

桦褐孔菌醇抑制LPS诱导RAW264.7细胞炎症反应

朱彦彬, 徐鑫婷, 黎燕冰, 赵成铭, 黄庆年, 陈志宝

Effect of Inotodiol on LPS-induced Injury of RAW264.7 Cells

ZHU Yanbin, XU Xinting, LI Yanbing, ZHAO Chengming, HUANG Qingnian, and CHEN Zhibao

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022100017>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

红松松仁多糖对脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症反应的抑制作用

Inhibitory Effects of *Pinus koraiensis* Pine Nut Polysaccharide on Inflammatory Response of RAW264.7 Cells Induced by Lipopolysaccharide

食品工业科技. 2020, 41(11): 328-334 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.11.051>

铁观音茶提取物对脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症反应的抑制作用及机制

Inhibitory Effects and Mechanism of Tieguanyin Tea Extracts on LPS-induced Inflammatory Response in RAW264.7 Cells

食品工业科技. 2018, 39(17): 294-299 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.17.049>

基于RAW264.7细胞模型的不同茶类抗炎功能特性

Anti-inflammatory activities of six types of tea in LPS-induced RAW264.7 cells

食品工业科技. 2017(19): 67-73 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.19.013>

野生亚侧耳多糖的提取和对巨噬细胞Raw264.7的免疫调节作用研究

Extraction of Polysaccharides from Wild *Hohenbuehelia serotina* and Its Immunomodulatory Function in Raw264.7 Cells

食品工业科技. 2020, 41(4): 271-276 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.04.046>

鹿胎肽对巨噬细胞RAW264.7的免疫调节作用

Immunomodulatory Effects of Peptides from Deer Fetus on RAW264.7 Macrophages

食品工业科技. 2021, 42(1): 342-347 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019110029>

不同食用菌多糖复配物对RAW264.7巨噬细胞的免疫调节作用

Immunomodulatory Effects of Different Edible Fungi Polysaccharide Complex on RAW264.7 Macrophages

食品工业科技. 2021, 42(17): 366-372 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110143>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

朱彦彬,徐鑫婷,黎燕冰,等.桦褐孔菌醇抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症反应 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(19): 401–409. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100017

ZHU Yanbin, XU Xinting, LI Yanbing, et al. Effect of Inotodiol on LPS-induced Injury of RAW264.7 Cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(19): 401–409. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100017

· 营养与保健 ·

桦褐孔菌醇抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症反应

朱彦彬,徐鑫婷[†],黎燕冰,赵成铭,黄庆年,陈志宝^{*}
(广东海洋大学滨海农业学院,广东湛江 524088)

摘要: 探究桦褐孔菌醇 (INO) 对 LPS 诱导小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7) 炎症反应的影响。实验采用 CCK-8 实验检测 RAW264.7 细胞活力; 利用 Hoechst33342 和 PI 检测细胞凋亡; 应用酶联免疫吸附法、Griess 法测定细胞白介素-6 (IL-6)、白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-18 (IL-18) 分泌及细胞中一氧化氮 (NO) 含量; 利用荧光探针和试剂盒检测活性氧 (ROS) 生成及细胞中丙二醛 (MDA)、过氧化氢 (H₂O₂) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽 (GSH) 活性。结果表明 20 μ mol/L 的 INO 能抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞活力下降, 阻止细胞凋亡, 能极显著抑制 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IL-18 和 NO 的分泌 ($P<0.01$), 极显著降低细胞中 MDA、H₂O₂ 的含量 ($P<0.01$), 能极显著提高细胞中 SOD、CAT、GSH 活性 ($P<0.01$)。以上结果表明 INO 能有效抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中促炎因子和过氧化物的产生, 提高细胞抗炎和抗氧化能力, 从而保护细胞免受损伤。

关键词: 桦褐孔菌醇, LPS, RAW264.7 细胞, 炎症反应, 氧化应激

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)19-0401-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100017

本文网刊:



Effect of Inotodiol on LPS-induced Injury of RAW264.7 Cells

ZHU Yanbin, XU Xinting[†], LI Yanbing, ZHAO Chengming, HUANG Qingnian, CHEN Zhibao^{*}

(Coastal Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: To explore the effect of Inotodiol (INO) on the inflammatory response of LPS-induced mouse mononuclear macrophages (RAW264.7). The experiment has investigated *in vitro* the effects of INO on mouse mononuclear macrophages (RAW264.7) induced by LPS. To do this, the following methods were adopted: The viability of RAW264.7 cells was detected by CCK-8 assay. Cell apoptosis was examined by Hoechst33342 and PI. The secretion of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-18 (IL-18) and the content of nitric oxide (NO) in cells were measured by ELISA and Griess. The production of reactive oxygen species (ROS), the content of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H₂O₂), and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione (GSH) in cells were detected by fluorescence probe and kit. The results showed that 20 μ mol/L INO could inhibit the decline of RAW264.7 cell viability induced by LPS, prevent cell apoptosis, and significantly inhibit the secretion of IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-18 and NO ($P<0.01$), could significantly reduce the contents of MDA and H₂O₂ in cells ($P<0.01$), and could significantly increase the activities of SOD, CAT and GSH in cells ($P<0.01$). The above results indicate that INO can effectively inhibit the production of pro-inflammatory factors and superoxides induced by LPS in RAW264.7 cells, improve the anti-inflammatory and anti-oxidative abilities of cells, and thus protect cells from damage.

收稿日期: 2022-10-08 +并列第一作者

基金项目: 中国热带农业科学院热带生物技术研究所热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室开放课题专项项目 (1630052019001); 广东海洋大学大学生创新创业训练计划项目 (S202110566023); 广东省普通高校重点领域专项 (2020ZDZX1043); 广东海洋大学科研启动经费资助项目 (R20061)。

作者简介: 朱彦彬 (1997-), 男, 硕士, 研究方向: 动物生产学, E-mail: 2692627418@qq.com。

徐鑫婷 (2001-), 女, 大学本科, 研究方向: 动物医学, E-mail: 2415802567@qq.com。

* 通信作者: 陈志宝 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 分子药理学、动物疾病与药物防治研究, E-mail: chenzb@gdou.edu.cn。

Key words: inotodiol; LPS; RAW264.7 cells; the inflammatory response; oxidative stress

桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*)也称作白桦茸、桦树茸,多生于桦树的树皮下,并在树皮破损处形成肉瘤状的菌核。桦褐孔菌的活性极强,会不断吸去桦树养分,大约 10~15 年后会把桦树的精髓吸收殆尽。其主要分布在俄罗斯、北欧、日本北海道、中国北部黑龙江、吉林长白山等地^[1],并且桦褐孔菌可煎煮作为茶饮饮用,世界各国癌症患者也将其视为抗癌和防癌的天然药物。桦褐孔菌化学成分含量丰富,包含多糖类、三萜类、芳香族化合物、叶酸衍生物等^[2~4]。其中三萜类是桦褐孔菌的主要活性成分,有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒等功效^[5~7]。实验室前期研究证明桦褐孔菌乙醇提取物可有效抑制朊病毒复制^[8],从乙醇提取物中分离出的单体化合物对癌细胞有较好的细胞毒性,能显著抑制人肝癌细胞(BEL-7402)、人胃癌细胞(SGC-7901)、人肝癌细胞(HepG2)等细胞增殖^[9]。桦褐孔菌醇(Imotodiol, INO)是从桦褐孔菌中分离得到的三萜类化合物,是桦褐孔菌的主要标志性成分^[10],许多研究表明桦褐孔菌醇在抗肿瘤方面发挥较大的作用^[11],但对抗炎抗氧化功能研究甚少,目前仅有研究表明 INO 可减少哮喘小鼠炎性细胞的数量,降低炎症反应^[12]。但是 INO 是否主要发挥抗炎活性及发挥抗炎活性后对哪些因子产生作用尚不明确。

炎症是生物体内外环境受到有害刺激后产生的生理或病理反应,当机体的炎症反应过强时,会导致体内环境失衡、组织损伤等病理后果,从而加剧疾病恶化。巨噬细胞在炎症反应中起着至关重要的作用,当巨噬细胞的炎症反应被激活后,耗氧量提升,细胞中合成大量促炎因子,加速自由基的生成,进而导致氧化应激产生^[13]。氧化应激也会加重细胞的炎症反应,进一步对细胞或机体造成损伤。桦褐孔菌一直被当做药用真菌而得以应用,桦褐孔菌的活性普遍被认同,但从目前的开发现状而言,桦褐孔菌大多都是以子实体煎服或水提为主的粗提物,未对其中活性物质进行富集和分离,也很少对其单一物质的活性进行研究并将之开发成新型保健品或药品。目前大多数研究停留在对桦褐孔菌总三萜类化合物抗炎抗氧化活性的检测,但是进一步对其主要成分 INO 抗炎抗氧化活性的具体作用研究未见报道,因此本实验利用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞,通过建立体外炎症模型,分析 INO 对 RAW264.7 细胞的保护作用,为 INO 用于炎症治疗和产品开发提供理论基础和新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

桦褐孔菌 俄罗斯贝加尔湖; RAW264.7 细胞 购于中国科学院上海生命研究院细胞库; 柱层析用硅胶 购于青岛海洋化工集团公司; DMEM 培养基(8122114) 购于美国 Gibco 公司; 胎牛血清(FB-

15015) 购于美国 CLARK 公司; DMSO(0219605590) 购于美国 MP 公司; CCK-8 试剂盒(M4839) 购于美国 AbMole 公司; IL-6 ELISA 试剂盒(QS4289)、IL-1 β ELISA 试剂盒(QS42776)、IL-18 ELISA 试剂盒(QS42905)、TNF- α ELISA 试剂盒(QS42868) 购于北京奇松生物科技有限公司; 一氧化氮(NO)检测试剂盒(A013-2-1)、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(A001-3-2) 购于南京建成生物工程研究所; 过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(BC0205)、乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(BC0685)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(BC0025)、谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(BC1175)、过氧化氢(H₂O₂)检测试剂盒(BC3595), Hoechst33342(C0031)、PI(P8080)荧光染料 北京索莱宝科技有限公司; ROS 检测试剂盒(S0033S) 上海碧云天生物技术有限公司。

N-1200B 旋转蒸发仪 上海爱朗仪器有限公司; 3K15 高速冷冻离心机 德国 Sigma 公司; MOC-18AIC 二氧化碳恒温细胞培养箱 日本 SANYO 公司; CKX53 倒置显微镜、XD30 荧光显微镜 日本 Olympus 公司; FC 型 Thermo 酶标仪 上海赛默飞世尔仪器有限公司; 2HH.SY-24 恒温水浴锅 北京精科华瑞仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 桦褐孔菌醇(INO)分离提取及鉴定 参考文献 [14~16] 方法提取 INO。把呈块状的桦褐孔菌进行粉碎后,用 95% 的乙醇反复浸泡提取 3 次,通过减压浓缩获得乙醇提取物。将获得的乙醇提取物用水分散,并依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,重复 3 次后便获得石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物。取乙酸乙酯萃取物,经过减压硅胶色谱,调节流速为 6 mL/min,以石油醚-乙酸乙酯(100:1→1:1)梯度洗脱得到 28 个流份(Fr.1~Fr.28)。

取 Fr.5 先经 C₁₈ 反相硅胶柱色谱,调节流速为 2 mL/min,以甲醇-水(1:1→1:0)梯度洗脱,得到 25 个流分(subfr.5-1~subfr.5-25)。subfr.5-22 经硅胶柱色谱,调节流速为 2 mL/min,以石油醚-乙酸乙酯(100:1→4:1)梯度洗脱,得到 17 个流分(subfr.5-22-1~subfr.5-22-17)。通过重结晶 subfr.5-22-13 得到 INO,加入少量氯仿溶解 subfr.5-22-23 后,重结晶得到 INO。INO 分离纯化流程如图 1 所示。

将分离得到的化合物用可溶解的氘代试剂溶解(常用的氘代试剂有 CDCl₃、CD₃OD、C₃D₆O、DMSO、C₅D₅N 等),少量多次转移到干净的核磁管中,封口膜密封,进行核磁共振测试。根据¹D NMR 确定化合物的纯度,微谱数据库判断是否为已知化合物。

1.2.2 RAW264.7 细胞培养和分组 将冻存的细胞进行复苏,复苏后的细胞用含 10%FBS 和 1% 双抗的 DMEM 培养基,放置在 37 °C、体积分为 5% 的 CO₂

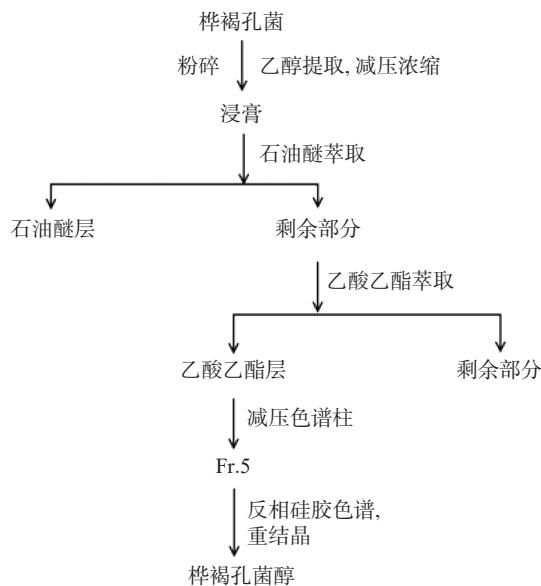


图 1 INO 分离纯化流程图

Fig.1 Flow chart of isolation and purification of inotodiol

恒温培养箱中培养, 待细胞密度大约达到 80%~90% 时, 按照 1:3 或 1:5 的比例对细胞进行传代处理。将细胞分为对照组、LPS 组、INO 低浓度组、INO 中浓度组、INO 高浓度组, 用于后续实验。

