

文章编号:1001-6880(2016)6-0922-06

中药提取物对钙调磷酸酶-活化T细胞核因子通路的抑制作用

刘 芳¹,林国超²,耿小双³,邓文娟³,翟春涛⁴,胡振林^{2*}

¹中国人民解放军第四五五医院药剂科,上海 200052;²中国人民解放军第二军医大学药学院生化药学教研室,上海 200433;³无限极(中国)有限公司,广州 510623;⁴上海莱博生物技术有限公司,上海 200233

摘要:通过研究多种具有清热解毒、除湿功效的中草药提取物对钙调磷酸酶-活化 T 细胞核因子(CaN-NFAT)信号通路的抑制作用发现天然的 CaN-NFAT 通路抑制剂。采用荧光素酶报告基因方法,检测多种中药提取物对 CaN-NFAT 信号通路影响;采用 CCK8 法检测中药提取物的非特异性细胞毒性。实验发现:多种中药提取物在 1 mg/mL 浓度时对 PMA/A23187 刺激的 K562 细胞内 CaN-NFAT 通路具有抑制作用,并且没有显著的细胞毒性作用;其中部分中药提取物在 0.25 ~ 1 mg/mL 剂量范围内对 CaN-NFAT 通路具有剂量依赖性的抑制作用,结果提示这些中药提取物中可能含有能够有效抑制 CaN-NFAT 信号通路的活性成分。

关键词:钙调磷酸酶;活化 T 细胞核因子;信号转导;细胞因子;炎症;中药提取物;湿疹

中图分类号:R967

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.6.018

Inhibitory Effect of Herbal Extracts on CaN-NFAT Pathway

LIU Fang¹, LIN Guo-chao², GAN Xiao-shuang³, DENG Wen-juan³, ZHAI Chun-tao⁴, HU Zhen-lin^{2*}

¹The 455th Hospital of PLA, Shanghai 200052, China; ²Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ³Infinitus (China) Co. Ltd, Guangzhou 510623, China; ⁴Shanghai Laibo Bio-chemical Co. Ltd, Shanghai 200233, China

Abstract: The present study was aimed to discover novel inhibitors of CaN-NFAT pathway from herbal extracts. The luciferase reporter assay was applied to screen the effective inhibitors of CaN-NFAT pathway from herbal extracts using K562 cells stably transfected with NFAT-driven luciferase reporter. CCK-8 assay was used to evaluate their cytotoxicity. The results of luciferase reporter assay and CCK8 cytotoxicity assay on a variety of herbal extracts showed that the herbal extracts of *propolis*, *Crataegus pinnatifida* Bunge, *Carthamus tinctorius* L., *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl, *Radix ranunculi ternati*, *Taraxacum mongolicum*, *Leonurus sibiricus* L., *Herba epimedii* effectively inhibited the activation of CaN-NFAT pathway in PMA/A23187-stimulated K562 cells at the concentration of 1 mg/mL without significant cytotoxicity. Dose-dependency study indicated that extracts of *Colla Apis*, *Crataegus pinnatifida* Bunge, *Carthamus tinctorius* L., *Artemisia carvifolia* and *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl inhibited the activation of CaN-NFAT signal pathway dose-dependently within the concentrations of 0.25~1 mg/mL. These results suggested that CaN-NFAT pathway might be one of the targets by which these herbs exert anti-inflammatory and immune-modulating effects, and that there might be inhibitors of CaN-NFAT pathway in these extracts.

Key words: calcineurin; NFAT; signal transduction; cytokine; herbal extract; inflammation; eczema

钙调磷酸酶(calcineurin, CaN)是迄今发现的唯一受 Ca^{2+} /钙调蛋白(CaM)调节的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶^[1,2]。CaN 参与多种细胞功能的调节,尤其在 T 细胞活化中起到调节枢纽的作用^[3,4]。CaN 主要介导活化 T 细胞核因子(NFAT)的脱磷酸反应,使其活化,进而启动 IL-2 等基因的转录,因此 CaN-

NFAT 信号通路在 T 细胞活化中起到关键的调节作用^[5]。钙调磷酸酶抑制剂环孢霉素、他克莫司(FK506)等是目前临幊上最有效的免疫抑制药物,近年来,钙调磷酸酶抑制剂他克莫司和吡美莫司的乳膏剂在临幊上治疗皮炎湿疹取得了很好的疗效,说明 CaN-NFAT 信号通路是研发抗皮炎药物的靶标。

