

陈海兰,蒙西南,赵尉丹,等. 鸡血藤总黄酮乙酸乙酯部位对大肠杆菌脂多糖(LPS)刺激 RAW264.7 免疫细胞氧化应激的调节作用[J]. 江苏农业科学,2017,45(8):154-156,162.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.043

鸡血藤总黄酮乙酸乙酯部位对大肠杆菌脂多糖(LPS)刺激 RAW264.7 免疫细胞氧化应激的调节作用

陈海兰,蒙西南,赵尉丹,付远妨,韦雅妮,胡庭俊

(广西大学动物科学技术学院,广西南宁 530005)

摘要:通过观察鸡血藤总黄酮乙酸乙酯部位(FEA)预处理和后处理对大肠杆菌脂多糖(LPS)刺激 RAW264.7 细胞所致氧化应激的影响,探讨其抗应激活性。试验将细胞分为空白对照组、LPS 刺激组、LPS + 阳性药物组(维生素 C)、LPS + 不同浓度 FEA 组(25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$)。试验 1 的细胞先用药物预处理 12 h,再用 LPS 进行刺激;试验 2 则先用 LPS 刺激 2 h 后,再用药物进行处理。分别采用 Griess 法和荧光探针法检测 NO 分泌和活性氧(ROS)水平。结果发现,FEA 预处理和后处理均能显著抑制 LPS 刺激引起的 NO 和 ROS 水平的升高($P < 0.05$),且后处理效果更明显。因此,FEA 具有良好的抗氧化应激活性,且作为治疗药物比作为预防药物效果更佳。

关键词:鸡血藤总黄酮;乙酸乙酯部位;脂多糖;氧化应激;免疫细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)08-0154-03

近年来,我国规模化养殖迅猛发展,在给畜牧养殖业带来革命性变化的同时,畜禽应激综合征的问题也开始显现。饲养管理、环境变化、饲料营养、免疫治疗和运输等都会使动物产生应激,引起氧化损伤^[1]。大量研究表明,氧化应激可导致动物采食量下降、生长发育和抗病力降低、死亡率增高,并显著降低畜产品品质^[1]。因此,如何预防或降低规模化养殖中畜禽的应激反应具有重要意义。

鸡血藤为豆科植物密花豆(*Spatholobus suberectus* Dunn)的干燥藤茎,分布于广西、云南、广东、贵州、福建等地区,主产于广西,以广西产者为地道药材^[2]。黄酮类化合物是鸡血藤的主要活性成分,主要包括异黄酮类、异黄烷类、二氢黄酮类、花青素类、查尔酮类等^[3-4]。鸡血藤总黄酮可依次采用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、乙醚等有机溶剂进行萃取分离,研究发现乙酸乙酯萃取物中黄酮化合物的含量最高^[5]。鸡血藤具有活血补血、调经止痛、抗炎、抗氧化、免疫调节、抗病毒、抗肿瘤等多种药理活性^[6-9]。现代药理学研究发现,鸡血藤总黄酮具有很强的自由基清除作用,可有效抑制 Fenton 体系诱导的大鼠心、肝、肾丙二醛(MDA)生成,抑制 H_2O_2 诱发的大鼠红细胞氧化溶血,通过清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及 H_2O_2 发挥抗氧化作用。鸡血藤黄酮的强抗氧能力,使它在消除氧化应激、增强机体免疫力、提高抗病能力方面有很大的应用潜能。然而,目前国内外对鸡血藤黄酮抗氧化能力的研究多集中在鸡血藤的

提取物上,并以体外清除自由基能力检测为主,而对鸡血藤进一步纯化产物及在细胞水平上的研究还比较少。

本试验采用乙醇提取法从广西产鸡血藤中得到鸡血藤总黄酮,通过有机溶剂萃取法对其进行初步分离,经浓缩干燥后得到鸡血藤总黄酮乙酸乙酯部位(FEA),然后对 FEA 的细胞毒性及其预处理、后处理对大肠杆菌脂多糖(LPS)刺激 RAW264.7 细胞所致氧化应激的影响,探讨其细胞安全性及抗应激活性,为鸡血藤的进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验细胞 小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 细胞,购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。

