



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109331033 B

(45) 授权公告日 2021. 11. 30

(21) 申请号 201811480778.1

(22) 申请日 2018.12.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109331033 A

(43) 申请公布日 2019.02.15

(73) 专利权人 浙江寿仙谷医药股份有限公司
地址 321200 浙江省金华市武义县壶山街
道商城路10号

专利权人 金华寿仙谷药业有限公司

(72) 发明人 李振皓 李明焱 王汉波 吴叶锋
赵凤杰

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 刘奇

(51) Int. Cl.

A61K 31/715 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

(56) 对比文件

Jun Yang等.Optimization of mechanochemical-assisted extraction and decoloration by resins of polysaccharides from petals of Crocus sativus L.《J Food Process Preserv.》.2017,第42卷(第1期),第1-11页.

赵成刚等.西红花花瓣粗多糖提取纯化工艺及体外抗氧化研究.《食品工业》.2012,(第1期),第1-4页.

赵成刚等.西红花花瓣粗多糖清除自由基的效果.《湖北农业科学》.2014,第53卷(第4期),第900-902,919页.

陈可等.藏红花花瓣粗多糖的体外抗氧化活性研究.《四川大学学报(自然科学版)》.2016,第53卷(第2期),第448-452页.

审查员 崔传明

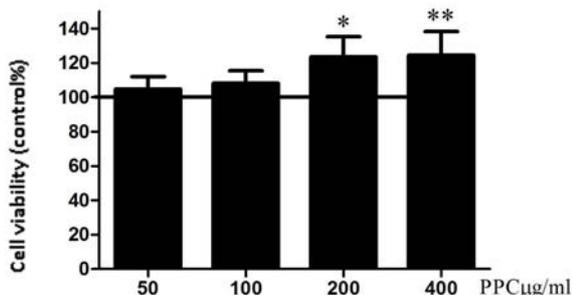
权利要求书1页 说明书8页
序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

藏红花花瓣总多糖在制备抗炎症的药物中的应用

(57) 摘要

本发明提供了藏红花花瓣总多糖在制备抗炎症的药物中的应用,属于藏红花活性物质应用技术领域,将所述藏红花花瓣总多糖与药学上接受的辅料混合制备抗炎症的药物,所述藏红花花瓣总多糖通过抑制炎症因子的表达实现抗炎症。通过预先用藏红花花瓣总多糖处理细胞,能够极显著降低由脂多糖引起的细胞中的炎症因子的表达,从而抑制炎症反应。



1. 藏红花花瓣总多糖在制备抗炎症的药物中的应用,其特征在于,将所述藏红花花瓣总多糖与药学上接受的辅料混合制备抗炎症的药物,所述藏红花花瓣总多糖通过抑制炎症因子的表达实现抗炎症;

所述藏红花花瓣总多糖的提取方法,包括以下步骤:

1) 将藏红花花瓣粉末醇提后的滤渣风干,得到风干滤渣与水以1g:20ml的比例混合置于98~102℃提取2.7~3.3h后固液分离,收集液相组分,获得藏红花花瓣水提液;所述的醇提包括以下步骤:将藏红花花瓣粉末与体积分数为55~65%的乙醇以1g:(15~25)ml的比例混合置于65~75℃提取1.5~2.5h后固液分离,收集固相组分风干后获得所述风干滤渣;

2) 将所述藏红花花瓣水提液醇沉,收集固相组分获得藏红花花瓣水提物固体粉末;所述醇沉为将乙醇与所述藏红花花瓣水提液混合,至混合液中乙醇的体积终浓度为85~95%;

3) 将所述藏红花花瓣水提物固体粉末复溶,透析后,用阴离子交换柱层析纯化、凝胶柱层析纯化获得藏红花花瓣总多糖;

所述透析的截留分子量为2500~3500D;所述透析的总时间为42~54h,每6~8h换水一次;

所述阴离子交换柱为DEAE-SephadexA-50柱,所述阴离子交换柱层析的上样浓度为30~40mg/ml;所述阴离子交换柱层析采用0.05~0.6mol/L的NaCl溶液梯度洗脱,所述洗脱速度为0.8~1.2ml/min;

所述凝胶柱层析采用Sephadex G-200,所述凝胶柱层析的洗脱液为水,洗脱流速为0.08~0.12ml/min。

2. 根据权利要求1所述的藏红花花瓣总多糖在制备抗炎症的药物中的应用,其特征在于,所述炎症因子包括IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和CXCL10。

3. 根据权利要求1或2所述的藏红花花瓣总多糖在制备抗炎症的药物中的应用,其特征在于,当所述抗炎症的药物为液体制剂时,所述藏红花花瓣总多糖在抗炎症的药物中的浓度为50~400 μ g/ml。

4. 根据权利要求3所述的藏红花花瓣总多糖在制备抗炎症的药物中的应用,其特征在于,当所述抗炎症的药物为液体制剂时,所述藏红花花瓣总多糖在抗炎症的药物中的浓度为100~250 μ g/ml。

5. 根据权利要求1所述的藏红花花瓣总多糖在制备抗炎症的药物中的应用,其特征在于,所述炎症为由脂多糖诱发的炎症反应。

藏红花花瓣总多糖在制备抗炎症的药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于藏红花活性物质应用技术领域,尤其涉及藏红花花瓣总多糖在制备抗炎症的药物中的应用。

