

紫草素通过 TLR4/NF- κ B 信号通路抑制由脂多糖诱导的巨噬细胞炎症研究

李叶静^{1,2}, 谈弋¹

(1. 武汉大学药学院, 湖北 武汉 430060; 2. 恩施土家族苗族自治州中心医院检验科, 湖北 恩施 445000)

摘要:目的 研究紫草素抑制由脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞炎症的机制。方法 以淀粉培养基注射 BALB/c 小鼠腹腔, 诱导并分离巨噬细胞, 以 APC 标记 F4/80 染色, 并用流式细胞仪检测分离巨噬细胞情况; 用 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LPS 刺激上述分离的巨噬细胞, 分组如下: DMSO 溶剂对照组, LPS 对照组, LPS + 低剂量紫草素组 ($0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); LPS + 中剂量紫草素组 ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); LPS + 高剂量紫草素组 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 通过 ELISA 和实时定量 PCR (qRT-PCR) 方法分别测定各处理组培养上清液以及细胞中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 和白细胞介素-10 (IL-10) 的表达情况; Western blot 分别测定 Toll 样受体 4 (TLR4) 和核因子- κ B (NF- κ B) 的 p65 亚基磷酸化表达情况。结果 流式细胞检测可知, APC 标记的 F4/80 染色巨噬细胞的纯度可达 97.8%; ELISA 和实时定量 PCR 结果显示, 紫草素处理后可以抑制由 LPS 刺激细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达 ($P < 0.05$), 并增加 IL-10 的表达 ($P < 0.05$), 且呈现出一定的浓度依赖性; Western blot 结果显示, 紫草素能下调由 LPS 刺激的 TLR4 的表达水平和 NF- κ B 的 p65 亚基磷酸化表达。结论 紫草素的抗炎机制可能是通过 TLR4 介导的信号通路活化 NF- κ B, 抑制 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的分泌, 并促进 IL-10 的分泌。

关键词: 紫草素; 腹腔巨噬细胞; 炎症细胞因子; Toll 样受体 4 信号通路

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.08.006

Anti-inflammatory effects of Shikonin by TLR4/NF- κ B pathway to inhibit LPS-induced macrophage inflammatory

LI Yejing^{1,2}, TAN Yi¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Central Hospital, Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei 445000, China)

Abstract: Objective To study the roles of Shikonin inhibits LPS-induced macrophage inflammatory and anti-inflammatory effect of peritoneal macrophages. Methods The peritoneal macrophages of BALB/c mouse were induced by injection intraperitoneal medium and were stained with F4/80. The groups were divided as follows: DMSO control group, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS control group, LPS + $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Shikonin group, LPS + $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Shikonin group and LPS + $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Shikonin group. The levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 were detected by ELISA and quantitative real-time PCR method. The expressions of TLR 4 and phosphorylation of p65 (pp65) were measured by Western blot. Results After treatment with shikonin, the expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 stimulated by LPS were decreased ($P < 0.05$), while the expression of IL-10 showed the opposite effect ($P < 0.05$). The expression level of TLR4 and pp65 in peritoneal macrophages stimulated with LPS were inhibited by Shikonin. Conclusion The anti-inflammatory mechanism of shikonin might be mediated by TLR4/NF- κ B signaling pathway to inhibit IL-1 β , IL-6 and TNF- α and promote the secretion of IL-10.

Key words: Shikonin; Peritoneal macrophages; Inflammatory cytokine; TLR4 signaling pathway

紫草素, 又称紫草醌或紫草宁 ($\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$), 是多年生草本植物紫草 (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.) 的一种有效的提取成分, 具有广泛的抗炎功效^[1-2]。研究发现, 紫草素能抑制炎症反应, 如在小鼠的急性胰腺炎模型中, 紫草素能抑制炎症细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)

和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 水平^[3]。紫草素能促进巨噬细胞免疫负调控抑制因子白细胞介素-10 (IL-10) 的表达, 对炎症起着调节作用, 影响巨噬细胞的功能等^[4]。紫草素的这些抗炎机制可能与 Toll 样受体 4 (TLR4) 和核因子- κ B (NF- κ B) 的 p65 亚基活化有关^[5-6], 但是具体的抗炎机制还未被研究。本课题以小鼠腹腔诱导的巨噬细胞模型为基础, 研究紫草素对脂多糖 (LPS) 诱导炎症细胞因子