1.2.3 INO 和 LPS 对 RAW264.7 细胞活力的影响
取对数生长期细胞, 以 1×10^4 /孔的数量将细胞接种到 96 孔板中, 放置在 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 恒温培养箱中培养 12 h, 待细胞完全贴壁。分别用浓度为 0、1、2.5、5、10、20、40、80、160 μmol/L 的 INO 处理细胞 3、6、12、24 h, 用 12.5、25、50、100、200 μg/mL 的 LPS 溶液分别处理细胞 6、12、24 h, 之后加入 10% CCK-8 溶液, 放入培养箱中孵育 1 h。用酶标仪在 450 nm 处测定各组的吸光度值并计算出各组的细胞活力值。根据细胞活力来确定 INO 和 LPS 最佳处理时间及浓度, 将细胞分为对照组、LPS 组 (LPS 50 μg/mL)、INO 低浓度组 (INO 5 μmol/L+LPS 50 μg/mL)、INO 中浓度组 (INO 10 μmol/L+LPS 50 μg/mL)、INO 高浓度组 (INO 20 μmol/L+LPS 50 μg/mL), 检测 INO 对 LPS 刺激细胞后 RAW264.7 细胞的活力。细胞活力计算公式如下:

$$\text{细胞活力}(\%) = (A_{\text{样本}} - A_0) / (A_{\text{空白}} - A_0) \times 100$$

1.2.4 INO 对 RAW264.7 细胞凋亡的影响 将细胞接种到 24 孔板中并将细胞分为对照组、LPS 组、INO 低浓度组、INO 中浓度组、INO 高浓度组, 放入培养箱中孵育。用 PBS 洗涤处理后的细胞 2 次。用 PBS 对 Hoechst33342 和 PI 染料进行稀释, 每 100 μL PBS 中加入 1 μL 染料, 将配制好的染料依次加入, 冰浴或 4 °C 条件下孵育 20~30 min。孵育结束后用荧光显微进行观察。利用 Image J 软件分析凋亡细胞的相对荧光强度, 并将各组数据标准化为对照组荧光强度。

1.2.5 INO 对 RAW264.7 细胞炎性因子和 NO 的影响 利用试剂盒检测 RAW264.7 细胞培养液中炎性因子的含量。将细胞分为对照组、LPS 组、INO 低浓度组、INO 中浓度组、INO 高浓度组, 并进行药物处理, 收集处理后的细胞培养液于 1.5 mL 离心管中, 根据 ELISA 试剂盒和 NO 含量测定试剂盒的操作说明对细胞培养液中 IL-6、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、NO 含量进行检测, 并计算出各个炎性因子的含量。

1.2.6 INO 对 RAW264.7 细胞内 ROS 含量的影响

将细胞接种到 24 孔板中并将细胞分为对照组、LPS 组、INO 低浓度组、INO 中浓度组、INO 高浓度组, 取出药物处理后的细胞, 弃除培养液, 用 PBS 洗涤 2 次。将 DCFH-DA 荧光探针用 PBS 按照 1:500 比例进行稀释, 并加入到培养板中, 37 °C, 避光孵育 20 min。20 min 后取出细胞, 用 PBS 洗涤 2~3 次, 利用荧光显微镜进行观察, 利用 Image J 软件分析各组细胞中 ROS 荧光强度, 并将各组数据标准化为对照组荧光强度。

1.2.7 INO 对 RAW264.7 细胞中 SOD、LDH、MDA、GSH、CAT、H₂O₂ 水平的影响 将细胞接种到 6 孔板中并将细胞分为对照组、LPS 组、INO 低浓度组、INO 中浓度组、INO 高浓度组, 进行药物处理, 收集处理后的细胞, 离心取上清液于 1.5 mL 离心管中, 细胞用 PBS 洗涤 2 次, 加入相应细胞提取液, 冰浴条件下对细胞进行超声破碎, 200 W, 3 s/次, 间隔 9 s, 循环 30 次。按照相应试剂盒方法检测细胞中 SOD、LDH、MDA、GSH、CAT、H₂O₂ 水平。

1.3 数据处理

本实验所有数据均采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 利用 Graphad Prism 软件进行绘图制作, 使用 SPSS23.0 软件进行统计分析。显著性差异表示为: 与对照组相比用“*”表示, $*(P < 0.05)$, $**(P < 0.01)$, $***(P < 0.001)$; 与 LPS 组相比用“#”表示, $%(P < 0.05)$, $##(P < 0.01)$, $###(P < 0.001)$ 。

2 结果与分析

2.1 桦褐孔菌醇 (INO) 化合物结构鉴定

INO 样品呈白色, 粉末状, 溶于氯仿; ESI-MS m/z 465.6[M+Na]⁺; 分子式 C₃₀H₅₀O₂; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δH 5.18(1H, t, J=7.0 Hz, H-24), 3.66(1H, m, H-22), 3.23(1H, dd, J=11.5, 3.9 Hz, H-3), 2.05(2H, m, H-23), 2.04(2H, m, H-7), 2.02(2H, m, H-11), 1.81(1H, m, H-16a), 1.79(1H, m, H-20), 1.74(3H, s, H-26), 1.73(1H, m, H-1a), 1.72(2H, m, H-12), 1.68(1H, m, H-6a), 1.65(3H, s, H-27), 1.63(2H, m, H-2), 1.62(1H, m, H-15a), 1.55(1H, m, H-17), 1.51(1H, m, H-6b), 1.42(1H, m, H-16b), 1.23(1H, m, H-1b), 1.19(1H, m, H-15b), 1.05(1H, d, J=12.6 Hz, H-5), 1.00(3H, s, H-29), 0.98(3H, s, H-19), 0.94(3H, d, J=6.5 Hz, H-21), 0.87(3H, s, H-30), 0.81

