

穿琥宁抗炎作用的血红素加氧酶-1 的信号转导机制

张波¹, 龙隆², 王莉莉², 刘克良², 宫泽辉¹

(军事医学科学院毒物药物研究所 1. 新药评定研究室, 2. 药物化学研究室, 北京 100850)

摘要:目的 初步探讨穿琥宁抗炎作用的信号转导机制。方法 用 WST-8 细胞计数试剂盒检测穿琥宁的细胞毒性;用 IN Cell Analyzer 2000 活细胞成像系统及组成型增强表达绿色荧光蛋白偶联 NF- κ BP65 (EGFP-NF- κ BP65)融合蛋白的 CHO 细胞和 EGFP 偶联促分裂原活化蛋白激酶 APk2 (EGFP-MAPK-APk2)融合蛋白的 BHK 细胞观察穿琥宁对白细胞介素 1 β (IL-1 β) 或肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导 NF- κ BP65 核转位及脂多糖 (LPS) 诱导的 P38MAPK 下游分子 MAPK-APk2 核转位的影响;Western 印迹法检测穿琥宁和血红素加氧酶-1 (HO-1) 特异性抑制剂锌原卟啉 (ZnPP) 对 RAW264.7 细胞 HO-1、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和环氧化酶 2 (COX-2) 表达的影响;Griess 反应和 ELISA 法测定穿琥宁对 RAW264.7 细胞一氧化氮 (NO) 和前列腺素 E₂ (PGE₂) 生成的影响。结果 穿琥宁 3 ~ 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 24 h 对 RAW264.7 细胞无细胞毒性。穿琥宁不能抑制由 IL-1 β 诱导的 NF- κ BP65 核转位和 LPS 诱导的 MAPK-APk2 核转位,对 TNF- α 诱导的 NF- κ BP65 核转位有较弱的抑制作用,抑制率为 20%,无明显浓度效应关系。穿琥宁 3, 10, 30 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 4 h 能诱导 RAW264.7 细胞 HO-1 表达,穿琥宁 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 6 h 显著抑制 IL-1 β 诱导的 COX-2 表达和 PGE₂ 产生,作用 12 h 抑制 iNOS 表达和 NO 产生。HO-1 活性抑制剂 ZnPP 能部分逆转穿琥宁的上述作用。结论 穿琥宁的抗炎作用可能主要通过 HO-1 信号转导,继而抑制 iNOS 和 COX-2 的表达及 NO 和 PGE₂ 的产生。对 NF- κ B 信号传导系统的调节作用尚不清楚。

关键词:穿琥宁;抗炎药(中药);血红素加氧酶-1;一氧化氮合酶;环氧化酶 2

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2013)01-0084-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.01.016

穿琥宁系穿心莲提取物穿心莲内酯经结构改造后所得化合物,是以穿心莲内酯为母核在其侧链的羟基位点进行了酯化、脱水、成盐而成。穿琥宁具有消炎退肿、解热镇痛、抗菌和抗病毒的作用,在临床上常用于治疗外感高热和急性感染性疾病等^[1-2]。以往研究主要集中在探讨原型药物穿心莲内酯的抗炎作用机制,提示其抗炎机制主要与阻断 NF- κ B 寡核苷酸与核酸蛋白的链接,进而降低诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和环氧化酶 2 (cyclooxygenase 2, COX-2) 表达有关^[3]。以往研究认为,穿心莲内酯通过抑制 NF- κ B 活性,降低炎性蛋白 iNOS 和 COX-2 的表达及 NO 和 PGE₂ 的产生是穿心莲抗炎机制之一^[4]。NF- κ B

是与炎症反应相关的基因表达调节分子^[5-6],在单核巨噬细胞膜上能激动 NF- κ B 通路的受体主要有白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β), 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 抑制其中任何一种受体都可以抑制 NF- κ B 的活性。目前尚无研究表明穿心莲内酯是通过膜受体产生效应,还是直接进入细胞内起作用,有关穿琥宁的研究更少。本研究采用高灵敏度的 IN Cell Analyzer 2000 活细胞成像系统,在特异性表达 IL-1 β 或 TNF 受体的组成性表达增强绿色荧光蛋白偶联 NK- κ BP65 (enhanced green fluorescent protein-NF- κ BP65) 融合蛋白的 CHO 细胞模型上,评价穿琥宁对 IL-1 β 和 TNF- α 诱导的 NF- κ BP65 核转位的抑制作用;在特异性表达 LPS 受体的组成性表达 EGFP 偶联促分裂原活化蛋白激酶 APk2 (EGFP-mitogen activated protein kinase APk2, EGFP-MAPK-APk2) 融合蛋白的 BHK 细胞模型上,评价穿琥宁对 LPS 诱导的 P38MAPK 下游分子 MAPK-APk2 核转位的抑制活性。

基金项目: 国家十一五科技重大专项综合性新药研究开发技术平台(2009ZX09301-002)