的调控方式,为紫草素抗炎研究进一步提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 左旋紫草素(中国药品生物制品检定所,批号:769-9001),左旋紫草素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110769-200405),以 DMEM 培养基溶解后,配制成所需浓度,并以 0.22 μm 微孔滤膜除菌后待用。BALB/c 小鼠购自武汉大学动物实验中心;LPS 购自 Sigma 公司;DMEM 培养基和小牛血清购自 Hyclone 公司;Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司(批号:15596-026);逆转录相关试剂购自 Takara 公司(批号:RR420A/B);TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 和 IL-6 鼠 ELISA 试剂盒等均购自达科为生物技术有限公司;兔抗鼠 TLR4 多克隆抗体购自 Abcam 公司(批号:SC-30002);p65 磷酸化抗体购自 CST 公司(批号:3033),ECL 化学发光检测试剂盒购自 Pierce(批号:NCI4106);兔抗鼠 β -actin 单抗购自武汉博士德工程有限公司(批号:BM0627);羊抗兔的 IgG 二抗购自武汉博士德工程有限公司(批号:BA1039);APC 标记 F4/80 抗体购于 Bio Legend 公司(批号:BM8)。

1.2 方法

1.2.1 腹腔巨噬细胞的诱导及流式细胞检测 取 5 mL 含 5% 的淀粉培养基注射 BALB/c 小鼠,诱导 5 d 后,打开小鼠腹腔,吸取腹腔巨噬细胞,细胞过滤洗涤后,以 10^6 mL^{-1} 铺 6 孔板,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 5% CO_2 细胞培养箱中诱导 4 h,观察细胞的贴壁情况,并洗去未贴壁的细胞。小心刮取细胞,将培养的巨噬细胞以 1:1 000 稀释比加入 F4/80 进行染色,用 PBS 洗涤 3 次后进行流式细胞仪检测。

1.2.2 ELISA 检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 的分泌情况 培养细胞至对数期,诱导细胞后分为如下 5 个组:(1)DMSO 为溶剂对照组;(2)以 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 为阳性对照组;(3)以 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 预刺激后 2 h,以 0.1、1 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的紫草素处理。将上述各组细胞分别在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱共培养 36 h 后,收集培养的细胞上清液,严格按照说明书进行,最后反应液在 450 nm 波长下测定光密度(OD)值。

1.2.3 qRT-PCR 检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 表达水平 按照上述药物处理细胞后,用 Trizol 法裂解并提取 RNA,并溶于 20 μL 焦碳酸二乙酯(DEPC)水中,经紫外分光光度计测定浓度并调整至相等浓度,用 Takara 反转录试剂盒将总 RNA 通过逆转录反应合成 cDNA,以 β -actin 作为内参基

因,通过实时定量 PCR 检测各组细胞中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-10 的表达,对照组和实验组基因表达的水平按 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行计算,计算方法和各引物序列参见文献[7]。

1.2.4 Western Blot 检测 TLR4 和 NF- κB 水平 用细胞裂解液裂解细胞后加入 SDS 缓冲液,进行 SDS-PAGE 电泳分离,以 200 mA 电流将蛋白转至 PVDF 膜,通过 5% 的脱脂奶粉封闭过夜,分别加入兔抗人 TLR4 多克隆抗体和 β -actin 单抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 1 h, TBST 洗涤 5 次后,以羊抗兔的 IgG 二抗进行杂交, TBST 洗涤 5 次,通过 ECL 显影。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,统计方法采用独立样本 t 检验或单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腹腔巨噬细胞诱导情况 检测腹腔诱导巨噬细胞流式细胞术检测结果显示,与未染色组比较(图 1A),APC 标记的 F4/80 染色巨噬细胞的纯度可达 97.8%。如图 1B。

