



# 葛根素预处理对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞活化的影响

胡建军, 张丹丹, 陈俊杰, 陈成水\*, 李玉苹  
(温州医学院附属第一医院呼吸内科, 浙江温州 325000)

**[摘要]** 目的:观察葛根素预处理对脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 活化和分泌细胞因子的影响,探讨其抗炎机制。方法:取对数期生长良好的 RAW264.7 细胞,随机分为空白对照组、LPS 组、葛根素预处理 + LPS 组。CCK-8 法检测葛根素对 RAW264.7 的细胞毒性作用,Giemsa 染色法观察细胞形态学变化,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞上清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP-2)的变化,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)动态测定 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达。结果:当葛根素的浓度为 100,200,400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,与 1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS 共培养均未显示出细胞毒性作用( $P < 0.05$ );与空白对照组相比,LPS 组可明显改变 RAW264.7 细胞的形态(胞体增大,形态不规则,伪足大量伸出),葛根素 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组干预后可明显抑制 LPS 导致的细胞形态学变化,葛根素 200,400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组的抑制效果更显著,但 2 组之间无明显差异;葛根素预处理可使细胞上清液中 TNF- $\alpha$ ,MIP-2 以及细胞内 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达受到抑制( $P < 0.05$ ),并随着葛根素浓度的增加,抑制效果逐渐增加( $P < 0.05$ ),但未达到对照组水平。结论:葛根素是一种安全有效的天然抗炎药物,可显著下调炎症细胞因子(如 TNF- $\alpha$ ,MIP-2)的表达,其作用机制可能与下调 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达有关。

**[关键词]** 葛根素;巨噬细胞;脂多糖;NF- $\kappa$ B

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome,ARDS)是一种临床上常见的危重症,病死率极高。虽然导致 ARDS 的病因很多<sup>[1]</sup>,但内毒素诱导的效应细胞和炎症介质的共同参与,通过激活 NF- $\kappa$ B 途径产生的机体过度的炎症反应,在 ARDS 的发病中起了关键性的作用。巨噬细胞是肺内主要的炎症反应细胞,在清除进入气道的感染性、有毒性或致敏性颗粒物中发挥着关键作用。目前研究表明过度活化的巨噬细胞通过分泌炎症细胞因子、趋化因子、损伤介质和抗炎性细胞因子等,在 ARDS 的发生、发展及转归中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。目前针对 ARDS 的治疗药物很多,但却未有效的降低死亡率<sup>[3]</sup>,并产生很多不良的效果<sup>[4]</sup>。因此有必要寻找出一种更加安全有效的药物去防治 ARDS。葛根素(puerarin)是目前临床应用较多的黄酮类药物,为一种天然的雌激素。研究表明,葛根素具有抗

氧化应激的作用<sup>[5]</sup>。本实验通过观察葛根素对体外实验巨噬细胞的形态及炎症因子表达的影响,探讨葛根素抗炎作用的效果,为其临床应用提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7(由中国科学院上海细胞库提供),加入含 10% 的胎牛血清、100  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青、链霉素的 DMEM 培养基,置于 5%  $\text{CO}_2$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中常规培养。细胞生长至 80% ~ 90% 融合后进行传代,2 ~ 3 d 传代 1 次。取 3 ~ 6 代生长良好的细胞用于试验。

**1.2 试剂和仪器** LPS(美国 Sigma 公司,批号 L2880);葛根素(南京替斯艾么中药研究所,批号 TCM054-1120);小鼠 TNF- $\alpha$ ,MIP-2 ELISA 检测试剂盒(上海西唐生物科技有限公司);胎牛血清,DMEM 培养基,胰蛋白酶(美国 GIBCO 公司);细胞活力测定试剂盒(CCK-8,日本同仁化学公司);Giemsa 染色试剂盒(上海源叶公司);TRIzol(美国 Invitrogen 公司);RT-PCR 试剂盒(北京天根生化科技公司);SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒(日本 TOYOBO 公司);引物(上海生工生物公司);SW-CJ-1FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);3111 型  $\text{CO}_2$  孵箱(美国 thermo forma 公司);CKX41 倒置相差显

