

黄连解毒汤主要成分的体外抗炎作用研究

胡淑平, 王怡, 于平野, 于晓敏, 潘晓军, 周慧萍* (温州医科大学, 浙江 温州 325035)

摘要: 目的 研究黄连解毒汤主要成分(黄连素、汉黄芩素)的体外抗炎作用及机制。方法 以小鼠 J774A.1 巨噬细胞为研究对象, 分别设对照组, 脂多糖(LPS)处理组, 药物(不同剂量的黄连解毒汤主要成分)处理组; 加入药物 2 h 后再加入 LPS 继续培养 24 h, 分别采用 ELISA 法检测关键炎症因子 TNF- α 、IL-6 表达; 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测细胞中 COX-2 mRNA 的水平; Western blot 法测定细胞中 COX-2 蛋白的表达。结果 黄连解毒汤主要成分黄连素、汉黄芩素能显著抑制 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞中 TNF- α 、IL-6 的表达以及 COX-2 mRNA 和 COX-2 蛋白的表达。结论 黄连解毒汤的抗炎作用可能与其主要成分黄连素和汉黄芩素抑制 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的活性及下调 COX-2 的表达有关。

关键词: 黄连素; 汉黄芩素; 抗炎; 体外

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)10-1171-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.10.002

Study on *in Vitro* Anti-inflammatory Mechanism of the Essential Component of Huanglian Jiedu Decoction

HU Shuping, WANG Yi, YU Pingye, YU Xiaomin, PAN Xiaojun, ZHOU Huiping* (Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To elucidate the mechanism of anti-inflammatory effect of the essential component of Huanglian Jiedu decoction(HLJD) *in vitro*. **METHODS** RAW264-7 cells and J774A.1 cells were allocated to blank control group, model group (treated with LPS) and HLJD groups (treated with berberine, wogonin, baicalein and jasminoidin, respectively). After being treated with HLJD for 2 h and then incubated with LPS for 24 h, ELISA was used to detect the level of TNF- α , IL-6; mRNA expression of COX-2 was examined by RT-PCR, and COX-2 protein expression in cells was analysed by Western blot. **RESULTS** HLJD remarkably reduced TNF- α , IL-6 and COX-2 production in peritoneal macrophages elicited by LPS. **CONCLUSION** HLJD displays an anti-inflammatory effect mainly through inhibiting the production of inflammatory cytokines including TNF- α , IL-6 and COX-2.

KEY WORDS: berberine; wogonin; anti-inflammation; *in vitro*

最新的研究表明, 动脉粥样硬化是一种炎症性疾病^[1-3]。我国传统中药复方利用成分之间相互作用, 不仅能提高疗效, 而且可以减少不良反应, 因此从中药复方中筛选辅助治疗药物是经济可行的。黄连解毒汤具有泻火解毒、消炎抗病毒之功效, 本实验在黄连解毒汤体现出较好抗炎活性的基础上^[4], 研究其主要成分(黄连素、汉黄芩素)协同抑制脂多糖(LPS)引起巨噬细胞中炎症因子释放的分子机制和信号传递通路, 为结合体外细胞模型和动物模型进一步验证该剂对炎症反应型动脉粥样硬化的防治作用奠定基础, 为中药现代化寻找有效治疗炎症性动脉硬化的辅助药物提供可靠的依据。

1 材料与仪器

CO₂ 细胞培养箱(美国 ThermoForma 公司); Galaxy 16DH 4 °C 低温离心机(美国 VWR International 公司); Wallac 1420 多功能全波长读板仪(美国 PerkinElmer 公司); C100 Thermal Cycler PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); IQ5 Multicolor Real-time PCR 检测系统(美国 Bio-Rad 公司); Bio-Rad Criterion cell 电泳系统(美国 Bio-Rad 公司); Trans-Blot cell 转膜系统(美国 Bio-Rad Lab 公司)。

黄连素(Sigma-Aldrich 公司, 批号: 110713-200911)。汉黄芩素(天津医工院, 批号: 111514-200403)。LPS(Sigma-Aldrich 公司)。小鼠 J774A.1 巨噬细胞由美国弗吉尼亚联邦大学医学院免疫与

基金项目: 国家自然科学基金项目(81070245); 浙江省自然科学基金项目(Y2110407); 浙江省中医药科学研究基金计划(2011ZA071); 浙江省卫生厅医药卫生平台骨干人才计划项目(2011RCB025)

