

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.31.009

大黄多糖抑制脂多糖引起的 TLR-4/ NF- κ B 通路活化*冯娟¹ 栗艳¹ 孙阳² 石小鹏¹ 文爱东^{1△}

(1 第四军医大学西京医院药剂科 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学药理学系药理教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨唐古特大黄多糖(Rheum tanguticum Polysaccharid, RTP)对脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)刺激上调结肠癌细胞 HT-29 中 TLR-4/NF- κ B 通路活性的影响及其机制。方法:将 HT-29 细胞分为对照组, LPS 处理组(1 μ g/mL, 作用 30 min, 1 h), RTP (1mg/mL, 提前 LPS 30 min 给予)+LPS 处理组(1 μ g/mL, 分别作用 30 min, 1 h), 采用免疫荧光法观察 NF- κ B 的细胞分布情况; Western Blot 法检测 HT-29 细胞中 I κ B- α , 磷酸化 I κ B- α 的蛋白变化, 以及细胞膜上 TLR-4 的水平。结果: RTP 可抑制 LPS 刺激引起的 HT-29 细胞的 NF- κ B 核转位; 可有效抑制 I κ B- α 降解及 I κ B- α 的磷酸化; 可下调细胞膜上 TLR-4 的表达。结论: RTP 可能通过抑制 LPS 刺激引起的 TLR-4 向细胞膜分布, 从而抑制了 NF- κ B 信号通路的活化。

关键词: 大黄多糖; 结肠癌; TLR-4; NF- κ B

中图分类号: R-33; R735.3; R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)31-6035-04

Rheum Tanguticum Polysaccharides Suppress Lipopolysaccharide Induced Activation of TLR-4/ NF- κ B Pathway*FENG Juan¹, LI Yan¹, SUN Yang², SHI Xiao-peng¹, WEN Ai-dong^{1△}

(1 Department of Pharmacy, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Pharmacology, School of Pharmacy, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of rheum tanguticum polysaccharides (RTP) on the activity of TLR-4/NF- κ B pathway and the possible mechanisms in lipopolysaccharide (LPS) treated human colon cancer cells HT-29. **Methods:** HT-29 cells were divided into control group, LPS-treated groups (1 μ g/mL, added for 30 min, and 1 h), RTP (1mg/mL, cells were pretreated with RTP for 30 min) and LPS-treated group (1 μ g/mL, added for 30 min, and 1 h). Then, the distribution of NF- κ B in cells was observed by immunofluorescence; the expression of I κ B- α , phosphorylated I κ B- α , as well as TLR-4 in the cell membrane, was detected using western blot. **Results:** RTP could inhibit LPS-stimulated nuclear translocation of NF- κ B, degradation of I κ B- α , phosphorylation of I κ B- α , and reduce TLR-4 expression in membrane. **Conclusion:** RTP may suppress the activation of NF- κ B signaling pathway through inhibition of LPS-stimulated TLR-4 distribution to cell membrane.

Key words: Rheum tanguticum polysaccharides; Colorectal cancer; TLR-4; NF- κ B

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.3; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)31-6035-04

前言

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一^[1]。在亚洲地区,结直肠癌的发病率呈现快速上升趋势;在我国,其发病率仅次于胃癌、肺癌和食道癌,排名第4位。肠道炎症在肠道肿瘤发生中扮演了重要角色^[2]。结直肠内存在着大量的革兰氏阴性菌,这些细菌的细胞壁组分之一:脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS),可以通过结合 toll 样受体 4(Toll-like receptor-4, TLR4),激活下游通路(主要是 NF- κ B 通路),促进致炎因子大量释放,在肠道炎症及肿瘤的发生、发展中起到重要作用^[3,4]。

中药大黄是我国传统的胃肠道疾病治疗良药。我们前期的研究表明,唐古特大黄多糖(Rheum tanguticum Polysaccharid, RTP)对 TNBS (Trinitro-benzene-sulfonic acid)诱导的小鼠溃疡

性结肠炎具有良好治疗作用,其机制可能与上调抗炎细胞因子及下调促炎细胞因子有关^[5]。为了进一步观察 RTP 对于炎症癌变是否具有防治作用并研究其可能机制,本实验使用 LPS 处理人结肠癌细胞 HT-29,观察使用 RTP 前后,细胞中 TLR-4/NF- κ B 通路的活性。

1 材料和方法

1.1 细胞培养及试剂

HT-29 细胞购自美国 ATCC 公司,采用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素以及 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 高糖培养液培养。LPS 购于美国 sigma 公司。抗 TLR-4 一抗购自英国 abcam 公司。抗 β -actin, NF- κ B (p65), I κ B- α , 磷酸化 I κ B- α 一抗购自美国 Cell signalling 公司。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30973914)

