

甘草内生菌代谢物的抗炎作用

杨志军, 邓毅*, 曼琼, 杨秀娟, 杨延泽(甘肃中医药大学, 兰州 730000)

摘要: 目的 研究甘草内生菌代谢物的体内外抗炎作用。方法 96 孔板中接种巨噬细胞 RAW264.7 培养, 模型组加入 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 脂多糖(LPS), 各受试药物组分别加入 10, 20, 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘草水提液浸膏或内生菌发酵物, 2 h 后再加入 LPS $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养, 检测 NO、IL-1 β 、PGE₂ 的含量。Wistar 大鼠 90 只, 随机分为 9 组, 空白组、模型组、阳性对照组给予生理盐水 $0.01 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, 甘草水煎液组给予甘草水煎液 $0.95 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 各内生菌代谢物组给予甘草内生菌发酵物 $0.95 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 每日 1 次, 连续灌胃给药 5 d。末次给药后 1 h, 除空白组外, 各组大鼠尾静脉注射 $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量 LPS, 制备急性肺炎模型, 空白组注射等量生理盐水, 阳性对照组按 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量腹腔注射地塞米松给药。6 h 后大鼠股动脉取血, 检测外周血白细胞计数及血清中 TNF- α 、IL-6、IL-10 的含量。结果 与 LPS 模型组比较, $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 甘草浸膏组、5 组内生菌代谢物组(JTZB006、JTZB018、JTZB059、JTZB060、JTZB063)巨噬细胞 RAW264.7 分泌的 NO、PGE₂、IL-1 β 的含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与同一质量浓度($40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的甘草浸膏组比较, JTZB006、JTZB060 组巨噬细胞 RAW264.7 分泌的 PGE₂ 的含量显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, 阳性对照组、甘草水煎液组、3 组内生菌代谢物组(JTZB006、JTZB060、JTZB063)大鼠外周血中白细胞数量及血清中 TNF- α 、IL-6 的含量均显著降低, IL-10 的含量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与甘草水煎液组比较, JTZB006、JTZB060、JTZB063 组 IL-10 的含量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 3 株甘草内生菌代谢物(JTZB006、JTZB060、JTZB063)对 LPS 诱导的炎症模型具有体外及体内抗炎作用。

关键词: 甘草; 内生菌代谢物; 抗炎; RAW264.7; 大鼠

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)05-0633-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.05.003

引用本文: 杨志军, 邓毅, 曼琼, 等. 甘草内生菌代谢物的抗炎作用[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(5): 633-637.

Anti-inflammatory Effect in the Metabolites of Endophytes from *Glycyrrhiza Uralensis*

YANG Zhijun, DENG Yi*, MAN Qiong, YANG Xiujuan, YANG Yanze(Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study anti-inflammatory effect of the metabolites of endophytes isolated from *Glycyrrhiza uralensis* *in vivo* and *in vitro*. **METHODS** RAW264.7 cells were inoculated onto a 96-well plate. The model group was added with $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS for culture, and each test drug group was added with *Glycyrrhiza* water extracts or the fermentation products of endophytes ($10, 20, 40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) for 2 h of treatment, then LPS ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was added for stimulation. The content of nitric oxide (NO), Interleukin-1 β (IL-1 β) and Prostaglandin E₂ (PGE₂) were measured. Ninety Wistar rats were randomly divided into 9 groups, and each group was given the corresponding drug by gavage administration once per day for 5 d. Except the blank group, the other groups were intravenously injected with LPS ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) to establish an acute pneumonia model, while the blank group was injected with the same volume of normal saline. After 6 h, blood was collected from rat femoral artery to detect peripheral white blood cell counts and the contents of serum TNF- α , IL-6 and IL-10. **RESULTS** Compared with LPS model group, when the mass concentration was maintained at $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the contents of NO, PGE₂ and IL-1 β were significantly reduced in extractum *Glycyrrhiza* group and endophytes fermentation products groups(JTZB006, JTZB018, JTZB059, JTZB060, JTZB063)($P<0.05$ or $P<0.01$). The contents of PGE₂ in JTZB006, JTZB060 were significantly lower than those of extractum *Glycyrrhiza* group at $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared with model group, the white blood cell counts and the contents of TNF- α and IL-6 were significantly reduced in positive control group, *Glycyrrhiza* water decoction group, 3 groups of the fermentation products of endophytes. The contents of IL-10 in JTZB006, JTZB060 and JTZB063 significantly higher than those of *Glycyrrhiza* water decoction group in rat serum ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSION** JTZB006, JTZB060 and JTZB063 have anti-inflammatory effects in LPS induced inflammatory model.