作者简介: 张波(1975-),男,博士研究生,主要从事新药评定研究。

通讯作者: 宫泽辉, E-mail: gongzeh@yahoo.com.cn; Tel: (010)66931620

1 材料与方法

1.1 药品、试剂和仪器

穿琥宁(粉末),成都一平科技发展公司。组成性表达 EGFP-NF- κ BP65 融合蛋白的 CHO 细胞购自美国 Thermo 公司;组成性表达 EGFP-MAPK-APK2 融合蛋白的 BHK 细胞购自美国 GE 公司;RAW264.7 细胞(单核巨噬细胞)购自协和细胞资源库;小鼠抗血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体、兔抗 iNOS 抗体和兔抗 COX-2 抗体均购自香港 Abcam 公司;小鼠抗 β 肌动蛋白抗体购自 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 抗体(二抗)均购自北京中杉金桥公司;杀稻瘟素(blasticidin)购自上海希美生物公司;IL-1 β 和 TNF- α 购自美国 PEPROTECH 公司,kB α 抑制剂(kB α inhibitor, I κ B α)特异性抑制剂 Ro106-9920 购自美国 Merck 公司;LPS 和锌原卟啉(zinc protoporphyrin, ZnPP)(HO-1 活性抑制剂)购自美国 Sigma 公司;WST-8 细胞计数试剂盒购自北京钮因华信科技发展有限公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒购自南京建成生物有限公司;前列腺素 E₂(prostaglandine E₂, PGE₂)ELISA 试剂盒购自泰泽瑞达(北京)科技有限公司;胎牛血清、G418、F12 培养液和 DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司;染色液购自美国 Invitrogen 公司。IN Cell Analyzer 2000 活细胞成像系统,美国 GE 公司;GENios pro 酶标仪,瑞士 TECAN 公司;垂直电泳槽,美国 Bio-Rad 公司;DYY-8C 型电泳仪,北京六一仪器厂;Thermo Forma 311 型水套式 CO₂ 培养箱,美国 Thermo 公司;凝胶成像仪,美国 Kodak 公司。

1.2 激动剂和化合物的配制

激动剂 IL-1 β 用含 0.1% 胎牛血清的 PBS 配成 10 mg·L⁻¹ 母液,用分析培养液配成 20 μ g·L⁻¹ (4 \times , 终浓度 5 μ g·L⁻¹) 工作液;I κ B α 抑制剂 Ro106-9920 用 DMSO 配成 25 mmol·L⁻¹ 母液,分析培养液配成 200 μ mol·L⁻¹ (4 \times , 终浓度 50 μ mol·L⁻¹);激动剂 TNF- α 用含 0.1% 胎牛血清的 PBS 配成 100 mg·L⁻¹ 母液,用分析培养液配成 40 μ g·L⁻¹ (4 \times , 终浓度 10 μ g·L⁻¹);激动剂 LPS 用 PBS 配成 1 g·L⁻¹ 母液,用分析培养液配成 4 mg·L⁻¹ (4 \times , 终浓度 1 mg·L⁻¹) 工作液;穿琥宁用 1% NaHCO₂ 水溶液配成 40 mmol·L⁻¹ 母液,用分析培养液配成 4 \times 工作液,选用 3, 10, 30 和 100 μ mol·L⁻¹ 连续 4 个浓度。工作液临用前配制,20 min 内使用。

1.3 细胞培养

组成性表达 EGFP-NF- κ BP65 融合蛋白的 CHO 细胞培养于含 G418 0.5 g·L⁻¹、杀稻瘟素 5 mg·L⁻¹ 和 10% 胎牛血清的 F12 培养液中;组成性表达 EGFP-MAPK-APK2 融合蛋白 BHK 细胞,培养于含 G418 0.5 g·L⁻¹ 和 10% 胎牛血清的 F12 培养液中;RAW264.7 细胞,培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中。上述细胞培养条件均为 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养。

1.4 细胞存活率测定

按照 WST-8 细胞计数试剂盒说明书测定细胞存活率。RAW264.7 细胞悬液(1 \times 10⁸ L⁻¹)按每孔 100 μ l 加入 96 孔板中(边缘孔用无菌水填充),培养过夜。每孔加入含穿琥宁终浓度分别为 3, 10, 30 和 100 μ mol·L⁻¹ 的培养液 10 μ l, 细胞对照和空白对照(不加细胞)组加等体积培养液,每组设 7 复孔,在培养箱培养 24 h 后每孔加入 WST-8 试剂 10 μ l, 在培养箱孵育 2 h 后,用酶标仪测定 450 nm 波长的吸光度(A)值。细胞存活率(%) = (A_{药物} - A_{空白对照}) / (A_{细胞对照} - A_{空白对照}) \times 100%

