

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2018) 05-0409-04

白杨素通过 MAPK 信号抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症

李 强^{1,2}, 齐世美¹, 姜 琦¹, 戚之琳¹, 章 尧¹

(皖南医学院 1. 生物化学与分子生物学教研室; 2. 人体解剖学教研室, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 探讨白杨素抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症的分子机制。方法: 用不同浓度的白杨素处理 RAW 264.7 细胞 24 h 后, CCK-8 法检测细胞活力; western blot 检测白杨素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 MAPK 信号蛋白 p-ERK、p-JNK 和 p-P38 水平; ELISA 法检测 TNF- α 、IL-6 和 NO 浓度; 活性氧探针检测细胞内 ROS 释放情况。结果: 白杨素浓度低于 60 mg/L 对 RAW 264.7 细胞增殖无影响; western blot 检测表明白杨素抑制了 MAPK 信号分子 p-ERK、p-JNK 和 p-P38 的水平; ELISA 结果显示, 白杨素抑制 TNF- α 、IL-6 和 NO 的释放; 此外, 白杨素也降低了细胞内 ROS 的产生。结论: 白杨素抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症反应是通过 MAPK 信号实现的。

【关键词】白杨素; 脂多糖; 活性氧簇; RAW 264.7 细胞; MAPK 信号通路

【中图分类号】R 285.5 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.05.001

Chrysin inhibiting LPS-induced inflammation of RAW 264.7 cells via MAPK signaling pathway

LI Qiang, QI Shimei, JIANG Qi, QI Zhilin, ZHANG Yao

Department of Biochemistry, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To investigate the anti-inflammatory mechanisms of chrysin in RAW 264.7 cells treated with lipopolysaccharides (LPS). **Methods:** RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of chrysin for 24 h. Cell viability was determined using CCK-8 kit. The protein levels in MAPK signaling pathway, including p-ERK, p-JNK and p-P38 were also assessed by western blot. ELISA was performed to detect the concentration of TNF- α , IL-6 and NO in the cellular supernatant. Intracellular level of reactive oxygen species (ROS) was measured using ROS probe. **Results:** There was no effect on the viability of RAW 264.7 cells under the chrysin (60 mg/L). western blot indicated that chrysin had inhibited the protein levels of MAPK signaling molecules, including p-ERK, p-JNK and p-P38. ELISA showed inhibited release of TNF- α , IL-6 and NO as well as decreased production of intracellular ROS. **Conclusion:** Anti-inflammatory mechanism of chrysin in RAW 264.7 cells induced by LPS is achieved via activating MAPK signaling pathway.

【Key words】 chrysin; LPS; ROS; RAW 264.7 cell; MAPK signaling pathway

炎症反应在组织创伤、感染、毒素反应以及自身免疫性应激损伤中, 参与许多细胞生理和病理变化过程^[1-3]。正常状态下, 巨噬细胞产生的促炎介质和促炎因子在细胞代谢和组织修复中发挥重要作用。MAPK 信号通路与细胞的生长、分化、凋亡等多种重要细胞的生理和病理过程息息相关^[4]。大量研究已证实 MAPK 信号通路的失调能导致多种炎症反应发生^[5], 因此针对 MAPK 信号通路靶位点进行研发抗炎药物是可行的。

白杨素又名白杨黄素, 具有广泛的生物学作用, 包括抗氧化、抗糖尿病、抗肿瘤等, 该类化合物分布广泛且毒性较低, 因此是新药开发研究中一个潜在的重要资源^[6]。

尽管已经有诸多研究报道了白杨素具有抗炎效果, 但未阐明白杨素在革兰阴性细菌表面脂多糖诱导的炎症反应以及具体的抗炎作用中的机制。本研究以 RAW 264.7 巨噬细胞为研究模型, 验证了白杨素的抗炎作用, 并证实了白杨素可以下调 MAPK 信

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目(1508085MH149); 活性生物大分子研究安徽省重点实验室项目(1306C083008); 皖南医学院重点科研项目(WK2017Z07)

收稿日期: 2018-02-25

作者简介: 李 强(1989-), 男, 助理实验师, (电话) 15055313119, (电子信箱) 334129219@qq.com;

