

氧化苦参碱对脂多糖诱导的胰腺星状细胞NOD样受体蛋白3活化的影响

陈伟¹, 许威², 向晓辉², 陈凯², 张青³, 夏时海^{2*}

1. 武警后勤学院, 天津 300309

2. 武警后勤学院附属医院 消化二科/肝胆胰脾中心, 天津 300162

3. 天津市西青医院 消化内科, 天津 300380

摘要: 目的 研究氧化苦参碱(OM)对脂多糖(LPS)诱导的大鼠胰腺星状细胞株(PSCs)NOD样受体蛋白3(NLRP3)活化的影响。方法 通过设置不同剂量(0、2.5、5、10、20、40 μg/mL)的LPS并设置相同剂量(10 μg/mL)的LPS刺激LTC14细胞不同时间(0、1、3、6、9、12 h),利用Western blotting检测技术,考察LPS引起炎性小体活化的量效关系;使用OM、Janus蛋白酪氨酸激酶2(JAK2)抑制剂AG490干预LPS诱导的LTC14细胞株后,通过Western blotting技术检测Janus蛋白酪氨酸激酶2/信号转导子和转录激活子3(JAK2/STAT3)信号通路中相关分子以及NLRP3炎性小体相关蛋白表达的变化。结果 与对照组比较,LTC14细胞接受不同浓度的LPS刺激后JAK2、STAT3、NLRP3、caspase1、白细胞介素-1β(IL-1β)蛋白表达呈显著增高趋势;与对照组比较,LTC14细胞接受相同浓度LPS刺激不同时间后JAK2、STAT3、NLRP3、caspase1、IL-1β蛋白表达呈显著增高趋势;与LPS组对比,OM和LPS共同处理组、AG490和LPS共同处理组JAK2、STAT3、NLRP3、caspase1及IL-1β的蛋白表达显著降低。结论 LPS呈一定的时间-剂量关系激活LTC14细胞JAK2/STAT3信号通路及NLRP3炎性小体;OM可能通过抑制JAK2/STAT3信号通路起到抑制NLRP3炎性小体活化的作用。

关键词: 氧化苦参碱;脂多糖;LTC14细胞;JAK2/STAT3信号通路;NLRP3炎性小体

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)11-2159-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.11.006

Effect of oxymatrine on activation of NLRP3 in pancreatic stellate cells induced by lipopolysaccharide

CHEN Wei¹, XU Wei², XIANG Xiaohui², CHEN Kai², ZHANG Qing³, XIA Shihai^{2*}

1. Logistics College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China

2. Department of Gastroenterology and Hepatobiliary Pancreas and Spleen Center, Affiliated Hospital of Armed Police Logistics College, Tianjin 300162, China

3. Department of Gastroenterology, Tianjin Xiqing Hospital, Tianjin 300380, China

Abstract: Objective To study the effects of oxymatrine (OM) on the activation of NLRP3 in pancreatic stellate cells (PSCs) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** By setting different doses of LPS (0, 2.5, 5, 10, 20, 40 μg/mL) and setting the same dosage of LPS (10 μg/mL) to stimulate LTC14 cells at different time (0, 1, 3, 6, 9, 12 h), the dose-effect relationship of LPS-induced inflammatory corpuscles activation was investigated by Western blotting. After using OM and JAK2 inhibitor AG490 to intervene LPS-induced LTC14 cell lines, the expression of related molecules in JAK2/STAT3 signaling pathway and NLRP3 inflammatory corpuscles-related protein were detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, the expression of JAK2, STAT3, NLRP3, caspase 1 and IL-1β protein in LTC14 cells were increased significantly after LPS stimulation at different concentrations. Compared with the control group, the expression of JAK2, STAT3, NLRP3, caspase 1 and IL-1β protein in LTC14 cells were increased significantly after LPS stimulation at the same concentration for different time. The protein expressions of

收稿日期: 2019-07-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81500489);天津市自然科学基金联合资助青年项目(15JCQNJC45600);天津市西青医院科研基金(XQYYLX201603)

