

杨卉卉, 沈金花, 刘庆华, 等. 千里光石油醚提取物对 LPS 激活的炎症反应的抑制效应[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(6): 187-191.  
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.06.025

# 千里光石油醚提取物对 LPS 激活的炎症反应的抑制效应

杨卉卉, 沈金花, 刘庆华, 彭勇波

中南民族大学生命科学院/武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 武汉 430074

**摘要** 以千里光石油醚提取物(PEESS)为材料,以脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞为炎症模型,通过 CCK-8 法检测细胞增殖、Griess 法检测一氧化氮(NO)含量、RT-PCR 法检测炎症相关因子的表达,及 Western blot 法检测炎症关键转录激活因子的活化,研究 PEESS 的抗炎作用及可能的分子机制。结果显示,0~80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PEESS 对巨噬细胞增殖无明显影响,但能显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 的分泌,并呈浓度依赖性;炎症相关因子基因 mRNA 表达检测结果显示:PEESS 能显著抑制 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞炎症模型中 *IL-1 $\beta$*  及 *IL-6* 的表达;同时,PEESS 还显著降低了 NF- $\kappa\text{B}$  p65 及 p44/p22 MAPK 蛋白的磷酸化水平。以上结果表明,千里光石油醚提取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型具有较好的抗炎效应,其作用发挥可能与其抑制 NF- $\kappa\text{B}$  和 MAPK 信号通路的活化以及 NO、*IL-1 $\beta$*  和 *IL-6* 等炎症介质的分泌有关。

**关键词** 千里光; 脂多糖; 巨噬细胞; 炎症反应; RAW264.7 细胞; 炎症介质; 抗炎活性成分; 体外抗炎  
**中图分类号** R 282.710.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)06-0187-05

炎症反应是机体抵御外界刺激的一种重要防御机制,适当的炎症反应对机体有保护作用,但过度的炎症反应可引发级联放大效应并造成全身炎症反应综合征(SIRS)甚至危及患者的生命<sup>[1]</sup>。巨噬细胞是机体病理性炎症过程的主要免疫细胞之一<sup>[2]</sup>,其异常激活能通过响应炎症应答信号,产生大量炎症因子并引发炎症介质的级联释放,从而诱导组织损伤,甚至多功能器官的衰竭等<sup>[3]</sup>。因此,调控巨噬细胞炎症应答对抗炎及炎症相关疾病的治疗具有重要意义。目前,针对炎症主要采用抗生素治疗,但抗生素的长期使用会产生抗药性、降低机体免疫力并加重肝肾损伤等。因此,从天然中草药中筛选具有显著抗炎效果、安全无毒并且价格低廉的药物已经成为当前动物养殖中开发抗生素替代药物的热点方向之一。

千里光(*Senecio scandens* Buch.-Ham.)为菊科千里光属多年生草本植物,在我国西藏、陕西及南方多省均有广泛分布,是我国常用的一味传统中药材,临床上多用于急性炎症性疾病的治疗。对千里光现代药理学研究表明,其主要含有鞣质、黄酮、酚酸、挥发

油、生物碱及萜类等生物活性成分,并主要具有抗炎、抑菌、抗氧化、抗癌及抗病毒等多种药理学作用<sup>[4-5]</sup>。

近年来,千里光因其广泛的药用价值而得到越来越多学者的关注<sup>[4,6]</sup>,但目前有关千里光对巨噬细胞炎症调控作用及机制的研究还未见报道。鉴于千里光具有抗炎作用及能治疗多种炎症性疾病的特性,本研究以千里光石油醚提取物(petroleum ether extract of *Senecio scandens*, PEESS)为材料,通过 CCK-8 法检测细胞增殖、Griess 法检测 NO 含量、RT-PCR 法及 Western blot 法检测炎症相关因子表达,综合探讨了千里光的抗炎作用及可能的分子机制,旨在为将其用于动物炎症性疾病的治疗及替代动物养殖中抗生素的使用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

千里光干燥全草购于北京同仁堂武汉药店,产地:湖北。称取经粉碎的千里光细粉 500 g,10 倍水 3 次加热回流煎煮后合并滤液并旋蒸浓缩,再经石

收稿日期: 2020-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371307)

