

# 连翘脂素对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症反应的影响

汤韵秋,全云云,余琳媛,郑立,李芸霞\*

成都中医药大学药学院 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室  
省部共建国家重点实验室培育基地,成都 611137

**摘要:**为研究连翘脂素的抗炎效应及其抗炎机制,以地塞米松作为阳性对照,建立脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞RAW264.7 炎症模型,检测炎症因子的释放及相关蛋白和 mRNA 的表达,以期提高对连翘脂素抗炎作用的全面认识并为连翘脂素临床开发提供有力的科学依据。实验采用 Griess 法检测细胞上清液中 NO 含量,ELISA 法检测 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的含量,Western blot 法检测 iNOS、COX-2 蛋白的表达,RT-qPCR 法检测 iNOS、COX-2 mRNA 的表达。与 LPS 组比较,连翘脂素组和地塞米松组可以明显降低 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞释放 NO、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的量,并呈现浓度依赖关系。Westren blot 和 RT-qPCR 结果显示连翘脂素能抑制 LPS 诱导的 iNOS、COX-2 的蛋白表达以及 mRNA 的表达,并呈浓度依赖关系。实验研究表明连翘脂素能够明显抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子的释放,iNOS、COX-2 蛋白及 mRNA 的表达从而抑制炎症反应。

**关键词:**连翘脂素;地塞米松;脂多糖;小鼠巨噬细胞;炎症因子

**中图分类号:**R285.5

**文献标识码:**A

**文章编号:**1001-6880(2019)7-1117-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.7.001

## Effect of Phillygenin on inflammatory response in LPS-induced RAW 264.7 cells

TANG Yun-qiu, QUAN Yun-yun, YU Lin-yuan, ZHENG Li, LI Yun-xia\*

School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine National Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China

**Abstract:** To study the anti-inflammatory effect and anti-inflammatory mechanism of Phillygenin, dexamethasone as a positive control, established a lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 inflammation model, to detect the release of inflammatory factors and the expression of related proteins and mRNA, in order to improve the comprehensive understanding of the anti-inflammatory effect of Phillygenin and provide a strong scientific basis for the clinical development of Phillygenin. The NO production was determined by assaying nitrite in culture supernatants with the Griess reagent. The levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in culture media were measured with ELISA kits. Western blot assay was performed to illustrate the inhibitory effects of Phillygenin on iNOS and COX-2. RT-qPCR was detected for mRNA expression of iNOS and COX-2. Treatment with Phillygenin or Dexamethasone dose-dependently inhibited the production expression of NO, TNF- $\alpha$  and IL-6 in RAW264.7 macrophages. Western blot and RT-qPCR assay suggested that the mechanism of the anti-inflammatory effect was associated with the inhibition of iNOS and COX-2. In conclusion, Phillygenin exhibited obvious anti-inflammatory effect and its mechanism may be related to its regulation on inflammatory cytokines, and inhibition of the expression of iNOS and COX-2.

**Key words:** Phillygenin; dexamethasone; lipopolysaccharide; macrophage in mice; inflammatory cytokines

炎症是临床中最常见的病症之一,是人体为了确保去除有害刺激并修复受损组织的一种防御反应。据流行病学和临床资料显示,多数疾病的发生、

发展过程中都伴随有炎症反应,炎症还能加速疾病的发展<sup>[1]</sup>。此外炎症反应还可引起一些自身免疫疾病或癌症,并且与许多慢性疾病如关节炎、骨质疏松、哮喘、阿尔察默病、心血管疾病、痴呆、癌症、肥胖及Ⅱ型糖尿病等密切相关<sup>[2]</sup>。因此,研究开发具有抗炎作用的药物对于临床开发意义重大。临床证实,中国传统中药中具有抗炎作用的药物众多<sup>[3,4]</sup>,

收稿日期:2018-10-30 接受日期:2019-05-28

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81573583,81630101);四川省科技厅省青年科技创新研究团队专项(2016TD0028,2017TD0001)