第一作者: 陈伟(1988—),男,湖南新化人,硕士。Tel: 18630992973 E-mail: 2970926125@qq.com

*通信作者: 夏时海 E-mail: xshhc@sina.com

JAK2, STAT3, NLRP3, caspase 1 and IL-1 β were significantly decreased in LPS-treated group. **Conclusion** LPS activates JAK2/STAT3 signaling pathway and NLRP3 inflammatory corpuscles in LTC14 cells in a time-dose relationship. OM may inhibit NLRP3 inflammatory body activation by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway

Key words: oxymatrine; lipopolysaccharide; LTC14 cells; JAK2/STAT3 signaling pathway; NLRP3 inflammatory corpuscles

慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)是各种病因引起胰腺组织和功能不可逆改变的慢性炎症性疾病,临床主要表现为反复发作的上腹部疼痛和胰腺内、外分泌功能不全^[1]。近年来,众多研究表明,NOD样受体蛋白3(NLRP3)主要通过活化形成炎性小体,并引起一系列信号级联反应,最终导致白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18(IL-18)等炎症因子的生成增加^[2],NLRP3炎性小体与重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)有着密切的关系^[3],而CP很大程度上是在急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)基础上发展而来的,因此设想CP的发生亦与NLRP3炎性小体的激活相关。肠道细菌易位学说认为:正常情况下肠道内的细菌难以移动到肠外组织,但在细菌过度生长、肠黏膜破坏等情况下,细菌可突破肠黏膜屏障而发生易位;易位细菌除本身刺激细胞产生致炎因子外,死亡或被吞噬后释放的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可进一步刺激机体免疫系统产生大量炎症因子,最终造成多脏器损伤^[4]。LPS是革兰阴性菌细胞壁外膜的重要组成部分^[5],常用来模拟肠道细菌易位引起的机体或细胞炎症反应。氧化苦参碱(oxymatrine, OM)是豆科植物苦参的主要有效成分,具有抗炎、抗病毒、抗菌、抗肿瘤、抗心律失常等多种药理作用,近年来得到人们的关注,在临床应用方面也有了一定研究基础^[6]。本课题组前期研究表明,OM可以减弱LPS诱导的胰腺星状细胞(PSCs)中核因子- κ B(NF- κ B)的表达,对治疗胰腺炎有明显的疗效^[7],另外,OM通过调控TGF- β 诱导的人胰腺导管癌细胞PANC-1中Smad3/Gli1通路中相关因子的表达,发挥抗胰腺纤维化的作用,对治疗CP有着重要意义^[8]。

本实验以LPS刺激体外LTC14细胞模拟慢性胰腺炎模型,探索OM抑制NLRP3炎性小体活化机制,以期OM治疗CP提供理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

IMDM培养基、胎牛血清购自Gibco公司;青链霉素混合液、ECL发光液购自Solarbio公司;LPS(货号L2630)、OM(货号Y0002015)、AG490(货号658411)购自Sigma公司;BCA蛋白定量试剂盒、胰

酶消化液购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; β -actin(货号20536-1-AP)、JAK2(货号17670-1-AP)、STAT3(货号10253-2-AP)、caspase1(货号22915-1-AP)一抗购自Proteintech公司;NLRP3(货号w102635)、IL-1 β (货号w100891)一抗由沈阳万类生物科技公司提供。辣根酶标记的山羊抗兔IgG(IH-0011)购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.2 细胞株

大鼠胰腺星状细胞株LTC-14由德国Rostock大学医院Robert Jaster教授友情惠赠^[9]。细胞在含10%胎牛血清的IMDM培养基中,置于37℃、50 mL/L CO₂的孵箱(相对湿度为95%)中培养。

