

川陈皮素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞损伤的保护作用

陈俊

(三峡大学医学院基础医学实验中心, 湖北宜昌 443002)

摘要: 研究川陈皮素对脂多糖 (LPS) 刺激的 RAW 264.7 巨噬细胞损伤的保护作用。MTT 法检测川陈皮素的安全用药范围; 乳酸脱氢酶试剂盒检测乳酸脱氢酶 (LDH) 的释放水平; 一氧化氮试剂盒检测细胞上清液中一氧化氮 (NO) 的释放水平; Real-time PCR 法检测 Toll 样受体 4 (TLR4)、内毒素受体 14 (CD14)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的 mRNA 表达水平; Western Blot 检测核转录因子- κ B (NF- κ B) 的核蛋白表达水平。与正常组比较, LPS 刺激组 LDH 活力和 NO 的释放量分别升高了 4.12 倍和 3.21 倍 ($p < 0.01$), iNOS、IL-1 β 、TNF- α 、TLR4 和 CD14 mRNA 表达水平分别升高了 2.73 倍、4.91 倍、10 倍、1.84 倍和 3.53 倍 ($p < 0.01$); 同时, NF- κ B 的核表达水平升高了 2.50 倍 ($p < 0.01$); 给予川陈皮素干预后, 与 LPS 刺激组比较, 川陈皮素各用药组均能明显降低 LDH 活力和 NO 的释放量, 减少 TLR4、CD14、IL-1 β 、TNF- α 和 iNOS 的 mRNA 表达水平和 NF- κ B 的核表达水平 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。川陈皮素可减轻 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞的损伤, 机制可能与抑制 TLR4-NF- κ B 信号通路有关。

关键词: 川陈皮素; 脂多糖; TLR4; NF- κ B

文章编号: 1673-9078(2019)010-44-49

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.10.008

The Protective Effect of Nobiletin on Lipopolysaccharides (LPS)-induced RAW 264.7 Cell Injury

CHEN Jun

(College of Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract: To investigate the protective effects of nobiletin on LPS-induced RAW 264.7 macrophage cell injury. The MTT method was used to detect the safe dosage of nobiletin. The release level of lactate dehydrogenase (LDH) was measured by the LDH assay kit. The level of nitric oxide (NO) released in the cell supernatant was evaluated by the NO assay kit. The mRNA expression levels of TNF- α , IL-1 β , iNOS, TLR4 and CD14 were evaluated by real-time PCR analysis. The expression level of NF- κ B nuclear protein was determined by the western blot method. Compared to the normal control group, the LDH activity and amount of released NO in the LPS-stimulated group increased by 4.12 times and 3.21 times, respectively ($p < 0.01$), and the mRNA expression levels of iNOS, IL-1 β , TNF- α , TLR4 and CD14 increased by 2.73 times, 4.91 times, 10 times, 1.84 times and 3.53 times, respectively ($p < 0.01$). Meanwhile, the nuclear expression level of NF- κ B in the LPS-stimulated group increased by 2.50 times ($p < 0.01$). However, the treatment with nobiletin at different doses decreased the activity of LDH and amount of the released NO, while reducing the mRNA expression levels of TNF- α , IL-1 β , iNOS, TLR4 and CD14 as well as the nuclear expression level of NF- κ B, compared with the LPS-stimulated group ($p < 0.05$ or $p < 0.01$). Nobiletin attenuates LPS-induced injury in RAW 264.7 cells through mechanisms probably associated with the inhibition of TLR4-NF- κ B signaling pathway.

Key words: nobiletin; lipopolysaccharide (LPS); TLR4; NF- κ B

川陈皮素 (nobiletin) 是一类天然黄酮类化合物, 通常存在于芸香科及大戟科植物的茎叶及果皮中, 广泛应用在医学和食品科学中。川陈皮素的制备方法主要包括植物萃取法和化学合成法。现代药理研究表明, 川陈皮素具有抗炎、抗氧化及调节免疫等多种生物活

收稿日期: 2019-04-01

作者简介: 陈俊(1987-), 女, 助理实验师, 研究方向: 抗炎免疫药理

性^[1]。脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分, 由多糖, O-特异性链和类脂 A 组成, 其中类脂 A 是 LPS 的主要活性成分^[2]。Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR) 最早是从果蝇体内分离得到的, 它主要决定果蝇的非特异性免疫反应。1997 年首次在人体分离出果蝇 TLR 的同系物, 从而发现它可以识别病原菌, 启动特异性和非特异性

