

# 石蒜碱对内毒素致炎症小鼠体内体外 COX-2的影响

抗晶晶<sup>1</sup>,李桂兰<sup>2</sup>,王 期<sup>2</sup>,殷志敏<sup>2</sup>

(1.黄河科技学院医学院生化教研室,河南 郑州 450063)

(2.南京师范大学生命科学学院,江苏省分子医学与生物技术重点实验室,江苏 南京 210023)

**[摘要]** 研究石蒜碱对内毒素导致的炎症小鼠体内体外 COX-2 的影响.通过内毒素诱导的小鼠建立急性肺损伤(ALI)模型,采用内毒素诱导的 RAW264.7 巨噬细胞建立细胞炎症反应模型,利用 Western blot 技术检测小鼠肺组织以及 RAW264.7 巨噬细胞中 COX-2 蛋白的表达量.结果显示,石蒜碱能够在体内、体外显著抑制内毒素诱导的 COX-2 的蛋白表达,并加快 COX-2 蛋白的降解速度.石蒜碱能够有效降低内毒素导致的炎症小鼠体内、体外 COX-2 的蛋白水平.

**[关键词]** 石蒜碱,内毒素,COX-2,急性肺损伤,RAW264.7 巨噬细胞

**[中图分类号]**R392.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1001-4616(2016)01-0086-04

## The Effect of Lycorine on LPS-Induced COX-2 *in vivo* and *in vitro*

Kang Jingjing<sup>1</sup>, Li Guilan<sup>2</sup>, Wang Qi<sup>2</sup>, Yin Zhimin<sup>2</sup>

(1.Department of Biochemistry, School of Medicine, Huanghe College of Science and Technology, Zhengzhou 450063, China)

(2.School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medicine Biotechnology, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** The object of this study was to explore the effect of lycorine on LPS-induced COX-2 *in vivo* and *in vitro*. The mice induced by LPS was used as an acute lung injury (ALI) model. The RAW264.7 cells induced by LPS was used as a cell model. The effect of lycorine was evaluated by Western blot for protein expression of COX-2 in lung tissue as well as in RAW264.7 cells. The results showed that lycorine could inhibit the expression of COX-2 protein *in vivo* and *in vitro* obviously and promote the protein degradation of COX-2 protein in RAW264.7 cells. In conclusion, lycorine could effectively reduce the protein level of COX-2 induced by LPS *in vivo* and *in vitro*.

**Key words:** lycorine, LPS, COX-2, acute lung injury, RAW264.7 cells

中药石蒜为石蒜科(*Amaryllidaceae*)植物石蒜(*Lycoris radiata Herb*)的鳞茎,作为一种传统的药用植物,在临床上有着悠久的历史.石蒜碱(Lycorine)是从石蒜鳞茎中分离出的含量较高的生物碱成分,药理作用广泛<sup>[1]</sup>.环氧合酶-2(COX-2, cyclooxygenase-2)是前列腺素合成过程中的限速酶,已有研究表明,COX-2 在小鼠急性肺损伤(ALI)时含量显著增加,COX-2 与 ALI 的发生关系密切<sup>[2]</sup>.本实验从抗炎角度将石蒜碱应用于 ALI 小鼠,通过观察小鼠肺组织中 COX-2 的表达情况,探究石蒜碱对 ALI 小鼠是否具有保护作用.此外,本研究在体外细胞水平观察石蒜碱对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中 COX-2 翻译以及翻译后水平的影响,旨在研究石蒜碱抗炎的作用靶点,为石蒜碱的临床应用和深入研究提供依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

18 g~22 g 健康 ICR 小鼠(购自扬州大学)60 只,雌雄各半,实验动物的处理和实验过程是按照中国实

收稿日期:2015-07-12.

基金项目:国家自然科学基金(81172798,81072433,31071000).

