

绿原酸对脂多糖致炎症小鼠体内体外 COX-2 的影响

抗晶晶¹, 张丽娟¹, 刘晓宁¹, 殷志敏²

(1. 黄河科技学院 医学院, 郑州 450063; 2. 南京师范大学 生命科学学院, 南京 210046)

摘要:探讨绿原酸对脂多糖致炎症小鼠体内体外 COX-2 蛋白表达的影响. 脂多糖滴鼻造模建立小鼠急性肺损伤模型, 脂多糖诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 建立细胞炎症反应模型, 应用 Weston blot 法, 检测小鼠肺组织内以及 RAW264.7 巨噬细胞中 COX-2 的蛋白表达. 绿原酸在小鼠体内体外均能有效降低脂多糖诱导的 COX-2 的蛋白表达, 并能促进 COX-2 蛋白的降解. 降低脂多糖诱导的 COX-2 的蛋白水平是绿原酸抗炎的机制之一.

关键词:绿原酸; 急性肺损伤; COX-2

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

绿原酸(Chlorogenic acid, CGA)又名咖啡鞣酸, 其广泛存在于植物中, 在杜仲、金银花、咖啡豆、葵花籽、小麦、苹果以及含酚酸类物质的马铃薯中含量较高, 是许多中成药和中药材的主要有效成分之一^[1]. 近年来的研究表明, 绿原酸具有多种药理作用. 急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)是指由肺内外致病因素导致的急性进行性缺氧性呼吸衰竭, 是一种常见而严重的呼吸急症^[2]. 已有研究表明, 环氧化酶-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)在小鼠发生急性肺损伤时含量显著增加, 这表明 COX-2 与急性肺损伤的发生关系密切^[3,4]. 本试验以脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)诱导小鼠建立 ALI 模型, 通过检测小鼠肺组织中 COX-2 的表达情况, 探究绿原酸对 ALI 小鼠是否具有保护作用. 此外, 本研究以 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞建立小鼠体外细胞炎症模型, 检测绿原酸对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中 COX-2 的蛋白表达与降解的影响, 旨在探究绿原酸抗炎的作用靶点, 为绿原酸的临床应用和深入研究提供依据.

1 材料与方法

1.1 动物

健康 ICR 小鼠(购自扬州大学)60 只, 雌雄各半(体质量 18~22 g), 实验动物的处理和实验过程按照中国实验动物管理规定执行^[5].

1.2 主要试剂

绿原酸(Aladdin), 脂多糖(Sigma), 兔抗鼠 β -actin 单克隆抗体(南京巴傲得公司), 兔抗鼠 COX-2 多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology), 放线菌酮 CHX(La Jolla, CA), 本实验中放线菌酮的使用剂量为($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

1.3 动物分组和给药

将小鼠随机分为空白组、阴性对照组、模型组、低、中、高药物剂量组, 每组各 10 只. 绿原酸药物组剂量分别为 20、40、80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 阴性对照组为 80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 绿原酸. 药物剂量组和阴性对照组小鼠用不同剂量的绿原酸连续灌胃 3 d, 空白组和模型组给予等体积蒸馏水, 随后用 LPS($37.5 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)滴鼻造模^[6].

1.4 细胞株与细胞培养

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞(中科院上海细胞库)在 37°C , 5% CO_2 条件下, 用含 10% 胎牛血清(Fetal

收稿日期:2016-12-28;修回日期:2017-06-01.

基金项目:河南省科技厅科技攻关项目(172102310208);河南省教育厅自然科学计划项目(16A180046).

作者简介(通信作者):抗晶晶(1987-), 女, 山西长治人, 黄河科技学院讲师, 研究方向为药物抗炎机制研究, E-mail: kangjingjingkuaile@163.com.

Bovine Serum, FBS)和抗生素($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素)的 DMEM 完全培养液(Hyclone 公司)培养.

1.5 Western blot 检测小鼠肺组织内 COX-2

造模 24 h 后,处死小鼠,剥离左肺,称取一定量的肺组织,加入细胞裂解液冰上匀浆,随后将细胞裂解物在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $15\ 000 \text{ g}$ 条件下离心 15 min. 离心结束后,收取离心上清液并用 Bradford 法测定每份样品的总蛋白浓度. 取等量蛋白进行 SDS-PAGE,电泳结束后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上(时间 100 min,恒流 350 mA). 随后用 TBS(含 5%脱脂奶粉)封闭 1 h, TBST 洗涤,每次 5 min,共洗涤 3 次. 加入一抗,在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜,抗体孵育过夜后,再用 TBST 洗涤 3 次,每次 5 min. 用 Ddy800 的荧光二抗孵育半小时,Odyssey 红外显像系统观测结果,扫描并计算信号条带密度值.

