

槲皮素通过调控巨噬细胞 MAPK/ERK 通路影响炎症反应的作用机制

薛锋

乌兰察布医学高等专科学校, 内蒙古乌兰察布, 012000;

摘要:目的: 探讨槲皮素对脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞炎症反应的影响及其对 MAPK/ERK 信号通路的调控作用。方法: 体外培养小鼠 RAW264.7 巨噬细胞, 分为对照组、模型组、槲皮素低剂量组(25 $\mu\text{mol/L}$)、中剂量组(50 $\mu\text{mol/L}$)、高剂量组(100 $\mu\text{mol/L}$), 采用 CCK-8 法检测细胞活力, ELISA 法检测 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平, Western blot 法检测 p-ERK1/2、ERK1/2、p-p38、p38 表达, qRT-PCR 法检测炎症因子 mRNA 表达。结果: 与对照组比较, 模型组炎症因子水平显著升高($P<0.01$), p-ERK1/2/ERK1/2、p-p38/p38 比值明显增加($P<0.01$), 槲皮素各剂量组能够剂量依赖性地降低炎症因子水平, 抑制 MAPK/ERK 通路磷酸化, 高剂量组效果最显著($P<0.01$)。结论: 槲皮素可通过抑制巨噬细胞 MAPK/ERK 信号通路激活, 下调炎症因子表达, 从而发挥抗炎作用。

关键词: 槲皮素; 巨噬细胞; MAPK/ERK 通路; 炎症反应; 脂多糖

DOI: 10.69979/3029-2808.26.01.043

炎症反应是机体对有害刺激的防御应答, 但过度炎症会导致组织损伤并引发动脉粥样硬化、类风湿性关节炎等慢性疾病, 因此寻找安全有效的抗炎药物具有重要意义^[1-2]。巨噬细胞在炎症反应中发挥核心作用, 受 LPS 刺激后释放 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等促炎因子, MAPK/ERK 信号通路是调控巨噬细胞炎症反应的关键通路, 该通路异常激活与多种炎症性疾病密切相关。槲皮素是广泛存在于蔬菜、水果中的黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗炎等生物活性, 但其抗炎的分子机制尚未完全阐明^[3-4]。本研究通过建立 LPS 诱导的巨噬细胞炎症模型, 观察槲皮素对炎症因子表达及 MAPK/ERK 通路的影响, 从分子水平阐明其抗炎机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系 RAW264.7 购自中国科学院细胞库, 槲皮素(纯度 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物科技有限公司, LPS 购自美国 Sigma 公司, DMEM 高糖培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司, CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所, TNF- α 、IL-6、IL-1 β ELISA 试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司, ERK1/2、p-ERK1/2、p38、p-p38 抗体购自美国 CST 公司, β -actin 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司, TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司^[5]。主要仪器包括 CO2 细胞培养箱(美国 Thermo 公司), 酶标仪(美国 B

io-Rad 公司), Western blot 电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司), 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司), 倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组

将 RAW264.7 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO2 培养箱中常规培养, 待细胞生长至 80% 融合度时进行传代, 取对数生长期细胞进行实验, 将细胞分为 5 组: 对照组(不加任何处理因素), 模型组(加入 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 24 h), 槲皮素低剂量组(25 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素预处理 2 h 后加入 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 24 h), 槲皮素中剂量组(50 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素预处理 2 h 后加入 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 24 h), 槲皮素高剂量组(100 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素预处理 2 h 后加入 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 24 h)。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞活力

将细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 按照 1.2.1 方法处理细胞后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值, 计算细胞存活率。

1.2.3 ELISA 法检测炎症因子水平

将细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 按照 1.2.1 方法处理后, 收集细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 分别检测上清液中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的浓度, 每组设置 3 个复孔。

1.2.4 Western blot 法检测蛋白表达

将细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 按照 1.2.1 方法处理后, 用 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离, 转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 分别加入 p-ERK1/2、ERK1/2、p-p38、p38、 β -actin 一抗 (1:1000 稀释) 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜后加入二抗 (1:5000 稀释) 室温孵育 2 h, ECL 化学发光法显影, Image J 软件分析条带灰度值, 以 β -actin 为内参, 计算 p-ERK1/2/ERK1/2 和 p-p38/p38 比值。

