DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2020.05.009

三叶青主要成分抗炎作用及其机制

Anti-inflammatory effect and mechanism of major components in *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg

邢 倩 郑溜丰 甘 婷 肖 婷 邓泽元 刘小如

XING Qian ZHENG Liu-feng GAN Ting XIAO Ting DENG Ze-yuan LIU Xiao-ru

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室,江西 南昌 330047)

(*State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi* 330047, *China*)

摘要:基于与 Keap1 蛋白的分子对接结果初步筛选,进而在血管内皮细胞低水平炎症模型下试验,对比分析活性成分对各类炎症相关因子的基因及蛋白表达影响。结果表明,三叶青根部的山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、异槲皮苷、芦丁以及叶片中的 5-咖啡酰奎宁酸、牡荆苷、荭草苷均能与 Keap1 蛋白紧密结合在 Keap1 与 Nrf2 蛋白相互作用的活性空腔中,从而可能使 Nrf2 解离并活化。6 种活性成分均可缓解血管内皮细胞低水平炎症,其中作用最强的是牡荆苷。进一步发现牡荆苷可显著上调细胞内 *Nrf2* 基因和蛋白表达,下调 Keap1 蛋白表达,说明 Nrf2 被活化。此外,牡荆苷在细胞培养基及缓冲盐溶液中稳定性强,能以原型形式被血管内皮细胞吸收,以剂量依赖的方式显著抑制 IL-6、IL-1β 和 ICAM 等炎症相关因子的基因和蛋白表达及 NF-κB p65 磷酸化水平。牡荆苷可能通过与 Keap1 蛋白结合活化 Nrf2 及影响 NF-κB 通路活性来发挥强效抗炎作用。

关键词:三叶青;分子对接;Keap1 蛋白;血管内皮细胞低水平炎症模型;抗炎作用

Abstract: The study aims to screen potential anti-inflammatory phytochemicals and explore its mechanism from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg based on their molecular docking with Keap1 protein and low-grade inflammatory model of vascular endothelial cells, and further analyzes the effects of active ingredients on the gene and protein expression of pro-inflammatory factors. Results showed that kaempferol-3-*O*-rutinoside, isoquercitrin, and rutin in root and 5-caffeoylquinic acid, vitexin, and orientin in leaf had significant interactions with Keap1 protein, all of which occurred in the binding cavity of Keap1 with Nrf2 protein, possibly leading to the dissociation of Nrf2 and activation. All of these six phytochemicals could alleviate vascular low-grade inflammation, and among which vitexin had the strongest protective effect. It was further found that vitexin could significantly up-regulate *Nrf2* gene and protein expression in cells, while down-regulate Keap1 protein expression, indicating that Nrf2 was activated. In addition, vitexin was highly stable in cell culture medium and buffer salt solution, and it could be absorbed by vascular endothelial cells in a prototype form. Furthermore, vitexin significantly inhibited the gene and protein expression of IL-6, IL-1β, and ICAM, as well as the phosphorylation level of NF-κB p65 in a dose-dependent manner. Therefore, vitexin may have a strong anti-inflammatory function by directly binding with Keap1 to potentially activate Nrf2 and affecting the activity of NF-κB pathway.

Keywords: *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg; molecular docking; Keap1 protein; low-grade inflammatory model of vascular endothelial cells; anti-inflammatory action

由肥胖、糖尿病等导致的心血管疾病已成为全球死亡的首要原因[1]。根据《中国心血管病报告 2018》指出,过去 10 年中国死于心血管疾病的居民占总构成比的 40%以上,居于首位,高于肿瘤及其他疾病[2]。虽然心血管疾病的病因和发病机制复杂,但慢性低水平炎症是包括心血管疾病在内的多种慢性病发生发展的典型特征之一[3]。炎症本身是人体重要的免疫性防御机能,但是长期过剩的慢性低水平炎症会造成人体功能受损,最终直接导致慢性病的发生[4-5]。更有研究[6]指出,动脉粥样硬化最有潜质的干预靶点是低水平炎症。另外,血管内皮细胞损伤是心血管疾病发生的始动环节,其中炎症是其重要诱因[7]。因此,通过抑制低水平炎症导致的血管内皮细胞损伤是防治心血管疾病的重要手段[8]。

基金项目:江西省自然科学基金(编号:20192BAB215049)

作者简介:邢倩,女,南昌大学在读硕士研究生。

通信作者:郑溜丰(1989—),男,南昌大学助理研究员,博士。

E-mail:xlh20080605@163.com

收稿日期:2020-03-16

近年来发现,药食兼用植物以安全、低耐药、特异性强等优势对于炎症有良好的治疗作用[9]。三叶青(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg)是中国民间常用的中草药,有药食两用功效,主要分布于江西、安徽、浙江及西南地区[10],以安全无副作用、低耐药性的特点被广泛应用[11]。作为中草药,三叶青具有祛风化痰,清热解毒等多种活性。三叶青临床应用历史悠久,对于治疗恶性肿瘤、炎症反应、抗病毒、保肝的效果尤为显著[12-13]。三叶青的抗癌作用已被广泛研究[14],其可抑制癌细胞的生长与繁殖。Peng 等[15]发现三叶青乙酸乙酯提取物可激活线粒体途径,诱导人肝癌细胞 HepG2 的凋亡。试验主要探究三叶青的抗炎活性成分,为三叶青的药用价值寻找新靶点。Liu 等[16]报道了以 10～160 μg/mL 的三叶青根部黄酮粗提物处理细胞,可以显著降低一氧化氮、IL-1β、TNFα 等促炎因子的产生,抑制 NF-κB 通路活性,并上调抗炎细胞因子 IL-10 的表达,从而缓解炎症反应。这些提示除抗癌外,三叶青有望成为安全有效的药食两用抗炎中草药。此外,课题组[17]从三叶青的根部和叶片中鉴定出了 133 种天然产物,其中根部中山奈酚-3-*O*-芸香糖苷、芦丁、异槲皮素含量较多;而叶片中富含的成分有 5-咖啡酰奎宁酸、荭草苷、异牡荆苷、异荭草苷、牡荆苷,但具体何种成分发挥抗炎作用及其机制有待于进一步研究。核转录因子 NF-E2 相关因子(Nuclear factor NF-E2 related factor,Nrf2)是被广泛关注的药效靶标,参与对慢性病下细胞损伤的保护作用,激活 Nrf2 可成为防治心血管疾病的有效方法[18-19]。最新的研究指出,Nrf2 是抗炎网路中的关键节点[20],在正常条件下,Nrf2 主要存在于细胞质中,与泛素连接酶肌动结合蛋白 Keap1 结合并促进自身泛素化及降解[21]。值得注意的是,与 Keap1 的结合是植物活性物质促使 Nrf2 解离并入核发挥作用的关键环节[22]。

