

·基础研究·

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

冯 丹, 凌文华*

(中山大学公共卫生学院预防医学系//广东省营养膳食与健康重点实验室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨番茄红素对脂多糖(LPS)所诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症因子生成的影响及其作用的分子机制。【方法】分别用 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的番茄红素孵育细胞 1 h, 再用 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 处理细胞不同时间, 分别用 Griess 法和 ELISA 法检测 RAW264.7 巨噬细胞培养基中 NO 及 IL-6 的含量, 用 Western-blot 检测核因子- κB (NF- κB) p65、磷酸化和非磷酸化 I- $\kappa\text{B}\alpha$ 、丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)的蛋白表达量。【结果】番茄红素能有效地降低炎症因子 NO 和 IL-6 分泌, 进一步研究显示番茄红素能够抑制 LPS 诱导 I- $\kappa\text{B}\alpha$ 磷酸化和降解、NF- κB 核转移, 阻断 ERK1/2 和 p38 MAPK 激活, 而对 JNK 活化没有影响。【结论】番茄红素能够通过抑制 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路的激活而抑制巨噬细胞 NF- κB 依赖的炎症因子 NO 和 IL-6 生成, 这可能是番茄红素防治一些炎症相关性疾病的作用机制之一。

关键词: 番茄红素; 脂多糖; 炎症; 丝裂原活化蛋白激酶; 核因子- κB

中图分类号: R151 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2011)04-0421-05

Effects of Lycopene on Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Response in Macrophages and Its Possible Molecular Mechanism

FENG Dan, LING Wen-hua*

(Department of Preventive Medicine, School of Public Health, Sun Yat-sen University//Guangdong Provincial Key Laboratory of Food, Nutrition and Health, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effects of lycopene on lipopolysaccharide (LPS)-induced proinflammatory cytokines production in RAW264.7 cells and its possible molecular mechanism. 【Methods】RAW264.7 cells were pretreated with 1, 5, and 10 $\mu\text{mol/L}$ lycopene for 1 h and then treated with 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS for different time. The LPS-induced NO and IL-6 release in macrophages were assayed by the methods of Griess and ELISA, respectively. Western blotting was used to analyze nuclear factor- κB (NF- κB) P65, phosphorylated and non-phosphorylated I- $\kappa\text{B}\alpha$, mitogen activated protein kinases (MAPKs) protein expression. 【Results】Lycopene inhibited LPS-induced production of nitric oxide (NO) and interleukin-6 (IL-6). Further study showed that lycopene also inhibited LPS-induced I- $\kappa\text{B}\alpha$ phosphorylation, I- $\kappa\text{B}\alpha$ degradation, and NF- κB translocation. Moreover, lycopene blocked the phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAP kinase but not c-Jun NH2-terminal kinase. 【Conclusion】Lycopene inhibits the inflammatory response of RAW 264.7 cells to LPS through inhibiting ERK/p38MAP kinase and the NF- κB pathway, which is one of the mechanisms responsible for preventing inflammation-related diseases by lycopene.

Key words: lycopene; lipopolysaccharide; inflammation; mitogen activated protein kinases; nuclear factor- κB

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(4):421-425]

番茄红素(lycopene)是人类血浆和组织中一种重要的类胡萝卜素, 大约 50% 血浆类胡萝卜素来源于番茄红素, 人血浆番茄红素浓度为 0.2 ~ 5

$\mu\text{mol/L}$ 。番茄红素作为一种天然色素广泛存在于番茄、胡萝卜、西瓜和番石榴等蔬菜和瓜果中。人体自身不能合成番茄红素, 需通过膳食补充。番茄

收稿日期: 2011-04-19

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI58B06)

作者简介: 冯丹, 博士, 讲师, 研究方向: 植物化学物与健康及疾病, E-mail: fengdan3@mail.sysu.edu.cn; * 通信作者: 凌文华, E-mail: lingwh@mail.sysu.edu.cn

