

柴胡皂苷d对LPS诱导的RAW264.7细胞炎症的抗炎作用机制

王妍婷^{1,2}, 牛志强^{1,2}, 刘亚男^{1,2}, 李甫³, 胡卫成^{1,2*}, 张迹^{1,4*}

(1. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830052) (2. 扬州大学医学院, 江苏扬州 225109)

(3. 中国科学院成都生物研究所天然产物研究中心, 四川成都 610041)

(4. 淮阴师范学院生命科学学院, 江苏淮安 223300)

摘要: 该文以细菌脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 刺激的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 为模型, 对柴胡皂苷 d (Saikosaponin d, SSd) 的体外抗炎作用机制进行深入研究。结果显示, SSd 在 8 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下能够显著抑制 RAW264.7 炎症细胞一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 的释放 ($P<0.01$), 并以剂量依赖性 (4 $\mu\text{mol/L}$ 、8 $\mu\text{mol/L}$) 抑制细胞一氧化氮合酶 (Inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)、环氧合酶 2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 及白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) 等炎症相关基因 mRNA 的表达 ($P<0.01$)。蛋白印迹结果表明, SSd 有效抑制了 iNOS 和 COX-2 蛋白的表达。扫描电镜观察分析发现 SSd 可以显著改善 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞形态改变。此外, SSd 能够抑制 Toll 样受体 4 (Toll-Like Receptor 4, TLR4)、I κ B 激酶 (I κ B Kinase- α , I κ B α)、核因子 κ B (Nuclear Factor Kappa-B, NF- κ B)、丝氨酸/苏氨酸激酶 (Serine/Threonine Kinase Proteins, GSK3 β) 等炎症相关信号通路关键蛋白的表达或磷酸化水平。结果表明, SSd 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症有较好的抑制作用, 其作用机制与 TLR4/NF- κ B 以及 GSK3 β 等炎症相关信号通路相关, 可为全面理解 SSd 的抗炎作用提供数据支撑。

关键词: 柴胡皂苷 d; RAW264.7 细胞; 抗炎作用; TLR4; GSK3 β ; NF- κ B

文章编号: 1673-9078(2025)03-80-88

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.0242

Anti-inflammatory Effect of Saikosaponin d on LPS-induced RAW264.7 Cell Inflammation

WANG Yanting^{1,2}, NIU Zhiqiang^{1,2}, LIU Ya'nan^{1,2}, LI Fu³, HU Weicheng^{1,2*}, ZHANG Ji^{1,4*}

(1. College of Food Science and Pharmacology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

(2. College of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225109, China) (3. Natural Products Research Center, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

(4. School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huaian 223300, China)

引文格式:

王妍婷,牛志强,刘亚男,等.柴胡皂苷d对LPS诱导的RAW264.7细胞炎症的抗炎作用机制[J].现代食品科技,2025, 41(3):80-88.

WANG Yanting, NIU Zhiqiang, LIU Ya'nan, et al. Anti-Inflammatory effect of saikosaponin d on LPS-induced RAW264.7 cell inflammation [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 80-88.

收稿日期: 2024-02-29

基金项目: 江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究重大项目(23KJA550001)

作者简介: 王妍婷 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养, E-mail: wytwt234@163.com

通讯作者: 胡卫成 (1984-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物化学及药理学, E-mail: hu_weicheng@163.com; 共同通讯作者: 张迹

(1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养学, E-mail: zhangji@hytc.edu.cn

Abstract: A mouse model of lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cell inflammation was developed to investigate the *in vitro* anti-inflammatory mechanism of saikosaponin d (SSd). SSd demonstrated a significant inhibition of nitric oxide release from RAW264.7 cells at a concentration of 8 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.01$) and suppressed mRNA level expression of inflammation-related genes, including inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase 2 (COX-2), interleukin-6, and tumor necrosis factor- α , in a dose-dependent manner at concentrations of 4 and 8 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.01$). Western blot analysis revealed that SSd effectively reduced the protein level expression of iNOS and COX-2. SEM images confirmed that SSd alleviated LPS-induced morphological changes in RAW264.7 cells. Additionally, SSd inhibited the expression and phosphorylation levels of key proteins involved in inflammation-related signaling pathways, including toll-like receptor 4 (TLR4), I κ B kinase, nuclear factor κ B (NF- κ B), and glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β). These findings indicate that SSd strongly inhibits LPS-induced RAW264.7 cell inflammation by targeting the TLR4/NF- κ B and GSK3 β signaling pathways. These findings contribute to our enhanced understanding of the anti-inflammatory effects of SSd.

Key words: saikosaponin d; RAW264.7 cells; anti-inflammatory effect; toll-like receptor 4; glycogen synthase kinase-3 β ; nuclear factor κ B

炎症是由缺血性损伤、感染、组织创伤等有害刺激引发的适应性反应，可控的急性炎症反应对机体是有益的（如抗感染的保护作用）^[1]。炎症持续存在或参与炎症反应的介质紊乱会导致慢性炎症的发生，引发类风湿性关节炎^[2]、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病^[3]，还会导致细胞突变和增殖，创造有利于癌症发生发展的环境^[4]。炎症反应过程中的宿主防御、组织修复等多种生理作用会导致炎症组织损伤，破坏机体稳态，进而产生一定的病理后果^[5]。因此，机体需要对炎症反应进行适当的调节。促进炎症消退（抗炎）的手段包括消除外界刺激，抑制促炎信号通路的信号传导以及促进炎症介质分解等^[6]。