作者简介:冯娟(1980-),女,硕士研究生,主管药师,主要研究方向:临床药理学,电话:13992808085, E-mail:278962335@qq.com

△ 通讯作者:文爱东, E-mail: adwen@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-03-18 接受日期:2014-04-15)

1.2 大黄多糖(RTP)的制备

唐古特大黄购于青海省医药公司,为当年新采摘的大黄根(根茎)。大黄多糖(RTP)的提取参照文献^[68],简述如下:采用水煮醇沉法提取唐古特大黄多糖,大黄粉碎后水煮3次,合并水提液,浓缩,无水乙醇沉淀6次,Sevag-冻融法联用除蛋白,无水乙醇沉淀脱色,过 Sephamyl--S400 凝胶柱,即为大黄多糖。

1.3 细胞处理

将 HT-29 细胞以 5×10^4 孔的密度接种于 6 孔板中。过夜,待细胞贴壁伸展后,分为 5 组:对照组;LPS 处理组($1 \mu\text{g/mL}$ LPS 分别作用细胞 30 min, 1 h);RTP 给药组(给予 1 mg/mL 的 RTP, 作用 30 min 后,加入 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 作用细胞 30 min, 1 h)。实验重复三次 ($n=3$)。

1.4 免疫荧光

吸弃培养液后,以 4%多聚甲醛 4°C 固定细胞 15 min,用含 1%BSA 的 PBS 室温封闭 30min,加入 NF- κB (p65)一抗 ($1:500$ 稀释), 4°C 过夜;用 PBS 缓冲液洗 $5 \text{ min} \times 3$ 次,加入 PBS 稀释的二抗,室温下避光放置 2 h;PBS 缓冲液洗 $5 \text{ min} \times 3$ 次,以 hoechst 衬染细胞核。采用奥林帕斯荧光显微镜观察,拍照。

1.5 蛋白的提取和蛋白免疫印迹法

用细胞刮刮取细胞。加入 RIPA 或者细胞膜蛋白提取液(含 PMSF 蛋白酶抑制剂,碧云天公司)细胞裂解液提取蛋白,

用 Bradford 法检测蛋白浓度。以 $30 \mu\text{g/孔}$ 的量加入蛋白,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜。NC 膜用 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,加入 TLR-4 ($1:500$),I $\kappa\text{B-}\alpha$, 磷酸化 I $\kappa\text{B-}\alpha$ 及 $\beta\text{-actin}$ ($1:1000$)一抗, 4°C 过夜。洗膜三次后加入 $1:6000$ 稀释的相应 HRP 标记二抗,室温孵育 1h,充分洗膜后,ECL 法显影。采用 Image J 软件扫描灰度。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件中的 Student-t 检验进行数据统计, $P<0.05$ 示结果有统计学差异。

2 结果

2.1 RTP 可抑制 NF- κB 核转位

当 NF- κB 转位至细胞核中,该通路将被激活。图 1 表明, $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 作用 HT-29 细胞 30 min, 1 h 后,细胞核中的 NF- κB 表达显著增高(红色荧光);而 RTP 可以有效抑制该转位。

2.2 RTP 对 I $\kappa\text{B-}\alpha$, 磷酸化 I $\kappa\text{B-}\alpha$ 的影响

NF- κB 核转位过程受到 I $\kappa\text{B-}\alpha$ 的降解以及磷酸化程度的调控。图 2 显示, $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 作用 HT-29 细胞 30 min 后, I $\kappa\text{B-}\alpha$ 即开始发生降解,表达降低,RTP 可有效抑制 I $\kappa\text{B-}\alpha$ 降解。并且,RTP 可以有效抑制 LPS 刺激后引起的磷酸化 I $\kappa\text{B-}\alpha$ 水平升高。

