

# 大黄素对 HT-29 细胞 MAPKs 信号通路活化及 IL-8 分泌的影响

王青 周联 董燕 周婷 王培训

(广州中医药大学临床药理研究所免疫研究室 广东广州 510405)

**摘要** 目的: 研究大黄素对 IFN- $\gamma$  和 LPS 刺激的人结肠癌细胞株 HT-29 细胞的 ERK、JNK 和 p38 MARK 和 IL-8 表达的影响。方法: 人结肠癌细胞株 HT-29 细胞与 40 ng/mL 的 IFN- $\gamma$  共培养 12 h, 再加入 100 ng/mL LPS 刺激 15 min, 用大黄素预处理进行干预。ELISA 检测 HT-29 细胞内的 ERK、JNK 和 p38 MARK 含量和细胞上清 IL-8 含量。结果: IFN- $\gamma$  和 LPS 刺激后 HT-29 细胞的 ERK、JNK 和 p38 MARK 磷酸化水平和 IL-8 分泌明显升高。大黄素对 p38 和 JNK 磷酸化有明显的抑制作用, 而对 ERK 磷酸化则没有明显抑制作用, 大黄素能显著降低 IFN- $\gamma$ +LPS 所引起的 HT-29 细胞 IL-8 的大量产生, 并且呈明显的剂量依赖关系。结论: 大黄素能有效抑制 IFN- $\gamma$ +LPS 所引起的 HT-29 细胞 p38 和 JNK 的磷酸化, 并显著降低 IL-8 分泌。

**关键词** 大黄素; HT-29 细胞; 丝裂原活化蛋白激酶; 白介素 8

**中图分类号** R285.5, R735.35 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)11-2087-03

## Effects of Emodin on IL-8 Secretion and MAPKs Signaling Pathways of HT-29 Cells\*

WANG Qing, ZHOU Lian, DONG Yan, WANG Pei-xun

(Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of TCM, Guangzhou, 510405, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the effect of emodin on IL-8 secretion and MAPKs signaling pathways of HT-29 cells. **Methods:** HT-29 cells were stimulated by gamma-IFN plus LPS, the production of IL-8 and change of MARKs was investigated by ELISA. **Results:** Emodin can significantly inhibit p38 and JNK phosphorylation of cellular model of HT-29 cells in response to IFN- $\gamma$ +LPS, but not ERK. Emodin can significantly inhibit IL-8 secretion in HT-29 cells induced by gamma-IFN plus LPS in a dose-dependent manner. **Conclusion:** Emodin inhibited IL-8 secretion and JNK and p38 phosphorylation of HT-29 cells in response to IFN- $\gamma$ +LPS.

**Key words:** Emodin; HT-29 cells; MAPKs; IL-8

**Chinese Library Classification(CLC):** R285.5, R735.35 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2011)11-2087-03

### 前言

中药大黄为蓼科植物掌叶大黄、药用大黄或唐古特大黄的根茎, 具有攻积导滞、泻火凉血、活血祛瘀、利胆退黄的功效, 临床用于治疗应激性胃肠粘膜、病危重症患者胃肠功能衰竭、急性胰腺炎等<sup>[1-3]</sup>。大黄素是大黄的主要活性成分之一, 现代药理研究表明其具有多种药理作用, 如抗炎作用、免疫调节作用和抗肿瘤作用等<sup>[4-5]</sup>。然而其对肠道上皮细胞作用的研究尚未见详细报道, 本研究采用结肠 HT-29 细胞株, 观察大黄素对 IFN- $\gamma$  和 LPS 刺激的 HT-29 细胞的 IL-8 分泌, 以及与其相关的 MAPKs 信号转导通路的变化。

### 1 材料与方法

#### 1.1 药物与主要试剂

HT-29 细胞来源于中科院上海细胞研究所, 由本实验室保存。DMEM 培养基 (Hyclone 公司), 胎牛血清 (PAA 公司), IFN- $\gamma$  (PeproTech 公司), LPS (Sigma 公司), 大黄素 (中国药品生物制品检定所) IL-8 ELISA 检测试剂盒 (武汉博士德公司),

