

文章编号:1001-6880(2014)1-0131-05

聚合度 7-15 的壳寡糖抑制脂多糖刺激的单核细胞产生 TNF- α 和 IL-8 的作用研究

李 昱^{1,2},王文霞¹,许青松¹,李曙光¹,杜昱光^{1*}¹中国科学院大连化学物理研究所,大连 116023; ²中国科学院研究生院,北京 100049

摘要:本文通过建立脂多糖刺激的单核细胞炎症损伤模型,观察聚合度 7-15 的壳寡糖对炎性单核细胞白细胞介素-8 (IL-8) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达的影响,及对 p38 丝裂原激活的蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK) 信号通路磷酸化的影响。采用 p38 信号通路抑制剂 (SB203580) 验证抑制 p38 信号通路对脂多糖诱导的单核细胞表达 IL-8 和 TNF- α 的作用,从而探索壳寡糖抑制单核细胞炎性损伤的分子机制。结果表明壳寡糖可抑制脂多糖诱导的单核细胞表达 IL-8 和 TNF- α ,并且抑制 p38 信号蛋白的磷酸化水平。因此,初步认为壳寡糖可能通过抑制炎性 U937 细胞中 p38MAPK 信号通路抑制 IL-8 和 TNF- α 的表达。

关键词:壳寡糖;脂多糖;p38MAPK 信号通路;白细胞介素-8;肿瘤坏死因子- α

中图分类号:R965

文献标识码:A

Research on the Blockade Role of Chitosan Oligosaccharides with 7-15 Polymerization Degree on Expressions of TNF- α and IL-8 in Monocytes Stimulated by LPS

LI Yu^{1,2}, WANG Wen-xia¹, XU Qing-song¹, LI Shu-guang¹, DU Yu-guang^{1*}¹Dalian Institute of chemical physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;²Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: To investigate the molecular mechanism of anti-inflammatory functions of chitosan oligosaccharides (COS), the inflammatory models of highly expressed IL-8 and TNF- α were established by LPS-stimulation. The levels of IL-8 and TNF- α in LPS-induced monocytes and the phosphorylation of p38 MAPK in inflammatory monocytes were observed. Blockage effects of p38 on deducing inflammatory response of LPS-stimulated monocytes were verified by SB203580 treatment. Results showed that COS suppressed the expression of IL-8 and TNF- α and blocked the phosphorylation of p38 MAPK signaling protein in U937 cells induced by LPS. Hence, it was considered that COS might exert anti-inflammatory effects by inhibiting the production of IL-8 and TNF- α and p38 MAPK signaling pathway in LPS-stimulated U937 cells.

Key words: chitosan oligosaccharides; lipopolysaccharide; p38MAPK signaling pathway; IL-8; TNF- α

脂多糖作为革兰氏阴性菌外膜的组分,是动物宿主细胞对细菌的受体激动剂之一。宿主识别脂多糖益于感知细菌的存在,动员机体防御机制,但对脂多糖反应过强会导致严重的败血症。当脂多糖结合蛋白 (LPS-binding protein, LBP) 将脂多糖提呈到 CD14 上,介导其与高亲和性跨膜受体 (Toll-like re-

ceptor 4, TLR4) 结合,可导致丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 的激活,如 p38, 细胞外信号调节蛋白 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2) 和 c-jun NH₂ 末端激酶 (c-jun NH₂-terminal kinase, JNK), 以及早期促炎细胞因子的产生,如 TNF- α 、IL-1、IL-8 等^[1]。因此,探索机体通过何种机制抑制脂多糖诱导的炎症反应,对于缓解炎症损伤及败血症并发症具有重要意义。

壳聚糖是天然的阳离子多糖,具有抗肿瘤、免疫增强及抗菌等活性,且由于其可再生性、无毒及生物可降解性,应用范围广^[2]。但溶解性差的特性使壳

收稿日期:2013-03-20 接受日期:2013-06-30

基金项目:国家自然科学基金项目(31072065);国家高技术研究发展计划“863”(2012AA021501);“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD26B02-3)

