

溃结灵对 Caco-2 炎症细胞模型 I κ B α 基因和蛋白表达的作用

柴玉娜, 杜 群, 李燕舞, 巫燕莉, 郭 珍, 陈 昀(广州中医药大学脾胃研究所, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察溃结灵对白介素-1 β (IL-1 β)刺激的 Caco-2 炎症细胞模型核因子抑制蛋白- κ B(I κ B α)基因表达及蛋白表达的作用, 对其抗溃疡性结肠炎(UC)作用机制进行探讨。**方法** 将生长融合至 70 %~80 %的 Caco-2 细胞分为 7 个组: 正常对照组、模型组、蛋白酶抑制剂组、阳性药柳氮磺胺吡啶组(SASP)及溃结灵高、中、低剂量组。IL-1 β 刺激细胞建立炎症模型, 收集细胞标本。采用实时荧光定量 PCR 方法检测 Caco-2 细胞 I κ B α 的基因表达, Western blot 方法检测其蛋白表达。**结果** IL-1 β 刺激的 Caco-2 炎症细胞中, 模型组 I κ B α 基因表达明显低于正常对照组($P < 0.05$), 溃结灵中剂量组 I κ B α 基因表达明显高于模型组($P < 0.05$); IL-1 β 刺激的 Caco-2 细胞炎症中, 模型组 I κ B α 蛋白表达低于正常对照组, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 而溃结灵高剂量组 I κ B α 蛋白表达明显高于模型组 ($P < 0.01$)。**结论** 溃结灵对 IL-1 β 刺激的 Caco-2 炎症细胞 I κ B α 基因和蛋白的表达有上调作用, 其抗 UC 作用的机理可能为抑制 I κ B α 蛋白的降解, 最终抑制 NF- κ B 的活化, 减轻炎症反应。

关键词: 溃结灵; 溃疡性结肠炎; Caco-2 细胞; 核因子抑制蛋白- κ B; 白细胞介素-1 β

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)01-0014-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.004

Effect of Kujieling Decoction on I κ B α Gene and Protein Expression in Caco-2 Cell Model

CHAI Yuna, DU Qun, LI Yanwu, WU Yanli, GUO Zhen, CHEN Xu (Pi-Wei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Kujieling Decoction(KD)on nuclear factor profilin kappa B(I κ B α) gene and protein expression in Caco-2 cell model induced by interleukin-1 β (IL-1 β), and to explore its possible mechanism. **Methods** Caco-2 cells in the growth density of 70%-80% were divided into seven groups: normal group, model group, proteasome inhibitor bortezomib group, positive drug salazosulfapyridine (SASP)group, and high-, middle- and low-dose HD groups. The cells were stimulated by IL-1 β for the establishment of cell model of inflammation. Real-time quantitative PCR and Western blotting technique were used to detect gene and protein expression of I κ B α , respectively. **Results** The relative gene expression level of I κ B α in the model group was lower than that in the normal group ($P < 0.05$), and was significantly higher in the middle-dose KD group than that in the model group ($P < 0.05$). The relative protein expression level of I κ B α was lower in the model group than that in the normal group, but the difference was insignificant($P > 0.05$). High-dose KD group had significantly higher I κ B α protein expression level than the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** KD has an effect on the up-regulation of the gene and protein expression levels of I κ B α in Caco-2 cell induced by IL-1 β , and its anti-ulcerative colitis mechanism is probably related to reducing the degradation of I κ B α , and finally inhibiting the activation of NF- κ B and relieving inflammatory reaction.

Keywords: Kujieling Decoction; Ulcerative Colitis; Caco-2 cells ; I κ B α ; Interleukin-1 β

收稿日期: 2012-08-01

作者简介: 柴玉娜, 女, 硕士研究生。研究方向: 中药药理。Email: 460071262@qq.com。通讯作者: 杜群, 研究员, 研究方向: 中西医结合中药药理。Email: duqun@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30873421)。

溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)又称非特异性溃疡性结肠炎,是炎症性肠病(IBD)的一种。核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是最重要的炎症调控因子,在 UC 炎症中发挥着关键作用,是多种抗炎药物的靶标^[1-3]。前期研究表明溃结灵含药血清对 TNF- α 及 IL-1 β 诱导的 Caco-2 炎症细胞模型细胞 NF- κ Bp65DNA 结合活性有下调的作用^[4]。为探讨其可能的作用机制,本实验用 IL-1 β 刺激 Caco-2 细胞建立炎症模型采用实时定量 PCR 法观察溃结灵对 NF- κ B 的抑制蛋白 I κ B α 的基因表达,免疫印迹(Western blot)法观察溃结灵对 I κ B α 的蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠,SPF 级,雄性,体质量 180~220 g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(粤)2008-0002。

1.2 药物 溃结灵复方,由救必应、白术、白芍、水蛭等组成,药材购于采芝林连锁药店,经广州中医药大学中药鉴定教研室喻良文老师鉴定,所购药材均符合《中华人民共和国药典标准》。按组方比例称取药材,常规方法制备水煎液。柳氮磺胺吡啶(SASP),批号:20101210,上海三维制药有限公司,用作阳性对照药物,按照说明书大鼠取 10 倍成人用量,即给药剂量为 0.5 g·kg⁻¹,用蒸馏水配成 50 g·L⁻¹ 浓度的混悬液备用。

1.3 试剂及仪器 Caco-2 细胞株,脾胃所李茹柳教授惠赠;胎牛血清(Charaterized FBS),中国医学科学院生物医学工程研究所;DMEM 培养基,Invitrogen Corporation,批号:1272041;白介素-1 β ,PEPRO TECH,批号:1202B95R1;Trizol,美国 Invitrogen 公司;两步法逆转录试剂盒,美国 Invitrogen 公司;PCR 试剂盒,北京天为时代科技有限公司;I κ B α 的 PCR 引物,大连宝生物工程有限公司;GAPDH 的 PCR 引物,上海生工生物工程技术有限公司;实时定量 PCR 试剂盒,宝生物工程大连有限公司,货号:DRR041A;Biovision mammalian cell Extraction kit 试剂盒,美国 Biovision 公司,批号:50569;凯基 BCA 蛋白含量检测试剂盒,凯基生物公司,货号:KGPBCA;164-5050Bio-RAD 电泳仪,美国 Bio-RAD 公司;Western Breeze, invitrogen 公司,批号:815192; β -actin 一抗, Santa Cruz 公司,批号: H1709; I κ B α 一抗, Cell Signaling 公司,批号:

0912009;羊抗小鼠二抗, bioworld 公司,批号: 315466;增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒, TIAN-GEN 公司,批号: J8303; GS-800Bio-RAD 扫描仪, 美国 Bio-RAD 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 含药血清的制备 溃结灵水煎液,救必应、水蛭、白术、白芍、炙甘草等常规制备,水浴浓缩至 2 g·L⁻¹ 备用。大鼠随机分为正常对照组、溃结灵组、柳氮磺胺吡啶(SASP)组。正常对照组按 10 mL·kg⁻¹ 体质量灌胃蒸馏水,溃结灵组按 10 mL·kg⁻¹ 体质量灌胃溃结灵水煎液(19.2 g·kg⁻¹), SASP 组按灌胃相同体积灌胃前述 SASP 水混悬液(0.5 g·kg⁻¹),动物给药 2 d,每天 1 次,然后禁食 24 h,再给药 2 次,间隔 2 h,末次给药后 1 h 腹主动脉取血(5 mL/只),离心取血清,56 ℃灭活 30 min,最后用 0.22 μ m 的针头滤器过滤,置于-20 ℃备用。药物血清在需要时均以空白血清稀释。

1.4.2 Caco-2 细胞培养 用含 20 %胎牛血清的 DMEM 培养液,将 Caco-2 细胞在 37 ℃、5 % CO₂ 培养箱条件下进行培养,3~4 d 可基本融合。将分化良好的 Caco-2 细胞接种于 6 孔板上,接种密度为 1×10⁷ 个/mL。

