

木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶对小鼠巨噬细胞RAW264.7的抗炎作用研究^Δ

刘立新^{1*}, 邹冬玉¹, 张羽男^{1#}, 张强², 张楠楠¹(1.佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 2.佳木斯大学公共卫生学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

中图分类号 R361⁺.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)05-0602-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.05.07

摘要 目的:研究木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶的抗炎作用及机制。方法:以正常小鼠巨噬细胞RAW264.7为对照,以脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7细胞为炎症模型,采用MTT法检测不同浓度(10、20、40、80 μmol/L)的木犀草素·4,4'-联吡啶和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶作用细胞2 h后的细胞活性;荧光定量聚合酶链式反应法测定40 μmol/L浓度时细胞中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶2(COX-2)mRNA的表达,酶联免疫吸附法测定40 μmol/L浓度时细胞中肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素6(IL-6)蛋白表达,Western blot法测定40 μmol/L浓度时细胞中核转录因子p65(NF-κB p65)蛋白表达。结果:与正常细胞比较,LPS诱导后RAW264.7细胞活性明显降低($P<0.01$),iNOS和COX-2 mRNA表达水平及TNF-α、IL-6、NF-κB p65蛋白表达水平均明显升高($P<0.01$)。木犀草素和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶均能增强LPS诱导后RAW264.7细胞活性($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且呈浓度依赖性;4,4'-联吡啶对LPS诱导后RAW264.7细胞活性无明显影响;40 μmol/L浓度下,木犀草素和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶可使LPS诱导后细胞中iNOS和COX-2 mRNA表达水平及TNF-α、IL-6、NF-κB p65蛋白表达水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶降低效果强于木犀草素($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶可能通过下调NF-κB信号来抑制炎症相关因子产生,其抗炎作用优于木犀草素。

关键词 木犀草素;4,4'-联吡啶;药物共晶;小鼠巨噬细胞RAW264.7;抗炎作用

Anti-inflammatory Effect of the Luteolin·4,4'-dipyridy Co-crystal on Macrophage RAW264.7 in Mice

LIU Lixin¹, ZOU Dongyu¹, ZHANG Yunan¹, ZHANG Qiang², ZHANG Nannan¹(1.College of Pharmacy, Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154007, China; 2.College of Public Health, Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154007, China)

components in Sanjie Zhentong capsule[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2015, 40(10):1945-1947.

- [6] 张静,李佳伟,张永静.超微粉碎技术在中药中的研究进展[J].包头医学院学报,2015,16(5):150-153.
- [7] 丁圣清,郁省,王冬东,等.中药饮片超微粉碎实现剂型改革的初步试验[J].中国药业,2016,25(23):38-42.
- [8] 李鹏,魏晓霞,南婷婷,等.灵芝三萜酸对小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国医院药学杂志,2013,33(23):1914-1918.
- [9] HA DO T, LOAN LE T, HUNG TM, et al. An improved HPLC-DAD method for quantitative comparisons of triterpenes in ganoderma lucidum and its five related species originating from vietnam[J]. *Molecules*, 2015, 20(1):

1059-1077.

- [10] 李守信,邱新建,贺凤成,等.红参超微粉的质量标准研究[J].中国药房,2014,25(3):256-259.
- [11] 何春龙,张屏,鞠爱华,等.灵芝超微粉,普通粉和灵芝提取物高效液相色谱指纹图谱的比较研究[J].中华中医药杂志,2017,32(2):575-578.
- [12] 吴长辉.超微粉碎对灵芝中多糖、三萜的影响[J].中国执业药师,2015(8):18-23.
- [13] 黄建城.膜分离及超微粉碎技术在灵芝制剂中的应用研究[D].贵阳:贵州大学,2008.
- [14] 孙源源,杜光.超微粉碎技术在中药中的应用进展[J].医药导报,2014,33(1):69-71.
- [15] 贾海玲,王健,张萍,等.河北省精神卫生机构老年抑郁症患者药物使用的调查分析[J].中国药房,2017,28(21):2895-2898.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81641120);黑龙江省卫生和计划生育委员会科研课题(No.2017-421)。

* 讲师,博士。研究方向:天然药物活性成分。电话:0454-8610758。E-mail:liulixin_2003@163.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:天然药物共晶设计合成。电话:0454-8610758。E-mail:zhangyunan79@163.com

(收稿日期:2017-07-04 修回日期:2017-12-26)

