

枫叶黄酮抑制脂多糖诱导破骨前体细胞 Raw264.7 细胞激活的作用

邹智荣¹⁾, 宗一¹⁾, 陆地¹⁾, 孙俊¹⁾, 马云兵²⁾, 曹西南³⁾

(1) 昆明医学院人体解剖学教研室, 云南昆明 650500; 2) 云南省第三人民医院骨科, 云南昆明 650011; 3) 昆明医学院生物化学教研室, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 探讨枫叶黄酮对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导破骨前体细胞 Raw264.7 细胞炎性因子释放的抑制作用. **方法** 用 LPS (5 mg/mL) 刺激 Raw264.7 细胞构建炎症模型, 采用四甲基偶氮唑蓝比色法 (MTT) 检测 Raw264.7 细胞的活力影响; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测一氧化氮 (NO) 和前列腺素 E2, PGE2 表达; 运用免疫荧光染色方法检测诱导型一氧化氮合酶和环氧合酶-2, COX-2、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白介素-1 β (IL-1 β)、核因子- κ B, NF- κ B 蛋白与 mRNA 的表达变化. **结果** 不同浓度的枫叶黄酮明显抑制了 LPS 诱导的 Raw264.7 细胞 NO、PGE2, iNOS 和 COX-2, TNF- α 和 IL-1 β 与 NF- κ B 的上调, 并且 NO、PGE2、iNOS、COX-2 和 NF- κ B 蛋白的表达呈剂量依赖性. **结论** 枫叶黄酮可抑制 LPS 诱导的破骨前体细胞 Raw264.7 细胞 iNOS、COX-2 和 NF- κ B/P65 蛋白表达和炎性因子释放从而抑制破骨细胞的激活.

[关键词] 枫叶黄酮; 脂多糖; 炎性因子; Raw264.7 细胞; 免疫荧光染色

[中图分类号] Q591.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 02-0004-06

Flavonoid Isolated from the Leaves of *Acer truncatum* Bunge Inhibits Lipopolysaccharide-induced Activation of Raw264.7 Cells

ZOU Zhi-rong¹⁾, ZONG Yi¹⁾, LU Di¹⁾, SUN Jun¹⁾, MA Yun-bing²⁾, CAO Xi-nan³⁾

(1) Dept. of Anatomy, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Dept. of Osteology, The 3rd People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650011; 3) Dept. of Biochemistry, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effects of flavonoid isolated from the leaves of *Acer truncatum* Bunge on the expression of pro-inflammatory cytokines in Raw264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Inflammatory cell model was structured by LPS-stimulated Raw264.7 cells, the cells were treated with flavonoid (10 μ M, 30 μ M and 60 μ M) prior to LPS (5 mg/mL) exposure and the effects of flavonoid on viability of Raw264.7 cells were measured by MTT assay, Nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (PGE2) were measured by ELISA, the effects on the protein levels of pro-inflammatory enzymes, cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), and pro-inflammatory cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-1 β (IL-1 β), inflammatory signaling proteins nuclear factor- κ B (NF- κ B) were analysed by immunofluorescence staining assay. **Results** LPS-induced NO, PGE2, iNOS, COX-2 and NF- κ B protein expression levels were significantly decreased by flavonoid in a concentration-dependent manner and flavonoid also had an effect on the expression of TNF- α , IL-1 β through translational inhibition. **Conclusion**

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30860336, 30560170); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才培养项目 (2009CI033); 云南省应用基础研究重点项目 (2008CC007); 昆明医学院研究生创新基金项目 (2011J01)

[作者简介] 邹智荣 (1968~), 男, 云南西双版纳州人, 在读硕士研究生, 副教授, 主要从事神经解剖学研究工作.

[通讯作者] 马云兵. E-mail: ynnanmayunbing@126.com; 曹西南. E-mail: xncaopst@yahoo.com;

Flavonoid isolated from the leaves of *Acer truncatum* Bunge can inhibit LPS-induced activation of Raw264.7 cells through inhibiting the release of pro-inflammatory mediators, then exerts its anti-osteoporosis activities.

