

罗福龙,李文举,吴小会,等. 连翘提取物通过调节巨噬细胞凋亡和极化抑制 LPS 诱导的炎症作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 18-26.

Luo FL, Li WJ, Wu XH, et al. *Forsythia suspensa* extract inhibits LPS-induced inflammation by regulating macrophage apoptosis and polarization [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 18-26.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.003

连翘提取物通过调节巨噬细胞凋亡和极化抑制 LPS 诱导的炎症作用

罗福龙^{1,2,3},李文举^{1,2,3},吴小会⁴,钟武^{2,3},范蓓¹,贯东艳¹,王凤忠^{1*},王琼^{1*}

(1.中国农业科学院农产品加工研究所,北京 100193;2.西南医科大学附属医院急诊科,四川 泸州 646000;
3.四川省康复医院,成都 611139;4.重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016)

【摘要】 目的 研究连翘提取物(FSE)对脂多糖(LPS)诱导炎症的抑制作用,以及 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞极化模型建立。**方法** MTT 法检测 FSE 和 LPS 对 RAW264.7 细胞的毒性作用;倒置显微镜检测不同浓度的 FSE 对 LPS 刺激后的细胞形态变化,酶标仪检测细胞上清液的一氧化氮(NO)生成量;荧光显微镜检测细胞内活性氧(ROS)和细胞凋亡的荧光强度;Real-time PCR 法检测巨噬细胞中 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、Arginase-1 和 CD206 mRNA 的表达水平。**结果** MTT 结果发现 FSE 在 50 μ g/mL 浓度时无细胞毒性,LPS 作用 36 h 时,不同浓度 FSE 对 LPS 刺激的细胞形态变化和 NO 生成有抑制作用,同时 FSE 可以抑制 LPS 刺激后活性氧(ROS)的减少和细胞的凋亡,Real-time PCR 结果显示,用不同浓度(100、250、500、750 ng/mL) LPS 处理细胞 24 h,或者用 500 ng/mL 浓度的 LPS 处理细胞不同时间后,RAW264.7 细胞 M1 型标记基因(TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、IL-6)mRNA 的表达水平明显升高,RAW264.7 细胞 M2 型标记基因(IL-10、Arginase-1、CD206)mRNA 的表达水平明显降低;FSE 可降低 LPS 诱导的 M1 型标记基因 mRNA 的表达水平,升高 M2 型标记基因 mRNA 的表达水平。**结论** FSE 可通过抑制 RAW264.7 细胞凋亡和促进 RAW264.7 细胞的极化来抑制 LPS 诱导的炎症反应。

【关键词】 连翘提取物;RAW264.7 细胞;M1/M2 亚型;炎症;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0018-09

Forsythia suspensa extract inhibits LPS-induced inflammation by regulating macrophage apoptosis and polarization

LUO Fulong^{1,2,3}, LI Wenju^{1,2,3}, WU Xiaohui⁴, ZHONG Wu^{2,3}, FAN Bei¹, GUAN Dongyan¹, WANG Fengzhong^{1*}, WANG Qiong^{1*}

(1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China.

2. Department of Emergency Medicine, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000.

3. Sichuan Rehabilitation Hospital, Chengdu 611139; 4. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

【基金项目】中国农业科学院农产品加工研究所创新工程院所重点任务(CAAS-ASTIP-2020-IFST);国家重点研发计划(2016YFE0131800);泸州市-西南医科大学联合课题(2019LZXNYDJ32)。

【作者简介】罗福龙(1995—),男,硕士研究生,研究方向:急诊医学。E-mail:1275128366@qq.com

【通信作者】王琼(1975—),女,博士,研究员,博士生导师,研究方向:食药资源神经精神调节作用研究。E-mail:luyiwangqiong@163.com
王凤忠(1972—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:食品功能因子研究利用与功能食品开发。

E-mail:wangfengzhong@sina.com * 共同通信作者

【Abstract】 Objective We investigated the inhibitory effect of *Forsythia suspensa* extract (FSE) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and establishment of an LPS-induced polarization model of RAW264.7 cells. **Methods** MTT assays were used to assess cytotoxic effects of FSE and LPS on RAW264.7 cells. Inverted microscopy was used to assess morphological changes of cells after stimulation with LPS and various concentrations of FSE. An enzyme marker was used to detect nitric oxide (NO) in culture supernatants. Fluorescence microscopy was used to detect intracellular reactive oxygen species (ROS) and apoptosis. ; Real-time PCR was used to detect iNOS expression in macrophages. iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, Arginase-1 and CD206 mRNA expression was measured by Real-time PCR. **Results** FSE was not cytotoxic at 50 $\mu\text{g/mL}$. At 36 h of LPS stimulation, various concentrations of FSE inhibited LPS-induced morphological changes, NO production and FSE inhibited LPS-induced the reduction of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis. Expression of M1-type marker genes (TNF- α , IL-1 β , iNOS and IL-6) in RAW264.7 cells was significantly increased after treatment with various concentrations (100, 250, 500 and 750 ng/mL) of LPS for 24 h or with 500 ng/mL LPS for various times. The mRNA levels of M2 marker genes (IL-10, Arginase-1 and CD206) were significantly decreased in RAW264.7 cells. FSE decreased the expression of LPS-induced M1 marker genes and increased expression of M2 marker genes. **Conclusions** FSE inhibits LPS-induced inflammatory responses by inhibiting RAW264.7 cell apoptosis and promoting polarization.

