

本文引用:黄淑梅,张葵之,阿丽米热·阿克木江,木拉提·克扎衣别克.阿尔泰瑞香提取物的体外抗炎及抗氧化活性[J].湖南中医药大学学报,2019,39(7):832-836.

阿尔泰瑞香提取物的体外抗炎及抗氧化活性

黄淑梅^{1,2},张葵之¹,阿丽米热·阿克木江³,木拉提·克扎衣别克^{1,2*}

(1.新疆医科大学药学院,新疆 乌鲁木齐 830001;2.伊犁哈萨克自治州中医医院,新疆 伊宁 835000;
3.伊犁州友谊医院药剂科,新疆 伊宁 835000)

〔摘要〕目的 探讨阿尔泰瑞香二氯甲烷提取物(Da-Dm)的体外抗炎及抗氧化活性。方法 以不同浓度(1、6、30 $\mu\text{g/mL}$)的 Da-Dm 作用于脂多糖(LPS,1 $\mu\text{g/mL}$)诱导的 RAW264.7 小鼠巨噬细胞,采用 CCK-8 法测定 Da-Dm 对细胞增殖的影响;Griess 法检测细胞上清液中一氧化氮(NO)的释放量;ELISA 法检测细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)的分泌量。以维生素 C 为对照,采用 FRAP 法、DPPH 法评价 Da-Dm 总抗氧化能力。结果 Da-Dm 在浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 及以下时对 RAW264.7 细胞增殖没有影响。与 LPS 组比较,1~30 $\mu\text{g/mL}$ 的 Da-Dm 可明显降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌炎症因子 NO、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量($P<0.05$, $P<0.01$),并呈现浓度依赖性。Da-Dm 对 DPPH 自由基有较好的清除能力,其清除率的 IC₅₀ 为 318.1 $\mu\text{g/mL}$,在 FRAP 实验中其对 Fe²⁺离子具有较强的还原能力。结论 Da-Dm 可以抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应,它的抗炎作用可能与抑制 NO、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的释放有关。Da-Dm 具有较好的抗氧化活性。

〔关键词〕 阿尔泰瑞香;二氯甲烷提取物;RAW264.7 细胞;炎症介质;抗氧化作用

〔中图分类号〕R285.5 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.07.009

Antioxidant and Anti-inflammatory Activities *in Vitro* of the Extracts from *Daphne altaica* Pall

HUANG Shumei^{1,2}, ZHANG Yanzhi¹, AKEMUJIANG Alimire³, KEZHAYIBIEKE Mulati^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830001, China; 2. Department of Pharmacy, The Friendship Hospital of Ili Kazak Autonomous Prefecture, Yining, Xinjiang 835000, China; 3. Traditional Chinese Medicine Hospital of Ili Kazak Autonomous Prefecture, Yining, Xinjiang 835000, China)

〔Abstract〕 Objective To explore the *in vitro* anti-inflammatory and antioxidant activities of the dichloromethane extracts from *Daphne altaica* Pall (Da-Dm). **Methods** Mice RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharides (LPS, 1 $\mu\text{g/mL}$) were treated with different concentrations of Da-Dm (1, 6, 30 $\mu\text{g/mL}$) respectively. The proliferation of RAW264.7 cells was determined by CCK-8 method; the output of nitric oxide (NO) in the cell supernatant was evaluated by Griess reagent assay; the secretion volumes of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) were detected by ELISA. The total antioxidant activity of the Da-Dm was evaluated by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay and ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay, and vitamin C (Vc) was used as a positive control. **Results** Da-Dm with the concentration of 30 $\mu\text{g/mL}$ and below had no influence on the proliferation of RAW264.7 cells. Compared with the LPS group, 1-30 $\mu\text{g/mL}$ of Da-Dm in the LPS-induced RAW264.7 cells greatly inhibited their release of inflammatory mediators, such as NO, IL-1 β , IL-6 and TNF- α ($P<0.05$, $P<0.01$), in a dose-dependent manner. The Da-Dm exhibited good DPPH radical cleaning power and good Fe²⁺ reducing power. The median

