

丹翘液对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症相关因子的抑制效应分析

魏立琴^{1,2}, 王东升¹, 董书伟¹, 邝晓娇¹, 张世栋^{1*}, 严作廷^{1*}

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所/农业部兽用药物创制重点实验室/甘肃省中兽药工程技术研究中心, 兰州 730050; 2. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

摘要: 为研究丹翘液的体外抗炎作用及其抗炎机制, 利用 LPS 诱导巨噬细胞建立炎症模型, MTT 法检测不同浓度丹翘液对 RAW264.7 细胞活力影响; NO 测试盒检测丹翘液对 LPS 诱导的 NO 释放量的影响; ELISA 方法检测丹翘液对 LPS 诱导的 TNF- α 、IL-6 和 PGE₂ 分泌的影响; RT-PCR 方法检测丹翘液对 LPS 诱导的 TNF- α 、IL-6、COX-2 和 iNOS 基因转录的影响; Western blot 检测对细胞核内 NF- κ B p65 蛋白表达的影响。结果显示丹翘液小于 700 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对细胞无毒性作用; 丹翘液各剂量组 (100、300、600 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 能不同程度地抑制 LPS 诱导的 NO、PGE₂、TNF- α 和 IL-6 的分泌; 能显著抑制 iNOS、COX-2、TNF- α 和 IL-6 基因转录和细胞核内 NF- κ B p65 蛋白表达。丹翘液的抗炎作用机制可能与抑制 NF- κ B 通路激活, 进而抑制炎症介质和炎性细胞因子的转录和表达有关。

关键词: 丹翘液; 抗炎机制; RAW264.7; LPS; 炎症模型

中图分类号: S853.9

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)12-2299-08

Inhibiting Effect Analysis of *Danqiao* Liquid on Inflammation-related Factors Induced by LPS in RAW264.7 Cells

WEI Li-qin^{1,2}, WANG Dong-sheng¹, DONG Shu-wei¹, KUANG Xiao-jiao¹,
ZHANG Shi-dong^{1*}, YAN Zuo-ting^{1*}

- (1. Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Science of CAAS/Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutics Discovery, Ministry of Agriculture/Engineering & Technology Research Center of Traditional Chinese Veterinary Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730050, China;
2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The aim of the present study was to study the anti-inflammatory effects and possible underlying mechanisms of *Danqiao* liquid in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The cytotoxicity of *Danqiao* liquid was detected by MTT method. The NO kit assay was adopted to detect the effect of *Danqiao* liquid on NO release from LPS-induced RAW264.7 cells. ELISA was used to evaluate the production of TNF- α , IL-6 and PGE₂ in LPS-induced RAW264.7 cells. Real-time PCR was used to detect the transcription of COX-2, iNOS, TNF- α and IL-6 in LPS-induced RAW264.7 cells. The protein expression of nuclear NF- κ B p65 was detected by Western blot. The result

收稿日期: 2015-04-13

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD12B03); 中国农业科学院科技创新工程-奶牛疾病研究

作者简介: 魏立琴(1986-), 女, 甘肃兰州人, 硕士, 主要从事中兽医临床和奶牛疾病防治的研究, E-mail: 24weiliqin@163.com, Tel: 0931-2115262

* 通信作者: 张世栋(1983-), 男, 甘肃张掖人, 助理研究员, 硕士, 主要从事药理毒理学研究, E-mail: zhangshidong@caas.cn, Tel: 0931-2115262; 严作廷(1962-), 男, 甘肃武威人, 研究员, 博士, 主要从事中兽医临床和奶牛疾病防治的研究, E-mail: yanzuoting@caas.cn, Tel: 0931-2115261

showed that the safe medication range of *Danqiao* liquid was less than $700 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Compared with the LPS model group, *Danqiao* liquid ($100, 300, 600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) could reduce the secretion of NO, PGE₂, TNF- α , and IL-6 in cells induced by LPS, and significantly inhibit the mRNA transcription of iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6 and the protein expression of NF- κ B p65. In conclusion, this study preliminarily proves the protective effect of *Danqiao* liquid on LPS-induced RAW264. 7 macrophages. Its action mechanism may be related to inhibit NF- κ B signal pathway and the genes expressions and secretion of inflammatory mediators and cytokines.

