

獐牙菜苦苷的抗炎活性及其对 NF- κ B 通路相关因子 p65 和 IKK- α 表达的影响

王君燕¹, 童晔玲^{2*}, 赵文慧²(1.浙江医院, 杭州 310030; 2.浙江省中医药研究院, 杭州 310007)

摘要: 目的 观察獐牙菜苦苷(Swertiamarin)的抗炎活性以及对核转录因子- κ B(NF- κ B)通路的调控作用。方法 采用脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 构建体外炎症模型, CCK-8 法观察獐牙菜苦苷对细胞活性的影响, ELISA 法检测其对炎症相关因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)表达的影响, RT-PCR 法测定其对 NF- κ B 通路相关因子 p65 和 IKK- α 的 mRNA 表达的影响。结果 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 獐牙菜苦苷能降低细胞存活率, 3.125~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度对细胞存活率无影响; 25~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 獐牙菜苦苷能降低炎症相关因子 TNF- α 及 IL-6 的释放; 12.5~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 獐牙菜苦苷能抑制 p65 的 mRNA 表达, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 獐牙菜苦苷能抑制 IKK- α 的 mRNA 表达。结论 獐牙菜苦苷对 LPS 诱导的炎症模型中 TNF- α 、IL-6 的生成具有抑制作用, 其机制可能与抑制 NF- κ B 通路相关因子 p65、IKK- α 的表达有关。

关键词: 獐牙菜苦苷; 巨噬细胞; 抗炎活性; 核转录因子- κ B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)12-1817-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.12.013

引用本文: 王君燕, 童晔玲, 赵文慧. 獐牙菜苦苷的抗炎活性及其对 NF- κ B 通路相关因子 p65 和 IKK- α 表达的影响[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(12): 1817-1820.

Anti-inflammatory Activity of Swertiamarin and Its Effect on the Expression of NF- κ B Pathway-related Factors p65 and IKK- α

WANG Junyan¹, TONG Yeling^{2*}, ZHAO Wenhui²(1.Zhejiang Hospital, Hangzhou 310030, China; 2.Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the anti-inflammatory activity of Swertiamarin and its regulation effect on the nuclear transcription factor- κ B(NF- κ B) pathway. **METHODS** Lipopolysaccharid(LPS) induced murine macrophage raw 264.7 cell was used to establish an inflammatory model *in vitro*. CCK-8 method was used to observe the effect of Swertiamarin on cell activity. ELISA was used to detect its effect on the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6(IL-6). RT-PCR was used to detect its effect on mRNA expression of NF- κ B pathway related factors p65 and Ikk- α . **RESULTS** The 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Swertiamarin could decrease the cell survival rate, and 3.125~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ had no effect on the cell survival rate. The 25~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Swertiamarin could reduce the release of TNF- α and IL-6. It was found that 12.5~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Swertiamarin could inhibit the mRNA expression of p65, and the mRNA expression of Ikk- α could be inhibited by 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Swertiamarin. **CONCLUSION** Swertiamarin has inhibitory effect on TNF- α and IL-6 production in LPS-induced inflammatory model, and its mechanism may be related to the inhibition of the expression of p65 and IKK- α , which are related factors of NF- κ B pathway.

KEYWORDS: Swertiamarin; macrophage; anti-inflammatory activity; NF- κ B

獐牙菜苦苷(Swertiamarin)是龙胆科(Gentianaceae)獐牙菜属(*Swertia L.*)植物的主要成分之一,属于环烯醚萜苷类化合物^[1]。研究表明,獐牙菜苦苷具有保肝利胆、降糖调脂、解痉镇痛、抗炎、调节免疫等多种生物学活性^[2-3]。本研究采用 LPS 诱导的炎症细胞模型,考察獐牙菜苦苷的抗炎活性及对 NF- κ B 通路相关因子 p65、IKK- α 表达的影响,初步阐明其抗炎作用机制。

1 材料

1.1 细胞株

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞株,购于中国科学院细胞库,液氮保存。

1.2 试剂

獐牙菜苦苷(HPLC \geq 98%,中国药品生物制品检定所,批号:0785-20020);DMEM 高糖培养基(吉诺生物医药技术有限公司,批号:1712260303);

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2016KYA003)

作者简介:王君燕,女,药师 Tel:(0571)81595039 E-mail:523613794@qq.com *通信作者:童晔玲,女,硕士,副研究员 Tel:(0571)88849082 E-mail:tongyeling@sina.com

胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号:20171011);LPS(美国 Sigma,批号:017M4112V);地塞米松(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:B1704084);0.4%台盼蓝(Sigma 公司,批号20171025);CCK-8 检测试剂盒(Dojindo,批号:LA779);小鼠 TNF- α ELISA 检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号:23913119103;规格:96T);小鼠 IL-6 ELISA 检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号:13113119103;规格:96T);Trizol(invitrogen,批号:135404);异丙醇(杭州双林化工试剂厂,批号:20151019);三氯甲烷(南京化学试剂有限公司,批号:14122713024);无水乙醇(杭州双林化工试剂厂,批号:20121225);PBS(gibco,批号:1715884);p65、IKK- α 引物[生工生物工程(上海)股份有限公司];BioRT cDNA First Strand Synthesis Kit(批号:20171201)、BioEasy SYBR Green I Real Time PCR Kit(批号:20180101)均购自杭州博日科技有限公司。

1.3 仪器

3111 型 CO₂ 培养箱(Thermo 公司);ECLIPSE Ti 型倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);HC-2514 型高速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);Spectra Max 190 全波长酶标仪(美国 Molecular Devices);AE240 电子天平(Switzerland);细胞培养板(美国 Costar 公司);7500 型实时荧光定量 PCR 仪(ABI 公司);超低温冰箱(Thermo 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,取对数生长期的细胞用台盼蓝染色,检测细胞存活率 \geq 95%,即可用于实验。

2.2 獐牙菜苦苷溶液的配制

獐牙菜苦苷用 DMEM 高糖培养液配成 1 mg·mL⁻¹,临用前稀释到相应浓度。

2.3 CCK-8 法检测细胞活力

取对数生长期的 RAW264.7 细胞,调整浓度为 1 \times 10⁵·mL⁻¹,每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后加入相应药物。实验设正常对照组和獐牙菜苦苷(3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g·mL⁻¹)组 7 组,每组 6 复孔,加药后 48 h 加入 CCK-8 试剂,37 °C 孵育 4 h,

培养液调零,450 nm 处测量吸光度(A)值,计算细胞存活率(%)。

2.4 ELISA 法检测 RAW264.7 细胞上清 TNF- α 、IL-6 含量

取对数生长期的 RAW264.7 细胞,调整浓度为 1 \times 10⁵·mL⁻¹,接种于 6 孔板中,每孔 2.5 mL,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后加入相应药物。实验设 6 组:正常对照组、LPS(10 μ g·mL⁻¹)组、LPS(10 μ g·mL⁻¹)+地塞米松(5 μ g·mL⁻¹)组、LPS(10 μ g·mL⁻¹)+獐牙菜苦苷(50 μ g·mL⁻¹)组、LPS(10 μ g·mL⁻¹)+獐牙菜苦苷(25 μ g·mL⁻¹)组、LPS(10 μ g·mL⁻¹)+獐牙菜苦苷(12.5 μ g·mL⁻¹)组。每组设 3 个复孔,獐牙菜苦苷提前 24 h 预处理,LPS 刺激 24 h,结束培养后收集细胞上清,采取酶联免疫双抗夹心法,检测 TNF- α 、IL-6 含量,具体按试剂盒说明书步骤操作。

2.5 实时荧光定量 PCR 法检测 RAW264.7 细胞中 p65、IKK- α 的 mRNA 表达

取上述细胞,用 Trizol 法提取总 RNA,按照试剂盒说明书进行逆转录反应和实时荧光定量 PCR 检测。PCR 引物序列见表 1。采用实时荧光定量 PCR 相对定量分析方法(2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法)进行分析。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequence for real time quantitative PCR

基因	引物序列
GAPDH	上游: 5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3'
	下游: 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTGATG-3'
p65	上游: 5'-GGACAGCACCACCTACGATG-3'
	下游: 5'-CTGGATCACTTCAATGGCCTC-3'
IKK- α	上游: 5'-GTGACATAAGTTCGGACTGCG-3'
	下游: 5'-TTTCGATTACATCGCGGAGCT-3'

2.6 统计学方法

各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析,所有数据均由 SPSS 19.0 统计软件进行处理, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 法检测细胞活力

獐牙菜苦苷(100 μ g·mL⁻¹)组的细胞存活率降低,与正常对照组相比差异显著($P < 0.01$)。獐牙菜苦苷(3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 μ g·mL⁻¹)组的细胞存活率与正常对照组相比无显著性差异。结果见图 1。

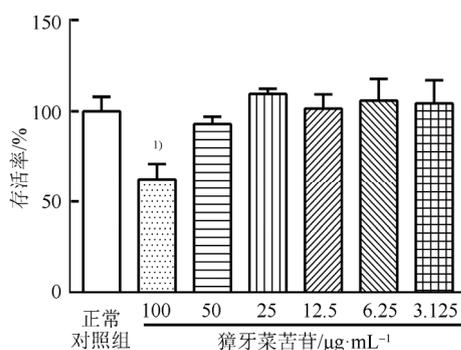


图1 獐牙菜苦苷对细胞活性的影响($n=6$)

与正常对照组相比, $^1)P<0.01$ 。

Fig. 1 The effect of Swertiamarin on cell activity($n=6$)

Compared with the control group, $^1)P<0.01$.