【Keywords】 *Forsythia suspensa* extract; RAW264.7 cells; M1/M2 subtype; inflammation; apoptosis

炎症的发生发展是一个时刻变化的过程,主要通过自身免疫系统实现对机体的自我保护作用^[1]。炎症反应在人体内普遍存在,不仅可以减轻和消除有害因子对人体的损伤,还可以促进后期的组织修复,但免疫系统的过度激活,会促使炎症因子的大量释放,形成“细胞因子风暴”^[2],发生严重的不良反应,甚至危及生命。

巨噬细胞作为炎症性疾病最主要的免疫防御细胞,可以释放促炎介质促进炎症因子的形成^[3]。巨噬细胞的可塑性和功能极化作用在炎症反应中发挥着重要作用^[4],巨噬细胞在特定微环境下,可以发生 M1 和 M2 表型的转化,在炎症反应的早期, M1 型巨噬细胞可以分泌多种促炎因子,如诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-12 (IL-12)、IL-6、IL-1 β 等,通过增强其自身的抗原提呈能力来激活 I 型免疫反应,引起组织细胞损伤阻止炎症反应进程。与之相反, M2 型巨噬细胞可以分泌多种炎症抑制因子,如 IL-10、IL-4、精氨酸酶-1 (Arginase-1)、CD206 等,通过抑制炎症反应的发展,促进组织损伤的自我修复过程^[5-6]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可以模拟炎症反应的早期阶段,通过诱导 M1 型巨噬细胞的分化^[7-8],促进炎症的发生。

中药免疫调节在炎症过程中发挥着重要作用,其内在机制可能与巨噬细胞 M1 和 M2 表型的平衡有关。连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl. 是木犀科连翘属植物,连翘果实作为中药在我国被广泛应用^[9],但连翘对巨噬细胞凋亡和

极化的研究鲜有报道。因此,本研究采用 LPS 诱导体外培养 RAW264.7 巨噬细胞的极化模型,探讨了连翘提取物 (FSE) 对 LPS 诱导的巨噬细胞 ROS 和细胞凋亡,以及 M1/M2 型相关标志基因的影响,初步探讨 FSE 在巨噬细胞发挥抗炎作用的内在机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞来自于北京大学医学部。

1.2 主要试剂与仪器

连翘产自山西,购自北京太洋树康药业有限责任公司 (批号 2012054),经水提、浓缩、喷雾干燥、粉碎而成; DMEM 培养基 (Thermo Scientific, 批号 11965092); 胎牛血清 (Gibco, 批号: 10099141); LPS (Sigma 公司, 批号 12880); 一氧化氮检测试剂盒 (碧云天, 批号: S0021); Hoechst33342 (碧云天, 批号: C1022); DCFH-DA 活性氧 ROS 荧光探针 (索莱宝, 批号: D6470); MTT 试剂盒 (索莱宝, 批号: M1020); EASYspinPlus 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒 (艾德莱, 批号: RN28); 反转录试剂盒 (普洛麦格, 批号: A5000); NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus (novoprotein, 批号: E096-01B); Real-time PCR 引物 (北京擎科生物科技有限公司)。

细胞培养箱 (美国, Thermo 公司, 型号: Thermo 371); 酶标仪 (美国, Molecular Devices 公司, 型号: spectra MAX190); 荧光倒置显微镜 (日本, Olympus

公司,型号:IX71);RT-PCR 扩增仪(美国 ABI 公司,型号:ABI 7500);可见紫外分光光度计(上海尤尼柯公司,型号:WFZ UV-2100);低温高速离心机(德国,Eppendorf 公司,型号:5430R)。

1.3 实验方法

1.3.1 RAW264.7 的培养与分组

RAW264.7 细胞复苏后,以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,5% 的 CO₂、37℃ 恒温培养箱培养细胞,每隔 24 h 观察细胞状态并换液和传代,取对数生长期细胞进行实验,以每毫升 1×10⁴ 个的细胞密度接种于 96 孔板,每孔 100 μL;或以每毫升 1×10⁶ 个细胞密度接种于 6 孔板,每孔 2 mL。接种 24 h 后进行实验,实验设置对照组, LPS 组(500 ng/mL),加药组(6.25、12.5、25、50 μg/mL),首先加入不同剂量连翘提取物作用 2 h,再每孔加入 500 ng/mL 的 LPS 溶液共同刺激 36 h。

1.3.2 MTT 法检测 FSE 和 LPS 对 RAW264.7 细胞的毒性作用

取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板,加入不同浓度的 FSE 和 LPS 作用 36 h,每孔加入 10% 的 MTT 溶液 100 μL,培养 4 h 后,吸去孔内培养液。每孔加入 110 μL 二甲苯亚砷,置摇床上低速震荡 10 min,使结晶物充分溶解。490 nm 检测各孔的吸光度。

1.3.3 倒置显微镜观察细胞形态

取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。然后加入 LPS 以及不同浓度 FSE 作用 36 h,用倒置显微镜观察各组细胞形态变化。

1.3.4 细胞上清液一氧化氮(NO)生成量测定

取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞密度接种于 96 孔板。药物处理 36 h 后,取各组细胞上清液 50 μL 分别加入 Griess Reagent I 和 Griess Reagent II 液各 50 μL,酶标仪 540 nm 检测各组的吸光度。

1.3.5 细胞内活性氧(ROS)和细胞凋亡测定

将对数生长期的 RAW264.7 细胞,接种于 6 孔板中,药物处理完成后,加入 1 mL 稀释好的 DCFH-DA 或 Hoechst33342 溶液,稀释比例为 1:1000,使其终浓度为 10 μmol/L,置于 37℃ 细胞培养箱内避光孵育 30 min,用无血清培养基洗 3 次,荧光显微镜观察细胞形态并拍照,用 Image-Pro Plus 分析荧光强度。

1.3.6 总 RNA 的提取、mRNA 的逆转录及 Real-time PCR

提取 RNA 方法参照试剂盒说明书进行,得到 RNA 溶液。按照逆转录试剂盒,以逆转录 cDNA 第一链合成,然后以 cDNA 为模板扩增目标基因的基因编码段,以鼠 GAPDH 为内参照,应用 2^{-ΔΔCt} 法计算各基因的相对表达量。扩增条件如下:95℃ 预变性 1 min;95℃ 变性 20 s,60℃ 延伸 1 min,40 个循环。本实验所用引物由北京擎科生物科技有限公司从 NCBI 中获得,引物用 Primer 6 和 Oligo 7 设计,并由北京擎科生物科技有限公司合成(表 1)。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析,结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间差异比较采用 *t* 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析,*P*<0.05 为具有显著性差异,*P*<0.01 为具有极显著性差异。