Key words: *Danqiao* liquid; anti-inflammatory mechanism; RAW264. 7; LPS; inflammatory models

炎症是机体对各种致炎因素及损伤所产生的具有防御意义的应答性反应,其在一定时期内对机体是有利的,可以提高机体抵抗力,但剧烈或持久的炎症反应会对机体造成损失,影响动物机体的健康,炎症反应是一些疾病的发病基础^[1-2]。近年来,中药制剂对炎症有较好的抑制效果,由于其毒副作用小,对机体不良反应较少,其影响炎症免疫反应作用的机制受到了广泛的关注^[3-4]。中药影响炎症免疫反应的机制包括影响炎性介质和炎性细胞因子的作用、核因子的功能、活性氧的生成、神经内分泌激素的生成等^[4-6]。

丹翘液是以丹参和连翘等中草药为主要成分,依据活血化瘀、缩宫排脓的治疗原则研制而成的中药子宫灌注剂,临床上主要用于防治奶牛子宫内膜炎^[7-8]。动物药理学研究显示,丹翘液具有良好的抗炎、镇痛的药理效应^[9],但是丹翘液的抗炎作用机制尚不清楚。因此,本试验利用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导巨噬细胞 RAW264. 7,建立炎症模型,并研究了丹翘液对炎症细胞模型的影响,旨在探讨丹翘液的体外抗炎作用及其抗炎机制,为该新药的研发提供理论基础和实验证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 小鼠单核/巨噬细胞株 RAW264. 7(购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)添加含 10% 胎牛血清、 $100 \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 培养基,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO₂、饱和湿度的培养箱内常规培养。取对数生长期的细胞用于试验。

1.1.2 试剂和仪器 脂多糖(*E. coli* 0111; B4)、噻唑蓝(MTT)购自 Sigma 上海公司;胎牛血清、DMEM、胰蛋白酶购自美国 GIBCO 公司;小鼠 TNF- α 、IL-6、PGE₂ 的 ELISA 检测试剂盒购自上海

酶联生物科技有限公司;NO 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒、SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;引物由北京六合华大基因合成;HRP 羊抗兔 IgG 购自西安壮志;兔多克隆抗体 NF- κ B p65 购自 Abcam;DMI6000B 倒置相差显微镜(德国 Leica 公司);SpectraMaxM2/M2e 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);CFX96 型定量 PCR 仪(美国 Bio Rad 公司);Heal Force HF90 型 CO₂ 培养箱(中国上海力康有限公司)。

1.1.3 中药丹翘液的制备 称取丹参 1 200 g、连翘 800 g,粉碎成粗粉,加乙醇加热回流提取 3 次,滤过,合并滤液,减压回收乙醇,干燥,加入 800 mL 聚乙二醇-200, $4 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,上清液合并后再加入聚乙二醇-200 定容至 1 000 mL,灭菌,即得每 1 mL 相当于原生药 2 g 的药液, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 细胞实验分组及处理 取对数生长期 RAW264. 7 细胞接种于培养板,细胞密度为 $8 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$,预培养 24 h 后进行分组处理。① 正常对照组:不做任何处理,正常培养 24 h;② 炎症模型组(LPS): $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 持续刺激细胞 6 h;③ 丹翘组: $600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 丹翘液作用细胞 24 h;④ 试验组: $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 持续刺激 RAW264. 7 细胞 6 h 后,加入不同浓度的丹翘液 ($100, 300, 600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 共同作用 24 h。

1.2.2 细胞毒性试验 细胞毒性评价采用 MTT 试验,取对数生长期 RAW264. 7 细胞接种于 96 孔板中,细胞分组及处理方法同 1.2.1,培养结束后,每孔加入 20 μL 的 MTT ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 继续培养 4 h,弃去培养液,每孔加入 100 μL 的 DMSO 溶解甲瓖,均匀振荡溶解完全后在 570 nm 处检测各

孔的吸光度。试验重复 3 次以上。

1.2.3 NO 含量测定 取对数生长期 RAW264.7 细胞接种于 24 孔板中,细胞分组及处理方法同 1.2.1,培养结束后,收集各组细胞上清液,按照 NO 试剂盒说明书检测细胞上清中 NO 的释放。酶标仪测定 550 nm 处的光吸收值,以亚硝酸钠作为对照品测定并计算 NO 的浓度。

1.2.4 ELISA 检测 TNF- α 、IL-6、PGE₂ 含量 取对数生长期 RAW264.7 细胞接种于 24 孔板中,细胞分组及处理方法同 1.2.1,培养结束后,收集各组细胞培养上清液,ELISA 法检测各组 TNF- α 、IL-6、PGE₂ 含量,操作步骤按照试剂盒说明书。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 RT-PCR oligo-nucleotide primers

