

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.08.015

# 早小洋菊和射阳大白菊对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症反应影响的差异

毛超一, 郭丛, 王跃生\*

中国中医科学院中药研究所, 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 100700

**摘要** 目的 评价早小洋菊和射阳大白菊抗炎作用及差异。方法 将 RAW264.7 细胞按  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 6 孔细胞培养板中培养。空白组不做任何处理正常培养 24 h; 模型组加入脂多糖 (LPS) 500 ng/ml 诱导 RAW264.7 细胞建立炎症模型; 早小洋菊和射阳大白菊高、低剂量组分别加入浓度为 125、62.5  $\mu\text{g/ml}$  相应菊花醇提取物 1 ml/孔, 作用 2 h 后再加入 LPS 溶液 500 ng/ml 刺激 24 h。每组设 5 个复孔。收获细胞上清液检测一氧化氮 (NO) 浓度, RT-PCR 法检测细胞中肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、诱导性一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧酶 2 (COX-2) mRNA 表达水平。结果 与空白组比较, 模型组上清液中 NO 水平和细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、iNOS、COX-2 mRNA 表达均上调 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 除早小洋菊高剂量组细胞中 IL-1 $\beta$  mRNA 表达外, 其余各菊花组上清液中 NO 水平和细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、iNOS、COX-2 mRNA 表达均下调 ( $P < 0.01$ )。早小洋菊高剂量组细胞中 iNOS mRNA 表达较射阳大白菊高剂量组降低, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 表达升高 ( $P < 0.01$ ); 早小洋菊低剂量组细胞中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、COX-2 mRNA 表达较射阳大白菊低剂量组降低, TNF- $\alpha$  mRNA 表达升高 ( $P < 0.01$ )。结论 早小洋菊和射阳大白菊均具有较好的抗炎活性, 对于炎症因子 iNOS、COX-2、IL-6 的抑制作用早小洋菊要强于射阳大白菊, 对于 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的抑制作用射阳大白菊强于早小洋菊。

**关键词** 菊花; 早小洋菊; 射阳大白菊; 抗炎作用; 脂多糖

菊花是菊科菊属植物菊 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) 的干燥头状花序, 具有散风清热、平肝明目等功效, 用于治疗风热感冒、头痛眩晕、目赤肿痛等病症。药理研究<sup>[1]</sup>发现, 菊花具有抗炎、抑菌、抗病毒、免疫调节、保护心血管系统、保肝及神经保护等药理作用。《中华人民共和国药典》<sup>[2]</sup>中收录的药用菊花品种有毫菊、滁菊、贡菊、杭菊、怀菊, 早小洋菊和射阳大白菊是杭菊的两个不同品种。汪涛<sup>[3]</sup>研究发现, 在 32 个不同的杭菊品种中, 射阳大白菊的主成分值最高, 质量最好。前期研究<sup>[4-5]</sup>也发现, 早小洋菊和射阳大白菊的主要化学成分存在较大差异。菊花的散风清热、解毒明目作用与抗炎具有较为密切的联系<sup>[6-7]</sup>。因此, 本研究选取早小洋菊和射阳大白菊两个具有代表性的品种评价其抗炎作用差异, 以期阐明不同菊花品种的活性差异, 为临床上更好地应

用不同品种菊花治疗炎症性疾病提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞 (美国 ATCC 公司, 货号 SC-6003)。

### 1.2 药物及制备

早小洋菊和射阳大白菊样品采自江苏无锡安利植物研发中心科研农场 (31°57'N, 120°30'E)。采摘的头状花序经蒸汽杀青 (100℃, 1 min)、烘干 (60℃, 24 h)、真空包装而得。取早小洋菊和射阳大白菊品种菊花各 2 g, 用 80% 乙醇 50 ml 回流提取 2 次, 每次 40 min, 合并提取液浓缩干燥, 分别得早小洋菊醇提取物, 提取率为 35.6%; 射阳大白菊醇提取物, 提取率为 30.7%。

### 1.3 主要试剂及仪器

脂多糖 (LPS, 批号 039M4004V), 美国 Sigma 公司; DMEM 高糖培养基 (批号: 20811862)、RPMI1640 培养基 (批号: 31318005), CORNING

基金项目: 国家科技重大专项 (民口) 课题 (2019ZX09201005)