柴胡（*Radix Bupleuri*, RB）是伞形科植物柴胡或狭叶柴胡的干燥根。作为中国传统草药之一，其最早记载于《神农本草经》中，距今已有两千多年的药用历史^[7]。柴胡早期常用于治疗感冒、发热、流行性感冒、肝炎等疾病，这与其含有丰富的柴胡皂苷（Saikosaponins, SS）、挥发油、黄酮类、多糖、脂肪酸和甾醇等有关^[8]。SS 属三萜皂苷，均为齐墩果烷型，因双键位置及取代基团等化学结构不同而分为多种不同的类型，近年来的研究表明，SS 是柴胡发挥药效作用的重要成分^[9-11]。SSd 为柴胡主要生物活性成分之一，其分子结构见图 1。研究表明 SSd 对各种炎症疾病，如结肠炎^[12]、肝炎^[13]、神经炎^[14]、胰腺炎^[15]具有积极的治疗效果。前人研究报告 SSd 在动物体内通过经典炎症信号通路 NF- κ B 发挥显著的抗炎作用，包括下调磷酸化 NF- κ B 水平，抑制 IL-1 β ，TNF- α 等促炎细胞因子释放，治疗小

鼠变应性鼻炎^[16]；SSd 还可抑制高迁移率族蛋白 B1（High Mobility Group Box-1 Protein, HMGB1）减少与 TLR4 受体结合，阻碍 NF- κ B 二聚体入核，从而减少炎症因子释放，缓解大鼠神经炎的发生^[17]。查阅相关文献得知 SSd 体外抗炎作用机制鲜有报道，为明确 SSd 在体外通过 NF- κ B 信号通路的机制研究，本文设计了 LPS 诱导的 RAW264.7 炎症细胞模型，围绕细胞炎症相关因子的表达调控及其对炎症相关通路蛋白的调节等抗炎作用机制进行深入研究，为全面理解 SSd 的抗炎作用提供数据和理论支撑。

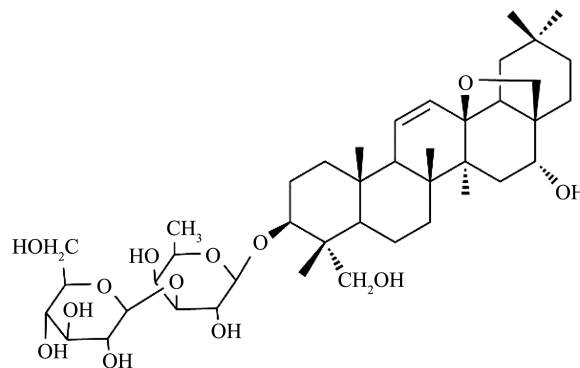


图 1 SSd 的结构

Fig.1 The structure of SSd

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

柴胡，购买于中华人民共和国四川省荷塘中草药市场。制备柱（50 mm×250 mm，直径 10 μm ），日本京都 YMC 株式会社。柱层析用硅胶（100-200 目）、

薄层用硅胶 GF254 (10~40 μm), 青岛海洋化工集团有限公司。小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7) 来源于美国典型培养物保藏中心 (ATCC); RPMI 1640 培养基、青-链霉素, Invitrogen Gibco; 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、二甲亚砜 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、台盼蓝、Trizol Reagent, Sigma; 细胞全蛋白及核蛋白提取试剂盒、ECL 化学发光检测试剂盒, 康为世纪; BCA 蛋白定量试剂盒, 碧云天; $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 、 $\text{p-I}\kappa\text{B}\alpha$ 、 $\text{GSK-3}\beta$ 、 $\text{p-GSK-3}\beta$ 、TLR4、NF- κB 等抗体, CST; 甲醇、二氯甲烷、正丁醇、乙醇、异丙醇、氯化钠、十二烷基硫酸钠、三氯甲烷、三羟甲基氨基甲烷等化学试剂, 国药集团。

1.2 仪器与设备

LC-20AD 高效液相色谱仪, SHIMADZU 公司; HERACELL I50i 细胞二氧化碳培养箱, Thermo Fisher 公司; 5414R 低温高速离心机, Eppendorf 公司; T100 Thermal Cycle PCR 仪, TIANGEN 公司; 5200 化学发光成像系统, Tanon 公司; BHH-2 数显恒温水浴锅, BKMAN 公司; TS-1 摇床, QILINBEIER 公司; OSE-DB-02 金属浴, TIANGEN 公司; Power Pac TMHC 电泳仪, BIO-RAD 公司; PT-3502B 酶标分析仪, POTENOV 公司; VCX130 超声细胞粉碎仪, SONICS 公司; q225 实时荧光定量 PCR 仪, Kubo 公司; Scanning Electron Microscopy, SEM, Quanta FEG450 扫描电子显微镜, Quanta FEG 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 SSd 的提取分离

柴胡 (60.0 kg) 粉碎后, 于 150 L 甲醇 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下提取 3 次, 合并提取液减压浓缩至干, 将提取物悬浮于纯水中, 依次以二氯甲烷和正丁醇萃取 4 次。正丁醇萃取物约 2.1 kg 进行硅胶柱层析, 以二氯甲烷: 甲醇=12:1 的水饱和溶剂作为初始溶剂进行梯度洗脱, 以出样量的增减作为是否在洗脱剂中添加甲醇的标准, 每 5 000 mL 洗脱液蒸馏 1 次。利用 TLC 对各馏分进行合并, 得 10 个组分, 分别为组分 1 (114 g)、2 (100 g)、3 (460 g)、4 (170 g)、5 (145 g)、6 (110 g)、7 (132 g)、8 (90 g)、9 (50 g) 和 10 (60 g)。取 20 g 组分 4 以体积分数为 80% 甲醇溶液进行反相 C18 色谱柱制备, 得 SSd 2.13 g。经高效液相色谱仪在流动相: 乙腈/水=50/50, 30 min; 流速 0.8 mL/min; 色谱柱: SinoChrom ODS-BP 5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm; 检测波长: 203 nm

