

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20233503

· 论 著 ·

黄杞苷干预 NF- κ B 信号通路抑制巨噬细胞炎症反应及氧化应激

李 珊¹, 周志文², 刘湘花³, 李宁宁⁴, 杨 艺¹, 闵远骞², 禄保平⁵

(1. 河南中医药大学医学院病理学与病理生理学教研室, 河南 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第二临床医学院肝胆脾胃科三区, 河南 郑州 450046; 3. 河南中医药大学电镜中心, 河南 郑州 450046; 4. 河南医学高等专科学校病理学教研室, 河南 郑州 451191; 5. 河南中医药大学肝病研究所, 河南 郑州 450046)

[摘要] 目的 探讨黄杞苷对脂多糖(LPS)诱导的小鼠 RAW264.7 巨噬细胞增殖、炎症反应及氧化应激的干预效果及分子机制。方法 RAW264.7 细胞随机分为对照组、LPS 组和不同浓度黄杞苷干预组, 于不同培养时间用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞的增殖; ELISA 检测上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)浓度; 试剂盒检测细胞活性氧(ROS)、超氧化物(O₂·⁻)和一氧化氮(NO)的释放量; Western blot 检测 NF- κ B 信号通路中 I κ B α 、p65、p-p65 蛋白的表达。结果 LPS 组较对照组细胞增殖增加, 而 100、200、400、600、800 μ mol/L 黄杞苷均能抑制 LPS 诱导的细胞增殖, 其中 400 μ mol/L 黄杞苷干预效果最明显。LPS 组细胞产生的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、O₂·⁻ 和 NO 较对照组升高, 400 μ mol/L 黄杞苷可降低 LPS 诱导 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、O₂·⁻ 和 NO 的产生。LPS 组细胞 I κ B α 蛋白水平下调, p65 蛋白、p-p65 蛋白水平上调, 而黄杞苷可抑制 LPS 诱导的 I κ B α 蛋白水平下调, p65 蛋白、p-p65 蛋白水平上调。结论 黄杞苷可能通过干预 NF- κ B 信号通路, 抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞增殖、炎症因子和 ROS/活性氮簇(RNS)产生, 显示了重要的抗炎和抗氧化功效, 为其治疗炎症性疾病的深入研究提供一定的依据和借鉴。

[关键词] 黄杞苷; NF- κ B 信号通路; 炎症; 氧化应激; 巨噬细胞

[中图分类号] R963 R966

Engeletin suppresses inflammatory response and oxidative stress of macrophage through interfering the NF- κ B signaling pathway

LI Shan¹, ZHOU Zhi-wen², LIU Xiang-hua³, LI Ning-ning⁴, YANG Yi¹, MIN Yuan-qian², LU Bao-ping⁵ (1. Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. The Section III of Hepatobiliary-Spleen-Stomach Department, The Second Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. Electron Microscope Center, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 4. Department of Pathology, Henan Medical College, Zhengzhou 451191, China; 5. Institute of Hepatology, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective** To explore the intervention effect and molecular mechanism of engeletin on the proliferation, inflammatory response, and oxidative stress in mouse RAW264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** RAW264.7 cells were randomly divided into the control group, the LPS group and the intervention groups with different engeletin concentrations. Cell proliferation was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay at different culture times. The concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-

[收稿日期] 2022-10-20

[基金项目] 河南省高等学校重点科研项目(21B310003); 河南省高等学校青年骨干教师资助项目(2021GGJS084); 河南省科技攻关计划项目(222102310373)

[作者简介] 李珊(1982-), 女(汉族), 河南省郑州市人, 副教授, 主要从事中医药抗感染性疾病研究。

[通信作者] 禄保平 E-mail: lbp1921@sohu.com

6) and interleukin-1 β (IL-1 β) in supernatant were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The release of cell reactive oxygen species (ROS), superoxide ($O_2 \cdot^-$) and nitric oxide (NO) was detected by corresponding kits. Expression of I κ B α , p65 and p-p65 in NF- κ B signaling pathway was analyzed by Western blot.

Results Compared with the control group, cell proliferation in the LPS group was increased, 100, 200, 400, 600 and 800 μ mol/L engeletin could inhibit LPS-induced cell proliferation, and 400 μ mol/L engeletin intervention was most effective. TNF- α , IL-6, IL-1 β , ROS, $O_2 \cdot^-$ and NO produced by cells in the LPS group were higher than those in the control group. 400 μ mol/L engeletin could decrease the production of LPS-induced TNF- α , IL-6, IL-1 β , ROS, $O_2 \cdot^-$ and NO. In the LPS group, protein level of I κ B α was down-regulated, and p65 and p-p65 were up-regulated; engeletin could rescue these phenotypes. **Conclusion** Engeletin may inhibit cell proliferation and the generation of inflammatory factors, ROS/reactive nitrogen species (RNS) in RAW264.7 cells under LPS induction through interfering NF- κ B signal pathway. It shows an important anti-inflammatory and antioxidant effect, and provides reference for research of engeletin in the treatment of inflammatory diseases.

