

网络出版时间: 2020-6-29 11:27 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200629.1110.021.html>

◇ 药学研究 ◇

连翘苷调控炎症的抑制作用及机制研究

杨本军^{1,2} 武明飞¹ 徐涛¹

摘要 目的 探讨连翘苷(PHN)对脂多糖(LPS)诱导的炎症反应的抑制作用及机制。方法 建立体外LPS诱导小鼠巨噬细胞(RAW264.7)炎症模型研究炎性细胞因子的分泌及相关通路蛋白的表达。实验采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测不同浓度的PHN对小鼠巨噬细胞活性的影响,采用Griess法检测细胞上清液中一氧化氮(NO)释放量,ELISA法检测白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达量,Western blot法检测TLR4信号通路相关蛋白的表达,分子对接验证结合模式。并且建立体内LPS诱导的急性肺损伤(ALI)模型,通过观察组织病理学变化,研究PHN的保护作用。结果 PHN在30 μ mol/L以下浓度范围对细胞增殖无明显抑制作用。并且PHN对LPS诱导的巨噬细胞分泌NO、TNF- α 和IL-6具有抑制作用。进一步的研究表明,PHN通过抑制TLR4信号通路抑制巨噬细胞的细胞因子分泌,并且分子对接显示PHN与TLR4蛋白直接有较好的亲和力。另外,PHN在LPS诱导的急性肺损伤模型中显示出良好的体内抗炎活性。结论 PHN可以有效地调控LPS诱导的炎症,其机制可能是阻断TLR4信号通路,从而减少炎性因子的表达。

关键词 连翘苷; 脂多糖; 小鼠巨噬细胞; 急性肺损伤; 炎症因子; 分子对接

中图分类号 R 965.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1093-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.021

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是一种具有高发病率和死亡率的急性炎症性疾病^[1]。ALI直接或间接由肺炎、吸入性损伤、溺水等引起,其临床表现包括肺水肿、呼吸困难、低氧血症^[2]。虽然针对ALI已经进行了很多研究,但到目前为止,还没有发现有效的治疗药物^[3]。越来越多的研究^[4]表明,抑制炎性细胞因子的过度分泌被视为治疗ALI的有

效策略。

连翘是我国40种常用大宗中药材之一,具有抗氧化、保肝、降血脂等多种活性。连翘苷(phillyrin, PHN)为连翘的干燥果实的提取物,是由两分子苯丙素侧链相互连接形成两个环氧结构的一类木脂素。其结构上连桥是多种天然产物单体发挥抗氧化、抗菌和抗炎作用中起着重要基团之一^[5]。基于这一特点,在本研究中使用细胞和动物模型研究PHN抗炎活性和初步分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 PHN购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购自美国Sigma-Aldrich公司;小鼠巨噬细胞RAW264.7作为实验细胞株来自安徽医科大学药学院;PBS缓冲液、培养基(DMEM)和胎牛血清购自美国Thermo Fisher Scientific公司;10% FBS购自以色列Biological Industries公司;一氧化氮(NO)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;白介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒购自杭州联科生物有限公司;一抗购自美国Cell Signaling Technology公司;二抗、TBST、RIPA裂解缓冲液购自上海碧云天生物技术有限公司;PVDF膜购自杭州联科美讯生物医药技术有限公司;酶标仪(型号:MQX200, Bio-Tek);分子对接软件Discovery Studio(型号:2017 R2, BIOVIA Software);其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将RAW264.7细胞在含有10% FBS、100 U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的DMEM中,于37 $^{\circ}$ C下,在含有5% CO₂的培养条件中培养。

1.2.2 炎性细胞因子的测定 将生长状态良好的对数期RAW264.7细胞(细胞密度:6 \times 10⁴个细胞/孔)接种到48孔细胞培养板上,并在培养箱中孵育24 h。弃去培养基,用不同浓度的PHN及阳性对照

2020-04-02 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81700522)

作者单位:¹安徽医科大学药学院,合肥 230032

²中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)药剂科,合肥 230001

作者简介:杨本军,男,主管药师;

