

- [7] Damodaran S, Olson E. Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 pathway in breast cancer[J]. Hospital Practice, 2012, 40(4): 7-15.
- [8] 周铁军, 向丽, 李霞斌, 等. NF- κ Bp65, EGFR, P16 在宫颈腺癌中的表达及临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(6): 1007-1010.
- [9] 冯望德, 伍晶晶, 沈国栋. 表皮生长因子受体与宫颈癌的研究进展[J]. 中国临床保健杂志, 2013, 16(2): 219-222.
- [10] 易福梅, 王俊杰. EGFR 拮抗剂在结直肠癌治疗中的应用[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(1): 188-191.

(编辑: 梁进权)

小叶榕叶对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 NO 和 TNF- α 的影响

黄 洋, 李 康, 邵慧凯, 刘盛权(广东药学院药科学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 采用体外炎症模型观察小叶榕叶水提物及其不同极性萃取部位对炎症介质一氧化氮(NO)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的影响。**方法** 采用脂多糖(LPS)刺激 RAW264.7 巨噬细胞, 建立体外炎症模型。采用噻唑蓝(MTT)法检测小叶榕叶水提物及其不同萃取部位对 RAW264.7 巨噬细胞的毒性作用; Griess 法检测培养液中 NO 含量; 采用酶联免疫试验(ELISA)法检测培养液中 TNF- α 的含量。**结果** LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞后, 培养液中 NO 和 TNF- α 含量显著增加($P < 0.01$); 小叶榕叶水提物及其不同萃取部位对 NO 和 TNF- α 的释放有不同程度的抑制作用, 其中水提物高、中、低浓度组对 NO 的抑制率分别为 17.0 %, 30.0 %, 33.0 %; 乙酸乙酯部位中、低浓度组对 NO 的抑制率分别为 40.0 %、27.0 %; 水相部分低浓度组对 NO 的抑制率为 37.0 %; 水提物中浓度组和乙酸乙酯部位高浓度组对 TNF- α 的抑制率分别为 58.0 %, 43.5 %, 与 LPS 组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 小叶榕叶可能通过抑制 NO 和 TNF- α 释放而发挥抗炎作用, 其中乙酸乙酯部位、水相部分是小叶榕叶的主要抗炎活性成分。

关键词: 小叶榕叶; 脂多糖; RAW264.7 巨噬细胞; 一氧化氮; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)02-0124-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.003

Effects of Water Extract of *Ficus microcarpa* Leaves and Polar Solvent Extract of Different Parts on Expression of NO and TNF- α in Peritoneal Macrophages RAW264.7 Induced by LPS

HUANG Yang, LI Kang, SHAO Huikai, LIU Shengquan (School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, 510006, Guangdong China)

Abstract: **Objective** To evaluate the effects of water extract of *Ficus microcarpa* leaves and the polar solvent extract of different parts on the release of inflammatory mediators of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) by using *in-vitro* inflammatory model. **Methods** Lipopolysaccharide (LPS) was used to stimulate the RAW264.7 macrophage line for the establishment of inflammatory model. MTT assay was performed to determine the toxic effects of water extract of *Ficus microcarpa* leaves and the polar solvent extract of different parts on the viability of RAW264.7. Griess reaction was used for assaying the concentration of NO, and ELISA was performed to measure the expression of TNF- α in the cultured solution. **Results** NO and TNF- α contents in the cultured solution of macrophages were significantly increased after the stimulation of LPS ($P < 0.01$). Water extract of *Ficus microcarpa* leaves and the polar solvent extract of different parts could remarkably ameliorate the inflammation factors release at various degrees. The inhibition of NO was 17.0 %, 30.0 %, 33.0 % in the high-, middle- and low-concentration water extract groups, respectively. The inhibition of NO was 40.0 %, 27.0 % in the middle- and low-concentration

收稿日期: 2013-09-17

作者简介: 黄洋, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药效物质基础及其质量评价方法研究。Email: hy1987615@163.com。通讯作者: 李康, 教授, 研究方向: 中药药效物质基础及其质量评价方法研究。Email: likang229@aliyun.com。

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金([2011]1139); 国家自然科学基金青年基金资助项目(30801515)。

acetoacetate fraction groups, respectively, and was 37.0% in the low-concentration water fraction group. Middle-concentration water extract and high-concentration acetoacetate fraction presented the inhibition of TNF- α being 58.0 %, 43.5 %, respectively, and the differences were significant when compared with LPS group ($P < 0.01$).