〔收稿日期〕2019-03-23

〔基金项目〕国家自然科学基金(81360499);新疆维吾尔自治区青年科技创新人才培养工程(QN2016YX0759)。

〔作者简介〕黄淑梅,女,在读硕士研究生,研究方向:抗炎免疫药理学。

〔通讯作者〕*木拉提·克扎衣别克,男,研究员,硕士研究生导师,E-mail:murat_kizaibek@sina.com。

inhibitory concentration (IC₅₀) of scavenging DPPH radical was 318.1 μg/mL. **Conclusion** Da-Dm can inhibit LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 cells, and its anti-inflammatory effect may be related to the reduction of the release of inflammatory cytokines, like NO, IL-1β, IL-6 and TNF-α. The antioxidant activity of Da-Dm is strong.

[**Keywords**] *Daphne altaica* Pall; dichloromethane extracts; RAW264.7 cells; inflammatory cytokines; antioxidant

阿尔泰瑞香(*Daphne altaica* Pall.)为瑞香科瑞香属植物阿尔泰瑞香的干燥茎皮,其主要分布于阿尔泰山脉^[1]。其味辛、温,有毒。具有发汗解表、止咳祛痰、温中止痛的功效^[2],长期以来在哈萨克传统医学中广泛应用于胃癌、气管炎、风湿性关节炎^[3-4]等疾病的治疗。有研究表明,阿尔泰瑞香正己烷提取物能够抑制人食管癌 ECA-109 细胞的增殖^[5],其二氯甲烷提取物和甲醇提取物均对人急性早幼粒白血病细胞株 HL-60 细胞的体外增殖具有明显的抑制活性^[6]。但阿尔泰瑞香的体内外抗炎抗氧化作用却鲜见报道。故本实验选取二氯甲烷提取物为实验对象,利用脂多糖(LPS)诱导的体外炎症模型来初步分析阿尔泰瑞香的抗炎效果,并对其体外抗氧化作用也进行了分析,以期对阿尔泰瑞香的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 药材

阿尔泰瑞香由伊犁州中医医院哈药研究所于2018年1月提供,其原植物经新疆农业大学吾买尔夏提·塔汉教授鉴定为瑞香科属植物阿尔泰瑞香 *Daphne altaica* Pall。

1.2 主要试剂

RAW264.7 小鼠巨噬细胞株(北京北纳创联生物技术研究院);维生素C标准品(中国食品药品检定研究院,批号:100425-201504,含量为100.0%);DMEM高糖培养基(美国GIBCO公司,批号:8118174);胎牛血清(依科赛生物科技有限公司,批号:11G145);脂多糖(LPS,美国Sigma-Aldrich公司,批号:028M4021V);CCK8试剂盒(北京全式金生物有限公司,批号:J30608);地塞米松(上海麦克林生物生化科技有限公司,批号:C10187631);NO试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20180725);TNF-α试剂盒(批号:A28280643)、IL-1β试剂盒(批号:A201B80633)、IL-6ELISA试剂盒(批号:A20680724)均购自于杭州联科生物技术有限公司;TPTZ(批号:111758-1701)、DPPH(批号:10257-1708)均购自于北京百灵威科技有限公司;其余试剂

均为分析纯。

1.3 主要仪器

CO₂细胞培养箱、生物安全柜(上海力康仪器有限公司);台式低速离心机(上海飞鸽仪器有限公司);恒温箱、恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);荧光倒置显微镜(日本尼康公司);酶标仪(Bio-Rad公司)。