\*通信作者 Tel:86-013699021135;E-mail:lyxcdutcm@126.com

明确抗炎有效成分以及探索其抗炎作用机制已经成为学者们关注的热点。

中药连翘为木犀科植物连翘(*Forsythia suspensa*)的干燥果实,其性寒、味辛苦、无毒、入肺、心、胆经具有清热解毒,疏散风热的功效<sup>[5]</sup>,被喻为“疮家圣药”。现代医学临床常用其治疗急性呼吸道感染,皮肤化脓性感染、急性肾炎、肝炎、脑膜炎等病症,以上病症均与细菌、病毒引起的炎症有关。关于连翘的抗炎作用成分研究一直是连翘研究的重点。连翘的主要化学成分多达150多种,主要包括木脂素类、苯乙醇苷类、五环三萜类和黄酮类等。对于连翘中的主要有效成分如连翘苷、连翘酯苷A等目前已经有多篇文献报道关于它们的抗炎活性及作用机制<sup>[7-9]</sup>,而连翘中的另一活性成分往往被人们忽视,即连翘脂(phillygenin)。连翘脂素是连翘苷的苷元,属于双环氧木脂素<sup>[10]</sup>,是连翘中重要的木脂素类成分之一,被纳为连翘的指纹成分。有研究表明连翘苷水溶性较差,口服吸收效果不理想<sup>[11]</sup>,在用人肝癌细胞(SMMC-7721)进行体外活性研究中,连翘苷没有活性,连翘脂素具有活性<sup>[12]</sup>;在用小鼠黑色素肉瘤细胞B16对连翘脂素和连翘苷抗癌活性研究中,连翘苷没有效果,而连翘脂素对小鼠黑色素肉瘤细胞B16有较强的抑制活性,甚至强于阳性对照的长春新碱<sup>[13]</sup>。并且有实验通过大鼠肠内菌转化连翘苷发现连翘苷被迅速代谢为连翘脂素<sup>[14]</sup>。连翘脂素作为连翘苷的苷元也是连翘苷的代谢产物之一<sup>[15]</sup>,猜想连翘苷发挥抗炎药效是否有连翘脂素的参与。已有研究表明连翘脂素具有较强的抗炎,抗氧化,降血脂活性<sup>[16,17]</sup>,但关于连翘脂素对炎症因子影响及其机制方面的研究鲜见报道。

当人体免疫细胞在受到致炎因子作用时,一些小分子量的、能在细胞间传递信息的、并且具有特异性免疫调节功能的可溶性蛋白质或多肽通过机体本身分泌出来,并能参与或引起炎症反应,这些物质被称为炎症因子,包括NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6、PGE2、IL-1等<sup>[18]</sup>。NO、IL-6、TNF- $\alpha$ 都是炎症反应中重要的细胞活性因子,它们对细胞炎症都有直接或间接的作用,彼此之间也产生影响。NO是氧化应激反应中的主要介质,氧化应激能参与并加剧炎症反应<sup>[19]</sup>。IL-6作为一种多功能细胞因子,具有抗炎和致炎的双向功能,其作用与组织中的含量有关,正常水平的IL-6对机体有利,产生过多会引起一系列炎性损伤<sup>[20]</sup>。TNF- $\alpha$ 是一个经典的炎症指标,具有对IL-

$\beta$ 、IL-6等的协调和调节作用,处于炎症级联反应的中心环节,其表达量的多少可以直接反映炎症的严重程度<sup>[21]</sup>。iNOS是NO合成酶,它的表达直接决定NO分泌量,是炎症反应检测的一个重要指标。目前,调节NO的合成及其诱导型合成酶iNOS的表达被认为是治疗炎症疾病的重要手段<sup>[22]</sup>。COX(环氧合酶)可以催化花生四烯酸生成前列腺素H2(PGH2),而PGH2是前列腺素的前体。COX有三种类型的同工酶,其中COX-2与炎症的关系最为密切。COX-2在正常细胞中表达量很低,但是在被激活的巨噬细胞和其他炎性细胞中表达水平会迅速上升,是一种反映炎症严重程度的重要标志酶<sup>[26]</sup>。

因而为进一步确定连翘脂素的抗炎作用及机制,本研究以LPS诱导小鼠巨噬细胞RAW264.7为体外炎症模型,观察连翘脂素对炎症因子NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6以及iNOS、COX-2蛋白和mRNA表达的影响,并以地塞米松作为阳性对照,探讨连翘脂素的抗炎作用及机制,以期为连翘脂素在临床抗炎药效的开发提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞

小鼠单核巨噬细胞RAW264.7,购于上海元和生物有限公司。

### 1.2 试药与试剂

连翘脂素(成都曼斯特生物科技有限公司,批号140722, $\geq 98\%$ );脂多糖(美国sigma公司,批号20160926);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号18460504);DMEM高糖培养基(美国Hyclone公司,批号SH40007.01);胰蛋白酶(美国Hyclone公司,批号SH40003.01);噻唑蓝(MTT,Biosharp公司,批号M-2128);青霉素(山东鲁抗医药股份有限公司,批号B150608);链霉素(华北制药股份有限公司,批号0171803202);二甲基亚砜(DMSO,成都市科龙化工试剂厂,批号为2015110201);磷酸盐缓冲液(PBS,pH=7.2~7.4,北京中杉金桥生物技术有限公司,批号150907);硝酸还原酶法NO试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20180530);IL-6,TNF- $\alpha$ 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(杭州联科生物有限公司,批号201705,201705);BCA蛋白试剂盒(联科生物,批号A81911151);引物(擎科生物公司合成);反转录试剂盒(擎科生物,批号20180328);iNOS、COX-2抗体(Abcam公司)。

### 1.3 实验仪器

BS 124 S 型分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);TANKPE030 型超纯水仪(四川优普超纯科技有限公司);SW-CJ-2FD 型净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司);3111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo scientific 公司);AE2000 型相差倒置显微镜(厦门 Motic 公司);ALLEGER X-12 型离心机(美国 BECKMAN Coulter 公司);varioskan flash-3001 型酶标仪(美国 Thermo scientific 公司);QTOWER 实时荧光定量 PCR 仪(德国 ANALYTICKJENA 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

小鼠巨噬细胞株 RAW264.7, 在含有抗生素(100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素)和 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 完全培养基中,于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的孵箱条件下培养。

### 2.2 MTT 法检测 raw264.7 细胞增殖率

取生长状态良好的对数期 RAW264.7 细胞,以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度将巨噬细胞悬浊液接种于 96 孔细胞培养板上,每个孔加入 100 μL 细胞悬浊液,放入孵箱培养 24 h。小心吸去上清,加入含不同浓度的连翘脂素或地塞米松(0、1、5、10、25、50、100、150、200 μg/mL)的 DMEM 溶液,每个样品 6 个重复孔。放入孵箱继续培养 24 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液,操作过程避光。放入孵箱继续孵育 4 h,小心吸去上清,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO)溶液,避光轻微震荡,待培养板内结晶完全溶解后,酶标仪于 570 nm 处测定 OD 值,并计算细胞增殖率(细胞增殖率大于 90% 表明此浓度的药物对细胞增值无明显抑制作用)。

### 2.3 Griess 法检测 RAW264.7 细胞 NO 释放量

选取生长状态良好的对数期 RAW264.7 细胞,以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度将细胞悬浊液接种于 24 孔细胞培养板上,每孔加入 1 mL 细胞悬液,孵箱培养 24 h,小心吸去上清。空白组加入 DMEM 溶液 1 mL;LPS 组加入含 LPS(10 ng/mL)的 DMEM 溶液 1 mL;LPS + 连翘脂素组加入含 LPS(10 ng/mL)以及不同浓度(5、50、100 μg/mL)连翘脂素的 DMEM 溶液 1 mL;阳性对照组加入含 LPS(10 ng/mL)以及不同浓度(5、50 μg/mL)地塞米松的 DMEM 溶液 1 mL。放入细胞孵箱继续培养 24 h。按照 NO 试剂盒操作,每个样品重复 6 个孔,使用酶标仪于 550

nm 处测定 OD 值并计算 NO 含量。

### 2.4 ELISA 法检测 RAW264.7 细胞 TNF-α、IL-6 释放量

取对数期巨噬细胞 RAW264.7, 并调整浓度后,以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度将细胞悬浊液接种于 24 孔细胞培养板上,每孔加入 1 mL 细胞悬液,孵箱培养 24 h, 小心吸去上清。空白组加入 DMEM 溶液 1 mL;LPS 组加入含 LPS(10 ng/mL)的 DMEM 溶液 1 mL;LPS + 连翘脂素组加入含 LPS(10 ng/mL)以及不同浓度(5、50、100 μg/mL)连翘脂素的 DMEM 溶液 1 mL;阳性对照组加入含 LPS(10 ng/mL)以及不同浓度(5、50 μg/mL)地塞米松的 DMEM 溶液 1 mL。放入细胞孵箱继续培养 24 h。按照 ELISA 试剂盒说明书进行实验操作后,于 450 nm 处测定各 OD 值,根 OD 值,计算 TNF-α、IL-6 细胞因子释放水平。