背景技术

[0002] 藏红花(Saffron,Crocus sativus L.),又名番红花、西红花、泊夫蓝、撒法即,为鸢尾科番红花属多年生草本植物,据《中华人名共和国药典》记载,其药用部位为干燥的花柱,藏红花作为传统中药其功效为:活血化瘀,凉血解毒,解郁安神。用于经闭癥瘕,产后瘀阻,温毒发斑,忧郁痞闷,惊悸发狂等。除药用外,它可用作食品添加剂、食用色素和高级香料。近年对藏红花的药理研究表明,其花柱中的主要有效成分—藏红花苷对于癌症、冠心病、动脉粥样硬化、高血脂症等多种疾病具有较好的防治作用。其花柱因产量极低同时具有神奇的药效而被世人封以“植物黄金”的称号。

[0003] 目前藏红花的药效功能尚未被完全开发,作用机理尚不清楚,造成极大的资源浪费。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种藏红花花瓣总多糖在制备抗炎症的药物中的应用。

[0005] 为了实现上述目的,本发明提供了一种藏红花花瓣总多糖在制备抗炎症的药物中的应用,将所述藏红花花瓣总多糖与药学上接受的辅料混合制备抗炎症的药物,所述藏红花花瓣总多糖通过抑制炎症因子的表达实现抗炎症。

[0006] 优选的,所述炎症因子包括IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和CXCL10。

[0007] 优选的,当所述抗炎症的药物为液体制剂时,所述藏红花花瓣总多糖在抗炎症的药物中的浓度为50~400 μ g/ml。

[0008] 优选的,当所述抗炎症的药物为液体制剂时,所述藏红花花瓣总多糖在抗炎症的药物中的浓度为100~250 μ g/ml。

[0009] 优选的,所述炎症为由脂多糖诱发的炎症反应。

[0010] 优选的,所述藏红花花瓣总多糖的提取方法,包括以下步骤:

[0011] 1) 将藏红花花瓣粉末醇提后的滤渣风干,得到风干滤渣与水以1g:(15~25)ml的比例混合置于95~105 $^{\circ}$ C提取2.5~3.5h后固液分离,收集液相组分,获得藏红花花瓣水提液;

[0012] 2) 将所述藏红花花瓣水提液醇沉,收集固相组分获得藏红花花瓣水提物固体粉末;

[0013] 3) 将所述藏红花花瓣水提物固体粉末复溶,透析后,用阴离子交换柱层析纯化、凝胶柱层析纯化获得藏红花花瓣总多糖。

[0014] 优选的,所述滤渣的质量与水的体积比例为1g:20ml,所述提取的温度为98~102

℃,所述提取的时间为2.7~3.3h;所述醇沉为将乙醇与所述藏红花花瓣水提液混合,至混合液中乙醇的体积终浓度为85~95%。

[0015] 优选的所述透析的截留分子量为2500~3500D;所述透析的总时间为42~54h,每6~8h换水一次。

[0016] 优选的,所述阴离子交换柱为DEAE-SephadexA-50柱,所述阴离子交换柱层析的上样浓度为30~40mg/ml;所述阴离子交换柱层析采用0.05~0.6mol/L的NaCl溶液梯度洗脱,所述洗脱速度为0.8~1.2ml/min。

[0017] 所述透析的截留分子量为2500~3500D;所述透析的总时间为42~54h,每6~8h换水一次。

[0018] 优选的,所述阴离子交换柱为DEAE-SephadexA-50柱,所述阴离子交换柱层析的上样浓度为30~40mg/ml;所述阴离子交换柱层析采用0.05~0.6mol/L的NaCl溶液梯度洗脱,所述洗脱速度为0.8~1.2ml/min。

[0019] 优选的,所述凝胶柱层析采用Sephadex G-200,所述凝胶柱层析的洗脱液为水,洗脱流速为0.08~0.12ml/min。

[0020] 本发明的有益效果:本发明提供的藏红花花瓣总多糖在制备抗炎症的药物中的应用,通过预先用藏红花花瓣总多糖处理细胞,能够极显著降低由脂多糖引起的细胞中的炎症因子的表达,从而抑制炎症反应。

[0021] 进一步的,根据实施例记载,所述藏红花花瓣总多糖在50~200μg/ml的浓度下,能够极显著的降低炎症因子IL-6、TNF-α、IL-1β和CXCL10的表达。

附图说明

[0022] 图1为藏红花花瓣总多糖对RAW264.7巨噬细胞的毒性和增殖的影响;

[0023] 图2为藏红花花瓣总多糖预先处理RAW264.7巨噬细胞,对LPS诱发的巨噬细胞CXCL10因子表达浓度的影响;

[0024] 图3为藏红花花瓣总多糖预先处理RAW264.7巨噬细胞,对LPS诱发的巨噬细胞IL-1β因子表达浓度的影响;

[0025] 图4为藏红花花瓣总多糖预先处理RAW264.7巨噬细胞,对LPS诱发的巨噬细胞IIL-6因子表达浓度的影响;