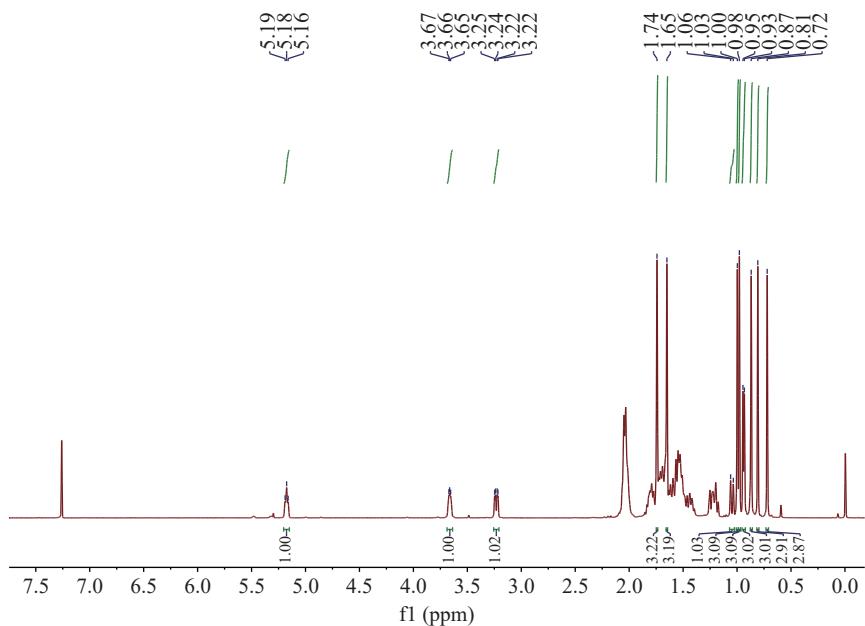


图 2 INO 的¹H NMR 图

Fig.2 ^1H NMR diagram of inotodiol

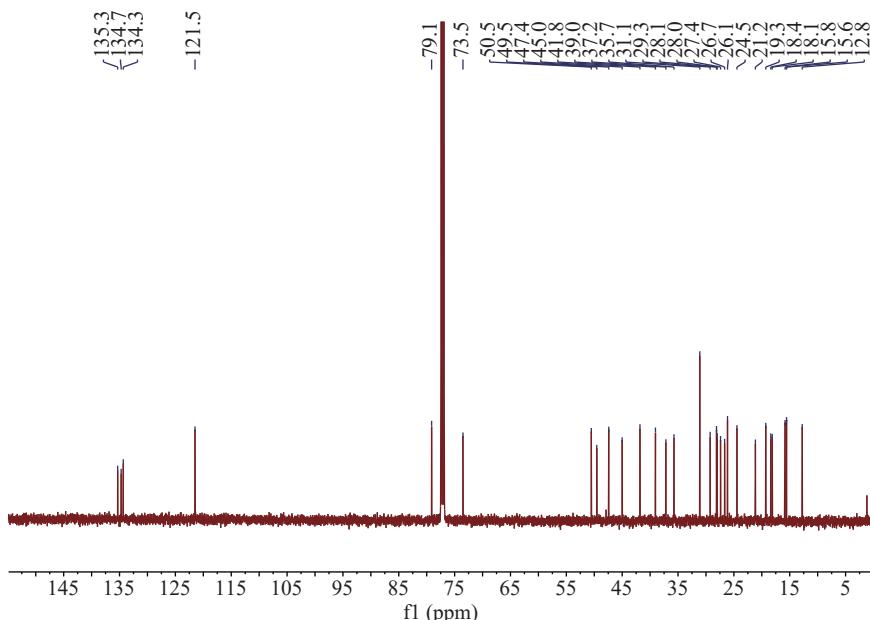


图 3 INO 的¹³C NMR 图

Fig.3 ^{13}C NMR diagram of inotodiol

(3H, s, H-28), 0.72(3H, s, H-18)(图2); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3)(图3)。该化合物经数据比对, 确定为 INO 。

2.2 桤褐孔菌醇 (INO) 对 RAW264.7 细胞活力的影响

高浓度药物或不同给药时间均可对细胞产生毒性作用,为防止高浓度 INO 对细胞造成损伤影响实验准确性,本实验采用 CCK-8 方法对 INO 进行细胞安全性评价,根据不同浓度 INO 对细胞活力的影响,确定其安全浓度范围,并选择最佳给药浓度及时间。用 0、2.5、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 INO 对 RAW264.7 细胞分别处理 3、6、12、24 h,利用 CCK-8 法检测细胞活力,结果如图 4 所示,INO 处

理 RAW264.7 细胞 3 h 后, 各浓度组细胞活力无显著性差异; 处理 6 h 后, 当浓度为 160 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活力显著下降 ($P<0.05$); 处理 12、24 h 后, 随着 INO 浓度提升, 细胞活力呈现下降趋势, 当 INO 浓度大于 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活力显著降低 ($P<0.05$), 并呈现剂量依赖性; 处理 12 h 与 24 h 后, INO 的最大安全剂量稳定在 20 $\mu\text{mol/L}$, 所以可得出 INO 对 RAW264.7 细胞的安全浓度范围为 0~20 $\mu\text{mol/L}$ 。根据细胞活力的结果, 最终本实验选择 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验的 INO 浓度梯度, 12 h 为 INO 处理 RAW264.7 细胞的最佳处理时间。

2.3 LPS 对 RAW264.7 细胞活力影响

LPS 可以刺激 RAW264.7 细胞产生炎症，并引

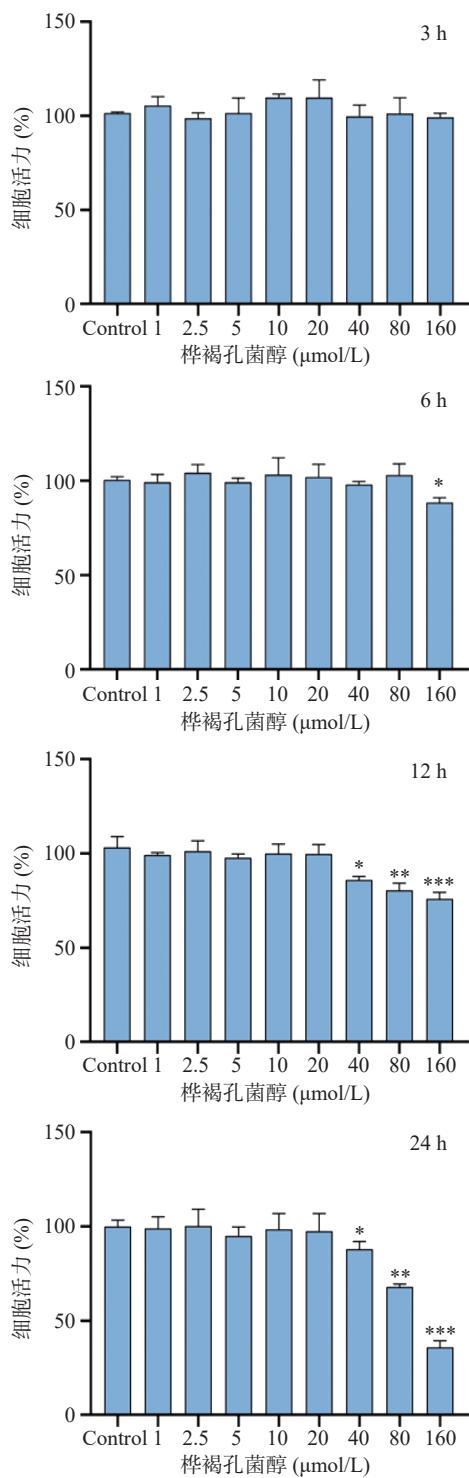


图 4 不同浓度 INO 处理不同时间对 RAW264.7 细胞活力的影响

Fig.4 Effect of different concentration of inotodiol on RAW264.7 cell viability

注: 与对照组相比用“*”表示显著性差异, *($P<0.05$), **($P<0.01$), ***($P<0.001$); 图 6 同。

发其细胞形态上的变化。在光学显微镜下观察细胞形态变化如图 5 所示, 正常状态下 RAW264.7 细胞贴壁生长通常呈圆形或椭圆形, 以圆形居多, 在显微镜下观察细胞透亮。RAW264.7 细胞经过 50 $\mu\text{mol/L}$ LPS 处理后, 细胞发生形变, 并分化出大量触角, 部分细胞也出现死亡。用 CCK-8 检测 RAW264.7 细胞

