

紫云英苷对 LPS 诱发的大鼠小肠上皮细胞(IEC-6)的抗炎作用

聂龙, 彭磊, 张皓, 李钰芳, 田洋

(云南农业大学食品科学技术学院, 国家辣木加工技术研发专业中心, 云南省生物大数据重点实验室, 生物大数据学院, 生物大数据研究院, 云南省药食同源功能食品工程研究中心, 云南昆明 650201)

摘要: 本研究探究了紫云英苷对脂多糖(LPS)诱发的大鼠小肠上皮细胞(Rat intestinal epithelial cells, IEC-6)炎症模型抗炎作用。构建 LPS 诱发 IEC-6 细胞炎症模型, 采用 MTT 法、酶联免疫吸附试验(ELISA)、实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 法检测紫云英苷对 IEC-6 炎症细胞的存活率、相关炎症因子、基因及蛋白表达水平; 结果显示, 随着紫云英苷浓度的增加, IEC-6 细胞的存活率逐渐增加, 紫云英苷剂量(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组存活率为 90.68%和 95.76% ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$); 酶联免疫吸附试验表明, 与 LPS 组相比, 紫云英苷 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量显著抑制炎症因子, 对 IL-6 炎症因子分泌水平抑制率分别为 21.98% ($p < 0.05$) 和 29.05% ($p < 0.01$), mRNA 表达水平分别降低了 34.90% ($p < 0.05$) 和 41.60% ($p < 0.01$)。TNF- α 炎症因子分泌水平抑制率分别为 16.25% ($p < 0.05$) 和 23.37% ($p < 0.01$), mRNA 表达水平分别降低了 34.11% ($p < 0.05$) 和 43.84% ($p < 0.01$); 蛋白通路方面, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的紫云英苷可显著抑制 LPS 诱导的 IEC-6 细胞 NF- κB 通路中 P-IKK α/β 降低了 27.46% ($p < 0.05$)、P-I $\kappa\text{B}\alpha$ 降低了 41.52% ($p < 0.05$)、P-p65 降低了 37.78% ($p < 0.01$)。本探究为紫云英苷作为一种潜在缓解炎症性肠病药物的开发提供了可靠的依据。

关键词: 紫云英苷; 脂多糖; 大鼠小肠上皮细胞; 炎症因子; NF- κB 信号通路

文章编号: 1673-9078(2020)06-17-23

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1201

Anti-inflammatory Mechanism Research of Astragaloside on Rat Intestinal Epithelial Cell (IEC-6) Inflammation Model Induced by LPS

NIE Long, PENG Lei, ZHANG Hao, LI Yu-fang, TIAN Yang

(College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, National Research and Development Center for Moringa Processing Technology, Yunnan Key Laboratory for Biological Big Data, Biological Big Data College, Biological Big Data Institute, Yunnan Engineering Research Center for Drug and Food Homologous Functional Food, Kunming 650201, China)

Abstract: This study investigated the anti-inflammatory effect of Astragaloside on rat intestinal epithelial cells (IEC-6) model induced by lipopolysaccharide (LPS). A model of IEC-6 cell inflammation induced by LPS was established, and the survival rate, the related inflammatory factors, genes and protein expression levels of inflammatory IEC-6 cells were determined by MTT method, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), real-time fluorescence quantitative PCR and Western-blot, respectively. The results showed that the survival rate of IEC-6 cells increased gradually with the increase of Astragaloside concentration. The survival rates of IEC-6 cells in different dose groups (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were 90.68% and 95.76% ($p < 0.05$ and $p < 0.01$), respectively. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) showed that compared with the LPS group, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Astragaloside significantly inhibited the secretion level of inflammatory factor IL-6, with inhibition rates of 21.98% ($p < 0.05$) and 29.05% ($p < 0.01$), respectively. The mRNA expression level of IL-6 was decreased by 34.90% ($p < 0.05$)

引文格式:

聂龙, 彭磊, 张皓, 等. 紫云英苷对 LPS 诱发的大鼠小肠上皮细胞(IEC-6)的抗炎作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(6): 17-23

NIE Long, PENG Lei, ZHANG Hao, et al. Anti-inflammatory mechanism research of astragaloside on rat intestinal epithelial cell (IEC-6) inflammation model induced by LPS [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 17-23

收稿日期: 2019-12-06

基金项目: 云南省科技厅重点项目(2018Z1001, 2019ZG00905); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目(2018HB040)

作者简介: 聂龙(1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 功能食品

通讯作者: 田洋(1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品

and 41.60% ($p < 0.01$), respectively. The inhibitory rates of TNF- α secretion were 16.25% ($p < 0.05$) and 23.37% ($p < 0.01$), respectively, and the mRNA expression levels were decreased by 34.11% ($p < 0.05$) and 43.84% ($p < 0.01$), respectively. In terms of protein pathway, 100 g/mL of Astragaloside showed significant inhibition of P-IKK α/β level 27.46% ($p < 0.05$) and P-I κ B α level 41.52% ($p < 0.05$) in NF- κ B pathway induced by LPS. This study provides a reliable basis for the development of Astragaloside as a potential drug to relieve inflammatory bowel disease.

