

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.30.003

文章编号: 1005-8982 (2018) 30-0011-05

染料木素对 HT29 细胞 IL-8 分泌及 Akt/NF- κ B 活化的影响 *

徐成飞, 韦立群, 李通, 潘晓航, 甘嘉亮

(广西医科大学第一附属医院, 广西 南宁 530021)

摘要: **目的** 观察染料木素对脂多糖 (LPS) 和人干扰素 γ (hIFN- γ) 诱导人结肠癌 HT29 细胞诱导产生白细胞介素 8 (IL-8) 中 Akt/NF- κ B 信号通路的作用, 并探讨其可能的作用机制。 **方法** 用噻唑蓝 (MTT) 法检测染料木素对 HT29 细胞增殖的影响。用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6)、IL-8、白细胞介素 10 (IL-10) mRNA 表达水平, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测上清中 IL-8 的含量。Western blot 检测细胞 p-Akt (S473)、Akt、p-p65、p65 蛋白的表达情况。 **结果** 用量达 200 μ mol/L 的染料木素处理 HT29 细胞, 未对细胞的增殖产生影响。ELISA 与 qRT-PCR 证实染料木素能降低 LPS+hIFN- γ 诱导 HT29 细胞转录和分泌 IL-8。Western blot 结果表明, 染料木素可以抑制 LPS+hIFN- γ 诱导的 Akt/NF- κ B 的活化。 **结论** 染料木素能够抑制 LPS+hIFN- γ 诱导的 HT29 中 IL-8 的转录和分泌发挥抗炎作用, 可能与抑制 Akt/NF- κ B 通路的活化有关系。

关键词: 白细胞介素 8; 染料木素; 炎症肠病; 克罗恩病; 溃疡性结肠炎

中图分类号: R574

文献标识码: A

Effect of Genistein on Akt/NF- κ B pathway mediated IL-8 secretion in HT29 cells*

Cheng-fei Xu, Li-qun Wei, Tong Li, Xiao-hang Pan, Jia-liang Gan

(The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Genistein on Akt/NF- κ B pathway mediated interleukin-8 (IL-8) secretion in human colon carcinoma HT29. **Methods** Cells were treated with LPS plus hIFN- γ . Cellular proliferation of HT29 cells was measured by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) test. Expression of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), IL-8 and interleukin-10 (IL-10) was identified by quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot method was performed to detect the expression of p-Akt (S473), Akt, p-p65 and p65. **Results** Genistein (200 μ mol/L) had no obvious inhibitory effect on HT29 cell proliferation. ELISA and qRT-PCR confirmed reduction of LPS+hIFN- γ induced IL-8 in Genistein treated HT29. Western blot analysis indicated that Genistein inhibited the activation of Akt/NF- κ B induced by LPS plus hIFN- γ . **Conclusion** Genistein inhibits expression of IL-8 through inhibiting the activation of Akt/NF- κ B pathway in HT29 cell line.

Keyword: IL-8; Genistein; inflammatory bowel diseases; crohn's disease; ulcerative colitis

收稿日期: 2018-05-26

* 基金项目: 广西自然科学基金面上项目 (No: 2013GXNSFAA019153); 广西高校科学技术研究项目 (No: 2013ZD015)

[通信作者] 甘嘉亮, E-mail: gjl259@126.com; Tel: 13878155172

染料木素又称染料木黄酮, 分布于豆科植物中的一种天然异黄酮类药物^[1], 具有多种生物活性, 多种体内外试验中有明确的抗炎活性^[2-3], 但在炎症肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 中的作用目前尚未见报道。研究表明结肠上皮细胞与肠道免疫功能之间“crosstalk”在炎症肠病中有着重要意义^[4], 同时在 IBD 中肠上皮细胞与肠道中免疫细胞可能起到类似的作用^[5-6]。所以本研究利用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和干扰素 γ (human interferon- γ , hIFN- γ) 诱导 HT29 细胞产生炎症模型, 探讨染料木素是否具有抑制炎症的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人结肠腺癌细胞系 HT29 购自上海细胞生物研究所, 染料木素购自上海源叶生物科技有限公司, 达尔伯克改良伊格尔培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 购自中国维森特生物技术有限公司, 噻唑蓝 (thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT) 购自美国 Sigma 公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自澳大利亚 Excellbio 公司, RNA 提取试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, RNA 逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNase H Plus) 购自日本 TaKaRa 公司, 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自武汉华美生物科技有限公司, p-Akt (S473)、Akt、p-p65、p65 及 GAPDH 兔抗人多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 细胞分组及处理

