

芹菜素逆转白介素 6 诱导的中性粒细胞凋亡延迟

韩露¹, 陈子¹, 柏芳芳¹, 王楠¹, 王曦¹, 李涛¹, 胡蓉¹, 黄茂¹, 张前德², 周林福^{1,2,3*}

(¹南京医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学中西医结合研究所, 江苏 南京 210029; ³南京医科大学附属江苏盛泽医院呼吸内科, 江苏 苏州 215228)

[摘要] 目的: 观察芹菜素对炎症因子白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)刺激的中性粒细胞(neutrophils, Neu)凋亡的影响, 并探讨可能的分子机制。方法: 采取健康志愿者外周静脉血, 分离纯化 Neu, 随机分为对照组、芹菜素组、IL-6 组、IL-6+芹菜素组及加入广谱天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)抑制剂的 Q-VD-Oph+IL-6+芹菜素组、z-VAD-fmk+IL-6+芹菜素组。流式细胞术观察 Neu 凋亡率, Western blot 检测 Neu 活化的 caspase-3(cleaved caspase-3)的表达情况。结果: 与对照组比较, 芹菜素促进 Neu 凋亡($P<0.05$), IL-6 抑制 Neu 凋亡($P<0.05$); 两者共孵育时, 芹菜素可以部分逆转 IL-6 诱导的 Neu 凋亡延迟($P<0.05$); 与 IL-6 组比较, 芹菜素与 IL-6 共孵育组 cleaved caspase-3 的蛋白表达水平显著增高($P<0.05$), 而且芹菜素对 caspase-3 的活化作用和对 IL-6 诱导的 Neu 凋亡延迟的逆转作用可以被 caspase 抑制剂消除($P<0.05$)。结论: 芹菜素可能通过 caspase 途径逆转 IL-6 诱导的 Neu 凋亡延迟, 为今后治疗 Neu 炎症性气道疾病提供了新思路。

[关键词] 芹菜素; 中性粒细胞; 凋亡; 白细胞介素 6

[中图分类号] R329.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)04-399-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20170403

Inhibitory effects of apigenin on IL-6-induced delayed apoptosis in neutrophils

Han Lu¹, Chen Zi¹, Bai Fangfang¹, Wang Nan¹, Wang Xi¹, Li Tao¹, Hu Rong¹, Huang Mao¹, Zhang Qiande², Zhou Linfu^{1,2,3*}

(¹Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital, NJMU, Nanjing 210029; ²Institute of Integrative Medicine, NJMU, Nanjing 210029; ³Department of Respiratory Medicine, Jiangsu Shengze Hospital, NJMU, Suzhou 215228, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of apigenin on interleukin 6 (IL-6)-induced delay in neutrophil apoptosis and its underlying mechanisms. **Methods:** Neutrophils (Neu) isolated from healthy volunteers were randomly divided into the control group, apigenin group, IL-6 group, IL-6+apigenin group, QVD+IL-6+apigenin group, and z-VAD+IL-6+apigenin group. Neu apoptosis was detected by flow cytometry. The protein expression of cleaved caspase-3 was determined by Western blotting analysis. **Results:** Compared with the control group, apigenin significantly induced Neu apoptosis ($P<0.05$), and IL-6 significantly inhibited Neu apoptosis ($P<0.05$). Apigenin partially reversed the anti-apoptotic effect of IL-6 on Neu ($P<0.05$). Compared with the IL-6 group, cleaved caspase-3 expression was significantly increased in the IL-6+apigenin group. Moreover, caspase inhibitors QVD-Oph and z-VAD reduced the levels of cleaved caspase-3 and abolished the ability of apigenin to counteract IL-6-induced delay in Neu apoptosis. **Conclusion:** Apigenin overrides IL-6-induced delayed apoptosis of Neu in a caspase-dependent manner, which provides a promising target for future therapy of neutrophilic inflammatory airway disorders.