ERK 检测试剂盒 (美国 RayBiotech 公司)。

#### 1.2 主要实验仪器

CO<sub>2</sub> 培养箱: 日本 SANYO 公司 MCO175; 多功能酶标仪: 瑞士 TECAN; 纯水器: 美国 Millipore 公司 Q-Plus 纯水器; 低温冰箱: 日本 SANYO 公司 MDFU5410; 超低温冰箱: 美国 Thermo 995, -86℃。离心机: 美国 Beckman CS-15R 型。

#### 1.3 细胞培养

人结肠癌细胞系 HT-29 细胞, 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞孵育箱中传代培养。

#### 1.4 酶联免疫吸附试验

1.4.1 ERK、JNK 和 p38 MARK 含量检测 HT-29 细胞按  $2 \times 10^5$  /mL 接种于 96 孔板上, 待细胞达到 80% 融合时, 更换培养液为无血清培养液, 培养过夜, 次日加入药物。正常组: 与其他各组细胞平行实验, 不作任何试剂或药物处理。当其他组给予干预因素时, 该组以完全培养液补足体积。LPS 组: 培养细胞孔中加入终浓度为 100 ng/mL LPS 培养 15 min。细胞模型组: 培养细胞孔中加入终浓度为 40 ng/mL 的 IFN- $\gamma$  培养 12 h, 再加入 LPS 刺激 15 min。中药组: 大黄素 10  $\mu$ mol/L 组 (E10), 大黄素

\* 基金项目: 广东高校优秀青年创新人才培育项目 (LYM09049)

作者简介: 王青 (1977-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 免疫药理。E-mail: qwang04@126.com

(收稿日期: 2010-12-27 接受日期: 2011-01-23)

20 μmol/L 组 (E20), 大黄素 40 μmol/L 组 (E40), 大黄素 80 μmol/L 组(E80)<sup>[6]</sup>, 预培养 30 min 后, 按细胞模型组处理, 造型时间与细胞模型组同步。实验操作方法严格按 ELISA 试剂盒说明进行。

1.4.2 IL-8 含量检测 HT-29 细胞按 2× 10<sup>5</sup> mL 接种于 96 孔板上, 设对照组、IFN-γ+LPS 组和中药组(大黄素 10μmol/L, 大黄素 20μmol/L, 大黄素 40μmol/L, 大黄素 80μmol/L), 培养结束后收集上清, -20 °C 保存。实验操作方法严格按 ELISA 试剂盒说明进行, 根据预实验结果对培养上清进行适当倍数稀释, 使所含细胞因子浓度进入标准曲线浓度范围。

1.5 统计学方法

全部数据使用统计软件包 SPSS 11.0 for Windows 进行处理, 数据以均数± 标准差表示, 多组间比较采用 Oneway-ANOVA。

2 结果

2.1 LPS 与 IFN-γ 对 MAPKs 信号通路的活化作用

HT-29 细胞经 LPS 刺激后, 其磷酸化 ERK/JNK/p38 含量均上升。以 40 ng/mL 的 IFN-γ 预处理的 HT-29 细胞经 100 ng/mL LPS 刺激 15 min 后, 磷酸化的 ERK/JNK/p38 的含量显著上升, 且高于单独 100 ng/mL LPS 刺激组, 提示 IFN-γ 预处理对 LPS 刺激的 ERK/JNK/p38 磷酸化有协同作用。见图 1。

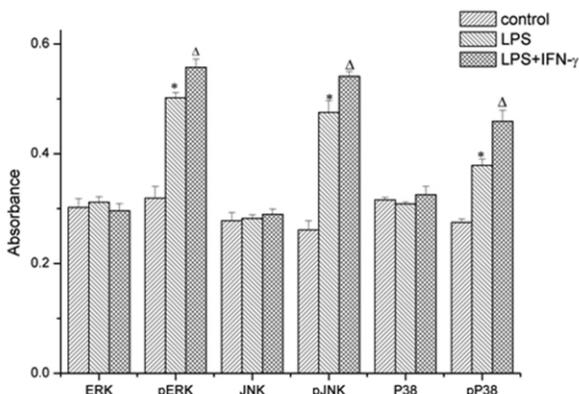


图 1 LPS 与 IFN-γ+LPS 活化 MAPKs 信号系统作用的比较(n=5)

