

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)10-1012-03

栀子苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 TLR4-NF- κ B 通路的影响

黄丽华^{1,2}, 王纯洁^{1*}, 纳仁高娃¹, 敖日格乐¹(¹内蒙古农业大学兽医学院, 内蒙古 呼和浩特 010010; ²包头医学院基础医学院, 内蒙古 包头 014060)

[摘要] 目的 研究栀子苷对脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中 Toll 样受体 4 (TLR4) 表达和 NF- κ B 活性以及前炎症细胞因子(TNF- α 、IL-1 和 IL-6)释放的影响, 以探讨栀子苷抗炎免疫的分子机制。方法 LPS 处理 RAW264.7 巨噬细胞系建立炎症细胞模型。细胞分为正常对照组、实验对照组(LPS 组)和实验组(LPS 联合栀子苷处理组)。CCK-8 方法检测细胞增殖情况; ELISA 检测培养细胞上清 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 的表达; 实时定量 PCR 检测 TLR4 和 P65 的表达; Western blot 法检测 P65、磷酸化的 P65(p-P65)、p-NF- κ B 和 TLR4 蛋白表达。结果 栀子苷对细胞增殖无影响; 栀子苷能下调 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 的表达及抑制 TLR4 表达和 NF- κ B 的活化。结论 栀子苷通过 TLR4-NF- κ B 信号转导通路抑制 NF- κ B 的活化进而控制细胞炎症因子释放而发挥抗炎免疫作用。

[关键词] 栀子苷; Toll 样受体 4; NF- κ B

[中图分类号] R392.11, R446.61, R285.5 **[文献标志码]** A

Effect of geniposide on LPS-induced activation of TLR4-NF- κ B pathway in RAW264.7 macrophage cell line

HUANG Lihua^{1,2}, WANG Chunjie^{1*}, NAREN Gaowa¹, AORI Gele¹

¹College of Veterinarian, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot (Huhehaote) 010010; ²Department of Basic Medicine, Baotou Medical College, Baotou 014060, China

[Abstract] **Objective** To study the anti-inflammatory mechanism of geniposide and observe the effect of geniposide on the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4), the activity of NF- κ B, and the release of pro-inflammatory cytokines-TNF- α , IL-1, and IL-6 in the RAW264.7 macrophages treated with lipopolysaccharide (LPS). **Methods** There were three experimental groups, including the control group, LPS group and LPS combined with geniposide group in this study. RAW264.7 macrophage cells were treated with LPS to induce cellular inflammation. Cell proliferation was measured by CCK-8. The concentrations of TNF- α , IL-1, and IL-6 in cell culture media were measured by ELISA. mRNA levels of TLR4 and P65 were examined by real-time PCR. The protein levels of p-I κ B, P65, p-P65 and TLR4 were detected by Western blotting. **Results** Geniposide had no effect on cell proliferation. However, geniposide down-regulated the expression of TNF- α , IL-1, and IL-6, and also inhibited the expression of TLR4 and the activity of NF- κ B. **Conclusion** Geniposide exerts its anti-inflammatory effect through inhibiting the activity of NF- κ B in the TLR4-NF- κ B pathway in macrophages.

[Key words] geniposide; TLR4; NF- κ B

天然免疫不同于获得性免疫, 其主要是机体在长期接触各种病原体的进化过程中获得的, 革兰氏阴性菌是主要致病原之一, 革兰氏阴性菌释放的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)进入机体后, 引起 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 的低聚而活化^[1], 将胞外的刺激导入细胞内, 随后激活下游通道中的蛋白, 活化核因子- κ B (nuclear factor-kappa B,

NF- κ B), 转录激活子蛋白-1 (activator protein 1, AP-1) 等, 促进肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、IL-6 及 IL-8 等炎症因子的合成表达, 引起机体损伤。栀子苷(geniposide)是栀子中一种主要的环烯醚萜苷类, 具有抗炎、解热、利胆和轻泻等作用^[2-3]。有研究发现栀子苷对二甲苯所致小鼠耳廓及角叉菜胶所致大

收稿日期: 2013-04-17; 接受日期: 2013-05-21

基金项目: 国家自然科学基金(31260590)