通讯联系人:抗晶晶,硕士,讲师,研究方向:药物抗炎. E-mail: kangjingjingkuai@163.com

验动物管理规定来进行的。

## 1.2 主要试剂

石蒜碱(Aladdin), LPS(Sigma), 兔抗鼠 COX-2 多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology), 兔抗鼠  $\beta$ -actin 单克隆抗体(南京巴傲得公司), 放线菌酮 CHX CA(La Jolla)。

## 1.3 细胞株与培养液

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞(中科院上海细胞库)在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下, 用含 10% 胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)和抗生素(100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素)的 DMEM 完全培养液(Hyclone 公司)培养。

## 1.4 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。石蒜碱药物组剂量分别为 10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg, 阴性对照组剂量为 40 mg/kg, 连续灌胃 3 d, 空白组和模型组给予等体积蒸馏水, LPS(37.5 mg/kg)滴鼻造模<sup>[3]</sup>。

## 1.5 Western blot 检测肺组织内 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 °C, 15,000 g 条件下离心 15 min。离心结束后, 收取上清液并用 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 °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 30 min, 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

细胞培养结束后, 弃去培养 RAW264.7 细胞的培养液, 用预冷的 1×PBS 漂洗 2 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 30 min。裂解结束后, 按上述 1.5 中方法检测 COX-2。

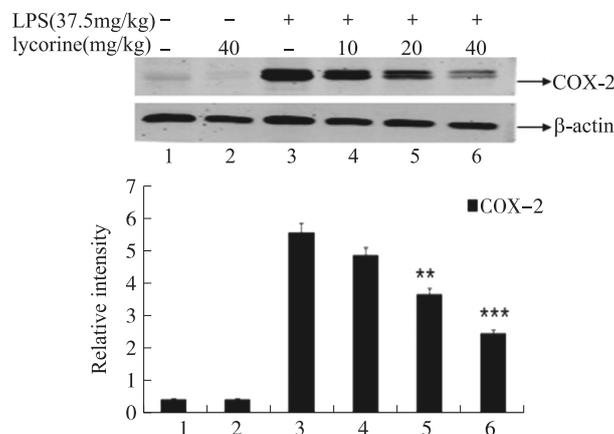
## 1.7 数据分析

使用 SPSS10.0 软件进行两组间 *t* 检验, 所有数值均表示为(mean±S.D), 并设置多个重复, *p*<0.05 认为有统计学差异。

# 2 结果

## 2.1 石蒜碱对 ALI 小鼠体内 COX-2 蛋白表达的影响

按上述 1.4 的材料与方法对小鼠进行分组与给药。造模 24 h 后, 处死小鼠, 取适量肺组织进行 Western blot, 结果如图 1 所示, 当小鼠发生 ALI 时, 小鼠肺组织中 COX-2 水平明显增加(模型组), 而石蒜碱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), 当石蒜碱达到 40 mg/kg 时,



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。与模型组相比, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001

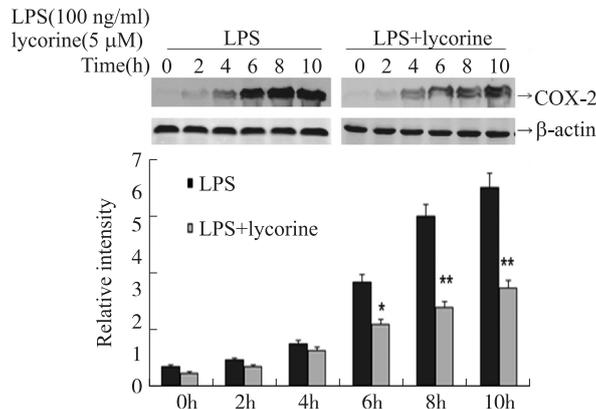
图 1 不同剂量的石蒜碱对 LPS 诱导的小鼠体内 COX-2 蛋白水平的影响

Fig.1 Effect of different doses of lycorine on LPS-induced COX-2 protein *in vivo*

COX-2 水平显著下降,与模型组比较,差异具有统计学意义.

