

本文引用:张桃伏,张凯强,李亚梅,栗倩,伊美瑾,龚云,张鹏,廖端芳.妇科千金胶囊的抗炎作用与其调节NF- κ B信号通路的关系[J].湖南中医药大学学报,2020,40(7):834-840.

妇科千金胶囊的抗炎作用与其调节 NF- κ B信号通路的关系

张桃伏¹,张凯强¹,李亚梅¹,栗倩¹,伊美瑾¹,龚云²,张鹏²,廖端芳^{1*}

(1.湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室,湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;

2.株洲千金药业股份有限公司,湖南株洲412007)

[摘要] **目的** 研究妇科千金胶囊总浸膏(Fuke Qianjin capsule extract, FKE)体外抗炎活性及其抗炎作用机制。**方法** 采用MTT法检测不同浓度FKE单独使用和FKE叠加100 ng/mL脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)使用时对小鼠巨噬细胞(RAW 264.7)活性的影响;采用ELISA法检测不同浓度FKE对LPS刺激后RAW 264.7细胞炎症因子一氧化氮(NO)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)释放的影响;通过RT-PCR法检测不同浓度FKE对炎症相关蛋白环氧合酶2(COX-2)、IL-6、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、TNF- α 转录水平的影响;采用Western blot检测不同浓度FKE对炎症相关蛋白I κ B α 、iNOS表达的影响;利用激光共聚焦技术检测FKE对NF- κ B p65核转位的影响;采用双荧光素酶报告基因检测不同浓度FKE对核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的影响。**结果** MTT测定结果表明,与对照组相比,FKE在50~800 μ g/mL浓度范围内对RAW 264.7细胞活性的影响无显著差异($P>0.05$);ELISA检测结果显示,FKE能明显降低LPS刺激诱导的RAW 264.7细胞NO含量,在400 μ g/mL浓度时,呈现出对IL-6、TNF- α 的抑制作用($P<0.05$);Western blot检测结果表明,FKE对I κ B α 的表达无影响,但对iNOS活性具有一定的抑制作用;激光共聚焦检测发现,与对照组比较,FKE部分抑制p65核转位;FKE在400 μ g/mL时,可明显抑制NF- κ B的激活($P<0.05$)。**结论** FKE具有明显减轻细胞炎症反应的作用,其机制可能与FKE抑制炎症通路关键信号分子NF- κ B激活从而导致TNF- α 、IL-6、iNOS等释放减少有关。

[关键词] 妇科千金胶囊;炎症因子;RAW 264.7;NF- κ B

[中图分类号]R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.07.011

Anti-inflammatory Effect of Fuke Qianjin Capsule and Its Relationship with Regulating NF- κ B Signal Pathway

ZHANG Taofu¹, ZHANG Kaiqiang¹, LI Yamei¹, SU Qian¹, YI Meijin¹, GONG Yun², ZHANG Peng², LIAO Duanfang^{1*}

(1. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd, Zhuzhou, Hunan 412007, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the *in vitro* anti-inflammatory and action mechanism of anti-inflammatory effect of Fuke Qianjin Capsule extract (FKE). **Methods** MTT assay was used to detect the effects of different concentrations of FKE alone and FKE plus 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) on the activity of mouse macrophages RAW 264.7 cells. ELISA method was applied to examine the effects of FKE with different concentrations on the release of inflammatory cytokines, like nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor α (TNF- α) in RAW 264.7 cells after LPS stimulation. The effects of FKE with different concentrations on the transcription levels of inflammatory-related proteins, such as COX-2, IL-6, iNOS, and TNF- α were observed by RT-PCR. Western blot was used to analyze the effects of FKE with different concentrations on the expression of inflammatory-related proteins of I κ B α and iNOS. The effect of FKE with different concentration on nuclear translocation of NF- κ B p65 was detected by laser confocal technology. The effect of FKE with different concentrations on nuclear factor- κ B (NF- κ B)