**[稿件编号]** 20111222020

**[基金项目]** 浙江省重点攻关项目(2010C14011)

**[通信作者]** \* 陈成水, Tel: 13806889081, E-mail: chenchengshui@gmail.com

**[作者简介]** 胡建军,硕士研究生, Tel: 13913030891, E-mail: htg-mx520@163.com



显微镜(日本 Olympus 公司);Wellscan MK 3 酶标仪(芬兰 Thermo 公司);mycycler 扩增仪(美国 BIO-ROD 公司);7500 型定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞分组** 取 3~6 代生长良好的细胞随机分为空白对照组, LPS 模型组( $LPS 1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ ), 葛根素预处理 + LPS 组(葛根素  $100, 200, 400 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$  预处理细胞 24 h 后, 换含  $LPS 1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  培养基孵育细胞 24 h)。各组在相同的时间点加入 LPS(空白对照组加入等量 PBS)。

**2.2 药物制备** 葛根素液用 DMEM 培养液配制, 将葛根素粉末溶于含 10% 胎牛血清、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素、链霉素的 DMEM 培养基中。配成终浓度为  $4 800 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$  原液,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  长期保存, 使用时用相同的 DMEM 培养液稀释成所需浓度。

**2.3 药物细胞毒性实验** 取对数生长期 RAW264.7 细胞,  $0.25 \text{ g} \cdot L^{-1}$  胰酶-EDTA 消化细胞后, 调节细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL, 均匀加入 96 孔培养板内, 每孔  $100 \mu\text{L}$ , 置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  孵箱培养 24 h。吸除旧培养液, 用新的  $100 \mu\text{L}$  培养液按 10 倍梯度将葛根素稀释为不同浓度( $0 \sim 4 800 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ ), 加入细胞培养板中, 每个药物稀释浓度平行做 6 个复孔。于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后, 加入  $10 \mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 培养 4 h。在  $450 \text{ nm}$  处检测各孔的吸光度。实验重复 3 次以上。用改进寇氏法计算药物最大无毒浓度( $TC_0$ )和半数中毒浓度( $TC_{50}$ )。

**2.4 RAW 264.7 细胞活力的检测** 调整 RAW264.7 细胞悬液密度为  $5 \times 10^4$  个/mL, 加入 96 孔培养板内, 每孔  $100 \mu\text{L}$ , 置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  孵箱培养 24 h。吸除旧培养液, 根据细胞分组处理, 每组均设 6 个复孔, 继续培养 24 h。加入  $10 \mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 培养 4 h。在  $450 \text{ nm}$  处检测各孔的吸光度。实验重复 3 次以上。

**2.5 细胞形态学检测** 调整 RAW264.7 细胞悬液密度为  $2 \times 10^5$  个/mL, 加入 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  孵箱培养 24 h。吸除旧培养液, 根据细胞分组处理后, 取培养上清, 离心去除细胞沉淀,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存, 贴壁细胞用预冷的 PBS 液洗 3 遍, 4% 多聚甲醛固定 10 min 后, 按照 Giemsa 试剂盒说明常规细胞染色, 预冷的 PBS 液洗 3 遍后, 倒置显微镜下观察细胞形态变化。

**2.6 TNF- $\alpha$  及 MIP-2 的检测** 取  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存的细胞上清液, 采用酶联免疫试剂盒检测 TNF- $\alpha$  及 MIP-2 含量。

**2.7 测定 NF- $\kappa$ B p65 的表达** RAW264.7 细胞  $2 \times 10^6$  个/mL 加入 6 孔板中, 每孔 2 mL, 根据细胞分组处理后, 吸除培养液, TRIzol 法提取总 RNA 后, 按照 RT 逆转录试剂盒操作说明将总 RNA 逆转录成 cDNA, 置  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存。按照 SYBR Green PCR 试剂盒说明扩增 NF- $\kappa$ B p65 (引物序列见表 1)。