1.1.2 药品与试剂 鸡血藤饮片,购自南宁市中尧路中药材市场,产地为广西崇左市,经广西大学动物科学技术学院药理实验室鉴定为鸡血藤正品。药材饮片经粉碎成中细粉后(过 4 号筛),采用乙醇提取法,以 50% 乙醇溶液为溶剂,在 1 g : 30 mL 料液比和 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下提取 3 h。提取液经过滤、浓缩、初步纯化后,依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,并对乙酸乙酯萃取液通过旋转蒸发去除有机溶剂得到棕黄色粉末,即为鸡血藤黄酮乙酸乙酯部位(FEA)。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、维生素 C(VC)、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)、大肠杆菌脂多糖(LPS)、亚硝酸钠(NaNO_2)、萘乙二胺和对氨基苯磺酸,均购自美国 Sigma 公司,胎牛血清(FBS)、DMEM 培养液、青链霉素(PS),均购自 Gibco 公司。

1.2 试验内容与方法

1.2.1 FEA 的细胞毒性研究 将对数生长期的 RAW264.7 细胞以 1×10^5 个/mL 的浓度接种于 96 孔板中,100 μL /孔。

收稿日期:2016-07-03

基金项目:广西自然科学基金(编号:2014GXNSFC118019);广西教育厅科研项目(编号:KY2015ZD007);国家级大学生创新创业训练计划(编号:201610593081)。

作者简介:陈海兰(1984—),女,广西玉林人,博士,讲师,研究方向为兽医药理学。E-mail:hlchen319@163.com。

通信作者:胡庭俊,博士,研究员,研究方向为兽医药理学。E-mail:tingjunhu@126.com。

37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养过夜后,弃去上清液,每孔加入 90 μL 新鲜培养液和 10 μL 不同浓度的 FEA 溶液,使其终浓度为 50、100、200、400、800 μg/mL。同时设对照组,加入 90 μL 新鲜培养液和 10 μL 磷酸缓冲盐溶液(PBS)。每个处理设 4 个重复。继续培养 72 h 后,弃去含药培养液,每孔加入 90 μL 新鲜培养液和 10 mL MTT 储存液(5 mg/mL),37 ℃ 孵育 4 h 后,每孔加入 100 μL MTT 结晶溶解液[10% 十二烷基硫酸钠(SDS),10 mmol/L HCl],37 ℃ 孵育过夜,使紫色结晶充分溶解,用多功能酶标仪检测 $D_{595\text{ nm}}$,并根据以下公式计算细胞相对活性:

$$\text{细胞相对活性} = \frac{D_{\text{试验}} - D_{\text{空白}}}{D_{\text{对照}} - D_{\text{空白}}} \times 100\%$$

1.2.2 FEA 预处理对 LPS 刺激免疫细胞氧化应激的作用
取对数生长期的 RAW264.7 细胞,以 1×10^5 个/mL 的浓度接种于 96 孔板中,100 μL/孔,并分为对照组、LPS 组、VC₁₀₀ 组、FEA₂₅ 组、FEA₅₀ 组、FEA₁₀₀ 组和 FEA₂₀₀ 组,每个处理组设 4 个重复。37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养过夜后,弃去上清液,对照组每孔加入 90 μL 新鲜培养液和 10 μL PBS,VC₁₀₀ 组每孔加入 90 μL 新鲜培养液和 10 μL 1 000 μg/mL VC 溶液,FEA₂₅ ~ FEA₂₀₀ 组每孔分别加入 100 μL 终浓度为 25、50、100、200 μg/mL 的 FEA 溶液。药物处理 12 h 后,弃去上清液,除对照组外,每孔加入终浓度为 1 μg/mL LPS 溶液。刺激 2 h 后,弃去含 LPS 培养液,换新鲜培养液(100 μL/孔)继续培养 4 h 后,检测上清液中 NO 浓度及细胞中活性氧(reactive oxygen, 简称 ROS)水平。

1.2.3 FEA 后处理对 LPS 刺激免疫细胞氧化应激的作用
取对数生长期的 RAW264.7 细胞,以 1×10^5 个/mL 的浓度接种于 96 孔板中,100 μL/孔,分组方式同“1.2.2”节。37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养过夜后,弃去上清液,除对照组外,每孔加入终浓度为 1 μg/mL 的 LPS 溶液。刺激 2 h 后,弃去上清液,对照组每孔加入 90 μL 新鲜培养液和 10 μL PBS,VC₁₀₀ 组每孔加入 90 μL 新鲜培养液和 10 μL 1 000 μg/mL VC 溶液,FEA₂₅ ~ FEA₂₀₀ 组每孔分别加入 100 μL 终浓度为 25、50、100、200 μg/mL 的 FEA 溶液。继续培养 8 h 后,检测上清液中 NO 浓度及细胞中 ROS 水平。

