

野漆树苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的抗炎作用及机制探究

宋小欣¹, 韩凌², 李宇邦¹, 陈家兰¹, 林励¹, 李海波³, 肖凤霞¹

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广东省中医院, 广州 510006;
3. 化州市正源堂化橘红实业有限公司, 广东 化州 525144)

摘要:目的:探究野漆树苷(Rhoifolin, RHO)对细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞炎症模型释放炎症因子的影响,并探讨其作用机制。方法:用脂多糖($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)刺激体外生长良好的 RAW264.7 细胞 24 h 建立体外细胞炎症模型,以 MTT 法测定不同浓度 RHO 对 RAW264.7 细胞的毒性作用,用 Griess 试剂法检测一氧化氮(Nitric Oxide NO)的含量,RT-PCR 法检测细胞中肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor, TNF- α),白介素 1β (Interleukin- 1β , IL- 1β),白介素 6(Interleukin, IL-6)的含量,采用 Western Blot 法检测 MAPK 信号通路中相关蛋白的含量。结果:与空白对照组相比,在 LPS 诱导下,RAW264.7 细胞分泌炎症因子 NO, TNF- α , IL- 1β , IL-6 ($P < 0.01$);与模型组相比,25 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RHO 可明显下调 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放炎症因子 NO, TNF- α , IL- 1β 和 IL-6 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),并呈现良好的剂量依赖关系;野漆树苷还不同程度的抑制了 Erk 和 JNK 激酶的磷酸化。结论:RHO 可以抑制 LPS 所致的 RAW264.7 细胞炎症反应,减少炎症因子 NO 分泌,抑制 TNF- α , IL- 1β 和 IL-6 mRNA 的合成,抑制 JNK/SAPK 及 Erk 信号通路可能是其抗炎作用机制之一。

关键词:野漆树苷;脂多糖;肿瘤坏死因子 α ;白介素 1β ;白介素 6

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

脂多糖(LPS),是革兰阴性菌细胞壁的组成成分之一。LPS 是存在于自然界中的致病原,其毒性成分主要为类脂质 A,是促发炎症反应的主体致病部分。体内免疫细胞如巨噬细胞在 LPS 诱导下会大量释放白细胞介素- 1β (IL- 1β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症因子,适量炎症因子的释放可通过刺激免疫系统产生有利作用,但过量会对机体造成病理伤害,促发全身炎症反应,进而发展为多器官功能衰竭,甚至死亡^[1-2]。

化橘红是化痰止咳的常用中药,为“十大广药”之一。化橘红有正毛、副毛之分,以正毛品质最佳。现代研究表明,毛橘红黄酮类成分具有化痰、止咳^[3-4]、抗炎^[5]等多种药理作用,为毛橘红的主要活性部位,常用于治疗咳嗽、痰多气喘、呕吐、饮食消化不良等症,含量高达 15% 以上,具有良好的应用前景。林励等^[6]比较了毛橘红与光橘红两品种的质量差异,结果发现毛橘红总黄酮含量、柚皮苷含量均高于光橘红,且前者野漆树苷(RHO)含量甚至为后者的 10 倍,且毛橘红的祛痰、镇咳、消炎作用均优于光橘红。RHO 可以显著抑制角叉菜胶诱导的大鼠水肿模型中的炎症反应^[7],但目前尚无有关于该成分体外抗炎作用机制的相关报道。因此本实验拟采用 LPS 诱使小鼠 RAW264.7 巨噬细胞活化,建立体外炎症模型,通过检测野漆树苷对细胞上清中 NO 的分泌量及炎症细胞因子 TNF- α , IL- 1β , 和 IL-6 的水平,及 MAPK 信号通路中相关蛋白的含量,旨在研究 RHO 抗炎作用机制,从而判断 RHO 在机体外的抗炎效果,同时努力阐明其体外抗炎作用机制。

收稿日期:2018-01-02; **修回日期:**2018-02-20.

基金项目:国家发展改革新兴产业重大工程包 8; 国家中医药管理局中药标准化项目(ZYBZH-Y-GD-13).

作者简介:宋小欣(1993-),女,四川泸州人,广州中医药大学硕士研究生,研究方向为中药资源开发利用与新药研究, E-mail: 754383743@qq.com.

通信作者:肖凤霞(1973-),女,山东临清人,广州中医药大学教授,硕士研究生导师,博士,研究方向为中药资源开发利用与新药研究, E-mail: xfx92@163.com.