[Key words] apigenin; neutrophils; apoptosis; interleukin 6

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(04): 399-402]

[基金项目] 国家自然科学基金(81670029, 81370133, 81170018); 江苏省临床医学科技专项(BL2012012); 江苏省社会发展重点研发专项(BE2015651); 江苏省卫生计生委预防医学科研课题(Y2015026); 江苏省中医药科技项目(YB2015110); 苏州市科技计划项目(SYS201402)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lfzhou@njmu.edu.cn

中性粒细胞(neutrophils, Neu)是运动活泼、吞噬积极、胞质内富含毒性颗粒的炎症细胞,在机体非特异性免疫防御中起重要作用。Neu是一把“双刃剑”,可通过释放细胞毒性物质杀伤外侵的病原微生物,发挥其防御功能,但是该过程缺乏特异性,当防御过强时也可造成自身组织损伤^[1]。显然,Neu在炎症的发生、发展和转归过程中起着关键作用。Neu是血细胞中寿命最短的终末分化细胞,其凋亡是有序的细胞死亡过程,是避免炎症反应扩大化、减少自身组织损伤的最佳方式,是调控炎症反应的主要机制之一^[2-3]。Neu凋亡平衡的失调在一定程度上促进中性粒细胞炎症性气道疾病的发生发展,如急性肺损伤(ALI)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、重症哮喘、阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(OSAS)、肺结核^[4-8]等。芹菜素是一种常见的黄酮类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗癌等药理特性。体外研究发现,芹菜素可促进Neu凋亡^[9]。本文将探讨在白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)存在的情况下,芹菜素对Neu自发性凋亡进程的影响,并且探究可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

Ficoll淋巴细胞分离液(GE公司,美国);RPMI1640、胎牛血清(FBS)(Gibco公司,美国);芹菜素和二甲基亚砜(DMSO)(Sigma公司,美国);IL-6(Peprotech公司,美国);FITC-Annexin V凋亡检测试剂盒(BD公司,美国),兔抗cleaved caspase-3抗体(Cell Signaling公司,美国); β -actin抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(Bioworld公司,美国);QVD-Oph(R&D公司,美国);z-VAD-fmk(Bachem公司,瑞士)。

1.2 方法

1.2.1 中性粒细胞的分离

参照文献^[10]分离中性粒细胞。肝素化静脉血先以生理盐水1:1稀释,稀释的静脉血与淋巴细胞分离液以2:1的比例共同分层置于试管中,离心后,弃除血浆层、单个核细胞层、分离液层,获得中性粒细胞和残存的红细胞。加入相当于沉积的细胞团块9倍体积的4℃氯化铵溶液(NH_4Cl 154 mmol/L, KHCO_3 10 mmol/L, EDTA 0.1 mmol/L),混匀,4℃静置10 min,这一过程可溶解残存的红细胞,1 500 r/min离心5 min,弃上清,重复红细胞裂解过程。生理盐水洗1次细胞,用台盼兰拒染试验、怀特-姬姆萨混合染色法鉴定Neu的活性与纯度,两者均大于96%

的细胞方可使用。

1.2.2 中性粒细胞的孵育

RPMI1640(含5%FBS, 0.2 mmol/L谷氨酰胺, 25 U/mL青霉素, 25 g/mL链霉素)悬浮Neu,调整细胞数为 1×10^7 个/mL,置于37℃、5% CO_2 培养箱中孵育。实验孔分为对照组、芹菜素(50 $\mu\text{mol/L}$)组、IL-6(100 $\mu\text{g/L}$)组、芹菜素(50 $\mu\text{mol/L}$)+IL-6(100 $\mu\text{g/L}$)组、caspase抑制剂QVD-Oph(20 $\mu\text{mol/L}$)或z-VAD-fmk(40 $\mu\text{mol/L}$)+芹菜素(50 $\mu\text{mol/L}$)+IL-6(100 $\mu\text{g/L}$)组。各组孵育12 h后,检测Neu凋亡率,或用于Western blot检测蛋白表达。

1.2.3 Neu凋亡率

收集细胞,用PBS清洗两次,将细胞重悬于缓冲液(10 mmol/L HEPES/NaOH(pH7.4), 140 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L CaCl_2),调整浓度为 $(0.1 \sim 1.0) \times 10^6$ 个/mL。依次加入Annexin V-FITC染色液(20 $\mu\text{g/mL}$)及PI染色液(25 $\mu\text{g/mL}$),避光室温静置15 min,应用流式细胞仪(BD公司,美国)检测细胞凋亡,实验重复6次。