KEY WORDS: *Glycyrrhiza uralensis*; the metabolites of endophytes; anti-inflammatory; RAW264.7; rats

植物内生菌是指在某一阶段或整个阶段生活在活体植物组织或细胞内, 且没有引起宿主植物明显感染的一类微生物群。自 Stierle 报道从短叶红豆

杉中分离出一株能产生抗癌活性成分紫杉醇的内生真菌后^[1], 药用植物内生菌及其代谢产物作为天然药物新资源逐渐受到重视。研究证实, 在与宿主

基金项目: 国家自然科学基金项目(81360633)

作者简介: 杨志军, 女, 博士, 副教授 Tel: (0931)8765389
Tel: (0931)8762701 E-mail: dengyi@gszy.edu.cn

E-mail: yangzhijun1971@yeah.net *通信作者: 邓毅, 男, 教授, 博导

植物共生进化过程中,内生菌及其次生代谢产物可能具有与宿主植物相似的药理作用^[2-3],甘草水提物及多种有效成分均有一定的抗炎作用^[4],但甘草内生菌代谢物的抗炎作用迄今鲜有报道。因此,本课题对甘草内生菌代谢物的体内外抗炎作用进行研究。

1 材料

1.1 动物

SPF级Wistar大鼠,♀♂各半,体质量(200±20)g,由甘肃中医药大学动物实验中心提供,合格证号:SCXK(甘)2015-0002。自由摄食、饮水,喂标准饲料。

1.2 仪器

DHP-927电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);MCO-18ATC(UV)CO₂培养箱(日本三洋公司);Motic220A荧光倒置显微镜(上海捷辰仪器有限公司);MODEL680-酶标仪(美国伯乐公司)。

1.3 药品与试剂

小鼠RAW264.7单核巨噬细胞株(货号:KG240,南京凯基生物科技发展有限公司);脂多糖(LPS,美国Sigma);胎牛血清(FBS,美国Hyclone公司,批号:NWL0509)一氧化氮(NO)试剂盒(批号:20150308,南京建成生物工程研究所);白介素-1β(IL-1β)、前列腺素E₂(PGE₂)、白介素-6(IL-6)ELISA试剂盒(批号分别为201505、201504、201601,上海丰翔生物科技有限公司);肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-10(IL-10)ELISA试剂盒(批号分别为R160506-102a、R160506-121a,欣博盛生物科技有限公司);地塞米松(国药集团容生制药有限公司,批号:1608206)。

2 方法

2.1 甘草内生菌代谢物的制备

从栽培的乌拉尔甘草中分离内生菌,进行初步形态学鉴定,通过预实验初步筛选出8株甘草内生菌(JTZB006、JTZB014、JTZB018、JTZB043、JTZB059、JTZB060、JTZB062、JTZB063)。经分子生物学鉴定,JTZB006、JTZB014、JTZB018为萎缩芽孢杆菌*Bacillus atrophaeus*,JTZB043为漠海威芽孢杆菌*Bacillus mojavensis*,JTZB059、JTZB060为枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*,JTZB062为厚壁菌门乳杆菌目绿色气球菌*Aerococcus viridans*,JTZB063为索诺拉沙漠芽孢杆菌*Bacillus sonorensis*。将300mL营养肉汤培养基分装于500mL锥形瓶中,121℃灭菌20min,

