

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01235

• 研究快报 •

## 灯盏乙素抑制 LPS 诱导 BV2 细胞株炎症细胞因子表达的研究

毛峻琴<sup>1</sup>, 孟慧<sup>1\*</sup>, 赵丹<sup>1</sup>, 王闰<sup>1</sup>, 郑悦<sup>2</sup>

1. 解放军 85 医院药剂科, 上海 200052

2. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 研究灯盏乙素对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导 BV2 细胞株炎症细胞因子表达的影响, 探讨灯盏乙素抗炎作用机制。**方法** 通过荧光素酶报告基因检测核转录因子 NF- $\kappa$ B 活性, 并利用 LPS 刺激使 BV2 细胞和通过 RT-PCR 和蛋白免疫法检测 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 及蛋白含量, 研究灯盏乙素的抗炎作用。实验分为正常组、LPS 刺激(1  $\mu$ g/ml)的模型组、灯盏乙素组(0.1、1、10 和 100  $\mu$ g/ml)。**结果** 灯盏乙素预处理(1~100  $\mu$ g/ml)可抑制 LPS 引起 pNF- $\kappa$ B 293 的核转录因子 NF- $\kappa$ B 激活( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 灯盏乙素预处理(1~100  $\mu$ g/ml)能够抑制 LPS 引起 BV2 的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 和蛋白含量升高( $P < 0.01$ )。**结论** 灯盏乙素具有抗炎作用, 其抗炎作用与抑制核转录因子 NF- $\kappa$ B、抑制炎症细胞因子表达有关。

**[关键词]** 灯盏乙素; 炎症; 细胞因子类; 肿瘤坏死因子; 白介素

**[中图分类号]** R 916.63 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)11-1235-04

### Scutellarin inhibits LPS-induced pro-inflammatory cytokine expression in BV2 cells

MAO Jun-qin<sup>1</sup>, MENG Hui<sup>1\*</sup>, ZHAO Dan<sup>1</sup>, WANG Run<sup>1</sup>, ZHENG Yue<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, No. 85 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China

2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of scutellarin on LPS-induced pro-inflammatory cytokine expression in BV2 cells, so as to explore the anti-inflammatory mechanism of scutellarin. **Methods** The experiment was divided into 5 groups, namely, a normal control group, a model control group (stimulated by LPS), and three Scutellarin treatment groups (0.1, 1, and 100  $\mu$ g/ml). NF- $\kappa$ B activity was examined by Luciferase Reporter Gene Assay. BV2 cells were treated with LPS; expressions of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA and protein were examined by real-time PCR and Western blotting analysis, respectively. **Results** Scutellarin treatment greatly inhibited LPS-induced NF- $\kappa$ B activation in pNF- $\kappa$ B 293 cells. The treatment also noticeably inhibited LPS-induced expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in BV-2 cells. **Conclusion** Scutellarin has anti-inflammatory effect, which maybe related to the inhibition of NF- $\kappa$ B-mediated pathway and inhibition of pro-inflammatory cytokine expression.

**[Key words]** scutellarin; inflammation; cytokines; tumor necrosis factor; interleukin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(11):1235-1238]

灯盏花, 又名灯盏细辛, 是菊科飞蓬属短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz. 的全草。其提取物已被证实具有止痛、消炎、抗凋亡<sup>[1-2]</sup> 等作用, 并制备成灯盏细辛注射液、灯盏细辛片等广泛应用于临床治疗心绞痛、脑血栓、脑梗死<sup>[2]</sup> 等疾病, 取得了一定的疗效。灯盏花提取物含有黄酮、吡喃酮、咖啡酸酯、酚酸类化合物等<sup>[3]</sup>, 其中灯盏乙素 (Scutellarin, Scu) 占总量的 90% 左右。本实验选取灯盏花的主要成分灯盏乙素作为研究对象, 进一步

