

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002427

熊果酸对脂多糖作用下肺上皮细胞炎症因子表达的影响及机制研究

余超,彭周杰,段妮,易明

(重庆大学附属三峡医院新生儿科,重庆 404000)

【摘要】目的:熊果酸(ursolic acid, UA)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作用下人肺上皮细胞来源的 A549 细胞的生物学活性影响及潜在机制。**方法:**CCK-8 检测不同浓度(10、50、100、150、200 $\mu\text{g/mL}$)UA 对 A549 细胞增殖的影响。此外,检测浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 UA 作用于 A549 细胞不同时间点对细胞的增殖影响。荧光定量 PCR 检测 UA 对 LPS 作用下 A549 细胞的白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的 mRNA 表达。ELISA 检测 ERK、p38、JNK 抑制剂对 UA 对 LPS 作用下 A549 细胞的 IL-1 β 表达的影响,结果采用单因素方差分析。**结果:**UA 能够显著抑制 A549 细胞的活性且呈浓度依赖性。CCK-8 检测结果显示,UA 作用 A549 细胞 24 h 后,10 $\mu\text{g/mL}$ 的 UA 能够明显抑制 A549 细胞的活性 ($P < 0.05$)。此外,UA 能够明显抑制 LPS 诱导的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA 表达($P < 0.05$)。其中,对 LPS 诱导的 IL-1 β 抑制作用最为明显。ELISA 结果显示,ERK、JNK 信号通路抑制剂作用下并不能影响 UA 抑制炎症的效果,但 p38 信号通路抑制剂能显著逆转 UA 对 LPS 诱导的 IL-1 β 的抑制作用($P < 0.05$)。p38 信号通路的激活剂却可以逆转这种抑制作用($P < 0.05$)。**结论:**UA 能够抑制 LPS 诱导的 IL-1 β ,且通过 p38 信号通路作用。

【关键词】熊果酸;脂多糖;白细胞介素-1 β ;p38 信号通路

【中图分类号】R734.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-12-14

Effect of ursolic acid on expression of inflammatory factors of pulmonary epithelial cells under lipopolysaccharide and its mechanism

Yu Chao, Peng Zhoujie, Duan Wei, Yi Ming

(Department of Neonatology, The Affiliated Three Gorges Hospital of Chongqing University)

【Abstract】Objective: To observe the effect of ursolic acid(UA) on the biological activity of A549 cells derived from human pulmonary epithelial cells under lipopolysaccharide(LPS) and its potential mechanism. **Methods:** The CCK-8 method was used to detect the effect of UA(10, 50, 100, 150 and 200 $\mu\text{g/mL}$) at different concentrations on the proliferation of A549 cells. In addition, the effect of 10 $\mu\text{g/mL}$ UA on the proliferation of A549 cells at different time points was also detected. The qPCR was used to detect the mRNA expression of interleukin(IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in A549 cells under LPS. The effect of UA on the expression of IL-1 β in A549 cells under LPS was detected by ELISA. **Results:** UA was able to significantly inhibit the activity of A549 cells. Results of CCK-8 showed that 10 $\mu\text{g/mL}$ UA was able to significantly inhibit the activity of A549 cells after 24 hours of UA treatment($P < 0.05$). In addition, UA was able to significantly inhibit the mRNA expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 induced by LPS ($P < 0.05$). Among them, the inhibition effect of LPS-induced IL-1 β was the most obvious. Results of ELISA showed that UA to inhibit inflammation was not influenced by ERK and JNK signaling pathway inhibitors, but p38 signaling pathway inhibitors was able to significantly reverse the inhibitory effect of UA on LPS-induced IL-1 β ($P < 0.05$). However, p38 signal pathway activator was able to reverse the inhibition effect ($P < 0.05$). **Conclusion:** UA can inhibit the LPS-induced IL-1 β and can exerts function through p38 pathway.

【Key words】ursolic acid; lipopolysaccharide; interleukin-1 β ; p38 signaling pathway

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是一种严重

的并发症,主要特征是中性粒细胞募集、间质水肿、上皮完整性破坏和炎症细胞因子过度分泌。虽然在理解 ALI 的病理生理学方面已经取得了很大的进展,但目前并没有降低 ALI 发病率的有效方法^[1-2]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性细菌细胞壁的重要组成部分,可诱导炎症反应,导致免疫

作者介绍:余超, Email: 442809156@qq.com,

研究方向:儿科学。

通信作者:易明, Email: yimingd123@126.com。

基金项目:重庆大学附属三峡医院内科技资助项目(编号:2019012)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200409.1417.004.html>