Conclusion *Ficus microcarpa* leaves exert anti-inflammatory action by inhibiting the release of NO and TNF- α , and the acetoacetate fraction and water fraction are the main anti-inflammatory active constituents of *Ficus microcarpa* leaves.

Keywords: *Ficus microcarpa* leaves; Lipopolysaccharide; RAW264.7; Nitric oxide; Tumor necrosis factor alpha

小叶榕叶是桑科植物榕属小叶榕 (*Ficus microcarpa* L.f.) 的干燥叶子, 在我国南方分布广泛, 全年可采, 阴干入药, 为岭南民间用药, 其水提物干浸膏是咳特灵胶囊的主要成分, 该胶囊收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》^[1]。小叶榕叶主要含黄酮类、三萜类、鞣质和酸性树脂等成分^[2], 具有抗炎、杀菌、镇痛和止咳平喘等作用^[3], 临床上常将其干浸膏用于咳嗽、哮喘等疾病的治疗^[4]。炎症过程涉及到多种细胞因子的参与, 而巨噬细胞是介导炎症的主要细胞, 通过吞噬杀伤微生物、抗原提呈和分泌多种细胞因子等作用来控制机体的炎症反应和免疫应答^[5-6]。脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导巨噬细胞已成为研究炎症应答的重要细胞模型^[7]。小叶榕叶的抗炎药效已经在整体动物实验证实^[8]。因此, 本研究采用 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞体外炎症模型, 观察小叶榕叶水提物及其不同萃取部位的抗炎作用及其可能的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 药物及试剂 小叶榕新鲜叶采自广州大学城穗石村, 于室内阴干, 经广东药学院中药学院生药学教研室刘基柱教授鉴定为桑科榕属植物榕树 *Ficus microcarpa* L. f. 的叶。RAW264.7 细胞株(中山大学实验动物中心细胞库); 地塞米松(Dexamethasone, DEX, 上海源叶生物科技有限公司, 批号: YY10803); LPS (美国 Sigma 公司, 批号: L2880); DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司); 胎牛血清、胰酶(美国 Gibco 公司); 双抗(美国 Hyclone 公司); 噻唑蓝(MTT, 美国 Axygen 公司); NO 检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司); TNF- α 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司); 实验中所用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇均为分析纯, 乙醇为食用级。

1.2 仪器 CO₂ 培养箱(美国 Thermo electron 公司); 倒置显微镜(广州湘仪机电设备有限公司); 超净工作台(苏州净化设备厂); 全波长多功能酶标仪(美国

Bio-Rad 公司), HH-S 型恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限公司); Thermo Scientific CL31 离心机(美国 Thermo electron 公司); 血球计数板(上海求精生化试剂仪器有限公司)。

1.3 小叶榕叶提取物的制备 取阴干后的小叶榕叶约 450 g, 剪碎后水提, 液料比 25 : 1, 回流提取 3 次, 每次 2 h, 浓缩至适当的相对密度后, 静置冷却, 用 95 %乙醇调节浓缩液含醇量至 80 % ~ 85 %, 慢加快搅, 静置 24 h, 抽滤, 回收乙醇, 浓缩至 50 mL (相当于生药材约 9.0 g·mL⁻¹)。

1.4 不同萃取物的制备 小叶榕水提物 50 mL, 依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 得石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水相部分, 减压挥干, 浓缩得到不同极性萃取物, 各萃取样用 45 %乙醇溶解并定溶至 50 mL, 置于 4 °C 保存备用。

1.5 细胞培养 取对数生长期的细胞, 用 0.25 %胰酶消化, 用含 10 %胎牛血清、100 μ L·mL⁻¹ 青霉素、0.1 mg·mL⁻¹ 硫酸链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 °C, 5 %CO₂ 培养箱中培养。根据代谢情况 1~2 d 换 1 次液, 至对数期备用。

