

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.04.012

基于NF- κ B通路探讨六神胶囊对脂多糖诱导巨噬细胞RAW264.7炎症反应的影响马钦海¹, 陈瑞晗¹, 雷标¹, 王周琅¹, 谢玉琪¹, 刘斌², 杨子峰¹✉

1. 广州医科大学附属第一医院, 广东省广州市越秀区东风西路195号, 511436; 2. 昆明理工大学医学院

[摘要] **目的** 探讨六神胶囊的抗炎作用及机制。**方法** RAW264.7细胞分为六神胶囊组和地塞米松组, 六神胶囊按9.76、4.88、2.44、1.22、0.61、0.31、0.15 $\mu\text{g/ml}$ 梯度稀释; 地塞米松按250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91 $\mu\text{g/ml}$ 梯度稀释, 选择细胞存活率大于90%的最大3个六神胶囊浓度和最大无毒剂量的地塞米松进行后续实验。RAW264.7细胞分为空白组, 地塞米松组, 模型组及六神胶囊高、中、低剂量组。除空白组外, 其余各组采用脂多糖诱导建立炎症模型。造模后六神胶囊高、中、低剂量组分别加入筛选浓度的高、中、低浓度六神胶囊溶液各1 ml; 地塞米松组加入筛选浓度的地塞米松溶液1 ml; 模型组和空白组加入1 ml培养液。24 h后收集细胞上清液检测一氧化氮(NO)的浓度, ELISA法检测细胞中白细胞介素1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)的含量, 实时荧光定量PCR法检测细胞中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6和诱导型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA表达, 蛋白印迹实验检测核因子 κ B p65(NF- κ B p65)、磷酸化核因子 κ B p65(p-NF- κ B p65)、核因子抑制蛋白 κ B(I κ B α)和磷酸化核因子抑制蛋白 κ B(p-I κ B α)表达。**结果** 选择六神胶囊1.22、0.61、0.31 $\mu\text{g/ml}$ 浓度, 地塞米松31.25 $\mu\text{g/ml}$ 浓度进行后续实验。与空白组比较, 模型组细胞中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6及NO水平, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和iNOS mRNA表达, p-I κ B α 、p-NF- κ B p65蛋白表达显著升高, I κ B α 蛋白表达显著降低($P<0.01$); 与模型组比较, 地塞米松组及六神胶囊中、高剂量组细胞TNF- α 、IL-1 β 、IL-6及NO水平, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和iNOS mRNA表达, p-I κ B α 和p-NF- κ B p65蛋白表达均显著降低, I κ B α 蛋白表达升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与地塞米松组比较, 六神胶囊高剂量组IL-1 β 水平降低、IL-6水平升高, TNF- α mRNA及p-NF- κ B p65蛋白表达显著降低($P<0.01$); 六神胶囊高剂量组TNF- α 、IL-1 β 含量, IL-6、TNF- α mRNA表达, p-NF- κ B p65蛋白表达低于六神胶囊中、低剂量组($P<0.01$)。**结论** 六神胶囊在体外具有良好的抗炎活性, 可能通过抑制NF- κ B信号通路的激活, 降低iNOS的表达, 进一步抑制NO的合成和炎症细胞因子的产生, 从而改善炎症反应, 以高剂量效果较佳。

[关键词] 炎症反应; 六神胶囊; 巨噬细胞; 脂多糖; 炎症因子; 核因子- κ B; 一氧化氮

炎症反应是组织损伤后发生的一系列局部细胞和血管防御反应, 是机体通过各种免疫细胞(如巨噬细胞等)清除损伤因子的一种保护机制。巨噬细胞是机体内重要的炎症细胞, 它通过参与炎症反应的启动, 分泌大量促炎介质和促炎因子, 在炎症性

疾病的发病机制中发挥重要作用^[1-2]。研究^[3]表明, 脂多糖(LPS)诱导的核因子 κ B(NF- κ B)通道激活在许多炎症性疾病的发生和发展中发挥重要作用, 当LPS与细胞膜上的受体相互作用后, 会启动细胞内信号传导, 激活NF- κ B, 启动多种炎症因子基因的转录, 导致肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素1 β (IL-1 β)等炎症因子大量释放, 增强和放大炎症反应。一般情况下炎症反应是机体内正常的免疫反应, 但过度的炎

基金项目:国家自然科学基金(82004033); 广东省基础与应用基础研究基金(2020A1515111155); 澳门特别行政区科学技术发展基金(0172/2019/A3); 中国博士后科学基金(2020T130028ZX); 广东省普通高校新冠肺炎疫情防控专项(2020KZDZX1159)

✉ 通讯作者: jeffyah@163.com, (020)37103057

症反应也会对机体造成一定的损害, 过多炎症性介质的释放会引起局部或全身性炎症反应^[4-5], 这也是许多慢性病发病的主要原因之一^[6-7]。

六神胶囊(即六神丸)来源于《雷允上涌芬堂方》, 为姑苏雷氏秘方。研究发现, 六神胶囊具有抗炎、抗病毒和免疫调节活性^[8], 在临床上用于治疗多种炎症疾病, 包括牙周脓肿、疱疹、霉菌性阴道炎、急性支气管炎、结肠炎等, 具有较好的疗效^[9-11]。前期研究^[12]发现, 六神胶囊可抑制流感病毒在体外的复制和增殖, 改善小鼠肺部炎症, 改善流感病毒感染引起的炎症介质紊乱。本研究通过建立 LPS 刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型, 探讨六神胶囊对 LPS 诱导的炎症反应的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)来源于美国 ATCC 细胞库, 采用含有 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 高糖培养基在 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.2 药物及制备