(编辑:刘明伟)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study anti-inflammatory effect and mechanism of the luteolin · 4, 4'-dipyridy co-crystal. METHODS: Using macrophage RAW264.7 of normal mice as control, the inflammation model was established with lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells. MTT assay was used to detect cells activity 2 h after treatment of different concentrations of luteolin (10, 20, 40, 80 μmol/L), 4, 4'-dipyridy (10, 20, 40, 80 μmol/L) and luteolin · 4, 4'-dipyridy co-crystal (10, 20, 40, 80 μmol/L). The mRNA expression of iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells at 40 μmol/L were determined by qRT-PCR. The protein expression of TNF-α and IL-6 in RAW264.7 cells at 40 μmol/L were determined by ELISA. The protein expression of NF-κB p65 in RAW264.7 cells at 40 μmol/L were determined by Western bolt. RESULTS: Compared with normal cells, the activity of RAW264.7 cells was decreased significantly after induced by LPS ($P < 0.01$); mRNA expression of iNOS and COX-2, protein expression of TNF-α, IL-6 and NF-κB p65 were increased significantly ($P < 0.01$). Both luteolin and luteolin · 4, 4'-dipyridy co-crystal could enhance the activity of RAW264.7 cells after induced by LPS ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in concentration-dependent manner. 4, 4'-dipyridy had no significant effect on the activity of RAW264.7 cells after induced by LPS. After luteolin and luteolin · 4, 4'-dipyridy co-crystal at 40 μmol/L, mRNA expression of iNOS and COX-2, protein expression of TNF-α, IL-6 and NF-κB p65 in RAW264.7 cells after induced by LPS were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the luteolin · 4, 4'-dipyridy co-crystal was better than luteolin ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: The luteolin · 4, 4'-dipyridy co-crystal can inhibit the generation of inflammatory factors by down-regulating NF-κB signal, and its anti-inflammatory effect is better than luteolin.

KEYWORDS Luteolin; 4, 4'-dipyridy; Pharmaceutical co-crystal; Mice macrophage RAW264.7; Anti-inflammatory effect

木犀草素为多羟基黄酮化合物,多存在于蔬菜和中草药中,具有较强的抗炎、抗菌、抗氧化、降血脂、降血压和抗肿瘤等作用,是一种广泛存在且具有药用价值的化合物^[1]。然而,由于木犀草素本身存在着水溶性差、生物利用度低等缺点,使其在临床应用中受到限制。为提高木犀草素的溶解度及药理活性,本研究应用药物共晶合成技术设计合成出了木犀草素药物共晶。药物共晶合成技术是一种新兴技术,可以通过引入共晶配体改善原有药物活性成分的溶解度、溶出速率、生物利用度及稳定性等性质,而其药物活性分子本身的结构并不受影响^[2]。

木犀草素的抗炎作用与其抑制一氧化氮(NO)和其他炎性细胞因子如肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素6(IL-6)的产生有关^[3-4]。本课题组前期研究发现,木犀草素与4,4'-联吡啶形成木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶后,两者形成的分子间作用力(如氢键等)致使木犀草素分子原有的堆积方式发生了显著变化,但这种变化与其抗炎作用机制和作用效果之间的关系尚未明确。本研究以脂多糖(LPS)诱导的小鼠巨噬细胞RAW264.7为炎症模型,在木犀草素、4,4'-联吡啶和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶分别作用下,通过检测炎症递质合成分泌的变化,探讨木犀草素药物共晶的抗炎作用效果及机制。

1 材料

1.1 仪器

SW-CJ-IFD超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);Sunrise酶标仪(瑞士Tecan公司);Forma3111 Series 2二氧化碳恒温培养箱(美国Thermo Electron公司);Bio-Rad半干转移电泳仪(美国Bio-Rad公司);CKX41荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);7300荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析仪(美国Applied Biosystems公司);Tanon 1600R全自动数码凝胶成像分析系统

(上海天能科技有限公司);Z300-K冷冻离心机(德国Hermle公司)。

1.2 药品与试剂

木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶(佳木斯大学天然药物化学实验室自制,批号:20161221,纯度:100%);木犀草素(纯度:≥98%);4,4'-联吡啶(分析纯)均购自天津市科密欧化学试剂有限公司;LPS(美国Sigma公司,批号:118k4052,规格:100 mg/瓶,来源:大肠埃希菌);DMEM(高糖)细胞培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);MTT、二甲基亚砜(DMSO)(美国Sigma公司);Trizol试剂(美国Invitrogen公司);反转录试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司];鼠源核转录因子p65(NF-κB p65)抗体(美国Cell Signaling Technology公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);鼠源TNF-α、IL-6酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(北京科研美科技有限公司);其他试剂均为分析纯。