[**Key words**] engeletin; NF- κ B signaling pathway; inflammation; oxidative stress; macrophage

炎症是机体对生物性、物理性、化学性等因素造成的损伤产生防御反应。炎症反应的产生伴随炎症细胞的渗出激活、吞噬免疫作用及炎症介质的合成、释放过程。炎症若迁延不愈,持续存在,便会呈现慢性炎症状态。研究^[1-5]证实,慢性炎症与肝硬化、冠心病、糖尿病、神经退行性疾病、肿瘤等多种疾病的发生发展密切相关。巨噬细胞是慢性炎症时发挥免疫吞噬功能的关键细胞,能够产生肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-10 (IL-10)等炎症介质^[6]。因此,研究巨噬细胞参与慢性炎症的作用机制,可以为进一步开发相应疾病的临床治疗药物提供重要参考。中药源自天然药材,在治疗慢性炎症性疾病方面具有独特优势。黄芩苷(engeletin, CAS号:572-31-6)是从多种药材中分离的黄酮类化合物,在减轻器官损伤、抗肿瘤、抗氧化方面有显著功效^[7-9]。为了解黄芩苷的抗炎作用及机制,本研究用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导小鼠RAW264.7单核巨噬细胞构建炎症模型,观察黄芩苷对炎症因子产生和氧化应激水平的干预效果及分子机制,为黄芩苷的开发利用提供一定的依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞和试剂 小鼠RAW264.7细胞株(中山大学病原生物学教研室馈赠),热灭活胎牛血清(美国GIBCO公司,批号1892436),黄芩苷(成都德思特生物技术有限公司,批号DST191028-045),LPS、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)(北京索莱宝科技有限公司,批号530R059、715F056、1121E0323)。小鼠TNF- α 、IL-6、IL-1 β

ELISA试剂盒(苏州卡尔文生物科技有限公司,批号E20220501A、E20220601A、E20220601A),活性氧(reactive oxygen species, ROS)、超氧化物($superoxide, O_2 \cdot^-$)、一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号41720200803、081420210429、11020200903、090419191224)。p65、GAPDH抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号10005701、10017731),辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)-IgG(H+L)抗体(成都正能生物技术有限公司,批号LL0310N),p-p65和I κ B α 抗体(美国Cell Signaling公司,批号013346S000204122021、004814T001711182020)。

1.2 试验仪器 细胞培养箱、低温离心机(均购自美国Thermo scientific公司),倒置荧光显微镜(日本Olympus公司),酶标仪、蛋白电泳仪、凝胶成像分析仪(均购自美国Bio-rad公司),荧光全波长酶标仪(美国BioTek公司),水平摇床(美国Scilogex公司)。

1.3 细胞培养及分组 RAW264.7细胞采用含10%胎牛血清和1%青链霉素的高糖DMEM培养基,置于含5%CO₂的37℃培养箱培养,细胞生长密度达80%后,用台盼蓝染色检测细胞存活率达94.25%,表明对数生长期细胞状态良好,可用于后续试验。细胞随机分为对照组、LPS组、不同浓度黄芩苷干预组,对照组给予完全培养基培养,LPS组给予含0.1 μ g/mL LPS的完全培养基培养,黄芩苷干预组则是在含0.1 μ g/mL LPS的完全培养基中加入不同浓度黄芩苷干预。

1.4 MTT细胞增殖检测及形态拍照 取对数生长期的RAW264.7细胞按 2×10^3 细胞/孔接种于

96 孔板,待细胞贴壁后,按照试验分组培养,并采用倒置显微镜观察细胞形态拍照记录。于不同培养时间进行 MTT 细胞增殖检测,在避光条件下加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液继续培养 4 h,弃培养基后加入 200 μL DMSO,置于水平振荡仪上快速振荡 10 min 使结晶物充分溶解,最后置于酶标仪检测各组 OD_{490nm} 值并计算细胞增殖率,细胞增殖率 = (试验组 OD_{490nm} - 空白组 OD_{490nm}) / (OD_{490nm} 对照组 - 空白组 OD_{490nm}) \times 100%。

1.5 ELISA 检测上清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 浓度 收集各组细胞 12、24、36 h 培养上清液,3 000 r/min 离心后去除杂质,依照 ELISA 试剂盒说明,标准孔依次加入 50 μL 倍比稀释的标准品,空白孔加入 50 μL 样本稀释液,样本孔加入 50 μL 稀释 5 倍的培养上清液,除空白孔外,标准孔和样本孔加入 HRP 标记的抗体工作液 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h,甩尽孔内液体,洗涤 5 次后加入四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)底物 A、B 各 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min,加终止液 50 μL ,终止反应后检测 OD_{450nm} 值,根据标准曲线计算上清液中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 浓度。