2.2 ELISA 法检测 RAW264.7 细胞上清 TNF- α 、IL-6 含量

与正常对照组相比, RAW264.7 细胞经过 LPS 诱导产生的 TNF- α 以及 IL-6 含量明显升高 ($P<0.01$)。獐牙菜苦苷组中, 随着浓度增加, 对 LPS 致 RAW264.7 细胞产生 TNF- α 及 IL-6 的抑制作用逐渐增强, 其中獐牙菜苦苷($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组的 TNF- α 、IL-6 含量显著低于 LPS 组 ($P<0.01$), 獐牙菜苦苷($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组的 TNF- α 含量显著低于 LPS 组 ($P<0.05$), 结果见表 2。

表 2 獐牙菜苦苷对 LPS 诱导后细胞上清 TNF- α 以及 IL-6 表达的影响($n=3$)

Tab. 2 The effect of Swertiamarin on the expression of TNF- α and IL-6 in cell supernatant induced by LPS($n=3$)

组别	TNF- α /pg·mL $^{-1}$	IL-6/pg·mL $^{-1}$
正常对照组	169.71 \pm 16.78	161.04 \pm 26.57
LPS($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	318.37 \pm 16.73 $^1)$	321.45 \pm 23.24 $^1)$
地塞米松($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	163.71 \pm 7.31 $^3)$	125.62 \pm 30.13 $^3)$
獐牙菜苦苷($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	183.93 \pm 14.18 $^3)$	196.45 \pm 31.61 $^3)$
獐牙菜苦苷($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	207.04 \pm 13.88 $^2)$	276.67 \pm 28.99
獐牙菜苦苷($12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	288.60 \pm 20.82	304.79 \pm 21.42

注: 与正常对照组相比, $^1)P<0.01$; 与 LPS 组相比, $^2)P<0.05$, $^3)P<0.01$ 。

Note: Compared with the control group, $^1)P<0.01$; Compared with LPS group, $^2)P<0.05$, $^3)P<0.01$.

2.3 实时荧光定量 PCR 法检测 RAW264.7 细胞中 p65、IKK- α 的 mRNA 表达

与正常对照组相比, RAW264.7 细胞经过 LPS 处理后, NF- κ B 通路相关因子 P65 和 IKK- α 的 mRNA 表达上调明显 ($P<0.01$); 而加入高、中、低不同浓度剂量的獐牙菜苦苷后, 与 LPS 组相比, 给药组 P65 和 IKK- α 的 mRNA 表达均有不同程度

下调, 且具有剂量依赖性。其中高、中、低浓度獐牙菜苦苷组的 P65 mRNA 含量与 LPS 组比较具有显著性差异 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而 IKK- α mRNA 只有高浓度獐牙菜苦苷给药组与模型组比较具有显著性差异 ($P<0.05$), 结果见图 2。

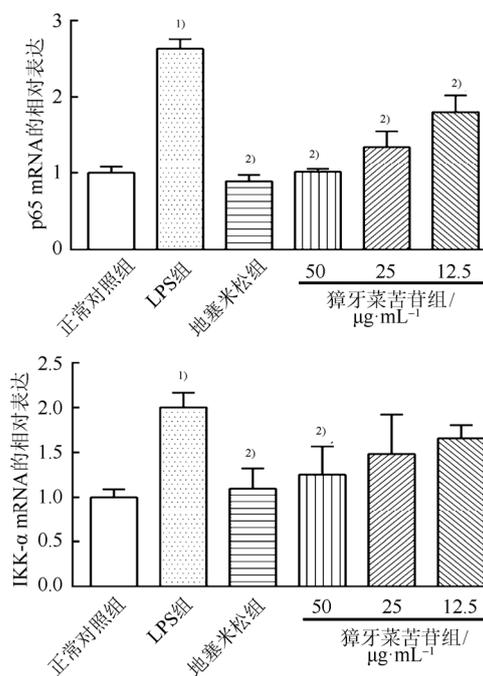


图2 獐牙菜苦苷对 LPS 诱导后细胞 p65、IKK- α mRNA 表达的影响($n=3$)

与正常对照组相比, $^1)P<0.05$; 与 LPS 组相比, $^2)P<0.05$ 。

Fig. 2 The effect of Swertiamarin on the mRNA expression of p65, IKK- α in cell induced by LPS($n=3$)

Compared with the control group, $^1)P<0.05$; compared with LPS group, $^2)P<0.05$.