[Key words] Flavonoid; Lipopolysaccharide; Pro-inflammatory cytokines; Raw264.7 cells; Immunofluorescence staining

破骨细胞是人体生理性骨重建和病理性骨破坏过程中高度特异性且具有骨质吸收功能的多核巨细胞, 来源于骨髓单核巨噬细胞系, 其主要功能为吸收骨。破骨细胞在骨发育、骨形成、骨吸收和骨量的调节方面起着关键作用。破骨细胞在进行骨吸收过程中是通过多种因素(如细胞因子等)的调控, 通过复杂的分子机制完成的^[1]。骨质疏松症、骨转移癌, 各种炎症导致的骨吸收, 都是由于破骨细胞活动增强, 导致骨吸收活动强于骨形成造成的。破骨细胞易受很多因素如内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase 3, MMP 3)等刺激都会迅速激活, 活化的破骨细胞可通过炎症信号蛋白如核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)等途径释放细胞炎性蛋白酶和促炎性因子, 如诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等细胞因子, 这些因子被认为可造成骨吸收活动强于骨形成最终导致骨质疏松的形成。

元宝枫(*Acer truncatum bunge*)为槭树科(Aceraceae)槭树属(*Acer*)落叶乔木, 枫叶黄酮为3, 5, 7, 3', 4'-五羟基黄酮, 即槲皮素^[2]。银杏黄酮是色烷及色原酮的衍生物, 它的主要有效成份包括银杏双黄酮、白果素、槲皮素、山奈酚等。近期研究发现银杏黄酮中所含的四羟基黄酮对急性炎症有抑制作用^[3], 尽管对银杏黄酮的抗炎作用已有较多的认识^[4], 但枫叶黄酮在破骨细胞中的作用未见系统研究报道。

本研究拟通过LPS刺激破骨细胞株Raw264.7细胞建立体外炎症模型, 应用酶联免疫吸附试验(ELISA), 免疫荧光染色技术(Immunofluorescence staining)方法检测相关细胞炎性蛋白酶和炎性因

子的表达变化, 探讨枫叶黄酮在LPS诱导Raw264.7细胞激活释放细胞炎性因子中的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

Raw264.7细胞株由南方医科大学细胞生物学教研室白晓春教授馈赠; DMEM高糖培养基、青霉素-链霉素双抗和胎牛血清购自美国Gibco公司; LPS购自美国Sigma公司; 一氧化氮(NO)、前列腺素E2(ProstaglandinE2, PGE2)ELISA试剂盒购自美国R&D公司; iNOS、COX-2、TNF- α 、IL-1 β 和NF- κ B抗体, TRITC偶联荧光二抗与DAPI核染料购自美国Santa Cruz公司; 枫叶黄酮购自昆明海之灵生物科技开发有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Raw264.7细胞用含10%胎牛血清, 105 U/L青霉素, 100 mg/L链霉素的DMEM高糖完全培养基在37℃、5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱中培养, 2~3 d更换1次培养基, 3~4 d传代1次, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 细胞毒性试验 将Raw264.7细胞悬液100 μ L按 1×10^5 /mL密度接种至96孔板中, 置于37℃、5%CO₂培养箱中孵育24 h, 至细胞良好贴壁后随机分为空白对照组、模型组和枫叶黄酮处理组, 每组设5个复孔。其中处理组预处理不同浓度的枫叶黄酮(10、30和60 μ M)1 h后加LPS(5 μ g/mL)刺激6 h, 模型组为单独LPS(5 μ g/mL)刺激6 h, 处理完毕各组每孔加入MTT溶液(5 mg/mL)50 μ L置于37℃、5%CO₂培养箱中孵育2 h, 弃培养基, 加入二甲基亚砜(DMSO)150 μ L, 振荡摇匀5~10 min, 待紫红色结晶颗粒完全溶解后用酶标仪在540 nm处检测各组细胞吸光度(OD), 然后求得细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{实验组吸光度} A - \text{空白组吸光度} A}{\text{阴性对照组吸光度} A - \text{空白组吸光度} A} \times 100\%$$

每组实验至少重复3次。

1.2.3 NO和PGE2含量测定 将Raw264.7细胞悬液100 μ L按 1×10^5 /mL密度接种至96孔板中,

置于37℃、5%CO₂培养箱中孵育24 h, 至细胞良好贴壁后随机分为空白对照组、模型组和枫叶黄酮处理组, 每组设5个复孔。建立标准曲线, 按

ELISA 试剂盒说明书操作。

1.2.4 免疫荧光双标检测 不同处理的细胞，加4%多聚甲醛固定15 min，漂洗3次×5 min，10%山羊血清室温下封闭1 h，加鼠抗 iNOS (1:500 稀释)，鼠抗 COX-2 (1:500 稀释)，兔抗 TNF- α (1:500 稀释)，兔抗 IL-1 β (1:500 稀释)、兔抗 NF- κ B/P65 (1:500 稀释)，4 $^{\circ}$ C 过夜。漂洗3次×5 min，加入 TRITC 标记的山羊抗兔 IgG 荧光二抗 (1:100 稀释)、TRITC 标记山羊抗鼠 IgG 荧光二抗 (1:100 稀释)，37 $^{\circ}$ C 孵育1 h。漂洗3次×5 min，在室温暗处晾干玻片，用 DAPI 试剂封片，室温下晾干，于荧光显微镜 (Nikon, D80i) 下观察、摄片。

