

doi: 10.3969/j.issn.1003-4271.2014.04.11

# 巴马汀对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 IL-6 表达的影响

张海<sup>1</sup>, 李佳川<sup>2</sup>, 胡泊杨<sup>1</sup>, 王平<sup>1</sup>

(1.成都中医药大学, 四川 成都 611137; 2.西南民族大学, 四川 成都 610041)

**摘要:** 目的: 观察巴马汀对脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 小鼠巨噬细胞白介素 6(IL-6)表达的作用. 方法: 采用 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞建立炎症反应模型, 加入不同浓度的巴马汀, 采用 ELISA 法检测 IL-6 的生成量; 采用 qRT-PCR 法检测 IL-6 mRNA 的表达. 结果: 巴马汀能明显抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 IL-6 的生成, 以及 IL-6 mRNA 的表达, 并呈现出浓度依赖性. 结论: 巴马汀可通过抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 IL-6 的生成及 IL-6 mRNA 的表达, 从而发挥抗炎作用.

**关键词:** 巴马汀; LPS; RAW264.7 巨噬细胞; IL-6

中图分类号: R285, R96

文献标识码: A

文章编号: 1003-4271(2014)04-0527-04

内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁上的一种脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)和蛋白的复合物, 其中 LPS 是诱发炎症反应过程中的主要致病因素, 它可以诱导体内单核-巨噬细胞合成并释放多种炎症介质, 参与机体免疫炎症反应. IL-6 是释放的这些炎症介质中的核心成员之一, 具有广泛的生物学活性, 它不仅是一种炎症细胞因子, 也是一种促炎介质<sup>[1-2]</sup>, 检测 IL-6 对研究炎症性疾病发病机制和治疗具有重要意义. 巴马汀(palmatine)系由毛茛科植物黄连(*Rhizoma Coptidis*)的干燥根茎中提取得到的生物碱精制而成, 具有抗菌<sup>[3-5]</sup>等广泛的药理作用. 动物试验研究表明巴马汀具有促 ACTH 释放功能<sup>[6]</sup>, 故具有抗炎作用, 但就其抗炎机制而言, 目前研究甚少. 本研究通过 LPS 诱导的 RAW264.7 小鼠巨噬细胞建立炎症反应模型, 观察巴马汀对 IL-6 的生成及 IL-6 mRNA 的表达, 探讨其体外抗炎机制.

## 1 材料

### 1.1 药品及试剂

巴马汀(HPLC $\geq$ 98%), 成都曼思特生物科技有限公司; 胎牛血清, 北京元亨金马生物技术开发公司; DMEM 培养基, 赛墨飞世尔生物化学制品(北京)有限公司; 二甲基亚砜(DMSO), 成都市科龙化工试剂厂. Alarm-Blue 细胞增殖与活性检测试剂, 上海生博医学生物工程科技有限公司; 内毒素(LPS), 美国 Sigma 公司, BAY 11-7082, 碧云天生物技术研究所; 白介素 6(IL-6) 酶联免疫吸附法试剂盒, Uscn Life Science Inc; qRT-PCR 试剂盒 SsoFast™ EvaGreen® SuperMix, Bio-Rad Laboratories.

### 1.2 细胞株

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞株细胞, 购自中国科学院上海生命科学研究院.

收稿日期: 2014-04-22

作者简介: 张海(1986-), 男, 汉族, 四川巴中人, 助理实验师, 硕士. 研究方向: 中药药效与毒理. E-mail: haicheung@163.com.

通讯作者: 王平(1979-), 男, 汉族, 陕西咸阳人, 副教授, 硕士. 研究方向: 中药药效与药代. E-mail: viviansector@aliyun.com.

基金项目: 四川省教育厅项目“黄连治疗老年性痴呆(AD)作用与  $\alpha$ 7nACh 受体相关性研究”(13ZB0314)和“民族药娘戎泽苦寒伤肝量-时-毒复杂关系研究”(14ZB0467); 成都中医药大学科技发展基金面上项目“黄连碱体外抗炎及其潜在性治疗阿尔兹海默症作用的研究”(ZRMS201337); 国家自然科学基金“从‘痰-浊-毒’毒损脑络病机基础探讨对酒蒸黄连石菖蒲组分抗糖尿病认知障碍的配伍调控机制”(81302912).