2 结果

2.1 FSE 和 LPS 对细胞活性的影响

实验结果显示,相比于对照组细胞,100、200 μg/mL 浓度的 FSE 细胞活力分别为(67.13±3.25)%、(41.49±2.78)%,FSE 浓度依赖性的抑制细胞增殖,在 FSE 低于 50 μg/mL 的浓度处理下,FSE 对细胞的增殖没有明显的抑制作用,细胞存活率没有显著性变化,故选用低于 50 μg/mL 浓度范围进行后续实验(图 1A)。相比于对照组细胞,LPS 浓度在 100~1500 ng/mL 均对细胞的增殖没有明显

表 1 Real-time PCR 引物序列
Table 1 Real-time PCR primer sequences

基因 Gene	引物序列(5' - 3') Primer sequence
TNF-α	Forward: TCTTCTCATTCCTGCTTGTTG
	Reverse: GGTCTGGGCCATAGAACTGA
iNOS	Forward: GAGGCCCAGGAGGAGAGATCCG
	Reverse: TCCATGCAGACAACCTTGCTGTTG
IL-1β	Forward: AAATACCTGTGGCCTTGGGC
	Reverse: CTTGGGATCCACACTCTCCAG
IL-6	Forward: CCAGAGATACAAAGAAATGATGG
	Reverse: ACTCCAGAAGACCAGAGGAAAT
IL-10	Forward: GTGGAGCAGGTGAAGAGTGA
	Reverse: TCGGAGAGAGGTACAAACGAG
Arginase-1	Forward: GTGAAGAAGCCACGGTCTGT
	Reverse: GCCAGAGATGCTTCCAACCTG
CD206	Forward: CTTCCGGCCTTTGGAATAAT
	Reverse: TAGAAGAGCCCTTGGCTTGA
GAPDH	Forward: GGCTGTATTCCCTCCATCG
	Reverse: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

的抑制作用(图 1B)。

2.2 FSE 降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 产生

为研究 FSE 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后的 NO 生成的影响,用不同浓度的 LPS 刺激细胞 36 h。结果发现,与对照组相比,在 500 ng/mL 的 LPS 刺激细胞时,NO 生成量最大,随着 LPS 浓度的增高,NO 生成量逐渐下降(图 2A),故后续实验采用 500 ng/mL 的 LPS 作为诱导浓度。在 500 ng/mL 的 LPS 刺激下,研究了 FSE 对细胞 NO 生成量的作用。结果发现 6.25、12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 FSE 可以降低 LPS 刺激后细胞内 NO 生成量(图 2B)。

2.3 FSE 对 LPS 诱导后 RAW264.7 细胞形态的影响

倒置显微镜下观察到细胞生长状态,正常组的细胞是不规则的圆形;LPS 组的细胞形态相对于正常细胞较大,长出不规则触角,变成梭形,细胞明显

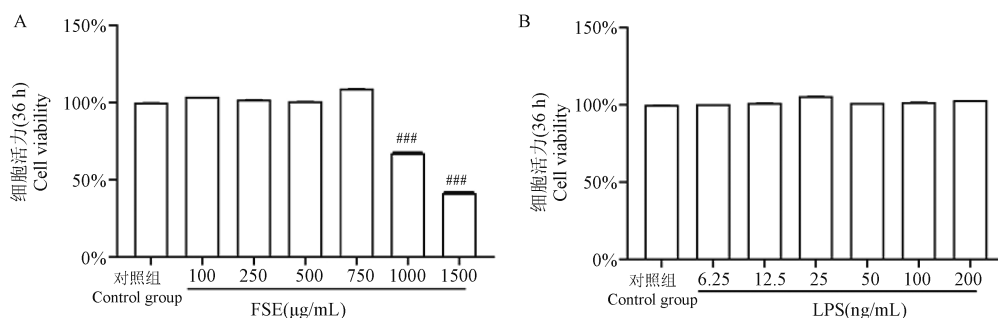
诱导贴壁;各给药组细胞形态均趋于正常,有部分细胞恢复为半贴壁的圆形细胞(图 3)。

2.4 FSE 对 LPS 诱导的细胞内 ROS 的影响

首先,在荧光显微镜下分别测得在 3、6、12、24 h 的绿色荧光强度。在 500 ng/mL 的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 3~6 h 时,荧光强度与对照组比明显升高,但 LPS 刺激细胞 24 h 时,荧光强度与对照组相比明显减少(图 4A)。再用 12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 的 FSE 作用细胞 24 h,与 LPS 组相比,FSE 组荧光强度明显升高(图 4B、4C)。

2.5 FSE 对 LPS 诱导的细胞凋亡的影响

为得到 LPS 刺激之后 RAW264.7 细胞的凋亡情况,在 Hoechst33342 染色的 3、6、12、24 h 分别在荧光显微镜下的蓝色荧光强度。结果发现,在 24 h 荧光强度差异最为明显(图 5A)。接下来,用 12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 的 FSE 作用 24 h,与模型组相比,FSE 组荧光强度明显下降(图 5B、5C)。