六神胶囊(批号: SA01004C, 苏州雷允上医药有限公司), 组成: 牛黄、麝香、蟾酥、珍珠、雄黄、冰片。将六神胶囊研磨成粉末状, 溶解于二甲基亚砜中制备成浓度为 5 mg/ml 的药液, 超声处理 4 h, 用离心机在室温、转速 12 000 r/min 下离心 15 min, 离心半径 8 cm, 用 0.22 μm 针头过滤器过滤上清液后作为储备液保存于 -20℃。地塞米松粉剂(批号: D4902, 美国 Sigma 公司), 溶解于二甲基亚砜中制备成浓度为 1 mg/ml 的溶液, 保存于 -20℃。

1.3 主要试剂和仪器

二甲基亚砜(批号: 67685, 浓度 <0.1%)、甲基噻唑四唑(MTT, 批号: M2003)、RIPA 裂解液(批号: R0278)、脂多糖(批号: MB5198), 美国 Sigma 公司, 脂多糖溶解于 DMEM 培养基制成浓度为 5 mg/ml 溶液, 用 0.22 μm 针头过滤器过滤后作为储备液保存于 -20℃; ELISA 试剂盒: IL-1β(批号: CSBE08054)、TNF-α(批号: CSBE04741)、IL-6(批号: CSBE04639), 武汉华美生物工程有限公司; Trizol(批号: 15596018)、ECL 发光液(批号: 34580), 美国 Thermo Fisher 公司; Prime-Script™ RT Master Mix 试剂盒(批号: RR036A)、

SYBR Green qPCR Mixes 试剂盒(批号: 208052), 日本 Takara Bio 公司; DMEM 高糖培养基(批号: C11995500BT, 美国 Gibco 公司); 核因子 κB p65(NF-κB p65, 批号: ab32536)抗体、磷酸化核因子 κB p65(p-NF-κB p65, 批号: ab76302)抗体、核因子抑制蛋白 κB(IκBα, 批号: ab76429)抗体、磷酸化核因子抑制蛋白 κB(p-IκBα, 批号: ab133462)抗体, 英国 Abcam 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号: P0012S)、非特异性荧光染料 DAF-FM DA(批号: S0019), 碧云天生物技术有限公司。

0.22 μm 针头过滤器(型号: SLGP033RB, 美国 Millipore 公司); 超微量紫外可见分光光度计(型号: DS-11, 美国 Denovix 公司); 离心机(型号: TG16-WS, 万丰仪器制造有限公司); 全波长酶标仪(型号: SL0501002, 美国 Thermo Fisher 公司); 荧光酶标仪(型号: FLx800™, 美国 BioTek 公司); PCR 数据检测系统(型号: ABI PRISM®7500 Real-time PCR system, 美国 Applied Biosystems 公司)。

1.4 细胞毒性试验

采用 MTT 法检测。取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以 4×10⁴ 个/ml 的密度接种到 96 孔板, 分为六神胶囊组和地塞米松组, 分别用 DMEM 配制不同浓度六神胶囊培养液和地塞米松培养液培养细胞, 根据前期预实验的结果, 六神胶囊按 9.76、4.88、2.44、1.22、0.61、0.31、0.15 μg/ml 梯度稀释; 地塞米松按 250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91 μg/ml 梯度稀释。在 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 48 h, 弃培养液, 用含 MTT 0.5 mg/ml 的 PBS 溶液孵育细胞 4 h, 弃上清, 加入二甲基亚砜溶解活细胞内甲瓞晶体。使用全波长酶标仪测定 490 nm 处的吸光度, 计算细胞存活率和半数致死浓度(TC₅₀)。细胞存活率=实验组 OD 值/空白组 OD 值×100%; 药物 TC₅₀ 用 GraphPad Prism 6.0 计算。每个浓度设 4 个复孔, 实验重复 3 次。选择细胞存活率大于 90% 的最大 3 个六神胶囊浓度和最大无毒剂量的地塞米松进行后续实验。

1.5 细胞中一氧化氮(NO)浓度检测

采用非特异性荧光染料 DAF-FM DA 检测 RAW264.7 细胞中 NO 浓度。将 RAW264.7 细胞以 1.2×10⁶ 个/ml 的密度接种到 6 孔板, 分为空白组、地塞米松组、模型组及六神胶囊高、中、低剂量组, 每组 3 个复孔。孵育过夜后, 除空白组外, 其余各组加入 500 ng/ml LPS 1 ml 刺激 1 h 诱导建立炎

