

参芍抗敏剂的抗炎作用研究

郑木创¹, 毕凡星², 刘 英³, 金敏蓉⁴, 翟春涛^{4*}

¹广东雅丽洁精细化工有限公司; ²广东芭薇生物科技股份有限公司; ³广东施露兰化妆品有限公司, 广东 515000;

⁴莱博药妆技术(上海)股份有限公司, 上海 201401

摘要:为研究参芍抗敏剂的抗炎作用,通过探索参芍抗敏剂对钙调磷酸酶通路的活化水平及对 TNF- α 诱导的 HaCaT 细胞炎症反应的作用,来探索参芍抗敏剂的抗炎作用。结果显示,参芍抗敏剂在 1:1 000 时就有与 125 μ M 他克莫司(FK506)相同的抑制效果;参芍抗敏剂对 TNF- α 处理的细胞内磷酸化 P38 的量有所减少,且随着药物浓度的降低而相对升高,其中 0.2% 参芍抗敏剂作用最显著;参芍抗敏剂对 TNF- α 刺激引起胞质中 NF- κ B 激活入核现象有显著抑制作用,且随着浓度的升高,入核比例下降,相同浓度的芍药苷和德敏舒具有相同作用;参芍抗敏剂、芍药苷和德敏舒可以抑制 TNF- α 刺激后细胞内源 TNF- α 表达量,其中 0.05% 参芍抗敏剂和芍药苷作用最明显;参芍抗敏剂、芍药苷和德敏舒可以抑制 TNF- α 刺激的 IL-6mRNA 的相对表达,其中随着参芍抗敏剂浓度的增加而逐渐下降,0.1% 参芍抗敏剂作用和芍药苷组作用相当,而德敏舒组作用更显著;参芍抗敏剂、芍药苷和德敏舒对 TNF- α 刺激的 IL-8mRNA 表达量显著下降;参芍抗敏剂、芍药苷和德敏舒对 TNF- α 诱导的 IL-1 α 没有显著的抑制作用;参芍抗敏剂、芍药苷和德敏舒可以对 TNF- α 引起的 COX-2 表达有显著的抑制作用。因此,参芍抗敏剂具有较好的抗炎作用。

关键词:参芍抗敏剂;抗炎作用;钙调磷酸酶通路;TNF- α

中图分类号:R961.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)Suppl-0023-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.S.004

Study on the anti-inflammatory effect of the Shengshao antisensitizer

ZHENG Mu-chuang¹, BI Fan-xing², LIU Ying³, JIN Min-rong⁴, ZHAI Chun-tao^{4*}

¹Guangdong Yalget Fine Chemical Co., Ltd.; ²Guangdong Bawei Biotechnology Corporation;

³Guangdong Siloran Cosmetics Co., Ltd., Guangdong 515000, China; ⁴LB Cosmeceutical Technology Co., Ltd., Shanghai 201401, China

Abstract: In order to study the anti-inflammatory effect of the Shengshao antisensitizer, the anti-inflammatory effect of the Shengshao antisensitizer was explored by exploring the activation level of calcineurin pathway and its effect on TNF- α -induced inflammatory response of HaCaT cells. Results showed that the same inhibitory effect as 125 μ M tacromox (FK506) was observed at 1:1 000. The amount of intracellular phosphorylation of P38 treated with TNF- α was decreased and increased with the decrease of the concentration of TNF- α , and 0.2% of them had the most significant effect. The Shengshao antisensitizer had a significant inhibitory effect on the nucleation phenomenon of NF- κ B activation in cytoplasm induced by TNF- α stimulation, and the nucleation ratio decreases with the increase of concentration. Paeoniflorin and SymCalmin at the same concentration have the same effect. The Shengshao antisensitizer, paeoniflorin and SymCalmin could inhibit the intracellular expression of TNF- α after TNF- α stimulation, among which 0.05% of the Shengshao antisensitizer and paeoniflorin have the most obvious effects. The relative expression of IL-6 mRNA stimulated by TNF- α could be inhibited by the Shengshao antisensitizer, paeoniflorin and deminshu, among which, the effects of the Shengshao antisensitizer was decreased gradually with the increase of the concentration. The effect of the Shengshao antisensitizer was equivalent to that of paeoniflorin group, and that of deminshu group was more significant. The expression level of IL-8 mRNA stimulated by the Shengshao antisensitizer, paeoniflorin and deminshu was significantly decreased. The Shengshao antisensitizer, paeoniflorin and SymCalmin had no significant inhibitory effect on TNF- α induced IL-1 α . The Shengshao antisensitizer, paeoniflorin and SymCalmin showed significant inhibitory effects on COX-2 expression induced by TNF- α . Therefore, the Shengshao antisensitizer has better anti-inflammatory effects.

Key words: Shengshao antisensitizer; antiinflammatory; calcineurin pathway; TNF- α

中草药为我国的传统用药,在临床上,中草药在湿疹等炎症和自身免疫性疾病的治疗中具有较好的效果。细胞内第二信使物质(cAMP、cGMP、IP₃、DAG、Ca²⁺)可参与细胞活化、增殖及调节功能,在炎症免疫反应中发挥重要的病理生理作用。现代研究发现某些中药单体成分能直接与CaN结合并抑制其活性,如槲皮素、山奈酚、酚醛棉酚等;同时,某些中药有效成分能在细胞水平有效抑制CaN-NF-AT通路的活化,抑制Th1和Th2型细胞因子的表达,抑制T细胞的活化,如虫草素、杜鹃素、非瑟酮等^[1]。细胞因子是一组调节细胞反应的相对低分子量糖蛋白,由体内多种炎细胞分泌产生,它既是机体应激反应的需要,又是过量分泌应激组织损伤发生发展的病理基础^[2]。Liu等^[3]研究发现车前子能通过抑制滑膜炎中TNF- α 和IL-12的含量进行抗炎。参芍抗敏剂(SS)是由玄参、人参和白芍所组成的一个中药复方。本文通过刺激K562细胞,检测转录因子NFAT驱动的荧光素酶基因表达水平,反应钙调磷酸酶(CaN)通路的活化水平以及TNF- α 诱导HaCaT细胞炎症反应来研究参芍抗敏剂的抗炎作用。