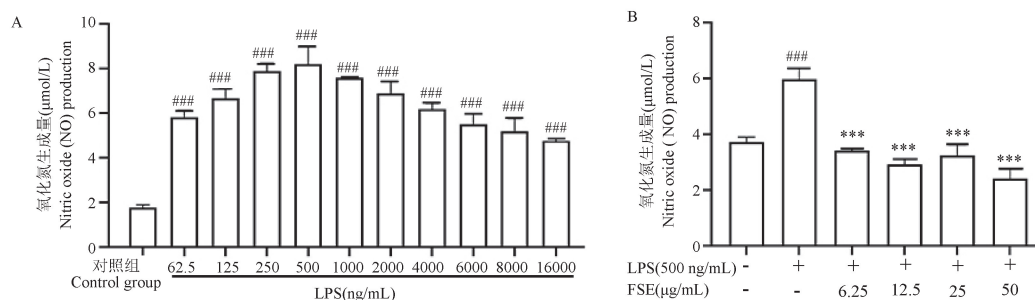


注:A:FSE 对 RAW264.7 细胞活性的影响;B:LPS 对 RAW264.7 细胞活性的影响。与对照组相比,### $P < 0.001$ 。

图 1 FSE 和 LPS 对 RAW264.7 细胞活性的影响

Note. A, Effect of FSE on the activity of RAW 264.7 cells. B, Effect of LPS on the activity of RAW 264.7 cells. Compared with the control group, ### $P < 0.001$

Figure 1 Effects of FSE and LPS on the activity of RAW 264.7 cells



注:A:不同浓度的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后 NO 生成量;B:不同浓度的 FSE 对 LPS 刺激后细胞 NO 生成量的影响。与对照组相比,### $P < 0.001$;与 LPS 组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 2 FSE 降低 LPS 刺激后 NO 的产生

Note. A, NO production of RAW264.7 cells stimulated by different concentrations of LPS. B, Effects of different concentrations of FSE on cell NO production stimulated by LPS. Compared with the control group, ### $P < 0.001$. Compared with the LPS group, *** $P < 0.001$.

Figure 2 FSE reduces NO production after LPS stimulation

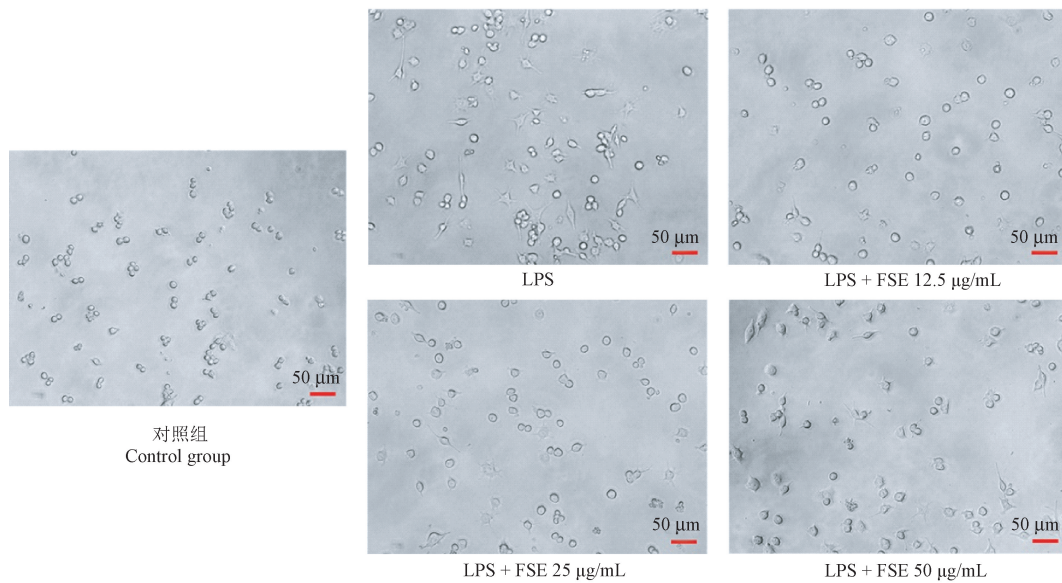
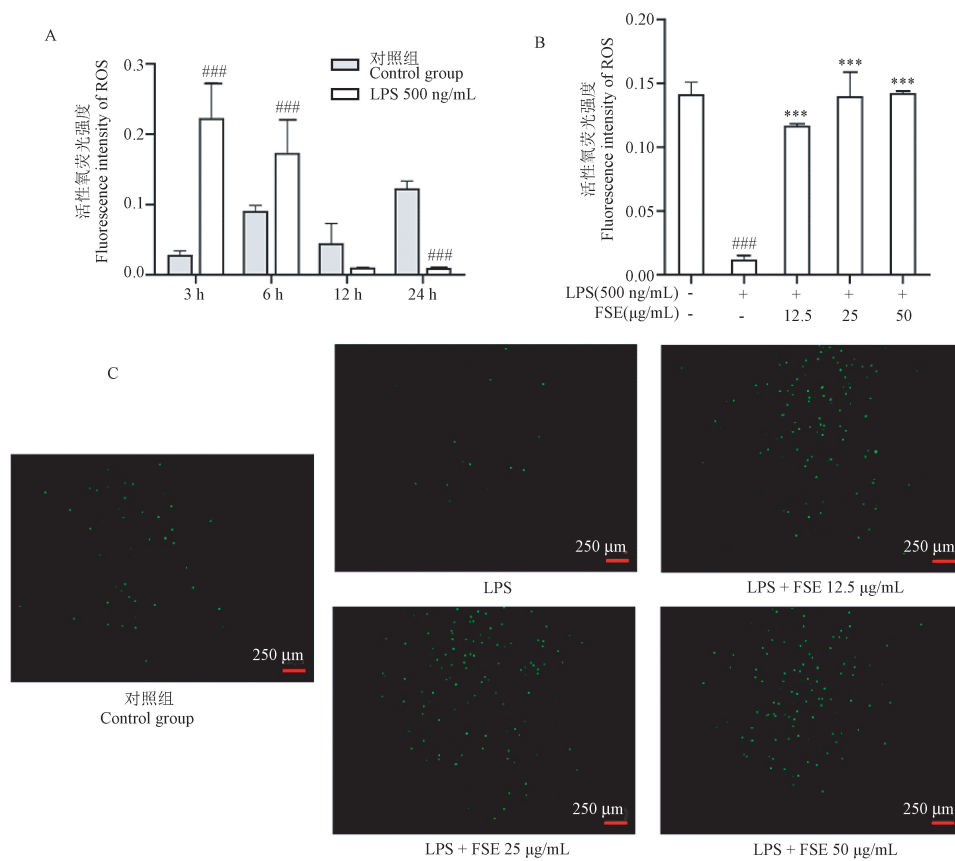