Key words: astragaloside; lipopolysaccharide (LPS); rat intestinal epithelial cells (IEC-6); inflammatory factor; NF- κ B pathway

在过去十年中, 炎症在慢性疾病发展中的作用, 大量的新证据突出了这一重要性, 神经退化, 癌症, 糖尿病, 心血管疾病和炎症肠道疾病。然而, 目前大多数的治疗方法并没有解决这个问题, 迫切需要更好的治疗^[1]。紫云英苷 (Astragaloside, AG) 又名黄芪苷、百蕊草素 II 是一种黄酮类化合物结构式如图 1, 是植物中重要的黄酮类化合物之一, 它存在与许多草药如黄芪、杜仲、百蕊草、荷叶、荨麻、报春花、桑树叶、辣木^[2-5]。研究显示, 它具有多种功能性质, 包括抗氧化, 抗炎, 抗癌, 神经保护, 和心脏保护性^[6-14]。

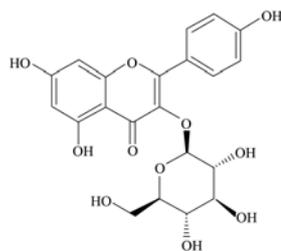


图 1 紫云英苷分子结构式

Fig.1 The chemical structure of astragaloside

大量实验研究表明, 紫云英苷通过下调 NF- κ B 信号通路来抑制炎症反应。有学者在研究中证明紫云英苷对脂多糖 (LPS) 诱导的炎症介质的抑制作用。在小鼠模型中通过下调脂多糖 (LPS) 诱导的乳腺炎中 NF- κ B 信号通路的下调来抑制炎症反应^[15]。同样也有体内研究表明, 用紫云英苷预处理可以提高致死性内毒素血症的存活率, 并减弱脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠模型中的炎症反应。紫云英苷发挥其抗炎作用的机制与通过灭活 NF- κ B 对肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-1 (IL-1) 和白细胞介素-6 (IL-6) 产生的抑制相关^[16]。甘草酸能抑制 LPS 活化的 TLR4/NF- κ B 信号通路, 进而下调 LPS 诱导的促炎基因表达, 减轻肠上皮细胞的炎症性损伤^[17]。黄芪多糖能降低细胞 TLR4、NF- κ B mRNA 表达, 且下游炎症因子含量降低, 一定程度缓解了 LPS 引起的细胞损伤, 通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路, 调节炎症反应而发挥抗炎作用^[18]。此外, 紫云英苷具有抗氧化性^[11]、清除自由基^[19]和抑制内毒素诱导的氧化应激作用^[20]。也有研究证明紫云英苷可作为生物系统中的抗氧化剂, 特别是暴露于太阳辐射的皮肤, 并保护细胞膜免受活性氧的影响^[21]。但是目前关于紫云英苷对肠道组织及细胞炎症抑制作

用的研究鲜见报道。

为进一步明确紫云英苷的抗炎作用及其机制, 以脂多糖 (LPS) 诱导的炎症反应, 探究紫云英苷对炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 白细胞介素 6 (IL-6) 的 mRNA 的表达的影响, 同时探讨紫云英苷的炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 白细胞介素 6 (IL-6) 的细胞因子表达的影响, 及检测紫云英苷对大鼠肠上皮细胞 (IEC-6) 中 NF- κ B 通路的影响。旨在体外细胞水平上探讨紫云英苷的抗炎作用及机制, 期待为紫云英苷的深度开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

1.1.1 材料与试剂

大鼠 IEC-6 细胞, 美国标准生物品收藏中心; 紫云英苷, 成都德锐可生物科技有限公司; 胎牛血清, Biological Industries; DMEM 高糖培养基, Hyclone 公司; PBS, 北京索莱宝科技有限公司; RIPA (蛋白提取试剂) 及 PMSF (胰蛋白酶消化液), 北京索莱宝科技有限公司; 胰蛋白酶消化液, 北京索莱宝科技有限公司; 噻唑蓝 MTT, Sigma 公司; 青链霉素-双抗, 南京诺唯赞生物科技有限公司; SYBR Green PCR 试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 反转录试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司; ELISA 试剂盒, 北京四正柏生物科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒, 碧云天试剂公司; NF- κ B 通路蛋白抗体, 美国 Cell signaling 公司; Western blot 所用试剂及分子标准购自美国 Bio-Rad 公司。