### 2.2 石蒜碱对小鼠体外细胞中 COX-2 蛋白翻译水平的影响

实验组用 5 μmol/L 的石蒜碱预敷 RAW264.7 细胞 3 h 后加入 LPS(100 ng/mL)刺激,对照组单加 LPS (100 ng/mL)刺激,分别培养 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h,收取细胞,检测石蒜碱对 LPS 刺激下 COX-2 蛋白表达随时间变化的影响.结果如图 2 所示,在加入石蒜碱(5 μmol/L)的情况下,LPS 虽然能时间依赖性地上调 COX-2 的蛋白水平,但其上调程度与单加 LPS 刺激相比显著偏低,说明石蒜碱能够在小鼠体外显著下调 RAW264.7 细胞中 LPS 诱导产生的 COX-2 的蛋白水平.



用 LPS(100 ng/mL)或 LPS(100 ng/mL)+石蒜碱(5 μmol/L),分别培养 RAW264.7 细胞 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h,随后 Western blot 检测各实验组中 COX-2 的表达情况,结果取 3 次独立实验的平均值.与单加 LPS 组相比,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$

图 2 石蒜碱对 LPS 刺激下 COX-2 蛋白表达随时间变化的影响

Fig.2 The time-dependent effect of lycorine on LPS-induced COX-2 protein

### 2.3 石蒜碱对小鼠体外细胞中 COX-2 蛋白翻译后水平的影响

LPS(100 ng/mL)培养 RAW264.7 细胞 10 h 后,加入放线菌酮 CHX(1 μg/mL,蛋白合成抑制剂)抑制 COX-2 蛋白的继续合成,观察石蒜碱对 COX-2 蛋白翻译后水平的影响.结果如图 3 所示,加入放线菌酮 CHX 抑制 RAW264.7 细胞中蛋白质的继续合成后,石蒜碱可促进 LPS 刺激后产生的 COX-2 蛋白的降解,从而在翻译后水平调节 COX-2 蛋白的含量.

用 LPS(100 ng/mL)培养 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 μg/mL),石蒜碱实验组加入放线菌酮 CHX(1 μg/mL)+石蒜碱(5 μmol/L),Western blot 检测石蒜碱 6 h 内对 COX-2 蛋白降解的影响.结果取 3 次独立实验的平均值.与单加 LPS 对照组相比,\* $p < 0.05$ .

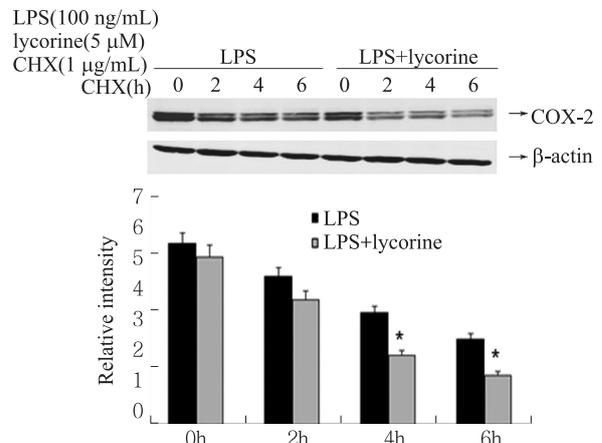


图 3 石蒜碱对 COX-2 蛋白翻译后水平的影响

Fig.3 The effect of lycorine on LPS-induced COX-2 protein at post translation level

## 3 讨论

内毒素(LPS)是革兰氏阴性菌的主要致病成分,在小鼠体内实验中 LPS 可引起中性粒细胞在肺内聚集、激活,释放氧自由基、蛋白水解酶,从而导致急性肺损伤(ALI)的发生<sup>[4]</sup>. 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,如内皮细胞、血管平滑肌细胞、单核巨噬细胞和成纤维细胞等将被诱导表达 COX-2,使 COX-2 水平以 8~10 倍的速度急速增长,引起受损部位炎症性前列腺素的合成和聚积,加速炎症反应的进行<sup>[5]</sup>.