图 3 FSE 对 LPS 诱导后 RAW264.7 细胞形态的影响

Figure 3 Effect of FSE on the morphology of RAW264.7 cells induced by LPS

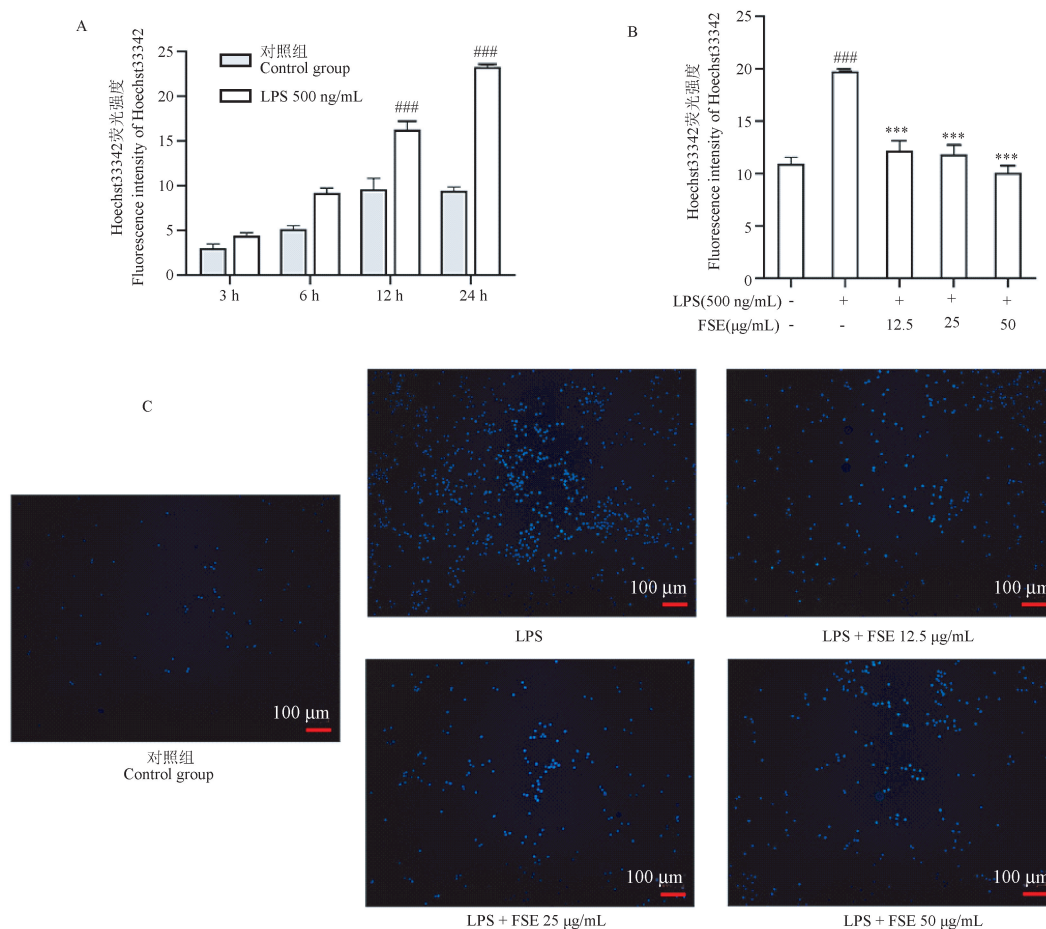


注: A: 不同浓度 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后 ROS 产生的作用时间; B、C: 不同浓度的 FSE 降低 LPS 刺激后 ROS 的产生。与对照组相比, ### $P < 0.001$; 与 LPS 组相比, *** $P < 0.001$ 。

图 4 FSE 升高 LPS 刺激后 ROS 的产生

Note. A, Time of ROS production after different concentrations of LPS stimulated RAW264.7 cells. B, C, Different concentrations of FSE reduce the production of ROS stimulated by LPS. Compared with the control group, ### $P < 0.001$. Compared with the LPS group, *** $P < 0.001$.

Figure 4 FSE reduces ROS production after LPS stimulation



注:A:不同浓度 LPS 刺激 RAW264.7 细胞凋亡的作用时间;B、C:不同浓度的 FSE 减少 LPS 刺激后的细胞凋亡。与对照组相比, $^{###}P < 0.001$;与 LPS 组相比, $^{***}P < 0.001$ 。

图 5 FSE 减少 LPS 刺激后的细胞凋亡

Note. A, Time of apoptosis of RAW264.7 cells stimulated by different concentrations of LPS. B, C, Different concentrations of FSE reduce apoptosis stimulated by LPS. Compared with the control group, $^{###}P < 0.001$. Compared with the LPS group, $^{***}P < 0.001$.