杨卉卉, 硕士研究生. 研究方向: 抗炎中草药药理活性分析. E-mail: 507547329@qq.com

通信作者: 彭勇波, 博士, 副教授. 研究方向: 疾病相关基因功能研究. E-mail: 30952054@qq.com

油醚萃取后旋蒸浓缩提取获得千里光石油醚提取物(浸膏状)并用 PBS 配制为 10 mg/mL 的储存液低温保存备用。小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 购于武汉 CCTCC 细胞库。

## 1.2 主要药物及试剂

胎牛血清(ScienCell, 美国); DMEM 培养基、青霉素-链霉素、0.25% 胰酶(Hyclone, 美国); 脂多糖(Sigma, 美国); CCK-8 试剂盒、反转录试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司); 总 RNA 快速提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司); RIPA 裂解液、总 NO 检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、化学发光显影液 ECL Plus(上海碧云天生物技术有限公司); 蛋白酶抑制剂 Cocktail(Bimake, 美国); NF- $\kappa$ B p65、MAPK p44/p22 及其磷酸化抗体、 $\beta$ -actin 抗体(Cell Signaling Technology, 美国);  $2 \times Pfu$  PCR Master Mix(北京康为世纪生物技术有限公司)。

## 1.3 细胞培养与分组处理

将生长状态良好的 RAW264.7 细胞以  $2 \times 10^4$ /孔的密度接种于 12 孔板, 每孔加 1 mL 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 4 h 后, 将细胞随机分为 5 组, 即对照组(细胞+培养基)、LPS 组(1  $\mu$ g/mL 的 LPS+细胞)、试验组(PEESS+1  $\mu$ g/mL LPS+细胞), 每组 5 个重复, PEES 预处理 RAW264.7 细胞质量浓度分别为 20、40、80  $\mu$ g/mL, 处理 20 h 后, 添加终质量浓度为 1  $\mu$ g/mL 的 LPS 刺激细胞。

## 1.4 CCK-8 法检测 PEES 对 RAW264.7 的细胞毒性

制备单细胞悬液( $2 \times 10^4$  个/mL), 100  $\mu$ L/孔接种于 96 孔板中, 培养 12 h, 再用不同质量浓度的 PEES(20、40 和 80  $\mu$ g/mL)处理细胞, 24 h 后向每个孔中添加 10% CCK-8, 继续培养 2 h, 然后用酶标仪在 450 nm 处测量每个孔中细胞的 OD 值。细胞活性 =  $(OD_{加药} - OD_{空白}) / (OD_{对照} - OD_{空白}) \times 100\%$ 。

## 1.5 Griess 法检测细胞 NO 的分泌

制备单细胞悬液( $5 \times 10^4$  个/mL), 100  $\mu$ L/孔接种于 96 孔板中, 培养 12 h。分组处理细胞后, 取细胞上清液 50  $\mu$ L/孔按 NO 检测试剂盒实验流程操作, 然后在 540 nm 处测定 OD 值, 根据标准曲线计算得到细胞分泌的 NO 含量。

## 1.6 RT-PCR 法检测炎症相关基因表达

获得细胞后, 用 Trizol 裂解提取 RNA, 再反转录得到 cDNA 用于实时荧光定量 PCR, 以  $\beta$ -actin

为内参, 目的基因为 *IL-1 $\beta$*  和 *IL-6*。其中, 引物序列: *IL-1 $\beta$*  上游 5'-TCTGTCATTCGCTCCCCACAT-3', 下游 5'-AGAGAGCACACCAGTCCAAA-3'; *IL-6* 上游 5'-TCCAGAAACCGCTATGAAGTTC-3', 下游 5'-CACCAGCATCAGTCCCAAGA-3'。