1 材料与方法

1.1 细胞

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞购于武汉中国生物样品典藏中心。

1.2 试剂与试剂

野漆树苷对照品(实验室自制,采用高效液相色谱法,经峰面积归一化法计算,其纯度大于 98%),细菌脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,批号 L2880),DMEM 细胞培养基(美国 Gibco 公司),NO 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),引物均由上海生工生物工程有限公司合成,TRIZOL Reagent RNA 提取试剂购自美国 Invitrogen 公司,蛋白质 marker 购于美国 thermo 公司,一抗及二抗购于 Cell signaling technolog 公司,配胶试剂盒购于碧云天。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与传代

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞培养于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中,并添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素,恒温培养箱的孵育条件为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$,隔天传代。

1.3.2 RHO 对 RAW264.7 细胞活力的影响

取生长状态良好的 RAW264.7 细胞,按每孔 5×10^3 个细胞种于 96 孔板中,孵育 24 h 后细胞给予不同浓度的 RHO ($3.125 \sim 400 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,用 DMSO 溶解,DMSO 的终浓度低于 0.2%) 处理(每个浓度设 6 个复孔),时间分别为 24 h、48 h 后,弃其培养基,每孔加入 MTT ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 溶液 $20 \text{ } \mu\text{L}$,继续在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下培养 4 h,小心吸弃 MTT 溶液,加 $150 \text{ } \mu\text{L}$ DMSO,在振荡器上振荡 5 min,在酶标仪上于 490 nm 波长处检测吸光值(OD 值)。

1.3.3 细胞 NO 含量测定

RAW264.7 细胞计数后,调整至实验所需细胞浓度即 2×10^5 个/mL。将细胞铺于 6 孔板中,每孔 2 mL,待细胞贴壁后给予不同浓度的 RHO ($0, 25, 50, 100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), LPS ($0.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), Dex ($1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$ 下作用 24 h 后,收集各组细胞上清液 $50 \text{ } \mu\text{L}$,加入 96 孔板中,每孔 $50 \text{ } \mu\text{L}$,随后加入 Griess Reagent I $50 \text{ } \mu\text{L}$,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温箱中反应 10 min; 后向各孔中加入 Griess Reagent II $50 \text{ } \mu\text{L}$,振荡混合均匀,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光反应 10 min 后,于 540 nm 波长处检测各组吸光度值。

NO 含量 = $[1 - (\text{给药孔 A} - \text{对照孔 A}) / \text{对照孔 A}] \times 100\%$ 。

1.3.4 Real-time PCR 法检测 TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA 的表达水平

从培养箱中取出细胞板,吸弃上清液,PBS 清洗 2 遍后,用 TRIZOL 从细胞中提取总 RNA,加适量 DEPC 水溶解后用紫外分光光度计检测提取到总 RNA 的浓度与纯度,使 A260/A280 在 1.8~2.0,随后以 $0.5 \text{ } \mu\text{g}$ Total RNA 为模板,反转录成 cDNA,反应条件设置为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 15 min; $85 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 s 终止反应,最后以 cDNA 为模板扩增目的基因(表 1),预变性过程: $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 s; 扩增过程: $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 s; $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 34 s, 40 个循环; 延伸过程: $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 s; $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 s; $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 s。Real-time PCR 结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算各 mRNA 的相对表达量。

表 1 目的基因的引物序列

genes	Primer sense	Primer antisense
GAPDH	GGAAAGCTGTGGCGTGATGG	AGCTCTGGGATGACCTTGCC
TNF- α	GCCAATGGCATGGATCTCAAAG	CAGAGCAATGACTCCAAAGT
IL-1 β	GGCCTTGGGCTCAAAGGAA	GCTTGGGATCCACACTCTCCA
IL-6	TCTGGGAAATCGTGAAATGAG	TCTCTGAAGGACTCTGGCTTTGTC

1.3.5 野漆树苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 MARK 信号通路的影响

将对数生长期的巨噬细胞 RAW264.7 按 2×10^5 个/mL 接种与 6 孔板中,每孔 2 mL,待细胞密度大约 80% 时,给予 LPS ($0.5 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$) 和不同浓度 ($25, 50, 100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 野漆树苷作用 3 h,收集细胞,加入

RIPA 及蛋白酶抑制剂,提取总蛋白,采用 BCA 蛋白定量法测定总蛋白浓度.总蛋白样品以 $30 \mu\text{g}$ 进行 5% 浓缩胶,8% SDS-PAGE 分离胶电泳,转膜,5% BSA 封闭 1 h, p-Erk, p-JNK, Erk, JNK 抗体孵育过夜,二抗常温孵育 1 h, ECL 显影.