作者简介: 胡淑平, 女, 博士, 讲师 Tel: 18858716935 E-mail: hsp008@yeah.net *通信作者: 周慧萍, 女, 博士, 教授 Tel: (0577)86699575 E-mail: 332577450@qq.com

微生物系分子药理实验室提供。DMEM 培养基 (Invitrogen 公司); 小牛血清 (FBS, Atlanta Biologicals 公司); 青霉素和链霉素均购自 Mediatech 公司。全细胞裂解液、伯乐蛋白测定试剂盒、硝酸纤维素膜均购自 Bio-Rad Lab 公司; 抗体 COX-2 (Santa Cruz Biotechnology 公司); 抗体 Actin (Ab-1, JLA20, Calbiochem 公司); RNA 收集分离试剂盒 (BIOLINE 公司); cDNA 逆转录试剂盒 (AB Applied Biosystems 公司); RNA 酶抑制剂 (Invitrogen 公司); PCR Mix Buffer (Bio-Rad 公司)。Anti-TNF- α 和 IL-6 IgG 及 TNF- α 和 mouse IL-6 标准品 (eBioscience 公司)

2 方法

2.1 巨噬细胞总蛋白提取及蛋白定量

巨噬细胞吸去培养液, 加入 1 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH=7.4), 用刮刀将培养皿中的细胞刮下置于 1.5 mL 试管中, 8 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 移去上清液后加入 300 μL 全细胞裂解液。 -80°C 冻融 1 次, 并于 4°C 下旋涡振荡 3~5 次 (每次 1 min) 裂解细胞后, 于 4°C 低温离心机中 4 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液于 -80°C 保存。配置浓度为 20% 的伯乐蛋白测定液, 于 500 μL 该溶液中加入 2 μL 上述含有细胞蛋白质的上清液, 搅拌均匀后置于 Wallac 1420 多功能全波长读板仪中用 Wallac 1420 软件中的蛋白质检测程序测定 595 nm 处的吸光度并与空白校正, 通过对照蛋白浓度-光密度标准曲线求出相应的蛋白浓度值。

2.2 Western blot 分析

根据检测的目的蛋白表达多寡定量蛋白的上样量, 将上样液加入凝胶加样孔内, 4°C 低温下放置于电泳缓冲液中电泳, 随后将电泳胶上的蛋白信息转移至硝酸纤维素膜。用 5% 脱脂牛奶封闭膜上的非特异性结合位点, 室温 1 h。将膜与 1:500 稀释的抗 COX-2 或 Actin 抗体共孵, 4°C 过夜。用 TBS 缓冲液洗膜 3 次, 每次 15 min。再与 1:10 000 稀释的标记有 HRP 的抗鼠 IgG 或抗兔 IgG 抗体共孵, 室温 2 h, 用 TBS 缓冲液洗涤膜 3 次, 每次 10 min, 然后将膜与化学发光底物共孵 1 min, 将膜与医用 X-光胶片置于暗盒中曝光, 冲洗胶片显影。

2.3 酶联免疫测定法 (ELISA)

将收集的细胞培养液从 -80°C 冰箱取出, 放在冰上溶解后于 8 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4°C 离心 5 min。按试剂盒检测 TNF- α 和 IL-6 浓度, 所得浓度用相应样

品的蛋白浓度校准, 消除细胞数量差异对炎症因子产生量的影响。

2.4 逆转录-定量 PCR (RT-qPCR)

