

闫普普,朱君,刘佳丽,等.黄芩苷对脂多糖诱导的小鼠炎症的保护作用[J].华中农业大学学报,2024,43(5):224-233.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.05.025

黄芩苷对脂多糖诱导的小鼠炎症的保护作用

闫普普,朱君,刘佳丽,黄永熙,余捷,汤锋,郭利伟

长江大学动物科学技术学院,荆州 434000

摘要 为进一步明晰黄芩苷(BCN)对脂多糖(LPS)诱导的小鼠炎症损伤的缓解作用机制,采用体内体外试验结合,体外试验采用LPS建立RAW264.7细胞炎症模型,测定细胞吞噬能力、一氧化氮释放、炎症细胞因子及TGF- β /SMAD2通路相关mRNA表达;体内试验采用不同浓度的黄芩苷对BALB/c小鼠连续7 d灌胃后腹腔注射LPS建立炎症模型,测定小鼠脾脏指数、T细胞亚群及免疫平衡,RT-qPCR法测定脾脏炎症细胞因子和TGF- β /SMAD2通路相关基因的mRNA表达。结果显示:黄芩苷在0~25 μ g/mL范围内对RAW264.7增殖无抑制作用,LPS质量浓度为1 mg/mL时,细胞存活率为54.55%。不同质量浓度黄芩苷均可增强RAW264.7细胞的吞噬能力($P<0.05$),降低NO释放($P<0.05$);LPS刺激后炎症细胞因子mRNA表达上升($P<0.05$),TGF- β 和SMAD2表达下降,黄芩苷干预后上述mRNA表达得到逆转。此外,LPS处理后小鼠脾脏指数显著上升($P<0.05$),不同剂量的黄芩苷组均改善这一情况($P<0.05$)。黄芩苷能够改善LPS刺激的CD4⁺细胞与CD8⁺细胞的分化,降低CD4⁺/CD8⁺,同时,黄芩苷可恢复LPS刺激的Th17/Treg平衡轴失衡。结果表明,黄芩苷对LPS诱导的小鼠炎症具有缓解作用,其作用机制可能与TGF- β /SMAD2信号通路激活、抑制炎症因子的表达及恢复Th17/Treg平衡轴有关。

关键词 黄芩苷;脂多糖;免疫调节;TGF- β /SMAD2;T细胞分化

中图分类号 S859.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)05-0224-10

在畜禽养殖产业中,由于饲养管理不当、畜禽养殖条件差引起的细菌入侵是炎症性疾病产生的重要因素^[1],细菌在动物体内生长繁殖和死亡过程中能够产生大量内毒素——脂多糖(lipopolysaccharides, LPS),LPS可通过结合宿主细胞膜表面的Toll样受体TLR4引起机体炎症反应,从而影响畜禽生理健康,降低养殖效益^[2]。Soria等^[3]研究表明,细菌在感染家畜家禽后能够影响其生产性能,包括养殖效率低下、家禽输卵管炎、腹膜炎、呼吸道相关疾病等一系列炎症反应,表现为血浆中IL-6、IL-2及干扰素 γ 等炎症细胞因子含量升高,从而造成机体免疫力和肠道消化与吸收功能降低。目前,细菌入侵带来的畜禽炎症性疾病在临床上仍依靠抗生素作为常规防治手段,但抗生素滥用不仅影响动物自身肠道微生物平衡,还会造成耐药菌株的出现,药物残留同样也威胁了人类的生命安全^[4]。因此,如何绿色有效防治炎症性疾病、提高生产性能,仍然是当前养殖业亟待

解决的问题。

黄芩苷(baicalin, BCN)是从黄芩中提取的一种黄酮类有效活性成分。研究表明,黄芩苷具有抗炎、抑菌和免疫增强效果^[5],可通过抑制TNF/ $\text{NF-}\kappa\text{B}$ /MAPK等信号通路的激活,缓解动物机体自身和细胞的炎症反应^[6]。在抑菌试验中,黄芩苷可以通过破坏革兰氏阴性细菌的细胞壁,导致蛋白质外泄,从而发挥其抑菌和杀菌性能^[7],此外,黄芩苷还可以通过调节炎症因子的表达和T淋巴细胞亚群水平来增强机体免疫效果^[8]。

TGF- β /SMAD2信号通路调节许多细胞反应,包括细胞分化、增殖和凋亡^[9]。该通路与免疫调控和炎症反应紧密相关,研究表明,TGF- β /SMAD2的激活能提升IL-17和TNF- α 的比例,导致机体炎症损伤,促使Treg/Th17平衡轴向Th17偏移造成免疫异常^[10]。TGF- β 可以诱导CD4⁺T细胞分化为Treg细胞亚型,并且与IL-6的联合作用下,诱导CD4⁺T细

收稿日期:2023-12-11

基金项目:国家自然科学基金项目(31602099);湿地生态与农业利用教育部工程研究中心开放基金项目(KFT202306)

闫普普,E-mail:1945885627@qq.com

通信作者:郭利伟,E-mail:guolw@yangtzeu.edu.cn

胞向 Th17 细胞亚型分化,此外, $TGF-\beta$ 可以通过 $TGF-\beta$ 受体(transforming growth factor- β receptor, $T\beta R$)激活受体调节型 $SMAD2$ 并将信号转导至细胞核内,调控靶基因维 A 酸相关孤儿受体 $\gamma(ROR\gamma t)$ 和 $Foxp3$ 的转录,进而发挥免疫调节作用^[11]。当前,关于黄芩苷调控 $TGF-\beta/SMAD2$ 信号通路和免疫平衡的报道较少。本研究采用体内体外试验结合,探讨黄芩苷通过免疫调节和 $TGF-\beta/SMAD2$ 缓解 LPS 诱导的小鼠炎症反应的作用机制,旨在为中药兽药的开发和临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

RAW264.7 小鼠巨噬细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司),RPMI-1640 培养基,胎牛血清,0.25% EDTA 胰酶(Gibco,赛默飞世尔科技(中国)有限公司),黄芩苷(纯度 $\geq 98\%$,上海源叶生物有限公司),DMSO(纯度 $>99.5\%$,北京索莱宝科技有限公司),LPS(纯度 $\geq 98\%$,北京索莱宝科技有限公司),一氧化氮含量检测试剂盒(S0021S,碧云天生物技术有限公司),总 RNA 提取试剂盒(R1200,北京索莱宝科技有限公司),cDNA 逆转录酶(RK20428,武汉爱博泰克生物有限公司),Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix(RK21204,武汉爱博泰克生物有限公司),FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Kit、CD3e、CD4、CD8a 抗体(美国 BD 生物公司)。

细胞培养箱(MCO-15AC,日本三洋电机有限公司),多功能酶标仪(SpectraMax iD3,美谷分子仪器有限公司),RT-qPCR 仪(CXT96,伯乐生命医学(上海)产品有限公司),BD FACSAria™ Fusion 细胞分选仪(美国 BD 生物公司)。