活力, 结果如图 6 所示, 随着 LPS 浓度的增长, 各处理时间的细胞活力均呈现下降趋势, 当 LPS 浓度达到 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞活力均显著降低($P<0.001$), 并且随着处理时间的延长, 显著性也逐渐升高, 当处理 12 h 时, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 LPS 使得 RAW264.7 细胞活力达到 55% 左右, 最终确定 LPS 刺激浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, 处理时间为 12 h。

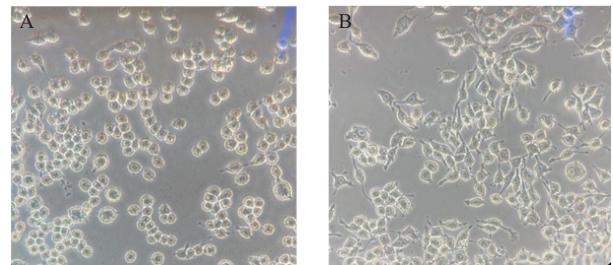


图 5 LPS 处理 RAW264.7 细胞显微拍照图(200 \times)
Fig.5 Micrograph of RAW264.7 cells treated with LPS (200 \times)
注: A: 对照组; B: LPS 处理组。

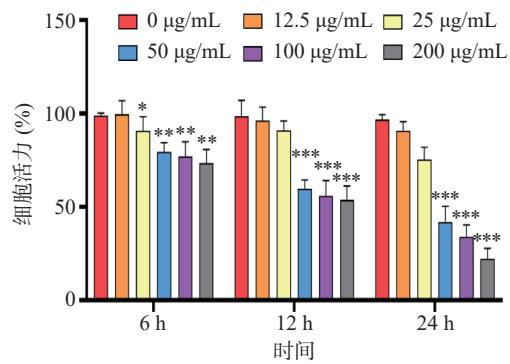


图 6 不同浓度 LPS 对 RAW264.7 细胞活力的影响
Fig.6 Effect of different content of LPS on the viability of RAW264.7 cells

2.4 INO 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞活力的影响

为了验证和 INO 对 RAW264.7 细胞的保护作用, 本实验首先用 INO 对细胞进行 12 h 的预处理, 再加入 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 进行刺激, 12 h 后用 CCK-

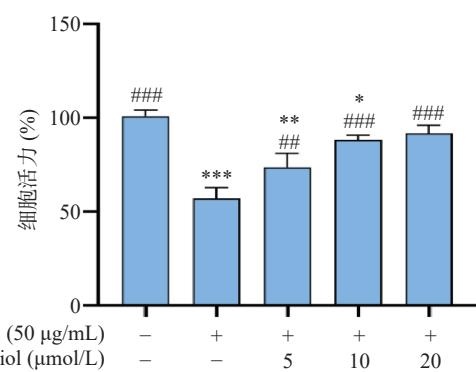


图 7 INO 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞活力的影响
Fig.7 Effect of inotodiol on LPS induced RAW264.7 cell viability

注: 与对照组相比用“*”表示差异显著, *($P<0.05$), **($P<0.01$), ***($P<0.001$); 与 LPS 组相比用“#”表示差异显著, #($P<0.05$), #($P<0.01$), ###($P<0.001$); 图 8~图 11 同。

8检测RAW264.7细胞活力,结果如图7所示,LPS组细胞活力与对照组相比显著降低($P<0.01$),用INO预保护后,各浓度INO组细胞活力与LPS组相比均显著升高($P<0.01$),并随INO浓度的提高呈现浓度依赖性,当INO到达20 $\mu\text{mol/L}$ 时,与对照组相比无显著性差异($P>0.05$)。实验表明INO对RAW264.7细胞有较好的保护效果,能够有效缓解LPS对其造成的损伤,减少细胞死亡,但是具体的调节作用尚不明确。

2.5 INO对LPS诱导的RAW264.7细胞凋亡的影响

CCK-8实验证明INO可以缓解LPS诱导的RAW264.7细胞损伤,提高细胞活力。而RAW264.7细胞损伤的同时会促使细胞凋亡,从而清除损伤细胞。为了验证INO是否可以抑制细胞凋亡,通过Hoechst33342/PI对细胞进行染色,利用荧光显微镜观察细胞凋亡情况。实验结果如图8所示,LPS处理细胞后凋亡细胞数量增加极显著($P<0.01$),INO保护后,凋亡细胞数量极显著降低($P<0.01$),并呈现浓度依赖性降低。这表明,INO能显著抑制LPS诱导的RAW264.7细胞凋亡。

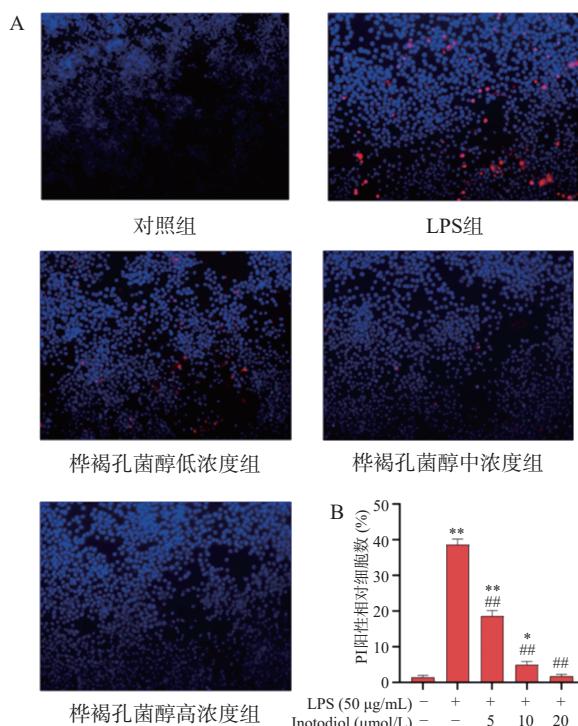


图8 INO对RAW264.7细胞凋亡的影响(200×)