1.3 统计学处理

所有数据利用 SPSS 统计软件包进行处理。各组数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组之间的比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 枫叶黄酮及 LPS 对 Raw264.7 细胞活毒性影响

单独 LPS (5 μ g/mL) 刺激 6 h 和预处理不同浓度的枫叶黄酮 (10、30 和 60 μ M) 1 h 后加 LPS (5 μ g/mL) 刺激 6 h 与空白对照组相比对 Raw264.7 细胞活性无明显影响 (见图 1)。

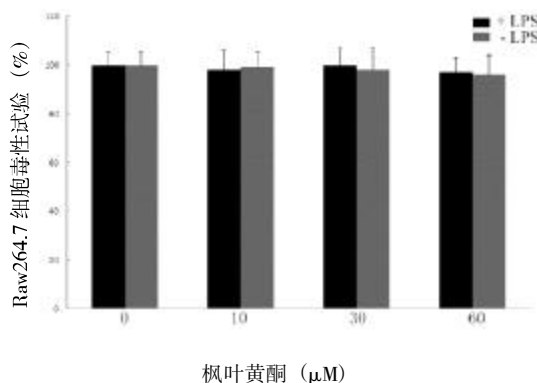


图 1 Raw264.7 细胞毒性试验

Fig. 1 Cytotoxic test in Raw264.7 cells

2.2 枫叶黄酮对 LPS 诱导的 Raw264.7 细胞 NO 及 PGE2 的影响

10、30 和 60 μ M 的枫叶黄酮对 Raw264.7 细胞预处理 1 h 后，加入 LPS (5 μ g/mL) 刺激 6 h 结果显示：单纯 LPS 处理组 Raw264.7 细胞 NO 及 PGE2 含量水平明显抑制 (见图 2)；与单纯 LPS 处理组

相比较，但预处理枫叶黄酮的 Raw264.7 细胞，明显抑制了 NO 及 PGE2 的含量明显减少 (见图 2)，并且呈量效关系。

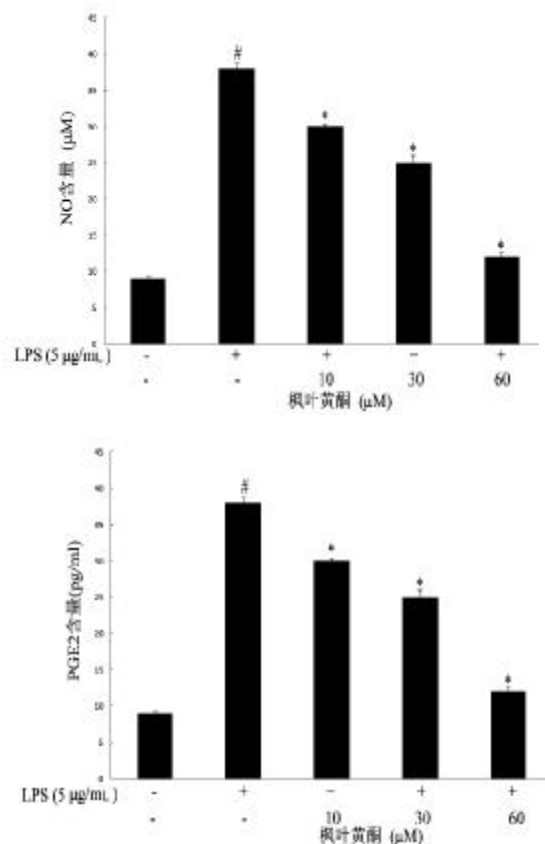


图 2 枫叶黄酮抑制 LPS 诱导的 Raw264.7 细胞 NO 及 PGE2 的表达

Fig. 2 Flavonoid inhibits the expression of NO and PGE2 in Raw264.7 cells induced by LPS

