

藏荆芥乙醇提取物抗炎作用及机制研究

泽仁拉姆¹, 袁瑞瑛^{1,2}, 李鑫宇³, 范成德³, 黄山³, 卓玛东智¹, 王聚乐¹, 普珍¹ (1. 西藏大学医学院, 西藏拉萨 850012; 2. 武汉大学药学院, 湖北 武汉 430072; 3. 青岛科技大学化工学院, 山东 青岛 266042)

摘要: **目的** 研究藏荆芥乙醇提取物对脂多糖(LPS)诱导的体内炎症模型的作用及其作用机制。**方法** 将小鼠随机分为空白对照组、脂多糖模型组、阳性药地塞米松(0.000 5 g·kg⁻¹)组及藏荆芥乙醇提取物低、中、高剂量组(0.500、1.000、2.000 g·kg⁻¹), 每组 10 只。通过腹腔注射脂多糖(0.001 g·kg⁻¹)建立小鼠急性腹膜炎模型, 采用酶联免疫法(ELISA)检测各组小鼠腹腔灌洗液中炎症因子水平。另外, 通过脂多糖诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 建立细胞炎症模型, 将 RAW264.7 细胞分为空白对照组、脂多糖模型组及不同浓度藏荆芥乙醇提取物组(25、50、100、200、400 μg·mL⁻¹), 检测细胞存活率以筛选给药浓度; ELISA 法检测藏荆芥乙醇提取物对促炎因子一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-6、IL-1β 的抑制作用; 蛋白电泳法检测促炎介质诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和环氧化酶-2(COX-2)的表达水平, 并采用蛋白电泳法和免疫荧光法检测细胞中 NF-κB 通路相关蛋白(p65、p-IκBα、IκBα)的表达水平。**结果** 体内实验中, 与脂多糖模型组比, 藏荆芥乙醇提取物中、高剂量组均不同程度降低了小鼠腹腔中 TNF-α、IL-6、IL-1β 的表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。在体外实验中, 根据实验结果, 与空白对照组比, 400 μg·mL⁻¹的藏荆芥乙醇提取物表现出明显的细胞毒性($P < 0.01$), 而 25~200 μg·mL⁻¹的藏荆芥乙醇提取物对细胞存活率无明显影响($P > 0.05$), 用于进一步实验; 与脂多糖模型组比, 藏荆芥组 NO、TNF-α、IL-6、IL-1β 水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。蛋白电泳结果显示, 与脂多糖模型组比, 不同浓度(150、200 μg·mL⁻¹)的藏荆芥组明显抑制 p65、p-IκBα 的表达, 逆转了 IκBα 的表达下降, 且差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。免疫荧光结果显示, 与脂多糖模型组比, 藏荆芥乙醇提取物明显抑制了细胞核中的 p65 的表达。**结论** 藏荆芥提取物具有明显的抗炎活性, 其作用机制可能通过抑制 NF-κB 通路活化而改善体内、外炎症。

关键词: 藏荆芥; 乙醇提取物; 巨噬细胞 RAW264.7; 小鼠; 炎症; NF-κB

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)11-1632-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.11.006

The Effect and Mechanism of Ethanol Extract of *Nepeta Angustifolia* C. Y. Wu on Inflammation

ZEREN Lamu¹, YUAN Ruiying^{1,2}, LI Xinyu³, FAN Chengde³, HUANG Shan³, ZHUOMA Dongzhi¹, WANG Jule¹, PU Zhen¹ (1. School of Medicine, Tibet University, Lhasa 850012 Tibet, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072 Hubei, China; 3. School of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qindao 266042 Shandong, China)

Abstract: **Objective** To study the effect and mechanism of ethanol extract of *Nepeta Angustifolia* C. Y. Wu (NA) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation *in vivo* and *in vitro*. **Methods** KM mice were randomly divided into the control group, LPS group and positive drug group (dexamethasone, 0.000 5 g·kg⁻¹), NA low, medium and high dose groups (0.500, 1.000, 2.000 g·kg⁻¹), 10 mice in each group. Mice model of acute peritonitis was established by intraperitoneal injection of LPS (0.001 g·kg⁻¹), and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was

收稿日期: 2021-04-18

作者简介: 泽仁拉姆, 女, 讲师, 硕士, 研究方向: 藏药药理学。Email: 994033145@qq.com。通信作者: 普珍, 女, 副教授, 研究方向: 藏药药理学。Email: 411658159@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760779, 81960781); 西藏自治区科技厅自然科学基金项目[XZ2019ZRG-13(Z)]; 西藏大学科研创新团队建设(00060612)。