Figure 5 FSE reduces apoptosis stimulated by LPS

2.6 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞极化的浓度和时间研究

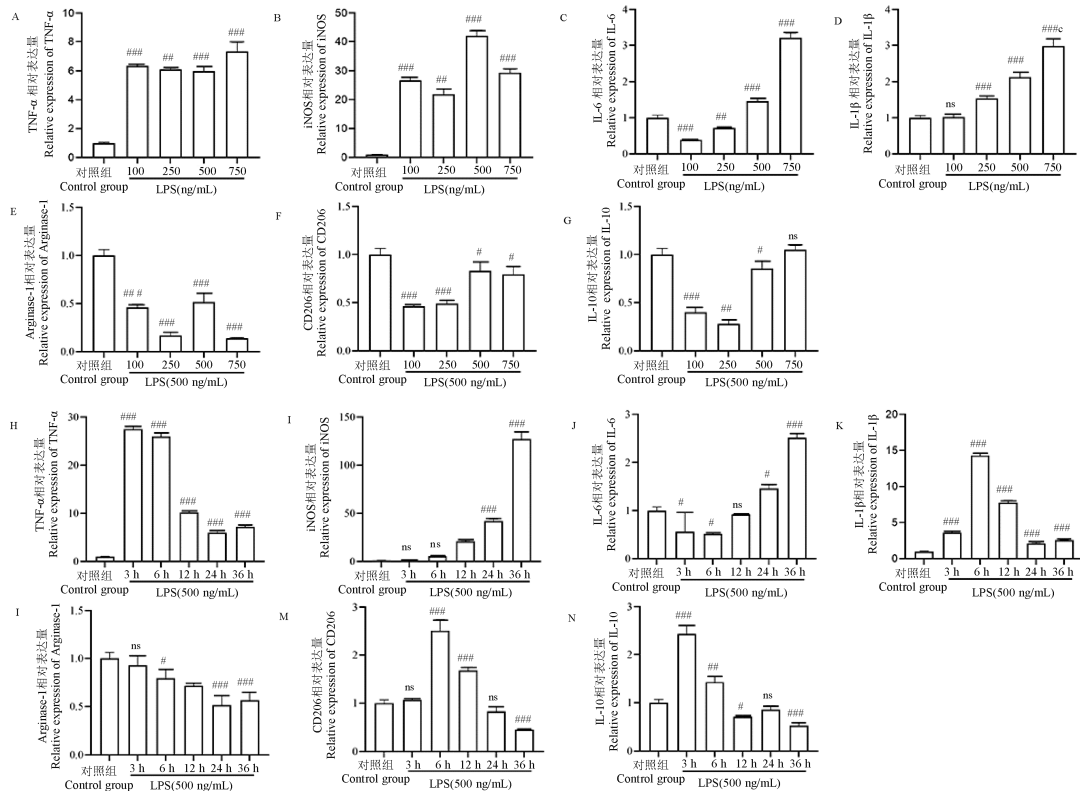
为了研究不同 LPS 浓度对 RAW264.7 细胞极化的影响,分别用 100、250、500、750 ng/mL 的 LPS 作用细胞 24 h,与对照组相比,TNF- α 、iNOS mRNA 表达水平在不同 LPS 浓度下均显著增高;IL-6 mRNA 表达水平在 100 ng/mL 和 250 ng/mL 的 LPS 作用下降低,在 500 ng/mL 和 750 ng/mL 的 LPS 作用下显著增高;IL-1 β mRNA 表达水平在 250 ng/mL 的 LPS 下逐渐增高;IL-10 mRNA 表达水平在 100 ng/mL 和 250 ng/mL 的 LPS 作用下显著降低;CD206 mRNA、Arginase-1 表达水平在不同 LPS 浓度下显著降低(图 6A~6G)。

为了研究 LPS 作用不同时间对 RAW264.7 细胞极化的影响,在 500 ng/mL 的 LPS 作用细胞后,

分别得到 M1 表型基因(TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、IL-6)和 M2 表型基因(IL-10、CD206、Arginase-1)不同时间点的 mRNA 表达水平。结果发现,TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达水平在 6 h 时显著增高,iNOS 和 IL-6 mRNA 表达水平在 36 h 时显著增高,IL-10、CD206 mRNA 表达水平在 36 h 时显著降低,Arginase-1 mRNA 表达水平在 24 h 时显著降低(图 6H~6N)。

2.7 FSE 对 LPS 诱导的细胞极化的影响

为了进一步研究 FSE 对细胞极化的调节作用,将 FSE 加入 500 ng/mL 的 LPS 刺激细胞 36 h。结果显示,FSE 可以降低 LPS 诱导上调的基因(IL-1 β 、IL-6、iNOS) mRNA 表达水平,同时可以升高 LPS 诱导下调基因(CD206、IL-10)mRNA 表达水平(图 7)。

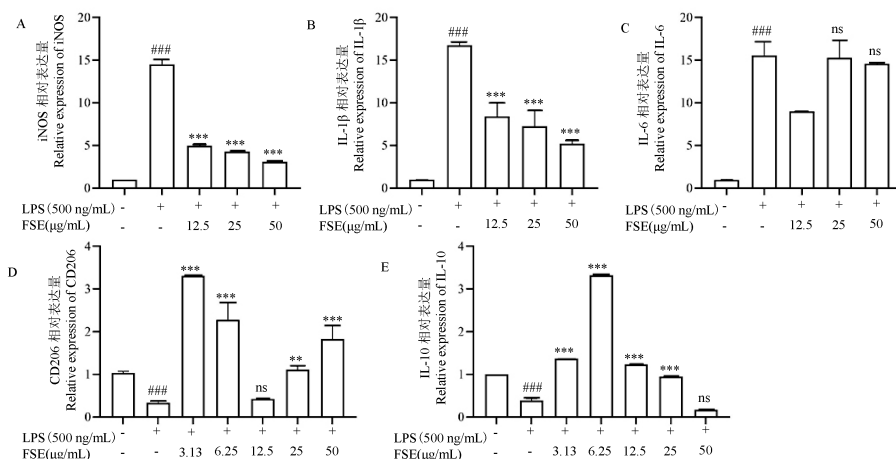


注: A~G: 500 ng/mL 的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞极化的作用时间; H~N: 不同浓度的 LPS 刺激 24 h 后 RAW264.7 的细胞极化。与对照组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$ 。

图 6 LPS 刺激 RAW264.7 细胞极化的时间和浓度

Note. A~G, Polarization time of RAW264.7 cells stimulated by 500 ng/mL LPS. H~N, Cell polarization of RAW264.7 after 24 hours stimulated by different concentrations of LPS. Compared with the control group, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$.