1 实验材料

参芍抗敏剂(由莱博药妆技术(上海)股份有限公司提供);他克莫司(FK506)(新美科技开发有限公司);德敏舒(市售);人角质形成细胞HaCaT(中国科学院上海细胞库干细胞库);K-562细胞(中国科学院上海细胞库干细胞库);DMEM高糖培养基(Thermo Fisher Scientific公司);RPMI-1640培养基(Thermo Fisher Scientific公司);胎牛血清(Thermo Fisher Scientific公司);胰酶-EDTA(Thermo Fisher Scientific公司);CaN活性检测试剂盒(Enzo Life Science公司);荧光素酶检测试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司);DMSO;TNF- α (Peprotech公司);Presto Blue试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司);Anti-NF- κ B P65(Cell Signaling公司);Anti-P38 rabbit(Bioworld公司);Anti-P-38 mouse(Cell Signaling公司);Cy3 labelled anti-rabbit 2nd antibody(Jackson Immunity公司);Trizol RNAiso(Takara公司);One Step SYBR PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit(Takara公司);相关PCR引物合成(生工生物工程(上海)公司)等。

2 实验方法

2.1 钙调磷酸酶(CaN)-NF-AT通路阻断剂的筛选步骤

2.1.1 药物对K562细胞的细胞毒性检测

采用常规的CCK8法:在96孔板中配置100 μ L的K562细胞悬液(1×10^5 /孔),将96孔板在培养箱预培养24 h(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂);加入10 μ L待测物质;将96孔板在培养箱中孵育24 h向每孔加入10 μ L CCK8溶液;将96孔板在培养箱内孵育4 h;用酶标仪测定在450 nm处的吸光度。

2.1.2 CaN酶活性检测

采用Enzo life Science公司的CaN活性检测试剂盒,按试剂盒的说明书进行。取小离心管,加入25 μ L CaM工作液,5 μ L CaN工作液,10 μ L 50 μ M待测化合物工作液,对照管加入10 μ L 0.5% DMSO水溶液,混匀,30 $^{\circ}$ C孵育10 min,每管再加入10 μ L底物工作液,混匀,30 $^{\circ}$ C孵育50~60 min,加入100 μ L显色剂,混匀,静止20~30 min,每孔取135 μ L转移到96孔板,620 nm处测定吸光度。

2.1.3 刺激剂PMA和A23187最适浓度的确定

为了确定刺激CaN-NF-AT通路活化所需要的刺激剂PMA(佛波酯)和A23187最适浓度,采用PMA浓度2.5、5、10、20、40 ng/mL;A23187浓度0.125、0.25、0.5、1、2 μ M,每个浓度系列设4复孔,刺激18 h后,检测各实验组荧光强度。

2.1.4 测定方法

稳定转染NFAT报告基因的K562细胞常规传代培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中,实验采用生长健康、处于对数增长期的细胞,将上述细胞按 2×10^5 /孔接种于24孔细胞培养板,加入待测样品,孵育1 h,加入PMA(10 ng/mL)和A23187(0.5 μ M)(通路刺激剂),刺激18 h,收集细胞,采用荧光素酶检测试剂盒按说明书操作,测定荧光强度(反映细胞内反应钙调磷酸酶通路活化水平)。

2.2 对TNF- α 诱导的HaCaT细胞炎症反应的作用检测

2.2.1 药物对人角质形成细胞HaCaT细胞的Presto-blue细胞活力检测

96孔培养板中细胞培养至80%融合率时,换新鲜空白DMEM培养基90 μ L/well,设置光加入DMEM培养基的孔作为背景空白对照;每孔中加入

10 μL Prestolblue 试剂,置于培养箱孵育 30 min;将 96 空培养板置于 SYNERGY 4 酶标仪进行荧光检测 (Fluorescence; Excitation 560 nm, Emission 590 nm)。最后导出数据进行统计分析。

2.2.2 核转录因子(nuclear factor κB , NF- κB)检测

各实验组(96孔)加入终浓度 10 ng/mL 的 TNF- α ,处理 30 min 后进行检测。

2.2.2.1 免疫荧光法检测细胞中 NF- κB 的分布

每孔以 PBS 清洗细胞后,用 4% 多聚甲醛对 HaCaT 细胞进行固定 10 min,然后 PBS 清洗 3 \times 5 min;用冰甲醇处理 10 min,然后 PBS 清洗 3 \times 5 min;0.1% 曲拉通处理 15 min,然后 PBS 清洗 3 \times 5 min;加入封闭剂(含 10% 山羊血清)作用 1 h,吸去封闭剂;加入稀释剂配制的兔抗 NF- κB (1:500)工作液,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBS 清洗 3 \times 5 min;用荧光 CY3 结合羊抗兔二抗(1:200)孵育 30 min,再用 PBS 清洗 3 \times 5 min 置于荧光显微镜下观察、拍照记录。

2.2.2.2 NF- κB 的分布的计数与统计

使用荧光正置显微镜拍照,每孔随机选取连续 5 个视野范围内的细胞,对胞质阳性和胞核阳性细胞分别进行计数,并计算比例,最后进行统计。

2.2.3 细胞 P-38 蛋白的蛋白表达检测

各实验组细胞(60 mm 培养皿)加入终浓度 10 ng/mL 的 TNF- α ,作用 30 min 后进行 P38 及磷酸化 P38 的蛋白免疫印迹(Western blot)检测。