[0026] 图5为藏红花花瓣总多糖预先处理RAW264.7巨噬细胞,对LPS诱发的巨噬细胞TNF-α因子表达浓度的影响。

具体实施方式

[0027] 本发明提供了一种藏红花花瓣总多糖在制备抗炎症的药物中的应用,将所述藏红花花瓣总多糖与药学上接受的辅料混合制备抗炎症的药物,所述藏红花花瓣总多糖通过抑制炎症因子的表达实现抗炎症。在本发明中所述炎症因子优选的包括IL-6、TNF-α、IL-1β和CXCL10。本发明对所述药学上接受的辅料没有特殊限定,采用本领域常规辅料即可。

[0028] 本发明中,所述抗炎症的药物的剂型优选为液体制剂,当所述抗炎症的药物为液体制剂时,所述藏红花花瓣总多糖在抗炎症的药物中的浓度优选为50~400μg/ml,更优选为100~250μg/ml。本发明中将所述藏红花花瓣总多糖预处理细胞,能够极显著降低由脂多

糖引起的细胞中的炎症因子的表达,从而抑制炎症反应。在本发明的具体实施过程中,优选的使用所述藏红花花瓣总多糖预处理RAW264.7巨噬细胞,所述处理时间优选为20~28h,更优选为22~26h,最优选为24h;本发明在所述藏红花花瓣总多糖处理细胞后,将脂多糖LPS与藏红花花瓣总多糖共同处理细胞。在本发明中所述脂多糖在细胞液中的终浓度优选为100ng/ml,所述藏红花花瓣总多糖在细胞液中的终浓度优选为60~300 μ g/ml,更优选为100~200 μ g/ml;本发明中所述脂多糖的作用为诱发细胞炎症反应。

[0029] 在本发明中所述藏红花花瓣总多糖的提取方法,包括以下步骤:1)将藏红花花瓣粉末醇提后的滤渣风干,得到风干滤渣与水以1g:(15~25)ml的比例混合置于95~105 $^{\circ}$ C提取2.5~3.5h后固液分离,收集液相组分,获得藏红花花瓣水提液;2)将所述藏红花花瓣水提液醇沉,收集固相组分获得藏红花花瓣水提物固体粉末;3)将所述藏红花花瓣水提物固体粉末复溶,透析后,用阴离子交换柱层析纯化、凝胶柱层析纯化获得藏红花花瓣总多糖。在本发明中,以藏红花花瓣为原料,所述藏红花花瓣优选为去除藏红花花柱的干燥花瓣。本发明中,所述藏红花花瓣优选的烘干至恒重后进行粉碎获得藏红花花瓣粉末;所述藏红花花瓣粉末的粒度优选的小于30目。本发明中所述藏红花花瓣粉末优选的采用石油醚脱脂后,烘干备用。本发明中所述烘干的温度优选为50~60 $^{\circ}$ C,更优选为56 $^{\circ}$ C。本发明中,所述藏红花花瓣粉末优选的密封避光保存。本发明中所述的醇提优选的包括以下步骤:将上述藏红花花瓣粉末与体积分数为55~65%的乙醇以1g:(15~25)ml的比例混合置于65~75 $^{\circ}$ C提取1.5~2.5h后固液分离,收集固相组分风干后即得到所述滤渣。

[0030] 本发明将所述滤渣与水以1g:(15~25)ml的比例混合置于95~105 $^{\circ}$ C提取2.5~3.5h后固液分离,收集液相组分,获得藏红花花瓣水提液。在本发明中,所述滤渣与水的比例优选为1g:(18~22)ml,更优选为1g:20ml。本发明中所述提取的温度优选为98~102 $^{\circ}$ C,更优选为100 $^{\circ}$ C;所述提取的时间优选为2.7~3.3h,更优选为3h。本发明在所述提取后进行固液分离,收集液相组分;本发明中,所述固液分离的方法优选为过滤,本发明对所述过滤没有特殊要求,采用本领域常规的纱布过滤、滤纸过滤或膜过滤均可。

[0031] 本发明在获得所述藏红花花瓣水提液后,将所述藏红花花瓣水提液醇沉。本发明中所述醇沉为将乙醇与所述藏红花花瓣水提液混合,至混合液中乙醇的体积浓度为85~95%,优选为90%。本发明中,所述醇沉的温度优选为4 $^{\circ}$ C,所述醇沉的时间优选为10~16h,更优选为12~14h;本发明在所述醇沉后,进行固液分离,收集固相组分。

[0032] 将固体组分至于30~50 $^{\circ}$ C,真空干燥10~14小时,即得藏红花花瓣水提物固体粉末。本发明中,所述固液分离的方式优选为离心或过滤;本发明对所述离心或过滤的具体条件没有特殊限定,只要能够实现固液分离即可;本发明中,所述干燥温度优选为40 $^{\circ}$ C,干燥时间为12小时。

[0033] 本发明在获得所述藏红花花瓣水提物固体粉末进行复溶后透析。在本发明中,所述复溶优选的用蒸馏水进行。在本发明中所述透析的截留分子量优选为2500~3500D,更优选为3000D;所述透析的总时间优选为42~54h,更优选为46~50h,最优选为48h;本发明在所述透析过程中优选的每6~8h换水一次。