Fig.8 Effect of inonitol on RAW264.7 cell apoptosis (200×)

注: A: 荧光显微镜观察细胞结果; B: 细胞凋亡结果。

2.6 INO对RAW264.7细胞IL-6、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、NO的影响

当RAW264.7细胞受到LPS刺激,会产生炎症反应,并大量分泌促炎因子,加剧细胞的炎症反应^[17]。如图9实验结果表明LPS组细胞的上清液中IL-6、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、NO含量最高,与对照组相比差异显著($P<0.05$),可以证明此时细胞已经

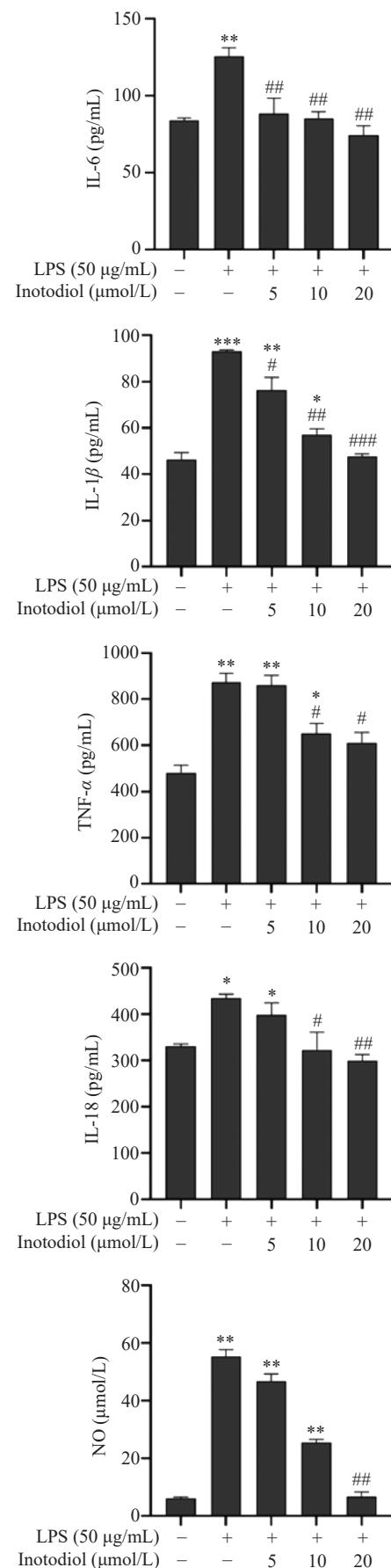


图9 RAW264.7细胞培养液中IL-6、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、NO含量

Fig.9 Contents of IL-6, IL-1 β , IL-18, TNF- α and NO in RAW264.7 cell culture medium

发生炎症反应, 当使用 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 INO 进行保护后与 LPS 组相比, IL-6、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、NO 含量均显著性降低($P<0.05$), 并随 INO 浓度升高呈现剂量依赖性。实验表明, INO 可有效缓解 LPS 引发的促炎因子的升高, 缓解细胞炎症反应, 从而保护细胞。

2.7 INO 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞内 ROS 含量的影响

LPS 可激活细胞产生炎症反应, 同时也可引起细胞内 ROS 和自由基大量积累, 引发氧化应激。细胞产生氧化应激会加剧炎症反应, 形成恶性循环, 最终导致细胞损伤, 功能受损。如图 10 所示, 与对照组相比, LPS 组细胞内 ROS 水平增加极显著($P<0.01$); 各 INO 组细胞内 ROS 水平与 LPS 相比极显著降低($P<0.01$), 并呈现浓度依赖性, 证明 INO 可有效降低细胞内 ROS 水平, 初步证明可缓解 LPS 引发的氧化应激。

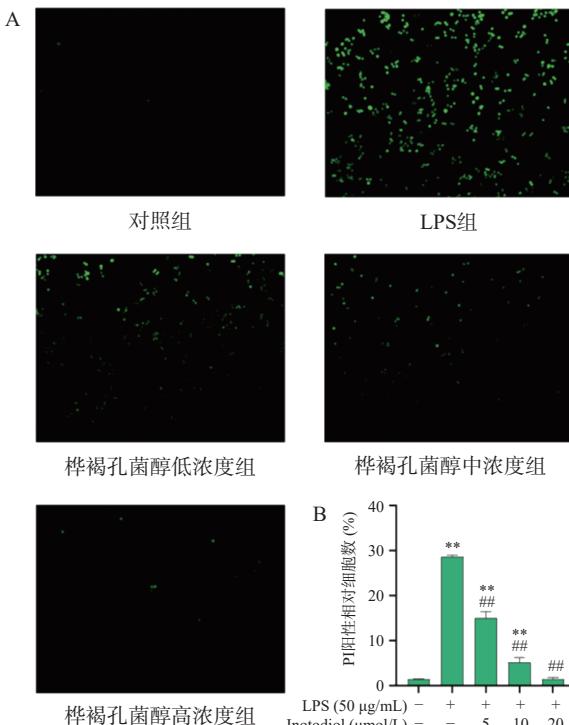


图 10 RAW264.7 细胞 ROS 水平($200\times$)

Fig.10 RAW264.7 cells ROS level ($200\times$)

注: A: 荧光显微镜观察细胞结果; B: ROS 水平结果。

2.8 INO 对 RAW264.7 细胞 MDA、GSH、LDH 水平及 SOD 活性的影响

MDA 是脂质过氧化的产物, 其含量可以直接证明氧化应激下细胞膜的损伤程度^[18]; LDH 存在于细胞内, 当细胞受损, LDH 被释放到细胞外, 细胞外 LDH 的含量可以直接反映细胞整体的受损程度^[19]。如表 1 所示, 与对照组相比, LPS 组 MDA、LDH 含量极显著升高($P<0.01$), 证明 LPS 使细胞膜受损, 导致胞内 LDH 大量释放。与 LPS 组相比, $20 \mu\text{mol/L}$ 的 INO 组 MDA、LDH 含量极显著降低($P<0.01$),

并呈现剂量依赖性, 表明 INO 能够有效缓解 LPS 诱导的细胞损伤, 抑制 MDA、LDH 的增加与释放。检测 GSH、SOD 结果显示, 与对照组相比, LPS 组细胞内 GSH 和 SOD 被明显抑制, GSH 含量极显著降低($P<0.01$)、SOD 活性极显著下降($P<0.01$)。与 LPS 组相比, $20 \mu\text{mol/L}$ 的 INO 使细胞中 GSH 含量极显著升高($P<0.01$)、SOD 活性极显著增强($P<0.01$), 这表明 INO 可通过提高细胞内 GSH 含量及 SOD 活性发挥抗氧化作用, 从而保护细胞缓解氧化应激对细胞造成的损伤。