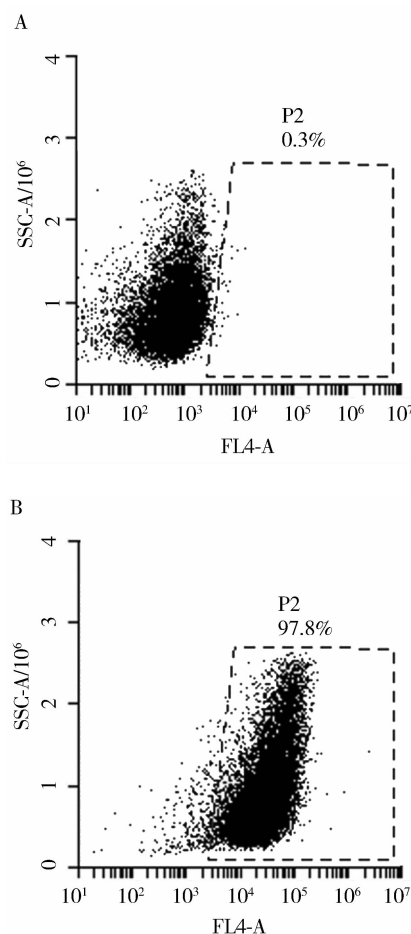


图1 腹腔巨噬细胞诱导与检测

表1 ELISA 测定紫草素处理前后培养上清细胞因子表达水平/(ng · L⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-10
DMSO 对照组	118.82 $\pm$ 3.54	169.57 $\pm$ 7.78	38.95 $\pm$ 2.05	146.01 $\pm$ 4.24
LPS 组	857.87 $\pm$ 68.73	512.53 $\pm$ 37.58	182.45 $\pm$ 15.49	90.51 $\pm$ 4.36
紫草素低剂量组	629.85 $\pm$ 74.18 ^a	428.59 $\pm$ 23.33 ^c	173.35 $\pm$ 14.35	104.53 $\pm$ 6.95
紫草素中剂量组	479.95 $\pm$ 60.46 ^b	352.03 $\pm$ 28.28 ^b	161.95 $\pm$ 11.84 ^c	117.04 $\pm$ 5.73 ^a
紫草素高剂量组	344.80 $\pm$ 24.61 ^b	270.52 $\pm$ 17.68 ^b	137.05 $\pm$ 5.77 ^a	121.05 $\pm$ 8.83 ^a

注:与 LPS 组比较^a $P < 0.01$,^b $P < 0.001$,^c $P < 0.05$ 。

2.2 培养上清炎症因子分泌浓度检测 ELISA 检测结果显示,较 DMSO 对照组,LPS 组中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的产生显著升高,IL-10 的表达降低,均差异有统计学意义($P < 0.05$);较 LPS 组,紫草素处理组中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达下降,IL-10 的表达上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 各组细胞炎症因子 mRNA 表达水平变化

qRT-PCR 检测 LPS 预刺激及紫草素处理后腹腔巨噬细胞 TNF- α (图 2A)、IL-1 β (图 2B)、IL-6(图 2C) 和 IL-10(图 2D) 炎症因子的分泌情况,结果显示,较 DMSO 对照组,LPS 组中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的产生显著升高,IL-10 的表达下降,均差异有统计学意义($P < 0.05$);较 LPS 组,紫草素处理组中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达下降,IL-10 的表达上升,均差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

2.4 各组细胞 TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达水平的变化 LPS 组能显著增加 TLR4 蛋白的表达和 NF- κ B 的 p65 磷酸化水平,紫草素处理组则能抑制由 LPS 介导的 TLR4 表达和 p65 磷酸化水平增加,且均随着紫草素刺激浓度增加,抑制作用越明显。见图 3。

3 讨论

作为一种中草药,紫草素具有较强的抗炎作用,常用于类风湿关节炎(RA)等自身免疫性疾病中,其抗炎机制可能激活 TLR4 分子及其下游的 NF- κ B 和 MAPK 信号通路,增加炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL- β 的表达水平^[8],而紫草素能降低这种机制导致的炎症作用^[9]。有研究表明,在 LPS 导致的大鼠急性肺损伤模型中,预处理紫草素后能抑制 TNF- α 表达和增加 IL-10 表达^[10]。LPS 可通过 TLR4 激活下游的 NF- κ B 等信号通路,促进 TNF- α ,