[0034] 本发明在所述透析后,再次浓缩,干燥(方法与藏红花花瓣水提物干燥方法相同)即得藏红花花瓣粗多糖。

[0035] 得到藏红花花瓣粗多糖后,取100mg样品,超纯水复溶,用阴离子交换柱层析纯化。

在本发明中,所述阴离子交换柱优选为DEAE-SephadexA-50柱。在本发明中,所述DEAE-SephadexA-50柱的制备采用本领域常规的手段进行,无其他特殊要求。本发明中所述阴离子交换柱层析的上样浓度优选为30~40mg/ml,更优选为31~35mg/ml;本发明中所述阴离子交换柱层析采用0.05~0.6mol/L的NaCl溶液梯度洗脱,本发明中,所述梯度洗脱NaCl溶液的浓度梯度优选为0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6mol/L;所述洗脱速度优选为0.8~1.2ml/min,更优选为1.0ml/min。在本发明具体实施过程中,自动部分收集器收集洗脱液,4min/管。用硫酸苯酚法测定每管中糖含量。收集糖富集的组分进一步纯化。

[0036] 本发明在所述阴离子交换柱层析纯化后,将收集到的糖富集组分进行凝胶柱层析。本发明中所述凝胶柱优选为Sephadex G-200。在本发明中,所述Sephadex G-200柱的制备采用本领域常规的手段进行,无其他特殊要求。本发明中,所述凝胶柱层析的洗脱液为水,所述洗脱流速优选为0.08~0.12ml/min,更优选为0.1ml/min。在本发明具体实施过程中,自动部分收集器收集洗脱下来的液体,20mL/管,测糖含量,收集糖反应呈阳性的组分,经浓缩,干燥(方法与藏红花花瓣水提物干燥方法相同)获得藏红花花瓣总多糖。

[0037] 本发明上述提取方法制备获得藏红花花瓣总多糖,其中总多糖含量为86.0~91.0%,还原糖的含量为2.5~3.5%,糖醛酸含量为38.5~43.5%,蛋白质含量为2.0~2.2%。

[0038] 本发明为了验证所述藏红花花瓣总多糖的质疑炎症因子表达的作用,在体外平台建立了脂多糖LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症反应模型,以此探究藏红花花瓣总多糖对脂多糖LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症反应的影响。

[0039] 本发明在具体实施过程中,优选的用藏红花花瓣总多糖预处理细胞,然后再用脂多糖又到细胞产生炎症反应。所述藏红花花瓣总多糖预处理细胞的时间优选为20~40h,更优选为22~28h。试验结果可知,用藏红花花瓣总多糖预处理细胞后,可显著抑制由LPS刺激的IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和CXCL10的浓度上调。

[0040] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0041] 实施例1

[0042] 精确称取3份醇提后风干的藏红花花瓣粉末,每份2g,分别放于3个相似的三角瓶中,按料水比1:20的比例分别加入40mL蒸馏水,用玻璃棒充分搅拌混匀。塑料保鲜膜封口以后,置于100℃的水浴锅中浸提3h。合并经布氏漏斗抽滤的滤液再重复抽滤一次,之后于旋转蒸发器中减压浓缩至最小体积,加入乙醇使乙醇最终体积约达到90%,搅拌后放入4℃冰箱静置过夜。所得沉淀物用200目尼龙滤网过滤后收集,于40℃真空干燥箱中干燥12h,得到藏红花花瓣水提物粉末。

[0043] 将藏红花花瓣水提物粉末用超纯水溶解,转入D3000的透析袋中,两端用透析袋夹子固夹紧,放入超纯水中,4℃透析48h,每隔6h换一次水。透析后用旋转蒸发器浓缩,放入真空干燥箱中干燥12h,得到藏红花花瓣粗多糖。

[0044] 阴离子交换柱层析

[0045] 取8g DEAE-SephadexA-50粉末于500mL烧杯中,加入300mL超纯水,沸水浴中溶胀3~4h。溶胀后去掉上层的漂浮的颗粒,用0.5mol/LNaOH浸泡1h,倒入砂芯漏斗用超纯水洗至中性;转入烧杯中用0.5mol/LHCl浸泡0.5h,洗至中性,再用碱洗后洗至中性。加0.05mol/

LNaCl搅拌,静置半小时后倾去上层颗粒,放入真空泵中抽真空2h。

[0046] 用0.05mol/LNaCl冲洗柱子,用镊子夹住出水管,保留约1/5体积缓冲液,将溶胀好的凝胶一次性装满柱子,连接恒流泵,调节1mL/min的流速,维持此流速冲洗5倍柱体积进行平衡,直至柱床高度稳定。100mg藏红花花瓣粗多糖溶于3mL超纯水上样,用0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6mol/L NaCl进行洗脱,流速为1ml/min,自动部分收集器收集洗脱液,4min/管。用硫酸苯酚法测定每管中糖含量。收集糖反应呈阳性部分,浓缩,干燥(方法与藏红花花瓣水提物干燥方法相同),得到糖富集组分,等待进一步纯化。

[0047] 凝胶柱层析

[0048] Sephadex G-200前处理方法与DEAE-Sephadex A-50类似,溶胀后碱-酸-碱洗后加超纯水抽真空,装柱,平衡。取100mg糖富集组分用3ml超纯水溶解,上样。上样后用超水洗脱,流速为0.1mL/min,20mL/管,自动部分收集器收集,收集糖反应呈阳性的组分,干燥后获得藏红花花瓣总多糖。