1.3 细胞

RAW264.7细胞购自中国科学院上海生物化学研究所。

2 方法

2.1 细胞培养

将RAW264.7细胞用含10%胎牛血清和100 u/mL双抗(青霉素、链霉素)的DMEM(高糖)细胞培养液,置于37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养。

2.2 MTT法检测细胞存活率

取对数生长期的RAW264.7细胞,调整细胞密度为10⁴个/mL,接种于96孔细胞培养板中,37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养24 h,然后分别加入木犀草素、4,4'-联吡啶和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶DMSO溶液(DMSO含量不超过0.2%),终浓度分别为10、20、40、80 μmol/L,同时设立正常对照组和LPS对照组,作用2 h后

加入 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS, 孵育 24 h, 之后每孔加入 MTT 10 μL (5 mg/mL) 孵育 4 h, 去除培养液, 加入 150 μL 的 DMSO, 振荡 10 min, 使用酶标仪在 570 nm 波长处测定光密度 (OD), 计算细胞存活率 (%) = (加药组 OD - 空白组 OD) / (正常对照组 OD - 空白组 OD) \times 100%, 式中空白组为不加药物不加细胞的空白对照。

2.3 qRT-PCR 法检测细胞中 iNOS 和 COX-2 mRNA 表达

将 RAW264.7 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 细胞密度约为 10^6 个/mL, 用 DMEM (高糖) 细胞培养液培养过夜, 分别加入终浓度均为 40 $\mu\text{mol/L}$ 的木犀草素、4,4'-联吡啶和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶溶液, 同时设立正常对照组和 LPS 对照组, 预处理 2 h 后加入 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS, 孵育 6 h, 收集细胞, 提取总 RNA。具体方法: 弃去培养液, 用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 液清洗细胞, 每孔加入 1 mL Trizol 充分裂解细胞, 取细胞至离心管中, 室温静置 3 min, 加入 200 μL 氯仿, 涡旋振荡 10 s, 室温静置 2 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min (离心半径 3 cm) 离心 10 min, 吸取上层水相至另一个离心管, 加入 500 μL 异丙醇, 室温静置 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min (离心半径 3 cm) 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇清洗沉淀, 离心后弃上清, 得总 RNA 沉淀物, 取少量用于 RNA 浓度和纯度的测定。提取的总 RNA 反转录为 cDNA 后, 采用 qRT-PCR 法检测细胞中一氧化氮合酶 (iNOS) 和环氧化酶 2 (COX-2) mRNA 表达情况。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 31 s; 共计循环 40 次。以 β -肌动蛋白 (β -actin) 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量, C_t 为目标扩增产物达到设定阈值所需要的循环数。qRT-PCR 检测的基因引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 检测的基因引物序列

Tab 1 Gene primer sequences for qRT-PCR

基因名称	上游引物 (5' \rightarrow 3')	下游引物 (5' \rightarrow 3')	片段长度, bp
iNOS	GCCTCATGCTTGGATTCAT	GAGGGTGAATTCAGAG	158
COX-2	GATACGTGTTGACGTCACAG	GTCTGTCTAGAGTTTCACCG	124
β -actin	CCGCAAGGACCTCTACGC	CATGCCAATCTCATCTCGTTTT	208

2.4 ELISA 法检测细胞中 TNF- α 和 IL-6 蛋白表达

细胞培养、分组及预处理同“2.3”, 预处理细胞 2 h 后, 加入 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 共同孵育 24 h, 收集细胞上清液。分别按鼠源 TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒要求操作, 检测细胞中 TNF- α 和 IL-6 蛋白表达水平。

2.5 Western blot 法检测细胞中 NF- κB p65 蛋白表达

细胞培养、分组及预处理同“2.3”, 预处理细胞 2 h 后, 加入 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 共同孵育 1 h, 收集细胞, 提取蛋白并进行蛋白含量测定^[6], 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后, 将凝胶上的蛋白带转移到硝酸纤维素膜, 5% 脱脂乳封闭 1.5 h 后, 洗膜 3 次, 置

于鼠源 NF- κB p65 抗体工作液 (稀释比例 1:1 000) 中孵育过夜, 洗膜 3 次, 置于 HRP 标记二抗工作液 (稀释比例 1:2 000) 中室温振荡孵育 1.5 h, 洗膜 3 次, 超敏发光液显光, 暗室内曝光显影、定影。用凝胶成像系统扫描、分析蛋白条带, 以目标蛋白的灰度值与内参 β -actin 灰度值的比值计算相对表达量。