在双人净化工作台上用接种环挑取活化的甘草内生菌菌种10环,接种于灭菌的营养肉汤培养液中,在25℃、200r·min⁻¹条件下在摇床发酵培养4d,过滤后在4℃、3000r·min⁻¹条件下离心15min,取上清液,60℃烘干备用,将其粉末用适量蒸馏水稀释后用于体内抗炎试验。体外抗炎试验时,将烘干的甘草内生菌发酵物粉末用含10%FBS的1640培养基溶解,分别配成10、20、40mg·L⁻¹甘草内生菌代谢物。

2.2 甘草水提液、浸膏的制备

将栽培乌拉尔甘草除去杂质,洗净切厚片,晾干,取适量甘草加10倍量水,煎煮50min,过滤,再加8倍量水,煎煮40min,过滤,将2次滤液合并,水浴浓缩为含原药材1g·mL⁻¹的浓缩液,高压灭菌,<4℃环境下储存,用于体内抗炎试验。将制备的甘草水提液浓缩,60℃恒温真空干燥器中干燥12h至恒重,得甘草水提液浸膏(1g浸膏相当于生药2.5g),将上述浸膏用含10%FBS的1640培养基溶解,分别配置成10、20、40mg·L⁻¹甘草水提液浸膏,用于体外抗炎试验。

2.3 体外抗炎试验

2.3.1 RAW264.7细胞存活率试验(MTT法)^[5]取对数生长期贴壁的小鼠RAW264.7巨噬细胞,胰蛋白酶消化,用含10%FBS的1640培养基制成1×10⁶·mL⁻¹的单细胞悬液,接种于96孔培养板,每孔100μL,培养箱中培养24h,弃各孔培养液。空白对照组加含10%FBS的1640培养基培养,各药物组分别加入10、20、40mg·L⁻¹甘草水提液浸膏及甘草内生菌代谢物,预处理2h,再加入1mg·L⁻¹的LPS。每浓度设置4个复孔,继续培养24h。各孔加入20μL四甲基偶氮唑(MTT)的生理盐水溶液(浓度5g·L⁻¹,pH7.4),培养4h,弃培养液,每孔再加入二甲基亚砷(DMSO)150μL溶解,水平振荡5min,使甲瓚充分溶解,用酶标仪在波长492nm处测定吸光值(A),计算细胞存活率:细胞存活率(%)=A_{药物组}/A_{空白组}×100%。

2.3.2 对LPS诱导RAW264.7细胞分泌的NO、IL-1β、PGE₂含量的检测^[6]将浓度为1×10⁶·mL⁻¹的RAW264.7单细胞悬液,接种于96孔板,每孔加100μL,培养至细胞贴壁。分组处理:空白对照组添加1640培养基培养;模型组添加1mg·L⁻¹LPS培养;甘草浸膏组及内生菌代谢物8组分别加入10、20、40mg·L⁻¹甘草水提液浸膏或内生菌

代谢物, 预处理 2 h, 再加入 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 LPS 刺激培养。24 h 后, 吸取上清液, 按试剂盒说明书检测 NO、IL-1 β 、PGE₂ 的含量。

2.4 对 LPS 致急性肺炎大鼠的干预作用^[7]

90 只 SPF 级 Wistar 大鼠随机分为 9 组, 即空白组、模型组、阳性对照组、甘草水煎液组、内生菌代谢物 5 组(体外抗炎试验有效菌株), 每组 10 只。空白组、模型组、阳性对照组均给予生理盐水 $0.01 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, 甘草水煎液组给予甘草水煎液 $0.95 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 各内生菌代谢物组给予甘草内生菌发酵液烘干粉末 $0.95 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 每日 1 次, 连续 5 d。末次给药后 1 h, 除空白组外, 各组大鼠按 $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量尾静脉注射 LPS, 制备急性肺炎模型; 空白组注射等量生理盐水, 阳性对照组按 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量腹腔注射地塞米松。6 h 后, 用 10% 水合氯醛对大鼠进行腹腔注射麻醉(剂量为 $0.003 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$), 麻醉后将大鼠仰卧位固定, 脱毛消毒后股动脉取血, 抗凝, 全血用于检测外周血白细胞计数。另取血, 静置 1 h, $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, ELISA 法检测血清中 TNF- α 、IL-6、IL-10 的含量。