中药治疗皮炎湿疹的疗效已经在长期中医临幊

实践中得到验证。目前报道治疗湿疹有效的各种方剂数以百计,但其物质基础和作用机制多未完全阐明。本课题通过研究多种具有清热解毒、除湿功效的中草药提取物对 CaN-NFAT 信号通路的抑制作用来发现天然的 CaN-NFAT 通路抑制剂。

1 实验材料

1.1 主要试剂

RPMI 1640 培养基、胎牛血清和 0.25% 胰酶细胞消化液购自 Gibco 公司; CCK8 试剂盒购自东仁化学科技有限公司。

1.2 细胞株

稳定转染 luc-NFAT 报告基因的人白血病细胞株 K562 (K562/NFAT-luc 细胞) 购自 Affymetrix 公司。

1.3 中药提取物

中药提取物采用 75% 乙醇提取,制备成 1 g/mL 生药浓度(100 g 中药材经提取后,制备成 100 mL 提取液)。

2 实验方法

2.1 细胞培养

K562/NFAT-luc 细胞采用悬浮培养方法,使用含有 10% FBS 的 1640 培养基中传代培养,细胞置于 37 °C, 5% CO₂, 相对湿度为 95% 的培养箱中培养,每三天传代一次。

2.2 荧光素酶活性检测

采用 Promega 公司的 the Luciferase Assay System 试剂盒按厂家说明书进行。

2.3 验证已知的 CaN-NFAT 通路抑制剂对 PMA/A23187 刺激的报告基因表达的影响

将 FK506 用培养基稀释,加入到 K562/NFAT-luc 细胞培养液中至终浓度 1 μM,将硫酸锌用培养基稀释至适当浓度,加入到细胞培养液中至终浓度 6.25、12.5、25、50 μM,培养 1 h。将 PMA、A23187 用培养基稀释并加入细胞培养液中至终浓度为 PMA(20 ng/mL)、A23187(1 μM)。刺激细胞 8 h, 收集细胞, 检测细胞裂解液的荧光素酶活性。

2.4 检测中药提取物对 NFAT 驱动的荧光素酶报告基因表达的影响

将 FK506 用培养基稀释,加入到 K562/NFAT-luc 细胞培养液中至终浓度 1 μM,作为阳性药。将中药提取物用培养基稀释至适当浓度,加入到细胞

培养液中至终浓度 0.2 mg/mL 或 1 mg/mL,培养 1 h。将 PMA、A23187 用培养基稀释并加入细胞培养液中至终浓度为 PMA(20 ng/mL)、A23187(1 μM)。刺激细胞 8 h, 收集细胞, 检测细胞裂解液的荧光素酶活性。

2.5 CCK8 法检测中药提取物的细胞毒性

将中药提取物用培养基稀释至适当浓度,加入到 K562/NFAT-luc 细胞培养液中至终浓度 1 mg/mL, 孵育 24 h, 加入 10 μL CCK-8 试剂, 孵育 1.5 h, 450 nm 处测定吸光度。

2.6 中药提取物的 CaN-NFAT 通路抑制作用量效关系研究

将 FK506 用培养基稀释,加入到 K562/NFAT-luc 细胞培养液中至终浓度 1 μM, 作为阳性药。将中药提取物用培养基稀释至适当浓度,加入到细胞培养液中至终浓度 0.25、0.5、1 mg/mL, 培养 1 h。将 PMA、A23187 用培养基稀释并加入细胞培养液中至终浓度为 PMA(20 ng/mL)、A23187(1 μM)。刺激细胞 8 h, 收集细胞, 检测细胞裂解液的荧光素酶活性。

2.7 统计学处理

定量数据以 Mean ± SEM 表示,用 SPSS11.0 统计软件进行方差分析,多组间采用 One-Way ANOVA 分析,方差非齐性则采用非参数检验, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

