

苦豆子对脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞炎症的抗炎作用和机制研究

李芳, 白珊泽, 牛淳, 周轲, 魏彦明, 华永丽*

甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070

摘要:以 RAW 264.7 细胞为研究对象, 探究苦豆子对脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞炎症的抗炎作用和机制。采用水煎煮、水超声、75% 乙醇回流和 75% 乙醇超声分别制备苦豆子水煎煮提取物(water decocting extract, WDE)、水超声提取物(water ultrasonic extract, WUE)、75% 乙醇回流提取物(ethanol reflux extract, ERE)和 75% 乙醇超声提取物(ethanol ultrasonic extract, EUE), D101 大孔树脂吸附法制备苦豆子总生物碱提取物(total alkaloids extract, TAE)和总黄酮提取物(total flavonoids extract, TFE), 水提醇沉法制备苦豆子总多糖提取物(total polysaccharides extract, TPE), 通过酸性染料比色法、 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 分光光度法、苯酚-硫酸法分别测定 TA、TF 和 TP 的含量, 并采用正交法初步设计 TAE、TFE 和 TPE 9 种配伍组合(1:1:1, 1:2:2, 1:3:3, 2:1:2, 2:2:3, 2:3:1, 3:1:3, 3:2:1, 3:3:2), 脂多糖($1\ \mu\text{g/mL}$)诱导 RAW 264.7 细胞建立体外细胞炎症模型, 利用细胞增殖检测试剂盒检测细胞活力, 硝酸还原酶法检测一氧化氮的释放, 酶联免疫吸附法检测细胞白介素- 1β 、白介素-6、肿瘤坏死因子- α 的分泌, 蛋白免疫印迹技术检测细胞 p65 NF- κB 、p-p65 NF- κB 、I $\kappa\text{B}\alpha$ 、p-I $\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白的表达。结果显示, TAE、TFE、TPE 中 TA、TF、TP 的含量分别为 94.79%、71.59% 和 73.51%。与模型组相比, WDE、WUE、ERE、EUE、TAE、TFE、TPE 及其 9 种配伍组合显著降低了 IL- 1β 、IL-6、TNF- α 以及 NO 的释放, 以 TAE:TFE:TPE 为 2:1:2 抑制效果最好, 其极显著降低了 I $\kappa\text{B}\alpha$ 和 p65 NF- κB 的磷酸化水平($P < 0.01$)。综上所述, 苦豆子对脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞炎症具有一定的抗炎作用, 以 TAE:TFE:TPE 为 2:1:2 抗炎效果最佳, 其通过抑制 NF- κB 信号通路的激活及下游炎症介质的转录表达, 缓解 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的炎症反应。

关键词:苦豆子; RAW 264.7 细胞; 抗炎; NF- κB 信号通路

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)3-0387-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.3.004

Anti-inflammatory effect and mechanism of *Sophora alopecuroides* L. on lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages

LI Fang, BAI Shan-ze, NIU Chun, ZHOU Ke, WEI Yan-ming, HUA Yong-li*

College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: The anti-inflammatory effect and mechanism of *Sophora alopecuroides* L. were explored and the inflammation were induced by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. The water decoction extract (WDE), water ultrasonic extract (WUE), 75% ethanol reflux extract (ERE) and 75% ethanol ultrasonic extract (EUE) of *S. alopecuroides* were prepared by water decocting, water ultrasonic, 75% ethanol reflux and 75% ethanol ultrasonic. Total alkaloids extract (TAE) and total flavonoids extract (TFE) of *S. alopecuroides* were extracted by D101 macroporous resin adsorption method, total polysaccharides extract (TPE) of *S. alopecuroides* was extracted by water extraction and alcohol precipitation. The contents of TA, TF and TP were determined by acid dye colorimetry, $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ spectrophotometry and phenol-sulfuric acid method, respectively. Nine different combinations of TAE, TFE, TPE were preliminarily designed by orthogonal method (1:1:1, 1:2:2, 1:3:3, 2:1:2, 2:2:3, 2:3:1, 3:1:3, 3:2:1, 3:3:2). LPS ($1\ \mu\text{g/mL}$) induced RAW 264.7 macrophages to establish in

收稿日期: 2022-08-09 接受日期: 2023-01-12

基金项目: 国家自然科学基金(31860717); 甘肃农业大学伏羲杰出人才培育计划(Gaufx-03J01); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-37)

* 通信作者 Tel: 86-013919082038; E-mail: huayongli2004@163.com

in vitro inflammatory model. Cell counting kit-8 assay was used to detect cell viability, nitrate reductase was used to detect nitric oxide release, and enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in cell supernatant, the expression of p65 NF- κ B, p-p65 NF- κ B, I κ B α and p-I κ B α were detected by Western blot. The results showed that the content of TA, TF and TP were 94.79%, 71.59% and 73.51% after purification. Compared with the model group, WDE, WUE, ERE, EUE, TAE, TFE, TPE and their 9 combinations significantly reduced the release of IL-1 β , IL-6, TNF- α and NO, and 2:1:2 of TAE:TFE:TPE had the best anti-inflammatory, which significantly reduced the phosphorylation levels of I κ B α and p65 NF- κ B ($P < 0.01$). In conclusion, *S. alopecuroides* have anti-inflammatory effects on the inflammation of RAW 264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide, The 2:1:2 of TAE:TFE:TPE had the best anti-inflammatory effect, which alleviated the LPS-induced inflammatory response of RAW 264.7 macrophages by inhibiting the activation of NF- κ B signaling pathway and the transcription expression of downstream inflammatory mediators.