### 2.5 Western blot 检测 iNOS、COX-2 蛋白表达

取生长状态良好的对数期细胞,调整细胞密度后,以每孔  $1 \times 10^6$  个细胞的密度接种于 6 孔板中,培养 24 h,小心吸取上清。空白组加入 DMEM 溶液 3 mL;LPS 组加入含 LPS(10 ng/mL)的 DMEM 溶液 3 mL;LPS + 连翘脂素组加入含 LPS(10 ng/mL)以及不同浓度(5、50、100 μg/mL)连翘脂素的 DMEM 溶液 3 mL;阳性对照组加入含 LPS(10 ng/mL)以及地塞米松(50 μg/mL)的 DMEM 溶液 3 mL,作用 24 h 后提取细胞总蛋白。将配制好的一抗(以抗体:5% BSA 溶液 1:1 000 稀释)进行免疫印迹,以 GAPDH 作为内参。显影,并计算光密度值。

### 2.6 RT-qPCR 检测 iNOS、COX-2 mRNA 表达

取生长状态良好的对数期细胞,调整细胞密度后,以每孔  $1 \times 10^6$  个细胞的密度接种于 6 孔板中,培养 24 h,小心吸取上清。空白组加入 DMEM 溶液 3 mL;LPS 组加入含 LPS(10 ng/mL)的 DMEM 溶液 3 mL;LPS + 连翘脂素组加入含 LPS(10 ng/mL)以及不同浓度(5、50、100 μg/mL)连翘脂素的 DMEM 溶液 3 mL;阳性对照组加入含 LPS(10 ng/mL)以及地塞米松(50 μg/mL)的 DMEM 溶液 3 mL。作用 24 h 后,吸弃上清液,用 PBS 清洗 2 次,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。按照扩增试剂盒的程序进行实验,以 GAPDH 做为内参,分析目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

### 2.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,组间比

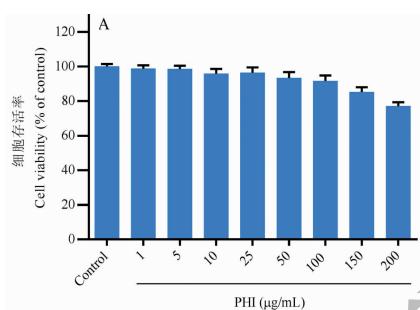
表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
GAPDH	F:5'-GCCCTTCCGTGTTCCCTACC-3' R:5'-TGCCTGCTTACCACTTC-3'
iNOS	F:5'-AGCAACTACTGCTGGTG-3' R:5'-TCTTCAGACTGCCCCATTG-3'
COX-2	F:5'-TGAGTACCGAAACGCTTCTC-3' R:5'-TGGACGAGGTTTCCACAG-3'

较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果



### 3.1 连翘脂素及地塞米松对 RAW264.7 细胞增殖的影响

采用 MTT 法考察细胞经不同浓度连翘脂素及地塞米松处理后 RAW264.7 细胞增殖活性的变化。图 1(A)所示,与空白组比较,连翘脂素在给药浓度为 0 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对细胞增殖无明显抑制作用。图 1(B)所示,地塞米松浓度在 0 ~ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对细胞增殖无明显抑制作用,因此在后续实验中选取连翘脂素对细胞增殖无明显抑制的低、中、高浓度(5、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )开展研究,由于地塞米松 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  对细胞增殖有影响,于是选取 5、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作为阳性对照。