[0049] 其中总糖为88.6%、还原糖为3.26%、糖醛酸为42.03%、蛋白质为2.14%。对其单糖组成进行薄层色谱分析,推测藏红花花瓣多糖的单糖组成为葡萄糖醛酸、葡萄糖(也可能为半乳糖)、阿拉伯糖、木糖、鼠李糖,还有一个未知单糖。

[0050] 实施例2

[0051] 藏红花花瓣总多糖的抑制有LPS诱导的炎症因子浓度上调作用

[0052] 为方便以下藏红花花瓣总多糖简称为PPC。

[0053] 1、细胞来源

[0054] RAW264.7小鼠源单核-巨噬细胞,由华东师范大学生命医学研究所提供,购买市售RAW264.7小鼠源单核-巨噬细胞也可。

[0055] 2、细胞培养方法

[0056] 1) RAW264.7巨噬细胞复苏:

[0057] 从液氮罐中提前一天取出冻存的细胞将其转移至-80℃超低温冰箱中过度适应,在60mm的细胞培养皿中加入4mL的细胞培养液,将细胞在37℃水浴锅中快速融化至仅剩一丁点冰时,迅速将其转移到预先加入5mL细胞培养液的15mL EP管中,1000rpm离心4min,弃去上清液,加入1mL新鲜细胞培养液,缓慢吹打8~10下,将其逐滴加入至60mm的小皿中,置于含5%CO₂的恒温培养箱中培养。RAW264.7巨噬细胞生长速度较快需每天更换培养基或传代。

[0058] 2) RAW264.7巨噬细胞接板:

[0059] 待细胞密度长至70%-80%时,根据自己的实验设计进行接板,首先弃去旧的培养基,用2mL新鲜的细胞培养基润洗细胞,弃去,再加入2mL的培养基直接将细胞缓慢吹打下来,制成细胞悬液,然后用血球计数板进行活细胞计数,按照 5×10^5 个/mL的细胞密度将其接至细胞板中培养。

[0060] 3) RAW264.7巨噬细胞冻存:

[0061] 待RAW264.7巨噬细胞密度长至80%左右可对其进行冻存,RAW264.7巨噬细胞的冻存液由FBS、DMSO、细胞悬液按照2:1:7的比例配成1mL。首先在冻存管中加入由FBS和DMSO配制的混合液300μL,然后再向每个冻存管中加入700μL的细胞悬液,快速颠倒混匀,然后将细胞置于4℃冰箱10min、转至-20℃冰箱2.5h、-80℃冰箱过夜,最后可长期保存在液氮中。

[0062] 1.MMTT法检测细胞存活率

[0063] 将RAW264.7巨噬细胞按照 5×10^5 个/mL的细胞密度接于96孔培养板中,待细胞密度长至70%左右,此时用100 μ L空白或含不同浓度的PPC的培养基替代旧的培养基,继续培养20h,向每个孔中加入20 μ L浓度为5mg/mL的MTT溶液,继续孵育4h,弃上清,每孔中再加入200 μ L的DMSO,室温静置10min,充分溶解结晶,在490nm的波长下检测吸光度。

[0064] 细胞存活率=(各浓度组OD值/空白对照组OD值) \times 100%。

[0065] 结果如图1所示,表明:PPC在400 μ g/ml以下无毒,200 μ g/ml显著刺激细胞增值(* $P < 0.05$),400 μ g/ml极显著刺激细胞增值(* $P < 0.01$)。

[0066] 2.q-PCR检测炎症因子的表达

[0067] 细胞接到12孔板内,置于5%CO₂、37 $^{\circ}$ C培养箱中培养,细胞生长到80%后,分为5组。正常组:不加LPS和PPC;PPC组:200 μ g/mL PPC处理细胞25.5h;LPS组:用100ng/mL的LPS处理细胞1.5h;PPC+LPS组:提前24h用50 μ g/mL和200 μ g/mL PPC预处理细胞,随后用100ng/mL的LPS和PPC共同处理1.5h。处理结束后,收样,提取细胞总RNA,采用q-PCR方法,检测细胞因子CXCL10的mRNA表达。

[0068] 4.1RAW264.7细胞总RNA的提取

[0069] 参考TRIzol试剂说明书,具体步骤如下:

[0070] (1)用预冷的PBS洗涤细胞1~2遍,吸取PBS,加1mL TRIzol,室温放5min。

[0071] (2)加0.2mL氯仿,盖紧样品瓶盖,用手用力摇晃15s,室温静置5min;4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心15min。

[0072] (3)小心吸取约400 μ L上层液体转移到新标号的RNase Free EP管中,加等体积的异丙醇,轻轻混匀,室温放置10min,4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心10min。

[0073] (4)小心吸去上清,留取沉淀,加入1mL现配预冷的75%乙醇,轻晃使底部RNA悬浮,4 $^{\circ}$ C 7500rpm离心5min。

[0074] (5)用移液枪吸尽乙醇,室温挥净乙醇后加65 $^{\circ}$ C的DEPC水溶解RNA。

[0075] (6)冰上操作进行RNA浓度测定、RNA电泳和反转录,剩余的RNA-80 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