Fig.1 Different Effect of LPS and IFN-γ Plus LPS on Activation of MAPKs Signaling System

Note: \*: LPS vs Control, P<0.01; Δ: LPS+IFN vs LPS, P<0.05

2.2 大黄素对 HT-29 细胞 MAPKs 信号通路活化的作用

大黄素对 IFN-γ 和 LPS 联合刺激的 HT-29 细胞 MAPKs 活化的作用, 结果显示大黄素对 ERK 磷酸化和低剂量大黄素对 JNK 的磷酸化的抑制作用没有统计学意义, 而大黄素对 p38 磷酸化和高剂量大黄素对 JNK 的磷酸化的抑制作用明显, 而且呈剂量依赖效应。见图 2。

2.3 大黄素对 HT-29 细胞 IL-8 含量的影响

对照组 IL-8 含量(pg/mL)较低, IFN-γ+LPS 组的 IL-8 表达升高非常显著, 而大黄素能显著降低 IFN-γ+LPS 所引起的 HT-29 细胞 IL-8 的大量产生, 并且呈明显的剂量依赖关系, 大黄素 10 μmol/L、大黄素 20 μmol/L、大黄素 40 μmol/L、大黄素

80 μmol/L 四组的 IL-8 含量(pg/mL), 与炎症模型细胞比较, 差异皆有非常显著意义(P<0.01)。见图 3。

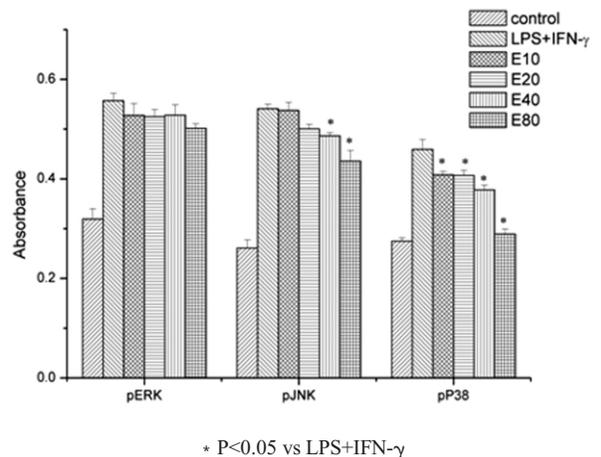


图 2 大黄素对 MAPKs 信号系统活化的影响(n=5)

Fig.2 Inhibitive Effect of Different Concentrations of Emodin on Activation of ERK/JNK/p38

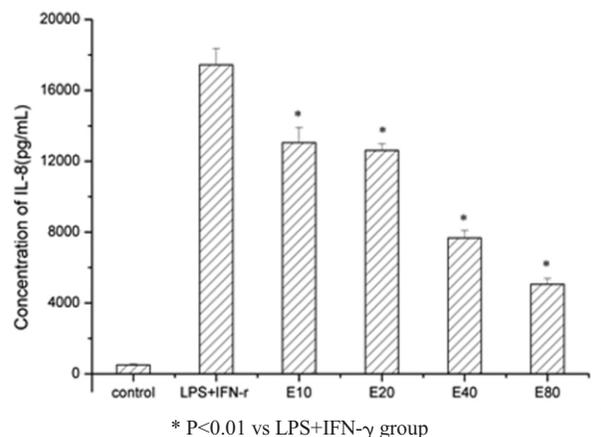


图 3 大黄素对 HT-29 细胞模型 IL-8 表达的影响(n=3)

Fig.3 Effect of Emodin on IL-8 Secretion of HT-29 Cells Activated by LPS and IFN-γ

