以 $P < 0.05$

为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 芒果苷对全血白细胞总数的影响 与正常组比较,模型组血白细胞总数显著增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较,泼尼松与 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 芒果苷可明显抑制 LPS 引起的血白细胞总数增加 ($P < 0.05$), $100, 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 芒果苷亦显示降低白细胞总数但差异无统计学意义,见表2。

表2 大鼠全血白细胞总数与 p38, ERK, JNK 基因表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	WBC/ $\times 10^9$ 个/L	p38	ERK	JNK
正常	-	7.28 ± 1.94	0.275 ± 0.057	0.295 ± 0.053	0.191 ± 0.051
模型	-	$13.15 \pm 1.75^{1)}$	$0.413 \pm 0.079^{1)}$	$0.368 \pm 0.084^{1)}$	$0.299 \pm 0.061^{1)}$
泼尼松	5	$8.39 \pm 1.62^{2)}$	$0.286 \pm 0.047^{2)}$	$0.288 \pm 0.060^{2)}$	$0.228 \pm 0.051^{2)}$
芒果苷	200	$8.49 \pm 2.03^{2)}$	0.412 ± 0.061	$0.302 \pm 0.062^{2)}$	$0.236 \pm 0.066^{2)}$
	100	11.67 ± 1.21	0.424 ± 0.063	0.334 ± 0.073	0.283 ± 0.058
	50	12.24 ± 1.24	0.401 ± 0.057	0.352 ± 0.075	0.300 ± 0.046

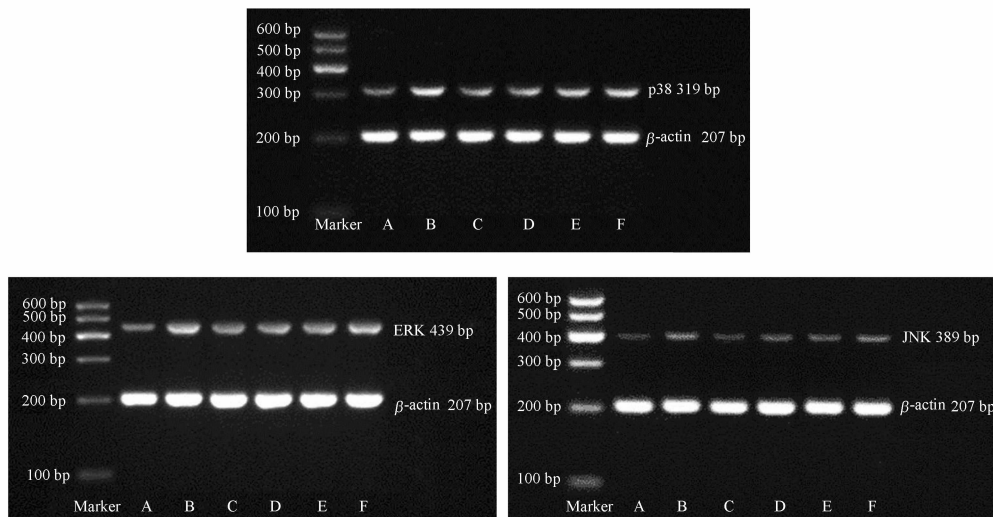
注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 芒果苷对白细胞 p38, ERK, JNK 基因表达的影响 与正常组比较,模型组 p38, ERK, JNK 基因表达显著上调 ($P < 0.05$)。与模型组比较,泼尼松

可明显抑制 LPS 引起的白细胞 p38, ERK, JNK 基因表达上调 ($P < 0.05$); $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 芒果苷可明显抑制 LPS 引起的白细胞 ERK, JNK 基因表达上

调($P < 0.05$),但对 p38 基因表达未能显示有统计学意义的下调作用;100,50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 芒果苷

稍下调 p38,ERK,JNK 基因表达,但差异无统计学意义,见表2,图1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 泼尼松组;D. 芒果苷高剂量组;E. 芒果苷中剂量组;F. 芒果苷低剂量组。

图1 各组大鼠 p38,ERK,JNK 基因表达

3.3 芒果苷对血清 TNF- α ,IL-6,sICAM-1 水平的影响 与正常组比较,模型组血清 TNF- α ,IL-6,sICAM-1水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,泼尼松与 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 芒果苷可明显抑制

LPS 引起的血清 TNF- α ,IL-6,sICAM-1 水平升高($P < 0.05$),100,50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 芒果苷虽然也降低血清 TNF- α ,IL-6,sICAM-1 水平,但差异无统计学意义,见表3。