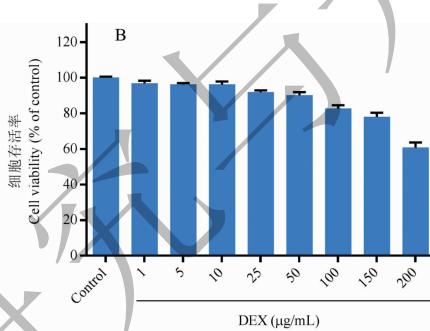


图 1 连翘脂素及地塞米松对 RAW264.7 细胞增值的影响

Fig. 1 Effect of Phillygenin and dexamethasone proliferation of RAW264.7 cells

### 3.2 连翘脂素对 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响

图 2 所示,LPS 作用于 RAW264.7 细胞,细胞上清液中的 NO 分泌量明显增加,与空白组比较,具有

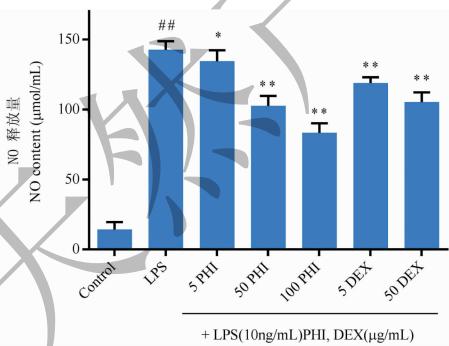


图 2 连翘脂素对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响

Fig. 2 Effect of Phillygenine on content of NO in LPS induced RAW264.7 cells

注:与空白组比较<sup>#</sup> $P < 0.01$ ;与 LPS 组比较

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . (下同)

显著性差异( $P < 0.01$ ),说明 LPS 诱导 RAW264.7 炎症模型建立成功。连翘脂素各质量浓度细胞上清液中的 NO 含量明显低于 LPS 组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),并呈剂量依懒性。地塞米松各质量浓度细胞上清液中的 NO 含量显著低于 LPS 组( $P < 0.01$ )。5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  连翘脂素组 NO 含量高于 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  地塞米松组( $P < 0.01$ )。50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  连翘脂素组 NO 含量与 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  地塞米松组无显著性差异。

### 3.3 连翘脂素对 RAW264.7 细胞 TNF- $\alpha$ 和 IL-6 释放量的影响

LPS 作用于 RAW264.7 细胞,细胞上清液中的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量明显增加,与空白组比较,具有显著性差异( $P < 0.01$ )。连翘脂素各质量浓度细胞上清液中的 TNF- $\alpha$ ,IL-6 含量显著低于 LPS 组( $P < 0.01$ ),并呈剂量依懒性。地塞米松各质量浓度细胞上清液中的 TNF- $\alpha$ ,IL-6 含量显著低于 LPS 组( $P < 0.01$ )。5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  连翘脂素组 TNF- $\alpha$ ,IL-6 含量高于 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  地塞米松组( $P < 0.05$ )。50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  连翘脂素组 TNF- $\alpha$ ,IL-6 含量与 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  地塞米松组无显著性差异(见图 3)。

Note: Compare with control, <sup>#</sup> $P < 0.01$ ; Compare with LPS,

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . (The same below)

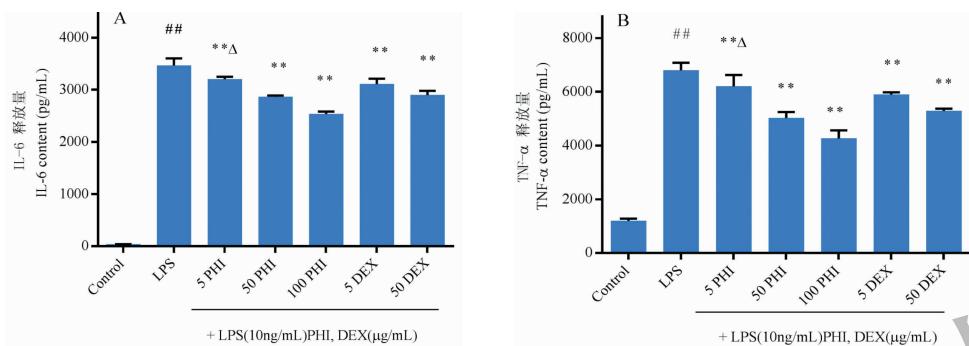


图 3 连翘脂素对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 TNF-α 和 IL-6 释放量的影响

Fig. 3 Effect of Phillygenine on content of TNF- $\alpha$ , IL-6 in LPS induced RAW264.7 cells

注:与同浓度地塞米松比较 $\Delta P < 0.05$ 。

Note: Compare with same concentration as dexamethasone  $\Delta P < 0.05$ .