* 通讯作者 Tel:86-411-84379061; E-mail:articles1805@gmail.com

聚糖在生物领域的应用受限。通过酶解制得的壳寡糖溶解性优于壳聚糖,某些生理活性也与壳聚糖不同。研究表明,壳寡糖可抑制脂多糖及 TNF- α 诱导的内皮细胞、肥大细胞及巨噬细胞等的炎症损伤^[3],但对于单核细胞炎症反应的抑制作用还鲜有报道。因此,本文以聚合度 7-15 的壳寡糖为研究对象,研究其对脂多糖诱导的单核细胞 U937 炎症反应的保护作用,为壳寡糖应用于炎症相关疾病的防治提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

壳寡糖(聚合度 7-15,脱乙酰度大于 95%)由本课题组制备,聚合度 7-聚合度 15 的壳寡糖含量分别为:4.45%、7.08%、10.49%、12.99%、13.77%、13.21%、11.53%、8.54%、5.64%。人单核细胞 U937(上海细胞库);RPMI1640 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(四季青);CCK-8 试剂(DOJINDO);脂多糖 055:B5(Sigma 公司);细胞总 RNA 抽提试剂 Trizol,逆转录试剂盒(Takara 公司);蛋白提取裂解液,BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天);PVDF 膜(Roche);p-p38 抗体,p38 抗体(Cell Signaling Technology 公司); β -actin 抗体,羊抗兔 IgG-HRP 二抗(Santa Cruz 公司);所有引物由宝生物(大连)公司合成;SB203580(Tocris Bioscience 公司)。 CO_2 培养箱(Nuaire 公司);低温高速离心机(HITACHI 公司);凝胶成像系统(UVP 公司);PCR 仪(ABI 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养

将人单核细胞 U937 细胞于 RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清,10⁵ U/L 青霉素,10⁵ U/L 链霉素)、5% CO_2 在 37 ℃ 培养箱中培养,传代。

1.2.2 细胞活力检测

96 孔板每孔加入 100 μL 5000 个细胞进行培养并给予 50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壳寡糖(聚合度 7-15)处理 U937 细胞 24 h,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,以加了相应量细胞培养液和 CCK-8 溶液但没有加入细胞的孔作为空白对照,在细胞培养箱内继续孵育 3 h,然后在 450 nm 测定吸光度。

1.2.3 总 RNA 提取与 RT-PCR

细胞于 6 孔板中培养,经药物处理一定时间后,用 PBS 洗 2 遍,用 Trizol 提取 U937 细胞总 RNA,然

后用 RT-PCR 试剂盒合成 cDNA,设计合成 IL-8、TNF- α 和 GAPDH 引物通过 PCR 反应扩增目的基因。引物序列如下:IL-8(240 bp)的引物序列:上游引物 5'-AGC CTT CCT GAT TTC TGC-3',下游引物 5'-TTC TCC ACA ACC CTC TGC-3';TNF- α (171 bp)的引物序列:上游引物 5'-AGA GTG ACA AGC CTG TAG CC-3';下游引物 5'-TGA AGA GGA CCT GGG AGT AGA T-3';GAPDH(382 bp)的引物序列:上游引物 5'-AAT CCC ATC ACC ATC TTC C-3';下游引物 5'-CAT CAC GCC ACA GTT TCC-3'。扩增条件:IL-8 和 GAPDH 为 94 ℃,30 s;52 ℃,30 s;72 ℃,30 s;33 个循环;TNF- α 为 94 ℃,30 s;55 ℃,30 s;72 ℃,30 s;33 个循环。PCR 扩增产物取 10 μL ,1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 Western blot 分析

