

去氢木香炔内酯抑制脂多糖/干扰素- γ 刺激巨噬细胞炎症反应的研究

胡琼英¹, 袁芸¹, 赵梓亦²

1. 成都中医药大学附属医院检验科, 四川 成都 610072; 2. 代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室, 四川 成都 610072

【摘要】 **目的** 探讨天然植物木香的有效成分去氢木香炔内酯(DCL)对脂多糖(LPS)/干扰素- γ (IFN- γ)诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症反应的抗炎活性,确定DCL发挥抗炎活性的分子机制。**方法** 用LPS(0.5 μ g/ml)和IFN- γ (10 ng/ml)刺激RAW264.7巨噬细胞,再用不同浓度DCL处理RAW264.7巨噬细胞,检测巨噬细胞产生一氧化氮(NO)的量、前列腺素E2(PGE2)的浓度、NO和PGE2合成所需的上游酶——诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和环氧化酶-2(COX-2)的蛋白表达情况及相关信号通路关键蛋白如核转录因子- κ B(NF- κ B)的表达情况。**结果** 在无明显细胞毒性的情况下,DCL以剂量依赖性方式抑制RAW264.7巨噬细胞中由LPS/IFN- γ 刺激诱导产生的NO和PGE2,同时DCL还抑制了细胞中iNOS和COX-2的蛋白表达水平,提示其具有显著的抗炎活性。另外,DCL也显著地抑制了RAW264.7巨噬细胞炎症反应时激活的NF- κ B经典信号通路中关键蛋白NF- κ B抑制蛋白激酶 α/β (IKK α/β)和核转录因子- κ B抑制蛋白 α (I κ B α)的磷酸化。**结论** DCL通过抑制经典的NF- κ B信号通路发挥对巨噬细胞的抗炎活性,为NF- κ B通路相关的炎症性疾病治疗提供了新的治疗策略。

【关键词】 去氢木香炔内酯;巨噬细胞;抗炎活性;NF- κ B信号通路

【中图分类号】 R392

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-6170(2026)01-0057-05

Study on the inhibition of LPS/IFN- γ -stimulated macrophage inflammatory response by dehydrocostus lactone HU Qiong-ying¹, YUAN Yun¹, ZHAO Zi-yi² 1. Department of Laboratory Medicine, Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China; 2. TCM Regulating Metabolic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610072, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the anti-inflammatory activity of dehydrocostus lactone (DCL) from natural plant wood fragrance on lipopolysaccharide (LPS)/interferon-gamma (IFN - γ)-stimulated RAW264.7 macrophages and determine the molecular mechanism of the anti-inflammatory activity of DCL. **Methods** RAW264.7 macrophages were stimulated with LPS (0.5 μ g/ml) and IFN- γ (10 ng/ml), and then treated with different concentrations of DCL. The treated RAW264.7 cells were then detected the nitric oxide (NO) production, the prostaglandin E2 (PGE2) and their synthesized upstream enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2). Finally, key target proteins of nuclear factor kappa-B (NF- κ B) signaling pathway was also detected by western blot. **Results** Without exhibiting significant cytotoxicity, DCL inhibited the production of NO and PGE2 induced by LPS/IFN- γ in RAW264.7 macrophages in a dose-dependent manner. Additionally, DCL suppressed the protein expression levels of iNOS and COX-2 in the LPS/IFN- γ -stimulated RAW264.7 macrophages. These results indicated a notable anti-inflammatory activity of DCL. Additionally, DCL significantly inhibited the phosphorylation of key proteins in the NF- κ B classical signaling pathway, including I κ B kinase α/β (IKK α/β) and nuclear factor- κ B inhibitor α (I κ B α), during the inflammatory response in RAW264.7 macrophages. **Conclusions** DCL exerts an anti-inflammatory activity on macrophages by inhibiting the classical NF- κ B pathway. This provides a new therapeutic strategy for the treatment of inflammatory diseases related to NF- κ B pathway.