1.4.3 建立炎症细胞模型 Caco-2 细胞培养、生长融合至 70 %~80 %时换液,分为正常对照组(20 %正常血清),模型组(20 %空白血清),蛋白酶抑制剂组(20 %空白血清,并于细胞因子刺激前 1 h 加入 25 μ g·mL⁻¹ 的硼替佐米),溃结灵高、中、低剂量组(20 %、10 %、5 %含药血清), SASP 组(10 %含药血清)。培养 24 h 后,除正常对照组外,其余各组均加入 10 ng·mL⁻¹ 的 IL-1 β 刺激 30 min。取出细胞,吸弃旧液,终止刺激。

1.4.4 PCR 方法检测 I κ B α 基因表达 取以上培养的炎症细胞, PBS 冲洗一遍,以 Trizol 一步法提取总 RNA,琼脂糖电泳检测 RNA 完整性,紫外分光光度法测定 RNA 的浓度及纯度。按试剂盒说明书,每份样品取 1 μ g 总 RNA 逆转录合成 cDNA。使用 SYBR Green 嵌合荧光法进行实时定量 PCR 检测,保存结果并分析。采用比较 Ct 值定量方法进行相对定量,公式为 2^{- $\Delta\Delta$ Ct},其中 Δ Ct=Ct_{目的基因}-Ct_{看家基因},均值按 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 计算与模型组比较原始模板相差程度,公式为 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}(给药组)/2^{- Δ Ct}(模型组)。

GAPDH (序列号: NM 002046.4): 引物正义 5'

-AAGGTGAAGGT CCGAGTCAA -3', 反义 5'AAT-GAAGGGGTCATTGATGG-3'; IkB α (序列号: NM 020529.2): 引物正义 5'-CAGCAGCTCACCGAG-GAC-3', 反义 5'-AAAGCCAGGTCTCCCTTCAC-3'。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C, 10 s, 55 °C, 10 s, 72 °C, 30 s; 39 个循环; 95 °C 再延伸 10 s。

1.4.5 BCA 法蛋白定量测定 IkB α 蛋白表达 按照 Biovision mammalian cell Extraction kit 试剂盒说明书操作, 提取 Caco-2 细胞全细胞蛋白, 并用 BCA 法测定蛋白含量。蛋白样本变性后经 SDS-PAGE 电泳 (100 μ g/泳道)、转膜及一抗 4 °C 孵育过夜 (β -actin 1:1000、IkB α 1:1000), 二抗摇床孵育 2 h (HRP 标记的羊抗小鼠二抗 1:2000)。DAB 显色后用凝胶成像仪对蛋白含量进行密度分析, 以目的蛋白与 β -actin 的密度比值作为目的蛋白的相对含量, 并进行组间比较。

1.5 统计学处理方法 应用 SPSS11.0 软件进行统计学处理, 各组间均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 溃结灵对 IL-1 β 刺激的 Caco-2 细胞 IkB α mRNA 表达的影响 见表 1。模型组 IkB α 基因表达明显低于正常对照组 ($P < 0.05$), 溃结灵中剂量组 IkB α 基因表达明显高于模型组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 溃结灵对 IL-1 β 刺激的 Caco-2 细胞 IkB α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The effect of *Kuijieling* Decoction on the mRNA expression of IkB α in Caco-2 cell induced by IL-1 β

组别	<i>n</i>	含药血清浓度/%	$2^{-\Delta\Delta CT}$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
正常对照组	4	-	0.0417 $\pm$ 0.0055*	1.41
模型组	4	-	0.0295 $\pm$ 0.0063	
SASP 组	4	10	0.0420 $\pm$ 0.0144	1.42
蛋白酶抑制剂组	4	25 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$	0.0328 $\pm$ 0.0102	1.11
溃结灵高剂量组	4	20	0.0386 $\pm$ 0.0082	1.31
溃结灵中剂量组	4	10	0.0433 $\pm$ 0.0032*	1.47
溃结灵低剂量组	4	5	0.0281 $\pm$ 0.0036	0.95

