

枸杞环肽调控 NLRP3 及 NF- κ B 信号通路 减轻 BaP 诱导的气道上皮细胞炎性损伤

赵传欣, 李叶婷, 卜凡莉, 郑曼*

(东营市人民医院, 山东东营 257091)

摘要: 该研究通过活性追踪法分离枸杞活性肽 (*Lycium barbarum* L. Bio-active Peptide, LBP), 并研究其抗苯并芘 (Benzopyrene, BaP) 诱导的气道上皮细胞损伤活性及潜在机制。利用 CCK-8 法检测 LBP 细胞毒性; ELISA 法检测 LBP-1 抑制 BaP 诱导的人支气管上皮 16-HBE 细胞炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、NO 和 PGE₂) 的分泌; Western Blot 法检测 LBP-1 及 BaP 对 16-HBE 细胞 COX-2、iNOS 及 NLRP3 炎症小体和 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响。结果显示, LBP-1 能显著减轻 BaP 暴露导致的 16-HBE 细胞活力降低, 且浓度小于 1 mmol/L 时无显著细胞毒性; LBP-1 降低了由 BaP 暴露导致的细胞炎症因子分泌增加, TNF- α 、IL-1 β 、IL-18、IL-6、NO 和 PGE₂ 的浓度分别降低了 34.93%、27.41%、31.05%、35.28%、51.15% 及 27.46%, 同时 PGE₂ 和 NO 的关键酶 (COX-2、iNOS) 的表达分别降低了 81.72% 及 41.70%; Western Blot 结果显示, LBP-1 可抑制 I κ B α 和 p65 的磷酸化, 降低 NLRP3 及含有 Card 的凋亡相关斑点样蛋白 (Apoptosis-associated Speck-like Protein containing a CARD, ASC) 的表达, 从而抑制了 NLRP3 及 NF- κ B 信号通路的激活。以上结果证实 LBP-1 可通过调控炎症细胞因子及 NLRP3、NF- κ B 信号通路相关蛋白的表达发挥抗 BaP 诱导的气道上皮细胞炎性损伤的作用。

关键词: 枸杞环肽; 气道上皮细胞; 苯并芘; 信号通路

文章编号: 1673-9078(2022)09-92-99

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.9.0835

Lycium barbarum Cyclic Peptide Regulates NLRP3 and NF- κ B Signaling Pathways to Reduce BaP-Induced Inflammatory Airway Epithelial Cell Injury

ZHAO Chuanxin, LI Yeting, BU Fanli, ZHENG Man*
(Dongying People's Hospital, Dongying 257091, China)

Abstract: In this study, *Lycium barbarum* L. bioactive peptide (LBP) was isolated by the activity tracking method, and its activity against benzopyrene (BaP)-induced airway epithelial cell injury and the potential underlying mechanism were investigated. The cytotoxicity of LBPs was examined by the CCK-8 method; The inhibitory effects of LBP-1 against BaP-induced secretion of inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, NO and PGE₂) in human bronchial epithelial cells (16-HBE cells) were examined by ELISA; Western Blot method was used to examine the effects of LBP-1 and BaP on the expressions of COX-2, iNOS, NLRP3 inflammasomes and NF- κ B signaling pathway-related proteins in 16-HBE cells. The results showed that LBP-1 could significantly reduce the decrease of 16-HBE cell viability caused by BaP exposure, and there was insignificant cytotoxicity when the concentration was lower than 1 mmol/L; LBP-1 decreased BaP exposure-induced

引文格式:

赵传欣,李叶婷,卜凡莉,等.枸杞环肽调控 NLRP3 及 NF- κ B 信号通路减轻 BaP 诱导的气道上皮细胞炎性损伤[J].现代食品科技,2022,38(9):92-99

ZHAO Chuanxin, LI Yeting, BU Fanli, et al. *Lycium barbarum* cyclic peptide regulates NLRP3 and NF- κ B signaling pathways to reduce BaP-induced inflammatory airway epithelial cell injury [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 92-99

收稿日期: 2021-08-02

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2019A1515110101)

作者简介: 赵传欣 (1982-), 女, 主管护师, 研究方向: 环境污染与动脉粥样硬化、心力衰竭关系; E-mail: pumolinnq628@163.com

通讯作者: 郑曼 (1986-), 女, 主治医师, 研究方向: 环境污染与动脉粥样硬化、心力衰竭关系; E-mail: zhenmandph@outlook.com

increase in the secretion of cytokines, and the concentrations of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, NO and PGE₂ decreased by 34.93%, 27.41%, 31.05%, 35.28%, 51.15% and 27.46% respectively, while the expressions of the key enzymes (COX-2 and iNOS) of PGE₂ and NO decreased by 81.72% and 41.70% respectively; Western Blot results showed that LBP-1 could inhibit the phosphorylation of I κ B α and p65, reduce the expressions of NLRP3 and apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC), thereby inhibiting the activation of NLRP3 and NF- κ B signaling pathways. The above results confirmed that LBP-1 could play a role in counteracting BaP-induced inflammatory airway epithelial cell injury through regulating the expressions of inflammatory cytokines and NLRP3 and NF- κ B signaling pathway-related proteins.