探讨其抗炎作用, 为确定其有效成分及提高药物纯度及疗效提供实验依据。

### 1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 灯盏乙素(批号:090108, 纯度 98%, 上海亿欣生物科技有限公司), 293 细胞和 BV-2 细胞株购自中国科学院细胞库, pNF- $\kappa$ B 293 细胞株由第二军医大学药学院药理学教研室实验室构建。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、丙烯酰胺、甲叉双

[收稿日期] 2011-06-08

[接受日期] 2011-10-10

[作者简介] 毛峻琴, 硕士, 主管药师. E-mail: maojq204@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81818310, E-mail: mengh1970@163.com

丙酰胺、十二烷基硫酸钠、四甲基乙二胺及四甲基偶氮唑 [3-(4,5)-dimethylthiazoliumromide, MTT], 均购于 Sigma 公司; 荧光素酶试剂盒和 M-MLV 反转录试剂盒为 Promega 公司; SYBR Premix Ex Taq 购自 TaKaRa 公司; ELISA 试剂盒、DMEM 培养液、胎牛血清、0.25% 胰酶和 TRIzol 购于 Invitrogen 公司; 蛋白一抗、二抗购于 Santa Cruz 公司; 蛋白提取、定量试剂盒及 ECL 发光试剂盒购于 Pierce 公司; 硝酸纤维素膜购于 Millipore 公司。CO<sub>2</sub> 孵箱 (日本 Sanyo 公司), 酶标仪 (Biotek 公司), 发光检测仪 (Berthold 公司), RT-PCR 仪 (TaKaRa 公司), 电泳仪和电转移仪 (Bio-Rad 公司)。

1.2 实验分组 本实验中共分 5 组, 分别是正常组、LPS 刺激 (1 μg/ml) 模型组、灯盏乙素低剂量组 (0.1 μg/ml)、灯盏乙素中剂量组 (1 μg/ml)、灯盏乙素大剂量组 (10 μg/ml) 和灯盏乙素高剂量组 (100 μg/ml)。

1.3 细胞培养 pNF-κB 293 细胞和 BV-2 细胞均培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 待细胞铺满培养皿底 70%~80% 后, 用 0.25% 的胰酶进行消化, 锥虫蓝染色进行活细胞计数, 使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液调整细胞密度至 6×10<sup>5</sup>/ml, 以每孔 100 μl 接种于 96 孔板中, 正常条件培养 24 h 后进行实验。

1.4 荧光素酶活性检测 pNF-κB 293 细胞先与不同浓度的药物共孵育 2 h, 同时设置空白及对照, 再加入 1 μg/ml 的 LPS 刺激 24 h<sup>[4]</sup>, 依照试剂盒说明书进行荧光素酶活性检测。

1.5 MTT 检测 BV-2 细胞与不同浓度的药物共孵育 24 h, 同时设置空白及对照, 然后每孔加入 10 μl 5 mg/ml MTT 溶液, 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续培养 4 h 后吸去上清, 每孔加入 150 μl 二甲亚砜溶液 (DMSO), 37°C 下振荡 15 min, 于 570 nm 下检测光密度 (D) 值。

1.6 酶联免疫吸附反应 (ELISA) 检测 TNF-α、IL-1β 含量 BV-2 细胞先与不同浓度的药物共孵育 2 h, 同时设置空白及对照, 再加入 1 μg/ml LPS 刺激 24 h, 收集上清, 3 000×g 离心 5 min, 去掉细胞碎片, 按照试剂盒说明书分别检测 TNF-α、IL-1β 蛋白含量。

1.7 RT-PCR 检测 mRNA 含量 使用 TRIzol 裂解法提取细胞 Total RNA, M-MLV 进行反转录得到 cDNA。使用荧光染料法进行实时定量 PCR 检测。25 μl 反应体系包括 2 μl cDNA、12.52 μl SYBR