免疫反应。TLR 产生不同的效应分子对抗不同的微生物感染,调节着组织和细胞的炎症反应^[3]。其中, Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 在识别 LPS 及介导的炎症反应信号转导中起着重要作用。LPS 能够结合 TLR4 激活巨噬细胞介导下游胞内信号如核转录因子 κ B (Nuclearfactor-kappa B, NF- κ B) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等信号通路,从而介导炎症反应,是复制整体动物和细胞炎症模型的常用外源激活剂^[4]。大量研究发现,许多黄酮类的化合物显示了良好的抗炎效应,如 Qi G 等的研究表明,川陈皮素可减轻 LPS 刺激的全身炎症反应,如减少白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) 的产生;同时可减轻腹腔注射 LPS 引起的中枢神经炎症反应及 LPS 诱导的空间学习记忆能力的损伤,其分子机制与其调节 MAPK 和核转录因子 κ B (Nuclearfactor-kappa B, NF- κ B) 信号通路有关^[5]。Liu F 等的研究表明,川陈皮素可通过氧化应激途径减轻缺氧再灌注诱导的 H9c2 心肌细胞的凋亡^[6]。但川陈皮素能否通过调节 TLR4 信号途径减轻 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的炎症反应还尚未见相关报道。因此,本研究以 LPS 刺激的 RAW 264.7 细胞为离体细胞炎症模型,探讨川陈皮素抑制炎症反应的作用,并围绕 TLR4 信号相关途径进行深入的研究,为后期开发川陈皮素抗炎药物的提供实验室基础。

1 材料与方法

1.1 材料

川陈皮素分子式 $C_{27}H_{32}O_{14}$, 分子量为 580.53, 相对纯度大于或等于 98%, 购于四川成都植化纯生物技术有限公司; RAW 264.7 细胞, 购于北京协和细胞资源中心; DMEM 高糖培养基, 美国 Sigma; 胎牛血清, Sciencell 公司; LPS, Sigma 公司, (来源于大肠杆菌); MTT, 武汉博士德生物公司; NO 试剂盒, 碧云天生物公司; 反转录试剂盒, Thermo 公司; PCR 引物, 生工生物工程公司; NF- κ B 和 Lamin B 抗体, 美国 Cell signaling 公司。

1.2 仪器

NU-4750E 型二氧化碳培养箱, NuAire 美国; CKX41 倒置显微镜, Olympus 日本; 全波长酶标仪, Thermo 美国; PCR 仪, Whatman Biometra 德国; 凝胶成像分析系统, Gel logic 200 美国柯达; CT15RT 高速冷冻离心机, 上海天美生化仪器设备工程有限公

司。

1.3 方法

1.3.1 RAW 264.7 细胞复苏及培养

用 75%酒精擦拭超净工作台, 紫外线照射超净工作台 30 min, 从液氮罐中取出冻存管, 迅速将冻存管放到已经预热的水浴锅 (37 °C) 中迅速解冻, 不断摇动, 待冻存管内液体完全溶解 (控制在 1 min 内), 取出用酒精棉球擦拭冻存管外壁, 再拿入超净台内, 将冻存管内的液体转入 15 mL 离心管, 加入 2 倍体积含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基, 800 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 重悬细胞, 接种到培养瓶中, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。传代: 待细胞长至 90%后, 从培养箱内取出细胞, 小心吸出旧培养液, 用 PBS 清洗, 加入 3 mL 10%胎牛血清的 DMEM 培养基, 用细胞刮棒沿一个方向轻轻将细胞刮下来, 将细胞悬液转移到 15 mL 离心管中, 800 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 加入培养液, 用滴管轻轻吹打细胞制成细胞悬液, 分装入培养瓶, 放入 37 °C培养箱、5% CO₂ 条件下培养。