章 尧, 男, 教授, 硕士生导师, (电子信箱) zhangyao@ahedu.gov.cn, 通信作者。

号蛋白的磷酸化,着重评估了白杨素在 LPS 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞的抗炎效果,拓展了白杨素在临床上的用药范围。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 中科院典型培养物保藏委员会昆明细胞库购买的 RAW 264.7 小鼠腹腔巨噬细胞系使用含 10% 胎牛血清 DME 完全培养基(Gibco)在细胞培养箱中培养,条件为 CO₂ 浓度:5%,温度:37℃,实验取对数生长期细胞。

1.2 细胞活力值检测 将 RAW 264.7 细胞每孔按照 1×10^4 个接种于 96 孔板,分别使用不同浓度的白杨素(购自中国阿拉丁生物试剂公司)(0、5、10、20、40、60、80、100、150、200 mg/L) 孵育 RAW 264.7 细胞 24 h,更换细胞培养液,按照 CCK-8(购自日本 DOJINDO 公司)试剂盒说明书操作,使用酶标仪测定每孔的吸光值(OD)。

1.3 活性氧簇的检测 将 1×10^7 个 RAW 264.7 细胞铺满 12 孔板,使用 CM-H₂DCFDA 荧光探针(购自中国 Beyotime 公司)检测各实验组中 RAW 264.7 细胞内活性氧簇释放情况。

1.4 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)抑制 ROS 产生 将 2×10^7 个 RAW 264.7 细胞铺满 6 孔板,LPS 刺激 15 min 过后 western blot 检测炎症蛋白和 MAPK 信号通路蛋白磷酸化情况。

1.5 炎症因子的检测 将 1×10^7 个 RAW 264.7 细胞铺满 12 孔板,孵育 RAW 264.7 细胞 24 h,使用 ELISA 试剂盒(R&D Systems)检测各组 TNF- α 、IL-6 和 NO 的 OD 值。

1.6 western blot 使用对数期 RAW 264.7 细胞进行铺板,孵育白杨素 2 h 后加入 LPS 刺激 18 h,每孔加入 120 μ L 含有蛋白酶抑制剂 PMSF 的蛋白裂解液(购自中国 Beyotime 公司)在冰上裂解 30 min,加入 120 μ L 2 \times SDS loading buffer,水浴煮沸 5 min,使用 4% 浓缩胶,12% 分离胶进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,转膜过后使用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,一抗(购自美国 Cell Signaling Technology 公司)4℃在水平摇床过夜,荧光二抗(购自美国 LI-COR Biosciences 公司)孵育 1 h,PBS 清洗过后,使用 Odyssey imaging system(购自美国 LI-COR Biosciences 公司)进行成像观察实验结果。

1.7 数据统计 使用 GraphPad Prism 5 软件进行数据统计,组间比较采用 *F* 检验和 SNK-*q* 检验。 $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