3 讨论

大黄素为蒽醌类衍生物, 是中药大黄的主要有效单体, 实验研究显示具有多种药理作用, 如: 抗炎、抑菌、保护肝肾、抗肿瘤及抑制血小板聚集、改善微循环等, 但是大黄素在肠道炎症性疾病中的作用却研究不多。现有研究表明, 肠道致炎细胞因子分泌紊乱, 造成的肠道粘膜上皮细胞功能紊乱, 肠道粘膜上皮细胞对 LPS 的反应性增强, 导致粘膜的过度炎症反应, 是炎症性肠病的重要发病机制。针对致炎细胞因子分泌的干预作用, 可以有效改善肠道粘膜的炎症反应, 具有潜在临床应用前景。

丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 是介导细胞反应的重要信号系统, 普遍存在于多种生物, 包括酵母和哺乳动物细胞。MAPKs 信号转导通路包括细胞外信号调节激酶 (Extracellular signal regulated kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun amino-terminal kinase, JNK) 和应激

激活蛋白激酶 (Stress-activated protein kinase, SAPK)、p38 等 MAPK 亚族<sup>[7,8]</sup>。MAPKs 通过对生理性和 / 或病理性刺激作出的不同反应,来调控细胞的增殖、分化和凋亡等细胞生物学行为。MAPKs 的活性表达增高,可见于多种疾病的发生和发展过程,如 IBD 患者肠上皮细胞中的 p38MAPK 和 JNK 蛋白表达中等程度升高<sup>[9,10]</sup>。鉴于 MAPKs 在疾病中的作用,以 MAPKs 为靶点的药物研发已成为热门研究领域,大量 MAPKs 非特异性及特异性抑制剂进入实验研究,现已有部分进行临床试验的报道<sup>[11]</sup>。大黄素对 MAPKs 活化的相关研究尚不多, Huang 等曾经报道大黄素能抑制 TPA 诱导的 HSC5 和 MDA-MB-231 细胞 ERK 和 JNK 的磷酸化,而对 p38 的磷酸化没有明显的作用<sup>[12]</sup>。本研究显示,大黄素对 HT-29 细胞 ERK 磷酸化和低剂量大黄素对 JNK 的磷酸化的抑制作用不显著,而大黄素对 HT-29 细胞 p38 磷酸化和高剂量大黄素对 JNK 的磷酸化的抑制作用明显,而且呈剂量依赖效应。

MAPKs 的激活促进各种炎症介质的合成与释放,IL-8 便是其中的一种。IL-8 是一种趋化因子,可以由 LPS 诱导肠粘膜上皮细胞产生的,IL-8 对中性粒细胞、T 淋巴细胞和嗜碱性粒细胞都有趋化作用,可扩大局部炎症反应,与 Crohn's 病和溃疡性结肠炎等炎症性肠病的发生、发展、转归和预后密切相关<sup>[13-17]</sup>。在多个细胞株中,p38 的激活是 IL-8 分泌的重要细胞内信号机制,阻断 p38 的活化可抑制 IL-8 的分泌<sup>[18]</sup>。JNK 也在 IL-8 的分泌中起重要的作用,JNK 抑制剂 SP600125 可部分阻断 IL-8 的分泌<sup>[19]</sup>。研究发现 JNK 和 p38 可协同诱导 IL-8 的表达,延缓 IL-8mRNA 的降解<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,大黄素能剂量依赖式抑制 IFN 和 LPS 联合刺激的 HT-29 细胞 IL-8 的分泌,结合大黄素对 JNK 和 p38 活化有抑制作用,提示抑制 JNK 和 p38 活化可能是大黄素下调 IL-8 基因表达的重要机制。

总之,本研究观察大黄素对 IFN- $\gamma$  和 LPS 共刺激 IL-8 分泌和 MAPKs 的激活的影响,发现大黄素能有效抑制 JNK 和 p38 的活化和 IL-8 的分泌。