3 实验结果

3.1 已知 CaN-NFAT 通路抑制剂(FK506 和硫酸锌)对 PMA/A23187 刺激的报告基因表达的影响

PMA 和 A23187 可以模拟 T 细胞受体信号激活 CaN-NFAT 通路, 本研究选用 Affymetrix 公司稳定转染 NFAT 驱动的荧光素酶报告基因(luc-NFAT)的 K562/NFAT-luc 细胞系, 以 PMA 和 A23187 作为刺激剂, 作为检测 CaN-NFAT 通路抑制的细胞模型。FK506 和硫酸锌为已知的 CaN-NFAT 通路抑制剂, 为了确定我们的报告基因实验系统是否可用于 CaN-NFAT 通路抑制剂的研究, 我们首先检测了 FK506 和硫酸锌对 PMA/A23187 刺激的报告基因表达的影响, 结果表明: FK506 在 1 μM 浓度时对 PMA/A23187 刺激的报告基因表达具有非常显著的抑制作用, 硫酸锌在 6.25 ~ 50 μM 浓度范围内也能剂量依赖性地抑制 PMA/A23187 刺激的报告基因表达(图 1)。上述结果表明本实验系统可以用于

CaN-NFAT 通路抑制剂的研究。

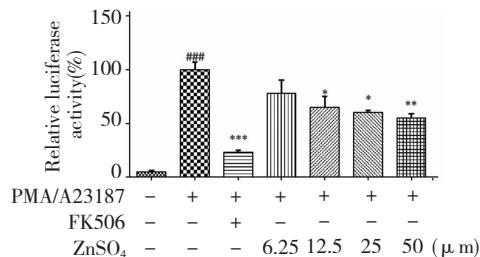


图 1 FK506 和硫酸锌对 PMA/A23187 刺激的报告基因表达的影响

Fig. 1 Inhibitory effects of FK506 and zinc sulfate on PMA/A23187-stimulated expression of reporter luciferase

Note: K562 cells transfected with NFAT-luciferase reporter were incubated with FK506 (1 μ M) and zinc sulfate (6.25-50 μ M) for 1 h and were then stimulated with 20 ng/mL of PMA and 1 μ M of A23187 for 8h. Luciferase activity was measured with a lumimometer. The experiments were performed in triplicate and data were presented as mean \pm SEM, * * $P < 0.01$, * * * $P < 0.001$ vs. PMA/A23187 alone by student t-test.

3.2 中药提取物对 NFAT 驱动的荧光素酶报告基因表达的影响

为了寻找能够抑制 CaN-NFAT 通路的中药有效

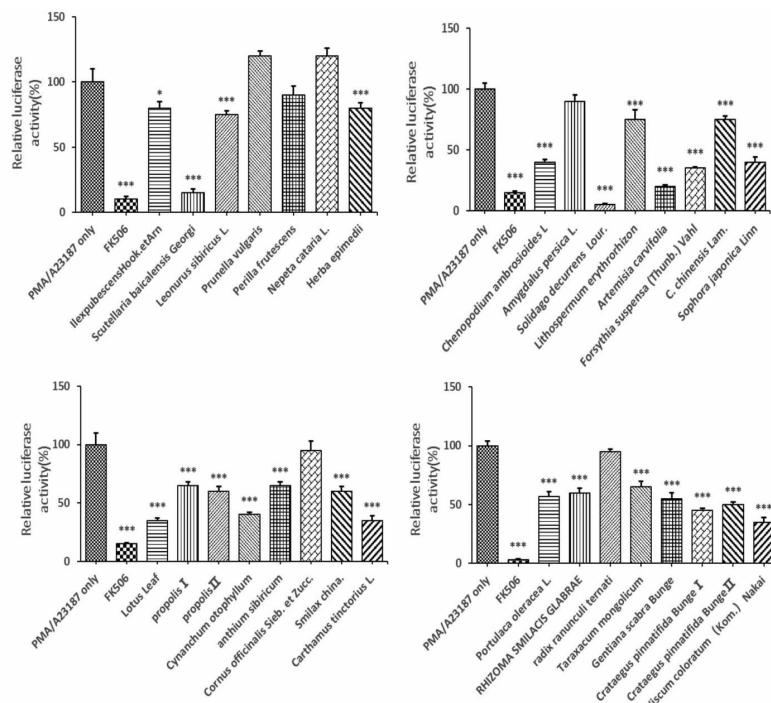


图 2 中药提取物在 1 mg/mL 浓度时对 PMA/A23187 刺激的荧光素酶报告基因表达的影响

Fig. 2 Inhibitory effects of herbal extracts on PMA/A23187-stimulated expression of reporter luciferase

Note: K562 cells transfected with NFAT-luciferase reporter were incubated with 1 mg/mL of herbal extracts for 1 h and were then stimulated with 20 ng/mL of PMA and 1 μ M of A23187 for 8h. Luciferase activity was measured with a lumimometer. Data were presented as mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate, * * $P < 0.01$, * * * $P < 0.001$ vs. PMA/A23187 alone by student t-test.