石蒜碱是从传统药用植物石蒜鳞茎中分离出的生物碱成分.生物活性实验研究表明,石蒜碱具有抗病毒、抗疟疾、诱导肿瘤细胞凋亡以及抗炎等多种作用<sup>[6]</sup>.本研究中,我们通过复制 LPS 诱导的小鼠建立

ALI 模型,发现当小鼠发生 ALI 时,小鼠肺组织中 COX-2 水平明显增加,而石蒜碱能够有效地抑制小鼠急性肺损伤时 COX-2 的表达,且呈一定的剂量依赖性.在以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为模型的体外实验中,石蒜碱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 细胞中的蛋白表达后,我们发现石蒜碱可加快 COX-2 蛋白的降解速度.

生物体内基因的表达包括转录和翻译等步骤,已有研究表明,石蒜碱不能在转录水平下调 COX-2 mRNA 的含量<sup>[7]</sup>,那么石蒜碱是如何下调 COX-2 蛋白含量的呢?现有文献显示,石蒜碱可显著抑制 LPS 刺激下诱生型一氧化氮合酶(iNOS)以及 NO 的产生<sup>[8,9]</sup>,而 iNOS 和 COX-2 的表达有密切联系,NO 能够促进 COX-2 的蛋白表达<sup>[10]</sup>,当石蒜碱抑制 iNOS 和 NO 的产生后就会间接地抑制 COX-2 的产生,但 iNOS 和 NO 对 COX-2 的影响作用有限,这表明石蒜碱还可能通过其他途径下调细胞中 COX-2 的蛋白含量,本实验发现石蒜碱可加快 COX-2 蛋白的降解速度,这表明石蒜碱可以在翻译后水平调节 COX-2 蛋白的含量,这可以在一定程度上解释为什么石蒜碱没有抑制 COX-2 基因的转录,却使得 COX-2 蛋白水平下降.

综上所述,我们以 COX-2 为主要观察指标,发现石蒜碱能够在小鼠体内体外有效抑制 LPS 刺激下 COX-2 的蛋白水平,机制上,石蒜碱可能通过促进 COX-2 蛋白的降解下调 COX-2 的蛋白水平,表明石蒜碱对 LPS 致 ALI 小鼠的保护效应可能与其抑制 COX-2 有关.由于 LPS 引起的炎症反应复杂,涉及的分子众多,因而明确石蒜碱抗内毒素机制尚需进行大量深入的研究.

#### [参考文献]

- [1] 秦昆明,李笑,徐昭,等.石蒜碱及其衍生物的药理作用研究概况[J].北京联合大学学报,2009,23(1):6-10.
- [2] 张丽娜,龚华,艾宇航.急性肺损伤大鼠肺组织 COX-2、NF- $\kappa$ B 表达及其相关性的研究[J].医学临床研究,2007,24(11):1 872-1 874.
- [3] SZARKA R J, WANG N, GORDON L, et al. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation[J]. Immunol Methods, 1997, 202: 49-57.
- [4] TOGNA A R, LATINA V, ORLANDO R, et al. Cigarette smoke inhibits adenine nucleotide hydrolysis by human platelets[J]. Platelets, 2008, 19(7): 537-542.
- [5] 李俊英. COX-2 在急性肺损伤中的作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2009, 18(12): 1 341-1 342.
- [6] 赵明明,熊海蓉,李霞,等.石蒜属植物中石蒜碱的研究进展[J].河南化工,2010,27(10):25-27.
- [7] JINGJING K, YUSHUN Z, XIANG C, 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.
- [8] OSAMA B, ABDEL H, TOSHIO M, et al. New crinetype alkaloids with inhibitory effect on induction of inducible nitric oxide synthase from *Crinum yemense*[J]. J Nat Prod, 2004, 67(13): 1 119-1 124.
- [9] YAMAZAKI Y, KAWANO Y. Inhibitory effects of herbal alkaloids on the tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264 macrophages[J]. Chem Pharm Bull, 2011, 59: 388-391.
- [10] RAHMAN M A, DHAR D K, EMI Y C, et al. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible virus-positive cases[J]. Clin Cancer Res, 2001(7): 1 325-1 332.

[责任编辑:黄 敏]