

文章编号: 1674-5566(2019)01-0029-08

DOI:10.12024/jsou.20180402268

紫檀芪影响脂多糖诱导巨噬细胞炎症因子的变化

姚 昀¹, 刘克海^{1,2}, 胡晓倩^{1,2}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 采用脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 建立炎症模型, 评价紫檀芪的抗炎作用。在 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中, 添加紫檀芪进行干预, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)方法检测细胞中炎症因子单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1), 白细胞介素 6(IL-6), 白细胞介素 1 β (IL-1 β), 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的 mRNA 表达量, Griess 法检测培养基中一氧化氮(NO)的释放量, 采用 Western blotting 方法进一步检测细胞中细胞外调节蛋白激酶(ERK), c-Jun 氨基末端激酶(JNK), p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)和核转录因子 κ B-p65(NF- κ B p65)的蛋白磷酸化水平。结果发现: 紫檀芪能够显著抑制炎症因子基因的表达和炎症介质 NO 的释放; 紫檀芪 + LPS 组中 ERK, p38 和 p65 的蛋白磷酸化水平显著下降。紫檀芪能显著抑制炎症因子 MCP-1, IL-6, IL-1 β , TNF- α 和 iNOS 的 mRNA 表达和 NO 的释放, 其机制可能与阻断丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和 NF- κ B 信号通路相关。

关键词: 紫檀芪; 巨噬细胞; 炎症因子; 丝裂原活化蛋白激酶; NF- κ B

中图分类号: TS 201.4 **文献标志码:** A

炎症是机体应对外来刺激的一种防御机制, 是一种常见的病理过程^[1]。然而长期的炎症反应或炎症反应过强则会诱导相关疾病的发生, 如肝炎、痛风、动脉粥样硬化甚至是癌症等^[2-5]。巨噬细胞是机体先天的免疫细胞, 在炎症反应中起重要作用^[6-7]。在 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中, toll-like 受体 4(TLR4) 识别并结合 LPS, 进而促进炎症信号传导并诱导 MAPK 和 NF- κ B 蛋白激酶的激活, 导致 MCP-1、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子的转录以及 NO 等炎性介质的释放, 最终导致炎症反应^[8-9]。

紫檀芪是近年来发现的一种优秀的抗氧化成分, 主要存在于蓝莓、葡萄等水果中, 天然来源的优势使得其在功能食品领域具有广阔的应用前景^[10]。目前, 关于紫檀芪的研究多集中在制备、合成和抗癌活性方面, 尚未发现国内有针对紫檀芪抗炎活性的研究^[11-13]。因此, 本研究以 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞建立炎症模型, 观察紫檀芪对炎症介质和炎性因子生成的影响, 并

对其抗炎机制进行进一步的探究, 为紫檀芪合理开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小鼠 RAW264.7 细胞株购自中国科学院上海细胞库; 紫檀芪(Pterostilbene, Pte; 纯度 99%) 购自中国杭州瑞树生化有限公司; 脂多糖(L4391, 0111; B4) 购自美国 Sigma 公司; 一氧化氮(NO)测定试剂盒购自中国南京建成生物工程研究所; Trizol 试剂, PrimeScript™ reagent Kit with gDNA Eraser 逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; Faststart Essential DNA Green Master 实时定量 PCR 试剂盒购自瑞士 Roche 公司; 一抗: anti-ERK1/2, anti-p-ERK1/2, anti-JNK, anti-p-JNK, anti-p38, anti-p-p38, anti-NF- κ B p65, anti-NF- κ B p-p65, 二抗: HRP-Linked antibody 购自美国 Cell Signaling 公司。

收稿日期: 2018-04-10 修回日期: 2018-05-10

基金项目: 国家自然科学基金(31601559)

作者简介: 姚 昀(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为白藜芦醇衍生物的抗炎活性。E-mail: yaoyun0111@163.com

通信作者: 胡晓倩, E-mail: xqhu@shou.edu.cn

1.2 实验方法

1.2.1 RAW264.7 细胞培养

RAW264.7 细胞使用含 10% FBS、1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基在 37 °C、5% CO₂ 浓度中进行培养。细胞生长至 80% ~ 90% 后进行传代, 1 ~ 2 d 换液 1 次、3 ~ 4 d 传代 1 次。细胞传代 3 次, 待细胞状态稳定后进行下一步实验。