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

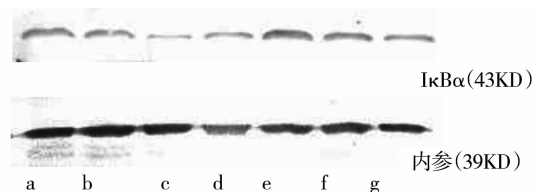
2.2 溃结灵对 IL-1 β 刺激的 Caco-2 细胞 IkB α 蛋白表达的影响 见表 2 及图 1。模型组 IkB α 蛋白表达低于正常对照组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。溃结灵高剂量组 IkB α 蛋白表达明显高于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 2 溃结灵对 IL-1 β 刺激的 Caco-2 细胞 IkB α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The effect of *Kuijieling* Decoction on protein expression of IkB α in Caco-2 cell induced by IL-1 β

组别	<i>n</i>	含药血清浓度/%	IkB α 蛋白含量
正常对照组	4	-	0.66 $\pm$ 0.11
模型组	4	-	0.54 $\pm$ 0.07
SASP 组	4	10	0.56 $\pm$ 0.04
蛋白酶抑制剂组	4	25 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$	0.84 $\pm$ 0.12**
溃结灵高剂量组	4	20	0.73 $\pm$ 0.05**
溃结灵中剂量组	4	10	0.64 $\pm$ 0.12
溃结灵低剂量组	4	5	0.57 $\pm$ 0.06

注: 与模型组比较: ** $P < 0.01$ 。



a. 正常对照组 b. 蛋白酶抑制剂组 c. 模型组 d. SASP 组 e. 溃结灵高剂量组高 f. 溃结灵中剂量组 g. 溃结灵低剂量组

图 1 IL-1 β 刺激的 IkB α 蛋白表达条带图

Figure 1 Protein expression of IkB α in Caco-2 cell induced by Interleukin-1 β

3 讨论

免疫功能异常是 UC 发病的关键因素之一, 包括炎症递质、细胞因子及免疫调节等多个方面。许多与此密切相关的细胞因子基因启动子或增强子部位均有 KB 位点, NF- κ B 在核内与 κ B 序列结合, 促进多种促炎性细胞因子, 如白细胞介素 (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8)、肿瘤坏死因子 (TNF- α) 等的基因转录。NF- κ B 是 UC 患者细胞因子释放的关键调控因素, 在 UC 的发生和发展中起着十分重要的作用。有资料表明 UC 黏膜在 NF- κ B 活性增高的同时伴有 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等水平上升^[5-6], IL-1 β 、TNF- α 可促进 NF- κ B 进一步活化, 从而促使炎症的发生。当细胞受到 IL-1 β 、TNF- α 、氧自由基、抗原等刺激时, NF- κ B 抑制蛋白 (IkB α) 迅速磷酸化, 从二聚体中解离出来, NF- κ B 从胞浆转移到胞核激活基因转录, 使细胞因子表达增强, 参与炎症反应、免疫反应、细胞凋亡及肿瘤发生^[7]。

典型的炎症刺激因子如 TNF, IL-1 β 及 LPS 等通

常在数分钟内促使 I κ Bs(尤其是 I κ B α)发生降解。首先 I κ B α 在激酶复合物 IKK 的作用下被磷酸化,磷酸化发生在 I κ B α 分子中 Ser32 和 ser36 两个位点^[8-9]。磷酸化后的 I κ B α 被泛素连接酶复合物 SCF (SkP-1/Cul/F-box)家族成员 E3RSI κ B/ β -TrCP 识别^[10],从而促使 I κ B α 分子中的 Lys21 及 Lys22 泛素化^[11-12],然后被 26 S 蛋白酶体识别并迅速降解。I κ B α 的降解使 NF- κ B 的核定位序列暴露出来,进入核内启动转录。

IL-1 家族成员包括 IL-1 α 和 IL-1 β ,在人体内,IL-1 的活性主要由 IL-1 β 调控。目前,IL-1 β 已被公认为与 UC 的发病密切相关,它由单核巨噬细胞产生,并能介导 UC 发病的细胞因子之一,可以产生对中性粒细胞等炎症细胞的趋化作用,吸引其进入肠道病变部位,从而引起一系列的肠道病变。有研究表明致炎因子 IL-1 β 在急性模型中持续参与炎症反应及结肠黏膜的损伤过程^[13-14]。我们前期研究表明,溃结灵含药血清对 IL-1 β 诱导的 Caco-2 炎症细胞模型细胞 NF- κ Bp65 DNA 结合活性有下调的作用,并且在刺激细胞后 30 min 作用最明显^[4]。因此,本实验采用 IL-1 β 刺激 Caco-2 细胞 30 min 建立细胞炎症模型。硼替佐米是一类活性很高的蛋白酶抑制剂,有报道蛋白酶抑制剂可抑制 I κ B 的降解,从而抑制 NF- κ B 启动的基因转录^[15],因此,我们同时设置了蛋白酶体抑制剂组来作为阳性对照。