1.6 检测细胞产生的 ROS、O₂ \cdot^{-} 和 NO

1.6.1 ROS 检测 细胞接种于 12 孔板培养 24 h,依照 ROS 检测试剂盒说明,在阳性对照组孔内加入 Rosup 刺激 30 min,其余孔按照预先分组培养,弃培养基后各孔加入 50 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 探针孵育 20 min,用无血清培养基洗涤 3 次后,采用倒置荧光显微镜观察细胞 ROS 荧光并拍照,重复试验并将培养板置于荧光全波长酶标仪检测各组 OD_{488/525nm} 值,ROS = (试验组 OD_{488/525nm} - 空白组 OD_{488/525nm}) / (对照组 OD_{488/525nm} - 空白组 OD_{488/525nm}) \times 100%。

1.6.2 O₂ \cdot^{-} 检测 细胞按预先分组接种于 96 孔板,LPS+ 黄芩苷组细胞给予不同浓度黄芩苷预处理 24 h,对照组和 LPS 组不作预处理,弃培养基并用 PBS 漂洗 2 次,依照 O₂ \cdot^{-} 检测试剂盒说明,加入 200 μL 检测工作液 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 min,随后 LPS 组和 LPS+ 黄芩苷组加入 LPS 刺激 20 min,置于酶标仪检测各组 OD_{450nm} 值,因超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)可清除 O₂ \cdot^{-} ,以 LPS 孔中加入 2 μL SOD 作为有效标准验证整个检测体系。

1.6.3 NO 检测 收集各组 24 h 培养上清液样本,依照 NO 检测试剂盒说明,按 50 μL /孔在酶标板中加入 0、1、2、5、10、20、40、60、100 $\mu\text{mol/L}$

NO 标准品和各组上清液样本,随后依次加入 Griess Reagent I 50 μL /孔和 Griess Reagent II 50 μL /孔,检测 OD_{540nm} 值并根据标准曲线计算各组 NO 浓度。

1.7 Western blot 检测 I κ B α 、p65、p-p65 蛋白表达 提取各组细胞总蛋白并检测蛋白浓度,蛋白与 5 \times loading buffer 混合后煮沸变性,随后行 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转于聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 漂洗 5 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 I κ B α (1:1 000)、p65(1:2 000)、p-p65(1:1 000)、GAPDH(1:20 000)一抗过夜, TBST 漂洗 5 次,室温孵育 HRP-IgG H + L 二抗(1:5 000)1 h, TBST 漂洗 5 次,采用 ECL 发光法成像仪显色,应用 Image J 软件进行灰度扫描。

1.8 统计学分析 应用 SPSS 22.0 对数据进行统计学分析,试验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用 ANOVA 方差分析、Tukey 检验方法和 LSD 检验方法,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度黄芩苷对 RAW264.7 细胞增殖率的影响 MTT 结果显示,不同组别间细胞增殖率比较,差异有统计学意义($F = 20.41, P < 0.001$);两两比较发现,LPS 组较对照组细胞增殖增加($P < 0.001$),100、200、400、600、800 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷均能抑制 LPS 诱导的细胞增殖(均 $P < 0.05$),其中 400 $\mu\text{mol/L}$ 抑制效果最明显,因此后续试验均采用该浓度。见表 1。

表 1 不同浓度黄芩苷对 RAW264.7 细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 Effect of different concentrations of engeletin on the proliferation rate of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别($n = 4$ /组)	细胞增殖率
LPS 组	155.63 \pm 8.58 ^{###}
LPS+ 100 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷组	134.50 \pm 3.14 [*]
LPS+ 200 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷组	122.73 \pm 6.48 ^{***}
LPS+ 400 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷组	100.48 \pm 3.75 ^{***}
LPS+ 600 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷组	119.78 \pm 13.18 ^{***}
LPS+ 800 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷组	116.58 \pm 5.69 ^{***}
对照组	100.03 \pm 12.77

注:采用单因素方差分析, $F = 20.41, P < 0.001$ 。多组间两两比较采用 Tukey 检验方法,“###”代表与对照组比较, $P < 0.001$;“*”、“***”分别代表与 LPS 组比较 $P < 0.05, P < 0.001$ 。

2.2 400 μmol/L 黄杞苷干预不同时间对 RAW264.7 细胞增殖率的影响 MTT 结果显示, 时间和组别间有交互效应($F=6.95, P<0.001$), 尽管组别和时间对细胞增殖率影响比较, 差异均有统计学意义(均 $P<0.001$), 但不能保证每个时间点的不同组别之间细胞增殖率均有差异。进一步做单独