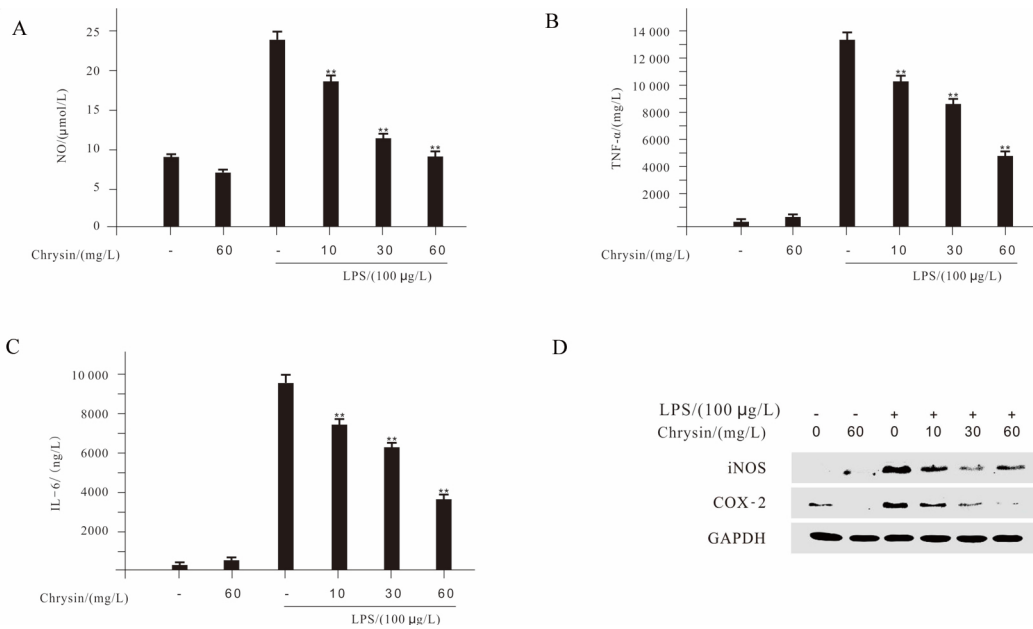
2 结果

2.1 白杨素对 RAW 264.7 细胞活力的影响 为了评估白杨素对 RAW 264.7 细胞增殖活力的影响,我们使用不同浓度的白杨素(0、5、10、20、40、60、80、100、150、200 mg/L)对 RAW 264.7 细胞进行处理,培育 24 h 后,每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂孵育 2 h,酶标仪测 A450 值,实验结果表明白杨素在小于 60 mg/L 时对 RAW 264.7 细胞活力没有影响,超过该浓度可降低细胞活力($F = 900.19, P < 0.01$)。因此我们将 10、30、60 mg/L 的白杨素作为 RAW 264.7 细胞的低、中、高剂量组。

2.2 白杨素抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症反应 使用不同浓度的白杨素(10、30、60 mg/L)预孵育 RAW 264.7 细胞 2 h 后加入 100 μ g/L 的 LPS 进行诱导,通过空白对照组、单加白杨素组、LPS 刺激组 and 不同浓度白杨素(10、30、60 mg/L) + LPS 实验组,37℃ 培养 18 h 后,取上清培养基检测各组 TNF- α 、IL-6 和 NO 的释放情况,western blot 检测炎症蛋白 iNOS 和 COX-2 的表达情况。实验结果(图 1)发现,经 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞后,白杨素能抑制炎症蛋白的表达和炎症因子 TNF- α ($F = 174.98, P < 0.01$)、IL-6 ($F = 99.40, P < 0.01$) 和 NO ($F = 18.42, P < 0.01$) 的释放。

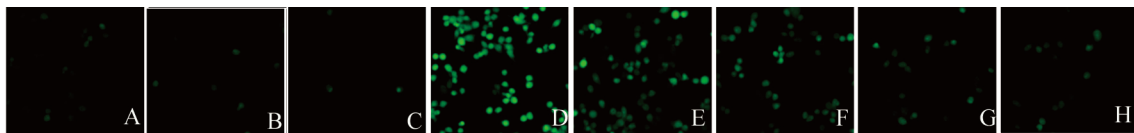
2.3 白杨素抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 ROS 的产生 研究发现 RAW 264.7 细胞经 LPS 刺激能产生大量的内源性 ROS,ROS 介导巨噬细胞的吞噬功能及炎症信号的传递。白杨素和 NAC 孵育 RAW 264.7 细胞 2 h,加入 100 μ g/L 的 LPS 进行诱导 15 min 后,使用活性氧探针 CM-H₂DCFDA 检测 ROS 的释放情况,实验结果见图 2。结果表明,与空白对照组、NAC 组、单加白杨素药物组比较,LPS 刺激组的细胞内绿色荧光增强,当孵育白杨素时,ROS 释放被抑制,这说明白杨素可以有效清除 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞内源性 ROS 蓄积。

2.4 白杨素阻断 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞 MAPK 信号的活化 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞后,能够激活 ERK、JNK、P38 蛋白磷酸化,当使用不同浓度白杨素(10、30、60 mg/L)处理 RAW 264.7 细胞后,MAPK 信号通路蛋白表达被抑制,见图 3、4,实验结果表明白杨素可以有效阻断 RAW 264.7 细胞 MAPK 信号的活化。



A~C.白杨素对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症因子 NO、TNF-α 和 IL-6 释放的影响; D.白杨素对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响。

图1 白杨素抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症反应



A.Control; B. Chrycin(60 mg/L); C. NAC(20 mmol/L); D.LPS(100 μg/L); E.LPS(100 μg/L)+Chrycin(10 mg/L); F.LPS(100 μg/L)+Chrycin(30 mg/L); G.LPS(100 μg/L)+Chrycin(60 mg/L); H. NAC(20 mmol/L)+LPS(100 μg/L)。