引物 primers		序列 Gene sequence	PCR 产物/bp PCR product	退火温度/°C Annealing temperature
β actin	Forward	5'-GCCACCAGTTCGCCATGGAT-3'	70	58
	Reverse	5'-GCTTTGCACATGCCGGAGC-3'		
TNF- α	Forward	5'-TCGAGTGACAAGCCCCGTAG-3'	180	58
	Reverse	5'-CAGCCTTGTCCTTGAAGAG-3'		
IL-6	Forward	5'-CTGATGCTGGTGACAACCAC-3'	143	59
	Reverse	5'-TCCACGATTTCCAGAGAAC-3'		
iNOS	Forward	5'-GGACCCAGTGCCCTGCTTT-3'	178	65
	Reverse	5'-CACCAAGCTCATGCGGCCT-3'		
COX-2	Forward	5'-TGAGTACCGCAAACGCTTCTC-3'	151	65
	Reverse	5'-TGGACGAGGTTTTTCCACCAG-3'		

1.2.6 Western blot 检测 NF- κ B 蛋白表达 取对数生长期 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板中,细胞分组及处理方法同 1.2.1,培养结束后,根据试剂盒说明提取总蛋白质、细胞核蛋白,BCA 法测定各组蛋白质浓度,各组取 40 μ g 蛋白质样品与蛋白质上样缓冲液混匀,沸水中变性 10 min 后,在 10% 分离胶、5% 浓缩胶中 100 V 恒压进行 SDS-PAGE 电泳 2.5 h,结束后半干转移法 12 V 恒压转印 1 h 到 PVDF 膜上,用 5% 的 BSA 封闭 1 h,加入一抗过夜孵育(4 °C),TBST 洗膜 4 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的二抗在室温缓慢摇动孵育 2 h,TBST 洗涤 10 min \times 4 次,加 ECL,暗室胶片曝光、显影、定影后显示各组细胞中目标蛋白质表达水平。

1.2.7 统计分析 炎症因子释放数据与 RT-PCR 采用 GraphPad Prism 5 软件分析,试验重复 3

1.2.5 RT-PCR 法检测 TNF- α 、IL-6、COX-2 和 iNOS 基因转录水平 取对数生长期 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板中,细胞分组及处理方法同 1.2.1,培养结束后,Trizol 法提取各组细胞总 RNA,按试剂盒说明书操作,将 mRNA 逆转录为 cDNA,得到的 cDNA 用于 RT-PCR 检测 TNF- α 、IL-6、COX-2 和 iNOS 基因的相对转录水平。PCR 引物见表 1。RT-PCR 反应条件是 95 °C 3 min;95 °C 15 s,60 °C 20 s,循环 40 次;55~95 °C 循环 81 次,mRNA 的相对转录量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算,并以 β actin 为内参基因。

次以上,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差(One-Way ANOVA)分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 丹翘液对 RAW264.7 细胞活力的影响

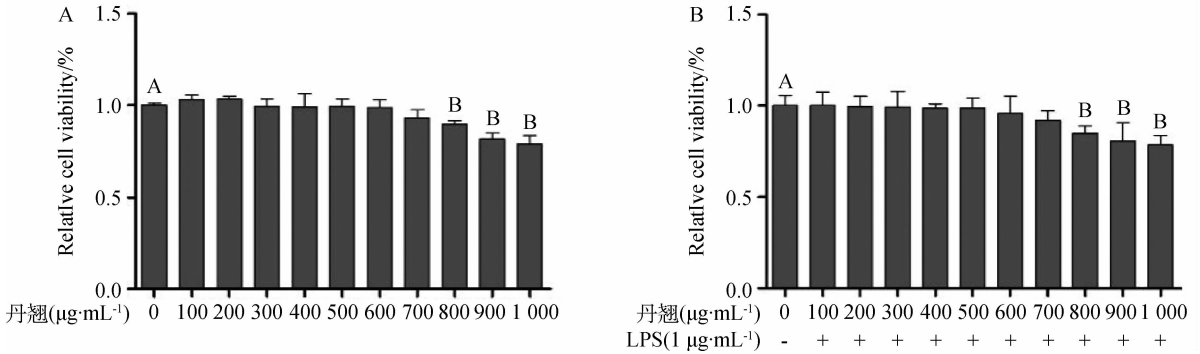
图 1A 为 MTT 法检测细胞经不同剂量的丹翘液处理后的细胞活力变化。结果显示,与空白对照组相比,丹翘液 $\leq 700 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对细胞无毒性作用($P > 0.05$),当丹翘液大于 $700 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,细胞活力明显下降($P < 0.01$)。图 1B 为丹翘液和 LPS 共同处理后细胞的活力变化,结果与丹翘液单独处理的一致。

2.2 丹翘液对 LPS 诱导的细胞炎症介质的影响

NO 检测结果显示,与正常对照组相比,LPS 处

理组的 NO 释放量极显著升高($P < 0.01$),丹翘液处理组的 NO 释放量不明显,与 LPS 处理组相比,丹翘液各组均能极显著抑制 NO 的释放量($P < 0.01$)。各剂量丹翘液抑制后 NO 含量与正常对照组差异显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) (图 2A)。ELISA 检测 PGE₂ 结果显示,与正常对照组相比,LPS 处理组的 PGE₂ 释放量极显著升高($P < 0.01$),