1.6 提取物及萃取物对 RAW264.7 细胞活性的影响^[9] 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 用 0.25 %的胰酶消化, 吹打, 使其成为均匀的单细胞悬液, 计数细胞, 用培养基稀释成约 6.2×10^4 mL⁻¹ 并接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 置 37 °C, 5 %CO₂ 培养箱培养 4 h。细胞贴壁后, 试验组加入试验药物(9.0, 4.5, 2.3, 1.1, 0.6, 0.3 mg·mL⁻¹), DEX 组加入 DEX 10.0 μ g·mL⁻¹, 正常对照组不加药物, LPS 组加入 LPS 1.0 μ g·mL⁻¹, 调零孔为不接种细胞的空白孔, 溶剂组加入含 0.9 %乙醇培养基, 每个浓度设置 5 个复孔。连续孵育 20 h, 在实验结束前 4 h, 每孔加入 MTT (5.0 mg·mL⁻¹)20 μ L, 继续孵育至实验结束, 吸弃上清, 每孔加入 150 μ L DMSO 充分溶解细胞沉淀, 振荡 15 min, 1 h 内用酶标仪在波长 490 nm, 参比波长 630 nm 处测定吸光度(OD)值。药物对细胞生长的抑

制作用以存活率表示,存活率越高,表明药物毒性越低。

存活率(%)=(药物干预孔 OD 值 - 空白对照孔 OD 值)/(正常细胞孔 OD 值 - 空白对照孔 OD 值) × 100 %。

1.7 小叶榕叶对细胞培养液中 NO 含量的影响^[10] 取对数生长期的 RAW264.7 细胞,用 0.25% 的胰酶消化,吹打,使其成为均匀的单细胞悬液,计数细胞,用培养基稀释成约 $1.3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 并接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$,5 % CO_2 培养箱培养 4 h。细胞贴壁后,设置正常对照组、LPS 组、小叶榕叶组(小叶榕叶水提物和各萃取部位 4.5, 2.3, 1.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和 DEX 组(10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),再往培养体系中加入终浓度为 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 作为刺激剂,置 37 $^{\circ}\text{C}$,5 % CO_2 培养 24 h,轻轻吸取上清。按照 NO 试剂盒说明书要求进行检测,即取 50 μL 培养液上清与 100 μL Griess 混合试剂[1 % 对氨基苯磺酸溶液 + 0.1 % N-(1-萘基)乙二胺二盐酸盐溶液等体积]充分混合、振摇 10 min,用酶标仪在 570 nm 处测量吸光度,根据标准曲线计算 NO 释放量;比标准管得出细胞上清液 NO 含量($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),每组设 3 个复孔。

抑制率(%)=(模型组细胞因子浓度 - 给药组细胞因子浓度)/(模型组细胞因子浓度 - 正常对照组细胞因子浓度) × 100 %。

1.8 酶联免疫试验(ELISA)法检测小叶榕叶对 TNF- α 的抑制作用^[10] 取对数生长期的 RAW264.7 细胞,用 0.25% 的胰酶消化,吹打,使其成为均匀的单细胞悬液,计数细胞,用培养基稀释成约 $2.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$,5 % CO_2 培养箱培养 4 h。细胞贴壁后,设置正常对照组、LPS 组、小叶榕叶组(小叶榕叶提取物和各萃取部位 4.5, 2.3, 1.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和 DEX 组(10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),再往培养体系中加入终浓度为 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 作为刺激剂,置 37 $^{\circ}\text{C}$,5 % CO_2 培养 24 h,收集上清液并以酶标仪读取 450 nm 波长处的 OD 值,根据 ELISA 试剂盒说明书操作并根据标准曲线计算 TNF- α 的含量,每组设 3 个复孔。

1.9 统计学处理方法 结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS17.0 统计学软件,采用单因素方差分析方法(one-way ANOVA)进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 小叶榕叶对 RAW264.7 细胞活性的影响 MTT

法检测显示,不同浓度小叶榕叶水提物和各萃取部位组(9.0, 4.5, 2.3, 1.1, 0.6, 0.3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)以及 DEX 组(10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、LPS 组(1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、溶剂组(0.9 % 乙醇培养基)对 RAW264.7 细胞的活力均无影响,存活率均在 85 % 以上,见图 1。