1.5 抑制 IL-1 β 和 TNF- α 诱导 NF- κ BP65 核转位分析

将组成性表达 EGFP-NF- κ BP65 融合蛋白的 CHO 细胞按每孔 100 μ l (含 1.5 \times 10⁴ 细胞)接种于预铺细胞黏附剂的 96 孔黑色孔底透光的细胞培养板中,在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 18~24 h。每孔细胞用 100 μ l 分析培养液洗 3 次,换 100 μ l 分析培养液,分细胞对照组、IL-1 β 5 μ g·L⁻¹ 激动剂组、Ro106-9920 (阳性对照) 50 μ mol·L⁻¹ + IL-1 β 5 μ g·L⁻¹ 组及穿琥宁 3, 10, 30 和 100 μ mol·L⁻¹ + IL-1 β 5 μ g·L⁻¹ 组,每组设 3 复孔。阳性对照和穿琥宁组 CHO 细胞先与 Ro106-9920 或穿琥宁作用 60 min,再加入 IL-1 β 作用 40 min,测定穿琥宁对 IL-1 β 诱导的 NF- κ BP65 核转位的影响。CHO 细胞分细胞对照组、TNF- α 10 μ g·L⁻¹ 激动剂组及穿琥宁 3, 10, 30 和 100 μ mol·L⁻¹ + TNF- α 10 μ g·L⁻¹ 组,每组设 3 复孔。穿琥宁组 CHO 细胞先与穿琥宁作用 60 min,再加入 TNF- α 作用 60 min,测定穿琥宁对 TNF- α 诱导的 NF- κ BP65 核转位的影响。每孔细胞用染色液 200 μ l 洗 3 次,并留在 200 μ l 染色液中室温染色 1 h。细胞在 IN Cell Analyzer 2000 活细胞成像系统上检测细胞质和细胞核荧光强度,每孔 5 个视野连续拍照。使用 GE 公司 IN Cell Analyzer 1000 Nuclear Trafficking Analysis Module 软件分析细胞核与细胞质荧光强度比值,表示报告基因核转位,并计算穿琥宁抑制核转位的活

性。穿琥宁抑制率(%) = (激动剂处理细胞核转位 - 穿琥宁处理细胞核转位) / (激动剂处理细胞核转位 - 对照组细胞核转位) × 100%。

1.6 抑制 LPS 诱导 MAPK-APk2 核转位分析

将组成性表达 EGFP-MAPK-APk2 融合蛋白的 BHK 细胞按每孔 100 μl (含 1.5×10^4 个细胞) 接种于预铺细胞黏附剂的 96 孔黑色孔底透光的细胞培养板中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养 18 ~ 24 h。每孔细胞用 100 μl 分析培养液洗 3 次, 换 100 μl 分析培养液, 分细胞对照组、LPS 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 激动剂组和穿琥宁 3, 10, 30 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + LPS 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, 每组设 3 复孔。穿琥宁组 BHK 细胞先与穿琥宁作用 60 min, 再加入 LPS 作用 30 min, 测定穿琥宁对 LPS 诱导的 MAPK-APk2 核转位的影响。每孔细胞用染色液 200 μl 洗 3 次, 并留在 200 μl 染色液中室温染色 1 h。同 1.5 测定并计算穿琥宁抑制核转位的活性。穿琥宁抑制率(%) = (穿琥宁处理细胞核转位 - 激动剂处理细胞核转位) / (对照组细胞核转位 - 激动剂处理细胞核转位) × 100%。

1.7 Western 印迹法测定 HO-1, iNOS 和 COX-2 蛋白表达

RAW264.7 细胞培养于 60 mm 细胞培养皿中, 用含穿琥宁终浓度分别为 3, 10, 30 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养液培养 4 h 后, 弃培养液, 用冷 PBS 清洗 3 次, 加入细胞裂解液, 裂解细胞提取细胞全蛋白, 考马斯亮蓝法测蛋白质浓度, 所提取的蛋白质用于检测 HO-1 的表达。同样将 RAW264.7 细胞培养于 60 mm 细胞培养皿中, 分细胞对照组、IL-1 β 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、IL-1 β 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 穿琥宁 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组和 IL-1 β 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 穿琥宁 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + ZnPP 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, 分别处理细胞 6 h, 提取总蛋白质用于检测 COX-2 蛋白表达; 分别处理 12 h, 提取总蛋白质用于检测 iNOS 蛋白表达。取蛋白质 40 μg 上样, 10% 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳, 随后电转移至硝酸纤维素膜, 分别用抗 HO-1 抗体 (1:2000), COX-2 抗体 (1:1000), iNOS 抗体 (1:1000) 或 β 肌动蛋白抗体 (1:5000) 一抗孵育过夜, 洗膜, 加入二抗孵育 1 h, 洗膜, 发光液孵育, 凝胶成像系统通过 Quantity one 软件分析各条带的积分吸光度 (integrated absorbance, IA)。目的蛋白的相对表达水平用 $\text{IA}_{\text{目的蛋白}} / \text{IA}_{\beta\text{肌动蛋白}}$ 比值表示。

1.8 细胞培养液中 PGE₂ 和 NO 含量测定

RAW264.7 细胞培养于 60 mm 细胞培养皿中, 分细胞对照组、IL-1 β 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、IL-1 β 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 穿琥宁 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、IL-1 β 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 穿琥宁

100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + ZnPP 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, 分别处理细胞 6 h, 取培养液, 按试剂盒说明书测定 PGE₂ 含量; 分别处理 12 h, 取培养液, 按试剂盒说明书测定 NO 含量。

1.9 统计学分析

实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS16.0 软件, 多组之间比较采用完全随机设计单因素多水平方差分析; 两两比较采用 q 检验; $P < 0.05$ 认为统计学差异显著。

