

番茄红素抑制香烟烟雾提取物刺激巨噬细胞所致的炎症反应

邹军¹, 刘俊强¹, 袁凤新¹, 杨玲¹, 黄景文¹, 罗韶金¹, 冯丹²

(1. 南方医科大学附属南海区人民医院心血管内科, 广东 佛山 528200; 2. 中山大学公共卫生学院预防医学系, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨番茄红素对香烟烟雾提取物(CSE)所诱导的人单核细胞株(THP-1)巨噬细胞炎症因子生成的影响及其作用的分子机制。【方法】用100 μg/L 佛波酯(PMA)诱导THP-1细胞48 h,使其分化为巨噬细胞后,分为空白组、CSE组和CSE+不同浓度番茄红素组(0.5、1和2 μmol/L)。采用ELISA法检测THP-1巨噬细胞培养基中白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的含量,荧光探针DCFH-DA测定细胞内活性氧(ROS)生成水平,Western-blotting检测核p65的蛋白表达量。【结果】CSE诱导THP-1巨噬细胞后,IL-6和TNF-α合成释放水平升高,番茄红素可降低CSE诱导引起IL-6和TNF-α生成水平升高。CSE刺激后细胞内ROS生成及核p65蛋白表达增加,核因子-κB(NF-κB)活化,番茄红素可拮抗以上作用,阻止NF-κB活化。【结论】番茄红素能够有效抑制CSE诱导THP-1巨噬细胞炎症反应,该作用主要通过阻断CSE诱导细胞内ROS生成进而抑制NF-κB依赖的炎症因子IL-6和TNF-α分泌发挥的,这可能是番茄红素抑制吸烟导致的炎症反应的作用机制之一。

关键词: 番茄红素;香烟烟雾提取物;炎症;核因子-κB;活性氧

中图分类号:R363 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2018)05-0687-06

Lycopene Inhibits Inflammatory Response of Macrophages Activated by Cigarette Smoke Extract

ZOU Jun¹, LIU Jun-Qiang¹, YUAN Feng-Xin¹, YANG Ling¹, HUANG Jing-Wen¹, LUO Shao-Jin¹, FENG Dan²

(1. Department of Cardiology, Affiliated Nanhai Hospital of Southern Medical University, Foshan 528200, China;

2. Department of Preventive Medicine, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: FENG Dan, E-mail: fengdan3@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of lycopene on the production of proinflammatory cytokines in macrophages of human monocyte line (THP-1) induced by cigarette smoke extract (CSE) and its possible molecular mechanisms. 【Methods】 100 μg/L phorbol ester (PMA) was used to induce THP-1 cells for 48 hours, after the differentiation of THP-1 cells, which became macrophage, and cells were divided into control group, CSE group and CSE combined with different concentration (0.5, 1, 2 μmol/L) of lycopene. The levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were assayed by ELISA. The level of reactive oxygen species (ROS) was detected by the methods of DCFH-DA. The level of nuclear factor-κB (NF-κB) P65 protein was analyzed by Western blotting. 【Results】 The levels of IL-6 and TNF-α were increased in the THP-1 macrophages after stimulated by CSE, lycopene could reduce the elevated levels of IL-6 and TNF-α. The production of ROS and the expression of nuclear P65 significantly increased after stimulated by CSE and NF-κB was activated. Lycopene could reverse the above changes and prevent the activation of NF-κB. 【Conclusion】 Lycopene could inhibit CSE-induced inflammatory response in THP-1 macrophages through reducing CSE-stimulated ROS production and then inhibiting the NF-κB activation and the related proinflammatory cytokines production, which is one of the mechanisms responsible for preventing smoking induced-inflammation by lycopene.