1.3.2 川陈皮素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞活力的影响

将 RAW 264.7 细胞悬液以 1×10^5 /mL 的密度接种于 96 孔板, 细胞贴壁后, 设置正常对照组、LPS 刺激组 (1 mg/L) 及川陈皮素给药组 (0.1 mg/L、1 mg/L、5 mg/L 和 25 mg/L), 每组 6 个复孔, 24 h 后加入 MTT, 避光培养 4 h 后吸弃上清, 每孔加入 150 μ L DMSO, 于摇床低速震荡溶解结晶, 酶标仪 490 nm 处测量吸光度, 细胞活力计算公式为: (实验组 OD 值-空白组 OD 值) / (对照组 OD-空白组 OD) \times 100%。

1.3.3 川陈皮素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞释放 NO 水平的影响

将 RAW 264.7 细胞悬液以 1×10^5 /mL 的密度接种于 96 孔板, 细胞贴壁后, 吸弃上清, 加入不同浓度的川陈皮素 (0.1 mg/L、1 mg/L、5 mg/L 和 25 mg/L) 预保护 12 h, 每组 6 个复孔, 再加入终浓度为 1 mg/L 的 LPS 刺激 12 h, Griess 法测定上清液中 NO 含量。

1.3.4 川陈皮素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 TLR4、CD14、iNOS、IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 表达水平的影响

将 RAW 264.7 细胞悬液以 1×10^5 /mL 密度接种 6 孔板, 每孔 2 mL, 待细胞贴壁后, 设置正常对照组、LPS 刺激组 (1 mg/L) 及川陈皮素给药组 (0.1 mg/L、1 mg/L、5 mg/L 和 25 mg/L), 药物预保护 12 h, 再加入 1 mg/L LPS 刺激 12 h, 按 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 逆转录为 cDNA 后 Real-time PCR 仪扩增。

β -actin、iNOS、TNF- α 、IL-1 β 、CD14 和 TLR4 引物 由上海生工合成, 引物序列如下表:

表 1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 The primers for Real-time PCR

引物	上游	下游
β -actin	5'-CGTGCGTGACATCAAAGAGAA-3'	5'-TGGATGCCACAGGATTCCAT-3'
iNOS	5'-GCCCTGCTTTGTGCGAAG-3'	5'-GCCCTTTGTGCTGGGAGTC-3'
TNF- α	5'-AGGCAACCTGACCACTCTCC-3'	5'-CACCACCATCAAGGACTCAA-3'
IL-1 β	5'-TGTCTGTGTAATGAAAGACGCGC-3'	5'-GCTTGTGCTGCTTGTGAGG-3'
CD14	5'-CAACAGGCTGGATAGGAACCC-3'	5'-GCCACTGCTTGGGATGATG-3'
TLR4	5'-CTCTGGCATCATCTTCATTGTCC-3'	5'-CTGCTGTTTGTCTCAGGATTCG-3'

扩增条件为 94 °C 5 min、94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 30 s、30 个循环、72 °C 5 min, 琼脂糖凝胶电泳检测各指标的 mRNA 表达情况。

1.3.5 川陈皮素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NF- κ B 表达的影响

将 RAW 264.7 细胞悬液以 1×10^5 /mL 密度接种 6 孔板, 每孔 2 mL, 待细胞贴壁后, 设置正常对照组、LPS 刺激组 (1 mg/L) 及川陈皮素给药组 (0.1 mg/L、1 mg/L、5 mg/L 和 25 mg/L), 药物预保护 12 h, 再加入 1 mg/L LPS 刺激 12 h 后把六孔板取出, 弃上清, 用预冷的 PBS 洗两遍, 然后加入 1 mL PBS, 用细胞刮棒将细胞刮取, 1000 r/min, 离心 5 min, 弃上清收集细胞估计离心后体积 (PCV), 加入 5 倍 PCV 的 CEB-A, 5 μ L 蛋白酶抑制剂, 涡旋混合仪剧烈震荡 30 s, 置于冰上 15 min, 每隔 5 min 震荡 15 s。加入 1/20 体积的 CEB-B, 涡旋混合仪震荡 10 s, 静置于冰上 1 min。1000 r/min 4 °C 离心 5 min, 沉淀为核粗提物, 上清为胞浆蛋白。用 100 μ L CEB-A 洗涤沉淀, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清。在离心沉淀物 (细胞核) 中加入 100 μ L 预冷的 NEB, 最大转速涡旋剧烈震荡 15 s, 冰上静置 30 min, 每间隔 10 min 涡旋剧烈震荡 15 s。4 °C, 12000 r/min, 离心 5 min, 迅速将上清转入另一离心管, 即得胞核蛋白。胞核蛋白进行蛋白定量, 取一定体积的蛋白加入 5X 的上样缓冲液, 煮沸 10 min, 电泳并转 PVDF 膜。5%脱脂奶粉封闭 1 h 后, 分别使用 NF- κ B 和内参 Lamin B 的抗体, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 二抗室温下孵育 1 h, TBST 洗 3 次, ECL 化学发光法显影。