1.1.2 主要仪器和设备

生物安全柜, 苏州净化设备有限公司; 高压灭菌锅, 日本 TOMY 公司; 高速冷冻离心机, 日本 HITACHI 公司; 低速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; 多功能酶标仪 Molecular Devices; 倒置显微镜, 上海蔡康光学仪器有限公司; 细胞计数器, Count Star; CO₂ 培养箱, 德国宾德; 电热恒温水浴锅, 上海赫田科学仪器有限公司; 荧光定量 PCR 仪 (LightCycler480), 罗氏医学仪器公司; 电泳仪, 北京六一; 曝光机, 科锐。

表1 实验试剂配方

Table 1 Formulations of experimental reagents

| 分组 | 配方 |
|----------|--|
| 空白对照组 | 10 mL 培养基到 15 mL 离心管 |
| 模型组 | 100 μ L 1 mg/mL LPS 到 15 mL 离心管补充培养基至 10 mL |
| 紫云英苷低剂量组 | 100 μ L 1 mg/mL LPS+25 mg/mL 紫云英苷 100 μ L 到 15 mL 离心管补充培养基至 10 mL |
| 紫云英苷中剂量组 | 100 μ L 1 mg/mL LPS+50 mg/mL 紫云英苷 100 μ L 到 15 mL 离心管补充培养基至 10 mL |
| 紫云英苷高剂量组 | 100 μ L 1 mg/mL LPS+100 mg/mL 紫云英苷 100 μ L 到 15 mL 离心管补充培养基至 10 mL |

1.2 实验方法

1.2.1 试剂配方

见表 1。

1.2.2 细胞培养

细胞生长至融合密度为 80%~90%时, 弃去原细胞培养液, 用适量的已预热为 37 $^{\circ}$ C 的 PBS 冲洗细胞两次, 后加入 1 mL 胰酶消化液。放回 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱, 消化 2~3 min。镜下观察细胞开始变圆并悬浮时, 加入培养基, 用于终止消化。然后用吸管将细胞轻轻吹下, 转移至新的 15 mL 离心管中, 配平后于离心机中离心, 1500 r/min, 3 min。吸走上清后加入新鲜培养基, 用吸管轻柔吹打混匀至单细胞悬液, 通常按一传二的比例接种到培养瓶或培养皿中, 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养。

1.2.3 MTT 实验

噻唑蓝(MTT)的检测原理: 活细胞的线粒体中有琥珀酸脱氢酶, 能够使 MTT 还原为紫色结晶物, 死细胞中脱氢酶失活, 不能还原 MTT, 紫色结晶溶于二甲亚砜(DMSO), 490 nm 处有最大吸收值。取 1×10^9 细胞悬液种植于 96 孔培养板中, 每孔 0.5×10^4 个细胞, 设空白对照组, 模型组和给药组。将 96 孔培养板置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的培养箱培养。24 h 后, 空白对照组加入培养液, 模型组加入含有终质量浓度为 1 mg/L LPS 的培养液, 给药组加入含有 LPS (1 mg/L) 与紫云英苷(25、50、100 μ g/mL) 3 个浓度的培养液, 每孔 100 μ L。12 h 后, 每孔加 20 μ L (5 μ g/L) MTT, 培养 4 h 并去培养基。最后加入 150 μ L 的 DMSO 用酶标仪在 490 nm 波长处检测吸光度(A)。平行实验重复 6 次。

1.2.4 细胞造模

将实验分为空白对照组、LPS 组和 LPS+紫云英苷 (25 μ g/mL) 组、LPS+紫云英苷 (50 μ g/mL) 组、LPS+紫云英苷 (100 μ g/mL) 组, 每组设 6 个重复; 取 1×10^9 的细胞悬液接种至 12 孔板, 每孔 2×10^5 个细胞, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的培养箱培养 24 h 后, 加入处理药物, 继续培养 12 h, 对细胞 RNA 进行提取。

1.2.5 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法检测炎症因子 TNF- α 、IL-6 的含量

将实验分为空白对照组、LPS 组和 LPS+紫云英苷 (25 μ g/mL) 组、LPS+紫云英苷 (50 μ g/mL) 组、LPS+紫云英苷 (100 μ g/mL) 组, 每组设 6 个重复; 取 1×10^9 的细胞悬液接种至 12 孔板, 每孔 2×10^5 个细胞, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的培养箱培养 24 h 后, 加入处理药物, 继续培养 12 h, 收集细胞培养上清液, 按照 ELISA 检测试剂盒说明书检测 TNF- α 、IL-6 的含量, 平行实验重复 6 次。