1.3.6 数据分析

实验数据采用 Graphpad Prism 5 软件中单因素方差分析(one-way ANOVA)的分析方法进行处理,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示.组间比较运用 Dunnett 检验方法进行, $P < 0.05$ 表示具有统计学显著性差异.

2 结果

2.1 野漆树苷对 RAW264.7 细胞毒性测定

经不同浓度的野漆树苷处理后,RAW264.7 细胞的增殖受到了不同程度的抑制,并且抑制率显示出明显的剂量依赖性.而相同浓度的野漆树苷在 24 h 和 48 h 的处理条件下无明显区别.结果见表 2.经计算,野漆树苷 24 h 和 48 h 的半数最大抑制浓度(IC_{50})分别为 $427.27 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $456.80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.基于 IC_{50} 的结果,选取浓度为 25, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的野漆树苷作为后续实验的浓度.

表 2 野漆树苷对 RAW264.7 细胞增殖抑制作用的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Group	24 h	48 h
control	100 \pm 0	100 \pm 0
RHO(3.126 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	101.00 \pm 7.72	92.33 \pm 7.20
RHO(6.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	92.17 \pm 5.19	89.17 \pm 7.57
RHO(12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	90.67 \pm 6.08	86.33 \pm 7.11
RHO(25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	89.17 \pm 8.47	83.00 \pm 3.74*
RHO(50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	81.33 \pm 3.23	80.67 \pm 4.17**
RHO(100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	73.83 \pm 7.08*	70.67 \pm 1.75**
RHO(200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	62.00 \pm 4.29**	68.00 \pm 5.48**
RHO(400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	60.50 \pm 5.47**	59.17 \pm 2.78**
Dex	97.45 \pm 5.98	95.78 \pm 7.52

注: * $P < 0.05$, vs control; ** $P < 0.01$, vs control.

2.2 野漆树苷对脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞释放 NO 的影响

结果见表 3,与空白对照组相比,巨噬细胞经脂多糖刺激 24 h 后大量分泌 NO;与脂多糖组比较,25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度野漆树苷对 NO 的分泌无明显抑制作用,但在 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时显著抑制 RAW264.7 巨噬细胞 NO 释放量,差异有统计学意义($P < 0.05$),由表 2 与图 1 可知野漆树苷抑制 RAW264.7 细胞 NO 释放可能是由于野漆树苷抑制 RAW264.7 细胞增殖引起的.

2.3 野漆树苷影响 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 mRNA 表达

从表 3 可以看出,与空白组相比,单用 LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞后,其 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 mRNA 的表达水平显著增加($P < 0.05$).当与 LPS 组比较时,野漆树苷各浓度均可以抑制 RAW264.7 细胞表达 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 mRNA 的水平,且呈现出明显的剂量依赖性.

表 3 野漆树苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 cells TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	TNF- α	IL-1 β	IL-6
空白	-	1.05 \pm 0.05	1.23 \pm 0.09	1.12 \pm 0.08
LPS	0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	26.35 \pm 2.41*	54.89 \pm 4.94*	13.67 \pm 0.72*
LPS+RHO	25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	9.73 \pm 0.88**	34.04 \pm 2.91	3.90 \pm 0.45**
	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	2.72 \pm 0.15***	32.21 \pm 3.31**	2.918 \pm 0.20**
	100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.81 \pm 0.09***	19.59 \pm 1.94**	1.759 \pm 0.14***

注 * $P < 0.05$, vs control; ** $P < 0.05$, vs LPS model; *** $P < 0.01$, vs LPS model

2.4 野漆树苷对 LPS 刺激的 RAW264.7 巨噬细胞 p-Erk, p-JNK 蛋白表达的影响

依据 Western blot 结果(图 2)所示:与空白对照组相比,小鼠的 RAW264.7 细胞经 LPS 刺激后,显著提高了 p-Erk, p-JNK 蛋白的表达水平($P < 0.05$).与模型组相比较,25, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 野漆树苷作用后,其 p-Erk, p-JNK 蛋白的表达随野漆树苷剂量的增大而逐渐减少,野漆树苷具有抑制 p-Erk, p-JNK 蛋白表达的作用($P < 0.05$).