2.2.3.1 BCA 蛋白定量

裂解并收集各实验组细胞蛋白样品,在 96 孔板中进行蛋白定量,每 3 孔为一重复组,在每一个重复孔中分别加入 10 μL 待测蛋白样品,使用 ddH₂O、0.185、0.37、0.74、1.48 mg/mL 的 BSA(试剂盒中提供)作为标准曲线;然后每孔中加入 200 μL BCA 混合液(A液:B液=50:1)并缓慢吹打,将 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱静置 30 min 使试剂反应;然后使用酶标仪检测在 562 nm 处的 OD 值,通过与标准品对照得到蛋白的浓度。

2.2.3.2 蛋白样品的制备

使用水将蛋白样品调整到相同浓度,加入适量 6 \times Loading Buffer 后 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min,然后将 EP 管插入冰中 3 min 降温,轻轻震荡混匀后瞬间使管壁上的液体落到底部,蛋白样品制好备用。

2.2.3.3 SDS-PAGE、转膜以及抗体孵育

将加入 Loading Buffer 并热处理过的蛋白样品按一定量加到配好的 SDS-PAGE(12% 分离胶、5%

浓缩胶)的胶孔中,80 V 电压下电泳 25 min 可通过浓缩胶,接着 120 V 75 min 左右使不同大小的蛋白在分离胶中充分分开;先将 PVDF 膜浸入甲醇中活化 30 s,然后将海绵-滤纸-SDSPAGE 胶-PVDF 膜-滤纸-海绵依次擦好,赶掉中间的气泡,放入夹子中,胶放在负极,膜在正极,140 V 湿转 100 min 将蛋白转移到 PVDF 膜上;使 5% 脱脂牛奶封闭抗原 90 min,然后将膜浸入用 2% 脱脂牛奶按比例稀释的一抗中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育旋转摇床上缓慢摇动过夜;将孵育一抗的 PVDF 膜在室温下恢复 20 min,然后用 2% 脱脂牛奶摇床上缓慢洗脱 PVDF 膜 10 min \times 3;然后将膜浸入 2% 牛奶稀释的二抗中,室温下避光孵育 100 min;TBST 避光洗脱 PVDF 膜 15 min \times 3 后到 Odyssey 仪器上扫描结果,使用定量软件 Quantity One 4.6.8 软件对目的蛋白定量,保存结果。

2.2.4 相关炎症因子转录水平检测

各实验组细胞(60 mm 培养皿)药物预处理后加入终浓度 10 ng/mL 的 TNF- α ,培养 6 h 后抽提细胞 RNA 样品进行实时定量 PCR 检测。主要对 tumor necrosis factor alpha(TNF- α)、Cyclooxygenase 2(COX-2)、interleukin 6(IL-6)、interleukin 1 alpha(IL-1 α)、interleukin 8(IL-8)等与炎症反应相关的基因表达的相对量进行检测。

2.2.4.1 收取 RNA 样品

Trizol 法从细胞中提取总 RNA 步骤:

培养贴壁细胞:不须消化,可直接用 Trizol 进行消化、裂解,Trizol 体积按 10 cm^2/mL 比例加入。

细胞或组织加 Trizol 后,室温放置 5 min,使其充分裂解。(注:此时可放入 -70 $^{\circ}\text{C}$ 长期保持。)12 000 rpm 离心 5 min,弃沉淀。按 200 μL 氯仿/mL Trizol 加入氯仿,振荡混匀后室温放置 15 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 15 min。吸取上层水相,至另一离心管中。按 0.5 mL 异丙醇/mL Trizol 加入异丙醇混匀,室温放置 5 ~ 10 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000g 离心 10 min,弃上清,RNA 沉于管底。按 1 mL 75% 乙醇/mL Trizol 加入 75% 乙醇,温和振荡离心管,悬浮沉淀。4 $^{\circ}\text{C}$ 8 000 g 离心 5 min,尽量弃上清。室温晾干或真空干燥 5 ~ 10 min。注:RNA 样品不要过于干燥,否则很难溶解。用 30 μL DEPC H₂O 溶解 RNA 样品,55 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$,5 ~ 10 min。测 OD 值定量 RNA 浓度(RNA A260/A280 值在 1.6 ~ 1.8 之间)。

2.2.4.2 引物设计及合成

实时定量 PCR 引物由生工生物工程(上海)公

司合成。引物序列见表 1。

表 1 引物设计及合成
Table 1 Primer design and synthesis

| 基因 Gene name | 正向引物 Forward | 反向引物 Reverse | 产物大小 Product size(bp) |
|-----------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|
| TNF- α | AGCTGGTGGTCCATCAGAGG | TGGTAGGAGACGGCGATGCG | 124 |
| COX-2 | TGGTCTGGTGCTGGTCTGATG | CCTGCTTGTCTGGAACAACACTGCTC | 124 |
| IL-1 α | CTATCATGTAAGCTATGGCCCA | GCTTAAACTCAACCGTCTCTTC | 163 |
| IL-6 | CACTGGTCTTTTGGAGTTTGAG | GGACTTTTGTACTCATCTGCAC | 101 |
| IL-8 | AACTGAGAGTGATTGAGAGTGG | ATGAATTCTCAGCCCTCTTCAA | 147 |
| β -actin | ACGCCAACACAGTGCTGTCTG | TGCTTGCTGATCCACATCTGCTG | 199 |

2.2.4.3 实时定量 PCR (Real-time PCR) 步骤

试剂盒: Takara One Step SYBR PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit。

按下列组分(见表 2)配制 Real-time PCR 反应液(反应液配制在冰上进行),反应参数见图 1。

表 2 Real-time PCR 反应液的配置
Table 2 Configuration of Real-time PCR reaction solution

| 试剂 Reagent | 使用量 Usage amount(μ L) | 终浓度 Final concentration |
|------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| 2 \times One Step SYBR RT-PCR Buffer 4 | 10 | 1 \times |
| TaKaRa Ex Taq HS Mix | 1.2 | |
| Prime Script PLUS RTase Mix | 0.4 | |
| PCR Forward Primer (10 μ M) | 0.8 | 0.4 μ M* |
| PCR Reverse Primer (10 μ M) | 0.8 | 0.4 μ M* |
| Total RNA | 2 [#] | |
| RNase Free dH ₂ O | 4.8 | |
| Total | 20 | |

注: * 通常引物终浓度为 0.4 μ M 可以得到较好结果。反映性能较差时,可以在 0.1 ~ 1.0 μ M 范围内调整引物浓度。[#]建议在反应液中使用 10 pg ~ 100 ng 的 Total RNA 为模板。

Note: * Usually, the final concentration of primers is 0.4 μ M, which can get better results. When the performance is poor, the primer concentration can be adjusted in the range of 0.1-1.0 μ M. [#] It is recommended to use 10 pg ~ 100 ng Total RNA as the template in the reaction solution.