症模型。炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 显著升高,说明炎症模型成功^[13]。造模成功后六神胶囊高、中、低剂量组分别加入筛选浓度的高、中、低浓度的六神胶囊溶液各 1 ml;地塞米松组加入筛选浓度的地塞米松溶液 1 ml;模型组和空白组加入 1 ml 培养液。24 h 后收集细胞,用稀释好的 DAF-FM DA (5 μ mol/L) 重悬细胞,在 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育 20 min,然后用 PBS 洗涤 3 次。用荧光酶标仪在 495 nm 激发波长,515 nm 发射波长下定量分析固定细胞的荧光。实验重复 3 次。

1.6 细胞中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 含量检测

将 RAW264.7 细胞以 1.2×10^6 个/ml 的密度接种到 6 孔板,细胞分组及处理同上,实验重复 3 次。24 h 后收集细胞上清,用 ELISA 试剂盒测定,严格按照产品说明书操作。使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度,根据标准曲线计算。

1.7 细胞中诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达

将 RAW264.7 细胞以 1.2×10^6 个/ml 的密度接种到 6 孔板,细胞分组及处理同上,每组 3 个复孔,实验重复 3 次。24 h 后收集细胞,根据 Trizol 法提取各组总 RNA,用超微量紫外可见分光光度计测定其纯度和浓度,使用 PrimeScriptTM RT Master Mix 试剂盒对 RNA 进行定量逆转录。然后通过 SYBR Green qPCR Mixes 试剂盒对 cDNA 样品进行 RT-PCR。PCR 数据使用检测系统进行分析。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 2 min,95 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 34 s,40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 PCR 产物的相对表达量^[14], β 肌动蛋白(β -actin)为内参。使用引物 5.0 设计,引物由华大基因公司合成,详见表 1。

表 1 RAW264.7 细胞中 iNOS、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6、 β -actin 引物序列

基因名称		引物序列 (5'-3')	长度 (bp)
TNF- α	正向	ACGTGGAAGTGGCAGAAGAG	236
	反向	CTCCTCCACTTGGTGGTTTG	
IL-6	正向	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	463
	反向	GCCACTCCTTCTGTGACTCC	
IL-1 β	正向	GTGTCTTTCCCGTGGACCTT	281
	反向	TCGTTGCTTGGTTCTCCTTG	
iNOS	正向	GCTATGGCCGCTTTGATGTG	184
	反向	ACCTCCAGTAGCATGTTGGC	
β -actin	正向	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	138
	反向	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	

注:TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-6, 白细胞介素 6; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; iNOS, 诱导型一氧化氮合酶; β -actin, β 肌动蛋白。

1.8 细胞中 NF- κ B 信号通路关键蛋白表达

采用蛋白免疫印迹法检测细胞中 NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、I κ B α 及 p-I κ B α 蛋白表达。将 RAW264.7 细胞以 1.2×10^6 个/ml 密度接种到 6 孔板,分组及处理同上,实验重复 3 次。24 h 后用预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 RIPA 裂解液裂解、提取细胞,使用 BCA 试剂盒对样品蛋白进行定量。取 30 μ g 变性蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳。将蛋白转移至 PVDF 膜,5% BSA 封闭 PVDF 膜,用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入稀释后的 NF- κ B p65 (1:1000)、p-NF- κ B p65 (1:1000)、I κ B α (1:1000) 及 p-I κ B α (1:1000) 一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日使用 TBST 洗涤 PVDF 膜并室温孵育相应 HRP 标记抗体,TBST 洗涤 3 次后加入 ECL 发光液,在凝胶成像系统中曝光得到蛋白条带,使用 Image J v1.8.0 软件测定条带灰度值,以目标蛋白/ β -actin 值作为其相对含量。

1.9 统计学方法

使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析,计量资料均符合正态分布及方差齐性,以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。计数资料采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组 RAW264.7 细胞存活率比较

表 2 示,六神胶囊组浓度 1.22 μ g/ml 以下 RAW264.7 细胞存活率均大于 90%,对 RAW264.7 细胞无明显的毒性作用,因此,研究选择浓度 1.22、0.61、0.31 μ g/ml 进行后续实验。经 GraphPad Prism 6.0 分析计算,六神胶囊对 RAW264.7 细胞的 TC_{50} 为 5.58 μ g/ml。地塞米松对 RAW264.7 细胞的 TC_{50} 为 86.10 μ g/ml,选择最大无毒剂量 31.25 μ g/ml (RAW264.7 细胞存活率大于 90%) 进行后续实验。

2.2 各组细胞中炎症因子及 NO 水平比较

表 3 示,与空白组比较,模型组细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 NO 水平显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,地塞米松组及六神胶囊高、中剂量组细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 NO 水平均显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),六神胶囊低剂量组仅 NO 水平降低 ($P<0.05$);地塞米松组及六神胶囊各剂量组间 NO 水平两两比较,差异均无统计学意义 ($P>0.05$);与地塞米松组比较,六神胶囊高剂量组 IL-1 β 水平显著降低,IL-6 水平升高,六神胶囊

中、低剂量组 TNF-α、IL-6 水平升高 ($P<0.01$); 六神胶囊高剂量组 TNF-α、IL-1β 含量低于六神胶囊中、低剂量组 ($P<0.01$), 六神胶囊高、中剂量组 IL-6 含量明显低于六神胶囊低剂量组 ($P<0.01$)。

