

蛇床子素抑制 LPS 诱导的肠上皮细胞株 Caco2 的炎症反应

孙 武,张欣欣,周文博,李 皓*

(南京医科大学病理生理学系,江苏 南京 211166)

[摘要] 目的:探讨蛇床子素(osthole)对内毒素(lipopolysaccharide, LPS)诱导的肠上皮细胞 Caco2 中炎症因子表达的影响及机制。方法:培养 Caco2 细胞,用 LPS 诱导炎症反应。在 LPS 刺激前给予细胞不同浓度的蛇床子素处理,通过 real-time PCR 检测白介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 的表达情况。分别用 PKA 抑制剂 H89 和 KT5720 处理细胞,观察 cAMP/PKA 信号通路对蛇床子素效应的影响;用 Western blot 检测细胞中 p38、Erk 和 JNK 的磷酸化水平。结果:LPS 刺激可以显著增加 Caco2 细胞中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达。蛇床子素预处理对 LPS 诱导的炎症反应有明显抑制作用,PKA 抑制剂 H89 和 KT5720 不能逆转蛇床子素的抑制作用。LPS 刺激后,Caco2 细胞中 p38、Erk 和 JNK 的磷酸化水平明显增加,蛇床子素可部分抑制它们的磷酸化。结论:蛇床子素具有抑制肠上皮细胞株 Caco2 炎症反应的效应,该效应不依赖于 cAMP/PKA,可能与抑制 Erk、JNK 和 p38 的磷酸化有关。

[关键词] 蛇床子素;脂多糖;炎症;MAPK;Caco2 细胞

[中图分类号] R282.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)07-814-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20170706

Osthole attenuates LPS-induced inflammatory response in Caco2 cells

Sun Wu, Zhang Xinxin, Zhou Wenbo, Li Hao*

(Department of Pathophysiology, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of osthole on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in Caco2 cells and the underlying mechanism. **Methods:** Caco2 cells were treated with various concentrations of osthole prior to LPS treatment. The mRNA levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6 and TNF- α were detected by real-time PCR. Cells were treated with PKA inhibitors H89 or KT5720 prior to LPS at indicated doses to observe the effect of cAMP/PKA signaling pathway on osthole. The phosphorylations of p38, Erk and JNK were detected by Western blot. **Results:** The expressions of inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α in Caco2 cells were significantly increased by LPS stimulation. Pretreatment of osthole significantly suppressed the up-regulation of inflammatory cytokines induced by LPS. PKA inhibitors failed to reverse the inhibitory effect of osthole. LPS induced significant phosphorylation of p38, Erk, and JNK in Caco2 cells, which were suppressed partly by osthole. **Conclusion:** Osthole attenuates LPS-induced inflammatory response in Caco2 cells. The inhibitory effect of osthole is independent on cAMP/PKA pathway. Osthole-induced reduction of phosphorylation of p38, Erk, and JNK may mediate its anti-inflammation action in Caco2 cells.

[Key words] osthole; LPS; inflammation; MAPK; Caco2

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(07): 814-817]

蛇床子素(osthole, 分子式: C₁₅H₁₆O₃), 又名甲氧基欧芹酚或欧芹酚甲醚, 其化学名称为 7-甲氧基-8-异戊烯基香豆素(7-methoxy-8-[3-methylpent-2-enyl] coumarin), 最早从伞形科植物中提取分离出来, 因伞形科植物蛇床的干燥成熟果实蛇床子(*Fructus Cnidii*)

中含量较高, 故而得名^[1]。除蛇床子外, 蛇床子素还存在于当归、独活、前胡、白芷、柑橘等多种伞形科、芸香科以及少数的菊科和豆科植物中。

蛇床子素属于香豆素类化合物, 其核心结构由苯环和吡喃酮环组成。此外, 蛇床子素还有异戊烯结构^[2]。异戊烯结构化合物作为植物抗毒素在植物的抗病过程中有重要作用。现代药理实验研究表明, 蛇床子素具有抗骨质疏松症、抗高血压、抗心律失常、