1.2.2 RAW264.7 细胞炎症模型的建立

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞以 2×10^6 个/mL 接种到 6 孔板中, 每孔 2 mL, 置于细胞培养箱中使细胞稳定生长, 待细胞贴壁后, 随机分为 4 组, 每个处理组设 3 个平行, 分别加入 0、50、100 和 200 ng/mL 的 LPS 进行刺激 24 h, 促使细胞产生炎症因子。采用 qPCR 法检测 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中炎症因子 *MCP-1*、*IL-6*、*IL-1 β* 和 *TNF- α* 表达量来确定 LPS 诱导炎症的合适浓度。

1.2.3 细胞活力的测定

为避免加入的紫檀芪因浓度过大而导致细胞损伤, 设置浓度梯度的紫檀芪, 采用结晶紫染色法^[14]检测紫檀芪对细胞存活率的影响, 以确定最终实验浓度。将 RAW264.7 细胞以 2×10^4 个/mL 接种到 96 孔板中, 每孔 200 μ L, 置于细胞培养箱中使细胞稳定生长, 待细胞贴壁后, 加入 DMSO 溶解的紫檀芪, 浓度依次为 0、5、10、15 和 20 μ mol/L, 每一浓度重复 5 孔, 培养 24 h 后用结晶紫染色法染色, 在酶联免疫检测仪 (SynergyTM Mx, 美国 BioTek) 570 nm 处测量各孔的吸光值。

1.2.4 NO 释放量的测定

LPS 刺激 RAW264.7 细胞后会释放大量的 NO, 而 NO 化学性质活泼, 在体内代谢很快转化

为硝酸盐 (NO₃⁻) 和亚硝酸盐 (NO₂⁻), 通过检测培养基中硝酸盐和亚硝酸盐含量来反映 NO 生成。调整细胞悬液浓度为 2×10^5 个/mL, 接种于 12 孔培养板, 待细胞长至 60% ~ 70% 后, 分为 3 组处理, 分别为对照组、LPS 处理组及 LPS 加紫檀芪组, 每组设置 3 个平行, 继续培养 24 h。收集培养基, 600 g 离心 5 min 取上清, 参照一氧化氮 (NO) 试剂盒说明操作, 通过测定 540 nm 处吸光值来衡量培养基中 NO 的含量。计算公式如下:

$$C_{-} = \frac{A_n - A_0}{A - A_0} \times C \times n \quad (1)$$

式中: C_{-} 为 NO₂⁻/NO₃⁻ 含量, μ mol/L; A_n 为样品的测定 OD 值; A_0 为空白 OD 值; A 为标准品的 OD 值; C 为标准品的浓度, 100 μ mol/L; n 为样品测试前稀释倍数。

1.2.5 细胞总 RNA 提取、逆转录及 Realtime-PCR

将 RAW264.7 细胞转入到 6 孔板中, 每孔中的细胞个数为 2×10^6 个/mL, 每孔 2 mL, 待细胞长至 60% ~ 70% 后, 分为 3 组处理, 分别为对照组、LPS 处理组及 LPS 加紫檀芪组, 每组设置 3 个平行, 继续培养 24 h。收集细胞, 采用 Trizol 试剂提取总 RNA, 通过测定吸光值 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 并计算其比值来判断 RNA 的纯度并测定其浓度, 按照 cDNA 逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA; 通过特异性引物进行 Realtime-PCR 扩增, *18S* 作为内参, 检测对应炎症因子的表达量, 引物序列见表 1。此反应依照 Faststart Essential DNA Green Master 试剂盒进行, 扩增程序: 95 °C, 10 min; 95 °C, 10 s; 60 °C, 10 s; 72 °C, 10 s; 45 个循环。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
<i>MCP-1</i>	AGCTCTTTCTCCACCA	CTACAGCTTCTTTGGGACACCT
<i>IL-6</i>	AGCCAGAGTCCTTCAGAGAGAT	GCACTAGGTTTGGCCG ACTAGAT
<i>IL-1β</i>	GCAACTGTTCCTGAACCTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
<i>TNF-α</i>	CACCACGCTCTTCTGTCTACTG	CTTGAGATCCATCGCGTTG
<i>iNOS</i>	GCCAGCCTGTGAGACCTTTG	GCATTGGAAGTGAAGCGTTTTC
<i>18S</i>	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCC

1.2.6 Western blot 法检测 RAW264.7 细胞中 MAPK 和 NF- κ B p65 蛋白表达水平

将 RAW264.7 细胞转入到 6 孔板中, 每孔中

的细胞个数为 2×10^6 个/mL, 每孔 2 mL, 细胞培养 48 h 后, 分为 3 组处理, 分别为对照组、LPS 处理组和 LPS 加紫檀芪组, 每组设置 3 个平行, 培