1.3.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5 软件, PCR 结果采用 Image J 软件分析, 计量资料采用 $\bar{X} \pm S$ 表示, 全部数据采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 各组均数用单因素方差分析, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 川陈皮素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞释放乳酸脱氢酶的影响

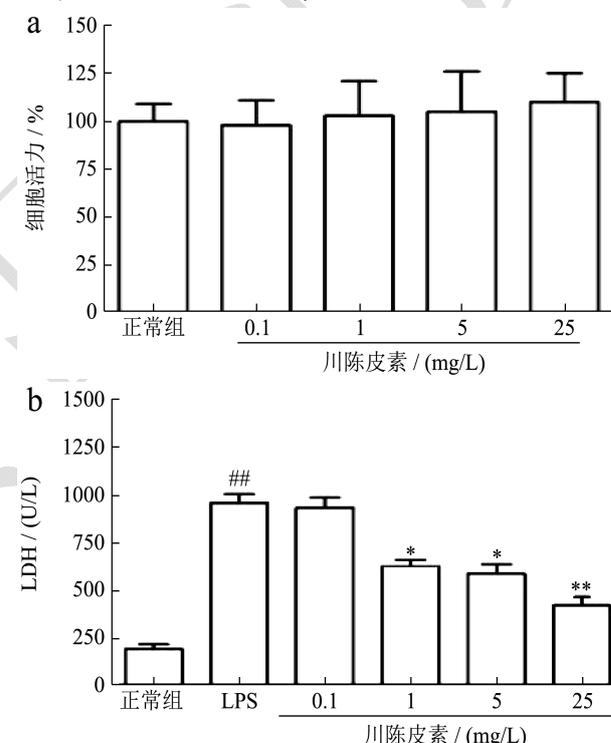


图 1 川陈皮素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞释放乳酸脱氢酶的影响

Fig.1 Effect of Nobiletin on LDH releasing in RAW 264.7 Cell induced by LPS

注: 与正常组比较, $## p < 0.01$; 与 LPS 刺激组比较, $* p < 0.05$, $** p < 0.01$; 图 a: 细胞活力; 图 b: 乳酸脱氢酶活力。

采用 MTT 法检测了川陈皮素对细胞活力的影响, 与正常组相比, 川陈皮素各剂量组 (0.1 mg/L、1 mg/L、5 mg/L 和 25 mg/L) 对细胞活力均没有影响; 我们又采用乳酸脱氢酶试剂盒检测了川陈皮素对乳酸脱氢酶的影响, 正常组乳酸脱氢酶的水平是 (188 \pm 25) U/L, 与正常组相比, LPS 刺激的 RAW 264.7 细胞的乳酸脱氢酶活力显著升高到 (958 \pm 46) U/L, 是正常组细胞

乳酸脱氢酶水平的 5.12 倍 ($p < 0.01$), 给予川陈皮素干预后, 1 mg/L、5 mg/L 和 25 mg/L 的川陈皮素均能降低 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞释放乳酸脱氢酶的水平, 分别降低到 (625 ± 34) U/L、(528 ± 55) U/L 和 (417 ± 55) U/L ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), 结果见图 1。

2.1.2 川陈皮素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞释放 NO 水平和 iNOS 表达的影响