条件下分析所得 SSd 纯度 > 99%, 见图 2。

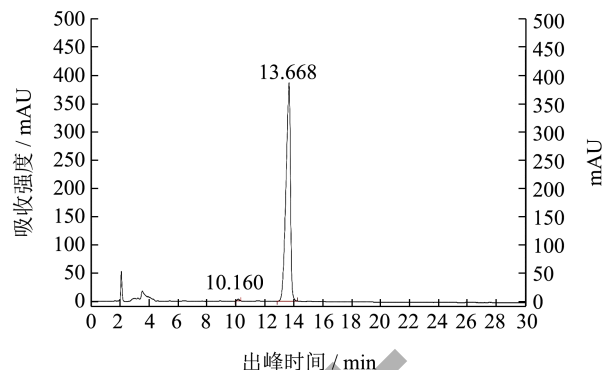


图 2 HPLC 分析 SSd 纯度

Fig.2 HPLC analysis of the purity of SSd

1.3.2 细胞培养及传代

取 RAW264.7 细胞, 加入含体积分数 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基, 置于体积分数为 5% CO_2 细胞培养箱中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。当细胞贴壁生长至大致铺满培养瓶时, 以 1:3~1:5 进行传代培养, 选取第 3~8 代处于对数生长期的细胞进行后续实验。

1.3.3 细胞存活率测定

以每孔 1×10^5 个细胞接种 RAW264.7 细胞入 96 孔细胞培养板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温过夜培养。次日, 分别用不同浓度的 SSd (0、0.5、1、2、4、6、8、10 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 24 h, 吸去培养基, 加入 100 μL 质量浓度为 0.5 mg/mL 的噻唑蓝 (Methyl Thiazolyl Tetrazolium, MTT) 工作液, 置于细胞培养箱内继续孵育 4 h 后, 再加入 100 μL 终止液, 孵育过夜。用酶标仪于 562 nm 处测定各样 OD 值, 对空白组归一化后按如下公式计算细胞存活率。

$$CV = \frac{a}{b} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

CV—细胞存活率, %;

a—样品在 562 nm 处吸光度;

b—对照组 562 nm 处吸光度平均值。

1.3.4 一氧化氮 (NO) 释放量测定

将 RAW264.7 细胞以每孔 1×10^5 个细胞接种于 96 孔板, 设空白组、模型组和药物组, 每组 3 个重复, 过夜培养。药物组细胞分别用浓度为 0.5、1、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$ 的 SSd 预处理 30 min 后, 加入终质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 处理 24 h。采用格里斯试剂比色法^[18]测定细胞培养上清的 NO 含量。

表 1 PCR引物序列
Table 1 PCR primer sequence

基因名称	正向引物	反向引物
iNOS	CATTGATCTCCGTGACAGCC	CATGCTACTGGAGGTGGGTG
COX-2	GGGAGTCTGGAACATTGTGAA	GCACATTGTAAGTAGGTGGACTGT
TNF- α	TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	GAGGCCATTTGGGAACCTCT
IL-1 β	CAGGATGAGGACATGAGCACC	CTCTGCAGACTAAACTCCAC
GAPDH	CACTCACGGCAAATTCAACGGCACA	GACTCCACGACATACTCAGCAC

1.3.5 细胞形态观察

将 RAW264.7 细胞以每孔 1.5×10^6 个细胞接种于底部预先放置有无菌细胞爬片的 6 孔板中，过夜培养。实验设置空白组、模型组和药物处理组，待细胞贴壁后，药物处理组用浓度为 $8\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 SSd 预处理 30 min，再加入 LPS 处理 24 h。弃培养液，用预冷的 PBS 漂洗 3 遍后，加入体积分数 2.5% 戊二醛固定液，于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 1 h。用磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffer Solution, PBS）漂洗固定好的细胞样品，再依次用体积分数 25%、50%、75%、100% 的乙醇溶液进行梯度脱水，每次脱水时间 3~5 min，脱水样品置于干燥器中待测。将各组细胞样品固定到样品台上，使用离子溅射仪进行喷金处理，随后进行扫描电镜观察分析。

1.3.6 炎症相关基因 mRNA 表达水平分析

将 RAW264.7 细胞以每孔 1.5×10^6 个细胞接种于 6 孔板，过夜培养。SSd（终浓度为 $4\text{ }\mu\text{mol/L}$ 和 $8\text{ }\mu\text{mol/L}$ ）预处理细胞 30 min，加入 LPS 处理 6 h 后，收集细胞提取细胞总 RNA。按试剂盒说明书步骤将 RNA 反转录，合成第一链 cDNA，并选用甘油醛-3-磷酸脱氢酶（Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, GAPDH）为内参基因，采用实时荧光定量 PCR 方法定量分析各组细胞中炎症相关基因 iNOS、COX-2、TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 相对表达量。本研究所用 PCR 引物均由上海生工合成，相关序列如表 1 所列。