Key words: *Sophora alopecuroides* L.; RAW 264.7 macrophages; anti-inflammatory; NF- κ B signaling pathway

炎症是机体受到病原体攻击、感染等内外界有害刺激时产生的一种防御性反应,它会启动免疫反应以保护机体^[1],当免疫系统过度或持续地激活时,则会导致机体发生如类风湿性关节炎、炎症性肠病、肿瘤等一系列与炎症相关的疾病,最终导致发生永久性或暂时性炎症^[2]。巨噬细胞在炎症反应的启动、维持和缓解等过程中发挥核心作用,它的持续积累和活化是慢性炎症的标志^[3]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可激活巨噬细胞并促使其分泌肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、一氧化氮(nitric oxide, NO)等炎症介质^[4],这些炎性介质的过度释放导致器官损伤和慢性疾病^[5]。NF- κ B在调节细胞凋亡、炎症反应等过程中发挥重要作用^[6],是抗炎治疗的重要靶点。

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)为豆科(Leguminosae)槐属植物,分布于中国西北各省以及中亚国家,具有清热解毒、止痛消炎、燥湿止痢等功效,是西北地区重要药用植物^[7]。苦豆子主要含有生物碱类、黄酮类、有机酸类、多糖类、挥发油类以及甾类、酚类等成分,其中生物碱类具有抗炎、抗癌、抗菌和免疫调节等作用^[8],黄酮类具有抗炎、抗病毒、抗氧化等作用^[9],多糖类具有免疫调节、抗肿瘤等功能,能够有效提高机体免疫力,在抗肿瘤及免疫促进方面发挥重要作用^[10,11]。以上研究都是基于苦豆子某一化学成分群进行研究,而中药具有多成分、多靶点、多途径联合作用的特点,能够以较低的药物剂量实现相同甚至更好的治疗效果,包括有效部位配伍以及有效成分配伍等,因此,需要探讨苦豆子不同化学成分群配伍是否可以增效。本文以LPS诱导的RAW 264.7细胞作为筛选苦豆子抗炎活性药物的炎症模型,探讨苦豆子常规水煎煮提取物(water

decocting extract, WDE)、水超声提取物(water ultrasonic extract, WUE)、75%乙醇回流提取物(ethanol reflux extract, ERE)、75%乙醇超声提取物(ethanol ultrasonic extract, EUE)和其不同有效部位总生物碱提取物(total alkaloids extract, TAE)、总黄酮提取物(total flavonoids extract, TFE)、总多糖提取物(total polysaccharides extract, TPE)及其9种配伍组合(1:1:1、1:2:2、1:3:3、2:1:2、2:2:3、2:3:1、3:1:3、3:2:1、3:3:2)的抗炎作用和作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

小鼠RAW 264.7单核巨噬细胞(普赛诺生命科技有限公司);DMEM高糖培养基(货号04-001-1ACS,以色列BI公司);胎牛血清FBS(货号30022.01,以色列BI公司);CCK-8(货号BS350B,美国Nuaire公司);牛血清白蛋白(纯度97%,货号A8020,北京索莱宝科技有限公司);100 \times 青霉素-链霉素(货号P7630,北京索莱宝科技有限公司);一氧化氮检测试剂盒(货号A012-1-2,南京建成生物科技有限公司);小鼠TNF- α 检测试剂盒(货号ml002095,上海酶联生物科技有限公司);小鼠IL-6检测试剂盒(货号ml063159,上海酶联生物科技有限公司);IL-1 β 检测试剂盒(货号ml301814,上海酶联生物科技有限公司);NF- κ B p65(货号bs-0465R,北京博奥森生物技术有限公司);I κ B α (货号T55034S,艾比玛特医药科技上海有限公司);p-NF- κ B p65(货号3033s, CST);p-I κ B α (货号TA2002, CST);SDS-PAGE分离胶缓冲液、SDS-PAGE浓缩胶缓冲液(北京索莱宝科技有限公司);5 \times 蛋白上样缓冲液、PMSF、细胞裂解液、羊抗兔二抗、预染Marker蛋白、抗体稀释液(北京博奥森生物技术有限公司);苦豆子(甘肃武威地区,经甘肃农业大学动物医学院中

兽医学教研室魏彦明教授鉴定为豆科植物苦豆子 (*Sophora alopecuroides* L.); D101 大孔树脂(实验级); 脂多糖(纯度 $\geq 98\%$, 货号 L8880, 北京索莱宝科技有限公司); 苦参碱对照品(纯度 $\geq 98\%$, 货号 YZ0120, 南京源植生物科技有限公司); 芦丁对照品(纯度 $\geq 98\%$, 货号 Yz0038, 南京源植生物科技有限公司); 葡萄糖(纯度 98%, 货号 14431-43-7, 国药集团化学试剂有限公司), 其他常用生化试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

全功能成像仪 (Amersham Imager 600, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden); 全波长酶标仪 (FK-058, 北京普天新桥技术有限公司)。

1.3 苦豆子不同提取物的制备

D101 大孔树脂预处理: 取适量树脂, 使用 95% 乙醇溶液浸泡 24 h, 湿法上柱, 柱高 60 cm, 直径 2.6 cm, 用 95% 乙醇溶液洗至洗脱液与水混合(1:2)不成白色浑浊为止, 接着用纯化水洗至无醇味, 2% 的盐酸溶液浸泡 3 h, 水洗至中性, 5% 氢氧化钠溶液浸泡 3 h, 水洗至中性, 备用。

TAE 制备: 准确称取过 60 目筛的苦豆子 100 g, 置于 1 000 mL 圆底烧瓶中, 按固液比 1:5 加入 65% 的乙醇溶液, 40 °C 超声提取 2 h, 共提取 2 次, 合并滤液离心后取上清并减压浓缩, 后经冷冻干燥机制成冻干粉, 使用 pH = 3 的盐酸溶液溶解后 25% 氨水调节溶液 pH = 10, 所得碱化液置于 500 mL 分液漏斗中, 2 倍体积的氯仿萃取 2 次后浓缩干燥, 再使用 25% 乙醇配制浓度为 2.5 mg/mL 的料液, 5% 氢氧化钠调节其 pH = 9, 以 2 BV/h 流速上样, 6 倍样品体积的 70% 乙醇 (pH = 9) 洗脱, 流速为 4 BV/h, 收集洗脱液, 减压浓缩, 加入氯仿(1:1) 萃取 2 ~ 3 次, 萃取液烘干, 得苦豆子 TAE。

TFE 制备: 准确称取过 40 目筛的苦豆子 100 g, 置于 1 000 mL 圆底烧瓶中, 按固液比 1:10 加入 75% 乙醇溶液, 85 °C 热回流提取 2 h, 共提取 2 次, 合并滤液离心后减压浓缩, 后经冷冻干燥机制成冻干粉, 取适量加纯化水溶解, 先用石油醚萃取 3 次(1:1), 后用乙酸乙酯萃取 3 次(1:1), 所得萃取液经浓缩烘干后称取 0.24 g, 加入 25% 乙醇溶解配成浓度为 2.5 mg/mL 的料液, 湿法上柱, 以 4 倍样品体积的纯化水洗脱除去水溶性杂质, 后用 6 倍样品体积的 80% 乙醇洗脱, 流速为 4 BV/h, 收集洗脱液减压浓缩至无醇味, 后用乙酸乙酯萃取 1 ~ 2 次, 烘