【Key words】 Dehydrocostus lactone; Macrophages; Anti-inflammatory activity; NF- κ B signaling pathway

巨噬细胞是机体主要的免疫细胞,可被细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和/或干扰素- γ (interferon-gamma, IFN- γ)等炎性物质激活,通过调节炎症的发生、发展和消退,在人体内稳态中发挥关键作用^[1,2]。活化的巨噬细胞可通过激活核转录因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)合成过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)及促炎因子——白细胞介素-6(Interleukin 6, IL-6)和肿瘤坏

死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)等^[3,4],从而激活MAPK等信号途径^[5]。过多的促炎细胞因子及活化的信号通路进一步通过募集和激活中性粒细胞和淋巴细胞引发相关炎症反应,从而导致组织器官损伤^[6]。因此,抑制巨噬细胞异常激活可作为炎症相关疾病的重要治疗策略^[7]。去氢木香炔内酯(dehydrocostus lactone, DCL)是一种从天然药材菊科植物中分离出来的倍半萜内酯。多项研究证实,DCL在抗癌^[8,9]、抗炎^[10,11]、抗氧化应激^[12,13]等病理过程中发挥重要的作用。DCL的抗炎生物活性虽已有部分文献报道,但其抗炎活性的确切分子作用机制尚未完全阐释。本实验旨在体外探讨DCL对LPS/IFN- γ 诱导的RAW264.7巨噬

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(编号:82074298);四川省中医药管理局科学技术研究专项课题(编号:2024MS160);成都中医药大学杏林学者青基人才专项(编号:QJRC2022007);成都中医药大学附属医院科技发展基金(编号:23MZ01)

细胞炎性反应是否有抑制作用, 以及其发挥抗炎作用所涉及的分子机制, 以期为炎症相关疾病的治疗提供候选药物和新的治疗方案。

1 材料与方法

1.1 材料 实验于 2023 年 9 月至 2024 年 3 月在代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室进行。小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7、BAY11-7082 (NF- κ B 抑制剂)、NO 检测试剂盒、IKK α / β 、I κ B α 及其磷酸化抗体购买于上海碧云天公司; 灭活胎牛血清购买于德国 PAN biotech 公司; DMEM 培养基购买于美国 Gibco 公司; DCL 购买于成都普瑞法公司; LPS 购自上海 Sigma 公司; 重组鼠 IFN- γ 购买于北京义翘神州公司; COX-2、iNOS、 β -Actin、 α -Tubulin、GAPDH 和 HRP 标记兔二抗均购买于武汉 ProteinTech 公司; CCK-8 试剂盒购买于上海 AbMole 公司; PGE2 ELISA 试剂盒购买于美国 R&D 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和 CCK-8 细胞活力检测 将 RAW264.7 细胞置于含有 10% 灭活血清的 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 等细胞长至 80% 后传代。将 RAW264.7 细胞 (1.5 × 10⁴/100 μ l) 接种于 96 孔板中用 LPS (0.5 μ g/ml) 和 IFN- γ (10 ng/ml) 和不同浓度 DCL 同时处理 24 h, 随之将 CCK-8 溶液 (10 μ l) 加入每个培养孔中, 于 37 °C 孵育 1 h 后, 应用多功能酶标仪 (FlexStation 3, Molecular Devices) 检测 450 nm 处的光密度值 (OD)。

1.2.2 Griess 试剂检测 NO 产量 将 RAW264.7 细胞 (1.5 × 10⁴/100 μ l) 置于 96 孔板中过夜, 用阳性对照药物或不同浓度的 DCL 与 LPS (0.5 μ g/ml) 和 IFN- γ (10 ng/ml) 同时刺激细胞 24 h, 按照 Griess 试剂盒操作流程检测细胞中的 NO 产量。

1.2.3 ELISA 检测 PGE2 浓度 将 RAW264.7 细胞 (6 × 10⁴/500 μ l) 置于 24 孔板中过夜, 用阳性对照药物或不同浓度的 DCL 与 LPS (0.5 μ g/ml) 和 IFN- γ (10 ng/ml) 同时刺激细胞 24 h, 按照 ELISA 试剂盒操作流程检测细胞培养物上清液中 PGE2 的浓度。