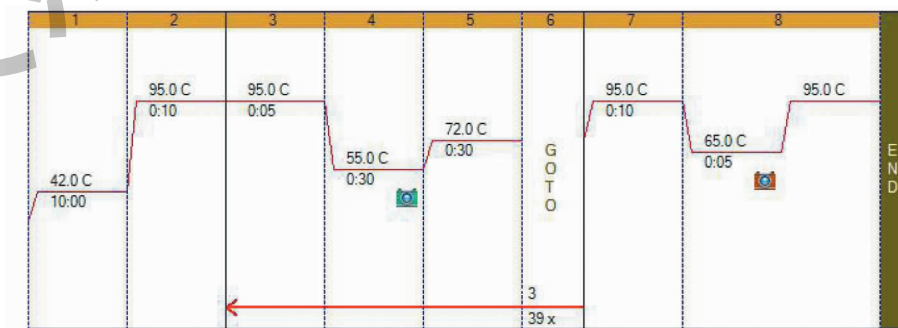


图 1 Real-time PCR 温度及循环设置

Fig. 1 The sittings of Real-time PCR's temperature and cycle

2.2.4.4 实时定量 PCR 结果的分析处理

对于 RT-qPCR 数据的分析使用 $\Delta\Delta Cq$ 比较。首先通过管家基因 β -actin 进行标准化处理: $\Delta Cq = Cq(\text{目的基因}) - Cq(\text{管家基因})$; 然后求 $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{实验组}) - \Delta Cq(\text{对照组})$; 最后求 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 并根据此数值作图。

实验数据采用平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 后期数据使用 Excel 2013 处理。组间两两比较使用 *t* 检验; 多组比较时使用单因素方差分析 ANOVA 进行比较。

3 实验结果

3.1 药物对 K562 细胞的作用研究

3.1.1 药物对 K562 细胞的细胞毒性检测

如图 2 所示, 参芍抗敏剂在稀释为 1:10 和 1:20 的时候具有明显的细胞毒性, 而在 1:50 ~ 1:2 000 时则无明显细胞性。

3.1.2 刺激剂 PMA 和 A23187 最适浓度的确定

由表 3 和图 3 可知, PMA 和 A23187 能够剂量

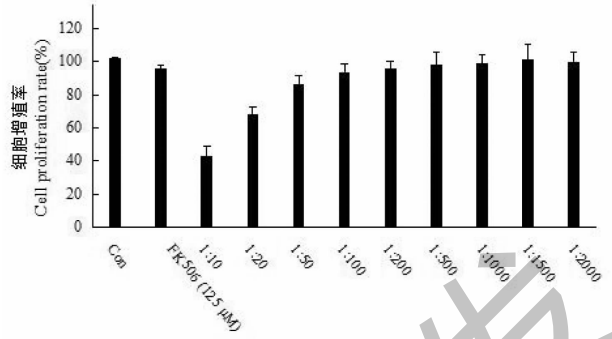


图 2 不同稀释浓度对 K562 细胞增值率的影响

Fig. 2 The effects of different dilution

concentrations on proliferation rate of K562 cells

注: Con: 空白对照; 1:10 ~ 1:2 000: 参芍抗敏剂的稀释浓度。

Note: Con: Control; 1:10 ~ 1:2 000: Dilution concentration of the Shenshao antisensitizer.

依赖性地刺激报告基因的表达, 复孔间的荧光度值差别可以控制在合理范围。上述实验基本确定了钙调磷酸酶通路激活剂的合适剂量为 PMA 10 ng/mL, A23187 0.5 μ M。

表 3 不同剂量的 PMA 和 A23187 对 K562 细胞 NFAT 报告基因表达的影响

Table 3 The effects of different doses of PMA and A23187 on NFAT reporter gene expression in K562 cells

| 刺激剂浓度 Irritant concentration | | Lum 值 Lum value | | | | |
|---------------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| PMA (ng/mL) | A23187 (μ M) | 复孔 1 Duplication 1 | 复孔 2 Duplication 2 | 复孔 3 Duplication 3 | 复孔 4 Duplication 4 | 平均值 Average value |
| 0 | 0 | 268 | 199 | 181 | 148 | 199 |
| 2.5 | 0.125 | 1 168 | 1 615 | 1 132 | 1 231 | 1 286 |
| 5 | 0.25 | 1 863 | 1 712 | 1 921 | 2 164 | 1 915 |
| 10 | 0.5 | 3 231 | 2 976 | 2 373 | 2 521 | 2 775 |
| 20 | 1 | 2 323 | 2 966 | 2 535 | 3 276 | 2 775 |
| 40 | 2 | 3 342 | 2 539 | 3 786 | 3 245 | 3 228 |

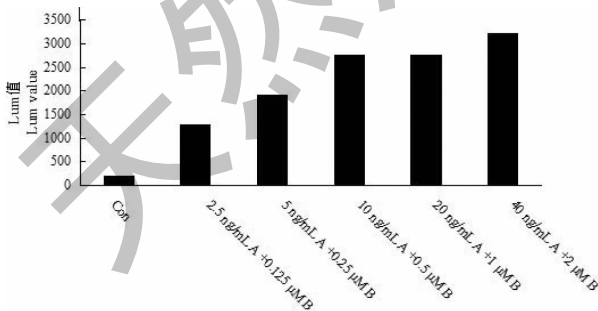


图 3 不同剂量的 PMA 和 A23187 对 K562 细胞 NFAT 报告基因表达的影响

Fig. 3 The effects of different doses of PMA and A

23187 on NFAT reporter gene expression in K562 cells

注: Con: 空白对照; A: PMA; B: A23187。Note: Con: Control; A: PMA; B: A23187.

