

牛蒡子苷元对小鼠脾细胞增殖的影响及相关机制

陆明¹, 姬飞虹², 张林杰¹

摘要 目的 研究牛蒡子苷元(ATG)对刀豆蛋白A(ConA)诱导的小鼠脾细胞增殖和相关细胞因子分泌的影响及其可能的分子机制。方法 MTT法检测ATG对小鼠脾细胞的毒性; H^3 -胸腺嘧啶核苷掺入法检测ATG对小鼠脾细胞的增殖抑制水平; ELISA法检测细胞因子干扰素 γ (IFN- γ)和白介素2(IL-2)的分泌水平; Western blot法检测mTOR通路相关蛋白(mTOR、P70S6K、Akt、AMPK、Raptor)的表达及磷酸化水平。结果 ATG对小鼠脾细胞无显著毒性; ATG显著抑制了ConA诱导的小鼠脾细胞增殖; ATG显著减少了小鼠脾细胞上清液中淋巴因子IFN- γ 和IL-2的含量,且具有浓度依赖性; ATG显著降低了mTOR和P70S6K的磷酸化水平,增加了上游AMPK和Raptor的磷酸化,而Akt的磷酸化水平没有明显变化。结论 ATG可显著抑制ConA诱导的小鼠脾细胞增殖并减少IFN- γ 、IL-2的分泌,该作用可能与其增强AMPK、Raptor的磷酸化,抑制mTOR、P70S6K的磷酸化有关。

关键词 牛蒡子苷元; 细胞增殖; IL-2; IFN- γ ; mTOR

中图分类号 R 285.5; R 329.25

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)06-0726-05

牛蒡子在中国传统中药中具有抗炎利尿排毒的作用^[1],而其单一化合物提取物牛蒡子苷(arctiin, AC)或牛蒡子苷元(Arctigenin, ATG, 图1)亦具有免疫抑制功能和抑癌功能^[2-3],但ATG的免疫抑制机制尚不明确。mTOR作为一种保守的丝/苏氨酸激酶,可以促进细胞蛋白质的翻译并促进细胞从G₁期进入S期,与细胞增殖、生存和代谢密切相关,并参与了免疫细胞激活和增殖^[4-5]。该研究通过观察ATG对小鼠原代脾细胞的作用,检测mTOR通路的相关改变,探索ATG的免疫抑制机制。

1 材料与方法

1.1 材料 ATG购于上海源叶生物;雷帕霉素(rapamycin, RAPA)购于上海生工;BALB/c小鼠购于上

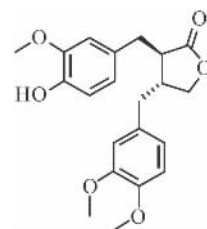


图1 Arctigenin 结构

海斯莱克实验动物有限公司; PRMI 1640 细胞培养基购于美国 Gibco 公司; 青霉素、链霉素、吐温 20、完全蛋白酶抑制剂、细胞裂解液、丽春红、二甲亚砜(DMSO)均购于美国 Sigma-Aldrich 公司; ELISA 试剂盒购于上海依科赛公司; BCA 蛋白定量试剂盒购于美国 Thermo 公司; GAPDH 抗体购于华安生物公司; AMPK、p-AMPK、Raptor、p-Raptor、mTOR、p-mTOR、P70S6K、p-P70S6K、Akt、p-Akt 抗体均购于美国 Cell Signaling Technology 公司; 蛋白预染 Marker、一抗稀释液、辣根过氧化物酶标记的二抗、ECL 化学发光液购于碧云天公司; 硝酸纤维素膜购于美国 Millipores 公司。

1.2 方法

1.2.1 BALB/c 小鼠脾细胞原代培养 配制含 10% 胎牛血清、110 mg 丙酮酸钠、20 mmol/L HEPES、100 U/ml 青霉素、0.1 mg/ml 链霉素的 1 L PRMI 1640 培养液(pH 7.2)。处死 6~8 周小鼠取脾脏,置于冷 PBS 中,研磨过 200 目筛网,1 200 r/min 离心 5 min,去上清液,沉淀加入红裂液 1 ml/脾,混匀,静置 1 min,加入 PBS 离心,再加入 PBS 过膜,1 200 r/min 离心 5 min,所剩细胞洗涤 1~2 次,1 ml 1640 打散离心后的沉淀(10 μ l 细胞悬液 + 190 μ l 台盼蓝,取 10 μ l 计数)。