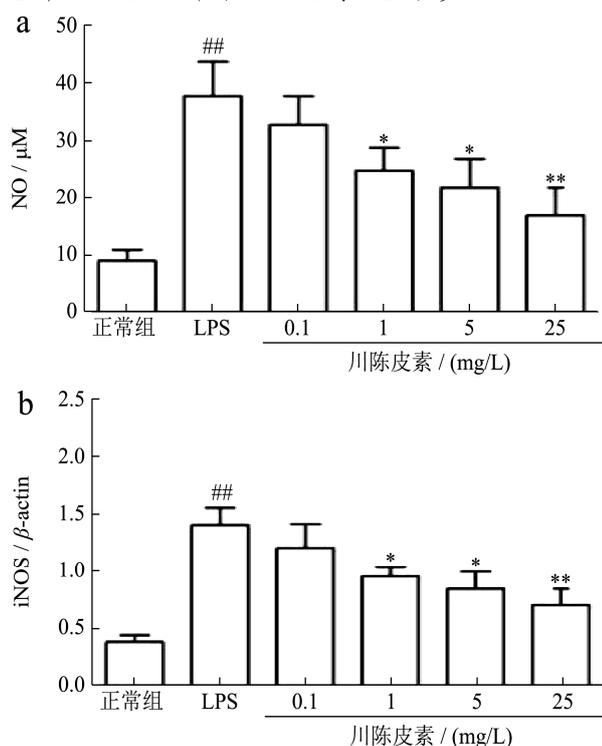


图2 川陈皮素对LPS诱导的RAW 264.7细胞释放NO水平和iNOS表达的影响

Fig.2 Effect of Nobiletin on NO level and iNOS expression in RAW 264.7 Cell induced by LPS

注: 与正常对照组比较, ^{##} $p < 0.01$; 与 LPS 刺激组比较, ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$; 图 a: NO 释放水平; 图 b: iNOS 表达水平。

诱导型一氧化氮合酶 (Inducible nitric oxide synthase, iNOS) 主要在炎症和免疫反应中被激活, 催化 NO 产生, 但 NO 产生过量则可诱导炎症性疾病的发生和发展^[7]。因此, 我们采用 NO 检测试剂盒和 Real-time PCR 的方法分别检测了 NO 水平和 iNOS 的 mRNA 表达水平。实验结果表明, 正常组的 NO 释放水平是 (9 ± 2) μM , iNOS mRNA 相对表达水平是 0.38 ± 0.06 , LPS 诱导 RAW 264.7 细胞的 NO 释放水平和 iNOS 表达均显著升高, 分别升高到 (38 ± 6) μM 和 1.40 ± 0.15 ($p < 0.01$); 给予川陈皮素干预后, 1 mg/L、5 mg/L 和 25 mg/L 各剂量组均能减少 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的 NO 释放水平和 iNOS 表达, 其中 NO 水平分别降低到 (25 ± 4) μM 、(22 ± 5) μM 和 (17 ± 5) μM , iNOS 表达分别降低到 0.95 ± 0.08 、 0.84 ± 0.15 和 0.7 ± 0.14

($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), 结果见图 2。

2.1.3 川陈皮素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平的影响

LPS 诱导的巨噬细胞等释放的炎症因子造成的级联反应对组织细胞的损伤程度远远大于其本身对机体的影响, 其中以经典的促炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 最为重要。因此, 采用 Real-time PCR 的方法分别检测 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平。与正常组相比, LPS 刺激的 RAW 264.7 细胞的 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平显著升高, 分别升高了 4.91 倍和 10 倍 ($p < 0.01$); 给予川陈皮素干预后, 1 mg/L、5 mg/L 和 25 mg/L 川陈皮素各剂量组均能降低 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的 IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平, 其中, 各剂量组的 IL-1 β 表达水平分别降低了 31%、47% 和 59%; TNF- α 表达水平分别降低了 50%、54% 和 64% ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), 结果见图 3。