2 结果

2.1 穿琥宁的细胞毒性作用

穿琥宁 3, 10, 30 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理 RAW264.7 细胞 24 h, 与细胞对照组比较, $A_{450 \text{ nm}}$ 均未发生明显变化, 细胞存活率均在 100% 以上, 表明穿琥宁小于 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 无明显细胞毒性 (表 1)。

Tab. 1 Effect of *Chuanhuning* on viability of RAW264.7 cells

<i>Chuanhuning</i> / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$A_{450 \text{ nm}}$	Viability rate / %
0	1.87 \pm 0.12	100 \pm 0
3	1.85 \pm 0.09	104 \pm 6
10	1.82 \pm 0.11	103 \pm 5
30	1.89 \pm 0.10	107 \pm 5
100	1.86 \pm 0.09	105 \pm 6

RAW264.7 macrophages were incubated with *Chuanhuning* for 24 h. The cell viability was determined at 450 nm with WST-8 cell count kit. Viability rate (%) = $(A_{\text{Drug}} - A_{\text{Blank}}) / (A_{\text{Cell control}} - A_{\text{Blank}}) \times 100\%$. $\bar{x} \pm s, n = 7$.

2.2 穿琥宁对 IL-1 β 诱导 NF- κ Bp65 核转位的影响

IL-1 β 受体激动剂 IL-1 β 能诱导 NF- κ Bp65 荧光蛋白从胞浆向核内转位, I κ B α 特异性抑制剂 Ro106-9920 能完全阻断其核转位效应, 其抑制率为 100% (图 1)。经计算, 穿琥宁 3, 10, 30 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 IL-1 β 诱导 NF- κ Bp65 核转位无抑制作用, 抑制率分别为 (9.3 \pm 7.8)%, (7.1 \pm 8.3)%, (4.7 \pm 8.3)% 和 (-4.5 \pm 8.6)% ($n = 3$), 提示穿琥宁的抗炎镇痛作用可能不是 IL-1 β 受体所介导的。

2.3 穿琥宁对 TNF- α 诱导 NF- κ Bp65 核转位的影响

TNF- α 受体激动剂 TNF- α 能诱导 NF- κ Bp65 荧光蛋白从胞浆向核内转位 (图 2)。穿琥宁 3, 10, 30 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 TNF- α 诱导 NF- κ Bp65 核转位有较弱的抑制作用, 经计算其抑制率分别为 (19.9 \pm 7.2)%, (18.1 \pm 8.5)%, (15.9 \pm 7.6)% 和 (16.2 \pm 8.8)% ($n = 3$), 提示穿琥宁的主要抗炎镇痛作用可能不是由 TNF- α 受体介导的。

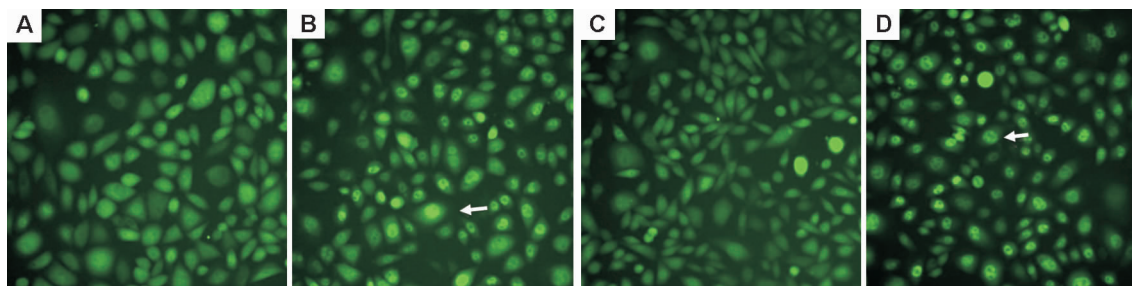


Fig. 1 Effect of *Chuanhuning* on nuclear transfer of NF-κBP65 induced by interleukin-1β (IL-1β) in CHO cells with enhanced green fluorescent protein (EGFP)-NF-κBP65 (×20). The green fluorescence was detected by IN Cell Analyzer 2000 live cell imaging system. A: control group, CHO cells were incubated in medium for 100 min, GFP was distributed in cytoplasm; B: IL-1β 5 μg·L⁻¹ group, CHO cells were incubated in medium for 60 min, then with IL-1β for 40 min, NF-κBP65 with GFP was transferred to the nucleus as shown by arrow; C: Ro106-9920 50 μmol·L⁻¹ + IL-1β 5 μg·L⁻¹ group, CHO cells were incubated with Ro106-9920 for 60 min, then coincubated with IL-1β for 40 min, nuclear transfer effect of GFP was blocked; D: *Chuanhuning* 100 μmol·L⁻¹ + IL-1β 5 μg·L⁻¹ group, CHO cells were incubated with *Chuanhuning* for 60 min, then coincubated with IL-1β for 40 min, nuclear transfer effect of NF-κBP65 could not be inhibited and GFP could still be observed in the nucleus as shown by arrow.