1.2.4 蛋白免疫印迹 (western blotting, WB) 检测蛋白 从 RAW264.7 细胞中提取蛋白, 以 10% SDS-PAGE 上分离总蛋白 20 μ g, 并转移至 PVDF (购买于美国赛默飞公司) 膜。配制 5% 脱脂牛奶在 Tris-HCl 缓冲盐水中添加 0.1% Tween-20 (TBS-T), 在室温下封闭膜 30 min 后, 添加一抗 (1 : 1000 稀释) 与膜在 4 °C 下孵育过夜。再将膜用 TBS-T 洗涤 3 次并与二抗 (1 : 5000 稀释) 在常温下孵育 1 h。用 TBS-T 洗涤 3 次后, 使用 ECL 显影液 (购自北京 4A Biotech 公司) 显影, 用赛智迷你型化学发光成像分析系统显色, 曝光采图, 并使用 Image J 软件进行定量。

1.3 统计学方法 采用 GraphPad Prism (8.0.1 版本) 统计学软件处理数据。计量资料以均数 \pm 标准差, 组间比较采用 Student-*t* 检验或单向方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DCL 有效抑制 LPS/IFN- γ 诱导 RAW264.7 巨噬细胞生成的 NO 和 PGE2 相较于对照组, LPS/IFN- γ 组的 NO 和 PGE2 水平明显升高, 用不同浓度 DCL 和阳性对照 BAY11-7082 (5 μ M) 处理, 细胞中 NO 和 PGE2 含量在 1 μ M DCL 中受到抑制, 且呈剂量依赖性 (图 1 a, b)。同时, CCK-8 细胞活性实验结果显示, DCL 对巨噬细胞无明显细胞毒性 (图 1 c)。

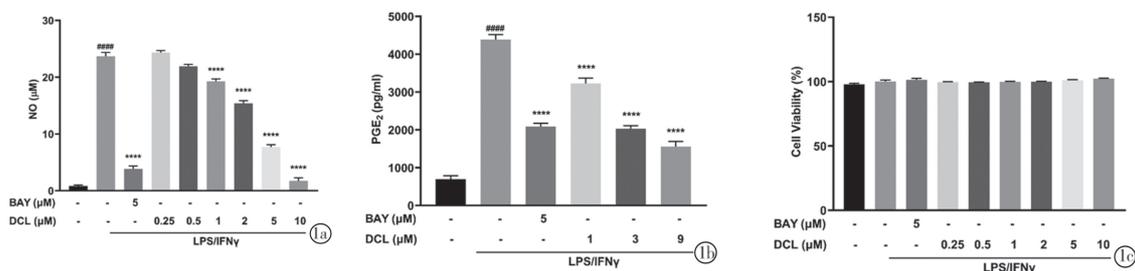


图 1 DCL 对 LPS/IFN- γ 刺激的巨噬细胞抗炎活性的影响 a: NO 试剂盒检测各组细胞培养上清液中 NO 含量; b: ELISA 方法检测各组细胞培养上清液中 PGE2 表达量; c: CCK-8 检测各组细胞的细胞活力 #### 与对照组比较, P < 0.0001; * * * * 与 LPS/IFN- γ 组比较, P < 0.0001

2.2 DCL 明显抑制 LPS/IFN- γ 刺激的 RAW264.7 巨噬细胞表达 iNOS 和 COX-2 蛋白 iNOS 和 COX-2 分别为 NO 和 PGE2 合成的上游酶, 因此检测了 DCL 处理 LPS/IFN- γ 刺激 RAW264.7 巨噬细胞后这两种蛋白的表达情况。相较于对照组, LPS/IFN-

γ 刺激的 RAW264.7 巨噬细胞组 iNOS 和 COX-2 的蛋白表达水平明显增高; 但经不同浓度 DCL 和 BAY 处理后, 炎性刺激的 RAW264.7 巨噬细胞中 iNOS 和 COX-2 表达水平分别在 9 μ M DCL 和 3 μ M DCL 受到明显抑制 (图 2 a, b)。