组别	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	孔数	细胞存活率/%
六神胶囊组	9.76	4	25.24±1.71
	4.88	4	59.84±2.54
	2.44	4	77.00±2.01
	1.22	4	93.46±3.17
	0.61	4	97.62±3.62
	0.31	4	99.45±2.75
	0.15	4	99.36±2.91
	250.00	4	12.00±0.81
地塞米松组	125.00	4	14.00±6.65
	62.50	4	82.00±6.97
	31.25	4	96.00±1.99
	15.63	4	102.00±4.54
	7.81	4	112.00±0.45
	3.90	4	108.00±4.80
	1.95	4	112.00±3.20

2.3 各组细胞中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 iNOS mRNA 表达比较

表 4 示, 与空白组比较, 模型组细胞中 TNF-α、

IL-1β、IL-6 和 iNOS mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 地塞米松组及六神胶囊高、中剂量组中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 iNOS mRNA 表达显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与地塞米松组比较, 六神胶囊高剂量组 TNF-α mRNA 表达显著降低, 六神胶囊高、中剂量组 IL-6、IL-1β mRNA 表达显著升高, 六神胶囊低剂量组中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 iNOS mRNA 表达显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 六神胶囊各剂量组 IL-6、TNF-α mRNA 表达随浓度升高而降低, 呈剂量依赖性 ($P<0.01$); 六神胶囊低剂量组 IL-1β mRNA 表达高于六神胶囊高剂量组, iNOS mRNA 表达高于六神胶囊中、高剂量组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.4 各组细胞中 NF-κB 信号通路关键蛋白表达比较

表 5 示, 与空白组比较, 模型组细胞中 p-IκBα、p-NF-κB p65 蛋白表达均升高, IκBα 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 地塞米松组细胞中 p-IκBα、p-NF-κB p65 蛋白表达降低, IκBα 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 六神胶囊各剂量组细胞中 p-IκBα 和 p-NF-κB p65 蛋白表达均降低 ($P<0.01$), 六神胶囊高、中剂量组细胞中 IκBα 蛋白表达升高 ($P<0.01$); 与地塞米松组比较, 六神胶囊高剂量组 p-NF-κB p65 蛋白及六神胶

组别	孔数	TNF-α/ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$	IL-1β/ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$	IL-6/ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
空白组	3	207.22±20.25	78.71±4.01	13.94±1.21	18.00±0.19
模型组	3	970.58±9.28 ^{a)}	286.77±27.21 ^{a)}	52.44±2.11 ^{a)}	36.19±0.71 ^{a)}
地塞米松组	3	777.58±13.38 ^{b)}	237.39±4.49 ^{c)}	15.95±0.99 ^{b)}	24.21±0.42 ^{b)}
六神胶囊高剂量组	3	784.32±19.91 ^{b)}	134.22±24.59 ^{b) d)}	40.69±2.38 ^{b) d)}	26.44±0.38 ^{b)}
六神胶囊中剂量组	3	900.51±21.31 ^{c) d) e)}	228.94±3.49 ^{b) e)}	45.01±2.07 ^{c) d)}	28.90±0.50 ^{b)}
六神胶囊低剂量组	3	955.67±16.76 ^{d) e)}	275.71±20.53 ^{c)}	55.06±2.41 ^{d) e) f)}	30.17±0.39 ^{c)}

注: TNF-α, 肿瘤坏死因子 α; IL-1β, 白细胞介素 1β; IL-6, 白细胞介素 6; NO, 一氧化氮。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与地塞米松组比较, $P<0.01$; e) 与六神胶囊高剂量组比较, $P<0.01$; f) 与六神胶囊中剂量组比较, $P<0.01$ 。

组别	孔数	TNF-α	IL-1β	IL-6	iNOS
空白组	3	1.11±0.50	1.01±0.18	1.00±0.13	1.01±0.17
模型组	3	12.66±3.12 ^{a)}	2664.65±466.91 ^{a)}	30.17±1.63 ^{a)}	71.97±7.17 ^{a)}
地塞米松组	3	8.56±0.99 ^{b)}	729.32±86.12 ^{c)}	5.25±0.47 ^{c)}	16.47±2.04 ^{c)}
六神胶囊高剂量组	3	4.29±0.39 ^{c) d)}	1651±119.95 ^{c) d)}	12.13±1.15 ^{c) e)}	20.92±2.33 ^{c)}
六神胶囊中剂量组	3	11.34±1.44 ^{b) g)}	1970.19±153.49 ^{b) e)}	19.51±0.66 ^{b) e) g)}	25.39±1.37 ^{c)}
六神胶囊低剂量组	3	20.29±1.89 ^{e) g) h)}	2632.19±432.27 ^{c) f)}	30.81±2.56 ^{c) g) h)}	57.44±4.82 ^{e) g) h)}

注: TNF-α, 肿瘤坏死因子 α; IL-1β, 白细胞介素 1β; IL-6, 白细胞介素 6; iNOS, 诱导型一氧化氮合酶。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与地塞米松组比较, $P<0.05$; e) 与地塞米松组比较, $P<0.01$; f) 与六神胶囊高剂量组比较, $P<0.05$; g) 与六神胶囊高剂量组比较, $P<0.01$; h) 与六神胶囊中剂量组比较, $P<0.01$ 。