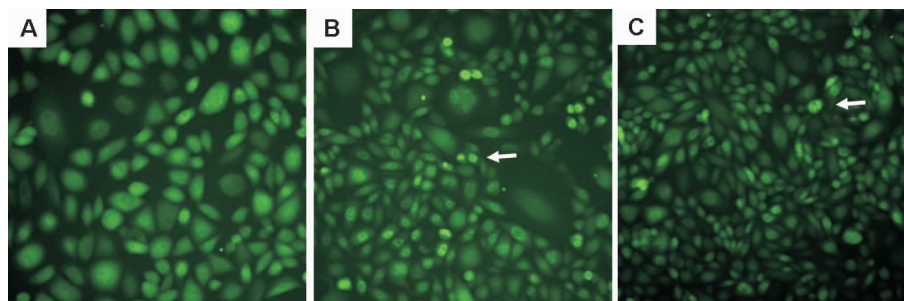


Fig. 2 Effect of *Chuanhuning* on nuclear transfer of NF-κBP65 induced by tumor necrosis factor-α (TNF-α) in CHO cells with EGFP-NF-κBP65 (×20). The green fluorescence was detected by IN Cell Analyzer 2000 live cell imaging system. A: control group, CHO cells were incubated in medium for 120 min, GFP was distributed in the cytoplasm and almost invisible in nucleus; B: TNF-α 10 μg·L⁻¹ group, CHO cells were incubated in medium for 60 min, then with TNF-α for 60 min, NF-κBP65 with GFP was transferred to the nucleus as shown by arrow; C: *Chuanhuning* 100 μmol·L⁻¹ + TNF-α 10 μg·L⁻¹ group, CHO cells were incubated with *Chuanhuning* for 60 min, then coincubated with TNF-α for 60 min, nuclear transfer effect of NF-κBP65 could not be inhibited and GFP could still be observed in the nucleus as shown by arrow.

2.4 穿琥宁对 LPS 诱导 MAPK-APk2 核转位的影响

LPS 受体激动剂 LPS 能诱导 MAPK-APk2 荧光蛋白从细胞核向细胞浆转位(图 3)。穿琥宁 3, 10, 30 和 100 μmol·L⁻¹ 对 LPS 诱导 MAPK-APk2

核转位无抑制作用,经计算其抑制率分别为(-6.1 ± 4.8)%, (-5.7 ± 4.7)%, (-5.0 ± 4.8)% 和 (-4.8 ± 5.8)% (n = 3),提示穿琥宁的抗炎镇痛作用可能不是由 LPS 受体介导的。

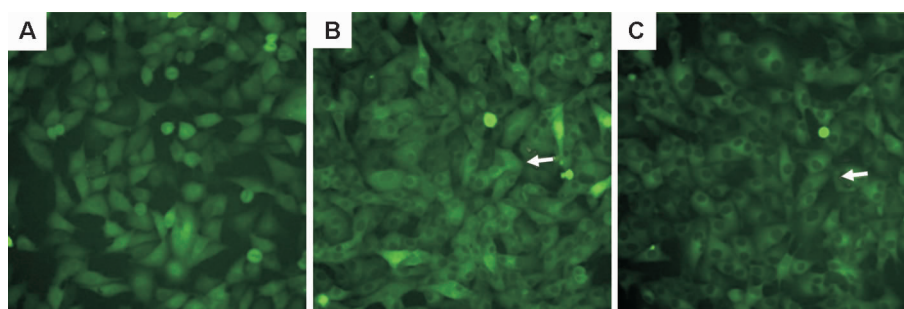


Fig. 3 Effect of *Chuanhuning* on nuclear transfer of mitogen activated protein kinase APk2 (MAPK-APk2) induced by lipopolysaccharides (LPS) in BHK cells with EGFP-MAPK-APk2 (×20). The green fluorescence was detected by IN Cell Analyzer 2000 live cell imaging system. A: control group, BHK cells were incubated in medium for 90 min, GFP gathered in the nucleus without agonist; B: LPS 1 mg·L⁻¹ group, BHK cells were incubated in medium for 60 min, then with LPS for 30 min, MAPK-APk2 with GFP was transferred to the cytoplasm under stimulating with LPS as shown by arrow; C: *Chuanhuning* 100 μmol·L⁻¹ + LPS 1 mg·L⁻¹ group, CHO cells were incubated with *Chuanhuning* for 60 min, then coincubated with LPS for 30 min, nuclear transfer effect of MAPK-APk2 could not be inhibited as shown by arrow.

2.5 穿琥宁对 RAW264.7 细胞 HO-1 蛋白表达的影响

如图 4 所示,穿琥宁 10, 30 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 分别处理 RAW264.7 细胞 4 h,能够诱导 HO-1 蛋白的表达 ($P < 0.01$); 穿琥宁 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用不明显。

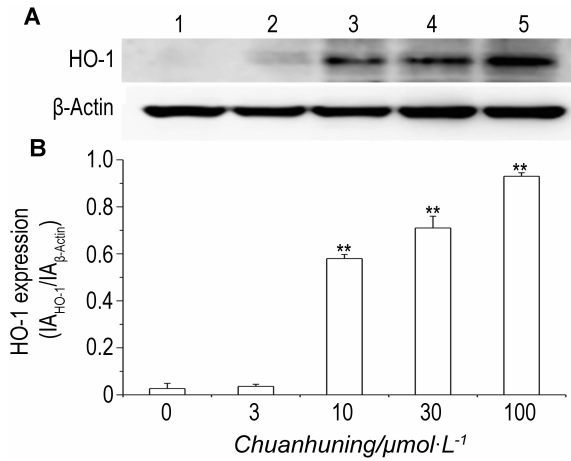


Fig. 4 Effect of *Chuanhuning* on heme oxygenase-1 (HO-1) expression in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated with *Chuanhuning* for 4 h. The expression of HO-1 was determined with Western blotting (A) and expressed as IA_{HO-1}/IA_{β-Actin} (B). IA: integrated absorbance. Lane 1: cell control; lane 2-5: *Chuanhuning* 3, 10, 30 and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P < 0.01$, compared with cell control group.

