

异补骨脂查尔酮抑制 IL-4 产生及其机制研究

梁正^{1,2}, 杨春³, 李峥¹, 李强⁴, 吴震州^{1*}

1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071

2. 成都中医药大学, 四川 成都 611137

3. 四川中医药高等专科学校, 四川 绵阳 621000

4. 集宁师范学院, 内蒙古 集宁 012000

摘要: 目的 从补骨脂单体化学成分中筛选抗哮喘的小分子化合物, 并阐释其抗哮喘作用机制。方法 基于 IL-4 在哮喘病理中的作用, 采用 IL-4-GFP 转基因报告小鼠 (4get 鼠) 和流式细胞术, 设计一种抑制白细胞介素-4 (IL-4) 产生的抗哮喘药物筛选新方法。结果 与 DMSO 组相比, 异补骨脂查尔酮能显著抑制 Th2 细胞中 IL-4 的产生 ($P < 0.001$), 减少转录因子 GATA-3 的表达 ($P < 0.01$), 降低信号转导与转录激活因子 STAT6 磷酸化水平 ($P < 0.01$)。结论 异补骨脂查尔酮通过抑制 STAT6 磷酸化而减少 GATA-3 的表达, 从而抑制 IL-4 的产生, 其具有开发成为治疗哮喘药物的潜力。

关键词: 抗哮喘药; 异补骨脂查尔酮; 白细胞介素-4; STAT6; GATA-3; 流式细胞术

中图分类号: R974.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)10-1299-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.018

Inhibition of isobavachalcone on IL-4 production and its mechanism

LIANG Zheng^{1,2}, YANG Chun³, LI Zheng¹, LI Qiang⁴, WU Zhen-zhou¹

1. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang 621000, China

4. Jining Teachers College, Jining 012000, China

Abstract: Objective To screen the small molecular compounds with anti-asthma activity from *Psoralea corylifolia* monomer and explain its regulation mechanism. **Methods** Based on the effect of IL-4 in pathological features of asthma, a high throughput screening system was designed by using 4get mice and flow cytometry to inhibit IL-4 production so as to anti-asthma. **Results** Compared with DMSO group, isobavachalcone showed high ability of inhibiting IL-4 production in Th2 cells ($P < 0.001$), down-regulating GATA-3 expression ($P < 0.01$), and decreasing the level of STAT6 phosphorylation ($P < 0.01$). **Conclusion** Isobavachalcone could inhibit the IL-4 production through down-regulating the GATA-3 expression by controlling the level of STAT6 phosphorylation. Isobavachalcone is a potential drug for the treatment of asthma.

Key words: anti-asthma drug; isobavachalcone; interleukin-4; STAT6; GATA-3; flow cytometry

过敏性哮喘为呼吸系统变态反应, 表现为支气管慢性炎症、气道高反应性, 并伴随大量白细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞浸润, 免疫球蛋白 E (IgE) 大量增加, 黏液分泌增多^[1-2]。开发高效、低毒的抗哮喘新药是促进治疗哮喘实现新进展的重要手段。鉴于白细胞介素-4 (IL-4) 在哮喘中高表达的病理特征, 本课题组以 IL-4 为靶点, 采用 IL-4-GFP

转基因报告小鼠 (4get 鼠)^[3], 建立了一种抗哮喘药物筛选的方法, 通过对补骨脂中化学成分的筛选, 发现异补骨脂查尔酮具有较高抑制 Th2 细胞 IL-4 表达的活性, 并对其作用的分子机制进行探讨。

1 材料

1.1 药品与试剂

补骨脂二氢黄酮甲醚 (bavachinin, N1)、补骨

收稿日期: 2012-07-28

基金项目: 国家自然科学基金杰出青年项目 (30890143)