1.2.4 Western blot

收集细胞,PBS清洗2次,加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,于冰上裂解30 min,4℃、14 000 r/min高速离心20 min。吸取上清,加入蛋白上样缓冲液,100℃水浴锅中煮沸5 min。蛋白上样量为10 μL , 12%SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,300 mA湿转,将蛋白转移至PVDF膜(Millipore公司,美国)。5%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭1 h,再分别加入cleaved caspase-3抗体(1:1 000),GAPDH抗体(1:5 000),4℃孵育过夜。TBST洗膜3次,每次15 min。加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:10 000),室温孵育1 h。TBST洗膜3次,每次15 min。曝光成像,应用ImageJ软件分析。

1.3 统计学方法

采用SPSS20.0软件进行分析,数据以均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)表示,采用单因素方差分析,组间两两比较用LSD检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芹菜素逆转IL-6诱导的Neu凋亡延迟

IL-6和芹菜素对Neu凋亡率的影响见图1。与对照组比较,IL-6显著抑制Neu凋亡 $[(24.88 \pm 3.57)\% \text{ vs. } (36.38 \pm 3.41)\%, P < 0.05]$,芹菜素显著促进Neu凋亡 $[(58.07 \pm 6.41)\% \text{ vs. } (36.38 \pm 3.41)\%, P < 0.05]$,而且芹菜素可抑制IL-6诱导的Neu凋亡延

迟 [(53.10±5.76)% vs. (24.88±3.57)%, $P<0.05$]。

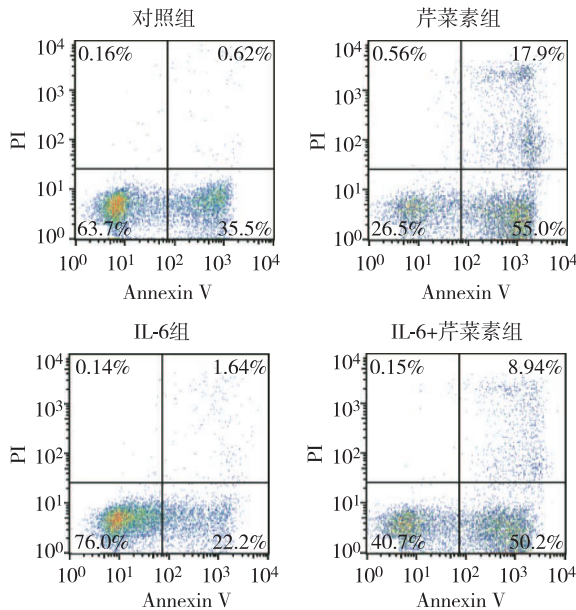


图 1 芹菜素和 IL-6 对中性粒细胞凋亡率的影响

Figure 1 Effects of apigenin and IL-6 on neutrophil apoptosis

2.2 芹菜素通过 caspase 途径逆转 IL-6 诱导的 Neu 凋亡延迟

2.2.1 芹菜素和 IL-6 对 cleaved caspase-3 表达量的影响

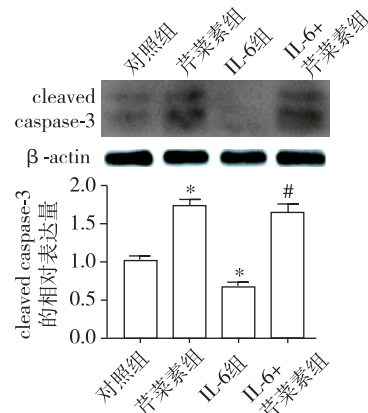
Western blot 分析显示,与对照组比较,芹菜素组和 IL-6 组 cleaved caspase-3 的表达水平分别显著升高 ($P<0.05$) 和降低 ($P<0.05$),同时芹菜素+IL-6 组 cleaved caspase-3 的表达水平较 IL-6 组显著升高 ($P<0.05$, 图 2)。这表明 IL-6 抑制 Neu 凋亡与抑制 caspase-3 活化有关,而芹菜素促进 Neu 凋亡,进而逆转 IL-6 对 Neu 凋亡的抑制作用与促进 caspase-3 活化有关。