表5 各组细胞中NF-κB信号通路关键蛋白表达比较

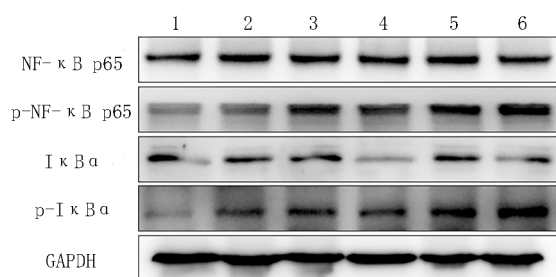
(/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	NF-κB p65	p-NF-κB p65	IκBα	p-IκBα
空白组	3	0.48±0.02	0.44±0.03	0.35±0.02	0.21±0.03
模型组	3	0.52±0.04	1.13±0.06 ^{a)}	0.19±0.02 ^{a)}	0.91±0.09 ^{a)}
地塞米松组	3	0.53±0.04	0.91±0.06 ^{b)}	0.33±0.03 ^{c)}	0.67±0.08 ^{b)}
六神胶囊高剂量组	3	0.53±0.07	0.56±0.04 ^{c) d)}	0.33±0.03 ^{c)}	0.39±0.06 ^{c) d)}
六神胶囊中剂量组	3	0.50±0.05	0.79±0.06 ^{c) e)}	0.31±0.01 ^{c)}	0.47±0.06 ^{c) d)}
六神胶囊低剂量组	3	0.50±0.05	0.85±0.04 ^{c) e)}	0.18±0.01 ^{d) e) f)}	0.47±0.05 ^{c) d)}

注：NF-κB p65，核因子κB亚基P65；p-NF-κB p65，磷酸化核因子κB亚基；IκBα，核因子κB；p-IκBα，磷酸化核因子κB；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ，c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与地塞米松组比较， $P<0.01$ ；e) 与六神胶囊高剂量组比较， $P<0.01$ ；f) 与六神胶囊中剂量组比较， $P<0.01$ 。

囊各剂量组 p-IκBα 蛋白表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；六神胶囊高剂量组 p-NF-κB p65 蛋白表达低于六神胶囊中、低剂量组 ($P<0.01$)，六神胶囊低剂量组 IκBα 蛋白表达低于六神胶囊中、高剂量组 ($P<0.01$)。各组细胞中 NF-κB 信号通路关键蛋白电泳图见图 1。



注：1，空白组；2，六神胶囊高剂量组；3，六神胶囊中剂量组；4，六神胶囊低剂量组；5，地塞米松组；6，模型组；NF-κB p65，核因子κB亚基P65；p-NF-κB p65，磷酸化核因子κB亚基；IκBα，核因子κB；p-IκBα，磷酸化核因子κB；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图1 各组细胞中NF-κB信号通路关键蛋白电泳图

3 讨论

炎症反应过程通常受到机体的严格调控，是机体的一种防御反应，一方面可以引发组织细胞的损坏，使组织变质、渗出和增生，另一方面可以引起机体免疫系统机能增加，清除炎症因子，促进受损组织的愈合^[15]。当致炎因子入侵机体后，体内的巨噬细胞被激活并产生大量细胞因子，其中包括促炎因子和抗炎因子，使炎症细胞趋化，进而导致炎症反应的发生^[16-17]。中医学中并无“炎症”概念，其表现形式多与中医的“热证”相似，根据炎症侵袭的范围不同，临床上以表热证、里实热证、里虚热证、虚实夹杂证多见。中医治疗炎症性疾病是在辨证的基础上，根据表里、寒热、虚实采用解表、清热、散结、祛湿、行气、活血、温通、补益等多

种方法综合治疗^[18]。六神胶囊以牛黄、麝香为君，清热解毒，活血散结；以蟾酥、珍珠、雄黄为臣，加强解毒之力；以冰片为佐，加强散结解毒作用，具有清热解毒、化痰散结、消肿止痛等功效。有研究^[8]表明，六神胶囊对非感染性、感染性炎症动物模型均有抑制作用，可能通过降低炎症因子含量发挥其抗炎作用。

NO与人类多种疾病的发生发展有着密切的联系，包括炎症、肿瘤、自身免疫疾病以及感染性疾病。NO是清除细菌和病原体的重要信使分子，通过细胞间信号传递，交换载体功能，从而发挥免疫调节作用^[19]。NO受iNOS调节，由iNOS催化L-精氨酸与氧分子经多步氧化还原反应生成。iNOS在静息细胞内不表达，当细胞受到外界各种刺激因子刺激时，如LPS强烈诱导，iNOS就会催化合成大量NO，促进炎症反应和导致组织损坏^[19-20]。NO也能使巨噬细胞释放大量的炎性细胞因子如IL-6、IL-1β、TNF-α等。TNF-α是炎症性疾病治疗靶点的细胞因子，主要由活化的巨噬细胞分泌，能够增强巨噬细胞的吞噬能力，在免疫调节和炎症反应中起重要作用^[21-22]。白细胞介素(ILs)是炎症级联反应重要的组成部分，其中IL-6能够促进T淋巴细胞和B淋巴细胞分化，促进其他炎症细胞因子的释放^[23]。IL-1受体I型(IL-1R1)是IL-1β的一种受体，是一种促炎因子，由先天免疫系统细胞(如单核细胞和巨噬细胞)分泌，可介导多种活性^[24-25]。本研究结果表明，用LPS刺激RAW264.7细胞后模型组IL-6、IL-1β、TNF-α、NO和iNOS表达显著上调，六神胶囊干预后，能显著抑制LPS诱导的RAW264.7细胞中IL-6、IL-1β、TNF-α、NO和iNOS表达，其中六神胶囊高剂量组降低炎症因子表达水平优于六神胶囊中、低剂量组。另外，与地塞米松组相比，六神胶囊高剂量组IL-1β水平和