2 方法

2.1 分组方法

A:LTC-14细胞随机分为6组,铺种细胞至6孔板中,十字摇匀,待细胞融合至70%~80%后更换无血清无双抗培养基,饥饿处理3 h,分别加入0、2.5、5、10、20、40 μ g/mL LPS刺激3 h,弃去培养基,预冷PBS洗涤3次后加入RIPA裂解液裂解细胞,提取蛋白;B:LTC-14细胞随机分为6组,铺种细胞至6孔板中,待细胞融合至70%~80%后更换无血清无双抗培养基,饥饿处理3 h,分别加入10 μ g/mL LPS刺激0、1、3、6、9、12 h,弃去培养基,预冷PBS洗涤3次后加入RIPA裂解液裂解细胞,提取蛋白;C:LTC-14细胞随机分为4组,铺种细胞至6孔板中,十字摇匀,待细胞融合至70%~80%后更换无血清无双抗培养基,饥饿处理3 h,按照对照组(常规培养)、LPS组、LPS+OM组、LPS+AG490组,分别加或不加药物处理3 h,预冷PBS洗涤3次后加入RIPA裂解液裂解细胞,提取蛋白。

2.2 Western blot检测方法

提取各组LTC-14细胞的总蛋白,BCA蛋白定量,稀释蛋白浓度至5 g/L,用聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行分离,浓缩胶电泳电压为80 V,分离胶电泳电压为120 V,电泳结束后以90 V电压在冰浴中1 h将蛋白转至PVDF膜上,转膜结束后按相对分子质量大小进行切膜,置于含5%脱脂奶粉的TBST中封闭2 h,加入浓度为1:1 000一抗稀释液,4℃过夜, TBST洗膜3次/10 min,然后加入辣根酶标记的二

抗稀释液室温中孵育2 h, TBST洗膜3次/10 min, 最后用ECL化学发光显影。以 β -actin作为内参。

2.3 统计学处理

使用GraphPad Prism 6统计学软件分析处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 LPS呈浓度-时间相关性激活胰腺星状细胞中的JAK2/STAT3信号通路

为了证实LPS对PSC中JAK2/STAT3通路影响作用, 设置不同浓度(0、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$)的LPS并设置相同剂量(10 $\mu\text{g/mL}$)的LPS刺激LTC14细胞不同时间(0、1、3、6、9、12 h), 如图1A、B所示, JAK2、STAT3的表达随LPS浓度的改变呈升高趋势, 分别在10 $\mu\text{g/mL}$ 及40 $\mu\text{g/mL}$ 达最高值; 如图1C、D所示, JAK2、STAT3的表达随LPS刺激时间的