1.2 细胞试验

1)RAW264.7 细胞活力的测定。将 RAW264.7 细胞培养于 RPMI-1640 完全培养基(89% RPMI-1640+10% 胎牛血清+1% 青霉素-链霉素)中,接种 96 孔板,待细胞贴壁弃上清,使用 DMSO 溶解黄芩苷^[12],并使用 RPMI-1640 基础培养基分别稀释至 1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50 及 100 $\mu\text{g/mL}$,同时将 LPS 分别稀释为质量浓度 0.125、0.25、0.5、1、2 及 4 mg/mL ,采用 CCK-8 法测定细胞活力。

2)RAW264.7 细胞吞噬能力的测定。参考易首利等^[13]的方法进行。

3) RAW264.7 细胞 NO 释放的测定。将

RAW264.7 细胞接种 6 孔板,设置分组并培养 24 h 后取上清,3 000 r/min 离心 10 min,按照试剂盒制造商提供的说明书检测 NO 含量。

4)细胞炎症因子及 $TGF-\beta/SMAD2$ 信号通路相关 mRNA 表达水平的测定。消化收集细胞,使用 RNA 提取试剂盒进行总 RNA 提取,随后使用 Ab-conal 提供的试剂说明书进行逆转录。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析并计算目的基因 mRNA 相对表达量。所有引物由 Primer 5 软件设计并由上海生工生物有限公司合成,引物序列见表 1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequences	基因编号 Gene ID
β -actin	F:GGAAGGAGGGCTGGAAGAG	11461
	R:AGGAAGGAGGGCTGGAAGAG	
iNOS	F:CAAGCACATTGGAATGGAGA	18126
	R:CAGAACTGAGGGTACATGCTGGAG	
IL-1	F:TGACGGACCCCAAAAGAT	111343
	R:GTGATACTGCCTGCCTGAAG	
IL-6	F:AGCCAGAGTCCTTCAGAGAG	16193
	R:GCCACTCCTTCTGTGACTCC	
IL-10	F:ACCCGTGGCTTCTAGTGCTGA	16153
	R:GAAGGCAGTCCGCAGCTCTA	
$TGF-\beta$	F:GCCACTGCCCATCGTCTACT	21083
	R:CACTTGCAGGAGCGCACAAT	
SMAD2	F:ATGTCGTCCATCTTGCCATTC	17126
	R:AACCGTCCTGTTTCTTTAGCTT	
IL-17	F:GCTCCAGAAGGCCCTCAGAC	16171
	R:CGGCACTGAGCTTCCCAGAT	
IL-22	F:CAGCCATGATCAGCCTCCCA	50929
	R:TAGAGCTGGCTCCCTGGACA	

1.3 动物实验

1)实验动物分组与试验设计。雄性 BALB/c 小鼠 55 只,体质量为(20 \pm 2) g,6~8 周龄,购自三峡大学动物实验中心,实验动物许可证号:SCXK(鄂)2022-0012,动物实验伦理经长江大学医学部审核批准(YJ202346)。在长江大学动物科学技术学院提供的标准动物房中饲养,环境条件为湿度(55 \pm 5)%、温度(23 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,明暗周期为 12 h/12 h,试验开始前适应性饲喂 1 周。使用 10% DMSO 溶液配制 1 g/mL 黄芩苷母液,并使用生理盐水稀释 DMSO 终含量为 1%。

将 55 只小鼠随机分为 5 组^[14]:组 1(0.9% NaCl)、组 2(BCN, 0 mg/kg)、组 3(BCN-L, 50 mg/kg)、组 4(BCN-M, 100 mg/kg)及组 5(BCN-H, 200 mg/kg),

每组11只,每日采用灌胃方式饲喂200 μL 黄芩苷溶液,连续饲喂1周后立即腹腔注射200 μL LPS溶液建立急性炎症模型,6 h后称体质量并记录。随后颈椎脱位处死,采集脾脏组织,PBS润洗并吸干水分,称取小鼠脾脏质量,计算脾脏脏器系数。

2) T细胞分化的测定。剪切新鲜脾脏,置于孔径200 μm 的滤网研磨,RPMI-1640冲洗收集滤液,4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min离心5 min,弃上清。加入500 μL 红细胞裂解液静置2 min后离心5 min,弃上清,1 mL RPMI-1640完全培养基混匀重悬。使用孔径48 μm 灭菌尼龙膜过滤,即得T细胞原液。取少量T细胞悬液使用RPMI-1640基础培养基稀释至 1×10^6 个/mL。加入CD8a抗体、CD4抗体、CD3e抗体(所有抗体使用PBS按说明书提供比例稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育,30 min后使用PBS洗涤2次并离心弃上清,加入300 μL PBS重悬细胞后上机检测。

3) 调节性T细胞Treg细胞的测定。取T细胞原液,加入CD4抗体和CD25抗体表面染色30 min;加入100 μL PBS重悬,并立即加入转录因子固定破核剂500 μL ,避光孵育50 min;收集细胞,加入10 μL Foxp3-APC抗体再次孵育50 min,随后加入300 μL PBS重悬细胞,混匀后上机检测。

4) 辅助性T细胞Th17的测定。取T细胞原液,每管加入刺激阻断剂100 μL ,细胞培养箱中刺激培养6 h,加入100 μL PBS重悬细胞,随后加入10 μL CD4抗体,避光孵育30 min,孵育结束弃上清;加入1 mL固定破膜剂重悬细胞,孵育1 h弃上清,使用 $1 \times \text{Perm}/\text{Wash}$ 重悬细胞。最后用IL-17A-APC

(Th17)抗体进行胞内染色,定容至300 μL 混匀后上机。

5) 相关mRNA的表达水平检测。利用总RNA提取试剂盒从小鼠脾脏中提取总RNA,使用逆转录试剂盒合成cDNA,储存在 -20°C 备用。RT-qPCR检测IL-1、TNF- α 、IL-17、IL-22、TGF- β 及SMAD2的mRNA表达水平,引物见表1。