1.4 体外抗炎实验

1.4.1 阿尔泰瑞香二氯甲烷提取物(Da-Dm)的制备 取阿尔泰瑞香干燥茎皮150g,以药材与正己烷为1:10的比例回流1h(提取2次),弃去正己烷提取液,继续将药材与二氯甲烷为1:10的比例回流1h(提取2次),将阿尔泰瑞香二氯甲烷提取液过滤,合并提取液,减压浓缩,冷冻干燥得Da-Dm。

1.4.2 细胞培养与传代 用含10%胎牛血清的高糖DMEM完全培养液(含100U/mL青霉素和链霉素)于5%CO₂、37℃恒温培养箱进行培养。取对数生长期的RAW264.7小鼠巨噬细胞进行实验。

1.4.3 分组 取对数生长期的RAW264.7细胞随机分为6组。空白对照组:加入等体积的培养液;炎症模型组:只用1μg/mL的LPS处理而不加药物干预;LPS+阳性对照组:10μM的地塞米松(DM)预处理1h后,再加1μg/mL LPS干预24h;LPS+药物组:取不同浓度的Da-Dm(1、6、30μg/mL),再加1μg/mL的LPS干预24h。

1.4.4 Da-Dm对LPS诱导后RAW264.7细胞增殖的影响 取对数生长期RAW264.7的细胞,调整细胞密度为1×10⁵/mL的单细胞悬液,以每孔100μL接种至96孔板中,24h后按1.4.3实验分组进行干预,每组5个重复,继续培养24h,每孔加入培养基总体积10μL的CCK-8溶液,继续孵育,1h后用酶标仪测定OD450nm处的吸光度A,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{样品}} / A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

1.4.5 Da-Dm对LPS诱导后RAW264.7细胞NO含量的影响 取对数生长期的RAW264.7细胞,调整细胞密度为1×10⁵/mL的单细胞悬液,以每孔300μL接种至48孔板中,24h后按“1.4.3”实验分组进行

干预,每组5个重复,继续培养24 h,收集上清,按NO试剂盒说明进行检测。

1.4.6 Da-Dm对LPS诱导后RAW264.7细胞炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量的影响 取对数生长期的RAW264.7细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的单细胞悬液,以每孔300 μL 接种至48孔板中,24 h后按“1.4.3”实验分组进行干预,每组5个重复,继续培养24 h,收集上清,按ELISA试剂盒说明进行检测。

1.5 体外抗氧化实验

1.5.1 FRAP法测定Da-Dm的抗氧化活性 按照Benzie等^[7]的方法进行进一步修改,精确量取醋酸钠缓冲液(0.3 mmol/L, pH 3.6)、TPTZ溶液(10 mmol/L)及FeCl₃(20 mmol/L)溶液,体积比为10:1:1的比例混匀,得FRAP工作液,配置FeSO₄标准系列溶液,分别取0.1 mL FeSO₄标准溶液加入3 mL FRAP工作液,在37 $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min,以蒸馏水为空白,测定溶液在593 nm处吸光度,建立浓度与吸光度的线性回归方程($y=0.0007x+0.0629$, $r=0.9996$);用乙醇为溶剂,将VC和Da-Dm配制成一系列待测溶液,将样品代替FeSO₄其余操作方法同上,上述实验进行3次,根据标准曲线计算FRAP值。

1.5.2 DPPH法测定Da-Dm的抗氧化活性 将DPPH配制成25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液,稀释成不同浓度,以95%乙醇为空白,测定上述标准溶液在517 nm处的吸光度,建立浓度与吸光度的线性回归方程($y=0.0316x+0.0072$, $r=0.9996$)。用乙醇为溶剂,将VC和Da-Dm配制成一系列待测溶液,取各浓度溶液0.2 mL加入3 mL 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的DPPH溶液,混匀,在37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中避光反应30 min,测定样品吸光度为 A_i ,空白组为等体积的乙醇溶液代替DPPH溶液,测得吸光度为 A_j ,以乙醇代替样品加入DPPH溶液测得吸光度为 A_s ,测定波长为517 nm,平行测定3次,根据公式计算清除率 I 。