\* 通讯作者: wylw915@163.com, 13501075828

Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

公司; 胎牛血清 (批号: 1843752)、0.25% Trypsin EDTA (批号: 2048562)、青链霉素 (批号: 1103916), Gibco 公司; 胰蛋白酶 (批号: V5113), 美国 Hyclone 公司; 细胞活力试剂盒 CCK-8 (批号: 42830), 美国 MCE 公司; 无水乙醇 (分析纯, 批号 20190326), 北京化工厂; 一氧化氮 (NO) 检测试剂盒 (批号: 032519191001), 碧云天生物技术有限公司; Trizol (批号: 235008), 美国 Ambion 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (批号: R7212), 天根生化科技 (北京) 有限公司; PrimeScript™ RT 逆转录试剂盒 (批号: D1109)、SYBR® Premix Ex Taq™ II (TliRNaseH Plus) ROX plus (批号: A3702-1)、DL2000 DNA Marker (批号: F4616), 日本 TaKaRa 公司。

超净工作台 (苏净安泰生物科技有限公司, 型号 SW-CJ-1F); CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 Thermo 公司, 型号 371); 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司, 型号 CKX41); 离心机 (美国 Sigma 公司, 型号 3K15); 涡旋振荡仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司, 型号 QL-902); 分光光度计 (美国 Thermo scientific 公司, 型号 NANODROP 2000); 荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司, 型号 ABI7500); 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司, 型号 Tanon 1600, 版本 Tanon MP 1.1); 多功能酶标仪 (美国 Biotek 公司, 型号 Synergy2)。

#### 1.4 各品种菊花不同浓度干预 RAW264.7 细胞毒性观察

将 RAW264.7 细胞按  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔细胞培养板中, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养过夜, 弃去上清, 将含不同药物浓度 (包括 250、125、62.5、31.25、15.6 μg/ml) 的细胞培养液 200 μl 加入细胞培养板中, 另设正常细胞对照组中加入无药物的细胞培养液, 每组 3 复孔。37℃、5% 培养 24 h 后, 弃掉上清液, 加入 10% 的 CCK-8 细胞溶液, 每孔加入 100 μl, 1~2 h, 酶标仪 450 nm 处测定吸光度 (OD 值), 计算细胞存活率 = (实验孔吸光度 - 空白孔吸光度) / (对照孔吸光度 - 空白孔吸光度) × 100%。

#### 1.5 各品种菊花对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 的影响

将 RAW264.7 细胞按  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 6 孔细胞培养板中, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养过夜。实验分为: 空白组不做任何处理正常培养 24 h。模型组加入 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症反应<sup>[8]</sup>, 前期研

究<sup>[9-14]</sup>发现, 在 LPS 500 ng/ml 刺激时炎症因子变化较明显, 因此本实验选取 500 ng/ml 的 LPS 浓度建立炎症模型。课题组选取了菊花醇提取物多个浓度进行预实验观察抗炎作用, 发现菊花醇提取物浓度在 125、62.5 μg/ml 时抗炎作用均呈现较好的剂量依赖, 因而本研究选择菊花醇提取物 125、62.5 μg/ml 作为高、低剂量进行干预。两品种高、低剂量组分别加入相应药物浓度的细胞培养液 1 ml/孔, 作用 2 h, 再加入 LPS 溶液 500 ng/ml, 刺激 24 h, 每组设 5 复孔。收获细胞上清液按 NO 检测试剂盒测定上清液 NO 浓度, 采用酶标仪于 450 nm 处测定 OD 值。