与空白对照组比较，* $P < 0.05$ ；

与单纯 LPS 处理组比较，* $P < 0.05$ 。

2.3 枫叶黄酮在对 LPS 诱导的 Raw264.7 细胞 iNOS 表达的抑制作用

Raw264.7 细胞预处理 10、30 和 60 μ M 的枫叶黄酮 1 h 后，加入 LPS (5 μ g/mL) 刺激 6 h，细胞免疫荧光染色检测发现：单纯 LPS 处理组 Raw264.7 细胞 iNOS 蛋白表达水平上调明显 (见图 3A)。但是，预处理枫叶黄酮的 Raw264.7 细胞，与单纯 LPS 处理组相比较，明显抑制了 iNOS 蛋白水平 (见图 3A) 的表达，并且呈量效关系。单纯 LPS 处理组 Raw264.7 细胞 COX-2 蛋白水平 (见图 3B) 表达明显上调。但是，预处理 10、30 和 60 μ M 的枫叶黄酮的 Raw264.7 细胞，与单纯 LPS 处理组相比，COX-2 蛋白水平 (见图 3B) 明显降低，呈剂量依赖。

2.4 枫叶黄酮对 LPS 诱导 Raw264.7 细胞炎症因子的表达的抑制作用

预处理不同浓度的枫叶黄酮 (10、30 和 60 μM) 1 h 后, 加入 LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 6 h, 细胞免疫荧光染色检测细胞炎症因子的蛋白表达水平发现: Raw264.7 细胞在 LPS 刺激之后 TNF- α 、IL-1 β (见图 3C, 3D) 的蛋白表达水平明显上调; 预处理 30 μM 枫叶黄酮后可明显抑制 LPS 诱导的 Raw264.7 细胞 TNF- α 的释放 (见图 3C).

2.5 枫叶黄酮对 LPS 诱导 Raw264.7 细胞 NF- κ B/P65 表达抑制作用

采用细胞免疫荧光染色检测发现: LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 6 h 后, 在 Raw264.7 细胞中 NF- κ B/P65 蛋白表达显著上调; 预处理不同浓度的枫叶黄酮 (10、30 和 60 μM) 的 Raw264.7 细胞明显抑制了 LPS 诱导的 NF- κ B/P65 蛋白表达上调 (见图 3E), 并且呈量效关系。

3 讨论

正常的骨重建过程依赖骨吸收和骨形成过程的动态平衡, 而这一过程又分别与破骨细胞和成骨细胞的功能密切相关。破骨细胞是人体生理性骨重建和病理性骨破坏过程中高度特异性且唯一具有骨质吸收功能的多核巨细胞, 来源于骨髓单核/巨噬细胞系, 在骨发育、骨形成、骨吸收和骨量的调节方面起着关键作用。破骨细胞被激活后, 可分泌酸性物质, 溶解矿物质, 分泌蛋白酶消化骨基质, 导致骨吸收形成骨陷窝^[5]。Nason 等^[6]调查了 LPS 在破骨细胞中的作用, 结果显示 LPS 有破坏骨质的潜力, 可以刺激单核破骨细胞前体细胞分化成破骨细胞。破骨细胞数量或和活性的增加会导致骨质疏松, 一旦破骨细胞的活性占优势, 即可导致溶骨。在牙槽骨吸收的模型中, 细菌内毒素及多种炎症因子也可诱导破骨细胞活化、增殖, 骨代谢平衡失调, 促进骨吸收^[7]。LPS 能直接刺激 Raw264.7 细胞释放促炎性蛋白酶 COX-2 和 iNOS, 促炎性因子 IL-1 β 和 TNF- α ^[8]。随着对 NO 研究的深入和发展, 发现 NO 同骨细胞的功能非常密切, 内源性 NO 可能是调节骨细胞功能的重要介质。NO 化学性质活泼也不稳定, 故常用 NOS 来衡量 NO 的活性。NOS 有构建型 (Constitute NOS, cNOS) 和 iNOS 2 种, 在正常骨组织中仅检测到 cNOS, 而未发现 iNOS 的表达^[9]。而细胞因子和炎症反应则可刺激 iNOS 的产生与活性^[10]。PGE2 是由花生四烯酸合成而来, 可以通过多种途径来