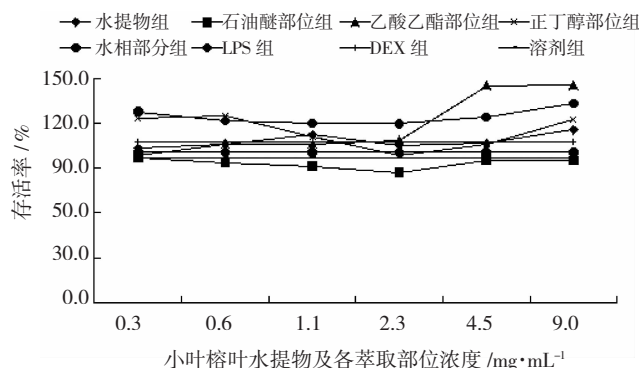


图 1 小叶榕叶水提物及各萃取部位对 RAW264.7 细胞的存活率影响($n=5$)

Figure 1 The effects of water extract of *Ficus microcarpa* leaves and the polar solvent extract of different parts on cell livability in RAW264.7

2.2 小叶榕叶对 RAW264.7 细胞中 NO 生成的影响 LPS 刺激 RAW264.7 细胞可产生大量的 NO,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);小叶榕叶水提物和各萃取部位的不同浓度均能显著抑制细胞上清液中 NO 的含量,其中,水提物高、中、低浓度组的抑制率分别为 17.0 %, 30.0 %, 33.0 %;乙酸乙酯部位中、低浓度组的抑制率分别为 40.0 %、27.0 %;水相部分低浓度组抑制率为 37.0 %,与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

2.3 小叶榕叶对 RAW264.7 细胞中 TNF- α 生成的影响 LPS1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 可诱导 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α ,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);小叶榕叶水提物以及各萃取部位各不同浓度组对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 TNF- α 的分泌具有一定的抑制作用,其中乙酸乙酯部位高浓度组和水提物中浓度组均能显著抑制 RAW264.7 细胞 TNF- α 的生成($P < 0.01$),其抑制率分别为 43.5 %, 58.0 %,见表 2。

3 讨论

预试验比较了不同 LPS 浓度对 RAW264.7 细胞分泌 NO 的影响,结果显示,当 LPS 浓度在 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,释放的 NO 含量最高,所以选择浓度为 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞建立体外

表 1 小叶榕叶水提取物及各萃取部位对 RAW264.7 细胞分泌 NO 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 The effect of water extract of *Ficus microcarpa* leaves and the polar solvent extract of different parts on secretion of NO in RAW264.7

组别	浓度 /mg·mL ⁻¹	NO 释放量 /μmol·L ⁻¹	NO 抑制率 /%
正常对照组		5.00 ± 0.32	
LPS 组		24.64 ± 0.74 [#]	
DEX 组	1.0 × 10 ⁻³	14.73 ± 1.89 ^{**}	41.8
水提取物	1.1	16.77 ± 1.79 ^{**}	33.2
	2.3	17.42 ± 1.82 ^{**}	30.0
	4.5	20.56 ± 1.81 ^{**}	17.2
石油醚萃取部位组	1.1	26.12 ± 4.07	-0.05
	2.3	28.99 ± 1.63	-1.5
	4.5	30.10 ± 2.79	-2.5
乙酸乙酯萃取部位组	1.1	15.19 ± 4.09 ^{**}	39.8
	2.3	18.16 ± 1.97 ^{**}	27.3
	4.5	21.95 ± 0.58	11.3
正丁醇萃取部位组	1.1	20.29 ± 2.10	18.4
	2.3	20.84 ± 1.53	16.0
	4.5	24.27 ± 0.42	1.6
水相部分组	1.1	15.94 ± 2.69 ^{**}	36.7
	2.3	20.57 ± 1.53	17.2
	4.5	22.32 ± 2.09	9.8

注：与正常对照组比较，[#] $P < 0.01$ ；与 LPS 组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

炎症模型。

本实验研究了小叶榕叶水提取物及其不同萃取部位对 RAW264.7 巨噬细胞增殖抑制的作用，结果显示，在本研究所选的浓度范围内小叶榕叶水提取物和不同萃取部位对 RAW264.7 巨噬细胞的活力无明显影响。