used to detect the level of inflammatory cytokines in the peritoneal lavage solution of mice. *In vitro*, LPS was used to induce mouse macrophages RAW 264.7 to establish a cell inflammation model. RAW 264.7 cells were divided into the control group, LPS group and difference concentration of NA groups (25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). MTT assay was used to detect the cell viability and screen the concentration of drug administration, and the effect of NA on pro-inflammatory cytokines such as nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) were measured by ELISA. The protein expression level of inducible nitric oxid synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) also were measured by Western Blotting. The expression levels of NF- κ B signaling pathway related proteins (p65, p-I κ B α and I κ B α) were detected by western blotting and immunofluorescence. **Results** *In vivo*, the levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in mice peritoneal of NA medium and high dose groups were significantly decreased when compared with LPS group in a dose-independent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). *In vitro*, MTT results showed that 25~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of NA has no significant effect on the cell viability ($P > 0.05$), while 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of NA exhibited significant cytotoxicity compared with the control group. Thus, the concentration of NA from 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was used for further experiment. Compared with LPS group, the levels of NO, TNF- α , IL-6 and IL-1 β in NA group were significantly decreased in a dose-independent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Additionally, Western Blotting results showed that the protein expression levels of iNOS and COX-2 in LPS group were significantly increased compared of that in the control group, while NA treatment dose-independently decreased the protein expression of iNOS and COX-2 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Western Blotting results showed that different concentration of NA (150, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) suppressed the phosphorylation of p65 and p-I κ B α , and restored the expression of I κ B α compared of that in LPS group with statistical difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Immunofluorescence results showed that NA treatment significantly inhibited the p65 translocation into the nucleus compared of that in LPS group. **Conclusion** NA may improve inflammation *in vivo* and *in vitro* by inhibiting the activation of NF- κ B signaling pathway, thereby exerts an anti-inflammatory effect.

Keywords: *Nepeta angustifolia* C. Y. Wu; ethanol extract; macrophage RAW264.7; mice; inflammation; NF- κ B

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, 通常情况下, 炎症属于人体必要和有益的免疫反应, 但过度的炎症反应, 则可能引起人体自身免疫系统的过敏, 进而攻击自身的组织及细胞^[1-2]。类固醇(如: 糖皮质激素)和非类固醇(如: 阿司匹林)是临床常用的抗炎药物, 但存在心血管及肠胃系统方面的副作用^[3-4]。我国传统药物, 因其作用良好、毒副作用少等优势, 在抗炎治疗中日益受到重视, 同时, 对于这些传统药物抗炎机制的研究也在逐渐深入。

藏荆芥(藏药名: 萨都那保, ཀ་ཟུང་འཕྲུལ་ནག་ཤོ།)为唇形科荆芥属植物藏荆芥 *Nepeta angustifolia* C.Y.Wu 的全草, 主要分布于我国西藏墨竹工卡、江孜、浪卡子等地区, 是西藏特有的传统药材, 味苦, 性凉, 具开窍醒神之功, 主治神昏痉厥、中风、癫痫、脑溢血、疮伤及疼痛等症^[5]。本课题组前期研究^[6-7]表

明, 与中药荆芥不同, 藏荆芥挥发性成分主要为荆芥内酯; 从其乙酸乙酯萃取部位中, 分离得到熊果酸、齐墩果酸、白桦酸、橙皮苷、补骨脂酚及 β -谷甾醇等成分。药理学实验发现, 藏荆芥挥发油具有良好的抗炎镇痛作用^[8]; 藏荆芥提取物不同部位萃取物中, 石油醚部位、二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位具有明显的抗炎、镇痛作用^[9]; 对于胶原酶IV型诱导大鼠脑出血模型, 藏荆芥提取物通过降低 AQP-4 的表达及提高 NGF 的表达起到改善脑水肿、脑血肿作用^[10]; 对于II型糖尿病大鼠模型, 藏荆芥提取物可明显降低高血糖水平, 改善其“三多一少”症状, 可通过改善内皮功能及减轻炎症反应, 对糖尿病血管病变起着明显的改善作用^[11]; 而对于糖尿病肾病, 可通过抑制氧化应激诱导的细胞凋亡, 有效起到改善的作用^[12]。为了进一步深入研究藏荆芥抗炎作用机制, 本研究拟采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)