Key words: lycopene; cigarette smoke extract; inflammation; nuclear factor-κB; reactive oxygen species

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(5):687-692]

收稿日期:2018-05-18

基金项目:广东省医学科学基金(A2018482);佛山市医学类科技攻关项目(2017AB000162);佛山市科技创新项目(2017AG100102)

作者简介:邹军,博士,副主任医师,研究方向:植物化学物与动脉粥样硬化,E-mail: zoujun961@163.com;冯丹,通信作者,副教授,硕士生导师,研究方向:营养与心血管疾病防治,E-mail: fengdan3@mail.sysu.edu.cn

动脉粥样硬化是冠心病等心血管疾病的主要病理基础,已成为威胁人类生命健康的重要疾病。吸烟是动脉粥样硬化性疾病发展的独立危险因素,能够引起机体的炎症反应增强及斑块的不稳定,容易诱发急性心血管事件的发生^[1]。番茄红素(lycopene)是一种广泛存在于番茄、胡萝卜及西瓜等蔬菜和水果中的植物化学物,也是人体血浆中最主要类胡萝卜素。人体自身不能合成番茄红素,需通过膳食补充。番茄红素除了具有强大的抗氧化作用外,近年来研究发现番茄红素还具有降胆固醇、预防肿瘤和保护心血管等多种生理功能^[2-3]。流行病学研究资料显示血浆中番茄红素的水平与动脉粥样硬化的发生率呈负相关^[4]。炎症是动脉粥样硬化等心血管病变的重要风险因子,慢性炎症反应与动脉粥样硬化及冠心病发病密切相关。我们前期研究发现番茄红素对脂多糖诱导的炎症反应具有显著的抑制作用^[5-6],目前番茄红素对吸烟引起的炎症反应是否同样具有抑制作用尚不清楚。巨噬细胞在受到外界刺激情况下能够合成并释放大量的炎症介质和因子,可以很好的模拟体内的炎症反应,是研究炎症应答的重要细胞模型。本研究通过建立香烟烟雾提取物(cigarette smoke extract, CSE)诱导的人THP-1巨噬细胞炎症模型,研究番茄红素对吸烟诱导的炎症反应的作用及探讨可能的作用机制。研究对于控烟和动脉粥样硬化等心血管疾病的防治具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

人THP-1单核细胞株购自武汉大学中国细胞典藏中心;番茄红素、佛波脂、四氢呋喃(美国Sigma公司);RPMI1640培养基(Gibco公司);P65抗体(美国Cell Signaling Technology公司);TranAmTM NF- κ B Transcription Factor 试剂盒(美国Active Motif公司);DCFH-DA 荧光探针(Molecular Probes公司);ELISA 试剂盒(比利时Biosource公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所)。

1.2 香烟烟雾提取物制备

香烟烟雾提取物提取参考文献方法制备并改良^[7],将一根橡皮管一端接香烟过滤嘴,另一端接

注射器,点燃香烟,模拟人吸烟情况。万宝路香烟参照美国联邦委员会推荐的香烟烟雾标准采气速率,每2 s抽气35 mL,间隔28 s抽气1次,直至靠近烟蒂2.0~3.0 mm处。连续抽取5支香烟,以5 mL无血清RPMI-1640为吸收液,用50 mL注射器抽取,每支香烟约产生10 mg CSE溶解于无血清RPMI-1640培养液配置成CSE原液,SCE原液浓度为10 mg/mL。最后用0.22 μ L孔径的滤膜过滤待用。

1.3 细胞培养及分组

人THP-1单核细胞经佛波酯刺激分化成人THP-1巨噬细胞后,接种入25 cm²细胞培养瓶,加入含100 ml/L胎牛血清的RPMI1640培养基中生长,常规细胞培养。实验时,更换新鲜培养基并分别加入终浓度为0.5、1和2 μ mol/L的番茄红素预孵育细胞1 h,再加入终浓度为1 mg/mL的CSE处理细胞不同的时间。番茄红素溶于四氢呋喃(Tetrahydrofuran, THF)中,THF在细胞中的终浓度为1 mL/L,1 mL/L THF处理组作为空白对照组(Control组)。