Figure 6 Time and concentration of LPS stimulated RAW264.7 cell polarization



注: A~C: 不同浓度的 FSE 对 LPS 刺激后的 RAW264.7 细胞 M1 表型的极化调节; D~E: 不同浓度的 FSE 对 LPS 刺激后的 RAW264.7 细胞 M2 表型的极化调节。与对照组相比, $^{###}P<0.001$; 与 LPS 组相比, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ 。

图 7 不同浓度的 FSE 对 LPS 刺激后的细胞极化的调节

Note. A~C, Polarization regulation of FSE at different concentrations on M1 phenotype of RAW264.7 cells stimulated by LPS. D~E, Polarization regulation of FSE at different concentrations on M2 phenotype of RAW264.7 cells stimulated by LPS. Compared with the control group, $^{###}P<0.001$. Compared with the LPS group, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

Figure 7 Regulation of FSE at different concentrations on cell polarization stimulated by LPS

3 讨论

炎症反应在人体内普遍存在,参与了慢性阻塞性肺病、炎症性肠病、神经退行性疾病、心血管疾病、消化性疾病以及糖尿病等多种疾病的发生发展^[9-10]。这些炎症性疾病给社会带来了相当大的经济负担,缩短了患者的平均预期寿命^[11-12],目前,非甾体抗炎药作为抑制炎症症状的常用药物,长期使用会产生胃肠道等各种副作用^[13],因此,迫切需要研究可靠、有效的替代药物来预防和治疗各种疾病。

连翘作为传统中药,具有抗炎、抑菌、抗病毒、抗肿瘤、神经系统保护等诸多作用。具有较大的临床药用价值,现已分离出 300 多种化学成分,包括苯乙醇苷类、木脂素类、酚酸类、黄酮类、萜类及挥发油、C₆-C₂ 天然醇及其苷类等^[14],其中主要化学成分为苯乙醇苷类和木脂素类^[15],目前分离得到苯乙醇苷类成分包括连翘酯苷 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、毛柳苷、车前草苷 A、木通苯乙醇苷 A、B 等^[16-17]。木脂素类成分主要包括连翘苷、连翘脂素、牛蒡子苷元、松脂素、表松脂素、落叶松脂素、异落叶松脂素、Cedrusin、连翘兰 A、连翘兰 B、异橄榄脂素^[18],其中连翘酯苷 A 和连翘苷为 2020 版《中国药典》连翘含量测定的指标性成分^[19]。连翘提取物均有抑制炎症反应的作用,其水提物、甲醇提取物、乙醇提取物以及挥发油等可以抑制多种炎症模型^[20-23],连翘各极性部位提取物的含量差别较大,其中水提取物提取率最高^[24],连翘提取物主要通过 NF- κ B 信号通路、JAK/STAT 信号通路、MAPK 信号通路,调控炎症过程中的多种酶及炎性介质的产生^[25],从而抑制炎症反应。

活性氧(ROS)作为体内炎症反应的重要活性成分,主要由 NADPH 氧化酶(Nox)产生,通过激活下游信号级联反应来扩大炎症的二级信使^[26-27],ROS 也可以过激活非特异性免疫系统消除病原体 and 修复损伤组织^[28],研究发现 LPS 可以促进 ROS 的产生^[29],本研究中,LPS 在刺激 RAW264.7 细胞后 3~6 h 时,细胞内 ROS 大量产生,但是在 LPS 刺激细胞 24 h 时,细胞内 ROS 产生减少,而 FSE 可以增加 LPS 刺激 24 h 时的 ROS 产生。

此外,ROS 通过磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)/AKT 途径触发多种细胞内反应^[29],调节细胞的凋亡过程^[30]。ROS 对巨噬细胞发挥双向调节作用,ROS 既

可以促进巨噬细胞的凋亡,又可以抑制巨噬细胞的凋亡,这可能与 cAMP 激活 cAMP 依赖性蛋白激酶有关^[31]。在 LPS 诱导 24 h 时,ROS 的产生量显著减少,RAW264.7 细胞凋亡显著增加。FSE 可以增加 LPS 刺激 24 h 时的 ROS 产生量,并且减少 LPS 刺激 24 h 时的细胞凋亡,FSE 发挥抗炎作用可能是通过增加巨噬细胞内的 ROS,抑制其自身细胞的凋亡,进而发挥巨噬细胞的免疫调节功能。

近年来,巨噬细胞的极化参与多种疾病过程的调节,如免疫性神经炎^[32]、炎症性肠病^[33]、糖尿病和肥胖症^[34]、类风湿性关节炎^[35]等,巨噬细胞的极化可以通过 LPS 诱导为 M1 型或者通过 IL-4 诱导为 M2 型巨噬细胞^[36-37],本文研究了 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞极化的模型,在不同浓度的 LPS 以及 LPS 作用不同时间中,M1 和 M2 表型的基因表达水平存在差异,为 RAW264.7 细胞极化的模型提供了新思路。进一步研究发现 FSE 可显著降低 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 M1 表型 IL-1 β 、iNOS、IL-6 mRNA 表达水平,FSE 同时明显升高 M2 表型 CD206、IL-10 mRNA 表达水平,以发挥抗炎的作用。

综上所述,FSE 可通过抑制 RAW264.7 细胞的凋亡以及促进 M2 型巨噬细胞的表达,从而抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应,从细胞凋亡和巨噬细胞极化功能角度进一步阐明连翘发挥抗炎作用的内在机制,对其临床应用提供了很好的参考。

参考文献:

- [1] Tasneem S, Liu B, Li B, et al. Molecular pharmacology of inflammation; medicinal plants as anti-inflammatory agents [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 139: 126-140.
- [2] Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, et al. Into the eye of the cytokine storm [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, 76(1): 16-32.
- [3] Yi YS. Folate receptor-targeted diagnostics and therapeutics for inflammatory diseases [J]. *Immune Netw*, 2016, 16(6): 337-343.
- [4] Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, et al. Tissue-resident macrophages [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(10): 986-995.
- [5] Daniel B, Nagy G, Czimmerer Z, et al. The nuclear receptor PPAR γ controls progressive macrophage polarization as a ligand-insensitive epigenomic ratchet of transcriptional memory [J]. *Immunity*, 2018, 49(4): 615-626.
- [6] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas [J]. *J Clin Invest*, 2012, 3: 787-795.
- [7] Mills CD, Kincaid K, Alt JM, et al. M-1/M-2 macrophages and