效应比较发现, 在 12、24、36、48 和 72 h 这些时间点, LPS 组较对照组细胞增殖增加(均 $P<0.001$), LPS+ 黄杞苷组较 LPS 组细胞增殖减少(均 $P<0.01$), 说明 400 μmol/L 黄杞苷能够抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞增殖。见表 2。

表 2 400 μmol/L 黄杞苷干预不同时间对 RAW264.7 细胞增殖率的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 2 Effect of 400 μmol/L engeletin on the proliferation rate of RAW264.7 cells at different intervention times($\bar{x} \pm s, \%$)

组别($n=3$ /组)	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
LPS 组	120.99 ± 18.12	132.01 ± 2.16 ^{###}	161.91 ± 7.28 ^{###}	178.42 ± 4.93 ^{###}	175.19 ± 10.57 ^{###}	175.60 ± 10.68 ^{###}
LPS+ 黄杞苷组	106.41 ± 7.29	115.70 ± 3.86 ^{**}	124.66 ± 2.19 ^{***}	137.89 ± 5.72 ^{***}	136.97 ± 8.61 ^{**}	140.92 ± 9.41 ^{**}
对照组	100.00 ± 5.29	100.09 ± 5.62	100.00 ± 3.76	100.05 ± 6.25	99.96 ± 6.44	99.96 ± 6.79

注: 采用重复测量资料方差分析, 时间×组别, $F=6.95, P<0.001$; 时间, $F=21.77, P<0.001$; 组别, $F=533.80, P<0.001$ 。单独效应比较采用 LSD 检验方法, “###”代表与同一时间的对照组比较, $P<0.001$; “**”、“***”分别代表与同一时间的 LPS 组比较, $P<0.01, P<0.001$ 。

2.3 400 μmol/L 黄杞苷对 RAW264.7 细胞生长状态的影响 倒置显微镜观察发现, LPS 刺激后 RAW264.7 细胞数量增多, 密度较高, 呈抱团生长

状态; 400 μmol/L 黄杞苷干预后, 细胞生长受到抑制, 密度减少, 说明其对 RAW264.7 细胞生长具有抑制作用, 见图 1。



图 1 400 μmol/L 黄杞苷对 RAW264.7 细胞生长状态的影响(100×)

Figure 1 Effect of 400 μmol/L engeletin on the growth of RAW264.7 cells (100×)

2.4 400 μmol/L 黄杞苷对 TNF-α、IL-6、IL-1β 生成的影响 根据 TNF-α、IL-6、IL-1β 标准品浓度梯度和对应的 OD_{450nm} 值生成标准曲线, 利用标准曲线计算出各组 TNF-α、IL-6、IL-1β 浓度。结果显示, TNF-α、IL-6、IL-1β 时间和组别间均无交互效应(均 $P>0.05$), 不同组别间 TNF-α、IL-6、IL-1β 差异有统计学意义(均 $P<0.001$)。两两比较显示, LPS 刺激 RAW264.7 细胞后 12、24、36 h, 培养上清液中 TNF-α、IL-6、IL-1β 均较对照组升高(均 $P<0.05$); 400 μmol/L 黄杞苷干预 12、24、36 h, 培养上清液中 TNF-α、IL-6、IL-1β 均较 LPS 组下降(均 $P<0.05$), 说明黄杞苷可抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞产生 TNF-α、IL-6、IL-1β。见表 3。

果显示, Rosup 组(Rosup 可刺激细胞产生 ROS)和 LPS 组较对照组细胞荧光增多, ROS 量增加(均 $P<0.001$), 说明 LPS 与 Rosup 作用类似, 能刺激 RAW264.7 细胞产生 ROS; 而 LPS+ 黄杞苷组较 LPS 组细胞荧光减少, ROS 量下降($P<0.05$), 说明黄杞苷可抑制 LPS 诱导的 ROS 产生, 见图 2 和表 4。O₂·⁻ 检测结果显示, LPS 组较对照组细胞 O₂·⁻ 量增加($P<0.001$); 而 LPS+ SOD 组(SOD 可清除细胞产生的 O₂·⁻)和 LPS+ 黄杞苷组较 LPS 组细胞 O₂·⁻ 量下降(均 $P<0.01$), 说明黄杞苷与 SOD 效果类似, 能减少 LPS 诱导的 O₂·⁻ 产生, 见表 4。NO 检测结果显示, LPS 刺激细胞 24 h, NO 量较对照组增加($P<0.001$); 而黄杞苷作用于细胞 24 h, NO 量较 LPS 组下降($P<0.001$), 说明黄杞苷可抑制 LPS 诱导的 NO 产生, 见表 4。

2.5 400 μmol/L 黄杞苷对 ROS、O₂·⁻、NO 释放的影响 不同组别之间 ROS、O₂·⁻、NO 释放量比较差异有统计学意义(均 $P<0.001$)。ROS 检测结

