

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.21.023

茶黄素在大鼠气道上皮细胞炎症损伤中的作用及可能机制*

文秀芳¹, 陈霞¹, 邬海桥^{1△}, 周向东²

(1. 重庆市第三人民医院呼吸内科 400014; 2. 重庆医科大学第二临床学院呼吸内科 400010)

摘要:目的 研究茶黄素对原代培养的大鼠气道上皮细胞表达 TLR4 及分泌 TNF- α 和 IL-6 的影响。方法 用脂多糖(LPS)建立体外大鼠气道上皮细胞炎症损伤模型,采用 ELISA 检测气道上皮细胞分泌 TNF- α 、IL-6 和气道上皮细胞中 TLR4 蛋白水平,RT-PCR 检测气道上皮细胞 TLR4 mRNA 的水平。结果 LPS 明显诱导大鼠气道上皮细胞分泌 TNF- α 、IL-6,同时增强 TLR4 mRNA 和 TLR4 蛋白的表达($P < 0.01$)。茶黄素可抑制 LPS 诱导 TNF- α 、IL-6 的分泌和 TLR4 基因的表达($P < 0.05$),并且与茶黄素药物浓度有关($P < 0.05$)。结论 在大鼠的气道上皮细胞培养中,茶黄素抗炎作用可能通过抑制 TLR4 基因的表达、LPS/TLR4 信号传导通路,从而减少炎性细胞因子的释放。

关键词:肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素-6; 脂多糖; 茶黄素; TLR4 mRNA

中图分类号: R562.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)21-2756-03

Effect of theaflavin on LPS-induced inflammatory injury of rat airway epithelial cell and possible mechanism*

Wen Xiufang¹, Chen Xia¹, Wu Haiqiao^{1△}, Zhou Xiangdong²

(1. Department of Respiratory Medicine, the Third People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014, China;

2. Department of Respiratory Medicine, Second Clinical College of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To study the influence of theaflavin on the expressions of TLR4 and release of TNF- α and IL-6 in primarily cultured rat airway epithelial cells. **Methods** Lipopolysacchride(LPS) was adopted to establish the in vitro inflammatory injury model of rat airway epithelial cell, the TNF- α and IL-6 secreted by the airway epithelial cells and the TLR4 protein level in the airway epithelial cells were detected with ELISA and the expressions of TLR4 mRNA was detected with RT-PCR. **Results** LPS significantly induced the airway epithelial cells to secrete TNF- α and IL-6, and enhanced the TLR4 mRNA and TLR4 protein expression($P < 0.01$). Theaflavin could inhibit LPS induced TNF- α and IL-6 secretion and TLR4 gene expression($P < 0.05$), which was related with the theaflavin concentration ($P < 0.05$). **Conclusion** In rat airway epithelial cell culture, the anti-inflammatory effect of theaflavin may be decrease the release of inflammatory cytokines via inhibiting TLR4 gene expression and LPS/TLR4 signal transduction pathway.

Key words: tumor necrosis factor-alpha; interleukin-6; lipopolysaccharide; theaflavin; TLR4 mRNA

院内感染细菌主要为耐药革兰阴性细菌,且日益表现为广泛、多重耐药。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性细菌产生的内毒素,是其损害人体的主要成分。研究已证明 TLR4 为 LPS 受体, LPS 引起的机体一系列反映通过 TLR4 信号途径,产生一系列生物效应,并引起机体的损害。目前研究认为茶黄素具有抗炎和免疫调节作用。茶黄素对 LPS 导致气道上皮细胞的 TLR4 表达和炎性介质释放是否有影响不清楚,国内少见相关报道,本研究探讨茶黄素在 LPS 诱导气道上皮细胞表达 TLR4 和释放 TNF- α 、IL-6 炎性介质中的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料 成年 SD 大鼠(重庆医科大学动物实验中心);茶黄素(上海一基生物试剂有限公司);大肠杆菌 LPS(美国 Sigma 公司);RNA 抽提试剂盒及 RT-PCR 试剂盒(大连 TaKaRa 公司);TNF- α 及 IL-6 ELISA 试剂盒(晶美生物工程有限公司);大鼠 TLR4 ELISA 试剂盒(上海时代生物科技有