3.1.3 各药物对 CaN-NF-AT 通路的抑制作用

如图 4 所示, 参芍抗敏剂的浓度在 1:1 000 时对 CaN-NF-AT 通路的抑制作用与阳性药 125 μ M 的他克莫司 (FK506) 相当。当参芍抗敏剂浓度大于等于 1:500 时效果优于 125 μ M 的 FK506。

3.2 药物对 TNF- α 诱导的 HaCaT 细胞炎症反应的作用检测

3.2.1 药物对人角质形成细胞 HaCaT 细胞的 Prestolblue 细胞活力检测

如图 5 所示, 荧光吸光值的大小及统计分析结果表明, 参芍抗敏剂的稀释度在 1:10 ~ 1:200 时, 细胞数显著低于对照组, 可能较高的浓度的参芍抗敏剂本身对于细胞生长存在明显的抑制生长或毒害作

用。而 1:500 ~ 1:2 000 范围内,药物则对细胞的生长没有明显的影响。

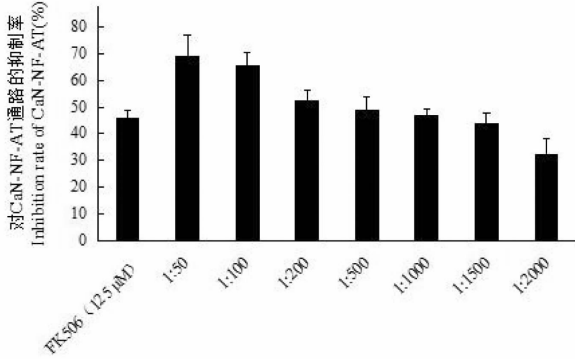


图 4 各药物对 CaN-NF-AT 通路的抑制作用

Fig. 4 The inhibitory effects of various drugs on CAN-NF-AT pathway

注:1:50 ~ 1:2000; 参芍抗敏剂的稀释浓度。Note:1:10~1:2000; Dilution concentration of the Shengshao antisensitizer.

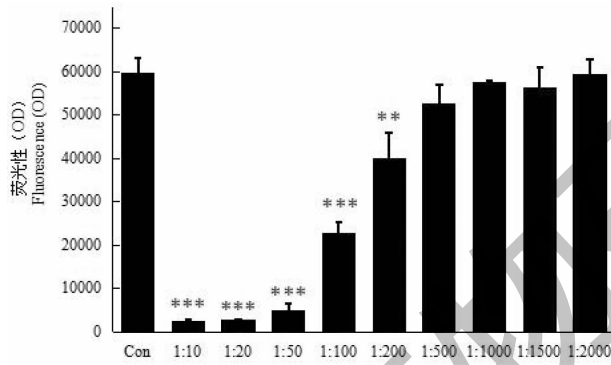


图 5 不同稀释度参芍抗敏剂对 HaCaT 细胞活力的影响

Fig. 5 The effects of different dilutions of the Shengshao antisensitizer on HaCaT cell viability

注:Con; 空白对照;1:10 ~ 1:2000; 参芍抗敏剂的稀释浓度。Note:Con; Control;1:10 ~ 1:2000; Dilution concentration of the Shengshao antisensitizer.

3.2.2 P-P38/P38 蛋白免疫印迹检测结果

如图 6 所示,与溶剂对照组 (Veh) 相比,各预处理组加入 TNF-α 处理 30 min 后,磷酸化 P38 的量都有上升。TNF-α 处理组表达最高,而不同浓度参芍抗敏剂处理组相对前者磷酸化 P38 的量有所减少,并随药物浓度的减低而相对升高。但其中仅 0.2% 参芍抗敏剂处理组对细胞内 P38 的磷酸化有显著性的阻碍作用,不同浓度组间无明显差异。

3.2.3 各实验组核转录因子 (NF-κB) 检测结果

由实验结果可见,溶剂 + TNF-α 处理组细胞中的 NF-κB 入核细胞比例达到 92.9%,这远远大于单

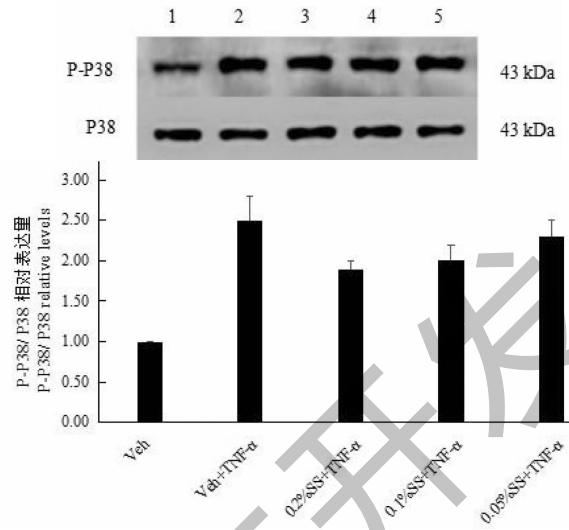


图 6 各实验组 P-P38 和 P38 蛋白免疫印迹检测 (A) 与相对表达量 (B)