诱导急性腹膜炎小鼠模型及相应细胞模型,对藏荆芥抗炎作用及机制进行探讨,为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂 脂多糖,批号:12171104,购于美国 Sigma 公司;地塞米松,批号:191029,上海麦克林生化科技有限公司;DMEM 高糖培养基(批号:AF29457755)、胎牛血清(FBS,批号:2238345RP)、0.25%胰蛋白酶(批号:J190005)、青霉素/链霉素双抗(批号:90212-1),均购于美国 Gibco BRL 公司;肿瘤坏死因子 α (TNF- α ,批号:241161101113)、白细胞介素(IL)-6(批号:132161131113)、IL-1 β (批号:116161061113)试剂盒,武汉博士德公司;Griess(批号:20190908)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:20200806)、RIPA 裂解液(批号:20200917)、异硫氰酸荧光素染液(FITC,批号:20200425)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶染液(DAPI,批号:20200719)、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐探针(DCFH-DA,批号:20200613),MTT(批号:715F0523),北京索莱宝生物科技有限公司;鼠源 iNOS 抗体(批号:13b2720)、鼠源 COX-2 抗体(批号:20p6056)、鼠源 Actin 抗体(批号:1gz2345)、鼠源 Lamin B 抗体(批号:2928)、鼠源 p65 抗体(批号:86g7531)、鼠源 I κ B α 抗体(批号:60k0141)、鼠源 p-I κ B α 抗体(批号:47y6501)、鼠源辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔(批号:4358j82),美国 Affinity 生物科技有限公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器 Infinite M200PR 型全波长酶标仪,瑞士 Tecan 公司;SW-CJ-2FD 型超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;CCL-170B-8 型二氧化碳恒温培养箱,新加坡艺思高科技有限公司;XSP-17CV 型倒置生物显微镜,上海巴拓仪器有限公司;IX73-A22FL/PH 型倒置荧光显微镜,日本 OLYMPUS 公司;Mini P-4 型小型垂直电泳系统,北京凯元信瑞仪器有限公司;Tanon-4600 型化学发光成像仪,上海天能科技有限公司;BSA224S 电子天平,德国 Sartorius 公司;TCL-16 型高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.3 藏荆芥乙醇提取物的制备 藏荆芥采集于西藏拉孜县,经西藏大学王聚乐教授鉴定为正品。称取藏荆芥药材 300 g,并粉碎成粉末,按照料液质量比

1:15 与 70%乙醇混合,加热回流提取 2 次,每次 2 h;纱布过滤,合并 2 次滤液;旋转蒸发,所得浸膏置烘箱 80 $^{\circ}\text{C}$ 中烘干,即得藏荆芥乙醇提取物样品(藏荆芥乙醇提取物中,熊果酸含量不得少于 5.0%,齐墩果酸含量不得少于 1.0%)^[11]。用 DMSO 配置 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的母液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,使用时用生理盐水(动物实验)或 DMEM 培养液(细胞实验)稀释至相应浓度。藏荆芥乙醇提取物储存于西藏大学“藏药组分库”(Component Bank of Tibetan Medicine)实验室,样品编号:CBTM-210。

1.4 动物实验

1.4.1 动物 4 周龄雄性昆明小鼠,SPF 级,体质量 20~22 g,购于湖北省实验动物研究中心,动物许可证号:SCXK(鄂)2015-0018,动物质量合格证号:4200060004284。饲养于武汉大学动物实验中心,许可证号:SYXK(鄂)2019-0013。动物实验符合国家《实验动物管理条例》,并经武汉大学动物伦理委员会批准,批准号:2019122。

1.4.2 ELISA 法检测腹膜炎小鼠炎症因子水平 适应性喂养 1 周后,将昆明小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,分别为空白对照组、脂多糖模型组、阳性药地塞米松组及藏荆芥乙醇提取物低(0.500 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中(1.000 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、高剂量组(2.000 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。按照人与小鼠体表面积折算,藏荆芥临床等效剂量为 0.500 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,作为低剂量;临床等效剂量的 2 倍、4 倍作为中、高剂量。按 10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给药,空白对照组、脂多糖模型组和阳性对照组给予等体积生理盐水,每日 1 次,连续 7 d。末次给药后,各组小鼠禁食不禁水 12 h 后,阳性对照组腹腔注射地塞米松(0.000 5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)^[13-15],1 h 后除空白对照组外的各组小鼠均腹腔注射脂多糖(0.001 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),4 h 后脱颈处死小鼠,打开腹腔,用含肝素(25 $\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$)的无菌磷酸盐缓冲液冲洗,用无菌注射器收集腹腔灌洗液。按试剂盒说明书方法测定腹腔洗液中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平。

1.5 细胞实验

1.5.1 细胞 小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 细胞,购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.5.2 细胞培养 将 RAW264.7 培养于含 10%胎牛血清和 1%双抗(青霉素 100 $\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、链霉素 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 DMEM 高糖培养液中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养至约 80%~90%时进行传代。

1.5.3 MTT 法检测藏荆芥乙醇提取物的细胞毒性 将对数生长期的 RAW264.7 细胞以每孔 1×10^5 个接种于 96 孔板中, 培养过夜; 各组加入不同浓度藏荆芥乙醇提取物, 使其药物终浓度为 25、50、100、200、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 空白对照组仅加入含相同浓度的二甲亚砜(DMSO)的培养基; 孵育 24 h 后, 每孔加入 50 μL 的 MTT($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)溶液, 37°C 孵育 4 h; 吸弃孔内的培养液, 每孔加入 150 μL 的 DMSO, 振荡至板底的紫色结晶完全溶解, 酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度(OD)值。细胞存活率计算公式如下: 细胞存活率(%)=(实验组 OD 值-空白孔 OD 值)/(空白对照组 OD 值-空白孔 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.5.4 ELISA 法检测 RAW264.7 细胞上清液中的炎症因子水平 取对数生长期的 RAW264.7 以每孔 5×10^4 个接种于 24 孔板中, 过夜, 按“1.5.3”项下方法分组和给药(25、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 除空白对照组外其余各组加入终浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的脂多糖。24 h 后取各组细胞培养上清液, 采用 Griess 试剂检测各组细胞上清液中 NO 的含量, 并按照 ELISA 说明书测定各组细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平。