实验分为5个细胞组:空白对照组;1 mg/mL CSE组;0.5 μ mol/L lycopene+1 mg/mL CSE组;1 μ mol/L lycopene+1 mg/mL CSE组;2 μ mol/L lycopene+1 mg/mL CSE组。

1.4 THP-1巨噬细胞合成分泌IL-6和TNF- α 水平测定

ELISA法检测THP-1巨噬细胞培养基中白介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)的含量,按说明书操作。

1.5 Western blot分析

按照说明书操作,提取细胞核蛋白并定量,以30 μ g蛋白样品进行电泳,将蛋白转移到PVDF膜上,用封闭液封闭2 h,加一抗兔抗人p65或 β -actin抗体,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;TBST缓冲液洗脱3次,每次5 min,置于二抗溶液中室温孵育1 h, TBST洗脱3次,每次5 min;用ECL化学发光试剂显影,使用Image One软件对图像进行定量分析。

1.6 NF- κ B DNA结合活性的测定

按照TranAmTM NF- κ B Transcription Factor试剂盒说明书进行操作。

1.7 THP-1巨噬细胞ROS水平的测定

THP-1巨噬细胞内活性氧(reactive oxygen

species, ROS) 的生成水平通过使用 ROS 敏感的荧光探针 DCFH-DA 测定。收集培养的人 THP-1 巨噬细胞,将其均匀接种至 12 孔板内,每孔细胞数约为 1×10^6 个,按上述方法诱导成为巨噬细胞后,每孔加入香烟提取物终浓度为 1 mg/mL 的 RPMI-1640 培养液培养细胞 2 h,吸弃细胞培养液,用 PBS 洗 3 遍,再加入荧光探针 DCFH-DA 使其终浓度达 $5 \mu\text{m}$,放入培养箱孵育 20 min 后,用 PBS 洗 3 遍,加入 1 mL PBS,荧光显微镜下观察后,用细胞刮将细胞刮下并收集,使用 488 nm 激发波长,525 nm 发射波长在荧光分光光度计上测定经不同刺激后细胞内氧化 DCFH 产生荧光强度的变化,间接反应 ROS 的产生量。

1.8 统计学分析

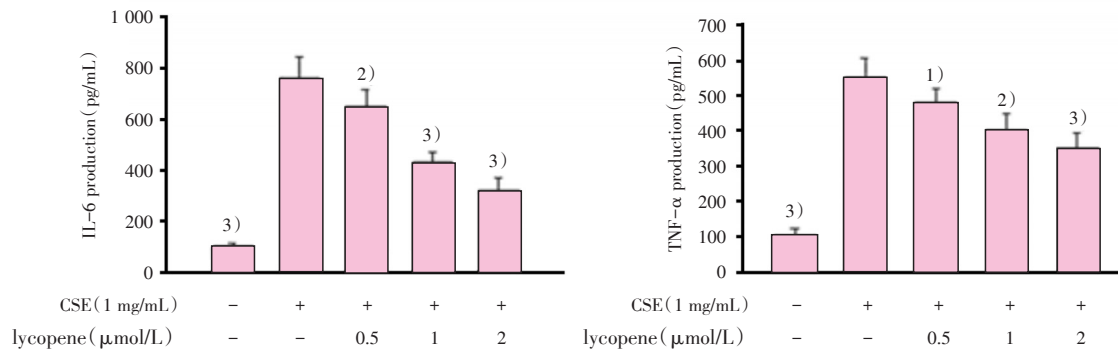
采用 SPSS16.0 软件进行统计学处理,数据以

均数 \pm 标准差表示。多组均数采用方差齐性检验和单因素方差分析,各组间两两比较采用 Bonferroni 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 番茄红素抑制 CSE 诱导的 THP-1 巨噬细胞 IL-6 和 TNF- α 的生成

与空白对照组比较,CSE 可显著刺激 THP-1 巨噬细胞合成分泌 IL-6 和 TNF- α 炎症因子。不同浓度(0.5、1 和 $2 \mu\text{mol/L}$)的番茄红素处理 THP-1 巨噬细胞后均能抑制 CSE 诱导的 IL-6 和 TNF- α 分泌,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),随着番茄红素浓度的增加其抑制效应越强,呈量效关系(图 1)。



The levels of IL-6 and TNF- α were increased in the THP-1 macrophages after stimulated by CSE, lycopene could reduce the elevated levels of IL-6 and TNF- α . $n=3/\text{group}$, IL-6: $F=64.222$, $P<0.001$; TNF- α : $F=46.978$, $P<0.001$. 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$ or 3) $P<0.001$ vs CSE alone.