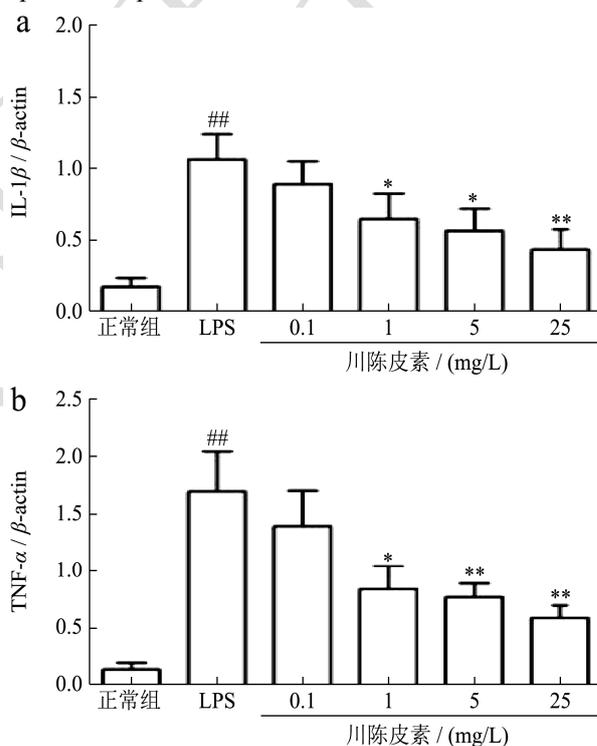


图3 川陈皮素对LPS诱导的RAW 264.7细胞IL-1 β 和TNF- α 的mRNA表达水平的影响

Fig.3 Effect of Nobiletin on mRNA expression of IL-1 β and TNF- α in RAW 264.7 Cell induced by LPS

注: 与正常组比较, ^{##} $p < 0.01$; 与 LPS 刺激组比较, ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$; 图 a: IL-1 β 表达水平; 图 b: TNF- α 表达水平。

2.1.4 川陈皮素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NF- κB 表达的影响

NF- κB 是介导炎症反应中发生的重要信号分子^[8]。我们采用 Western Blot 法检测了 NF- κB 的核蛋白表达水平, 与正常组相比, LPS 刺激的 RAW 264.7 细

胞 NF- κ B 核蛋白表达水平显著升高, 升高了 2.50 倍 ($p<0.01$), 给予川陈皮素干预后, 1 mg/L、5 mg/L 和 25 mg/L 川陈皮素各剂量组均能降低 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NF- κ B 的核蛋白表达水平, 分别降低了 20%、32%和 52% ($p<0.05$ 或 $p<0.01$), 结果见图 4。

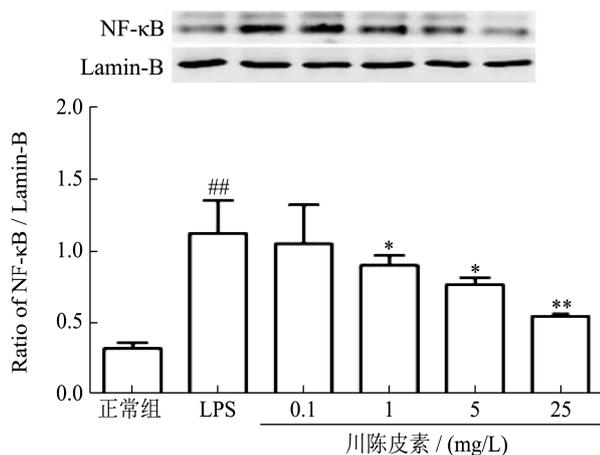


图 4 川陈皮素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NF- κ B 表达水平的影响

Fig.4 Effect of Nobiletin on nuclear expression of NF- κ B in RAW 264.7 Cell induced by LPS

注: 与正常组比较, $^{##}p<0.01$; 与 LPS 刺激组比较, $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$ 。

2.1.5 川陈皮素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 TLR4 和 CD14 的 mRNA 表达水平的影响

TLR4 和 CD14 形成的多受体复合物在 LPS 介导的炎症反应中起重要作用^[9]。因此, 采用 Real-time PCR 方法检测了 TLR4 和 CD14 mRNA 的表达水平。与正常组相比, LPS 刺激的 RAW 264.7 细胞的 TLR4 和 CD14 mRNA 表达水平显著升高, 分别升高 4.53 倍和 2.84 倍 ($p<0.01$); 给予川陈皮素干预后, 1 mg/L、5 mg/L 和 25 mg/L 川陈皮素各剂量组均能降低 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的 TLR4 和 CD14 mRNA 的表达水平, 其中, TLR4 分别降低了 41%、50%和 57%; CD14 的表达水平降低了 51%、59%和 62% ($p<0.05$ 或 $p<0.01$), 结果见图 5。