表 1 NF- $\kappa$ B p65 的引物序列

Table 1 Primer for NF- $\kappa$ B p65

基因	引物序列	产物长度/bp
NF- $\kappa$ B p65	F: AAGCACAGATACCACCAAGACA	160
	R: GTCAGCCTCATAGTAGCCATCC	
GAPDH	F: GGTGGAAGGTCGGTGTGAACG	234
	R: CTCGCTCTGGAAGATGGTG	

**2.8 统计学处理** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。各组间数据的比较用 One-Way ANOVA, 两两比较用 least significant differenced (LSD) 法。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 药物对细胞的毒性测定** 检测药物的最大无毒浓度( $TC_0$ ) 为  $520.361 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ , 半数毒性浓度( $TC_{50}$ ) 为  $5 451.77 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 。

**3.2 RAW 264.7 细胞活力的检测** 与对照组比较, LPS 组以及葛根素不同浓度组均未显示出细胞毒性作用(图 1)。

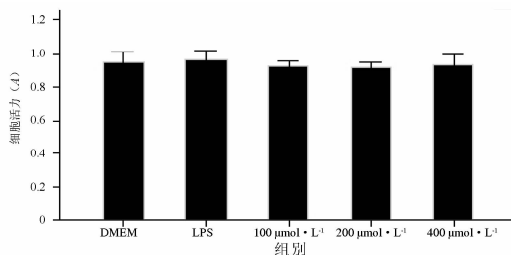


图 1 葛根素对细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of puerarin on the viability of RAW264.7 cells

**3.3 细胞形态学检测** 倒置显微镜下观察, 未经

LPS 刺激的 RAW264.7 细胞体积较小,成球形,少部分成梭形。LPS ( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 刺激后细胞形态向成树突状改变(具体表现为胞体增大,形态不规则,伪足大量伸出),葛根素  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组干预后可明显抑制 LPS 导致的细胞形态学变化,葛根素 200,  $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组的抑制效果更显著,但最大剂量组仍未达到 LPS 刺激前的形态(图 2)。

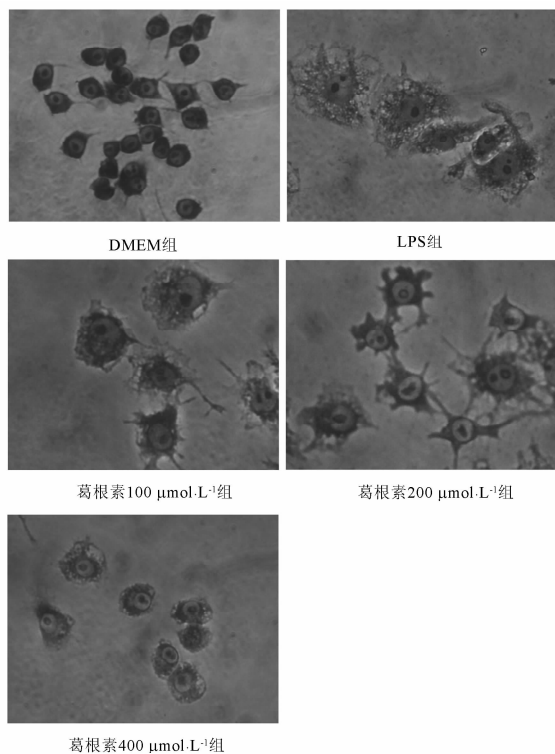


图 2 葛根素对细胞形态的影响(Giemsa,  $\times 400$ )  
Fig. 2 Effect of puerarin on the morphology of RAW264.7 cells(Giemsa,  $\times 400$ )

**3.4 各组 RAW 264.7 细胞上清液 TNF- $\alpha$  及 MIP-2 检测结果比较** 同对照组相比, LPS ( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 刺激 24 h 后 RAW 264.7 细胞上清液中 TNF- $\alpha$  及 MIP-2 含量显著升高( $P < 0.05$ ), 而经过不同浓度的葛根素 ( $100, 200, 400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预处理 24 h 后, RAW264.7 细胞上清液中 MIP-2, TNF- $\alpha$  的释放受到明显抑制( $P < 0.05$ ), 并呈现一定的剂量依赖性(表 2)。