$$I=[1-(A_i-A_j)/A_s] \times 100\%$$

1.6 统计学方法

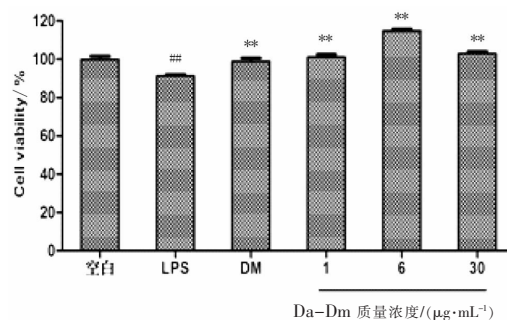
采用SPSS 19.0统计软件进行分析,多组间比较应用单因素方差分析,实验数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 Da-Dm对LPS诱导后RAW264.7细胞增殖的影响

CCK-8实验结果显示:当Da-Dm实验浓度为

1、6、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,RAW264.7细胞存活率为101.0%~114.9%,说明各浓度下的药物对细胞无毒性。另外,与空白组比较,LPS作用后RAW264.7细胞活力下降,细胞增殖受到抑制($P < 0.01$)。与LPS组相比较,加入DM及Da-Dm 24 h后各实验组均能使细胞增殖抑制状态有所恢复,差异具有统计学意义($P < 0.01$),说明实验浓度下的药物对RAW264.7细胞有显著的保护作用。见图1。

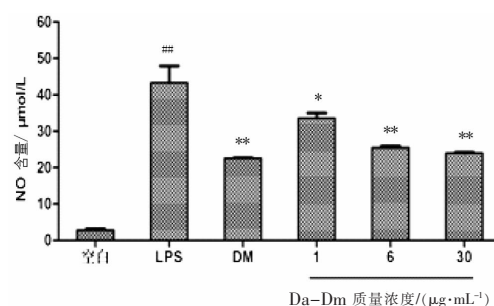


注:与空白组比较,### $P < 0.01$;与LPS组比较,** $P < 0.01$

图1 Da-Dm对LPS诱导后细胞增殖的影响

2.2 Da-Dm对NO释放量的影响

Griess法结果显示,正常RAW264.7细胞上清液中只含有少量的NO,当给与LPS刺激后,LPS组细胞培养液中的NO含量较空白组显著提高($P < 0.01$),体外炎症模型建立成功。与LPS组相比,加入DM及1、6、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Da-Dm 24 h后各实验组均能显著抑制NO产生($P < 0.05$),并呈量效关系。见图2。



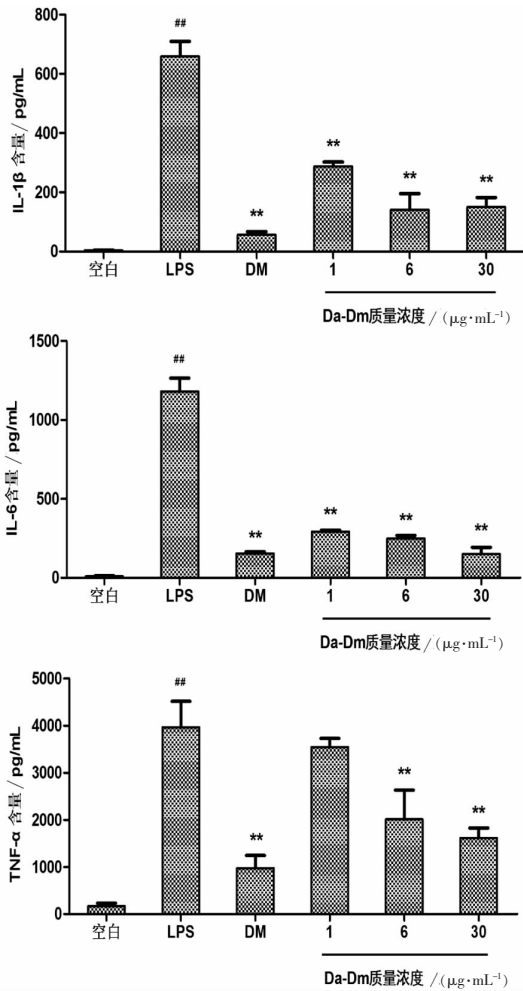
注:与空白组比较,### $P < 0.01$;与LPS组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图2 Da-Dm对LPS诱导后NO含量的影响