表 3 400 μmol/L 黄芩苷对 TNF-α、IL-6、IL-1β 生成的影响 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Table 3 Effect of 400 μmol/L engeletin on the production of TNF-α, IL-6 and IL-1β ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别 (n=3/组)	TNF-α			IL-6			IL-1β		
	12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h
LPS 组	2 865.96 ± 95.17 ^{###}	2 908.91 ± 178.02 ^{##}	3 255.06 ± 91.63 ^{###}	452.16 ± 24.50 ^{##}	465.06 ± 28.03 [#]	485.78 ± 24.66 ^{##}	274.57 ± 12.69 ^{##}	282.95 ± 15.59 ^{##}	310.84 ± 14.21 ^{##}
LPS+ 黄芩苷组	1 604.42 ± 25.22 ^{**}	1 755.06 ± 32.77 [*]	1 967.88 ± 213.91 ^{**}	331.58 ± 44.72 [*]	352.30 ± 35.23 [*]	361.43 ± 22.60 ^{**}	203.47 ± 9.81 ^{**}	231.69 ± 10.52 [*]	262.35 ± 14.01 [*]
对照组	1 341.60 ± 29.44	1 349.29 ± 14.69	1 422.37 ± 5.88	299.12 ± 17.20	262.30 ± 50.33	298.97 ± 23.18	159.75 ± 21.12	183.62 ± 7.16	191.74 ± 0.63

注:采用重复测量资料方差分析。(1)TNF-α 时间×组别, $F=2.89, P=0.069$; 时间, $F=20.45, P<0.001$; 组别, $F=465.70, P<0.001$; (2)IL-6 时间×组别, $F=1.08, P=0.409$; 时间, $F=2.02, P=0.184$; 组别, $F=46.32, P<0.001$; (3)IL-1β 时间×组别, $F=1.42, P=0.286$; 时间, $F=24.54, P<0.001$; 组别, $F=160.60, P<0.001$ 。多组间两两比较采用 Tukey 检验方法,“#”、“##”、“###”分别代表与同一时间的对照组比较, $P<0.05, P<0.01, P<0.001$;“*”、“**”分别代表与同一时间的 LPS 组比较, $P<0.05, P<0.01$ 。

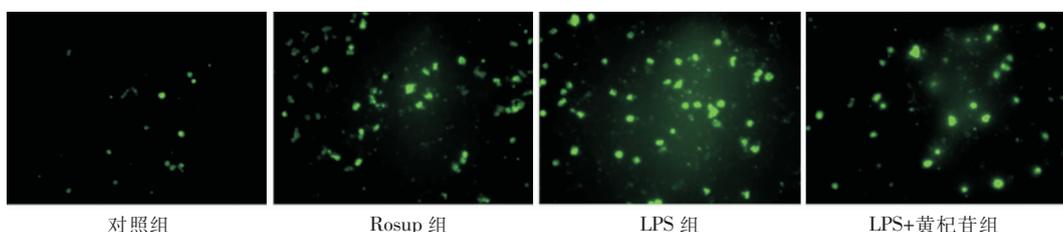


图 2 400 μmol/L 黄芩苷对 RAW264.7 细胞 ROS 荧光的影响 (400×)

Figure 2 Effect of 400 μmol/L engeletin on the ROS fluorescence in RAW264.7 cells (400×)

表 4 400 μmol/L 黄芩苷对 ROS、O₂·⁻、NO 释放的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of 400 μmol/L engeletin on the release of ROS, O₂·⁻ and NO ($\bar{x} \pm s$)

组别 (n=3/组)	ROS(%)	O ₂ · ⁻ (OD _{450nm})	NO(μmol/L)
Rosup 组	202.24 ± 28.25 ^{###}	-	-
LPS 组	260.57 ± 8.59 ^{###}	1.07 ± 0.03 ^{###}	12.28 ± 1.97 ^{###}
LPS+黄 芩苷组	215.92 ± 14.13 [*]	0.85 ± 0.04 ^{**}	4.93 ± 0.55 ^{***}
LPS+ SOD 组	-	0.67 ± 0.06 ^{***}	-
对照组	100.00 ± 2.45	0.73 ± 0.04	4.29 ± 0.62

注:采用单因素方差分析。(1)ROS, $F=51.28, P<0.001$; (2)O₂·⁻, $F=47.10, P<0.001$; (3)NO, $F=38.84, P<0.001$ 。多组间两两比较采用 Tukey 检验方法,“###”代表与相应对照组比较 $P<0.001$;“*”、“**”、“***”分别代表与相应 LPS 组比较, $P<0.05, P<0.01, P<0.001$ 。“-”表示结果不存在。