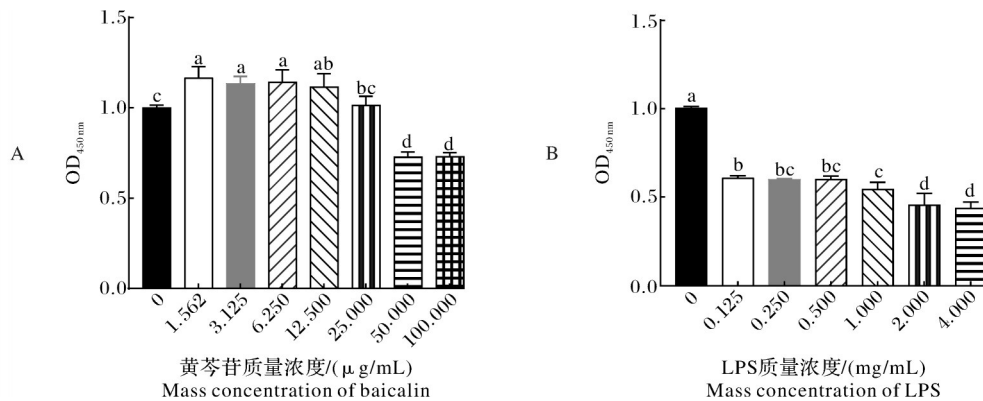
1.4 数据处理

流式细胞术下机数据采用Flow Jo V10.0软件进行分析和统计,试验数据采用IBM SPSS 25.0进行单因素方差分析,采用Duncan's检验确定各组间的显著性差异。使用GraphPad Prism 8.0进行绘图。各组试验数据均以“平均值 \pm 标准差”(Mean \pm SD)表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 黄芩苷和LPS处理RAW264.7细胞的安全浓度

黄芩苷和LPS对RAW264.7细胞增殖的影响如图1所示。由图1可见,在0~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,不同质量浓度的黄芩苷对RAW264.7细胞增殖无抑制作用,并且在一定程度上能够促进细胞增殖。当黄芩苷质量浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞活力明显下降($P < 0.05$)。与0 mg/mL相比,当LPS质量浓度为1 mg/mL时,细胞活力显著下降($P < 0.05$),存活率为54.55%。因此,选择黄芩苷质量浓度分别为3.125、6.25、12.5、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以及1 mg/mL LPS进行后续试验。



不同小写字母代表差异显著($P < 0.05$)。下同。Different letters represent significant differences ($P < 0.05$). The same as below.

图1 黄芩苷(A)和LPS(B)对RAW264.7细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of baicalin (A) and LPS (B) on the proliferation of RAW264.7 cell

2.2 黄芩苷对LPS刺激RAW264.7细胞的吞噬能力和NO释放的影响

细胞吞噬试验结果如图2A所示,与组1相比,组

2经LPS刺激后RAW264.7细胞的吞噬能力显著下降($P < 0.05$),与组2相比,组3黄芩苷细胞吞噬能力呈上升趋势($P < 0.05$);组4、组5和组6的差异显著

($P<0.05$), LPS 刺激 RAW264.7 细胞 NO 释放结果如图 2B 所示, 与组 1 相比, 组 2 的 NO 释放显著增加 ($P<0.05$), 相较组 2, 组 3 黄芩苷能显著降低 LPS 刺激的 NO 释放, 并随其剂量增加, NO 释放显著降低 ($P<0.05$)。

2.3 黄芩苷对 LPS 刺激细胞炎症因子与 $TGF-\beta$ /SMAD2 信号通路相关 mRNA 表达水平的影响

RAW264.7 细胞相关基因的 mRNA 表达水平见图 3。由图 3 可见, 与组 1 相比, 组 2 经 LPS 刺激后, RAW264.7 细胞 $iNOS$ 、 $IL-1$ 、 $IL-6$ 和 $IL-10$ 的 mRNA 表达均显著上调 ($P<0.05$), 而在组 3 补充黄芩苷后, 上述细胞因子的 mRNA 表达水平呈现下调趋势 ($P<$

0.05), 与组 2 相比, 组 4、组 5 和组 6 的差异显著 ($P<0.05$), $TGF-\beta$ 和 $SMAD2$ 的 mRNA 表达水平如图 3E-F 所示, 与组 1 相比, 组 2 经 LPS 刺激后, $TGF-\beta$ 和 $SMAD2$ 的表达水平下降 ($P<0.05$), 与组 2 相比, 组 3 并未提高 $TGF-\beta$ 和 $SMAD2$ 的 mRNA 表达水平 ($P>0.05$), 但组 5 和组 6 的 $TGF-\beta$ 和 $SMAD2$ 的 mRNA 表达差异显著 ($P<0.05$)。

2.4 脾脏指数

小鼠脾脏指数见图 4, 与组 1 相比, 组 2 的脾脏指数显著上升 ($P<0.05$), 与组 2 相比, 组 3 的脾脏系数明显下降 ($P<0.05$), 组 4 和组 5 的脾脏指数差异显著 ($P<0.05$), 但与组 1 无明显差异。

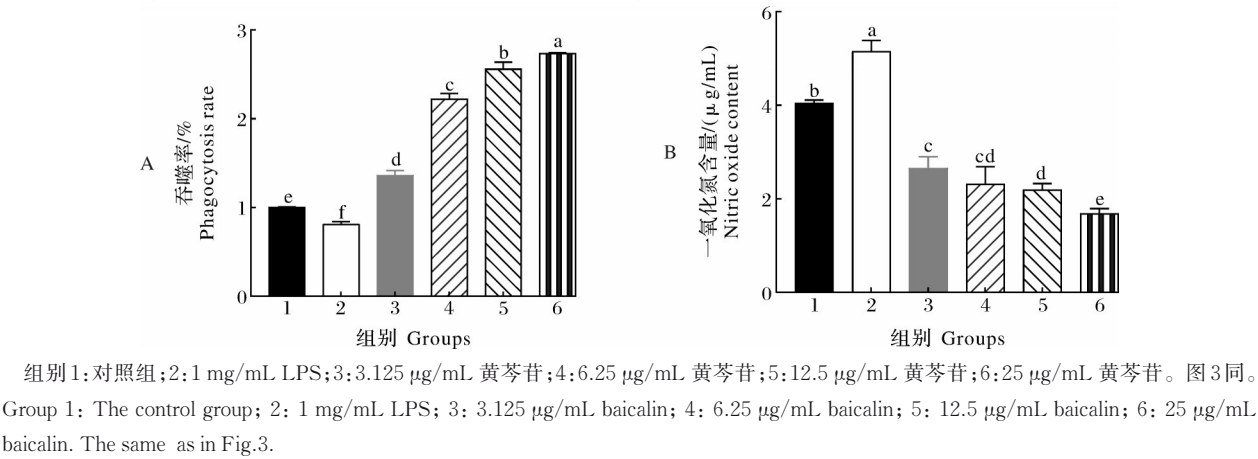


图 2 黄芩苷处理的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞的吞噬能力 (A) 和 NO 释放 (B)
Fig. 2 Phagocytosis (A) and NO content (B) of LPS-stimulated RAW264.7 cells by baicalin treatment