养 30 min 后, PBS 冲洗 2 遍, RIPA 裂解液提取蛋白, 收集细胞蛋白, 定量, 等量蛋白上样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 半干转 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 一抗 4 °C 过夜, PBST 洗膜 3 次, HRP 标记二抗 30 min, PBST 洗膜 3 次, ECL 化学发光显色反应, 用凝胶成像分析系统成像。

1.3 统计学处理

实验数据采用 Graph Pad Prism 5.0 软件进行处理, 所有数值以 Mean ± SEM 表示, 组间比较采用方差分析和 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异显著。

2 结果

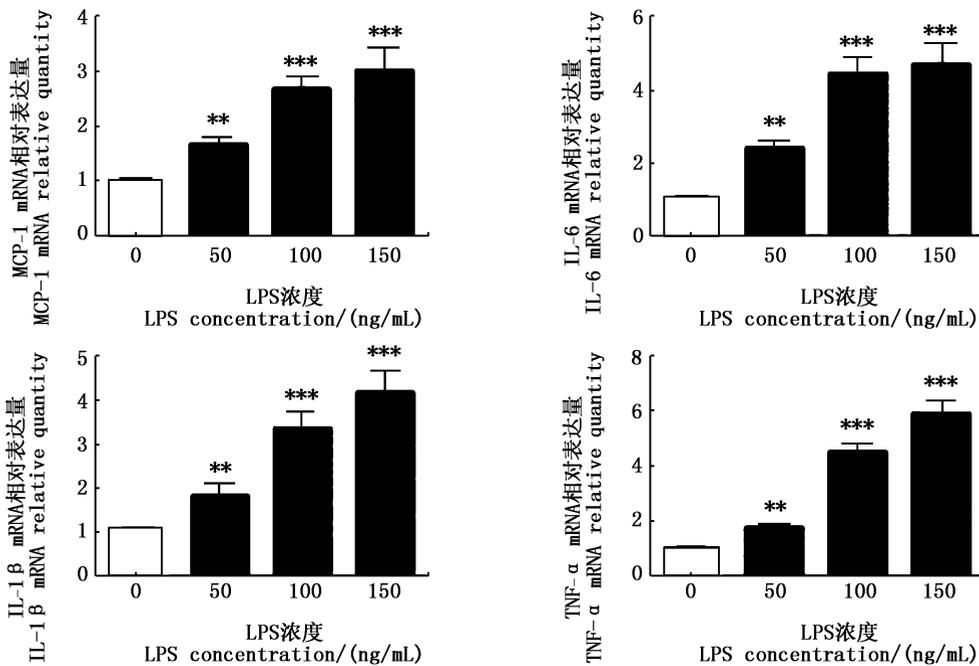
2.1 不同浓度 LPS 对 RAW264.7 细胞炎症因子表达的影响

为确定 LPS 诱导炎症的合适浓度, 分别检测了 50、100 和 150 ng/mL 的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞对炎症因子表达量的影响。MCP-1、IL-6、IL-1β 和 TNF-α 是免疫细胞分泌的一系列重要炎症

因子。由图 1 可知, 3 种浓度梯度的 LPS 在处理细胞 24 h 后, 均能诱导 RAW264.7 细胞提高炎症因子 MCP-1、IL-6、IL-1β 和 TNF-α 基因的表达量。在 100 ng/mL 的 LPS 刺激下, 对炎症因子表达上调已经达到极显著的效果 (*P* < 0.001), 细胞产生明显的炎症反应, 且未见细胞损伤, 因此后续实验选用 100 ng/mL 的 LPS 刺激细胞产生炎症。

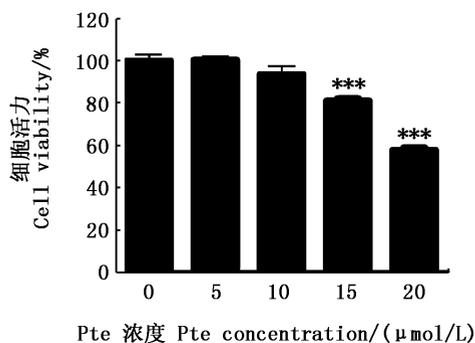
2.2 紫檀芪对 RAW264.7 细胞活力的影响

为明确紫檀芪的无毒作用浓度, 检测了不同浓度紫檀芪对 RAW264.7 细胞活力的影响。图 2 结果显示, 不同浓度的紫檀芪处理细胞 24 h 后, 与空白组相比, 低于 10 μmol/L 的紫檀芪处理对细胞存活率无明显作用, 超过 10 μmol/L 浓度的紫檀芪使细胞存活率降低到 80% 左右, 毒性作用明显 (*P* < 0.001)。因此, 最终确定使用的紫檀芪浓度为 5 μmol/L。