Key words: *Lycium barbarum* cyclepeptide; airway epithelial cells; benzopyrene; signaling pathway

苯并芘 (Benzopyrene, BaP) 是重要的大气污染物, 化石燃料的燃烧及烧烤、油炸过程会产生大量的苯并芘^[1]。苯并芘吸入或皮肤接触会导致机体 DNA 损伤, 造成呼吸系统及皮肤炎症, 持续大量苯并芘暴露会导致肺癌^[2]、皮肤癌^[3]等疾病。

炎症是机体对外界刺激的一种防御反应, 大多数情况下是有益的, 但当炎症朝着不受控制的情况发展就会损害机体健康^[4]。支气管炎是一种常见的气道炎症, 临床表现以咳嗽为主, 常伴有咽痛、鼻塞等症状, 对患者的生活质量造成很大影响^[5]。同时, 慢性支气管炎还有可能发展成为慢性阻塞性肺疾病^[6]、肺源性心脏病^[7]等, 严重危害患者的身体健康。研究发现, 苯并芘暴露会诱发或加重支气管炎、慢性支气管炎及慢性阻塞性肺疾病等疾病^[8], 但现代医学对于支气管炎等相关呼吸道疾病尚未有良好对策。

枸杞是茄科枸杞属植物, 广泛分布于亚、欧及北美干旱和半干旱地区^[9]。在中国, 枸杞作为药物使用的历史可追溯到 2300 年前, 人们日常生活中常见的枸杞子多是由宁夏枸杞的果实制成^[10]。《本草纲目》记载, 枸杞子能够补肝明目; 现代医学证实, 枸杞含有多种多糖、类胡萝卜素、类黄酮、生物碱等活性物质^[11], 具有抗炎^[12,13]、免疫调节^[14]、抗氧化^[15]等活性。人们前期的研究主要集中在枸杞中的多糖类物质, 同样具有免疫调节、抗氧化、降血压等功能的糖肽、ACE 抑制肽等肽类物质很容易被忽视^[16,17], 而针对枸杞环肽能否抑制 BaP 导致的气道上皮细胞损伤的活性及机制鲜有报道。因此, 本实验将构建 BaP 暴露气道上皮细胞模型并通过活性追踪方法分离枸杞活性肽, 在此基础上进一步研究其潜在的活性及机制, 以期对枸杞活性肽类物质的研究奠定一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人支气管上皮 16-HBE 细胞, 中国科学院上海细胞生物研究所; 苯并芘, 阿拉丁试剂有限公司; DMEM 基础培养基、胎牛血清-FBS 和青霉素-链霉素混合液,

美国 Gbico; BCA 蛋白质浓度测定试剂盒, 碧云天生物技术有限公司; Human PGE₂ Elisa Kit、一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; Human IL-1 β (白细胞介素-1 β) 和 Human TNF- α (肿瘤坏死因子- α) ELISA 试剂盒, 北京四正柏生物科技有限公司; I κ B、p-I κ B、p65、p-p65、NLRP3、ASC、COX-2 和 iNOS 的一抗抗体, 美国 CST。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-IC 超净工作台, 苏州; INCO2108 CO₂ 培养箱, 德国 Memmert; 2K15 低温高速离心机, 美国 Sigma 公司; Waters R2487 高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), 美国沃特世; 液质联用 (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC/MS), 美国 Agilent Technologies; 组织匀浆器, Ultra-Turrax; IKALabortechnik, 德国 Staufen; Epics Altra 型流式细胞仪, 美国 Beckman; 3-30 K 高速台式冷冻离心机, 美国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 枸杞活性肽的分离、鉴定

1.3.1.1 枸杞粗蛋白制备

将干枸杞 (1.0 kg) 匀浆与异丙醇按 1:5 (*m/V*) 的比例混合, 断搅拌 2 h。收集沉积物, 冷冻干燥并储存在 -80 °C。脱脂沉淀物 (205 g) 溶解在 0.25 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 值 7.3) 中 (10%, *m/V*)。离心 (9 000 g, 12 min), 上清液冻干, 作为枸杞总蛋白。

1.3.1.2 超滤、疏水层析

超滤色谱法: 采用分子量为 1 ku 的超滤膜对枸杞总蛋白进行超滤分离。收集 LBP-A (Mw < 1 ku) 和 LBP-B (Mw > 1 ku) 两个组分, 冷冻干燥。评价 LBP-A 和 LBP-B 对 BaP 暴露的 16-HBE 细胞的保护活性, 收集具有最佳保护活性部分。

1.3.1.3 疏水色谱法

将 LBP-A (27.3 g) 溶解于用 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 值 7.3) 制备的 1.60 mol/L (NH₄)₂SO₄ 中。苯基 Sepharose CL-4B 疏水色谱柱 (3.0 cm×100 cm),

30 mm 磷酸盐缓冲液 (pH 值 7.3) 2.5 mL/min 的流速梯度 [1.60、0.80 和 0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] 洗脱。300 nm 监测, 收集 10 个组分 (LBP-A-1~10, 每个组分 500 mL), 并将组分进行冷冻干燥。评价 LBP-A-1~10 对 BaP 暴露的 16-HBE 细胞的保护活性, 收集具有最佳保护活性部分。

1.3.1.4 阴离子交换色谱法

将 LBP-A-4 溶液 (3 mL, 2.27 g/mL) 上样于 DEAE-52 纤维素阴离子交换柱 (Sigma-Aldrich, 上海, 3.0 cm×100 cm), 去离子水预平衡。2.0 mL/min 的流量, 0、0.20、0.40 和 0.80 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液梯度洗脱。300 nm 监测, 收集 10 个组分 (LBP-A-4-1~10, 每个组分 500 mL), 并将组分进行冷冻干燥。评价 LBP-A-4-1~10 对 BaP 诱导的 16-HBE 细胞的保护活性, 收集具有最佳保护活性部分。