徐涛,男,博士,副教授,责任作者, E-mail: xutao@ahmu.edu.cn

药物塞来昔布(celecoxib)预处理细胞1h,然后在LPS(0.5 μg/ml)诱导下温育24h。收集上清液,并使用按照NO试剂盒 Griess 试剂检测NO含量。按照ELISA试剂盒说明书,进行实验操作测定上清液中TNF-α、IL-6细胞因子的分泌水平。

1.2.3 细胞毒性测定 将生长状态良好的对数期RAW264.7细胞(细胞密度:6 × 10³个细胞/孔)接种到96孔细胞培养板上,培养箱中孵育24h。弃去培养基,用不同浓度的PHN及阳性对照药物塞来昔布(10、20、30 μmol/L)预处理细胞1h,然后与LPS(0.5 μg/ml)一起在培养箱中温育24h。通过MTT方法测试细胞活力,具体的方法:弃去培养基,向每个孔中加入MTT溶液(在PBS中5 mg/ml)并在37℃下孵育4h。除去含MTT的培养基,然后加入150 μl 二甲基亚砷(DMSO)溶液,置于摇床上振荡30 min。通过酶标仪在492 nm处检测吸光度,并计算细胞增殖率。

1.2.4 Western blot 检测 将生长状态良好的对数期RAW264.7细胞(细胞密度:3 × 10⁵个细胞/孔)接种到6孔细胞培养板上,然后培养24h。弃去培养基,用不同浓度的PHN(1.25、2.5、5、10 μmol/L)预处理细胞12h,然后与LPS(0.5 μg/ml)一起在培养箱中温育1h后提取细胞总蛋白。用含有PMSF和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液裂解细胞,然后在冰上孵育30 min。通过12% SDS-PAGE分离蛋白质裂解物,随后转移到PVDF膜上。将封闭的膜与指定的一抗(以抗体:5% BSA溶液1:1000稀释)在4℃温育过夜。用TBST洗涤3次后,将膜与HRP偶联的二抗在室温下孵育1h,以GAPDH作为内参。显影并计算光密度值。

1.2.5 分子对接 采用分子对接研究PHN与TLR4之间的潜在相互作用,使用Discovery Studio,软件进行模拟测试。TLR4蛋白(PDB代码:2Z64)的X射线晶体结构获自RCSB蛋白质数据库。将TLR4蛋白晶体结构导入DS软件中,对蛋白结构进行去水、加氢处理,然后利用该软件中的准备蛋白工具对蛋白进行处理。PHN结构进行能量最小化处理。使用CDOCKER模块进行分子对接研究。

1.2.6 体内实验 50只雄性C57BL/6小鼠(体重18~25 g)购自安徽医科大学实验动物中心。将C57BL/6小鼠随机分为5组(n=10),分别对照组(生理盐水)、模型组、PHN低剂量组、PHN中剂量组、PHN高剂量组。对照组小鼠正常饲养,除了对照组外,其余组通过尾静脉注射20 mg/kg LPS。在

注射LPS之前0.5h,PHN低剂量组和PHN高剂量组通过腹腔内注射分别给予浓度为10 mg/kg和20 mg/kg的PHN。在LPS注射后48h对小鼠进行麻醉并处死。收集肺组织并将其固定在4%多聚甲醛溶液中,然后包埋在石蜡中。脱水后用苏木精和伊红(HE)染色切片并进行免疫组织化学染色。该研究经安徽医科大学伦理委员会批准。

1.3 统计学处理 数据分析是由Prism 6及SPSS 16.0统计软件进行统计和分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),两组之间比较采用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PHN抑制LPS诱导的NO释放 用LPS处理RAW 264.7细胞导致炎症因子的分泌,包括NO、IL-6和TNF-α。与空白对照组相比,LPS模型组细胞上清液的NO含量明显增加。PHN作用的细胞上清液中NO含量明显低于LPS模型组。其中,当浓度为10 μmol/L时,PHN对NO释放的抑制率为63.34%;当浓度为20 μmol/L时,抑制率为45.49%(P<0.05)(图1)。