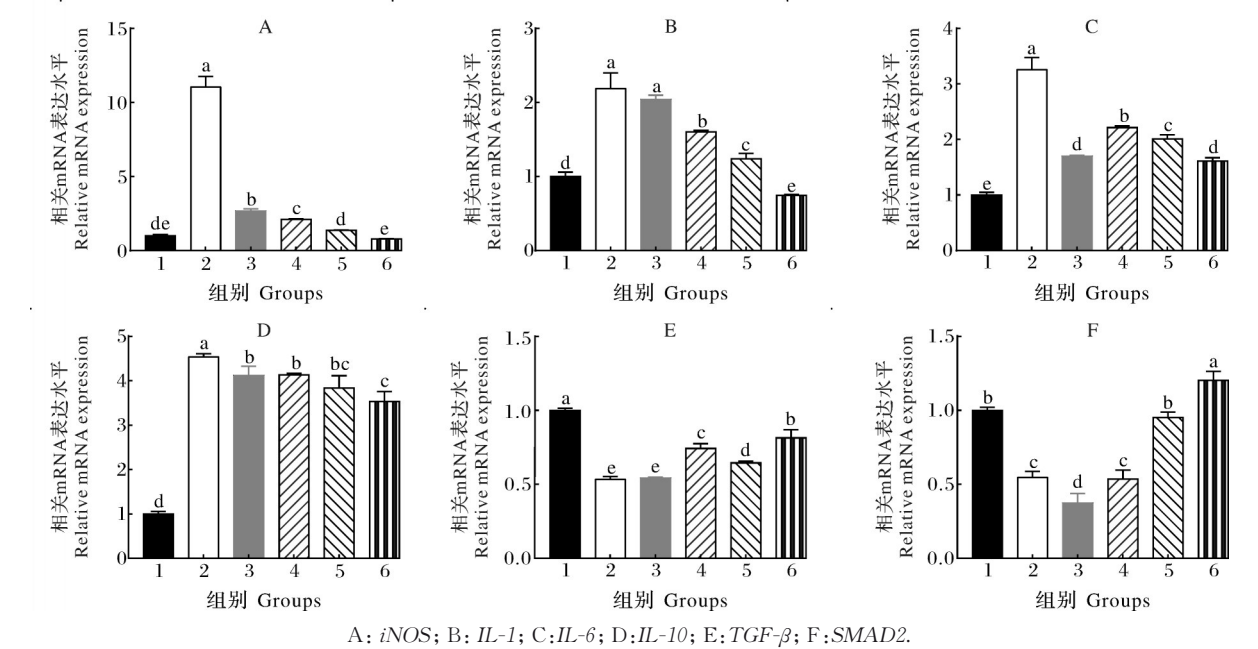
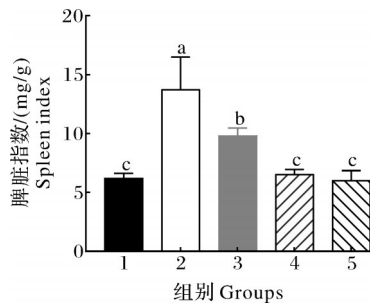


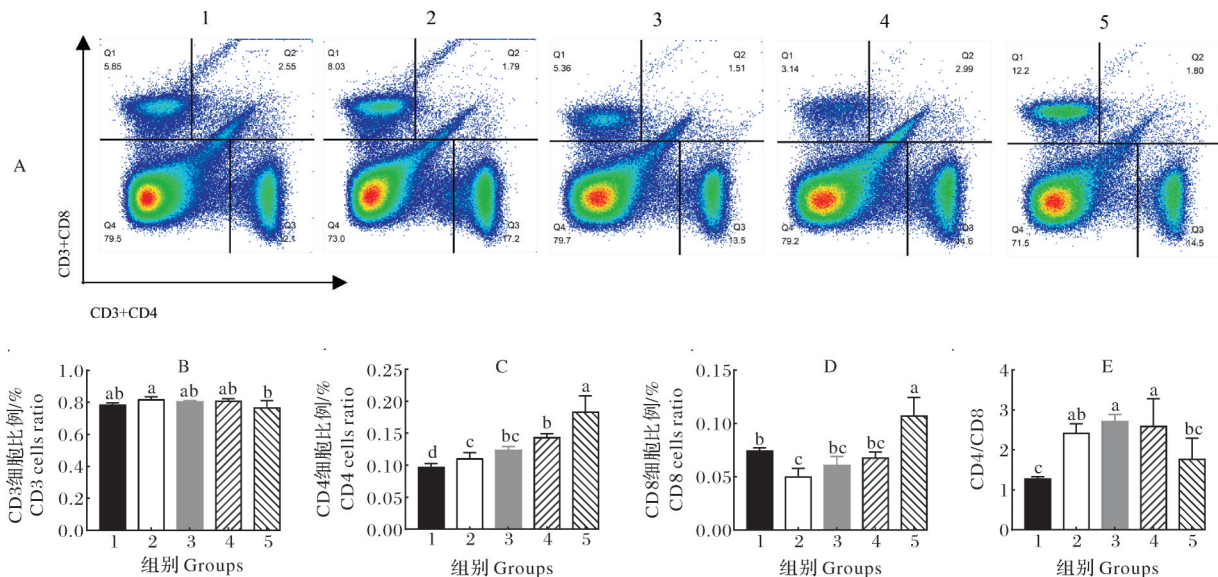
图 3 黄芩苷处理的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞相关基因 mRNA 表达水平
Fig. 3 Relative mRNA expression levels in RAW264.7 cells after LPS stimulation and baicalin treatment



组别 1: 对照组; 2: 1 mg/mL LPS; 3: 50 mg/kg 黄芩苷; 4: 100 mg/kg 黄芩苷; 5: 200 mg/kg 黄芩苷。下同。Group 1: The control group; 2: 1 mg/mL LPS; 3: 50 mg/kg baicalin; 4: 100 mg/kg baicalin; 5: 200 mg/kg baicalin. The same as below.

图4 饲喂不同水平黄芩苷和LPS刺激的小鼠脾脏指数

Fig. 4 Spleen index of mice after different levels of baicalin feeding and LPS stimulation



A: 流式细胞术分区; B: CD3 细胞比例; C: CD4 细胞比例; D: CD8 细胞比例; E: CD4/CD8。A: Flow cytometry zonation; B: CD3 cell proportion; C: CD4 cell proportion; D: CD8 cells proportion; E: CD4/CD8.