Fig. 6 The Western blot detection of P-P38 and P38 proteins in each experimental group (A) and relative expression levels (B) 独溶剂处理组的 4.53%,表明 TNF-α 刺激诱导效果明显。而三个不同浓度参芍抗敏剂预处理组, TNF-α 后处理的产生的 NF-κB 入核细胞比例却显著下降。0.2%、0.1% 和 0.05% 参芍抗敏剂预处理组比例分别为 10.78%、12.87% 和 17.61%。这表明药物预处理对于 TNF-α 刺激引起的胞质中 NF-κB 激活入核的现象具有明显的抑制作用,而且随着预处理药物浓度的上升,入核细胞比例有所下降,其中 0.05% 和 0.2% 参芍抗敏剂预处理组之间的结果有显著的差异 (图 7,8)。

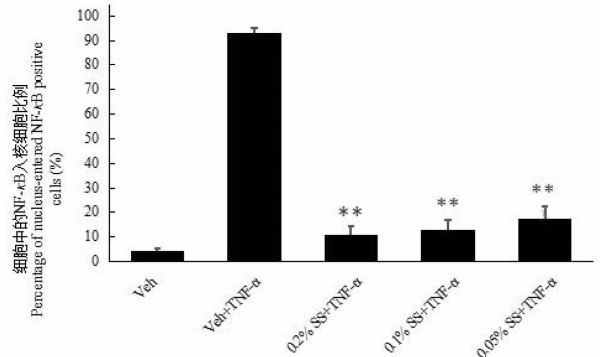


图 7 不同浓度参芍抗敏剂对 TNF-α 诱导 HaCaT 细胞引起的 NF-κB 入核的影响

Fig. 7 The effects of different concentrations of the Shengshao antisensitizer on the nucleation of NF-κB in HaCaT cells induced by TNF-α

作为效果对照的两组处理组,德敏舒预处理组使用了与 0.1% 参芍抗敏剂相同的稀释浓度,芍药

芍预处理组则以 0.1% 参芍抗敏剂中芍药苷含量相同的浓度进行处理。得到结果分别为 13.10% 和 13.41%, 都显著低于溶剂 + TNF- α 处理组, 而与

0.1% 参芍抗敏剂预处理组效果相当, 没有显著差异 (图 8、9)。

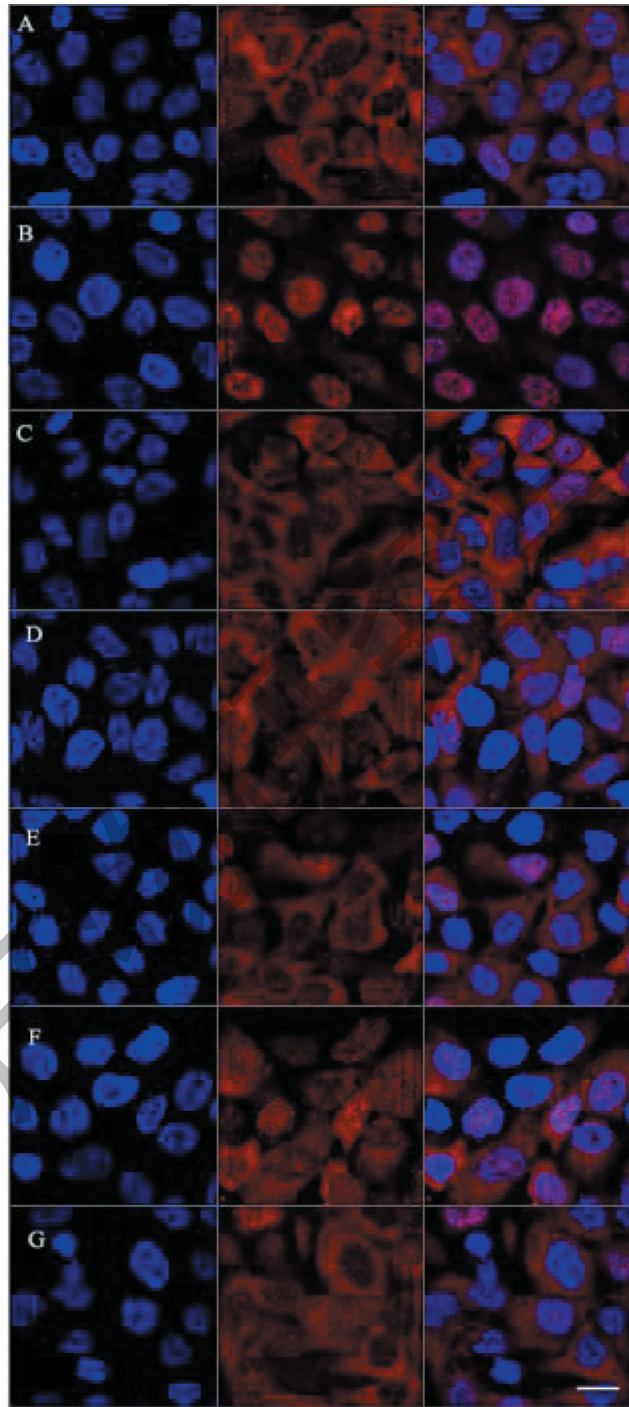


图 8 各实验组对 TNF- α 诱导 HaCaT 细胞引起的 NF- κ B 入核的影响

Fig. 8 The effects of TNF- α induced nucleation of NF- κ B on HaCaT cells in each experimental groups (Bar = 20 μ M)

注: A:空白溶剂 (Veh); B: Veh + TNF- α ; C: 0.2% 参芍抗敏剂 (SS) + TNF- α ; D: 0.1% 参芍抗敏剂 + TNF- α ; E: 0.05% 参芍抗敏剂 + TNF- α ; F: 芍药苷 + TNF- α ; G: 德敏舒 + TNF- α ; 蓝色为核染料 DAPI 染色; 红色为 NF- κ B P65 染色。下同。Note: A: Veh; B: Veh + TNF- α ; C: 0.2% SS + TNF- α ; D: 0.1% SS + TNF- α ; E: 0.05% SS + TNF- α ; F: Paeoniflorin + TNF- α ; G: SymCalmin + TNF- α ; The blue color was the nuclear dye DAPI staining, the red stain was NF- κ B P65. The same below.