1.2.2 MTT 测 ATG 的细胞毒性 用 RPMI 1640 将小鼠原代脾细胞调成 4×10^6 个/ml,在 96 孔板中,每孔加 100 μ l 细胞悬液(4×10^5 个细胞),50 μ l 培养液和 50 μ l ATG(终浓度为 200、100、50、25、12.5、6.25 μ mol/L, RPMI 1640 溶解,对照组为培养液),各浓度设 3 个复孔,另设置 3 个不加细胞和药物(用培养基替代)的调零孔,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养 48 h,培养结束前 4 h 加 20 μ l MTT(母液 5 mg/ml),

2014-01-15 接收

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金(编号: KJ2011A167)

作者单位:¹安徽医科大学免疫学教研室,合肥 230032

²上海市勤浩生物科技有限公司,上海 201203

作者简介:陆明,男,硕士研究生;

张林杰,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: zlj33@ahmu.edu.cn

培养结束后加入 MTT 三联溶解液 4 h 后测 OD 570 nm 处波长。结果用 GraphPad Prism 5 软件作图,用 SPSS 21.0 软件计算半数细胞毒性浓度(50% cytotoxic concentration, CC_{50})。

1.2.3 H^3 -胸腺嘧啶核苷掺入法测 ATG 的增殖抑制作用 于 96 孔板中每孔加入 100 μ l 细胞悬液(4×10^5 个细胞) 50 μ l ATG(终浓度为 50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5 μ mol/L, RPMI 1640 溶解, 对照组加培养液)和 50 μ l 刀豆蛋白 A (concanavalin, ConA, 终浓度 20 μ g/ml), 总体积 200 μ l。每组设 5 个复孔, 另设 5 孔不加 ConA 作为细胞增殖的本底对照, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 孵箱中培养 48 h, 结束培养前 8 h 每孔加入 H^3 -TdR 25 μ l。培养结束时, 先在 HARVEST 上收集细胞。再在液闪机(beta-counter)上检测。结果用 GraphPad Prism 5 软件作图、进行与对照组相比的单因素方差分析, 用 SPSS 21.0 软件计算半数细胞抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC_{50})。

1.2.4 ELISA 法测定细胞培养上清液中白介素 2 (IL-2)、干扰素 γ (IFN- γ) 含量 用 RPMI 1640 将小鼠原代脾细胞调成 7.5×10^6 个/ml, 于 24 孔板中每孔加 400 μ l 细胞悬液(3×10^6 个细胞), 200 μ l ConA(终浓度 20 μ g/ml)和 200 μ l ATG(终浓度为 25、12.5、6.25 μ mol/L, 对照组加培养液), 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 孵箱中培养 24 h, 离心 1 770 r/min 5 min 收集上清液, 测定细胞因子。根据依科赛细胞上清液 IL-2、IFN- γ 测定试剂盒指示进行测量。每次测量样品, 设置 3 个复孔。结果用 GraphPad Prism 5 软件作图, SPSS 21.0 软件进行与对照组相比的单因素方差分析。

1.2.5 Western blot 法检测 mTOR 通路相关蛋白 用 RPMI 1640 将小鼠原代脾细胞调成 1.2×10^7 个/ml, 于 6 孔板中每孔加 1 ml 细胞悬液(1.2×10^7 个细胞), 500 μ l ConA(终浓度 20 μ g/ml, 空白组加培养基)和 500 μ l ATG(终浓度为 25、12.5、6.25 μ mol/L, 对照组加培养基, 阳性对照组用终浓度 50 μ mol/L RAPA 替代), 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 孵箱中培养 24 h。使用 RIPA 细胞裂解液提取蛋白, BCA 蛋白分析试剂盒(Thermo)进行蛋白定量, 配置统一浓度(1 μ g/ μ l)蛋白溶液。配置 SDS-PAGE 胶(5% 浓缩胶、6% 或 10% 分离胶), 每孔 30 μ l, 电泳, 转膜 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 按说明书比例(1:1 000)加入一抗, 室温孵育 1 h, 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗 10 min \times 3 次, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:500), 室温孵育 2 h, TBST 洗 10 min \times 3 次, ECL 显色, X 线片暗