### 1.3 仪器

SW-CJ-2FD 洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; MCO-15AC 型 CO<sub>2</sub> 培养; Multiskan MK3 酶标仪, 美国 Thermo 公司; 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 分析天平, sartorius 公司; Chromo4 荧光定量 PCR 仪、My Cycler™PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司.

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

RAW264.7 细胞按常规方法复苏, 培养于含 10% 胎牛血清、青霉素( $1 \times 10^5$  U/L)及链霉素(100 mg/L)的 DMEM 高糖培养基中, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、95%湿度的细胞培养箱中培养. 倒置显微镜下观察细胞的生长情况, 细胞贴壁率达到 80%左右传代, 传代三次以上细胞进入对数生长期, 即可用于实验.

### 2.2 细胞增殖检测

取对数生长期的细胞, 按  $4 \times 10^4$ /孔 200  $\mu$ l 接种到 96 孔培养板, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、95%湿度的培养箱中培养. 培养过夜后, 加入终浓度为 0.1 $\mu$ M、1 $\mu$ M、10 $\mu$ M、20 $\mu$ M、30 $\mu$ M、50 $\mu$ M 的巴马汀, 同时设置空白对照组. 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中继续培养, 细胞培养满 24h 后每孔加入 Alarm-Blue 细胞增殖与活性检测试剂 10 $\mu$ L 并于培养箱中继续培养 2-6h. 当培养基的颜色由靛青蓝变成粉红色后用荧光酶标仪测定各孔相对荧光单位(RF 值), 激发光波长和发射光波长分别设置为 560nm 和 590nm. 根据所测得的 RUF 值计算 RAW264.7 巨噬细胞增殖抑制率:

$$\text{细胞增殖抑制率} = (1 - \text{实验组 RFU 值} / \text{空白对照组 RFU 值}) \times 100\%$$

### 2.3 巴马汀对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞生成 IL-6 的影响

取生长状态良好的 RAW264.7 巨噬细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化后加含 10% FBS 的无酚红 DMEM 高糖培养基制成细胞悬液, 并稀释细胞浓度至  $5 \times 10^5$  个/mL 接种到 24 孔培养板, 每孔 1mL, 置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养.

实验分为巴马汀组, 浓度分别为 1 $\mu$ M、10 $\mu$ M、30 $\mu$ M; 阳性药 BAY 11-7082 组, 浓度为 10 $\mu$ M, 同时设置 LPS 组(LPS: 1 $\mu$ g/mL)和空白对照组. 细胞融合后, 以上各组除 LPS 组和空白对照组外均先加入相应的药物预处理 1h, 然后各组加入 1 $\mu$ g/mL 的 LPS, 空白对照组加入相同体积的 DMSO, 置于培养箱中培养 24h 后取细胞培养上清液, 按试剂盒说明操作, 用酶标仪于 450nm 波长测定吸光度值.

### 2.4 巴马汀对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 IL-6 mRNA 表达的影响

细胞悬液稀释至  $1 \times 10^6$  个/mL, 2mL/孔接种至 6 孔培养板. 细胞融合后, 各组加入相应药物孵育 1h, 然后除空白对照组外, 各组加入 1 $\mu$ g/mL 的 LPS, 于培养箱中培养 24h 后终止培养. TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计在 260nm 波长处测定 RNA 浓度. 以 Oligo(dT)18 为引物, 用 SuperScript III 逆转录酶将新提取的等量细胞总 RNA 逆转录为 cDNA. 以 cDNA 为模板, 用 SsoFast™ EvaGreen® SuperMix 荧光定量反应试剂盒进行定量 PCR 反应, 以 GAPDH 为内参. 荧光定量 PCR 所用引物见表 1.

表 1 荧光定量 PCR 所用引物序列  
Tab.1 Primers of qRT-PCR

基因名称	引物序列
IL-6 forward	5' TGGAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAG 3'
IL-6 reverse	5' TCTGACCACAGTGAGGAATGTCCAC 3'
GAPDH forward	5' AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG 3'
GAPDH reverse	5' CCTGGAAGATGGTGATGGGAT 3'

### 2.5 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计软件进行统计分析. 组间差异比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 方差齐者采用 LSD 检验, 方差不齐者采用 Tamhane's T2 检验, 数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 以  $p < 0.05$  认为其组间差异有统计学意义.