(2020-04-10)

系统功能紊乱。ALI 的分子机制可能与炎症信号的激活有关,包括 p-38MAPK-Akt 和核转录因子- κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)等多种信号通路。目前研究认为,内毒素进入机体后启动了肺组织多种细胞产生的级联效应是急性肺损伤的一个重要病理机制。这些信号通路的下游效应器导致各种炎症介质的产生,包括促炎因子、趋化因子、黏附分子、活性氧等^[2]。炎症细胞因子可能通过促进炎症渗出、破坏肺组织结构、纤维化和诱导凋亡等途径参与 ALI 的发生发展。

熊果酸(ursolic acid, UA)是一种天然的三萜羧酸,广泛存在于各种植物中。其生化和药理作用包括抗炎、抗氧化、抗增殖、抗癌、抗微生物、抗高血压、抗病毒等特性^[3]。多种证据支持 UA 能抑制 NF- κ B 等因子的免疫调节能力,其抗炎潜力越来越受到广泛关注,但其对 ALI 的影响尚不清楚。本研究旨在探讨 UA 对 LPS 作用下 A549 细胞的抗炎作用,并探讨其潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

A549 细胞购自中国科学院细胞库,ELISA 试剂盒购自上海沪尚生物科技有限公司;RPMI 1640 细胞培养基、胎牛血清购自美国 Sigma 公司;胰酶购自美国 Hyclone 公司;IL-1 β ELISA 试剂盒购于 R & D 公司。抗 IL-1 β 鼠单克隆抗体(工作浓度 1:500)购自武汉博士德生物技术有限公司;PD98059、SP600125、SB203050 购自美国 Selleck 公司;青霉素-链霉素溶液、抗 β -actin 鼠单克隆抗体(工作浓度 1:1 000)购自武汉碧云天生物技术公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔/抗鼠 IgG 二抗购自北京中杉金桥公司(工作浓度 1:5 000);CCK-8 试剂盒购自 Dojindo Molecular Technologies Inc 公司;蛋白裂解液、酶标仪、电泳仪、转膜仪、凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司;光学显微镜购自日本 Nikon 公司;脱色摇床购自美国 Thermo 公司。

1.2 细胞培养

A549 细胞培养于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中,于 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(含 100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素)隔日换液,3~4 d 分瓶传代继续培养。取对数生长期的细胞用于试验。

1.3 ELISA 检测各组培养基上清中 IL-1 β 的浓度

各实验组于相应时间点收集细胞培养上清,按照人白细胞介素(interleukin, IL)-1 β ELISA 试剂盒说明书进行操作,用酶标仪在 450 nm 波长处测定样品光密度(optical density, OD)值,根据标准品绘制标准曲线,最后根据标准曲线计算各样品 IL-1 β 的浓度。

1.4 CCK-8 细胞活性测定

A549 按 2×10^3 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板,取对

数生长期的细胞分为空白细胞组、不同浓度(10、50、100、150、200 μ g/mL)UA 处理组。每组设 6 个复孔,待细胞贴壁后,分别于 12、24、48、96 h 时加入 10 μ L CCK-8 溶液,置于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养 3 h;用自动酶标仪在 450 nm 波长处检测各孔的 OD 值。

1.5 引物设计

根据 NCBI 的基因序列用 Premier 5.0 软件设计的引物,并由上海生工生物工程技术有限公司合成。其中, TNF- α 上游引物:5'-CGAGTGACAAGCCTGTAGC-3',下游引物 5'-GGTGTGGGTGAGGAGCACAT-3'。IL-1 β 上游引物:5'-TGGCCTGCACAGTGAAGTGCTG-3',下游引物 5'-TGGCC-AGCTCCGGGACTCACA-3'。IL-6 上游引物:5'-TAGTG-AGGAACAAGCCAGAG-3',下游引物 5'-TACA-TTTGCC-AAACCTTTCCACC-3'。 β -actin 上游引物:5'-GTAGTTTC-GTGGATGCCACAG-3,下游引物:5'-GAGCTACGAGCTGCC-TGACG-3。

1.6 荧光定量 PCR

消化离心后的 A549 细胞,采用 Trizol 法提取细胞的总 RNA,并按照 Prime Script™ RT reagent Kit 逆转录试剂盒操作步骤对 RNA 进行逆转录,荧光定量 PCR 检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 、IL-6 的相对 mRNA 表达量,比较不同城市 PM_{2.5} 对细胞内 IL-1 β 基因表达水平的影响。