## 1.7 Western blot 法检测细胞 NF- $\kappa$ B 及 MAPK 通路表达

用含有磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解 RAW264.7 细胞, 每隔 15 min 振荡 1 次, 共 4 次。然后在 4 °C 和 12 000 r/min 下离心 15 min。用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定所得蛋白质的浓度。随后, 进行电泳, 将分离的蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜上, 并在封闭溶液中封闭 1 h, 然后在 4 °C 与一抗(1 : 1 000)孵育过夜。之后, 将膜与二抗(1 : 4 000)在 25 °C 孵育 1 h。用增强的化学发光试剂检测蛋白质水平, 并使用 Image J 凝胶分析软件对蛋白条带强度进行定量。

## 1.8 数据分析

试验数据以平均值  $\pm$  标准差( $n=3$ )表示。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式计算 RT-PCR 结果。使用 SPSS 22.0、GraphPad Prism 6.0 处理数据和绘图,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

# 2 结果与分析

## 2.1 PEES 对 RAW264.7 细胞生长的影响

为排除 PEES 细胞毒性对细胞免疫应答的影响, 分别用终质量浓度为 20、40、80  $\mu$ g/mL 的 PEES 处理细胞, 24 h 后使用 CCK-8 测定法测定 PEES 对 RAW264.7 细胞生长的影响。结果显示, 利用 0~80  $\mu$ g/mL 质量浓度范围内的 PEES 处理 RAW264.7 细胞时, 与正常对照组相比, 细胞生长无明显变化(图 1), 这表明 0~80  $\mu$ g/mL 质量浓度可用于后续实验。

## 2.2 PEES 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 NO 分泌量的影响

通过测定细胞 NO 分泌量检测 PEES 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞炎症应答的调控作用, 结果如图 2 所示, 与无 LPS 刺激的空白对照组相比, LPS 刺激 RAW264.7 可显著提升 NO 的分泌水平( $P < 0.01$ ); 而与 LPS 处理组相比, 不同浓度的 PEES 则能显著抑制 NO 的分泌, 呈现明显的浓度依赖性( $P < 0.01$ )。

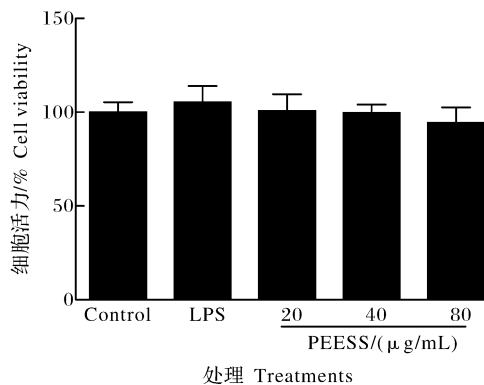
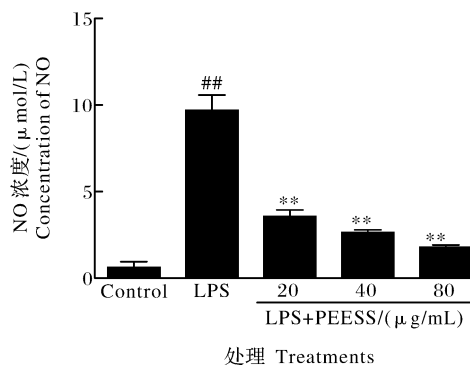


图 1 PEESS 处理后 RAW264.7 细胞活性

Fig.1 Viability of RAW264.7 cells after treating by PEESS



## 代表与对照组比较,  $P < 0.01$ ; \* 代表与 LPS 刺激组比较,  $P < 0.01$ 。下同。## means comparing with control,  $P < 0.01$ ; \* means comparing with LPS treated-group,  $P < 0.01$ . The same as below.

图 2 PEESS 处理后 RAW264.7 细胞炎症模型 NO 分泌的变化

Fig.2 Effect of PEESS on NO level in LPS-stimulated RAW264.7 cells

### 2.3 PEESS 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞炎症相关基因 mRNA 表达的影响

采用 RT-PCR 检测炎症相关基因的表达, 结果如图 3 和图 4 所示, 与无 LPS 刺激对照组比较, LPS 刺激 RAW264.7 细胞 24 h 能显著提高炎症因子  $IL-1\beta$  和  $IL-6$  的表达 ( $P < 0.01$ ); 而与 LPS 组比较, 20、40、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PEESS 则能显著抑制 LPS 刺激的上述 2 种炎症因子的表达, 并呈现出明显的浓度依赖性 ( $P < 0.05$ )。表明 PEESS 具有较好的体外抗炎特性, 其抗炎机制很可能与其抑制炎症因子表达有关。