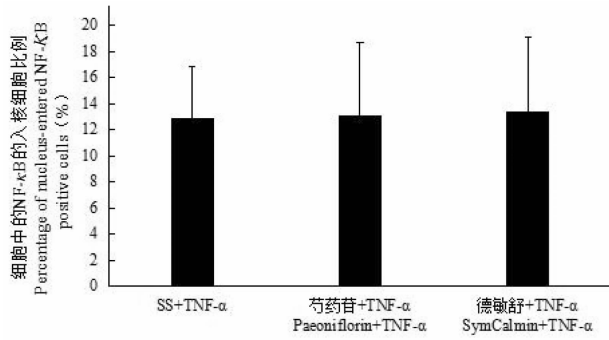


图9 三种不同药物处理对 TNF- α 诱导 HaCaT 细胞引起的 NF- κ B 入核的影响

Fig. 9 The effects of three different drug treatments on TNF- α induced nucleation of NF- κ B in HaCaT cells

3.2.4 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) mRNA 的表达量

如图 10 所示,溶剂处理组细胞加入 TNF- α 刺激后,其内源 TNF- α 表达有显著的升高,而三种不同浓度参芎抗敏剂处理组以及芍药苷和德敏舒预处理组的相对表达量则都相较前者有显著的下降。尤其 0.05% 参芎抗敏剂和芍药苷组更有明显下降。各药物预处理组之间在表达上并没有显著性的差异。

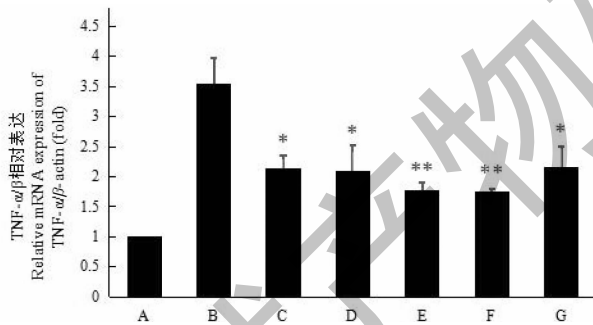


图10 各实验组 TNF- α mRNA 相对表达(比较 β -actin)

Fig. 10 The relative expression of TNF- α mRNA in each group (compared with β -actin)

3.2.5 白细胞素 6 (IL-6) mRNA 的表达量

如图 11 所示,药物溶剂 + TNF- α 刺激组的 IL-6 mRNA 表达有极显著的升高 (>9 倍),而三种不同浓度参芎抗敏剂处理组以及芍药苷、德敏舒预处理组的相对表达量则都相较前者有极显著的下降。其中随着参芎抗敏剂作用浓度的增加,IL-6 mRNA 的相对表达逐渐下降,通过统计检验,三组之间也都达到显著的差异。通过统计发现,0.1% 参芎抗敏剂作用组和芍药苷处理组之间作用效果相当,而德敏舒处理组的作用较前两者显著。

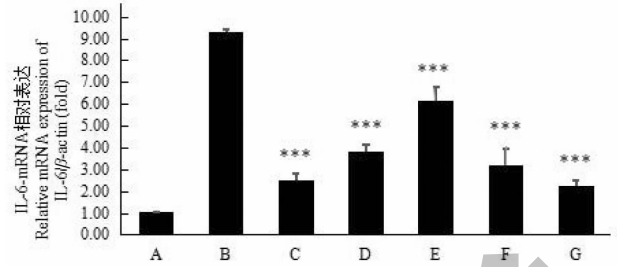


图11 各实验组 IL-6-mRNA 相对表达(比较 β -actin)

Fig. 11 The relative expression of IL-6-mRNA in each group (compared with β -actin)

3.2.6 白细胞素 8 (IL-8) mRNA 的表达量

如图 12 所示,药物溶剂 + TNF- α 刺激组的 IL-8 mRNA 表达较对照组有极显著的升高 (2.5 倍),而三种不同浓度参芎抗敏剂处理组以及芍药苷、德敏舒预处理组的相对表达量也都相较前者有极显著的下降。各药物预处理组之间在 IL-8 的相对表达量上则没有发现明显的差异。

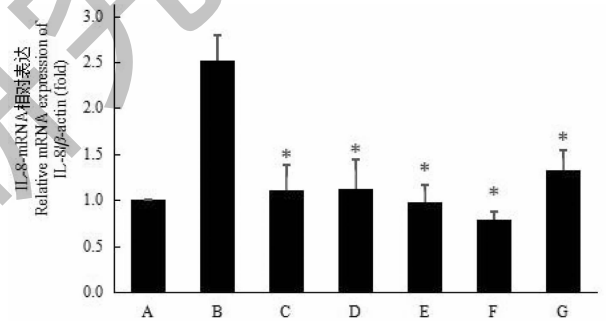


图12 各实验组 IL-8-mRNA 相对表达(比较 β -actin)

Fig. 12 The relative expression of IL-8-mRNA in each group (compared with β -actin)

3.2.7 白细胞素 1 α (IL-1 α) mRNA 的表达量

如图 13 所示,药物溶剂 + TNF- α 刺激组的 IL-1 α mRNA 表达显著高于对照组 (>2.4 倍),但是其它的五组的药物预处理组却与前者相比没有显著性的差别,表明药物处理对 TNF- α 诱导的 IL-1 α 表达没有明显的抑制作用。