#### 1.6 各品种菊花对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症因子 mRNA 表达的影响

分组及干预方法同上, 采用 RT-PCR 法检测 mRNA 表达。刺激 6 h 后弃细胞上清液, 贴壁细胞每孔加 1 ml Trizol 试剂; 用 1 ml 枪头反复吹打, 使 Trizol 接触所有长有细胞的培养瓶表面, 并进行充分消化约 1 min, 转移到 RNasefree 的 2 ml 的离心管中, 用一次性注射器进行反复抽打细胞直至看不见成团的细胞块, 整个溶液呈清亮而不黏稠的状态; 液氮速冻之后放入 -80℃ 冰箱中保存。按试剂盒说明书提取总 RNA, 将 mRNA 逆转录为 cDNA, 得到的 cDNA 用于 RT-PCR 检测肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1β (IL-1β)、诱导性一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧合酶 2 (COX-2) mRNA 表达水平, β-肌动蛋白 (β-actin) 作为内标基因。PCR 引物由美国 Invitrogen 公司合成, COX-2 上游引物: GAAAGCCCTCTACAGTGA-CATC, 下游引物: GGTGCTCCAAGCTCTACCAT, 产物大小 111 bp; iNOS 上游引物: GGCAAAC-CCAAGGTCTACG, 下游引物: ACCTGCTC-CTCGCTCAAGTT, 产物大小 182 bp; TNF-α 上游引物: CTCTGTGAAGGGAATGGGTG, 下游引物: GGGCTCTGAGGAGTAGACGATAAAG; 产物大小 94 bp; IL-6 上游引物: GATAACAAGAAAG-CAAAGCCAGAGTC, 下游引物: AGCATTGGAAAT-TGGGCTAGGAAG, 产物大小 120 bp; IL-1β 上游引物: TGCCACCTTTTACAGTGATGA, 下游引物: TGTGCTGCTGCGAGATTTGA, 产物大小 135 bp; β-actin 上游引物: CGTTGACATCCGTAAAGACCTC, 下游引物: ACAGAGTACTTGGCCTCAGGAG, 159 bp。使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 mRNA 的相对表达, 计算  $\Delta Ct = Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 内参基因}$ ;  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$

给药组 -  $\Delta Ct$  对照组, 其中空白组的数值设为 1。

### 1.7 统计学方法

应用 GraphPad Prism 8.3 软件分析处理, 计量数据符合正态分布用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间数据分析采用  $t$  检验、单因素方差分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度菊花干预细胞存活率比较

表 1 示, 早小洋菊和射阳大白菊各浓度细胞存活率与 0 浓度细胞存活率比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 说明菊花醇提取物在 250 ~ 15.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之间均无明显的细胞毒性。

表 1 不同浓度各品种菊花干预下细胞存活率比较 (%)

| 浓度 (g/ml) | 样本数 | 早小洋菊   | 射阳大白菊  |
|-----------|-----|--------|--------|
| 0         | 3   | 100.97 | 105.43 |
| 250       | 3   | 104.32 | 100.06 |
| 125       | 3   | 109.32 | 101.95 |
| 62.5      | 3   | 109.07 | 98.78  |
| 31.25     | 3   | 107.61 | 100.79 |
| 15.6      | 3   | 100.97 | 105.43 |

### 2.2 各组细胞上清液中 NO 水平比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组上清液中 NO 水平升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各菊花组均能显著降低上清液中 NO 水平 ( $P < 0.01$ )。早小洋菊高、低剂量组上清液中 NO 水平均低于同剂

表 2 各组细胞上清液中 NO 水平比较 (OD 值,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 样本数 | NO                                           |
|-----------|-----|----------------------------------------------|
| 空白组       | 5   | 0.006 $\pm$ 0.004*                           |
| 模型组       | 5   | 0.729 $\pm$ 0.021                            |
| 早小洋菊高剂量组  | 5   | 0.149 $\pm$ 0.009* $\Delta$ $\blacktriangle$ |
| 早小洋菊低剂量组  | 5   | 0.253 $\pm$ 0.007* $\Delta$                  |
| 射阳大白菊高剂量组 | 5   | 0.247 $\pm$ 0.017*                           |
| 射阳大白菊低剂量组 | 5   | 0.362 $\pm$ 0.019*                           |

注: 与模型组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与射阳大白菊同剂量组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 与同品种低剂量组比较,  $\blacktriangle P < 0.01$

量的射阳大白菊组 ( $P < 0.01$ ); 早小洋菊高剂量组上清液中 NO 水平亦低于早小洋菊低剂量组 ( $P < 0.01$ ); 而射阳大白菊高、低剂量组上清液中 NO 水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 各组细胞中炎症因子 mRNA 表达比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、iNOS、COX-2 mRNA 表达均上调 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 除早小洋菊高剂量组细胞中 IL-1 $\beta$  mRNA 表达外, 其余各菊花组细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、iNOS、COX-2 mRNA 表达均下调 ( $P < 0.01$ )。早小洋菊高剂量组细胞中 iNOS mRNA 表达较射阳大白菊高剂量组降低, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 表达升高 ( $P < 0.01$ ); 早小洋菊低剂量组细胞中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、COX-2 mRNA 表达较射阳大白菊低剂量组降低, TNF- $\alpha$  mRNA 表达升高 ( $P < 0.01$ )。早小洋菊高剂量组细胞中 iNOS、COX-2 mRNA 表达低于早小洋菊低剂量组, 而 IL-1 $\beta$  mRNA 表达升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。射阳大白菊高剂量组细胞中 IL-1 $\beta$  mRNA 表达较射阳大白菊低剂量组降低 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