1.6 Western blot 检测细胞内 COX-2

将对数生长期的 RAW264.7 细胞在实验前 1 d 以 5×10^5 的密度接种于 12 孔板,细胞密度达到 80% 时加入 LPS 或绿原酸进行敷育. 细胞培养结束后,弃去培养 RAW264.7 细胞的培液,用预冷的 $1 \times \text{PBS}$ 漂洗两次并弃尽多余的 PBS,然后加入预冷的细胞裂解液置于冰上孵育半个小时. 裂解结束后,离心获得上清液,按上述 1.5 中方法进行 Western blot 检测.

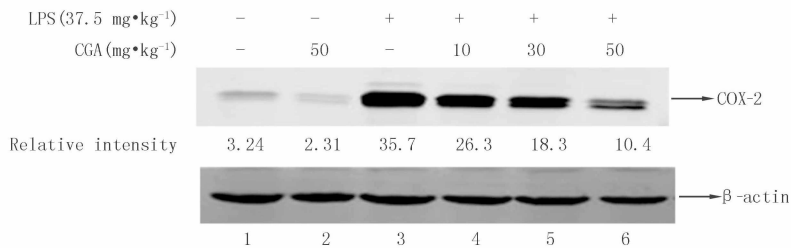
1.7 数据统计分析

使用 SPSS10.0 软件进行两组间 t 检验,所有数值均表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$,并设置多个重复.

2 结果

2.1 绿原酸对 ALI 小鼠肺组织中 COX-2 蛋白表达的影响

ALI 小鼠成功造模 24 h 后,处死小鼠,取适量肺组织进行 Western blot 检测,结果如图 1 所示,单独加入绿原酸不会引起小鼠肺组织中 COX-2 的表达,表明绿原酸对正常小鼠影响较小(阴性对照组);当小鼠发生 ALI 时,小鼠肺组织中 COX-2 水平明显增加(模型组),而绿原酸能够剂量依赖性地抑制小鼠急性肺损伤时 COX-2 的表达(低、中、高药物剂量组),当绿原酸达到 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,COX-2 水平显著下降,与模型组比较,差异具有统计学意义.



1. 空白组;2. 阴性对照组;3. 模型组;4. 低剂量组;5. 中剂量组;6. 高剂量组. 结果取3次独立实验的平均值.

图1 不同剂量的绿原酸对LPS诱导的小鼠体内COX-2蛋白水平的影响

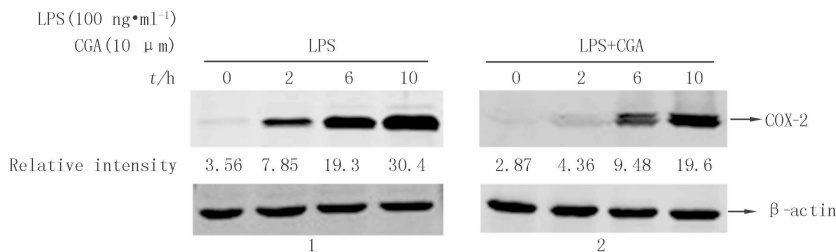
2.2 绿原酸对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中 COX-2 蛋白翻译水平的影响

将对数生长期的 RAW264.7 细胞在实验前一天以 5×10^5 的密度接种于 12 孔板. 细胞密度达到 80% 时分别加入终浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 或 LPS($100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) + CGA ($10 \mu\text{M}$), 分别培养 0, 2, 6, 10 h 后收取细胞. 通过 Western blot 检测绿原酸对 RAW264.7 细胞中 COX-2 蛋白翻译水平的影响. 如图 2 所示, 用 LPS($100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理 RAW264.7 细胞, 随着刺激时间延长(0~10 h), 胞内 COX-2 蛋白水平逐渐上升(对照组); 在加入 CGA ($10 \mu\text{M}$) 的情况下, LPS 虽能时间依赖性地上调 COX-2 蛋白水平, 但其程度与单独用 LPS 刺激相比显著偏低(实验组). 可见, 在 LPS 诱导细胞内 COX-2 蛋白表达的过程中, CGA 能够有效地抑制这种诱导作用.