TNF- α mRNA 表达量显著降低, 但 IL-6、IL-1 β mRNA 表达量显著升高, 提示六神胶囊高剂量组抑制炎症过度表达的效果可能与地塞米松组相当。以上结果说明六神胶囊对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应具有一定保护作用。

NF- κ B 由蛋白 Rel 和 p50 二聚体组成, 是一种重要的转录因子, 参与调节机体的炎症和免疫反应^[26]。当细胞受到外界刺激后, I κ B 激酶 (IKK) 被激活, 从而导致 I κ B α 磷酸化, 随后 I κ B α 降解, NF- κ B 向细胞核移位^[27]。在活化的巨噬细胞中, NF- κ B 与其他转录激活剂协同作用, 在协调编码 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 iNOS 的基因表达中发挥重要作用, 当固有免疫细胞 (如巨噬细胞) 识别病原体表面的 LPS 时, NF- κ B 信号通路被激活以诱导 iNOS 的产生, 促进 NO 的合成和炎症细胞因子的产生, 加剧了炎症反应^[28-29]。本研究结果表明, 当 RAW264.7 细胞受到 LPS 刺激时, 激活了 NF- κ B 信号通路, 模型组 p-I κ B α 、p-NF- κ B p65 蛋白表达均升高, 而 I κ B α 蛋白表达减低, 六神胶囊可降低 p-I κ B α 、p-NF- κ B p65 蛋白表达, 升高 I κ B α 蛋白表达, 且六神胶囊高剂量组抑制 NF- κ B 信号通路关键蛋白表达优于六神胶囊中、低剂量组。另外, 与地塞米松组相比, 六神胶囊高剂量组 p-NF- κ B p65 蛋白和 p-I κ B α 蛋白表达降低, 提示六神胶囊高剂量抑制 NF- κ B 信号通路的效果优于地塞米松组。因此, 推测六神胶囊的抗炎作用机制可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路, 降低 iNOS 的表达和 NO 的合成, 从而抑制炎症因子的产生, 达到改善炎症反应的目的, 且以高剂量效果更佳。

综上所述, 六神胶囊的抗炎作用可能与 NF- κ B 信号通路有关, 但两者之间的关系还需要沉默或者过表达 NF- κ B 基因进一步验证, 也需要进一步探究该通路上游与下游基因之间的关系。同时, 由于本研究只涉及单纯离体细胞实验, 其影响因素较为单一, 并不能综合反映炎症反应在体的整个过程, 而且仅根据毒性关系选择 3 个浓度来进行实验, 后续需进一步观察其量效关系。

参考文献

- [1] BOSSCHE J VAN DEN, O'NEILL LA, MENON D. Macrophage immunometabolism: where are we (going)? [J]. Trends Immunol, 2017, 38(6): 395-406.
- [2] 徐霄龙, 郭玉红, 赵京霞, 等. 参附黄方对斑马鱼炎症、巨噬细胞吞噬功能的影响 [J]. 中医杂志, 2020, 61(23): 2092-2097.
- [3] REN J, SU D, LI L, et al. Anti-inflammatory effects of aureusidin in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via suppressing NF- κ B and activating ROS- and MAPKs-dependent Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 387: 114846. doi: 10.1016/j.taap.2019.114846.
- [4] SHIH CC, LIU PY, CHEN JH, et al. Macrophage expression of E3 ubiquitin ligase Grail protects mice from lipopolysaccharide-induced hyperinflammation and organ injury [J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0208279.
- [5] SUN Q, FAN J, BILLIAR TR, et al. Inflammasome and autophagy regulation: a two-way street [J]. Mol Med, 2017, 23(1): 188-195.
- [6] LIBBY P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms [J]. Am J Clin Nutr, 2006, 83(2): 456s-460s.
- [7] CHIURCHIÙ V, MACCARRONE M. Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(9): 2605-2641.
- [8] 孙建辉, 霍海如, 李小芹, 等. 六神丸对非感染性、感染性炎症动物模型抗炎作用研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(10): 60-65.
- [9] 丁兰芳. 六神丸抗炎临床应用及机制研究进展 [J]. 实用中西医结合临床, 2020, 20(9): 158-159.
- [10] 郑国华, 王桂红. 六神丸的临床应用和药理研究进展 [J]. 湖北中医杂志, 1996, 18(4): 56-57.
- [11] 韩树景, 裴改社. 六神丸的临床运用 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2000, 9(1): 57-58.
- [12] MA Q, HUANG W, ZHAO J, et al. Liu Shen Wan inhibits influenza A virus and excessive virus-induced inflammatory response via suppression of TLR4/NF- κ B signaling pathway in vitro and in vivo [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 252(5): 112584-112593.
- [13] 余功旺, 黄文浩, 刘爱梅, 等. 小鼠腹腔巨噬细胞炎症模型的建立 [J]. 广东药学院学报, 2014, 30(6): 766-770.
- [14] PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(9): e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- [15] ZHONG J, SHI G. Editorial: regulation of inflammation in chronic disease [J]. Front Immunol, 2019, 10: 737. doi: 10.3389/fimmu.2019.00737.
- [16] FUJIWARA N, KOBAYASHI K. Macrophages in inflammation [J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005, 4(3): 281-286.
- [17] KANG JK, HYUN CG. 4-Hydroxy-7-Methoxycoumarin inhibits inflammation in LPS-activated RAW264.7 mac-