干后得苦豆子 TFE。

TPE 制备: 准确称取过 40 目筛的苦豆子 20 g, 按固液比 1:3 加入 60 mL 石油醚, 持续搅拌脱脂浸泡 3 天, 后使用 95% 乙醇同样处理 3 天, 溶液抽滤后 60 °C 干燥, 称取 17.84 mg, 按固液比 1:10 加入蒸馏水溶解, 70 °C 热回流提取 4 h, 离心取上清, 凉至室温, 加入 4 倍体积 95% 乙醇, 4 °C 沉淀过夜, 取沉淀烘干, 得苦豆子 TPE。

取适量苦豆子挑去杂质, 粉碎后过 20 目筛。分别称取 25 g 苦豆子按以下四种方法提取:

EUE 制备: 按固液比 1:10 加 250 mL 75% 的乙醇, 浸泡 1 h 后在温度 35 °C、功率 50 W 条件下, 超声提取 40 min, 滤过离心, 取上清。

ERE 制备: 固液比 1:10 加入 250 mL 75% 的乙醇, 浸泡 1 h, 加热煎煮 2 h, 滤过离心, 取上清。

WUE 制备: 固液比 1:10 加 250 mL 纯化水, 浸泡 1 h, 按温度 35 °C、功率 50 W 的条件, 超声提取 40 min, 滤过离心, 取上清。

WDE 制备: 固液比 1:10 加入 250 mL 纯化水, 浸泡 1 h, 加热煎煮 2 h, 滤过离心, 取上清。

将上述所得上清浓缩后冷冻干燥机制成冻干粉备用。

1.4 苦豆子 TA、TF、TP 含量测定

根据文献^[12-14]和实验室建立方法, 采用酸性染料比色法、 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 分光光度法和苯酚-硫酸法分别测定 TA、TF 和 TP 的含量。

1.5 细胞及培养

将小鼠 RAW 264.7 单核巨噬细胞接种于 ($V_{\text{胎牛血清}}:V_{\text{青链霉素}}:V_{\text{DMEM}} = 10:1:89$) 的完全培养基中, 置细胞培养箱中培养 (37 °C, 5% CO_2), 1 ~ 3 d 更换一次完全培养基, 维持细胞正常生长的营养物质供给。

1.6 苦豆子不同提取物对 RAW 264.7 细胞存活率的影响

使用二甲基亚砜 DMSO 以及维持培养基 DMEM 溶解药物 (WDE、WUE、ERE、EUE、TAE、TFE、TPE), 分别配成不同浓度的培养基溶液 (1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

采用细胞增殖检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测细胞活力, 将 RAW 264.7 细胞以 1×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL , 置于 37 °C, 5% CO_2 、饱和湿度条件下的 CO_2 培养箱中培养 24 h, 待 RAW 264.7 细胞贴壁后弃去旧培养

液,加入不同浓度的苦豆子各提取物干预 6 h,弃培养基,加入 CCK-8 工作液 100 μL ,继续培养 40 min 后,设置 CCK-8 工作液为空白组,每组 6 个平行重复,酶标仪 450 nm 处测定各孔吸光度(A)值,根据公式计算各组细胞活力:细胞活力 = $[A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}} / A_{0\text{加药}} - A_{\text{空白}}] \times 100\%$ 。

1.7 苦豆子不同提取物对 RAW 264.7 细胞产生 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 NO 的影响

将 RAW 264.7 细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 24 孔板中,每孔 0.5 mL,培养 24 h 后弃去旧培养基,分别加入以维持培养基稀释的各浓度药物(根据 CCK-8 细胞活力试验选择浓度为 125、62.5、31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$),并设置对照组与模型组(LPS = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每组 3 个平行重复。药物作用于细胞 6 h 后吸出孔内培养液,将药物组和模型组各加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 溶液,对照组加入等量 DMEM 培养液,继续培养 24 h 后收集培养基上清液,1 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,使用 NO 检测试剂盒按照硝酸还原酶法检测 NO 释放量,同时使用 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 检测试剂盒按照酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测细胞上清中的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的释放量。

1.8 苦豆子 TAE、TFE、TPE 及其不同配伍组合对 RAW 264.7 细胞存活率的影响

使用 DMSO 以及维持培养基 DMEM 将苦豆子 TAE、TFE、TPE 配为浓度 61.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的培养基溶液,并按照 TAE:TPE 为 1:1:1、1:2:2、1:3:3、2:1:2、2:2:3、2:3:1、3:1:3、3:2:1、3:3:2 比例配制 9 种配伍组合。

将 RAW 264.7 细胞以 1×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板中,按照“1.6”中方法检测苦豆子 TAE、TFE、TPE 及其不同配伍组合对 RAW 264.7 细胞存活率的影响。

1.9 苦豆子 EUE、ERE、TAE、TFE、TPE 及不同组合对 RAW 264.7 细胞产生 TNF- α 的影响

将 RAW 264.7 细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 96 孔板中,按照“1.7”中方法测定苦豆子 EUE、ERE、TAE、TFE、TPE 及不同组合(61.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对 RAW 264.7 细胞产生 TNF- α 的影响。

1.10 苦豆子对 RAW 264.7 细胞中 NF- κB 信号通路关键蛋白的影响

采用蛋白免疫印迹法(Western blot, WB)检测细胞中 NF- κB p65、p-NF- κB p65、I $\kappa\text{B}\alpha$ 及 p-I $\kappa\text{B}\alpha$ 蛋