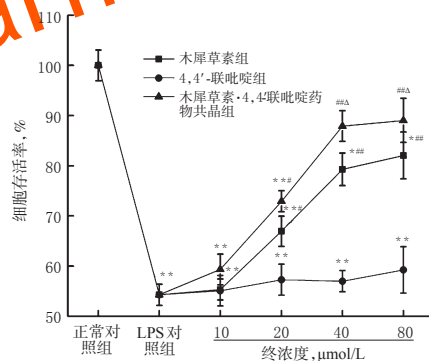
2.6 统计学方法

数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素分析, 组间两两比较采用 t 检验, 百分率或构成比比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 细胞存活率

与正常对照组比较, LPS 对照组细胞存活率明显下降 ($P < 0.01$)。与 LPS 对照组比较, 木犀草素和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶能明显增强细胞存活率 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈浓度依赖性, 当木犀草素和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶浓度大于 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率趋于平稳; 而 4,4'-联吡啶对细胞存活率几乎无影响。与木犀草素比较, 木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶增强 RAW264.7 细胞存活率的效果更显著 ($P < 0.05$)。结果表明, 木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶能够对抗 LPS 对 RAW264.7 细胞增殖的抑制作用, 并且效果优于木犀草素。各组细胞存活率变化见图 1。



注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 LPS 对照组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; 与木犀草素组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. LPS control group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; vs. luteolin group, $^{\Delta}P < 0.05$

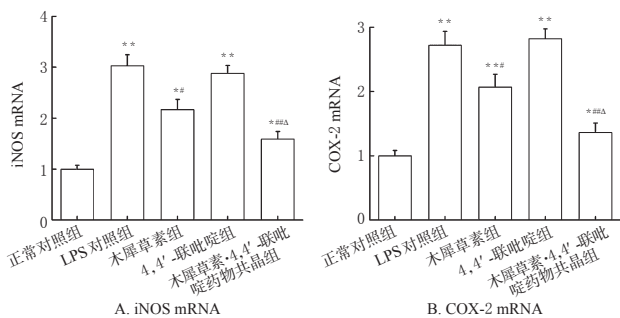
图 1 各组细胞存活率变化

Fig 1 Changes of cell survival rate in each group

3.2 细胞中 iNOS 和 COX-2 mRNA 表达水平

与正常对照组比较, LPS 对照组细胞中 iNOS 和 COX-2 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。与 LPS 对照组比较, 木犀草素组和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶组细胞中 iNOS 和 COX-2 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 4,4'-联吡啶组细胞中 iNOS 和 COX-2 mRNA 表达水平无明显变化 ($P > 0.05$)。与木犀

草素组比较,木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶组细胞中iNOS和COX-2 mRNA表达水平明显降低($P<0.05$)。结果表明,木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶能够有效抑制RAW264.7细胞iNOS和COX-2 mRNA表达,并且效果强于木犀草素。各组细胞中iNOS和COX-2 mRNA表达的变化见图2。



注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与LPS对照组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与木犀草素组比较, $\Delta P<0.05$

Note: vs. normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. LPS control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; vs. luteolin group, $\Delta P<0.05$

图2 各组细胞中iNOS和COX-2 mRNA表达的变化
Fig 2 mRNA expression of iNOS和COX-2 in cells of each group

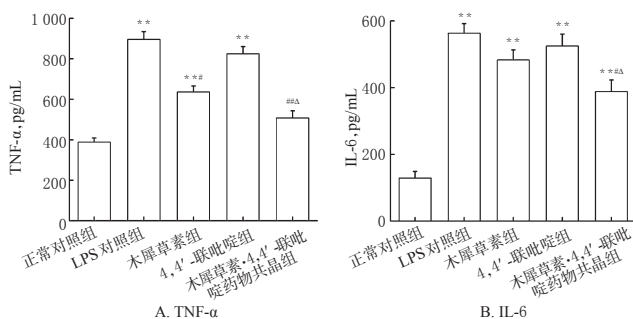
3.3 细胞中TNF- α 和IL-6蛋白表达

与正常对照组比较,LPS对照组细胞中TNF- α 和IL-6蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。与LPS对照组比较,木犀草素组和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶组细胞中TNF- α 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶组细胞中IL-6蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),而木犀草素组细胞中IL-6蛋白表达无明显变化($P>0.05$)。4,4'-联吡啶组细胞中TNF- α 和IL-6蛋白表达均无明显变化($P>0.05$)。与木犀草素组比较,木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶组细胞中TNF- α 和IL-6蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。结果表明,木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶能够有效抑制RAW264.7细胞中TNF- α 和IL-6的分泌,并且效果强于木犀草素。各组细胞中TNF- α 、IL-6蛋白表达的变化见图3。

