

槐定碱、苦参碱和苦豆碱对 LPS 诱发结肠上皮细胞炎症模型中细胞因子 IL-6 和 TNF- α 水平的影响

郑堰心¹, 张丽¹, 邓虹珠^{1*}, 梁磊²

(1. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515; 2. 广州军区广州总医院药剂科, 广州 510010)

[摘要] 目的:构建结肠上皮细胞炎症模型,探讨槐定碱、苦参碱和苦豆碱对细胞因子白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达的影响。**方法:**将细胞接种 12 孔板中,每孔接种肠上皮细胞株 IEC-6 2×10^5 个细胞。细菌脂多糖(LPS, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)干预生长良好的 IEC-6 细胞 12 h,建立细胞炎症模型。四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测 3 种生物碱不同浓度对炎症细胞增殖的影响;ELISA 法检测给药后细胞上清中 IL-6、TNF- α 的变化;免疫印迹法检测细胞内 IL-6 及 TNF- α 蛋白表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组细胞上清中 IL-6、TNF- α 水平显著升高,LPS ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)干预 12 h 后,IL-6、TNF- α 含量分别为 ($1\,899.68 \pm 45.80$), (148.67 ± 5.93) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。苦豆碱、槐定碱和苦参碱均可有效减弱 LPS 诱导的结肠上皮细胞损伤。当生物碱浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,槐定碱、苦参碱和苦豆碱均可提高 LPS 损伤细胞的活性,细胞存活率分别从 80.47% 提高为 91.96%、92.40%、97.23%。此外,这 3 种生物碱可降低 IL-6 和 TNF- α 的含量及其在细胞内的表达。**结论:**槐定碱、苦参碱和苦豆碱 3 种生物碱均可通过降低 IL-6 和 TNF- α 活性发挥抗炎作用。其中,苦豆碱的抗炎作用最佳。

[关键词] 槐定碱; 苦参碱; 苦豆碱; 结肠上皮细胞; 细胞炎症模型

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0133-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014080133

Effects of Sophoridine, Matrine and Aloperine on the Contents of Cytokine IL-6 and TNF- α in LPS-induced IEC-6 Cells Inflammatory Model

ZHENG Yan-xin¹, ZHANG Li¹, DENG Hong-zhu^{1*}, LIANG Lei²

(1. Traditional Chinese Medicine of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Pharmacy of Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effects of sophoridine, matrine and aloperine on lipopolysaccharide (LPS) -induced IEC-6 cells inflammatory model. **Method:** IEC-6 cells were seeded into 12-well plates at the density of 2×10^5 /well and treated with LPS for 12 h. Then, the inflammatory model was constructed by detecting the content of interleukin (IL) -6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α). MTT assay was used to determine the activities of aloperine, sophoridine and matrine on LPS-injured IEC-6 cells. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) was used to detect the content of IL-6 and TNF- α in cell supernatant and Western blotting analysis was employed to detect the protein expression levels of IL-6 and TNF- α . **Result:** Compared with the control group, levels of IL-6 and TNF- α of inflammatory model group were significantly upregulated. Aloperine, sophoridine and matrine could significantly reduce the cytotoxicities of IEC-6 cells induced by LPS. The cell viabilities were increased from 80.47% to 91.96%, 92.40% and 97.23% after sophoridine, matrine and aloperine treatment at the concentration of $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Moreover, ELISA and Western blotting analysis results demonstrated that these compounds could attenuate the content and expression of IL-6 and TNF- α .

[收稿日期] 20131023(020)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81001701)

[第一作者] 郑堰心, 硕士研究生, 从事中药药理学研究, Tel:15521118315, E-mail:85309640@qq.com

[通讯作者] * 邓虹珠, 硕士, 教授, 博导, 从事中药药理学研究, Tel:13602751889, E-mail:zhengyanxin1110@126.com

Conclusion: Aloperine, sophoridine and matrine exhibit anti-inflammatory effects though decreasing the activities of IL-6 and TNF- α . Among them, aloperine shows the best activities.