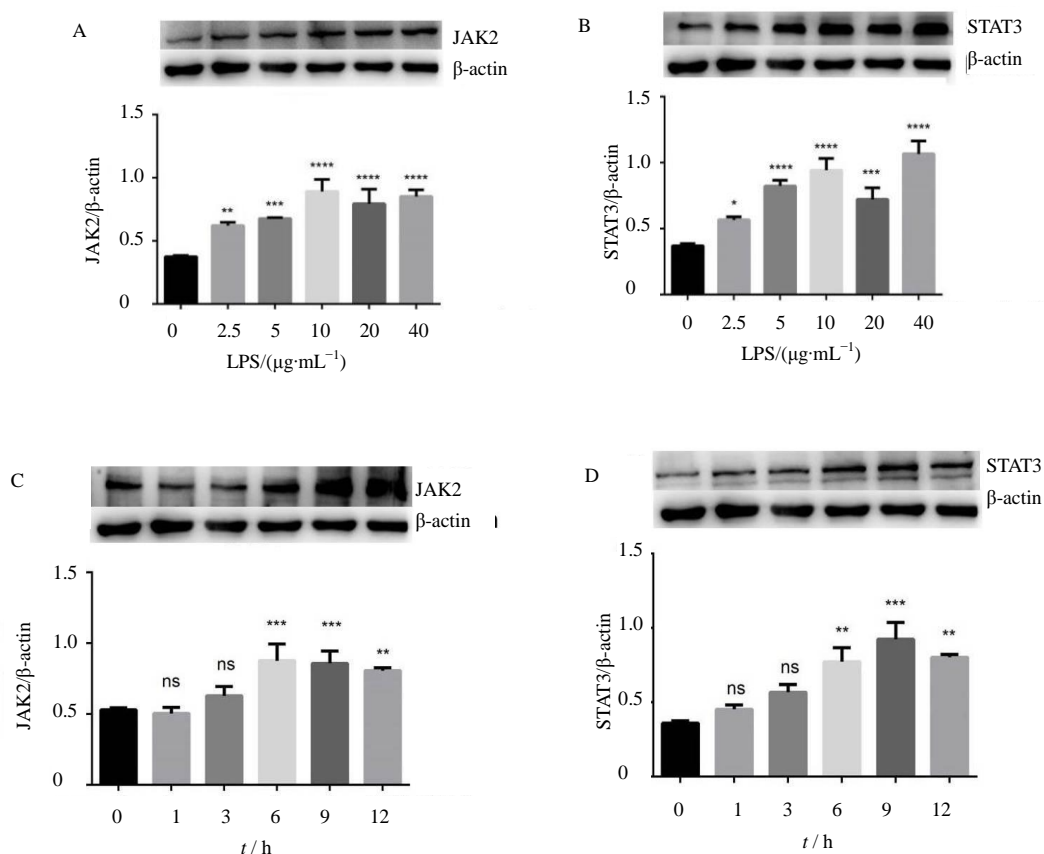
变化呈升高趋势, 分别在6、9 h达最高值。

3.2 LPS呈浓度-时间相关性激活胰腺星状细胞中的NLRP3炎性小体

为了证实LPS对PSC中NLRP3炎性小体的活化作用, 设置不同浓度(0、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$) LPS并设置相同剂量(10 $\mu\text{g/mL}$)的LPS刺激LTC14细胞不同时间(0、1、3、6、9、12 h), 如图2A、B、C所示, NLRP3、caspase1、IL-1 β 表达随LPS浓度改变呈升高趋势; 如图2D、E、F所示, NLRP3、caspase1、IL-1 β 的表达随LPS刺激时间变化呈升高趋势。

3.3 OM对JAK2/STAT3信号通路的影响

根据3.1、3.2实验结果, 选用10 $\mu\text{g/mL}$ LPS作用LTC14细胞3 h进行下一步; 为了验证OM是否通过JAK2/STAT3通路发挥作用, 结合文献选用了JAK2抑制剂AG490, 浓度为5 $\mu\text{mol/L}$, OM浓度为0.5 mg/mL, 提前0.5 h按预先分组加入, 结果见图3。