[收稿日期]2020-01-20

[基金项目]国家中药标准化项目(ZYBZH-C-HUN-21);湖南省重大科技专项(2015SK1001)。

[作者简介]张桃伏,女,在读硕士研究生,研究方向:中药抗炎活性筛选。

[通讯作者]*廖端芳,男,教授,博士研究生导师,E-mail:dfliao@hnuocm.edu.cn。

was detected by the dual-luciferase reporter system. **Results** MTT measurement showed that FKE had no significant effect on the activity of RAW 264.7 cells in the concentration of 50–800 μ g/mL when compared with the control group ($P>0.05$). ELISA detection showed that FKE can significantly reduce the NO content of RAW 264.7 cells induced by LPS. FKE with 400 μ g/mL showed an inhibitory effect on IL-6 and TNF- α levels ($P<0.05$); Western blot detection showed that FKE significantly inhibited the activity of iNOS, but without effects on I κ B α . Laser confocal analysis showed that FKE partially inhibited the nuclear translocation of p65 when compared with the control group. FKE at 400 μ g/mL could obviously inhibit the activation of NF- κ B ($P<0.05$). **Conclusion** FKE showed an obvious effect on alleviating inflammation, whose mechanism might be related to FKE's inhibition of activation of NF- κ B, a key signaling molecule in the inflammatory pathway, resulting in reduced release of TNF- α , IL-6, iNOS, etc.

[**Keywords**] Fuke Qianjin Capsules; inflammatory factors; RAW 264.7; NF- κ B

妇科千金胶囊属于国家中药保护品种,是由千金拔、金樱根、穿心莲、单面针、功劳木、鸡血藤、当归、党参这八味中药材组成的中药复方制剂,目前收载于2015版《中华人民共和国药典》一部^[1]。近年临床研究表明,妇科千金胶囊用于治疗急慢性盆腔炎、慢性宫颈炎、老年性阴道炎、子宫内膜炎、慢性附件炎等各种妇科炎症疗效显著,此外,用于治疗慢性前列腺炎、急慢性喉炎、流行性出血性结膜炎、牙周炎、非特异性溃疡性结肠炎等其他多种炎症也具有很好的疗效^[2]。妇科千金胶囊作用于炎症的研究多集中于临床疗效观察,对其具体作用机制研究较少。前期研究发现,妇科千金胶囊挥发油部位抗炎作用机制与抑制 NF- κ B 通路的激活有关^[3],因此,本实验采用脂多糖(LPS)诱导 RAW 264.7 细胞炎症模型,观察妇科千金胶囊的抗炎作用与其调节 NF- κ B 信号通路的关系。

1 材料

1.1 细胞株

小鼠单核巨噬细胞系 RAW 264.7 购于中南大学湘雅医院细胞中心。

1.2 主要药物与试剂

妇科千金胶囊总浸膏(Fuke Qianjin capsule extract, FKE),由株洲千金药业提供;DMEM 高糖培养基(SH30022.01)、双抗(SV30010)、胰蛋白酶(SH40003.01)、PBS 磷酸盐缓冲液(SH30256.01)均购于美国 Hyclone 公司;胎牛血清 FBS(S-FBS-SA-015)购于德国 Serana 公司;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(CW0022S)购于康为世纪生物公司;FITC 荧光二抗(70-GAR001)、小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)(70-EK2822/2)、小鼠白介素-6(IL-6)(70-EK2062/2)ELISA 检测试剂盒购于联科生物技术公司;LPS(L2880)、4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI, D9542)、四甲基偶氮唑蓝(MTT, M5655)、DMSO(D2650)均购于美国 Sigma 公司; β -actin(CSB-MA000194)一抗购于武汉华美生物工程

有限公司;NO 检测试剂盒(S0021)购于上海碧云天生物技术公司; α -tubulin(AB7291)一抗购于上海 Abcam 公司;抗 I κ B α 抗体(L35A5)、抗 iNOS 抗体(D6B6S)购于 Cell Signaling 公司;羊抗兔二抗(SA00001-2)、羊抗鼠二抗(SA00001-1)购于武汉三鹰生物有限公司;PVDF 膜(ISEQ00010)、ECL 显影液(WBLUR0500)均购于 Millipore 公司;反转录试剂盒购于天根公司;SYBR 染料法荧光定量 PCR 试剂盒(CW0957)购于康为世纪生物公司;NF- κ B RE 萤火虫荧光素酶报告基因质粒(E8491)、pRL-SV40 海肾荧光素酶报告基因质粒(E6911)、ViaFectTM(E4981)转染试剂、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(E1910)购买于 Promega 公司。

1.3 主要仪器

AL104 电子分析天平(Mettler Toledo 公司);Milli-Q Biocel 超纯水仪(Millipore 公司);CO₂ 培养箱(Sheldon Manufacturing 公司);冷冻离心机(Eppendorf 公司);DMLB2 多功能显微镜(LEICA 公司);多功能酶标仪(Thermo Scientific 公司);TC20 全自动细胞计数仪、荧光定量 PCR 仪、蛋白印迹系统(Bio-Rad 公司);Tanon6200 全自动数码凝胶图像分析系统(上海天能科技公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 用 DMEM 高糖培养基(含 10% FBS 以及 1% 双抗)于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,待细胞生长至 80% 左右,用含 0.25% 的胰酶消化传代,取对数生长期细胞用于后续实验。