图 1 番茄红素对 CSE 诱导的 THP-1 巨噬细胞 IL-6 和 TNF- α 生成的影响

Fig.1 Effects of lycopene on CSE-induced IL-6 and TNF- α production in THP-1 cells

2.2 番茄红素抑制 CSE 诱导的 THP-1 巨噬细胞 NF- κ B 激活

与空白对照组比较,CSE 作用 THP-1 巨噬细胞 1 h,可明显促进 NF- κ B 核转移并与 DNA 结合,核 p65 蛋白的表达水平和 NF- κ B DNA 结合活性也均升高,差异有统计学意义。不同浓度(0.5、1 和 $2 \mu\text{mol/L}$)的番茄红素预处理细胞 1 h 能有效地阻抑 CSE 诱导 NF- κ B p65 核转移(图 2A),降低 NF- κ B DNA 结合活性($P < 0.05$, $P < 0.01$;图 2B),这一作用也具有显著的量效关系。

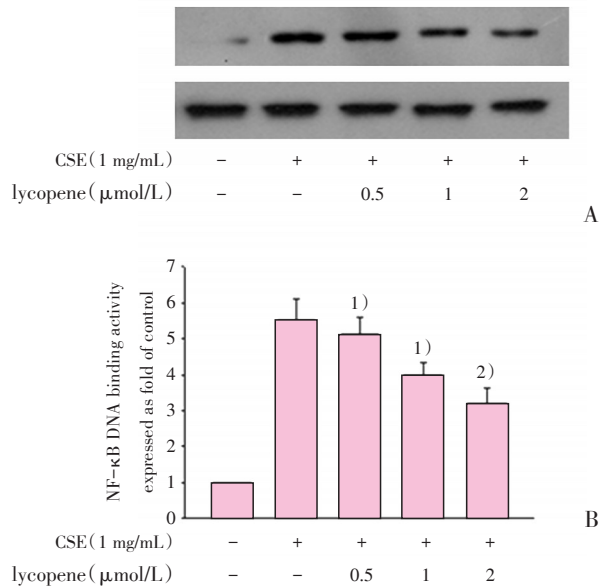
2.3 番茄红素抑制 CSE 诱导的 THP-1 巨噬细胞 ROS 生成

用 ROS 敏感的荧光探针 DCFH-DA 测定人 THP-1 巨噬细胞内 ROS 的含量,不同处理的细胞

荧光强度分析结果表明,人 THP-1 巨噬细胞经香烟烟雾提取物刺激后,细胞内 ROS 的水平明显升高,CSE 组荧光强度约为空白对照组的 4.5 倍。0.5、1 和 $2 \mu\text{mol/L}$ 番茄红素预孵育细胞 1 h 后能呈浓度依赖性抑制 CSE 刺激的 THP-1 巨噬细胞内 ROS 生成,番茄红素干预组的荧光强度显著低于 CSE 组,差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.001$;图 3)。