按高通量 cDNA 逆转录试剂盒构建逆转录体系, 用 Mastercycler gradient PCR 仪进行逆转录。逆转录后得含 cDNA 的溶液 20 μL , 其中 cDNA 浓度为 100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。目的基因引物的设计: mouse TNF- α 正向引物 5'-TGGAAGTGGCAGAAGA GG-3', 反向 5'-AGACAGAAGAGCGTGGTG-3'; mouse IL-6 基因引物: 正向引物 5'-GAGGATACC ACTCCAAGAGACC-3', 反向引物 5'-AAGTGC ATCATCGTTGTTTCATACA-3'; mouse Actin 基因引物: 正向 5'-ACCACACCTTCTACAATGAG-3', 反向引物 5'-ACGACCAGAGGCATACAG-3'。mouse COX-2 正向引物 5'-GGAGTCTGGAACAT TGTGAAC-3'; 反向引物 5'-GGTGTAGTAGGAGA GGTGG-3'。引物与 PCR Mix Buffer 以 1:100 混合, 取混合液 62.7 μL , 加入稀释后的 cDNA 溶液 3.3 μL , 均匀混合后分装入 PCR 专用 96 孔板, 每孔 20 μL , 重复 3 孔。QC-PCR 使用仪器为 IQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System; 软件系统: Bio-Rad IQ5 2.0.148.60623 (Bio-Rad Co., USA); PCR 程序: 第一阶段 95°C 10 min; 第二阶段 94°C 30 s, 57°C 45 s, 共 40 个循环; 通过 QCPCR 仪检测到目标基因扩增到特定数量时的周期数, 用该周期数减去同一样品作为内标的 GAPDH 或 Actin mRNA 的周期数, 所得差值与对照组校准, 校准后的值 x (对照组 $x=0$) 再通过公式 $y=2^{-x}$ 求得样品中目标 mRNA 的相对含量 (对照组 $y=1$)。

3 结果

3.1 黄连素、汉黄芩素抑制 LPS 诱导小鼠巨噬细胞中 TNF- α 和 IL-6 的表达

分别用 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄连素和 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 汉黄芩素处理小鼠 J774A.1 巨噬细胞 2 h 后, 与 LPS (黄连素组为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 汉黄芩素组为 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 一起孵育 24 h。显微镜下用胎盼蓝染色计数法来计数细胞, 药物处理后细胞数量与对照组没有显著差异, 均为 2×10^6 。收集细胞培养液, 测定上清液中的 IL-6 及 TNF- α , 结果见图 1。与对照组相比, LPS 能显著升高 IL-6 及 TNF- α 水平, 而黄连素能够显著抑制 LPS 诱导的巨噬细胞分泌 TNF- α 和 IL-6; 汉黄芩素对 LPS 诱

导的巨噬细胞分泌 TNF- α 和 IL-6 的表达亦有显著抑制作用。

用相同的方法处理细胞, 收集总 RNA, 用 RT-qPCR 检测黄连素和汉黄芩素对 LPS 诱导的巨噬细胞中 TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达的影响。结果见图 1。与对照组相比, LPS 能显著升高 TNF- α 和 IL-6 mRNA 的水平, 黄连素能显著抑制 LPS 诱导的巨噬细胞中 TNF- α 和 IL-6 mRNA 的表达。汉黄芩素对于 IL-6 mRNA 的表达抑制非常明显, 但增加 TNF- α mRNA 的水平。汉黄芩素出现和笔者预期结果相反的结果, 是一个非常有趣的现象, 这也是中药复方多成分共同作用的综合疗效和单味药或单体成分的单独作用相比较, 往往会出现不一致现象的再次印证。应用中并不能因此而轻易去掉此单体成分或其在所在的单味药, 因为复方的作用并不是各个单味药作用的简单叠加, 而很有可能出现了新的作用和变化, 最终在整体上使治疗作用更加有效。

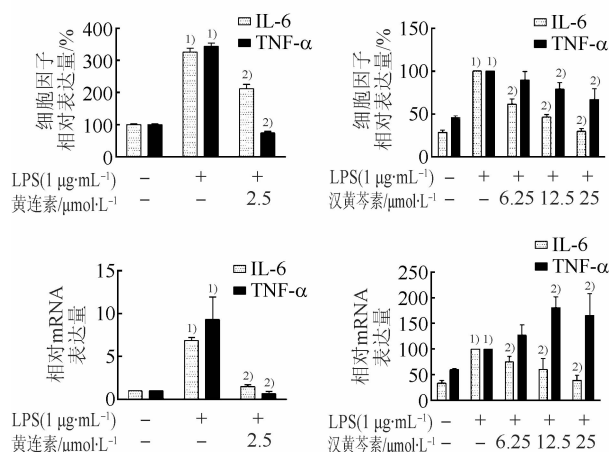


图 1 黄连素、汉黄芩素对 LPS 诱导小鼠 J774A.1 型巨噬细胞中 TNF- α 和 IL-6 表达的影响
与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。
Fig. 1 Effect of berberine and wogonin on LPS induced TNF- α and IL-6 expression in J774A.1 macrophages
Compared with blank control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with LPS group, ²⁾ $P < 0.05$.