2×10^5 细胞经 50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壳寡糖(聚合度 7-15)处理 24 h 后,用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 刺激细胞 15 min,收集细胞,冷 PBS 洗 2 次,加入 100 μL 裂解液提蛋白,用 BCA 法测蛋白浓度。将 30 μg 蛋白样品与 5 × Loading Buffer 混匀,沸水浴 5 min,经 8%~12% SDS-PAGE 电泳分离,之后将蛋白转移到 PVDF 膜上。5% BSA 封闭 1 h,随后与一抗磷酸化的 p38 及 p38 孵育,4 ℃ 过夜,之后用 TTBS 漂洗 3 次,每次 5 min。再与 HRP 偶联的二抗室温孵育 1 h。TTBS 洗涤 3 次后,用 ECL 化学发光试剂与二抗上的 HRP 标记反应后用 X 光片显影。

1.2.5 统计学分析

数据以($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示,应用 SPSS 13.0 软件进行 one-way ANOVA 方差分析,每个试验重复 3 次,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

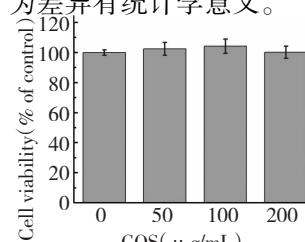


图 1 壳寡糖对 U937 细胞活力无显著影响

Fig. 1 COS had no obvious effect on cell viability of U937 cells. U937 cells were treated with COS (0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. The viability of the monocytes was described as a percentage of the vehicle-treated group. Data were presented as means \pm SD ($n = 3$).

2 试验结果

2.1 壳寡糖处理对 U937 细胞活力无显著影响

如图 1 所示,经 CCK-8 试剂检测证实,50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的壳寡糖对 U937 细胞活力与对照组相比无显著性差异。因此后续工作选用 50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的壳寡糖处理细胞。

2.2 脂多糖处理对 U937 细胞 IL-8 和 TNF- α 表达的刺激作用

本文选用浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖刺激单核细胞 U937 建立炎症损伤模型的依据来自于文献调研^[4,5],以该浓度脂多糖刺激细胞 15~180 min,观察脂多糖对 U937 细胞炎症因子 IL-8 和 TNF- α 的影响。如图 2 所示,脂多糖可刺激 U937 细胞过度表达 IL-8 和 TNF- α ,且在 60 min 时对 IL-8 和 TNF- α 的激活作用最为显著($P < 0.01$),因此后续选用 60 min 作为脂多糖刺激 U937 细胞建立炎症损伤模型的最佳刺激时间。

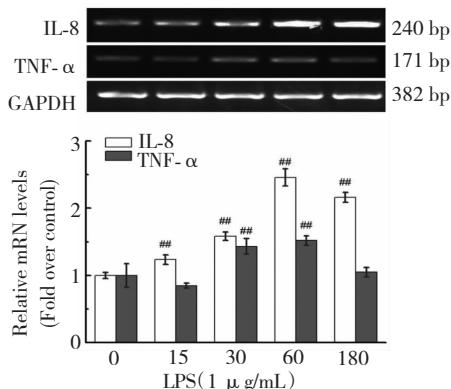


图 2 LPS 对 U937 细胞 IL-8 和 TNF- α 的表达的刺激作用

Fig. 2 Effects of LPS on expression of IL-8 and TNF- α in U937 cells. U937 cells were stimulated by LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for indicated time. Data were presented as means \pm SD ($n = 3$).

Compared to control group, ## $P < 0.01$

2.3 壳寡糖预处理对脂多糖刺激的 U937 细胞 IL-8 和 TNF- α 表达的抑制作用

如图 3 所示,以 50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壳寡糖预处理细胞 24 h,发现壳寡糖可显著抑制脂多糖所致的炎性 U937 细胞 IL-8 和 TNF- α 炎症因子的高表达,且 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壳寡糖对 IL-8 和 TNF- α 的抑制作用较好($P < 0.01$)。

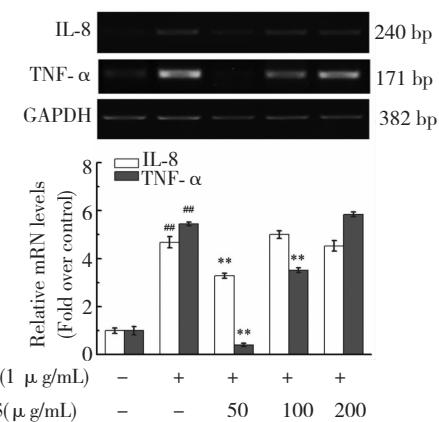


图 3 壳寡糖对 LPS 诱导的 U937 细胞 IL-8 和 TNF- α 表达的抑制作用

Fig. 3 The inhibitory role of COS in LPS-induced expression of IL-8 and TNF- α . U937 cells were pretreated by COS (50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h followed by LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) stimulation for 1 h. Data were represented as means \pm SD ($n = 3$).