成分, 我们选取了数十种具有清热解毒功效的中药制备中药提取物, 首先在 1 mg/mL 浓度下检测中药提取物对 PMA/A23187 刺激的荧光素酶报告基因表达的影响。

结果显示, 与只加刺激剂的模型组相比, 阳性药 FK506 组荧光强度显著降低, 说明 FK506 能够有效抑制 CaN-NFAT 通路的激活; 同时毛冬青 (*Ilex pubescens* Hook. et Arn.)、黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi)、益母草 (*Leonurus japonicus* L.)、淫羊藿 (*Herba epimedii*)、土荆芥 (*Chenopodium ambrosioides* L.)、一枝黄花 (*Solidago decurrens* Lour.)、紫草 (*Lithospermum erythrorhizon*)、青蒿 (*Artemisia carvifolia*)、连翘 [*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl]、菟丝子 (*C. chinensis* Lam.)、槐花 (*Sophora japonica* Linn)、荷叶 (LotusLeaf)、蜂胶 (propolis)、白芍 (*Cynanchum otophyllum*)、苍耳子 (*Anthium sibiricum*)、菝葜 (*Smilax china*)、红花 (*Carthamus tinctorius* L.)、马齿苋 (*Portulaca oleracea* L.)、土茯苓 (*Rhizoma smilacis Glabrae*)、猫爪草 (*Radix ranunculi ternati*)、蒲公英 (*Taraxacum mongolicum*)、龙胆 (*Gentiana scabra* Bunge)、山楂 (*Crataegus pinnatifida* Bunge)、槲寄生

[*Viscum coloratum* (Kom.) Nakai] 等中药提取物在 1 mg/mL 浓度下能够显著降低报告基因荧光强度, 提示上述中药提取物能够抑制报告基因荧光素酶表达(图 2)。

将上述实验中发现的具有抑制活性的中药提取

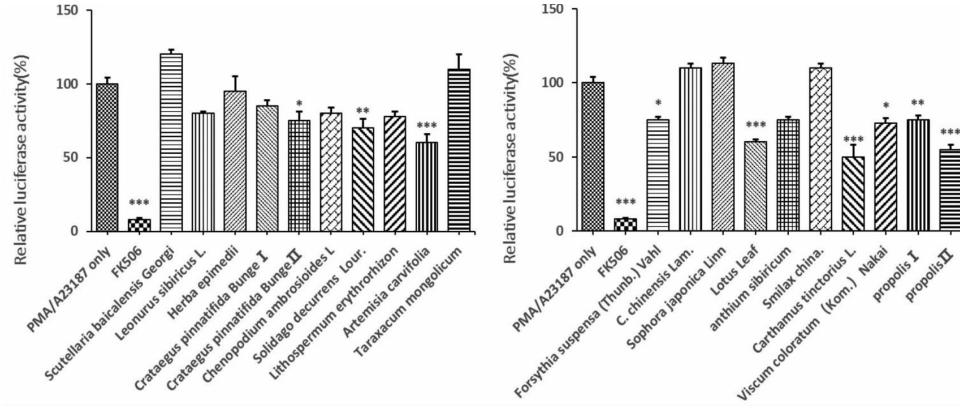


图 3 中药提取物在 0.2 mg/mL 浓度时对 PMA/A23187 刺激的荧光素酶报告基因表达的影响

Fig. 3 Inhibitory effects of 0.2 mg/mL of herbal extracts on PMA/A23187-stimulated expression of reporter luciferase

Note: K562 cells transfected with NFAT-luciferase reporter were incubated with 0.2 mg/mL of herbal extracts for 1 h and were then stimulated with 20 ng/mL of PMA and 1 μM of A23187 for 8 h. Luciferase activity was measured with a luminometer. Data were presented as mean ± SEM of three independent experiments performed in triplicate, * * P < 0.01, * * * P < 0.001 vs. PMA/A23187 alone by student t-test.