2.3 Da-Dm对炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响

LPS可激活巨噬细胞,诱导其分泌一系列炎症因子,炎症因子的分泌是评价炎症严重程度的一个量化指标,如图3所示,空白组IL-1 β 、IL-6及TNF- α 质量浓度均较低,经LPS刺激后三者释放均显著增加($P < 0.01$)。用10 μM 的DM及1、6、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Da-Dm处理RAW264.7细胞后,与LPS组相比,加入DM及Da-Dm 24 h后各实验组释放的炎症因

子含量均显著降低 ($P<0.05, P<0.01$) (除 TNF- α 实验中 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Da-Dm 组), 并呈量效关系。见图 3。



注:与空白组比较,### $P<0.01$;与 LPS 组比较,** $P<0.01$

图 3 Da-Dm 对 LPS 诱导的炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 含量的影响

2.4 FRAP 法测定 Da-Dm 的抗氧化活性

由于 FRAP 法不是针对某一种自由基清除能力,而是样品总的还原能力,因此可用来反映样品总的抗氧化活性^[8],实验结果表明对铁还原能力强弱顺序为 VC>Da-Dm,二者的总抗氧化值与浓度呈正比,虽然 Da-Dm 对铁的还原能力不及 VC,但其也表现出较好的还原能力,见图 4。

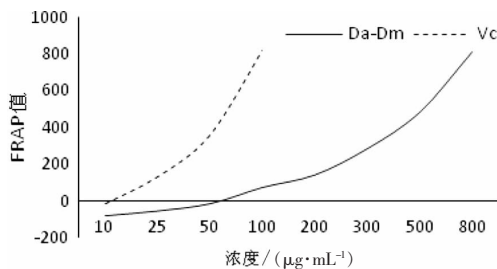


图 4 不同浓度下 Vc 和 Da-Dm 的 FRAP 值

2.5 Da-Dm 清除 DPPH 自由基的活性

为了更准确地评价样品间的抗氧化活性,常用清除 50% 自由基时的溶液质量浓度 IC_{50} 来比较,较低的 IC_{50} 值说明具有较高的自由基清除能力^[9]。在实验浓度范围内,对 DPPH 自由基清除能力的强弱顺序为 VC>Da-Dm,且其浓度与清除率呈现良好的剂量依赖关系,VC 及 Da-Dm 的 IC_{50} 分别为 57.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 318.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。说明 Da-Dm 对自由基有较好的清除能力,能起到较好的抗氧化作用。见表 1。

表 1 Vc 和 Da-Dm 清除 DPPH 自由基的能力

样品	线性方程	r	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g}/\text{mL}^{-1})$
VC	$y=0.931 8x-3.864$	0.998 5	57.8
Da-Dm	$y=0.062 8x+16.21$	0.982 3	318.1