炎症反应是抵御病原微生物入侵机体的一种重要防御能力, LPS 是革兰氏阴性细菌细胞壁中的一种成分, 能够诱导巨噬细胞释放炎症介质<sup>[1]</sup>。既往许多研究<sup>[9-10,12]</sup> 均是通过药物干预 RAW264.7 细胞炎症相关细胞因子及趋化因子的影响, 来研究药物对于炎症细胞的保护机制。巨噬细胞被激活后可释放炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等, 以抵抗病原体的入侵和扩散<sup>[13]</sup>。iNOS 在巨噬细胞炎症反应过程中表达增加, 促进 NO 合成, NO 对细菌等病原体具有杀伤和细胞毒性作用<sup>[14]</sup>, 同时 NO 的过度产生导致组织损伤和促进炎症反应, 也可使巨噬细胞释放炎症细胞因子, 如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等, 进而介导炎症过程<sup>[15-16]</sup>。有研究<sup>[7]</sup> 发现,

表 3 各组细胞中炎症因子 mRNA 表达比较 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 样本数 | iNOS mRNA                                   | TNF- $\alpha$ mRNA        | IL-6 mRNA                 | IL-1 $\beta$ mRNA                          | COX-2 mRNA                        |
|-----------|-----|---------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------|
| 空白组       | 5   | 0.95 $\pm$ 0.03*                            | 0.91 $\pm$ 0.06*          | 0.98 $\pm$ 0.02*          | 0.90 $\pm$ 0.07*                           | 0.98 $\pm$ 0.01*                  |
| 模型组       | 5   | 243.99 $\pm$ 4.83                           | 8.25 $\pm$ 0.27           | 12.59 $\pm$ 0.24          | 23.74 $\pm$ 0.23                           | 13.65 $\pm$ 0.21                  |
| 早小洋菊高剂量组  | 5   | 59.65 $\pm$ 5.46* $\Delta$ $\blacktriangle$ | 5.73 $\pm$ 0.27* $\Delta$ | 4.70 $\pm$ 0.41*          | 25.68 $\pm$ 0.27 $\Delta$ $\blacktriangle$ | 3.24 $\pm$ 0.08* $\blacktriangle$ |
| 早小洋菊低剂量组  | 5   | 125.71 $\pm$ 1.06*                          | 4.96 $\pm$ 0.08* $\Delta$ | 3.56 $\pm$ 0.04* $\Delta$ | 14.90 $\pm$ 0.39* $\Delta$                 | 4.24 $\pm$ 0.08* $\Delta$         |
| 射阳大白菊高剂量组 | 5   | 111.36 $\pm$ 5.98*                          | 2.62 $\pm$ 0.17*          | 5.57 $\pm$ 0.36*          | 14.90 $\pm$ 0.88* $\blacktriangle$         | 5.79 $\pm$ 0.59*                  |
| 射阳大白菊低剂量组 | 5   | 128.36 $\pm$ 4.06                           | 2.68 $\pm$ 0.06           | 6.26 $\pm$ 0.14           | 17.68 $\pm$ 0.63                           | 5.74 $\pm$ 0.24                   |

注: TNF- $\alpha$ , 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; IL-6, 白细胞介素 6; IL-1 $\beta$ , 白细胞介素 1 $\beta$ ; iNOS, 诱导性一氧化氮合酶; COX-2, 环氧合酶 2; 与模型组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与射阳大白菊同剂量组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 与同品种低剂量组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