与 LPS 处理组相比,丹翘液高、中剂量组能显著抑制 PGE₂ 的释放量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),低剂量差异不显著($P > 0.05$)。高剂量丹翘液抑制后 PGE₂ 含量与正常对照组无显著差异($P > 0.05$),中、低剂量丹翘液抑制后 PGE₂ 含量与正常对照组显著差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) (图 2B)。

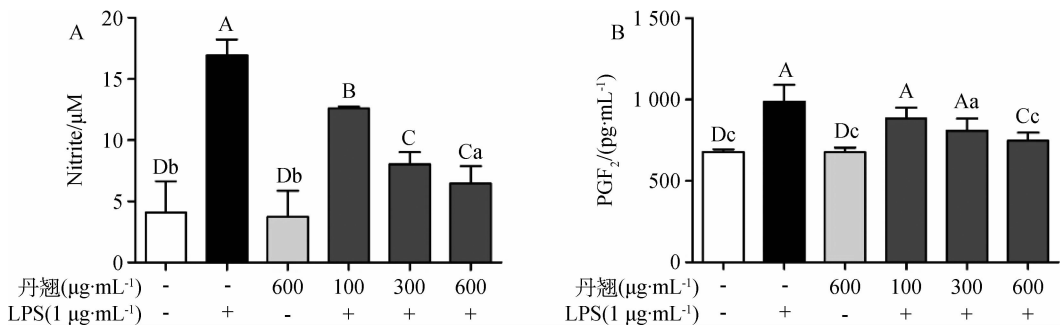


A. 不同浓度的丹翘液(0~1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)作用 24 h 时细胞的活力变化;B. 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 持续刺激 RAW264. 7 细胞 6 h 后,不同浓度的丹翘液(0~1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)作用 24 h 时细胞的活力变化。标注不同大写字母表示组间差异极显著($P < 0.01$),标相同或未标字母表示组间差异不显著($P > 0.05$)

A. Viabilities of cells that treated with or without *Danqiao* liquid(0-1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 24 h;B. Cells were treated with or without *Danqiao* liquid for 24 h after exposure to LPS(1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 6 h. Values with different capital letters mean extremely significant difference($P < 0.01$),and with the same letters or without letters mean not significant difference($P > 0.05$)

图 1 丹翘液对 RAW264. 7 细胞的毒活性作用

Fig. 1 The effects of *Danqiao* liquid on viability in RAW264. 7 cells



标注不同大写字母表示组间差异极显著($P < 0.01$),标注不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$),标相同小写字母表示组间差异不显著($P > 0.05$)。下同

Values with different capital letters mean extremely significant difference($P < 0.01$),with different letters mean significant difference($P < 0.05$),and with the same letters mean not significant difference($P > 0.05$). The same as below

图 2 丹翘液对 LPS 诱导 RAW264. 7 细胞分泌 NO 和 PGE₂ 的影响

Fig. 2 The effects of *Danqiao* liquid on PGE₂ and Nitrite in RAW264. 7 macrophage cells induced by LPS

2.3 丹翘液对 LPS 诱导的炎症细胞因子分泌的影响

图 3A、B 为 ELISA 法检测丹翘液对 LPS 诱导的 RAW264. 7 细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 含量的影响,结果显示,与正常对照组相比,LPS 处理组的 TNF- α 、IL-6 释放量极显著升高($P < 0.01$),丹翘液组的释放量变化不明显($P > 0.05$),与 LPS 处理

组相比,高剂量丹翘液能显著抑制 TNF- α 、IL-6 的释放量($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),但中、低剂量对 TNF- α 、IL-6 的抑制无统计学意义($P > 0.05$)。高剂量丹翘液抑制后 TNF- α 、IL-6 含量与正常对照组无显著差异($P > 0.05$),低剂量丹翘液抑制后 TNF- α 、IL-6 含量与正常对照组极显著差异($P < 0.01$)。

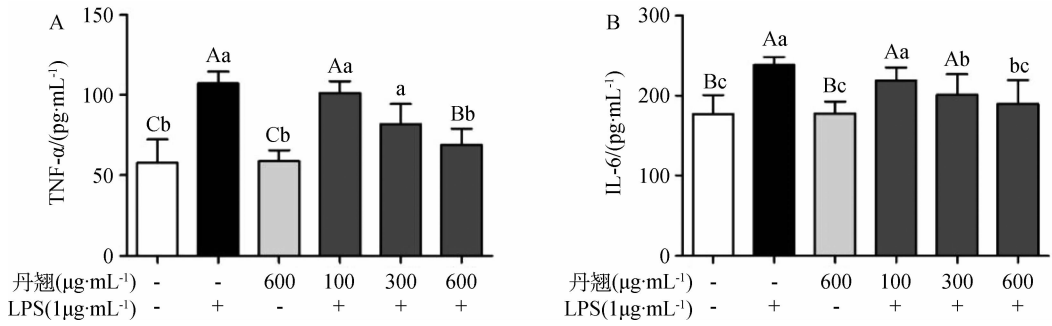


图3 丹翘液对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的炎症细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的影响