3 讨论

炎症反应是由多种化学因子共同参与调节的,与其具有最密切联系的炎症介质与炎症因子是 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6^[10]。NO 在缺氧、炎症和肿瘤等情况下被大量表达,过量表达的 NO 会与超氧阴离子 O_2^- 反应,然后生成过氧化亚硝酸盐,从而导致局部组织产生损伤,其进一步介导了炎症的发生发展,细胞内 NO 的含量可作为反映炎症损伤程度的一种指标^[11]。TNF- α 是一种促炎因子,当体内的 TNF- α 处于低浓度时,可通过自分泌的方式调节白细胞功能,介导炎症反应的发生;而当 TNF- α 处于高浓度时,可进入血液循环中促进机体的体温升高, TNF- α 也可促进中性粒细胞的粘附及吞噬功能,促进细胞的呼吸爆发,并协助其它细胞因子(IL-6、IL-1 等)的表达^[12]。IL-1 β 可以促进组织的损伤,介导炎性细胞进入病变组织部位,促进细胞产生前列腺素等因子而引发全身反应,IL-1 β 还可促进巨噬细胞对抗原的识别,吸引中性粒细胞,并且促进炎性介质的释放^[13]。IL-6 在炎症反应初期被大量的表达,它能使中性粒细胞活性降低,促进炎症介质的产生,导致炎症反应的进程被加速^[14]。本实验以炎性因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 及炎性介质 NO 作为检测指标,来评价 Da-Dm 的抗炎效果,结果表明, Da-Dm 能显著抑制 NO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达,并且呈剂量依赖性,说明 Da-Dm 抗炎作用的产生可能与抑制 NO、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的释放有关。

自由基是一群具有一个或多个不成对电子且单独存在极短暂的原子、分子、离子或者原子团,正常情况下,体内自由基的产生和消除处于动态平衡中,但是当自由基产生过多或消除过慢时,会造成机体在分子水平、细胞水平及组织水平的损伤而诱发疾病。在抗氧化实验中 Da-Dm 表现出了较好的清除 DPPH 自由基能力及 FRAP 抗氧化能力。

参考文献

- [1] 巴哈尔古丽, 库里夏西. 哈萨克族民间用药阿尔泰瑞香的民间处方及应用[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 1028-1029.
- [2] 巴哈尔古丽·黄尔汉, 徐新. 哈萨克药志[M]. 北京: 民族出版社 2009: 33-35.
- [3] KIZAIBEK M, DANIR M, LI L, et al. Antiproliferative activity of different extracts from *Daphne altaica* Pall on selected cancer cells[J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2011, 5(15): 3448-3452.
- [4] 张薇, 柳润辉, 张川, 等. 瑞香属植物化学成分及其药理与临床作用的研究[J]. 药学进展, 2005, 29(1): 22-27.
- [5] 阿依夏木古丽·吾布力, 木拉提·克扎衣别克, 等. 阿尔泰瑞香提取物对人食管癌 Eca-109 细胞增殖、周期及凋亡的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(3): 323-327.
- [6] 木拉提·克扎衣别克. 哈萨克药阿尔泰瑞香及同属植物的传统应用及抗癌活性研究进展[J]. 河北医药, 2016, 38(19): 3007-3010.
- [7] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plas-ma as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239: 70-76.
- [8] 郭长江, 杨继军, 李云峰, 等. FRAP 法测定水果不同部分抗氧化活性[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(7): 841-843.
- [9] LEE M Y, LEE J A, SEOETAL C S. Anti-inflammatory activity of *Angelica dahurica* ethanolic extract on RAW264.7 cells via upregulation of heineoxygenase-1[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49: 1047-1055.
- [10] CHA S M, CHA J D, JANG E J, et al. Sophoraflavanone G prevents *Streptococcus mutans* surface antigen I/II-induced production of NO and PGE2 by inhibiting MAPK-mediated pathways in RAW264.7 macrophages[J]. Archives of Oral Biology, 2016, 68: 97.
- [11] BEUTLER B, CERAMI A. The biology of cachectin/TNF-Q primary mediator of the host response[J]. Annual Review of Immunology, 1989, 7: 625-655.
- [12] QIN Y, EKMEKCIOGLU S, LIU P, et al. Constitutive aberrant endogenous interleukin-1 facilitates inflammation and growth in human melanoma[J]. Molecular Cancer Research, 2011, 9: 1537-1550.
- [13] ZHANG W J, WEI H, HAGEN T, et al. Lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(10): 4077-4082.

(本文编辑 苏 维)