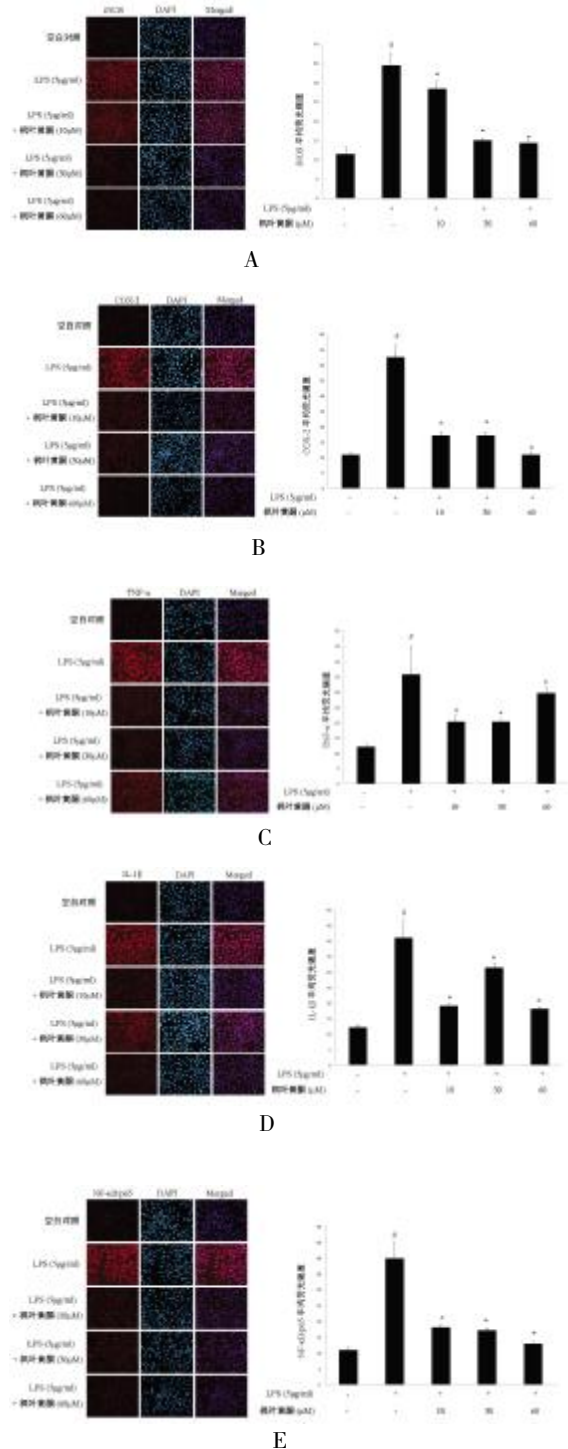


图3 不同浓度的枫叶黄酮对 LPS 诱导 Raw264.7 细胞的 iNOS、COX-2、TNF- α 、IL β 和 NF- κ β /P65 蛋白表达的抑制作用 ($\times 400$)

Fig. 3 Flavonoid inhibits the expression of iNOS (A), COX-2 (B), TNF- α (C), IL-1 β (D) and NF- κ B/p65 (E) in Raw264.7 cells induced by LPS ($\times 400$)

与空白对照组比较, $^{\#}P < 0.05$; 与单纯 LPS 处理组比较, $^{\ast}P < 0.05$ 。

合成。PGE2 可通过刺激类成骨细胞产生破骨细胞分化因子促成破骨，破骨细胞分化因子可促成骨细胞与破骨细胞之间产生黏连触，从而刺激破骨细胞的分化与激活^[11,12]。IL-1 β 和 TNF- α 是 LPS 所致炎症反应中的重要早期促炎介质，在炎症反应中发挥重要作用，主要由单核巨嗜细胞产生，其在骨髓中能通过自分泌和旁分泌作用，诱发骨原巨嗜细胞产生 IL-1 β 和 TNF- α ^[13]。

目前世界上尚未成功建立破骨细胞系，但已建立了前体破骨细胞系，目前多采用鼠源性单核巨嗜细胞系 Raw264.7。本实验采用 Raw264.7 建立细胞炎症模型，镜下观察细胞生长，细胞形态清晰，呈不规则形、类三角形或梭形，单个细胞核，细胞胞浆丰富，贴壁生长，且贴壁牢固，符合标准 Raw264.7 细胞株的形态和生长特性。

为了检测枫叶黄酮（10、30 和 60 μM ）对 Raw264.7 细胞的毒性作用，笔者通过 MTT 研究发现：枫叶黄酮在 10、30 和 60 μM 对细胞无明显的损伤作用。