2.6 400 μmol/L 黄芩苷对 IκBα、p65、p-p65 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,不同组别之间 IκBα、p65、p-p65 蛋白表达差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。两两比较发现,与对照组相比,LPS 组

细胞 IκBα 蛋白表达水平下调 ($P<0.01$),而 p65 蛋白、p-p65 蛋白表达水平上调(均 $P<0.05$);与 LPS 组比较,加入 400 μmol/L 黄芩苷干预后,IκBα 蛋白表达水平上调 ($P<0.001$),而 p65 蛋白、p-p65 蛋白表达水平下调(均 $P<0.05$),提示黄芩苷可干预 NF-κB 信号通路中 IκBα、p65、p-p65 蛋白的表达,见图 3 和表 5。

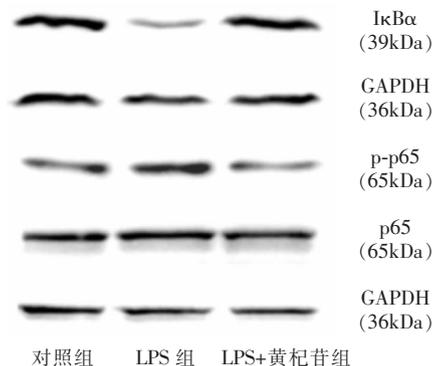


图 3 400 μmol/L 黄芩苷对 IκBα、p65、p-p65 表达的影响
Figure 3 Effect of 400 μmol/L engeletin on the expression of IκBα, p65 and p-p65

表 5 400 μmol/L 黄杞苷对 IκBα、p65、p-p65 蛋白表达的影响
Table 5 Effect of 400 μmol/L engeletin on the expression of IκBα, p65 and p-p65

组别 (n = 3/组)	IκBα/GAPDH	p65/GAPDH	p-p65/p65
LPS 组	0.48 ± 0.05 ^{##}	1.29 ± 0.05 [#]	0.98 ± 0.04 [#]
LPS + 黄杞苷组	1.35 ± 0.21 ^{***}	1.02 ± 0.06 ^{**}	0.89 ± 0.01 [*]
对照组	1.17 ± 0.10	1.08 ± 0.08	0.87 ± 0.03

注：采用单因素方差分析。(1) IκBα/GAPDH, $F = 33.00, P < 0.001$; (2) p65/GAPDH, $F = 13.81, P = 0.006$; (3) p-p65/p65, $F = 13.18, P = 0.006$ 。多组间两两比较采用 Tukey 检验方法，“#”、“##”、“#”分别代表与相应对照组比较, $P < 0.05, P < 0.01$; “*”、“**”、“***”分别代表与相应 LPS 组比较, $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ 。

3 讨论

巨噬细胞是机体的天然免疫细胞,能够吞噬、清除衰老细胞和病原微生物,递呈抗原,并诱导免疫应答反应,具有维持内环境稳态、参与组织修复和抵御感染的重要作用^[10]。LPS 是革兰阴性菌细胞壁破裂释放的主要成分之一,进入体内可诱发炎症反应,激活巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞等,是临床上感染性休克的主要诱因。作为最常见的外源性细菌内毒素成分,LPS 被广泛用于构建体外炎症模型。龙碧莹^[11]用 LPS 刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7 后,细胞增殖能力增强,成功构建巨噬细胞炎症模型。本研究也发现 LPS 刺激后,RAW264.7 细胞数量增多,密度增高,增殖能力增强。巨噬细胞主要在慢性炎症时大量聚集,发挥吞噬免疫作用,可被不同刺激物激活,并诱导 M1 型或 M2 型极化。M1 型巨噬细胞可产生 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-12 等炎症介质,也是体内杀伤性分子 O₂·⁻、羟自由基(hydroxyl radical, ·OH)、NO 等 ROS/活性氮簇(reactive nitrogen species,RNS)的重要来源,从而清除病原微生物,发挥防御功能^[12]。本研究 LPS 刺激后 RAW264.7 细胞发生 M1 极化,TNF-α、IL-1β、IL-6、ROS、NO、O₂·⁻增多,与前期研究^[13-14]一致。其中,NO 属于 RNS,O₂·⁻属于 ROS,两者均可由内、外源性因素诱导产生。LPS 作为内毒素的成分,除了诱导巨噬细胞增殖聚集,还能促进炎症细胞因子、ROS/RNS 的释放,导致炎症病变时氧化应激水平升高。