[Key words] sophoridine; matrine; aloperine; IEC-6 cells; inflammation

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组反复发作的慢性炎症性肠道疾病,主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克隆病(Crohn's disease, CD)^[1]。近年来,该病的发病率在全球均呈逐年上升趋势^[2],因此,寻找有效治疗 IBD 的药物具有重要意义。豆科槐属植物苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)为一种传统中药,广泛分布于我国西部省区,其性味苦寒,具有清热燥湿、止痛杀虫等作用^[3]。苦豆子的主要化学成分为生物碱类、黄酮类、蛋白质类等。其中,主要生物碱有槐定碱,苦参碱和苦豆碱等^[4]。现代药理研究表明该植物具有抗炎、免疫调节、中枢神经镇静等作用^[5]。有研究发现槐定碱对脂多糖(LPS)诱导的 RAW2647 细胞炎症模型有一定保护作用,其机制可能与调控核因子(NF- κ B) p65、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)有关^[6]。此外,本课题组前期体内试验也表明苦豆子总生物碱可以减轻大鼠实验性结肠炎损伤^[7]。然而,苦豆子总生物碱抗 LPS 诱导的结肠炎的活性评价及作用机制未见报道。因此,笔者通过构建 LPS 诱发结肠上皮细胞炎症模型,并采用苦豆子主要生物碱(槐定碱,苦参碱和苦豆碱)进行干预,探讨苦豆子生物碱的抗炎作用及可能的作用机制。

1 材料

1.1 细胞与药物 肠上皮细胞株 IEC-6 购自中国科学院上海细胞生物研究所。槐定碱(110784. 200804)、苦参碱(110805. 200508)、苦豆碱(110905. 200808)(由宁夏紫荆花药业提供;纯度均 $\geq 98.0\%$)。

1.2 试剂 RPMI 1640 培养基、胎牛血清(杭州四季青生物科技公司),四甲基噻唑蓝[3-(4, 5)-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT, Amresco 公司],白细胞介素-6(IL-6)、TNF- α 、 β -actin 抗体及羊抗兔 IgG-HRP(均购自美国 Sigma 公司),ELISA 试剂盒(购自南京建成生物科技公司),其他试剂均购自美国 Sigma 公司。

1.3 仪器 BA110S 型电子天平(德国 Sartorius 公司);3K30 型低温高速离心机(Sigma 公司);CA-920-2 垂直层流洁净工作台(上海上净净化设备有限公司);Western blotting 电泳设备(美国 Bio-Rad 公司);超低温冰箱(美国 Bio-Rad 公司);MPS30

Leica 倒置显微镜(德国 Leica 公司);EIA multi-well reader Sigmadiagnostic 酶标仪(Sigma 公司)。

2 方法

2.1 IEC-6 细胞的培养 用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中。待细胞生长到 80% ~ 90%,弃除培养液,用 PBS 轻轻洗涤细胞后加入适量胰酶消化。待细胞变圆后终止消化,用 RPMI 1640 培养液重悬细胞,并按 1:3 的比例进行传代培养。

2.2 肠上皮细胞 IEC-6 炎症细胞模型 取 $1 \times 10^9/\text{L}$ 的细胞悬液接种至 12 孔板,每孔 2×10^5 个细胞。24 h 后,加入不同质量浓度 LPS(0, 0.5, 1, 2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),继续培养 12 h 或 24 h。然后收集细胞培养液,并按照实验说明,检测细胞炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的含量。平行实验重复 3 次。

2.3 对 LPS 诱发结肠上皮细胞炎症模型中细胞活性的影响 取 $1 \times 10^9/\text{L}$ 细胞悬液种植于 96 孔培养板中,每孔 0.5×10^4 个细胞,设空白对照组,模型组和给药组。将 96 孔培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱培养。24 h 后,空白对照组加入培养液,模型组加入含有终质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 的培养液,给药组加入含有 LPS($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)与生物碱(每种生物碱设 10, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个浓度)的培养液,每孔 100 μL 。12 h 后,每孔加 20 μL (5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) MTT,培养 4 h 并去培养基。最后加入 150 μL 的 DMSO,用酶标仪在 490 nm 波长处检测吸光度(A)。平行实验重复 3 次。

2.4 检测细胞内 IL-6, TNF- α 表达水平 取 $1 \times 10^9/\text{L}$ 的细胞悬液接种至 12 孔板,每孔 2×10^5 个细胞。按照实验分组进行处理并吸取细胞培养液,按照 ELISA 检测试剂盒说明书检测 IL-6, TNF- α 的含量。平行实验重复 3 次。