### 2.4 PEESS 对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 NF- $\kappa$ B、MAPK 途径的影响

NF- $\kappa$ B、MAPK 信号通路是炎症反应的重要调控信号通路, 为了进一步证实 PEESS 可能的抗炎机

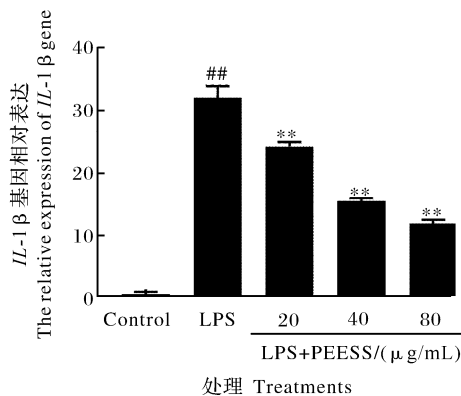
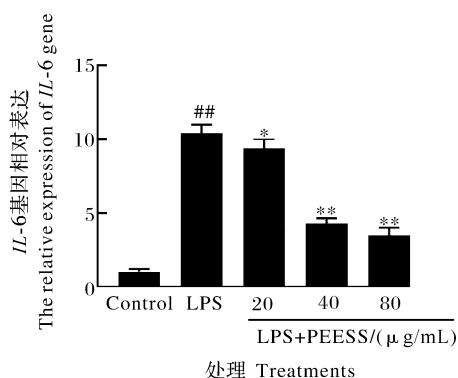


图 3 PEESS 处理后 RAW264.7 细胞炎症模型  $IL-1\beta$  基因表达水平的变化

Fig.3 Effect of PEESS on LPS-induced  $IL-1\beta$  mRNA expression levels in RAW264.7 cells



## 代表与对比较,  $P < 0.01$ ; \* 代表与 LPS 组比较,  $P < 0.05$ ; \*\* 代表与 LPS 组比较,  $P < 0.01$ 。## means comparing with control,  $P < 0.01$ ; \* means comparing with LPS treated-group,  $P < 0.05$ ; \*\* means comparing with LPS treated-group,  $P < 0.01$ .

图 4 PEESS 处理后 RAW264.7 细胞炎症模型  $IL-6$  基因表达水平的变化

Fig.4 Effect of PEESS on  $IL-6$  mRNA expression levels in LPS-stimulated RAW264.7 cells

制, 采用 Western blot 法检测 PEESS 对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞 NF- $\kappa$ B p65 和 MAPK p44/42 蛋白表达及磷酸化水平, 结果如图 5 所示, LPS 处理细胞 24 h 能显著提高 p65 和 p44/42 蛋白的磷酸化水平 ( $P < 0.01$ ); 而与 LPS 组比较, PEESS 则显著下调了 p65 与 p44/42 蛋白的磷酸化水平 ( $P < 0.01$ ), 并对 p44/42 蛋白的磷酸化水平的抑制作用呈现明显剂量依赖性。上述结果说明 PEESS 可抑制 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 NF- $\kappa$ B、MAPK 通路的活化, 并呈现一定的剂量依赖性。

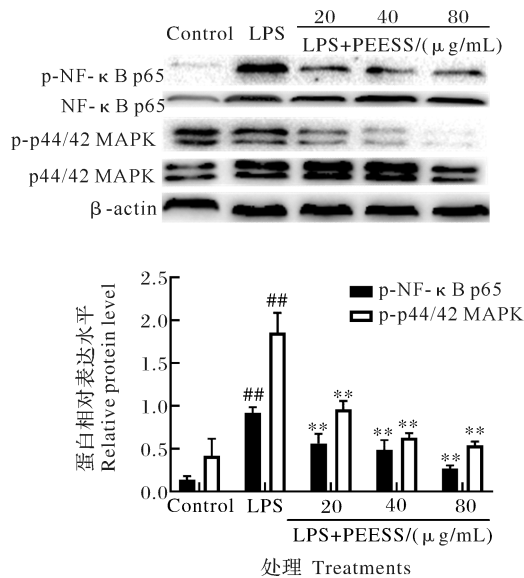


图 5 PEESS 处理后 RAW264.7 细胞炎症模型 NF-κB 和 MAPK 通路相关蛋白磷酸化水平的变化

Fig.5 Effect of PEESS on the phosphorylation level of NF-κB and MAPK pathway relative proteins in LPS-stimulated RAW264.7 cells