表 1 INO 对 MDA、GSH 水平及 SOD、LDH 活性的影响

Table 1 Effects of inonotol on the levels of MDA, GSH and the activities of SOD and LDH

	MDA (nmol·mg ⁻¹)	SOD (U·mg ⁻¹)	GSH (μg·mg ⁻¹)	LDH (U·mL ⁻¹)
对照组	5.216± 0.945	29.893± 2.366	20.271± 0.709	72.957± 0.972
LPS组	15.151± 1.746**	8.144± 1.170**	10.698± 0.954**	140.649± 2.760**
INO低浓度组	11.866± 1.920**	17.409± 2.007**	16.152± 0.601**	84.936± 1.675**
INO中浓度组	8.363± 0.748**	32.148± 1.918*	17.695± 0.911**	80.850± 2.275**
INO高浓度组	5.485± 1.032##	41.044± 3.391***	20.376± 0.256##	68.964± 0.739##

注: 与对照组相比用“*”表示, $^{*}(P<0.05)$, $^{**}(P<0.01)$; 与 LPS 组相比用“#”表示, $^{*}(P<0.05)$, $^{##}(P<0.01)$ 。

2.9 INO 对 RAW264.7 细胞 H_2O_2 水平及 CAT 活性的影响

CAT 是清除细胞内 H_2O_2 的关键酶, 可将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 , 保护细胞免受损伤^[20]。如图 11,

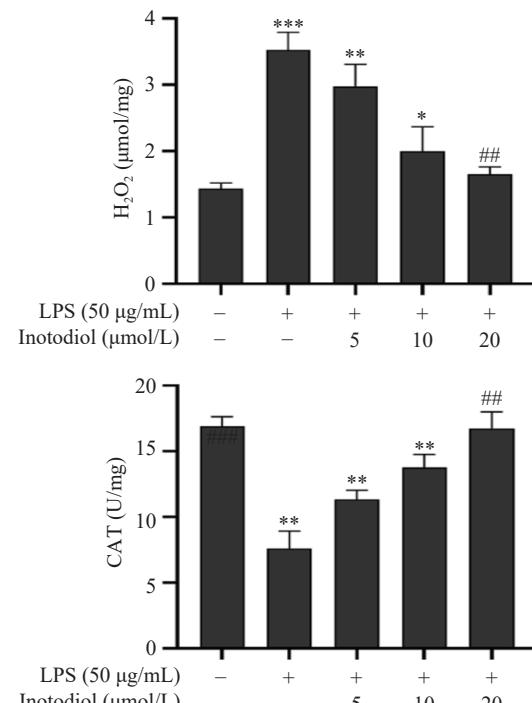


图 11 INO 对细胞 H_2O_2 水平及 CAT 活性的影响

Fig.11 Effects of inonotol on H_2O_2 level and CAT activity of cells

与对照组相比, LPS 组 H_2O_2 含量极显著升高 ($P < 0.01$), CAT 活性极显著降低 ($P < 0.01$)。与 LPS 相比 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 INO 使细胞中 H_2O_2 含量极显著降低 ($P < 0.01$), CAT 活性极显著提升 ($P < 0.01$), 表明 INO 可提高细胞内 CAT 活性, 帮助细胞清除氧化应激产生的 H_2O_2 , 发挥抗氧化作用。

3 讨论与结论

巨噬细胞是机体炎症反应中的主要参与者。机体发生炎症反应时, 巨噬细胞会吞噬病原体并与相应的抗体形成抗原抗体复合物, 将病原体清除^[21]。巨噬细胞在不同的调控作用下会发生极化, 加剧机体炎症反应^[22]。LPS 可诱巨噬细胞向 M1 型极化, 并分泌不同的细胞因子发挥免疫调节作用^[23-25], 导致促炎因子大量生成并释放^[26], 还能刺激 NO 产生, 加剧对细胞的损伤, 进而引发多种炎症疾病破坏机体健康^[27]。实验结果表明, LPS 刺激 RAW264.7 细胞后, 细胞活力与对照组相比显著下降, 导致 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的分泌和 NO 含量显著提高, 桦褐孔菌醇(INO)可有效提高 RAW264.7 细胞活力, 抑制细胞促炎因子分泌, 减轻细胞的炎症反应。促炎因子的大量释放还会激活细胞的凋亡程序, 引发细胞凋亡^[28-29]。细胞凋亡结果显示, LPS 处理 RAW264.7 细胞后, 细胞凋亡率到达 38%, 而 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 INO 可有效阻止细胞凋亡的发生, 使凋亡率降低到 2%, 与对照组相比无显著差异。IL-18 主要由巨噬细胞合成并表达, 能促进细胞中炎性小体的成熟诱导细胞产生严重的炎症性损伤^[30]。实验结果表明, LPS 刺激 RAW264.7 后, 细胞大量分泌 IL-18, 而 INO 能有效抑制 IL-18 的分泌, 减轻细胞的炎症性损伤。以上结果表明, INO 可以提高 RAW264.7 细胞活力, 抑制细胞促炎因子的分泌, 降低细胞 NO 的合成, 减轻细胞凋亡, 发挥抗炎活性缓解 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的炎症损伤。

炎症的发生也会伴随氧化应激的产生^[31], 当细胞出现炎症反应, 细胞本身会产生 ROS 抵御病原体的攻击。而 ROS 又是巨噬细胞经典的促炎介质^[32], 未被清除的 ROS 加剧细胞的炎症反应, 提高细胞内 MDA、LDH、 H_2O_2 含量, 抑制细胞中抗氧化酶活性, 最终导致细胞损伤, 发生凋亡, 甚至死亡。实验结果表明, LPS 刺激 RAW264.7 细胞后, ROS、 H_2O_2 、MDA、LDH 含量与对照组相比显著提高, 说明细胞发生氧化应激, 使细胞活力下降; INO 处理 RAW264.7 细胞后, 能显著提高细胞中 SOD、GSH、CAT 活性, 降低细胞中 ROS、 H_2O_2 含量, 抑制细胞氧化应激反应, 同时细胞中 MDA、LDH 含量的降低, 表明细胞损伤得到缓解, 使 INO 高浓度组细胞活力恢复到 98%, 与对照组无显著差异。以上结果表明 INO 能通过提高 RAW264.7 细胞中 SOD、GSH、CAT 活性, 抑制细胞中 ROS、 H_2O_2 的生成, 发挥抗氧化活性提高 RAW264.7 细胞活力缓解 LPS 诱导的氧化应激反应, 保护细胞免受损伤。

综上所述, INO 能有效抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞促炎因子分泌, 提高细胞中抗氧化酶活性, 降低细胞的炎症和氧化应激反应, 缓解 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞损伤。这说明 INO 具有较好抗炎作用, 但对其具体的调控机制尚未明确, 有待进一步研究。桦褐孔菌由于其天然、绿色、安全、具有多种药学活性, 为功能性食品开发和炎症疾病防治提供实验依据。