2.5 检测 IL-6, TNF- α 蛋白的表达 取 $1 \times 10^9/\text{L}$ 细胞悬液接种至 6 孔板,每孔 5×10^5 个细胞。按照实验分组进行相应处理后,提取细胞总蛋白。经 SDS-PAGE 进行电泳分离蛋白质后,采用半干转法将蛋白质转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,将一抗与 PVDF 膜 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二抗室温孵育 2 ~ 3 h,化学发光法显色成像并采用 Image Pro 软件分析条带灰度值。平行实验重复 3 次。

2.6 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,每次实验均至少重复 3 次。采用 SPSS 13.0 软件进行处理,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 LPS 对 IEC-6 细胞内 IL-6, TNF- α 的影响 与

表 1 LPS 诱导 IEC-6 细胞后 IL-6, TNF- α 的水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度	IL-6	TNF- α	组别	质量浓度	IL-6	TNF- α
	/mg·L ⁻¹	/ng·L ⁻¹	/ng·L ⁻¹		/mg·L ⁻¹	/ng·L ⁻¹	/ng·L ⁻¹
空白 12 h	—	727.6 ± 28.6	86.2 ± 5.2	空白 24 h	—	839.0 ± 25.1	93.4 ± 4.1
LPS 12 h	0.5	1 098.7 ± 20.6 ¹⁾	114.2 ± 9.5 ¹⁾	LPS 24 h	0.5	965.3 ± 32.2 ³⁾	113.4 ± 9.3 ³⁾
	1	1 899.7 ± 45.8 ²⁾	148.7 ± 5.9 ²⁾		1	1 492.5 ± 32.9 ⁴⁾	152.3 ± 10.0 ⁴⁾

注:与 12 h 空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 24 h 空白组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 不同浓度槐定碱、苦参碱和苦豆碱对炎症损伤细胞活性的影响 MTT 结果显示(表 2),生物碱浓度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,苦豆碱能够提高 LPS 损伤细胞的存活,而槐定碱和苦参碱无明显作用;当生物碱浓度提到为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,槐定碱、苦参碱和苦豆碱均可提高 LPS 损伤细胞的活性,细胞存活率分别从 80.47% 提高为 91.96%, 92.40% 和 97.23%。其中,苦豆碱的活性最佳。

表 2 槐定碱、苦参碱和苦豆碱

对 LPS 1 mg·L⁻¹ 炎症损伤细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	药物浓度	细胞活性
	/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	/%
空白	—	100.00
LPS ³⁾	—	79.35 ± 0.73
LPS ³⁾ + 槐定碱	50	82.07 ± 1.32
	100	91.96 ± 1.31 ¹⁾
LPS ³⁾ + 苦参碱	50	82.31 ± 2.10
	100	92.40 ± 2.76 ¹⁾
LPS ³⁾ + 苦豆碱	50	92.76 ± 1.42 ¹⁾
	100	97.23 ± 1.37 ¹⁾

注:与 LPS 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ LPS 质量浓度为 1 mg·L⁻¹ (表 3~4 同)。

3.3 对 LPS 诱导的炎症细胞内 IL-6 及 TNF- α 的影响 浓度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,苦豆碱,槐定碱,苦参碱组与模型组比较均能明显减少炎症细胞内 IL-6 及 TNF- α 表达水平。其中苦豆碱干预 12 h 对细胞内 IL-6 及 TNF- α 的表达下调作用明显高于其他组;槐定碱组和苦参碱组与苦豆碱组比较,细胞内 IL-6 及 TNF- α 水平下降趋势略弱,但仍低于模型组。

3.4 槐定碱、苦参碱和苦豆碱对 LPS 诱导的炎症细胞模型内 IL-6 及 TNF- α 蛋白表达水平的影响 免疫印迹法结果显示(图 1),与 LPS 组比较,50

空白对照组比较,加入 LPS (0.5, 1 mg·L⁻¹) 后均能明显增加 IEC-6 细胞 IL-6, TNF- α 的含量。其中 LPS (1 mg·L⁻¹) 干预细胞 12 h 对 IL-6, TNF- α 的表达上调作用最为明显 ($P < 0.01$), 因此选择该时间点和浓度进行后续研究。见表 1。