1.2.5 qRT-PCR 法检测 mRNA 表达

按照 1.2.1 方法处理细胞后, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 测定 RNA 浓度及纯度, 取 1 μ g 总 RNA 逆转录为 cDNA, 以 β -actin 为内参, 采用 SYBR Green 法进行荧光定量 PCR, 反应条件为 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火延伸 30 s, 共 40 个循环, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量, 引物序列由上海生工生

物工程公司合成^[6]。

1.3 观察指标

观察各组细胞活力, 检测 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平及 mRNA 表达, 检测 p-ERK1/2、ERK1/2、p-p38、p38 蛋白表达。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞活力及炎症因子水平比较 (见表 1)

与对照组比较, 模型组细胞活力无明显变化 ($P > 0.05$), 但 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 槲皮素各剂量组细胞活力均无明显变化 ($P > 0.05$), 但炎症因子水平呈剂量依赖性降低, 高剂量组降低最显著 ($P < 0.01$)。

表 1 各组细胞活力及炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	细胞活力(%)	TNF- α (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
对照组	100.00 \pm 0.00	45.32 \pm 5.18	38.26 \pm 4.73	28.15 \pm 3.92
模型组	98.75 \pm 3.24	326.84 \pm 28.56#	285.47 \pm 25.38#	198.63 \pm 18.74#
槲皮素低剂量组	97.83 \pm 3.51	258.31 \pm 22.47*	223.58 \pm 20.15*	156.28 \pm 15.33*
槲皮素中剂量组	98.26 \pm 3.08	189.46 \pm 17.82**	162.74 \pm 15.69**	108.57 \pm 12.46**
槲皮素高剂量组	97.94 \pm 2.97	125.73 \pm 13.25**	102.85 \pm 11.24**	72.84 \pm 9.58**

注: 与对照组比较, # $P < 0.05$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 各组 MAPK/ERK 通路相关蛋白表达比较 (见表 2)

与对照组比较, 模型组 p-ERK1/2/ERK1/2 和 p-p38

/p38 比值显著升高 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 槲皮素各剂量组比值呈剂量依赖性降低, 高剂量组抑制效果最明显 ($P < 0.01$)。

表 2 各组 MAPK/ERK 通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	p-ERK1/2/ERK1/2	p-p38/p38
对照组	0.28 \pm 0.04	0.31 \pm 0.05
模型组	1.85 \pm 0.16#	1.92 \pm 0.18#
槲皮素低剂量组	1.46 \pm 0.13*	1.51 \pm 0.14*
槲皮素中剂量组	0.95 \pm 0.09**	1.02 \pm 0.10**
槲皮素高剂量组	0.52 \pm 0.06**	0.58 \pm 0.07**

注: 与对照组比较, # $P < 0.05$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 各组炎症因子 mRNA 表达水平比较 (见表 3)

与对照组比较, 模型组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA

表达水平显著上调 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 槲皮素各剂量组 mRNA 表达水平呈剂量依赖性下调, 高剂量组下调最显著 ($P < 0.01$)。

表 3 各组炎症因子 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	TNF- α	IL-6	IL-1 β
对照组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
模型组	8.64 \pm 0.78#	7.92 \pm 0.71#	6.85 \pm 0.63#
槲皮素低剂量组	6.82 \pm 0.61*	6.23 \pm 0.56*	5.38 \pm 0.49*
槲皮素中剂量组	4.53 \pm 0.41**	4.15 \pm 0.38**	3.62 \pm 0.34**
槲皮素高剂量组	2.75 \pm 0.25**	2.48 \pm 0.23**	2.16 \pm 0.20**

注: 与对照组比较, # $P < 0.05$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

炎症反应失控会导致组织损伤和多种疾病,巨噬细胞受 LPS 刺激后释放大促炎因子,放大炎症反应,因此调控巨噬细胞炎症反应是防治炎症性疾病的重要策略。本研究发现 LPS 刺激可显著升高 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平及 mRNA 表达,证实炎症模型建立成功。MAPK 通路包括 ERK1/2、p38、JNK 三条亚通路,在调控炎症反应中发挥重要作用。当巨噬细胞受 LPS 刺激时,MAPK 通路被激活,关键激酶磷酸化,激活下游转录因子,促进炎症因子转录表达^[7-9]。本研究显示 LPS 可显著增加 p-ERK1/2/ERK1/2 和 p-p38/p38 比值,提示 MAPK/ERK 通路在炎症反应中发挥重要调控作用。