图5 饲喂不同水平黄芩苷和LPS刺激的小鼠T细胞分化结果

Fig. 5 Results of T Cell differentiation after different levels of baicalin feeding and LPS stimulation

2.6 免疫平衡

如图6所示, LPS刺激后, 组2的Th17细胞数量显著上升, Treg的分化显著减少, Th17/Treg平衡轴往Th17方向分化($P<0.05$), 出现Th17/Treg失衡。与组2相比, 组3和组4小鼠Th17细胞的分化显著下降($P<0.05$), 组5存在显著差异($P<0.05$); 此外, 不同剂量的黄芩苷对于Treg细胞的分化与表达均具有促进作用, 其细胞比例明显增多。表明黄芩苷对于LPS导致的Th17/Treg平衡轴的失衡具有恢复作用。

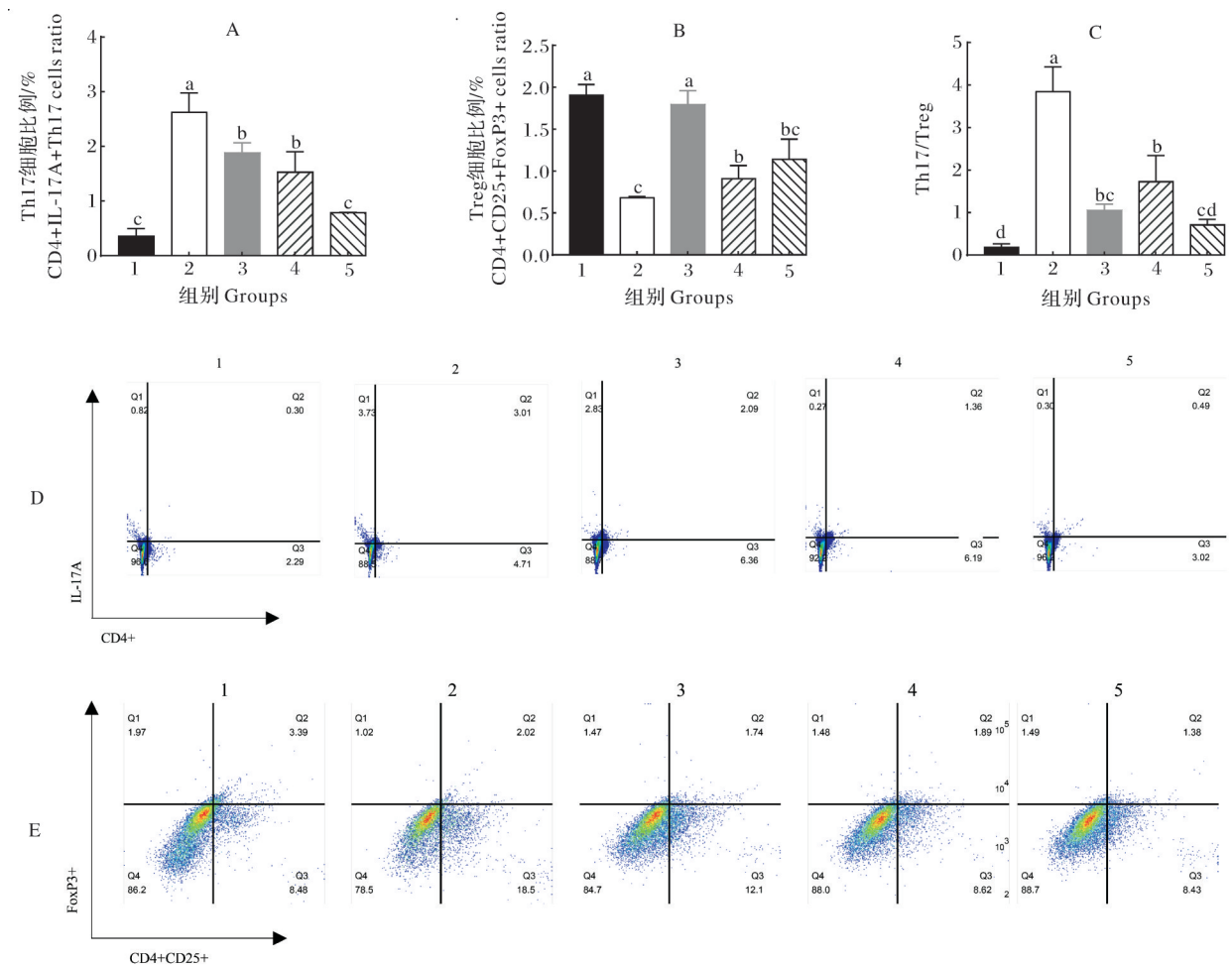
2.5 T细胞分化

小鼠脾脏T细胞分化结果如图5A-F所示, 与组1相比, 组2促进CD3⁺细胞比例增加, 但差异不显著; 与组2相比, 组5能显著降低LPS刺激下CD3细胞的比例($P<0.05$)。CD4细胞增殖情况如图5C所示, 与组1相比, 组3和组4均显著促进CD4细胞增殖($P<0.05$), 组5差异显著($P<0.05$); CD8细胞增殖情况如图5D所示, 与组1相比, 组2的CD8细胞比例减少($P<0.05$), 与组2相比, 组5能够显著促进CD8细胞增殖($P<0.05$); 此外, CD4/CD8如图5E所示, 与组1相比, 组2的CD4/CD8升高($P<0.05$), 与组2相比, 组5的CD4/CD8存在下调趋势, 表明一定剂量的黄芩苷能够在一定程度上恢复LPS刺激的小鼠T细胞分化。

2.7 脾脏相关细胞因子表达水平

如图7所示, 与组1相比, 经LPS刺激后, 小鼠脾脏中IL-1、TNF- α 、IL-17及IL-22的mRNA表达水平显著上调($P<0.05$), 与组2相比, 组3黄芩苷灌胃小鼠的上述炎症细胞因子的表达水平均显著下调($P<0.05$), 组4和组5的差异显著($P<0.05$)。

图7E~F展示了TGF- β 和SMAD2基因的表达情况, 与组1相比, TGF- β 在LPS刺激后表达水平呈下调趋势, 但无显著性差异; 与组2相比, 组3显著上调了TGF- β 的表达水平($P<0.05$), 组4和组5差异显著($P<0.05$)。与组1相比, 经LPS刺激后,



A: Th17 的表达情况; B: Treg 的表达情况; C: Th17/Treg; D: Th17 流式分区; E: Treg 流式分区。A: Th17 expression; B: Treg expression; C: Th17/Treg; D: Th17 flow partition; E: Treg flow partition.

图6 饲喂不同水平黄芩苷和LPS刺激的免疫平衡流式细胞图

Fig. 6 Immuno-equilibrium flow cytometry after different levels of baicalin feeding and LPS stimulation

SMAD2 表达水平显著下调 ($P < 0.05$), 与组 2 相比, 黄芩苷 3 个剂量组均显著上调了 SMAD2 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 表明黄芩苷可以通过激活 $TGF-\beta$ /SMAD2 缓解 LPS 引起的炎症反应。

3 讨论

黄芩苷是中药黄芩中最主要的活性成分之一, 调查发现, 在众多黄酮类化合物中, 黄芩苷含量最高可占生药材的 20.7%^[15]。因其含量高、源药材种植范围广, 相较其他单一化合物, 黄芩苷的提取工艺更简单, 生产成本更低廉, 在畜禽生产中应用很多, 如提高家禽产蛋性能, 减少畜禽病害等^[16-18]。此外, 与槲皮素、大豆异黄酮等化合物在抑菌、抗炎和抗病毒方面相比, 黄芩苷较低剂量 (100 mg/kg) 应用在小鼠即可达到良好效果^[19]。