作者简介: 梁正, 硕士, 主要研究方向为生物制药。E-mail: liangzheng7119@yahoo.com.cn

*通信作者 吴震州 E-mail: naturepower@nankai.edu.cn

脂宁 (corylin, N2)、补骨脂素 (psoralen, N3)、异补骨脂素 (angelicin, N4)、异补骨脂二氢黄酮 (isobavachin, N5)、异补骨脂查尔酮 (isobavachalcone, N6)、新补骨脂异黄酮 (neobavaisoflavone, N7)、补骨脂定 (psoralidin, N8)、补骨脂二氢黄酮 (bavachin, N9)、补骨脂酚 (bakuchiol, N10), 上海顺勃生物技术有限公司, 经 HPLC 检测质量分数 $\geq 98\%$ 。IV 型伴刀豆球蛋白、R7757 红细胞裂解液, Sigma Chemical 公司; 重组小鼠 IL-2, R&D Systems 公司; 重组小鼠 IL-4、抗鼠 CD4 抗体、GATA-3 抗体, eBioscience 公司; STAT6 (pY641) 磷酸化抗体、固定打孔液 (Fixation/Permeabilization), BD 公司; RPMI 1640 培养液, 美国 Thermo 公司; 胎牛血清 (FBS), 美国 Gibco 公司; 台盼蓝液, 美国 Invitrogen 公司; quantscript RT 试剂盒, 天根生物公司。

1.2 动物

IL-4-GFP 转基因报告小鼠 (4get 鼠), 清洁级、SPF 级, 从 Richard M Locksley 实验室引进^[3]; 野生型 BALB/c 小鼠, SPF 级, 南开大学动物实验中心培育。

1.3 仪器

BD FACS Calibur 流式细胞仪, BD 公司; 800 型酶标仪, Bio-Tek 公司; Eppendorf 实时定量 PCR 仪, Nanodrop 分光光度计, Eppendorf 公司; 96 孔细胞培养板, 碧云天公司; CellQuest Pro/FlowJo.7.6.1 流式分析软件。

1.4 引物的设计与合成

GAPDH 上游引物: 5'-GCTACACTGAGGACC AGGTTGTCT-3', 下游引物: 5'-ACCAGGAAATGAGCTTGACAAAGT-3'; IL-4 上游引物: 5'-GAAAAC TCCATGCTTGAAGAA-3', 下游引物: 5'-TCTTTCA GTGATGTGGACTTG-3'; GATA-3 上游引物: 5'-AG AGGTGGACGTACTTTTAAAC-3', 下游引物: 5'-A GAGATCCGTGCAGCAGAG-3'; 均由上海生工生物公司合成。

2 方法

2.1 化合物选取

选取中成药或药用植物提取分离的具有抗炎、平喘、祛痰功效的天然单体成分作为抗哮喘化合物来源。经筛选, 选取补骨脂单体成分, 即 N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8、N9、N10 进行抗哮喘药物筛选实验。

2.2 抗哮喘活性化合物筛选

2.2.1 细胞悬液制备 4get 鼠颈椎脱臼法处死, 无菌条件下取脾脏置于 10 mL 的磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 中, 用无菌病理玻片磨碎脾脏, 0.4 μm 细胞滤网滤过。细胞悬液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 400 r/min 离心 7 min, 弃上清, 加入 3 mL 红细胞裂解液, 打匀, 室温静置 5 min 裂解红细胞后加入 RPMI 1640 培养基稀释至 10 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 400 r/min 离心 7 min, 弃上清, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬, 配制 $4 \times 10^6/\text{mL}$ 密度的细胞悬液。

2.2.2 分组与给药 用 98% DMSO 将待筛选化合物制备成浓度为 20 mmol/L 的储备原液, 实验时再用 RPMI 1640 培养基 (含 10% FBS) 梯度稀释至筛选浓度 (10 $\mu\text{mol/L}$)。96 孔培养板每孔加入 100 μL 细胞悬液和 100 μL 待筛选化合物, 加入 Th2 细胞诱导刺激因子半刀豆球蛋白 (Con A, 终质量浓度 2.5 $\mu\text{g/mL}$)、IL-2 (终质量浓度 2 ng/mL)、IL-4 (终质量浓度 20 ng/mL), 诱导 T 细胞向 Th2 细胞分化, 激活 IL-4 信号通路, 使其高表达。然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h, 收集细胞于流式管中, 加入 PBS, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 400 r/min 离心 7 min, 弃上清。向 100 μL 细胞悬液中加入 APC-conjugated 抗小鼠 CD4 抗体 0.5 μL 进行细胞表面染色, 遮光冰浴 15 min, PBS 洗 1 遍, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 400 r/min 离心 7 min, 弃上清, 每管加 0.2 mL PBS, 流式细胞仪检测 CD4^+ T 细胞中绿色荧光蛋白 (GFP) 阳性的比率。同时设 DMSO (1/2 000) 空白对照组。