白的表达。将 RAW 264.7 细胞以 1×10^6 个/mL 的密度接种到 6 孔板,设置对照组、模型组和给药组,待细胞贴壁后弃去旧培养基,给药组加入苦豆子 TAE、TFE、TPE(2:1:2, 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)药物预处理 6 h,模型组和对照组加入等量 DMEM 培养液,6 h 后弃培养基,模型组和给药组加入 LPS 溶液(LPS = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$),对照组加入等量 DMEM 培养液,继续培养 24 h 后用预冷 PBS 洗涤细胞 3 次,加入 RIPA 裂解液、PMSF、磷酸酶抑制剂(100:1:1),每孔加入 200 μL ,冰上裂解 5 min 后放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱反复冻融 3 次,使用细胞刮刀刮取并收集于 1.5 mL EP 管,4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 r/min 离心 15 min 后取上清,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,沸水中蛋白变性 10 min,10% SDS-PAGE 凝胶电泳并转于 PVDF 膜上,用 5% 的 BSA 对磷酸化蛋白封闭 1 h,5% 脱脂奶粉对非磷酸化蛋白封闭 2 h,加入 I $\kappa\text{B}\alpha$ (1:1 000)、NF- κB p65(1:5 000)、p-I $\kappa\text{B}\alpha$ (1:1 000)、p-NF- κB p65(1:800),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日使用 TBST 洗涤 PVDF 膜,磷酸化一抗洗涤 3 次,非磷酸化一抗洗涤 10 次,5 min/次,并室温孵育相应 HRP 标记抗体 1 h,同上继续洗膜后以 1:1 比例将 ECL 化学发光液 A、B 液混合摇匀,在凝胶成像系统中曝光得到蛋白条带,使用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度值分析并计算。

1.11 数据统计分析

实验数据均应用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,各组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVN)进行比较,两两比较用 LSD 检验进行验证,以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图。

2 结果

2.1 苦豆子 TA、TF、TP 含量测定

TA 含量测定:以苦参碱为对照品,采用酸性染料比色法测定 TA 含量,以吸光度(A)为纵坐标,浓度(C)为横坐标,得到线性回归方程为 $A = 0.0677C - 0.0012$, $R^2 = 0.9998$,并测得苦豆子 TAE 中 TA 的含量为 94.79%,可用于后续试验研究。

TF 含量测定:以芦丁为对照品,采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 分光光度法测定 TF 含量,以吸光度(A)为纵坐标,浓度(C)为横坐标,得到线性回归方程为 $A = 0.012C + 0.0031$, $R^2 = 0.9998$,并测得苦豆子 TFE 中 TF 的含量为 71.59%,可用于后续试验研究。

TP 含量测定:以葡萄糖为对照品,采用苯酚-硫酸法测定 TA 含量,以吸光度(A)为纵坐标,浓度(C)为横坐标,得到线性回归方程为 $A = 0.051 2C - 0.041 3, R^2 = 0.999 1$,并测得苦豆子 TPE 中 TP 的含量为 73.51%,可用于后续试验研究。

2.2 苦豆子对 RAW 264.7 细胞存活率的影响

由图 1 可知,TAE 浓度在 15.625 ~ 125 $\mu\text{g/mL}$ 、

TFE 浓度在 15.625 ~ 250 $\mu\text{g/mL}$ 、TPE、EUE、ERE、WDE、WUE 浓度在 15.625 ~ 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内都无明显的细胞毒性,其中不同浓度 TPE 对 RAW 264.7 具有显著的促增值作用,细胞存活率均有提高,故选取 125、62.5、31.25 $\mu\text{g/mL}$ 的药物浓度作为试验的高、中、低剂量。

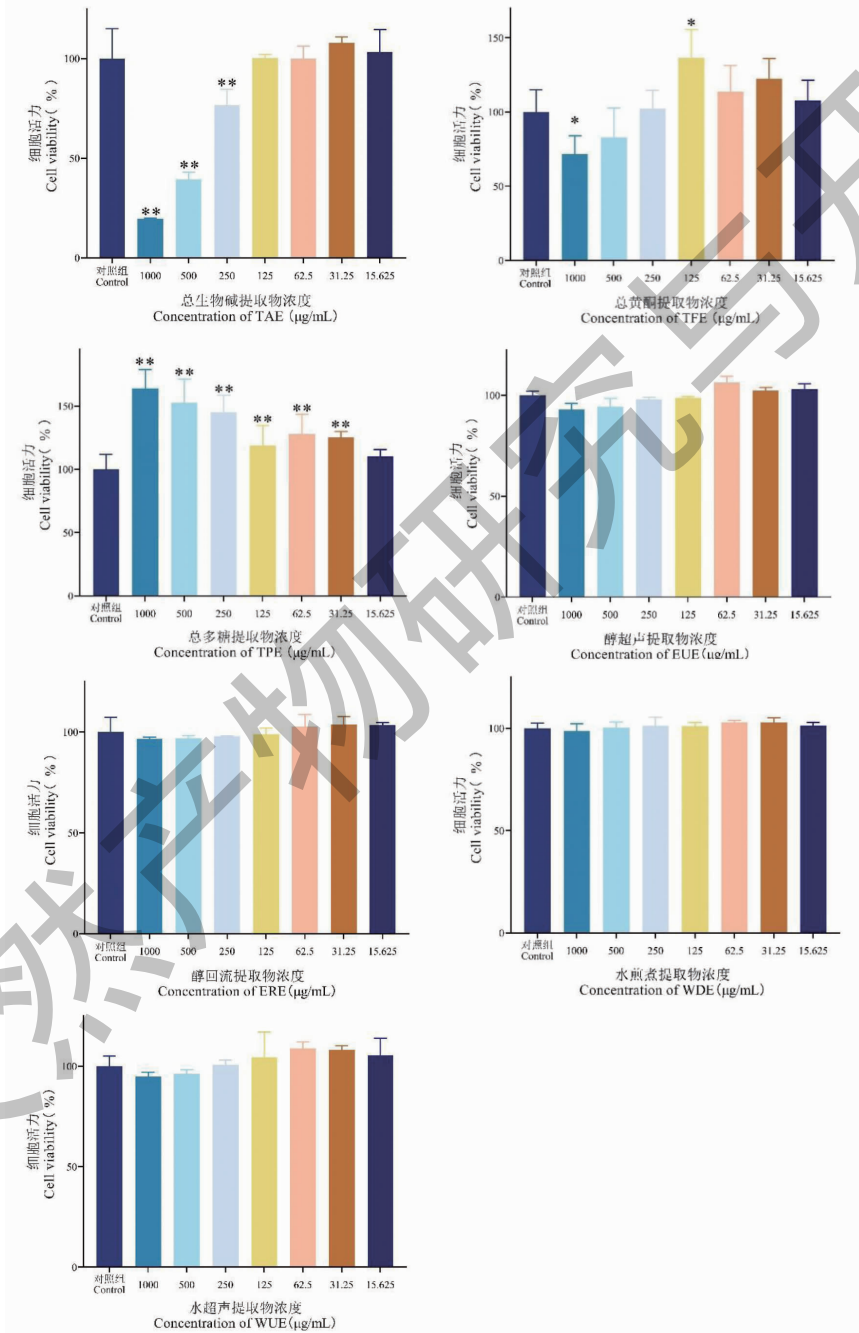


图 1 苦豆子对 RAW 264.7 细胞存活率的影响

Fig. 1 Effect of *S. alopecuroides* on RAW 264.7 macrophages viability

注:与对照组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3 苦豆子对 RAW 264.7 细胞产生 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 NO 的影响