1.3.7 蛋白印迹

SSd（4、 $8\text{ }\mu\text{mol/L}$ ）预处理 30 min，LPS 分别刺激 0.5、1、3 或 6 h 后收集细胞，用冰冷的 PBS 漂洗后，根据细胞全蛋白、细胞核蛋白提取试剂盒说明书操作步骤，分别提取细胞的全蛋白和核蛋白。取 96 孔板，每孔加入 $1\text{ }\mu\text{L}$ 样本上清 + $19\text{ }\mu\text{L}$ 超纯水（设置空白对照 $20\text{ }\mu\text{L}$ 超纯水），加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ BCA 工作液（试剂 A: 试剂 B=50:1）， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水

浴锅孵育 30 min，酶标仪波长 562 nm 处测量吸光度，根据标准曲线计算各个样本的蛋白浓度，采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（体积分数为 8%~12%）分离。随后将蛋白从凝胶转移至聚偏二氟乙烯膜上（100 V 冰浴），用体积分数为 5% 的牛血清白蛋白封闭 2 h，TTBS 洗涤缓冲液清洗 3 次后，装入抗体孵育袋，加入对应一抗， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 TTBS 洗涤缓冲液再洗膜 3 次，加入二抗，继续孵育 2 h 后，加入发光液进行曝光显色并拍照，使用 Image J 对蛋白条带进行灰度分析。

1.4 数据处理及统计分析

所有数据均采用 IBM SPSS Statistics 26 进行 *t* 检验、单因素方差分析， $P<0.05$ 表示存在显著性差异（*）， $P<0.01$ 表示差异极显著（**）。采用 Origin 2021 进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 SSd 对 RAW264.7 细胞活力影响

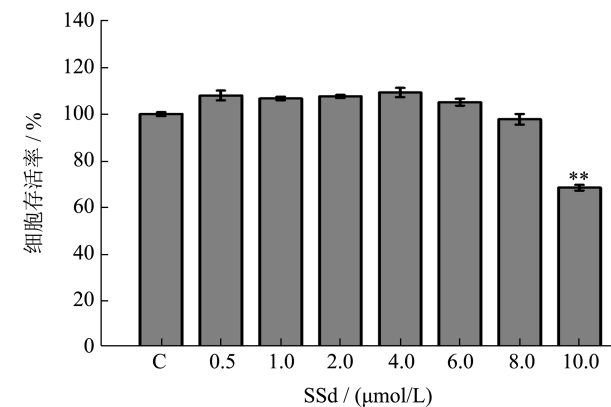


图 3 SSd 对 RAW264.7 细胞活力影响

Fig.3 Effect of SSd on the cell viability of RAW264.7 macrophages ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

注: ** 代表与空白对照组比较呈极显著差异 ($P<0.01$)。

柴胡皂苷相较其他植物提取物具有一定的溶血性与毒性^[19]，因此需筛选 SSd 的安全给药浓度。本

文首先研究了不同浓度 SSd (0、0.5、1、2、4、6、8、10 $\mu\text{mol/L}$) 对 RAW264.7 细胞活力的影响。结果如图 3 所示, 0~8 $\mu\text{mol/L}$ SSd 对 RAW264.7 细胞无毒性作用, 并且在较低浓度药物处理下, 细胞活性还呈现了一定的上升趋势。但在 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活性显著下降 ($P < 0.01$), 约降至对照组的 70%, 显示 SSd 在该浓度下对 RAW264.7 细胞具有一定的毒性。结果表明, SSd 在 8 $\mu\text{mol/L}$ 以内为安全的给药浓度范围, 不会对 RAW264.7 细胞的活力造成影响。因此, 本文选择最高安全给药浓度为 8 $\mu\text{mol/L}$ 进行后续实验。

2.2 SSd对LPS刺激RAW264.7细胞NO释放的影响

炎症的发生会造成细胞内各类炎症效应物与促炎细胞因子的活化。iNOS 以 L-精氨酸为底物, 利用氧生成 NO, 参与多种炎症性疾病的发生于发展^[20], 且在细胞炎症状态下, NO 的增加会进一步刺激炎症的发生。本研究采用格里斯试剂比色法测定了 SSd 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响。如图 4 所示, 与 LPS 组 (SSd 浓度为 0) 相比, 所有药物处理组均可显著下调 NO 释放量 ($P < 0.01$), 尤其在 6 $\mu\text{mol/L}$ 和 8 $\mu\text{mol/L}$ 时, NO 释放量平均为 22.67% 与 9.59%。有研究表明, 人参皂苷 F2 在与本实验相同模型条件下, 最佳给药浓度 NO 释放量为 71.11%^[21], 因此本实验中 SSd 在安全给药浓度范围内 (0.5~8 $\mu\text{mol/L}$) 可以有效抑制炎症细胞的 NO 释放量, 发挥抗炎作用。

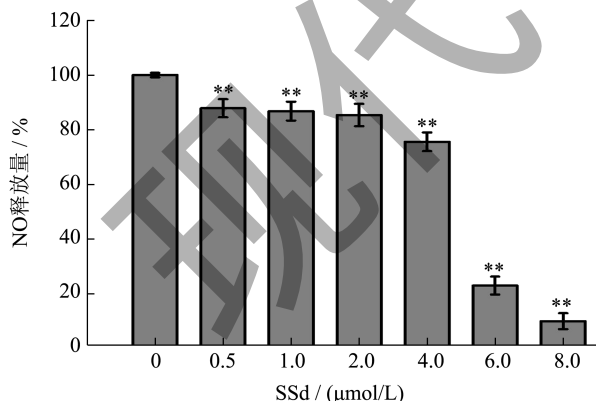


图 4 SSd 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞产生 NO 的作用
Fig.4 Effect of SSd on NO production of RAW264.7 cells stimulated by LPS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: ** 代表与 LPS 处理组比较呈极显著差异 ($P < 0.01$)。