### 3.4 连翘脂素对 LPS 诱导下 iNOS、COX-2 蛋白表达的影响

如图 4 所示,未加任何刺激的空白组细胞中, iNOS、COX-2 蛋白未见表达。与空白组比较,LPS 可以使 iNOS、COX-2 蛋白显著表达,与 LPS 组比较,连翘脂素(5、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )呈浓度依赖性下调 iNOS、COX-2 蛋白表达( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ),尤其是

连翘脂素高、中浓度组,对下调 iNOS、COX-2 蛋白表达更为明显( $P < 0.01$ )。说明连翘脂素通过下调激活 RAW264.7 细胞中 iNOS、COX-2 蛋白表达。由图 4(A)可见,与地塞米松相比,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  连翘脂素与同浓度的地塞米松 iNOS 的蛋白表达量无明显差异,表明连翘脂素有良好的抑制 iNOS 蛋白表达的作用。

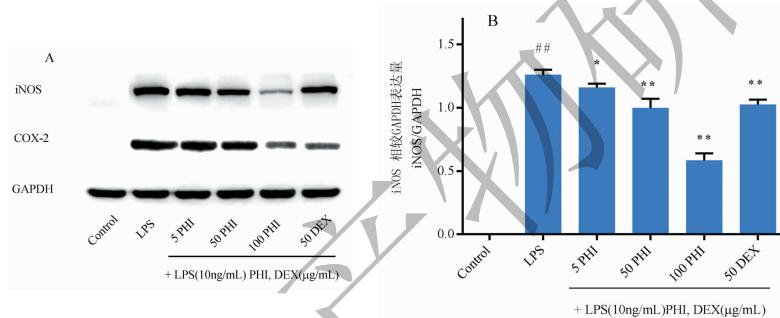


图 4 连翘脂素对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 iNOS、COX-2 蛋白表达水平的影响

Fig. 4 Effect of Phillygenine on LPS-induced iNOS, COX-2 protein expression in RAW264.7 cells

注:与同浓度地塞米松比较 $\Delta \Delta P < 0.01$ , (下同)。

Note: Compare with same concentration as dexamethasone  $\Delta \Delta P < 0.01$ , the same below.

### 3.5 连翘脂素对 LPS 诱导下 iNOS、COX-2 mRNA 表达的影响

如图 5 所示,未加任何刺激的空白组细胞中, iNOS、COX-2 mRNA 表达量很少。与空白组比较,LPS 可以使 iNOS、COX-2 mRNA 显著表达,与 LPS 组比较,连翘脂素(5、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )呈浓度依赖性下调 iNOS、COX-2 mRNA 表达( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ),尤其是连翘脂素高、中浓度组,对下调 iNOS、COX-2 mRNA 表达更为明显( $P < 0.01$ )。由图 5(A)可见,与地塞米松相比,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  连翘脂素与

同浓度的地塞米松 iNOS 的 mRNA 表达量无明显差异,表明连翘脂素有良好的抑制 iNOS mRNA 表达的作用。说明连翘脂素可以通过下调激活 RAW264.7 细胞中 iNOS、COX-2 mRNA 表达,抑制炎症反应。

## 4 讨论

本研究通过 LPS 诱导 RAW264.7 细胞建立体外炎症模型,探讨连翘脂素的抗炎作用及其机制。在给药浓度的确定上,本实验采用 MTT 法观察连翘脂素各浓度对细胞增殖的影响,选取对细胞增殖无明显抑制(细胞增殖率大于 90%)的低、中、高浓度