由图 2 ~ 5 可知,苦豆子 WDE、WUE、EUE、ERE、TAE、TFE、TPE 均能不同程度抑制细胞中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 NO 的产生,其中对 NO 和 TNF- α 抑制作用较好的提取物分别为 EUE、ERE 和 ERE、TFE,对 IL-6 和 IL-1 β 抑制作用较好的提取物分别为 EUE、TAE 和 TFE、WUE,综合以上结果,筛选出苦豆子常规 EUE、ERE 及有效部位 TFE 的抑制效果较好,且 TFE 单个作用时对 TNF- α 的抑制效果较其他各组更为明显,推测其具有更好的抗炎活性,可进一步研究 TAE、TFE、TPE 及其配伍后的抗炎活性,探讨其是否可以达到协同增效的作用,并结合“2.2”中细胞活力试验结果,选择对细胞活力抑制率较低的 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 为后续药物试验浓度。

2.4 苦豆子 TAE、TFE、TPE 及其不同配伍组合对 RAW 264.7 细胞存活率的影响

由图 6 可知,苦豆子 TAE、TFE、TPE 及其不同配伍组合对 RAW 264.7 细胞无细胞毒性,TAE、TFE、TPE 配伍为 1:1:1、1:2:2、1:3:3、2:1:2、2:2:3、3:1:3 时,其细胞活力较 TAE、TFE 单一作用时有所提高,但并不显著,TPE 对 RAW 264.7 细胞具有显著的促增值作用,细胞存活率显著提高。

2.5 苦豆子 EUE、ERE、TAE、TFE、TPE 及不同组合对 RAW 264.7 细胞产生 TNF- α 的影响

由图 7 可知,当 TAE、TFE、TPE 配伍为 1:3:3、2:1:2、2:2:3、2:3:1、3:1:3、3:2:1、3:3:2 时,TNF- α 的释放量低于 EUE、ERE、TAE、TFE 和 TPE 组,其中配伍为 2:1:2 时抑制效果最好,且除了与配伍 1:3:3 和 3:3:2 两组组合外,与其他药物组都形成显著差

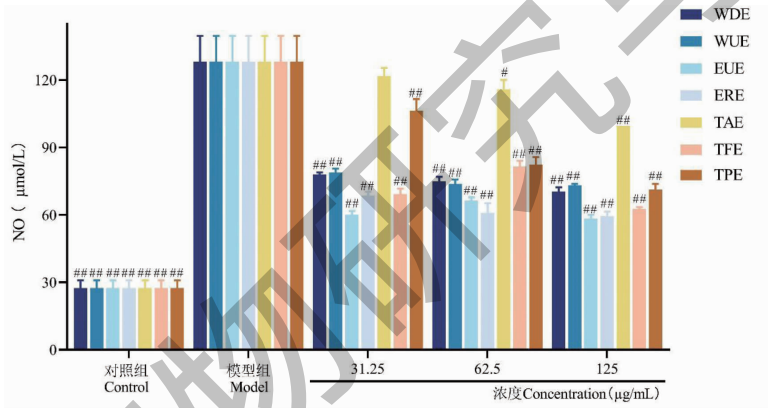


图 2 苦豆子对 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞释放 NO 的影响

Fig. 2 Effect of *S. alopecuroides* on NO release in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages
注:与模型组相比,[#] $P < 0.05$;^{##} $P < 0.01$ 。Note:Compared with the model group,[#] $P < 0.05$;^{##} $P < 0.01$.

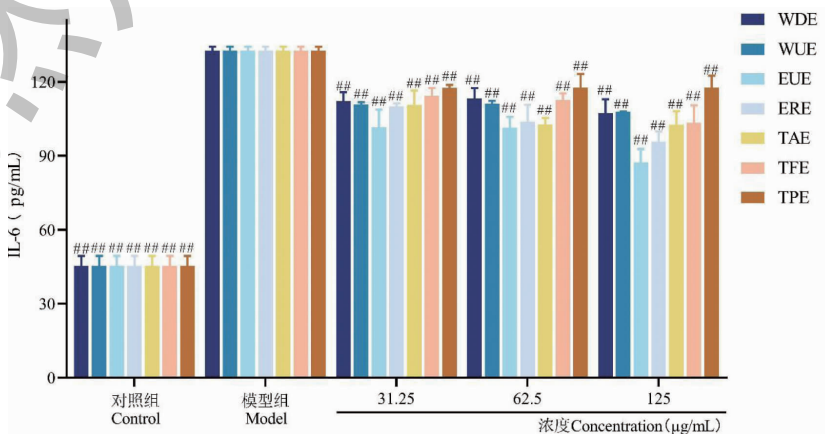


图 3 苦豆子对 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞释放 IL-6 的影响

Fig. 3 Effect of *S. alopecuroides* on IL-6 release in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages

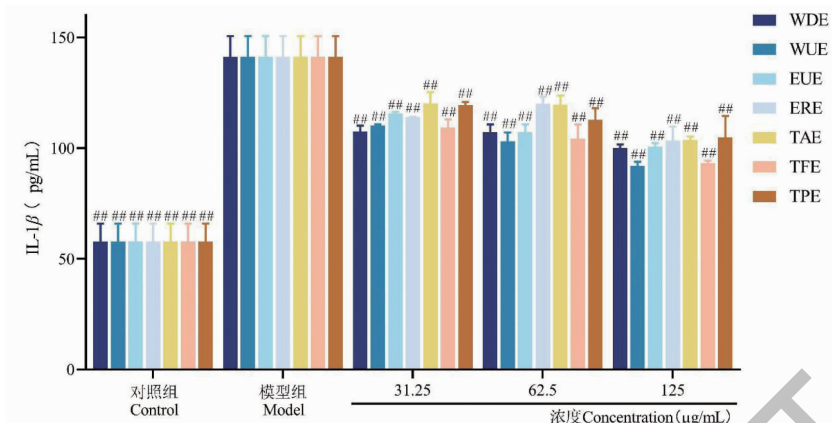


图 4 苦豆子对 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞释放 IL-1β 的影响

Fig. 4 Effect of *S. alopecuroides* on IL-1β release in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages

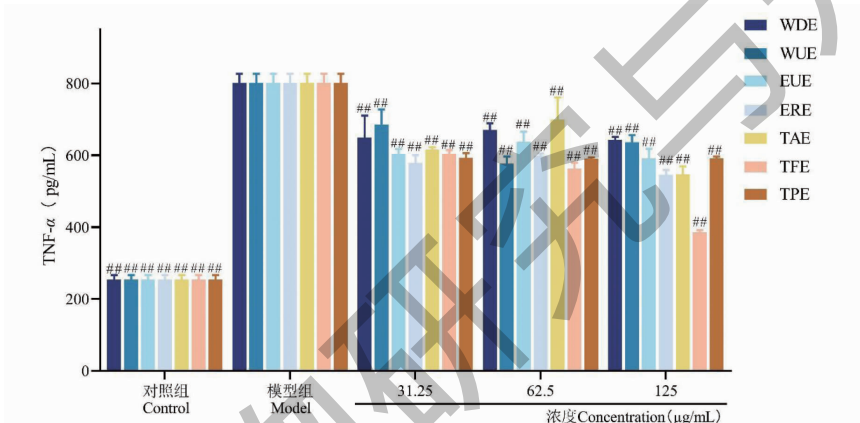


图 5 苦豆子对 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞释放 TNF-α 的影响

Fig. 5 Effect of *S. alopecuroides* on TNF-α release in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages

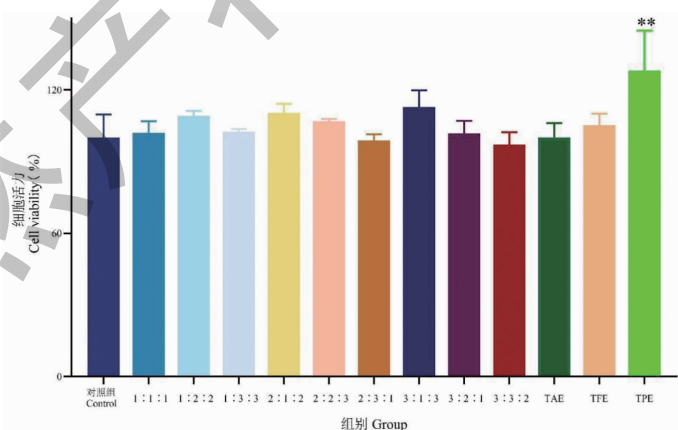


图 6 TAE、TFE、TPE 及其不同配伍对 RAW 264.7 细胞存活率的影响

Fig. 6 Effect of TAE, TFE, TPE and their different compatibilities on cell viability of RAW 264.7 macrophages

注:与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with the control group, ** $P < 0.01$.

异,结合 3 种配伍组合(2:1:2、1:3:3 和 3:3:2)的细胞活力试验结果,选择配伍 2:1:2 作为后续药物配伍组合。

2.6 苦豆子 TAE、TFE、TPE (2:1:2) 对炎症 RAW 264.7 细胞中 NF-κB 信号通路关键蛋白的影响
NF-κB 通路是炎症发生的关键通路,已被证明

与各种炎症介质基因的转录和调控有关,当细胞受到刺激后, $I\kappa B\alpha$ 磷酸化后降解,促进 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的活化,如 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 亚单位 p65 的磷酸化,p65 磷酸化后启动相关基因转录并合成促炎因子,进一步诱发和加重炎性损伤^[15,16]。如图 8 所示,模型组同对照组相比, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65 和 $I\kappa B\alpha$ 蛋白的磷酸化水平极显著升高($P < 0.01$),表明 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 诱导 RAW 264.7

细胞后,导致细胞 $I\kappa B\alpha$ 蛋白发生磷酸化,促使 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65 磷酸化并激活了 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号通路,而 TAE、TFE、TPE 预作用 6 h 后,与模型组相比, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65 和 $I\kappa B\alpha$ 蛋白的磷酸化水平极显著降低($P < 0.01$),表明 TAE、TFE、TPE 联合作用后能够显著降低 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 $I\kappa B\alpha$ 、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65 蛋白的磷酸化水平,进而抑制了 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号通路的激活。

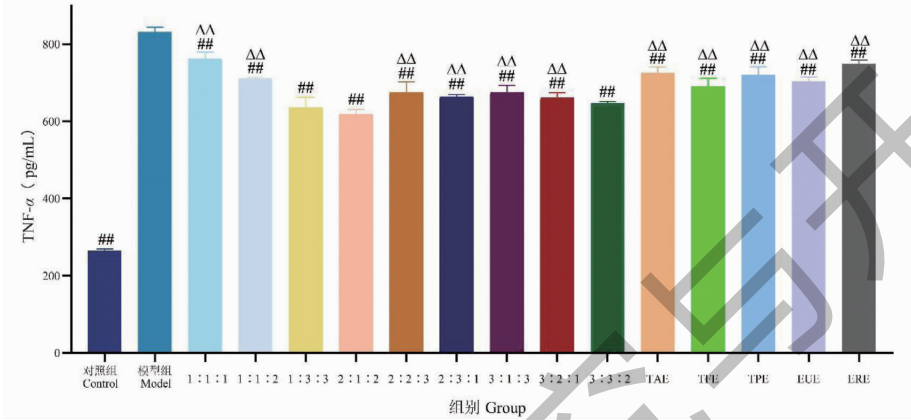


图 7 不同提取物及 TAE、TFE、TPE 不同比例对 RAW 264.7 细胞释放 $\text{TNF-}\alpha$ 的影响

Fig. 7 Effect of different extracts and different proportions of TAE, TFE, TPE on $\text{TNF-}\alpha$ release from RAW 264.7 macrophages