2.3 SSd对炎症相关基因mRNA表达的影响

环氧合酶 (Cyclooxygenase, COX) 和一氧化氮合酶 (Inducible Nitric Oxide Synthase, NOS) 是两个

同工酶家族, 是人体防御炎症刺激 (如病毒、细菌感染和损伤反应) 的一部分, 这两种途径密切相关。机体受到刺激后释放 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等促炎细胞因子, 随后激活不同的转录因子, 使 COX-2 基因表达增加, 进而导致炎症因子的持续释放, 从而加重炎症疾病^[22]。有研究表明, 三百棒可抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的促炎细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6) 的 mRNA 表达减轻巨噬细胞炎症反应^[23]。本实验通过 RT-qPCR 技术, 分析了 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中的炎症效应物相关基因 iNOS 和 COX-2, 以及促炎细胞因子 TNF- α 与 IL-6 的 mRNA 相对表达水平。如图 5 所示, 与对照组相比, 模型组中的 iNOS、COX-2、TNF- α 与 IL-6 mRNA 的相对表达量均有显著升高 ($P < 0.01$), 表明 LPS 刺激会促进 RAW264.7 细胞炎症因子的释放, 而不同浓度的 SSd (4、8 $\mu\text{mol/L}$) 均可显著 ($P < 0.01$) 抑制上述炎症因子 mRNA 的相对表达量。抑制促炎细胞因子及相关炎症效应物是判断生物活性物质是否具有抗炎作用的重要依据, 本实验结果与三七姜醇提取物^[24]相同模型条件下, 在最佳浓度下均有效抑制炎症细胞中 iNOS、COX-2、TNF- α 与 IL-6mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 表明 SSd 能够改善 LPS 对巨噬细胞的过度刺激, 降低炎症程度, 具有明确的抗炎活性。

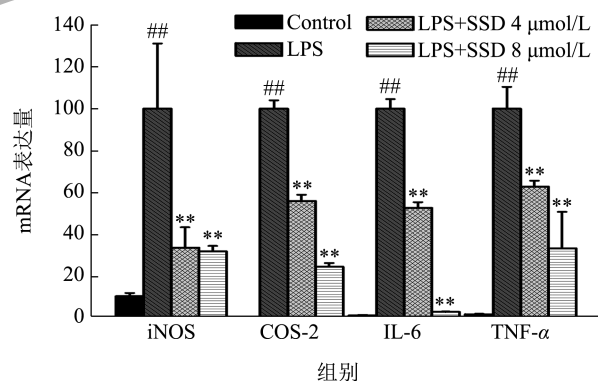


图 5 SSd 对炎症相关基因 mRNA 表达的影响
Fig.5 Effects of SSd on mRNA expression of inflammation-related genes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: ## 表示与对照组相比呈极显著差异 ($P < 0.01$); ** 表示与 LPS 组相比呈极显著差异 ($P < 0.01$)。

2.4 SSd对炎症细胞iNOS和COX-2蛋白表达水平的影响

通过蛋白印迹检测分析了 SSd 对 LPS 诱导的 RWA264.7 细胞中 iNOS、COX-2 蛋白表达水平的影响 (图 6)。结果显示, 与对照组相比, LPS 处理显

著诱导了 iNOS、COX-2 的表达。而与模型组相比，iNOS 组中不同浓度 SSd（4、8 $\mu\text{mol/L}$ ）处理均抑制了其蛋白表达水平；COX-2 组中，给药 4 $\mu\text{mol/L}$ SSd 和 8 $\mu\text{mol/L}$ SSd 时 COX-2 蛋白均出现显著下调现象，相似的结果在人参皂苷 F2 研究^[21]一文中得到证实。本实验结果与 2.4 中 iNOS 和 COX-2 组 mRNA 表达水平结论一致，但抑制程度略有差异，推测 SSd 在蛋白水平和转录翻译水平对炎症效应蛋白的影响作用具有一定的差异性。

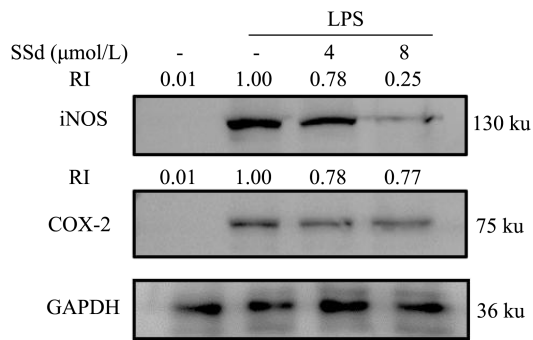


图 6 SSd 对 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响
Fig.6 The effect of SSd on the expression of iNOS and COX-2

2.5 SSd对LPS诱导RAW264.7的细胞形态学影响

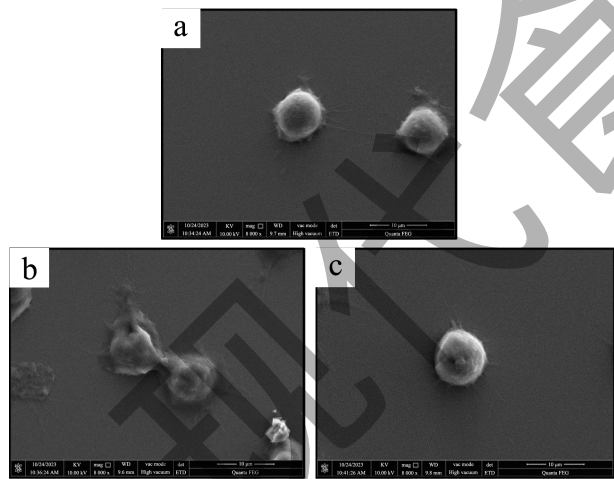


图 7 扫描电镜观察 SSd 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞的保护作用
Fig.7 The protective effect of SSd on RAW264.7 cells stimulated by LPS under SEM