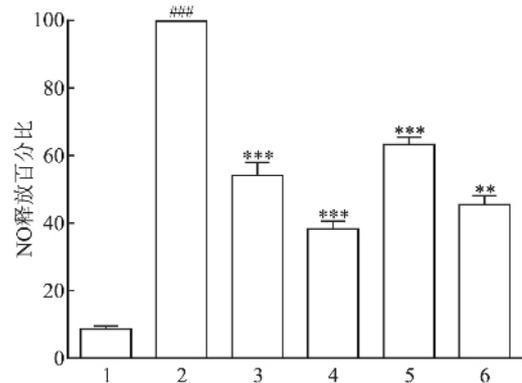


图1 PHN对LPS诱导的RAW264.7细胞中NO释放的抑制率
1: 对照组; 2: 模型组; 3: Cel组(10 μmol/L); 4: Cel组(20 μmol/L); 5: PHN组(10 μmol/L); 6: PHN组(20 μmol/L); 与对照组比较: ###P<0.001; 与模型组比较: **P<0.01, ***P<0.001

2.2 细胞毒性评估 为了避免对NO释放的抑制作用与细胞活力相关,采用MTT测定法检测不同浓度PHN及塞来昔布对细胞活力的影响。如图2,PHN和阳性药物在不同浓度范围内(10、20、30 μmol/L)对细胞增殖无明显抑制作用,细胞存活率均大于95%,不同剂量的PHN组间差异无统计学意义。结果表明PHN的抗炎活性不是由细胞毒作

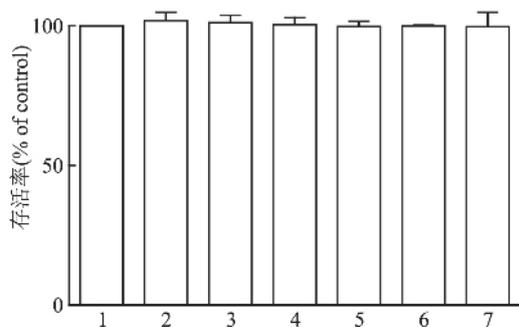


图2 PHN对RAW264.7细胞活力的影响

1: 对照组; 2: Cel 组(10 μmol/L); 3: Cel 组(20 μmol/L); 4: Cel 组(30 μmol/L); 5: PHN 组(10 μmol/L); 6: PHN 组(20 μmol/L); 7: PHN 组(30 μmol/L)

用介导的。因此,PHN 的抗炎作用机制值得进一步探索。

2.3 PHN 抑制 LPS 诱导的细胞因子分泌 用 PHN 进一步评估 LPS 诱导的 TNF-α 和 IL-6 分泌量的影响作用。当予以 0.625、1.25、2.5、5 和 10 μmol/L PHN 时,IL-6 浓度分别降低到(840.66 ± 8.09)、(781.67 ± 13.59)、(644 ± 13.45)、(516.66 ± 44.09)和(452.66 ± 23.56) pg/ml(图3A),TNF-α 浓度分别降低到(2255.67 ± 67.36)、(2037.66 ± 42.31)、(1691.66 ± 13.19)、(1493.66 ± 39.57)和(1294.33 ± 84.68) pg/ml(图3B)。该结果表明 PHN 以浓度依赖性方式降低 IL-6 和 TNF-α 分泌。

2.4 PHN 抑制 LPS 诱导的 TLR4 表达 课题组研究了 TLR4 的表达是否受到 PHN 的调控。如图4所示,LPS(0.5 mg/mL)刺激的 RAW264.7 细胞可显著增强 TLR4 的表达。PHN 通过以浓度依赖性方式抑制了 TLR4 的表达水平。该结果再次证明 PHN 可以抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中的炎症反应。