1.5.5 Western Blotting 法检测细胞 iNOS、COX-2 以及 NF- κ B 通路相关蛋白表达 将对数生长期的 RAW264.7 细胞以每孔 2×10^5 个接种于 6 孔板中, 细胞处理按“1.5.4”中所述。按照总蛋白提取试剂盒说明书提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度; 蛋白样品制备完成后, 进行凝胶电泳, 并按湿转法将胶中蛋白转到纤维膜上, 室温下用 5% 脱脂奶粉 TBST 封闭 2 h, TBST 洗膜; 然后加入相应稀释比例 1:1 000 一抗(iNOS、COX-2、Lamin B 和 Actin, 以及 NF- κ B 通路相关蛋白 I κ B α 、p-I κ B α 、p65)孵育过夜, TBST 洗膜后加入 1% 脱脂奶粉 TBST 稀

1:5 000 HRP 二抗孵育 1 h; 洗膜后用 ECL 试剂进行显影, 利用化学发光成像仪分析。通过 Gel-Pro Analyzer 软件对蛋白条带灰度进行定量分析, 以目标条带灰度值与内参 Actin 和 Lamin B 条带灰度值之比表示目标蛋白的表达水平。

1.5.6 免疫荧光法检测 RAW264.7 细胞中 p65 的核易位 按“1.5.5”中所述方法处理细胞, 结束后吸弃培养基, 用磷酸盐缓冲液洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛在室温下固定 20 min, 用 0.1% Triton-X 100 孵育 10 min; 然后用 1% FBS 脱脂奶粉封闭 30 min, 用 p65 一抗(1:200)孵育过夜, 用 PBS 冲洗; 再用 FITC 标记的二抗(1:2 000)避光孵育 1 h, PBS 洗 3 次; 用 DAPI($0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)孵育 5 min, PBS 洗 3 次; 将细胞爬片取出, 封片, 至荧光显微镜下观察并拍照。

1.6 统计学处理方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行结果分析。结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 *T* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 藏荆芥乙醇提取物对脂多糖诱导的腹膜炎小鼠炎症因子水平的影响 实验结果见表 1。与空白对照组比较, 脂多糖模型组小鼠腹腔灌洗液中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平均明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与脂多糖模型组比较, 藏荆芥乙醇提取物低剂量组小鼠的 TNF- α 水平($P < 0.05$)及藏荆芥乙醇提取物中($P < 0.05$)、高($P < 0.01$)剂量组和地塞米松组($P < 0.01$)的 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平均降低, 差异有统计学意义。结果说明, 藏荆芥乙醇提取物可降低脂多糖诱导的小鼠腹腔灌洗液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平, 进而减轻脂多糖诱导的小鼠急性腹膜炎。

表 1 藏荆芥乙醇提取物对小鼠腹腔灌洗液中炎症因子水平的作用($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effects of NA on the inflammatory cytokines in the peritoneal lavage solution of mice($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	TNF- α /($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-6/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-1 β /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白对照组	—	4 054.90 $\pm$ 113.02	729.85 $\pm$ 33.91	140.78 $\pm$ 23.88
脂多糖模型组	—	10 156.79 $\pm$ 169.69**	2 439.65 $\pm$ 75.20**	25 633.60 $\pm$ 1535.44**
地塞米松组	0.000 5	5 226.11 $\pm$ 173.47**	1 293.23 $\pm$ 69.55**	3 601.38 $\pm$ 690.50**
藏荆芥乙醇提取物低剂量	0.500	8 626.70 $\pm$ 187.43*	2 126.29 $\pm$ 53.70	4 424.19 $\pm$ 327.90
藏荆芥乙醇提取物中剂量	1.000	3 072.30 $\pm$ 104.03*	1 810.17 $\pm$ 76.10*	3 605.08 $\pm$ 353.93*
藏荆芥乙醇提取物高剂量	2.000	2 514.55 $\pm$ 15.40**	1 756.23 $\pm$ 124.81**	2 877.88 $\pm$ 172.34**

注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与脂多糖模型组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 藏荆芥乙醇提取物的细胞毒性实验结果 结果如表 2 所示, 与空白对照组比较, 当藏荆芥乙醇提取物的浓度在 $25\sim 200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内时, 对 RAW264.7 细胞活性无影响, 差异无统计学意义($P>0.05$); 当浓度达到 $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞存活率下降明显, 差异有统计学意义($P<0.01$)。因此, 本研究采用 $25\sim 200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的藏荆芥乙醇提取物进行后续细胞实验。