室曝光 15 min, X 线片显影定影。结果用 Image J 软件进行灰度定量, 用 GraphPad Prism 5 软件进行作图和与对照组的单因素方差分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 软件进行分析(图中的误差棒均为标准差 SD, 均来自三次独立实验的统计结果)和作图, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验组与对照组之间均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 ATG 对小鼠原代脾细胞的作用 通过 MTT 测得 ATG 在 6.25 ~ 200 μ mol/L 之间对小鼠脾细胞活性的影响见图 2。ATG 对小鼠脾细胞毒性的 CC_{50} 为 $(4\ 237.23 \pm 1\ 670.86)$ μ mol/L, 表明 ATG 对小鼠脾细胞无明显细胞毒性。

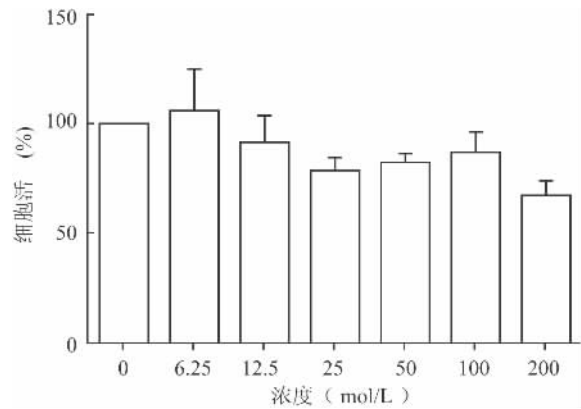


图 2 ATG 对小鼠脾细胞的毒性作用

2.2 ATG 对 ConA 诱导小鼠脾细胞增殖抑制作用及 IC_{50} 测定 通过 H^3 -胸腺嘧啶核苷掺入法实验测得 ATG 在 3.125 ~ 50 μ mol/L 浓度时显著抑制 ConA 诱导的小鼠脾细胞增殖($P < 0.01$, $F = 97.38$), 见图 3; 并计算出 ATG 抑制 ConA 诱导小鼠脾细胞增殖的 IC_{50} 为 (15.55 ± 6.13) μ mol/L。

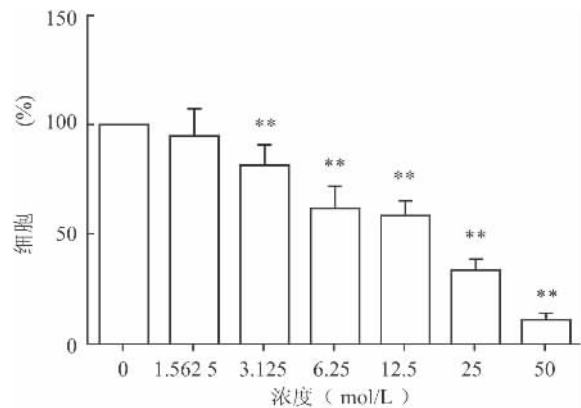


图 3 ATG 对 ConA 刺激的小鼠脾细胞的抑制效应与对照组(0 μ mol/L)比较: ** $P < 0.01$

2.3 ATG 对原代培养的小鼠脾细胞 IFN- γ 、IL-2 分泌的影响 通过 ELISA 测得 ATG 在 6.25 ~ 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时小鼠脾细胞上清液中 IFN- γ ($P < 0.01$, $F = 67.31$) 和 IL-2 ($P < 0.01$, $F = 38.99$) 的含量显著下降,见图 4。