3.4 细胞中NF- κ B p65蛋白表达

与正常对照组比较,LPS对照组细胞中NF- κ B p65蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。与LPS对照组比较,木犀草素组和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶组细胞中NF- κ B p65蛋白表达水平明显降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$),4,4'-联吡啶组细胞中NF- κ B p65蛋白表达水平无明显变化($P>0.05$)。与木犀草素组比较,木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶组细胞中NF- κ B p65蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。结果表明,木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶能够抑制RAW264.7细胞NF- κ B p65蛋白表达,且效果强于木犀草素。各组细胞中NF- κ B p65蛋白

表达的电泳图见图4,变化情况见图5。



注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与LPS对照组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与木犀草素组比较, $\Delta P<0.05$

Note: vs. normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. LPS control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; vs. luteolin group, $\Delta P<0.05$

图3 各组细胞中TNF- α 、IL-6蛋白表达的变化
Fig 3 Protein expression of TNF- α and IL-6 in cells of each group

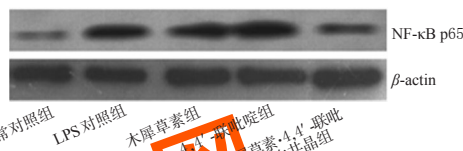
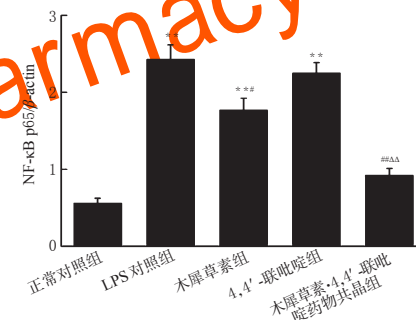


图4 各组细胞中NF- κ B p65蛋白表达的电泳图
Fig 4 Electrophoretic diagram of protein expression of NF- κ B p65 in cells of each group



注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与LPS对照组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与木犀草素组比较, $\Delta P<0.01$

Note: vs. normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. LPS control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; vs. luteolin group, $\Delta P<0.01$

图5 各组细胞中NF- κ B p65蛋白表达的变化
Fig 5 Changes of protein expression of NF- κ B p65 in cells of each group

4 讨论

炎症是一个十分常见并且重要的病理过程,可以发生在机体的各组织和器官,临床上常用非甾体类抗炎药物和肾上腺皮质激素类药物进行治疗,但是两者均被报道有诸多的不良反应^[6]。因此,具有资源丰富、毒副作用少等优点的中药逐渐成为人们研究的热点。据报道,大部分单味中药、复方制剂、中草药的有效部位和有效成分等均有良好的抗炎作用^[7]。木犀草素属于黄酮类化合物,主要存在于金银花、菊花等中草药,以及洋白菜、甜

菜和胡萝卜等蔬菜中^[8]。有研究发现,木犀草素能下调LPS诱导后RAW264.7细胞中COX-2 mRNA的表达,降低NF- κ B的活性^[9],可以有效地抑制肺组织的炎症反应,减少肺组织内iNOS的表达^[4],木犀草素也可以逆转LPS对细胞增殖的抑制作用,抑制细胞致炎因子TNF- α 和IL-6等的表达^[10-11]。但是,由于木犀草素纯品为粉末状,微溶于水、稳定性差等性质,使之很难在临床上直接应用。当前,对木犀草素本身分子进行结构修饰可以有效地改善其水溶性、生物利用度及稳定性等,但其原有分子结构的改变将使其变为新的化合物,其药效及毒副作用也将发生难以预料的改变。因此,本课题组研究人员引入了药物共晶合成技术,在共晶体系中,药物活性成分主要依靠分子间的氢键、范德华力等相互作用与共晶配体形成非共价键的超分子晶体结构。