IL-6 参与多种炎症疾病的病理生理过程,是一种重要的炎症介质。IL-1 $\beta$  主要由活化的巨噬细胞分泌,是一种参与各种炎症反应的多效细胞因子,能引起急性炎症性疾病并引起组织损伤<sup>[13]</sup>。TNF- $\alpha$  主要由巨噬细胞产生,能够促进巨噬细胞的活化,增强吞噬功能,促进炎症反应,能够引起急性炎症性疾病和组织损伤<sup>[14]</sup>。花生四烯酸代谢也是与炎症反应密切相关的通路之一<sup>[15]</sup>。花生四烯酸在环氧酶(COX)的作用下代谢生成前列腺素 G<sub>2</sub>,进而生成前列腺素 H<sub>2</sub>,并以此为底物生成前列腺素 E<sub>2</sub> 等其他种类的前列腺素产物<sup>[16]</sup>。文献报道<sup>[17]</sup>发现,口服 COX-2 选择性抑制剂可显著抑制 PGE<sub>2</sub> 诱导的炎症反应。药理学研究<sup>[18]</sup>显示,菊花中含有多种化学成分,主要有黄酮类、挥发油、苯丙素类、萜类等,具有抗炎作用。

本实验结果表明,早小洋菊和射阳大白菊提取物在 250 ~ 15.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之间均无明显的细胞毒性。两品种高、低剂量组均显著降低 NO 释放水平,亦可下调细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、iNOS、COX-2 mRNA 表达水平,说明早小洋菊和射阳大白菊对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症反应具有一定的保护作用。本研究结果还显示,对 NO 释放的抑制和促炎因子 iNOS、COX-2、IL-6 的抑制作用早小洋菊要强于射阳大白菊,而对于 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的抑制作用,射阳大白菊强于早小洋菊,说明不同品种菊花在抗炎靶点作用强度上存在差异。因此,对于由 iNOS、COX-2 参与的蛋白通路的炎症反应性疾病可选择早小洋菊进行治疗;而在 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  为主导的促炎反应中,可选择用射阳大白菊进行干预。药效的不同可能是由于成分种类差异或相同成分含量差异所导致的,差异性成分的研究有望为同一药材不同品种的合理划分奠定基础。

## 参考文献

- [1] 瞿璐,王涛,董勇喆,等. 菊花化学成分与药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究,2015,38(1):98-104.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 版) [M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:310.
- [3] 汪涛. 杭菊品质比较及其影响因子研究 [D]. 南京:南京农业大学,2012.
- [4] 李建民,李华擎,胡世霞. 杭菊花的产区和商品种类现状 [J]. 中国药师,2015,18(7):1098-1100.
- [5] 郭巧生,汪涛,程俐陶. 不同栽培类型药用菊花黄酮类成分比较分析 [J]. 中国中药杂志,2008,33(7):756-779.
- [6] 马纳,李亚静,范吉平. 菊花明目作用的研究进展 [J]. 中医药导报,2018,24(19):111-113.
- [7] 王琦妙. 清热明目方经超声雾化法治疗结膜炎的应用研究 [D]. 北京:北京中医药大学,2013.
- [8] KIM YS, AHN CB, JE JY. Anti-inflammatory action of high molecular weight mytilus edulis hydrolysates fraction in LPS-induced RAW264.7 macrophage via NF-kappa B and MAPK pathways [J]. Food Chem,2016,202(1):9-14.
- [9] MI J, JEONG SW, SOMI KC et al. Anti-inflammatory effects of an ethanolic extract of guava (psidiumguajava l.) leaves in vitro and in vivo [J]. J Med Food,2014,17(6):678-685.
- [10] ANA GL, CARLOS M, NOELIA M, et al. In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans [J]. Food Chem,2014,161(15):216-223.
- [11] 杨一新,李桂源. LPS 所介导的信号转导通路研究进展 [J]. 中南大学学报(医学版),2006,31(1):141-145.
- [12] RHULE A, NAVARRO S, SMITH JR, et al. Panaxnotoginseng attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells [J]. J Ethnopharmacol,2006,106(1):121-128.
- [13] RODES L, KHAN A, PAUL A, et al. Effect of probiotics lactobacillus and bifidobacterium on gut-derived lipopolysaccharides and inflammatory cytokines: an in vitro study using a human colonic microbiota model [J]. J Microbiol Biotechnol,2013,23(4):518-526.
- [14] KINGETER LM, LIN X. C-type lectin receptor-induced NF-kappaB activation in innate immune and inflammatory responses [J]. Cell Mol Immunol,2012,9(2):105-112.
- [15] CHOI KC, LEE YH, JUNG MG, et al. Gallic acid suppresses Lipopoly saccharide-induced nuclear factor-kappaB signaling by preventing RelA acetylation in A549 lung cancer cells [J]. Mol Cancer Res, 2009,7(12):2011-2021.
- [16] ANDUJAR I, RIOS JL, GINER RM, et al. Beneficial effect of shikonin experimental colitis induced by dextran sulfate sodium in BALB/c mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med,2012:271606. doi: 10.1155/2012/271606.
- [17] MANJEET KR, GHOSH B. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages [J]. Int J Immunopharmacol,1999,21(7):435-443.
- [18] HRSTKA R, STULIK J, VOJTESEK B. The role of MAPK signal pathways during francisellatularensis LVS