试验拟基于与 Keap1 蛋白的分子对接,从三叶青中筛选了可能具有潜在抗炎活性的成分,同时在肿瘤坏死因子-α(Tumor necrosis factor-α,TNFα)联合白细胞介素-17(Interleukin-17,IL-17)诱导的血管内皮细胞低水平炎症模型下深入探究具体何种活性成分能强效抗炎,并分析该活性成分在培养基及缓冲盐溶液中的稳定性及细胞中的摄取,同时揭示其抗炎机制,旨在为三叶青发挥强效抗炎作用提供有力的依据。

1　材料与方法

1.1　材料、试剂与仪器

1.1.1　材料

人脐静脉血管内皮细胞(Human umbilical vein endothelial,HUVEC):武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2　试剂

细胞因子 IL-17、肿瘤坏死因子 TNFα:美国 Peprotech 公司;

Ham's F-12K (Kaighn's) Medium(F-12K)培养基:武汉普诺赛生命科技有限公司;

胎牛血清(FBS):以色列 Biolnd 公司;

胰蛋白酶:美国 Sigma 公司;

山奈酚-3-*O*-芸香糖苷、异槲皮苷、芦丁、5-咖啡酰奎宁酸(新绿原酸)、牡荆苷、荭草苷标准品:>98%,中国索莱宝科技有限公司;

Cell Counting Kit-8(CCK-8 试剂盒)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒:中国碧云天生物科技公司;

RIPA 裂解液:加拿大 Thermo Fisher 公司;

一抗:英国 Abcam 公司;

二抗:北京全式金生物有限公司;

TRIzol™ Reagent:加拿大 Thermo Fisher 公司;

PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time):日本 TaKaRa 公司;

Bestar® qPCR mastermix(SYBR Green):德国 DBI® Bioscience 公司。

1.1.3　仪器与设备

超高效液相色谱仪:1290 型,美国 Agilent 公司;

三重四级杆液质联用仪:6470 型,美国 Agilent 公司;

生物安全柜:BHC-1300A/B3 型,苏州安泰空气技术有限公司;

低温高速离心机:Neofuge 15R 型,香港力康公司;

细胞破碎仪:Qsonica Sonicator Q500 型,加拿大 Thermo Fisher 公司;

CO_2 细胞培养箱:Forma series II 型,加拿大 Thermo Fisher 公司;

化学发光成像仪:ChemiDoc™ XRS+型,美国伯乐公司;

蛋白质电泳仪:DYCZ-24DN 型,北京六一生物科技有限公司;

转膜仪:Criterion 系,美国伯乐公司;

倒置显微镜:37XC(XDS-1A)型,上海蔡康光仪器公司;

震荡混合器:WH-866 型,中国太仓科教器材厂;

实时定量 PCR:CFX96 Touch 型,美国伯乐公司。

1.2　方法

1.2.1　Keap1 蛋白的同源建模和分子对接　采用同源模型服务软件 SWISS-MODEL 预测人源 Keap1 蛋白的三维结构,选择相似度且评分最高的模型作为蛋白的三维晶体结构[23]。采用 Ramachandran plot 和 Profile-3D 方法对模型进行评估,进一步采用分子对接软件 AutoDockTools 将 Keap1 与成分进行对接,使用 Flexible

Docking 模块计算两者相互作用的位点及对接能。成分的分子结构从 Automated Topology Builder 上下载。

1.2.2 细胞培养 人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC 培养在含 10%胎牛血清(FBS)及 0.1%双抗的 F-12K 培养基中。待细胞长满后弃去培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞两次,加入含乙二胺四乙酸的胰蛋白酶液消化细胞,显微镜下观察到游离细胞后弃去消化液,加入培养液反复吹打,稀释后装入新培养瓶置于 37 ℃、5% CO_2 恒温恒湿箱中培养。

1.2.3 Western blot 测定细胞蛋白表达水平 将山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、异槲皮苷、芦丁、5-咖啡奎宁酸、牡荆苷、荭草苷标准品分别用二甲基亚砜溶解,配成 200 mmol/L 的母液,用培养基稀释至试验需求浓度。将 HUVEC 细胞用胰蛋白酶消化后加入培养基稀释。取 6 cm 小皿,每皿加入 3 mL 细胞,放进 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养 12 h 至贴壁。倒掉培养基,每皿加入不同浓度的标准品孵育2 h,再用 1 ng/mL TNFα 联合 100 ng/mL IL-17 诱导细胞低水平炎症,37 ℃培养 12 h。结束后参考 Zheng 等[24]的方法制备细胞全蛋白裂解液,BCA 法测定蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 电泳及转膜,最终发光显影拍照,导入软件分析得到蛋白表达量。

1.2.4 CCK8 方法测定细胞存活率 96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬液,待细胞贴壁。在进行牡荆苷自身的细胞毒性试验时加入不同浓度的牡荆苷,每个浓度 8 个复孔,37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养 24 h。在进行牡荆苷缓解内皮细胞炎症的试验时先加入不同浓度的牡荆苷孵育 2 h,再用 1 ng/mL TNFα 联合 100 ng/mL IL-17 诱导细胞低水平炎症,37 ℃、5% CO_2 培养 24 h。培养结束后倒掉培养基,加入 CCK8,1 h 后用酶标仪测定 $OD_{450\ nm}$ 值。按式(1)计算细胞存活率。

$$c=\frac{OD_1}{OD_2}\times 100\%, \tag{1}$$

式中:

c——细胞存活率,%;

OD_1——试验组 $OD_{450\ nm}$ 值;