1.3.1.5 凝胶过滤色谱法

LBP-A-4-4 溶液 (1.5 mL, 366 mg/mL) 上样于 Sephadex G-15 柱 (Sigma-Aldrich, 上海, 3.0 cm×100 cm), 2.0 mL/min 的流量用 0.40 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液洗脱。300 nm 监测, 收集 10 个组分 (LBP-A-4-4-1~10, 每个组分 300 mL), 并将组分进行冷冻干燥。评价 LBP-A-4-4-1~10 对 BaP 暴露的 16-HBE 细胞的保护活性, 收集具有最佳保护活性部分。

1.3.1.6 RP-HPLC 法

LBP-A-4-4-1 通过 RP-HPLC (Agilent 1200 HPLC) 分析制备, Zorbax, SB C-18 柱 (4.6×250 mm, 5 μm)。洗脱溶剂体系为水-三氟乙酸 (溶剂 A; 100:0.1, V/V) 和乙腈-三氟乙酸 (溶剂 B; 100:0.1, V/V)。以 2.0 mL/min 的流量从 30% 到 60% 的溶剂 B 梯度洗脱 60 min, 检测波长设置为 300 nm。将分离得到的化合物组分进行冷冻干燥, 最终分离获得两个枸杞肽类活性化合物枸杞活性肽-1 (LBP-1) 及枸杞活性肽-2 (LBP-2)。

1.3.1.7 LBP-1~2 的分子量测定及氨基酸序列分析

SCIEX500R Q-TOF 质谱仪 (Framingham, 美国) 进行 HPLC-ESI-MS 分析。质谱条件: ESI 源质量范围设为 m/z 50~1 500, 以正离子模式采集 Q-TOF-MS 数据。MS 分析条件为: CAD 气体流量 7 L/min; 干燥气体温度, 550 $^\circ\text{C}$; 离子喷涂电压, 5 500 V; 去聚电位, 80 V。软件生成的数据文件: SCIEX OS 1.0。

1.3.2 细胞培养

将质量分数分别为 10% 的 FBS、1% 的青霉素-链霉素混合液和 89% 的 DMEM 基础培养基混合后配置成 DMEM 完全培养基用于后续实验; 将 16-HBE 细胞接种于含有 DMEM 完全培养基的 T75 细胞培养瓶中,

隔日换液; 待细胞处于对数生长期后即可以 1:3 的比例进行传代或收集细胞进行后续实验。

1.3.3 细胞活力检测

将 16-HBE 细胞密度调整为每毫升 1×10^5 个细胞, 于 96 孔板中每孔接种 100 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养, 隔日换液。分为 4 组, 每组 6 个复孔, 第 1 组细胞不做任何处理, 第 2~4 组的细胞培养基中分别加入不同浓度的 LBP-1、LBP-2, 培养箱中孵育 48 h 后, 每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL , 温育 4 h, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光度, 检测 LBP-1、LBP-2 的细胞毒性。

将 16-HBE 细胞密度调整为每毫升 1×10^5 个细胞, 于 96 孔板中每孔接种 100 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养。分为 4 组, 每组 6 个复孔, 第 1 组细胞不做任何处理, 第 2~4 组加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 BaP, 孵育 12 h 后, 第 3、4 组分别加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 LBP-1 及 LBP-2, 培养箱中孵育 12 h。每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL , 温育 4 h, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光度, 评价 LBP-1、LBP-2 的保护活性。

1.3.4 ELISA 检测 16-HBE 细胞炎症因子分泌

将 16-HBE 细胞密度调整为每毫升 1×10^5 个细胞, 于 24 孔板中每孔接种 1 mL, 37 $^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养。分为 4 组: ①空白对照组 (Control), ②BaP 组 (BaP), ③10 $\mu\text{mol/L}$ LBP-1 组, ④50 $\mu\text{mol/L}$ LBP-1 组, 每组 3 个复孔。①不做任何处理, ②③④加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 BaP, 孵育 12 h 后, ③加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 LBP-1, ④加入终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 LBP-1。再次孵育 12 h, 收集细胞培养基, 1 400 r/min 离心 5 min, 收集上清液。参照 IL-1 β 、TNF- α 、NO 和 PGE₂ 的 ELISA 试剂盒说明书检测细胞上清液中炎症因子含量。

1.3.5 Western Blot 检测相关蛋白的表达

将 16-HBE 细胞密度调整为每毫升 3×10^5 个细胞, 于 6 孔板中每孔接种 3 mL, 37 $^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养。参照方法 1.3.4 分组处理, 收集细胞, 加入适量 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。参考文献方法, Western Blotting 检测 NF- κB 信号通路及 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达。

1.3.6 数据处理

所有数据采用 SPSS 18 软件进行统计。对阴性对照和阳性对照采用独立样本 t 检验, 对 LBP-1 处理效应进行回归分析。 $p<0.05$ 表明具有显著差异, $p<0.01$ 表明具有极显著差异, 结果均以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 枸杞环肽的分离鉴定