红素具有多种重要生理功能,它具有抗氧化、清除自由基、预防肿瘤和心血管疾病以及调节机体免疫功能等作用^[1]。流行病学研究资料显示,富含番茄红素的番茄及番茄制品的饮食摄入量、血清和组织中番茄红素的水平与慢性疾病如癌症、心血管疾病的发病危险呈负相关关系^[2-3]。炎症反应与一些慢性疾病如动脉粥样硬化、癌症发生发展有着密切的联系^[4-5]。番茄红素除了上述一些重要的生理功能和机体保护作用外,体内研究发现它还具有一定的抗炎作用^[6-7],但关于其作用的机制尚不清楚。RAW264.7 细胞是一种鼠源性的单核巨噬细胞系,在受到外界因素如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激时能够合成并释放大量的炎症介质和炎症因子,模拟体内炎症反应状态,作为一种炎症细胞模型而被广泛用于炎症研究。因此,本研究拟通过建立 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞的炎症实验模型,探讨番茄红素对巨噬细胞炎症因子生成的影响以及其作用的信号通路,以了解番茄红素的抗炎作用分子机制。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

RAW264.7 细胞株购自武汉大学中国细胞典藏中心;番茄红素、LPS、MAPKs 抑制剂 SB203580 和 U0126(美国 Sigma 公司);p65 抗体、磷酸化和非磷酸化 I- κ B α 、ERK1/2、p38 MAPK 和 JNK 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂(美国 Sigma 公司);TranAmTM NF- κ B Transcription Factor 试剂盒(美国 Active Motif 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 细胞培养及分组

将 RAW264.7 细胞接种入 25 cm² 细胞培养瓶,加入含体积分数 10%胎牛血清的 DMEM 培养基(青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μ g/mL) 4~5 mL,置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中,体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下培养。每 2~3 d 换液 1 次。用 0.25%胰蛋白酶和 0.1% EDTA 混合消化液(1:1)消化传代培养。实验时,更换新鲜培养基并分别加入终浓度为 1、5、10 μ mol/L 的番茄红素预孵育细胞 1 h,再加入终浓度为 1 μ g/mL 的 LPS 处理细胞不同的时间。番茄红素溶于二甲基亚砜

(dimethyl sulfoxide, DMSO) 中,DMSO 在细胞中的终体积分数为 0.1%,0.1% DMSO 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 μ g/mL LPS 组;1 μ mol/L lycopene +1 μ g/mL LPS 组;5 μ mol/L lycopene +1 μ g/mL LPS 组;10 μ mol/L lycopene+1 μ g/mL LPS 组。

1.3 Western blot 分析

提取细胞总蛋白和核蛋白并测定其浓度,取 30 μ g 蛋白样品进行电泳,将蛋白转移到 PVDF 膜上,用封闭液室温封闭 2 h,加一抗兔抗鼠 p65、磷酸化和非磷酸化 I- κ B α 、ERK1/2、p38 MAPK、JNK 或 β -actin 抗体,抗体稀释度为 1:1 000,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBS-T 洗 3 次,每次 5 min,加入辣根酶标记山羊抗兔二抗室温孵育 1 h,TBS-T 洗 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。

1.4 RAW264.7 细胞中 NO 及白细胞介素-6 表达水平测定

常规 Griess 法^[8]检测 RAW264.7 巨噬细胞培养基中 NO 的含量,ELISA 法检测 RAW264.7 巨噬细胞培养基中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的含量,按说明书操作。

1.5 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。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件建立数据库,进行统计分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数采用方差齐性检验和单因素方差分析(One-way ANOVA),各组间两两比较采用 Bonferroni 法,检验水准为 $P < 0.05$ 。所有分析均在 SPSS 13.0 软件包上实现。