A 组为对照组: 加入完全培养基培养; B 组为模型组: 给予 IFN- γ 20 ng/ml 孵育 12 h, 再加入 1 μ g/ml LPS 孵育 4 h; C-E 组为观察组: 在模型组的基础上给予不同浓度的染料木素 (25、50 及 100 μ mol/L) 孵育 24 h。

1.3 HT29 细胞培养

HT29 细胞采用 DMEM 培养基培养 (10% 的胎牛血清、100 u/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素) 于 37℃ 的 5% 二氧化碳 CO₂ 孵育箱中培养。采用对数生长期的细胞进行实验。

1.4 细胞增殖观察

采用的 MTT 方法。取对数生长期的 HT29 细胞, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 以 4×10^3 个/孔接种到 96 孔板中。待细胞贴壁后并分加入染料木素 (0、25、

50、100 及 200 μ mol/L), 每个浓度设置 3 个复孔。放置于 5% CO₂、37℃ 的细胞培养箱中孵育 24 h 后加入 MTT 溶液, 继续培养 4 h, 弃上清液后, 每孔加入二甲亚砜 150 μ l 避光在微量震荡器上震荡 15 min, 490 nm 的酶标仪测定其吸光值, 计算细胞增殖率。重复 3 次试验。

1.5 白细胞介素的检测

采用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real time-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 8 (interleukin-8, IL-8)、白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 的表达量。取对数生长的细胞接种于培养瓶中, 按 1.2 分组及方法收集细胞。依照美国 Invitrogen 公司 RNA 试剂提取盒进行 RNA 提取, 定量后按照逆转录 TaKaRa 试剂盒说明书进行逆转录, 用逆转录的 cDNA 为模版进行扩增, 引物由生工生物工程上海股份有限公司合成, 序列见表 1。反应条件: 50℃ 孵育 2 min, 95℃ 活化 10 min 1 个循环, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 1 min, 共 40 个循环。基因相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行分析。重复 3 次实验。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度 /bp
IL-1 β	正向: 5'-AGGCTGCTCTGGGATTC-3'	266
	反向: 5'-GCCACAACAACACTGACGC-3'	
IL-6	正向: 5'-TGTAGTGAGGAACAAGCCAGAG-3'	236
	反向: 5'-TACATTTGCCGAAGAGCC-3'	
IL-8	正向: 5'-ATACTCCAAACCTTTCCACCC-3'	134
	反向: 5'-AGTTTTCTCTGGGGTCCAGA-3'	
IL-10	正向: 5'-ACCTGCCTAACATGCTTCGAG-3'	204
	反向: 5'-CTGGGTCTTGTTCTCAGCTT-3'	
GAPDH	正向: 5'-GTCTTCACCACCATGGAGAAG-3'	201
	反向: 5'-GTTGTCATGGATGACCTTGGC-3'	

1.6 检测细胞上清液中 IL-8 的含量

用 ELISA 试剂盒进行测定。收集 1.2 的分组方法培养的细胞液上清液, 在 4℃ 低温离心机以 2 000 r/min 速度, 离心 5 min, 收集上清液, 置入 -80℃ 冰箱冷冻保存备用。检测时按华美 ELISA 试剂盒说明书进行细胞上清中的 IL-8 含量的检测。实验重复 3 次。

1.7 Western blot 检测 p-Akt (S473)、Akt、p-p65、p65 蛋白表达

收集 1.2 的分组方法培养的细胞,用 RIPA 裂解液、苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、Cocktail 提取各组细胞总蛋白量,使用核酸检测仪检测样品蛋白浓度。用 10% 分离胶 60 V 恒压电泳,聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜进行半干转,5% 的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭 1 h。分别加入稀释为 1 : 1 000 的 p-Akt (S473)、Akt、p-p65、p65 及 GAPDH 抗体 4℃ 摇床过夜,在室温避光孵育荧光二抗 2 h,浓度为 (1 : 10 000),使用双色红外荧光扫描成像系统进行扫膜。用 Image J 进行蛋白灰度值的分析处理,目的蛋白比上内参 GAPDH 作为蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 染料木素对 HT29 增殖的影响