OD_2——对照组 $OD_{450\ nm}$ 值。

1.2.5 荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达 细胞接种到 24 孔板中,贴壁后加入不同浓度牡荆苷培养 24 h。使用 Trizol 试剂提取法[24]提取细胞中总 RNA,按照逆转录试剂盒操作得到所需 cDNA,取 2 μL 进行扩增。引物序列:*Nrf2*,上游 5′-CACATCCAGTCAGAAACCAGTGG-3′,下游 5′-GGAATGTCTGCGCCAAAAGCTG-3′;白细胞介素-1β(*IL*-1β),上游 5′-GCATCCAGCTACG AATCTCC-3′,下游 5′-GAACCAGCATCTTCCTCAGC-3′;细胞间黏附分子(*ICAM*),上游 5′-GGAAATACTGAAACTTGCTGCC TAT-3′,下游 5′-ACACATGTCTATGGAGGGCCAC -3′;β-*actin*,上游 5′-CCTGACTGACTACCTCATGAAG-3′,下游 5′-GACG-TAGCACAGCTTCTCCTTA-3′。配置好反应混合液,加入 96 孔反应板中,使用荧光定量 PCR 仪进行扩增。

1.2.6 药物稳定性的测定 用 F-12K 培养基或 Hank′s 平衡盐溶液(HBSS)稀释牡荆苷标准品至 60 μmol/L。放入 37 ℃、5% CO_2 恒温恒湿培养箱中培养,在 0.0,0.5,1.0,2.0,4.0,6.0,12.0 h 后取出,过 0.22 μm 的滤膜,利用超液相色谱检测牡荆苷的含量。

液相条件:色谱柱型号为 Zorbax Eclipse Plus C_{18}(5 μm,3.0 mm×100 mm);流动相 0.1% 甲酸—乙腈(A)和 0.1% 甲酸—水(B)。梯度洗脱条件为:0~2 min,20%~25% A;2~7 min,25%~30% A;7~8 min,30%~20% A。流速 0.3 mL/min,色谱柱温度 25 ℃,参比波长 280 nm,收集波长 340 nm,进样量 10 μL。

以 0 h 培养基中牡荆苷的含量作为 100%,将不同处理时间下牡荆苷的含量与 0 h 的含量对比分析,得到牡荆苷随时间变化在培养基中残留的百分率。

1.2.7 细胞吸收的测定 HUVEC 细胞接种于 6 cm 培养皿中,贴壁后加入不同浓度牡荆苷培养 2 h。弃去细胞培养液,PBS 洗涤两遍,加入 1.5 mL PBS 收集细胞至离心管中,取 1/10 测蛋白浓度,剩下的部分 2 000 r/min 离心 5 min。弃上清,5%甲酸—甲醇复溶,冰水浴超声处理5 min使细胞破碎,结束后放入-80 ℃冰箱过夜。第 2 天取出室温溶解,涡旋 2 min,2 000 r/min 离心 10 min,收集上清。再用 1 mL 5%甲酸—甲醇重复提取两次。上清液合并,氮吹后用 250 μL 甲醇复溶,过 0.22 μm滤膜,用液相色谱-质谱联用仪检测分析细胞中牡荆苷的含量。

质谱条件:采用三重串联四级杆质谱仪,装备电喷雾离子源(ESI),负离子+MRM 模式定量分析。牡荆苷的定量条件为:母离子 m/z 431.1,子离子 m/z 311.1,裂解电压 160 V,碰撞能 18 eV;进样量 5 μL[25]。

1.2.8 数据处理与分析 每个样品指标测定 3 次,以均值±标准偏差(mean±*SD*)形式表示。以 SPSS 软件中的单因素方差分析处理,Duncan 比较进行显著性分析,$P<0.05$(*)、$P<0.01$(**)、$P<0.001$(***)表示与未处理的对照组有显著性差异。$P<0.05$(#)、$P<0.01$(##)、$P<0.001$(###)表示与 1 ng/mL TNFα 联合 100 ng/mL IL-17 诱导的低水平炎症组有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 三叶青中 6 种候选成分与 Keap1 蛋白的分子对接

分子对接是一种在分子层面预测配体和受体之间结合模式和亲合力的一种理论模拟方法。试验采用分子对接方法初步对比分析了三叶青根部和叶片中几十种含量丰富的成分与 Keap1 蛋白的结合能力,筛选出

了 6 种成分可与 Keap1 蛋白显著结合,分别是山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、异槲皮苷、芦丁、5-咖啡奎宁酸、牡荆苷和蒜草苷。由图 1 可知,这 6 种成分均结合在 Keap1 蛋白分子的活性空腔之中,并且主要的结合位点是缬氨酸残基。该活性空腔恰恰是 Keap1 与 Nrf2 结合的区域,提示这 6 种成分与 Keap1 的结合很可能阻断了 Keap1 与 Nrf2 的相互作用,进而使 Nrf2 解离活化。另外,白藜芦醇具有良好的抗炎活性,通常作为阳性对照,图 1 中显示山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、异槲皮苷、芦丁、5-咖啡奎宁酸、牡荆苷和蒜草苷 6 种成分的对接能均小于白藜芦醇的,证明与 Keap1 蛋白的结合能力均强于白藜芦醇;其中最强的是山柰酚-3-*O*-芸香糖苷,其次是牡荆苷。以上提示,三叶青中的这 6 种成分可能均具有良好的抗炎效果。