2.2.2 caspase 抑制剂对 cleaved caspase-3 表达量的影响

如图 3 所示,与 IL-6 组相比,IL-6+芹菜素组 cleaved caspase-3 的表达水平显著升高 ($P<0.05$)。但是,在加入有效的广谱 caspase 抑制剂 QVD-OPh 或 z-VAD-fmk 后,cleaved caspase-3 的表达水平较 IL-6+芹菜素组显著降低 ($P<0.05$)。这表明 caspase 抑制剂可以抑制 caspase-3 的激活,从而可能消除芹菜素逆转 IL-6 诱导的 Neu 凋亡受抑作用。

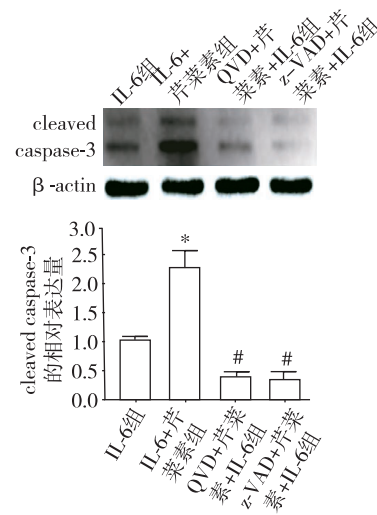
2.2.3 caspase 抑制剂对 Neu 凋亡的影响

如图 4 所示,芹菜素可逆转 IL-6 诱导的 Neu 凋亡延迟 [(53.10±5.76)% vs. (24.88±3.57)%, $P<0.05$]。但是,在加入有效的广谱 caspase 抑制剂 QVD-OPh



与对照组相比,* $P<0.05$;与 IL-6 组相比,# $P<0.05$ ($n=6$)。

图 2 芹菜素和 IL-6 对 cleaved caspase-3 表达量的影响
Figure 2 Effects of apigenin and IL-6 on the levels of cleaved caspase-3



与 IL-6 组相比,* $P<0.05$;与 IL-6+芹菜素组相比,# $P<0.05$ ($n=6$)。

图 3 caspase 抑制剂对 cleaved caspase-3 表达量的影响
Figure 3 Effects of caspase inhibitors on the levels of cleaved caspase-3

或 z-VAD-fmk 后,芹菜素的逆转作用消除 [(5.66±1.42)% vs. (53.10±5.76)%, $P<0.05$; (7.95±1.04)% vs. (53.10±5.76)%, $P<0.05$]。这表明 caspase 抑制剂可以消除芹菜素逆转 IL-6 诱导的 Neu 凋亡受抑作用,结合图 3 的结果说明 caspase 抑制剂可以抑制 caspase-3 的激活从而消除芹菜素逆转 IL-6 诱导的 Neu 凋亡受抑作用,证实芹菜素确实通过 caspase 途径拮抗 IL-6 诱导的 Neu 凋亡延迟。