3.2 黄连素、汉黄芩素抑制 LPS 诱导小鼠巨噬细胞中 COX-2 的表达

小鼠 J774A.1 巨噬细胞分成 2 组, 一组分别用 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 汉黄芩素处理 2 h, 然后与 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 一起孵育 24 h。另一组加入 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄连素 2 h, 然后与 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 一起孵育 24 h。2 组细胞均收集总蛋白及总 RNA 分别检测 COX-2 蛋白、COX-2 mRNA 的表达量。

汉黄芩素不仅能在蛋白表达水平上抑制 COX-2 的表达, 同时也能显著抑制 COX-2 mRNA 在 LPS 诱导小鼠巨噬细胞炎症反应中的表达。在黄连素的实验中也观察到相同结果。结果表明黄连解毒汤主要组分中的黄连素和汉黄芩素均对 LPS 诱导小鼠巨噬细胞表达 COX-2 有很好的抑制作用。结果见图 2。

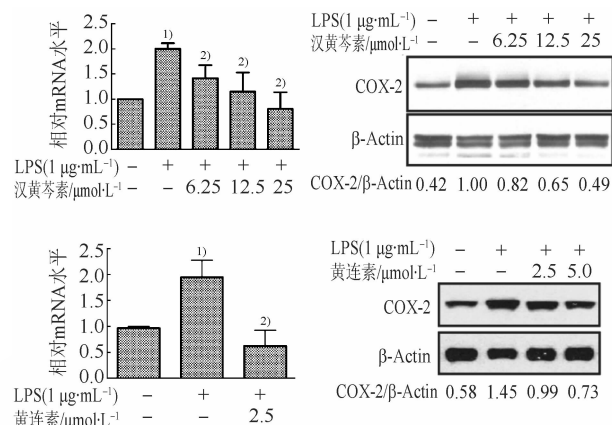


图 2 黄连素、汉黄芩素抑制 LPS 诱导的小鼠 J774A.1 巨噬细胞中 COX-2 表达的作用
与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。
Fig. 2 Effect of berberine and wogonin on LPS induced COX-2 expression in J774A.1 macrophages
Compared with blank control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with LPS group, ²⁾ $P < 0.05$.

4 讨论

过度的炎症反应会诱发多种疾病。除呼吸系统、消化系统、泌尿生殖系统炎症疾病外, 近期研究表明动脉粥样硬化、糖尿病等都有炎症反应参与。当机体受到感染或刺激时巨噬细胞会产生大量的炎症因子^[5]。TNF- α 是炎症反应过程中出现最早、最重要的炎性介质, 能激活中性粒细胞和淋巴细胞, 使血管内皮细胞通透性增加, 调节其他组织代谢活性并促使其他细胞因子的合成和释放。IL-6 能诱导 B 细胞分化和产生抗体, 并诱导 T 细胞活化增殖、分化, 参与免疫应答, 是炎症反应的促发剂。上述炎症因子会活化自身的环氧合酶(cyclooxygenase, COX), 包括 COX-1 及 COX-2 2 大类。COX-2 与炎症性疾病的关系密切^[6], 各种炎症疾病和动物炎症模型的炎性渗出液中均发现 COX-2 mRNA 和蛋白表达增强, 同时 COX-2 会使花生四烯酸大量转变为 PGE₂、PGF_{2 α} 等前列腺素类化合物, 并伴随 PGI₂ 代谢物和 TXA₂ 水平的提高, 诱发下游炎症反应。实验结果显示, 黄连素能显著抑制小鼠巨噬细胞中 TNF- α 、IL-6 以及

COX-2 蛋白与 mRNA 的表达。汉黄芩素能在蛋白水平显著抑制小鼠巨噬细胞中 TNF- α 、IL-6 以及 COX-2 的表达,但在 mRNA 水平仅能抑制 IL-6 与 COX-2 mRNA,对 TNF- α 的 mRNA 反而有促进其表达的作用,其量效关系也不显著,推测 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量下的汉黄芩素对 TNF- α 的 mRNA 调控可能增加了其 mRNA 的稳定性,进而导致 mRNA 上调,但汉黄芩素可能抑制了 TNF- α 的蛋白水平表达或分泌。