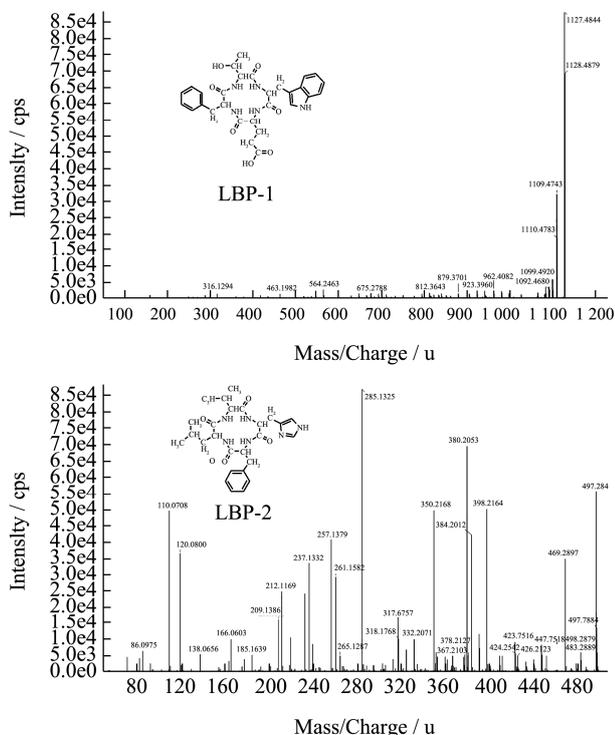


图1 LBP-1 及 LBP-2 结构及二级质谱图

Fig.1 The structure and MS-MS of LBP-1 and LBP-2

LBP-1: 白色粉末, m/z 564.245 0 离子是 $[M+H]^+$, 确定分子式为 $C_{29}H_{33}N_5O_7$; m/z 546.234 3 离子是 $[M-H_2O+H]^+$; m/z 463.197 7 离子是 $[M-Thr+H_2O+H]^+$; m/z 435.200 6 离子是 $[M-Glu+H_2O+H]^+$; m/z 417.183 3 离子是 $[M-Phe+H_2O+H]^+$; m/z 378.166 0 离子是 $[M-Trp+H_2O+H]^+$; m/z 316.129 0 离子是 $[Glu-Trp-H_2O+H]^+$; m/z 288.134 4 离子是 $[Thr+Trp-H_2O+H]^+$; m/z 249.123 0 离子是 $[Phe-Thr-H_2O+H]^+$; m/z 187.086 5 离子是 $[Trp-H_2O+H]^+$; m/z 159.091 5 离子是 $[Trp-COOH+H]^+$; m/z 102.055 4 离子是 $[Glu-COOH+H]^+$; m/z 74.061 9 离子是 $[Thr-COOH+H]^+$; 最终, 确认 LBP-1 是环-(Trp-Glu-Phe-Thr)肽。

LBP-2: 白色粉末, m/z 497.284 3 离子是 $[M+H]^+$, 确定分子式为 $C_{26}H_{36}N_6O_4$; m/z 469.289 7 离子是 $[M-CO+H]^+$; m/z 398.216 4 离子是 $[M-Val+H_2O+H]^+$; m/z 384.201 2 离子是 $[M-Leu+H_2O+H]^+$; m/z 380.205 3 离子是 $[M-Val+H]^+$; m/z 350.216 8 离子是 $[M-Phe+H_2O+H]^+$; m/z 285.132 5 离子是 $[His-Phe-2H_2O+H]^+$; m/z 261.158 2 离子是 $[Leu-Phe-2H_2O+H]^+$; m/z 237.133 2 离子是 $[His-Val-2H_2O+H]^+$; m/z 212.116 9 离子是

$[Val-Leu-2H_2O+H]^+$; m/z 138.065 6 离子是 $[His-H_2O+H]^+$; m/z 110.070 8 离子是 $[His-COOH+H]^+$; m/z 86.097 5 离子是 $[Leu-COOH+H]^+$; 最终, 确认 LBP-2 是环-(Leu-Val-His-Phe)肽。

2.2 LBP-1 对 16-HBE 细胞的保护作用

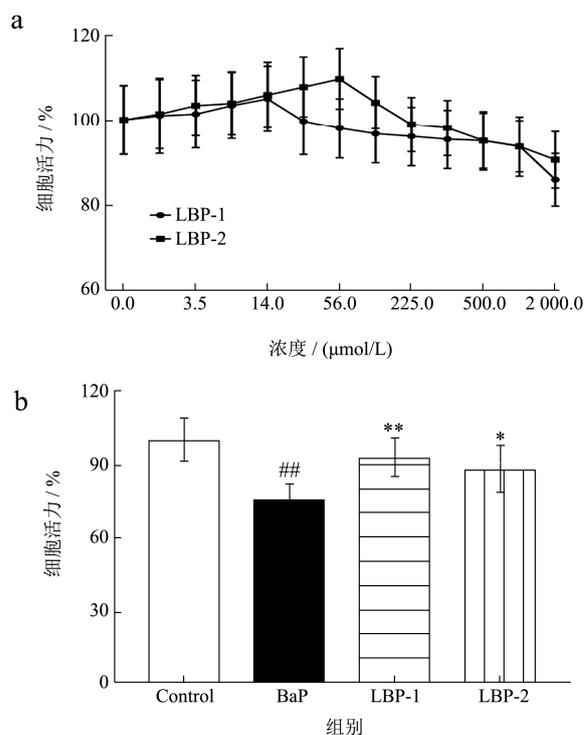


图2 LBP-1、LBP-2 的细胞毒性及对 16-HBE 细胞的保护活性

Fig.2 Cytotoxicity of LBP-1 and LBP-2 and their protective activity on 16-HBE cells

注: #表示与空白对照组相比极具显著差异 ($p < 0.01$); *表示与 BaP 组相比具有显著差异 ($p < 0.05$), **表示与 BaP 组相比极具显著差异 ($p < 0.01$), 结果均以平均值±标准差表示。图 3 同。

本研究检测了 LBP-1、LBP-2 的细胞毒性。结果如图 2a, LBP-1、LBP-2 的浓度低于 1.0 mmol/L 时, 16-HBE 细胞活力与空白对照组相比均无显著差异 ($p > 0.05$)。表明, LBP-1、LBP-2 的浓度低于 1.0 mmol/L 时, 无显著细胞毒性, 因此后续实验将 LBP-1、LBP-2 的浓度设置为低于 1.0 mmol/L。