Premix, 上下游引物为 0.5 μl, 9.5 μl dH<sub>2</sub>O。引物序列如下: TNF-α-forward primer: 5'-GAG TCC GGG CAG GTC TAC TTT-3', TNF-α-reverse primer 5'-CAG GTC ACT GTC CCA GCA TCT-3'; IL-1β-forward-primer: 5'-ACC TGG GCT GTC CTG ATG AGA G-3', IL-1β-reverse primer 5'-CCA CGG GAA AGA CAC AGG TAG C-3'。实验中用 β-actin 作为参照基因, 引物序列如下: β-actin-forward primer: 5'-CCT CTA TGC CAA CAC AGT GC-3', β-actin-reverse primer: 5'-GTA CTC CTG CTT GCT GAT CC-3'。实验条件为: 95°C 10 s 预变性; 95°C 10 s 变性, 60°C 延伸 20 s (40 个循环)。

1.8 蛋白质免疫印迹 (Western blotting) 检测 TNF-α 和 IL-1β 蛋白水平 提取细胞总蛋白 10 μl 上样, 使用 4% SDS-PAGE 浓缩胶及 12% SDS-PAGE 分离胶进行垂直电泳, 400 mA 横流 60 min 转膜。用 5% 脱脂奶粉溶液封闭 1 h, 4°C 一抗 (1:1 000 稀释) 孵育过夜, 用含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 3 次, 再用二抗 (1:5 000 稀释) 常温孵育 2 h, 进一步清洗后, 化学显色、曝片, 底片扫描后进行光密度分析。

1.9 统计学处理 使用 SPSS 13.0 软件进行统计, 采用 ANOVA 过程进行单因素方差分析。检验水平 (α) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 荧光素酶检测结果 结果 (图 1) 表明: 通过相对光单位 (relative light unit, RLU) 比较, 在 293 细胞中 1 μg/ml 的 LPS 能够引起细胞内核转录因子 NF-κB 激活, 与空白对照组比较差异有统计学意义 (P<0.01); 灯盏乙素预处理组细胞, NF-κB 被 LPS 激活的趋势得到抑制, 相比较于 LPS 刺激组, 100、10、1 和 0.1 μg/ml 灯盏乙素组荧光素酶活性分别降低了 63.71%、60.94%、40.62%、31.66%, 且灯盏乙素抑制 NF-κB 激活具有浓度梯度依赖趋势。

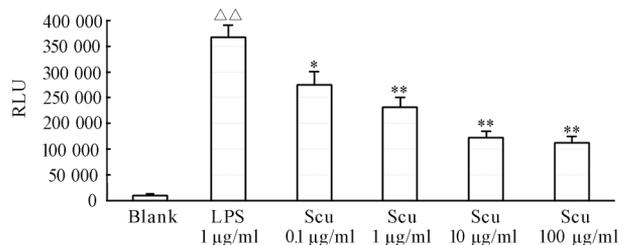


图 1 荧光素酶检测结果

Fig 1 Results of luciferase detection

\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs LPS group; △△ P<0.01 vs blank group. n=3,  $\bar{x} \pm s$ . RLU: Relative light unit; Scu: Scutellarin; LPS: Lipopolysaccharide

2.2 细胞活性检测结果 图 2 表明, 0.1~100  $\mu\text{g/ml}$  灯盏乙素对 BV2 细胞活性无明显影响, 1 000  $\mu\text{g/ml}$  灯盏乙素可降低 BV2 细胞活性 ( $P < 0.01$ )。所以本实验灯盏乙素的浓度确定为 100  $\mu\text{g/ml}$  以下。

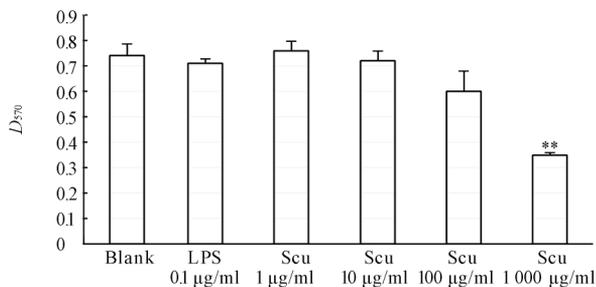


图 2 灯盏乙素 MTT 实验结果

Fig 2 MTT results of scutellarin(Scu)