$P < 0.01$ compared to the control group; * $P < 0.05$, and ** $P < 0.01$ compared to the LPS treatment group.

2.4 壳寡糖预处理对脂多糖诱导的 U937 细胞 p38 MAPK 信号通路磷酸化的抑制作用

脂多糖可以与其细胞表面受体结合,起始下游

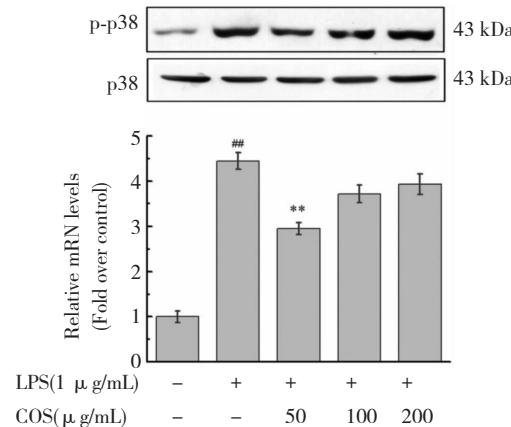


图 4 壳寡糖对 LPS 诱导的 U937 细胞 p38 信号通路磷酸化的抑制作用

Fig. 4 The inhibitory effects of COS on LPS-induced phosphorylation of p38 signaling pathway. U937 cells were pretreated with COS (50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h followed by LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) stimulation for 15 min. Data were represented as means \pm SD ($n = 3$).

$P < 0.01$ compared to the control group; ** $P < 0.01$ compared to the LPS treated group.

MAPK 信号通路磷酸化,并激活相关炎性基因的启动。因此推测 p38 MAPK 信号通路作为重要的真核生物炎症相关信号传递网络,是壳寡糖发挥抗炎作用的潜在机制。以 50~200 μg/mL 壳寡糖预处理细胞 24 h,发现壳寡糖处理可抑制脂多糖诱导的 U937 细胞 p38 磷酸化水平,且 50 μg/mL 壳寡糖的抑制作用较好($P < 0.01$) (如图 4)。

2.5 p38MAPK 信号通路在脂多糖诱导的单核细胞中过表达 IL-8 和 TNF-α 的作用

为阐明 p38MAPK 信号通路参与了脂多糖诱导的 IL-8 和 TNF-α 产生,使用 p38 特异性抑制剂 SB203580 预处理单核细胞 1 h,接着以 1 μg/mL 脂多糖处理细胞 1 h,发现脂多糖对炎症因子 IL-8 和 TNF-α 的刺激作用被抑制,说明 p38MAPK 信号通路在脂多糖诱导的单核细胞炎症反应过程中发挥作用。

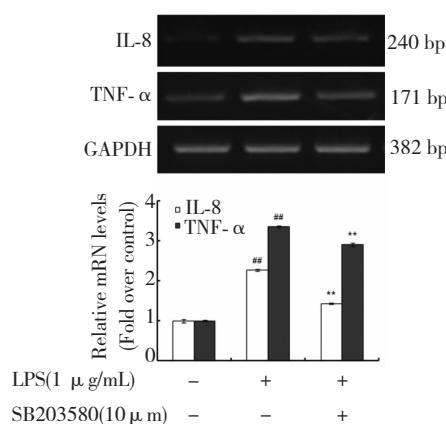


图 5 p38 抑制剂 SB203580 处理 U937 细胞可抑制 LPS 诱导的 IL-8 和 TNF-α 的表达

Fig. 5 p38 signaling pathway inhibitor SB203580 suppressed LPS-stimulated expression of IL-8 and TNF-α in U937 cells. U937 cells were treated with SB203580 (10 μM) for 1 h then stimulated by LPS for 1 h. Data were represented as means ± SD ($n = 3$). *** $P < 0.01$ compared to the control group; ** $P < 0.01$ compared to the LPS treated group.