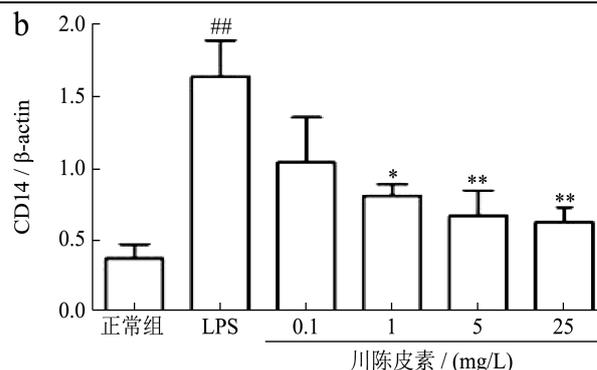
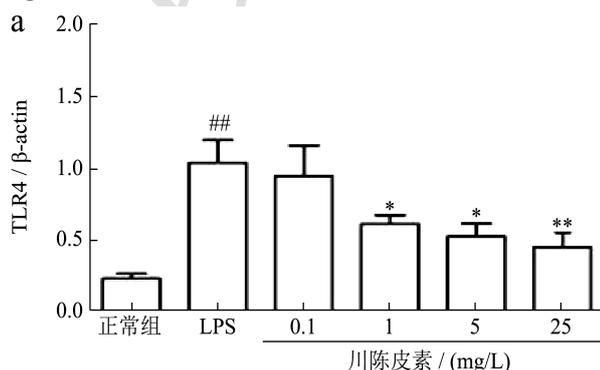


图 5 川陈皮素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 TLR4 和 CD14 的 mRNA 表达水平的影响

Fig.5 Effect of Nobiletin on mRNA expression of TLR4 and CD14 in RAW 264.7 cell induced by LPS

注: 与正常组比较, $^{\#}p<0.05$, $^{##}p<0.01$; 与 LPS 刺激组比较, $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$; 图 a: TLR4 表达水平; 图 b: CD14 表达水平。

2.2 讨论

LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的主要组成成分, 其毒性成分主要为类脂质 A, 能够引起哺乳动物细胞发生免疫反应, 从而导致促炎因子的释放。通过细胞表面的先天免疫分子受体识别 LPS 是感染性休克的重要过程^[4]。TNF- α 是由巨噬细胞/单核细胞在急性炎症过程中产生的炎性细胞因子, 并且调控细胞内多种信号通路, 导致细胞坏死或凋亡。机体受到细菌入侵后, TNF- α 在 30 min 之内就可以检测到, IL-1、IL-6 分别在 3 h、6 h 可以检测到。NO 参与机体的许多生理过程, 同时也是一种重要的炎症介质, 其过量产生可促进炎症性疾病的发生发展。研究显示, 许多药物都可以通过抑制炎症相关因子的产生显示出良好的抗炎活性。如 Dai 等人的研究发现, 竹节参的不用提取部位和竹节参皂苷均对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞具有良好的抗炎效应, 可明显减轻细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 的产生水平, 且能减少细胞中 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平^[10]。因此, 如果要评价某种药物的抗炎效果, 研究者们首先考虑用 IL-1 β 和 TNF- α 的释放水平或表达水平来进行初步的评价。本研究中, 我们采用 1 mg/L 的 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞, 给予不同剂量的川陈皮素预保护后, 实验结果表明, 川陈皮素能抑制 LPS 刺激导致的 RAW 264.7 细胞中 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平的增强。此外, 过量 NO 产生能够导致多种炎症状态, 抑制 NO 的产生与抗炎作用密切相关^[7]。在本研究中发现, 与正常组相比, LPS 能够引起 RAW 264.7 细胞上清液中的 NO 的分泌升高以及 RAW 264.7 细胞中 iNOS 表达水平的增加, 给予