LPS; Lipopolysaccharide. \*\*  $P < 0.01$  vs blank group.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 ELISA 检测结果 图 3 表明: 在 BV-2 细胞中, 灯盏乙素不同浓度预处理组 (1~100  $\mu\text{g/ml}$ ) 细胞上清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量较 LPS 刺激组降低 ( $P < 0.01$ )。100、10 和 1  $\mu\text{g/ml}$  浓度的灯盏乙素对 TNF- $\alpha$  的抑制率分别为 72.78%、59.43%、27.91%。灯盏乙素对 TNF- $\alpha$  的抑制作用有浓度依赖趋势。灯盏乙素对 IL-1 $\beta$  的抑制作用同样具有浓度依赖趋势, 100、10、1  $\mu\text{g/ml}$  浓度灯盏乙素对 IL-1 $\beta$  的抑制率分别为 76.47%、47.06%、30.41%。

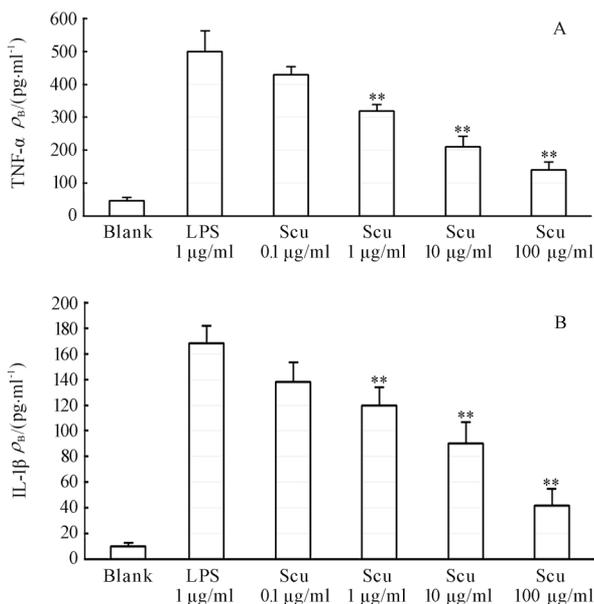


图 3 灯盏乙素对 LPS 诱导 BV-2 细胞 TNF- $\alpha$ (A)、IL-1 $\beta$ (B) 表达的影响

Fig 3 Effect of scutellarin(Scu) on LPS-induced expression of TNF- $\alpha$ (A) and IL-1 $\beta$ (B) in BV-2 cells

\*\*  $P < 0.01$  vs LPS group.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . LPS; Lipopolysaccharide

2.4 RT-PCR 检测结果 图 4 表明: 细胞经 LPS 刺激后, 细胞内 TNF- $\alpha$  mRNA 含量增加。灯盏乙素各预处理组 (1~100  $\mu\text{g/ml}$ ) 均能抑制 LPS 导致的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 升高。灯盏乙素 1、10 和 100  $\mu\text{g/ml}$  浓度组对 TNF- $\alpha$  的抑制率分别为 49.23%、55.37% 和 70.75% ( $P < 0.01$ ), 对 IL-1 $\beta$  mRNA 的抑制率分别为 36.1%、43.1% 和 58.2% ( $P < 0.01$ )。