3 讨论

野漆树苷(Rhoifolin, 芹菜素-7-O-新橙皮糖苷)是从毛橘红或山香圆中提取的具有活性的黄酮类化合物,具有抗炎^[8]、降血压^[9]、抗氧化^[10]等多种药理作用.野漆树苷^[11]可以通过增强脂联素的分泌、胰岛素受体- β 的酪氨酸磷酸化、加强葡萄糖转运因子 4 转运来改善糖尿病并发症.野漆树苷还可以通过抑制 TNF- α 的含量显著抑制角叉菜胶诱导的大鼠水肿模型中的炎症反应^[7];鉴于野漆树苷是毛橘红中含量仅次于柚皮苷的黄酮类成分,且具有较好的抗炎效果,且其在细胞、分子水平的抗炎研究有待完善,因此有必要对其进行更深入的研究.

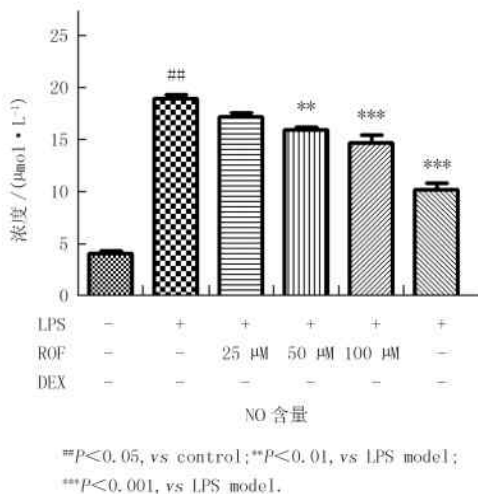
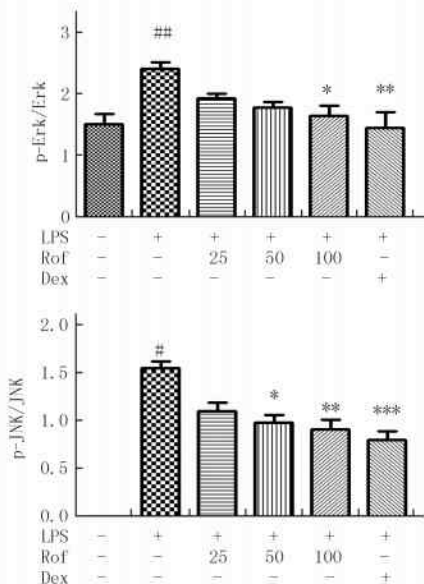
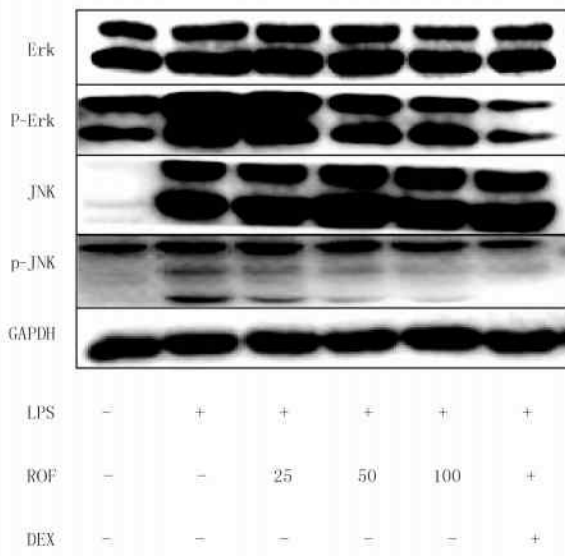


图 1 野漆树苷对 RAW264.7 细胞释放 NO 的抑制作用 ($x \pm s, n=4$)



* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with the control group; # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the LPS-stimulated group.