2.4 阻断 ROS 生成可抑制 CSE 诱导的 THP-1 巨噬细胞 NF- κ B 激活

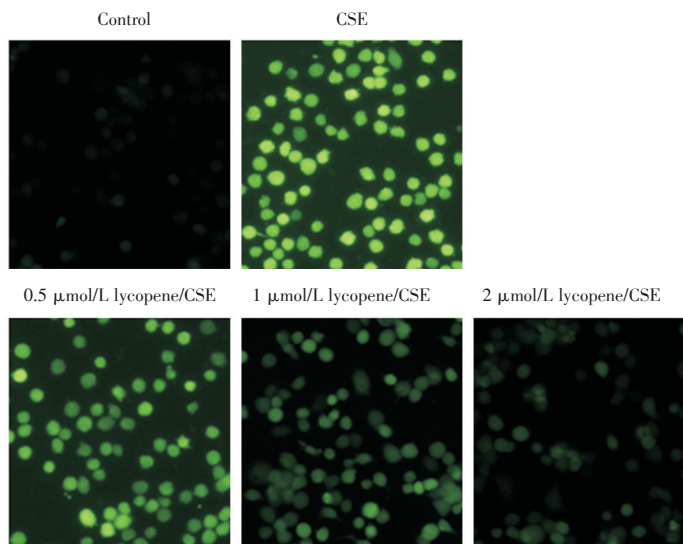
与空白对照组比较,人 THP-1 巨噬细胞内的 NF- κ B 经 CSE 诱导后被大量激活进入细胞核,加入抗氧化剂 NAC 预孵育细胞 1 h 能明显抑制 CSE 诱导的 NF- κ B 核内转移和与 DNA 结合,与 CSE 组相比,差异有统计学意义($P < 0.001$;图 4)。



A: lycopene inhibited CSE-induced NF-κB p65 nuclear translocation; B: lycopene inhibited CSE-induced NF-κB DNA binding. $n=3/\text{group}$, $F=52.861$, $P<0.001$. 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$ vs CSE alone.

图2 番茄红素对CSE诱导的THP-1巨噬细胞NF-κB激活的影响

Fig.2 Effect of lycopene on CSE-induced NF-κB activation in THP-1 cells



Lycopene inhibited CSE-induced ROS production. $\times 200$, $n=3/\text{group}$, $F=92.485$, $P<0.001$. 2) $P<0.01$, 3) $P<0.001$ vs CSE alone.

图3 番茄红素对CSE诱导的THP-1巨噬细胞ROS生成的影响

Fig.3 Effects of lycopene on CSE-induced ROS production in THP-1 cells

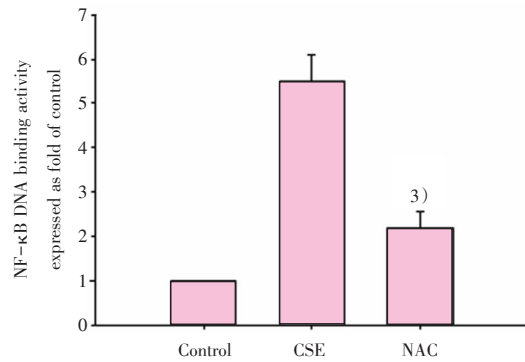
3 讨论

吸烟是一个严重的公共卫生问题,吸烟与人类很多疾病的发生、早死以及社会经济负担密切相关。居民中以与吸烟密切相关的慢性非传染性疾病为特点的死亡模式已经成为影响社区居民健康的主要卫生问题。炎症反应与一些慢性疾病的发生发展密切相关,如动脉粥样硬化,糖尿病等的形成,大量研究显示吸烟可促进机体炎症反应,升高血清炎症因子或炎症介质的水平。我们前期在984名现吸烟者中的研究也发现,吸烟可显著升高血清炎症介质CRP和其它一些炎症因子水平,且吸烟量与血清炎症因子水平呈明显剂量依赖关系,并进一步发现炎症反应介导了吸烟导致的高血压和2型糖尿病发病,其中介效应高达50%以上^[8-9]。因此,阻断吸烟导致的炎症反应对于一些慢性非传染性疾病防治具有重要意义。

香烟烟雾成分十分复杂,主要是刺激性气体、尼古丁、重金属、醛、多环芳烃和致癌的焦油颗粒物的混合物等。目前已鉴定出的化学物质有4700余种,其中很多化合物如尼古丁、镉、多环芳

烃、氧自由基和焦油颗粒物等都具有促炎作用^[10]。例如,尼古丁长期吸入可显著诱导大鼠体内炎症因子合成和释放,促进心肺炎症反应发生^[11]。香

烟烟雾含有大量的氧自由基,同时也可在体内产生大量的超氧自由基和羟自由基,后者可诱导炎症信号通路激活,继而促进炎症反应^[10]。番茄红



NAC inhibited CSE-induced NF-κB activation. $n=3/\text{group}$, $F=96.887$, $P<0.001$. 3) $P<0.001$ vs CSE alone.