3.2.8 环氧合酶 2 (COX-2) mRNA 的表达量

如图 14 所示,药物溶剂 + TNF- α 刺激组的 COX-2 mRNA 表达明显高于对照组,而三种不同浓度参芎抗敏剂处理组以及芍药苷、德敏舒预处理组的相对表达量也都相较前者有显著的下降,基本与溶剂对照组水平相当。结果显示各组药物预处理对 TNF- α 引起的 COX-2 表达有明显的抑制作用。

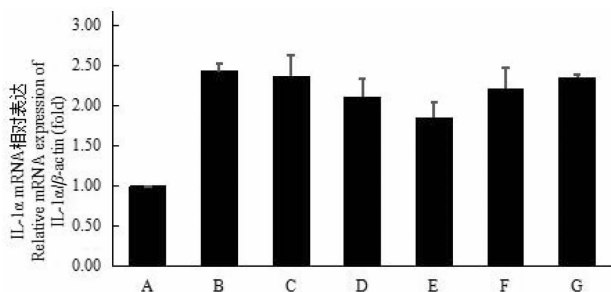


图 13 各实验组 IL-1 α mRNA 相对表达 (比较 β -actin)

Fig. 13 The relative expression of IL-1 α mRNA in each group (compared with β -actin)

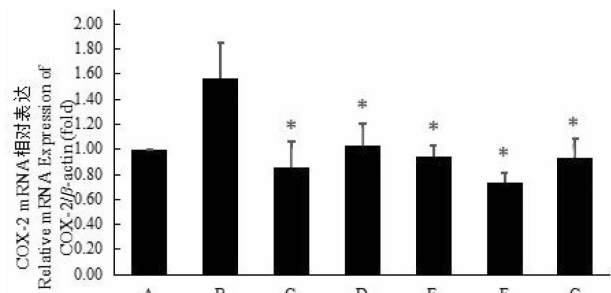


图 14 各实验组 COX-2 mRNA 相对表达 (比较 β -actin)

Fig. 14 The relative expression of COX-2 mRNA in each group (compared with β -actin)

4 讨论

芍药抗敏剂由玄参、人参和白芍所组成。玄参为玄参科植物玄参的干燥根,具有凉血滋阴,泻火解毒的功效。现代研究表明,玄参具有较好的抗炎作用。Zhang 等^[4]发现,玄参中的哈帕昔和哈帕酯昔的 β -葡萄糖苷酶水解产物能直接同 COX-2 结合从而抑制其活性,并且在 2.5 ~ 100 μ M 之间呈剂量依赖性。Paulina 等^[5]研究发现玄参中的桃叶珊瑚昔能明显抑制钙离子载体受激鼠腹膜巨噬细胞的白三烯 C4 (LTC₄) 的释放, bartsioside、桃叶珊瑚昔、哈帕酯昔和 8-乙酰哈帕昔能显著抑制钙离子载体受激人血小板中血栓烷 B₂ (TXB₂) 的释放。人参为五加科植物人参的根,具有大补元气,补脾益肺,生津,安神益智的功效。现代研究表明,人参抗炎的主要成分为人参皂昔,人参皂昔 Re 可通过调节 NF- κ B 信号通路来抑制炎症,人参皂昔 Rh₁ 可以通过减少 MAPK 信号传导,对单核细胞功能具有潜在的抑制作用^[6]。白芍为毛茛科植物芍药的干燥根,具有养血调经,敛阴止汗,柔肝止痛,平抑肝阳的功效。现代研究表明芍药总昔通过阻断 Toll 样受体 4/5 信号通路,抑制树突状细胞的功能,从而减轻免疫接到的

炎症反应;在苦基氯诱导的接触性屁眼中,芍药昔对巨噬细胞功能产生负调控,包括抑制 T 细胞中巨噬细胞移动抑制因子的表达,下调巨噬细胞移动抑制因子-细胞外信号调节激酶 1/2-环氧化酶 2 信号,及脂多糖诱导的肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和一氧化氮产生^[7]。

本文研究发现,芍药抗敏剂具有较好的 CaN-NF-AT 通路的抑制作用,同时,其抑制作用随着浓度的增加而增加。同时,芍药抗敏剂能很大程度上抑制 TNF- α 刺激的 NF- κ B 入核过程,且随着浓度的增加,抑制效应有所增强。这与芍药抗敏剂中主要成分芍药昔以及市场成品—德敏舒在细胞实验中起到的作用很接近。实验中也对于各预处理组几种炎症因子的 mRNA 的相对表达量进行了检测和比较。结果表明, TNF- α 能够明显诱导 HaCaT 细胞中所检测的几种炎症因子 mRNA 的相对表达量的上升,而芍药抗敏剂的预处理则能够对其中一些因子表达起到一定的抑制效果。芍药抗敏剂对 IL-6 的作用非常显著,并且呈现出抑制效果与浓度之间的相关性。对于内源 TNF- α 、IL-8 以及前列腺素合成初始步骤中关键性限速酶 COX-2,芍药抗敏剂也都有较为明显的抑制作用。而较为意外的是,芍药抗敏剂对于 TNF- α 诱导的常见的 IL-1 α 表达上升却没有明显的抑制效果,这也同样发现在芍药昔和德敏舒药物处理组中,其中的信号机制值得进一步探讨。从细胞实验结果可以看到,芍药抗敏剂作为含有芍药昔等成分的复方制剂具有较为明显的抵抗炎症反应作用,这与市售的产品德敏舒以及单纯芍药昔成分的效果都较为接近,而其在整体上的效果是否与细胞实验一致还有待进一步检验。

参考文献

- 1 He N, Wu PF, Cui ZF. Progress of inhibitory effect of medicinal plant extracts on calcineurin [J]. Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 2016, 28: 462-467.
- 2 Li SS, Zhu Y. Research progress of anti-inflammatory action in active ingredient of Chinese drugs [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2012, 30: 143-146.
- 3 Liu Q, Mu HB, Liu YL. The experimental research of the influence of TNF- α and IL-12 on rat with gasbag synovitis by *Plantago asiatica* L [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2007, 25: 816-818.