2.2 药物制备

药物用含 0.1% FBS 的 DMEM 配置成 2 mg/mL 的母液,LPS 以 PBS 缓冲液配置成 1 mg/mL,MTT 以 DMEM 配置成 5 mg/mL,均用 0.2 μ m 微孔滤膜过滤,-20 $^{\circ}$ C 避光保存备用。实验组分别设置为:(1)对照组:生理盐水处理。(2)模型组:仅 100 ng/mL LPS

刺激。(3)FKE组(100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

2.3 MTT法检测药物对细胞活性的影响

取对数生长期 RAW 264.7 细胞消化后,以每孔 1×10^4 个细胞浓度种于 96 孔板中,培养贴壁,待细胞长至 80%~90%后,取出孔板,弃去上清,药物组分别加入浓度为 50、100、200、400、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 FKE 药液,对照组仅加入含 0.1% FBS 的 DMEM 培养基,每组五个复孔,每孔 200 μL 。继续培养 24 h,弃去上清,每孔加入 0.5 mg/mL MTT 100 μL ,培养箱中孵育 4 h,弃去上清,加入 150 μL DMSO,摇床振摇 10 min,酶标仪 490 nm 处测量各孔吸光度值^[4]。

2.4 药物叠加 LPS 毒性实验

采用 MTT 法,评价药物与 LPS 100 ng/mL 造模联合使用时对细胞活力的影响。取对数生长期 RAW 264.7 细胞消化后,以每孔 1×10^4 个细胞浓度种于 96 孔板中,培养贴壁,按“2.2”实验组别给药。孵育 2 h 后除正常组外其它各组均加入 LPS 使其终浓度为 100 ng/mL ,每组 5 个复孔,继续培养 24 h,后续按“2.3”项下方法法做 MTT 检测。

2.5 ELISA 法检测 LPS 刺激后细胞炎症因子的释放

将 RAW 264.7 细胞消化后以每孔 1×10^5 个细胞浓度种于 6 孔板中,培养贴壁。按“2.2”分组给药孵育 2 h 后除对照组外其它各组均加入 LPS 使其终浓度为 100 ng/mL ,每组 3 个复孔,细胞培养箱中培养,刺激 3 h 后,收集细胞上清 2250 $\times g$ 离心 10 min,取上清根据 TNF- α ELISA 试剂盒说明书进行测量;刺激 18 h 后,收集细胞上清 2250 $\times g$ 离心 10 min,取上清根据 IL-6 ELISA 试剂盒说明书进行测量;刺激 24 h 后收取细胞上清,2250 $\times g$ 离心 10 min,取上清按照 NO 检测试剂盒(Griess 法)说明书进行操作。

2.6 RT-PCR 法检测炎症相关蛋白转录水平

取对数生长期 RAW 264.7 细胞消化传代于 60 mm 细胞培养皿中并按“2.2”分组给药。药物孵育 2 h 后除正常组外其它各组均加入 LPS 使其终浓度为 100 ng/mL ,刺激 6 h 后,TRAzol 法提取细胞总 RNA,用 Nanodrop 紫外分光法检测所提 RNA 浓度以及纯度并采用琼脂糖水平电泳检测所提 RNA 完整性^[5]。所得总 RNA 采用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。按照染料法实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书,进行荧光定量 PCR 检测目的基因表达水平,结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来分析数据,PCR 引物序列由上海生工合成, β -actin 正向引物:CAAC

GAGCGGTTCCGATG,反向引物:GCC ACAGGATTC CAT ACCCA;IL-6 正向引物:CTGCAAGAGACTTC CATCCAG,反向引物:AGTGGTATAGACAGGTCT GTTGG;TNF- α 正向引物:TCTACTCCCAGGTTCTCT-TC,反向引物:GCAGAGAGGAGGTTGACTTT;iNOS 正向引物:ACTACTAAATCTCTCTCCTCTCC,反向引物:TCTCTGCTCTCAGCTCCAA;COX-2 正向引物:GCGA-CATACTCAAGCAGGAGCA,反向引物:AGTG GTA-ACCGCTCAGGTGTTG。溶解扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 持续 3 min 预变性;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s,扩增 40 个循环;再于 95 $^{\circ}\text{C}$ 持续 10 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 持续 15 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 持续 10 s。