2.3 MTT 法检测化合物的细胞毒性

取野生型 BALB/c 小鼠脾脏, 细胞悬液制备方法同“2.2.1”项。分组与给药同“2.2.2”项。培养 48 h 后, 每孔吸弃 20 μL 上清液, 加入 MTT 溶液 (用 PBS 配制成质量浓度为 5 mg/mL) 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续孵育 4 h 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 400 r/min 离心 7 min, 吸弃上清, 每孔加 DMSO 150 μL , 室温下 200 r/min 振荡 10 min, 充分融解结晶物。在酶标仪上选择 490 nm 波长读数, 测定各孔吸光度 (A) 值。

2.4 RT-PCR 检测 IL-4 和 GATA-3 基因表达

取野生型 BALB/c 小鼠脾脏, 细胞悬液制备方法同“2.2.1”项, 实验设 DMSO (1/2 000) 空白对照组和 N6 10 $\mu\text{mol/L}$ 给药组。各组细胞培养同“2.2.2”项, 28 h 后收集细胞, 用 Trizol 提取 RNA, 异丙醇沉淀 RNA, DEPC 水溶解 RNA。分光光度

计检测并计算 RNA 的 A_{260}/A_{280} 值,记录 RNA 浓度,备逆转录用。按试剂盒操作说明进行 cDNA 合成。

应用上述逆转录的 cDNA 进行 RT-PCR 检测。分别加入 IL-4、GATA-3 上下游引物,按试剂盒说明检测 IL-4、GATA-3 的基因表达,以 GAPDH 持家基因作为内参,结果用 Eppendorf realplex 软件进行分析。

2.5 流式细胞仪检测 GATA-3 表达和 STAT6 磷酸化水平

2.5.1 GATA-3 表达检测 取野生型 BALB/c 小鼠脾脏,细胞悬液制备方法同“2.2.1”项。实验设空白对照组(未加 Con A、IL-2、IL-4 刺激因子,也未加化合物,是自然状态下培养的细胞),DMSO (1/2 000)组,N6 (10 $\mu\text{mol/L}$)组。DMSO 组及 N6 组均是在 ConA、IL-2、IL-4 刺激因子诱导 Th2 分化(诱导分化过程同“2.2.2”项)的条件下培养。细胞分别培养 20、26、32 h 后收集于流式管中,加入 PBS, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 400 r/min 离心 7 min,弃上清,每管加入 1 mL Fixation/Permeabilization,置冰浴固定并打孔。2 h 后加入 1 \times Permeabilization Buffer 2 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 400 r/min 离心 7 min,弃上清,洗 2 次后加入 APC-conjugated 抗鼠 CD4 抗体、Alexa Fluor 647-conjugated 抗人/鼠 GATA-3 抗体,冰浴染色 30 min,每管加入 1 \times Permeabilization Buffer 2 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 400 r/min 离心 7 min,弃上清,每管再次加入 1 \times Permeabilization Buffer 2 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 400 r/min 离心 7 min,洗 1 遍,弃上清,最后加入 1 \times Permeabilization Buffer 150~200 μL 重悬,流式细胞仪检测 CD4 $^{+}$ T 细胞中 GATA-3 的表达比率。