3.3 中药提取物的细胞毒性

图 2 和 3 实验中中药提取物对荧光素酶表达的抑制作用既可能是由于抑制了 CaN-NFAT 通路的激活所致,也可能是由于非特异性的细胞毒性所致,所以,排除中药提取物的非特异性细胞毒性,有助于确认中药提取物对荧光素酶的抑制作用是抑制了 CaN-NFAT 通路的激活,从而抑制了荧光素酶的表达。为此我们采用 CCK-8 法检测了中药提取物对 K562 细胞的细胞毒性。将 K562/NFAT-luc 细胞,以 2×10^4 cells/well 接种于 96 孔板,培养 24 h,加入 1 mg/mL 的中药提取物孵育 24 h,加入 10 μL CCK-8 试剂,孵育 1.5 h,450 nm 处测定吸光度。结果显示:蜂胶、红花、猫爪草、蒲公英、益母草、淫羊藿、山楂、青蒿、连翘提取物在 1 mg/mL 浓度作用 24 h 无明显细胞毒作用,提示这些中药提取物对报告基因表达的抑制作用并非是由于细胞毒性所致;而毛冬青、黄芩、土荆芥、一枝黄花、紫草、菟丝子、槐花、荷叶、白芍、苍耳子、菝葜、红花、马齿苋、土茯苓、龙胆、槲寄生等提取物在 1 mg/mL 浓度下存在明显的细胞毒作用(图 4),这些中药提取物对报告基因表达的抑制作用很可能是由于细胞毒性所致,无法判断其对 CaN-NFAT 通路激活是否有抑制作用。

3.4 中药提取物对 CaN-NFAT 通路抑制作用量效关系研究

综合图 2~4 的实验结果,青蒿、连翘、红花、蜂胶的提取物在 0.2 mg/mL 和 1 mg/mL 浓度下都能够明显抑制 PMA/A23187 刺激的荧光素酶报告基因表达,并且在 1 mg/mL 浓度下无细胞毒性;益母草、紫苏、淫羊藿、蒲公英在 0.2 mg/mL 浓度下对 CaN-NFAT 通路的激活无抑制作用,但在较高浓度 1 mg/mL 时对荧光素酶报告基因表达有明显的抑制作用并且无细胞毒作用;毛冬青、黄芩、土荆芥、一枝黄花、紫草、菟丝子、槐花、荷叶、白芍、苍耳子、菝葜、红花、马齿苋、土茯苓、龙胆、槲寄生等提取物在 1 mg/mL 浓度下虽能明显抑制荧光素酶报告基因表达,但同时又明显的细胞毒性;夏枯草、荆芥、桃花、山茱萸、猫爪草等在 1 mg/mL 浓度下对荧光素酶的表达无抑制作用。

为了进一步探究中药提取物对 CaN-NFAT 通路的抑制作用,选取了作用较强而无细胞毒性的山楂、青蒿、连翘、红花、蜂胶提取物进行量效关系研究。将稳转了 luc-NFAT 报告基因的 K562 细胞,以 2×10^5 cells/well 接种于 12 孔板,培养 24 h,以 FK506 作为阳性化合物,加入不同浓度的中药乙醇提取物(0.25~1 mg/mL),孵育 1 h,然后加入刺激剂 PMA

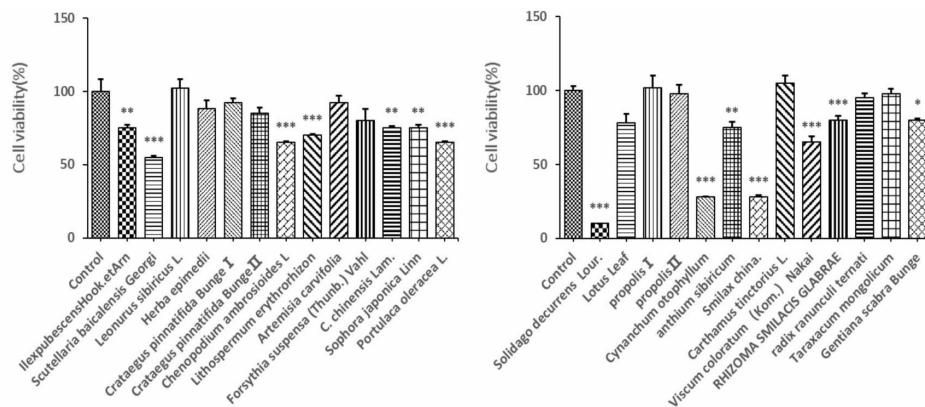


图 4 中药提取物的细胞毒性

Fig. 4 Effects of herb extracts on cellular viability

Note: K562 cells were incubated with 1 mg/mL of herb extracts for 24 h and then incubated with CCK-8 for 1.5 h, OD was measured at 450 nm and normalized to medium control. Data were presented as mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. medium control by student t-test.