3 讨论

作为机体固有免疫的组成部分,Neu 可迅速募集到炎症部位发挥防御作用,形成机体抗细菌和真菌感染的重要防线。在防御过程中,Neu 所含的细胞

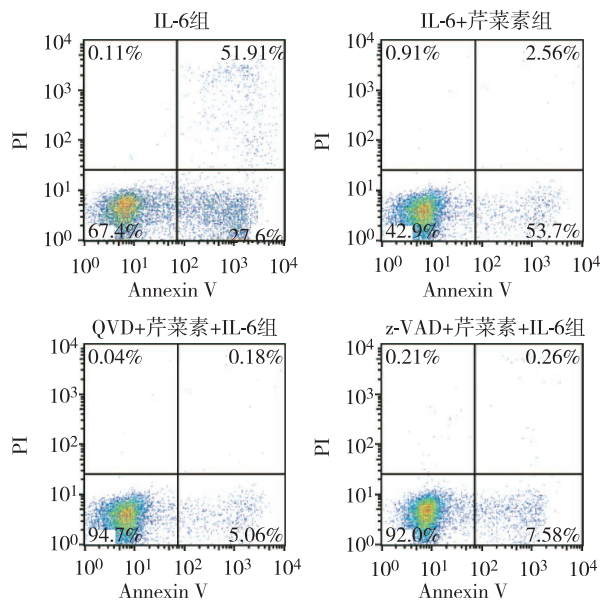


图4 caspase抑制剂对中性粒细胞凋亡率的影响

Figure 4 Effects of caspase inhibitors on neutrophil apoptosis

毒性物质既对病原微生物产生强劲杀伤作用,也对自身组织细胞造成损伤^[1,11]。机体 Neu 无损害性收敛通过自发性凋亡的方式来实现。通常,机体以这种方式调控 Neu 对周围正常组织的毒性作用,从而减轻炎症反应。Neu 是终末分化细胞,不具备分化和增殖能力。诚然,脂多糖(LPS)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等炎性物质抑制 Neu 自发性凋亡,导致 Neu 凋亡失衡,从而使有毒产物的释放机会相对增多,这无疑将迁延和加重炎症反应^[12]。

多数肺部疾病均与 Neu 凋亡平衡失调有关。如 Neu 凋亡失衡可能参与 ALI 患者病情的变化^[4];在反复发作的 COPD 中,Neu 凋亡延迟及其释放的相关酶可能加重了患者的病理变化^[5];Neu 凋亡延迟在中性粒细胞性哮喘的发生发展中发挥了重要作用,并可能是重症哮喘激素抵抗性的重要机制^[6];在肺结核患者中,Neu 凋亡失衡会引起机体免疫力减退,导致肺结核疾病反复发作及治愈延迟^[7];在 OSAS 患者中,Neu 凋亡失衡易引起肺部疾病的发生,同时易于并发其他疾病^[8]。所以,促进 Neu 凋亡可能成为防治上述肺部疾病的新靶点。

IL-6 是一种重要的、多活性细胞因子,在大部分肺部疾病中具有重要作用^[13-15]。在本研究中,发现 IL-6 可造成离体 Neu 的凋亡障碍,说明 IL-6 可能是导致 Neu 凋亡失衡并参与大部分肺部疾病的重要机制之一。

芹菜素具有抗氧化作用,可抑制 Neu 的趋化、吞噬、呼吸爆发,降低活性氧的产量,还可直接促进 Neu 凋亡^[9]。但是,芹菜素是否对某些炎性因子如 IL-6 诱导的 Neu 凋亡延迟发挥对抗作用,尚未完全证实。本实验证明,芹菜素可逆转 IL-6 诱导的 Neu 凋亡延迟,表明芹菜素在炎性因子 IL-6 存在的环境中仍可促进 Neu 凋亡。

caspase 是一组以天冬氨酸为底物的半胱氨酸蛋白酶家族,是细胞凋亡信号的执行者,其家族成员在细胞凋亡过程中起重要作用。激活的 caspase (cleaved caspase)可作用于其他的 caspase 前体并使其激活,形成级联反应。在细胞内,caspase 作用于 DNA 修复蛋白和细胞骨架蛋白,导致细胞凋亡^[16]。caspase-3 是 caspase 家族的重要成员,系各种细胞凋亡通路中最易于激活的 caspase,是死亡受体途径或线粒体途径介导的细胞凋亡信号通路的关键节点和交汇点,在细胞凋亡过程中可能发挥“控制门”的作用^[12]。Western blot 结果显示,IL-6 通过抑制 caspase-3 的激活而延迟 Neu 凋亡,芹菜素则通过激活 caspase-3 而促进 Neu 凋亡并拮抗 IL-6 诱导的 Neu 凋亡延迟。而且,caspase 抑制剂可以通过抑制 caspase-3 的活化有效逆转芹菜素对 IL-6 诱导的 Neu 凋亡延迟。这再次证实芹菜素是经过干预 caspase 途径,从而逆转 IL-6 诱导的 Neu 凋亡受抑作用。