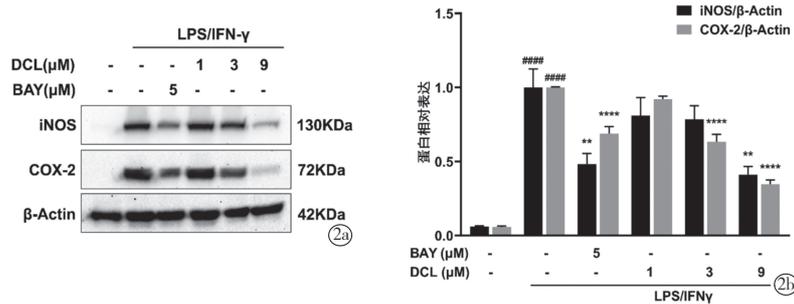


图2 DCL对LPS/IFN- γ 刺激的巨噬细胞中iNOS和COX-2蛋白表达的影响 a: WB检测各组细胞中iNOS和COX-2蛋白的表达含量;b:各组细胞中iNOS和COX-2蛋白的相对表达比较####与对照组比较, $P < 0.0001$;与LPS/IFN- γ 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$

2.3 DCL阻断LPS/IFN- γ 刺激的RAW264.7巨噬细胞NF- κ B信号途径 NF- κ B信号途径与炎症反应紧密相关,经典的NF- κ B信号途径涉及的关键蛋白包括IKK α / β 和I κ B α 。本实验用不同浓度的DCL和阳性对照药物BAY处理LPS/IFN- γ 刺激的RAW264.7巨噬细胞,然后收集和检测细胞蛋白。

结果证实,相较于对照组,LPS/IFN- γ 刺激的RAW264.7巨噬细胞组中IKK α / β 和I κ B α 蛋白的磷酸化水平明显升高,IKK α / β 总蛋白无明显变化,I κ B α 总蛋白明显降低,而DCL或BAY处理则可逆转以上趋势(图3a、b,表1)。

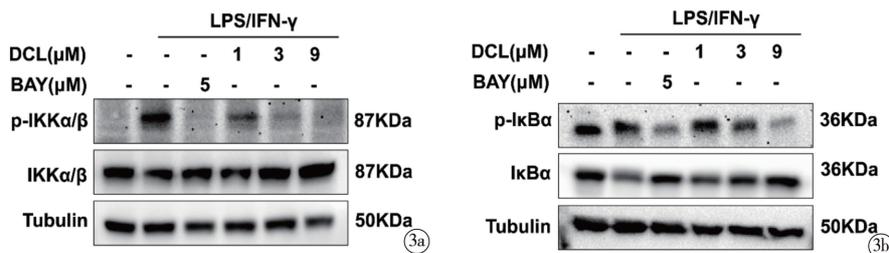


图3 DCL对LPS/IFN- γ 刺激的巨噬细胞NF- κ B信号通路相关蛋白的影响 a:WB检测各组细胞中IKK α / β 和p-IKK α / β 蛋白的表达含量;b:WB检测各组细胞中I κ B α 和p-I κ B α 蛋白的表达含量

表1 DCL抑制LPS/IFN- γ 刺激的巨噬细胞NF- κ B信号通路相关蛋白激活

| 组别 | p-IKK α / β /IKK α / β | IKK α / β /Tubulin | p-I κ B α /I κ B α | I κ B α /Tubulin |
|-----------------------------------|--|---------------------------------|--|--------------------------------|
| 对照组 | 0.37 \pm 0.03 | 0.95 \pm 0.13 | 0.33 \pm 0.04 | 1.52 \pm 0.01 |
| LPS/IFN- γ 组 | 1.00 \pm 0.11#### | 1.00 \pm 0.04 | 1.00 \pm 0.07#### | 1.00 \pm 0.04## |
| 5 μ M BAY+LPS/IFN- γ 组 | 0.47 \pm 0.10** | 0.99 \pm 0.30 | 0.26 \pm 0.04**** | 1.33 \pm 0.04* |
| 1 μ M DCL+LPS/IFN- γ 组 | 0.64 \pm 0.07* | 0.95 \pm 0.19 | 0.62 \pm 0.08* | 0.95 \pm 0.05 |
| 3 μ M DCL+LPS/IFN- γ 组 | 0.46 \pm 0.05** | 0.88 \pm 0.11 | 0.39 \pm 0.09*** | 1.35 \pm 0.10* |
| 9 μ M DCL+LPS/IFN- γ 组 | 0.39 \pm 0.09*** | 1.22 \pm 0.11 | 0.29 \pm 0.10**** | 1.68 \pm 0.12*** |