对 LPS 诱导炎症的抑制作用是用来表征药物抗炎作用的主要方法之一^[7-9]。本实验结果显示,汉黄芩素能明显抑制 IL-6 的表达,但同时却增加 TNF- α 在巨噬细胞中的表达量。汉黄芩素为何能在诱导 TNF- α 表达增加的同时抑制 IL-6 的表达还需要进一步的研究。

通过对黄连解毒汤中 2 种主要组分的抗炎活性筛选,发现黄连素和汉黄芩素不仅可以抑制相关炎症因子在蛋白水平上的表达,而且对其 mRNA 也同样具有很好的抑制作用。下一步工作将对上述成分对于关键炎症因子 mRNA 的调控机制进行研究。为了深入研究黄连解毒汤中的主要成分对于关键炎症因子 mRNA 的调控机制,首先弄清楚所使用的炎症造模药物 LPS 是如何参与到对炎症因子的调控有着重要的意义。

本实验的特色与创新之处在于:①通过拆方研究中中药复方主要的单体成分协同用药作用机制。由于在前期实验中发现小檗碱能在多种细胞中强烈抑制 LPS 诱导的炎症因子释放和 TNF- α 浸润,使笔者相信传统中药里肯定能找到含有小檗碱的中药复方来防治 HIV-PIs 导致的炎症性动脉粥样硬化。通过大量筛选终于在体外发现黄连解毒汤能够抑制利托那韦引起的泡沫细胞的形成,具有明显的保护作用,进一步确定该复方很可能应用于 HIV 的辅助治疗。尽管中药复方的药理作用不能完全等同于几个单体成分的协同用药,但复方里含量最多的几个单体成分应该是起到了主要的药理作用,通过体内体外实验研究其分子机制,探讨作用的靶点和信号传递通路是中药复方药理研究的一条新的道路,也能够被国际学术界承认。本研究将继续利用这一思路探讨黄连解毒汤的药

理学活性和机制,期望能够为黄连解毒汤在临床艾滋病的防治上打下良好的研究基础。②从中医理论和现代分子生物学手段两方面研究中药复方。尽管中西医理论上区别很大,但对于多种药物协同作用的治疗理念是一致的。中药复方就是多种药物联合治疗,每味中药发挥其针对疾病的部分功效;而在现代医学角度,目前医学界也越来越重视联合用药,“鸡尾酒疗法”实质上就是联合用药拮抗 HIV 病毒,而“鸡尾酒疗法”也存在价格昂贵,不良反应大,停药反应及耐药性等问题,其局限性也让人们开始将目光转向传统中药。后续的实验将建立动物动脉粥样硬化模型,探讨黄连解毒汤主要成分抑制 LPS 引起的炎症浸润和动脉粥样硬化药理效应,并尝试解释黄连解毒汤的药性。

REFERENCES

- [1] RAMKHELAWON B, YANG Y, VAN GILS J M, et al. Hypoxia induces netrin-1 and Unc5b in atherosclerotic plaques: mechanism for macrophage retention and survival [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(6): 1180-1188
- [2] TABAS I. Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(9): 2333-2339.
- [3] SEIMON T, TABAS I. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis [J]. *J Lipid Res*, 2008, 50: S382-387.
- [4] LIU W X, WANG J P, LIN L H, et al. Analgesic, anti-inflammatory and *in vivo* antitumor effects of Huanglianjiadu decoction [J]. *J Shenyang Medi Coll(沈阳医学院学报)*, 2013, 15(1): 53-55.
- [5] GAO Y, CHEN X, FANG L, et al. Rhein exerts pro- and anti-inflammatory actions by targeting IKK β inhibition in LPS-activated macrophages [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014(72): 104-112. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.001.
- [6] ELZAGHEID A, EMAETIG F, ALKIKHIA L, et al. High cyclooxygenase-2 expression is associated with advanced stages in colorectal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(8): 3137-3143.
- [7] AKASHI S, SHIMAZU R, OGATA H, et al. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages [J]. *J Immunol*, 2000, 164(7): 3471-3475.
- [8] SALUK-JUSZCZAK J, WACHOWICZ B. The proinflammatory activity of lipopolysaccharide [J]. *Postepy Biochem*, 2005, 51(3): 280-287.
- [9] TAN X S, ZHANG Y Y, LIU L T, et al. Protective effect of erythromycin on cigarette-induced emphysema in rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2012, 29(4): 294-298.

收稿日期: 2013-11-23