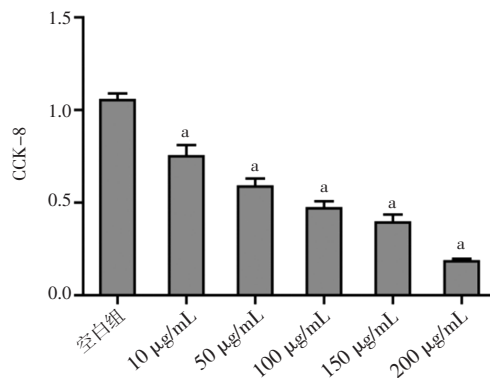
1.7 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

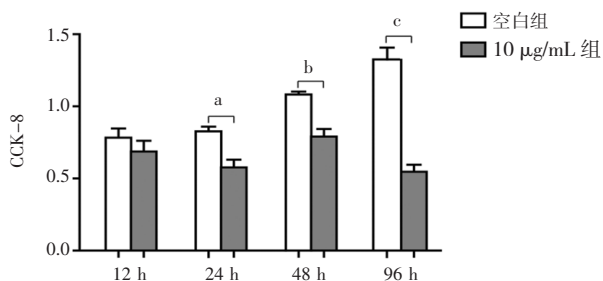
2.1 UA 对 A549 细胞生物学活性的影响

用不同浓度(10、50、100、150、200 μ g/mL)UA 作用于 A549 细胞,CCK-8 检测结果如图 1 所示。UA 能够显著抑制 A549 细胞的活性($P<0.01$),且呈浓度依赖性。此外,用 10 μ g/mL 分别作用于 A549 细胞 12、24、48、96 h 后,CCK-8 检测结果显示如图 2 所示。在 24 h 后,10 μ g/mL 的 UA 能够显著抑制 A549 细胞的活性($P<0.05$)。



注:a, 10、50、100、150、200 μ g/mL 组与空白组比, $P=0.000$

图 1 不同浓度 UA 对 A549 细胞增殖的影响 ($n=3$)

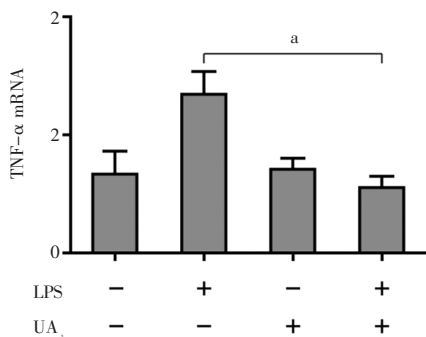


注:a, 24 h 10 µg/mL 组与空白组相比, $P=0.017$; b, 48 h 10 µg/mL 组与空白组相比, $P=0.006$; c, 96 h 10 µg/mL 组与空白组相比, $P=0.001$

图2 不同作用时间 UA 对 A549 细胞增殖的影响 ($n=3$)

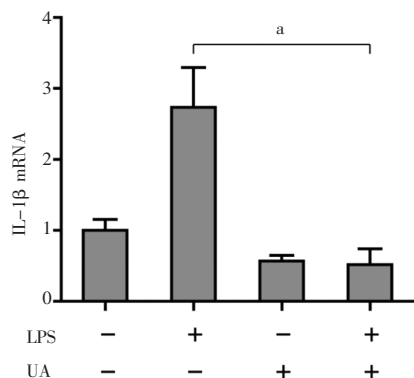
2.2 UA 对 LPS 诱导的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达的影响

使用 10 µg/mL 的 UA 对 A549 细胞进行预处理,再用 1 µg/mL 的 LPS 作用于 A549 细胞 48 h,观察 UA 对 LPS 作用下的 A549 炎症因子释放作用。结果显示,UA 能够显著抑制 LPS 诱导的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达($P<0.01$),如图 3 至图 5 所示。其中,对 LPS 诱导的 IL-1 β 的抑制作用最为明显。



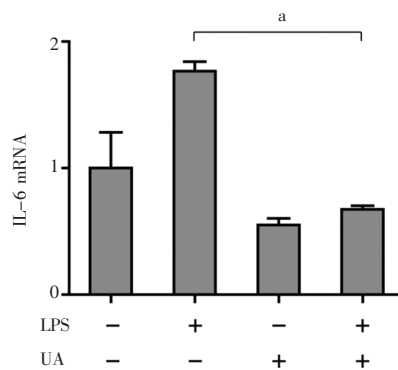
注:a, LPS 组与 LPS 和 UA 预处理组相比, $P=0.007$

图3 UA 对 LPS 诱导的 A549 细胞 TNF- α 表达的影响 ($n=3$)