本实验结果显示,IL-1 β 诱导的 Caco-2 炎症细胞模型组的 I κ B α 基因表达及 I κ B α 蛋白表达低于正常组,提示 I κ B α 的合成减少或降解增加可导致细胞内 I κ B α 的减少,从而暴露 NF- κ B 的核定位信号,使 NF- κ B 由胞浆入核并与特定基因的 κ B 部位结合,激活靶基因转录,从而参与细胞分化、发育、凋亡、黏附及炎症反应。而溃结灵高剂量组 I κ B α 蛋白表达明显高于模型组以及中剂量组 I κ B α 基因表达明显高于模型组,蛋白酶体抑制剂组 I κ B α 蛋白表达也明显升高,表明溃结灵可能通过增加 I κ B α 合成或抑制细胞内 I κ B α 降解,从而抑制 NF- κ B 的过度活化,减轻炎症反应,提示溃结灵对 I κ B α 的干预作用可能是其治疗 UC 的作用机理之一。

参考文献:

- [1] Andresen L, Jorgensen VL, Perner A, et al. Activation of nuclear factor kappaB in colonic mucosa from patients with collagenous and ulcerative colitis[J]. Gut, 2005, 54: 503-509.
- [2] Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, et al. Constitutive NF-kappa B activity in neurons[J]. Mol Cell Biol, 1994, 14: 3981-3992.
- [3] Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease[J]. Gut, 1998, 42: 477-484.
- [4] 唐立海,纪艳艳,杜群,等.溃结灵对 Caco-2 炎症细胞模型核因子- κ B p65 DNA 结合活性的影响[J].广州中医药大学学报,2012,29(3): 283-286.
- [5] Neurath MF, Fuss I. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease[J]. Ann NY Acad Sci, 1998, 859: 149-159.
- [6] Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferators activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation[J]. Inflamm Res, 2000, 49(10): 497-505.
- [7] Verma IM, Scevenson JK, Schwarz EM, et al. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation[J]. Genes Dev, 1995, 9(22): 2723-2735.
- [8] DiDonato JA, Mercurio F, Rosette C, et al. Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16: 1295-1304.
- [9] Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T. Phosphorylation of human Ikappa B on serines 32 and 36 controls Ikappa B proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli[J]. EMBO J, 1995, 14: 2876-2883.
- [10] Yaron A, Hatzubai A, Davis M, et al. Identification of the receptor component of the Ikappa B-ubiquitin ligase[J]. Nature, 1998, 396: 590-594.
- [11] Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, et al. Signal-induced site-specific phosphorylation targets Ikappa B to the ubiquitin proteasome pathway[J]. Genes Dev, 1995, 9: 1586-1597.
- [12] Baldi L, Brown K, Franzoso G, et al. Critical role for lysines 21 and 22 in signal-induced, ubiquitin-mediated proteolysis of Ikappa B[J]. J Biol Chem, 1996, 271: 376-379.
- [13] 张凯,邓子辉,薛辉,等.溃疡性结肠炎患者血清中 Leptin 与炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达水平及意义[J].军医进修学院学报,2011,32(4): 386-388.
- [14] 曹秀红,张学彦,张晓娜.白介素在溃疡性结肠炎发病机制中的研究进展[J].世界华人消化杂志,2011,19(30): 3143-3148.
- [15] 高伟艳,申凤乾,崔瑞雪,等.蛋白酶体抑制剂对大肠癌细胞增殖和凋亡的影响[J].中国实用医刊,2009,36(9): 48.

(编辑:邓响潮)