作者简介: 黄丽华(1976-), 女, 内蒙古包头人, 讲师, 在读博士

Tel: 13848924866; E-mail: huanglihua858@163.com

*Corresponding author, 王纯洁, E-mail: chunjiewang200@sohu.com

鼠足跖炎症均有不同程度的抑制作用,但其分子机制尚不清楚^[4-5]。本实验通过检测栀子苷对LPS诱导RAW264.7巨噬细胞分泌炎症细胞因子为靶点,观察TLR4的表达和NF- κ B活化,探讨栀子苷抗炎免疫可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 小鼠巨噬细胞株RAW264.7细胞购于中国科学院上海细胞库。DMEM培养基、TRIzol、胎牛血清为Gibco公司产品。栀子苷(批号110749)购自中国药品生物制品检定所;96孔板、细胞培养皿为Corning公司产品;一次性滤器、胰蛋白酶、LPS、MTT为Sigma公司产品,TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的ELISA试剂盒为R&D公司产品,RT-PCR试剂盒为Promega公司产品。兔抗NF- κ B抗体、兔抗p-I κ Ba抗体、兔抗P65、p-P65抗体、兔抗p-I κ Ba抗体和兔抗TLR4抗体购自Santa Cruz公司;超净工作台为苏州智净净化设备有限公司产品,CO₂培养箱和-70℃低温冰箱为Thermo公司产品,实时定量PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)试剂为Invitrogen公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含100 mL/L的胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM培养基于37℃、50 mL/L CO₂饱和度培养箱内培养。传3~5代,待状态稳定后移至96孔培养板上,分组实验。

1.2.2 CCK-8方法检测不同浓度、不同时间栀子苷单品对RAW264.7细胞增殖能力的影响 RAW264.7细胞按 1×10^5 接种于96孔板中,培养体系体积控制在100 μ L。每孔设置5个平行孔。实验分为5组:正常细胞对照组,栀子苷药物组(栀子苷终浓度分别为5 mmol/L、10 mmol/L和20 mmol/L)和本底对照组,每组设5个复孔。以上细胞分别孵育6、12、24、48 h,然后每孔加入10 μ L的CCK-8溶液,在培养箱内孵育1 h,把96孔板置于摇床上摇动1 min,以充分混匀待检测体系。在450 nm处测量吸光度(A)值。细胞增殖率=(A_{受试孔} - A_{本底对照})/(A_{对照细胞} - A_{本底对照}) \times 100%。

1.2.3 ELISA检测栀子苷对LPS诱导RAW264.7细胞释放IL-1、IL-6、TNF- α 的影响 实验分为正常细胞组、炎症模型组、栀子苷药物组、NF- κ B抑制剂吡咯烷二硫代甲酸(pyrrolidinedithiocarbamic acid, PDTC)组、阳性对照组(地塞米松)。RAW264.7细胞按 1×10^5 孔接种于96孔板中,每组设5个复孔,贴壁4 h后,依照ELISA试剂盒的说明书进行操作。

1.2.4 实时定量PCR检测栀子苷单品对P65 mRNA和TLR4 mRNA表达的影响 实验分组同上。用TRIzol依照RNA的提取步骤提取细胞中的总RNA,然后反转录合成cDNA,依此为模板利用PCR方法进行扩增,使用 β -actin作为内参。依照实时定量PCR试剂盒的说明书进行操作。P65-F: 5'-gcagaaagaagacattgagg-3'; P65-R: 5'-tcactctgtctggcaagta-3'; TLR4-F: 5'-acctctgccttcaactacaga-3'; TLR4-R: 5'-agggaactctcaac-

tctc-3'。使用ABI的96孔板,每孔依次加入cDNA 1 μ L, 2 \times mix 25 μ L, 3'和5'端引物(10 μ mol/L)各1 μ L, 无菌水19 μ L,在ABI 7900 real-time PCR反应仪上反应,每个样本设5个复孔。反应参数:95℃预变性5 min,再进行95℃,20 s; 61℃,20 s; 72℃,20 s(40循环),最后72℃延伸5 min停止反应。qRT-PCR实验中样本基因的Ct值通过GAPDH的Ct值均一化,即 Δ Ct = Ct_{样本} - Ct_{内参},而样本基因mRNA相对丰度值以 $\Delta\Delta$ Ct值表示, $\Delta\Delta$ CT = $2^{-\Delta\Delta$ Ct}。

1.2.5 Western blot法检测栀子苷单品对P65、p-P65、p-I κ Ba和TLR4的影响 实验分组同上。BCA法进行细胞总蛋白定量,从各组样品中分别取50 μ g的总蛋白上样,用100 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。将蛋白电转到硝酸纤维素膜上,用50 g/L脱脂奶粉封闭1 h,分别加1:1 000稀释的兔源性抗体(P65、p-P65、p-I κ Ba、TLR4、 β -actin),4℃过夜;TBST洗膜,用1:5 000稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG孵育,TBST洗膜;用ECL化学发光试剂在X线胶片上曝光、显影、定影。以 β -actin为内参,应用凝胶成像分析系统进行条带扫描分析结果,结果以蛋白条带的面积积分值与 β -actin的面积积分值比值表示。