由图 2b 可知, 相比于空白对照组, 经 10 μ mol/L 的 BaP 处理 12 h 后, 16-HBE 细胞的活力降低 24.84% ($p < 0.01$); 而经 LBP-1 及 LBP-2 处理 12 h 后, BaP 暴露导致的 16-HBE 细胞活力降低被显著抑制。相比于 BaP 组, LBP-1、LBP-2 组细胞活力分别提高了 17.83% ($p < 0.01$) 及 12.78% ($p < 0.05$)。考虑到 LBP-1 的保护活性比 LBP-2 更佳, 因此选择 LBP-1 进行后续研究。

2.3 LBP-1 抑制 BaP 诱导的 16-HBE 细胞炎症

因子分泌

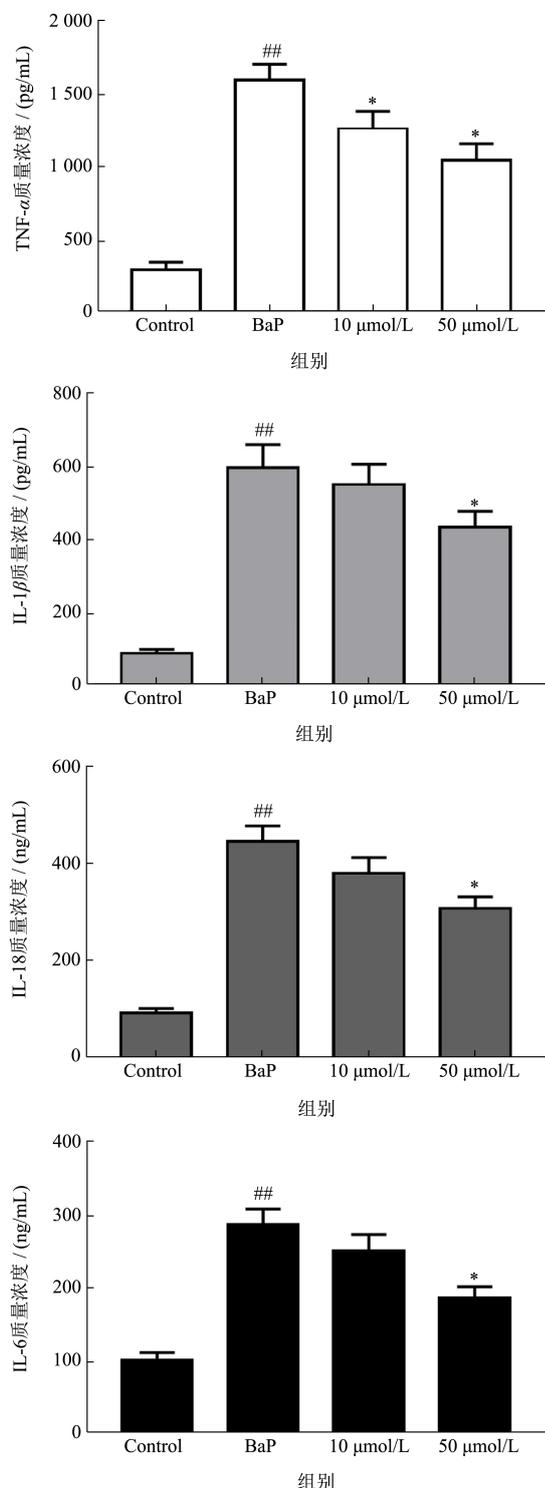


图3 LBP-1 对 BaP 诱导的 16-HBE 细胞炎症因子分泌的影响

Fig.3 Effect of LBP-1 on the secretion of inflammatory factors in 16-HBE cells induced by BaP

促炎因子是一类由机体的免疫和非免疫细胞合成和分泌的小分子多肽类物质，它们调节多种细胞生理

功能，并在创伤、疼痛、感染等应激过程中起重要作用。促炎性细胞因子包括白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等^[14]。TNF- α 主要由巨噬细胞和淋巴细胞分泌，以应对感染或其他外界刺激引起的细胞损伤^[15]，同时它也可由如上皮细胞等许多其他类型的细胞和组织分泌^[18]；IL-1 β 与 TNF- α 类似，是一种促炎细胞因子^[19]。本研究中，BaP 暴露使 16-HBE 细胞 IL-1 β 与 TNF- α 分泌显著增加，而 LBP-1 干预后，BaP 诱导的 IL-1 β 与 TNF- α 过量分泌被显著抑制。

BaP 会导致炎症的发生^[20]，结果如图 3 所示，BaP 暴露会诱发 16-HBE 细胞炎症性细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 和 IL-6) 的过量分泌。相比于空白对照组，BaP 暴露使 16-HBE 细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 和 IL-6 炎症性细胞因子分泌分别增加了 556.15% ($p < 0.01$)、690.72% ($p < 0.01$)、476.53% ($p < 0.01$) 和 286.45% ($p < 0.01$)。表明，BaP 暴露会造成 16-HBE 细胞炎症损伤，并诱发炎症因子大量分泌。研究表明，多种生物活性肽具有抑制炎症的功能^[21]，本研究中，50 $\mu\text{mol/L}$ 的 LBP-1 处理后，相比于 BaP 组，细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-1 β 的质量浓度分别降低了 34.93% ($p < 0.05$) 及 27.41% ($p < 0.05$)；IL-18 和 IL-6 的质量浓度降低了 31.05% ($p < 0.05$)、35.28% ($p < 0.02$)。本文推测，BaP 暴露造成的 16-HBE 细胞炎症损伤被 LBP-1 显著减轻。