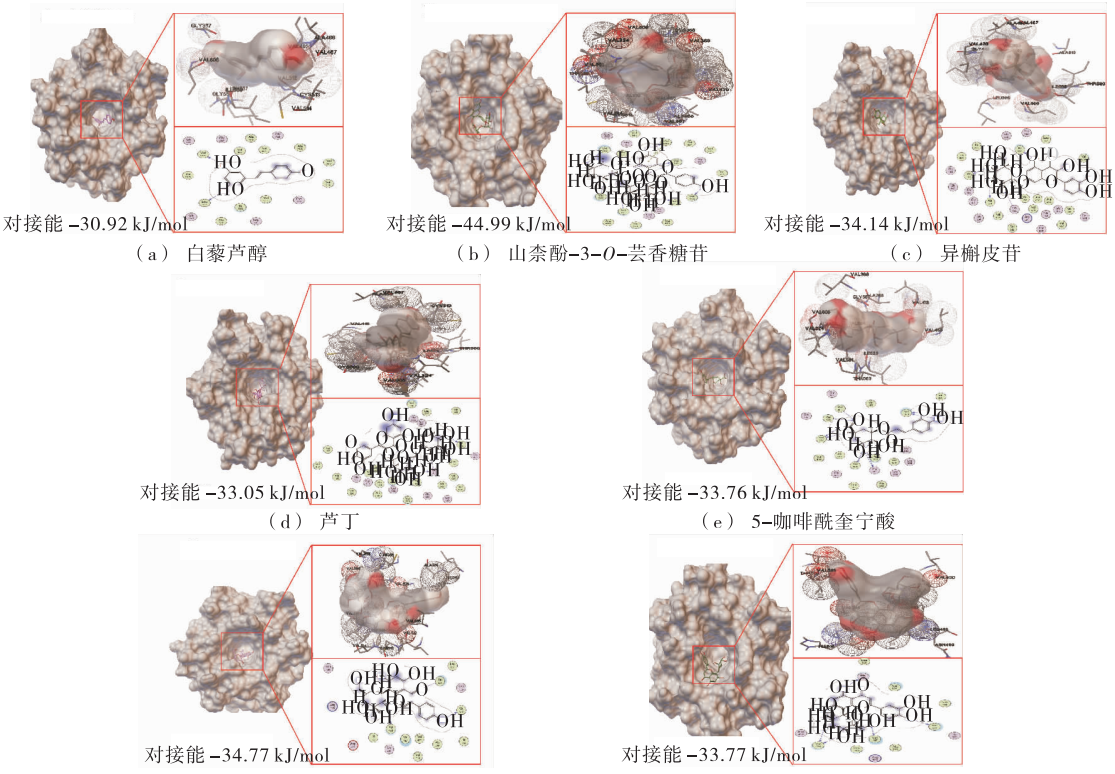


图 1　三叶青中 6 种候选成分与 Keap1 蛋白的分子对接

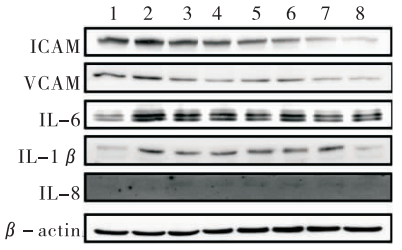
Figure 1　Molecular docking betweensix candidate ingredients in *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg and Keap1 protein

2.2　三叶青中 6 种候选成分对血管内皮细胞炎症的抑制作用

研究使用浓度为 100 μmol/L 或 50 μmol/L 的成分处理细胞,联合低剂量 TNFα 与 IL-17 诱导低水平血管内皮细胞炎症,采用 Western blot 法检测山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、异槲皮苷、芦丁、5-咖啡奎宁酸、牡荆苷和蒜草苷 6 种成分对促炎因子和黏附分子表达的影响。如图 2 所示,联合低剂量 TNFα 与 IL-17 可升高各类炎症相关因子的蛋白表达,6 种成分可不同程度的下调炎症因子表达量。当浓度为 100 μmol/L 时,异槲皮苷、芦丁、蒜草苷、牡荆苷对于 ICAM 的抑制作用更为显著,而牡荆苷可更加显著地抑制血管细胞黏附分子(VCAM)的表达。当浓度为 50 μmol/L 时,牡荆苷更明显地下调了白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-8(IL-8)的蛋白表达。综上所述,牡荆苷的抗炎效果最明显。

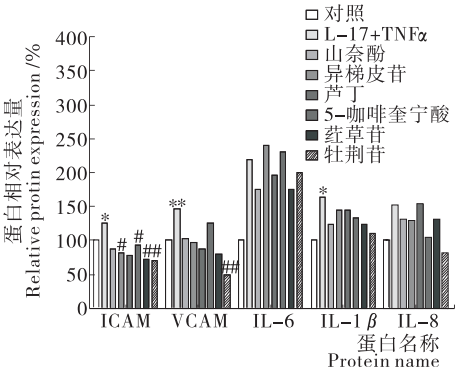
2.3　牡荆苷对血管内皮细胞炎症损伤的保护作用

CCK8 试验测定了牡荆苷对 HUVEC 细胞的毒性作用以及在血管内皮细胞中牡荆苷对低剂量 TNFα 与 IL-17 诱导低水平炎症的缓解作用,结果见图 3。图 3(a)为牡荆苷对血管内皮细胞的毒性作用,与未处理的空白对照组细胞相比,牡荆苷浓度<80 μmol/L 时,对细胞活性没有影响,高于 80 μmol/L 后对细胞表现明显的抑制生长作用。因此,选用 20,40,60 μmol/L 作为试验组浓度。图 3(b)显示,与对照组相比,联合低剂量 TNFα 和 IL-17 降低细胞存活率,但以 20,40,60 μmol/L 牡荆苷对血管内皮细胞预孵 2 h 后,细胞存活率呈浓度依赖性的升高,证明牡荆苷对低剂量 TNFα 与 IL-17 诱导的低水平炎症具有缓解作用。

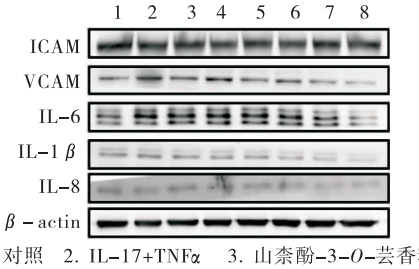


1. 对照　2. IL-17+TNFα　3. 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷+IL-17+TNFα　4. 异槲皮苷+IL-17+TNFα　5. 芦丁+IL-17+TNFα　6. 5-咖啡奎宁酸+IL-17+TNFα　7. 荭草苷IL-17+TNFα　8. 牡荆苷+IL-17+TNFα

（a）100 μmol/L候选成分作用下炎症相关蛋白条带图

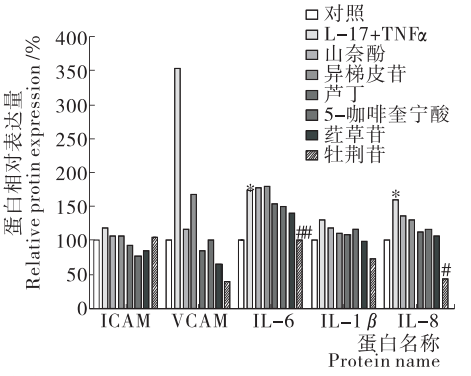


（b）100 μmol/L候选成分作用下炎症相关蛋白统计图



1. 对照　2. IL-17+TNFα　3. 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷+IL-17+TNFα　4. 异槲皮苷+IL-17+TNFα　5. 芦丁+IL-17+TNFα　6. 5-咖啡奎宁酸+IL-17+TNFα　7. 荭草苷IL-17+TNFα　8. 牡荆苷+IL-17+TNFα