1.2.6 RT-qPCR 实验

1.2.6.1 IEC-6 细胞总 RNA 的提取

处理好的细胞, 弃上清, PBS 洗一次; 加入 1 mL TransZolTM UP, 使其均匀的覆盖细胞表面, 室温静置 1 min; 用 1 mL 枪头将细胞刮下来, 将其移入 1.5 mL EP 管中, 上下颠倒混匀至无肉眼可见颗粒, 室温静置 5 min; 加 0.2 mL 氯仿, 上下颠倒混匀, 室温孵育 3 min; 10000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min。将 1.5 mL EP 管从离心机中轻轻取出, 此时样品处于分层状态: 上层为无色水相、中间层为白色、下层为粉红色有机相, 目的 RNA 在上层无色水相(约 500 μ L)中, 取时可以少取一些无色水相层, 但不可取到中间层; 将含有 RNA 的无色水相层转移至新的 1.5 mL EP 管中, 同时加入等体积的异丙醇, 上下颠倒混匀, 将混匀好的样品室温静置孵育 10 min; 10000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 弃上清, 管底白色胶状沉淀即为 RNA; 加入 1 mL 75%乙醇 (DEPC 水配制), 上下颠倒混匀; 7500 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min; 弃上清, 室温晾干至白色胶状沉淀变成无色胶状沉淀, 约 20 min; 加入 50 μ L~100 μ L 60 $^{\circ}$ C 孵育的 RNA 溶解液, 60 $^{\circ}$ C 孵育 10 min; 取 2 μ L RNA 稀释 30 倍, 检测 RNA 浓度。

1.2.6.2 IEC-6 细胞总 RNA 反转录

基因组 DNA 的除去反应, 取 PCR 管(RNase free) 加入以下试剂, 42 $^{\circ}$ C 孵育 2 min。立即冰上冷却, 瞬时离心。反转录反应, 在以上反应液中加入以下试剂, 使反应总体积为 100 μ L。37 $^{\circ}$ C 15 min \rightarrow 85 $^{\circ}$ C 5 s \rightarrow

4 °C, 得到的 cDNA 于-20 °C 储存备用。

表2 用RT-PCR进行基因表达分析的引物序列

Table 2 Primer sequences used for gene expression analysis by real-time PCR

| 基因 | Forward | Reverse |
|----------------|-----------------------------|---------------------------|
| β -actin | 5'-CTTCAAATCTCACAGCAGCAT-3' | 5'-CAGGTCGTCATCATCCCAC-3' |
| TNF- α | 5'-CTTCTCATTCCTGCTCGTGG-3' | 5'-TCCTCCGCTTGGTGGTTT-3' |
| IL-6 | 5'-GAGATCATTGAGCAGCCCAAG-3' | 5'-GGTGCCTTAGTGGTATCTG-3' |

1.2.6.3 IEC-6 细胞实时定量 PCR

- (1) 引物序列见表2。
- (2) PCR 循环见表 3。

表3 PCR循环

Table 3 PCR cycle

| 阶段 | 名称 | 循环 | 温度/°C | 时间/s |
|--------|------|---------|-------|------|
| Stage1 | 预变性 | Reps:1 | 95 | 30 |
| Stage2 | 循环反应 | Reps:40 | 95 | 10 |
| | | | 60 | 30 |
| | | | 95 | 15 |
| Stage3 | 溶解曲线 | Reps:1 | 60 | 60 |
| | | | 95 | 15 |

注: PCR循环后得出数据, 基因表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.2.7 Westernblot 方法

将细胞放在(以高效 RIPA 裂解液: PMSF=100:1 配制而成的裂解液中)蛋白裂解液中, 使用匀浆机进行匀浆, 并通过冷冻离心机以 12000 r/min 在 4 °C 下离心 10 min。收集上清液并转移到新的 EP 管中。使用 BCA 蛋白质测定试剂定量蛋白质浓度。通过 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离裂解物并转移至 PVDF 膜。用浓度为 5% 的 BSA 溶液封闭 1 h 后, 与初级抗体结合, 将膜在 4 °C 过夜孵育。用 TBST 洗涤三次后(每次 10 min), 将膜与第二抗体在 4 °C 冰箱孵育 1 h。用 PBST 再次洗涤 3 次后(每次 10 min), 用 Pri-light HRP 化学发光检测试剂将蛋白质-抗体复合物显色, 并用曝光仪记录, 并用 Image J 进行条带灰度分析, 即可得到目的蛋白与对应内参蛋白之间的灰度值之比, 并进行组间比较。

1.2.8 统计学分析

所有数据均独立平行测定 3 次, 数据结果以平均值±标准差(mean±SEM)的形式表示, 采用 GraphPad Prism 5.01 软件进行分析, 组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 紫云英苷对 IEC-6 炎症细胞存活率的影响