本研究结果表明，小叶榕叶水提取物有较明显的抗炎作用，与文献报道相符^[1]。本研究进一步将小叶榕叶水提取物按照极性大小顺序依次进行萃取，并分别对各萃取物进行药效比较。结果显示，乙酸乙酯部位、水相部分能显著抑制细胞上清液中 NO 的含量，乙酸乙酯部位同时能显著抑制 RAW264.7 巨噬细胞 TNF-α 的生成。因此，乙酸乙酯部位、水相部分是小叶榕叶的主要抗炎活性成分，可作为小叶榕叶抗炎药效的研究重点，进一步开展相关的研究。同时，可以推测小叶榕叶可能通过抑制巨噬细胞所产生的 NO、TNF-α 等炎症因子来发挥抗炎作用。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部. 卫生部药品标准[S]. 1997: 110.
[2] 韦锦斌, 黄仁彬, 林军, 等. 小叶榕水提取物和醇提取物止咳平喘作用

表 2 小叶榕叶水提取物及各萃取部位对 RAW264.7 细胞分泌 TNF-α 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 The effect of water extract of *Ficus microcarpa* leaves and the polar solvent extraction of different parts on secretion of TNF-α in RAW264.7

组别	浓度 /mg·mL ⁻¹	TNF-α 释放量 /pg·mL ⁻¹	TNF-α 抑制率 /%
正常对照组		221.28 ± 3.50	
LPS 组		489.18 ± 22.64 [#]	
DEX 组	1.0 × 10 ⁻³	321.28 ± 1.096 ^{**}	62.3
水提取物	1.1	377.60 ± 8.04	41.6
	2.3	333.74 ± 10.53 ^{**}	58.0
	4.5	396.54 ± 37.81	34.5
石油醚萃取部位组	1.1	543.21 ± 27.31	-20.2
	2.3	536.19 ± 11.83	-17.6
	4.5	524.09 ± 13.59	-13.1
乙酸乙酯萃取部位组	1.1	439.35 ± 45.83	18.5
	2.3	389.70 ± 61.09	37.1
	4.5	372.33 ± 59.99 ^{**}	43.5
正丁醇萃取部位组	1.1	453.74 ± 40.49	13.2
	2.3	398.47 ± 66.24	33.8
	4.5	495.84 ± 37.56	-2.6
水相部分组	1.1	599.88 ± 73.72	-41.4
	2.3	580.40 ± 74.57	-34.1
	4.5	394.61 ± 77.80	35.2

注：与正常对照组比较，[#] $P < 0.01$ ；与 LPS 比较，^{**} $P < 0.01$ 。

的比较研究[J]. 广西中医药, 2006, 8(29): 58-59.
[3] 刘力恒, 王立升, 王天文, 等. 小叶榕化学成分及药理活性的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 390-392.
[4] 戴臻, 李书渊, 房志坚, 等. HPLC 法测定不同采收期小叶榕叶中异牡荆苷的含量[J]. 广东药学院学报, 2008, 24(3): 231-235.
[5] 刘利本, 平家奇, 刘婧陶. 蒲公英提取物对 LPS 激活小鼠腹腔巨噬细胞炎症因子分泌的影响[J]. 动物医学进展, 2011, 32(2): 45-47.
[6] 谢勇, 曾建伟, 林秀琴, 等. 草珊瑚多糖对经脂多糖刺激的 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用研究[J]. 中国食物与营养, 2010, 16(10): 63-65.
[7] 支娜, 陶玲, 沈祥春. 大蝎子草水层部位对 LPS 诱导大鼠腹腔巨噬细胞 iNOS 与 TNF-α 的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(3): 39-41.
[8] 陈艳芬, 江涛, 唐春萍, 等. 小叶榕不同提取物镇咳祛痰作用的比较研究[J]. 中医药导报, 2010, 16(7): 98-99.
[9] 吴秀荣, 梅全喜, 林焕泽, 等. 白木香叶提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞炎症因子的影响[J]. 今日药学, 2012, 22(8): 471-473.
[10] 沈祥春, 支娜, 许立, 等. 大蝎子草乙酸乙酯部位对脂多糖诱导巨噬细胞炎症介质表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(9): 1397-1400.
[11] 陈露, 蓝鸣生, 王硕. 小叶榕不同提取物的主要药效学研究[J]. 广西植物, 2009, 29(6): 871-874.

(编辑：梁进权)