- infection-induced apoptosis in murine macrophages [J]. *Microbes Infect*, 2005, 7(4): 619–625.
- [9] AHMAD SF, ANSARI MA, ZOHEIR KM, et al. Regulation of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B activation through the JAK/STAT signaling pathway downstream of histamine 4 receptor in a rat model of LPS induced joint inflammation [J]. *Immunobiol*, 2015, 220(7): 889–898.
- [20] 吴晓丽. 野菊花超临界二氧化碳萃取物抗炎活性及机

- 理研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [21] 郭歌, 祖凌云, 高炜. 花生四烯酸代谢产物与动脉粥样硬化 [J]. *心血管病学进展*, 2014, 35(5): 526–530.
- [22] 黄冰晴, 王兵丽. 前列腺素  $E_2$  及其受体对炎性痛调制的研究进展 [J]. 2017, 96(2): 65–70.
- [23] 周衡朴, 任敏霞, 管家齐, 等. 菊花化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物预测分析 [J]. *中草药*, 2019, 19(50): 4785–4795.

## Difference of Effects of Early Chrysanthemum and Sheyang White Chrysanthemum on Inflammatory Reaction on Lipopolysaccharide-induced RAW264.7 Cells

MAO Chaoyi, GUO Cong, WANG Yuesheng

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700

**ABSTRACT** **Objective** To evaluate anti-inflammatory effect and difference of Early Chrysanthemum and Sheyang White Chrysanthemum. **Methods** RAW264.7 cells were inoculated into 6-hole cell culture plates at  $5 \times 10^4$  cells/hole. Blank group was cultured for 24 h without any treatment; model group was added with 500 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) to induce RAW264.7 cells to establish inflammation models; high and low dose groups of Early Chrysanthemum and Sheyang White Chrysanthemum were added with 125 and 62.5  $\mu$ g/ml corresponding chrysanthemum alcohol extracts for 1 ml/hole, respectively, and 2 h after the treatment, they were stimulated by 500 ng/ml LPS solution for 24 h. Five parallel holes were set in each group. Supernatant of the cells was collected to detect the concentration of nitric oxide (NO), and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX-2) mRNA expression levels were detected by RT-PCR. **Results** Compared with the blank group, the level of NO in the supernatant and the expressions of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS and COX-2 mRNA in the cells of the model group were up-regulated ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, except for the expression of IL-1 $\beta$  mRNA in the cells of the high dose group of Early Chrysanthemum, the levels of NO in the supernatant and the cell TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS and COX-2 mRNA expressions in the other medicated groups were down-regulated ( $P < 0.01$ ). The expression of cell iNOS mRNA in the high dose group of Early Chrysanthemum was lower than that in the high dose group of Sheyang White Chrysanthemum, and the expressions of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA were increased ( $P < 0.01$ ). The expressions of cell IL-6, IL-1 $\beta$  and COX-2 mRNA in the low dose group of Early Chrysanthemum were lower than those in the low dose group of Sheyang White Chrysanthemum, and the expression of TNF- $\alpha$  mRNA was increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Early Chrysanthemum and Sheyang White Chrysanthemum have good anti-inflammatory activity. The inhibitory effect of Early Chrysanthemum on inflammatory factors iNOS, COX-2 and IL-6 is stronger than that of Sheyang White Chrysanthemum, and the inhibitory effect of Sheyang White Chrysanthemum on TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  is stronger than that of Early Chrysanthemum.

**Keywords** Chrysanthemum; Early Chrysanthemum; Sheyang White Chrysanthemum; anti-inflammatory effect; lipopolysaccharide

(收稿日期: 2019-11-14; 修回日期: 2019-12-20)

编辑: 邓 媛