**3.5 NF- $\kappa$ B p65 的表达** 将各组 Ct 值(threshold cycle, 循环阈值)经统计学处理, 具有统计学差异的( $P < 0.05$ ), 行  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式法相对定量, 结果以相对

表 2 葛根素对 RAW264.7 细胞 MIP-2, TNF- $\alpha$  分泌的影响( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 2 Effect of puerarin on secretion of MIP-2 and TNF- $\alpha$  in LPS-treated RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量 $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- $\alpha$ $/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	MIP-2 $/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
对照	-	$41.46 \pm 11.68$	$34.81 \pm 9.36$
LPS	1	$310.51 \pm 26.98^{2)}$	$384.28 \pm 42.59^{2)}$
葛根素	100	$203.05 \pm 36.96^{1)}$	$291.29 \pm 23.21^{1)}$
	200	$164.64 \pm 18.80^{1)}$	$196.17 \pm 24.78^{1)}$
	400	$125.14 \pm 15.05^{1)}$	$81.93 \pm 10.50^{1)}$

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与对照组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; LPS 剂量单位为  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

倍数表示(表 3)。同对照组相比, LPS 组中 NF- $\kappa$ B p65 表达量明显上升, 达到对照组的 12.99 倍, 而经过葛根素  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  预处理后, NF- $\kappa$ B p65 的释放受到明显抑制, 下降到对照组的 6.49 倍, 葛根素 200,  $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组的抑制差异的( $P < 0.05$ ), 但最大剂量组 NF- $\kappa$ B p65 的释放仍未达到 LPS 刺激前的水平( $P < 0.05$ )。

表 3 各组 RAW264.7 细胞 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 相对表达量  
Table 3 The relative expression of NF- $\kappa$ B p65 mRNA in RAW264.7 cells

组别	剂量 $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	NF- $\kappa$ B p65	GAPDH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
对照	-	$26.80 \pm 0.37$	$13.81 \pm 0.04$	1.00(0.79 ~ 1.26)
LPS	1	$22.60 \pm 0.16$	$13.30 \pm 0.11$	12.99(12.55 ~ 13.45)
葛根素	100	$23.96 \pm 0.37$	$13.67 \pm 0.18$	6.49(5.69 ~ 7.41)
	200	$24.81 \pm 0.28$	$13.88 \pm 0.13$	4.20(3.78 ~ 4.65)
	400	$25.45 \pm 0.26$	$13.81 \pm 0.15$	2.54(2.36 ~ 2.75)

## 4 讨论

ARDS 是一种临床上常见的危重症, 病死率极高, 其发病机制极其复杂, 迄今尚未阐明。近年来随着失控的炎症反应引发 ARDS 这一中心机制被广泛接受, 参与炎症反应的炎症细胞和细胞因子及其可能的信号转导途径成为了研究的热点。研究证实巨噬细胞在 ARDS 的发生、发展中起到关键角色, 活化后的巨噬细胞可通过分泌多种炎性介质介导炎症反应及组织修复<sup>[6]</sup>。在炎症反应的早期, 巨噬细胞可释放中性粒细胞(PMN)活化因子, 如 IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  等, 进一步的激活自身和 PMN<sup>[7]</sup>。从而导



致失控的炎症损伤反应。而在巨噬细胞释放的一系列炎症因子中, TNF- $\alpha$  和 IL-8 的作用尤其重要。TNF- $\alpha$  被称为炎症反应的始动因子<sup>[8]</sup>, 研究表明 TNF- $\alpha$  是 ARDS 发病中最先升高的炎症因子。TNF- $\alpha$  通过刺激趋化因子释放和上调黏附分子表达, 促使巨噬细胞和中性粒细胞的趋化及附壁, 同时 TNF- $\alpha$  还能刺激成纤维细胞的增生, 能诱导多种炎症介质的释放, 还能通过调节多种细胞的凋亡<sup>[9-11]</sup>。参与炎症的损伤和修复中。ARDS 特征性标志是 PMN 的聚集, PMN 的聚集很大程度上直接由趋化因子决定。巨噬细胞是气道趋化因子的主要来源。IL-8 是已知的人类最强的趋化因子, 是 PMN 趋化入肺的关键因子, 而在鼠类中扮演着 IL-8 角色的趋化因子为 MIP-2<sup>[12]</sup>。本实验发现未经 LPS 刺激的巨噬细胞仅产生极其微量 TNF- $\alpha$  和 MIP-2, 经 LPS 刺激 24 h 后, 巨噬细胞释放 TNF- $\alpha$  及 MIP-2 的能力明显加强, 表明了 LPS 诱导了巨噬细胞的炎症性反应。