[基金项目] 国家自然科学基金(81270944)

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

抗衰老、抗肿瘤、抗凝血、抗菌、杀虫、抗炎镇痛等作用^[3-5]。其中,在抗炎作用方面的研究表明:蛇床子素能够在体外显著抑制巨噬细胞、支气管上皮细胞、大鼠腹腔细胞、人外周血单核细胞等的炎症反应^[4,6],并在动物体内明显减轻物理和化学因素引起的炎症^[3,7]。然而,蛇床子素对肠上皮细胞炎症反应的效应目前尚无报道。本研究观察了蛇床子素对 LPS 刺激的 Caco2 细胞炎症因子表达的影响,并对其抗炎作用机制进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

人结肠肿瘤细胞株 Caco2(ABM 公司,加拿大); p38、p-p38、p-JNK、Erk、p-Erk 抗体(CST 公司,美国); DMEM 培养基和胎牛血清(Gibco 公司,美国);蛇床子素(Selleck 公司,美国);脂多糖(LPS)、PKA 抑制剂 H89(Sigma 公司,美国);PKA 抑制剂 KT5720(赛默飞公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

Caco2 细胞采用 DMEM 培养基加 10%胎牛血清和 100 U/mL 青链霉素在 37 °C 和 5% CO₂ 的培养箱中进行培养。细胞传代按照 1:3 进行。将蛇床子素、H89 和 KT5720 溶解于二甲基亚砷(DMSO)中,浓度分别为 1、10 和 50 mmol/L,储存于-20 °C 冰箱中。使用前用 DMEM 稀释,最终给药浓度见文中所述。在所有处理组中 DMSO 的含量均小于 0.1%。

1.2.2 Real-time PCR 检测

TRIzol 法提取细胞总 RNA,用 Taqman 逆转录试剂盒,将 RNA 逆转录成 cDNA。引物由上海捷锐生物有限公司合成,序列见表 1。Real-time PCR 应用 SYBR Premix Extaq™(TaKaRa 公司,日本),反应体系为:SYBR Premix Extaq™ 10 μL,模板 5 μL,引物 2.5 μL,灭菌蒸馏水 2.5 μL。反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,循环 40 次。采用 Applied Biosystems 7500 real-time PCR System 进行检测,分析扩增曲线和分离曲线。数据分析以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算。

1.2.3 蛋白质免疫印迹(Western blot)

6 孔板每孔加入 60 μL RIPA 裂解液,用细胞刮将细胞均匀刮干净。取 50 μg 蛋白,SDS-PAGE 电泳分离后转膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h,一抗 4 °C 孵育过夜,洗膜 4 遍,每次 10 min。之后用 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h,漂洗 3 次后用 ECL 显影液显影成像。

表 1 引物名称和序列

Table 1 Names and sequences of primers

基因名称	序列(5'→3')
IL-1β	F:GAATGACGCCCTCAATCAAAGT R:TCATCTTGGGCAGTCACATACA
IL-6	F:CCTGAACCTTCCAAAGATGGC R:TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA
TNF-α	F:GAGGCCAAGCCCTGGTATG R:CGGGCCGATTGATCTCAGC
GAPDH	F:TGTTCTCATGGTGTGAACC R:GCACTGATGGCATGGACTGTG

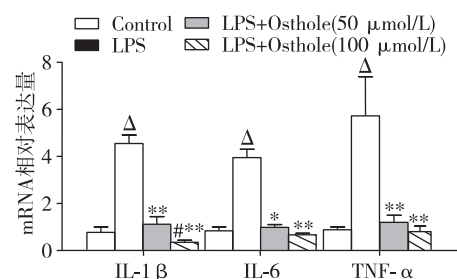
1.3 统计学方法

本实验所有数据采用 SPSS 20.0 分析,数值均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。 $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蛇床子素显著降低 LPS 诱导的炎症因子表达