2 结 果

2.1 番茄红素抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 NO 和 IL-6 生成

1、5、10 μ mol/L 番茄红素孵育 RAW264.7 巨噬细胞后均能明显的抑制 LPS 诱导的 NO 和 IL-6 分泌,其中 5、10 μ mol/L 番茄红素可分别降低 NO 生成达 27.9% 和 52.8%,降低 IL-6 生成达 20% 和 43%,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),并呈浓度-效应关系(图 1)。

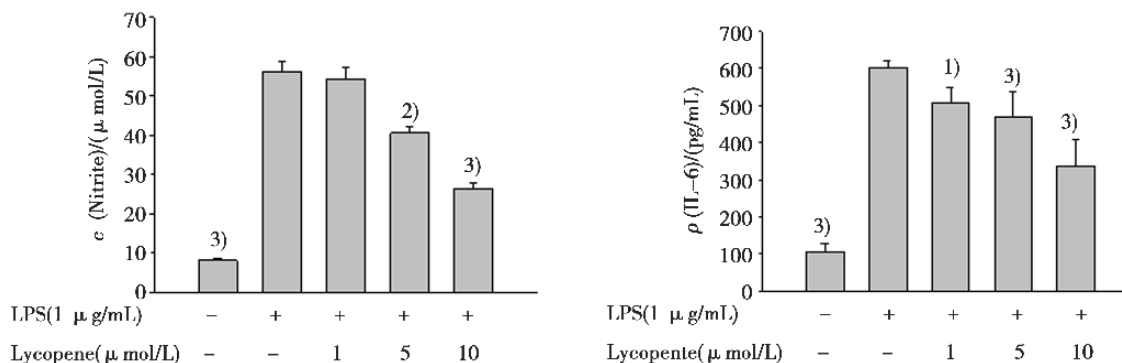


图1 番茄红素对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞NO和IL-6生成的影响

Fig.1 Effects of lycopene on LPS-induced NO and IL-6 production in RAW 264.7 cells

Data are the mean $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ or 3) $P < 0.001$ compared with LPS alone. Lycopene inhibited LPS-induced NO and IL-6 production

2.2 番茄红素抑制LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞NF-κB激活

NF-κB是炎症反应早期的重要调控因子。NF-κB上的I-κBα降解后,其活性成分向细胞核内转移是NF-κB活化的第一步。p65是介导NF-κB核转移的主要组成部分,NF-κB p65向细胞核内转移并与DNA结合后诱导炎症相关基因转录和表达。如图2所示,1 μg/mL LPS作用RAW264.7细胞1 h,可显著促进NF-κB核转移和与DNA结合,核p65蛋白的表达水平和NF-κB DNA结合活性均明显高于空白对照组。1、5、10 μmol/L番茄红素预孵育细胞1 h能有效地阻抑LPS诱导NF-κB p65核转移(图2A),降低NF-κB DNA结合活性($P < 0.01$,图2B),这一作用也具有明显的浓度-效应关系。

2.3 番茄红素抑制LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞I-κBα磷酸化和降解

由于NF-κB的激活和核转移首先是由I-κBα磷酸化和降解所介导的,为进一步探讨番茄红素抑制NF-κB激活的作用机制,我们用Western blot方法检测I-κBα磷酸化和降解情况。如图3所示,1 μg/mL LPS作用RAW264.7细胞30 min,可明显诱导I-κBα磷酸化和降解。1、5、10 μmol/L番茄红素预孵育细胞1 h能够抑制LPS诱导I-κBα磷酸化,阻抑I-κBα降解,差异具有统计学意义($P < 0.001$;图3)。