2.4 ATG 对 mTOR 途径中相应蛋白磷酸化的影响 在给药 24 h 之后,与对照组进行比较,ATG 显著抑制了小鼠脾细胞 mTOR ($P < 0.01$, $F = 31.26$) 及下游 P70S6K 的磷酸化 ($P < 0.01$, $F = 45.70$),并且在上游激活了 AMPK 的磷酸化 ($P < 0.01$, $F = 11.15$),提高了 Raptor 的磷酸化水平 ($P < 0.01$, $F = 20.39$),而相应非磷酸化蛋白的水平没有明显改变。同时 ATG 没有明显改变其上游 Akt 的磷酸化水平。见图 5。

3 讨论

免疫细胞的过分激活和增殖常导致自身免疫反应和移植排斥反应等严重免疫疾病。本研究显示随着 ATG 浓度的增高,小鼠原代培养脾细胞的增殖水平明显地降低,在 15.55 $\mu\text{mol/L}$ 时,其增殖水平可降低 50%。而细胞毒性实验则表明这种抑制并不是由 ATG 的毒性导致的,提示可能由于 ATG 作用于细胞中某些与细胞增殖相关的信号通路,从而导致了细胞增殖抑制。

用 ConA 刺激小鼠原代培养的脾细胞主要激活 T 细胞的增殖,IFN- γ 、IL-2 作为 T 细胞释放的主要炎症因子,在免疫细胞群整体的激活增生和募集中有重要的作用^[6]。本研究显示随着 ATG 给药浓度

的增高,小鼠脾细胞上清液中 IFN- γ 、IL-2 的含量明显降低,一方面提示 T 细胞分泌淋巴因子的能力减低,一方面提示小鼠脾淋巴细胞的激活和增殖受到了抑制。

RAPA 是 mTOR 的特异性抑制剂,具有免疫抑制作用,其衍生物(rapalog) 广泛应用于临床的免疫抑制治疗,本研究使用 RAPA 作为 mTOR 受抑制的阳性对照^[7]。当 mTOR 被抑制时,其下游的 P70S6K 也被抑制,进而抑制蛋白质的合成以及细胞的增殖和活性^[8]。本研究显示 ATG 显著降低了小鼠原代脾细胞中 mTOR 和 P70S6K 的磷酸化水平,提示 ATG 可能通过减少细胞周期素、淋巴因子等的蛋白合成,进而导致细胞增殖抑制。

Akt 和 AMPK 是 mTOR 的上游蛋白,作为 mTOR 上游的细胞因子和能量感受器,其激活分别促进和抑制了 mTOR 的磷酸化激活^[9-10]。其中 AMPK 可以通过 TSC1/2/RHEB 途径抑制 mTOR 的磷酸化,也可以直接磷酸化 Raptor 而降低 mTOR 的活性^[4]。本研究显示 mTOR 上游的 AMPK 蛋白随 ATG 浓度升高发生显著的磷酸化激活,AMPK 下游的 Raptor 的磷酸化也相应增强;但 Akt 蛋白的改变并不显著,提示 ATG 对小鼠原代脾细胞 mTOR 通路的抑制可能是通过 AMPK 的激活实现的。

综上所述,ATG 通过促进 AMPK 和 Raptor 的磷酸化,抑制了 mTOR/P70S6K 的活性,并抑制了淋巴因子 IL-2、IFN- γ 的分泌和小鼠原代脾细胞的增殖,为进一步深入研究 ATG 的免疫抑制作用和相关机制提供了研究基础。