表 2 藏荆芥乙醇提取物对细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 2 Effects of NA on the cell viability($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%
空白对照组	—	100.00 ± 13.41
藏荆芥乙醇提取物	25	97.91 ± 10.65
	50	98.76 ± 11.26
	100	98.75 ± 12.06
	200	91.18 ± 11.20
	400	67.41 ± 16.96**

注: 与空白对照组比较, ** $P<0.01$

2.3 藏荆芥乙醇提取物对脂多糖诱导的巨噬细胞上清液中炎症因子水平的影响 实验结果如表 3 所示。

表 3 藏荆芥乙醇提取物对细胞中炎症因子水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

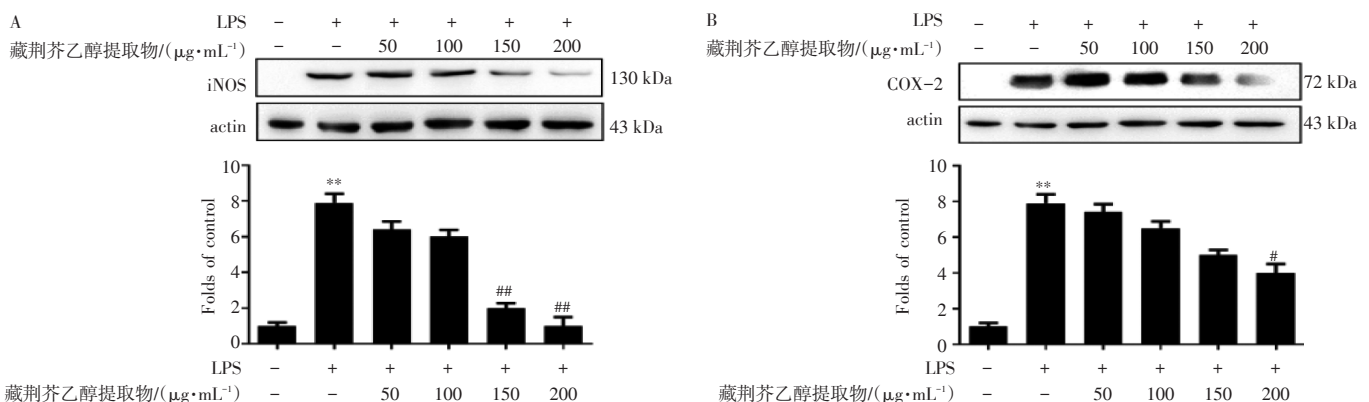
Table 3 Effects of NA on the level of pro-inflammatory cytokines in cells($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	NO/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	TNF- α / $(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$	IL-6/ $(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$	IL-1 β / $(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$
空白对照组	—	6.06 ± 0.71	12 434.02 ± 281.26	44.97 ± 7.19	12.41 ± 0.09
脂多糖模型组	1	18.21 ± 1.54**	828 397.36 ± 21 712.43**	4 904.12 ± 190.94**	345.46 ± 66.54**
藏荆芥乙醇提取物	25	10.79 ± 0.97**	575 196.16 ± 30 146.14	4 000.28 ± 262.69**	203.52 ± 45.13**
	50	10.55 ± 1.27**	480 423.86 ± 26 098.28*	3 576.82 ± 277.99**	144.61 ± 22.18**
	100	8.74 ± 0.35**	194 878.77 ± 23 187.17**	2 113.48 ± 394.08**	135.03 ± 20.08**
	200	8.00 ± 0.85**	146 425.96 ± 17 238.21**	1 734.64 ± 369.06**	99.45 ± 18.52**

注: 与空白对照组比较, ** $P<0.01$; 与脂多糖模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

与空白对照组比较, 脂多糖模型组细胞上清液中的炎症因子 NO、TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 水平均明显上升, 差异有统计学意义($P<0.01$)。与脂多糖模型组比较, 当藏荆芥乙醇提取物浓度为 $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞上清液中 NO、IL-6、IL-1 β 水平均有明显下降, 差异有统计学意义($P<0.01$), TNF- α 水平也有降低, 但差异无统计学意义($P>0.05$); 当藏荆芥乙醇提取物浓度为 $50\sim 200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞上清液中 NO、TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 水平均有明显下降, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。由此说明, 藏荆芥乙醇提取物可降低脂多糖诱导的巨噬细胞上清液中的炎症因子水平。

2.4 藏荆芥乙醇提取物对脂多糖诱导巨噬细胞中 iNOS、COX-2 以及 NF- κ B 通路相关蛋白表达的影响 如图 1 所示, 与空白对照组比较, 脂多糖模型组细胞的 iNOS 和 COX-2 的表达量均升高, 差异有统计学意义($P<0.01$)。与脂多糖模型组比较, 当藏荆芥乙醇提取物浓度为 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞 iNOS 和 COX-2 的表达量有一定程度下降, 但差异无统计学意义($P>0.05$); 当藏荆芥乙醇