### 3 讨论

传统用药和临床上,千里光可用于治疗眼部感染、风寒发热、尿路感染、滴虫性阴道炎及荨麻疹等<sup>[6]</sup>,提示其具有良好的抗炎作用。为进一步探讨博达的千里光抗炎作用及潜在的机制,本研究在千里光石油醚部提取基础上,以 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型为材料,检测了千里光石油醚提取物的体外抗炎作用和抗炎机制。

巨噬细胞是免疫系统中的一道重要防线,在炎症发生过程中至关重要<sup>[7]</sup>。LPS 刺激小鼠来源的巨噬细胞 RAW264.7 可诱导和激活细胞免疫应答,释放 NO 这一重要的炎症介质,并分泌如 *IL-1β*、*IL-6* 和 *TNF-α* 等在内的促炎因子,从而诱发细胞损伤,促进炎症反应<sup>[8]</sup>。在本研究中,与单纯 LPS 刺激组细胞比较,添加 PEESS 能显著抑制 NO 的分泌及炎症因子 *IL-1β* 和 *IL-6* 的表达水平,这不仅表明 PEESS 可能通过降低炎症介质释放和促炎细胞因子的表达从而发挥体外抗炎作用,也与千里光对炎症性疾病具有较好的治疗作用的报道一致<sup>[6]</sup>。同时,我们也通过 CCK-8 检测其对细胞增殖毒性的影响排除了千里光提取物的抗炎作用不是依赖于其对 RAW264.7 细胞的毒性效应而发挥影响作用。

在 LPS 刺激的细胞炎性应答机制中,LPS 通过

Toll 样受体家族成员 TLR4 的介导<sup>[9]</sup>,激活 NF-κB 和 MAPK 信号通路,从而调控 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的免疫反应<sup>[10]</sup>。为了进一步阐明 PEESS 是否通过影响上述信号通路发挥抗炎作用,本研究进一步检测了 PEESS 对 NF-κB 和 MAPK 信号通路关键信号蛋白表达的影响。NF-κB 是连接炎症的关键因子<sup>[11]</sup>,由 p65/RelA、p50、p52、RelB 和 c-Rel 亚基组成,其中 p65 磷酸化是介导炎症最关键的一步<sup>[12]</sup>。另一方面,MAPK 信号通路可激活 AP-1 转录因子从而诱导促炎细胞因子的表达分泌<sup>[13]</sup>,在 LPS 诱导的促炎信号转导中同样发挥重要作用<sup>[14]</sup>。本研究的结果表明,PEESS 可显著地抑制 NF-κB 和 MAPK 信号通路中 p65 及 p44/42 蛋白的磷酸化水平,从而发挥抗炎的作用。

综上,PEESS 具有良好的抗炎效应,其作用机制可能是通过抑制促炎信号通路 NF-κB 和 MAPK 通路中 p65 及 p44/42 蛋白的磷酸化,从而抑制促炎细胞因子 *IL-1β*、*IL-6* 等的表达和分泌,但有关上述信号通路相互之间作用,尤其是千里光中具体抗炎活性成分的鉴定还有待进一步的研究。