2.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析和显著性检验。方差齐时, 两两比较采用 LSD 检验; 方差不齐时, 采用 Tamhance's T2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对巨噬细胞 RAW264.7 存活率的影响

与空白组比较, 质量浓度为 10, 20, $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的各给药组细胞存活率无显著性差异, 表明受试药物在这 3 个浓度时, 无明显细胞毒性, 因此以 10, 20, $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为下一步体外抗炎研究中的给药剂量, 结果见表 1。

3.2 各组药物对 LPS 诱导的 RAW264.7 分泌炎症因子的影响

与空白组比较, 模型组 NO、PGE₂、IL-1 β 的含量显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 甘草浸膏组、JTZB063 组的 NO 含量以及 JTZB060 组的 NO、PGE₂ 含量显著降低($P < 0.05$); $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, JTZB006 组 NO、PGE₂、IL-1 β 的含量均显著降低, 其余各组个别指标含量降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 甘草浸膏组、5

组内生菌代谢物组(JTZB006、JTZB018、JTZB059、JTZB060、JTZB063)NO、PGE₂、IL-1 β 的含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与同一浓度($40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的甘草浸膏组比较, JTZB006、JTZB060 组 PGE₂ 的含量显著降低($P < 0.05$)。结果见表 1。

3.3 对 LPS 致急性肺炎大鼠的干预结果

3.3.1 对大鼠外周血白细胞数量的影响 与空白组比较, 模型组大鼠外周血白细胞数量显著增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳性对照组、甘草水煎液组、3 组(JTZB006、JTZB060、JTZB063)内生菌发酵物组大鼠外周血白细胞数量显著降低($P < 0.01$); JTZB018、JTZB059 组大鼠白细胞数量显著高于甘草水煎液组($P < 0.05$)。结果见表 2。

3.3.2 对肺炎模型大鼠炎症相关因子含量的影响 与空白组比较, 模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 的含量显著升高, IL-10 的含量显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳性对照组、甘草水煎液组、3 组内生菌代谢物组(JTZB006、JTZB060、JTZB063)大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 的含量均显著降低, IL-10 的含量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与甘草水煎液组比较, JTZB006、JTZB060、JTZB063 组 IL-10 的含量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见表 3。

4 讨论

炎症是机体应对刺激产生的一种防御反应。静止的单核巨噬细胞产生极少量的炎症因子, LPS 刺激巨噬细胞后产生大量炎症因子和炎症介质, 引起一系列炎症反应。本研究采用经典的 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 建立细胞炎症模型, 考察甘草内生菌代谢物的体外抗炎作用。巨噬细胞受到外界 LPS 刺激时, 诱导型 NO 合成酶(iNOS)大量生成, NO 被大量合成, 异常升高, 促进巨噬细胞产生 PGE₂、TNF- α 和 IL-1 β 等炎症因子和炎症介质, 这些因子又激活 iNOS, 促进机体产生更多的 NO, 加重炎症反应。在 LPS 等刺激诱导下, 环氧酶-2 大量合成, 催化花生四烯酸产生 PGE₂, PGE₂ 可与缓激肽、白三烯等炎症介质起协同作用, 亦能与 NO 协同发挥致炎生物活性, 加剧炎症反应^[8]。巨噬细胞被认为是分泌合成 IL-1 β 最主要的来源, IL-1 β 是炎症反应的促炎介质之一, 并能进一步合成并诱导炎症始动因子 TNF- α 的合成释放, 加剧炎症反应。