图 2 野漆树苷对 LPS 诱导的小鼠 RAW264.7 细胞 p-Erk, p-JNK 蛋白表达的影响

脂多糖(LPS),是革兰阴性菌细胞壁的组成成分之一,其毒性成分主要为类脂质 A,是促发炎症反应的主要致病部分.巨噬细胞属于免疫效应细胞,在调节机体炎症反应中扮演者关键作用.当机体遭到 G-入侵而产生炎症反应时,巨噬细胞系统便会被激活,导致炎症因子如 TNF- α , IL-1 β , IL-6 等大量分泌^[12-13].本实验利用 LPS 刺激单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞建立炎症细胞模型,考察野漆树苷对体外抗炎的效果与机制.研究结果表明 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 刺激 RAW 264.7 细胞 24 h 后,细胞上清液中检测到 NO 释放量为 19.01 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,与 LPS 组相比,给予野漆树苷干预之后可以显著降低其 NO 的释放量,能明显抑制其炎

症反应;与对照组相比,在LPS刺激下,TNF- α 、IL-1 β 和IL-6 mRNA的表达水平显著增高,与LPS模型组相比,不同浓度野漆树苷可明显抑制巨噬细胞TNF- α 、IL-1 β 和IL-6 mRNA的合成,且与其降低NO水平一样,呈明显的剂量依赖关系。

MAPKS信号转导通路由丝/苏氨酸蛋白激酶组成,目前已有研究证明存在着三条并行的信号通路,即Erk信号通路、JNK/SAPK信号通路和P38 MAPK信号通路。LPS可以使巨噬细胞活化,随后可以使几条通路同时被激活,MAPK通路的亚基便会发生磷酸化作用^[14]。信号通路主要参与应激条件下细胞的免疫调节、炎症反应和细胞凋亡过程。本实验还研究了在LPS诱导下,野漆树苷对巨噬细胞的信号通路的影响。结果表明,在LPS刺激下及野漆树苷实验组中,Erk和JNK等非磷酸化蛋白的表达水平并无显著差异。当巨噬细胞被LPS诱导后,其p-Erk和p-JNK的蛋白水平均有显著提升,与Joh^[15]等的相关研究结果相一致说明LPS可激活Erk及JNK/SAPK信号通路;而不同剂量野漆树苷作用后,其相应磷酸化蛋白的表达水平有不同程度的下降,说明野漆树苷对LPS诱导的细胞Erk及JNK/SAPK信号通路有明显的抑制作用。

综上所述,本文首次从细胞水平上证明了毛橘红中野漆树苷的抗炎作用,RHO可以抑制LPS诱导的RAW264.7细胞炎症反应,减少炎症因子NO分泌,抑制TNF- α 、IL-1 β 和IL-6 mRNA的合成,抑制JNK/SAPK及Erk信号通路可能是其抗炎作用机制之一。

参 考 文 献

- [1] Harrison D A, Welch C A, Eddleston J M. The epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004; secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database[J]. Crit Care, 2006, 10(2): 42.
- [2] 江泽波, 胡金萍, 温晓文, 等. 猪苓多糖对巨噬细胞 RAW264.7 的双向免疫调节作用[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(12): 1033-1038.
- [3] 周博文. 化州橘红治疗慢支肺气肿成分[J]. 中草药, 1992(7): 350.
- [4] 张秀明, 陈志霞, 林励. 毛橘红与光橘红的化痰及抗炎作用比较研究[J]. 中药材, 2004, 27(02): 122-123.
- [5] 肖崇厚, 杨松松. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 265.
- [6] 林励, 陈志霞, 袁旭江, 等. 两种化橘红的质量鉴别[J]. 广州中医药大学学报, 2004, 21(4): 308-312.
- [7] Eldahshan O A, Azab S. Anti-inflammatory effect of Apigenin-7-neohesperidoside (Rhoifolin) in carrageenin-induced rat edema model[J]. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2012, 2(8): 74-79.
- [8] 张秀明, 陈志霞, 林励. 毛橘红与光橘红的化痰及抗炎作用比较研究[J]. 中药材, 2004, 27(02): 122-123.
- [9] Occhiuto F, Circosta C, De Pasquale A, et al. Comparative hemodynamic effects of the flavonoids rhoifolin and vitexin in the dog[J]. Phytotherapy Research, 1990, 4(3): 118-20.
- [10] Kiem P, Nguyen TM, Minh C, et al. Two new c-glucosyl benzoic acids and flavonoids from Mallotus nanus and their antioxidant activity [J]. Archives of Pharmacal Research, 2010, 33(2): 203-208.
- [11] Rao YK, Lee MJ, Chen K, et al. Insulin-Mimetic Action of Rhoifolin and Cosmosiin Isolated from Citrus grandis (L.) Osbeck Leaves; Enhanced Adiponectin Secretion and Insulin Receptor Phosphorylation in 3T3-L1 Cells[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011: 1-9.
- [12] Kyriakis J M, Avruch J. Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation[J]. Physiol. Rev. 2001, 81(2): 807-869.
- [13] Luedde T, Trautwein C. Intracellular survival pathways in the liver[J]. Liver International Official Journal of the International Association for the Study of the Liver, 2006, 26(10): 1163.
- [14] Guiqing Kong, Xiao Huang, Lipeng Wang, et al. Astilbin alleviates LPS-induced ARDS by suppressing MAPK signaling pathway and protecting pulmonary endothelial glycocalyx[J]. International Immunopharmacology, 2016, 36: 51-58.
- [15] Eun-Ha Joh, Wan Gu, Dong-Hyun Kim. Echinocystic acid ameliorates lung inflammation in mice and alveolar macrophages by inhibiting the binding of LPS to TLR4 in NF- κ B and MAPK pathways[J]. Biochemical Pharmacology, 2012, 84(3): 331-340.