2.7 Western blot 检测炎症相关蛋白的表达

实验设置对照组、模型组和 FKE 低、中、高剂量组(40、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每组 3 皿细胞。将对数生长期的 RAW 264.7 细胞消化后在细胞培养箱中贴壁过夜。按上述分组加入含药完全培养液(含 0.1% FBS,1% 双抗 DMEM),孵育 2 h 后,除对照组外,其他组均加入 LPS 使其终浓度为 100 ng/mL ,孵育 30 min 后收集蛋白检测 I κ B α ^[6];孵育 18 h 后收集蛋白检测 iNOS^[6]。孵育完成后,移除上清,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗 3 遍后将培养皿置于冰上,向每皿细胞中加含 1% 磷酸酶混合抑制剂和含 1% PSMF 的 RIPA 强裂解液(现配)150 μL ,冰上裂解 30 min,细胞刮刀充分刮取细胞并收集后离心(9 000 $\times g$,10 min),取上清;BCA 法蛋白定量后,取等量蛋白加上样缓冲液在 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 6 min,电泳(10%分离胶用于 I κ B α ,8% 分离胶用于 iNOS);应用三明治法转膜;5% 脱脂牛奶摇床轻微摇动,室温封闭 1 h,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜(轻摇);洗膜后,二抗室温封闭 1 h(轻摇);再次洗膜加入显影液曝光显影。

2.8 激光共聚焦技术检测 NF- κ B p65 核转位

采用激光共聚焦技术检测 NF- κ B p65 的核转位情况^[7],实验设置正常组、模型组和 FKE 组(160 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每组设置 3 个复孔。将对数生长期的 RAW 264.7 细胞以 1×10^5 个/孔种于 24 孔板爬片上过夜贴壁,按实验分组给药孵育 2 h 后加入 LPS(使终浓度为 100 ng/mL),刺激 20 min 后,取出爬片用预冷的 PBS 浸洗(5 min/次,3 次);用 4% 多聚甲醛固定爬片 15 min,PBS 浸洗;加入 0.1% Triton-100 室温透膜 20 min;PBS 浸洗爬片,加入 5% BSA(TBST 配置)室温封闭 1 h;加入稀释的抗 p65 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST 浸洗爬片后加入 FITC 标记的荧光二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h;TBST 浸洗爬片后,加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI

(PBS 配置)避光孵育 5 min 染核;TBST 浸洗(5 min/次,4 次);取出爬片,用含抗荧光淬灭剂封片液封片后在共聚焦显微镜下观察(采用 488 nm 波长的激光激发荧光二抗上标记的 FITC,采用 358 nm 波长的激光激发染核的 DAPI 染料)^[8]。

2.9 转染条件的优化

在 96 孔板中种上 RAW 264.7 细胞,每孔细胞液为 100 μ L,贴壁融合至 60%左右,去除细胞上清,加入 100 μ L 含 1% FBS 且不含抗生素的 DMEM 培养基;设置转染试剂(μ L):转染内参质粒 pRL-SV40 (ng) 配比分别为 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1,用 DMEM(无血清无双抗)配好质粒终浓度 10 ng/mL 后室温静置 20 min;通过控制加入体积(5、8、11、14、17 μ L) 分别向每孔中加入 50、80、110、140、170 ng 质粒量的转染复合物;置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 24 h 后,弃去细胞上清,PBS 清洗后,于多功能酶标仪中进行荧光值测定。

2.10 双荧光素酶报告基因评价 NF- κ B 激活抑制作用

在 RAW 264.7 细胞中,转染条件优化后,对细胞进行 NF- κ B RE 质粒以及 pRL-SV40 海肾荧光素酶报告基因质粒共转染。实验设置正常组、模型组和 FKE 低、中、高组(100、200、400 μ g/mL)给药,每组

设置 3 个重复。将 RAW 264.7 细胞接种在 96 孔板中,每孔细胞液为 100 μ L,贴壁融合至 60%左右,去除细胞上清,加入 100 μ L 不含抗生素的 DMEM 培养基(含 1% FBS)。

共转染 NF- κ B RE 萤火虫荧光素酶质粒以及 pRL-SV40 内参海肾荧光素酶质粒(比例为 50:1)于 RAW 264.7 细胞,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 24 h。给药后将细胞置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 1.5 h 后,除正常组外,其他各组均加入 LPS 使其终浓度为 100 ng/mL,置于细胞培养箱中再培养 6 h^[9]。取出细胞,弃去上清,PBS 清洗后,用 Promega 双荧光报告基因检测试剂盒在多功能酶标仪中检测荧光强度。