(20 ng/mL) 和 A23187(1 μ M) 刺激细胞 8 h, 收集细胞, 测定荧光强度。结果发现山楂、青蒿、连翘、红花

和蜂胶提取物能够剂量依赖性的抑制荧光素酶报告基因表达(图 5)。

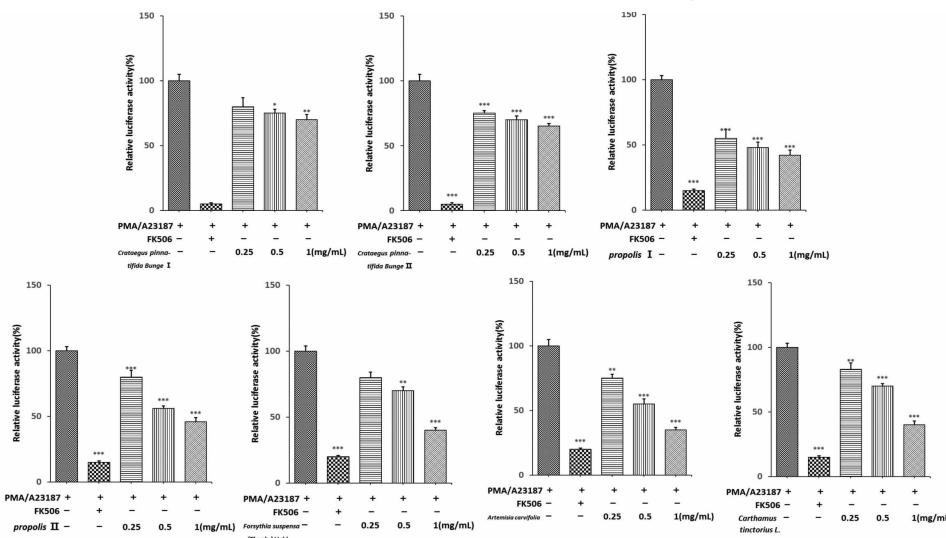


图 5 中药提取物抑制荧光素酶报告基因表达的量效关系

Fig. 5 Dose-dependency of inhibition on PMA/A23187-stimulated expression of reporter luciferase by herbal extracts

Note: K562 cells transfected with NFAT-luciferase reporter were incubated with indicated concentrations of herbal extracts for 1 h and were then stimulated with 20 ng/mL of PMA and 1 μ M of A23187 for 8 h. Luciferase activity was measured with a luminometer. Data were presented as mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. PMA/A23187 alone by student t-test.

4 讨论

湿疹是一种由于免疫紊乱所导致的皮肤炎症性疾病, 主要病理特征为皮肤起红斑、丘疹、水疱、甚至糜烂渗出, 并伴有剧烈瘙痒, 发病率高, 易反复发作, 病程迁延难愈。传统的湿疹治疗药物包括激素、抗组胺药、抗炎药等, 这些药物可以暂时缓解症状, 但

停药后往往复发, 且病情加重, 甚至转为慢性。许多药物尤其是激素类药物长期使用有严重的毒副作用。

钙调磷酸酶抑制剂类药物作为湿疹的新型治疗药物, 近年来取得了良好的临床治疗效果, 说明 CaN-NFAT 信号通路是湿疹治疗的有效靶标, 但目前临床使用的钙调磷酸酶抑制剂钙调磷酸酶抑制剂

FK506 等也有局限性,如价格昂贵,系统性使用有毒副作用和免疫抑制作用,因此只能外用,长期使用甚至有可能诱发皮肤癌、淋巴瘤等。鉴于钙调磷酸酶抑制剂类药物在治疗湿疹等皮肤病方面的显著疗效和局限性,以 CaN-NFAT 信号通路为靶标寻找更加安全、有效、甚至作用温和的 CaN-NFAT 通路抑制剂对研发新型的抗炎药物有重要意义。