2.6 穿琥宁对 RAW264.7 细胞 COX-2 表达和 PGE₂ 产生的影响

如图 5 所示,在 IL-1 β 刺激下,RAW264.7 细胞 COX-2 表达明显增高 ($P < 0.01$),穿琥宁能明显抑制 IL-1 β 的刺激作用 ($P < 0.01$),HO-1 特异性拮

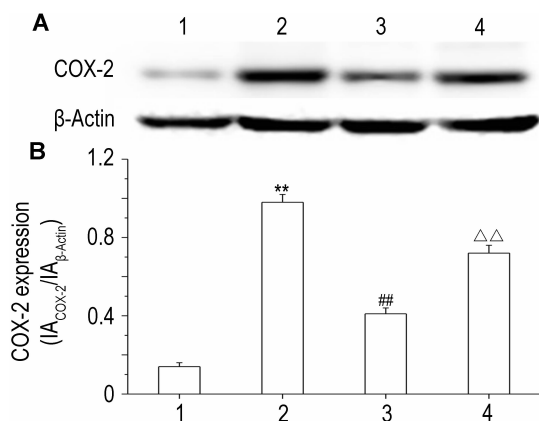


Fig. 5 Effect of *Chuanhuning* on cyclooxygenase 2 (COX-2) expression stimulated by IL-1 β in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated with IL-1 β , *Chuanhuning* + IL-1 β or *Chuanhuning* + IL-1 β + zinc protoporphyrin (ZnPP) for 6 h, respectively. The expression of COX-2 was determined with Western blotting (A) and expressed as IA_{COX-2}/IA_{β-Actin} (B). 1: cell control; 2: IL-1 β 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 3: *Chuanhuning* 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + IL-1 β 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 4: *Chuanhuning* 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + IL-1 β 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + ZnPP 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P < 0.01$, compared with cell control group; ## $P < 0.01$, compared with IL-1 β 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ group; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$, compared with *Chuanhuning* + IL-1 β group.

抗剂 ZnPP 能部分逆转穿琥宁对 IL-1 β 诱导 COX-2 表达的抑制作用 ($P < 0.01$)。同样,如图 6 所示,穿琥宁抑制 IL-1 β 诱导 PGE₂ 的产生 ($P < 0.01$), ZnPP 也部分逆转穿琥宁对 IL-1 β 诱导产生的抑制作用 ($P < 0.05$)。

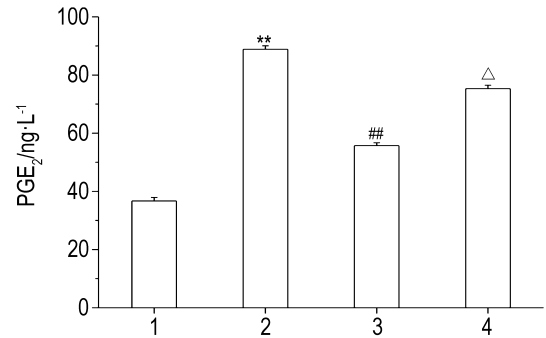


Fig. 6 Effect of *Chuanhuning* on production of prostaglandins E₂ (PGE₂) stimulated by IL-1 β in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated with IL-1 β , *Chuanhuning* + IL-1 β or *Chuanhuning* + IL-1 β + ZnPP, respectively, for 6 h. The PGE₂ concentration was determined with PGE₂ kit. 1: cell control; 2: IL-1 β 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 3: *Chuanhuning* 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + IL-1 β 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 4: *Chuanhuning* 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + IL-1 β 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + ZnPP 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P < 0.01$, compared with cell control group; ## $P < 0.01$, compared with IL-1 β group; Δ $P < 0.05$, compared with *Chuanhuning* + IL-1 β group.