3 讨论

炎症反应在机体健康和疾病状态中均扮演重要角色,它是宿主对感染或组织浸润的基本反应。机体单核巨噬细胞受到脂多糖刺激可释放多种细胞因子的产生,如 TNF-α、IL-1β 和 IL-6,导致发热、休克、器官衰竭和死亡。因此脂多糖可作为潜在的抗炎药物靶点。研究发现壳寡糖有抑菌活性,且对内皮细

胞、巨噬细胞等的炎症反应均有抑制作用,壳寡糖究竟通过何种机制抑制机体炎症反应有待于进一步探索阐明。

本文选择单核细胞 U937 为研究对象,以脂多糖为炎症刺激物,探讨壳寡糖抗炎的分子机制,为壳寡糖作为潜在的抗炎制剂提供理论支持。根据前期工作基础,在研究聚合度 2~8 的壳寡糖抗炎活性时选择 50~200 μg/mL 浓度处理细胞,且发现其抗炎作用具有浓度依赖性,在 100 或 200 μg/mL 浓度时对氧化或生物刺激的保护作用较好,因此在观察聚合度 7~15 的壳寡糖抗炎效果时也选择了同样浓度范围处理细胞,但在浓度为 50 μg/mL 时取得了显著的抗炎效果,对 IL-8 和 TNF-α 的抑制率分别达到了 29.86% 和 92.66%。高聚合度壳寡糖的分子量比低聚合度壳寡糖的分子量高,暴露的氨基酸数量相对也多,因此,高聚合度壳寡糖与细胞结合的能力也比低聚合度壳寡糖强^[6],这为解释聚合度 7~15 的壳寡糖在低浓度即有有效的抗炎效果提供了参考,而本结果也佐证了这一理论。

p38MAPK 信号通路是脂多糖诱导的重要下游通路。MAPKs 信号蛋白的磷酸化可激活相关转录因子,调节多种促炎细胞因子及介质的产生,如 NO,白细胞介素,TNF-α 及粘附分子等^[7,8]。壳寡糖抑制脂多糖诱导的单核细胞 IL-8 和 TNF-α 的产生是否是通过阻断 p38 通路蛋白磷酸化实现有待于验证。以 50~200 μg/mL 壳寡糖预处理 U937 细胞 24 h,观察炎性单核细胞 p38 蛋白的磷酸化,发现壳寡糖可抑制脂多糖刺激的 p38 蛋白磷酸化。应用 p38 通路特异性抑制剂 SB203580 可抑制脂多糖刺激的单核细胞产生 IL-8 和 TNF-α,此现象与壳寡糖的作用一致,说明 p38 信号通路在壳寡糖抑制脂多糖诱导的单核细胞产生 IL-8 和 TNF-α 过程中扮演重要角色,即壳寡糖通过阻止脂多糖导致的细胞内信号级联反应及炎症因子的产生抑制单核细胞细菌性炎症反应。此外,壳寡糖能否通过影响细胞表面信号的产生从而中和脂多糖或缓解脂多糖信号级联反应的起始还有待于深入研究。

4 结论

本试验采用脂多糖诱导的单核细胞炎症模型系统,通过对炎症因子的抑制作用证实壳寡糖是一种有效的抗炎物质,在浓度为 50 μg/mL 时对 IL-8 和 TNF-α 表达的抑制率分别可达 29.86% 和 92.66% ,