2.5 PHN 结合 TLR4 的对接分析 为了阐明 PHN 可以抑制炎症细胞因子分泌的机制,通过分子对接来研究 PHN 与 TLR4(PDB 代码:2Z64)之间的结合模式。对接结果显示,PHN 与 TLR4 之间的结合能量最高打分为 440.571 kJ/mol 如图5所示,PHN 通过与 TLR4 上的 THR614 和 ASP619 形成 2 个常规氢键,与 GLU611、SER623、CYS580、ASP619 和 ASN622 形成 7 个碳氢键,以及多个范德华力等。以上结果表明,PHN 与 TLR4 的活性位点稳定结合,两者之间具有较好的亲和力。

2.6 PHN 对 LPS 诱导的 ALI 小鼠的保护作用 通过肺组织切片病理形态学变化评估 PHN 对 LPS

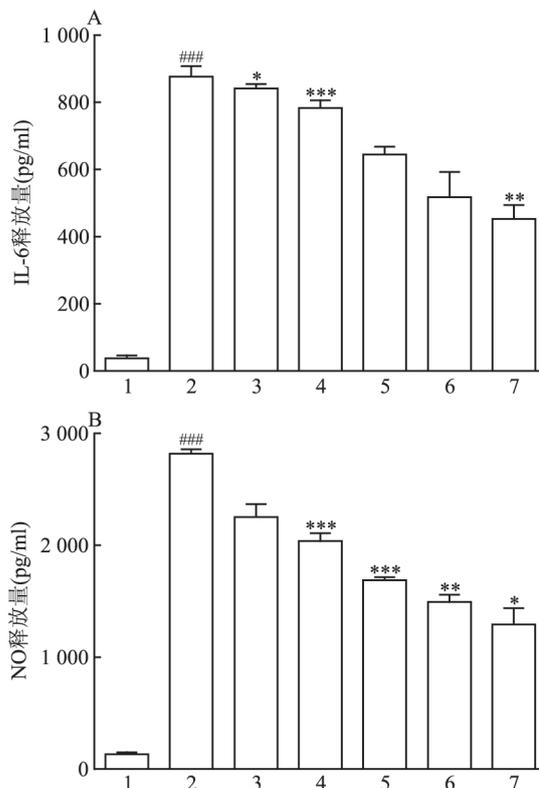


图3 PHN对RAW264.7细胞中LPS诱导的细胞因子分泌量的变化

1: 对照组; 2: 模型组; 3: PHN 组(0.625 μmol/L); 4: PHN 组(1.25 μmol/L); 5: PHN 组(2.5 μmol/L); 6: PHN 组(5 μmol/L); 7: PHN 组(10 μmol/L); 与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

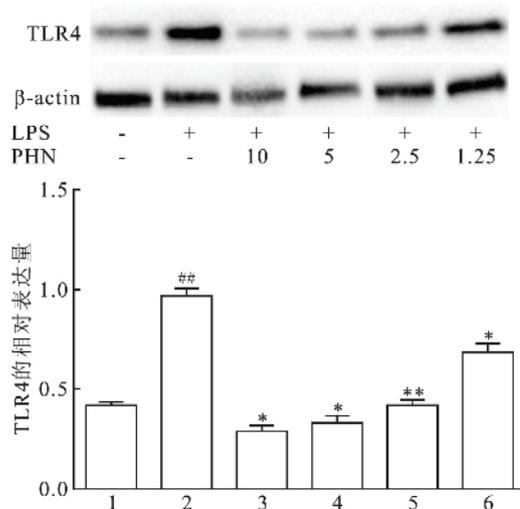


图4 PHN对LPS诱导RAW264.7细胞TLR4蛋白表达水平的影响

1: 对照组; 2: 模型组; 3: PHN 组(10 μmol/L); 4: PHN 组(5 μmol/L); 5: PHN 组(2.5 μmol/L); 6: PHN 组(1.25 μmol/L); 与LPS未刺激细胞比较: ## $P < 0.01$; 与LPS刺激的细胞比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