以LPS/IFN- γ 组数据对各组进行归一化处理,与对照组比较,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$;与LPS/IFN- γ 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$

3 讨论

炎症是体内诸多病理条件的关键驱动因素,如过敏、癌症、阿尔茨海默病等,因此研究药物对炎症反应的抑制作用是探索炎症相关疾病治疗靶点的重要方向。近年来,药用植物中具有生物活性的天然化合物是新药开发的主要来源^[14];如青蒿素及其类似物已用于多种炎症性疾病的临床治疗^[15]。DCL是天然药材菊科植物木香发挥药效的主要成分,研究发现其在胃癌^[16]、溃疡性结肠炎^[17]和真菌感染^[18]等疾病发挥治疗作用。过往对于DCL的

研究集中在具体病种,在全身性炎症中的研究较少。当机体产生全身性炎症反应时,巨噬细胞被活化,通过吞噬病原体和分泌相应细胞因子参与整个炎症反应过程^[19]。

当细胞受到LPS/IFN- γ 刺激时,炎症介质iNOS催化L-精氨酸生成NO,COX-2催化花生四烯酸转化为PGE2,调控巨噬细胞极化防御病原体侵入^[20,21]。为探索DCL在体外对炎症反应的影响,本研究以LPS/IFN- γ 刺激RAW264.7巨噬细胞在体外构建炎症模型,检测细胞中NO产量和PGE2

浓度、以及 NO 和 PGE2 合成的上游酶 iNOS 和 COX-2 蛋白的表达情况,发现 DCL 均能抑制以上物质的生成,表明了 DCL 在体外具有明显的抗炎作用。为进一步探讨该抗炎作用的分子机制,本实验检测了炎症反应过程中经典的 NF- κ B 信号通路关键蛋白的表达情况。NF- κ B 是参与免疫和炎症过程的关键转录因子,其过度激活在炎症性疾病的发病和进展过程中起着重要的推动作用。正常情况下,IKB 蛋白与核 NF- κ B 亚基结合存在于细胞质中;在外界刺激下,IKK 复合物(包括三个重要的成员,NEMO,IKK α ,IKK β)被激活,导致 NF- κ B 抑制剂蛋白 I κ B α 磷酸化,进而使蛋白酶 I κ B 被泛素化降解,从而导致二聚化 NF- κ B 的亚基 P65 释放和随后的核转移,启动与炎症反应相关的靶基因表达,引起 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、NO 和 iNOS 等炎症介质的转录翻译^[22-24]。本研究发现,DCL 抑制 LPS/IFN- γ 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 IKK α/β 和 I κ B α 的磷酸化以及 I κ B α 的降解,表明 DCL 可显著抑制 RAW264.7 巨噬细胞 NF- κ B 信号通路的活化。研究表明,抑制 NF- κ B 信号通路活性阻碍促炎性巨噬细胞浸润到呼吸道病毒诱导的肺部中^[25]。同时,抑制 I κ B α 和 NF- κ B 磷酸化可促进小胶质细胞/巨噬细胞 M2 极化,从而改善脑缺血再灌注损伤^[26]。NF- κ B 信号通路在多种器官组织炎症中发挥关键作用,天然产物 DCL 针对 NF- κ B 通路活性发挥抗炎效果,具备高效能低毒性的独特优势。

综上所述,本研究通过体外实验证实,DCL 对 LPS/IFN- γ 刺激诱导的巨噬细胞炎症反应有明显的抑制作用,其作用机制主要与抑制 NF- κ B 信号途径相关。通过上述实验结果证实了 DCL 抗炎作用的有效性,可为炎性相关疾病的治疗提供新的策略和候选药物。