综上所述,芹菜素可能通过 caspase 途径逆转 IL-6 诱导的 Neu 凋亡障碍,有望为今后治疗中性粒细胞炎症性气道疾病提供新方法。

参考文献

- [1] Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease[J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30(11):459-489
- [2] Martin KR, Ohayon D, Witko-Sarsat V. Promoting apoptosis of neutrophils and phagocytosis by macrophages: novel strategies in the resolution of inflammation[J]. *Swiss Med Wkly*, 2015, 145:w14056
- [3] Hampson P, Hazeldine J, Lord JM. Neutrophil apoptosis and its induction as a potential treatment for chronic inflammatory disease[J]. *Curr Opin Hematol*, 2013, 20(1): 10-15
- [4] Wan D, Li X, Li C, et al. Protectin D1 promotes resolution of inflammation in a murine model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury via enhancing neutrophil apoptosis[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127(5):810-814

(下转第 408 页)

- 中华肾脏病杂志, 2013, 29(9): 670-675
- [8] Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, et al. World incidence of AKI: a meta-analysis[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2013, 8(9): 1482-1493
- [9] Di Paola R, Genovese T, Impellizzeri D, et al. The renal injury and inflammation caused by ischemia-reperfusion are reduced by genetic inhibition of TNF- α R1: a comparison with infliximab treatment[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 700(1/3): 134-146
- [10] Lu L, Faubel S, He Z, et al. Depletion of macrophages and dendritic cells in ischemic acute kidney injury[J]. *Am J Nephrol*, 2012, 35(2): 181-190
- [11] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3): 787-795
- [12] Ricardo SD, Van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(11): 3522-3530
- [13] Yang Z, Xian H, Hu J, et al. USP18 negatively regulates NF- κ B signaling by targeting TAK1 and NEMO for deubiquitination through distinct mechanisms[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12738
- [14] Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling[J]. *Cell*, 2008, 132(3): 344-362
- [15] Li T, Morgan MJ, Choksi S, et al. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(9): 799-805
- [16] Lawrence T, Bebiec M, Liu GY, et al. IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation[J]. *Nature*, 2005, 434(737): 1138-1143

[收稿日期] 2016-11-09

(上接第 402 页)

- [5] Milara J, Juan G, Peiró T, et al. Neutrophil activation in severe, early-onset COPD patients versus healthy non-smoker subjects in vitro: effects of antioxidant therapy[J]. *Respiration*, 2012, 83(2): 147-158
- [6] 陈子, 朱进, 郑涛, 等. 唾液酸结合的免疫球蛋白样凝集素 9 (Siglec-9): 重症哮喘潜在的治疗靶点[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2015, 35(9): 712-716
- [7] Alemán M. Neutrophil apoptosis in the context of tuberculosis infection[J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2015, 95(4): 359-363
- [8] Li S, Feng J, Wei S, et al. Delayed neutrophil apoptosis mediates intermittent hypoxia-induced progressive heart failure in pressure-overloaded rats[J]. *Sleep Breath*, 2016, 20(1): 95-102
- [9] Lucas CD, Allen KC, Dorward DA, et al. Flavones induce neutrophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1 via a proteasomal-dependent pathway[J]. *FASEB J*, 2013, 27(3): 1084-1094
- [10] Lucas CD, Dorward DA, Tait MA, et al. Downregulation of Mcl-1 has anti-inflammatory pro-resolution effects and enhances bacterial clearance from the lung[J]. *Mucosal Immunol*, 2014, 7(4): 857-868
- [11] Caielli S, Banchereau J, Pascual V. Neutrophils come of age in chronic inflammation[J]. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24(6): 671-677
- [12] Gabelloni ML, Trevani AS, Sabatté J, et al. Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death[J]. *Semin Immunopathol*, 2013, 35(4): 423-437
- [13] 张晓鸣, 顾绍庆. 水飞蓟素对急性肺损伤小鼠肺组织 IL- β , IL-6, 去化因子 fractalkine 表达的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(8): 1083-1086
- [14] 魏江涛, 候明勇, 何斌, 等. IL-6 基因多态性与 COPD 发病风险关系的 Meta 分析[J]. *中国循证医学杂志*, 2014, 14(9): 1131-1134
- [15] Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(9): 1281-1290
- [16] Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, et al. Old, new and emerging functions of caspases[J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(4): 526-539

[收稿日期] 2016-10-20