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苦豆碱,槐定碱及苦参碱可明显抑制炎症细胞 IEC-6 细胞内 IL-6 及 TNF- α 蛋白表达水平。槐定碱及苦参碱与苦豆碱比较,抑制 IL-6 及 TNF- α 蛋白表达的能力有所下降,但与造模组比较有一定差异(表 3, 4)。

表 3 槐定碱、苦参碱和苦豆碱对 LPS 1 mg·L⁻¹ 诱导的炎症细胞内 IL-6 及 TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	药物浓度	IL-6/U·L ⁻¹	TNF- α /U·L ⁻¹
	/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		
空白	—	727.6 ± 35.0	59.7 ± 6.0
LPS ³⁾	—	1 899.7 ± 56.1	97.0 ± 5.6
LPS ³⁾ + 槐定碱	50	1 742.4 ± 46.1 ¹⁾	85.7 ± 3.5 ¹⁾
LPS ³⁾ + 苦参碱	50	1 697.6 ± 42.1 ¹⁾	82.7 ± 2.5 ¹⁾
LPS ³⁾ + 苦豆碱	50	781.04 ± 94.1 ²⁾	62.3 ± 6.7 ²⁾

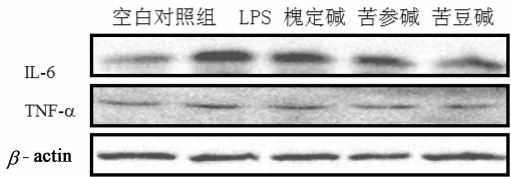


图 1 槐定碱、苦参碱和苦豆碱对 LPS 诱导的炎症细胞模型内 IL-6 及 TNF- α 蛋白表达水平的影响

表 4 槐定碱、苦参碱和苦豆碱对 LPS 1 mg·L⁻¹ 诱导的炎症细胞模型内 IL-6 及 TNF- α 与 β -actin 的灰度比值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	药物浓度	IL-6/ β -actin	TNF- α / β -actin
	/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		
空白	—	60.03 ± 2.02	51.73 ± 2.38
LPS ³⁾	1	166.03 ± 7.55	66.33 ± 2.41
LPS ³⁾ + 槐定碱	50	85.37 ± 4.72 ¹⁾	46.77 ± 3.54 ¹⁾
LPS ³⁾ + 苦参碱	50	73.57 ± 0.99 ¹⁾	45.20 ± 3.22 ¹⁾
LPS ³⁾ + 苦豆碱	50	60.80 ± 2.46 ²⁾	46.60 ± 2.38 ²⁾

4 讨论

LPS 是引起炎症的关键细胞毒性因子,能诱导粒细胞、子宫内膜的上皮细胞、肠上皮细胞、血管内皮细胞等分泌炎症细胞因子,产生毒副作用^[8]。目前,LPS 已被广泛地用于构建炎症或细菌感染的体内炎症模型^[9]。在炎症诱发的免疫应答过程中,细胞因子起着重要的调节作用^[10],如促炎细胞因子 IL-1,IL-6,TNF- α ,TNF- β 等。本实验结果显示,经一定浓度 LPS 刺激后的 IEC-6 细胞内 IL-6 及 TNF- α 水平明显增加,尤其是在 1 mg·L⁻¹ 的 LPS 处理 12 h 后,二者的表达达到最高峰,提示 IL-6 及 TNF- α 参与由 LPS 诱导的肠上皮细胞急性炎症损伤的病理生理过程,LPS 可诱导结肠上皮细胞 IEC-6 发生炎症反应。

苦豆子临床上主要用于治疗菌痢和肠炎^[11-12],但其主要活性成分及抗结肠炎作用机制仍不明确。因此笔者选取苦豆子中的主要生物碱(槐定碱,苦参碱和苦豆碱)进行抗结肠炎的研究。MTT 结果表明,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的苦豆碱可提高炎症细胞活力。随着浓度的增加,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的苦豆碱,槐定碱和苦参碱均可增强炎症细胞活力。该结果表明,这 3 种生物碱可减轻 LPS 诱导的结肠炎症损伤。