#### 参考文献(References)

- [1] 陈德昌,李红江. 大黄在危重病急救领域的药理作用机制 [J]. 中国危重病急救医学,2000,12(7):439-440  
Chen De-chang, Li Hong-jiang. Pharmacological role of emodin on Critical Care Medicine [J]. Chinese Critical Care Medicine, 2000, 12(7):439-440
- [2] 蔡长茂,李威. 大黄防治胃肠黏膜屏障损伤的研究进展郑雨[J]. 现代生物医学进展,2010,10(2):376-378  
Cai Chang-mao Li Wei. The Advance of Rhubarb on Gastrointestinal Mucosal Barrier Injury[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010,10(2):376-378
- [3] 郑雨,向群,万幸. 大黄及大黄素干预全身性炎症反应作用的研究进展[J]. 中药材,2004,27(9):694-698  
Zhen Yu, Xiang Qu, Wan Xin. Progress in the effect of emodin on systemic inflammation response Syndrome [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2004,27(9):694-698
- [4] 张喜平. 大黄素的药理作用研究概况 [J]. 中国药理学通报,2003,19(8):851-854  
Zhang Xi-ping. Research progress on pharmacological activities of emodin[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2003,19(8):851-854
- [5] 李杰,张陆勇,江振洲. 大黄素的药理学研究近况 [J]. 药学进展,2005,29(12):540-544  
Li Jie, Zhang Lu-yong, Jiang Zhen-zhou. A Survey of Recent Studies on Pharmacology of Emodin[J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2005, 29(12):540-544
- [6] 王青,周婷,周联. 大黄素对 HT-29 细胞 IL-8 分泌及 NF- $\kappa$  B 活化的影响[J]. 中国药理学通报,2007,23(11):1451-1454  
Wang Qing, Zhou Ting, Zhou Lian. Effects of emodin on IL-8 secretion and NF- $\kappa$  B activation of HT-29 cells[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2007,23(11):1451-1454
- [7] Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades[J]. Adv Cancer Res, 1998,74:49-139
- [8] Pearson G, Robinson F, Beers GT, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions [J]. Endocr Rev, 2001, 22(2):153-183
- [9] Waetzig GH, Seeger D, Rosenstiel P, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF- $\alpha$  signaling in inflammatory bowel disease[J]. J Immunol, 2002; 168:5342-5351
- [10] Kurtovic J, Segal I. Recent advances in biological therapy for inflammatory bowel disease. Trop Gastroenterol, 2004; 25(1):9-14
- [11] Hommes D, van den Blink B, Plasse T, et al. Inhibition of Stress Activated MAP Kinases Induces Clinical Improvement in Moderate to Severe Crohn's Disease[J]. Gastroenterology, 2002, 122(1):7-14
- [12] Huang Q, Shen HM, Ong CN. Inhibitory effect of emodin on tumor invasion through suppression of activator protein-1 and nuclear factor-kappaB[J]. Biochem Pharmacol, 2004, 68(2):361-371
- [13] Remick DG. Interleukin-8 [J]. Crit Care Med, 2005, 33 (12 Suppl): S466-S467
- [14] Vavricka SR, Musch MW, Chang JE, et al. hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells[J]. Gastroenterology, 2004; 127(5): 1401-1409
- [15] Avramescu C, Vere CC, Margaritescu C, et al. Cytokine in panel in rheumatoid arthritis and correlation with histological patterns of synovitis - active type of disease[J]. Rom J Morphol Embryol, 2005; 46(2):87-92
- [16] Delgado MA, Poschet JF, Deretic V. Nonclassical pathway of Pseudomonas aeruginosa DNA-induced interleukin-8 secretion in cystic fibrosis airway epithelial cells [J]. Infect Immun, 2006; 74(5): 2975-2984
- [17] Tsai PJ, Chen YH, Hsueh CH, et al. Streptococcus pyogenes induces epithelial inflammatory responses through NF-kappaB/MAPK signaling pathways[J]. Microbes Infect, 2006, 8(6):1440-1449
- [18] Ma P, Cui X, Wang S, et al. Nitric oxide post-transcriptionally up-regulates LPS-induced IL-8 expression through p38 MAPK activation[J]. J Leukoc Biol, 2004, 76(1):278-287
- [19] Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, et al. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells[J]. Hepatology, 2003, 37(5):1043-1055
- [20] Holtmann H, Winzen R, Holland P, et al. Induction of Interleukin-8 Synthesis Integrates Effects on Transcription and mRNA Degradation from at Least Three Different Cytokine- or Stress-Activated Signal Transduction Pathways[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(10):6742-6753