用 50 μmol/L 蛇床子素处理 Caco2 细胞,16 h 后给予 1 μg/mL LPS 刺激,对照组仅给予溶剂处理,24 h 后提取 RNA 进行 real-time PCR 检测。结果显示,LPS 刺激可以显著增加炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的表达(图 1)。蛇床子素预处理显著降低了 LPS 诱导的炎症因子表达,并且呈现一定的剂量依赖性(图 1)。以上结果表明,蛇床子素在肠上皮细胞株 Caco2 中有显著的抗炎作用。



与 Control 组相比,Δ $P < 0.05$;与 LPS 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 50 μmol/L 蛇床子素组相比,# $P < 0.05$ ($n=3$)。

图 1 蛇床子素对炎症因子的抑制作用呈现一定的剂量依赖性
Figure 1 Osthole decreases the expression of inflammatory cytokines in a dose-dependent manner

2.2 蛇床子素对炎症因子的抑制作用不依赖于 cAMP/PKA 信号通路

通常情况下,细胞内 cAMP 的含量增高和抗炎作用相关^[8]。cAMP 信号通路的主要效应是通过活化 cAMP 依赖的 PKA,导致下游靶蛋白磷酸化,从而影

响细胞代谢和功能。cAMP 主要被磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE)水解。PDE3 和 PDE4 是细胞中主要的 cAMP 水解酶^[9]。PDE4 抑制剂的抗炎作用已有多篇文献报道^[10-11]。有研究证实,蛇床子素可以提高组织 cAMP 含量,是天然的 PDE4 抑制剂^[12]。为确定蛇床子素对 Caco2 细胞炎症反应的抑制效应是否与 cAMP 信号通路有关,我们分别用 PKA 抑制剂 H89(10 μmol/L)和 KT5720(1 μmol/L)处理细胞 2 h,之后给予蛇床子素 50 μmol/L 处理 16 h,再用 LPS 刺激 24 h 后收取细胞,通过 real-time PCR 检测炎症因子的表达情况。结果显示,H89 和 KT5720 均不能逆转蛇床子素对 LPS 引起的炎症反应的抑制作用(图 2),提示蛇床子素在 Caco2 细胞的抗炎作用并不依赖 cAMP/PKA 信号通路,而是存在其他机制。

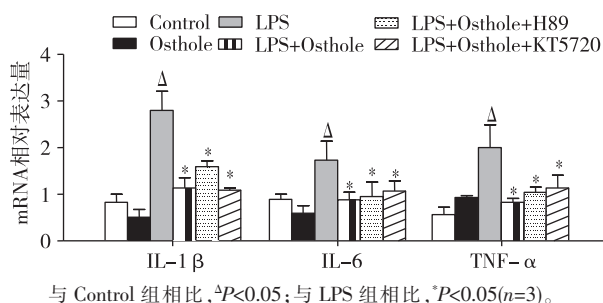


图 2 PKA 抑制剂不能逆转蛇床子素对 LPS 诱导的炎症反应的抑制作用

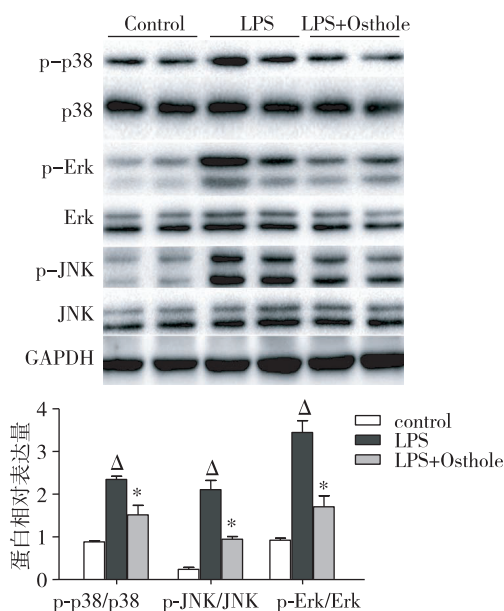
Figure 2 PKA inhibitors fail to reverse the inhibitory effect of osthole on LPS-induced inflammatory response in Caco2 cells