2.4 番茄红素对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞MAPKs信号通路激活的影响

MAPKs在NF-κB激活和炎症介质生成中起着重要作用,为了进一步确定MAPKs信号通路途

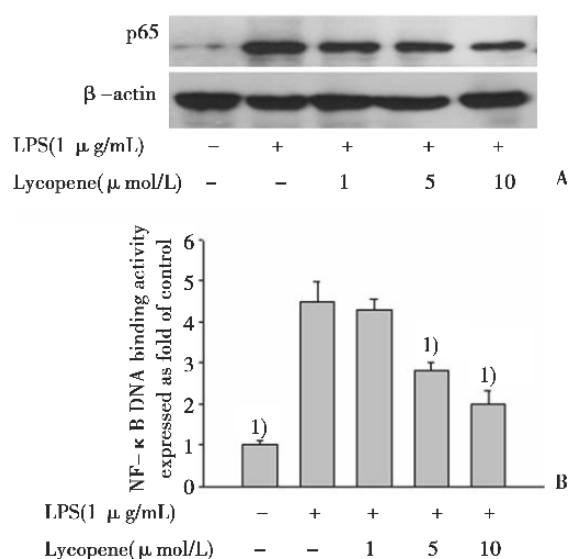


图2 番茄红素对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞NF-κB激活的影响

Fig. 2 Effect of lycopene on LPS-induced NF-κB activation in RAW 264.7 cells

Each bar represents the $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments. 1) $P < 0.01$ compared with LPS alone. A: showed lycopene inhibited LPS-induced NF-κB p65 nuclear translocation; B: showed that lycopene inhibited LPS-induced NF-κB DNA binding

径在番茄红素抗炎中的作用,采用Western blot检测3种MAPKs(包括ERK1/2,p38MAPK和JNK)的磷酸化水平。如图4所示,与空白对照组比较,1 μg/mL LPS作用RAW264.7巨噬细胞15 min,ERK1/2,p38 MAPK和JNK的磷酸化水平均显著增高。1、5、10 μmol/L番茄红素预孵育细胞1 h能够抑制LPS诱导ERK1/2和p38 MAPK磷酸化,

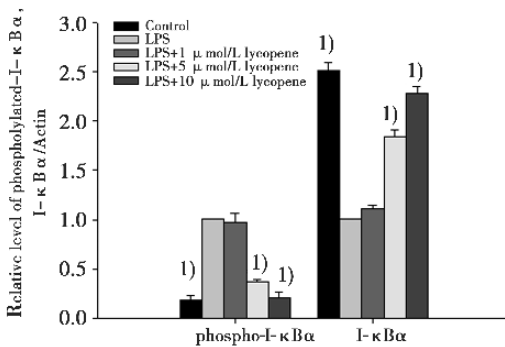
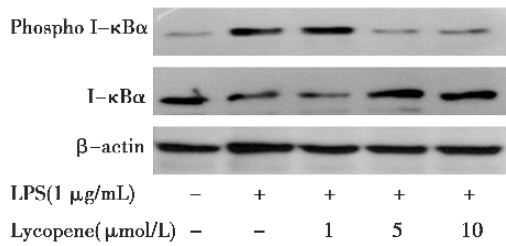


图 3 番茄红素对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 I-κBα 磷酸化和降解的影响

Fig.3 Effects of lycopene on LPS-induced I-κBα phosphorylation and degradation in RAW 264.7 cells

The results are representative of three independent experiments.1)P < 0.001 compared with LPS alone. Lycopene blocked LPS-induced I-κBα phosphorylation and degradation