[0076] 4.2RNA浓度的测定

[0077] 取1 μ L RNA用核酸测定仪测定RNA浓度,OD₂₆₀/OD₂₈₀在1.8~2.0之间可进行下一步反转录。

[0078] 4.3琼脂糖凝胶电泳

[0079] 琼脂糖凝胶电泳验证RNA是否降解。

[0080] 4.4反转录

[0081] 按反转录试剂盒说明书加好各试剂,混匀后瞬离,37 $^{\circ}$ C水浴反应15min后85 $^{\circ}$ C水浴5~10s。加DEPC水稀释后-80 $^{\circ}$ C保存。

[0082] 4.5q-PCR引物序列

[0083] 表1CXCL10q-PCR引物序列

[0084] 基因名称	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')

[0085]	CXCL10	atgacgggccagtgagaatg (SEQ ID No.1)	gaggtctctgtgtccatc (SEQ ID No.2)
	IL-6	gaggataccactcccaacagacc (SEQ ID No.3)	aagtgcatacatcgtgttcataca(SEQ ID No.4)
	IL-1 β	gcttcaggcaggcagtagatc (SEQ ID No.5)	aggatgggctcttcttcaag (SEQ ID No.6)
	TNF- α	agagctacaagaggatcaccagcag (SEQ ID No.7)	tcagattacgggtcaacttcacat (SEQ ID No.8)

[0086] 4.6q-PCR

[0087] 25 μ L体系,按试剂盒说明书操作,操作时注意避光。

[0088] LPS

[0089] LPS购于Sigma公司

[0090] LPS是存在于革兰氏阴性菌细胞壁上的结构复杂的糖脂。同时也是机体先天免疫系统识别外界细菌入侵的重要靶标,可以诱发多种细胞的炎症反应。

[0091] 本实验在体外平台建立了LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症反应模型,以此探究PPC对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症反应的影响。

[0092] 本实验中,如结果所示LPS处理1.5h后可极显著地促进CXCL10mRNA的表达,成功诱导了RAW264.7巨噬细胞产生炎症反应。

[0093] 结果如附图2~5所示,PPC预先处理RAW264.7巨噬细胞24h后,可明显降低LPS诱发的巨噬细胞IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和CXCL10的浓度上调。

[0094] 图2:RAW264.7细胞长到80%时,用浓度200 μ g/ml PPC,可以刺激细胞24h,细胞内CXCL10的浓度极显著上调(###P<0.01)。LPS(终浓度100ng/ml)刺激细胞1.5h后,细胞内CXCL10的浓度极显著上调(##P<0.01)。细胞用浓度为50 μ g/ml PPC处理24h,再加入LPS(终浓度100ng/ml)和50 μ g/ml PPC共处理1.5h后,可以显著抑制由LPS刺激的CXCL10的浓度上调(*P<0.05)。200 μ g/ml PPC同样方式处理细胞,对CXCL10只有抑制的趋势。

[0095] 50和200 μ g/ml PPC预先处理RAW264.7巨噬细胞24h后,可明显降低LPS诱发的巨噬细胞内趋化因子CXCL10的mRNA表达水平以及IL-1 β 的mRNA表达水平,与LPS单独处理组相比,具有显著的统计学差异(P<0.05)。结果表明,PPC预先处理RAW264.7巨噬细胞24h,可在一定程度上降低LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞趋化因子CXCL10的mRNA表达。

[0096] 图3:RAW264.7细胞长到80%时,用浓度200 μ g/ml PPC,可以刺激细胞24h,细胞内IL-1 β 的浓度极显著上调(###P<0.01)。LPS(终浓度100ng/ml)刺激细胞1.5h后,细胞内IL-1 β 的浓度极显著上调(##P<0.01)。细胞用浓度为50 μ g/ml PPC处理24h,再加入LPS(终浓度100ng/ml)和50 μ g/ml PPC共处理1.5h后,可以极显著抑制由LPS刺激的IL-1 β 的浓度上调(**P<0.01)。PPC在浓度为50 μ g/ml,200 μ g/ml,可以极显著抑制由LPS刺激引起的IL-1 β 的浓度上调(**P<0.01)

[0097] 图4:PPC在浓度为50 μ g/ml,200 μ g/ml,可以极显著抑制由LPS刺激引起的IL-6的浓度上调(**P<0.01)。

[0098] 图5:PPC在浓度为50 μ g/ml,200 μ g/ml,可以极显著抑制由LPS刺激引起的TNF- α 的浓度上调(**P<0.01)。

[0099] 综上所述,本发明提供的藏红花花瓣总多糖预处理细胞后,能够显著降低由LPS诱导的巨噬细胞的多种炎症因子mPNA的表达。

[0100] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 浙江寿仙谷医药股份有限公司
- [0003] 金华寿仙谷药业有限公司
- [0004] <120> 藏红花花瓣总多糖在制备抗炎症的药物中的应用
- [0005] <160> 8
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 20
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] atgacgggcc agtgagaatg 20
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 20
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0017] <400> 2
- [0018] gaggctctct gctgtccatc 20
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 23
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0023] <400> 3
- [0024] gaggatacca ctccaacag acc 23
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 24
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0029] <400> 4
- [0030] aagtgcatac tcgttggtca taca 24
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 19
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0035] <400> 5
- [0036] gcttcaggca ggcagtatc 19
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 21