1.2.4 NO 浓度的检测 称取 6.9 mg NaNO₂ 加入 100 mL 超纯水中溶解,配成 1 mmol/L 的储存液。用 NaNO₂ 储存液配制浓度为 100、80、60、40、20、0 μmol/L 的标准稀释液,各取 100 μL,加入 100 μL Griess 试剂(等体积混合的 0.1% 萘乙二胺和 1% 对氨基苯磺酸),振荡,室温避光反应 10 min,于多功能酶标仪上检测 $D_{550\text{ nm}}$,并以 NaNO₂ 浓度为横坐标、吸光度为纵坐标制作标准曲线。

取 100 μL 细胞上清液,加入 100 μL Griess 试剂测定 $D_{550\text{ nm}}$ 作对照,并根据 NaNO₂ 标准曲线计算 NO 浓度。

1.2.5 ROS 水平的检测 弃去培养液,用 PBS 洗涤细胞 3 次,每孔加入 50 μL 10 μmol/L 的 DCFH-DA 荧光探针,37 ℃、5% CO₂ 孵育 30 min,每 10 min 轻轻摇匀 1 次。孵育结束后,弃上清液,用 PBS 洗涤 3 次,于多功能酶标仪激发波长 488、525 nm 处检测荧光强度。

1.3 数据分析

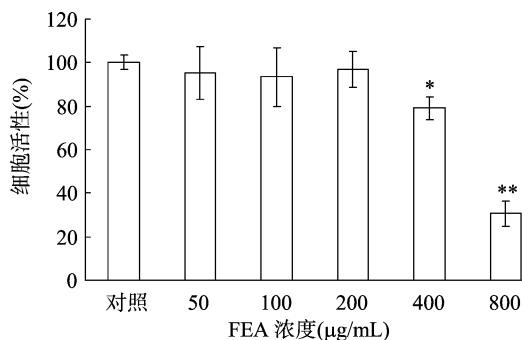
试验数据采用 SPSS 21.0 进行分析,采用单因素方差分

析(One-Way ANOVA)方法,进行 LSD 组间比较,结果以“平均值 ± 标准差”的形式表示。

2 结果与分析

2.1 细胞毒性作用研究

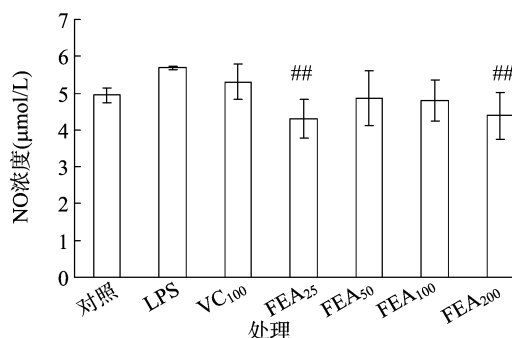
用不同浓度的 FEA 处理 RAW264.7 细胞后,利用 MTT 法检测细胞活性以分析 FEA 的细胞毒性作用。由图 1 可见,当 FEA 浓度 ≤ 200 μg/mL 时,细胞存活率均接近对照组;随着 FEA 浓度的增大,细胞活性逐渐下降,当 FEA 浓度 ≥ 400 μg/mL 时,细胞活性显著或极显著低于对照组。因此,FEA 的安全浓度范围为 0 ~ 200 μg/mL,在此范围内对 RAW264.7 细胞的生长无不良影响。



“*”表示与对照组相比差异显著($P < 0.05$), “**”表示与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。下图同
图1 FEA 对 RAW264.7 细胞的活性影响

2.2 FEA 预处理对 LPS 刺激免疫细胞氧化应激的作用

为了探讨 FEA 对氧化应激的预防作用,RAW264.7 细胞先用系列浓度的 FEA 处理 12 h,然后用 LPS 刺激诱导氧化应激的产生,再对 NO 分泌水平和 ROS 水平进行分析。由图 2 可知,LPS 刺激 4 h 后,NO 分泌水平有所升高,但是与对照组相比差异不显著;与模型组(LPS)比较,FEA 预处理可以降低 NO 分泌水平,且在 25、200 μg/mL 时,差异极显著($P < 0.01$)。从图 3 可以看出,LPS 刺激后,RAW264.7 细胞内的 ROS 水平显著升高($P < 0.05$),而 FEA 预处理则可以显著降低 ROS 水平,在 FEA 浓度为 100 μg/mL 时差异极显著($P < 0.01$)。这些结果表明,FEA 预处理对于预防 LPS 诱导的氧化应激具有一定的保护作用。