2.7 穿琥宁对 RAW264.7 细胞 iNOS 表达和 NO 产生的作用

如图 7 所示,在 IL-1 β 刺激下,RAW264.7 细胞

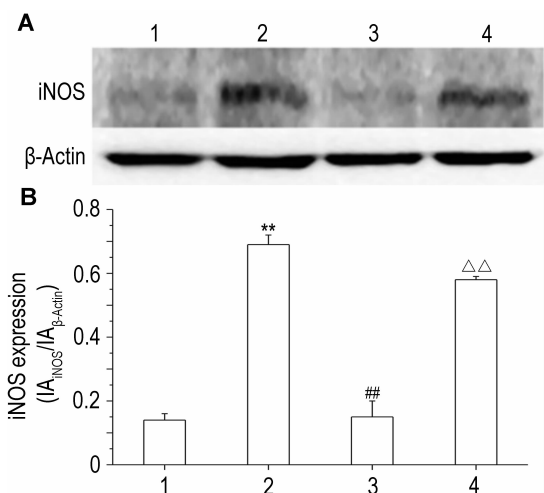


Fig. 7 Effect of *Chuanhuning* on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression stimulated by IL-1 β in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated with IL-1 β , *Chuanhuning* + IL-1 β or *Chuanhuning* + IL-1 β + ZnPP, respectively, for 12 h. The expression of iNOS was determined with Western blotting (A) and expressed as IA_{iNOS}/IA_{β-Actin} (B). 1: cell control; 2: IL-1 β 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 3: *Chuanhuning* 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + IL-1 β 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 4: *Chuanhuning* 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + IL-1 β 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + ZnPP 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P < 0.01$, compared with cell control group; ## $P < 0.01$, compared with IL-1 β group; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$, compared with *Chuanhuning* + IL-1 β group.

iNOS 表达明显高于细胞对照组 ($P < 0.01$), 穿琥宁作用后其表达下降 ($P < 0.01$), HO-1 特异性拮抗剂 ZnPP 部分逆转穿琥宁对 IL-1 β iNOS 表达的抑制作用 ($P < 0.01$)。同样, 如图 8 所示, 穿琥宁抑制 IL-1 β 诱导 NO 的产生 ($P < 0.01$), ZnPP 也部分逆转穿琥宁对 IL-1 β 诱导 NO 产生的抑制作用 ($P < 0.01$)。

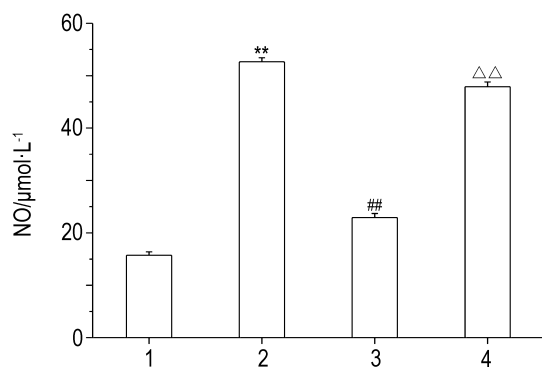


Fig. 8 Effect of Chuanhuning on production of nitric oxide (NO) stimulated by IL-1 β in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated with IL-1 β , Chuanhuning + IL-1 β or Chuanhuning + IL-1 β + ZnPP, respectively, for 12 h. The NO concentration was determined with kit. 1: cell control; 2: IL-1 β 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 3: Chuanhuning 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + IL-1 β 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 4: Chuanhuning 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + IL-1 β 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + ZnPP 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. $\bar{x} \pm s, n=3$. ** $P < 0.01$, compared with cell control group; ## $P < 0.01$, compared with IL-1 β group; △△ $P < 0.01$, compared with Chuanhuning + IL-1 β group.

3 讨论

本研究结果显示, 穿琥宁对 CHO 细胞 IL-1 β 受体和 BHK 细胞 LPS 受体无抑制作用, 对 CHO 细胞 TNF- α 受体仅具有较弱的抑制活性 (抑制强度 20%), 且无明显的浓度效应关系。但是, 在 RAW264.7 细胞模型上, 穿琥宁能显著抑制 IL-1 β 刺激产生的炎性蛋白 iNOS 和 COX-2 的表达及 NO 和 PGE₂ 生成, 提示 NF- κ B 通路可能不是穿琥宁抗炎作用的主要机制。

炎症是组织对损伤因子产生的复杂防御反应。刺激单核巨噬细胞释放大量炎症因子的信号通路, 除了 NF- κ B 这条经典的抗炎通路外, 还存在其他的抗炎通路。目前研究较多的是 HO-1, HO-1 是血红素代谢的限速酶和起始酶, 能将血红素代谢成一氧化碳、胆绿素和游离的铁离子^[7], 这些代谢产物都是重要的生物效应分子, 在抗氧化、抗炎和抗增殖中发挥着重要的作用^[8-10]。据报道, 穿心莲内酯能够诱导 HO-1 的高表达^[11]。本研究在 RAW264.7 细胞模型上, 发现穿琥宁也能够诱导 HO-1 表达增加, 抑制由 IL-1 β 刺激产生的 iNOS 和 COX-2 高表达及