表3 大鼠血清 IL-6,TNF- α ,sICAM-1 水平($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	IL-6/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	sICAM-1/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	594.78 \pm 263.45	61.86 \pm 14.10	179.62 \pm 60.38
模型	-	1 304.76 \pm 162.74 ¹⁾	119.49 \pm 10.15 ¹⁾	366.03 \pm 38.73 ¹⁾
泼尼松	5	632.02 \pm 148.61 ²⁾	62.80 \pm 9.74 ²⁾	201.67 \pm 48.93 ²⁾
芒果苷	200	833.89 \pm 190.86 ²⁾	68.96 \pm 10.87 ²⁾	213.57 \pm 59.02 ²⁾
	100	1 169.03 \pm 263.37	113.84 \pm 9.10	329.70 \pm 79.23
	50	1 179.32 \pm 180.29	115.59 \pm 14.12	335.73 \pm 77.22

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

芒果苷对急性炎症模型(小鼠耳肿胀模型、大鼠角叉菜胶足踝关节肿胀模型、大鼠皮下气囊炎症模型、大鼠胸/腹膜炎模型等)、慢性增生性炎症模型(大鼠棉球肉芽肿模型)均具有显著抑制作用^[1-2,5]。临床试用于治疗呼吸道感染性炎症的咳嗽、咳痰、喘息、发热等症状,具有显著疗效^[6],提示芒果苷体内应用具备抑制感染性炎症作用。而LPS介导的效应是导致感染性炎症损伤的最重要的原因

之一,研究芒果苷对介导LPS主要生物学效应的MAPK信号转导通路的影响,有助于阐明芒果苷抑制感染性炎症的作用机制。

哺乳动物体内存在3条与炎症密切相关的经典MAPK信号通路:p38通路、MAPK细胞外信号调节激酶(ERK)通路、c-Jun氨基末端激酶(JNK)通路和ERK5通路^[7-8]。关于LPS信号在细胞内传导的研究结果显示,干预LPS致炎信号的细胞内传递是人为控制炎症级联反应的重要途径,MAPK信号通路



在 LPS 致炎信号的细胞内传递中具有重要作用,是人为控制 LPS 诱导炎症反应的潜在靶位^[9-10]。

迄今为止的研究表明,LPS 首先与血浆中的 LPS 结合蛋白(LBP)结合,再结合于细胞表面的 CD14 分子,以 LPS-LBP-CD14 复合物形式与单核-巨噬细胞膜上的 TLR4 结合导致 TLR4 的聚合而活化,在分泌蛋白 MD-2 的辅助下,活化的 TLR4 胞内尾状结构激活胞质内的接头蛋白 MyD88 (myeloid differentiation protein,髓样分化蛋白 88),后者再与白介素 1 受体相关激酶(IL-1 receptor associated kinase, IRAK)结合,导致 IRAK 的自身磷酸化,然后与肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TNF- α receptor associated factor 6, TRAF6)相互作用并使其寡聚化,激活 MAPKKK, MAPKK 及其下游的主要信号分子 p38, ERK, JNK, 最后导致转录因子 AP-1 家族成员 jun 和 fos 活化,导致炎症因子的大量表达^[11]。因此,MAPK 信号通路的主要信号分子 p38, ERK, JNK 在 LPS 诱导的慢性炎症中扮演了关键性的角色。本研究中模型组大鼠接受 LPS 尾静脉注射后,白细胞 p38, ERK, JNK 基因表达明显高于正常组($P < 0.05$);反映炎症细胞动员与活化的病理生理指标全血白细胞计数与血清中重要的炎症细胞因子 TNF- α , IL-6, sICAM-1 水平也显著高于正常组($P < 0.01$),提示 MAPK 信号通路基因持续异常表达为 LPS 诱导慢性炎症的重要原因,故推测下调 p38, ERK, JNK 基因表达可能是抑制此类炎症的一个有效方法^[12]。

活化的白细胞是 LPS 诱导的慢性炎症病理进程中非常重要的促进因素,如上所述,活化的白细胞其 p38, ERK, JNK 基因表达明显上调,导致炎症因子的大量表达而使炎症状态持续存在。本研究结果显示,接受 LPS 注射的大鼠在灌胃给予芒果苷 200 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹后,全血白细胞计数与血清 TNF- α , IL-6, sICAM-1 水平均显著低于模型组($P < 0.05$),表明芒果苷可有效抑制 LPS 诱导的慢性炎症状态。本研究同时显示,灌胃给予芒果苷 200 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹可显著下调白细胞 ERK, JNK 基因表达(与模型组比较 $P < 0.05$),但对 p38 基因表达影响很小。此结果提示,芒果苷显著下调 ERK, JNK 基因表达可能是芒果苷抑制 LPS 诱导的慢性炎症的重要分子机制之一。