炎症反应是机体稳态系统应对外界和内部刺激时的必要生理过程, 在正常情况下, 轻微的炎症反应能够刺激机体快速清除病原体, 改善免疫失衡从而维持自身健康^[20]。然而近年来, 随着抗生素滥用, 在产生耐药细菌的同时造成动物抵抗能力降低^[21], 导致多数情况下炎症往往不能自愈, 且在不加干预的情况下逐步恶化, 致使其他系列疾病出现^[22]。研究指出, LPS 能通过 Toll 样受体募集 MYD88 从而激活 $NF-\kappa B$ 引起细胞炎性损伤和机体炎症^[23]。骆思园等^[24]在 RAW264.7 小鼠巨噬细胞上使用 LPS 刺激后发现其活性下降, 并且激活 ERK 信号通路。在本研究中, 使用 1 mg/mL 的 LPS 同样能够降低 RAW264.7 细胞的活力, 降低细胞存活率。巨噬细胞可通过自身吞噬功能清除外来病原微生物, 吞噬能力降低可能会引起病原微生物的免疫逃逸^[25], 在本

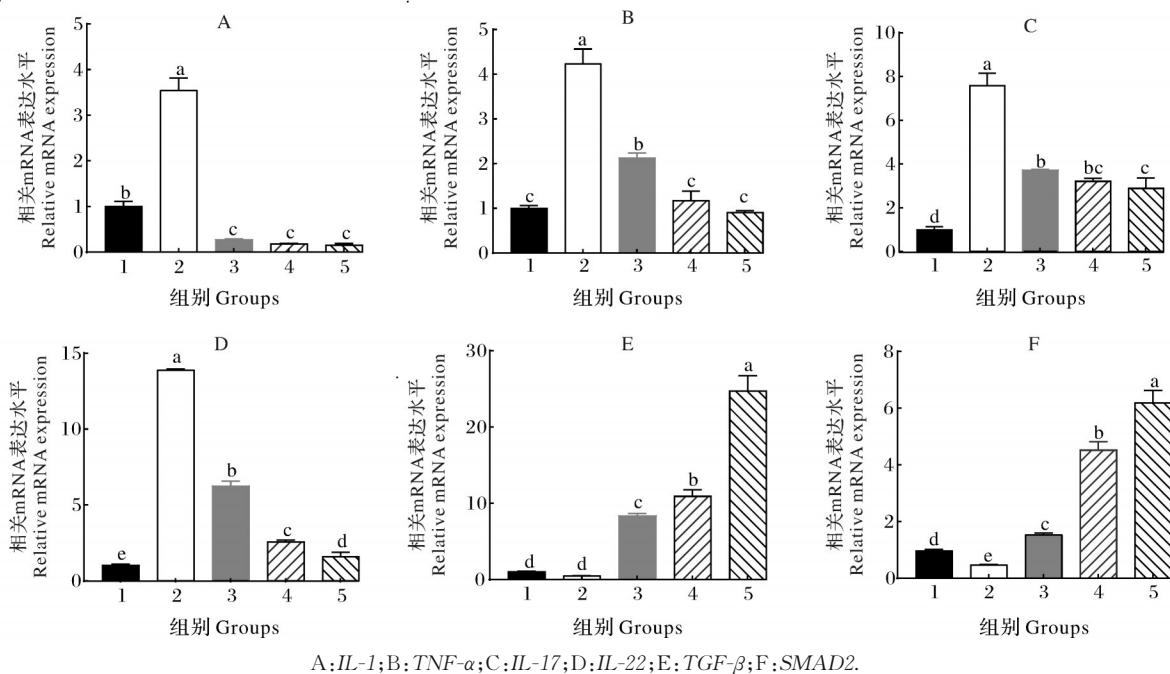


图7 饲喂不同水平黄芩苷和LPS刺激的脾脏相关炎症细胞因子mRNA表达水平

Fig.7 mRNA expression of cytokines associated with spleen after different levels of baicalin feeding and LPS stimulation

研究中,中性红染色试验发现LPS刺激后的RAW264.7细胞吞噬能力下降,而在补充黄芩苷后吞噬能力呈剂量依赖式增长,这可能与黄芩苷的特异性免疫增强作用相关^[26]。

RAW264.7等巨噬细胞在遭受外界刺激时能够促进NO的释放,而这一机制是由*iNOS*激活引起的^[27]。NO含量的升高能够导致细胞缺氧,进一步激活炎症与细胞程序性死亡,从而释放*IL-1*、*IL-6*及*IL-10*等促炎细胞因子^[28],在本研究中,LPS刺激后小鼠巨噬细胞NO释放含量显著增加,在随后的基因表达检测中发现*iNOS*、*IL-1*、*IL-6*及*IL-10*水平均显著升高,这也进一步佐证了细胞炎症的形成。

研究表明,*TGF-β*/*SMAD*信号通路在细胞早期发育、免疫监督、组织修复及稳态平衡的过程中发挥重要作用,Lan等^[29]使用血流阻断法建立肾损伤小鼠模型后发现*TGF-β*基因的mRNA表达水平降低,而过表达*TGF-β*后,小鼠肾损伤情况得到了改善,并且下游*SAMD2/3*信号被激活,有效抑制了*MAPK*和*NF-κB*信号通路的激活,这一结果表明*TGF-β*/*SMAD*能够通过负向调控炎症信号通路,从而改善组织损伤。在本研究中,LPS刺激小鼠巨噬细胞后,*TGF-β*/*SMAD*表达水平降低,而补充黄芩苷后,该情况得到了缓解,该结果也在后续的研

究中得到验证,以上结果表明黄芩苷同样可能通过激活*TGF-β*/*SMAD*信号通路减轻LPS诱导的小鼠炎症。

T细胞亚群紊乱可能与局部炎症和免疫反应激活有关^[30],*CD4*分子属于免疫球蛋白超家族,当*CD4*⁺细胞大量分化,能进一步促进单核和巨噬细胞活化,从而吞噬入侵病原体。在本研究中,黄芩苷灌胃后小鼠*CD4*⁺细胞表达显著上升,在本研究的细胞试验中黄芩苷同样提升了小鼠巨噬细胞的吞噬能力,提示*CD4*⁺细胞在抗炎效应中发挥了一定的作用。此外,本研究发现,LPS刺激后,*CD8*⁺细胞表达显著降低,这可能与BALB/c小鼠的免疫系统遭到破坏相关。*CD4*⁺/*CD8*⁺比值的高低往往作为免疫激活或抑制的标志物,在临床上可用于识别为炎症相关的慢性免疫疾病^[31]。本研究发现,腹腔注射LPS能够降低小鼠脾脏中*CD4*⁺/*CD8*⁺的比值,同样,在Ron等^[32]的研究中发现,一些因病毒或其他微生物感染的患者表现出高*CD4*⁺/*CD8*⁺比值,而使用药物干预的患者则降低了*CD4*⁺/*CD8*⁺比值。