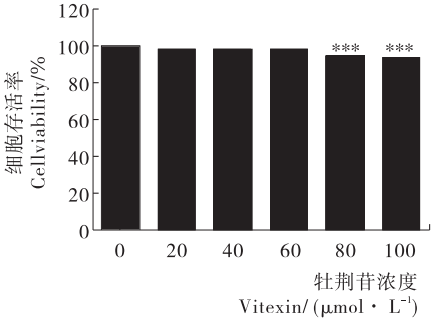
（c）50 μmol/L候选成分作用下炎症相关蛋白条带图



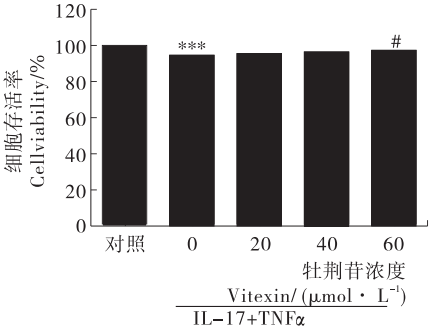
（d）50 μmol/L候选成分作用下炎症相关蛋白统计图

图 2　三叶青中 6 种候选成分的抗炎活性

Figure 2　Anti-inflammatory activities of six candidate ingredients in *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg



（a）牡荆苷的细胞毒性作用



（b）牡荆苷缓解细胞炎症作用

图 3　牡荆苷对 HUVEC 细胞炎症损伤的保护作用

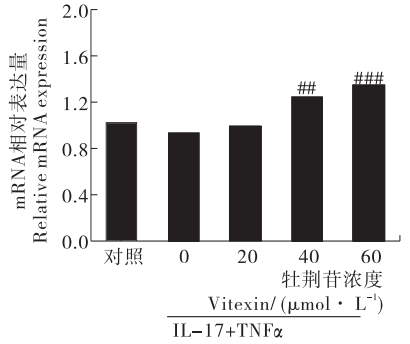
Figure 3　The protective role of vitexin in inflammation-induced HUVEC cell injury

2.4　牡荆苷激活 Nrf2 信号通路

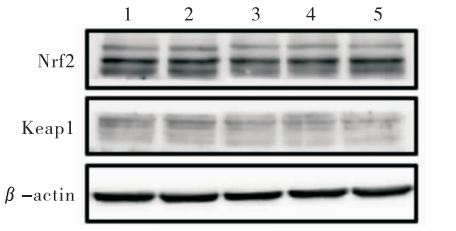
从 Nrf2-Keap1 复合物上解离的 Nrf2 能在细胞内富集并活化，为了在细胞水平进一步验证分子对接结果，即牡荆苷与 Keap1 的结合可活化 Nrf2，试验检测了牡荆苷处理细胞后 Nrf2 信号通路活性。图 4(a)～(c)显示，20～60 μmol/L 牡荆苷以浓度依赖方式显著增加 Nrf2 的基因和蛋白表达水平，相反降低 Keap1 蛋白的表达水平，故而 Nrf2/Keap1 比值会逐渐升高[见图 4(d)]，表明 Nrf2 通路被激活。

2.5　牡荆苷抑制血管内皮细胞炎症相关因子的基因表达

为检测牡荆苷对 HUVEC 细胞中炎症相关因子表达的影响，采用荧光定量 PCR 法检测了 20，40，60 μmol/L 牡荆苷调节细胞炎症相关因子表达的作用，结果见图 5。20，40，60 μmol/L 牡荆苷均可下调促炎因子 *IL-1β* 和黏附分子 *ICAM* 的基因表达，随着牡荆苷浓度的加大基因表达量下降，证明牡荆苷可缓解血管内皮细胞炎症。因此，牡荆苷对血管内皮细胞中低剂量 TNFα 与 IL-17 诱导低水平炎症有抑制作用。

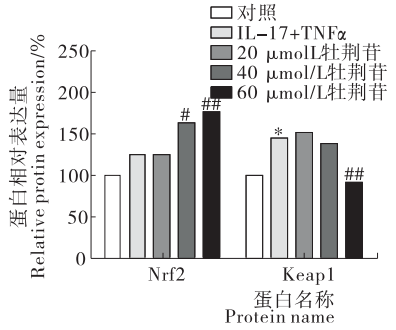


（a）牡荆苷作用下Nrf2的基因表达

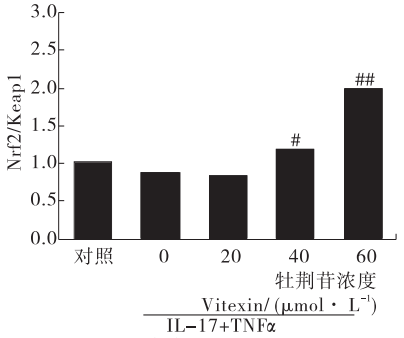


1. 对照　2. IL-17+TNFα　3. 20 μmol/L牡荆苷+IL-17+TNFα　4. 40 μmol/L牡荆苷+IL-17+TNFα　5. 60 μmol/L牡荆苷+IL-17+TNFα

（b）牡荆苷作用下Nrf2及Keap1蛋白条带图



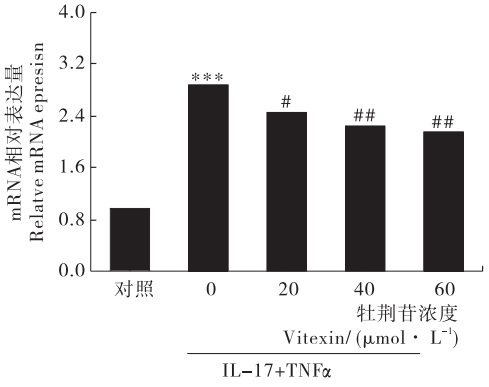
（c）牡荆苷作用下Nrf2及Keap1蛋白统计图



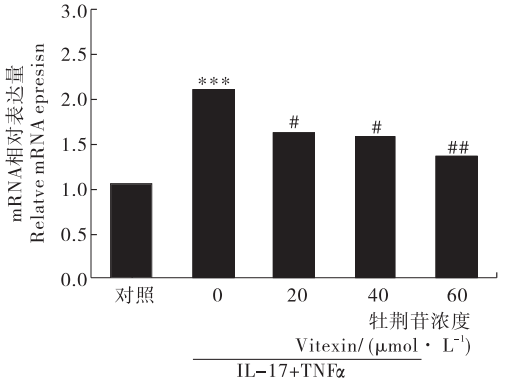
（d）Nrf2/Keap1

图 4　牡荆苷激活 Nrf2 信号通路

Figure 4　Vitexin activated Nrf2 signaling pathway



（a）牡荆苷作用下*IL-1β* 基因表达



（b）牡荆苷作用下*ICAM*基因表达

图 5　牡荆苷抑制 HUVEC 细胞炎症相关因子的基因表达

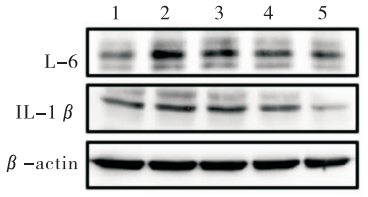
Figure 5　The suppressive effect of vitexin on gene expression of pro-inflammatory cytokines in HUVEC cells