限公司);MTG2000 图像分析测量系统。

1.2 方法

1.2.1 气道上皮细胞的原代培养及鉴定 从 SD 大鼠气管中分离出气道上皮细胞,将之放在 5% CO₂ 孵箱中 37 °C 孵育。用台盼蓝染色检查存活率,要求在 95% 左右。当细胞达融合状态时,用抗角蛋白抗体进行上皮细胞的鉴定。经鉴定的上皮细胞培养于 1640 培养基中,其中含小牛血清(10%)、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 mg/L),37 °C 下置于 5% CO₂ 培养箱中。采用 MTT 法测定细胞活性。细胞接种于 96 孔培养板,每孔 200 μ L 完全培养基细胞悬液中含有 1×10^4 个细胞,培养 24 h 后用于实验。

1.2.2 实验分组 实验分为对照组(无干预无刺激)、模型组(LPS 刺激)和干预组。干预组分 4 种不同茶黄素浓度组: T40 组(LPS 和茶黄素 40 μ g/mL), T60 组(LPS 和茶黄素 60 μ g/mL), T80 组(LPS 和茶黄素 80 μ g/mL), T100 组(LPS 和茶黄素 100 μ g/mL)。用 10 μ g/mL 浓度的 LPS 刺激气道上皮细胞

* 基金项目:重庆市科委资助项目(cstc2013jcyjA1062)。 作者简介:文秀芳(1971—),副主任医师,硕士,主要从事气道炎症发生机制及防治研究。 △ 通讯作者, E-mail:20571380@qq.com。

1 h, 干预组在 LPS 刺激前用不同浓度茶黄素预处理 12 h, 培养 24 h 后用 MTT 法检测各组细胞活力。各组培养于 8 h 收集上清液; 培养 24 h 后收集细胞分别用于下面的实验。

1.2.3 ELISA 检测 各组培养上清液的 TNF- α 及 TL-6 水平 取各组细胞培养上清液 50 μ L, 按 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.2.4 ELISA 检测 各组培养细胞中 TLR4 蛋白水平 取各组培养的细胞, 使用细胞裂解液, 提取各组培养瓶的总蛋白, 取各组蛋白 50 μ L, 按大鼠 TLR4 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.2.5 RT-PCR 检测 TLR4 mRNA 按 RNA 抽提试剂盒说明书一步法提取各组气道上皮细胞总 RNA, 按 RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录为 cDNA 及 PCR。管家基因 GAPDH 扩增引物: 上游 5'-GGA TGA TGC CTC TCT TGC AT-3', 下游 5'-TGA TCC ATG CAT TGG TAG GTA A-3'。TLR4 扩增引物: 上游 5'-TGG AAG TTG AAC GAA TGG AAT GTG-3', 下游 5'-ACC AGA ACT GCT ACA ACA GAT ACT-3'。反应条件设置: 预变性 (95 $^{\circ}$ C 4 min), PCR 扩增反应 (94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环)。产物经凝胶电泳鉴定基因片段, 目的基因 (127 bp)、管家基因 (178 bp) 的积分光密度比值作为目的基因 mRNA 的相对水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较行方差分析, 组间的两两比较行 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组细胞培养上清液 TNF- α 、IL-6 水平 在对照组中只有极少量的 TNF- α 、IL-6 的分泌。经 LPS 刺激 8 h 后的 TNF- α 、IL-6 的水平, 在模型组明显增加, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 各干预组均明显减少, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各干预组间亦有明显差异 ($P < 0.05$), 茶黄素剂量越高气道上皮细胞分泌 TNF- α 、IL-6 的水平越低。各干预组与对照组比较均有明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 各组 TLR4 mRNA 及蛋白比较 LPS 刺激大鼠气道上皮细胞 24 h 后 TLR4 mRNA 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); TLR4 蛋白的表达水平明显增强, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。给予不同浓度茶黄素干预后, 均明显降低了 TLR4 mRNA 及蛋白表达水平, 各干预组与模型组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 各干预组间 TLR4 mRNA 及蛋白水平比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 随茶黄素剂量增加而递减。见表 2、图 1。

表 1 各组 TNF- α 、IL-6 的水平比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	TNF- α	IL-6
对照组	0.041 \pm 0.007	0.032 \pm 0.004
模型组	0.960 \pm 0.050	1.090 \pm 0.010
T40 组	0.740 \pm 0.020	0.860 \pm 0.060
T60 组	0.560 \pm 0.060	0.670 \pm 0.030
T80 组	0.340 \pm 0.020	0.410 \pm 0.060
T100 组	0.140 \pm 0.060	0.180 \pm 0.030