且可有效抑制 p38MAPK 的磷酸化, 抑制率达 33.58%。表明壳寡糖是天然有效的外源性抗炎物质。

参考文献

- 1 Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 1996, 87:2095-2147.
- 2 Jeon YJ, Shahidi F, Kim SK. Preparation of chitin and chitosan oligomers and their application in physiological functional foods. *Food Rev Int*, 2000, 16:159-176.
- 3 Xia WS, Liu P, Zhang JL, et al. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25:170-179.
- 4 Austenaa LM, Carlsen H, Hollung K, et al. Retinoic acid dampens LPS-induced NF-kappaB activity: results from human monoblasts and in vivo imaging of NF-kappaB reporter mice. *J Nutr Biochem*, 2009, 20:726-734.
- 5 Shao DZ, Lin M. Platonin inhibits LPS-induced NF-kappaB by preventing activation of Akt and IKKbeta in human PB-MC. *Inflamm Res*, 2008, 57:601-606.
- 6 Wei X, Wang Y, Xiao J, et al. Separation of chitooligosaccharides and the potent effects on gene expression of cell surface receptor CR3. *Int J Biol Macromol*, 2009, 45:432-436.
- 7 Yoon WJ, Moon JY, Song G, et al. Artemisia fukudo essential oil attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF-kappaB and MAPK activation in RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48:1222-1229.
- 8 Kim JY, Shin JS, Ryu JH, et al. Anti-inflammatory effect of anemarsaponin B isolated from the rhizomes of Anemarrhenaaaspheleoides in LPS-induced RAW 264.7 macrophages is mediated by negative regulation of the nuclear factor-kappa B and p38 pathways. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47:1610-1617.

(上接第 80 页)

- 4 Manitto P, Monti D, Speranza G. Studies on Aloe. Part 6. conformation and absolute configuration of aloins A and B and related 10-C-Glucosyl9-anthrone. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1990, 1:1297-1300.
- 5 Yamamoto M, Masui T, Sugiyama K, et al. Anti-inflammatory active constituents of *Aloe arborescens* Miller. *Agric Biol Chem*, 1991, 55:1627-1629.
- 6 Okamura N, Hine N, Harada S, et al. Diastereomeric C-glucosylanthrones of *Aloe vera* leaves. *Phytochemistry*, 1997, 45: 1519-1522.
- 7 Still WC, Kahn M, Department AM. Rapid chromatographic

technique for preparative separations with moderate resolution. *J Org Chem*, 1978, 43:2923-2925.

- 8 Weber P, Hamburger M, Schafroth N, et al. Flash chromatography on cartridges for the separation of plant extracts: rules for the selection of chromatographic conditions and comparison with medium pressure liquid chromatography. *Fitoterapia*, 2011, 82:155-161.
- 9 Dagne E, Wyk BV, Stephenson D, et al. Three oxanthrones from *Aloe littoralis*. *Phytochemistry*, 1996, 42:1683-1687.
- 10 Park MK, Park JH, Shin YG, et al. Chemical constituents in *Aloe barbadensis*. *Arch Pharm Res*, 1997, 20:88-90.

(上接第 104 页)

- 5 Amiot J, Ancienne-Lorette L. Enzymatic hydrolysate of milk protein. US/2003/0130195 A1, 2003-07-10.
- 6 Zhang EX(张尔贤). The discussion of several problems in the cell culture Lactoprotein hydrolysate. *Amino Acids* (氨基酸杂志), 1986, 1:17-27.
- 7 Cui M(崔敏), Fu J(傅婕), Chi YL(迟原龙), et al. Comparison of ninhydrin colorimetry and formaldehyde titration in determination of collagen hydrolysate. *China Leather* (中国皮革), 2011, 40(7):1-4.

- 8 Xu J(徐娟), Lv JL(吕嘉枥). Determination of content of peptides in milk protein hydrolysates. *Food Sci Tech* (食品科技), 2010, 35:275-278.
- 9 Zhang H(张华), Xu CD(徐德昌), Yang X(杨鑫), et al. Determination of dissimilative amino acid in cerebroprotein hydrolysate. *Mod Inst* (现代仪器), 2006, 1:36-38.
- 10 Gu RZ(谷瑞增), Liu Y(刘艳), Lin F(林峰), et al. Application and research progress of protein hydrolysates in animal cell culture. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2012, 9:21-27.