与空白组比较, * * *P* < 0.01; * * * *P* < 0.001
 Compared with the blank group, * * *P* < 0.01; * * * *P* < 0.001

图 1 不同浓度 LPS 诱导 RAW264.7 细胞对炎症因子基因表达的影响
 Fig.1 Effects of different concentration of LPS on gene expression of inflammatory cytokines in RAW264.7 cells



与空白组比较, *** $P < 0.001$

Compared with the blank group, *** $P < 0.001$

图2 紫檀芪对 RAW264.7 细胞活力的影响

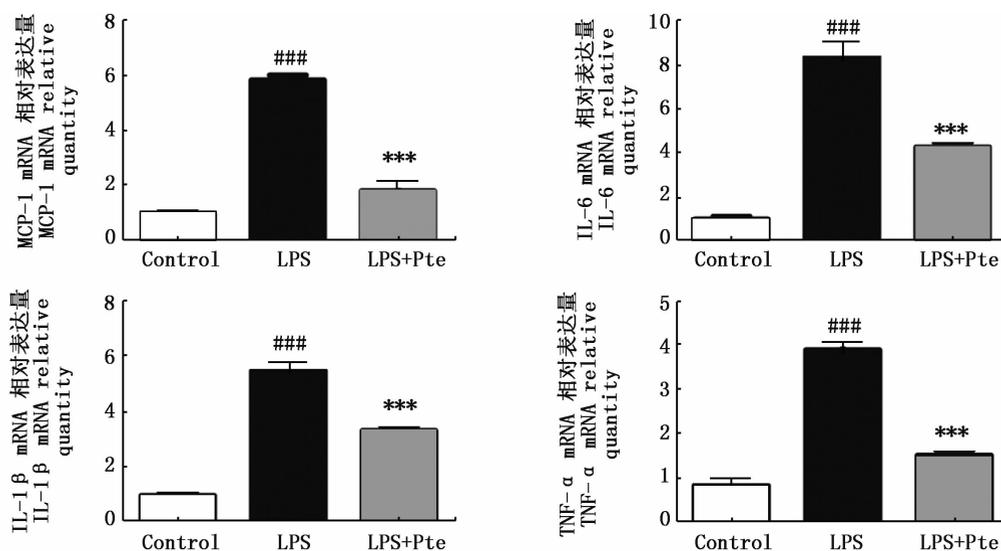
Fig. 2 Effects of Pte on cell viability in RAW264.7 cells

2.3 紫檀芪对 RAW264.7 细胞炎症因子基因表达的影响

由图3可知,与空白组对比,100 ng/mL LPS 刺激细胞后,极大提高了 *MCP-1*、*IL-6*、*IL-1β* 和 *TNF-α* 这4种炎症因子的 mRNA 表达水平,说明 LPS 刺激可以造成巨噬细胞炎症因子转录水平的显著上升,这与模型建立的结果一致。与 LPS 组相比,紫檀芪对上述炎症因子均有抑制作用,且效果显著 ($P < 0.001$)。

2.4 紫檀芪对 NO 释放量及 *iNOS* 基因表达的影响

NO 是一种重要的炎性介质,参与宿主的免疫防御和调节过程。由图4可知,紫檀芪能显著

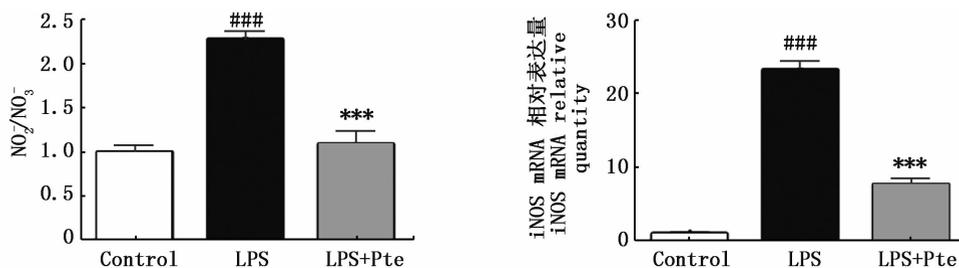


与 control 组比较,### $P < 0.001$; 与 LPS 组比较,*** $P < 0.001$

Compared with the control group, ### $P < 0.001$; Compared with the blank group, *** $P < 0.001$