NO 和 PGE₂ 生成; HO-1 特异性拮抗剂 ZnPP 能显著阻断穿琥宁的作用, 部分逆转穿琥宁对炎性物质释放的抑制作用, 提示穿琥宁能促进 HO-1 蛋白表达, 其抗炎作用可能主要是通过促进 HO-1 蛋白表达, 继而抑制 iNOS, COX-2, NO 和 PGE₂ 等炎性物质的生成和释放, 最终发挥抗炎作用。综上所述, NF- κ B 信号通路可能不是穿琥宁发挥抗炎作用的主要通路, 其抗炎作用可能是通过 HO-1 信号通路发挥作用。HO-1 信号通路与 NF- κ B 信号通路之间相互调节机制尚不清楚。本研究为阐明穿琥宁的抗炎作用机制奠定了基础, 也为 HO-1 信号系统与 NF- κ B 通路可能存在相互调节的研究提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Long P, Fang WM, Xiang L. Clinical application of the Chuanhuning injection[J]. *Acta Chin Med Pharmacol* (中医药学报), 2001, **29**:52-54.
- [2] Na ZL, Qing SH, Qin Z, Qiong PS. The ADR analysis of Chuanhuning for 45 cases[J]. *China Pharmacy* (中国药房), 2004, **15**:300-301.
- [3] Xia YF, Ye BQ, Li YD, Wang JG, He XJ, Lin X, et al. Andrographolide attenuates inflammation by inhibition of NF-kappaB activation through covalent modification of reduced cysteine 62 of p50[J]. *J Immunol*, 2004, **173** (6):4207-4217.
- [4] Hidalgo MA, Romero A, Figueroa J, Cortés P, Concha II, Hancke JL, et al. Andrographolide interferes with binding of nuclear factor-kappaB to DNA in HL-60-derived neutrophilic cells[J]. *Br J Pharmacol*, 2005, **144** (5):680-686.
- [5] García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, et al. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, **557** (2-3):221-229.
- [6] Konson A, Mahajna JA, Danon A, Rimon G, Agbaria R. The involvement of nuclear factor-kappa B in cyclooxygenase-2 overexpression in murine colon cancer cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase gene [J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, **13** (12):1093-1104.
- [7] Chung HT, Pae HO, Cha YN. Role of heme oxygenase-1 in vascular disease[J]. *Curr Pharm Des*, 2008, **14** (5):422-428.
- [8] Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **338** (1):558-567.
- [9] Gueller F, Park JK, Rong S, Kirsch T, Lindschau C, Zheng W, et al. Statins attenuate ischemia-reperfusion injury by inducing heme oxygenase-1 in infiltrating macrophages[J]. *Am J Pathol*, 2007, **170** (4):1192-1199.
- [10] Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase[J]. *Pharmacol Rev*, 2008, **60**

(1):79-127.

- [11] Yu AL, Lu CY, Wang TS, Tsai CW, Liu KL, Cheng YP, et al. Induction of heme oxygenase 1 and inhibition of tumor

necrosis factor alpha-induced intercellular adhesion molecule expression by andrographolide in EA. hy926 cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(13):7641-7648.

Heme oxygenase-1 signaling mechanism of *Chuanhuning* anti-inflammatory effect

ZHANG Bo¹, LONG Long², WANG Li-li², LIU Ke-liang², GONG Ze-hui¹

(1. Department of Drug Evaluation, 2. Department of Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To explore the anti-inflammatory mechanism of *Chuanhuning*. **METHODS** Cell survival was measured with WST-8 kit. NF- κ BP65 and mitogen activated protein kinase APk2 (MAPK-APk2) nuclear translocation was studied in CHO cells with NF- κ BP65-enhanced green fluorescent protein (EGFP) fusion protein and BHK cells with EGFP-MAPK-APk2 fusion protein. The protein expression of heme oxygenase-1 (HO-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX-2) of RAW264.7 cells was detected by Western blotting. The concentration of nitric oxide (NO) and prostaglandins E₂ (PGE₂) of RAW264.7 cells was measured by Griess reaction and ELISA. **RESULTS** *Chuanhuning* 3 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h had no cytotoxicity for RAW264.7 cells. *Chuanhuning* 3 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ could not inhibit NF- κ BP65 nuclear translocation or MAPK-APk2 nuclear translocation induced by interleukin-1 β (IL-1 β) or lipopolysaccharides (LPS). *Chuanhuning* 3 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ weakly inhibited NF- κ BP65 nuclear translocation induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α), and the inhibitory rate was 20% and had no concentration-effect relationship. The protein expression of HO-1 in RAW264.7 cells was induced by *Chuanhuning* 3, 10, 30 and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 4 h. *Chuanhuning* 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 6 h inhibited COX-2 expression and PGE₂ production, and for 12 h inhibited iNOS expression and NO production induced by IL-1 β of RAW264.7 cells. Zinc protoporphyrin partially reversed the inhibitory effect of *Chuanhuning* on iNOS and COX-2 expression and NO and PGE₂ production. **CONCLUSION** The anti-inflammatory mechanism of *Chuanhuning* may be related to its inhibition of iNOS and COX-2 expression and NO and PGE₂ production via up-regulation of HO-1 pathway. The regulatory role of *Chuanhuning* for the NF- κ B signaling system remains unclear.

Key words: *Chuanhuning*; anti-inflammatory drugs (TCD); heme oxygenase-1; nitric oxide synthase; cyclooxygenase 2

Foundation item: The project supported by National "the 11th Five-Years Plan" Scientific and Technological Major Special Project of Integrated New Drug R&D Technology Platforms (2009ZX09301-002)

Corresponding author: GONG Ze-hui, E-mail: gongzeh@yahoo.com.cn, Tel: (010)66931620

(收稿日期: 2012-05-23 接受日期: 2012-10-11)

(本文编辑: 齐春会)