3 讨论

炎症是一个复杂的生物学过程, 是机体对致病性因素及损伤的一种正常防御反应。在炎症反应过程中, 巨噬细胞在启动、维护、解决炎症反应, 以及促炎细胞因子的过表达等方面起着重要的作用 $^{[4]}$ 。文献已证实, LPS 作用于 RAW264.7 巨噬细胞可激活 TLR4 受体, 引起细胞下游的 NF- κ B 炎性信号通路的激活, 从而产生 TNF- α 、IL-6 等促炎因子, 导致继发瀑布式的级联反应 $^{[5-7]}$ 。IL-6 由多细胞产生, 参与多种生物学过程, 包括免疫异常性疾病和癌症等。TNF- α 能促使中性粒细胞聚集、内皮细胞黏附分子上调、凝血酶原效应等, 在炎症反应、免疫应答的启动和持续过程中具有不可或缺的作用 $^{[8]}$ 。

獐牙菜属植物种类众多, 资源丰富, 成分复

杂, 地理分布广泛, 具有极大的研究价值。有关獐牙菜苦苷的抗炎作用研究报道不多, Saravanan 等^[9-10]利用 IL-1 β 诱导的成纤维细胞样滑膜细胞模型及大鼠佐剂性关节炎模型, 考察獐牙菜苦苷的抗炎作用, 证实獐牙菜苦苷可以在整体动物和细胞水平抑制 NF- κ B、p-I κ B α 、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达, 证实獐牙菜苦苷可能通过 NF- κ B/I κ B、JAK2/STAT3 信号通路产生抗炎作用。

本实验在 Saravanan 等研究的基础上, 通过 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞模型进一步考察了不同浓度獐牙菜苦苷的抗炎活性及其对 NF- κ B 通路相关因子 p65 和 IKK- α 表达的影响, 证实 25~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 獐牙菜苦苷能抑制促炎因子 TNF- α 及 IL-6 的释放; 并能降低 p65 和 IKK- α 的 mRNA 表达, 有效保护了 LPS 所致的机体损伤, 明确了其有效抗炎浓度和初步的作用机制, 为獐牙菜苦苷的临床使用和药物制剂开发提供了一定的科学依据。基于獐牙菜苦苷的良好抗炎活性, 未来有必要结合蛋白质组学, 代谢组学等相关学科进行深入广泛的研究。

REFERENCES

- [1] XIAO H, SONG Y L, WANG Y, et al. Content comparing of Swertiamarin in different species of Swertia [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2009, 26(9): 730-732.
- [2] 李宏亮, 白敏, 宋秋艳, 等. 天然活性成分獐牙菜苦苷的研究进展 [J]. 云南中医学院学报, 2011, 34(4): 66-70.
- [3] CHEN K, WU T, SONG H P. Research progress on pharmacological activities of swertiamarin [J]. Drugs & Clinic(现代药物与临床), 2016, 31(10): 1684-1688.
- [4] SUN H N, HAN Y H, FENG L, et al. 16 α , 17 α -epoxy pregnenolone-20-oxime inhibits NO and IL-6 production in LPS-treated RAW264. 7 cells [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(6): 4927-4933.
- [5] WANG P, QIAO Q, LI J, et al. Inhibitory effects of geraniin on LPS-induced inflammation via regulating NF- κ B and Nrf2 pathways in RAW264. 7 cells [J]. Chem Biol Interact, 2016, 253: 134-142.
- [6] SONG J L, YI R K, GAO Y. Anti-inflammatory effect of methanolic extract of Conyzacanadensis in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264. 7 murine macrophage cells [J]. Pak J Pharm Sci, 2016, 29(3): 935-940.
- [7] LIU Y F, LI M M, LIU F, et al. Effect of Methotrexate on the pathway of LPS-induced pI κ B α -NF- κ Bp65-inflammatory cytokine in the rat spinal cord glial cells [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(2): 186-190.
- [8] YU B, HUANG S H, ZHANG T S, et al. Interleukin-6 as a therapeutic target on inflammatory disease and castleman's disease [J]. J Logist Univ PAP(Med Sci)(武警后勤学院学报: 医学版)[J]. 2017, 26(7): 634-636.
- [9] SARAVANAN S, ISLAM V I, THIRUGNANASAMBANTHAM K, et al. Swertiamarin ameliorates inflammation and osteoclastogenesis intermediates in IL-1 β induced rat fibroblast-like synoviocytes [J]. Inflamm Res, 2014, 63(6): 451-462.
- [10] SARAVANAN S, ISLAM V I, BABU N P, et al. Swertiamarin attenuates inflammation mediators via modulating NF- κ B/I κ B and JAK2/STAT3 transcription factors in adjuvant induced arthritis [J]. Eur J Pharm Sci, 2014, 56: 70-86.

收稿日期: 2018-04-03
(本文责编: 曹粤锋)