参考文献

- [1] 黄年来. 俄罗斯神秘的民间药用真菌-桦褐孔菌[J]. 中国食用菌, 2002(4): 7-8. [HUANG N L. A mysterious folk medicinal fungus in Russia-*Inonotus obliquus*[J]. Chinese Edible Fungi, 2002(4): 7-8.]
- [2] LU Y, JIA Y, XUE Z, et al. Recent developments in *Inonotus obliquus* (Chaga mushroom) polysaccharides: isolation, structural characteristics, biological activities and application[J]. *Polymers (Basel)*, 2021, 13(9): 1441.
- [3] ZOU C X, ZHANG Y Y, BAI M, et al. Aromatic compounds from the sclerotia of *Inonotus obliquus*[J]. *Natural Product Research*, 2021, 35(14): 2454-2457.
- [4] 魏艳梅. 桦褐孔菌中化合物的分离鉴定及其部分生物活性初探[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2020. [WEI Y M. Isolation and identification of compounds from *Inonotus obliquus* and preliminary study on some biological activities[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University, 2020.]
- [5] PENG A, LIU S, FANG L, et al. *Inonotus obliquus* and its bioactive compounds alleviate non-alcoholic fatty liver disease via regulating FXR/SHP/SREBP-1c axis[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2022, 921: 174841.
- [6] LEE M G, KWON Y S, NAM K S, et al. Chaga mushroom extract induces autophagy via the AMPK-mTOR signaling pathway in breast cancer cells[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 274: 114081.
- [7] KIM J, YANG S C, HWANG A Y, et al. Composition of triterpenoids in *Inonotus obliquus* and their anti-proliferative activity on cancer cell lines[J]. *Molecules*, 2020, 25(18): 4066.
- [8] 杨微, 陈志宝, 陈操, 等. 桦褐孔菌乙醇粗提物对朊病毒复制的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(7): 8-13. [YANG W, CHEN Z B, CHEN C, et al. Inhibitory effect of ethanol crude extract of *Inonotus obliquus* on prion replication[J]. Modern Food Technology, 2021, 37(7): 8-13.]
- [9] 魏艳梅, 陈惠琴, 杨理, 等. 桦褐孔菌化学成分的胆碱酯酶抑制和细胞毒活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(7): 1156-1163. [WEI Y M, CHEN H Q, YANG L, et al. Cholinesterase inhibition and cytotoxic activity of chemical components of *Inonotus obliquus*[J]. Research and Development of Natural Products, 2020, 32(7): 1156-1163.]
- [10] 贺紫薇, 刘旭, 李东辉, 等. 桦褐孔菌研究进展[J]. 中医药信息, 2020, 37(2): 119-123. [HE Z W, LIU X, LI D H, et al. Research progress of *Inonotus obliquus*[J]. Information of Traditional Chinese Medicine, 2020, 37(2): 119-123.]
- [11] ZHAO Y, ZHENG W. Deciphering the antitumoral potential of the bioactive metabolites from medicinal mushroom *Inonotus obliquus*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 265: 113321.
- [12] 张如平, 姚建南, 李国立, 等. 桦褐孔菌多糖抗哮喘作用实验研究[J]. 当代医学, 2012, 18(12): 19-20. [ZHANG R P, YAO J N, LI G L, et al. Experimental study on anti asthma effect of *Inonotus obliquus* polysaccharide[J]. Contemporary Medicine, 2012, 18]

- (12): 19–20.]
- [13] MATYAS C, HASKÓ G, LIAUDET L, et al. Interplay of cardiovascular mediators, oxidative stress and inflammation in liver disease and its complications[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2021, 18(2): 117–135.
- [14] DU D, ZHU F, CEHN X, et al. Rapid isolation and purification of inotodiol and trametenolic acid from *Inotodiol obliquus* by high speed counter current chromatography with evaporative light scattering detection[J]. *Phytochemical Analysis*, 2011, 22(5): 419–423.
- [15] KUKULIANSKAIA T A, KURCHENKO N V, KURCHENKO V P, et al. Physicochemical properties of melanins produced by *Inonotus obliquus* (“chagi”) in the nature and the cultivated fungus [J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2002, 38: 68–72.
- [16] WANG Y, GUO L, LIU C, et al. Total triterpenoid extraction from *Inonotus obliquus* using ionic liquids and separation of potential lactate dehydrogenase inhibitors via ultrafiltration high-speed countercurrent chromatography[J]. *Molecules*, 2021, 26(9): 2467.
- [17] XU R, MA L, CEHN T, et al. Sophorolipid suppresses lps-induced inflammation in RAW264.7 cells through the NF- κ B signaling pathway[J]. *Molecules*, 2022, 27(15): 5037.
- [18] GAWEL S, WARDAS M, NIEDWOROK E, et al. Dialdehyd malonowy (MDA) jako wskaźnik procesów peroksydacji lipidów w organizmie [Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker][J]. *Wiad Lek*, 2004, 57(9–10): 453–455.
- [19] MAEKAWA M. Lactate dehydrogenase (LDH)[J]. *Nihon Rinsho*, 1995, 53(5): 1151–1156.
- [20] ZHANG Z, XU Y, XIE Z, et al. Association-dissociation of glycolate oxidase with catalase in rice: A potential switch to modulate intracellular H₂O₂ levels[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(5): 737–748.
- [21] SHAPOURI M A, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(9): 6425–6440.
- [22] MILLS C D. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease[J]. *Critical Reviews in Immunology*, 2012, 32(6): 463–88.
- [23] QIU P, LIU Y, ZHANG J. Review: The role and mechanisms of macrophage autophagy in sepsis[J]. *Inflammation*, 2019, 42(1): 6–19.
- [24] KADOMOTO S, IZUMI K, MIZOKAMI A. Macrophage polarity and disease control[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 23(1): 144.
- [25] WYNN T A, VANNELLA K M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis[J]. *Immunity*, 2016, 44(3): 450–462.
- [26] OISHI Y, MANABE I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration[J]. *International Immunology*, 2018, 30(11): 511–528.
- [27] AGGARWAL B B, GUPTA S C, KIM J H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey[J]. *Blood*, 2012, 119(3): 651–655.
- [28] BEDOUI S, HEROLD M J, STRASSER A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020, 21(11): 678–695.
- [29] CHU W M. Tumor necrosis factor[J]. *Cancer Letter*, 2013, 328(2): 222–225.
- [30] VECCHIÉ A, BONAVENTURA A, TOLDO S, et al. IL-18 and infections: Is there a role for targeted therapies?[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(3): 1638–1657.
- [31] LEE S, SEOK B G, LEE S J, et al. Inhibition of mito NEET attenuates LPS-induced inflammation and oxidative stress[J]. *Cell Death and Disease*, 2022, 13(2): 127.
- [32] HERB M, SCHRAMM M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(2): 313.