2.5.2 STAT6 磷酸化水平检测 分组与给药同“2.5.1”项(细胞分别培养 20、26 h)。收集细胞于流式管中,以 1:20 体积加入预热的 1 \times BDTM Phosflow Lyse/Fix Buffer 固定细胞磷酸化状态,置入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中孵育 10 min。加入 PBS, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 400 r/min 离心 7 min,洗细胞 1~2 次,弃上清,每管加入 1 \times BDTM Phosflow Lyse/Fix Buffer III 1 mL 打孔,冰上孵育 30 min,用 BD PharmingenTM Stain Buffer 洗细胞 2 次,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 400 r/min 离心 7 min,弃上清,加入 APC-conjugated 抗鼠 CD4 抗体、PE-conjugated 抗鼠磷酸化 STAT6 (pY641) 抗体,室温染色 0.5 min 后加入 BD PharmingenTM Stain Buffer 洗细胞 2 次,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 400 r/min 离心 7 min,弃上清,加入 100~200 μL Stain Buffer 重悬,

流式细胞仪检测 CD4 $^{+}$ T 细胞中磷酸化 STAT6 (p-STAT6) 的表达比率。

2.6 统计学分析

数据分析采用 InStat version 3.06 software for Windows,两组间数据采用双尾非成对 t 检验进行统计学比较。

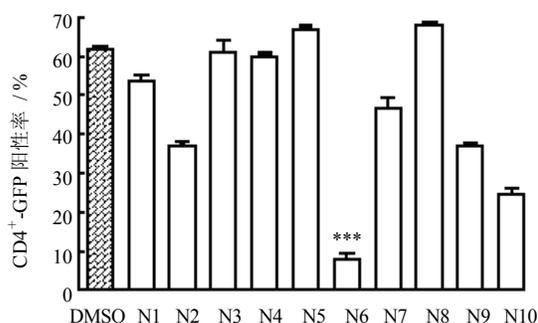
3 结果

3.1 抗哮喘活性化合物筛选

化合物 N2、N6、N7、N9、N10 均能显著抑制 4get 小鼠 CD4 $^{+}$ 细胞中 GFP 的表达量,其中 N6 的效果最为显著,与 DMSO 空白对照组相比差异显著 ($P < 0.001$)。结果见图 1。

3.2 细胞毒性

采用 MTT 法检测,浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,化合物 N1、N10 具有一定的细胞毒性,但 N6 无细胞毒性。结果见图 2。



与 DMSO 空白对照组比较: *** $P < 0.001$
*** $P < 0.001$ vs DMSO blank control group

图 1 化合物 N1~N10 对 4get 鼠 CD4 $^{+}$ 细胞中 GFP 表达的影响 ($n = 3$)

Fig. 1 Effects of compounds N1—N10 on GFP expression of CD4 $^{+}$ cells in 4get mice ($n = 3$)

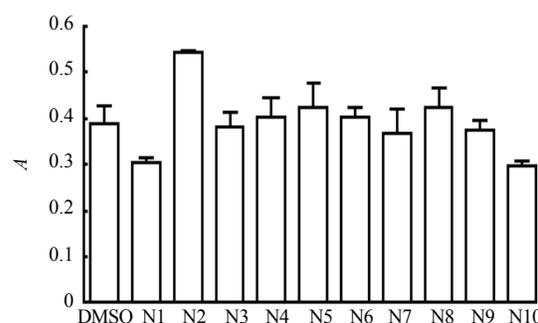


图 2 化合物 N1~N10 对 BALB/c 小鼠脾细胞的毒性 ($n = 3$)

Fig. 2 Cytotoxicity of compounds N1—N10 on spleen cells in BALB/c mice ($n = 3$)

3.3 N6 实验浓度的筛选

本实验选取活性最强的 N6 进一步探索其对 4get 小鼠 CD4⁺ T 细胞中 GFP 的表达的量效关系。N6 用 RPMI 1640 培养基 (含 10% FBS) 梯度稀释成 0.1、1、10 μmol/L 3 个浓度, 结果显示 N6 浓度为 10 μmol/L 时, 显著抑制 GFP 的表达, 而在 0.1、1 μmol/L 时, 有抑制 GFP 表达的趋势。结果见图 3。