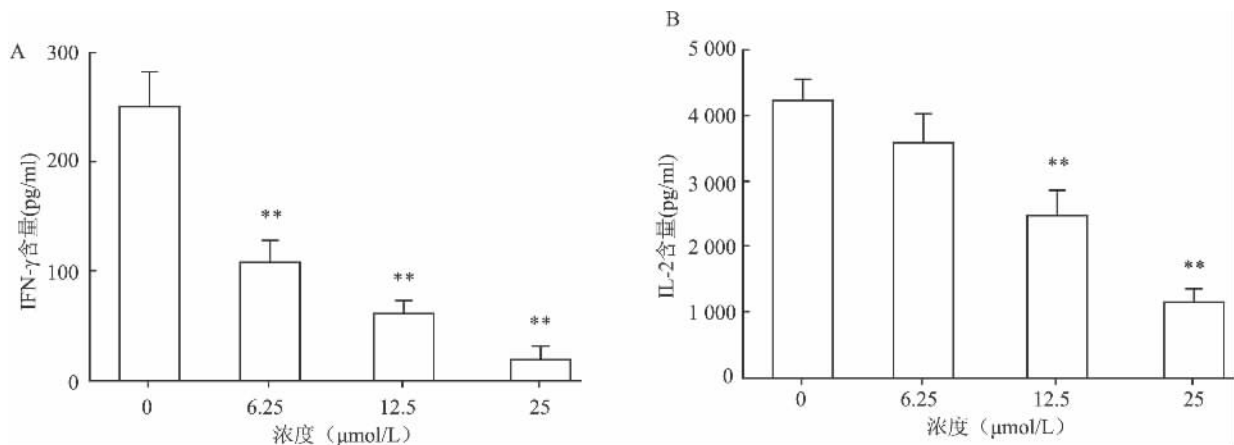


图 4 ATG 对 ConA 刺激的小鼠脾细胞培养上清液中 IFN- γ 、IL-2 含量的影响
A: 上清液 IFN- γ 含量; B: 上清液 IL-2 含量; 与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$) 比较: ** $P < 0.01$