图4 阻断ROS生成可抑制CSE诱导的THP-1巨噬细胞NF-κB激活

Fig.4 Blockade of ROS production inhibits CSE-induced NF-κB activation

素是一种广泛存在于番茄、西瓜及胡萝卜等蔬菜和水果中的类胡萝卜素。具有抗氧化、降胆固醇等多种生理功能。流行病学研究资料显示血浆中番茄红素的水平与动脉粥样硬化的发生率呈负相关^[4]。在我们的前期研究中发现番茄红素对脂多糖诱导的炎症反应具有显著的抑制作用。因此,我们推测番茄红素对吸烟诱导的炎症反应也可能具有一定的抑制作用。本研究在CSE诱导的人THP-1巨噬细胞炎症模型中发现,番茄红素可呈浓度依赖性抑制CSE诱导的炎症因子IL-6和TNF-α分泌,具有抑制CSE诱导的炎症反应的作用。

机体的炎症信号通路受到多种复杂机制的调节,其中核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 信号通路是重要的调节机制之一。NF-κB 是一个主要的转录因子,能调节很多与免疫和炎症相关的基因,涉及到免疫反应、细胞增殖与凋亡、炎症等多种生理和病理过程。NF-κB 在未受到刺激时,NF-κB 以同二聚体或异二聚体存在细胞质中,并与其抑制蛋白I-κB 结合以三聚体形式存在。当细胞受到刺激,其抑制蛋白I-κB 发生磷酸

化并降解,紧接着NF-κB 转移到细胞核并诱导炎症相关基因的转录^[12-13]。有研究表明吸烟可诱导大鼠细支气管上皮细胞NF-κB 的活化,使其进一步调控前炎症因子的表达^[14]。本研究同样发现香烟烟雾提取物能够显著诱导THP-1巨噬细胞内NF-κB 活化,促进THP-1巨噬细胞炎症反应,而番茄红素能够通过阻断CSE诱导NF-κB p65核转移,降低NF-κB DNA结合活性,从而抑制NF-κB 活化。

氧化应激是指机体内氧化与抗氧化系统的平衡紊乱,导致大量氧化中间产物产生的病理过程。氧化应激,过度的ROS活性状态,许多血管疾病(如动脉粥样硬化、高血压等)的发生发展与之相关。研究发现,燃烧的烟草产生的气体和焦油除了所共知的血管内皮功能紊乱、炎症反应之外,还引起氧化应激反应,存在大量对人体有害的自由基^[15]。吸烟能使机体ROS生成显著增多和氧化应激水平提高,而ROS还能够作为一个重要的信号分子诱导NF-κB 炎症信号通路激活和各种炎性基因表达^[16]。本研究结果显示:在CSE刺激下,THP-1样巨噬细胞内ROS的水平明显升高。用NAC预孵育细胞1h,减少ROS生成,可有效抑制CSE诱导的NF-κB 激活,表明ROS在吸烟导致炎症反应中起着重要的作用。番茄红素是自然界内最强的抗氧化剂之一,其清除单线态氧的速度常数,是目前常用抗氧剂维生素E的100倍,β-胡萝卜素的两倍以上,它主要通过单线态氧的淬灭、自由基的清除而发挥强大抗氧化作用^[17]。本研究结果也显示番茄红素能够明显抑制CSE诱导的细胞内ROS生成,并呈浓度-效应关系。

综上所述,番茄红素能够有效抑制CSE诱导THP-1巨噬细胞炎症反应,该作用主要通过阻断CSE诱导细胞内ROS生成进而抑制NF-κB 依赖的炎症因子IL-6和TNF-α分泌发挥的,这可能是番茄红素抑制吸烟导致的炎症反应的重要作用机制。

参考文献

[1] Burke GM, Genuardi M, Shappell H, et al. Temporal associations between smoking and cardiovascular

disease, 1971 to 2006 (from the framingham heart study) [J]. Am J Cardiol, 2017, 120(10): 1787-1791.

