

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.11.002

文章编号: 1005-8982 (2020) 11-0007-04

姜黄素烟酸酯对辐射诱导的巨噬细胞 IL-1 β 、IL-18 表达的影响 *

邓礼明, 熊国祚

(南华大学附属第二医院 血管外科, 湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 研究姜黄素烟酸酯对巨噬细胞受射线照射产生的炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18 (IL-18) 的影响。**方法** 将巨噬细胞分为空白对照组、单纯照射组及不同浓度姜黄素烟酸酯组 (1.0、3.0 和 9.0 $\mu\text{mol/L}$), 应用 Western blotting 检测 IL-1 β 、IL-18 的表达。**结果** 1.0、3.0 和 9.0 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素烟酸酯组与单纯照射组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 各浓度姜黄素烟酸酯组 IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达量较单纯照射组下降; 单纯照射组 IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达量较对照组升高 ($P < 0.05$)。**结论** 姜黄素烟酸酯可抑制辐射诱导巨噬细胞内炎症因子 IL-1 β 、IL-18 的产生。

关键词: 姜黄素烟酸酯; 辐射; 白细胞介素-1 β ; 白细胞介素-18

中图分类号: R543.4; R285

文献标识码: A

Inhibitory effect of curcumin nicotinate on expression of IL-1 β , IL-18 in macrophage exposed to radiation *

Li-ming Deng, Guo-zuo Xiong

(Department of Vascular Surgery, The Second Affiliated Hospital, University of South China,
Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of curcumin nicotinate on IL-1 β , IL-18 production in macrophage exposed to radiation. **Methods** Macrophage were divided into non-treated control group, irradiated group and curcumin nicotinate treated group where curcumin nicotinate with different dosage of 1.0 $\mu\text{mol/L}$, 3.0 $\mu\text{mol/L}$ and 9.0 $\mu\text{mol/L}$ was administrated to macrophage before irradiation. The expressions of IL-1 β , IL-18 protein were detected using Western blotting. **Results** Compared with the control group, the expression levels of IL-1 β and IL-18 proteins in the curcumin niacin group were significantly increased ($P < 0.05$). The curcumin nicotinate group was given with the concentration of 1.0 mol/L, 3.0 mol/L and 9.0 mol/L respectively. The protein expressions of IL-1 beta and IL-18 were significantly decreased compared with that of the exposure group ($P < 0.05$). **Conclusions** Curcumin nicotinate could inhibit the induction of inflammatory factor, IL-1 β and IL-18, in the irradiated macrophage.

Keyword: curcumin nicotinate; radiation; interleukin-1beta; interleukin-18

放疗所致颈动脉炎是头颈恶性肿瘤放疗患者卒中新的独立危险因素。放疗会造成照射野内血管损伤,

其动脉损伤导致动脉血管狭窄会引起患者出现一过性黑朦、轻瘫、感觉障碍等症状, 严重狭窄会增加发生

收稿日期: 2019-11-04

* 基金项目: 2017 年度湖南省临床医疗技术创新引导计划项目 (No: 2017SK50210); 衡阳市科学技术发展项目 (No: 2017KJ328)

[通信作者] 熊国祚, E-mail: 55752528@qq.com

脑血管事件的风险^[1-3]。因此,早期减轻放疗性颈动脉炎,可减缓颈动脉狭窄发展进程,从而降低脑卒中发生率。放射线对血管内皮损伤致巨噬细胞的活化是放疗后动脉炎发生的关键因素。研究发现,辐射刺激可诱导巨噬细胞内 NLRP3 炎症小体活化,从而促进细胞分泌炎症因子 IL-1 β 、IL-18^[4]。姜黄素烟酸酯是姜黄素和烟酸两者结合形成的新型化合物,具有抗炎、抗氧化、抗纤维化、免疫调节等诸多药理作用。研究表明,姜黄素在炎症疾病中能起到良好的抗炎作用^[5-6]。因此,本实验以巨噬细胞作为模型,通过射线照射巨噬细胞,以姜黄素烟酸酯干预,观察其对放疗后炎症介质释放的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

姜黄素烟酸酯由湖南中医药大学庾勤慧老师赠送,将其溶于二甲亚砜(DMSO)中,储液浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。实验所用一抗为多克隆兔抗人白细胞介素-1 β (IL-1 β)(ab2105)、兔抗人白细胞介素-18(IL-18)(ab71495)、鼠抗人 β -actin(ab8227)购自美国 Abcam 公司,巨噬细胞(RAW264.7)由南华大学附属第二医院临床实验中心所有,高糖 DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司,SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天有限公司,Western blotting 发光液购自北京英格恩生物科技有限公司,CCK-8 试剂盒购自广州七星生物科技有限公司,Siemens Primus 直线加速器购自德国西门子公司,参数设定为 6 MVX,吸收剂量为 200 Gy/min,源皮距为 100 cm。