黄酮类化合物是从多种中药材中分离的,具有抗菌消炎、抗氧化作用的药效成分,分为黄酮类、黄

酮醇类、二氢黄酮类、二氢黄酮醇类、异黄酮类、双黄酮类、查尔酮类及其他黄酮类等,能够治疗多种炎症性疾病。土茯苓总黄酮具有除湿解毒、疏通关节、减轻炎症的药理作用,可减轻痛风性关节炎小鼠的踝关节肿胀度^[15];菝葜总黄酮具有祛风消肿、解毒散瘀、抗炎抗菌的药理作用,能降低慢性盆腔炎大鼠子宫组织中 IL-6 和 IL-1β 水平,一定程度上改善慢性盆腔炎,缓解盆腔粘连^[16]。本研究中的黄杞苷属于土茯苓(光叶菝葜)和菝葜(金刚藤)等菝葜属中药材分离的黄酮类化合物,也能减少 LPS 诱导的炎症细胞因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 的产生,发挥重要的抗炎作用。此外,黄杞苷还能抑制 LPS 诱导的 ROS/RNS 产生。作为细胞氧化还原反应的代谢物,过多的 ROS/RNS 会引起细胞 DNA、蛋白质和脂质的过氧化损伤,诱导细胞死亡^[17]。谢雨露等^[18]研究发现,黄杞苷通过直接或间接清除氮氧自由基减少 ROS/RNS 生成,具有重要的抗氧化作用。

抗炎、抗氧化的药物往往具有抑制氧化损伤、保护组织、细胞的功效。文献^[19-21]证实,黄杞苷能够减轻 LPS 诱导的急性肝、肺损伤和子宫内膜炎,其机制与抑制 NF-κB 信号通路的激活,减少 TNF-α、IL-6、IL-1β 和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的产生或表达有关。NF-κB 是一种广泛存在于细胞内的核转录因子,与类风湿性关节炎、牛皮癣、肠炎、肝纤维化等多种炎症性疾病的发生发展密切相关,是炎症反应和氧化应激级联作用的中心调控器^[22-23]。炎症诱导因子 LPS 可与巨噬细胞表面的 Toll 样受体 4(TLR4)结合,激活 NF-κB 信号通路,高效诱导细胞因子(TNF-α、IL-6、IL-1)、趋化因子、黏附分子(ICAM-1、VCAM-1)等的表达,启动炎症反应;炎症反应产生大量的 ROS/RNS,导致氧化应激水平升高,有利于有效消灭和清除外源感染物^[24-25]。黄杞苷缓解椎间盘退行性变、骨盆炎症性疾病、骨关节炎的作用也均与干预 NF-κB 信号通路有关^[26-28]。因此,黄杞苷抑制巨噬细胞增殖,减少炎症细胞因子和 ROS/RNS 的产生,可能也是通过干预 NF-κB 信号通路实现。