目前认为真核细胞转录因子 NF- $\kappa$ B 是 ALI 炎症反应的主要炎症介质和转录因子, 在细胞因子瀑布效应中发挥着开关作用。NF- $\kappa$ B 的持续活化与肺损伤的严重程度有关, 在 ALI 的炎症介质网络调控中起中心环节作用<sup>[13]</sup>。本实验发现经 LPS 刺激后, 巨噬细胞内的 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 升高显著(比对照组升高 12.99 倍左右), 与经 LPS 刺激后 TNF- $\alpha$  及 MIP-2 的升高比例呈一定的对应关系, 猜测 NF- $\kappa$ B 可能是 LPS 活化巨噬细胞产生炎症介质的重要通路。

葛根素是由豆科植物野葛或甘葛藤根中提出的一种黄酮苷, 属于植物雌激素类。目前广泛用于心血管方面的治疗, 具有扩张心血管、降低心肌耗氧、改善心脏功能的作用<sup>[14]</sup>。近年对其进一步的研究发现, 葛根素具有抗氧化应激、抗肿瘤、改善胰岛素抵抗等作用<sup>[15-18]</sup>。但目前对葛根素抗炎及其可能的机制研究较少, 对其能否应用到呼吸重症医学的研究尚待深入。本实验发现, 葛根素可呈浓度依赖性的下调 TNF- $\alpha$  及 MIP-2 炎症因子的过度表达。这与其对巨噬细胞内的 NF- $\kappa$ B 的表达的影响存在着一定的对应关系, 推测葛根素是通过 NF- $\kappa$ B 表达的调控达到对抗炎症因子过度释放的目的。此外, 葛根素通过抑制巨噬细胞增大, 伪足增多等形态学的改变, 降低了其吞噬能力, 进一步达到对抗炎症

的目的。

综上所述, 葛根素预处理可抑制 NF- $\kappa$ B p65 表达, 进而降低其下游炎症因子 TNF- $\alpha$  及 MIP-2 的分泌, 发挥抗炎作用, 然而, 葛根素具体是作用在哪些转导通路, 发挥其抗炎作用, 还需要进一步研究证实。

#### [参考文献]

- [1] Weinacker A B, Vaszar L T. Acute respiratory distress syndrome: physiology and new management strategies[J]. *Annu Rev Med*, 2001, 52:221.
- [2] Rubins J B. Alveolar macrophages: wielding the double-edged sword of inflammation[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(2):103.
- [3] Rubenfeld G D. Incidence and outcomes of acute lung injury [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(16):1685.
- [4] B Byl, P Clevenger, A Kentos, et al. Ceftazidime- and imipenem-induced endotoxin release during treatment of gram-negative infections[J]. *J Clin Microbiol Infect Dis*, 2001, 20:804.
- [5] Park K H, Park Y D, Han J M, et al. Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthenes and flavonoids isolated from *Cudrania tricuspidata* [J]. *Bioorgan Med Chem Lett*, 2006, 16(21):5580.
- [6] Beatrice B, Reto S, Thomas P, et al. Alveolar macrophages regulate neutrophil reemittance in endotoxin-induced lung injury [J]. *Respir Res*, 2005, 6:61.
- [7] Goannoudis P V. Current concepts of the inflammatory response after major trauma: an update [J]. *Injury*, 2003, 34(6):397.
- [8] Song Y, Ao L, Raeburn C D, et al. A low level of TNF- $\alpha$  mediates hemorrhage-induced acute lung injury via p55 TNF receptor [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281(3):L677.
- [9] Haddad B. Differential effects of ebselen on neutrophil recruitment, chemokine, and inflammatory mediator expression in a rat model of lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation [J]. *J Immunol*, 2002, 169(2):974.
- [10] Knaus W A. The ongoing mystery of ARDS [J]. *Intensive Care Med*, 1996, 22(6):517.
- [11] Dunican A L. TNF- $\alpha$ -induced suppression of PMN apoptosis is mediated through interleukin-8 production [J]. *Shock*, 2000, 14(3):284.
- [12] Frevert C W, Farone A, Danae H, et al. Functional characterization of rat chemokine macrophage inflammatory protein-2 [J]. *Inflammation*, 1998, 19:133.
- [13] Aghai Z H. Dexamethasone suppresses expression of nuclear factor- $\kappa$ B in the cells of tracheobronchial lavage fluid in premature neonates with respiratory distress [J]. *Pediatr Res*, 2006, 59(6):811.
- [14] 张晓丹, 赵风华, 张秀梅, 等. 葛根素通过线粒体途径诱导肺动脉平滑肌细胞凋亡 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(16):2255.