表 2 各组 TLR4 mRNA 及蛋白比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	TLR4 mRNA	TLR4 蛋白 (pg/mL)
对照组	1.144 \pm 0.055	1.990 \pm 0.120
模型组	1.811 \pm 0.058	16.500 \pm 0.100
T40 组	0.734 \pm 0.072	11.860 \pm 0.260
T60 组	0.672 \pm 0.076	7.020 \pm 0.210
T80 组	0.371 \pm 0.018	4.440 \pm 0.310
T100 组	0.267 \pm 0.038	2.160 \pm 0.150

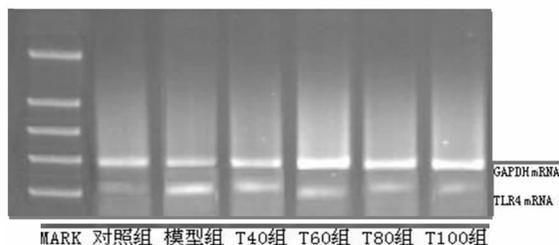


图 1 各组 TLR4 mRNA 电泳结果

3 讨 论

TLR4 不仅可以识别革兰阴性菌 LPS, 还是将 LPS 信号由胞外转向胞内的关键信号分子, TLR4 在炎症反应中的表达变化对机体的炎症反应具有重要的调控作用。在 LPS 刺激人单核细胞分泌 TNF- α 中, 存在 TLR4 抗体时, LPS 刺激作用被抑制^[1]。目前发现 LPS 与 TLR4 结合后可能启动如下信号转导途径^[2-3]: (1) 通过依赖性的 MyD88/非依赖 MyD88 途径; (2) 导致 MAPK 信号通路、NF- κ B 的激活, 使多种细胞因子的瀑链式释放而产生生物学效应^[4]。

研究不仅发现茶黄素具有良好的生物活性, 如抗炎、抗黏液高分泌、抗氧化、免疫调节等药理作用^[5-10], 而且发现茶黄素可减少多种疾病过程中相关炎症分子的分泌而减轻机体的炎症反应。茶黄素明显减少 LPS 诱导 TNF- α 生成^[11], 茶黄素明显降低 TPA 诱导 TL-6 水平^[12], 与本研究结论一致。研究还发现茶黄素可通过抑制炎症相关的 NF- κ B 信号通路: 茶黄素预处理可明显抑制细胞核内 NF- κ B 活性的升高, 进而显著降低 iNOS 和 TNF- α 等在结肠黏膜中的表达^[6, 13]; 用 TPA 诱导鼠皮肤炎症模型中茶黄素明显抑制 IL-1B、IL-6、TNF- α 、C-JUN、NF- κ B 的转录水平的表达^[12]。

本研究证明 LPS 明显诱导 TLR4 基因表达及增量分泌 TNF- α 及 IL-6。在茶黄素的干预下, LPS 诱导 TLR4 基因表达及分泌 TNF- α 、IL-6 的作用明显被抑制, 给予干预茶黄素剂量越大, 抑制作用越明显。茶黄素抑制 TLR4 基因表达同时 LPS/TLR4 信号传导通路下游的 TNF- α 、IL-6 亦明显减少。结合 Kim 等^[2] 研究茶黄素可通过阻断 TLR4 启动的信号转导途径抑制 LPS 诱导 IL-6、MCP-1、ICAM-1 的表达而具有抗炎作用, 在离体及载体实验中茶黄素均表现出明显抗炎活性^[12]。可以推测出茶黄素是通过抑制 LPS/TLR4 信号传导通路相关因子如 TLR4、NF- κ B 等的表达, 从而减少炎症细胞因子的释放而起抗炎作用。尽管抗菌药物种类多, 但细菌日益耐药, 多重耐药、泛耐药细菌的不断出现, 研发新抗菌药物难以突破, 寻找减轻细菌感染对机体的损伤和影响的药物是紧迫的。随着

进一步对茶黄素在急性炎症中体内、外研究,茶黄素有可能作为一种有价值、有潜力的抗感染药物。

参考文献:

- [1] Lagoumintzis G, Xaplanteri P, Dimitracopoulos G, et al. TNF- α induction by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide or slime-glycolipoprotein in human monocytes is regulated at the level of Mitogen-activated Protein Kinase activity: a distinct role of Toll-like receptor 2 and 4[J]. *Scand J Immunol*, 2008, 67(2): 193-203.
- [2] Kim S, Joo YE. Theaflavin inhibits LPS-Induced IL-6, MCP-1, and ICAM-1 expression in bone Marrow-Derived macrophages through the blockade of NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *Chonnam Med J*, 2011, 47(2): 104-110.
- [3] Lai TY, Wu SD, Tsai MH, et al. Transcription of *tifaip3* is regulated by NF- κ B and p38 via C/EBP β in activated macrophages[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73153.
- [4] Yang YX, Li GY. Progression of lipopolysaccharide signal pathway[J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2006, 31(1): 141-145.
- [5] Cai F, Li CR, Wu JL, et al. Theaflavin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-inflammatory effect and modulation of STAT-1[J]. *Mediators Inflamm*, 2006(5): 30490.
- [6] Ukil A, Maity S, Das PK. Protection from experimental colitis by theaflavin-3, 3'-digallate correlates with inhibition of IKK and NF-kappaB activation[J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 149(1): 121-131.
- [7] Wu HQ, Ding YP, Zhou XD, et al. Roles of theaflavins in inflammatory airway mucus hypersecretion[J]. *Shanghai Jiaotong Univ(Med Sci)*, 2009, 29(2): 126-129.
- [8] Arent SM, Senso M, Golem DL, et al. The effects of theaflavin-enriched black tea extract on muscle soreness, oxidative stress, inflammation, and endocrine responses to acute anaerobic interval training: a randomized, double-blind, crossover study[J]. *J Int Soc Sports Nutr*, 2010, 7(1): 11.
- [9] Cai F, Li C, Wu J, et al. Modulation of the oxidative stress and nuclear factor kappaB activation by theaflavin 3, 3'-gallate in the rats exposed to cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Folia Biol (Praha)*, 2007, 53(5): 164-172.
- [10] Yoshino K, Yamazaki K, Sano M. Preventive effects of black tea theaflavins against mouse type IV allergy[J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90(12): 1983-1987.
- [11] Luo XY, Takahara T, Hou J, et al. Theaflavin attenuates ischemia-reperfusion injury in a mouse fatty liver model[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(1): 287-293.
- [12] Gossiau A, En Jao DL, Huang MT, et al. Effects of the black tea polyphenol theaflavin-2 on apoptotic and inflammatory pathways in vitro and in vivo[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55(2): 198-208.
- [13] Sun Z, Andersson R. NF- κ B activation and inhibition: a re-view[J]. *Shock*, 2002, 18(2): 99-106.

(收稿日期: 2014-02-06 修回日期: 2014-03-27)

(上接第 2755 页)

- H, et al. Inhibitory effect of dietary perilla oil rich in the n-3 polyunsaturated fatty acid alpha-linolenic acid on colon carcinogenesis in rats[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1991, 82(10): 1089-1096.
- [9] Narisawa T, Fukaura Y, Yazawa K, et al. Colon Cancer prevention with a small amount of dietary perilla oil high in alpha-linolenic acid in an animal model[J]. *Cancer*, 1994, 73(8): 2069-2075.
- [10] Onogi N, Okuno M, Komaki C, et al. Suppressing effect of perilla oil on azoxymethane-induced foci of colonic aberrant crypts in rats[J]. *Carcinogenesis*, 1996, 17(6): 1291-1296.
- [11] Komaki C, Okuno M, Onogi N, et al. Synergistic suppression of azoxymethane-induced foci of colonic aberrant crypts by the combination of beta-carotene and perilla oil in rats[J]. *Carcinogenesis*, 1996, 17(9): 1897-1901.
- [12] 王威, 闫喜英, 王永奇. 紫苏油药理活性研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2000, 11(3): 283-284.
- [13] Zhao ML, Tang L, Zhu XM, et al. Enzymatic production of zero-trans plastic fat rich in α -linolenic acid and medium-chain fatty acids from highly hydrogenated soybean oil, Cinnamomum camphora seed oil, and perilla oil by lipozyme TLIM[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(6): 1189-1195.
- [14] 吴旭锦, 朱小甫. 紫苏子油纳米乳诱导小鼠乳腺癌细胞 EMT-6 凋亡试验[J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(11): 1522-1525.

(收稿日期: 2014-01-08 修回日期: 2014-02-20)

欢迎投稿

欢迎订閱