Th17细胞能够促进组织的炎症反应,而Treg细胞则抑制自身免疫。*IL-17*是许多自身免疫性疾病发病机制的核心,同样存在有效的宿主耐受与调节机制来控制自身反应性Th17细胞与*IL-17*诱导的炎

症反应^[33]。IL-22由不同种类的淋巴细胞表达,尤其是Th17细胞、T细胞及NK细胞等^[34]。有研究表明,IL-17在保护性免疫与破坏性炎症中具有双重作用,而在炎症性肠病患者中IL-22的表达则显著升高^[35]。在本研究中,使用LPS注射的小鼠出现Th17/Treg失衡、IL-17及IL-22高度表达,而这一情况在灌胃黄芩苷后得到了一定程度的缓解,表明黄芩苷可以逆转小鼠体内炎症带来的免疫失衡。

综上所述,LPS可刺激RAW264.7细胞和小鼠产生炎症反应,促进炎症因子释放导致免疫失衡,黄芩苷干预后能够缓解LPS诱导的小鼠炎症反应,该机制可能是通过降低相关炎症因子mRNA表达、提高免疫能力、恢复Th17/Treg平衡及激活TGF- β /SMAD信号通路实现的。

参考文献 References

- [1] YAN P P, LIU J L, HUANG Y X, et al. Lotus leaf extract can attenuate salpingitis in laying hens by inhibiting apoptosis [J/OL]. Poultry science, 2023, 102 (10) : 102865 [2023-12-11]. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102865>.
- [2] RYU J K, KIM S J, RAH S H, et al. Reconstruction of LPS transfer cascade reveals structural determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for efficient LPS recognition and transfer [J]. Immunity, 2017, 46 (1) : 38-50.
- [3] SORIA M A, BONNET M A, BUENO D J. Relationship of Salmonella infection and inflammatory intestinal response with hematological and serum biochemical values in laying hens [J]. Veterinary immunology and immunopathology, 2015, 165 (3/4) : 145-153.
- [4] BLAIR J M A, WEBBER M A, BAYLAY A J, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance [J]. Nature reviews: microbiology, 2015, 13 (1) : 42-51.
- [5] 蒋庆佳, 杨放, 杨安迪, 等. 中药抑菌活性成分及其作用机制研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48 (8) : 855-861. JIANG Q J, YANG F, YANG A D, et al. Research progress of bacteriostatic mechanism of traditional Chinese medicine based on chemical components [J]. Chinese journal of antibiotics, 2023, 48 (8) : 855-861 (in Chinese with English abstract).
- [6] WU Y L, WANG F, FAN L H, et al. Baicalin alleviates atherosclerosis by relieving oxidative stress and inflammatory responses via inactivating the NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways [J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2018, 97 : 1673-1679.
- [7] PELLISSERY A J, VINAYAMOHAN P G, KUTTAPPAN D A, et al. Protective effect of baicalin against *Clostridioides difficile* infection in mice [J/OL]. Antibiotics (Basel, Switzerland), 2021, 10 (8) : 926 [2023-12-11]. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080926>.
- [8] LIU P P, XIAO Z H, YAN H P, et al. Baicalin suppresses Th1 and Th17 responses and promotes Treg response to ameliorate sepsis-associated pancreatic injury via the RhoA - ROCK pathway [J/OL]. International immunopharmacology, 2020, 86 : 106685 [2023-12-11]. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106685>.
- [9] 赵明超. 褪黑素通过激活 SIRT1/NF- κ B/TGF- β 1/Smad2 抑制骨关节炎大鼠软骨细胞基质降解机理研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022. ZHAO M C. Mechanism of melatonin inhibiting matrix degradation of chondrocytes in osteoarthritis rats by activating SIRT1/NF- κ B/TGF- β 1/Smad2 [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2022 (in Chinese with English abstract).
- [10] PANG N N, ZHANG F B, MA X M, et al. TGF- β /Smad signaling pathway regulates Th17/Treg balance during *Echinococcus multilocularis* infection [J]. International immunopharmacology, 2014, 20 (1) : 248-257.
- [11] MARTINEZ G J, ZHANG Z M, REYNOLDS J M, et al. Smad2 positively regulates the generation of Th17 cells [J]. The Journal of biological chemistry, 2010, 285 (38) : 29039-29043.
- [12] 朱依玲. 荷叶碱体内外抗炎及对DSS诱导肠炎小鼠的保护作用研究 [D]. 荆州: 长江大学, 2022. ZHU Y L. Anti-inflammatory effect of nuciferine *in vitro* and *in vivo* and its protective effect on DSS-induced enteritis in mice [D]. Jingzhou: Yangtze University, 2022 (in Chinese with English abstract).
- [13] 易首利, 韦玉衡, 赵怡, 等. 槲皮苷对PCV2感染猪肺泡巨噬细胞吞噬活性的影响 [J]. 现代畜牧兽医, 2023 (2) : 1-4. YI S L, WEI Y H, ZHAO Y, et al. Effect of quercetin on phagocytic activity of PCV2-infected porcine alveolar macrophages [J]. Modern journal of animal husbandry and veterinary medicine, 2023 (2) : 1-4 (in Chinese with English abstract).
- [14] LUAN Y, SUN C, WANG J, et al. Baicalin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt/NF- κ B pathway [J]. Journal of cellular biochemistry, 2019, 120 (3) : 3212-3219.
- [15] 薛黎明, 秦雪梅, 张丽增. 不同产地黄芩药材的黄芩苷含量测定及指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2008, 30 (1) : 10-13. XUE L M, QIN X M, ZHANG L Z. Determination of baicalin in *Scutellaria baicalensis* Georgi from different areas and study on its fingerprint [J]. Chinese traditional patent medicine, 2008, 30 (1) : 10-13 (in Chinese).
- [16] MA X D, ZHANG X G, GUO S J, et al. Application of enzyme-assisted extraction of baicalin from *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. Preparative biochemistry & biotechnology, 2021, 51 (3) : 241-251.
- [17] WANG W W, JIA H J, ZHANG H J, et al. Supplemental plant extracts from *Flos lonicerae* in combination with Bai-