为明确 IEC-6 细胞的存活率与紫云英苷之间是否存在剂量依赖性, 我们用不同浓度紫云英苷(25、50、100 μ g/mL)处理 IEC-6 细胞, 48 h 后, 采用 MTT 法检测细胞存活率。如图 2 所示, 与对照(0 μ g/mL)相比, 紫云英苷能显著提高 IEC-6 细胞存活率, 细胞存活率与药物剂量呈依赖性, 存活率分别为空白对照组 100.00%、LPS 对照组 77.04%、紫云英苷低剂量组 84.39%、紫云英苷中剂量组 90.68% ($p < 0.05$) 和紫云英苷高剂量组 95.76% ($p < 0.01$), 相比 LPS 对照组, 紫云英苷各剂量组存活率分别提高了 1.10 倍、1.18 倍和 1.24 倍。实验结果表明, 在 50, 100 μ g/mL 剂量下, 紫云英苷可以显著提高 LPS 诱发的 IEC-6 细胞炎症模型的细胞存活率。在一定程度上说明紫云英苷具有一定的抗炎作用。

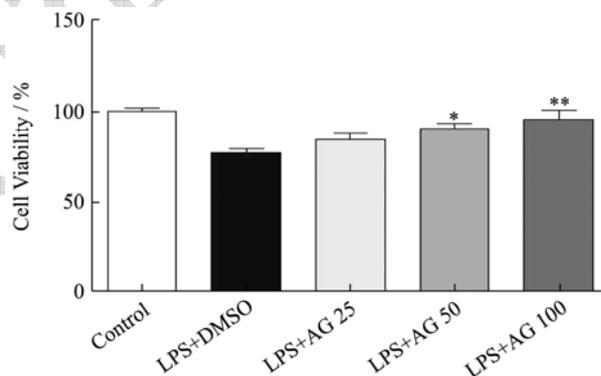


图 2 炎症细胞活性检测结果

Fig.2 Inflammatory cell activity detection results

注: 与(LPS+DMSO)组相比, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。(Control): Normal; (LPS+DMSO): 1 mg/L LPS+DMSO; (LPS+AG 50): 1 mg/L LPS+25 μ g/mL Astragalin; (LPS+AG 50): 1 mg/L LPS+50 μ g/mL Astragalin; (LPS+AG 100): 1 mg/L LPS+100 μ g/mL Astragalin。

2.2 紫云英苷对 IEC-6 细胞炎症因子分泌的影响

进一步从细胞炎症因子探究, 结果如图 3 表所示, 与正常组相比, LPS 刺激的 IEC-6 细胞的 IL-6 和 TNF- α 炎症因子的分泌水平显著升高, 分别升高了 33.16 ($p < 0.01$) 倍和 14.37 倍 ($p < 0.01$); 在 50, 100 μ g/mL 剂量下, 紫云英苷可显著抑制 LPS 诱导 IL-6 和 TNF- α 炎症因子的分泌。其中, 相较于 LPS 组, 紫云英苷各

剂量组的 IL-6 分泌水平分别降低了 4.86%、21.98% ($p<0.05$) 和 29.05% ($p<0.01$); TNF- α 分泌水平分别降低了 9.44%、16.25% ($p<0.05$) 和 23.37% ($p<0.01$)。在 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 剂量下, 紫云英苷可显著抑制 LPS 诱导 IL-6 和 TNF- α 炎症因子分泌。实验结果说明, 细胞炎症因子分泌情况来看, 紫云英苷具有明确的抗炎反应作用。

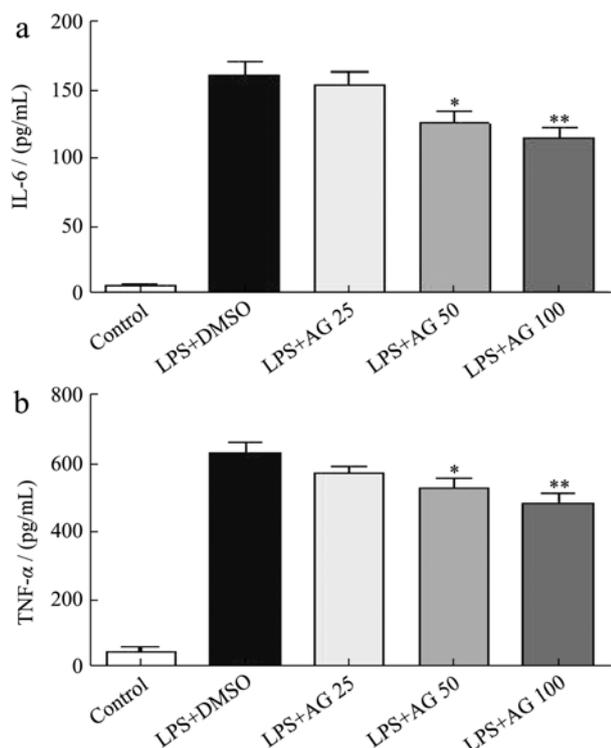


图3 IEC-6 细胞炎症因子 ELISA 检测结果

Fig.3 The results of ELISA detection of inflammatory factors in IEC-6 cells

注: 与(LPS+DMSO)组相比, * $p<0.05$; ** $p<0.01$ 。(Control): Normal; (LPS+DMSO): 1 mg/L LPS+DMSO; (LPS+AG 50): 1 mg/L LPS+25 $\mu\text{g/mL}$ Astragalins; (LPS+AG 50): 1 mg/L LPS+50 $\mu\text{g/mL}$ Astragalins; (LPS+AG 100): 1 mg/L LPS+100 $\mu\text{g/mL}$ Astragalins.