“#”表示与模型组(LPS)相比差异显著($P < 0.05$), “##”表示与模型组相比差异极显著($P < 0.01$)。下图同
图2 FEA 预处理对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 NO 分泌水平的影响

2.3 FEA 对 LPS 刺激免疫细胞氧化应激的作用

进一步研究 FEA 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞氧化应激

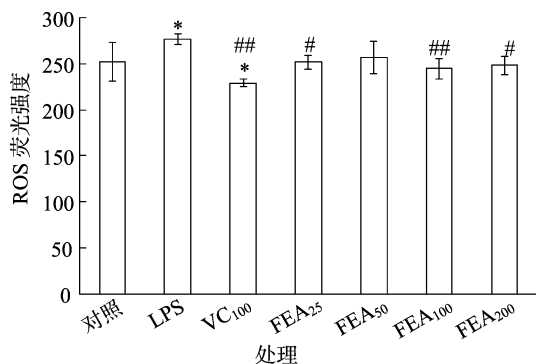


图3 FEA 预处理对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 ROS 水平的影响

的治疗作用。与预防试验不同的是,本试验先用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞建立氧化应激模型,然后用不同浓度的 FEA 处理细胞,通过检测 NO、ROS 水平的变化,分析其抗氧化应激作用。由图 4、图 5 可知,LPS 刺激 RAW264.7 细胞后,NO、ROS 水平均极显著升高 ($P < 0.01$),表明免疫细胞氧化应激模型已成功建立。相比于模型组,经 VC 或 25 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 FEA 处理后,NO 水平均极显著下降 ($P < 0.01$),且较高浓度的 FEA (50 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$) 可同时显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 下调 ROS 水平。因此,FEA 后处理对于 LPS 诱导产生的氧化应激具有良好的抑制作用,效果与对照药物 VC 相当。

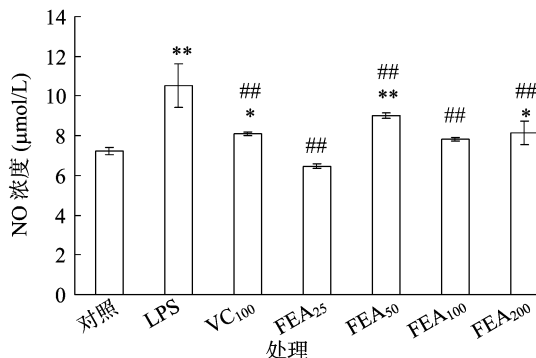


图4 FEA 后处理对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 NO 水平的影响

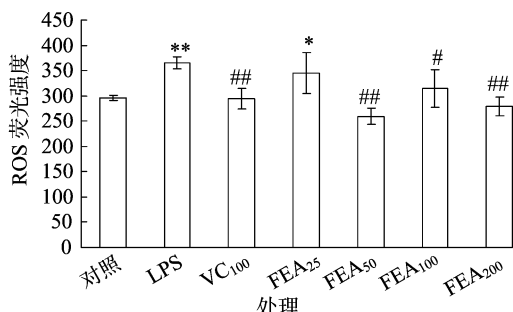


图5 FEA 后处理对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 ROS 水平的影响

3 讨论与结论

氧化应激是指机体遭受各种有害刺激时,机体内的活泼分子如活性氧自由基 (reactive oxygen free radicals) 产生并堆积,超过了动物机体对过氧化物的清除能力,致使机体的氧化

系统和抗氧化系统失衡^[10]。活性氧是含有氧分子的自由基,包括超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、过氧化氢 (H_2O_2)、次氯酸离子 (OCl^-) 和一氧化氮 (NO)。ROS 含有的不成对电子使其具有很强的反应活性,极易攻击 DNA、脂质、蛋白质等生物分子,造成机体组织的氧化损伤,加速机体的衰老,引发炎症,导致各种慢性疾病的发生^[11-12]。当机体受到刺激时,细胞内成分转移至细胞膜的内表面,形成具有 NADPH 氧化酶活性的完全活性酶复合物,进而催化 ROS 的生成^[13]。脂多糖是介导系统性炎症反应综合征的主要启动因子,它可激活单核细胞和巨噬细胞,引起 NO 和炎性细胞因子的合成与释放,进而导致机体一系列炎症反应的发生和发展^[14-15]。