免疫调节异常在炎症性肠病的发病中占有中心地位,而细胞因子实质上是免疫细胞功能上相互联系的重要因素之一^[13]。近年来的研究表明,细胞因子在 IBD 的形成过程中发挥着重要的作用^[14]。随着 TNF- α 在 IBD 发病机制中的深入研究及抗 TNF- α 单克隆抗体 Infliximab 成功应用于 CD 的治疗后,以 TNF- α 为靶向成为 IBD 治疗的新方向。Linehan 等^[15]发现 IBD 发生时,肠黏膜的 IL-6 水平显著升高,而抗 IL-6 受体单克隆抗体能有效地减缓 IBD 的发展。该结果提示 IL-6 介导了 IBD 发展过程,是 IBD 的主要参与者。因此,笔者检测了苦豆碱,槐定碱和苦参碱对炎症细胞中 IL-6 和 TNF- α 的影响。ELISA 实验显示,这 3 种生物碱(50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)均可显著下调炎症细胞 IEC-6 培养上清液中 IL-6 及 TNF- α 的表达,其中苦豆碱对细胞内 IL-6 及 TNF- α 的表达下调作用最为显著。进一步的免疫印迹结果也表明,苦豆碱,槐定碱和苦参碱可下调细胞内 IL-6 及 TNF- α 蛋白水平,并且苦豆碱作用最为明显。以上结果提示,苦豆碱,槐定碱及苦参碱可能通过抑制细胞炎症因子 IL-6 及 TNF- α 蛋白的表达,减轻或改善炎症反应。

综上所述,本研究表明,苦豆子生物碱可能是一种潜在的治疗 IBD 的前体药物。本实验为开发利

用苦豆子生物碱治疗 IBD 及其作用机制提供了理论依据,为进一步探究苦豆子生物碱治疗炎症性肠病的作用机制奠定实验基础。

[参考文献]

[1] Bewtra M, Johnson F R. Assessing patient preferences for treatment options and process of care in inflammatory bowel disease;a critical review of quantitative data [J]. Patient, 2013,6(4):241.

[2] 朱庆强. 慢性炎症性肠病的影像学诊断及其进展[J]. 医学研究生学报, 2011,24(8):883.

[3] 杨巧丽,顾政一,黄华. 中药苦豆子的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2011,26(3):232.

[4] 张为民,张彦明,张涛,等. 苦豆子生物碱抑菌抗炎作用研究[J]. 动物医学进展, 2005,26(10):82

[5] 单晓菊,邸明磊,陶遵威. 苦豆子化学成分及药理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(3):105.

[6] 杨峰,王艳荣,周娅. 槐定碱预处理对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞表达 NF- κ B 的影响[J]. 宁夏医科大学学报, 2011, 33(2):122.

[7] 周毅,邓虹珠,王赫,等. 苦豆子总碱对大鼠实验性结肠炎中调节性 T 细胞及 Foxp3 mRNA 的表达影响[J]. 中华消化杂志, 2007, 27(10):708.

[8] Schumann R R. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes; a short review [J]. Res Immunol, 1992, 143(1):11.

[9] 黄丽华,王纯洁,纳仁高娃,等. 梔子苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 TLR4-NF- κ B 通路的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(10):1012.

[10] Atan R, Crosbie D, Bellomo R. Techniques of extracorporeal cytokine removal; a systematic review of the literature on animal experimental studies [J]. Int J Artif Organs, 2013, 36(3):149.

[11] 张琳娜,白洁. 苦豆子药理作用的研究进展[J]. 宁夏医学院学报, 2004, 26(3):214.

[12] 高晓原,贝鑫临,雷茜,等. 宁夏苦豆子资源基本情况及综合开发现状 [J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(2):17.

[13] 董玲,沈锡中. 免疫抑制剂与炎症肠病[J]. 世界临床药物, 2003, 24(10):597.

[14] 甘华田,欧阳钦,贾道全,等. 溃疡性结肠炎患者核因子- κ B 活化与细胞因子基因表达[J]. 中华内科杂志, 2002, 41(4):252.

[15] Linehan J D, Kolios G, Valatas V, et al. Immunomodulatory cytokines suppress epithelial nitric oxide production in inflammatory bowel disease by acting on mononuclear cells [J]. Free Radic Biol Med, 2005, 39(12):1560.

[责任编辑 聂淑琴]