注:与模型组相比, $^{###}P < 0.01$; 与 2:1:2 组相比, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。Note: Compared with the model group, $^{###}P < 0.01$; Compared with the 2:1:2 group, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

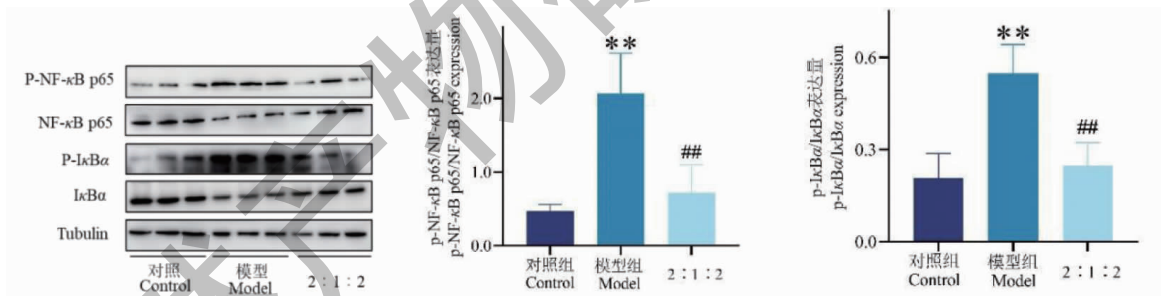


图 8 TAE、TFE、TPE (2:1:2) 对 $I\kappa B\alpha$ 、p- $I\kappa B\alpha$ 、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65、p- $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65 蛋白表达的影响

Fig. 8 Effect of TAE, TFE, TPE (2:1:2) on the expression of $I\kappa B\alpha$, p- $I\kappa B\alpha$, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ P65, p- $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65

注:与对照组相比, $^{**}P < 0.01$; 与模型组相比, $^{###}P < 0.01$ 。Note: Compared with the control group, $^{**}P < 0.01$; Compared with the model group, $^{###}P < 0.01$ 。

3 讨论与结论

巨噬细胞参与机体免疫反应,当受到 LPS 刺激时巨噬细胞通过触发信号通路(如 $\text{NF-}\kappa\text{B}$),促使其产生如 NO、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 等促炎介质^[17]。NO 生成量过多与炎症发生有密切关系^[18], $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 的水平增加可促使细胞分泌更多的促炎因子, IL-6 为重要促炎细胞因子,可诱导 B 细胞、T 细胞活化,参与机体免疫应答^[19], $\text{IL-1}\beta$ 在急性或慢性炎症

中, $\text{IL-1}\beta$ 的表达升高^[20], 本研究结果发现 LPS 作用 RAW 264.7 后, NO、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 、 $\text{IL-1}\beta$ 的释放显著增加,表明体外炎症模型建立成功,而苦豆子 WDE、WUE、EUE、ERE 及其 TAE、TFE、TPE 都能够抑制 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞中 NO、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 、 $\text{IL-1}\beta$ 的产生,其中 TFE、EUE、ERE 的抑制作用较明显,将 TAE、TFE、TPE 按不同比例配伍后,发现其都能不同程度抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 的释放,其中除配伍 1:1:1 和 1:1:2

组合外,其他 7 种组合对 TNF- α 的释放的抑制效果较单独作用时效果更好,其配伍为 2:1:2 时抑制效果最好,体现出明显的协同增效。

为探究苦豆子抗炎活性的分子机制,本研究采用 WB 检测 NF- κ B 信号通路关键蛋白 I κ B α 、NF- κ B p65 和 p-I κ B α 、p-NF- κ B p65 的表达。NF- κ B 是炎症的关键调节因子,可调节许多关键炎症介质的转录,如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等^[21],LPS 与 TLR4 受体结合激活 NF- κ B 信号通路是诱导巨噬细胞释放炎症介质的关键环节^[22],当细胞受到刺激后,与 NF- κ B 结合的抑制性蛋白 I κ B α 在 I κ B α 激酶作用下迅速磷酸化为 p-I κ B α ,释放出有活性的 p-NF- κ B p65 进入细胞核,从而促进炎症相关因子的合成与分泌^[23]。近年来,对生物碱、黄酮和多糖类成分抗炎的报道较为广泛,如研究发现苦豆碱可通过抑制 I κ B α 磷酸化和 NF- κ B p65 核移位来减轻 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞的炎症反应^[17],Zhao 等^[24]研究发现苦豆子总生物碱可能通过抑制 NF- κ B 活化来缓解葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎,研究表明中药黄酮可以降低 NF- κ B 信号通路中的蛋白 I κ B α 和 p65 蛋白的磷酸化水平来发挥抗炎作用^[25],Li 等^[26]发现苦参总黄酮可通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路激活发挥对溃疡性结肠炎的免疫调节作用,草苈蓉多糖可通过抑制 NF- κ B、MAPK、STAT3 活化来抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞的炎症反应^[27],而 Qu 等^[28]研究表明红松松仁多糖可通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路来抑制 LPS 诱导的炎症反应。目前关于生物碱、黄酮、多糖类成分配伍对炎症影响的相关研究较少,本研究发现当苦豆子 TAE、TFE、TPE 联合作用后,极显著降低了 NF- κ B p65 和 I κ B α 蛋白磷酸化,抑制了 p-I κ B α 、p-NF- κ B p65 蛋白的表达,表明苦豆子总生物、总黄酮和总多糖配伍后,可通过抑制 NF- κ B 通路的激活来缓解 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞的炎症反应。

综上所述,本研究主要比较了苦豆子常规 WDE、WUE、EUE、ERE 和其不同有效部位 TAE、TFE、TPE 及其 9 种配伍组合(1:1:1、1:2:2、1:3:3、2:1:2、2:2:3、2:3:1、3:1:3、3:2:1、3:3:2)在体外的抗炎活性,发现 TAE、TFE、TPE(2:1:2)配伍使用时对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症的抑制效果最好,且其在体外通过抑制 NF- κ B 炎症通路激活,发挥抗炎作用。本试验只完成了细胞水平上的抗炎药物筛选,且仅筛选出苦豆子不同药效部位的配伍组