3 结果

3.1 FKE 对 RAW 264.7 细胞活性影响

采用 MTT 法初步筛查 FKE 对 RAW 264.7 细胞的细胞毒性,如图 1a 所示,用 50~800 μ g/mL FKE 处理后,与对照组相比,细胞活性未被抑制($P>0.05$),说明在此浓度范围内,药物无细胞毒性;图 1b 表明,FKE 叠加 LPS 使用时在 100~400 μ g/mL 剂量下均未出现细胞毒性($P>0.05$)。故后续抗炎活性实验可在 400 μ g/mL 浓度下进行。

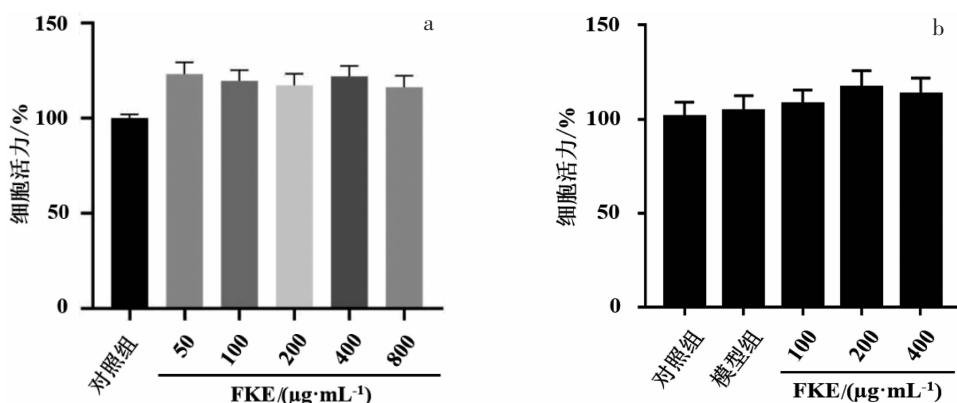
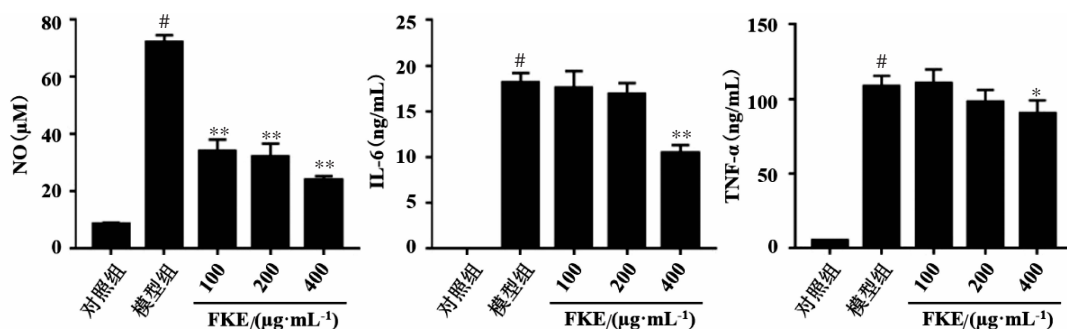


图 1 FKE 对 RAW264.7 细胞活力的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)



注:与对照组相比,# $P<0.01$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 2 FKE 对 NO、IL-6 和 TNF- α 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

3.2 FKE 对 LPS 刺激后细胞炎症因子释放的影响

采用 ELISA 的方法对药物的抗炎活性进行初步检测,如图 2,结果表明:在 100 ng/mL LPS 刺激后,NO、IL-6 和 TNF- α 的胞外释放均显著增加,与模型组相比,FKE 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 能明显降低 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞产生的 NO 的含量($P<0.01$),在高剂量 400 $\mu\text{g/mL}$ 时,FKE 呈现出对 IL-6 和 TNF- α 的抑制作用($P<0.05$)。