3.4 对 IL-4 和 GATA-3 基因表达的影响

RT-PCR 检测结果显示, N6 显著抑制 IL-4 及 GATA-3 基因的表达, 与 DMSO 组相比差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见图 4。

流式细胞仪检测 GATA-3 表达的结果显示, 空白

对照组表达 GATA-3 细胞的量非常少, 仅占 CD4⁺ T 细胞的 2%~4%, 加入 Th2 诱导因子后, 表达 GATA-3 细胞的量显著升高, 达 65% 以上; 化合物 N6 能抑制 GATA-3 的表达, 使其表达率降至 30% 左右, 与 DMSO 组相比差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01), 结果见图 5。

3.5 对 STAT6 磷酸化水平的影响

空白对照组 CD4⁺ T 细胞中 STAT6 发生磷酸化的量很低; 加入 Th2 诱导因子后, STAT6 磷酸化水平显著升高, 达 60% 以上; N6 能有效抑制 STAT6 发生磷酸化, 使磷酸化水平降低至 20%~30%, 与 DMSO 组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。结果见图 6。

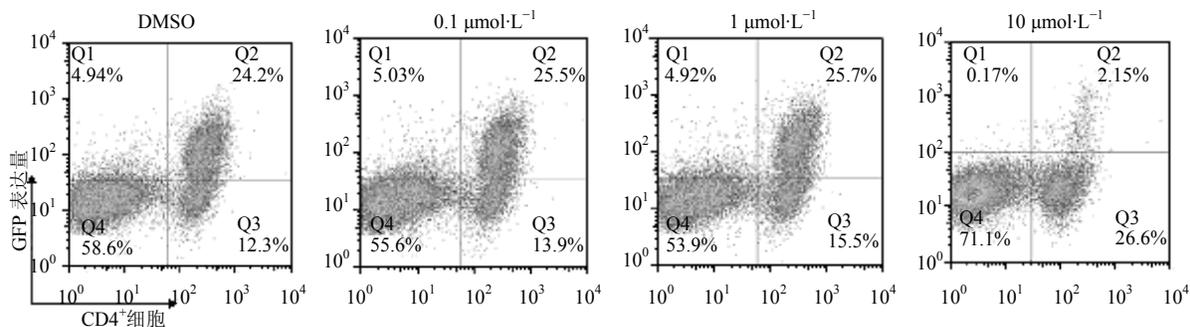
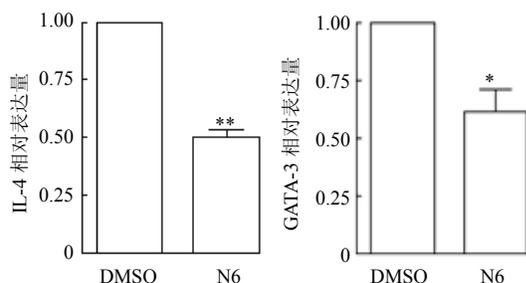


图 3 N6 浓度梯度筛选流式图 (n = 3)

Fig. 3 Concentration gradient screening for compound N6 (n = 3)



与 DMSO 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs DMSO group

图 4 异补骨脂查尔酮对 CD4⁺ T 细胞 IL-4 和 GATA-3 基因表达的影响 (n = 3)