- [15] Hwang Y P, H G Jeong. Mechanism of phytoestrogen puerarin-mediated cytoprotection following oxidative injury: estrogen receptor-dependent up-regulation of PI3K/Akt and HO-1 [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 233(3): 371.
- [16] Yu Z, Li W. Induction of apoptosis by puerarin in colon cancer H T229 cells [J]. *Cancer Lett*, 2006, 238(1): 53.
- [17] Choi J. Effect of kaikasaponin III obtained from *Pueraria thunbergiana* flowers on serum and hepatic lipid peroxides and tissue factor activity in the streptozotocin-induced diabetic rat [J]. *J Med Food*, 2004, 7(1): 31.
- [18] 程月发, 朱国旗, 关亚丽, 等. 葛根素对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞线粒体途径凋亡的保护作用 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(9): 1222.

## Effect of pretreatment with puerarin on activation of LPS-induced RAW264.7 cells

HU Jian-jun, ZHANG Dan-dan, CHEN Jun-jie, CHEN Cheng-shui\*, LI Yu-ping

(Department of Respiratory, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of pretreatment with puerarin on activation of LPS-induced RAW264.7 cells and secretory cytokines, and discuss its anti-inflammatory mechanism. **Method:** Well-grown RAW264.7 cells in the exponential phase were collected and randomly divided them into the blank control group, the LPS group and the puerarin pretreatment + LPS group. The cellular toxic effect of puerarin on RAW264.7 cells was examined by CCK-8 assay, cell morphology was detected by Giemsa stain method, the changes in TNF- $\alpha$  and MIP-2 were tested by ELISA, and the expression of NF- $\kappa$ B p65 mRNA were determined by qRT-PCR. **Result:** When puerarin was cultured with  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS at a concentration of lower than  $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , it had not showed the cellular toxic effect ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the LPS group could significantly change the morphology of RAW264.7 cells (increase in cell body, irregular shape, with a large number of pseudopodia extending). After intervention, the puerarin  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  group could significantly inhibit LPS-induced cell morphological changes, while the puerarin  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  puerarin groups showed more notable inhibitory effects. However, there was no obvious difference between the two groups. The pretreatment with puerarin could inhibit the expression of TNF- $\alpha$  and MIP-2 in cell supernatant and NF- $\kappa$ B p65 mRNA in cells ( $P < 0.05$ ). With increase in the puerarin concentration, its inhibitory effect gradually grew ( $P < 0.05$ ), but did not reach the level of the blank control group. **Conclusion:** As a safe and effective natural anti-inflammatory drug, puerarin can significantly reduce the expression of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , MIP-2). Its mechanism may be related to the reduction of NF- $\kappa$ B p65 mRNA expression.

**[Key words]** puerarin; RAW264.7 cell; lipopolysacchride (LPS); NF- $\kappa$ B

doi:10.4268/cjcmm20122023

[责任编辑 张宁宁]