图3 紫檀芪对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞 *MCP-1*、*IL-6*、*IL-1β* 和 *TNF-α* 表达量的影响

Fig. 3 Effects of Pte on expression of *MCP-1*, *IL-6*, *IL-1β* and *TNF-α* in LPS-induced RAW 264.7 cells



与 control 组比较,### $P < 0.001$; 与 LPS 组比较,*** $P < 0.001$

Compared with the control group, ### $P < 0.001$; Compared with the blank group, *** $P < 0.001$

图4 紫檀芪对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞 NO 释放量及 *iNOS* 基因表达的影响

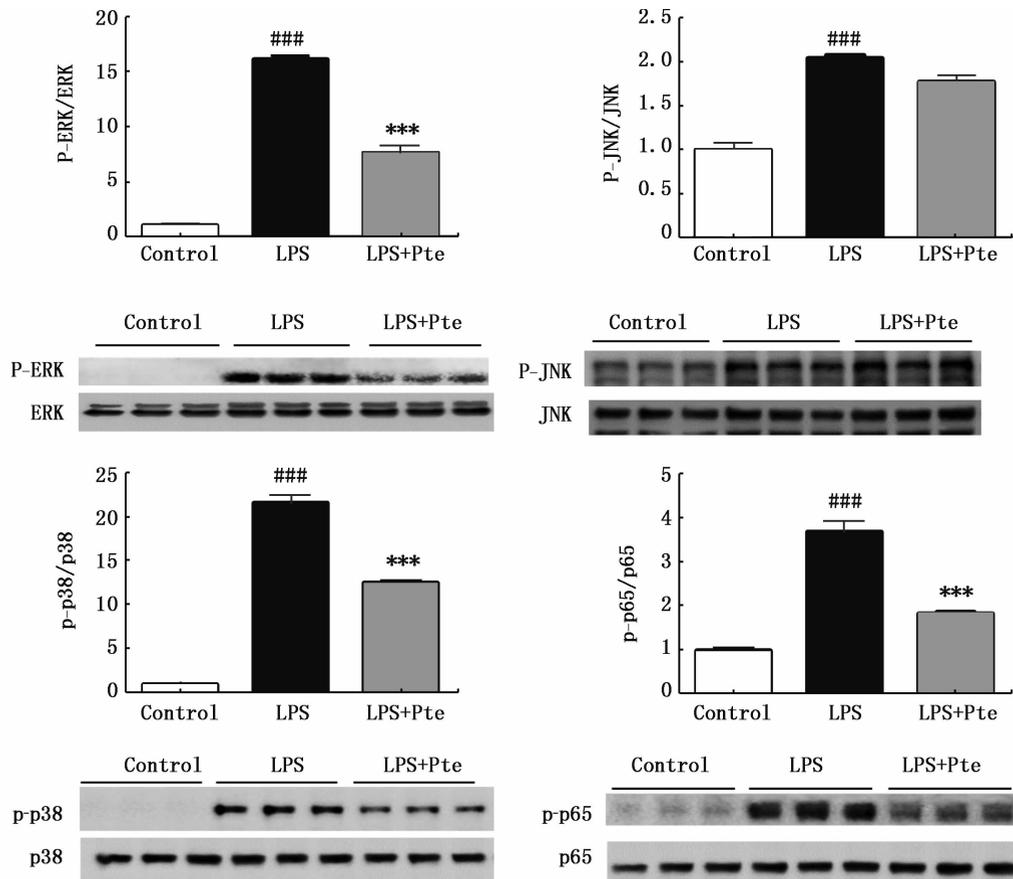
Fig. 4 Effects of Pte on NO production and gene expression of *iNOS* in LPS-induced RAW 264.7 cells

抑制细胞 NO 的释放,经紫檀芪处理,培养基中的 NO 浓度恢复至空白对照水平($P=0.001$)。iNOS 作为 NO 生成的关键限速酶,其基因表达水平是调控 NO 释放的重要因素,通过检测 iNOS mRNA 水平的表达,发现 LPS 可显著上调 iNOS 表达,而紫檀芪能够显著降低 LPS 诱导的 iNOS 表达量($P<0.001$)。