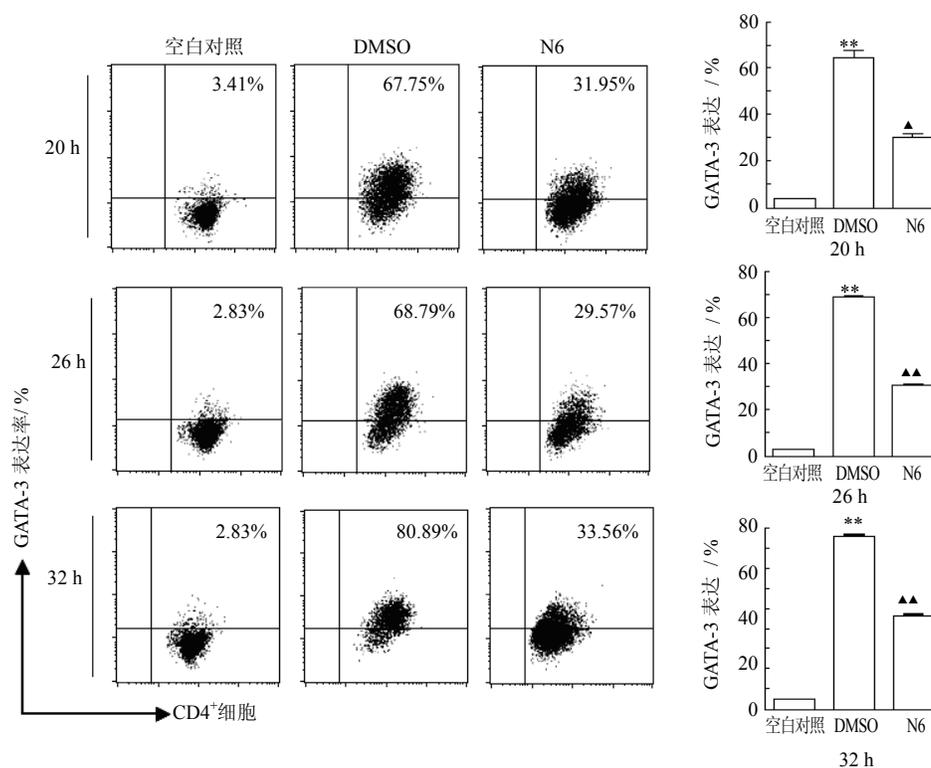
Fig. 4 Effect of isobavachalcone on expression of IL-4 and GATA-3 mRNA in CD4⁺ T cells (n = 3)

4 讨论

Bian 等^[4]发现 T-bet/GATA-3 表达失衡是形成气道炎症哮喘的主要原因, 主要病理特征为 Th2 型 IL-4 表达显著升高。IL-4 与其受体 IL-4R 结合, 在 TCR 信号参与下, 启动 JAK1/JAK3-STAT6 信号通路, 其中 STAT6 的磷酸化在 IL-4 信号通路中起

主要作用。已有研究证实, 小鼠缺失 STAT6 的表型和小鼠敲除 IL-4R 一样, 缺失 STAT6 的小鼠对病原微生物敏感, 易患自身免疫性疾病^[5], 而对哮喘和一些肿瘤疾病则具有保护作用^[6-7]。STAT6 磷酸化后激活 Th2 分化的正调节细胞因子 GATA-3, 激活 IL-4 基因表达, 并抑制 IFN- γ 转录, 引起向 Th2 细胞亚群分化, 产生大量 IL-4。

在 20 世纪 90 年代末期, 有人提议使用 IgE 的抗体进行治疗, 采用单克隆抗体如奥马珠单抗等进行临床试验, 开启了特异靶向治疗的阶段^[8]。在众多细胞因子中, IL-4 无疑是临床治疗哮喘的较理想靶点。本课题组参考现行各种药物筛选方法, 结合本实验室条件, 采用 IL-4-GFP 转基因报告小鼠建立抗哮喘药物筛选方法, 通过对补骨脂 10 个单体成分的筛选, 发现异补骨脂查尔酮 (N6) 显著抑制 IL-4 表达和 GATA-3, 并对 GATA-3 mRNA 转录具有较强抑制活性。STAT6 的磷酸化为其活性形式, 其二聚化激活下游 IL-4 转录因子 GATA-3, 从而激活 IL-4 的转录表达^[1]。为进一步阐明补骨脂查尔酮抑制作用的分子机制, 寻找其抑制 IL-4 表达的靶点, 实验



与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 DMSO 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$, 下同
 ** $P < 0.01$ vs blank control group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs DMSO group, same as below

图 5 异补骨脂查尔酮对 CD4⁺ T 细胞中 GATA-3 表达的影响 (n = 3)