性因子的分泌有关。因此,PHN 在临床 ALI 的治疗中具有潜在的研究价值。

参考文献

- [1] Xu L, Li Y, Wan S, et al. Protective effects of apocynin nitrone on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in rats [J]. *Int Immunopharmacol* 2014 20(2): 377–82.
- [2] Zhang Z J, Wang X, Ma C Z, et al. Genipin protects rats against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by reinforcing autophagy [J]. *Int Immunopharmacol* 2019 72(3): 21–30.
- [3] 孟雄,王兮,郭芮伶. 辛伐他汀对脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠保护作用及对 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *职业与健康* 2019 35(11): 1470–5.
- [4] 王芳,孙耀贵,尹伟等. 苦参碱联合黄芩苷对 LPS 诱导小鼠肺炎的影响 [J]. *中国药理学通报* 2018 34(8): 1105–9.
- [5] Yang L L, Zhou X G, Huang W J, et al. Protective effect of phillyrin on lethal LPS-induced neutrophil inflammation in zebrafish [J]. *Cell Physiol Biochem* 2017 43(5): 2074–87.
- [6] Richeldi L, Du Bois R M, Raghu G, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2014 370(1): 207182.
- [7] Neudecker V, Brodsky K S, Clambey E T, et al. Neutrophil transfer of miR-223 to lung epithelial cells dampens acute lung injury in mice [J]. *Sci Transl Med* 2017, 408(9): 5360.
- [8] 徐霄,汪洋,王思为等. 衢枳壳黄酮组分抑制脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症反应的作用机制研究 [J]. *中国中医药科技* 2019 26(4): 529–32.
- [9] Chen G, Zhang Y, Liu X, et al. Discovery of a new inhibitor of myeloid differentiation 2 from cinnamide derivatives with anti-inflammatory activity in sepsis and acute lung injury [J]. *J Med Chem* 2016 59(6): 2436–51.
- [10] Wu K, Xiu Y, Zhou P, et al. A new use for an old drug: carmo-fur attenuates lipopolysaccharides(LPS) induced acute lung injury via inhibition of FAAH and NAAA activities [J]. *Front Pharmacol*, 2019 818(10): 1–10.
- [11] 张自丽,胡璇,刘慧莹等. 脂多糖诱导急性肺损伤小鼠肺脏蛋白质电泳图谱分析 [J]. *安徽医科大学学报* 2017 52(5): 670–3.
- [12] Feng G, Sun B, Liu H X, et al. EphA2 antagonism alleviates LPS-induced acute lung injury via Nrf2/HO-1, TLR4/MyD88 and RhoA/ROCK pathways [J]. *Int Immunopharmacol* 2019 72(5): 176–85.

Effect and mechanism of phillyrin on inhibiting inflammation

Yang Benjun^{1,2}, Wu Mingfei¹, Xu Tao¹

¹School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of USTC, Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China (Anhui Provincial Hospital), Hefei 230001]

Abstract Objective To investigate the inhibitory effect and mechanism of phillyrin (PHN) on inflammatory response induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** An LPS-induced mouse macrophage (RAW264.7) inflammatory model was established to study the secretion of inflammatory cytokines and the expression of related proteins. The effects of PHN at different concentrations on the activity of mouse macrophages were detected by MTT assay. The nitric oxide (NO) release was detected by Griess method. The expression levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were detected by ELISA assay. The expression level of TLR4 signaling pathway-associated protein was detected by Western blot. Binding affinity was detected by molecular docking. Furthermore, an acute lung injury (ALI) model induced by LPS *in vivo* was established, and the protective effect of PHN was studied by observing histopathological changes. **Results** PHN had no significant inhibitory effect on cell proliferation in the concentration range below 30 μ mol/L. Furthermore, PHN could inhibit the secretion of NO, TNF- α and IL-6 by LPS-induced macrophage cells. Further studies had shown that PHN inhibited the secretion of cytokines by inhibiting the TLR4 signaling pathway, and molecular docking showed that PHN had a strong affinity with TLR4 protein. In addition, PHN showed good function *in vivo* anti-inflammatory activity in an LPS-induced ALI model. **Conclusion** PHN can effectively regulate LPS-induced inflammation, which may be through blocking the TLR4 signaling pathway to reduce the expression of inflammatory cytokines.

Key words phillyrin; lipopolysaccharide; RAW264.7; acute lung injury; inflammatory cytokines; molecular docking