2.3 紫云英苷对 IEC-6 细胞炎症因子 mRNA 影响的检测结果

为进一步探究紫云英苷的抗炎作用, 因此, 采用 Real-time PCR 的方法分别检测经典的促炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平。结果如图 4 所示, 与正常组相比, LPS 刺激的 IEC-6 细胞的 IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平显著升高, 分别升高了 18.39 倍和 13.49 倍 ($p<0.01$); 其中, 相较于 LPS 组, 紫云英苷各剂量组的 IL-6 的 mRNA 表达水平分别降低了 11.32%、34.90% ($p<0.05$) 和 41.60% ($p<0.01$); TNF- α

的 mRNA 表达水平分别降低了 21.04%、34.11% ($p<0.05$) 和 43.84% ($p<0.01$)。在 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 剂量下, 紫云英苷可显著抑制 LPS 诱导 IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达。实验结果说明, 紫云英苷可以剂量依赖性的抑制 LPS 诱导 IEC-6 细胞株细胞中炎症因子 IL-6、TNF- α 的 mRNA 表达。从 mRNA 表达水平来看紫云英苷具有明确的抗炎反应作用。

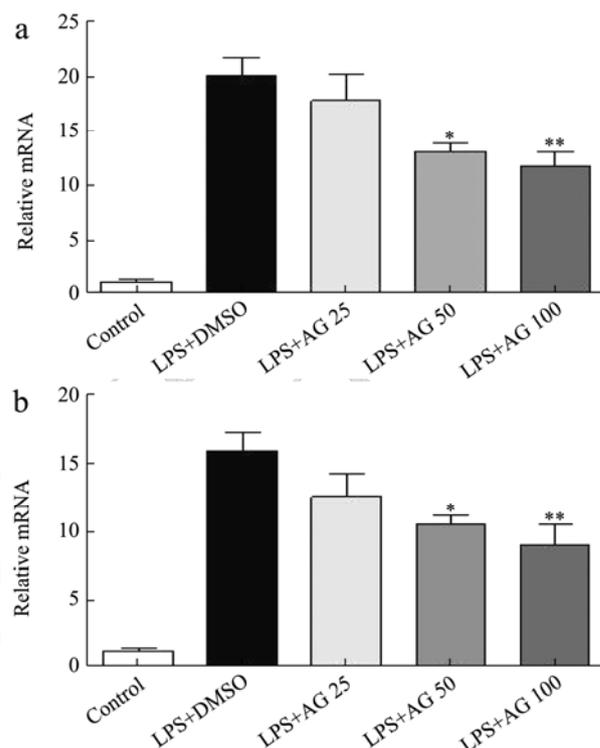


图4 IEC-6 细胞株炎症因子 mRNA 影响的检测结果

Fig.4 The results of detection of the effect of inflammatory factor mRNA on IEC-6 cell line

注: 与(LPS+DMSO)组相比, * $p<0.05$; ** $p<0.01$ 。(Control): Normal; (LPS+DMSO): 1 mg/L LPS+DMSO; (LPS+AG 50): 1 mg/L LPS+25 $\mu\text{g/mL}$ Astragalins; (LPS+AG 50): 1 mg/L LPS+50 $\mu\text{g/mL}$ Astragalins; (LPS+AG 100): 1 mg/L LPS+100 $\mu\text{g/mL}$ Astragalins.

2.4 紫云英苷对 IEC-6 细胞株 NF- κ B 通路蛋白影响的检测结果

NF- κ B 作为重要的转录因子, 调控炎症因子的表达, p65 蛋白作为重要的转录因子与 p50 形成异二聚体结合至炎症因子启动子处调控基因表达, NF- κ B 通路被激活, 进而诱导 p65/p50 异二聚体进入细胞核中, 诱导炎症基因转录。免疫印迹结果显示, 脂多糖处理 IEC-6 细胞株可以诱导 NF- κ B 通路中 IKK α 和 IKK β 蛋白磷酸化, 并且磷酸化下游 I κ B α 和 p65 蛋白。结果如下图表所示, 紫云英苷剂量依赖性地抑制 NF- κ B 通路