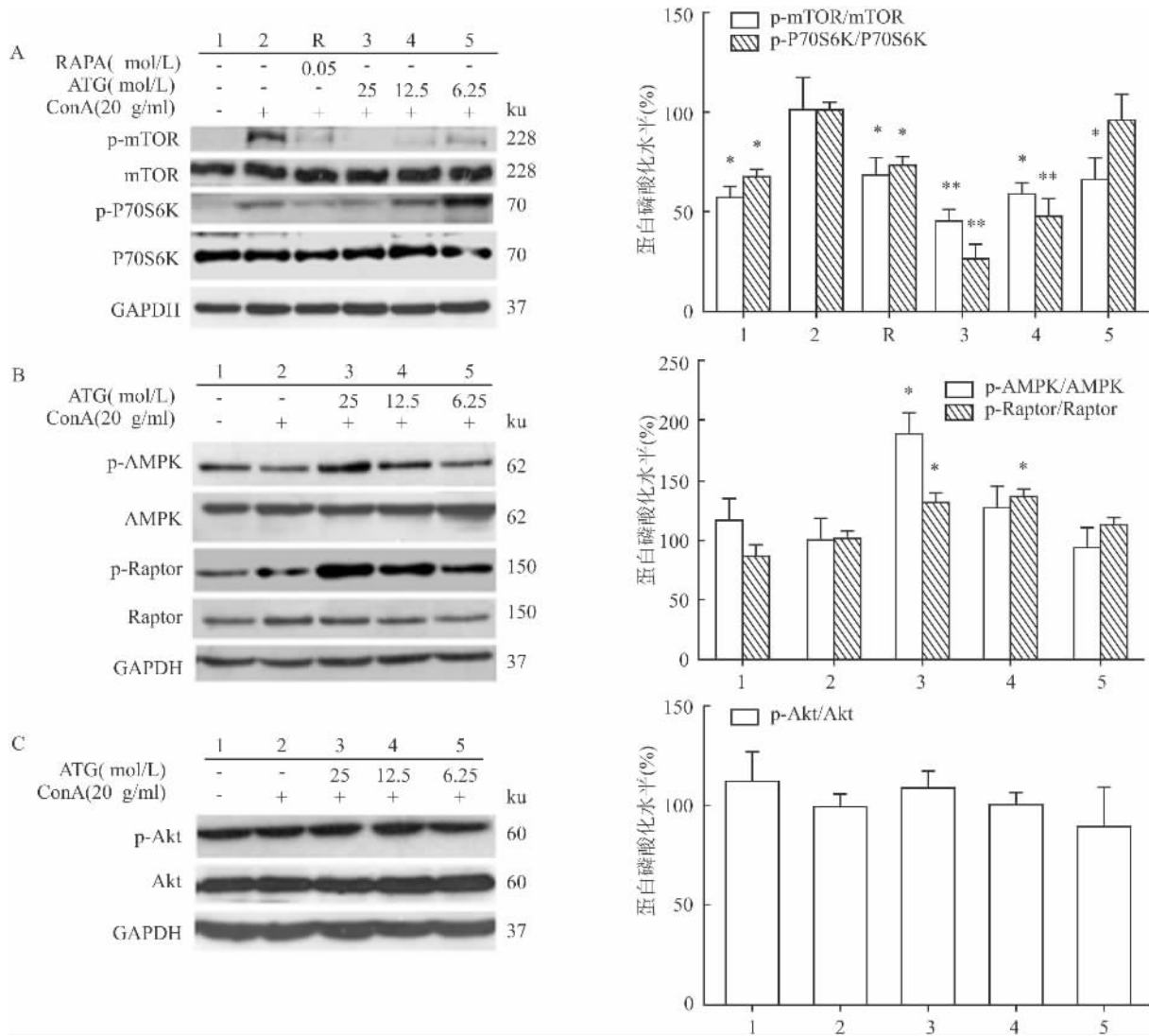


图5 ATG对mTOR途径中相应蛋白磷酸化的影响

1: 空白组; 2: 对照组; R: RAPA 终浓度 0.05 μmol/L 组, 作为抑制 mTOR 和 P70S6K 磷酸化的阳性对照; 3: ATG 终浓度 25 μmol/L 组; 4: ATG 终浓度 12.5 μmol/L 组; 5: ATG 终浓度 6.25 μmol/L 组; A: mTOR、P70S6K 的磷酸化水平改变; B: AMPK、Raptor 的磷酸化水平改变; C: Akt 的磷酸化水平改变; 与对照组 (0 μmol/L) 比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

参考文献

[1] Park S Y, Hong S S, Han X H, et al. Lignans from *Arctium lappa* and their inhibition of LPS-induced nitric oxide production [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2007, 55(1): 150-2.

[2] Hyam S R, Lee I A, Gu W, et al. Arctigenin ameliorates inflammation *in vitro* and *in vivo* by inhibiting the PI3K/AKT pathway and polarizing M1 macrophages to M2-like macrophages [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 708(1-3): 21-9.

[3] Susanti S, Iwasaki H, Itokazu Y, et al. Tumor specific cytotoxicity of arctigenin isolated from herbal plant *Arctium lappa* L [J]. J Nat Med, 2012, 66(4): 614-21.

[4] Dunlop E A, Tee A R. Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms [J]. Cell Signal, 2009, 21(6): 827-35.

[5] Rosner M, Hengstschläger M. mTOR protein localization is cell cycle-regulated [J]. Cell Cycle, 2011, 10(20): 3608-10.

[6] Rochman Y, Spolski R, Leonard W J. New insights into the regulation of T cells by gamma (γ) family cytokines [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(7): 480-90.

[7] Sehgal S N. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): Mechanism of action. Immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression [J]. Clin Biochem, 1998, 31(5): 335-40.

[8] Schmelzle T, Hall M N. TOR, a central controller of cell growth [J]. Cell, 2000, 103(2): 253-62.

[9] Stylianou K, Petrakis I, Mavroedi V, et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway is activated in murine lupus nephritis and downregulated by rapamycin [J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(2): 498-508.

[10] Gu Y, Sun X X, Ye J M, et al. Arctigenin alleviates ER stress *via* activating AMPK [J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(7): 941-52.