1.2 方法

1.2.1 照射剂量 常规对 RAW264.7 细胞进行培养,取对数生长期细胞进行实验。RAW264.7 细胞的照射剂量为 200 Gy/min。将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞给予不同剂量(0、2、4 和 8 Gy)的照射,照射完毕后,提取细胞总蛋白,应用 Western blotting 检测 IL-1 β 、IL-18 的表达。

1.2.2 细胞分组 分为空白对照组(0.0 $\mu\text{mol/L}$)、单纯照射组(Vector)、姜黄素烟酸酯不同浓度组(1.0、3.0 和 9.0 $\mu\text{mol/L}$)。空白对照组和单纯照射组照射前不给予药物干预,姜黄素烟酸酯不同浓度组照射前 1 h 预先给予不同浓度的姜黄素烟酸酯,照射后 24 h 提取细胞总蛋白行进一步检测。

1.2.3 Western blotting 检测 照射后 24 h 收集各组细

胞,提取细胞总蛋白,蛋白定量检测按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行操作。取 25 mg 蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳,80 V 稳压转膜,以含 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗 4℃孵育后,洗膜加入相应辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育 1 h,电化学发光(ECL)法检测。以 β -actin 作为内参。

1.2.4 CCK-8 实验 取对数生长期 RAW264.7 细胞消化后进行稀释,并计算浓度,按 10 000 个/孔细胞接种于 64 孔板中,每组设置 3 个复孔。贴壁过夜后去除培养基,加入根据实验需要配置的梯度浓度姜黄素烟酸酯,每孔 100 μl 。24 h 后,弃培养基,每孔加入新鲜培养基 100 μl 及 CCK-8 试剂 10 μl ,注意不要留有气泡。培养板置于细胞培养箱中 37℃培养 30 min,然后立即取出置于酶标仪,于波长 450 nm 处检测吸光度值,以 3 个复孔平均值作为每个样本最终结果,实验重复 3 次,根据说明书计算生存分数。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 最适照射剂量

射线照射后内 IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达水平升高(见图 1、2)。以 0、2、4 和 8 Gy 剂量放射线照射 RAW264.7 细胞后,各组 IL-1 β 的蛋白表达水平分别为(0.157 $\pm$ 0.009)、(0.387 $\pm$ 0.010)、(0.437 $\pm$ 0.010)和(0.396 $\pm$ 0.010),经单因素方差分析,差异有统计学意义($F = 436.534$, $P = 0.000$)。2、4 和 8 Gy 组分别与 0 Gy 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组 IL-18 的蛋白表达水平分别为(0.899 $\pm$ 0.004)、(1.074 $\pm$ 0.044)、(1.375 $\pm$ 0.038)和(1.240 $\pm$ 0.041),经单因素方差分析,差异有统计学意义($F = 74.762$, $P = 0.000$)。2、4 和 8 Gy 组分别与 0 Gy 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。IL-1 β 、IL-18 表达水平在 0 ~ 4 Gy 照射剂量范围随照射剂量增加而升高,而 8 Gy 照射后有所下降,因此 4 Gy 是最适照射剂量。