### 3 结果

#### 3.1 巴马汀对 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响

如表 2 所示, 巴马汀 50 $\mu$ M 浓度对 RAW264.7 巨噬细胞的增殖有明显的抑制作用, 其他浓度对 RAW264.7 巨噬细胞的增殖没有明显的影响, 和空白对照组比较无显著性差异, 表明 0.1 $\mu$ M、1 $\mu$ M、10 $\mu$ M、20 $\mu$ M 和 30 $\mu$ M 的巴马汀无细胞毒作用, 不影响细胞的生长, 所以选取浓度在 50 $\mu$ M 以下的巴马汀用于实验.

表 2 巴马汀对 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响

Tab.2 Effect of palmatine on the cell proliferation of RAW 264.7 macrophage cells

组别	浓度( $\mu$ M)	增殖抑制率(%)
空白	—	0.00 $\pm$ 0.00
巴马汀(Palmatine)	0.1	2.23 $\pm$ 1.72
	1	-0.50 $\pm$ 1.47
	10	2.59 $\pm$ 1.63
	20	3.23 $\pm$ 1.46
	30	5.97 $\pm$ 2.43
	50	29.57 $\pm$ 1.19**

注: \*\*  $p < 0.01$ , 与空白对照组比较

#### 3.2 巴马汀对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞生成 IL-6 的影响

如图 1 所示, 正常 RAW264.7 巨噬细胞上清液中 IL-6 含量很低, 给予 LPS 刺激后, 各组 IL-6 的生产量均显著增加, 加入 BAY 11-7082 和不同浓度的巴马汀能明显抑制 LPS 诱导的 IL-6 生成, 其中, 巴马汀的抑制作用呈现出浓度依赖性.

#### 3.3 巴马汀对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 IL-6 mRNA 表达的影响

如图 2 所示, 和空白组比较, LPS 可显著诱导 RAW264.7 巨噬细胞 IL-6 mRNA 的表达, BAY 11-7082 和不同浓度的巴马汀均可显著抑制 IL-6 mRNA 的表达, 其抑制效应随着巴马汀浓度的增加而增强.

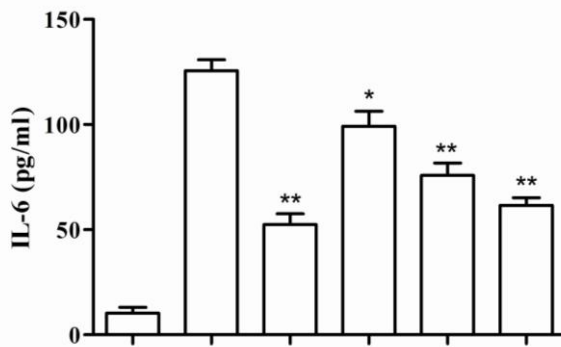


图 1 巴马汀对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞生成 IL-6 的影响

Fig.1 Effect of palmatine on IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells

注: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , 与 LPS 组比较

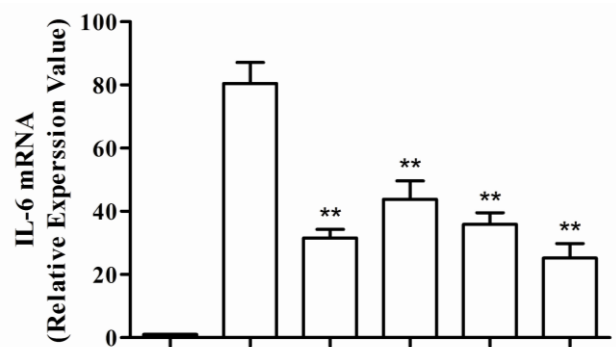


图 2 巴马汀对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 IL-6 mRNA 表达的影响

Fig.2 Effect of palmatine on the expression of IL-6 mRNA in LPS-induced RAW264.7 cells

注: \*\*  $p < 0.01$ , 与 LPS 组比较

### 4 讨论与结论

巨噬细胞(Macrophages)是调控炎症反应的主要细胞, 是体内启动炎症介质产生的中心细胞. 在参与炎症反应的各种介质中, 最重要的是肿瘤坏死因子( tumor necrosis factor, TNF), 白细胞介素-1( interleukin-1, IL-1 ),

IL-6、IL-8 等促炎性细胞因子(pro-inflammatory cytokine), 与内毒素休克发病和死亡的关系也最为密切<sup>[7-8]</sup>. IL-6 又称 B 细胞分化因子, 由单核细胞、T 淋巴细胞及纤维母细胞产生, 是重要的致热性细胞因子, 可由 IL-1 和 TNF- $\alpha$  诱导产生, 其在血浆中的水平常作为细胞因子级联反应激活的一个标志, 反映出宿主炎症反应与疾病严重程度<sup>[9]</sup>的相关性.