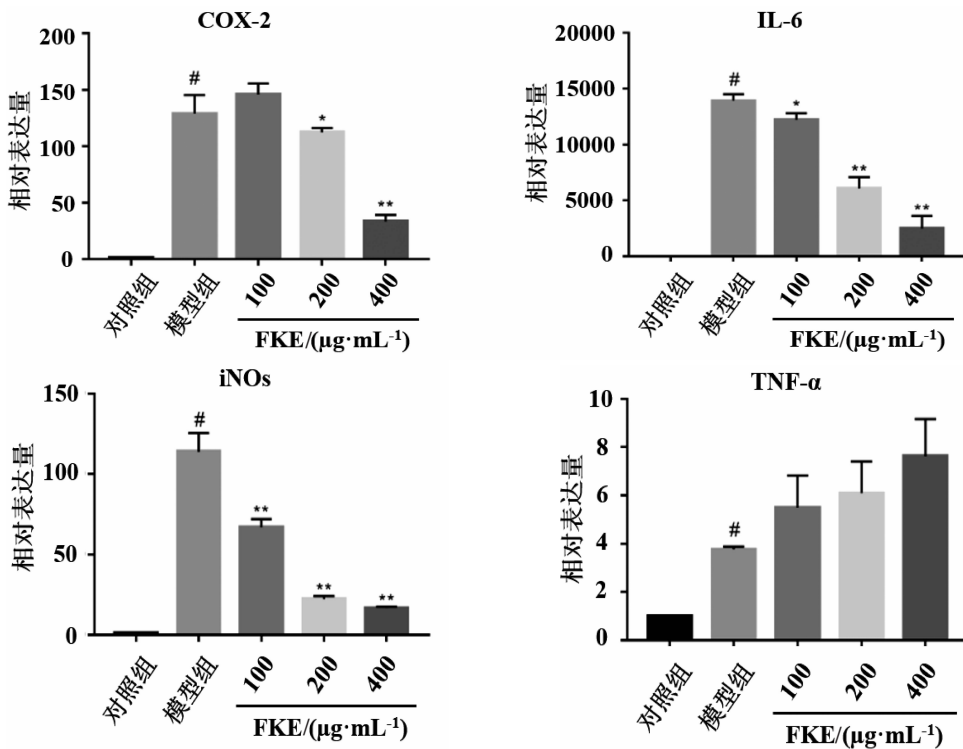
3.3 FKE 对炎症相关蛋白转录水平的影响

为了验证 FKE 在 RAW 264.7 细胞系中的体外抗炎效果,RT-PCR 用于检测 FKE 对炎症相关蛋白 COX-2、IL-6、iNOS、TNF- α 转录水平的影响。实验结果如图 3。实验结果表明:在 RAW 264.7 细胞中,

FKE 能有效降低由 LPS 刺激引起的炎症相关因子及蛋白(COX-2、IL-6、iNOS)的高表达($P<0.05$, $P<0.01$),且呈现出良好的剂量关系;同时,我们观察到,FKE 反而升高了 TNF- α 的转录水平,其具体原因有待进一步研究。

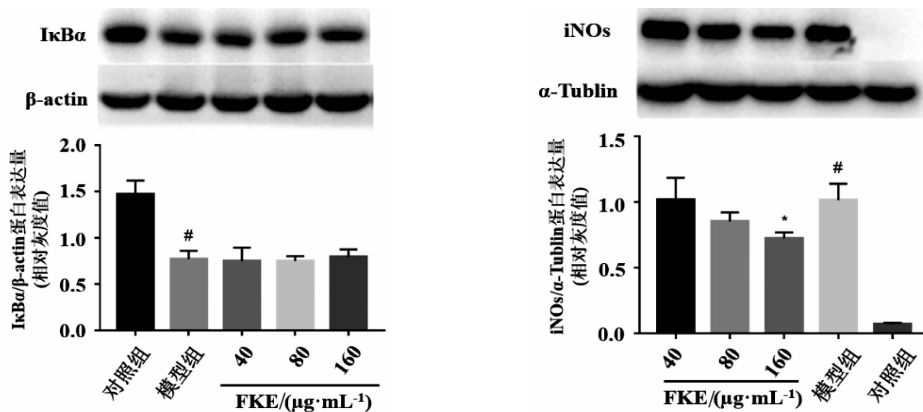
3.4 Western blot 法检测 FKE 对炎症相关蛋白的影响

从实验结果中(图 4)得知,仅给予 LPS 刺激后,I κ B α 的含量显著降低($P<0.01$),说明模型成功,但 FKE 的作用不明显($P>0.05$);对照组中,无 LPS 刺激下,细胞内几乎不表达 iNOS,而在 LPS 刺激后,细胞内 iNOS 的表达显著升高($P<0.01$),说明模型成功。



注:与对照组相比,# $P<0.01$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 3 RT-PCR 检测 FKE 对炎症相关蛋白转录水平的影响($\bar{x}\pm s,n=3$)



注:与对照组相比,# $P<0.01$;与模型组相比,* $P<0.05$

图 4 FKE 对 LPS 刺激后 RAW264.7 细胞 I κ B α 、iNOS 蛋白的影响($\bar{x}\pm s,n=3$)

与模型组相比, FKE 组对 iNOS 具有一定的抑制作用($P<0.05$)。

3.5 激光共聚焦检测 FKE 对 NF- κ B p65 转核的影响

采用激光共聚焦显微镜观察给药后 p65 的转核情况, 由图 5 可知, 对照组在无 LPS 刺激下, p65 主要分布于细胞质中, 而与对照组比较, LPS 刺激组可观察到明显的 p65 转核。FKE 组中 p65 有大部分分布在细胞质中, 说明 FKE 部分抑制了 p65 的转核。