槲皮素是天然黄酮类化合物,具有良好的抗炎活性,本研究发现槲皮素能剂量依赖性降低炎症因子分泌,100 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素可使 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平分别降低 61.5%、64.0%和 63.3%。同时显著抑制炎症因子 mRNA 表达,提示槲皮素通过抑制转录调控发挥抗炎作用。机制研究显示,槲皮素能显著降低 p-ERK1/2/ERK1/2 和 p-p38/p38 比值,抑制 MAPK/ERK 通路激活,高剂量槲皮素可使两者比值分别降低 71.9%和 69.8%,接近对照组水平,说明槲皮素通过抑制 MAPK/ERK 通路激活,下调炎症因子转录表达实现抗炎作用^[10]。本研究还发现槲皮素在 25-100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度对细胞活力无影响,说明所用浓度安全可靠,但本研究仅在体外细胞水平探讨机制,体内效果需进一步验证。

4 结束语

本研究表明槲皮素能剂量依赖性降低炎症因子分泌,抑制其 mRNA 表达,这一作用与槲皮素抑制 MAPK/ERK 通路激活密切相关,槲皮素可显著降低 p-ERK1/2 和 p-p38 磷酸化水平,从而抑制炎症因子转录表达。本研究从分子水平阐明了槲皮素通过调控 MAPK/ERK 通路发挥抗炎作用的机制,为临床应用槲皮素防治炎症性疾病提供了理论依据。

参考文献

- [1]王领,赵雪,王金林.七氟醚通过 p38/MAPK 信号通路抑制脂多糖诱导的肺泡巨噬细胞 M1 型极化[J].中国免疫学杂志,2024,40(09):1850-1855.
- [2]曾麒,宋世雷,陈跃平.DUSP1/MAPK 信号通路影响巨噬细胞极化促进骨愈合的研究进展[J].中国骨与关节损伤杂志,2024,39(07):721-724.
- [3]刘继东,樊程程,王天朗,等.化痰祛痰方调控 MAPK 通路对 AS 小鼠主动脉巨噬细胞的影响及机制研究[J].时珍国医国药,2024,35(06):1357-1360.
- [4]王文琳,罗烨,柯晓.辣椒来源外泌体样纳米囊泡通过 ERK1/2 通路拮抗巨噬细胞向泡沫细胞转化[J].中国动脉硬化杂志,2024,32(06):503-513.
- [5]朱恩惠,何程,殷丽,等.参七虫草方靶向 MAPK/ERK/Nrf2 信号通路调控肺泡巨噬细胞的作用机制研究[J/O L].中国免疫学杂志,1-12[2025-10-15].
- [6]郑翠翠.基于 p38MAPK 通路探讨川芎嗪调控巨噬细胞极化防治动脉粥样硬化的机制[D].江西中医药大学,2024.
- [7]张汝.肺炎支原体 MPN606 经 NF- κ B 和 MAPK 信号通路诱导 M1 型巨噬细胞活化[D].南华大学,2024.
- [8]柯玲玲,王敏,高洁,等.STAT1 对肺结核大鼠巨噬细胞凋亡及 MAPK/NF- κ B 信号通路的机制研究[J].解剖学研究,2024,46(02):115-122.
- [9]乌里盼·托乎达阿里,丁宛婷,孙媛,等.鞣花酸通过 TLR4-SRC/MAPK/NF- κ B 途径抑制脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞的炎症反应[J].中南药学,2024,22(04):943-949.
- [10]包子平.同源盒蛋白 1 通过 MAPK 通路和 NF- κ B 通路调控 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应[D].广州医科大学,2024.

乌兰察布医学高等专科学校校级科研项目;项目编号:WLCBYZK202401;项目名称:槲皮素对巨噬细胞炎症反应和抗氧化功能的影响及机制的研究。