2.3 绿原酸对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中 COX-2 蛋白降解的影响

放线菌酮(Cycloheximide, CHX)是一种在真核生物中对蛋白质生物合成过程有抑制效应的化合物,在分子生物学中放线菌酮可用来确定蛋白质降解的半衰期^[7]. 本实验用 LPS($100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)刺激 RAW264.7

细胞 10 h 后,加入放线菌酮 CHX($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)抑制 COX-2 蛋白的继续合成,观察绿原酸对 COX-2 蛋白降解的影响.结果如图 3 所示,由于放线菌酮阻碍蛋白质的合成,细胞内由先前 LPS 刺激产生的 COX-2 蛋白不断减少(对照组),绿原酸的加入促进了 COX-2 蛋白的降解(实验组),缩短了 COX-2 蛋白的半衰期.

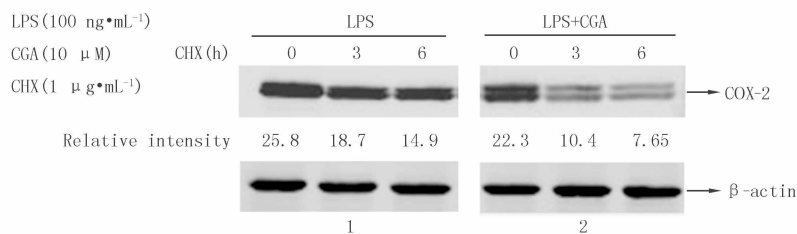


1. 对照组;2实验组. 对照组中加入LPS($100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 实验组中加入LPS($100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)+CGA($10 \mu\text{m}$), 分别培养RAW264.7细胞 0、2、6、10 h, 随后Western blot检测各组中COX-2的表达情况, β -actin作为内参. 结果取3次独立实验的平均值.

图2 绿原酸对LPS刺激下COX-2蛋白表达随时间变化的影响

3 讨论

感染是 ALI 的主要病因之一,其中革兰氏阴性细菌感染占检出病菌的 70%~80%,而 LPS 是革兰氏阴性细菌的主要抗原性及致病性成分,它可通过活化炎症细胞,使其释放大量炎症因子从而造成 ALI^[8]. 目前临床上仍缺乏针对 ALI 的有效干预和治疗手段,药物治疗常采用糖皮质激素,但其在临床上频繁地引起一些副反应,如中风、肝细胞损害、生长抑制等,这些副反应限制了它们在临床上的广泛应用,从天然产物中寻找副作用少的新型抗炎药物显得尤为重要^[9]. COX-2 是一种诱导型合酶,是启动炎症反应的关键酶,由其合成的病理性前列腺素可介导炎症反应. 正常情况下的肺组织中几乎不表达 COX-2,当机体受到致炎因子刺激时,某些细胞,如单核巨噬细胞和成纤维细胞中会诱导表达 COX-2,引起受损部位病理性前列腺素的合成和聚积,加速炎症反应的进行^[10]. 近年来研究表明,COX-2 在 ALI 发生、发展中具有重要作用,因此,许多新型的 COX-2 抑制剂被开发成用于治疗 ALI 的有效抗炎药物^[11].



1. 对照组;2. 实验组. LPS($100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)刺激RAW264.7细胞10 h后,更换新鲜的细胞培养液. LPS对照组加入放线菌酮CHX($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),绿原酸实验组加入放线菌酮CHX($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)+CGA($10 \mu\text{M}$),分别培养0、3、6 h后收取细胞,Western blot检测绿原酸在6 h内对COX-2蛋白降解的影响, β -actin作为内参. 结果取3次独立实验的平均值.

图3 绿原酸对COX-2蛋白降解的影响

绿原酸在植物中广泛存在,近年来,绿原酸的抗炎作用得到越来越多的关注^[12,13],在多种具有抗炎作用的植物提取物中,都分离出活性成分绿原酸. 本研究中,我们以小鼠体内体外表达的 COX-2 为观察对象,探究绿原酸对 ALI 小鼠的保护作用. 我们发现当小鼠发生 ALI 时,小鼠肺组织中 COX-2 水平明显增加,而绿原酸能够剂量依赖性地抑制小鼠急性肺损伤时 COX-2 的表达;在以 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 发生的体外细胞炎症模型中,绿原酸能够在体外显著抑制 LPS 诱导的 COX-2 的蛋白表达;在用放线菌酮 CHX 抑制 RAW264.7 细胞中 COX-2 蛋白的继续表达后,我们发现绿原酸可加快先前由 LPS 诱导产生的 COX-2 蛋白的降解速度;此外,SHAN 等已有结果表明绿原酸能够有效降低 LPS 诱导的 COX-2 基因水平的上调^[14].