Fig. 3 The effects of *Danqiao* liquid on TNF- α and IL-6 in RAW264.7 macrophage cells induced by LPS

2.4 丹翘液对 LPS 诱导的炎症相关基因转录的影响

RT-PCR 检测各处理组细胞的 TNF- α 、IL-6、iNOS 和 COX-2 基因的相对转录水平,结果显示,与正常组相比,LPS 处理组的 TNF- α 、IL-6、iNOS 和 COX-2 mRNA 转录均极显著升高 ($P < 0.01$),与 LPS 处理组相比,丹翘液各剂量组均能够显著抑制 LPS 诱导巨噬细胞 iNOS 和 COX-2 mRNA 转录的

升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) (图 4A、B),也能够显著抑制 TNF- α 、IL-6 mRNA 转录的升高 (图 4C、D),且对 TNF- α 、iNOS 和 COX-2 具有一定的剂量效应。各剂量丹翘液抑制后 IL-6、iNOS 和 COX-2 mRNA 转录与正常对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$),高、中剂量丹翘液抑制后 TNF- α mRNA 转录与正常对照组相比,无显著差异 ($P > 0.05$)。

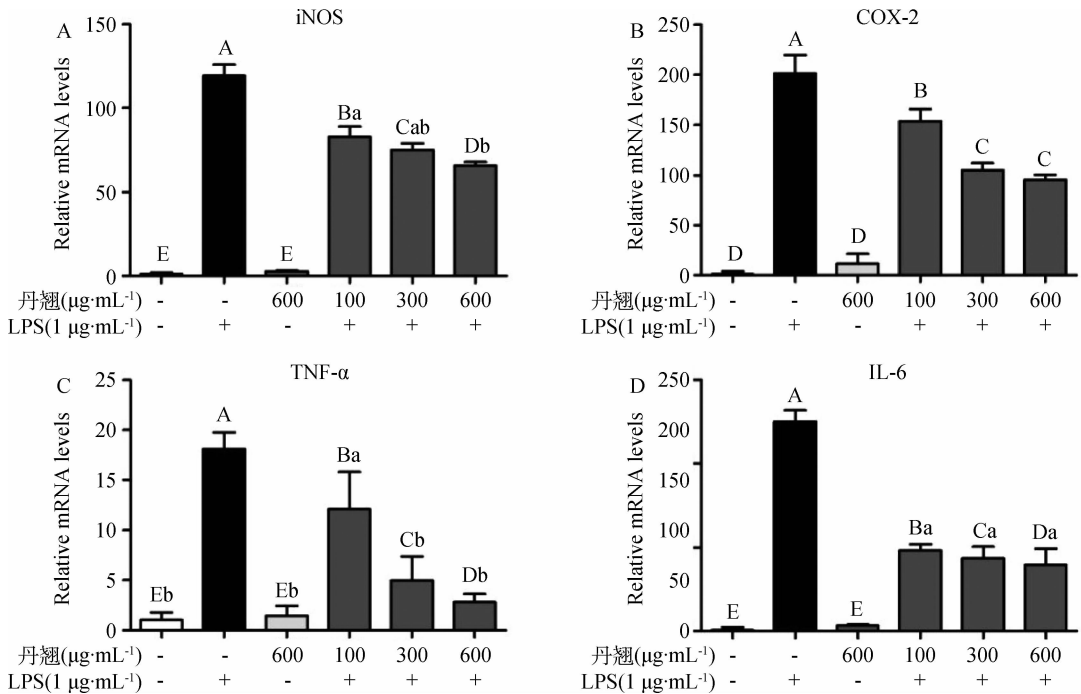


图4 丹翘液对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的炎症相关基因转录的影响

Fig. 4 The effects of *Danqiao* liquid on gene transcription of TNF- α , IL-6, iNOS and COX-2 in RAW264.7 macrophage cells induced by LPS

2.5 核转录因子 NF- κ B 蛋白表达

Western blot 对不同处理组细胞内 NF- κ B p65 蛋白表达检测,结果显示:与正常对照组相比,LPS 刺激 RAW264.7 细胞活化后,细胞核内 NF- κ B p65