综上所述,芒果苷可有效地抑制 LPS 诱导的慢

性炎症,此有益的治疗效应与其抑制 ERK, JNK 基因的异常表达有关,提示芒果苷可能在影响广泛的 LPS 相关慢性炎症的治疗方面具有重要的潜在价值。然而,芒果苷在较大剂量(200 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹)方能显示明显的 ERK, JNK 基因调控作用,将削弱其实际的应用价值。导致此现象的原因尚不完全清楚,但也许与其分子结构中的 C-葡萄糖苷键在肠道中被某些厌氧拟杆菌裂解而降低芒果苷的生物利用度有关^[13],解决此问题可能需要从芒果苷的结构改造、制剂工艺等方面进行更多的研究。

[参考文献]

- [1] 邓家刚, 阎莉, 郭力城. 芒果苷对花生四烯酸代谢产物的影响[J]. 中国民族医药杂志, 2008, 8(8): 26.
- [2] 邓家刚, 郝二伟, 郑作文, 等. 芒果苷对两种不同炎症模型前列腺素 E2 含量的影响[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(10): 2085.
- [3] Ben-Haim S, Gacinovic S, Israel O. Cardiovascular infection and inflammation [J]. Semin Nucl Med, 2009, 39(2): 103.
- [4] Yuan H, Perry C N, Huang C, et al. LPS-induced autophagy is mediated by oxidative signaling in cardiomyocytes and is associated with cytoprotection [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296(2): H470.
- [5] 邓家刚, 郑作文, 曾春晖. 芒果苷的药效学实验研究[J]. 中医药学刊, 2002, 20(6): 802.
- [6] 覃骊兰, 梁爱武, 邓家刚. 芒果苷片治疗急性上呼吸道感染 30 例[J]. 山东中医杂志, 2008, 27(9): 587.
- [7] Boutins T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer [J]. Pharmacol Rev, 2008, 60(3): 261.
- [8] Zhou H Y, Shin E M, Guo L Y, et al. Anti-inflammatory activity of 4-methoxyhonokiol is a function of the inhibition of iNOS and COX4 expression in RAW 264.7 macrophages via NF- κ B, JNK and p38 MAPK inactivation [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 586(1/3): 340.
- [9] Waetzig G H, Seeger D, Rosenstiel P, et al. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF- α signaling in inflammatory bowel disease [J]. J Immunol, 2002, 168(10): 5342.
- [10] Hollenbach E, Neumann M, Vieth M, et al. Inhibition of p38 MAP kinase and RICK/NF- κ B signaling suppresses inflammatory bowel disease [J]. FASEB J, 2004, 18(13): 1550.
- [11] McAleer J P, Vella A T. Understanding how lipopolysaccharide impacts CD4 T-cell immunity [J]. Crit Rev Immunol, 2008, 28(4): 281.
- [12] Norm L D, Duong D, Peehl D M. Chemopreventive anti-inflammatory activities of curcumin and other phytochemicals mediated by MAP kinase phosphatase-5 in prostate cells [J]. Carcinogene-



sis, 2007, 28(6): 1188.

[13] Sanugul K, Akao T, Li Y, et al. Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibili-

ty of the enzyme that cleaves a C-glucosyl bond [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(9): 1672.

Effects of mangiferin on MAPK signaling pathway in chronic inflammation

WEI Zhiquan¹, YAN Li², DENG Jiagang^{2*}, DENG Jing³

(1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530001, China;

3. Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA)

[Abstract] **Objective:** To investigate mechanism of inhibition on the lipopolysaccharide induced chronic inflammation of mangiferin by the regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into normal control, model control, positive drug control (prednisone, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and mangiferin ($200, 100, 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group. The chronic inflammation models were established by intermittent injection of lipopolysaccharide via the tail vein. The leucocyte count was measured. The levels of serum tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to evaluate the expressions of p38, ERK, JNK gene of leucocyte in MAPK signaling pathway. **Result:** Compared with the model control, not only the leucocyte count and the level of serum TNF- α , IL-6, sICAM-1 but also the expressions of ERK, JNK gene of leukocyte were markedly reduced in mangiferin ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group ($P < 0.05$). However, there was no statistics significance for the expression of p38 gene between the model control and the mangiferin ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group. **Conclusion:** As a possible mechanism, the regulation of mangiferin on the expressions of ERK, JNK gene of leukocyte in MAPK signaling pathway was involved in its great inhibition on the chronic inflammation induced by lipopolysaccharide.

[Key words] mangiferin; chronic inflammation; MAPK signaling pathway; gene expression

doi:10.4268/cjmm20111323

[责任编辑 张宁宁]