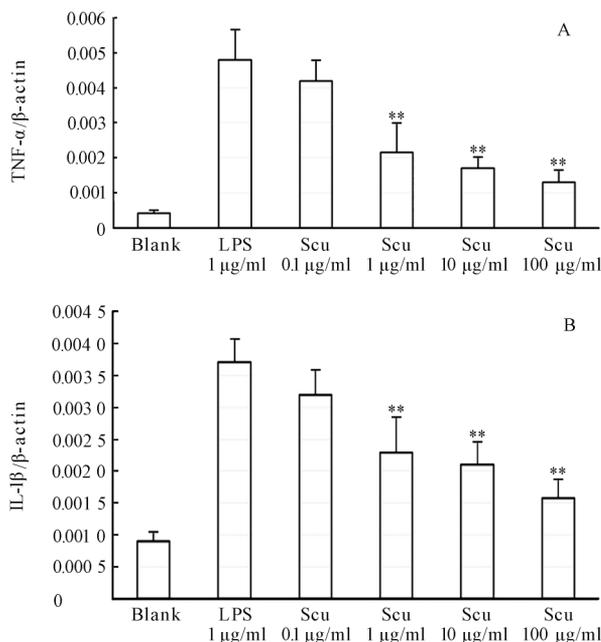


图 4 灯盏乙素对 LPS 诱导 BV2 细胞 TNF- $\alpha$ (A) 和 IL-1 $\beta$ (B) 的 mRNA 影响

Fig 4 Scutellarin(Scu) inhibited LPS-induced expression of TNF- $\alpha$ (A) and IL-1 $\beta$ (B) at mRNA level in BV2 cells

\*\*  $P < 0.01$  vs LPS group.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . LPS; Lipopolysaccharide

2.5 蛋白免疫印迹检测结果 图 5 表明, 灯盏乙素能抑制 LPS 诱导的 BV2 细胞 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  蛋白水平升高。

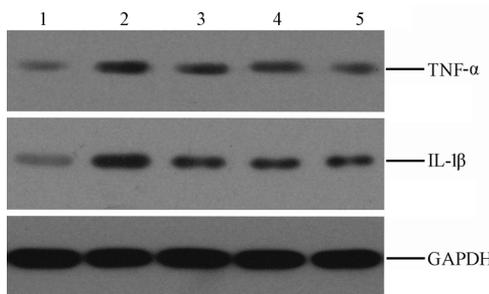


图 5 灯盏乙素对 LPS 诱导的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  蛋白水平的影响

Fig 5 Inhibition of LPS-induced protein expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in rat BV2 cells

1: BV-2 cell group; 2: LPS group; 3: Scutellarin group(1  $\mu\text{g/ml}$ ); 4: Scutellarin group(10  $\mu\text{g/ml}$ ); 5: Scutellarin group(100  $\mu\text{g/ml}$ )

### 3 讨论

炎症是临床上最为常见的症状之一,减轻及消除炎症反应对于治疗疾病意义十分重大。大量研究表明炎症反应的主要通路为 NF- $\kappa$ B 介导的通路<sup>[5]</sup>等。NF- $\kappa$ B 是一种普遍存在于真核细胞的核转录因子,首次发现于 B 淋巴细胞核提取物中,能调控细胞因子、生长因子、细胞黏附分子及急性时相蛋白等蛋白基因的表达,同时也参与细胞增殖调控和凋亡<sup>[6]</sup>。NF- $\kappa$ B 作为一种转录因子,是调节基因转录的重要因素之一。内外源致炎物质作用于机体,使机体产生炎症因子,进而促使机体发生 NF- $\kappa$ B 核迁移及活化,后者还可诱导炎症因子的大量增加,达到进一步放大炎症信号的目的。TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  都是重要的炎症因子,由单核细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞等多种细胞分泌,在接受 LPS、TNF- $\alpha$ <sup>[7-8]</sup> 等刺激信号后,继而导致其他一系列细胞因子的合成和释放,引起中性粒细胞、嗜碱粒细胞等炎症细胞的聚集,并诱导细胞间黏附分子表达。可见,无论是抑制 NF- $\kappa$ B 活化还是降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平,均能有效抑制 NF- $\kappa$ B 通路,达到减轻及消除炎症反应的目的。