-
- [0039] <212> DNA
[0040] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0041] <400> 6
[0042] aggatgggct cttcttcaaa g 21
[0043] <210> 7
[0044] <211> 25
[0045] <212> DNA
[0046] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0047] <400> 7
[0048] agagctacaa gaggatcacc agcag 25
[0049] <210> 8
[0050] <211> 25
[0051] <212> DNA
[0052] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0053] <400> 8
[0054] tcagatttac gggatcaactt cacat 25

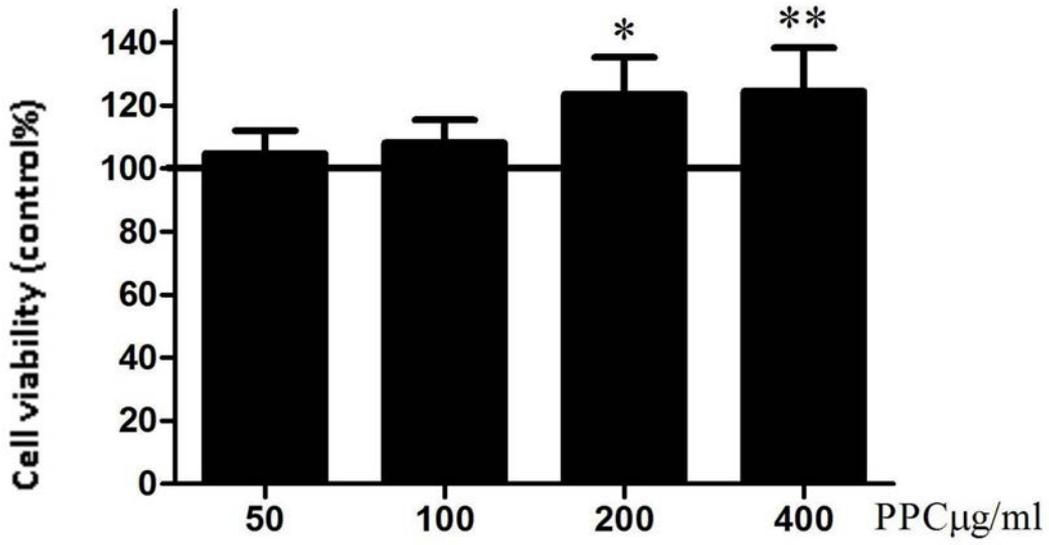


图1

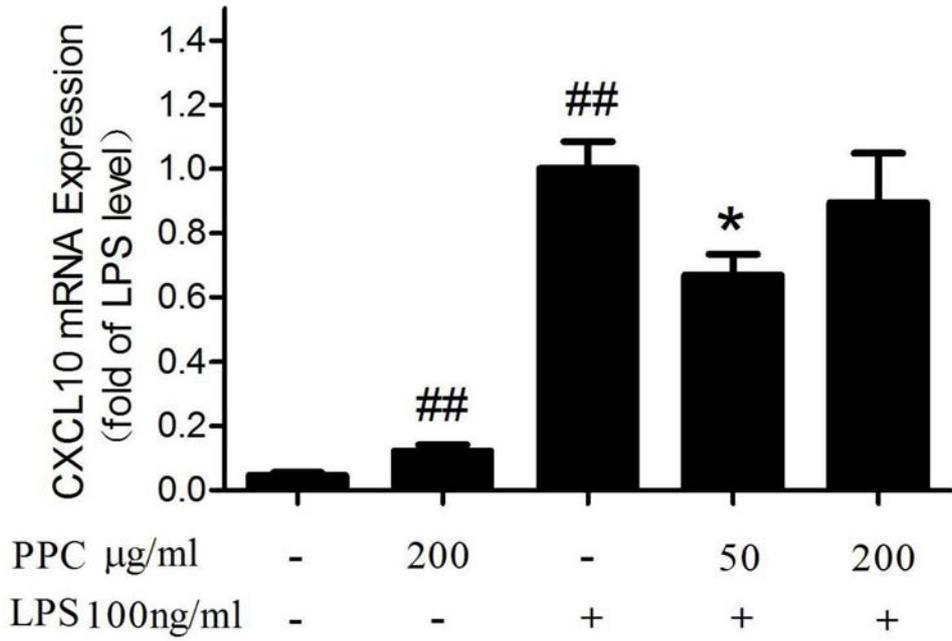


图2

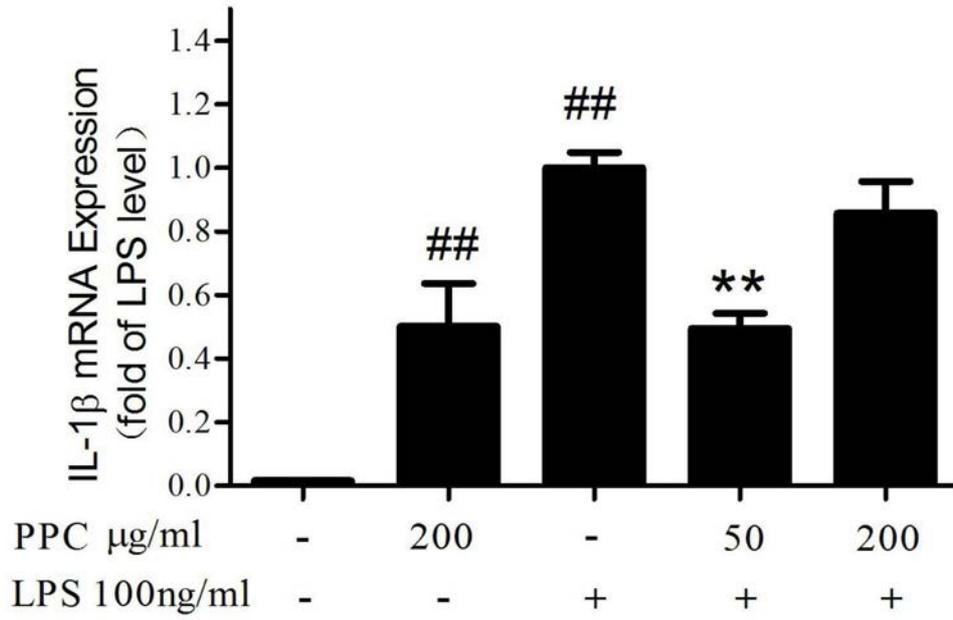


图3

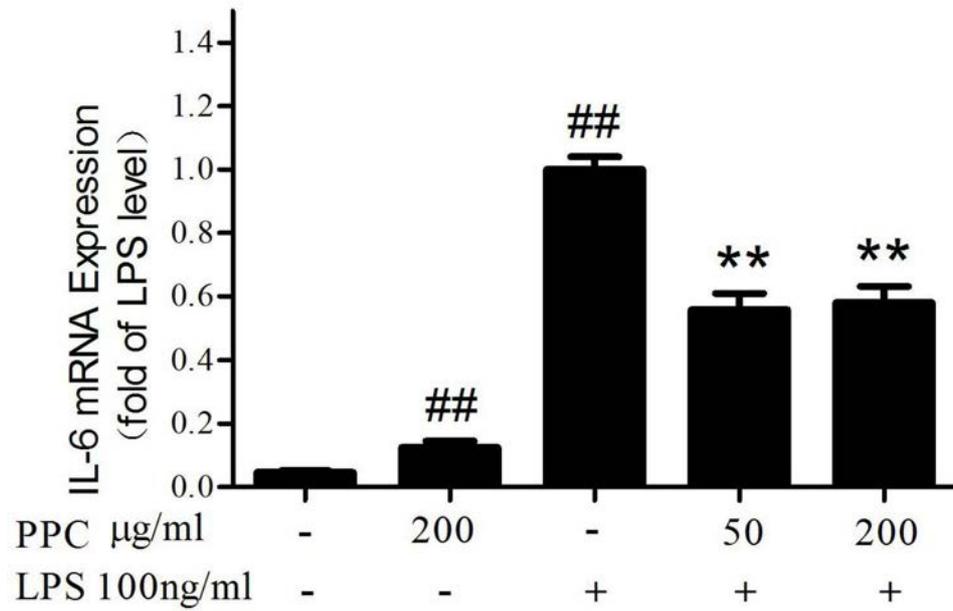


图4

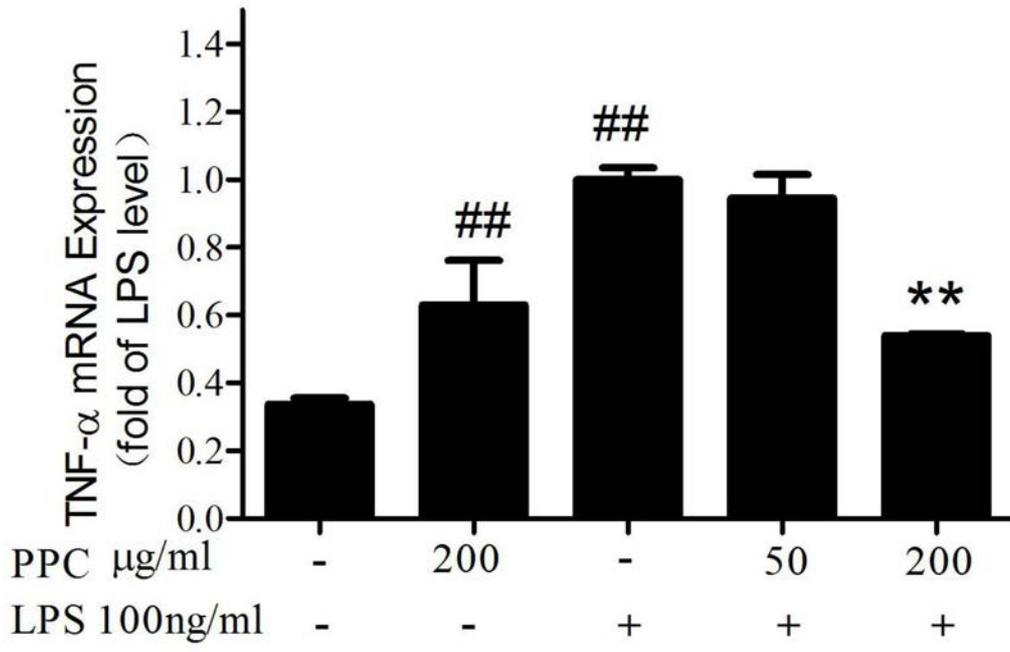


图5