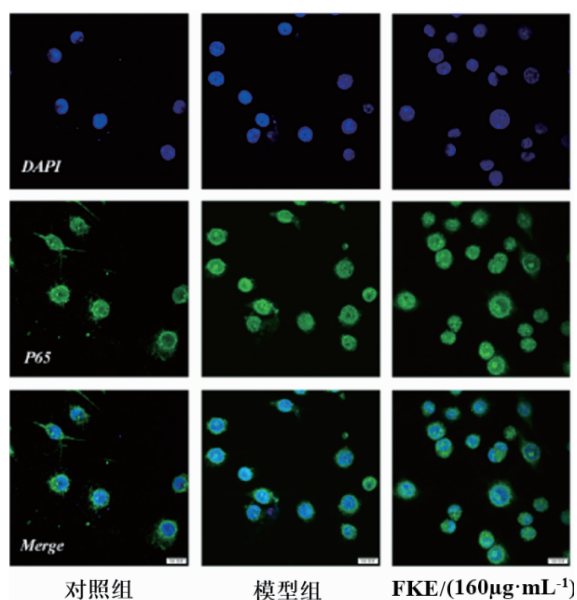
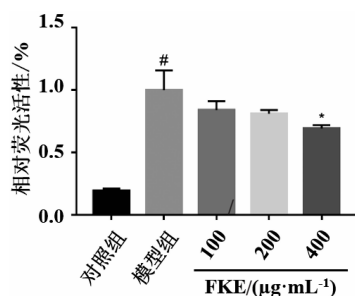


图 5 FKE 对 NF- κ B p65 转核的影响($\times 400$)

3.6 FKE 对 NF- κ B 的激活抑制作用

图 6 中 NF- κ B 激活程度由萤火虫荧光素酶数值与海肾荧光素酶数值比值表示。在 LPS 刺激后, 模型组相对对照组 NF- κ B 显著激活($P<0.01$); FKE 组 NF- κ B 激活被抑制, 当给药浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, NF- κ B 激活被抑制的程度与模型组有明显差异($P<0.05$)。



注: 与对照组相比, # $P<0.01$; 与模型组相比, * $P<0.05$

图 6 双荧光素酶报告系统检测 FKE 对 NF- κ B 激活抑制作用($\bar{x}\pm s, n=3$)

4 讨论

在正常生理或异常病理过程中, “炎性机制”对盆腔炎等妇科疾病均起了重要作用。研究发现, 女性生殖系统在排卵、受精着床、月经等过程中, 存在白细胞浸润并释放 PGE2、IL-6、炎症趋化因子等多种细胞因子, 以达到修复和重塑卵巢表面上皮、维持胎儿的发育以及促进子宫内膜的脱落、重塑及增殖等作用^[10]。然而, 当生殖系统受到支原体、衣原体或者细菌的感染时, 生殖道或周围组织上皮细胞首先成为靶向感染目标, 其通过分泌炎症趋化因子诱导机体天然免疫应答以抵抗感染, 而这种保护方式同时也诱导了炎症的发生^[11]。持续性炎性因子的释放和炎症相关细胞的激活损伤卵巢、输卵管和子宫等生殖系统上皮表面, 从而导致周围形成组织粘连、结缔组织增生、瘢痕形成以及盆腔充血和积液, 进而促进盆腔炎的形成和发展^[12]。本实验采用 LPS 作为诱发因素刺激 RAW 264.7 细胞, 检测 FKE 对细胞炎症因子释放的影响, 结果表明, FKE 能显著降低 LPS 诱导的 COX-2、TNF- α 、IL-6、NO 的释放, 说明 FKE 不仅能调节细胞的免疫功能, 而且可以抑制炎性因子的浸润, 进而达到保护生殖系统损伤等作用。

以往研究表明, 盆腔炎等妇科疾病中子宫内膜细胞炎症相关因子的表达受 NF- κ B 通路的调控, NF- κ B 通路的激活是下游促炎因子过量释放的重要原因^[13]。NF- κ B 是调节细胞基因转录的关键因子之一, 活化后的 NF- κ B 可直接启动和调节众多参与炎症反应、免疫反应相关基因的转录, 调控大量细胞因子、黏附分子的表达。同时, NF- κ B 又能够被这些细胞因子进一步活化, 这样在它们之间构成了正负反馈通路并形成相互调节的作用力, 从而诱使炎症反应进一步发展导致组织损伤^[14]。其中, NF- κ B 的激活需要两个重要活性因子, 即 I κ B α 和 p65。当细菌等感染源侵袭子宫内膜时, 上皮细胞和间质细胞等内膜细胞首先受到侵袭, 细菌等通过 LPS 作用于内膜细胞膜上的 MD2 蛋白和膜受体 TLR4, 形成 LPS-MD2/TLR4 复合体, 激发髓性分化蛋白 88(MyD88)依赖的信号传递, 激活 NF- κ B。活化的 NF- κ B 与 I κ B α 解离后转位入核与 COX-2 等靶基因上的 AP-1 (Activator protein 1, AP-1) 位点结合, 导致 TNF- α 、