药物活性成分形成共晶后,其分子结构并未发生变化,可以保持其原有成分的药效活性,而其溶解度、溶出速率、生物利用度及稳定性等却会有较大的改变^[12]。近年来,研究者们设计合成出了大量的天然成分药物共晶。这些药物共晶水溶性、溶出速率及生物利用度等理化性质较原天然活性成分均有显著提高和改善,并且其抗炎、抗菌及抗溶血等药理活性也显著增强。以4,4'-联吡啶为共晶配体的山柰酚药物共晶和槲皮素药物共晶对大肠埃希菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的抑菌作用均优于山柰酚和槲皮素原料药^[13-14];分别以胞嘧啶(CYT)和维生素B₆为共晶配体的白杨素药物共晶对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率、抗溶血作用以及体内大鼠足肿胀抗炎效果均高于原料药白杨素^[15]。

本研究通过检测木犀草素·4,4'-联吡啶和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶分别对LPS诱导的RAW264.7细胞活性、炎性相关因子表达及NF- κ B信号的影响,比较和探讨了木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶的抗炎作用和作用机制。MTT法试验结果表明,随着木犀草素和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶浓度的增加,细胞存活率逐渐升高,当浓度大于40 μ mol/L时,趋于平稳,而4,4'-联吡啶对细胞活性几乎无影响,为了便于试验分析比较,后期试验均采用统一的浓度为40 μ mol/L。本研究结果表明,木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶可以通过抑制NF- κ B核转位而下调iNOS、COX-2 mRNA表达和TNF- α 、IL-6的分泌,提高细胞的增殖活性,并且抗炎效果明显高于木犀草素原料药。

参考文献

[1] PRATHEESHKUMAR P, SON YO, BUDHRAJA A, et al. Luteolin inhibits human prostate tumor growth by sup-

pressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52279.

- [2] BRAGA D, GREPIONI F, MAINI L, et al. Crystal polymorphism and multiple crystal forms[J]. *Structure & Bonding*, 2009, 132(6): 25-50.
- [3] 李远航.木犀草素防治COPD的效果及抗炎机制[J]. *现代医药卫生*, 2016, 32(8): 1216-1218.
- [4] 王书侠, 张家明, 姚孝明, 等.木犀草素对活化的RAW264.7巨噬细胞分泌炎症因子的影响[J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(1): 31-35.
- [5] LIU LX, LIN Y, LIU LL, et al. 14-3-3 γ Regulates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and lactation in dairy cow mammary epithelial cells by inhibiting NF- κ B and mapks and up-regulating mTOR signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(7): 16622-16641.
- [6] 夏哲林, 陈赛贞, 林佳苗, 等.非甾体类抗炎药的不良反应[J]. *海峡药学*, 2011, 23(6): 262-263.
- [7] 黄滨, 雷小勇.中药抗炎作用发挥途径及作用机制研究进展[J]. *临床合理用药杂志*, 2015, 8(11C): 177-179.
- [8] 邹小华, 王双虎, 周云芳.木犀草素和木犀草苷在大鼠体内的药动学研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(22): 3058-3061.
- [9] 张毅, 王旭光.木犀草素的体外抗炎机制研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2007, 24(3): 231-234.
- [10] DEQIU Z, KANG L, JIALI Y, et al. Luteolin inhibits inflammatory response and improves insulin sensitivity in the endothelium[J]. *Biochemie*, 2011, 93(3): 506-512.
- [11] ANEKNAN P, KUKONGVIRIYAPAN V, PRAWAN A, et al. Luteolin arrests cell cycling, induces apoptosis and inhibits the JAK/STAT3 pathway in human cholangiocarcinoma cells[J]. *APJCP*, 2014, 15(12): 5071-5076.
- [12] 张羽男, 殷和美, 张宇, 等.以4,4'-联吡啶为配体的木犀草素药物共晶的合成及表征[J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46(12): 72-78.
- [13] ZHANG YN, YIN HM, ZHANG Y, et al. Cocrystals of kaempferol, quercetin and myricetin with 4,4'-bipyridine: crystal structures, analyses of intermolecular interactions and antibacterial properties[J]. *J Mol Struct*, 2016. DOI: 10.1016/j.molstruc.2016.10.034.
- [14] ZHANG YN, YIN HM, ZHANG Y, et al. Preparation of a 1:1 cocrystal of genistein with 4,4'-bipyridine[J]. *J Cryst Growth*, 2017. DOI: 10.1016/j.jcrysgro.2016.10.084.
- [15] CHADHA R, BHALLA Y, NANDAN A. Chrysin cocrystals: characterization and evaluation[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.10.020.

(收稿日期:2017-09-05 修回日期:2017-10-26)

(编辑:邹丽娟)