MTT 结果显示, 浓度为 10, 20, $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 差异, 表明受试药物在这 3 个浓度时, 无明显细

表 1 对巨噬细胞 RAW264.7 存活率及分泌炎症因子的影响($n=4, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects on the macrophages survival rate and the secretion of inflammatory factors in RAW264.7 cell($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PGE ₂ / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-1 β / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
空白组	-	100	15.60±1.31	86.24±9.25	8.05±0.45
模型组	1	95.8	89.53±8.02 ¹⁾	420.85±57.85 ¹⁾	35.24±5.77 ¹⁾
甘草浸膏组	10	94.2	76.21±5.67 ²⁾	395.44±54.17	31.36±7.73
	20	90.9	64.38±5.31 ³⁾	346.87±63.47	26.50±9.29
	40	92.3	55.29±5.59 ³⁾	286.79±62.85 ²⁾	19.68±5.56 ³⁾
JTZB006	10	96.8	80.45±5.84	354.79±36.77	28.14±4.79
	20	94.9	75.82±4.87 ²⁾ 4)	289.04±39.78 ³⁾	25.32±5.52 ²⁾
	40	94.5	65.87±4.99 ³⁾ 4)	214.39±41.33 ³⁾ 4)	22.08±6.29 ²⁾
JTZB014	10	94.3	82.56±6.43	397.21±55.36	30.25±7.73
	20	92.1	80.77±7.46 ⁴⁾	368.82±62.78	32.19±8.03
	40	96.2	85.42±6.69 ⁵⁾	337.61±54.22	38.56±7.97 ⁵⁾
JTZB018	10	96.6	78.53±6.20	347.23±58.56	26.59±6.65
	20	95.5	75.40±4.26 ²⁾ 4)	304.89±56.07 ²⁾	25.37±5.99
	40	95.3	62.34±5.02 ³⁾	273.16±58.09 ³⁾	20.99±5.12 ³⁾
JTZB043	10	97.5	86.45±9.16	398.46±71.28	32.75±6.35
	20	97.1	80.33±7.21 ⁴⁾	415.32±42.06	30.28±7.67
	40	93.6	84.25±9.69 ⁵⁾	438.05±72.79 ⁴⁾	30.89±8.66
JTZB059	10	98.5	81.54±6.27	384.20±66.68	27.09±6.04
	20	96.9	73.42±6.58 ²⁾	340.72±64.50	24.52±5.61 ²⁾
	40	97.4	62.47±5.52 ³⁾	267.54±51.32 ³⁾	20.17±6.32 ²⁾
JTZB060	10	95.3	77.38±5.82 ²⁾	297.32±53.40 ²⁾ 4)	31.08±4.80
	20	94.7	65.49±6.15 ³⁾	246.17±59.57 ³⁾	27.12±6.31
	40	93.1	58.75±4.89 ³⁾	192.49±33.73 ³⁾ 4)	22.55±5.25 ²⁾
JTZB062	10	94.0	80.58±8.54	385.24±63.61	29.46±8.01
	20	92.3	72.46±9.03 ²⁾	400.16±59.81	31.52±8.05
	40	91.2	70.28±5.49 ³⁾ 5)	420.78±61.16 ⁴⁾	33.94±7.53 ⁴⁾
JTZB063	10	95.3	76.54±4.97 ²⁾	415.26±54.53	28.04±5.88
	20	94.5	65.48±6.83 ³⁾	356.27±66.30	24.37±7.17
	40	92.3	61.74±4.48 ³⁾	268.22±49.19 ³⁾	19.22±6.96 ²⁾

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; 与同一质量浓度的甘草浸膏组比较, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; compared with the same concentration groups of extractum *Glycyrrhiza*, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$.