IL-6 等炎症细胞因子的大量生成,启动炎症应激级联事件^[15]。在本研究中,FKE 虽然对 LPS 刺激后 IκBα 蛋白水平无影响,但 FKE 可显著抑制 NF-κB p65 亚基的核转位,说明 FKE 可抑制 NF-κB 激活,下调 NF-κB 介导的下游因子转录来抑制 iNOS 表达和 NO 产生,进而发挥抗炎作用。若抑制 NF-κB 通路的活化,能有效阻断 COX-2/PGE2 与 IL-6、IL-8 等炎症因子间的分子信号传递,阻止炎症反应的级联扩大及其对生殖系统的损伤,抑制 PID 以及后遗症的进一步发展,与文献报道的结果一致^[16]。

妇科千金胶囊作为市场上应用最广泛的妇科用药之一,具有广泛的应用前景和社会效益,本研究结果为深入探讨妇科千金胶囊的抗炎机制提供了新的理论基础和实验依据。

参考文献

- [1] 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,2015:902.
- [2] 袁兴辉,尹 胜,刘向东.妇科千金片临床研究总结[J].医学信息(中旬刊),2011,24(7):3249-3250.
- [3] 张凯强,闫庆梓,杨 超,等.妇科千金胶囊挥发油抗炎作用研究[J].中药新药与临床药理,2018,29(4):415-420.
- [4] HAN Y K, KIM Y S, NATARAJAN S B, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of chaenomeles sinensis leaf extracts on LPS-stimulated RAW 264.7 cells[J]. Molecules, 2016, 21(4): 422.
- [5] TEWTRAKUL S, WATTANAPIROMSAKUL C, MAHABUSARAKAM W. Effects of compounds from Garcinia mangostana on inflammatory mediators in RAW 264.7 macrophage cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 121(3): 379-382.
- [6] RHULE A, NAVARRO S, SMITH J R, et al. Panax notoginseng attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators in RAW 264.7 cells[J]. Journal of ethnopharmacology, 2006, 106(1): 121-128.
- [7] KIM K N, HEO S J, YOON W J, et al. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF-κB and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages[J]. European Journal of Pharmacology, 2010, 649 (1-3): 369-375.
- [8] CUNHA M G D, FRANCHIN M, PAULA-EDUARDO L F D, et al. Anti-inflammatory and anti-biofilm properties of ent-nemorosone from Brazilian geopropolis[J]. Journal of Functional Foods, 2016 (26): 27-35.
- [9] JI-YEON KIM A B, SEUNG JAE PARK A B, KYUNG-JIN YUN A B, et al. Isoliquiritigenin isolated from the roots of Glycyrrhiza uralensis inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF-κB in RAW 264.7 macrophages[J]. European journal of pharmacology, 2008, 584(1): 75-184.
- [10] JABBOUR H N, SALES K J, CATALANO R D, et al. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease[J]. Reproduction, 2009, 138(6): 903-919.
- [11] KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors[J]. Nature immunology, 2010, 11(5): 373-384.
- [12] SHELDON I M, CRONIN J G, HEALEY G D, et al. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease[J]. Reproduction, 2014, 148(3): R41-R51.
- [13] ZHONG Z, UMEMURA A, SANCHEZ-LOPEZ E, et al. NF-κB restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria[J]. Cell, 2016, 164(5): 896-910.
- [14] AFONINA I S, ZHONG Z, KARIN M, et al. Limiting inflammation—the negative regulation of NF-κB and the NLRP3 inflammasome[J]. Nature immunology, 2017, 18(8): 861-869.
- [15] CRONIN J G, TURNER M L, GOETZE L, et al. Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium[J]. Biology of reproduction, 2012, 86(2): 51-59.
- [16] WU B, CHEN X, HE B, et al. ROS Are critical for endometrial breakdown via NF-κB-COX-2 signaling in a female mouse menstrual-like model[J]. Endocrinology, 2014, 155(9): 3638-3648.

(本文编辑 苏 维)