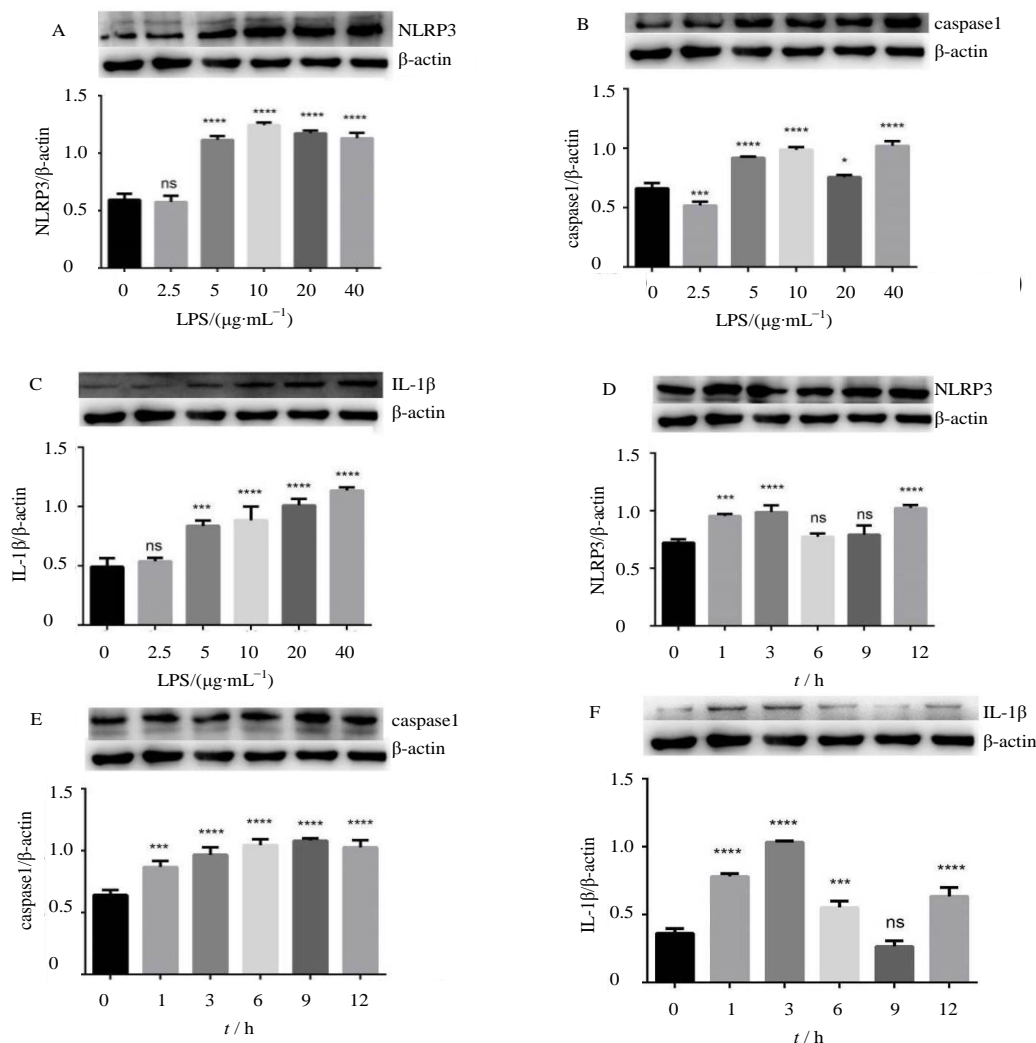


与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$ vs control group

图1 不同浓度LPS及相同浓度LPS刺激不同时间对JAK2、STAT3蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of different concentration of LPS and the same concentration of LPS at different time on the protein expression of JAK2, and STAT3 in LTC14 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$ vs control group

图2 不同浓度LPS及相同浓度LPS刺激LTC14细胞不同时间对NLRP3、caspase1、IL-1β蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig.2 Effect of different concentration of LPS and the same concentration of LPS at different time on protein expression of NLRP3, caspase1, and IL-1β in LTC14 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

各种病因引起胰腺组织和功能不可逆改变是CP的病理生理基础,腹痛是CP患者主要临床症状^[1]。据研究表明NLRP3炎性小体与多种消化系统疾病包括SAP的发生发展有着密切的关系^[3-4],考虑到CP可由AP发展而来,故本课题组设想针对NLRP3炎性小体生成的调节,有可能是药物治疗靶点。

中药OM具有抗病毒、抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗心律失常等多种药理作用^[7],该药能否有效治疗CP是本课题组长期以来研究的方向和目标,目前在离体细胞实验及动物实验过程中,已发现其抗炎、抗纤维化、抑制肿瘤等功能^[8-10]。

JAK2/STAT3信号通路由JAK2介导,传递胞外

信号入核,调控基因表达,对细胞增殖、分化以及凋亡等生理功能产生重要影响^[11],STAT3位于JAK2的下游,作为细胞核内的转录因子,参与许多疾病的发生发展过程^[12],据研究报道,使用雨蛙素刺激大鼠胰腺腺泡细胞,可使JAK1/STAT1、JAK2/STAT3信号通路被激活,导致TNF-α、IL-1β、IL-6等促炎因子显著升高^[13],证明JAK2/STAT3信号通路参与炎症反应。

NLRP3炎性小体是由胞浆内NLRP3、ASC、pro-caspase1组装而成的多蛋白复合体^[14-15],在固有免疫细胞以及非免疫细胞中都有表达,多种因素刺激后,历经起始、组装、活化三阶段,得以激活,从而使caspase1获得催化活性,催化炎性因子IL-1β、IL-18活化后产生促炎作用^[16-19]。