2.6　牡荆苷抑制血管内皮细胞炎症相关因子的蛋白表达

采用 Western blot 方法研究了 20,40,60 μmol/L 牡荆苷对 HUVEC 细胞中炎症相关因子蛋白表达的影响。细胞发生炎症之后,引起炎症相关因子的基因表达升高,由基因进一步翻译成蛋白质,炎症相关因子的蛋白表达如图 6 所示。20,40,60 μmol/L 牡荆苷可逐渐下调炎症相关因子的蛋白表达,其中促炎因子 IL-6 表达水平与低水平炎症组比有显著性下降,IL-1β 无显著差异。证明牡荆苷可抑制促炎因子的蛋白表达,其结果与基因表达结果一致,更好地说明了牡荆苷具有良好的抗炎效果。Lu 等[26]证明在 C57BL/6 小鼠中,牡荆苷抑制脂多糖引起的 TNFα、IL-6 以及 IL-1β 表达增加,发挥抗炎作用。

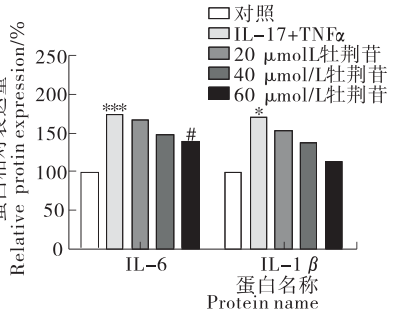
2.7　牡荆苷抑制血管内皮细胞 NF-κB 信号通路的活性

核因子-κB(NF-κB)调控着细胞的炎症水平,抑制 NF-κB 信号通路可以阻止产生过多的炎症介质。利用 Western blot 法检测了牡荆苷对 NF-κB p65 蛋白磷酸化的影响,结果如图 7 所示。20,40,60 μmol/L 牡荆苷可以逐渐降低磷酸化 p65 蛋白水平,呈剂量依赖关系。证明了牡荆苷可以抑制 NF-κB 信号通路的活性,从而进一步降低促炎因子的基因和蛋白表达。



1. 对照　2. IL-17+TNFα　3. 20 μmol/L牡荆苷+IL-17+TNFα　4. 40 μmol/L牡荆苷+IL-17+TNFα　5. 60 μmol/L牡荆苷+IL-17+TNFα

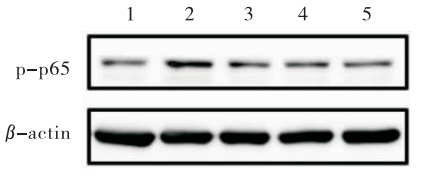
（a）牡荆苷作用下IL-6及IL-1 β 蛋白条带图



（b）牡荆苷作用下IL-6及IL-1 β 蛋白统计图

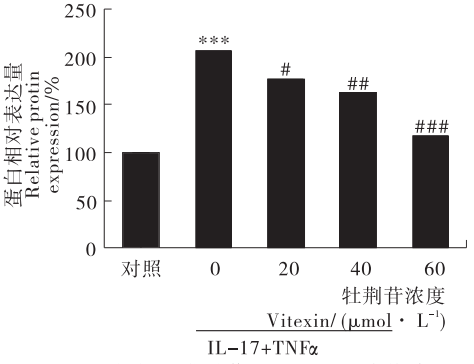
图 6　牡荆苷抑制 HUVEC 细胞炎症相关因子的蛋白表达

Figure 6　The suppressive effect of vitexin on protein expression of pro-inflammatory cytokines in HUVEC cells



1. 对照　2. IL-17+TNFα　3. 20μ mol/L牡荆苷+IL-17+TNFα　4. 40 μmol/L牡荆苷+IL-17+TNFα　5. 60 μmol/L牡荆苷+IL-17+TNFα

（a）牡荆苷作用下p-p65蛋白条带图



（b）牡荆苷作用下p-p65蛋白统计图

图 7　牡荆苷对 NF-κB p65 蛋白磷酸化的影响

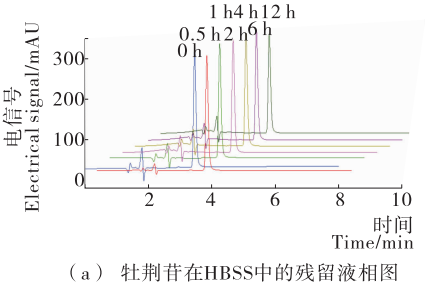
Figure 7　Effect of vitexin on the phosphorylation of NF-κB p65

2.8　牡荆苷在细胞培养基及缓冲盐溶液中的稳定性

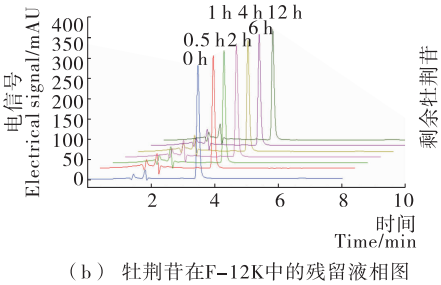
药物的作用与其在培养基中的稳定性有紧密联系，经不同时间处理后，牡荆苷在 HBSS 及 F-12K 培养基中残留的液相图及计算结果见图 8。结果表明，牡荆苷在 F-12K 细胞培养基及 HBSS 缓冲液中均表现为很强的稳定性，尤其是 12 h 后在 F-12K 细胞培养基中的保留率达 80%以上。牡荆苷的强稳定性源于自身结构中存在 8 号位点糖基化[27]，而在培养基中稳定性更高可能是由于细胞培养基中含有血清蛋白。Tang 等[28]报道，多酚化合物可以与蛋白质相互作用，使得多酚的稳定性增强。