由于 LPS 引起的炎症反应复杂,涉及的分子众多,因而明确绿原酸抗 LPS 引起的炎症机制尚需进行大

量深入的研究. 进一步阐明绿原酸抗炎药理作用的分子生物学机制, 将使其在抗炎作用中具有更广阔的应用前景.

4 结 论

综上, 以 COX-2 为主要观察指标, 发现绿原酸能够在小鼠体内体外有效降低 LPS 刺激下 COX-2 的蛋白水平, 表明绿原酸对 LPS 致 ALI 小鼠的保护效应可能与其抑制 COX-2 有关. 机制上, 绿原酸促进 COX-2 蛋白的降解可能是下调 COX-2 蛋白水平的一个方面.

参 考 文 献

- [1] 魏明, 杨晓梅, 刘佳红, 等. 绿原酸的药理作用研究进展[J]. 陕西中医, 2016, 37(4): 511-512.
- [2] 俞敏, 田兆方. 急性肺损伤时损伤标志物的研究进展[J]. 中国当代儿科杂志, 2014, 16(1): 94-98.
- [3] 潘永利. COX-2 在内毒素致大鼠急性肺损伤中的变化及意义[J]. 中国实用医药, 2012, 7(27): 248-249.
- [4] 张丽娜, 龚华, 艾宇航. 急性肺损伤大鼠肺组织 COX-2、NF- κ B 表达及其相关性的研究[J]. 医学临床研究, 2007, 24(11): 1872-1875.
- [5] 抗晶晶, 李桂兰, 王期, 等. 石蒜碱对内毒素致炎症小鼠体内体外 COX-2 的影响[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2016, 39(1): 86-89.
- [6] Szarka R J, Wang N, Gordon L, et al. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation[J]. Journal of Immunological Methods, 1997, 202(1): 49-57.
- [7] Vajrala N, Bottomley P J, Stahl D A, et al. Cycloheximide prevents the de novo polypeptide synthesis required to recover from acetylene inhibition in *Nitrosopumilus maritimus*[J]. Fems Microbiology Ecology, 2014, 88(3): 495-502.
- [8] 余雄英, 杨晓金, 田真真, 等. 槐定碱对 ALI 模型鼠肺组织 TGF- β 和 Smads 蛋白表达的影响[J]. 江西中医药, 2016, 47(5): 36-38.
- [9] 史家欣, 李家树. 糖皮质激素抗炎作用机制的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2014(6): 983-984.
- [10] KANG Jingjing, ZHANG Yushun, CAO Xiang, et al. Lycorine inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 up-regulation in RAW264. 7 cells through suppressing P38 and STATs activation and increases the survival rate of mice after LPS challenge[J]. International Immunopharmacology, 2012, 12(1): 249-256.
- [11] 王建春, 毛宝龄, 陈正堂, 等. 环氧合酶-2 抑制剂对大鼠急性肺损伤的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999(6): 351-353.
- [12] XU Yuexin, CHEN Jingwen, YU Xiao, et al. Protective effects of chlorogenic acid on acute hepatotoxicity induced by lipopolysaccharide in mice[J]. Inflammation Research, 2010, 59(10): 871-877.
- [13] YAN Feng, YU Yinghua, WANG Shuting, et al. Chlorogenic acid protects d-galactose-induced liver and kidney injury via antioxidation and anti-inflammation effects in mice[J]. Pharmaceutical Biology, 2016, 54(6): 1-8.
- [14] SHAN Jianhua, FU Jin, ZHAO Zhihui, et al. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264. 7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation[J]. International Immunopharmacology, 2009, 9(9): 1042-1048.

Effect of Chlorogenic Acid on LPS-induced COX-2 in Vivo and Vitro

Kang Jingjing¹, Zhang Lijuan¹, Liu Xiaoning¹, Yin Zhimin²

(1. School of Medicine, Huanghe College of Science and Technology, Zhengzhou 450063, China;

2. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: The object of this study was to explore the effect of chlorogenic acid on LPS-induced COX-2 in vivo and vitro. The mice induced by LPS was used as an acute lung injury model. The RAW264. 7 cells induced by LPS was used as an cell inflammatory model. The expression of COX-2 in lung tissue as well as in RAW264. 7 cells was detected by Western blot. The results showed that chlorogenic acid could inhibit the expression of COX-2 protein in vivo and vitro effectively and promote the protein degradation of COX-2 protein in RAW264. 7 cells. Reducing the protein level of LPS-induced COX-2 is one of the mechanisms for the anti-inflammatory action of chlorogenic acid.

Keywords: chlorogenic acid; acute lung injury; COX-2