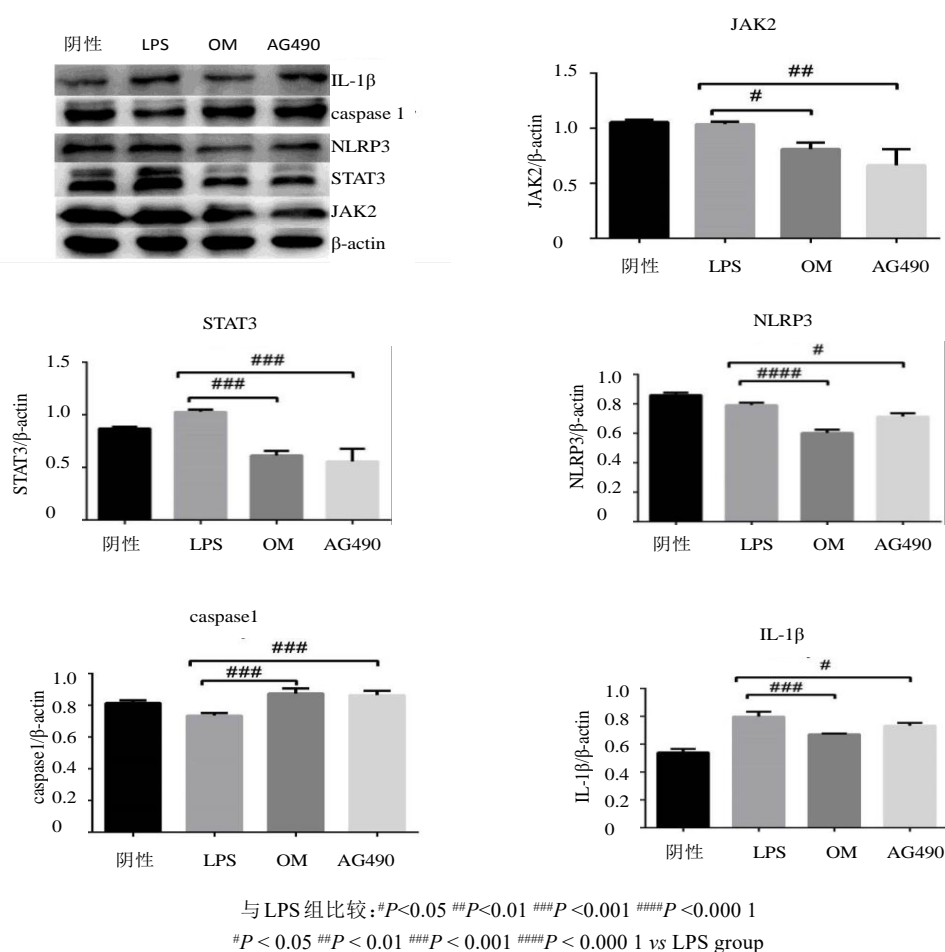


图3 OM、AG490对JAK2、STAT3、NLRP3、caspase1、IL-1 β 蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.3 Effects of OM and AG490 on JAK2, STAT3, NLRP3, caspase1, and IL-1 β in LTC14 cells by LPS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

本实验过程中发现,在LPS刺激下,JAK2、STAT3表达均增高,JAK2/STAT3信号通路被激活,与此同时,NLRP3、caspase1、IL-1 β 表达有增高趋势,JAK2/STAT3信号通路可能参与了NLRP3炎性小体的激活过程。而使用OM进行干预后,上述分子表达均有降低趋势,为了验证OM可能通过抑制JAK2/STAT3信号通路继而抑制NLRP3炎性小体与IL-1 β 的活化,达到抗炎作用,使用了广泛应用于阻断JAK2/STAT3信号通路活化的JAK2特异性抑制剂AG490^[20]干预LPS诱导的LTC14细胞,通过对比,OM干预LPS刺激的LTC14细胞后JAK2、STAT3的表达受抑制的情况与AG490干预后基本一致,由此推测OM与AG490作用原理类似,即通过抑制JAK2的介导作用从而抑制JAK2/STAT3信号通路的激活。