2.2 姜黄素烟酸酯对照射后 RAW264.7 细胞 IL-1 β 、IL-18 蛋白表达的影响

行 CCK-8 实验检测姜黄素烟酸酯不同浓度组生存率,结果显示各组生存率 $> 80\%$ 。见图 3。

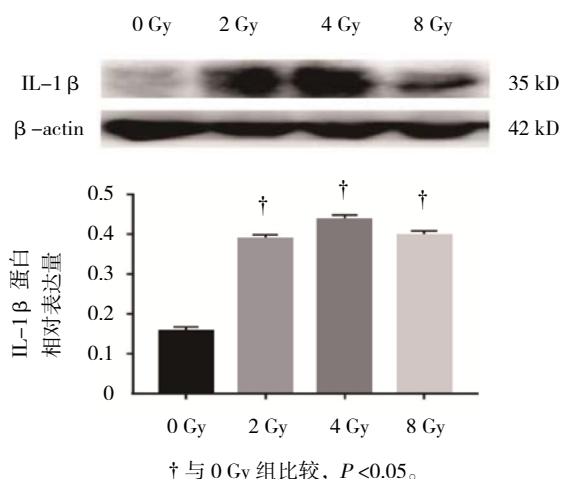


图 1 不同剂量放射线照射后 RAW264.7 细胞的 IL-1 β 蛋白表达

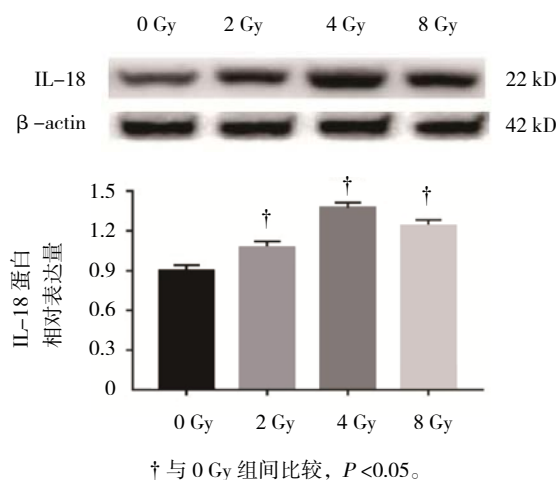


图 2 不同剂量放射线照射后 RAW264.7 细胞的 IL-18 蛋白表达

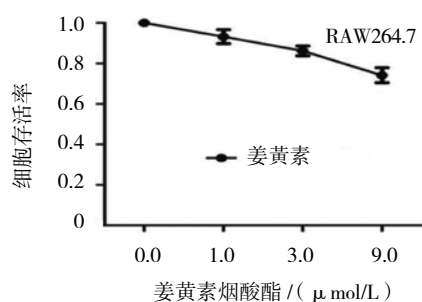
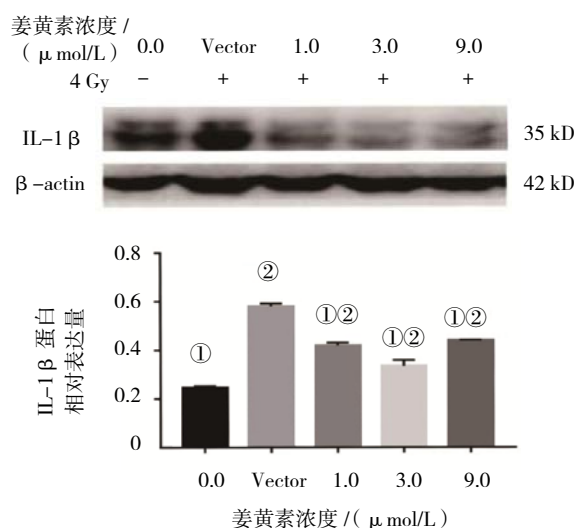


图 3 不同浓度姜黄素烟酸酯对 RAW264.7 细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

照射前 1 h 分别给予 1.0、3.0 和 9.0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素烟酸酯,再经最适照射剂量 4 Gy 照射,24 h 后提取蛋白,空白对照组(0.0 $\mu\text{mol/L}$)、单纯照射组(Vector)、姜黄素烟酸酯不同浓度组(1.0、3.0 和 9.0 $\mu\text{mol/L}$) IL-1 β 的蛋白表达水平分别为 (0.244 ± 0.008)、(0.580 ± 0.012)、(0.419 ± 0.012)、(0.333 ± 0.025) 和

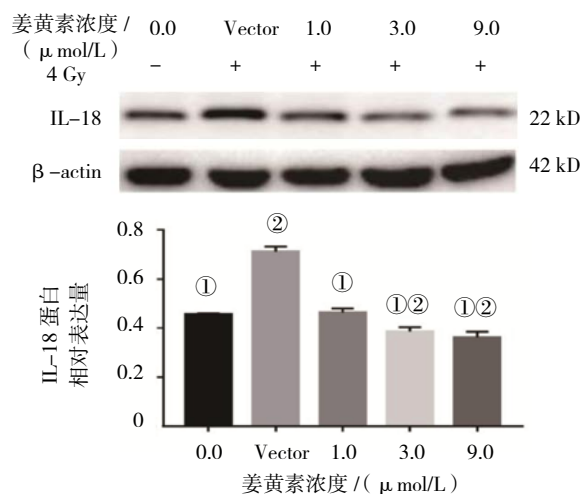
(0.439 ± 0.003),经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($F=235.134$, $P=0.000$),各组 IL-1 β 的蛋白表达水平分别与空白对照组比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$),各组 IL-1 β 的蛋白表达水平分别与单纯照射组比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 4。

由图 5 示:空白对照组(0.0 $\mu\text{mol/L}$)、单纯照射组(Vector)、姜黄素烟酸酯不同浓度组(1.0、3.0 和 9.0 $\mu\text{mol/L}$) IL-18 的蛋白表达的水平分别为 (0.454 ± 0.006)、(0.711 ± 0.010)、(0.463 ± 0.016)、(0.385 ± 0.018) 及 (0.361 ± 0.023),经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($F=182.243$, $P=0.000$)。各组 IL-18 的蛋白表达水平分别与空白对照组比较,除 1.0 $\mu\text{mol/L}$