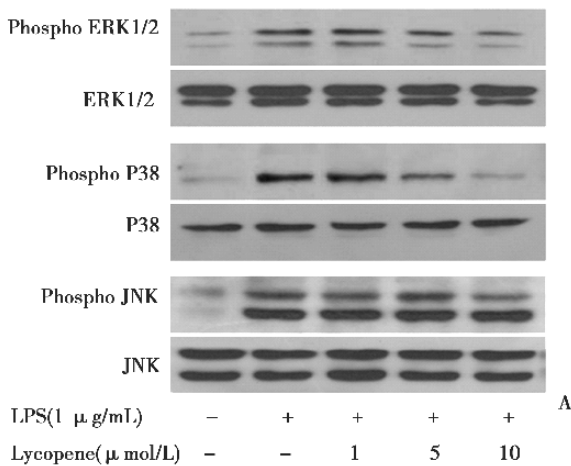


图 4 番茄红素对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 MAPKs 信号通路激活的影响

Fig.4 Effects of lycopene on LPS-induced activation of MAPKs in RAW 264.7 cells

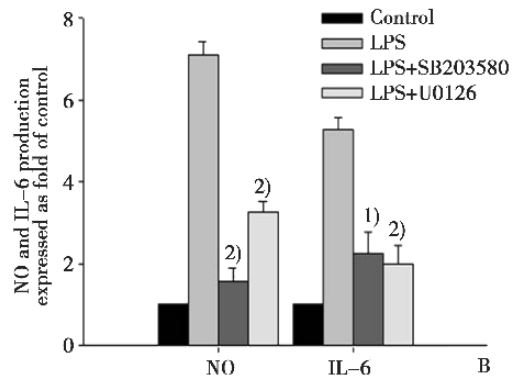
The results are representative of three independent experiments. 1)P < 0.01 or 2)P < 0.001 compared to LPS. A showed that lycopene inhibited LPS-induced ERK1/2 and p38 MAPK activation. B showed that activation of ERK1/2 and p38 MAPK mediated LPS-induced NO and IL-6 production

而对 JNK 的活化无明显的影响,其中以 5、10 μmol/L 番茄红素作用最强(图 4A)。为了进一步明确干扰 ERK/p38MAPK 信号通路激活介导了番茄红素的抗炎效应,分别用 ERK1/2 阻断剂 U0126 和 p38 MAPK 阻断剂 SB203580 预处理巨噬细胞 2 h,发现分别阻断 ERK1/2 和 p38 MAPK 后,LPS 诱导的巨噬细胞 NO 和 IL-6 分泌明显降低,与 LPS 组比较,差异具有统计学意义 (P < 0.01, P < 0.001;图 4B),表明抑制 ERK1/2 和 p38 MAPK 激活是介导番茄红素抗炎作用的一个重要的上游机制。

3 讨论

巨噬细胞在炎症反应中起着重要的作用,它在受到外界刺激如 LPS,可释放大量的炎症介质和促炎因子如一氧化氮 NO 和白介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1α、肿瘤坏死因子-α 等,后者介导了炎症发生发展以及组织的损伤^[9]。本实验结果显示,番茄红素可显著降低巨噬细胞炎症介质 NO 和促炎因子 IL-6 分泌,抑制炎症反应。

机体的炎症信号通路受到多种复杂机制的调节,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein



kinases, MAPKs)和核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB)是其中重要的调节机制之一。NF-κB 是一个重要的转录因子,介导了许多免疫和炎症基因的表达和调控,在炎症反应中起着重要的作用^[10]。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 结合在一起。当细胞受到刺激如受到内毒素 LPS 的刺激,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^[11]。另外 NF-κB 的激活也受到上游一些蛋白激酶的调控,

其中包括 MAPKs。本实验结果显示,番茄红素能够通过抑制 LPS 诱导 I- κ B α 磷酸化和降解而阻断 NF- κ B p65 核转移,降低 NF- κ B DNA 结合活性,从而抑制 NF- κ B 的激活。