为了研究枫叶黄酮是否可以抑制 NO 和 PGE2 的表达，本实验通过 ELISA 检测研究发现：不同浓度的枫叶黄酮（10、30 和 60 μM ）明显的抑制 LPS 诱导的 Raw264.7 细胞 NO 和 PGE2 表达。

为了研究枫叶黄酮是否可以通过抑制炎症蛋白酶（COX-2 和 iNOS）表达和促炎性细胞因子（IL-1 β 和 TNF- α ）的分泌，从而对抗 LPS 诱导的 Raw264.7 激活。本研究发现：不同浓度的枫叶黄酮（10、30 和 60 μM ）明显的抑制 LPS 诱导的 Raw264.7 细胞 COX-2 和 iNOS 表达和 IL-1 β 和 TNF- α 的分泌，从而抑制 Raw264.7 的激活。

为阐明枫叶黄酮抑制 Raw264.7 COX-2、iNOS 和促炎细胞因子表达的作用机制，本研究进一步调查了枫叶黄酮对炎症信号通路中的关键蛋白 NF- κ B 的作用。NF- κ B 是由多肽链 p50 和 p65 两亚基形成的二聚体，静息状态下，NF- κ B 的 p65 亚基与抑制性 κ B (I κ B) 蛋白结合，覆盖了 p50 的核定位信号，使 NF- κ B 以无活性的二聚体形式留在胞浆中。而细胞受到内外源性激活剂如 LPS 的刺激时，I κ B 激酶可使 I κ B 磷酸化而降解，导致 p50 蛋白的核定位信号区暴露，这时 NF- κ B 可经核孔进入核内与相应靶序列结合，从而发挥其对基因转录（如 il-1 β 、tnf- α 、il-6、cox-2、inos、骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 的调节功能^[14,15]，促进了破骨细胞的分化以及骨吸收，抑制破骨细胞 NF- κ B 的活性可以减弱这些炎症因子的释放，从而起到保护破骨细胞的作用。笔

者通过免疫荧光方法证实：在 Raw264.7 细胞中，不同浓度的枫叶黄酮（10、30 和 60 μM ）明显抑制了 LPS 诱导的 NF- κ B/p65 蛋白表达上调。

综上所述，枫叶黄酮可能是通过抑制 LPS 诱导细胞炎症信号通路中的关键蛋白 NF- κ B 的表达，从而抑制炎症蛋白酶的表达（如 iNOS 和 COX-2）和促炎细胞因子（如 TNF- α 和 IL-1 β ）的释放，发挥抗骨质疏松的作用，为骨质疏松症的预防和治疗提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] BAX B E, ALAM A S, BASHAB B, et al. Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 183 (3): 153 - 158.
- [2] 李云志, 曾凡俊. 元宝枫叶黄酮类化合物分离与鉴定 [J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 3 (18): 426 - 427.
- [3] 张黎, 陈志武, 王俞, 等. 银杏叶总黄酮抗炎作用及机制的探讨 [J]. *安徽医科大学学报*, 2001, 36 (5): 350 - 352.
- [4] SHI C, XIAO S, LIU J, et al. Ginkgo biloba extract EGb761 protects against aging-associated mitochondrial dysfunction in platelets and hippocampi of SAMP8 mice [J]. *Platelets*, 2010, 21 (5): 373 - 379.
- [5] SOEDARSONO N, RABELLO D, KAMEI H, et al. Evaluation of RANK/RANKL/OPG gene polymorphisms in aggressive periodontitis [J]. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 2009, 2 (1): 56 - 64.
- [6] NASON R, JUNG J Y, CHOLE R A. Lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis from mononuclear precursors: a mechanism for osteolysis in chronic otitis [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2009, 10 (2): 151 - 160.
- [7] CHEN L L, YAN J. Por Phyromonas gingivalis lipopolysaccharide activated bone resorption of osteoclast by inducing IL-1, TNF, and PGE [J]. *Acta Phannacol Sinica*, 2001, 22 (7): 614 - 618.
- [8] AN H J, KIM I T, PARK H J, et al. Tormentone acid, a triterpenoid saponin, isolated from *Rosa rugosa*, inhibited LPS-induced iNOS, COX-2, and TNF- α expression through inactivation of the nuclear factor- κ B pathway in RAW 264.7 macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11 (4): 504 - 510.
- [9] HELFRICH M H, EVANS D E, GRABOWSKI P S, et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures [J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12 (7): 1108 - 1115.
- [10] VAN'T HOF R J, ARMOUR K J, SMITH L M, et al. Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for

(下转第 13 页)