2.5 紫檀芪对 RAW264.7 细胞中 MAPK 和 NF- κ B p65 蛋白磷酸化的影响

MAPK 包括 ERK、JNK 和 p38,是参与炎症相关信号通路的重要酶。因此,通过 Western blot

法检测了紫檀芪对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中 MAPK 途径的影响。结果显示,紫檀芪对 ERK 和 p38 的磷酸化均有抑制作用,但对 JNK 没有抑制作用。另外,NF- κ B 在调节炎症因子中起重要作用。活化的 NF- κ B 易位至细胞核以结合特异性 DNA,进而调节各种炎性细胞因子的表达。因此,进一步检测了紫檀芪对 LPS 诱导的巨噬细胞中 NF- κ B p65 磷酸化的影响,结果显示紫檀芪显著降低了 p65 的蛋白磷酸化水平。以上结果表明紫檀芪通过抑制 MAPK 和 NF- κ B 途径抑制炎症因子基因的表达。



与 control 组比较,### $P<0.001$; 与 LPS 组比较,*** $P<0.001$

Compared with the control group,### $P<0.001$; Compared with the blank group,*** $P<0.001$

图5 紫檀芪对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞 MAPK 和 NF- κ B p65 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of Pte on protein expression of MAPK and NF- κ B p65 in LPS-induced RAW264.7 cells

3 讨论

紫檀芪是一种存在于蓝莓、树莓中的多酚物质。尽管其抗炎作用少有报道,其结构类似物白藜芦醇,则被公认为具有优良的抗炎效果^[15-16]。

鉴于其与白藜芦醇结构类似,推测紫檀芪很有可能具有抑制炎症的作用。探究了紫檀芪在 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中的抗炎作用,发现紫檀芪能够显著抑制促炎因子 MCP-1, IL-6, IL-1 β 和 TNF- α 在 mRNA 水平的表达,并能通过抑制 iNOS

表达来抑制 LPS 诱导的 NO 的产生。此外,还发现紫檀芪可能是通过阻断 MAPK 和 NF- κ B 通路来抑制炎症反应。

MCP-1 已经被证实是负责招募巨噬细胞的主要趋化因子,广泛参与了类风湿关节炎、心血管病和动脉粥样硬化等多种炎性疾病的发生^[17]。IL-6 是目前发现在慢性炎症疾病中作用最突出的细胞因子。同样,IL-1 β 和 TNF- α 能够增强巨噬细胞的敏感性,结合相应的受体,然后继续作为刺激信号激活更多的巨噬细胞,促进炎症的发展^[18-19]。上述炎症因子被广泛用于指示炎症反应强度。本研究通过检测 RAW264.7 巨噬细胞中上述炎症因子的基因表达,证实了紫檀芪显著降低了 LPS 诱导的炎症因子,可以抑制炎症发生,这与白藜芦醇的抗炎作用类似。彭洁等^[20]通过培养外周血单个核细胞,结果发现白藜芦醇能够有效抑制促炎因子 IL-1 β 、IL-6 及 MCP-1 表达。ZONG 等^[21]发现白藜芦醇同样能够抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 IL-1 β 和 TNF- α 的表达。此外,我们发现紫檀芪除了抑制 MCP-1、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子的表达,同时抑制了炎性介质 NO 的产生,具有多靶点抑制炎症反应的特性。NO 由一氧化氮合酶(NOS)催化产生,高浓度 NO 有一定杀菌作用,但可作为促炎介质引起全身炎症反应,在炎症相关发病过程中起关键作用^[22-23]。NOS 有 3 种亚型结构,其中诱导型一氧化氮合酶被认为是巨噬细胞中 NO 合成的主要限速酶。本研究表明紫檀芪通过下调 iNOS 的表达起到抑制 NO 生成的效果,这与白藜芦醇的作用途径一致^[24]。

MAPK 家族主要包括 3 种信号通路的转导,分别为 ERK、JNK 和 p38,这 3 条途径在炎症反应中起重要作用^[25]。ZONG 等^[21]研究发现白藜芦醇能够通过抑制 ERK、JNK 和 p38 的蛋白磷酸化水平来下调炎症因子的表达。与白藜芦醇不同的是,本实验结果显示紫檀芪能够有效抑制 ERK 和 p38 的磷酸化水平,而对 JNK 无明显抑制作用。因此,紫檀芪的抗炎作用与 ERK 和 p38 通路相关,主要通过抑制 ERK 和 p38 的磷酸化水平来下调炎症因子的表达。这可能由于两种多酚结构的不同,苯环上的羟基被甲氧基所取代,从而导致作用的途径不同。NF- κ B 是调节参与炎症的各种基因转录的关键核转录因子。一般而言,