综上所述,氧化苦参碱可能通过抑制JAK2/STAT3信号通路达到抑制NLRP3小体的活化而产生抗炎作用。

参考文献

- [1] 苗毅,刘续宝,赵玉沛,等.慢性胰腺炎诊治指南(2014)[J].中国实用外科杂志,2015,35(3):277-282.
- [2] Tózsér J, Benkő S. Natural compounds as regulators of NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β production [J]. Mediat Inflamm, 2016, 2016: 1-16.
- [3] Ren J D, Ma J, Hou J, et al. Hydrogen-rich saline inhibits NLRP3 inflammasome activation and attenuates experimental acute pancreatitis in mice [J]. Mediat Inflamm, 2014, 2014: 1-9.
- [4] Moody F G, Haley-Russell D, Muncy D M. Intestinal transit and bacterial translocation in obstructive pancreatitis [J]. Digest Dis Sci, 1995, 40(8): 1798-1804.
- [5] 刘中原,李延平.细菌脂多糖的生物活性及作用机制[J].医学综述,2010,16(2):166-169.
- [6] 史艳平,陈涛,李丹,等.氧化苦参碱药理作用研究进展[J].陕西医学杂志,2018,47(2):271-273.
- [7] 荣亚梅,夏时海,向晓辉,等.氧化苦参碱对胰腺星状细胞中脂多糖诱导的NF- κ B表达的影响[J].世界华人消化杂志,2015,23(5):761-766.

- [8] 李嫚华, 许威, 张青, 等. 氧化苦参碱对 TGF- β 1 诱导的 PANC-1 细胞 Smad3/Gli1 通路相关因子表达的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5200-5205.
- [9] Tsang S W, Zhang H J, Lin C Y, et al. Rhein, a natural anthraquinone derivative, attenuates the activation of pancreatic stellate cells and ameliorates pancreatic fibrosis in mice with experimental chronic pancreatitis [J]. *Plos One*, 2013, 8(12): e82201. DOI:10.1371/journal.pone.0082201.
- [10] 蔡燕, 祝荫. NLRP3 炎症小体及其在消化系统疾病中的作用 [J]. 南昌大学学报(医学版), 2018, 58(2): 87-91.
- [11] 熊旋, 李磊, 王庆才. 氧化苦参碱对肿瘤抑制作用的研究进展 [J]. 海南医学, 2018, 29(8): 1135-1138.
- [12] Severgnini M, Takahashi S, Rozo L M, et al. Activation of the STAT pathway in acute lung injury [J]. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286(6): L1282-L1292.
- [13] Matsuda T. Signal transducer and activator of transcription 3 regulation by novel binding partners [J]. *World J Biol Chem*, 2015, 6(4): 324.
- [14] Yuan. The antagonist of the JAK-1/STAT-1 signaling pathway improves the severity of cerulein-stimulated pancreatic injury via inhibition of NF- κ B activity [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 27(5): 731. DOI: 10.3892/ijmm.2011.632.
- [15] Saxena M, Yeretssian G. NOD-like receptors: master regulators of inflammation and cancer [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 327.
- [16] Gómez D M, Urcuqui-Inchima S, Hernandez J C. Silica nanoparticles induce NLRP3 inflammasome activation in human primary immune cells [J]. *Innate Immun*, 2017, 23(8): 697-708.
- [17] Kim J K, Jin H S, Suh H, et al. Negative regulators and their mechanisms in NLRP3 inflammasome activation and signaling [J]. *Immunol Cell Biol*, 2017, 95(7): 584-592.
- [18] He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(12): 1012-1021.
- [19] Próchnicki T, Mangan M S, Latz E. Recent insights into the molecular mechanisms of the NLRP3 inflammasome activation [J]. *F1000Res*, 2016, 5: 1469.
- [20] Yu J H, Kim K H, Kim H. Suppression of IL-1 β expression by the Jak 2 inhibitor AG490 in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(11): 1555-1562.