2.9　牡荆苷在血管内皮细胞中的摄取

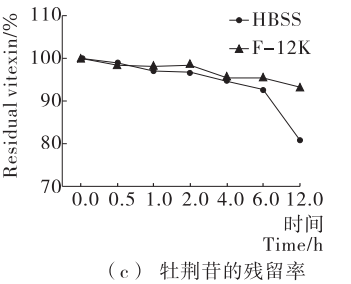
研究[27]表明，药物的抗炎效果与其细胞内的吸收有关。试验利用了液相三重串联四极杆液相质谱联用系统（HPLC-QqQ-MS）检测了 20，40，60 μmol/L 牡荆苷在血管内皮细胞内的含量。由图 9 可知，血管内皮细胞可以原型形式摄取牡荆苷，且随着牡荆苷的浓度增加，血管内皮细胞对牡荆苷的摄取程度加大，在细胞内的牡荆苷含量增多。特别是以 60 μmol/L 牡荆苷刺激细胞之后，牡荆苷在细胞内的含量达到了（3.03±0.79）pmol/mg·蛋白。说明吸收的牡荆苷含量增多，所以逐渐下调了各类



（a）牡荆苷在HBSS中的残留液相图



（b）牡荆苷在F-12K中的残留液相图



（c）牡荆苷的残留率

图 8　牡荆苷在细胞培养基及缓冲盐溶液中的稳定性

Figure 8　The stability of vitexin in cell culture medium and saline buffered solution

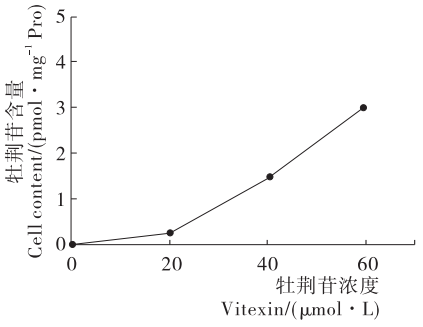


图 9　牡荆苷在 HUVEC 细胞中的含量

Figure 9　Content of vitexin in HUVEC cells

炎症相关因子的表达,增加了抗炎效果。

3　结论

三叶青中山柰酚-3-*O*-芸香糖苷等 6 种候选成分均具有抗炎活性,其中活性最强的是牡荆苷。牡荆苷主要富含于山楂、牡荆草等植物中,且在三叶青中含量也达到了(8.28±2.03) mg/g 干物质[17]。目前牡荆苷主要用于治疗心血管疾病,并且还能发挥明显的防癌抗肿瘤作用[29]。研究通过血管内皮细胞试验证实了牡荆苷的抗炎效果,这也许解释了其为何能降低心血管疾病风险。

Nrf2 是在抗炎反应中发现的新机制,其活化机理主要包括两个方面:① 亲电子化合物以共价键的方式与 Keap1 蛋白的半胱氨酸残基结合,使 Keap1 蛋白发生构象改变,结构变得松散,促进 Nrf2 从 Nrf2-Keap1 复合物上解离[22]。Mills 等[20]报道衣康酸通过烷化 Keap1 蛋白上的半胱氨酸残基使得 Nrf2 解离活化。② 小分子化合物以非共价键的方式与 Keap1 蛋白结合,通过占据 Nrf2 与 Keap1 蛋白结合的活性空腔使 Nrf2 解离活化[22]。研究筛选出的牡荆苷等小分子植物化学物正是结合在 Keap1 蛋白的活性空腔中,促使 Nrf2 活化。

牡荆苷能够激活转录因子 Nrf2,抑制血管内皮细胞低水平炎症,有望成为防治慢性炎症乃至慢性疾病的新契机。试验还有待进一步完善与探索。

参考文献

[1] SOWERS J R. Obesity and cardiovascular disease[J]. Clinical Chemistry, 2020, 44(8): 8-10.

[2] 胡盛寿.《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.

[3] LUIGI F, ELISA F. Inflammageing: Chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty[J]. Nature Reviews Cardiology, 2018, 15(1): 505-522.

[4] GRIVENNIKOV S, GRETEN F, KARIN M. Immunity, inflammation, and cancer[J]. Cell, 2010, 140(6): 883-899.

[5] TAUBE A, SCHLICH R, SELL H, et al. Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 302(11): 2 148-2 155.

[6] LI J J, LI Y S, FANG C H, et al. Effects of simvastatin within two weeks on anti-inflammatory cytokine interleukin 10 in patients with unstable angina[J]. Heart, 2006, 92(4): 529-530.

[7] FERRIE J, KIVIM K, SHIPLEY M, et al. Job insecurity and incident coronary heart disease: The whitehall II prospective cohort study[J]. Atherosclerosis, 2013, 227(1): 178-181.

[8] SUN Shao-mei, WU Hong-mei, ZHANG Qing, et al. Subnormal peripheral blood leukocyte counts are related to the lowest prevalence and incidence of metabolic syndrome: Tianjin chronic low-grade systemic inflammation and health cohort study[J]. Mediators of Inflammation, 2015, 2 014(1): 1-12.

[9] 刘文静, 刘东波, 张志旭, 等. 药食兼用植物抑菌和抗炎作用研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(19): 3 535-3 542.

[10] 李瑛琦, 陆文超, 于治国. 三叶青的化学成分研究[J]. 中草药, 2003, 34(11): 982-983.

[11] 陈红, 廖淑彬, 陈丹, 等. 闽产三叶青地上部分抗炎提取物的急性毒性研究[J]. 福建医科大学学报, 2017, 51(5): 287-290.

[12] 刘培刚, 魏克民. 三叶青生物学、药理学及临床应用相关研究进展[J]. 中国中医药科技, 2018, 25(6): 927-933.

[13] 徐硕, 金鹏飞, 徐文峰, 等. 民间中药三叶青的研究进展[J]. 中南药学, 2016, 14(12): 1 336-1 341.

[14] 程权, 傅华洲. 三叶青药理作用及临床应用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(4): 235-238.

[15] PENG Xin, ZHANG Yuan-yuan, WANG Jin, et al. Ethylacetate extract from Tetrastigma hemsleyanum induces apoptosis via the mitochondrial caspase-dependent intrinsic pathway in HepG2 cells[J]. Tumor Biology, 2015, 37(1): 865-876.