[21] 南景龙,薛丽英,贺文帅,等.奥利司他对男性腹型肥胖症患者血清 Irisin 影响的研究[J].中国老年保健医学,2015,13(6):53-55.

Effects of exercise training and orlistat on the weight loss and exercise capacity of obese mice

Su Kunxia

(Public Education Department, Xinlian College of Henan Normal University, Zhengzhou 451400, China)

Abstract: The 4-week-old male C57BL / 6J mice were fed with high-fat diet for 8 weeks to construct a model of nutritive obese mice, the obese mice were divided into obese model group, exercise group, orlistat group and exercise combination with orlistat group (combined group). The normal diet of mice in the same batch was used as the blank control group; the exercise group and the combined group were moderate treadmill exercise, the other groups did not exercise; the orlistat and the combined group were treated with orlistat, and the other groups were treated with orlistat solvent. After 8 weeks, comparative body mass, Lee's index, wet weight of fat, the shape and size of adipocytes of mice and exhaustive exercise time of mice in each group, to study the effect of exercise training combined with orlistat on the weight loss of nutritive obese mice and the effect on the athletic ability of mice. The results showed that both exercise and orlistat significantly reduced body mass, Lee's index, wet weight of fat and the shape and size of adipocytes in obese mice; exercise can effectively extend the time of exhaustive exercise in mice and only with orlistat is no significant effect; exercise and orlistat combined treatment has a better effect, can make obese mice to return to normal state, especially in extend the time of exhaustive exercise.

Keywords: exercise training; orlistat; weight loss; athletic ability

[责任编辑 杨浦]

(上接第 88 页)

Anti-inflammatory effects and mechanism of rhoifolin on LPS-induced RAW264.7 cells

Song Xiaoxin¹, Han Ling², Li Yubang¹, Chen Jialan¹, Lin li¹, Li Haibo³, Xiao Fengxia¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Province Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

3. Huazhou City Zhengyuantang Citrus grandis Industrial, Huazhou 525144, China)

Abstract: This study performed to investigate the effect of Rhoifolin (RHO) on the secretion of inflammatory factors in monocyte-macrophage RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide (LPS), and to explore its mechanism. RAW264.7 cells were cultured with lipopolysaccharide ($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) for 24 h to establish the model of in vitro cell inflammation. MTT assay was used to determine the toxic effects of different concentrations of RHO on RAW264.7 cells. The levels of nitric oxide (NO) was determined by Griess reagent; the level of TNF- α , interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) in the cells were measured by RT-PCR; Western Blot was used to detect the content of related proteins in MAPK signal pathway. Data showed that compared with the control group, LPS could induce the secretion of inflammatory factors NO, TNF- α , IL-1 β and IL-6 ($P < 0.01$) in RAW264.7 cells. Compared with the model group, 25~100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RHO significantly down-regulated LPS-induced release of inflammatory cytokines NO, TNF- α , IL-1 β and IL-6 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and showed well dose-dependent relationship. In conclusion, Rhoifolin also inhibited the phosphorylation of Erk and JNK kinase to some extent, RHO can inhibit the inflammatory response of RAW264.7 cells induced by LPS, and its anti-inflammatory mechanism may be related to the decrease of NO secretion, inhibition the level of TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA, and inhibit JNK / SAPK and Erk signaling pathways.

Keywords: Rhoifolin; lipopolysaccharide; tumor necrosis factor α ; interleukin 1 β ; interleukin 6

[责任编辑 王凤产]