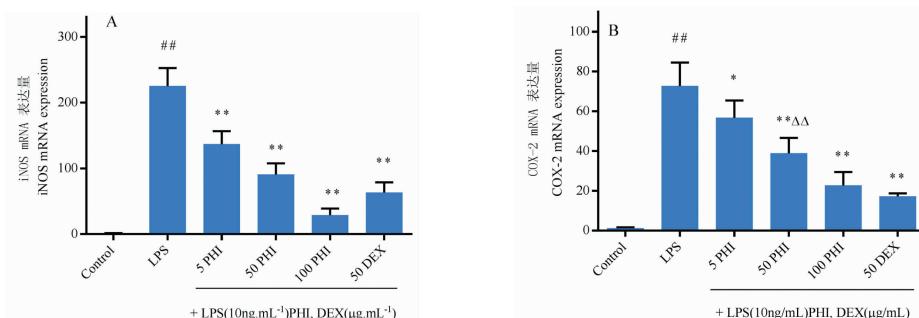


图5 连翘脂素对LPS诱导RAW264.7细胞iNOS、COX-2 mRNA表达的影响

Fig. 5 Effect of Phillygenine on LPS-induced iNOS, COX-2 mRNA expression in RAW264.7 cells

(5、50、100 μg/mL)开展研究。阳性药地塞米松由于100 μg/mL对细胞增殖有影响(增殖率小于90%),所以选取对细胞无明显抑制且与连翘脂素相等的浓度(5、50 μg/mL)作为对照。以10 ng/mL的LPS刺激RAW264.7细胞24 h,与空白组相比较发现细胞上清中NO、TNF-α和IL-6的表达均显著性增加,表明LPS诱导RAW264.7细胞炎症成功。

本研究表明连翘脂素低、中、高浓度均可以抑制LPS诱导RAW264.7细胞产生的NO、TNF-α和IL-6表达上调,并呈现良好的浓度依赖关系,说明连翘脂素的抗炎作用与抑制NO、TNF-α和IL-6释放有关。以地塞米松作对照,发现连翘脂素对RAW264.7细胞的毒性小于地塞米松,低浓度(5 μg/mL)连翘脂素抑制NO、IL-6、TNF-α的释放能力弱于地塞米松,中浓度(50 μg/mL)连翘脂素抑制NO、IL-6、TNF-α的释放能力与地塞米松无显著性差异,提示连翘脂素具有较强的抗炎作用。分析原因,可能是由于地塞米松相较于连翘脂素对RAW264.7细胞毒性更大,当给药浓度为5 μg/mL时,由于浓度足够低,毒性可以忽略,于是可以体现地塞米松良好的抗炎作用;而当给药浓度为50 μg/mL时,同样的浓度,地塞米松对细胞的毒性较连翘脂素更大,更容易引起细胞分化,导致给药效果不如连翘脂素。

在确定了连翘脂素具有良好的抗炎作用的基础上进行了对其抗炎机制的研究,发现LPS诱导RAW264.7细胞iNOS、COX-2蛋白及mRNA表达上调,连翘脂素低、中、高浓度均可以抑制它们的表达,并呈现良好的浓度依赖关系,说明连翘脂素的抗炎机制与抑制iNOS、COX-2蛋白及mRNA的表达有关。与地塞米松相比,50 μg/mL连翘脂素与同浓度地塞米松对iNOS蛋白及mRNA的表达的抑制作用无显著性差异,表明连翘脂素具有良好的抑制iNOS表

达的药理活性。

综上所述,连翘脂素可以抑制LPS诱导的RAW264.7细胞释放NO、TNF-α和IL-6,其作用机制与抑制iNOS、COX-2蛋白及mRNA的表达有关。与地塞米松相比较,连翘脂素的抗炎效果良好,毒性较地塞米松更小,表明连翘脂素在抗炎活性方面具有巨大的开发潜力。

#### 参考文献

- Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer[J]. J Clin Invest, 2007, 117:1175-1183.
- Jonathan C. The immunopathogenesis of sepsis[J]. Nature, 2002, 420:885-891.
- Zheng LL, Zhang GJ, Wang JJ, et al. Biological anti-inflammatory effects in active components of *Flos Chrysanthemi Indicum*[J]. Tianjin J Tradit Chin Med(天津中医药), 2011, 8: 251-253.
- Zhang ZY, Zhang GJ, Wang JJ, et al. Extract technique of water-soluble polysaccharide of *Lysimachia foenum-graecum Hance* optimized by RSM and its anti-inflammatory actions [J]. Tianjin J Tradit Chin Med(天津中医药), 2013, 30: 235-238.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 170-171.
- Pan XL. Effect of forsythin on LPS-induced inflammatory response and its molecular mechanism[D]. Nanjing: Nanjing Normal University(南京师范大学), 2014.
- Zhou L. Experimental study on anti-endotoxin effect and mechanism of forsythiaside A[D]. Nanchang: Nanchang University(南昌大学), 2013.
- Lu S, Chen SN, Guan JY, et al. Effect of forsythiaside on the