应用传统中药治疗炎症性皮肤病在我国有着悠久的历史,中草药是发现活性抗炎成分的重要来源^[6]。并且在传统中医药治疗皮炎湿疹的处方中,诸多药方含有益母草、红花、山楂、青蒿、蜂胶、蒲公英等成分,这也说明了这些中药提取物具有治疗皮炎湿疹的可能^[7-10]。虽然当前中草药在湿疹治疗取得了一定的临床疗效,但由于其作用机制和物质基础不明,限制了中药制剂的标准化和疗效的进一步提高。中药的成分复杂,可能作用于多个靶点,从而影响多条通路,发挥彼此协同的作用。以植物为主要来源的中草药是我们中华民族的传统瑰宝,中药与西药的区别在于其多成分、多靶点、多途径的特征。

本课题的研究结果表明,这些中药的提取物能抑制 CaN-NFAT 信号通路的激活,这一方面提示 CaN-NFAT 信号通路可能是上述中药发挥抗炎和免疫调控功效的重要靶标之一,另一方面也提示蜂胶、红花、猫爪草、蒲公英、益母草、淫羊藿、山楂、青蒿、连翘等中药提取物中可能含有能够有效抑制 CaN-NFAT 信号通路的活性成分,进一步进行该信号通路抑制活性指导下的活性成分分离,有可能发现新的 CaN-NFAT 信号通路抑制剂,有助于探明中药治疗湿疹的物质基础。

另外,本课题的研究结果还提示,抑制 CaN-NFAT 信号通路可能是中药治疗湿疹的作用机制之一,这对进一步探明中药的多靶点多通路的药理学机制提供了有价值的线索。尽管从本研究的结果看,中药提取物的作用与 FK506 相比较较弱,但通过与中药其他成分作用的其他通路协同发挥作用,有可能产生较强疗效;再者,中草药中的提取的天然化合物的药理活性一般比较弱,但其优点是具有相对的安全、经济的特点;另外,中草药与化学药物合用,可能出现协同、相加效应。例如,在临床实践中,

盐酸小檗碱可显著增加肾移植受者 CsA 的全血浓度,较大幅度的减少 CsA 剂量,有望成为节省 CsA 昂贵费用的手段^[11]。沿着这一思路,这些活性中药协同 FK506 治疗湿疹的作用也值得进一步深入研究。

致谢:感谢上海莱博生物技术有限公司的卞春亮和贺改英在制备提供本研究所涉及的中药提取物和论文写作方面所提供的帮助。

参考文献

- 1 Aramburu J, Rao A, Klee CB. Calcineurin: from structure to function. *Curr Top Cell Regul*, 2000, 36:237-295.
- 2 Klee CB, Draetta GF, Hubbard MJ. Calcineurin. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1988, 61:149-200.
- 3 Aramburu J, Heitman J, Crabtree GR. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep*, 2004, 5: 343-348.
- 4 Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*, 2000, 80:1483-1521.
- 5 Ye Q, Feng Y, Yin Y, et al. Structural basis of calcineurin activation by calmodulin. *Cell Signal*, 2013, 25:2661-2667.
- 6 Zhao JC(赵津成). 中药治疗皮肤湿疹临床研究. *Inner Mongol J Tradit Chin Med*(内蒙古中医药), 2014, 26:30-31.
- 7 Miao MS(苗明三), Zhang XX(张雪侠), Wu W(吴巍). Effect of Herba Leonuri on pruritus and eczema animal models. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*(中药新药与临床药理杂志), 2013, 24:540-543.
- 8 Feng YL(冯悦龙), Liu YQ(刘瑛琦). 青蒿鳖甲汤加减治疗日光性皮炎 72 例观察. *J Pract Tradit Chin Med*(实用中医药杂志), 2014, 30:822-823.
- 9 Yang YF(杨玉峰), Wang YX(王一鑫), Huang J(黄晶), et al. 蒲公英在治疗亚急性湿疹中的临床应用. *J Hebei Tradit Chin Med Pharmacol*(河北中医药学报), 2013, 28(4):25-26.
- 10 Zhang J(张娟), Li J(李娟), Qi XG(祁秀格). 西红花雪莲汤综合治疗急慢性湿疹 58 例疗效观察. *Ningxia Med J*(宁夏医学杂志), 2014, 36:850-851.
- 11 Huang XS(黄雪珊), Yang GF(杨国锋), Pan YC(潘禹辰), et al. Effect of Berberine Hydrochloride on blood concentration of cyclosporine A in cardiac transplanted recipients. *Chin J Integr Tradit Western Med Digest*, 2008, 28:702-704.