2.4 LBP-1 对 16-HBE 细胞 PGE₂、NO 分泌及 COX-2、iNOS 表达的影响

iNOS 在细胞中通常不表达，但会响应细胞的炎症刺激 (如细胞因子) 而产生，一旦表达就会产生高水平的 NO，而高水平的 NO 则会产生细胞毒性，对炎症和宿主免疫产生持久影响^[22]；花生四烯酸从生物膜中释放出来后，被迅速氧化成不稳定的 PGG₂，随后被还原为 PGH₂，这两个过程均由 COX-2 催化，随后，PGH₂ 会被一组末端合成酶迅速转化为 PGE₂^[23]，而 COX-2 在许多组织中可通过促炎因子诱导高表达，从而产生大量的 PGE₂^[24]，同时 PGE₂ 在炎症的初期会促进中性粒细胞、巨噬细胞和肥大细胞从血流中流入组织，导致感染或组织损伤部位肿胀和水肿，从而促进炎症的发生和发展^[25]。本研究中，BaP 暴露使 16-HBE 细胞 iNOS 与 COX-2 表达显著增加，同时，NO 及 PGE₂ 含量显著升高。而 LBP-1 干预后，BaP 诱导的 iNOS 与 COX-2 高表达及 NO、PGE₂ 过量分泌被显著抑制。提示 LBP-1 具有预防 BaP 暴露所致的气道上皮细胞炎症

反应, 从而缓解和改善细胞活力减弱细胞损伤。

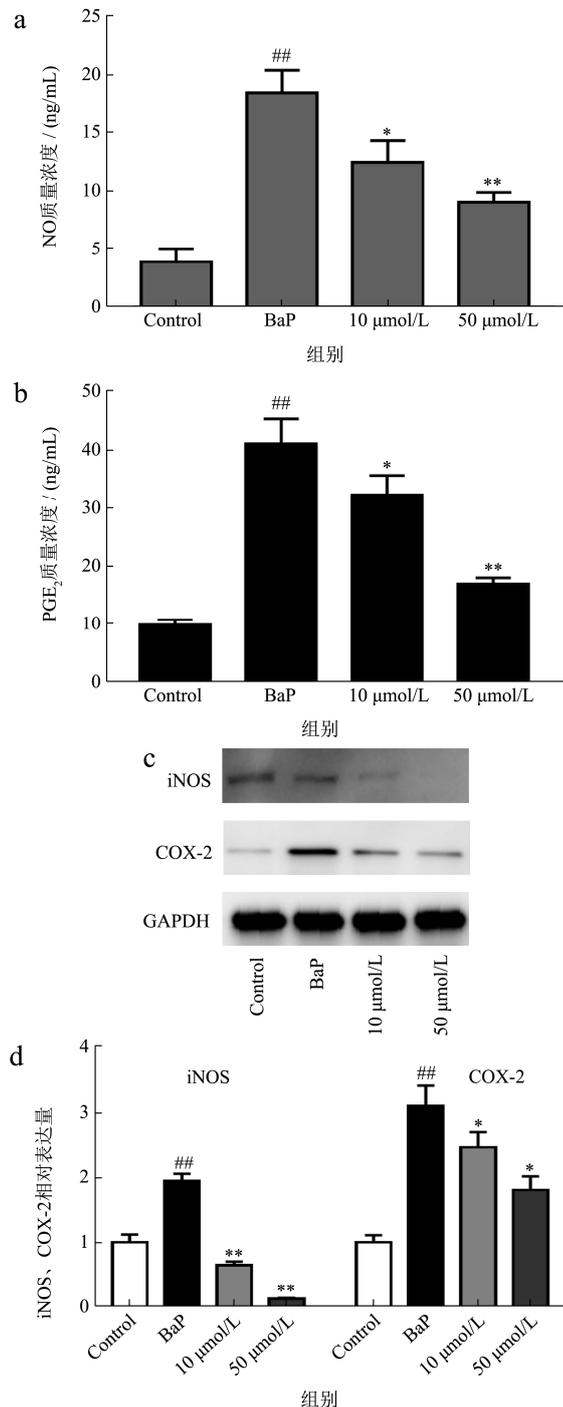


图4 LBP-1对BaP诱导的16-HBE细胞NO、PGE₂分泌及iNOS、COX-2表达的影响

Fig.4 Effects of LBP-1 on the secretion of NO and PGE₂ and the expression of iNOS and COX-2 in 16-HBE cells induced by BaP

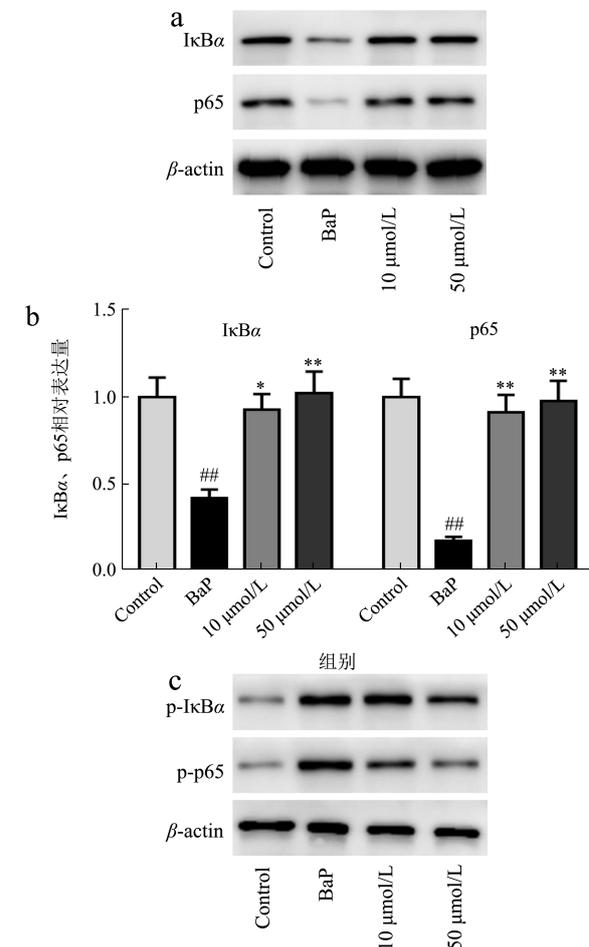
注: #表示与空白对照组相比具有显著差异 ($p < 0.05$), ##表示与空白对照组相比极具显著差异 ($p < 0.01$); *表示与BaP组相比具有显著差异 ($p < 0.05$), **表示与BaP组相比极具显著差异 ($p < 0.01$), 结果均以平均值±标准差表示。图5同。