NF- κ B 以异二聚体结合 I κ B 的形式位于细胞质中。当细胞受到刺激后,I κ B- α 被磷酸化并迅速降解,促进 NF- κ B p65 的激活和磷酸化。活化的 NF- κ B 易位至细胞核以结合目标 DNA 并诱导其下游炎性细胞因子如 MCP-1、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的过度表达,并最终诱导炎症反应的发生^[26-27]。因此,NF- κ B p65 的含量和形式的变化是 NF- κ B 途径活化的重要标志。本实验进一步探究了紫檀芪对 NF- κ B p65 蛋白表达的影响,结果显示紫檀芪能够显著降低 NF- κ B p65 的蛋白磷酸化水平,这表明紫檀芪对炎症因子的抑制作用部分是通过抑制 NF- κ B p65 的抑制而实现的。因此,紫檀芪还可通过阻断 NF- κ B 途径来发挥抗炎作用。

4 结论

总之,紫檀芪能够显著抑制多种炎症因子的 mRNA 表达以及炎性介质的释放,表现出显著的改善炎症效果。对其抗炎机制的分析提示,紫檀芪可能是通过阻断 MAPK 和 NF- κ B 途径的激活来抑制炎症因子的转录和表达,从而发挥抗炎的功效。因此,紫檀芪作为一种天然的多酚化合物,表现出多靶点抑制炎症反应的特性,在开发新型有效的功能性食品方面将具有很大优势。

参考文献:

- [1] LANDSKRON G, DE LA FUENTE M, THUWAJIT P, et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment [J]. Journal of Immunology Research, 2014. doi: 10.1155/2014/149185.
- [2] FRANCESCHI C, CAMPISI J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases[J]. The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences, 2014, 69 (s1): S4-S9.
- [3] ESSER N, LEGRAND-POELS S, PIETTE J, et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes [J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2014, 105(2): 141-150.
- [4] ELINAV E, NOWARSKI R, THAISS C A, et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms [J]. Nature Reviews Cancer, 2013, 13(11): 759-771.
- [5] WOJDASIEWICZ P, PONIATOWSKI Ł A, SZUKIEWICZ D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Mediators of Inflammation, 2014. doi: 10.1155/2014/561459.
- [6] GU Q L, YANG H L, SHI Q. Macrophages and bone