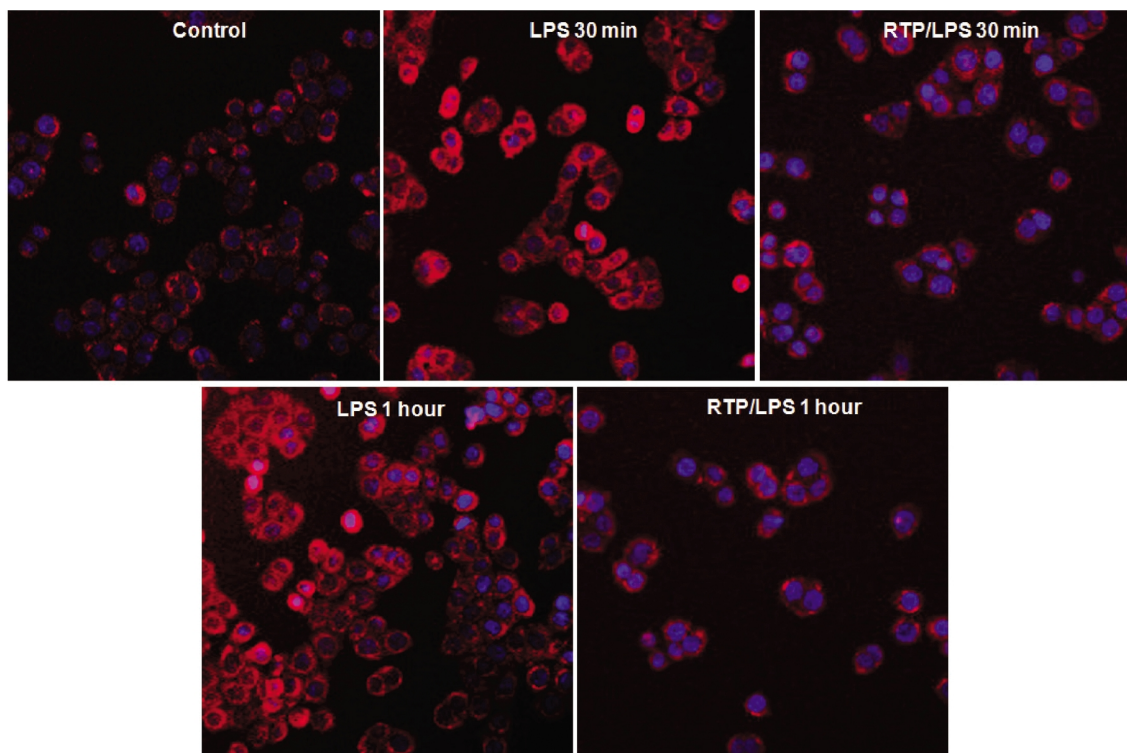


图 1 RTP 对 LPS 刺激后 HT-29 细胞中 NF- κB 核转位的影响。红色荧光示 NF- κB ,细胞核用 Hoechst 衬染 ($200\times$)

Fig. 1 Effects of RTP on NF- κB translocation in LPS-activated HT-29 cells. Red staining showed NF- κB . Sections were counterstained with Hoechst (blue) to identify the orientation of nuclei. (original magnification, $200\times$)

2.3 RTP 可下调细胞膜上 TLR-4 的表达

TLR-4 表达在细胞膜与细胞浆中。通常,只有表达在细胞膜上的 TLR-4 才能与 LPS 结合,并激活下游的 NF- κB 通路。图 3 显示, $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 可上调细胞膜上 TLR-4 的水平;RTP 能

有效抑制 LPS 刺激引起的细胞膜 TLR-4 的升高。

3 讨论

肠道的慢性炎症是结直肠癌发生的主要原因之一,流行病

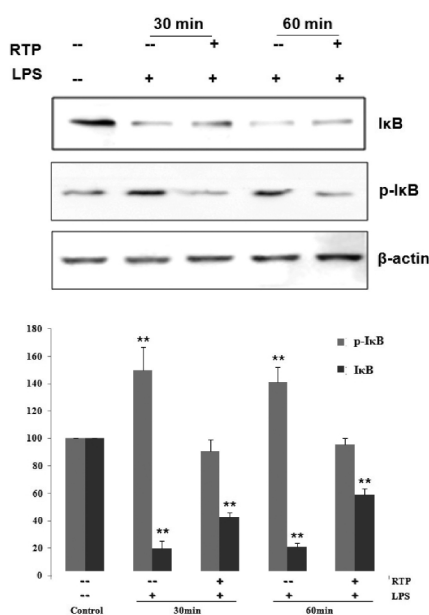


图2 RTP对LPS刺激后HT-29细胞中IκBα的磷酸化及降解的影响

Fig. 2 Effects of RTP on IκBα phosphorylation and degradation in

LPS-activated HT-29 cells

注:**P<0.01 与对照组相比。

Note:**P<0.01 vs. Control.