应用基因芯片技术筛选转染 CDX2 基因后胃癌细胞差异表达基因

陈晓双 秦蓉 储婧 陈宗科

摘要 目的 观察转染 CDX2 基因后人胃癌细胞系 BGC-823 基因表达谱的变化。方法 通过脂质体介导法转染 pEGFP-C1-CDX2 和空载体 pEGFP-C1 至人胃癌细胞系 BGC-823 中,经 G418 筛选后获得稳定转染细胞,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 CDX2 基因的表达。应用人类表达谱芯片 Affymetrix 2.0 对两组细胞同时进行基因芯片分析,筛选出差异表达基因(以表达差异 ≥ 2.0 或 ≤ 0.5 倍为限),选择部分差异表达基因进行实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(Real-time PCR)验证。结果 基因芯片筛选出 CDX2 转染人胃癌细胞 BGC-823 差异表达基因 599 个,其中上调基因 275 个,下调基因 324 个,这些基因主要涉及细胞增殖、分化、凋亡、信号转导、蛋白酶活性、肿瘤侵袭和转移等方面;Real-time PCR 检测部分差异表达基因 DKK3、FOXP1、TWIST1、GATA6、RUNX3 和 BMP2,其结果与芯片结果一致,确定芯片结果可靠。结论 应用人类表达谱芯片成功筛选出 CDX2 转染人胃癌细胞 BGC-823 后差异表达基因,为深入

探讨 CDX2 在胃癌中的作用机制提供线索。

关键词 胃肿瘤;尾侧型同源转录因子-2;基因芯片;实时荧光定量 PCR

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0730-05

胃癌是源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,发病率居我国恶性肿瘤首位。CDX2 尾型同源盒转录因子 2,位于人类 13 号染色体,属于 ParaHox cluster 成员。目前国内外普遍认为 CDX2 在肠黏膜上皮细胞的发育及其形态和结构特征的维持过程扮演重要的作用。前期研究^[1]显示 CDX2 在正常胃黏膜组织、慢性浅表性胃炎中不表达,在肠化组织中的表达明显高于异型增生和胃癌,在胃癌细胞中 CDX2 过表达明显抑制胃癌细胞增殖、降低其迁移能力。本文将 CDX2 基因和空载体分别转染至胃癌细胞系 BGC-823 中,构建实验组 BGC-823/CDX2 和阴性对照组 BGC-823/EV,利用基因芯片技术筛选 CDX2 转染人胃癌细胞 BGC-823 后差异表达基因;应用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(Real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction, Real-

2014-02-17 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:090413118)

作者单位:安徽医科大学基础医学院病理学教研室,合肥 230032

作者介绍:陈晓双,女,硕士研究生;

秦蓉,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: qinrong0717@163.com

Effects and its mechanism of Arctigenin on mouse spleen cells

Lu Ming¹, Ji Feihong², Zhang Linjie¹

(¹ Dept of Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ² Shanghai Genhouse Biotechnology Corporation, Shanghai 201203)

Abstract **Objective** To investigate the effects of Arctigenin (ATG) on concanavalin (ConA)-stimulated cell proliferation and cytokine secretion in mouse spleen cells, and its possible mechanism. **Methods** The toxicity of ATG on mouse spleen cells was determined by MTT assay. The inhibition of proliferation was investigated by tritiated thymidine incorporation method. Secreted cytokines (IFN- γ and IL-2) were analyzed by ELISA. The associated proteins and phosphorylation levels of mTOR pathway (mTOR/P70S6K/Akt/AMPK/Raptor) were detected by Western blot. **Results** ATG had no significant toxicity to mouse spleen cells. ATG significantly inhibited mouse primary spleen cells proliferation induced by ConA. ATG suppressed IL-2 and IFN- γ production of mouse spleen cells in a concentration-dependent manner. ATG remarkably suppressed the phosphorylation of mTOR and P70S6K, and enhanced the phosphorylation of upstream AMPK and Raptor, while the phosphorylation of Akt did not change significantly. **Conclusion** ATG markedly suppresses the proliferation of mouse spleen stimulated by ConA cells and secretion of IFN- γ and IL-2, which may be correlated to the abilities of enhancing the phosphorylation of AMPK and Raptor, inhibiting the phosphorylation of mTOR and P70S6K.

Key words Arctigenin; cell proliferation; IL-2; IFN- γ ; mTOR