1.2.6 统计学分析 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS统计软件15.0进行分析。各组间数据的比较,先做方差齐性检验,方差齐时用One-way ANOVA法,两两比较用LSD分析;方差不齐时用Kruskal-Wallis H检验分析,两两比较用Nemenyi法检验(手工计算)。P < 0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对RAW264.7细胞增殖能力检测 (5、10、20)mmol/L终浓度的栀子苷分别与细胞孵育6、12、24、48 h,对静息态的RAW264.7细胞无影响,表明栀子苷对RAW264.7细胞无细胞毒性作用。为避免实验系统误差,选取20 mmol/L栀子苷用于后续实验的研究。

表1 栀子苷对RAW264.7细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h
正常细胞对照组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
栀子苷5 mmol/L	1.01 \pm 4.13	1.01 \pm 1.74	0.97 \pm 1.05	0.94 \pm 2.50	0.98 \pm 3.88
栀子苷10 mmol/L	1.04 \pm 3.45	1.00 \pm 3.72	0.92 \pm 2.45	0.91 \pm 0.47	0.92 \pm 3.36
栀子苷20 mmol/L	0.99 \pm 2.93	0.98 \pm 2.68	0.89 \pm 1.14	0.88 \pm 1.83	0.84 \pm 3.91

2.2 对RAW264.7细胞IL-1、IL-6、TNF- α 分泌的影响 在LPS刺激条件下,IL-1、IL-6、TNF- α 表达水平均表现为上调,表明在刺激剂的作用下能够增加巨噬细胞炎症因子的表达,证明巨噬细胞炎症模型构建成功。经过栀子苷药物处理后,IL-1、IL-6、TNF- α 蛋白表达明显降低,同时PDTC和地塞米松组IL-1、IL-6、TNF- α 的表达也降低,并且与LPS组比较有统计学意义(表2)。

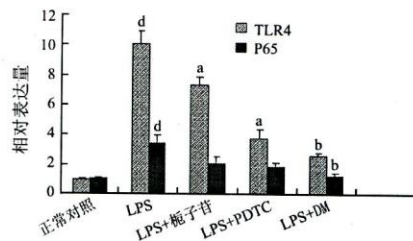
2.3 对P65和TLR4 mRNA表达的影响 NF- κ B是三聚体复合物,大量资料表明P65是NF- κ B的转

录活性形式^[9],因此选取 P65 和 TLR4 检测栀子苷是否在转录水平激活 TLR4-NF- κ B 信号通路。PDTC 为 NF- κ B 的抑制剂,地塞米松通过抑制 NF- κ B 发挥抗炎作用。实验结果表明给予 LPS 刺激后,P65 和 TLR4 mRNA 表达明显升高,PDTC、地塞米松和栀子苷作用于细胞后,不同程度下调 P65 和 TLR4 mRNA 表达,且与 LPS 组比较都有统计学意义(图 1)。

表 2 栀子苷对 RAW264.7 细胞 IL-1、IL-6、TNF- α 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
正常细胞对照组	37.96 \pm 1.39	44.24 \pm 2.07	86.32 \pm 1.56
LPS	525.12 \pm 12.75	598.56 \pm 23.63	784.21 \pm 42.93
LPS+栀子苷	354.80 \pm 11.08 ^a	379.77 \pm 13.70	612.56 \pm 17.29
LPS+PDTC	289.02 \pm 9.73 ^b	292.02 \pm 12.57	387.45 \pm 25.67
LPS+地塞米松	172.59 \pm 7.65 ^b	163.16 \pm 6.31	90.34 \pm 2.79

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs LPS.



^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs LPS 组; ^d $P < 0.01$ vs 正常对照组。

图 1 栀子苷对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的影响

2.4 对 p-I κ B α 、P65、p-P65 和 TLR4 蛋白表达的影响 P65 是 NF- κ B 解离后在细胞质中存在的形式,磷酸化后的 P65 (p-P65) 其分子构象发生改变,促进与特定的蛋白结合后,从而完成 P65 的激活。Western blot 法检测结果 LPS 组的 P65 和 p-P65 表达明显增加,栀子苷作用于细胞后 P65 和 p-P65 明显降低,与 PDTC 和地塞米松有相同的趋势。核因子 κ B 抑制剂 (inhibitor of NF- κ B, I κ B) 磷酸化后与 NF- κ B 解离,使 NF- κ B 具有转录活性。LPS 组的 p-I κ B 表达上调,栀子苷、PDTC 和地塞米松都能够降低 p-I κ B 蛋白表达从而抑制 NF- κ B 的活化(图 2)。