学研究表明:大约40%的结肠炎将发展成为结直肠癌^[9]。肠道菌群中,包含了大量的革兰氏阴性菌,其细胞壁中的脂多糖(LPS)与肠黏膜上皮细胞相应模式识别受体(例如TLR-4)相互作用,促使肠上皮细胞产生免疫应答,通过Toll样受体信号通路和/或细胞因子受体活化黏膜免疫,诱导NF-κB通路活化,导致促炎细胞因子和其他介质释放^[10-18]。这种炎症是机体对各种病原微生物等损伤因子刺激所发生的免疫防御反应,有利于清除病原微生物、组织结构修复与功能恢复。然而,若炎症状态反复迁延,却能造成不断的组织损伤和修复过程,可导致肿瘤的发生。

TLR4是模式识别受体Toll样受体家族的成员之一,是LPS信号通路的主要传递者,在炎症癌变过程中发挥重要作用。TLR4活化后,触发下游NF-κB信号通路,NF-κB从细胞质转移至细胞核内^[9],进一步激活其他靶基因,引起细胞增殖,抗凋亡等效应。根据前期研究结果,我们选择1 mg/mL的给药浓度(此浓度下,RTP的作用明显且对细胞增殖无显著影响),观察RTP对LPS刺激上调HT-29细胞中TLR-4/NF-κB通路活性的影响。本实验结果表明:LPS刺激后,HT-29细胞膜上TLR-4水平明显升高;NF-κB P65亚单位从胞浆向胞核转位;IκB-α发生降解,表达降低,磷酸化IκB-α水平升高^[20]。RTP可以有效地抑制上述趋势。鉴于此,我们推测:RTP可能通过抑制LPS刺激引起的TLR-4向细胞膜分布,从而抑制了NF-κB信号通路的活化。尽管该效果需要在更多的细胞株以及动物模型上进一步观察,具体的机制也尚需深入研究,上述结果提示:大黄多糖可能用于肠道炎症刺激下引起的癌变。

参考文献(References)

[1] Siegel R, Ma JM, Zou ZH, et al. Cancer statistics 2014 [J]. CA: A

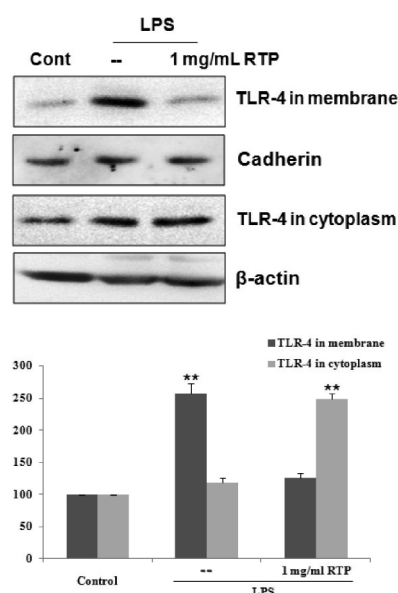


图3 RTP对LPS刺激后HT-29细胞的细胞膜及细胞质中TLR-4水平的影响

Fig. 3 Effects of RTP on protein levels of TLR4 in LPS-activated HT-29 cells

注:**P<0.01 与对照组相比。

Note:**P<0.01 vs. Control.

Cancer Journal for Clinicians, 2014, 64(1): 9-29

- [2] Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? [J]. Lancet, 2001, 357(9255): 539-545
- [3] Palsson-McDermott EM, O'Neil LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4 [J]. Immunology, 2004, 113(2): 153-162
- [4] Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens [J]. European Respiratory Journal, 2004, 23(2): 327-333
- [5] 张蓉,王志鹏,刘莉,等. 唐古特大黄多糖对小鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(9): 995-999
Zhang Rong, Wang Zhi-peng, Liu Li, et al. Effects of rheum tanguticum polysaccharides on ulcerative colitis induced by TNBS in mice[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2006, 11(9): 995-999
- [6] 刘莉,王志鹏,梅其炳,等. 大黄多糖提取工艺对糖含量和糖醛酸含量的影响[J]. 中药及天然药物, 2003, 38(10): 748-750
Liu Li, Wang Zhi-peng, Mei Qi-bing, et al. Effects of different extraction methods on polysaccharide and uronic acid contents of Rheum tanguticum polysaccharide[J]. Chin Pharm J, 2003, 38(10): 748-750
- [7] 刘莉,王志鹏,梅其炳,等. 唐古特大黄多糖的理化特性和脾细胞增殖活性研究[J]. 中国新医药, 2003, 2(5): 1-3
Liu Li, Wang Zhi-peng, Mei Qi-bing, et al. The study on physicochemical characterization and lymphocytes proliferation activity of Rheum tanguticum polysaccharide [J]. China New Medicine, 2003, 2(5): 1-3
- [8] 刘莉,梅其炳,周四元,等. 大黄多糖对TNBS诱导大鼠结肠炎的治疗作用[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(3): 246-249