合,但仍存在化学成分复杂,其发挥作用的药效成分及物质基础不够明确等问题,需要进一步的研究。

参考文献

- 1 Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair[J]. J Athl Train, 2006, 41:457-465.
- 2 Liu JX, Tang JS, Zuo YH, et al. Staurosporine B inhibits macrophage activation by inhibiting NF- κ B and ERK MAPK signalling[J]. Pharmacol Res, 2016, 111:303-315.
- 3 Zhang LP, Chen YY, Lu HY, et al. Regulatory effect of *Osbeckia opipara* total phenols on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mouse macrophages[J]. J Guangxi Med Univ (广西医科大学学报), 2022, 39:370-374.
- 4 Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation[J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005, 4:281-286.
- 5 Philippou A, Maridaki M, Theos A, et al. Cytokines in muscle damage[J]. Adv Clin Chem, 2012, 58:49-87.
- 6 Lee TH, Jung M, Bang MH, et al. Inhibitory effects of a spinasterol glycoside on lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines via down-regulating MAP kinase pathways and NF- κ B activation in RAW 264.7 macrophage cells[J]. Int Immunopharmacol, 2012, 13:264-270.
- 7 Liu W, Zhang YX, Yang XZ, et al. Hypoglycemic effect and mechanism of total alkaloids of *Sophora alopecuroides* L. [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33:1991-1997.
- 8 Wang RZ, Deng XX, Gao QX, et al. *Sophora alopecuroides* L.: an ethnopharmacological, phytochemical, and pharmacological review[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 248:112172.
- 9 Shi FY, Qiu MN, Li GZ, et al. Research progress on the resource status, chemical composition, toxicity, exploitation and utilization of *Sophora alopecuroides* [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med (黑龙江畜牧兽医), 2019, 13:34-38.
- 10 Zheng D, Feng WR, Chen G, et al. Effect of polysaccharide from *Sophora alopecuroides* on regulating the immune function in mice[J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2018, 35:94-97.
- 11 Chen G, Zhao ZY, Fu Y, et al. Structural characterization of *Sophora alopecuroides* polysaccharides and study on its antitumor activity of CT26[J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 13:1103-1107.
- 12 Wang FL. Optimization of extraction of alkaloid from *Sophora alopecuroides* by response surface methodology and its antimicrobial activity[J]. Food Ind (食品工业), 2020, 41:130-

- 134.
- 13 Ye XJ, Li L. Determination of the content of total flavonoids in *Sophora alopecuroides* L. residues[J]. J Anhui Agric Sci, 2012, 40:736-737.
- 14 Zhang CH, Yun YH, Fan W, et al. Rapid analysis of polysaccharides contents in *Glycyrrhiza* by near infrared spectroscopy and chemometrics[J]. Int J Biol Macromol, 2015, 79:983-987.
- 15 Qiu M, Feng LJ, Zhao CJ, et al. *Bacillus subtilis* ameliorates LPS-induced mastitis through inhibiting NF- κ B signaling pathway in mice[J]. Chin J Vet Sci (中国兽医学报), 2022, 42:1018-1022.
- 16 Yu B, Liang T, Lu JF, et al. Borneol ameliorates LPS-induced BMECs injury by down-regulating TLR4-NF- κ B pathway[J]. Immunol J (免疫学杂志), 2022, 38:1-6.
- 17 Haque MA, Jantan I, Harikrishnan H, et al. Enhances LPS-activated pro-inflammatory responses via MyD88-dependent pathways in U937 macrophages[J]. Planta Med, 2018, 84:1255-1264.
- 18 Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases[J]. Inflammopharmacology, 2007, 15:252-259.
- 19 Huang P, Hong JX, Zhang PX, et al. Polyphenols extracted from *Hizikia fusiformis* relieves lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 cells via the nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinase signaling pathways[J]. Food Sci (食品科学), 2022, 43:141-148.
- 20 Kanamori Y, Murakami M, Sugiyama M, et al. Hepcidin and IL-1 β [J]. Vitam Horm, 2019, 110:143-156.
- 21 DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer[J]. Immunol Rev, 2012, 246:379-400.
- 22 Shao QY, Jiang CM, Xia YY, et al. Dioscin ameliorates peritoneal fibrosis by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2019, 12:867-875.
- 23 Choi E, Kim MY, Cho JY. Anti-inflammatory activities of *Canarium subulatum* Guillaumin methanol extract operate by targeting Src and Syk in the NF- κ B pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2019, 238:111848.
- 24 Zhao WC, Song LJ, Deng HZ. Protective effect of total alkaloids of *Sophora alopecuroides* on dextran sulfate sodium-induced chronic colitis[J]. Chin J Integr Med, 2011, 17:616-624.
- 25 Zhu HY, Zhou WR, Zhang ZH. Anti-inflammatory effect of flavonoids from *Enhalus acoroides* on RAW 264.7 cells stimulated by LPS[J]. Chin J Mar Drugs (中国海洋药物), 2020, 39:51-55.
- 26 Li ZC, Lin ML, Li YD, et al. Total flavonoids of *Sophora flavescens* and kurarinone ameliorated ulcerative colitis by regulating Th17/Treg cell homeostasis[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 297:115500.
- 27 Liu LY, Zhang Z, Ge NJ, et al. Effect of *Boschniakia rossica* polysaccharides on LPS-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages[J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2021, 56:1479-1485.
- 28 Qu H, Gao X, Yi JJ, et al. Inhibitory effects of *Pinus koraiensis* pine nut polysaccharide on inflammatory response of RAW 264.7 cells induced by lipopolysaccharide[J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2020, 41:328-334.
- (上接第 386 页)
- 16 Zhang XH, Yang HW, Pan YF. Research on antioxidant activity *in vitro* of different fractions from total flavonoids of *Vitex negundo* L. seeds[J]. J Liaoning Med Univ (辽宁医学院学报), 2014, 6:4-6.
- 17 Su Q, Liu W, Chen QQ. Advances in chemical components and pharmacological effect of *Vitex negundo* fruits[J]. Zhejiang J Tradit Chin Med (浙江中医杂志), 2010, 45:462-463.
- 18 Kong J, Pei SC, Chen J. Analgesic and anti-inflammatory effects of different fractions from *Vitex negundo* seeds[J]. Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志), 2011, 31:803-806.
- 19 Yan J, Zheng MD, Cui YH. Advances in pharmacological effect of vitexin[J]. Shandong Med J (山东医药), 2017, 57:110-112.