注：a：对照组；b：LPS 处理组；c：LPS+SSd（8 $\mu\text{mol/L}$ ）处理组。放大 8 000 倍。

本文采用扫描电镜观察，从细胞形态学上研究了 SSd 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的影响。如图 7a 所示，空白组细胞形态为圆形，边缘光滑，边界分明，无伪足；图 7b 因 LPS 诱导，细胞形态发

生改变，整体仍为圆形，体积增大，细胞边缘模糊且表面呈凹凸不平状，有明显的孔隙形成；与模型组相比，SSd 处理组（图 7c）的细胞形态有明显的改善，表现为细胞边缘光滑，有明显的边界，表面的孔隙减少。观察结果表明，SSd 可明显改善 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞形态学改变，减轻炎症，保护细胞。

2.6 SSd对细胞膜表面受体TLR4的影响

LPS 刺激 RAW264.7 细胞，激活细胞膜表面受体 TLR4，随后 TLR4 将接收的炎症信号转移至胞内受体，进而参与并介导促炎细胞因子信号通路的转导^[21]。TLR4 是 LPS 跨膜信号传导的关键受体，Liu 等^[25]研究表明，SSd 抑制 LPS 诱导小胶质细胞神经炎模型中 TLR4 的蛋白表达。本文通过蛋白印迹法，研究了 RAW264.7 细胞在 LPS 和 SSd 不同处理时间下的表达水平。结果如图 8 所示，在处理时长为 0.5 h 和 1 h 时，SSd 对 LPS 诱导下 TLR4 蛋白表达水平无明显影响。但处理时长为 3 h 时，SSd 显著抑制了 TLR4 的蛋白表达。Wang 等^[26]发现在小胶质细胞神经炎模型模型中，柴胡皂苷 b2（Saikosaponin b2, SSb2）发挥抗炎作用与抑制 TLR4 蛋白表达相关。由此得出，SSd 可通过下调细胞膜表面受体 TLR4 的表达，阻断 LPS 刺激引发的信号转递，从而达到抑制炎症的效果。

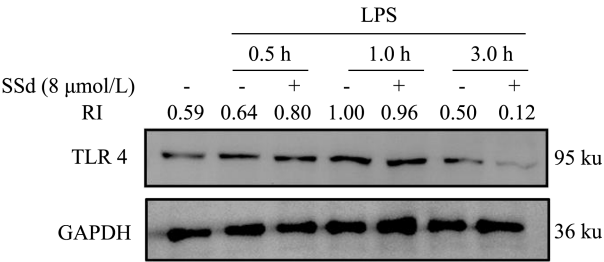


图 8 SSd 对膜表面受体 TLR4 的影响
Fig 8 Effect of SSd on the expression of membrane surface receptor TLR4

2.7 SSd对炎症通路相关蛋白表达和活化的影响

NF- κ B 信号通路是最重要的炎症信号通路之一，该信号通路的激活可促使早期防御反应的相关基因表达，调控相关细胞增殖与凋亡、炎症反应与免疫应答^[27]。哺乳动物 NF- κ B 转录因子家族中的蛋白相互关联形成不同转录活性的二聚体复合物，共享一个二聚化、DNA 结合、与 I κ B 激酶相互作用以及核易位所必需的、保守的长氨基末端 Rel 同源

结构域^[28]。I κ B- α /NF- κ B P65 二聚体几乎在所有细胞类型中都有发现,并以无活性状态存在,当受到外界刺激时,一系列信号级联反应促使 I κ B- α 磷酸化,使 NF- κ B 进入细胞核,其中的核心组分通过转录翻译引发炎症。当机体产生大量促炎细胞因子时,抗炎细胞因子分泌同时增加,造成免疫紊乱^[29]。本文研究显示(图9),SSd 在 LPS 刺激 0.5 h 时明显抑制了 I κ B α 蛋白的磷酸化;在 LPS 刺激 1 h 和 3 h 时,SSd 可明显增强 I κ B α 的蛋白表达,此结果与 Su 等^[30]报道 SSd 抑制 LPS 诱导的小胶质细胞炎症研究相似,均验证了 SSd 可阻碍 I κ B α 蛋白磷酸化,增强 I κ B α 的表达实现抗炎效果。GSK-3 β 在 NF- κ B 信号通路中作为典型炎症效应物存在^[21],在 LPS 不同处理时间下,给药 SSd 均可显著降低 GSK-3 β 蛋白的磷酸化水平,与先前报道的戊三酸处理 LPS 诱导 RAW264.7 炎症模型有着相同的发现^[31],在最适给药浓度下对磷酸化的 GSK-3 β 蛋白具有抑制作用。该研究结果表明,SSd 能够通过抑制 NF- κ B 以及 GSK-3 β 等炎症相关信号通路的激活,逆转 LPS 诱导的炎症水平,发挥抗炎作用。