注: 与空白对照组比较, ** $P<0.01$; 与脂多糖(LPS)模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 1 藏荆芥乙醇提取物对细胞中 iNOS(A)和 COX-2(B)蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

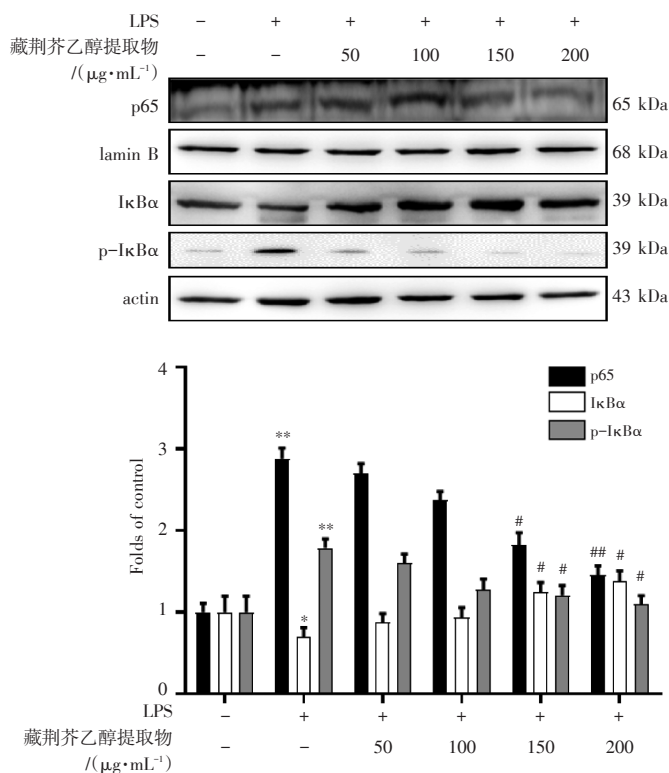
Figure 1 Effects of NA on the protein expression of iNOS(A) and COX-2(B) in cells($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

提取物浓度为 $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, iNOS 的表达量下降明显 ($P < 0.01$), COX-2 的表达量虽然也有下降 ($P > 0.05$), 但差异无统计学意义; 当藏荆芥乙醇提取物浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, iNOS ($P < 0.01$) 及 COX-2 的表达量均明显下降 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。

如图 2 所示, 与空白对照组比较, 脂多糖模型组细胞核中的 p65 表达量明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与脂多糖模型组比较, 藏荆芥乙醇提取物浓度为 50 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, p65 表达量的差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 浓度为 150 、 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, p65 表达量下降明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与空白对照组比较, 脂多糖模型组细胞胞浆中 I κ B α 的表达量明显下降 ($P < 0.05$), p-I κ B α 的表达量明显上升 ($P < 0.01$), 差异均有统计学意义。与脂多糖模型组比较, 藏荆芥乙醇提取物浓度为 50 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, I κ B α 和 p-I κ B α 表达量的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 浓度为 150 、

$200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, I κ B α 表达量明显升高, p-I κ B α 表达量明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。由此可见, 150 、 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 藏荆芥乙醇提取物可抑制脂多糖诱导的 NF- κ B 信号通路的活化。

2.5 藏荆芥乙醇提取物对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞中 p65 核易位的影响 如图 3 所示, 绿色为 p65 阳性染色, 蓝色为 DAPI 细胞核阳性染色。由图 3 可知, 与空白对照组比较, 脂多糖模型组细胞核中的 p65 表达量明显增加; 与脂多糖模型组比较, $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 藏荆芥乙醇提取物组细胞核中的 p65 表达量有一定程度下降, 表明藏荆芥乙醇提取物能够抑制脂多糖诱导的 p65 核易位。



注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与脂多糖(LPS)模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 2 藏荆芥乙醇提取物对细胞中 NF- κ B 信号通路活化的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 2 Effects of NA on the activation of NF- κ B signaling pathway in cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