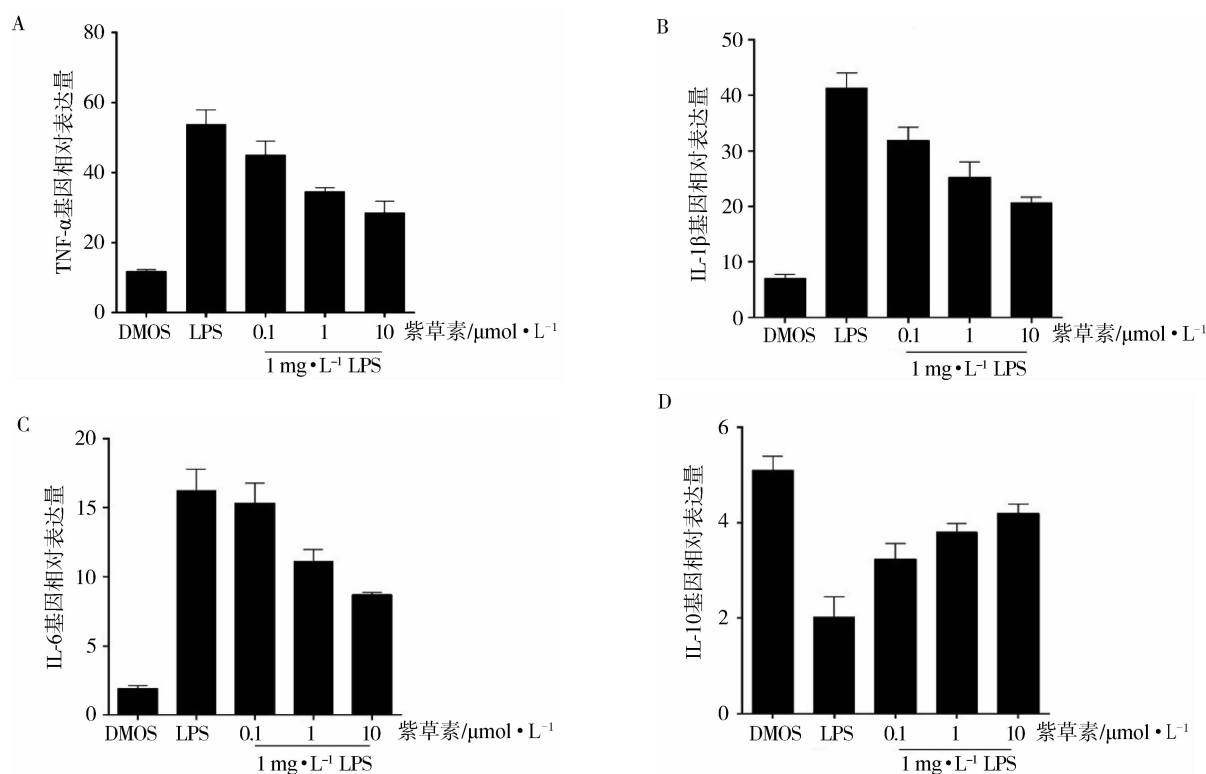


图2 qRT-PCR 检测紫草素处理前后细胞因子的表达

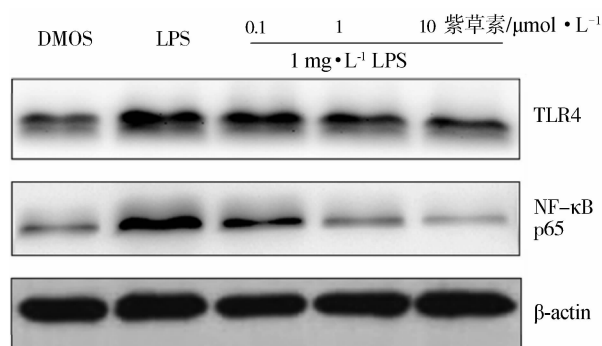


图3 Western blot 检测紫草素处理前后
TLR4 和 NF- κ B 表达变化

IL-1 β 等炎症因子的表达^[11],并且在 RAW264.7 细胞系中,紫草素能抑制由 LPS 诱导的 NF- κ B 的信号通路^[12]。我们对紫草素诱导小鼠腹腔巨噬细胞炎症模型的研究与此一致,紫草素的处理可以抑制由 LPS 刺激细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达,并增加 IL-10 的产生,而这种抑炎效应与 TLR4 信号通路和 NF- κ B 活化有关,这可能为紫草素的抗炎效应提供一种机制。作为一种重要的中药成分,紫草素除了抗炎外,还具有抗肿瘤等功效^[13]。在抗肿瘤作用机制的研究中,紫草素能通过 PI3K/Akt 信号通路机制,促进多种癌细胞的凋亡^[14-16],紫草素的抗炎和抗肿瘤机制是否有 PI3K/Akt 信号通路的参与还有待验证,总之这些研究可以为紫草素抗炎和抗肿瘤效应提供一些理论依据。

参考文献

- [1] 韩廷廷,闫冬,徐佳. 浅谈近年来紫草素的药理学性质发展[J]. 生物技术世界,2015(12):179.
- [2] 徐佳,伍春莲. 紫草素药理作用研究进展[J]. 药物生物技术,2015,22(1):87-90.
- [3] XIONG J, NI J, HU G, et al. Shikonin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 145(2): 573-580.
- [4] YUAN DP, GU L, LONG J, et al. Shikonin reduces endometriosis by inhibiting RANTES secretion and mononuclear macrophage chemotaxis[J]. Exp Ther Med, 2014, 7(3): 685-690.
- [5] WANG L, LI Z, ZHANG X, et al. Protective effect of shikonin in experimental ischemic stroke: attenuated TLR4, p-p38MAPK, NF- κ B, TNF- α and MMP-9 expression, up-regulated claudin-5 expression, ameliorated BBB permeability[J]. Neurochem Res, 2014, 39(1): 97-106.
- [6] YANG Y, WANG J, YANG Q, et al. Shikonin inhibits the lipopolysaccharide-induced release of HMGB1 in RAW264.7 cells via IFN and NF- κ B signaling pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 19(1): 81-87.
- [7] GHOSH S, HOWE N, VOLK K, et al. Candida albicans cell wall components and farnesol stimulate the expression of both inflammatory and regulatory cytokines in the murine RAW264.7 macrophage cell line[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010, 60(1): 63-73.