①与单纯照射组(Vector)组比较, $P<0.05$; ②与空白对照组比较, $P<0.05$ 。

图 4 各组 RAW264.7 细胞 IL-1 β 蛋白的表达



①与单纯照射组(Vector)比较, $P<0.05$; ②与空白对照组比较, $P<0.05$ 。

图 5 各组 RAW264.7 细胞 IL-18 蛋白的表达

组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其余组差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各组 IL-18 的蛋白表达水平分别与单纯照射组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

放疗引起的血管损伤机制是放射线导致内皮细胞的炎症反应, 释放炎症介质导致动脉炎性损伤。抑制巨噬细胞的活化、减少炎症因子释放, 可减轻放射性动脉损伤, 延缓颈动脉狭窄的发生。研究表明抗炎、抗氧化、抗免疫调节是姜黄素诸多药理作用之一^[7]。JAIN 等^[8]研究表明, 在姜黄素干预后糖尿病大鼠的炎症因子 TNF- α 、IL-6 表达水平下降。姜黄素的缺点是其体内代谢消除快、生物利用度低, 临床应用受到限制。调节炎症因子药物烟酸单用有皮肤潮红、瘙痒、肝功能损害等副作用。因此, 将姜黄素和烟酸两者结合形成新型化合物姜黄素烟酸酯, 可充分发挥烟酸的调节炎症因子以及姜黄素的抗炎作用, 可提高其生物利用度, 减轻副反应。因此, 本实验从细胞层面探讨姜黄素烟酸酯对炎症因子 IL-1 β 、IL-18 的抑制作用, 证明其可作为辐射防护药物。

本研究结果显示, 巨噬细胞在受到射线照射后, 随着照射剂量的增大, 细胞 IL-1 β 、IL-18 蛋白的表达升高, 于 4 Gy 照射剂量时达到峰值, 但是当照射剂量达 8 Gy 时, IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达反而下降, 究其原因可能为大剂量射线照射时细胞损伤增加, 从而影响细胞的活性进而导致 IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达降低, 因此 4 Gy 是其最适照射剂量。在 4 Gy 射线照射前预先给予不同浓度的姜黄素烟酸酯, 随着姜黄素烟酸酯剂量增加, IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达水平降低, 提示姜黄素烟酸酯可减少辐射诱导的 IL-1 β 、IL-18 的表达, 减轻细胞的炎症反应, 对细胞具有保护作用。

本研究中未涉及细胞培养基中分泌型 IL-1 β 、IL-18 表达的检测, 这也正是本课题组进一步研究的内容。包括放疗前后及姜黄素烟酸酯干预处理后培养基中 IL-1 β 、IL-18 表达的变化; 同时, 可以收集临

床患者接受放疗前后的血清, 检测 IL-1 β 、IL-18 的表达变化。

综上所述, 研究发现 4 Gy 照射巨噬细胞可诱导细胞 IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达, 一定剂量的姜黄素烟酸酯可降低辐射后巨噬细胞 IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达水平, 抑制炎症反应, 具有较好的辐射防护作用。

参考文献:

- [1] HOKARI M, ISOBE M, ASANO T, et al. Treatment strategy for bilateral carotid stenosis: 2 cases of carotid endarterectomy for the symptomatic side followed by carotid stenting[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2014, 23(10): 2851-2856.
- [2] GUJRAL D M, CHAHAL N, SENIOR R, et al. Radiation-induced carotid artery atherosclerosis[J]. Radiother Oncol, 2014, 110(1): 31-38.
- [3] LEE C C, SU Y C, HO H C, et al. Increased risk of ischemic[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011, 81(5): e833-e838.
- [4] STROWIG T, HENAO-MEJIA J, ELINAV E, et al. Inflammasomes in health and disease[J]. Nature, 2012, 481(7381): 278-286.
- [5] BENGMARK S. Curcumin an atoxic antioxidant and natural NF-kappa B, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: ashield against acute and chronic diseases[J]. JPENJ Parenter Enteral Nutr, 2006, 30(1): 45-51.
- [6] MAEZUREK A, HAGER K, KENKLIES M, et al. Lipoic acid as ananti inflammatoryand neuroprotective treatment for Alzheimer's disease[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(13/14): 1463-1470.
- [7] MARATHE S A, DASGUPTA I, GNANADHAS D P, et al. Multifaceted roles of curcumin: two sides of a coin[J]. Expert Opin Biol Ther, 2011, 11(11): 1485-1499.
- [8] JAIN S K, RAINS J, CROAD J, et al. Curcumin supplementation lowers TNF-alpha, IL-6, IL-8 and MCP-1 secretion in highglucose-treated cultured monocytes and blood levels of TNF alpha, IL-6, MCP-1, glucose and glycosylated hemoglobin indiabetic rats[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(2): 241-249.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 邓礼明, 熊国祚. 姜黄素烟酸酯对辐射诱导的巨噬细胞 IL-1 β 、IL-18 表达的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(11): 7-10.