本试验中,首先通过 MTT 法研究了 FEA 的细胞毒性作用,发现其细胞毒性较低,在 $\leq 200 \mu\text{g/mL}$ 范围内对 RAW264.7 细胞的生长无明显不良影响。然后,通过预防试验和治疗试验探讨了 FEA 的抗氧化应激活性。研究发现,LPS 刺激 RAW264.7 细胞后,NO、ROS 水平明显上升,提示氧化应激的发生。FEA 预处理和后处理,基本能不同程度抑制 LPS 刺激引起的 NO 和 ROS 产生,表明 FEA 能够改善 RAW264.7 细胞氧化应激损伤,与黄酮类化合物较强的自由基清除能力和抗氧化能力相关,并与黄酮类化合物可通过抑制炎症因子 (NO、TNF- α 等) 的释放降低细胞氧化损伤的报道^[16-17] 相一致。另外,相比于药物预处理 (预防试验),先造成氧化应激再用药物处理 (治疗试验),FEA 的作用更加明显。治疗试验中,NO、ROS 水平均显著或极显著低于 LPS 刺激组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明在抗应激反应中,FEA 更适宜作为治疗药物使用。

综上所述,本试验先通过 MTT 法检测了 FEA 的细胞毒性,然后通过分析 FEA 预处理或后处理对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 NO、ROS 分泌水平的影响,探讨了其抗氧化应激作用。试验观察到 FEA 在 0 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度内对 RAW264.7 细胞的生长无明显不良影响,能显著或极显著抑制 LPS 诱导的氧化应激反应,且后处理比预处理细胞对 LPS 诱导应激反应的抑制作用更明显,表明 FEA 更适合作为治疗药物用于抵抗氧化应激反应。

参考文献:

- [1] 徐建雄. 关注氧化应激提高动物健康水平[J]. 饲料与畜牧, 2012(8): 1.
- [2] 王强,徐国钧. 地道药材图典: 中南卷[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2003: 102-103.
- [3] 符影,程悦,陈建萍,等. 鸡血藤化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2011, 42(6): 1229-1234.
- [4] 刘湘,汪秋安. 天然产物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 65-75.
- [5] 张夏辉. 鸡血藤中黄酮类化合物提取及抗氧化性的研究[D]. 柳州: 广西科技大学, 2013.
- [6] 邓家刚,梁宁,周程艳. 鸡血藤药效及作用机理研究进展[J]. 广西中医药, 2006, 29(6): 311-313.
- [7] Li R W, David L G, Myers S P, et al. Anti-inflammatory activity of Chinese medicinal vine plants[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 85(1): 61-67.

融+酸沉降复合胁迫条件下,幼苗体内 POD 活性随温度降低而升高,在 -2°C 时,升到最高值,为 6.96 U/mg ;在温度升到 10°C 时,POD 活性下降,为 5.49 U/mg (图 5)。以上分析表明,冻融+酸沉降复合胁迫能使黑麦草幼苗体内的 POD 活性含量增加。

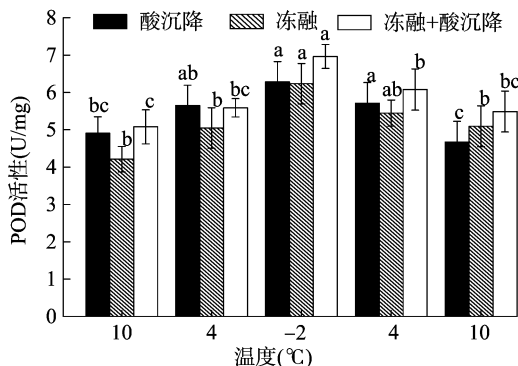


图5 冻融及酸沉降胁迫对黑麦草幼苗体内 POD活性的影响

3 结论

变温胁迫可使黑麦草积累渗透调节物质,增加了其可溶性蛋白、可溶性糖、MDA 含量,SOD 和 POD 活性也明显提升。在酸沉降胁迫下,黑麦草幼苗体内可溶性蛋白、可溶性糖、MDA 含量呈下降趋势,SOD 和 POD 活性提高。结果表明,黑麦草自身具有较强的抗寒性,在低温胁迫下可以起到自我保护的作用,同时黑麦草也具有一定的抗酸性,对逆境的适应能力强。

参考文献:

- [1] 李国辉,李志坚,胡跃高. 青刈黑麦产草量与营养动态分析[J]. 草地学报,2000,8(1):49-54.
- [2] 多立安,赵树兰. 刈割冬牧 70 黑麦地上生物量动态与草群再生效应的研究[J]. 植物研究,2001,21(2):304-307.
- [3] Dax M, Yin W X, Zhao Y X, et al. The production and scavenging of reactive oxygen species in plants[J]. Chin J Biology, 2001, 17(2): 121-125.
- [4] 杜子银,蔡延江,王小丹,等. 土壤冻融作用对植物生理生态影响研究进展[J]. 中国生态农业学报,2014,22(1):1-9.
- [5] 黄婷,邵辉,吴坤胜,等. 模拟酸雨对黑麦草种子萌发及生理特性的影响[J]. 种子,2011,30(4):8-11.
- [6] 黄辉,黄朝法. 酸雨对植物生理生态特性的影响研究进展[J]. 林业勘察设计,2008(1):46-49.
- [7] 李铁冰,杨顺强,任广鑫,等. 低温处理下不同禾本科牧草的生理变化及其抗寒性比较[J]. 生态学报,2009,29(3):1341-1347.
- [8] 黄开志. 模拟酸雨对蔬菜细胞透性和营养及卫生品质的影响[J]. 生物学通报,2000,35(2):34.
- [9] 童贯和,梁惠玲. 模拟酸雨及其酸化土壤对小麦幼苗体内可溶性糖和含氮量的影响[J]. 应用生态学报,2005,16(8):1487-1492.
- [10] 孙亚琴,尚鹤,邓仕槐,等. 模拟酸雨胁迫对夹竹桃 MDA 和 MP 的影响[C]//四川省环境科学学会. 四川省水污染控制工程学术交流论文集. 成都,2009:176-181.
- [11] 宋采博,王波. 不同温度对白三叶种子发芽及幼苗生长的影响[J]. 湖北农业科学,2009,48(11):2772-2774.
- [12] 王强,金则新,彭礼琼. 模拟酸雨对乌药幼苗生理生态特性的影响[J]. 浙江大学学报(理学版),2013,40(4):447-455.
- [13] 吕家根,占达东,王周平,等. 酸雨胁迫下小麦微弱延迟发光及其生理生态变化相关性研究[J]. 化学学报,2003,61(5):760-764.
- [14] 王晨光,王希,苍晶,等. 低温胁迫对水稻幼苗抗冷性的影响[J]. 东北农业大学学报,2004,35(2):205-207.
- [15] 王涛,张珊珊,谢寅峰,等. 模拟酸雨胁迫对菲白竹生理特性的影响[J]. 东北林业大学学报,2014,42(11):17-21.
- [16] 郭慧媛,马元丹,王丹,等. 模拟酸雨对毛竹叶片抗氧化酶活性及释放绿叶挥发物的影响[J]. 植物生态学报,2014,38(8):896-903.
- [17] 王红梅,吕耀中,刘莉娜,等. 不同组方加味藿香正气软胶囊对脂多糖诱导小鼠原代骨髓巨噬细胞炎症相关因子表达的影响[J]. 世界科学技术:中医药现代化,2016,18(3):476-481.
- [18] Leyva N, Nair V, Bang W Y, et al. Protective role of terpenes and polyphenols from three species of *Oregano* (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 187:302-312.
- [19] 汪娟,蒋维,王毅. 降香中黄酮类化合物对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞抗炎作用研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(7):681-684.
- [20] 杨耀智,汤有志,陈建新. 取代基对黄酮类化合物抑制脂多糖诱导巨噬细胞释放一氧化氮活性的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(5):107-110.
- [21] Sohal R S, Allen R G. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis[J]. Experimental Gerontology, 1990, 25(6):499-522.
- [22] Aruoma O I, Grootveld M, Baborun T. Free radicals in biology and medicine: from inflammation to biotechnology[J]. Biofactors, 2006, 27(1/2/3/4):1-3.
- [23] Niki E. Free radicals in biology and medicine: good, unexpected, and uninvited friends[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2010, 49(49):S2.
- [24] Dawson J, Walters M. Uric acid and xanthine oxidase: future therapeutic targets in the prevention of cardiovascular disease? [J]. British Journal of Clinical Pharmacology, 2006, 62(6):633-644.

(上接第 156 页)

- [8] 胡庭俊,何彩美,钟晶. 鸡血藤不同极性段提取物制备及体外抑菌作用初步研究[J]. 动物医学进展,2010,31(9):33-36.
- [9] 张爱文,何彩美,钟晶,等. 鸡血藤提取物的制备及药理毒理研究[J]. 中兽医医药杂志,2011,30(3):20-22.