### 参考文献 References

- [1] ISMAIL J, SANKAR J. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis - an ever-evolving paradigm[J]. *Indian J Pediatr*, 2015, 82(8): 675-676.
- [2] OISHI Y, MANABE I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration[J]. *Int Immunol*, 2018, 30(11): 511-528.
- [3] HAMIDZADEH K, CHRISTENSEN S M, DALBY E, et al. Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation[J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 567-592.
- [4] 徐定平, 周鑫堂, 郜红利, 等. 千里光化学成分和药理作用研究进展[J]. *中国药师*, 2014, 17(9): 1562-1565. XU D P, ZHOU X T, GAO H L, et al. Study progress in chemical constituents and pharmacological effects of *Senecio scandens* Buch.-Ham. [J]. *China pharmacist*, 2014, 17(9): 1562-1565 (in Chinese with English abstract).
- [5] LIU F, NG T B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs[J]. *Life Sci*, 2000, 66(8): 725-735.
- [6] 罗伦. 千里光的临床使用情况分析[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2019(38): 168. LUO L. Analysis of the clinical use of *Senecio scandens* Buch.-Ham. [J]. *Electronic journal of clinical medical literature*, 2019(38): 168 (in Chinese).
- [7] RIVERA A, SIRACUSA M C, YAP G S, et al. Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(4): 356-363.

- [8] SUSCHEK C V, SCHNORR O, KOLB-BACHOFEN V. The role of iNOS in chronic inflammatory processes *in vivo*: is it damage-promoting, protective, or active at all? [J]. *Curr Mol Med*, 2004, 4(7): 763-775.
- [9] NATIVEL B, COURET D, GIRAUD P, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides act exclusively through TLR4 with a resilience between mouse and human[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15789 [2020-04-20]. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-16190-y>. DOI: 10.1038/s41598-017-16190-y.
- [10] WU H, ZHAO G, JIANG K, et al. Plantamajoside ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via suppressing NF-kappaB and MAPK activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 35: 315-322.
- [11] LIU T, ZHANG L, JOO D, et al. NF-kappaB signaling in inflammation[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2017, 2: 17023 [2020-04-20]. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- [12] CHEN L F, GREENE W C. Shaping the nuclear action of NF-kappaB[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(5): 392-401.
- [13] DING M, ZHAO J, BOWMAN L, et al. Inhibition of AP-1 and MAPK signaling and activation of Nrf2/ARE pathway by quercitrin[J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(1): 59-67.
- [14] BLUM Y, MIKELSON J, DOBRZYNSKI M, et al. Temporal perturbation of ERK dynamics reveals network architecture of FGF2/MAPK signaling[J/OL]. *Mol Syst Biol*, 2019, 15(11): e8947 [2020-04-20]. <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/msb.20198947>.

## Anti-inflammatory effect of petroleum ether extract from *Senecio scandens* on LPS-stimulated RAW264.7 cells

YANG Huihui, SHEN Jinhua, LIU Qinghua, PENG Yongbo

*School of Life Sciences/ Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plant Germplasm in Wuling Area of China, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China*

**Abstract** In order to explore the anti-inflammatory effect and its underlying mechanism of *Senecio scandens*, petroleum ether extract of *S. scandens* (PEESS) was used to treat the lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cell. The cell proliferation was detected by CCK-8, the secretion of NO was detected by Griess method, and the expression of inflammation-associated factors was detected by RT-PCR and Western blot. The results showed that PEES at 0-80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  had no significant effect on the proliferation of RAW264.7. However, it significantly inhibited the secretion of NO in LPS induced RAW264.7 cells by a concentration-dependent manner. Besides, the expression of *IL-1 $\beta$*  and *IL-6* was significantly inhibited by PEES in LPS induced RAW264.7 cells. Meanwhile, PEES also significantly reduced the expression of p-NF- $\kappa\text{B}$  p65 and p-p44/p22 MAPK proteins. In conclusion, the above results indicated that PEES may participate in the process of anti-inflammatory response by inhibiting the expression of some pro-inflammatory mediators such as NO, *IL-1 $\beta$*  and *IL-6*, and the activation of the NF- $\kappa\text{B}$  and MAPK signaling pathways. This study lays a foundation for the application of *S. scandens* in curing some inflammatory disease of animals.

**Keywords** *Senecio scandens*; lipopolysaccharide; macrophage; inflammation reaction; RAW264.7 cells; inflammatory mediators; anti-inflammatory active ingredient; anti-inflammation *in vitro*

(责任编辑:边书京)