Fig. 5 Effect of isobavachalcone on GATA-3 expression in CD4⁺ T cells (n = 3)

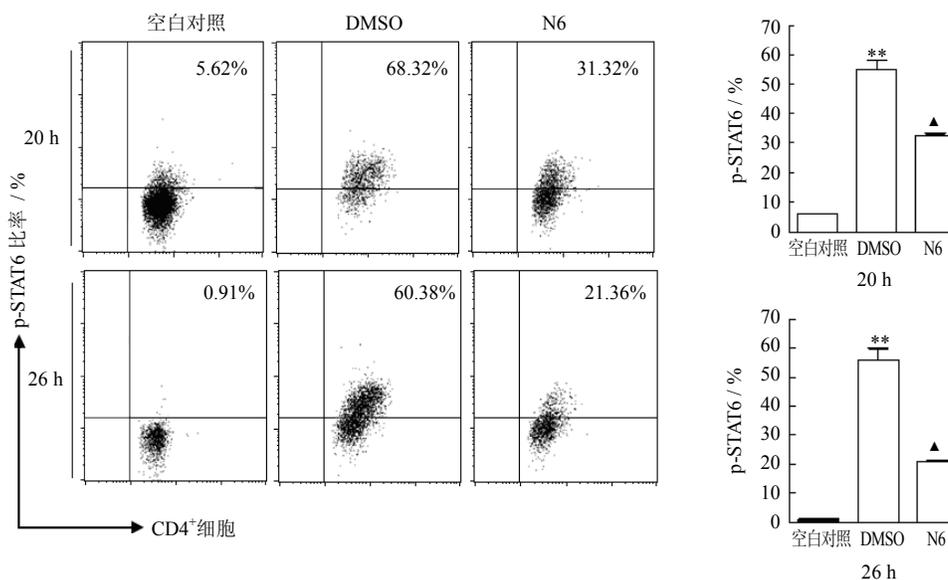


图 6 异补骨脂查尔酮对 CD4⁺ T 细胞中 STAT6 磷酸化水平的影响 (n = 3)

Fig. 6 Effect of isobavachalcone on STAT6 phosphorylation in CD4⁺ T cells (n = 3)

分析了控制 Th2 分化的关键信号转导转录激活因子 STAT6, 发现该化合物较强地抑制 STAT6 磷酸化。综上所述, 异补骨脂查尔酮显著抑制 IL-4 表达,

其作用机制是通过减少 STAT6 磷酸化而降低 GATA-3 的表达, 从而抑制 IL-4 的表达上调, 该化合物具有开发为治疗哮喘等炎症疾病的小分子药物的潜力。

参考文献

- [1] Mahajan S G, Mehta A A. Suppression of ovalbumin-induced Th2-driven airway inflammation by β -sitosterol in a guinea pig model of asthma [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650(1): 458-464.
- [2] Bousquet J, Jeffery P K, Busse W W, *et al.* Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161(5): 1720-1745.
- [3] Mohrs M, Shinkai K, Mohrs K, *et al.* Analysis of type 2 immunity *in vivo* with a bicistronic IL-4 reporter [J]. *Immunity*, 2001, 15(2): 303-311.
- [4] Elias J A, Wu Y, Zheng T, *et al.* Cytokine and virus-stimulated airway smooth muscle cells produce IL-11 and other IL-6-type cytokines [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(3): L648-L655.
- [5] Chitnis T, Najafian N, Benou C, *et al.* Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(5): 739-747.
- [6] Akimoto T, Numata F, Tamura M, *et al.* Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airways hyper-reactivity in signal transducers and activators of transcription (STAT) 6-deficient mice [J]. *J Exp Med*, 1998, 187(9): 1537-1542.
- [7] Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, *et al.* NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 path-way [J]. *Nat Immunol*, 2000, 1(6): 515-520.
- [8] Cortes J R, Perez-G M, Maria D, *et al.* Kaempferol inhibits IL-4-induced STAT6 activation by specifically targeting JAK3 [J]. *J Immunol*, 2007, 179(6): 3881-3887.