[2] Zou J, Feng D. Lycopene reduces cholesterol ab-

- sorption through the downregulation of Niemann-Pick C1-like 1 in Caco-2 cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(11): 2225-2230.
- [3] Costa-Rodrigues J, Pinho O, Monteiro PRR. Can lycopene be considered an effective protection against cardiovascular disease [J]? *Food Chem*, 2018, 15(245): 1148-1153.
- [4] Sesso HD, Liu S, Gaziano JM, et al. Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women [J]. *J Nutr*, 2003, 133(7): 2336-2341.
- [5] Zou J, Feng D, Ling W H, et al. Lycopene suppresses proinflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by inhibiting ROS-induced trafficking of TLR4 to lipid raft-like domains [J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(6): 1117-1122.
- [6] 冯丹, 凌文华. 番茄红素对脂多糖诱导巨噬细胞炎症反应的作用及其分子机制 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2011, 32(4): 421-425.
- Feng D, Ling WH. Effects of lycopene on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in macrophages and its possible molecular mechanism [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2011, 32(4): 421-425.
- [7] Vayssier-Taussat M, Camilli T, Aron Y, et al. Effects of tobacco smoke and benzo[a]pyrene on human endothelial cell and monocyte stress responses [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280(3): H1293-H1300.
- [8] Feng D, Liu T, Wang H, et al. Mediation role of C-reactive protein on the association between smoking quantity and type 2 diabetes in current Chinese smokers [J]. *J Diabetes Res*, 2014, 18(23): 171538-171541.
- [9] Feng D, Liu T, Su DF, et al. The association between smoking quantity and hypertension mediated by inflammation in Chinese current smokers [J]. *J Hypertens*, 2013, 31(9): 1798-1805.
- [10] 孙咏梅, 戴树桂, 裘著革. 香烟烟雾成分分析及其对DNA生物氧化能力研究 [J]. *环境与健康杂志*, 2001, 18(4): 203-207.
- Sun YM, Dai SG, Xi ZG. Analysis of components in tobacco smoke and study of its biological oxidative ability on DNA [J]. *J Environ Health*, 2001, 18(4): 203-207.
- [11] 程攀, 何庆, 张晓宇, 等. 载气吹扫尼古丁长期吸入对大鼠心血管功能? 氧化应激和炎症水平影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(6): 834-839.
- Cheng P, He Q, Zhang XY, et al. Effects of long-term inhalation of nicotine by gas-purge on cardiovascular function, oxidative stress and inflammation in rats [J]. *Acta Uni Med Anhui*, 2018, 53(6): 834-839.
- [12] Chiba T, Inoko H, Kimura M, et al. Role of nuclear IκBs in inflammation regulation [J]. *Biomol Concepts*, 2013, 4(2): 187-196.
- [13] Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF-κB: a blossoming of relevance to human pathobiology [J]. *Cell*, 2017, 168(1-2): 37-57.
- [14] Nishikawa M. Cigarette smoke-induced acute airway impairment [J]. *Nihon Ko Ga Za*, 2000, 38(5): 347-353.
- [15] Niemann B, Rohrbach S, Miller MR et al. Oxidative stress and cardiovascular risk: obesity, diabetes, smoking, and pollution: Part 3 of a 3-Part Series [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70(2): 230-251.
- [16] Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, et al. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling [J]. *Circ Res*, 2018, 122(6): 877-902.
- [17] Rao AV, Shen H. Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress [J]. *Nutr Res*, 2002, 22(10): 1125-1131.

(编辑 王晓鹰)