中 IKK α 和 IKK β 蛋白磷酸化, 其中, 紫云英苷各剂量组的 P-IKK α/β 表达水平分别降低了 8.09%、11.79% 和 27.46% ($p < 0.05$); 紫云英苷各剂量组的 P-I κ B α 表达水平分别降低了 8.62%、12.42% 和 41.52% ($p < 0.05$); 紫云英苷各剂量组的 P-p65 表达水平分别降低了 7.77%、11.82% 和 37.78% ($p < 0.01$)。实验结果说明, 紫云英苷可以通过抑制 NF- κ B 通路活化抑制 LPS 诱导 IEC-6 细胞炎症因子产生。

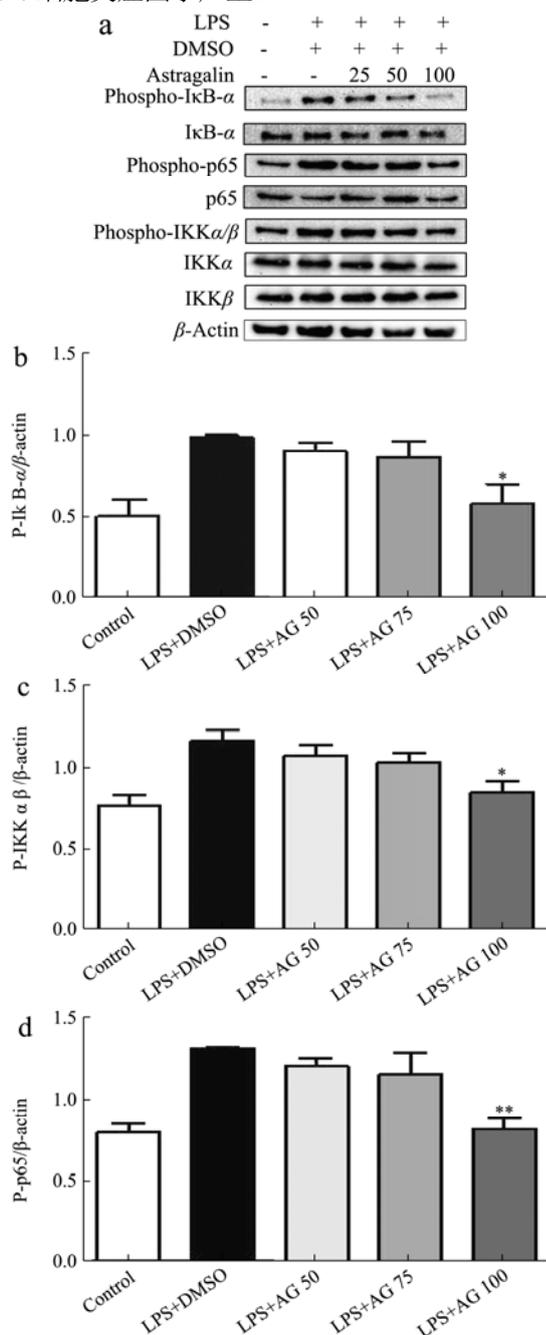


图5 紫云英苷对 IEC-6 大鼠小肠隐窝上皮细胞 NF- κ B 通路蛋白的影响检测结果

Fig.5 Effect of astragaloside on NF- κ B pathway protein in IEC-6 cells

注: 与 (LPS+DMSO) 组相比, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。(Control):

Normal; (LPS+DMSO): 1 mg/L LPS+DMSO; (LPS+AG 50): 1 mg/L LPS+ 25 μ g/mL Astragaloside; (LPS+AG 75): 1 mg/L LPS+50 μ g/mL Astragaloside; (LPS+AG 100): 1 mg/L LPS+100 μ g/mL Astragaloside.

3 结论

本实验通过研究体外抗炎细胞实验探讨了紫云英苷的抗炎作用。在体外细胞实验中, 噻唑蓝 (MTT) 法检测对造模后的 IEC-6 细胞增殖活力的作用结果可知, 紫云英苷对炎症细胞有一定的恢复作用, 并呈现一定程度剂量依赖效应。同时, 紫云英苷可以抑制脂多糖 (LPS) 诱导的 IEC-6 细胞表达炎症因子如 IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达以及炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的产生, 提示紫云英苷可以抑制脂多糖 (LPS) 诱导的炎症产生, 其作用机制可能与阻断 NF- κ B 有关。Western blot 法检测出紫云英苷能有效抑制相关通路蛋白 P65、I κ B α 、IKK α 和 IKK β 的磷酸化水平。本研究通过选用 IEC-6 大鼠小肠上皮细胞作为细胞实验对象, 实验结果紫云英苷对 IEC-6 细胞炎症有显著的治疗作用, 表明紫云英苷可以作为一种潜在的抗炎症性肠病药物, 具有一定的开发价值。