结果如图4a、4b所示, BaP暴露会诱发16-HBE细

胞NO、PGE₂的过量分泌。相比于空白对照组, BaP暴露使16-HBE细胞NO、PGE₂分泌分别增加475.34% ($p < 0.01$)、414.77% ($p < 0.01$)。而50 μmol/L的LBP-1处理后, 相比于BaP组, 细胞培养上清液中NO、PGE₂的浓度分别降低了51.15% ($p < 0.01$)及27.46% ($p < 0.01$)。COX-2及iNOS是细胞合成PGE₂和NO的关键酶, BaP诱导的PGE₂和NO过量分泌被LBP-1显著抑制。从海马中纯化出的一种生物活性肽可以抑制iNOS和COX-2的表达, 从而抑制LPS诱导的炎症^[26], BaP及LBP-1对COX-2和iNOS表达的影响的结果如图4c、4d所示, BaP暴露使16-HBE细胞中iNOS和COX-2表达显著升高。10 μmol/L LBP-1处理后, 16-HBE细胞iNOS及COX-2的表达量有所下降, 但不具有显著性差异。而50 μmol/L LBP-1处理后, 16-HBE细胞iNOS及COX-2的表达显著下降。相比于BaP组, 50 μmol/L LBP-1组iNOS及COX-2表达降低81.72% ($p < 0.01$)和41.70% ($p < 0.05$)。LBP-1可通过抑制BaP诱导的COX-2及iNOS的表达进而抑制PGE₂及NO的过量分泌。

2.5 LBP-1抑制BaP诱导的16-HBE细胞

NLRP3和NF-κB信号通路激活



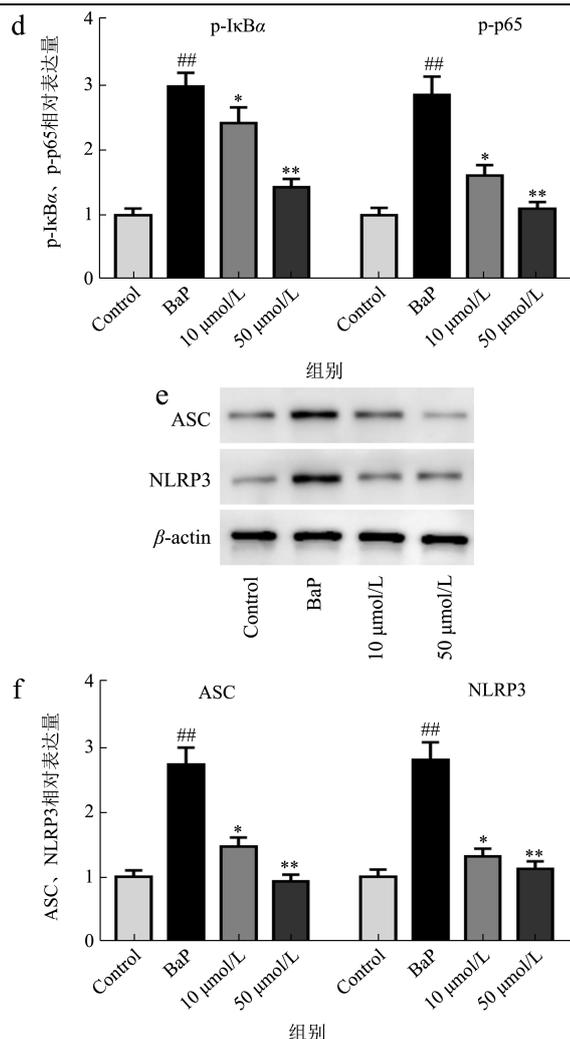


图5 LBP-1对BaP暴露诱导16-HBE细胞NF-κB、NLRP3信号通路相关蛋白表达影响

Fig.5 Effect of LBP-1 on the expression of NF-κB and NLRP3 signaling pathway related proteins in 16-HBE cells induced by BaP exposure

核转录因子κB (NF-κB) 是细胞中重要的转录调节因子,通常以p50-p65异二聚体的形式与其抑制性蛋白(inhibitorκB, IκB)结合而呈非活化状态;NF-κB通过刺激因子(肿瘤坏死因子、淋巴毒素、环境污染物等)的活化进而诱导多种基因的表达,产生多种细胞因子参与炎症反应^[27]。因此,NF-κB信号通路是经典的炎症通路,也是抗炎药物的经典靶点。NLRP3也叫NOD样受体蛋白3,属于炎性复合体的传感蛋白,当细胞受到感染刺激时,被激活的NLRP3形成NLRP3炎性小体,在炎性小体的作用下,促进下游炎性细胞因子IL-1β和IL-18的释放从而引起炎症反应^[28]。