【参考文献】

- [1] Salti T, Braunstein I, Haimovich Y, et al. Widespread S-persulfidation in activated macrophages as a protective mechanism against oxidative-inflammatory stress[J]. *Redox Biol*, 2024, 72: 103125.
- [2] Wang X, Labzin LI. Inflammatory cell death: how macrophages sense neighbouring cell infection and damage[J]. *Biochem Soc Trans*, 2023, 51(1): 303-313.
- [3] Li M, Niu Y, Tian L, et al. Astragaloside IV alleviates macrophage senescence and d-galactose-induced bone loss in mice through STING/NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 129: 111588.
- [4] Deng Z, Zhang Y, Zhu Y, et al. BRD9 inhibition attenuates matrix degradation and pyroptosis in nucleus pulposus by modulating the NOX1/ROS/NF- κ B axis[J]. *Inflammation*, 2023, 46(3): 1002-1021.
- [5] Zhao X, Li M, Lu Y, et al. Sirt1 inhibits macrophage polarization and inflammation in gouty arthritis by inhibiting the MAPK/NF- κ B/AP-1 pathway and activating the Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Inflamm Res*, 2024, 73(7): 1173-1184.
- [6] Schulz C, Petzold T, Ishikawa-Ankerhold H. Macrophage regulation of granulopoiesis and neutrophil functions[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 35(3): 182-191.
- [7] Ri MH, Li MY, Xing Y, et al. Narirutin exerts anti-inflammatory activity by inhibiting NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *Phyther Res*, 2023, 37(4): 1293-1308.
- [8] Chen Y, Shen J, Yuan M, et al. Dehydrocostus lactone suppresses gastric cancer progression by targeting ACLY to inhibit fatty acid synthesis and autophagic flux[J]. *J Adv Res*, 2025, 67: 331-348.
- [9] Gu W, Zhao H, Yuan H, et al. Dehydrocostus lactone reduced malignancy of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells via down-regulation of the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2023, 174(3): 360-364.
- [10] Chen Z, Yang X, Zhou Y, et al. Dehydrocostus lactone attenuates the senescence of nucleus pulposus cells and ameliorates intervertebral disc degeneration via inhibition of STING-TBK1/NF- κ B and MAPK signaling[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 641098.
- [11] Yu B, Li B, Chen T, et al. A NF- κ B-based high-throughput screening for immune adjuvants and inhibitors[J]. *Inflammation*, 2023, 46(2): 598-611.
- [12] Zhang X, Chu C, Huang Y. Inhibition of thioredoxin-interacting protein may enhance the therapeutic effect of dehydrocostus lactone in cardiomyocytes under doxorubicin stimulation via the inhibition of the inflammatory response [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(3): 226.
- [13] Abouelwafa E, Zaki A, Sabry O, et al. Dolomiaea costus: an untapped mine of sesquiterpene lactones with wide magnificent biological activities[J]. *Nat Prod Res*, 2023, 37(23): 4069-4079.
- [14] Wu W, Lin Y, Farag MA, et al. Dendrobium as a new natural source of bioactive for the prevention and treatment of digestive tract diseases: A comprehensive review with future perspectives [J]. *Phytomedicine*, 2023, 114: 154784.
- [15] Cen Y, Xiong Y, Qin R, et al. Anti-malarial artesunate ameliorates atherosclerosis by modulating arterial inflammatory responses via inhibiting the NF- κ B-NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1123700.
- [16] Chen Y, Shen J, Yuan M, et al. Dehydrocostus lactone suppresses gastric cancer progression by targeting ACLY to inhibit fatty acid synthesis and autophagic flux [J]. *J Adv Res*, 2025, 67: 331-348.
- [17] Xu C, Zhao L, Zhou W, et al. Synergistic effect of berberine hydrochloride and dehydrocostus lactone in the treatment of ulcerative colitis: Take gut microbiota as the target [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt B): 111009.
- [18] Zhang J, Sun J, Zhang Y, et al. Dehydrocostus lactone inhibits *Candida albicans* growth and biofilm formation[J]. *AMB Express*, 2023, 13(1): 82.
- [19] Konec G, Jenei V, Tóth M, et al. Damage-mediated macrophage polarization in sterile inflammation[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1169560.
- [20] Cinelli MA, Do HT, Miley GP, et al. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition[J]. *Med Res Rev*, 2020, 40(1): 158-189.