不同浓度染料木素作用 HT29 细胞 24 h 细胞的增殖率分别为:100%、(99.34 ± 2.67)%、(99.46 ± 3.80)%、(98.42 ± 0.70)% 和 (94.36 ± 2.28)%,经单因素方差分析,差异无统计学意义 ($F = 2.869$, $P = 0.080$)。200 μmol/L 以下浓度的染料木素对 HT29 的增殖几乎无影响。后续研究采用 25、50 及 100 μmol/L 作为药物实验浓度。

2.2 各组 HT29 细胞中炎症因子 mRNA 的表达量

5 组 IL-1β、IL-6 及 IL-10 的 mRNA 相对表达量经单因素方差分析,差异无统计学意义 ($F = 1.486$ 、 1.650 及 1.433 , $P = 0.278$ 、 0.237 及 0.293)。5 组 IL-8 的 mRNA 相对表达量经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($F = 172.048$, $P = 0.000$);模型组较对照组表达 IL-8 高 ($P < 0.05$),观察组 IL-8 表达较模型组低 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 各组 HT29 细胞上清液中 IL-8 的含量

各组上清液 IL-8 含量分别为 (112.66 ± 7.23)、(1 420.69 ± 76.74)、(1 258.66 ± 93.07)、(845.77 ± 117.06)及 (446.95 ± 72.73) pg/ml,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($F = 133.204$, $P = 0.000$)。模型组比对照组上清液表达 IL-8 高 ($P < 0.05$),观察组上清

表 2 IL-1β、IL-6、IL-8 及 IL-10 的 mRNA 相对表达量情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1β	IL-6	IL-8	IL-10
A	1	1	1	1
B	1.08 ± 0.14	1.04 ± 0.03	219.72 ± 18.69 ¹⁾	1.04 ± 0.04
C	1.09 ± 0.11	1.01 ± 0.01	121.21 ± 18.58 ²⁾	1.05 ± 0.03
D	1.03 ± 0.21	1.03 ± 0.02	28.89 ± 3.20 ²⁾	1.05 ± 0.04
E	1.33 ± 0.31	1.04 ± 0.04	23.54 ± 2.80 ²⁾	1.04 ± 0.02
F 值	1.486	1.650	172.048	1.433
P 值	0.278	0.237	0.000	0.293

注: A: 对照组; B: 模型组; C-E 分别为模型组加入不同染料木素浓度的观察组 (25、50 及 100 μmol/L)。1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

液 IL-8 表达量较模型组低 ($P < 0.05$)。

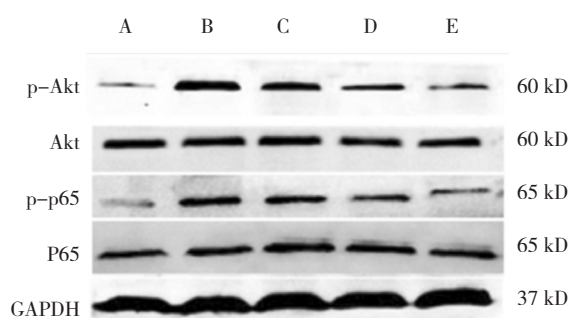
2.4 染料木素对 HT29 细胞炎症模型 Akt/NF-κ B (p65) 通路蛋白表达的影响

各组 p-Akt (S473) 和 p-p65 蛋白相对表达量经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($F = 100.430$ 、 76.321 , 均 $P = 0.000$),模型组 p-Akt (S473) 和 p-p65 蛋白相对表达量较对照组高 ($P < 0.05$),观察组 p-Akt (S473) 和 p-p65 蛋白相对表达量比模型组低 ($P < 0.05$)。各组 Akt 和 p65 的蛋白相对表达量经单因素方差分析,差异无统计学意义 ($F = 0.463$ 和 1.361 , $P = 0.762$ 和 0.314)。见附图和表 3。