- rophages by suppressing NF- κ B and MAPK activation [J]. *Molecules*, 2020, 25(19): 4424.
- [18]姜淑凤. 浅谈中医药治疗炎症性疾病五法 [J]. *山东中医杂志*, 2015, 34(5): 354-356.
- [19]林海珊, 欧敏. 诱导型一氧化氮合酶及其相关分子的研究进展 [J]. *现代医学*, 2015, 43(5): 644-647.
- [20]ZHAO WR, SHI WT, ZHANG J, et al. Tribulus terrestris L. Extract protects against lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264. 7 macrophage and zebrafish via inhibition of Akt/MAPKs and NF- κ B/iNOS-NO signaling pathways [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021: 6628561. doi: 10.1155/2021/6628561.
- [21]CHU CQ. Molecular probing of TNF: From identification of therapeutic target to guidance of therapy in inflammatory diseases [J]. *Cytokine*, 2018, 101: 64-69. doi: 10.1016/j.cyt.2016.08.020.
- [22]MITOMA H, HORIUCHI T, TSUKAMOTO H, et al. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- α agents-comparison among therapeutic TNF- α antagonists [J]. *Cytokine*, 2018, 101: 56-63. doi: 10.1016/j.cyt.2016.08.014.
- [23]SEBINA I, FOGG LG, JAMES KR, et al. IL-6 promotes CD4⁺ T-cell and B-cell activation during plasmodium infection [J]. *Parasite Immunol*, 2017, 39(10): 12455-12465.
- [24]YANG Q, CHU Q, ZHAO X, et al. Characterization of IL-1 β and two types of IL-1 receptors in miuiy croaker and evolution analysis of IL-1 family [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 63: 165-172. doi: 10.1016/j.fsi.2017.02.005.
- [25]LOPEZ-CASTEJON G, BROUGH D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(4): 189-195.
- [26]VALLABHAPURAPU S, KARIN M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 693-733. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132641.
- [27]SUN SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(9): 545-558.
- [28]LIM JH, KIM HY, LEE JS, et al. Dp44mT regulates the levels of inflammatory mediators through blocking NF- κ B nuclear translocation in LPS-stimulated RAW 264. 7 macrophages [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2021, 57(3): 332-341.
- [29]BAEUEERLE PA, HENKEL T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system [J]. *Annu Rev Immunol*, 1994, 12: 141-179. doi: 10.1146/annurev.im.12.040194.001041.

Effect of *Liushen Capsules* (六神胶囊) on Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Response in RAW264. 7 Macrophages: based on NF- κ B Pathway

MA Qin¹, CHEN Ruihan¹, LEI Biao¹, WANG Zhoulang¹, XIE Yuqi¹, LIU Bin², YANG Zifeng¹

1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, 511436; 2. School of Medicine, Kunming University of Science and Technology

ABSTRACT Objective To explore the anti-inflammatory effect of *Liushen Capsules* (六神胶囊) and the underlying mechanism. **Methods** The RAW264. 7 cells were divided into *Liushen Capsules* group and dexamethasone group. *Liushen Capsules* solution at the concentration of 9. 76, 4. 88, 2. 44, 1. 22, 0. 61, 0. 31, and 0. 15 μ g/ml were used for gradient dilution, and dexamethasone solution at the concentration of 250, 125, 62. 5, 31. 25, 15. 63, 7. 81, and 3. 91 μ g/ml were administered for gradient dilution. The top three maximum concentrations of *Liushen Capsules* solution with cell viability over 90%, as well as the maximum non-toxic concentration of dexamethasone solution were selected for subsequent experiments. RAW264. 7 cells were divided into blank group, dexamethasone group, model group and high-, medium- and low dose *Liushen Capsules* groups. Except for the blank group, the rats were induced by lipopolysaccharide to establish the inflammation model. After modeling, 1 ml of the selected concentrations of *Liushen Capsules* solutions were added into the corresponding high-, medium- and low-dose *Liushen Capsules* groups, while 1 ml of the dexamethasone solution with selected concentration was added in the dexamethasone group; and 1 ml of culture medium was given in the model group and the blank group. After 24 hours, the cell supernatant was collected to detect the concentration of nitric oxide (NO), and the ELISA method was used to detect the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF- α), and interleukin-6 (IL-6) in the cells. The mRNA expressions of IL-1 β , TNF- α , IL-6 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the cells were detected by