- inflammation[J]. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2017, 10: 86-93.
- [7] 倪湾,李敬双,于洋. 洋葱槲皮素对脂多糖诱导的小鼠腹腔巨噬细胞炎症反应抑制作用[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(23): 284-288.
- NI W, LI J S, YU Y. Inhibiting effect of onion quercetin on lipopolysaccharide-induced mice's enterocolitis macrophage inflammatory response[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(23): 284-288.
- [8] WANG T Y, WU F H, JIN Z G, et al. Plumbagin inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of the nuclear factor-kappa B and mitogen activated protein kinase signaling pathways in RAW 264. 7 cells [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 64: 177-183.
- [9] HANADA T, YOSHIMURA A. Regulation of cytokine signaling and inflammation[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2002, 13(4/5): 413-421.
- [10] 徐方方,漆睿,江斯炜,等. 紫檀芪的研究进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28(3): 406-410.
- XU F F, QI R, JIANG S W, et al. Progress in pterostilbene research[J]. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*, 2017, 28(3): 406-410.
- [11] PARK S H, JEONG S O, CHUNG H T, et al. Pterostilbene, an active constituent of blueberries, stimulates nitric oxide production via activation of endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2015, 70(3): 263-268.
- [12] 王标,杨玲英,曾庆友. 天然抗氧化剂紫檀芪的合成[J]. *应用化工*, 2015, 44(3): 431-433.
- WANG B, YANG L Y, ZENG Q Y. Study on the synthesis of natural antioxidant Pterostilbene [J]. *Applied Chemical Industry*, 2015, 44(3): 431-433.
- [13] SCHNEIDER J G, ALOSI J A, MCDONALD D E, et al. Pterostilbene inhibits lung cancer through induction of apoptosis[J]. *Journal of Surgical Research*, 2010, 161(1): 18-22.
- [14] FEOKTISTOVA M, GESERICK P, LEVERKUS M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells[J]. *Cold Spring Harbor Protoc*, 2016. doi: 10.1101/pdb.prot087379.
- [15] 付光新,姜鲜,李佳,等. 白藜芦醇对LPS刺激RAW264.7细胞炎症因子影响研究[J]. *现代预防医学*, 2010, 37(3): 568-569, 575.
- FU G X, JIANG X, LI J, et al. The effects of resveratrol on inflammatory cytokines release from RAW 2647 cells induced by LPS[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2010, 37(3): 568-569, 575.
- [16] 刘芳,曲极冰,李红,等. 白藜芦醇抗炎作用机制的初步研究[J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(15): 1138-1141.
- LIU F, QU J B, LI H, et al. Study on anti-inflammatory mechanisms of resveratrol [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2006, 41(15): 1138-1141.
- [17] KANDA H, TATEYA S, TAMORI Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116(6): 1494-1505.
- [18] HUNTER C A, JONES S A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease[J]. *Nature Immunology*, 2015, 16(5): 448-457.
- [19] TANIGUCHI K, KARIN M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer [J]. *Seminars in Immunology*, 2014, 26(1): 54-74.
- [20] 彭洁,韩雪莹,胡晓燕,等. 白藜芦醇对外周血单个核细胞中IL-1 β 、IL-6、MCP-1及SOCS1/3表达的影响[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2011, 49(11): 64-68.
- PENG J, HAN X Y, HU X Y, et al. The effect of resveratrol on expression of IL-1 β , IL-6, MCP-1 and SOCS1/3 in human peripheral blood mononuclear cells [J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2011, 49(11): 64-68.
- [21] ZONG Y, SUN L, LIU B, et al. Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264. 7 macrophage cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e44107.
- [22] HU W Z, YANG X J, ZHE C, et al. Puerarin inhibits iNOS, COX-2 and CRP expression via suppression of NF- κ B activation in LPS-induced RAW264. 7 macrophage cells[J]. *Pharmacological Reports*, 2011, 63(3): 781-789.
- [23] SHARMA J N, AL-OMRAN A, PARVATHY S S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases [J]. *Inflammopharmacology*, 2007, 15(6): 252-259.
- [24] ZHONG L M, ZONG Y, SUN L, et al. Resveratrol inhibits inflammatory responses via the mammalian target of rapamycin signaling pathway in cultured LPS-stimulated microglial cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32195.
- [25] SHEN C Y, ZHANG W L, JIANG J G. Immune-enhancing activity of polysaccharides from *Hibiscus sabdariffa* Linn. via MAPK and NF- κ B signaling pathways in RAW264. 7 cells [J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 34: 118-129.
- [26] JIANG F, GUAN H N, LIU D Y, et al. Flavonoids from sea buckthorn inhibit the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264. 7 macrophages through the MAPK and NF- κ B pathways [J]. *Food & Function*, 2017, 8(3): 1313-1322.
- [27] TAK P P, FIRESTEIN G S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2001, 107(1): 7-11.

Effects of pterostilbene on lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine expression in macrophages

YAO Yun¹, LIU Kehai^{1,2}, HU Xiaoqian^{1,2}

(1. Food Science and Technology College, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

Abstract: To evaluate the anti-inflammation effect of pterostilbene on RAW264.7 macrophages, an inflammation model in vitro was established by lipopolysaccharide (LPS) stimulation. After exposing RAW264.7 cells to pterostilbene and LPS, the mRNA expression of inflammatory cytokines including monocyte chemoattractant protein (*MCP*)-1, interleukin (*IL*)-6 and *IL*-1 β , tumor necrosis factor (*TNF*)- α , and inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Nitric oxide (NO) production in supernatant was analyzed using Griess method. The protein expression of extracellular regulated protein kinases (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and Nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) were detected by Western blot analysis. The results showed that pterostilbene significantly inhibited the gene expression of inflammatory cytokines and the production of NO. Pterostilbene significantly suppressed LPS-induced ERK, p38 and p65 phosphorylation. Data showed that pterostilbene could inhibit the mRNA expression of LPS-induced inflammatory cytokines including *MCP*-1, *IL*-6, *IL*-1 β , *TNF*- α and *iNOS*, and the release of NO, and its mechanism may be related to blocking the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and NF- κ B pathway.

Key words: pterostilbene; macrophage; inflammatory cytokine; MAPK; NF- κ B