表 2 各组大鼠外周血白细胞计数($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Peripheral white blood cell counts of rats in each group($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	WBC/ $\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$
空白组	-	8.56±1.29
模型组	0.005	15.50±2.17 ¹⁾
阳性对照组	0.95	9.42±1.77 ²⁾
甘草水煎液组	0.95	10.97±1.17 ²⁾
JTZB006	0.95	9.87±1.47 ²⁾
JTZB018	0.95	13.65±2.48 ³⁾
JTZB059	0.95	13.17±2.46 ³⁾
JTZB060	0.95	9.59±1.72 ²⁾
JTZB063	0.95	12.05±2.06 ²⁾

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$; 与甘草水煎液组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$; compared with *Glycyrrhiza* water decoction group, ³⁾ $P<0.05$.

表 3 各组大鼠血清中炎症相关因子的含量($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The contents of inflammation-associated factors in serum of rats($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-6/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-10/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
空白组	120.05±40.17	185.32±23.67	885.76±62.56
模型组	318.20±54.00 ¹⁾	364.12±34.61 ¹⁾	430.52±65.93 ¹⁾
阳性对照组	175.44±38.49 ³⁾	228.65±34.00 ³⁾	725.09±79.14 ³⁾
甘草水煎液组	230.96±33.69 ³⁾	270.57±37.81 ³⁾	596.78±66.81 ³⁾
JTZB006	222.48±34.92 ²⁾	273.41±41.23 ³⁾	711.34±60.62 ³⁾ 5)
JTZB018	280.65±45.69 ⁴⁾	315.20±50.78	489.35±84.10 ⁴⁾
JTZB059	298.42±48.40 ⁵⁾	338.45±49.06 ⁵⁾	509.59±90.51 ⁴⁾
JTZB060	207.35±36.69 ³⁾	246.52±46.44 ³⁾	724.90±82.96 ³⁾ 5)
JTZB063	211.90±51.90 ³⁾	294.64±44.85 ²⁾	699.72±90.76 ³⁾ 4)

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; 与甘草水煎液组比较, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; compared with *Glycyrrhiza* water decoction group, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$.

胞毒性。因此, 选用这 3 个质量浓度作为体外抗时, 各给药组细胞存活率与空白组相比无显著性炎症研究剂量。与模型组比较, $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘草浸膏组和 5 组内生菌代谢物组(JTZB006、JTZB018、JTZB059、JTZB060、JTZB063)巨噬细胞 RAW264.7 分泌的 NO、PGE₂、IL-1 β 的含量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明甘草水提液浸膏及 5 组内生菌代谢物具有体外抗炎作用, 能显著抑制 RAW264.7 合成炎症因子 NO、PGE₂、IL-1 β 。

甘草具有清热解毒、祛痰止咳之功, 常用于治疗外感、内伤所致的咳嗽痰多之症。LPS 为内毒素的主要活性成分。本研究采用 LPS 诱导大鼠急性肺炎模型, 探讨上述具有体外抗炎作用的 5 组甘草内生菌代谢物对急性肺炎模型大鼠的干预作用。

急性肺炎早期以渗出、水肿为特点, 继而机体白细胞增高, 并与血管内皮细胞相互作用, 导致炎性白细胞在炎症病灶区域集聚。同时, 激活的血管内皮细胞和单核细胞释放大量促炎性因子。TNF- α 主要由激活的单核-巨噬细胞分泌产生。炎症反应时, TNF- α 大量释放, 激活炎症细胞释放大量炎症介质, 并作用于血管内皮细胞, 促进粘附分子的表达, 使血管内皮细胞发生改变, 促进炎症介质及炎性细胞因子的产生, 形成细胞因子的炎症瀑布连锁效应, 引起肺部一系列炎性损害。因此, TNF- α 水平是反应肺部感染及病变程度的标志物^[9]。IL-6 主要由活化的 T 淋巴细胞、成纤维细胞、肺泡巨噬细胞等多种免疫和非免疫细胞分泌。炎症反应时, IL-6 是一种主要的炎性细胞因子。研究表明, IL-6 在机体针对革兰阴性菌感染产生的炎症反应中起主要作用, IL-6 的含量与肺炎病变程度呈正相关^[10], IL-6 既可作为反应肺部炎症轻重程度的指标, 亦可作为监测药物抗炎疗效的指标^[11]。