图2 白杨素抑制 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞 ROS 的产生

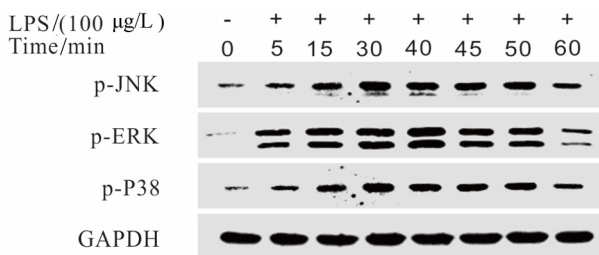


图3 白杨素对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞 MAPK 信号通路蛋白活化的影响

2.5 ROS 介导 MAPK 信号活化 NAC 是一种还原性的活性氧清除剂,可以有效清除各种细胞刺激时引发产生的内源性活性氧,对异常产生的 ROS 能有效清除,可以有效减少 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞 ROS 的累积。实验结果表明白杨素可以有效抑制 LPS 诱导炎症蛋白的表达并影响 MAPK 信号通路转导。使用 20 mmol/L 的 N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC) 预孵育 RAW 264.7 细胞 2 h 后,加入 100 μg/L 的 LPS 诱导 18 h 后 检测 iNOS 和 COX-2 蛋白的表达情况;同样使用 LPS 诱导 30 min 后收集细胞裂解液 运用 western blot 技术检测 p-ERK、p-JNK 和 p-P38 蛋白表达情况 实验结果图 5 表明 NAC 能

有效抑制炎症蛋白表达和 p-ERK、p-JNK 和 p-P38 蛋白的活化。提示白杨素可能是通过有效清除细胞内上游信号分子 ROS 进而调控 MAPK 信号通路蛋白的活性而发挥抗炎作用。

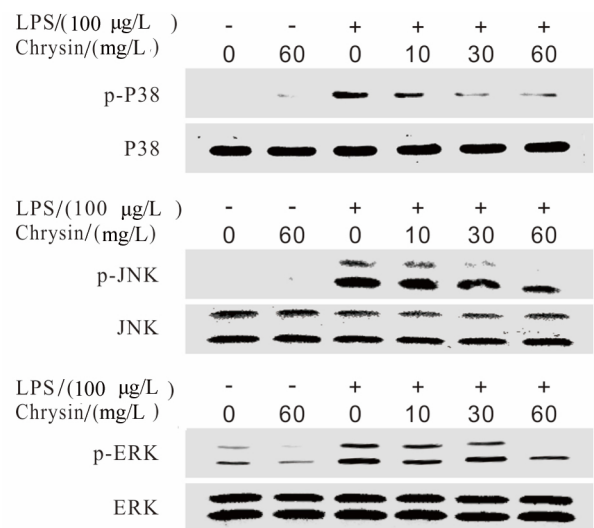
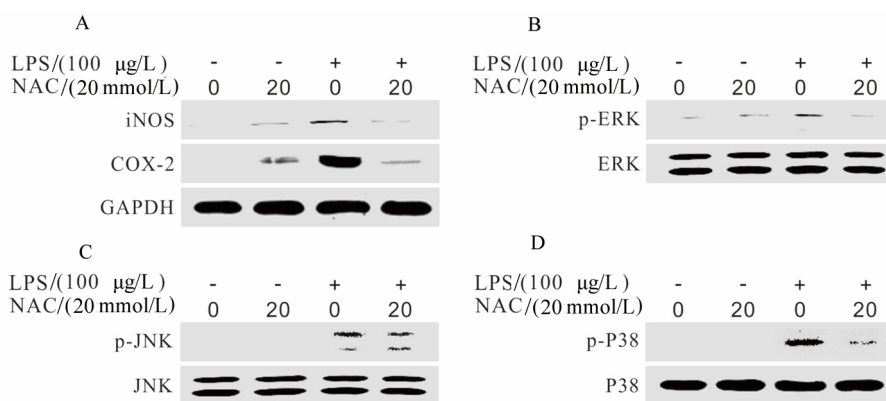


图4 白杨素对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞 MAPK 信号通路蛋白的影响



A.NAC对LPS诱导的RAW 264.7细胞内iNOS和COX-2蛋白表达的影响; B~D.NAC对LPS诱导RAW 264.7细胞p-ERK、p-JNK和p-P38蛋白表达的影响。