- function of RAW264.7 cells under endotoxin [J]. Chin Agric Bull(中国农学通报), 2012, 28(20): 58-62.
- 9 Nishibe S, Sakushima A, Kitagawa S, et al. Phenolic compounds from forsythia Leaves(III): on the comparison of constituents between hybrid and parents [J]. Japan J Pharmacog, 1988, 42: 324-328.
- 10 Maiada MA, Rahman, Paul M, et al. Lignans of forsythia intermedia [J]. Phytochemistry, 1990, 29: 1971-1980.
- 11 Su BN, Zhu QX, Gao K, et al. Ligand and phenylpropanoid glycosides from lancea tibetica and their antitumor activity [J]. Planta Medica, 1999, 65: 558-561.
- 12 Zhao CY, Qiu R, Zheng RL. *In vitro* antitumor activities of furan lignans [J]. J Lanzhou Univ Med; Nat Sci(兰州大学学报:自科版), 2000, 36(4): 66-68.
- 13 Liu XZ, Sheng N, Huo HL. Metabolites of phillyrin by rat intestinal flora [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2012, 43: 455-458.
- 14 Liu XZ, Sheng N, Huo HL, et al. Metabolites of forsythin in rat intestinal bacteria [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2012, 43: 455-458.
- 15 Quan YY, Yuan A, Gong XH, et al. Basic screening study on anti-inflammatory pharmacodynamics of forsythia [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 435-438.
- 16 Hung CY, Tsai YC, Li KY. Phenolic antioxidants isolated from the flowers of osmanthus fragrans [J]. Molecules, 2012, 17: 10724-10737.
- 17 Kang WY, Wang JM. *In vitro* antioxidant properties and in vivo lowering blood lipid of forsythia suspense leave [J]. MCRE, 2010, 19: 617-628.
- 18 Yu YH, Shi Z, Li YJ, et al. Inhibition of iNOS and COX-2 expression by ginsenoside Rd in LPS-stimulated RAW264.7 cells [J]. Chin J Immun(中国免疫学杂志), 2014, 30: 209-212.
- 19 Zhag XH, Dong L, Yang YX, et al. Effect of ethanol component of Zijinlong on secretion of inflammatory factors in RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide [J]. Chin J of Exper Trad Med Formu(中国实验方剂学杂志), 2014, 20: 149-152.
- 20 Lei XH, Bao M, Zhen HN. Effect of TNF- $\alpha$  on expression of connective tissue growth factor in rat lung fibroblasts [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2010, 31: 340-342.
- 21 Shi ZR. Expression of IL-2, IL-8, TNF- $\alpha$  and MMP-9 in stable phase of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2010, 31: 422-423.
- 22 Wang D, Dubois RN. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer [J]. Oncogene, 2010, 29: 781-788.

## 《天然产物研究与开发》青年编委会

### 青年编委(以姓氏笔划为序)

#### Members

王红兵 WANG Hongbing	戈惠明 GE Huiming	尹文兵 YIN Wenbing	尹胜 YIN Sheng	吕兆林 LV Zhaolin	刘相国 LIU Xiangguo
孙昊鹏 SUN Haopeng	孙桂波 SUN Guibo	李良成 LI Liangcheng	李国友 LI Guoyou	邱莉 QIU Li	汪海波 WANG Haibo
沐万孟 MU Wanmeng	张炳火 ZHANG Binghuo	陈益华 CHEN Yihua	林昌俊 LIN Changjun	欧阳杰 OU Yangjie	易华西 YI Huaxi
罗应刚 LUO Yinggang	周文 ZHOU Wen	胡友财 HU Youcai	袁涛 YUAN Tao	夏永刚 XIA Yonggang	高慧敏 GAO Huimin
唐金山 TANG Jinshan	黄胜雄 HUANG Shengxiong	韩秀珍 HAN Xiuzhen	韩淑燕 HAN Shuyan	曾克武 ZENG Kewu	蓝蔚青 LAN Weiqing
廖晨钟 LIAO Chenzhong	薛永波 XUE Yongbo				