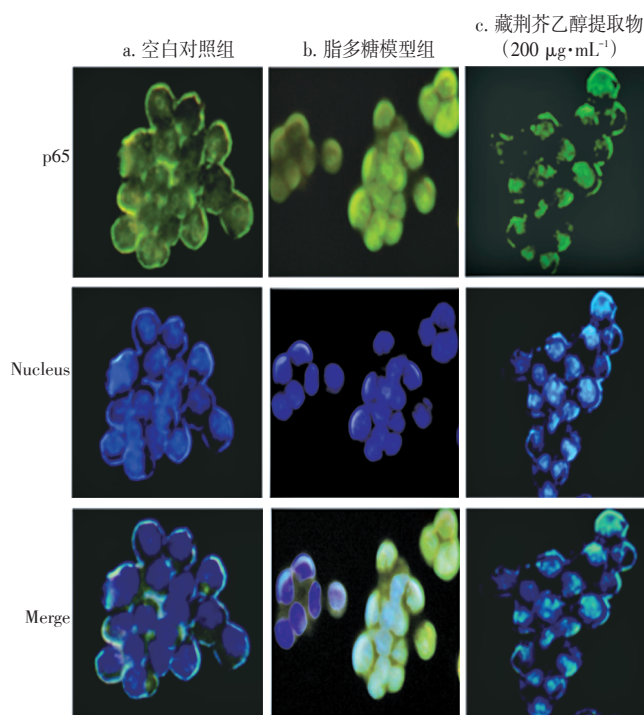


图 3 藏荆芥乙醇提取物对细胞中 p65 核易位的影响 ($\times 400$)
Figure 3 Effects of NA on the nuclear translocation of p65 in cells ($\times 400$)

3 讨论

炎症是具有血管系统的活体组织对各种损伤因子的刺激所发生的以防御为主的基本病理过程, 这些病理过程包括血管扩张、局部炎症性充血及组织液渗出、炎细胞浸润及炎症介质释放等^[1, 16-17]。免疫细胞和炎症因子在炎症反应发生和消退过程中发挥着重要作用, 其中, 作为机体重要非特异性免疫细胞的巨噬细胞, 在启动炎症反应和抵抗外界感染中起着较为关键的作用^[18]。在诱导炎症反应的多种因素

中,脂多糖是最常见且危害性最大的因素,其诱导巨噬细胞释放大量炎症因子,诱发炎症反应。因此,脂多糖诱导急性腹膜炎小鼠模型和 RAW264.7 细胞炎症模型,已广泛用于抗炎药物评价及作用机制研究^[19-20]。

一氧化氮(NO)是一种重要的继发性炎症介质,一般由一氧化氮合酶(NOS)催化 L-精氨酸产生^[21]。诱导型一氧化氮合酶(iNOS)是参与细胞炎症反应的主要活性酶,可作为一种载体在细胞间进行信息交流。当巨噬细胞受脂多糖刺激后,可诱导 iNOS 表达,进而产生大量 NO,导致炎症加重。COX-2 是炎症反应过程中炎症介质合成的关键酶,其高表达可推动炎症的发展与恶化^[22-23]。本研究实验结果显示,藏荆芥乙醇提取物可明显抑制脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症模型中 NO 含量,还可明显降低细胞模型 iNOS 和 COX-2 蛋白表达。

肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 是机体重要的促炎因子,可导致炎症的发生与发展。其中,TNF- α 是由巨噬细胞产生的炎性细胞因子,不仅可引起炎症反应,还可促进巨噬细胞生成大量 NO 及诱导 IL-1 β 、IL-6 的释放,加剧炎症反应^[24]。IL-1 β 是具有较强生物活性的分泌型促炎因子,在炎症的病理反应中起着关键作用,与白细胞聚集和毛细血管壁通透性增加等炎症过程密切相关;IL-6 是一种功能广泛的多效性细胞因子,当机体炎症反应发生时,IL-6 可迅速被合成并激活急性免疫应答,此外,IL-6 也被认为是脂多糖诱导发热的内源性介质^[25-27]。本实验研究表明,藏荆芥乙醇提取物可降低急性腹膜炎模型小鼠腹腔灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平,也可降低模型细胞上清液中 3 种炎症因子含量,说明藏荆芥乙醇提取物对于体内外炎症模型,均具有明显的炎症抑制作用。

脂多糖可通过 TLR4-MyD88 等信号通路激活 NF- κ B 信号通路,引发相关炎症因子基因及蛋白的表达,最终导致炎症因子的表达升高,引发和加剧炎症反应程度^[28-29]。NF- κ B 一般以异源二聚体形式存在于细胞内,静息状态下,NF- κ B 二聚体与 I κ B 单体偶联,以无活性的形式存在于细胞中;而当此复合体被激活后,I κ B 从复合体中解离并降解,同时 p50/p65 二聚体移位至细胞核内与特定的 κ B 序列结合,参与 iNOS、COX-2、细胞因子等基因的表达,

从而诱导巨噬细胞分泌各类炎症因子,导致炎症的发生^[30-31]。本实验研究结果显示,藏荆芥乙醇提取物可抑制脂多糖诱导巨噬细胞细胞核中 p65 和胞浆中 p-I κ B α 的表达,而 I κ B α 表达升高,说明其可抑制巨噬细胞模型中 NF- κ B 通路的异常活化,起到抗炎作用。

综上,藏荆芥乙醇提取物可降低脂多糖诱导的体内外炎症模型的炎症因子水平,其作用与其抑制 NF- κ B 通路的异常激活有关,这也为藏荆芥的临床应用提供了一定的实验依据,有利于该药的进一步开发与利用。

参考文献:

- [1] MEDZHITOV R. Origin and physiological roles of inflammation[J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 428-435.
- [2] SERHAN C N, SAVILL J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end[J]. *Nature Immunology*, 2005, 6(12): 1191-1197.
- [3] 吕田,叶海,张灿. 安全性高的非甾体抗炎药的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(11): 1258-1265.
- [4] DINARELLO C A. Anti-inflammatory agents: present and future[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 935-950.
- [5] 西藏自治区藏医院药物研究所. 中华本草: 藏药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 359-361.
- [6] 泽仁拉姆. 藏荆芥化学成分与提取工艺的研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2011.
- [7] 胡丹丹, 黄山, 李斌, 等. 藏荆芥与荆芥的挥发性成分比较[J]. *中成药*, 2016, 38(5): 1078-1082.
- [8] 黄山, 江春艳, 龙飞. 藏荆芥挥发油抗炎与镇痛作用研究[J]. *医药导报*, 2011, 30(10): 1262-1265.
- [9] 孟宁, 黄山, 胡丹丹, 等. 藏荆芥不同萃取部位抗炎、镇痛活性研究[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(8): 1874-1877.
- [10] 刘志明, 黄山, 常柄权, 等. 藏荆芥提取物对脑出血大鼠 AQP-4 及 NGF 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(9): 150-154.
- [11] HUANG S, LIU Z M, LIU H F, et al. Nepeta angustifolia attenuates responses to vascular inflammation in high glucose-induced human umbilical vein endothelial cells through heme oxygenase-1 induction[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, 231: 187-196.
- [12] HUANG S, TAN M, GUO F, et al. Nepeta angustifolia C.Y.Wu improves renal injury in HFD/STZ-induced diabetic nephropathy and inhibits oxidative stress-induced apoptosis of mesangial cells[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 255: 112771.
- [13] SUVITHA S, AHMAD B, RASEDEE A, et al. Beta mangostin suppress LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macro-

- phages in vitro and carrageenan-induced peritonitis in vivo[J]. *Journal of Ethnopharmacology: An Interdisciplinary Journal Devoted to Bioscientific Research on Indigenous Drugs*, 2014, 153(2): 435–445.
- [14] SUN W, LIU C, ZHANG Y, et al. Ilexgenin A, a novel pentacyclic triterpenoid extracted from aquifoliaceae shows reduction of LPS-induced peritonitis in mice[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2017, 797: 94–105.
- [15] 王先丽, 任丹, 詹光杰, 等. 延龄草总皂苷对LPS诱导炎症大鼠的抗炎效果[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(8): 296–303.
- [16] MEDZHITOV R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 771–776.
- [17] STEWART A G, BEART P M. Inflammation: maladies, models, mechanisms and molecules[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2016, 173(4): 631–634.
- [18] HAMIDZADEH K, CHRISTENSEN S M, DALBY E, et al. Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation [J]. *Annual Review of Physiology*, 2017, 79: 567–592.
- [19] 王媛. 脂多糖LPS在炎症模型研究中的应用[J]. *特别健康*, 2020, 31: 253.
- [20] 王依楠, 刘静波, 张婷. 一种LPS诱导RAW264.7细胞炎症模型的建立方法: CN108486056A[P]. 2018.
- [21] KROL M, KEPINSKA M. Human nitric oxide synthase—its functions, polymorphisms, and inhibitors in the context of inflammation, diabetes and cardiovascular diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 22(1): 56.
- [22] 汪仕良. 炎症中诱导型氧化氮合酶与环加氧酶2相互作用及胰岛素抗炎效应[J]. *中华烧伤杂志*, 2006, 22(4): 241–242.
- [23] FERRER M D, BUSQUETS-CORTES C, CAPO X, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors as a therapeutic target in inflammatory diseases[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2019, 26(18): 3225–3241.
- [24] KALLIOLIAS G D, IVASHIKIV L. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2016, 12(1): 49–62.
- [25] LOPEZ C G, BROUGH D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(4): 189–195.
- [26] YAZDI A S, GHORESCHI K. The interleukin-1 family[M]. Springer Netherlands, 2016, 941: 21–29.
- [27] NGUYEN D P, LI J, TEWARI A K. Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6(IL-6)[J]. *Bju International*, 2014, 113(6): 986–992.
- [28] 邓超, 任改艳, 孙阿宁, 等. 豆蔻明对TLR4/MyD88/NF- κ B/iNOS信号通路的调节作用[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(6): 779–783.
- [29] 张雯, 宋俊科, 朱晓瑜, 等. 表没食子儿茶素对TLR4/MyD88/NF- κ B通路减轻脂多糖诱导BV2细胞炎症反应的影响[J]. *医药导报*, 2020, 39(6): 735–740.
- [30] NAPETSCHNIG J, HAO W. Molecular basis of NF- κ B signaling [J]. 2013, 42(1): 443–468.
- [31] ZHANG Q, LENARDO M J, BALTIMORE D. 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology[J]. *Cell*, 2017, 168(1–2): 37–57.

(编辑: 修春)