MAPKs 是一类高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,主要包括 ERK1/2、p38MAPK 和 JNK。MAPKs 能被多种炎性刺激所激活,并对炎症的发生、发展起重要调控作用^[12]。大量的研究报道 LPS 可诱导巨噬细胞三种 MAPKs 激活,巨噬细胞也可通过不同的 MAPKs 途径调节炎症反应,并且三种 MAPKs 对不同的抗炎化合物可能有不同的反应和应答^[13],如从黑莓中的提取的花色苷能通过抑制 ERK1/2 激活,降低由 NF- κ B 所介导的炎性因子的表达^[14];大豆异黄酮类化合物异丁子香酚主要干扰 ERK、p38MAPK 信号通路的激活,从而阻断 NF- κ B 所介导的炎性因子的生成^[15]。与许多研究报道相一致,本实验用 1 μ g/mL LPS 可显著诱导三种激酶 ERK1/2、p38MAPK 和 JNK 激活,不同浓度的番茄红素预处理细胞可阻断 LPS 诱导 ERK1/2 和 p38MAPK 激活,而对 JNK 活化没有显著的作用,提示番茄红素对 ERK1/2、p38MAPK 和 JNK 信号通路有不同的调节作用,这可能是由于 MAPKs 对不同的化合物有不同的反应。另外,为了进一步明确干扰 ERK/p38MAPK 通路激活介导了番茄红素的抗炎效应,我们分别用 ERK1/2 阻断剂 U0126 和 p38 MAPK 阻断剂 SB203580 预处理巨噬细胞 2 h,发现分别阻断 ERK1/2 和 p38 MAPK 后,LPS 诱导的巨噬细胞 NO 和 IL-6 分泌明显降低,表明 ERK1/2 和 p38 MAPK 通路激活在 LPS 诱导的巨噬细胞 NO 和 IL-6 生成中起着重要的作用,番茄红素可通过阻断 LPS 诱导 ERK/p38 通路激活,进而抑制 NF- κ B 依赖的 NO 和 IL-6 分泌。

综上所述,阻断 ERK1/2 和 p38MAPK 信号通路的激活,抑制 NF- κ B 活化及相关炎性因子的生成,是番茄红素发挥抗炎效应的重要作用途径,也是其防治一些炎症相关性疾病的作用机制之一。

参考文献:

- [1] Kong KW, Khoo HE, Prasad KN, et al. Revealing the power of the natural red pigment lycopene [J]. *Molecules*, 2010, 15(2): 959-987.
- [2] Rissanen T, Voutilainen S, Nyyssonen K, et al. Low plasma lycopene concentration is associated with increased intima-media thickness of the carotid artery wall[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(12): 2677-2681.
- [3] Nkondjock A, Ghadirian P, Johnson KC, et al. Dietary intake of lycopene is associated with reduced pancreatic cancer risk[J]. *J Nutr*, 2005, 135(3): 592-597.
- [4] Montecucco F, Mach F. Atherosclerosis is an inflammatory disease[J]. *Semin Immunopathol*, 2009, 31(1): 1-3.
- [5] Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer[J]. *Mutat Res*, 2008, 659(1-2): 15-30.
- [6] Saedisomeolia A, Wood LG, Garg ML, et al. Lycopene enrichment of cultured airway epithelial cells decreases the inflammation induced by rhinovirus infection and lipopolysaccharide[J]. *J Nutr Biochem*, 2009, 20(8): 577-585.
- [7] Lee CM, Chang JH, Moon DO, et al. Lycopene suppresses ovalbumin-induced airway inflammation in a murine model of asthma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(9): 248-252.
- [8] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids [J]. *Anal Biochem*, 1982, 126(1): 131-138.
- [9] Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1995, 35(9): 655-677.
- [10] Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(11): 837-848.
- [11] Wan F, Lenardo MJ. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives[J]. *Cell Res*, 2010, 20(1): 24-33.
- [12] Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 661(9): 3-38.
- [13] Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs[J]. *Oncogene*, 2007, 26(22): 3100-3112.
- [14] Pergola C, Rossi A, Dugo P, et al. Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract[J]. *Nitric Oxide*, 2006, 15(1): 30-39.
- [15] Choi CY, Park KR, Lee JH, et al. Isoeugenol suppression of inducible nitric oxide synthase expression is mediated by down-regulation of NF-kappaB, ERK1/2, and p38 kinase[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 576(1-3): 151-159.

(编辑 刘清海)