LPS 所致的炎症是一种复杂的防御性免疫体系, 由多种细胞、多种因子参与, 通过调节促炎和抗炎系统之间的平衡, 介入炎症的发生、发展过程。炎症时, 抗炎系统亦被激活, IL-10 是重要的免疫抑制因子, 炎症反应时, IL-10 作为抗炎因子, 能抑制 TNF- α 、IL-6 等促炎因子的表达, 同时 IL-10 又是细胞因子合成的抑制因子, 能抑制活化的淋巴细胞产生细胞因子, IL-10 还能抑制单核细胞、巨噬细胞产生致炎介质^[12]。因此, IL-10 高表达可减轻机体炎症反应, 减少胶原的产生, 有效控制炎症。

结果显示, 与模型组比较, 阳性对照组、甘草水煎液组、3 组内生菌代谢物组(JTZB006、JTZB060、JTZB063)大鼠外周血中白细胞数量及血清中 TNF- α 、IL-6 的含量均显著降低, IL-10 的含量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明 3 株内生菌的代谢物对急性肺炎模型大鼠具有抗炎作用。

综上, 3 株甘草内生菌代谢物(JTZB006、JTZB060、JTZB063)对 LPS 诱导的炎症模型具有体外及体内抗炎作用。

REFERENCES

- [1] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces* and reanae, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216.
- [2] KROHN K, FLORKE U. Metabolites from fungi 15. New iso-coumarins from an endophytic fungus isolated from the Cana-dian thistle *circiumarvense* [J]. *Nat Prod Lett*, 2001, 5(5): 353-361.
- [3] MAN Q, DENG Y, YANG Z J, et al. Comparative study on the intervention effects of endophytic bacteria isolated from *Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma* on rats with phlegm turbidity obstructing in the lung [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2017, 34(2): 161-165.
- [4] PARK S J, YOUN H S. Suppression of homodimerization of toll-like receptor 4 by isoliquiritigenin [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(14/15): 1736-1740.
- [5] WU Y J, SU J, HUANG P J, et al. Buddleoside prevents TNF- α -induced human aortic endothelial cells inflammatory injury through inhibiting TLR4/I κ B α /NF- κ B signaling pathway [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2017, 34(5): 637-643.
- [6] WANG Y H, ZHU Y P, YANG X D, et al. Screening of endophytic fungi from *Curcuma wenyujin* with anti-inflammatory and anti-oxidant activities [J]. *Drug Evaluation Res*(药物评价研究), 2013, 36(2): 90-94.
- [7] OU L L, YU X, ZHU Y, et al. Anti-inflammatory effects of *Achyranthes aspera* on animal models of acute inflammation [J]. *West China J Pharm Sci*(华西药学杂志), 2012, 27(6): 644-646.
- [8] PARK J Y, PLILLINGER M H, ABRAMSON S B. Prostaglandin in E2 synthesis and secretion: The role of PGE₂ synthesis [J]. *Clin Immunol*, 2006, 119(3): 229-240.
- [9] JERALA R. Structural biology of the LPS recognition [J]. *Int J Med Microbiol*, 2007, 297(5): 353-363.
- [10] SHAO M Y, HUANG P, CHENG R. Interleukin-6 polymorphisms modify the risk of periodontitis: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2009, 10(12): 920.
- [11] CHEN W L, LIU X J. Clinical study on the effects of Huatan zhike mixture on the levels of serum SAA, IL-6, IL-1 β and lung function in acute exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2017, 34(3): 432-435.
- [12] CHEN Y M, HUANG W J, LI S L, et al. Changes of IFN- γ , IL-6 and TNF- α levels in rats with severe pneumonia [J]. *Chin J Pathophysiol*(中国病理生理杂志), 2007, 23(3): 492-494.

收稿日期: 2017-10-22

(本文责编: 蔡珊珊)