参考文献

- [1] Yeung Y T, Aziz F, Guerrero-Castilla A, et al. Signaling pathways in inflammation and anti-inflammatory therapies [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24
- [2] Aishan H, Baba M, Iwasaki N, et al. The constituents of urtica cannabina used in uighur medicine [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2010, 48(5): 577-583
- [3] Baczek K, Przybył J L, Mirgos M, et al. Phenolics in *Primula veris* L. and *P. elatior* (L.) hill raw materials [J]. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 2017(1): 1-7
- [4] Fu G M, Tong H Y, Zeng H L, et al. Antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of *Eucommia ulmoides* olive leaf extracts [J]. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 31(4): 1333-1339
- [5] Krasteva I, Platikanov S, Nikolov S, et al. Flavonoids from *Astragalus hamosus* [J]. *Natural Product Research*, 2007, 21(5): 392-395
- [6] Abdullah M Z, Ali J M, Abolmaesoomi M, et al. Anti-proliferative, *in vitro* antioxidant, and cellular antioxidant activities of the leaf extracts from polygonum minus huds: Effects of solvent polarity [J]. *International Journal of Food Properties*, 2017, 20: S846-S862
- [7] Ahn E M, Han J T, Kwon B M, et al. Anti-cancer activity of

- flavonoids from *Aceriphyllum rossii* [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2008, 51(4): 309-315
- [8] Baek Y S, Song N Y, Nam T G, et al. Flavonoids from *Fragaria ananassa* calyx and their antioxidant capacities [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2015, 58(6): 787-793
- [9] Bernaert N, Wouters D, De Vuyst L, et al. Antioxidant changes of leek (*Allium ampeloprasum* var. Porrum) during spontaneous fermentation of the white shaft and green leaves [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(9): 2146-2153
- [10] Bitis L, Kultur S, Melikoglu G, et al. Flavonoids and antioxidant activity of *Rosa agrestis* leaves [J]. Natural Product Research, 2010, 24(6): 580-589
- [11] Choi J, Kang H J, Kim S Z, et al. Antioxidant effect of astragalins isolated from the leaves of *Morus alba* L. Against free radical-induced oxidative hemolysis of human red blood cells [J]. Archives of Pharmacal Research, 2013, 36(7): 912-917
- [12] Chung M J, Lee S, Park Y I, et al. Neuroprotective effects of phytosterols and flavonoids from *Cirsium setidens* and *Aster scaber* in human brain neuroblastoma SK-N-SH cells [J]. Life Sciences, 2016, 148: 173-182
- [13] Kim M S and Kim S H. Inhibitory effect of astragalins on expression of lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators through NF- κ B in macrophages [J]. Archives of Pharmacal Research, 2011, 34(12): 2101-2107
- [14] Qu D X, Han J C, Ren H H, et al. Cardioprotective effects of astragalins against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016: 8194690
- [15] Li F Y, Liang D J, Yang Z T, et al. Astragalins suppresses inflammatory responses via down-regulation of NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in a murine model [J]. International Immunopharmacology, 2013, 17(2): 478-482
- [16] Soromou L W, Chen N, Jiang L N, et al. Astragalins attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by down-regulating NF- κ B signaling pathway [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 419(2): 256-261
- [17] 罗敏,肖婷婷,曾星,等.甘草酸对 LPS 诱导的 IEC-6 细胞 NF- κ B 通路及炎症因子表达的影响[J].中国免疫学杂志, 2019,35(10):1160-1163,1168
- LUO Min, XIAO Ting-ting, ZENG Xing, et al. Effects of Glycyrrhizic acid on LPS-induced activation of IEC-6 cells NF- κ B pathway and expression of inflammatory factors [J]. Chinese Journal of Immunology, 2019, 35(10): 1160-1163, 1168
- [18] 吴佳,尧雪洲.在慢阻肺炎症反应中黄芪多糖的抗炎作用及抑制 TLR4/NF- κ B 通路的机制[J].西安交通大学学报(医学版),2018,39(5):760-764
- WU Jia, YAO Xue-zhou. Anti-inflammatory effect of *Astragalus* polysaccharides and the mechanism of inhibiting TLR4/NF- κ B pathway in COPD inflammatory response [J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences), 2018, 39(5): 760-764
- [19] Vongsak B, Mangmool S and Gritsanapan W. Antioxidant activity and induction of mRNA expressions of antioxidant enzymes in HEK-293 cells of *Moringa oleifera* leaf extract [J]. Planta Medica, 2015, 81(12-13): 1084-1089
- [20] J H G, M K K, E J L, et al. Astragalins inhibits airway eotaxin-1 induction and epithelial apoptosis through modulating oxidative stress-responsive MAPK signaling [J]. BMC Pulmonary Medicine, 2014, 14(1): 122
- [21] Park S N, Kim S Y, Lim G N, et al. In vitro skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from *Suaeda asparagoides* extracts [J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2012, 18(2): 680-683