蛋白表达极显著升高 ($P < 0.01$),与 LPS 处理组相比,不同浓度的丹翘液处理后,显著抑制 NF- κ B p65 表达 ($P < 0.05$),并呈现剂量依赖性 (图 5)。

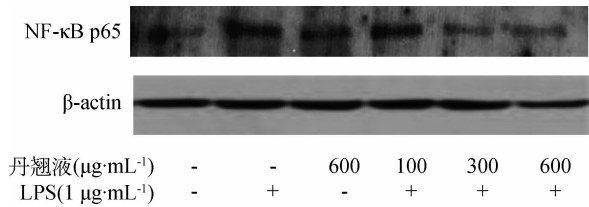


图5 丹翘液对LPS诱导RAW264.7细胞的NF-κB p65蛋白表达的影响

Fig. 5 The effects of Danqiao liquid on nuclear translocation of NF-κB p65 in RAW264.7 cells by LPS

3 讨论

炎症是机体对于刺激的一种防御反应,表现为红肿热痛和功能障碍。炎症反应是损伤与抗损伤的过程,损伤因子一方面可以直接或间接破坏组织和细胞,另一方面可以通过炎症充血和渗出反应,杀伤和包围损伤因子,通过实质和间质细胞的再生修复和愈合受损的组织^[10-11]。如损伤过程占优势,则炎症加重,并向全身扩散;若抗损伤过程占优势,则炎症逐渐趋向痊愈。所以,控制损伤、加强抗损伤过程是机体维持正常生理功能的重要环节。巨噬细胞参与吞噬、免疫调节、组织修复、新陈代谢和炎症等多种生理过程。微生物刺激巨噬细胞产生多种促炎性细胞因子和趋化因子,这些促炎因子反过来引起细胞渗出和激活其他类型的免疫细胞(如T细胞),这些因素共同介导形成免疫炎症反应^[12-13]。因此本研究利用LPS诱导巨噬细胞炎症反应模型对丹翘液的体外抗炎作用及机制进行深入的探讨。本试验首先检测丹翘液对RAW264.7细胞活力的影响,MTT试验结果表明,药物浓度在 $700 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以内对RAW264.7细胞无明显毒性作用。因此,选择 $0 \sim 700 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的丹翘液进行下一步的抗炎活性研究。

NO既能参与机体生理过程的调节及免疫应答反应,其过度产生又可导致组织损伤和炎症反应。体内NO产生由一氧化氮合酶(NOS)催化L-精氨酸(L-Arg)产生。NOS可以分为结构型(eNOS)和诱导型(iNOS)。eNOS只产生少量NO,发挥正常生理作用,病原微生物感染及组织损伤都可诱导iNOS表达,促进NO大量产生。NO具有抗炎和促炎双重功能^[14-15]。少量NO可通过抑制中性粒细胞与内皮细胞的黏附表现抗炎活性^[16]。反之,炎症性疾病过程中,过度的NO通过激活NF-κB诱导促炎

症细胞因子TNF-α、IL-6等的产生促进炎症反应,这些细胞因子又能激活iNOS,促进机体产生更多的NO,使NO及细胞因子的分泌得以持续,从而使炎症反应更持久,更剧烈^[17]。环氧酶(COX)是机体催化花生四稀酸转变为前列腺素的限速酶,COX有三种同工酶,其中COX-2为诱导性表达,在脂多糖(LPS)等炎症因子的诱导下,COX-2大量合成,进而催化PGs大量合成,参与并放大炎症反应^[18-21]。在炎症过程中,若能够抑制炎症介质NO和PGE₂的释放及其催化酶的活化,就能有效抑制其介导的炎症反应。本研究结果显示,LPS刺激细胞后NO和PGE₂的分泌水平极显著升高,说明细胞发生了极显著的炎症反应,不同剂量的丹翘液作用炎性细胞后均能显著抑制LPS诱导的NO和PGE₂的分泌及iNOS和COX-2 mRNA的转录,且表现出一定的剂量效应,结果表明丹翘液抑制炎症限速酶的基因表达和介质分泌是其抗炎机制之一。但是丹翘液抑制后NO和PGE₂的分泌及iNOS和COX-2 mRNA转录与正常对照组相比有显著差异,说明丹翘液有抗炎作用,但不能完全阻断细胞的炎症反应。