1: 正常对照; 2: LPS; 3: 栀子苷; 4: PDTC; 5: 地塞米松。

图 2 栀子苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 p-I κ B、P65、p-P65 和 TLR4 蛋白表达的影响

3 讨论

栀子苷具有广泛的药理作用,除了抗氧化、抗肿瘤、降血糖、保肝利胆作用外,近年来国内外学者研究发现栀子苷还具有抗炎^[6]和调节免疫反应的作用^[7]。本研究结果显示栀子苷能抑制促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 分泌,说明栀子苷对 LPS 致炎症反应有一定的保护作用。此外,已有大量的研究表明,地塞米松对 LPS 致急性肺损伤有明显的保护作用,且其作用机制已被阐明^[8]。提示借鉴这一经典糖皮质激素类抗炎药的研究过程,进而对中国传统中草药的单体进行研究,探究其具体的作用机制。因此,本试验采用地塞米松作为标准阳性对照药物,结果显示地塞米松和栀子苷对 LPS 诱导的炎症反应的保护效果相当,并且与以往的研究具有一定的一致性^[9]。

以 TLR4 为靶位,抑制或激活 TLR4 表达或调控 TLR4 信号通路,不仅是炎症疾病新的治疗策略,而且还可作为药物设计和疫苗研制的新靶点^[10]。广泛存在于革兰氏阴性菌表面的 LPS 可以通过 TLR4 激活下游 NF- κ B 信号通路^[11]。本实验通过 Western blot 法和实时定量 PCR 分析 TLR4-NF- κ B 通路中两个经典蛋白 TLR4-表达和 NF- κ B 活化程度。结果表明 LPS 诱导细胞后,I κ B 磷酸化水平明显增加,栀子苷能使 I κ B 磷酸化水平显著降低,PDTC 作为 NF- κ B 的抑制剂,栀子苷的结果与其一致。说明栀子苷能够阻止 I κ B 降解。如果栀子苷能够阻止 I κ B 降解,应该可以阻止 NF- κ B 激活,为了验证这点分别从蛋白和基因水平检测 P65 和 p-P65 的表达,实验结果表明栀子苷降低 P65 mRNA 和蛋白表达,抑制 P65 发生磷酸化作用而活化,从而阻断了 NF- κ B 信号转导通路激活。此外,还发现栀子苷能够显著降低 TLR4 mRNA 和蛋白表达,进一步证实栀子苷通过 TLR4-NF- κ B 通路发挥抗炎免疫作用。王丽莎等^[12]和候金才等^[13]分别从动物水平和细胞水平报道了栀子苷通过抑制 TLR4-NF- κ B 信号转导通路发挥对机体的保护作用,本实验结果与其报道相符。

综上所述,栀子苷通过抑制 TLR4-NF- κ B 通路信号转导影响 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 释放,而有效的保护 LPS 所致的机体损伤发挥抗炎免疫作用,为栀子苷在临床上进一步的应用提供了理论依据。但是,本研究只是从细胞水平观察了天然免疫中重要的膜识别受体 TLR4 表达和 NF- κ B 的活化,要进一步明确栀子苷抗炎免疫的机制,还需进行广泛深入的研究。

(下转 1019 页)

参考文献:

- [1] Lee HJ, Jung J, Cho KJ, et al. Comparison of *in vitro* hepatogenic differentiation potential between various placenta-derived stem cells and other adult stem cells as an alternative source of functional hepatocytes[J]. *Differentiation*, 2012, 84(3): 223-231.
- [2] Klein D, Misawa R, Bravo-Egana V, et al. MicroRNA expression in alpha and beta cells of human pancreatic islets[J/OA]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55064.
- [3] Tzur G, Levy A, Meiri E, et al. MicroRNA expression patterns and function in endodermal differentiation of human embryonic stem cells [J/OA]. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3726.
- [4] Ninov N, Borius M, Stainier DY. Different levels of Notch signaling regulate quiescence, renewal and differentiation in pancreatic endocrine progenitors[J]. *Development*, 2012, 139(9): 1557-1567.
- [5] 朱永朝, 马海滨, 刘婷, 等. 干扰素- γ 对人胎盘胎儿来源间充质干细胞免疫调节功能的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(10): 1058-1061.
- [6] 刘婷, 王立斌, 马晓娜, 等. 体外分步诱导人母体来源胎盘间充质细胞分化为胰岛素分泌细胞[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(26): 3208-3212.
- [7] Martinez-Ceballos E, Chambon P, Gudas LJ. Differences in gene expression between wild type and Hoxa1 knockout embryonic stem cells after retinoic acid treatment or leukemia inhibitory factor (LIF) removal[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(16): 16484-16498.
- [8] Makki N, Capecchi MR. Identification of novel Hoxa1 downstream targets regulating hindbrain, neural crest and inner ear development [J]. *Dev Biol*, 2011, 357(2): 295-304.
- [9] Zarif MN, Soleimani M, Abolghasemi H, et al. Megakaryocytic differentiation of CD133⁺ hematopoietic stem cells by down-regulation of microRNA-10a[J]. *Hematology*, 2013, 18(2): 93-100.
- [10] Trakooljul N, Hicks JA, Liu HC. Characterization of miR-10a mediated gene regulation in avian splenocytes [J]. *Gene*, 2012, 500(1): 107-114.
- [11] Ohuchida K, Mizumoto K, Lin C, et al. MicroRNA-10a is overexpressed in human pancreatic cancer and involved in its invasiveness partially *via* suppression of the HOXA1 gene [J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(7): 2394-2402.
- [12] Marappagounder D, Somasundaram I, Dorairaj S, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and subcutaneous adipose tissue into pancreatic islet-like clusters *in vitro* [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2013, 18(1): 75-88.
- [13] Li J, Zhu L, Qu X, et al. Stepwise differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells toward definitive endoderm and pancreatic progenitor cells by mimicking pancreatic development *in vivo* [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(10): 1576-1587.
- [14] Lee J, Kim SC, Kim SJ, et al. Differentiation of human adipose tissue-derived stem cells into aggregate of insulin-producing cells through overexpression of pancreatic and duodenal homeobox gene-1 [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(6): 1053-1060.
- [15] Sui L, Bouwens L, Mfopou JK. Signaling pathways during maintenance and definitive endoderm differentiation of embryonic stem cells [J]. *Int J Dev Biol*, 2013, 57(1): 1-12.

(上接 1014 页)

参考文献:

- [1] Park BS, Song DH, Kim HM, et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex [J]. *Nature*, 2009, 458(7242): 1191-1195.
- [2] Koo HJ, Lim KH, Jung HJ, et al. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 103(3): 496-500.
- [3] Lee P, Lee J, Choi SY, et al. Geniposide from gardenia jasminoides attenuates neuronal cell death in oxygen and glucose deprivation-exposed rat hippocampal slice culture [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(1): 174-176.
- [4] 程合理, 赵新明. 栀子苷的抗炎作用实验研究 [J]. *安徽医药*, 2004, 8(3): 167-168.
- [5] 刘源才, 张庆华, 林英, 等. 栀子苷镇痛和抗炎作用的研究 [J]. *时珍国药*, 2008, 19(6): 1374-1375.
- [6] Mase A, Makino B, Tsuchiya N. Active ingredients of traditional Japanese (kampo) medicine, inchinkoto, in murine concanavalin A-induced hepatitis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(3): 742-749.
- [7] 盛喜霞, 李涛, 刘继平, 等. 黄连解毒汤不同提取部位及相关单体对小鼠脾淋巴细胞增殖作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(1): 19-22.
- [8] 林季, 王广发, 汤秀英, 等. 地塞米松对内毒素致急性肺损伤大鼠肺的保护作用 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2006, 38(4): 393-396.
- [9] 李敏, 王斌, 唐至书, 等. 黄芩苷、栀子苷对大鼠脑缺血保护作用机制 [J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(3): 34-36.
- [10] 王平忠, 白雪帆, 黄长形, 等. Toll 样受体介导的抗病毒天然免疫 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(5): 539-541.
- [11] Ianaro A, Tersigni M, D'Acquisto F. New insight in LPS antagonist [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2009, 9(3): 306-317.
- [12] 王丽莎, 梅姝. 栀子苷对小鼠急性肺损伤保护机制的研究 [J]. *中国农学通报*, 2012, 28(23): 26-31.
- [13] 侯金才, 张鹏, 刘建勋, 等. 栀子苷对缺氧/复氧小胶质细胞 TLR4 通路的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(6): 769-773.
- [14] Kim TH, Yoon SJ, Lee SM. Genipin attenuates sepsis by inhibiting Toll-like receptor signaling [J]. *Mol Med*, 2012, 18: 455-465.