注:a, LPS 组与 LPS 和 UA 预处理组相比, $P=0.007$

图4 UA 对 LPS 诱导的 A549 细胞 IL-1 β 表达的影响 ($n=3$)

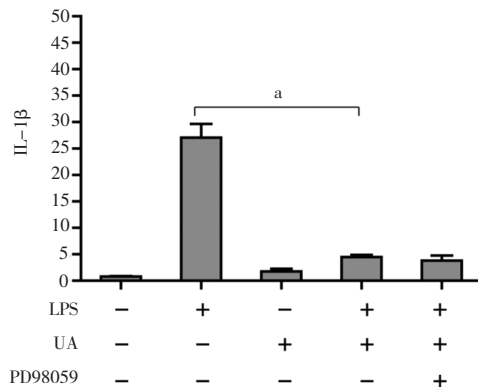


注:a, LPS 组与 LPS 和 UA 预处理组相比, $P=0.001$

图5 UA 对 LPS 诱导的 A549 细胞 IL-6 表达的影响 ($n=3$)

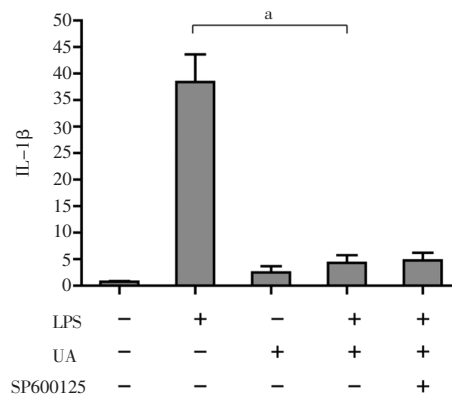
2.3 ERK、p38、JNK 抑制剂检测 UA 抑制炎症的效果

分别运用 ERK、p38、JNK 抑制剂检测 UA 抑制炎症的效果。ELISA 结果显示,ERK 信号通路抑制剂 PD98059 (10 µmol/L)、JNK 信号通路抑制剂 SP600125 (10 µmol/L) 作用下并不能影响 UA 抑制炎症的效果(图 6、图 7),但 p38 信号通路抑制剂 SB203050 (10 µmol/L) 能显著逆转 UA 对 LPS 诱导的 IL-1 β 的抑制作用($P<0.05$)(图 8)。



注:a, LPS 组与 LPS 和 UA 预处理组相比, $P=0.000$; LPS 和 UA 预处理组与加上 PD98059 处理组, $P=0.706$

图6 PD98059、UA 对 LPS 诱导的 A549 细胞 IL-1 β 分泌的影响 ($n=3$)



注:a, LPS 组与 LPS 和 UA 预处理组相比, $P=0.000$

图7 SP600125、UA 对 LPS 诱导的 A549 细胞 IL-1 β 分泌的影响 ($n=3$)

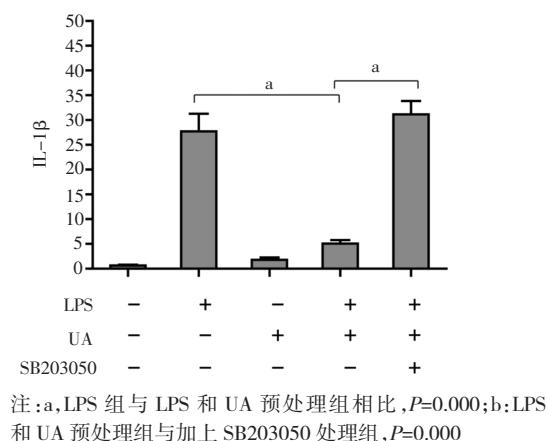


图 8 SB203050、UA 对 LPS 诱导的 A549 细胞 IL-1 β 分泌的影响 ($n=3$)

3 讨论

ALI 是一种儿科临床上常见的综合征, 发病率高, 死亡率高。该综合征的主要病理特征之一是肺泡上皮和肺微血管内皮发生损伤和炎症。来自细菌细胞壁释放的 LPS 会导致肺血管内皮通透性增加, 被认为是在 ALI 发展中的一个重要诱发因素。在 ALI 中, 不仅伴随着肺部病变, 更是系统炎症在肺部的免疫调节失控。这种免疫失衡导致肺上皮细胞、多形核白细胞、肺泡巨噬细胞等在内的多种细胞炎症免疫应答过度激活, 并大量释放 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等关键炎症递质, 引起下游炎症信号调控的级联效应, 从而加重肺部损伤。近年来, 虽然对 ALI 的发病机制进行了大量的探索 and 认识, 但治疗效果并没有明显改善。