综上所述,本研究发现黄杞苷可能通过干预 NF-κB 信号通路,抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞增殖、炎症因子和 ROS/RNS 的产生,显示了其抗炎和抗氧化功效,为其治疗炎症性疾病的深入研究提供一定的依据和借鉴。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(1): 55–64.
- [2] Wirtz PH, von Känel R. Psychological stress, inflammation, and coronary heart disease[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2017, 19(11): 111.
- [3] Rohm TV, Meier DT, Olefsky JM, et al. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders[J]. *Immunity*, 2022, 55(1): 31–55.
- [4] Stephenson J, Nutma E, van der Valk P, et al. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases[J]. *Immunology*, 2018, 154(2): 204–219.
- [5] Singh N, Baby D, Rajguru JP, et al. Inflammation and cancer[J]. *Ann Afr Med*, 2019, 18(3): 121–126.
- [6] Thapa B, Lee K. Metabolic influence on macrophage polarization and pathogenesis[J]. *BMB Rep*, 2019, 52(6): 360–372.
- [7] Liu H, Li SC, Xu YY, et al. Engeletin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by modulating the VEGF/vasohibin and Ang-1/Tie-2 pathways[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2021, 54(10): e11028.
- [8] Liu T, Li Y, Sun JL, et al. Engeletin suppresses lung cancer progression by inducing apoptotic cell death through modulating the XIAP signaling pathway: a molecular mechanism involving ER stress[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110221.
- [9] 刘慧, 闫冬, 徐洋洋, 等. 黄杞苷对 H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. *滨州医学院学报*, 2021, 44(1): 1–6.
- Liu H, Yan D, Xu YY, et al. Protective effect of engeletin on H₂O₂ induced oxidative stress injury in SH-SY5Y cells[J]. *Journal of Binzhou Medical University*, 2021, 44(1): 1–6.
- [10] Li C, Xu MM, Wang KP, et al. Macrophage polarization and Meta-inflammation[J]. *Transl Res*, 2018, 191: 29–44.
- [11] 龙碧莹. 油酸对脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞炎症反应的影响及其机制[D]. 衡阳: 南华大学, 2019.
- Long BY. Effect of oleic acid on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mouse macrophages and its mechanism [D]. Hengyang: University of South China, 2019.
- [12] Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, et al. Macrophage polarization: different gene signatures in M1(LPS+) vs. classically and M2(LPS-) vs. alternatively activated macrophages[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1084.
- [13] Monga S, Fares B, Yashaev R, et al. The effect of natural-based formulation (NBF) on the response of RAW264.7 macrophages to LPS as an in vitro model of inflammation[J]. *J Fungi (Basel)*, 2022, 8(3): 321.
- [14] 李思媛, 崔玉顺, 李新星, 等. 黄精皂苷对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症模型的抗炎作用及其机制[J]. *中成药*, 2021, 43(10): 2659–2665.
- Li SY, Cui YS, Li XX, et al. Anti-inflammatory effect and mechanism of Polygonati Rhizoma saponins on inflammation model of LPS-induced RAW264.7 cells[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2021, 43(10): 2659–2665.
- [15] 金晓敏, 张晓熙, 郭璐, 等. 基于 NLRP3 炎性体轴探讨土茯苓总黄酮对痛风性关节炎的作用和机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(4): 90–95.
- Jin XM, Zhang XX, Guo L, et al. Effect and mechanism of total flavonoids from Smilacis Glabrae Rhizoma in treatment of gouty arthritis based on NLRP3 inflammasomes axis[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2018, 24(4): 90–95.
- [16] Chen JQ, Jin C, Xu BL, et al. Identification of major compounds of total flavonoids from Smilax china and evaluation of anti-inflammatory effect on phenol mucilage-induced pelvic inflammation in rats[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2021, 30(2): 157–168.
- [17] 周志文, 李姗, 刘湘花, 等. 中药单体调控氧化应激肝纤维化的机制和价值[J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(9): 2198–2202.
- Zhou ZW, Li S, Liu XH, et al. Research advances in monomers of Chinese herbs in treatment of liver fibrosis by regulating oxidative stress[J]. *Journal of Clinical Hepatology*, 2021, 37(9): 2198–2202.
- [18] 谢雨露, 黄毓桃, 李熙灿. 黄杞苷保护 DNA 氧化损伤的活性及其可能机制[J]. *中国现代应用药学*, 2018, 35(9): 1333–1336.
- Xie YL, Huang YY, Li XC. Protection effect of engeletin towards DNA against oxidative damage and its possible mechanisms[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2018, 35(9): 1333–1336.
- [19] Tian Q, Wang GJ, Zhang YM, et al. Engeletin inhibits lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury in mice through activating PPAR-γ[J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 140(3): 218–222.
- [20] Jiang X, Chen LJ, Zhang Z, et al. Protective and therapeutic effects of engeletin on LPS-induced acute lung injury[J]. *Inflammation*, 2018, 41(4): 1259–1265.
- [21] Wu HC, Zhao G, Jiang KF, et al. Engeletin alleviates lipopolysaccharide-induced endometritis in mice by inhibiting TLR4-mediated NF-κB activation[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(31): 6171–6178.
- [22] Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling[J]. *Cell Res*, 2011, 21(1): 103–115.
- [23] Hoessel B, Schmid JA. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 86.
- [24] Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(6): a001651.

- [25] 于卫华, 周庆彪, 刘颖, 等. 活性氧调控炎症诱发肿瘤机制的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2016, 28(2): 158 - 161.
Yu WH, Zhou QB, Liu Y, et al. Research progress on the mechanism of reactive oxygen species regulating inflammation and inducing tumor[J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2016, 28(2): 158 - 161.
- [26] Li BX, Yang X, Zhang P, et al. Engeletin alleviates the inflammation and apoptosis in intervertebral disc degeneration via inhibiting the NF- κ B and MAPK pathways[J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 5767 - 5783.
- [27] Wang CM, La L, Feng HX, et al. Aldose reductase inhibitor engeletin suppresses pelvic inflammatory disease by blocking the phospholipase C/protein kinase C-dependent/NF- κ B and MAPK cascades[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(42): 11747 - 11757.
- [28] Wang H, Jiang ZX, Pang ZY, et al. Engeletin protects against TNF- α -induced apoptosis and reactive oxygen species

generation in chondrocytes and alleviates osteoarthritis in vivo [J]. J Inflamm Res, 2021, 14: 745 - 760.

(本文编辑: 翟若南)

本文引用格式:李珊,周志文,刘湘花,等. 黄杞苷干预 NF- κ B 信号通路抑制巨噬细胞炎症反应及氧化应激[J]. 中国感染控制杂志, 2023, 22(4): 383 - 390. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 - 9638. 20233503.

Cite this article as: LI Shan, ZHOU Zhi-wen, LIU Xiang-hua, et al. Engeletin suppresses inflammatory response and oxidative stress of macrophage through interfering the NF- κ B signaling pathway[J]. Chin J Infect Control, 2023, 22(4): 383 - 390. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 - 9638. 20233503.