表 3 染料木素对 Akt/NF-κ B (p65) 通路蛋白表达的影响 ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	p-Akt	Akt	p-p65	P65
A	0.234 ± 0.024	0.814 ± 0.003	0.293 ± 0.071	0.841 ± 0.008
B	0.828 ± 0.019 ¹⁾	0.816 ± 0.008	0.858 ± 0.042 ¹⁾	0.848 ± 0.003
C	0.750 ± 0.043 ²⁾	0.812 ± 0.003	0.753 ± 0.016 ²⁾	0.847 ± 0.005
D	0.632 ± 0.029 ²⁾	0.815 ± 0.004	0.618 ± 0.042 ²⁾	0.847 ± 0.001
E	0.491 ± 0.100 ²⁾	0.818 ± 0.008	0.448 ± 0.037 ²⁾	0.849 ± 0.003
F 值	100.430	0.463	76.321	1.361
P 值	0.000	0.762	0.000	0.314

注: A: 对照组; B: 模型组; C-E 分别为模型组加入不同染料木素浓度的观察组 (25、50 及 100 μmol/L)。1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$



A: 对照组; B: 模型组, C-E 分别为模型组加入不同浓度的染料木素的观察组 (25、50 及 100 $\mu\text{mol/L}$)

附图 染料木素对 Akt/NF- κ B (p65) 蛋白表达水平的影响

3 讨论

IBD 是累及胃肠道的慢性非特异性炎症, 主要包括溃疡性结肠炎、克罗恩病^[6], 西方发达国家是该病的主要发生区域, 仅在北美地区约有 150 万的患者^[1], 但在过去的 10 年, 亚洲患病人数增加 1 倍^[7], 提示该病在世界范围内逐渐扩展。目前, IBD 的发病机制及病因仍不明确, 可能与免疫、精神、遗传等有关, 药物控制是其主要的治疗方法, 包括氨基水杨酸、免疫抑制剂、糖皮质激素等药物^[8], 其目的是缓解症状, 改善患者的生活质量^[9]。传统这类药物治疗会引一系列严重的副作用, 如骨髓抑制、肝肾功能损害等^[10]。因此, 有必要寻找副作用少新的替代药物。

染料木素于 1899 年从染料花中分离出来, 广泛分布在豆科植物中, 具有抗肿瘤、抗氧化等药理作用^[1]。近年来发现它具有抗炎作用。EO 等^[2]发现, 喂食染料木素可以降低用四氧嘧啶诱导糖尿病大鼠的延迟损伤修复过程中的炎症反应, 并可以减轻炎症因子的释放。王小倩等^[3]在体外试验中发现染料木素可以促进 AMPK α 磷酸化抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 表达肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factors, TNF- α)、IL-6。炎症肠病的慢性炎症可能是由于促炎因子异常持续分泌而导致^[11], 而 IL-8 是主要的趋化因子之一。IL-8 可以激活中性粒细胞, 诱导其表达多种促炎因子, 如: IL-6、TNF- α 、IL-1 β ^[11-12]。本研究结果显示, IL-8 mRNA 表达升高, 而 IL-1 β 、IL-6、IL-10 无变化。ELISA 检测培养上清液中 IL-8 蛋白表达也升高, 提示细胞炎症模型是成功的。在此基础上, 后续给予不同浓度的染料木素处理, 结果显示染料木素能抑制 IL-8 mRNA 表达和细胞上清中 IL-8 蛋白表达, 提示染料木

素可能具有一定的抗炎活性。

LPS 是革兰阴性杆菌细胞壁组成部分, 在许多实验中可用来诱导产生炎症反应^[13]。LPS 能够特异性识别表达在巨噬细胞、上皮细胞细胞等表面的 Toll 样受体 4 (toll-like receptors 4, TLR4)^[14]。TLR4 识别 LPS 后诱导髓样分化因子 88 (myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88) 依赖性细胞内的信号传导过程, MyD88 召集 IL-1 受体相关激酶 (IL-1 receptor-associated kinases, IRAKs)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor-necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6), 从而激活核因子 κ B 激酶抑制剂 (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase, IKK) 复合体, IKK 磷酸化后介导 NF- κ B 激活, 处在包质中的 NF- κ B 被激活后转入细胞内发挥生物学活性, 使 IL-8、IL-1 β 、TNF- α 基因转录增强而高表达^[15], 持续大量的 NF- κ B 激活与炎症程度呈正相关。所以 NF- κ B 活性是炎症程度的一个重要指标。Akt 是 NF- κ B 上游激活的信号激活, 他们在调节肿瘤细胞增殖、血管生成、转移中起重要的作用^[16], 活化的 Akt 也能激活 NF- κ B 进入细胞核, 促使相关炎症因子的基因转录表达增强^[17]。本研究免疫印记实验结果显示, 随着浓度的增大, 染料木素逐渐抑制 p-Akt (S473) /p-p65 的活性, 提示染料木素对 Akt/NF- κ B 通路具有抑制作用。