巴马汀存在于多种植物中, 是中药黄连、黄柏、黄藤等的主要生物活性物质. 本研究中, 我们选取炎性细胞因子 IL-6 及其 mRNA 的表达来探讨巴马汀抗炎作用分子机制. 结果表明, 巴马汀对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 IL-6 有明显的抑制作用, 且呈剂量依赖; qRT-PCR 结果显示, 巴马汀能明显抑制 IL-6 mRNA 的表达, 表明巴马汀可影响促炎细胞因子的转录表达.

综上所述, 巴马汀可明显抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 IL-6 生成, 表现出较强的抗炎作用. 由于炎性细胞因子 mRNA 含量代表了转录表达水平, 因此可得出巴马汀的抗炎作用是通过抑制 IL-6 mRNA 的表达发挥作用. 研究表明, 核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和活化蛋白 AP-1 能从基因转录水平调控 IL-6 和 IL-1 $\beta$  等炎性细胞因子的表达<sup>[10]</sup>; 巴马汀的抗炎作用是否与 NF- $\kappa$ B 通路有关, 即是否还存在其他靶点和环节仍需进一步研究.

## 参考文献

- [1] PAPANICOLAOU DA, WILDER RL, MANOLAGAS SC, et al. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease [J]. *Ann Intern Med*, 1998, 128 (2): 127-137.
- [2] XING Z, GAULDIE J, COX G, et al. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1998, 101 (2): 311-320.
- [3] KIM SH, LEE SJ, LEE JH, et al. Antimicrobial activity of 9-O-acetyl- and 9-O-alkylberberubine derivatives [J]. *Planta Med*, 2002, 68 (3): 277-281.
- [4] 杨勇, 叶小利, 李学刚. 4 种黄连生物碱的抑菌作用 [J]. *时珍国医国药*, 2007, 18 (12): 3013-3014.
- [5] YAN D, JIN C, XIAO XH, DONG XP, et al. Antimicrobial properties of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2008, 70 (6): 845-849.
- [6] 张恒昆, 王跃飞, 王强, 等. 人体血浆中盐酸巴马汀的 HPLC 测定和药代动力学研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2008, 19 (2): 120-125.
- [7] 倪志宇, 丛斌, 董玫, 等. 八胆胆囊收缩素通过 p38 MAPK 通路抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 IL-1 $\beta$  表达 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27 (7): 971-975.
- [8] HWANG PA, CHIEN SY, CHAN YL, et al. Inhibition of Lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses by *Sargassum hemiphyllum* sulfated polysaccharide extract in RAW264.7 macrophage cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(5): 2062-2068.
- [9] 徐晓玲, 梁瑞霞, 黄君健, 等. 细胞因子在类风湿关节炎发病机制中的作用 [J]. *生物技术通讯*, 2008, 19 (1): 111-114.
- [10] CHARLES A, DINARELLO MD. Proinflammatory Cytokines [J]. *Chest Journal*, 2000, 118 (2): 503-508.

## Effect of palmatine on IL-6 expression induced by LPS in RAW264.7 macrophage cells

ZHANG Hai<sup>1</sup>, LI Jia-chuan<sup>2</sup>, HU Po-yang<sup>1</sup>, WANG Ping<sup>1</sup>

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, P.R.C.;

2. Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, P.R.C.)

**Abstract: Objective:** To investigate the effect of palmatine on IL-6 expression induced by lipopolysaccharide (LPS) in RAW264.7 mice macrophage cells. **Methods:** An inflammatory response model was established using RAW264.7 macrophage cells induced by LPS. Doses of palmatine were used to treat RAW264.7 macrophage cells to evaluate the effects of palmatine. IL-6 concentration was measured with ELISA and IL-6 mRNA expression was tested by qRT-PCR. **Results:** Palmatine inhibited the production of IL-6 and IL-6 mRNA expression in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells in a dose-dependent manner. **Conclusion:** The anti-inflammatory effects of palmatine may be mediated by inhibiting the production of IL-6 and the expression of IL-6 mRNA.

**Key words:** palmatine; LPS; RAW264.7 macrophage cell; IL-6