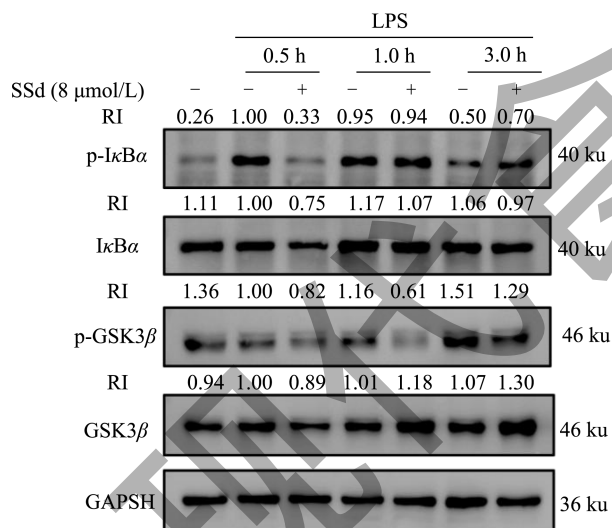


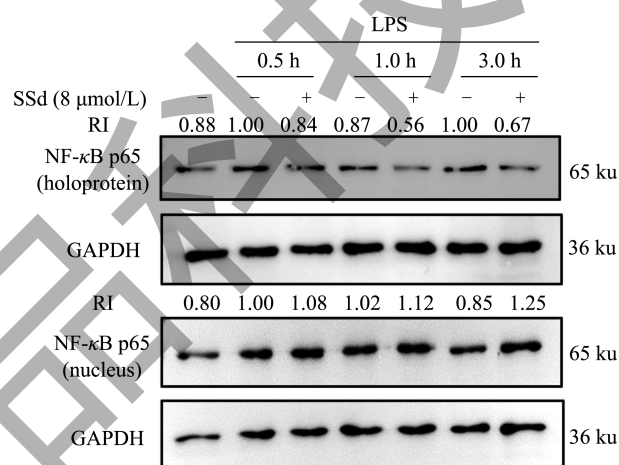
图9 柴胡皂苷的 d 抗炎作用机制

Fig.9 Mechanism of anti-inflammatory action by SSd

2.8 SSd对NF- κ B P65蛋白表达及入核的影响

NF- κ B 信号通路介导炎症发生的关键在于 NF- κ B 进入细胞核后启动了炎症基因的转录翻译。Kim 等^[32]研究发现,SSa 可抑制 3T3-L1 脂肪细胞中 I κ B α 磷酸化,阻止 NF- κ B (p50/p65) 入核发挥抗炎作用;相同的结果在 SSb2 治疗 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型中也有报导^[33]。本文对 SSd 影响 NF- κ B P65 的表达水平和入核情况进行探究,

结果显示给药 8 μ mol/L SSd 在 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的 3 个处理时间均可抑制细胞 NF- κ B (P65) 的蛋白表达水平,但未对 NF- κ B P65 入核产生显著影响(图10)。前文提到,药物通过 NF- κ B 信号通路发挥抗炎作用研究结论一般与影响 NF- κ B p65 入核相关,而本研究结果表明 SSd 不影响 NF- κ B P65 入核,但 Lu 等^[34]研究表明,SSd 能阻止 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞胞质中 NF- κ B (P50) 活化入核,且影响细胞核内 NF- κ B (P50) 的水平,由此推测在本实验模型中,SSd 抑制除 P65 外 NF- κ B 家族的其他成员在细胞核内的转录翻译,发挥抗炎作用,但这一推测有待后续进一步探索。

图10 SSd 不影响 NF- κ B P65 核内表达Fig.10 The effect of SSd on the nuclear translocation of NF- κ B P65

3 结论

本文基于 LPS 诱导的 RAW264.7 炎症细胞模型,对 SSd 的抗炎活性及其潜在的作用机制进行了深入研究。结果表明,SSd 能够显著抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的 NO 释放量,并能抑制 iNOS、COX-2 及 IL-6 和 TNF- α 的表达,显著逆转 LPS 诱导对细胞形态的改变,对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症具有明显的改善作用。此外,SSd 还能够显著抑制 TLR4、I κ B α 、GSK3 β 、NF- κ B P65 等炎症相关基因的表达或活化,通过调节 TLR4/NF- κ B 以及 GSK3 β 等炎症相关信号通路发挥抗炎作用。天然产物药理活性通常具有多通路多靶点的特性,本文研究结果可为更全面和深入理解柴胡皂苷抗炎活性的作用机制提供一定的数据支撑。目前,柴胡皂苷的抗炎机制尚未完全解析,进一步深入开展相关研究仍具有重要的科学意义和应用价值。