2.3 蛇床子素在 Caco2 细胞中的抗炎作用与抑制 MAPK 磷酸化有关

MAPK 信号通路参与很多炎症因子的表达调控^[13]。为研究蛇床子素减轻炎症因子的表达是否与 MAPK 信号通路有关,我们检测了 MAPK 信号通路中 p38、Erk 和 JNK 的磷酸化水平。Western blot 结果显示,LPS 刺激后,Caco2 细胞中 p38、Erk 和 JNK 的磷酸化水平明显增加;蛇床子素本身对 MAPK 的磷酸化无明显影响(结果未发表),但可部分抑制 LPS 引起的 p38、Erk 和 JNK 磷酸化(图 3)。这些结果提示,蛇床子素在 Caco2 细胞中的抗炎作用可能与抑制 MAPK 信号通路的磷酸化有关。

3 讨论

蛇床子是传统的中药材,从古至今被历代医家视为治疗皮肤病、瘙痒症的中药。近年来对蛇床子有效成分的研究主要集中在香豆素类。从蛇床子



与 Control 组相比, ^ΔP<0.05; 与 LPS 组相比, ^{*}P<0.05。

图 3 蛇床子素明显抑制 LPS 引起的 MAPK 信号通路的激活
Figure 3 Osthole pretreatment attenuates the phosphorylation of MAPK kinases

总香豆素中可分离得到多个单体,其中蛇床子素含量最高,约占总香豆素的 60%^[1]。随着对蛇床子素药理学作用的研究,其多种多样的生物学功能逐渐被发现。蛇床子素的抗炎作用已在小鼠巨噬细胞等多种细胞中得到证实^[4,6]。本研究发现蛇床子素能显著抑制肠上皮细胞株 Caco2 中 LPS 引起的炎症因子表达,为蛇床子素的抗炎作用提供了新的实验证据。

以往研究表明,PDE4 抑制剂通过增加细胞内 cAMP 含量发挥抗炎作用^[13]。文献报道,蛇床子素在中性粒细胞中的抗炎效应呈 cAMP/PKA 依赖性^[12]。与此不同,我们的实验结果显示,在 Caco2 细胞中,抑制 PKA 不能阻断蛇床子素对 LPS 诱导的炎症反应的抑制作用。猜测这种差异可能与细胞类型有关。值得注意的是,蛇床子素除抑制 PDE4 外,还有诸多其他生物活性,如通过抑制其他 PDE 导致细胞内 cGMP 的升高、调节钙离子等离子通道、抑制 5-lipoxygenase、抗氧化应激、抗凋亡等^[14]。蛇床子素对炎症因子的调控可能是其多种生物活性的综合效应,因而导致其抗炎机制更为复杂。

蛇床子素对 MAPK 磷酸化的影响已有文献报道。研究显示,在前列腺癌细胞及 HepG2 细胞中,蛇床子素通过抑制 Erk、JNK 和 p38 对肿瘤的转移或炎症反应产生抑制效应^[15-16];在失血导致的肝损伤中,蛇床子素通过增强 p38 的磷酸化减轻肝损伤^[17];在巨噬细胞 J774A.1 中,蛇床子素抑制 p38 和 JNK

的磷酸化,而对 Erk 无明显影响^[18]。这些研究结果提示,蛇床子素对 MAPK 的效应可能与细胞类型及刺激的性质有关。

本研究结果显示,在 Caco2 细胞中,蛇床子素对 Erk、JNK 和 p38 的激活均有抑制作用。MAPK 抑制剂对炎症反应的抑制作用已被证实^[19]。因此,我们推测,在 Caco2 细胞中,蛇床子素抑制 LPS 诱导的炎症反应可能与其抑制 MAPK 有关。有文献报道,在中性粒细胞中,蛇床子素对 Erk 磷酸化的抑制是 cAMP/PKA 依赖性的^[12]。在 Caco2 细胞中,蛇床子素对 Erk、JNK 和 p38 磷酸化的抑制作用是否与 cAMP/PKA 有关尚待进一步研究。同时,LPS 主要通过刺激 TLR4 信号产生炎症反应,抑制 P38 可以显著降低 TLR4 信号通路炎症因子的表达^[20],我们推测蛇床子素抑制炎症因子的表达可能与抑制 TLR4 信号通路有关。本研究表明,蛇床子素具有抑制肠上皮细胞株 Caco2 炎症反应的效应,该效应不依赖于 cAMP/PKA,可能与抑制 Erk、JNK 和 p38 的磷酸化有关。本研究结果丰富了对蛇床子素生物功能的认识,为其药用价值的开发提供了新依据。