- [8] 王圆圆,姚茹冰,蔡辉. TLR2、TLR4 与类风湿关节炎[J]. 安徽医药, 2015, 19(6): 1021-1024.
- [9] 张永红,于慧敏,聂英坤. 紫草素对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞 COX-2 表达的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2012, 46(3): 261-265.
- [10] 杨慧,杨莉. 紫草素对脂多糖致新生大鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 江苏医药, 2014, 40(10): 1127-1129, 前插 1.
- [11] PALSSON-MCDERMOTT EM, O'NEILL LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4[J]. Immunology, 2004, 113(2): 153-162.
- [12] CHENG YW, CHANG CY, LIN KL, et al. Shikonin derivatives inhibited LPS-induced NOS in RAW 264.7 cells via downregulation of MAPK/NF-kappaB signaling[J]. J Ethnopharmacol, 2008, 120(2): 264-271.
- [13] GUPTA B, CHAKRABORTY S, SAHA S, et al. Antinociceptive properties of shikonin: in vitro and in vivo studies[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016, 94(7): 788-796.
- [14] 陈菊英,刘朝纯,曾智,等. 紫草素通过 PI3K/Akt 通路促进人乳腺癌 MCF-7 细胞自噬[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(2): 194-198.
- [15] 余思云,黄彩梅,胡国华. 紫草素通过 PI3K/Akt 信号通路诱导子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡[J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(12): 1303-1306.
- [16] ZHANG FY, HU Y, QUE ZY, et al. Shikonin Inhibits the Migration and Invasion of Human Glioblastoma Cells by Targeting Phosphorylated β -Catenin and Phosphorylated PI3K/Akt: A Potential Mechanism for the Anti-Glioma Efficacy of a Traditional Chinese Herbal Medicine[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(10): 23823-23848.

(收稿日期:2016-09-05;修回日期:2016-10-14)