- the Th1/Th2 paradigm [J]. J Immunol, 2000, 12: 6166-6173.
- [8] Liu L, Guo H, Song A, et al. Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF- κ B and MAPK pathways [J]. BMC Immunol, 2020, 21(1): 32.
- [9] Liu Z, Ren Z, Zhang J, et al. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases [J]. Front Physiol, 2018, 9: 477.
- [10] Aksentijevich M, Lateef SS, Anzenberg P, et al. Chronic inflammation, cardiometabolic diseases and effects of treatment: Psoriasis as a human model [J]. Trends Cardiovas Med, 2020, 30(8): 472-478.
- [11] Jacobs P, Bissonnette R, Guenther LC. Socioeconomic burden of immune-mediated inflammatory diseases-focusing on work productivity and disability [J]. J Rheumatol Suppl, 2011, 88: 55-61.
- [12] Utzeri E, Usai P. Role of non-steroidal anti-inflammatory drugs on intestinal permeability and nonalcoholic fatty liver disease [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(22): 3954-3963.
- [13] 郭强, 王智民, 林丽美, 等. 连翘属药用植物化学成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(5): 74-79.
- [14] 周明月, 霍金海, 孙国东, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的连翘叶化学成分分析 [J]. 中药材, 2019, 42(11): 2582-2587.
- [15] 宋小俊. 连翘不同部位化学成分研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2014, 29(2): 220-222.
- [16] 陈梦莹, 李钦, 韩晶晶, 等. 老翘的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(12): 2066-2072, 2093.
- [17] 宋建平, 张立伟. 连翘木脂素研究进展 [J]. 文山学院学报, 2019, 32(6): 28-34.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2020.
- [19] 刘建洲, 张立伟. 基于人呼吸道上皮细胞炎症模型的连翘提取物抗炎活性实验研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27: 1248.
- [20] Zhao P, Piao X, Pan L, et al. *Forsythia suspensa* extract attenuates lipopolysaccharide induced inflammatory liver injury in rats via promoting antioxidant defense mechanisms [J]. Anim Sci J, 2017, 88(6): 873.
- [21] Lee SE, Lim C, Kim H, et al. A study of the anti-inflammatory effects of the ethyl acetate fraction of the methanol extract of *Forsythiae fructus* [J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2016, 13(5): 102.
- [22] Wang JM, Cui Y, Chen SQ, et al. *In vivo* evaluation of ethanol extract of *Forsythia suspensa* (thunb.) vahl (fruit) in anti-inflammatory and analgesic activities [J]. J Invest Med, 2017, 65(7): A73.
- [23] 陈泽文, 王学方, 李晓, 等. 连翘不同极性部位的抗炎活性研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020, 18: 124-128.
- [24] 余元勋. 中国分子白血病学 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社; 2016.
- [25] 白关亚, 何盼, 李媛媛, 等. 青翘不同极性部位抗炎作用的谱效关系分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 1-6.
- [26] Yang CS, Kim JJ, Lee SJ, et al. TLR3-triggered reactive oxygen species contribute to inflammatory responses by activating signal transducer and activator of transcription-1 [J]. J Immunol, 2013, 190(12): 6368-6377.
- [27] Hong HY, Jeon WK, Kim BC, et al. Up-regulation of heme oxygenase-1 expression through the Rac1/NADPH oxidase/ROS/p38 signaling cascade mediates the anti-inflammatory effect of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 in murine macrophages [J]. FEBS Lett, 2008, 582(6): 861-868.
- [28] Blaser H, Dostert C, Mak TW, et al. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation [J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(4): 249-261.
- [29] Chen L, Liu P, Feng X, et al. Salidroside suppressing LPS-induced myocardial injury by inhibiting ROS-mediated PI3K/Akt/mTOR pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(12): 3178.
- [30] Walls M, Mehta PP, Baxi SM, et al. Abstract 4479: Targeting non-small cell lung cancer cells harboring a PIK3CA mutation by a novel and oral PI3K selective inhibitor, PF-4989216 [J]. Cancer Res, 2011, 71: 4479-4479.
- [31] 黄行许, 陈练波, 马晓冬, 等. ROS 对小鼠腹腔巨噬细胞凋亡的影响 [J]. 免疫学杂志, 2000, 16(5): 334-338.
- [32] Han R, Xiao J, Zhai H, et al. Dimethyl fumarate attenuates experimental autoimmune neuritis through the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2/hemoxygenase-1 pathway by altering the balance of M1/M2 macrophages [J]. J Neuroinflamm, 2016, 13(1): 97.
- [33] Akihito H, Yuji N, Tomohisa T, et al. BTB and CNC homolog 1 (*bach1*) deficiency ameliorates TNBS colitis in mice [J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 16(4): 740-753.
- [34] Feng B, Ping J, Nie Y, et al. Clodronate liposomes improve metabolic profile and reduce visceral adipose macrophage content in diet-induced obese mice [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24358.
- [35] Wang Y, Han CC, Cui D, et al. Is macrophage polarization important in rheumatoid arthritis [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 50: 345-352.
- [36] Ye Y, Xu Y, Lai Y, et al. Long non-coding RNA *cox-2* prevents immune evasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by altering M1/M2 macrophage polarization [J]. J Cell Biochem, 2018, 3: 2951-2963.
- [37] Kimbrough D, Wang SH, Wright LH, et al. HDAC inhibition helps post-MI healing by modulating macrophage polarization [J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 119: 51-63.

[收稿日期] 2021-11-15