real-time fluorescence quantitative PCR, while the expressions of nuclear factor κ B p65 (NF- κ B p65), phosphorylated NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65), inhibitor of nuclear factor κ B α (I κ B α) and phosphorylated I κ B α (p-I κ B α) were detected through western blotting. **Results** The selected concentrations of *Liushen Capsules* solution were 1.22, 0.61, and 0.31 μ g/ml for subsequent experiments, and the selected concentration of dexamethasone solution was 31.25 μ g/ml. Compared to those in the blank group, the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NO in the cells, the mRNA expressions of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and iNOS, and the protein expressions of p-I κ B α and p-NF- κ B p65 significantly increased in the model group, and the protein expression of I κ B α was significantly reduced ($P < 0.01$). Compared to those in the model group, the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NO, the mRNA expressions of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and iNOS, the protein expressions of I κ B α and p-NF- κ B p65 were significantly reduced, while the protein expression of I κ B α was increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the dexamethasone group, the high-dose *Liushen Capsules* group had lower level of IL-1 β , higher level of IL-6, and decreased expressions of TNF- α mRNA and p-NF- κ B p65 protein ($P < 0.01$). The levels of TNF- α and IL-1 β , the mRNA expressions of IL-6 and TNF- α , and the protein expression of p-NF- κ B p65 in the high-dose *Liushen Capsules* group were significantly lower than those in the medium- and low-dose groups ($P < 0.01$). **Conclusion** *Liushen Capsules* has good anti-inflammatory activity in vitro, which may improve the inflammatory responses by inhibiting the activation of NF- κ B signaling pathway, reducing the expression of iNOS, further inhibiting NO synthesis and inflammatory cytokines productions, and higher dose shows better effect.

Keywords inflammatory response; *Liushen Capsules* (六神胶囊); macrophages; lipopolysaccharide; inflammatory factors; nuclear factor- κ B; nitric oxide

(收稿日期: 2021-03-09; 修回日期: 2021-10-01)

[编辑: 王利芬]

· 信 息 窗 ·

《推进中医药高质量融入共建“一带一路”发展规划(2021-2025年)》印发 推动中医药国际合作

日前,国家中医药管理局、推进“一带一路”建设工作领导小组办公室联合印发《推进中医药高质量融入共建“一带一路”发展规划(2021-2025年)》(以下简称《规划》),旨在全面提升中医药参与共建“一带一路”质量与水平。展望2035年,中医药融入更多共建“一带一路”国家主流医学体系,在国际传统医学领域的话语权和影响力显著提升。

《规划》提出,“十四五”时期,与共建“一带一路”国家合作建设30个高质量中医药海外中心,颁布30项中医药国际标准,打造10个中医药文化海外传播品牌项目,建设50个中医药国际合作基地和一批国家中医药服务出口基地,加强中药类产品海外注册服务平台建设,组派中医援外医疗队,鼓励社会力量采用市场化方式探索建设中外友好中医医院。

《规划》提出,深化全球卫生治理合作,着力构建传统医学合作伙伴关系。推动中医药纳入更多国家主流卫生体系和政府间合作机制,加大中医药对外援助力度。深化国际组织框架下合作,完善中医药国际标准化体系建设,协调制定国际传统医药标准和监管规则。深化医疗卫生合作,着力增加优质中医药服务供给。加强国际抗疫合作,完善中医药应对国际关注的公共卫生紧急事件机制,加大“三药三方”等有效方剂宣传和推介力度。打造高水平医疗服务平台,向共建“一带一路”国家民众、海外华侨华人、留学生、中资机构人员和赴境外旅行人员等提供优质中医药服务。

《规划》明确,深化科技创新合作,着力塑造中医药发展新优势。加强科技交流合作,推动中医药参与国家战略性科技创新合作与政府间国际科技创新合作,探索中医药国际大科学计划和大科学工程。强化科研平台建设,支持中医药科研院所、高校、企业与共建“一带一路”国家相关机构以合资、合作的方式联合建设“一带一路”中医药联合实验室。开展中医药领域重大装备研发,加速科技成果向现实生产力转化。

《规划》提到,深化教育合作,着力加强中医药国际人才队伍建设。开展院校合作,提升中医药高等院校国际教育水平,积极推动中医药纳入共建“一带一路”国家高等教育体系。拓展培训合作,提升共建“一带一路”国家民众对中国文化和中医药基础知识理解和认同。加大国际复合型中医药人才培养力度,实施中医药英才海外培养合作项目。深化文化交流合作,着力增强中医药影响力,讲好中医药故事,不断提升对中华文化的理解,加强已纳入人类非物质文化遗产代表作名录中医药项目的保护和传承。将中医药纳入国家重大对外文化推广活动,打造融中医药健康咨询、展览展示、品鉴体验、现场习练为一体的具有全球影响力的中医药文化亮点品牌。发展中医药对外文化产业,形成一批具有国际知名度的中医药新媒体品牌。

(本文来源于国家中医药管理局官网)