细胞因子是一类具有广泛生物学活性、且功能复杂的小分子蛋白质。TNF-α主要由单核巨噬细胞产生,被视为促进炎症反应最重要的细胞因子之一,它能引起急性炎症性疾病并引起组织损伤^[22-23]。IL-6也是诱导炎症反应的主要因素,它能促进T淋巴细胞和B淋巴细胞的分化,和其他炎性细胞因子协同作用,级联促进和放大炎症反应造成组织损伤^[24]。因此,TNF-α和IL-6作为炎症标志物,对药物的抗炎作用研究具有指示作用^[25]。试验结果显示,高剂量丹翘液能显著抑制细胞炎症反应中TNF-α和IL-6的释放,但中、低剂量对TNF-α和IL-6的释放抑制效果不显著。同时TNF-α和IL-6基因的相对转录结果显示,丹翘液各剂量组均能剂量依赖性的抑制TNF-α和IL-6的转录,以上结果说明丹翘液对促炎细胞因子分泌的抑制是抑制其基因转录的结果。此外,两种检测结果间有差异可能与不同方法的灵敏度有关。

此外,NF-κB是重要的核转录因子,在炎症反应的各阶段起重要的调控作用,其主要的诱导型亚基是p50/p65^[26]。静息状态时,NF-κB与IκB形成复合体存在于细胞质中。当受到特定刺激后,IκB被活化的激酶复合体(IκB kinase, IKK)磷酸化,NF-κB与IκB解离,游离的NF-κB p65迅速转移到

细胞核,与 κB 结合位点结合,启动炎性介质及促炎症细胞因子的转录与表达^[27-31]。本试验 NF- κB 蛋白表达结果显示,LPS 刺激细胞后,细胞核内 NF- κB p65 蛋白表达升高,说明 NF- κB 被激活并转移至细胞核内,丹翘液能抑制细胞核内 NF- κB p65 蛋白表达升高,说明丹翘液可抑制 NF- κB 的活化与核转移,进而抑制炎症相关基因的表达与炎症介质的产生。

4 结 论

丹翘液能够抑制 LPS 刺激巨噬细胞产生炎性介质 NO 和 PGE₂;也能抑制炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的分泌及其基因转录;亦对炎症关键酶 iNOS、COX-2 的基因转录具有抑制作用。丹翘液能抑制 LPS 对巨噬细胞内 NF- κB 信号通路的激活,抑制 NF- κB p65 活化因子的入核转移,从而抑制炎症过程中关键酶和炎症因子的基因表达及炎症介质的产生。因此,丹翘液对 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应具有抗炎保护作用。

参考文献 (References):

[1] MATHUR N, PEDERSEN B K. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation[J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2008, 2008: 109502. [2015-10-23]. <http://www.hindawi.com/journals/mi/2008/109502/>.

[2] RAMOS G C. Inflammation as an animal development phenomenon[J/OL]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 983203. [2015-10-23]. <http://www.hindawi.com/journals/jir/2012/983203/>.

[3] 郭醉元. 溶菌酶与中药治疗奶牛子宫内膜炎的比较研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.

GUO Z Y. Comparative studies on lysozyme and traditional Chinese medicine treating cow endometritis [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2008. (in Chinese)

[4] 岑玉文, 谭行华, 张坚生, 等. 中西医结合疗法改善艾滋病合并肺部感染患者中医证候的随机对照研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(15): 2448-2452.

CEN Y W, TAN X H, ZHANG J S, et al. Randomized controlled study of integrated treatment of traditional Chinese medicine and western medicine on AIDS with pulmonary inflammation patients[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2013, 38(15): 2448-2452. (in Chinese)

[5] 周松, 刘永刚, 张国祥, 等. 中药影响炎症免疫反应的机制研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(2): 183-185.

ZHOU S, LIU Y G, ZHANG G X, et al. Research Progress on the Mechanism of the Influences of Traditional Chinese Medicine on Inflammation Immunity [J]. *Medicine Recapitulate*, 2012, 18(2): 183-185. (in Chinese)

[6] 刘红, 孙伟, 万毅刚, 等. 慢性肾脏病肾组织炎症信号通路 NF- κB 的调节机制及中药的干预作用[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24): 4246-4251.

LIU H, SUN W, WAN Y G, et al. Regulatory mechanism of NF- κB signaling pathway on renal tissue inflammation in chronic kidney disease and interventional effect of traditional Chinese medicine [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2013, 38(24): 4246-4251. (in Chinese)

[7] 王洪海, 王国卿, 郭梦尧, 等. 中药治疗奶牛子宫内膜炎研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(8): 64-66.

WANG H H, WANG G Q, GUO M Y, et al. Progress of Treatment of Traditional Chinese Herb on Dairy Cows With Endometritis[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2010, 46(8): 64-66. (in Chinese)

[8] SHELDON I M, PRICE S B, CRONIN J, et al. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle [J]. *Reprod Domest Anim*, 2009, 44(Suppl 3): 1-9.

[9] 魏立琴, 王东升, 苗小楼, 等. 丹翘灌注液抗炎镇痛作用的研究[J]. 中国农学通报, 2015, 31(2): 75-79.