- kal skullcap* attenuate intestinal disruption and modulate gut microbiota in laying hens challenged by *Salmonella pullorum* [J/OL]. *Frontiers in microbiology*, 2019, 10: 1681 [2023-12-11]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01681-1690>.
- [18] FU S L, YIN R H, ZUO S L, et al. The effects of baicalin on piglets challenged with *Glaesserella parasuis* [J/OL]. *Veterinary research*, 2020, 51 (1) : 102 [2023-12-11]. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00826-5>.
- [19] 王文强, 凡思华, 张明辉, 等. 黄酮化合物在畜禽生产中的应用研究进展[J]. 湖南畜牧兽医, 2023(5): 54-57. WANG W Q, FAN S H, ZHANG M H, et al. Research progress in the application of flavones in livestock and poultry production[J]. *Hunan journal of animal science & veterinary medicine*, 2023(5): 54-57 (in Chinese).
- [20] MARTÍNEZ DE TODA I, CEPRIÁN N, DÍAZ-DEL CERRO E, et al. The role of immune cells in oxi-inflamm-aging [J/OL]. *Cells*, 2021, 10(11): 2974 [2023-12-11]. <https://doi.org/10.3390/cells10112974>.
- [21] FERRI M, RANUCCI E, ROMAGNOLI P, et al. Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems[J]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2017, 57 (13): 2857-2876.
- [22] LAI H C, HO U Y, JAMES A, et al. RNA metabolism and links to inflammatory regulation and disease [J/OL]. *Cellular and molecular life sciences*, 2021, 79 (1) : 21 [2023-12-11]. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04073-5>.
- [23] LI W J, WANG K X, LIU Y D, et al. A novel drug combination of mangiferin and cinnamic acid alleviates rheumatoid arthritis by inhibiting *TLR4/NF-κB/NLRP3* activation-induced pyroptosis [J/OL]. *Frontiers in immunology*, 2022, 13: 912933 [2023-12-11]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.912933>.
- [24] 骆思园, 刘明明, 曲庆, 等. 柠檬酸对诱导的RAW264.7细胞炎症反应的保护作用[J]. 中国兽医学报, 2023, 43(9): 1905-1910. LUO S Y, LIU M M, QU Q, et al. Protective effect of citric acid on LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells [J]. *Chinese journal of veterinary science*, 2023, 43(9): 1905-1910 (in Chinese with English abstract).
- [25] SUKUMARAN A, BALL B, KRIEGER J R, et al. Cross-Kingdom infection of macrophages reveals pathogen- and immune-specific global reprogramming and adaptation [J/OL]. *mBio*, 2022, 13(4): e0168722 [2023-12-11]. <https://doi.org/10.1128/mbio.01687-22>.
- [26] LAI Y S, PUTRA R B D S, AUI S P, et al. M2C polarization by baicalin enhances efferocytosis via upregulation of MERTK receptor [J]. *The American journal of Chinese medicine*, 2018, 46(8): 1899-1914.
- [27] ZHU Y L, ZHAO Q, HUANG Q, et al. Nuciferine regulates immune function and gut microbiota in DSS-induced ulcerative colitis [J/OL]. *Frontiers in veterinary science*, 2022, 9: 939377 [2023-12-11]. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.939377>.
- [28] KANG R F, LI R N, DAI P Y, et al. Deoxynivalenol induced apoptosis and inflammation of IPEC-J2 cells by promoting ROS production [J]. *Environmental pollution*, 2019, 251: 689-698.
- [29] LAIDLAW B J, CRAFT J E, KAECH S M. The multifaceted role of CD4⁺ T cells in CD8⁺ T cell memory [J]. *Nature reviews: immunology*, 2016, 16(2): 102-111.
- [30] HOHMAN L S, PETERS N C. CD4⁺ T cell-mediated immunity against the phagosomal pathogen *Leishmania*: implications for vaccination [J]. *Trends in parasitology*, 2019, 35 (6) : 423-435.
- [31] CROMPTON T, HEFTI H, LEES R K, et al. CD4/CD8 lineage commitment in T cell receptor transgenic mice: evidence for precommitment of CD4⁺/CD8⁺ thymocytes [J]. *Seminars in immunology*, 1994, 6(4): 249-256.
- [32] RON R, MORENO E, MARTÍNEZ-SANZ J, et al. CD4/CD8 ratio during human immunodeficiency virus treatment: time for routine monitoring? [J]. *Clinical infectious diseases*, 2023, 76(9): 1688-1696.
- [33] WANG D D, HUANG S S, YUAN X R, et al. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus [J]. *Cellular & molecular immunology*, 2017, 14(5): 423-431.
- [34] KEIR M, YI T S, LU T, et al. The role of *IL-22* in intestinal health and disease [J/OL]. *The journal of experimental medicine*, 2020, 217(3): e20192195 [2023-12-11]. <https://doi.org/10.1084/jem.20192195>.
- [35] MCGEACHY M J, CUA D J, GAFFEN S L. The *IL-17* family of cytokines in health and disease [J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 892-906.

Effects of baicalin on protecting inflammation in mice induced by lipopolysaccharide

YAN Pupu, ZHU Jun, LIU Jiali, HUANG Yongxi, YU Jie, TANG Feng, GUO Liwei

College of Animal Science and Technology, Yangtze University, Jingzhou 434000, China

Abstract A inflammatory model of RAW264.7 cell induced with lipopolysaccharide (LPS) was established *in vitro* to study the effects and mechanism of baicalin (BCN) against LPS-induced inflammatory injury in mice. The cellular phagocytic ability, nitric oxide (NO) release, and mRNA expression to inflammatory cytokines and *TGF- β /SMAD2* pathways related genes were measured. Experiments *in vivo* were conducted using different concentrations of baicalin to establish an inflammatory model in BALB/c mice after 7 consecutive days of gastric lavage and intraperitoneal injection of LPS. The spleen index, subgroups and immune balance of T cell in mice were detected. RT-qPCR was used to determine the mRNA expression of inflammatory cytokines and *TGF- β /SMAD2* pathways related genes in the spleen. Results showed that baicalin had no effect on inhibiting the proliferation of RAW264.7 cell within the range of 0-25 $\mu\text{g/mL}$. When the LPS concentration was 1 mg/mL , the survival rate of RAW264.7 cell was 54.55%. Different concentrations of baicalin enhanced the phagocytic ability ($P < 0.05$) and reduced NO release ($P < 0.05$) of RAW264.7 cells. The mRNA expression of inflammatory cytokines related genes increased ($P < 0.05$) while the mRNA expression of *TGF- β /SMAD2* pathways related genes decreased after LPS stimulation. The mRNA expression of above genes was reversed after intervention with baicalin. The spleen index of mice significantly increased ($P < 0.05$) after LPS treatment, and different doses of baicalin groups improved this situation ($P < 0.05$). Results of flow cytometry showed that baicalin improved the differentiation of CD4^+ and CD8^+ cells stimulated by LPS, reduced the ratio of $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$, and restored the imbalance of Th17/Treg balance axis induced by LPS. It is indicated that baicalin alleviates the LPS induced inflammation in mice, and its mechanism may be related to the activation of *TGF- β /SMAD2* signaling pathway, the inhibition of inflammatory cytokines expression, and the restoration of Th17/Treg balance axis.

Keywords baicalin (BCN); lipopolysaccharide (LPS); immune regulation; *TGF- β /SMAD2*; differentiation of T cell

(责任编辑:赵琳琳)