UA 存在于许多植物中, 并被广泛用于药物制作中。目前, UA 具有多种生物活性, 如抗炎、抗氧化、抗肿瘤等。已有研究证明, UA 对哮喘、急性肝损伤、癌症、关节炎和结肠炎等炎症相关疾病的实验模型具有有益作用。最近的研究表明, UA 能够在脓毒症的情况下保护肺部损伤^[4-6]。这对于过度炎症反应的治疗而言, UA 被认为是一个潜在的用药。近几十年来, 人们对自然药物的治疗用途越来越感兴趣, 尤其是针对儿童和老年人的用药, 更期望运用植物的成分来预防某些炎症疾病^[7-8]。然而, 目前还没有研究评价 UA 对 LPS 激发的小鼠 ALI 机制研究。本研究旨在探讨 UA 对 LPS 作用下 A549 细胞的抗炎作用及其作用机制。

本研究通过体外实验探讨了 UA 对 LPS 作用下的肺上皮细胞的影响和涉及的潜在机制。结果显示, 不同浓度 UA 作用于 A549 细胞, UA 能够显著抑

制 A549 细胞的活性且呈浓度依赖性。此外, 本研究用 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 UA 对 A549 细胞进行预处理, 再用 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 作用于 A549 细胞 48 h, 观察 UA 对 LPS 作用下的 A549 炎症因子释放的作用。结果显示, UA 能够显著抑制 LPS 诱导的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达。其中, 对 LPS 诱导的 IL-1 β 的抑制作用最为明显。为了研究 UA 对细胞保护作用涉及的潜在机制, 本研究又分别运用 ERK、p38、JNK 抑制剂检测 UA 抑制炎症的效果。ELISA 结果显示, ERK、JNK 信号通路抑制剂作用下并不能影响 UA 抑制炎症的效果, 但 p38 信号通路抑制剂能显著逆转 UA 对 LPS 诱导的 IL-1 抑制作用。这说明 UA 的抗炎保护作用是通过 p38 信号通路进行的。根据先前的研究结果, 假设通过它的多效性特性, UA 可以在治疗 ALI 中发挥有益的作用, 那么与其相关的 NPH、ARDS 也可以通过这种药物的使用得到相应控制。UA 的治疗作用为临床提供了新的研究方向。

参 考 文 献

- [1] Furue S, Kuwabara K, Mikawa K, et al. Crucial role of group IIA phospholipase A(2) in oleic acid-induced acute lung injury in rabbits [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(4): 1292-1302.
- [2] 韩玉昆, 蔡栩栩. 新生儿肺出血与急性肺损伤[J]. 中国当代儿科杂志, 2004, 19(6): 433-434.
- [3] Zhao J, Zheng H, Sui Z, et al. Ursolic acid exhibits anti-inflammatory effects through blocking TLR4-MyD88 pathway mediated by autophagy[J]. Cytokine, 2019, 123: 154726.
- [4] Zhou JX, Wink M. Evidence for anti-inflammatory activity of isoliquiritigenin, 18 β glycyrrhetinic acid, ursolic acid, and the traditional Chinese medicine plants *Glycyrrhiza glabra* and *Eriobotrya japonica*, at the molecular level[J]. Medicines (Basel), 2019, 6(2): E55.
- [5] Luo H, Vong CT, Chen H, et al. Naturally occurring anti-cancer compounds: shining from Chinese herbal medicine[J]. Chin Med, 2019, 14: 48.
- [6] Kim SH, Jin H, Meng RY, et al. Activating hippo pathway via rassf1 by ursolic acid suppresses the tumorigenesis of gastric cancer[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19): E4709.
- [7] Moon PD, Han NR, Lee JS, et al. Ursolic acid downregulates thymic stromal lymphopoietin through the blockade of intracellular calcium/caspase1/NF- κ B signaling cascade in HMC1 cells[J]. Int J Mol Med, 2019, 43(5): 2252-2258.
- [8] Alqahtani F, Balla S, Alhajji M, et al. Temporal trends in the utilization and outcomes of percutaneous coronary interventions in patients with liver cirrhosis[J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2020, 96(4): 802-810.
- [9] Chen X, Wan Y, Zhou T, et al. Ursolic acid attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in a mouse model[J]. Immunotherapy, 2013, 5(1): 39-47.

(责任编辑: 张学颖)