- Liu Li, Mei Qi-bing, Zhou Si-yuan, et al. Effects of tanguticum maxim polysaccharide on ulcerative colitis induced by TNBS in rats [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2003, 28(3): 246-249
- [9] Ren LL, Fang JY. Should we sound the alarm Dysplasia and colitis-associated colorectal cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12 (8): 1881-1886
- [10] Hill MJ, Drasar BS. The normal colonic bacterial flora[J]. Gut, 1975, 16 (4): 318-323
- [11] Chung KT, Fulk GE, Slein MW. Tryptophanase of fecal flora as a possible factor in the etiology of colon cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 1975, 54 (5): 1073-1078
- [12] Ganguly NK, Kingham JG, Lloyd B, et al. Acid hydrolases in monocytes from patients with inflammatory bowel disease, chronic liver disease, and rheumatoid arthritis [J]. Lancet., 1978, 1 (8073): 1073-1075
- [13] Rhodes JM, Gallimore R, Elias E, et al. Faecal mucus degrading glycosidases in ulcerative colitis and Crohn's disease[J]. Gut, 1985, 26 (8): 761-765
- [14] Fukata, M, Chen A, Vamadevan AS, et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors[J]. Gastroenterology, 2007, 133(6): 1869-1881
- [15] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway [J]. Cytokine, 2008, 42(2): 145-151
- [16] Singh JC, Cruickshank SM, Newton DJ, et al. Toll-like receptor-mediated responses of primary intestinal epithelial cells during the development of colitis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 288(3): G514-G524
- [17] Medvedev AE, Piao W, Shoenfelt J, et al. Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance [J]. J Biol Chem, 2007, 282(22): 16042-16053
- [18] Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, et al. A single amino acid of toll-like receptor 4 that is pivotal for its signal transduction and subcellular localization[J]. J Biol Chem, 2009, 284 (6): 3513-3520
- [19] Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Regulation of Spontaneous Intestinal Tumorigenesis Through the Adaptor Protein MyD88 [J]. Science, 2007, 317(5834): 124-127
- [20] Greten FR, Eckmann L, Greten TF, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer[J]. Cell, 2004, 118(3): 285-296

(上接第 6049 页)

- [9] Barrett2Connor E, Bush TL. Estrogen and coronary heart disease [J]. JAMA, 2010, 265: 1861-1867
- [10] Sohrabji F, Bake S, Lewis DK. Age-related changes in brain support cells: Implications for stroke severity[J]. Neurochem Int, 2013, 63(4): 291-301
- [11] Kurzer MS. Xu X Dietary, Phytoestrogens[J]. Annu Rev Nutr, 1997, 17: 353-357
- [12] Laurey R, Simkin S, Rena R, et al. Weight gain during menopause [J]. Postgraduate Med, 2007, 108(3): 47-53
- [13] Ma T, He RR. Research of phytoestrogen cardiovascular effect [J]. Progress Physiol Science, 2008, 33(1): 69-70
- [14] Alejandro Reeio-May0ml, Justin C. Mason. Chronic inflammation and coronary micmvascular dysfunction in patients without risk factors for coronary artery disease[J]. European Heart Journal, 2009, 30: 1837-1843
- [15] John F, Behrame. Advances in coronary micmvascular dysfunction [J]. Heart, Lung and Circulation, 2010, 18: 19-27
- [16] Barbara Sotgia, Roberto Sciaga. Spatial relationship between coronary microvascular dysfunction and delayed contrast enhancement in patients with hypertrophic cardiomyopathy [J]. The Journal of Nuclear Medicine, 2008, 49(7): 1090-1097
- [17] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine [J]. Nature, 1980, 288: 373-376
- [18] Rubanyi GM, Polokof MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiogy, and pathophysiology [J]. Pharmacol Rev, 1994, 46(3): 325-415
- [19] 孔霞. 血管内皮细胞与动脉粥样硬化 [J]. 郴州医学高等专科学校学报, 2002, 4(4): 55
- Kong Xia. Vascular endothelial cell and atherosclerosis[J]. Journal of Xiangnan University: Medical Sciences, 2002, 4(4): 55
- [20] Babaev VR, Ding L, Reese J, et al. Cyclooxygenase-1 deficiency in bone marrow cells increases early atherosclerosis in apolipoprotein E-and low-density lipoprotein receptor-null mice [J]. Circulation, 2009, 113(1): 108