综上所述, 染料木素能抑制 LPS 和 hIFN- γ 诱导 HT29 细胞的炎症反应, 其机制可能与抑制 Akt/NF- κ B 通路有关。为深入研究染料木素抗炎作用提供一定的理论基础。

参考文献:

- [1] SPAGNUOLO C, RUSSO G L, ORHAN I E, et al. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions[J]. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 2015, 6(4): 408-419.
- [2] H EO, H J LEE, Y LIM. Ameliorative effect of dietary genistein on diabetes induced hyper-inflammation and oxidative stress during early stage of wound healing in alloxan induced diabetic mice[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communication*, 2016, 478(3): 1021-1027.
- [3] 王小倩, 纪桂元, 蒋卓勤. 染料木黄酮对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子、腺苷酸激活蛋白激酶磷酸化的影响[J]. *营养学报*, 2012, 34(2): 177-180.
- [4] S AHN, M H SIDDIQI, V C ACEITUNO, et al. Suppression of MAPKs/NF- κ B activation induces intestinal anti-inflammatory action of Ginsenoside Rf in HT-29 and RAW264.7 cells[J].

- Immunological Investigations, 2016, 45(5): 439-449.
- [5] NUNES C, FERREIRA E, FREITAS V, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of red wine extract: unveiling the mechanisms in colonic epithelial cells[J]. Food & Function, 2012, 4(3): 373-383.
- [6] SOUFLI I, TOUMI R, RAFA H, et al. Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases[J]. World Journal of Gastrointestinal Pharmacology & Therapeutics, 2016, 7(3): 353-360.
- [7] W KNG, WONG S H, S C NG. Changing epidemiological trends of inflammatory bowel disease in Asia[J]. Intestinal Research, 2016, 14(2): 111-119.
- [8] 王英德. 炎症性肠病的药物治疗现状及进展 [J]. 医学与哲学, 2014, 35(4): 7-10.
- [9] NUNES C, ALMEIDA L, BARBOSA R M, et al. Luteolin suppresses the JAK/STAT pathway in a cellular model of intestinal inflammation[J]. Food Funct, 2017, 8(1): 387-396.
- [10] SALARITABAR A, DARVISHI B, HADJIAKHOONDI F, et al. Therapeutic potential of flavonoids in inflammatory bowel disease: A comprehensive review[J]. World Journal of Gastroenterology, 2017, 23(28): 5097-5114.
- [11] 侯小凤, 潘浩, 徐丽慧, 等. 胡椒碱抑制 LPS 活化的人结肠腺癌细胞 SW480 表达 IL-8 的作用机制研究 [J]. 免疫学杂志, 2014, 30(11): 957-961.
- [12] van DEVENTER S J H, RADEMA S A, LAMMERS K, et al. Induction of IL-8 in inflammatory bowel disease[M]. The Chemokines Boston: Springer, 1993: 198-199.
- [13] XU D, YAN S, WANG H, et al. IL-29 enhances LPS/TLR4-mediated inflammation in rheumatoid arthritis[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2015, 37(1): 27-34.
- [14] LU Y C, YEH W C, OHASHI P S. LPS/TLR4 signal transduction pathway[J]. Cytokine, 2008, 42(2): 145-151.
- [15] 庞敏, 王冬, 李婷, 等. 重组大鼠 CC16 蛋白质对 LPS 诱导大鼠气道上皮细胞表达 TNF- α , IL-6 和 IL-8 的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(10): 1843-1847.
- [16] SONG J, FENG L, ZHONG R, et al. Icariside II inhibits the EMT of NSCLC cells in inflammatory microenvironment via down-regulation of Akt/NF- κ B signaling pathway[J]. Molecular Carcinogenesis, 2017, 56(1): 36-48.
- [17] SUN Z J, CHEN G, HU X, et al. Activation of PI3K/Akt/IKK- α /NF- κ B signaling pathway is required for the apoptosis evasion in human salivary adenoid cystic carcinoma: its inhibition by quercetin[J]. Apoptosis, 2010, 15(7): 850-863.
- (王荣兵 编辑)