WEI L Q, WANG D S, MIAO X L, et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of *Danqiao perfusate* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(2): 75-79. (in Chinese)

[10] ARROYO A G, IRUELA-ARISPE M L. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(2): 226-235.

[11] MCCARTHY N. Inflammation: An innate response [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(4): 197.

[12] MANTOVANI A, BISWAS S K, GALDIERO M R, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling [J]. *J Pathol*, 2013, 229(2): 176-185.

[13] BISWAS S K, CHITTEZHATH M, SHALOVA I N, et al. Macrophage polarization and plasticity in health and disease[J]. *Immunol Res*, 2012, 53(1-3): 11-24.

[14] 王强, 廖清奎. 一氧化氮在炎症反应中的作用[J]. 医学综述, 2002, 8(4): 198-200.

- WANG Q, LIAO Q Q. The role of nitric oxide in the inflammatory response [J]. *Medicine Recapitulate*, 2002, 8(4): 198-200. (in Chinese)
- [15] ZHOU L, ZHU D Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications [J]. *Nitric Oxide*, 2009, 20(4): 223-230.
- [16] MEDZHITOV R. Toll-like receptors and innate immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2001, 1(2): 135-145.
- [17] DEBPRASAD C, HEMANTA M, PAROMITA B, et al. Inhibition of NO₂, PGE₂, TNF- α , and iNOS expression by *Shorea robusta* L.: An ethnomedicine used for anti-inflammatory and analgesic activity [J/OL]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 254849. [2015-10-23]. <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/254849/>.
- [18] WANG D, DUBOIS R N. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2010, 29(6): 781-788.
- [19] 徐艺荣. 九种黄酮类化合物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 PGE₂、COX-2 表达的影响 [D]. 天津: 天津科技大学, 2012.
- XU Y R. Comparison of Inhibitory Effects of nine flavonoids on prostaglandin E₂ production and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages [D]. Tianjin; Tianjin University of Science And Technology, 2012. (in Chinese)
- [20] CHEN J, JIANG X H, CHEN H, et al. CFTR negatively regulates cyclooxygenase-2-PGE₂ positive feedback loop in inflammation [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(6): 2759-2766.
- [21] LI H, BRADBURY J A, DACKOR R T, et al. Cyclooxygenase-2 regulates Th17 cell differentiation during allergic lung inflammation [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 184(1): 37-49.
- [22] AHMAD S F, ANSARI M A, ZOHEIR K M, et al. Regulation of TNF- α and NF- κ B activation through the JAK/STAT signaling pathway downstream of histamine 4 receptor in a rat model of LPS-induced joint inflammation [J]. *Immunobiology*, 2015, 220(7): 889-898.
- [23] YAMANAKA H. TNF as a target of inflammation in rheumatoid arthritis [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2015, 15(2): 129-134.
- [24] HONG S H, ONDREY F G, AVIS I M, et al. Cyclooxygenase regulates human oropharyngeal carcinomas via the proinflammatory cytokine IL-6: a general role for inflammation? [J]. *FASEB J*, 2000, 14(11): 1499-1507.
- [25] MANJEET K R, GHOSH B. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages [J]. *Int J Immunopharmacol*, 1999, 21(7): 435-443.
- [26] 邢飞跃, 赵克森, 姜勇. NF- κ B 的信号通路及阻断策略 [J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(6): 849-855.
- XING F Y, ZHAO K S, JIANG Y. Signal transduction pathway and blocking strategies of NF- κ B [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2003, 19(6): 849-855. (in Chinese)
- [27] 乔静. 葫芦素 E 对脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应的抑制作用及其机制研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2013.
- QIAO J. The inhibitory effect of cucurbitacin E on the inflammatory response of lipopolysaccharides-induced mouse macrophage RAW264.7 and its mechanism [D]. Guangzhou; Jinan University, 2013. (in Chinese)
- [28] OH Y C, JEONG Y H, HA J H, et al. Oryeongsan inhibits LPS-induced production of inflammatory mediators via blockade of the NF-kappaB, MAPK pathways and leads to HO-1 induction in macrophage cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 242.
- [29] GUGASYAN R, GRUMONT R, GROSSMANN M, et al. Rel/NF- κ B transcription factors; key mediators of B-cell activation [J]. *Immunol Rev*, 2000, 176: 134-140.
- [30] BAWADEKAR M, DE ANDREA M, LO CIGNO I, et al. The extracellular IFI16 protein propagates inflammation in endothelial cells via p38 MAPK and NF- κ B p65 activation [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2015, 35(6): 441-453.
- [31] ZHAO W, SUN Z, WANG S, et al. Wnt1 participates in inflammation induced by lipopolysaccharide through upregulating scavenger receptor A and NF- κ B [J]. *Inflammation*, 2015, 38(4): 1700-1706.