参考文献

- [1] RUSLAN M. Origin and physiological roles of inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454: 428-435.
- [2] ELZBIETA K, PAUL K. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13: 159-175.
- [3] SHAO W H, PHILIP L C. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Resrarch & Therapy*, 2011, 13: 202.
- [4] NITIN S, DEEPAK B, JAGADISH P R, et al. Inflammation and cancer [J]. *Annals of African Medicine*, 2019, 18(3): 121-126.
- [5] JUDITH A, JOHANNES R, KATARZYNA B K. The good and the bad: monocytes' and macrophages' diverse functions in inflammation [J]. *Cells*, 2022, 11: 2-23.
- [6] KEVIN R. An Inflammation classification system using cytokine parameters [J]. *The Scandinavian Foundation for Immunology*, 2021, 93(2): e12970.
- [7] YUAN B C, YANG R, MA Y, et al. A systematic review of the active saikosaponins and extracts isolated from radix bupleuri and their applications [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2017, 55: 620-635.
- [8] SUI C, HAN W J, ZHU C R, et al. Recent progress in saikosaponin biosynthesis in bupleurum [J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2021, 22(3): 329-340.
- [9] LI X Q, SONG Y N, WANG S J, et al. Saikosaponins: a review of pharmacological effects [J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2018, 20(5): 399-411.
- [10] LI X J Y, LI X Y, HUANG N N, et al. A comprehensive review and perspectives on pharmacology and toxicology of saikosaponins [J]. *Phytomedicine*, 2018, 50: 73-87.
- [11] ZHANG K, ZHENG X L, ZHANG H F, et al. Research progress on the pharmacological effects and quality analysis methods of bupleurum [J]. *Journal of Clinical and Nursing Research*, 2022, 6(3): 7-13.
- [12] YAN Y J, YIN S S, BIAN X Y, et al. Gas chromatography-mass spectrometry based metabolomics reveals the potential mechanism of action of saikosaponin d against DSS-induced acute ucerative colitis [J]. *Phytochemistry Letters*, 2023, 57: 133-139.
- [13] 陈浩,郝健亨,李振城,等.自身免疫性肝炎小鼠模型差异表达基因的筛查及柴胡皂苷D对部分差异表达基因表达的影响[J].*临床肝胆病杂志*,2020,36(4):840-846.
- [14] SU J, PAN Y W, WANG S Q, et al. Saikosaponin d attenuated lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors via inhibiting microglia activation and neuroinflammation [J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 80: 106181.
- [15] LI C X, CUI L H, ZHANG L Q, et al. Saikosaponin d attenuates pancreatic injury through suppressing the apoptosis of acinar cell via modulation of the MAPK Signaling pathway [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 735079.
- [16] PIAO C H, ZHOU S C, BUI T T, et al. Saikosaponin d inhibits nasal inflammation by regulating the transcription factors T-box protein expressed in T cells/GATA-3 and retinoic acid-related orphan nuclear receptor γ t in a murine model of allergic rhinitis [J]. *Heliyon*, 2023, 9: e17319.
- [17] WANG X Y, YANG G F. Saikosaponin a attenuates neural injury caused by ischemia/reperfusion [J]. *Translational Neuroscience*, 2020, 11: 227-235.
- [18] HWANG J S, KWON M Y, KIM K H, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated iNOS induction is increased by glucosamine under normal glucose conditions but is inhibited by glucosamine under high glucose conditions in macrophage cells [J]. *Biological Chemistry*, 2017, 292 (5): 1724-1736.
- [19] ZHOU P, SHI W, HE X Y, et al. Saikosaponin d: review on the antitumour effects, toxicity and pharmacokinetics [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2021, 59(1): 1478-1487.
- [20] LIN X B, ZHANG J H, FAN D C. Frutescone o from baeckea frutescens blocked TLR4-mediated Myd88/NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS induced RAW264.7 macrophages [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 643188.
- [21] 牛志强,李琦,刘亚男,等.人参皂苷F2对LPS诱导RAW264.7细胞炎症反应的改善作用[J].*现代食品科技*, 2024,40(1):1-7.
- [22] LIU L Z, HUQ S, XU W M. Targeting cyclooxygenase and nitric oxide pathway cross-talk: a new signal transduction pathway for developing more effective anti-inflammatory drugs[J]. *Current Signal Transduction Therapy*, 2009, 4:66-75.
- [23] 张宗星,刘道忠,江露,等.三百棒通过调控TLR4/NF- κ B信号通路对脂多糖诱导的RAW264.7细胞极化的影响[J].*中国病理生理杂志*,2023,39(10): 1849-1858.
- [24] 梁洁,梁晶春,刘星晨,等.壮药三七姜醇提取物及含药血清对脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症的抗炎作用及机制[J].*中国药房*,2023,34(5):548-553.
- [25] LIU X L, FAN L, YUE B H, et al. Saikosaponin a mitigates the progression of parkinson's disease via attenuating microglial neuroinflammation through TLR4/MyD88/NF- κ B pathway [J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2023, 27: 6956-6971.
- [26] WANG X M, LI S S, Yu J Y, et al. Saikosaponin b2 ameliorates depression-induced microglia activation by inhibiting ferroptosis-mediated neuroinflammation and ER stress [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 316: 116729.

- [27] NEIL D P. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8: 49-62.
- [28] ANDREA O, SANKAR G. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1: a000034.
- [29] MORENA Z, VALENTINA L, DAVIDE F, et al. Ciprofloxacin and levofloxacin attenuate microglia inflammatory response via TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2019, 16: 148.
- [30] SU J, PAN Y W, WANG S Q, et al. Saikosaponin-d attenuated lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors via inhibiting microglia activation and neuroinflammation [J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 80: 106181.
- [31] CHOI W S, SHIN P G, LEE J H, et al. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells [J]. *Cellular Immunology*, 2012, 280: 164-170.
- [32] KIM S O, PARK J Y, JEON S Y, et al. Saikosaponin a, an active compound of radix bupleuri, attenuates inflammation in hypertrophied 3T3-L1 adipocytes via ERK/NF- κ B signaling pathways [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2015, 35: 1126-1132.
- [33] SHIN J S, IM H T, LEE K T. Saikosaponin b2 suppresses inflammatory responses through IKK/I κ B α /NF- κ B signaling inactivation in LPS-induced RAW264.7 macrophages [J]. *Inflammation*, 2018, 42(1): 342-353.
- [34] LU C N, YUAN Z G, ZHANG X L, et al. Saikosaponin a and its epimer saikosaponin d exhibit anti-inflammatory activity by suppressing activation of NF- κ B signaling pathway [J]. *International Immunopharmacology*, 2012, 14: 121-126.