[参考文献]

[1] You LS, Feng S, An R, et al. Osthole: a promising Lead compound for drug discovery from a traditional Chinese medicine (TCM) [J]. *Nat Prod Commun*, 2009, 4(2): 297-302

[2] Okamoto T, Kobayashi T, Yoshida S. Chemical aspects of coumarin compounds for the prevention of hepatocellular carcinomas [J]. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2005, 5(1): 47-51

[3] Matsuda H, Tomohiro N, Ido Y, et al. Anti-allergic effects of *Cnidii Monnieri Fructus* (Dried fruits of *Cnidium monnieri*) and its major component, osthol [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(6): 809-812

[4] Zimecki M, Artym J, Cisowski W, et al. Immunomodulatory and anti-inflammatory activity of selected osthole derivatives [J]. *Z Naturforsch C*, 2009, 64(5/6): 361-368

[5] Wu L, Wang X, Xu W, et al. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(32): 4236-4260

[6] Chiu PR, Lee WT, ChuYT, et al. Effect of the Chinese herb extract osthol on IL-4-induced eotaxin expression in BEAS-2B cells [J]. *Pediat Neonatol*, 2008, 49(4): 135-140

[7] 刘建新, 张文平, 周 俐, 等. 蛇床子素对大鼠的抗炎作用和机制 [J]. *中药材*, 2005, 28(11): 1002-1006

[8] Serezani CH, Ballinger MN, Aronoff DM, et al. Cyclic AMP:

master regulator of innate immune cell function [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 39(2): 127-132

[9] Torphy TJ. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157(2): 351-370

[10] Hartmann G, Bidlingmaier C, Siegmund B, et al. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 292(1): 22-30

[11] Loher F, Schmall K, Freytag P, et al. The specific type-4 phosphodiesterase inhibitor mesopram alleviates experimental colitis in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 305(2): 549-556

[12] Tsai YF, Yu HP, Chung PJ, et al. Osthol attenuates neutrophilic oxidative stress and hemorrhagic shock-induced lung injury via inhibition of phosphodiesterase 4 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 89: 387-400

[13] Dang PM, Morel F, Gougerot-Pocidal MA, et al. Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67 (PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region [J]. *Biochemistry*, 2003, 42(15): 4520-4526

[14] Zhang ZR, Leung WN, Cheung HY, et al. Osthole: A review on its bioactivities, pharmacological properties, and potential as alternative medicine [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 919616

[15] Wen YC, Lee WJ, Tan P, et al. By inhibiting snail signaling and miR-23a-3p, osthole suppresses the EMT-mediated metastatic ability in prostate cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(25): 21120-21136

[17] Yu HP, Liu FC, Tsai YF, et al. Osthole attenuates hepatic injury in a rodent model of trauma-hemorrhage [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65916

[18] Liao PC, Chien SC, Ho CL, et al. Osthole regulates inflammatory mediator expression through modulating NF-kappaB, mitogen-activated protein kinases, protein kinase C, and reactive oxygen species [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(19): 10445-10451

[19] Meng AH, Zhang XP, Wu SY, et al. In vitro modeling of COPD inflammation and limitation of p38 inhibitor-SB203580 [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2016, 11: 909-917

[20] Lai JL, Liu YH, Liu C, et al. Indirubin inhibits LPS-Induced inflammation via TLR4 abrogation mediated by the NF-kB and MAPK signaling pathways [J]. *Inflammation*, 2017, 40(1): 1-12

[收稿日期] 2017-03-15