[16] LIU Dan-dan, CAO Gang, HAN Li-kai, et al. Flavonoids from Radix Tetrastigmae inhibit TLR4/MD-2 mediated JNK and NF-κB pathway with anti-inflammatory properties[J]. Cytokine, 2016, 84: 29-36.

[17] 孙永. 三叶青化学成分及其抗氧化和抗癌活性的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2018: 25-48.

[18] KASHIHARA N, SATOH M, KANWAR Y. Reactive oxygen species in the pathogenesis of chronic kidney disease: lessons derived from diabetic nephropathy[J]. Systems Biology of Free Radicals & Antioxidants, 2016, 118: 2 675-2 703.

[19] REULAND D, MCCORD J, HAMILTON K. The role of Nrf2 in the attenuation of cardiovascular disease [J]. Exercise & Sport Sciences Reviews, 2013, 41(3): 162-168.

(下转第 110 页)

transfer at the subcooled: Craped surface with/without phase change[J]. AIChE Journal, 2003, 49(8): 1 947-1 955.

[62] BOTT T R, AZOORY S, PORTER K E. Scraped-surface heat exchangers Part I: Hold-up and residence time studies[J]. Chemical Engineering Research and Design, 1968, 46: 33-36.

[63] MILTON J L, ZAHRADNIK J W. Residence time distribution of a votator pilot plant using a non-newtonian fluid[J]. Agricultural Engineering, 1973, 16(6): 1 186-1 189.

[64] RUSSELL A B, BURMESTER S S H, WINCH P J. Characterization of shear thinning flow within a scraped surface heat exchanger [J]. Food and Bioproducts Processing, 1997, 75(3): 191-197.

[65] TAEYMANS D, ROELANS E, LENGES J. Residence time distribution in a horizontal SSHE for UHT processing of liquids containing solids in Food Engineering and Process Applications[C]// Transport Phenomena. London: Elsevier Applied Science, 1986: 247-258.

[66] ALHAMDAN A, SASTRY S. Residence time distribution of food and simulated particles in a holding tube[J]. Journal of Food Engineering, 1997, 34(3): 271-292.

[67] LEE J H, SINGH R K. Residence time distribution characteristics of particle flow in a vertical scraped surface heat exchanger[J]. Journal of Food Engineering, 1993, 18(4): 413-424.

[68] LEE J H, SINGH R K. Scraped surface heat exchanger orientation influence on particle residence time distributions [J]. Journal of Food Science, 1991, 56(5): 1 446-1 447.

[69] LEE J H, SINGH R K. Normalized particle residence times as affected by process parameters in a vertical scraped surface heat exchanger [J]. International Journal of Food Science & Technology, 1998, 33(4): 429-434.

[70] CHEN C R, RAMASWAMY H S. A neuro-computing approach for modeling of residence time distribution (RTD) of carrot cubes in a vertical scraped surface heat exchanger (SSHE)[J]. Food Research International, 2000, 33(7): 549-556.

[71] ARELLANO M, BENKHELIFA H, ALVAREZ G, et al. Experimental study and modelling of the residence time distribution in a scraped surface heat exchanger during sorbet freezing[J]. Journal of Food Engineering, 2013, 117(1): 14-25.

[72] FRANCINE F, BELHAMRI R, FLICK D. Residence time distribution measurements and simulation of the flow pattern in a scraped surface heat exchanger during crystallisation of ice cream [J]. Journal of Food Engineering, 2013, 116(2): 390-397.

[73] ABICHANDANI H, SARMA S C. Residence time distribution in horizontal thin film scraped surface heat exchanger (SSHE)[J]. Journal of Food Process Engineering, 2010, 10(2): 71-80.

[74] TROMMELEN A M, BOEREMA S. Power consumption in a scraped surface heat exchanger[J]. Transactions of the Institution of Chemical Engineers, 1966, 44: 329-334.

[75] ALTIOKKA, MEHMET R. Power consumption for a scraped-surface heat exchanger with a "no-leak" reactor[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 1992, 31 (10): 2 385-2 388.

[76] ABICHANDANI H, SARMA S C. Power requirement during concentration of milk and cream in horizontal thin-film scraped surface heat exchanger[J]. Indian Journal of Dairy Science, 1989, 42(2): 155-158.

(上接第 53 页)

[20] MILLS E, RYAN D, PRAG H, et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1[J]. Nature, 2018, 556: 113-117.

[21] LU Meng-chen, JI Jian-ai, JIANG Zheng-yu, et al. The Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: An update[J]. Medicinal Research Reviews, 2016, 36(5): 924-963.

[22] SUN Hao-peng, ZHU Jie, LIN Hong-zhi, et al. Recent progress in the development of small molecule Nrf2 modulators: A patent review (2012—2016) [J]. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2017, 7(27): 763-785.

[23] 董丽莎, 李妍妍, 张红燕, 等. 黑线鳕鱼皮胶原蛋白胰蛋白酶酶解多肽对 UVB 诱导 HaCaT 光损伤的抑制作用[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 185-192.

[24] ZHENG Liu-feng, WEI Hong-kui, YU Hui-chao, et al. Fish skin gelatin hydrolysate produced by ginger powder induces glutathione synthesis to prevent hydrogen peroxide-induced intestinal oxidative stress via Pept1-p62-Nrf2 cascade[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(44): 11 601-11 611.

[25] 彭瀚. 黑豆不同形态多酚的组成、消化特性及其抗氧化活性的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2017: 77-78.

[26] LU Ying, YU Ting, LIU Jing-yao, et al. Vitexin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by controlling the Nrf2 pathway[J]. PLOS One, 2018, 13(4): 1-12.

[27] XIAO Jian-bo, GGER P. Stability of dietary polyphenols under the cell culture conditions: avoiding erroneous conclusions[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63(5): 1 547-1 557.

[28] TANG Fen, XIE Yi-xi, CAO Hui, et al. Fetal bovine serum influences the stability and bioactivity of resveratrol analogues: A polyphenol-protein interaction approach[J]. Food Chemistry, 2017, 219: 321-328.

[29] BHARDWAJ M, CHO H, PAUL S, et al. Vitexin induces apoptosis by suppressing autophagy in multi-drug resistant colorectal cancer cells[J]. Oncotarget, 2017, 9(3): 3 278-3 291.