LPS 是 G<sup>-</sup> 细菌细胞壁中的脂多糖成分,由亲水性的多糖及疏水性的类脂成分。其中类脂部分由 2 个葡糖胺、磷酸盐和一定量的脂肪酸组成,无种属特异性,是 LPS 的主要生物活性成分。众多研究表明,LPS 是介导革兰阴性菌脓毒症的重要启动因子,通过其结合 Toll 样受体或调节蛋白的作用,诱导宿主多种细胞因子的合成和释放,触发机体一系列病理生理过程,如促进炎症因子转录和表达等<sup>[9]</sup>。大量研究表明 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号转导通路是 LPS 所介导的信号转导通路中最重要的下游通路<sup>[10]</sup>,LPS 作用于 TLR4 后导致 TLR4 的聚合而活化,磷酸化 NF- $\kappa$ B 抑制因子,使 NF- $\kappa$ B 进行核转移,激活 NF- $\kappa$ B 介导的通路。

本实验就其主要成分灯盏乙素进行了相关实验,结果显示灯盏乙素细胞毒性低,浓度低于 100  $\mu$ g/ml 时无细胞毒作用( $P>0.05$ );灯盏乙素还降低了 LPS 刺激产生的炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 水平和蛋白质水平升高。实验表明,灯盏乙素能有效抑制 NF- $\kappa$ B 的活化,并降低炎症因子的应答,进而阻断 NF- $\kappa$ B 介导的炎症通路。

### [参考文献]

- [1] Hong H, Liu G Q. Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin [J]. *Life Sci*, 2004, 74: 2959-2973.
- [2] Ma R, Sun J L, Zhang X Q, Dai Y, Sun J Z. Amelioration of graft ischemia-peperfusion injury by breviscapine in rat small bowel transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2008, 38: 2788-2790.
- [3] 张峻, 李雪松, 张卫东. 中药灯盏花化学成分与药理活性研究进展 [J]. *药学实践杂志*, 2002, 20: 103-108.
- [4] Zheng L T, Ock J, Kwon B M, Suk K. Suppressive effects of flavonoid fisetin on lipopolysaccharide-induced microglial activation and neurotoxicity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8: 484-494.
- [5] Leiro J, Arranz J A, Yáñez M, Ubeira F M, Sanmartín M L, Orallo F, et al. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4: 763-778.
- [6] Hong M H, Lee J Y, Jung H, Jin D H, Go H Y, Kim J H, et al. *Sophora flavescens aiton* inhibits the production of pro-inflammatory cytokines through inhibition of the NF kappaB/IkappaB signal pathway in human mast cell line (HMC-1) [J]. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23: 251-258.
- [7] Li H, Lin X. Positive and negative signaling components involved in TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation [J]. *Cytokine*, 2008, 41: 1-8.
- [8] Lyu S A, Lee S Y, Lee S J, Son S W, Kim M O, Kim G Y, et al. Seungma-galgeun-tang attenuates proinflammatory activities through the inhibition of NF-kappaB signal pathway in the BV-2 microglial cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 107: 59-66.
- [9] Liu D Z, Liang H J, Chen C H, Su C H, Lee T H, Huang C T, et al. Comparative anti-inflammatory characterization of wild fruiting body, liquid-state fermentation, and solid-state culture of *Taiwanofungus camphoratus* in microglia and the mechanism of its action [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113: 45-53.
- [10] Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide; evidence for TLR4 as the LPS gene product [J]. *J Immunol*, 1999, 162: 3749-3752.
- [11] Seger R, Krebs E G. The MAPK signaling cascade [J]. *FASEB J*, 1995, 9: 726-735.
- [12] Choi Y, Moon A, Kim Y C. A pinusolid derivative, 15-methoxypinusolidic acid from *Biota orientalis* inhibits inducible nitric oxide synthase in microglial cells; implication for a potential anti-inflammatory effect [J]. *Int immunopharmacol*, 2008, 8: 548-555.

[本文编辑] 尹 茶