图5 NAC对LPS诱导RAW 264.7细胞MAKP信号通路蛋白的影响

3 讨论

白杨素衍生物能降低LPS诱导RAW 264.7细胞炎症蛋白的生成^[7],然而,白杨素在LPS诱导的RAW 264.7细胞中发挥抗炎作用的具体分子机制尚未见报道。正常情况下,炎症相关介质NO和PGE2,主要由iNOS和COX-2酶生成,与巨噬细胞产生的细胞因子在细胞代谢和组织修复过程中发挥重要作用。相关研究表明这些炎症介质和细胞因子过度产生伴随着炎症疾病^[8]。因此,研究通过抑制炎症细胞因子和炎症介质对有效的预后或诊断生物标记物以及开发靶向治疗抗炎药物都是至关重要的^[9]。

在巨噬细胞中,ROS还可以作为第二信使调节多条信号激酶级联并激活相关转录因子^[10-12]。本研究结果表明,LPS诱导RAW 264.7细胞能上调NO的产生,且在白杨素安全剂量范围内预处理可抑制LPS诱导RAW 264.7巨噬细胞TNF-α、IL-6和NO的释放,并且呈剂量依赖性。NAC是一种还原性的活性氧清除剂,可以清除各种细胞刺激时引发的内源性活性氧。实验结果表明NAC能抑制LPS刺激RAW 264.7细胞引起的炎症蛋白iNOS、COX-2的表达,且炎症因子IL-6、TNF-α及NO的释放同样被抑制,这说明ROS可能是作为炎症因子表达调控的上游信号分子。western blot分析结果显示,RAW 264.7细胞内ROS能被白杨素有效清除,进而说明ROS可能是白杨素抑制LPS诱导RAW 264.7细胞炎症反应的作用靶点。本研究的结果表明白杨素可通过减少LPS刺激RAW 264.7细胞促炎分子的产生而发挥抗炎作用。

综上所述,本研究结果证实白杨素具有抗炎作用,其机理可能是通过清除细胞内源性ROS的生成,进而调控MAPK信号转导而实现的。本研究拓

展了我们对白杨素生物学功能尤其是在抗炎方面的认识,从而为其潜在的临床应用提供了进一步的实验支撑。

【参考文献】

- [1] NATHAN C. Points of control in inflammation [J]. *Nature* 2002, 420(6917) : 846-852.
- [2] NABAVI SF ,BRAIDY N ,ORHAN IE *et al.* Rhodiola rosea L. and Alzheimer's disease: from farm to pharmacy [J]. *Phytother Res* , 2016, 30(4) : 532-539.
- [3] CONTI B ,TABAREAN I ,ANDREI C *et al.* Cytokines and fever [J]. *Front Biosci* 2004, 9(6) : 1433-1449.
- [4] JOHNSON VJ ,HE Q ,OSUCHOWSKI MF *et al.* Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture ,silymarin ,in BALB/c mice: III. Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses [J]. *Planta Med* 2003, 69(1) : 44-49.
- [5] KAMATA H ,HONDA S ,MAEDA S *et al.* Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases [J]. *Cell* 2005, 120(5) : 649-661.
- [6] 杨晓露,刘朵,卞卡,等. 甘草总黄酮及其成分体外抗炎活性及机制研究[J]. *中国中药杂志* 2013, 38(1) : 99-104.
- [7] CHO H ,YUN CW ,PARK WK *et al.* Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes ,COX-2 and iNOS ,by chrysin derivatives [J]. *Pharmacol Res* 2004, 49(1) : 37-43.
- [8] LEE M ,HONG S ,PARK C *et al.* Anti-inflammatory effects of Daehwangmokdintang ,a traditional herbal formulation ,in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. *Exp Ther Med* 2017, 14(6) : 5809-5816.
- [9] LAVETI D ,KUMAR M ,HEMALATHA R *et al.* Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2013, 12(5) : 349-361.
- [10] DEWAELE M ,MAES H ,AGOSTINIS P. ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy [J]. *Autophagy* 2010, 6(7) : 838-854.
- [11] NATHAN C ,CUNNINGHAMBUSSEL A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species [J]. *Nat Rev Immunol* 2013, 13(5) : 349-361.
- [12] QI SM ,FENG ZJ ,LI Q *et al.* Myricitrin modulates NADPH oxidase-dependent ROS production to inhibit endotoxin-mediated inflammation by blocking the JAK/STAT1 and NOX2/p47phox pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 2017: 9738745.