不同剂量的川陈皮素预保护后,川陈皮素能抑制 LPS 刺激导致的 RAW 264.7 细胞上清液中 NO 的分泌和 iNOS 表达水平的升高。

TLR4 作为 Toll 样家族的一个成员,被发现是由哺乳动物的先天免疫细胞表达的第一个模式识别受体^[4]。CD14 是表达于单核细胞表面上糖基磷脂酰肌醇链接的一种糖蛋白,同时作为一种可溶性蛋白质存在于血清中。CD14 在 LPS 信号调节中的关键作用已经通过 CD14^{-/-}敲除小鼠证实,该缺陷鼠对于直接注射 LPS 或者注射活菌引发的感染性休克感染具有高度的抵抗性^[11]。CD14 首先与 LPS 结合,然后 LPS 结合蛋白将 CD14 与 LPS 的结合物转运到 TLR4-MD-2 复合物。LPS 与 TLR4 结合形成复合物之后具有高亲和力,从而将信号转导到细胞内进而诱导一系列的炎症级联信号^[9]。我们的研究也表明,川陈皮素能显著抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 CD14 和 TLR4 的 mRNA 表达水平。NF- κ B 属于 Rel 家族的二聚体蛋白,大多数二聚体包括 p65 和 p50 两种亚基。NF- κ B p65, 又称 RelA, 其 C 端含有转录激活域,其中富集丝氨酸、酸性氨基酸和疏水性氨基酸,能直接与各种 I κ B 成员藕联而激活转录过程,而 p50 和 p52 无此结构。在正常生理条件下,NF- κ B 与 I κ B 结合形成复合体,以无活性形式存在于胞浆中。当细胞受细胞外信号刺激后,I κ B 激酶复合体(I κ B kinase, IKK)活化将 I κ B 磷酸化,使 NF- κ B 暴露核定位位点。游离的 NF- κ B 迅速移位到细胞核与特异性 κ B 序列结合,诱导相关基因转录^[12]。研究报道,甘草酸和异脂酸可以通过抑制 TLR4/MD-2 复合物,进而抑制 NF- κ B 信号途径抑制 LPS 诱导的炎症反应^[13]。本实验中,我们的研究表明,川陈皮素能显著抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 NF- κ B 核蛋白的表达水平。以上研究结果提示,川陈皮素的抗炎效应与其调控 TLR4-NF- κ B 信号通路,进而抑制炎症因子分泌有关。

3 结论

川陈皮素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞损伤具有良好的保护作用,其保护作用与其抗炎效应相关,深入的分子机制研究表明其抗炎作用与其调控 TLR4-NF- κ B 信号通路,进而抑制炎症因子分泌有关。

参考文献

- [1] 王景翔,于宏伟,胡瑞省.川陈皮素研究进展[J].安徽农业科学,2011,39(13):7731-7733
WANG Jin-xiang, YU Hong-wei, HU Rui-sheng. Research

- advances of nobiletin [J]. Journal of Anhui Agriculture Science, 2011, 39(13): 7731-7733
- [2] Kong Y, Le Y. Toll-like receptors in inflammation of the central nervous system [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(10): 1407-1414
- [3] Medzhitov R, Janeway, C A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition [J]. Cell, 1997, 91(3): 295-298
- [4] Nijland R, Hofland T, Van Strijp J A. Recognition of LPS by TLR4: Potential for anti-inflammatory therapies [J]. Mar Drugs, 2014, 12(7): 4260-4673
- [5] Qi G, Mi Y, Fan R, et al. Nobiletin protects against systemic inflammation-stimulated memory impairment via MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(18)
- [6] Liu F, Zhang H, Li Y, et al. Nobiletin suppresses oxidative stress and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes following hypoxia/reoxygenation injury [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 854: 48-53
- [7] Davis K, Martin E, Turko I, et al. Novel effects of nitric oxide [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001, 41: 203-236
- [8] Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(4-5): 413-421
- [9] Jinfeng Wu, Junmin Zhou, Xianghong Chen, et al. Attenuation of LPS-induced inflammation by ICT, a derivative of icariin, via inhibition of the CD14/TLR4 signaling pathway in human monocytes [J]. International Immunopharmacology, 2012, 12(1): 74-79
- [10] Dai Y W, Yuan D, Wan J Z, et al. Study on protective effect of total saponins of *Panax japonicus* on LPS-induced RAW 264.7 cell inflammation through NF-kappa B pathway [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2014, 39(11): 2076-2080
- [11] Ulevitch R J, Tobias P S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin [J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13: 437-435
- [12] Hoesel B, Schmid A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer [J]. Molecular Cancer, 2013, 12: 1-86
- [13] Honda H, Nagai Y, Matsunaga T, et al. Glycyrrhizin and isoliquiritigenin suppress the LPS sensor toll-like receptor 4/MD-2 complex signaling in a different manner [J]. J Leukoc Biol, 2012, 91(6): 967-976