因此本文检测了LBP-1对BaP暴露诱导的16-HBE细胞NF-κB和NLRP3信号通路相关蛋白的影响。BaP可通过激活NF-κB信号通路从而导致炎症^[20],如图5a、5b和5c、5d所示,BaP暴露会使IκBα和

p65表达降低,诱导IκBα和p65磷酸化;与此同时,BaP暴露使NLRP3及ASC表达显著增高。说明,BaP暴露激活了NF-κB和NLRP3信号通路。活性肽也可通过NF-κB信号通路抑制炎症^[26],本研究中50 μmol/L的LBP-1处理16-HBE细胞后,BaP暴露导致的NF-κB和NLRP3信号通路激活被显著抑制。IκBα和p65表达升高,IκBα和p65磷酸化水平降低,NLRP3及ASC表达也被显著抑制。通过结果推测,LBP-1可通过抑制NF-κB和NLRP3信号通路相关蛋白的表达抑制BaP暴露导致的16-HBE细胞NF-κB和NLRP3信号通路激活,进而发挥抗炎活性。

3 结论

多环芳烃化合物(PAHs)及其衍生物已经被证明在环境污染所引起的癌症的发生发展过程中起着非常重要的作用。苯并芘及其代谢产物能够诱导生物有机体产生炎症反应,进而表现出较强的致癌性,在慢性肺炎及肺部肿瘤的形成过程中发挥重要作用。本研究构建BaP诱导的气道上皮细胞损伤模型,通过活性追踪方式从枸杞中分离获得具有保护活性的环肽类化合物。发现枸杞环肽-1(LBP-1,环-(Trp-Glu-Phe-Thr)肽)能够显著抑制BaP暴露导致的细胞活力降低,进一步的研究显示LBP-1能够抑制BaP暴露诱发的炎性细胞因子分泌,抑制IκBα磷酸化及ASC高表达。本文推测LBP-1抗BaP诱导的气道上皮细胞炎症损伤可能是通过抑制BaP暴露诱导的炎性细胞因子分泌及诱导的NF-κB/NLRP3信号通路激活有关。

本研究发现BaP暴露会激活NF-κB信号通路,同时NLRP3炎性小体的NLRP3及ASC蛋白表达增加,而LBP-1处理后,BaP暴露诱导的p65与IκBα磷酸化及NLRP3炎性小体激活收到显著抑制。说明,LBP-1可通过调控NLRP3及NF-κB信号通路相关蛋白表达发挥抗BaP诱发的气道上皮细胞炎症损伤。总之,LBP-1可通过抑制BaP诱导的气道上皮细胞NF-κB/NLRP3信号通路激活及iNOS、COX-2酶活性从而抑制炎症因子IL-1β、NO等的释放,进而有效抑制炎症反应。本研究将为新型活性枸杞活性肽的开发及抗环境污染物多环芳烃诱导的呼吸道损伤药物研发提供新的研究思路和实验依据。

参考文献

- [1] Gianelle V, Colombi C, Caserini S, et al. Benzo(a)pyrene air concentrations and emission inventory in Lombardy region, Italy [J]. Atmos Pollut Res, 2013, 4(3): 257-266
- [2] Zhao G, Wang Z, Huang Y, et al. Effects of benzo(a)pyrene on

- migration and invasion of lung cancer cells functioning by TNF- α [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(8): 6492-6500
- [3] Digiovanni J, Rymer J, Slaga T J, et al. Anticarcinogenic and cocarcinogenic effects of benzo[e]pyrene and dibenz[a,c]anthracene on skin tumor initiation by polycyclic hydrocarbons [J]. *Carcinogenesis*, 1982, 3(4): 371-375
- [4] Dinarello C A. Anti-inflammatory agents: present and future [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 935-950
- [5] 李建生,余学庆.急性气管支气管炎中医诊疗指南(2015版) [J].*中医杂志*,2016,57(9):806-810
LI Jiansheng, YU Xueqing. Guidelines for diagnosis and treatment of acute tracheobronchitis in traditional Chinese medicine (2015 edition) [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2016, 57(9): 806-810
- [6] 杨丽芸,方朝义,马金生.中医药治疗慢性支气管炎研究进展[J].*解放军医药杂志*,2015,27(5):103-105
YANG Liyun, FANG Chaoyi, MA Jinsheng. Research progress in the treatment of chronic bronchitis with traditional Chinese medicine [J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2015, 27(5): 103-105
- [7] Tian X, Liang T, Liu Y, et al. Extraction, structural characterization, and biological functions of *Lycium barbarum* polysaccharides: a review [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(9): 389
- [8] Li X M. Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats [J]. *Int J Biol Macromol*, 2007, 40(5): 461-465
- [9] Gao Y, Wei Y, Wang Y, et al. *Lycium barbarum*: a traditional Chinese herb and a promising anti-aging agent [J]. *Aging Dis*, 2017, 8(6): 778-791
- [10] Lee S R, Hwang H J, Yoon J G, et al. Anti-inflammatory effect of *Lycium barbarum* on polarized human intestinal epithelial cells [J]. *Nutr Res Pract*, 2019, 13(2): 95-104
- [11] Huang K, Dong W, Liu W, et al. 2-O-beta-d-glucopyranosyl-l-ascorbic acid, an ascorbic acid derivative isolated from the fruits of *Lycium barbarum* L., modulates gut microbiota and palliates colitis in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(41): 11408-11419
- [12] Huang K, Yan Y, Chen D, et al. Ascorbic acid derivative 2-o-beta-d-glucopyranosyl-l-ascorbic acid from the fruit of *Lycium barbarum* modulates microbiota in the small intestine and colon and exerts an immunomodulatory effect on cyclophosphamide-treated BALB/c mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(40): 11128-11143
- [13] Shi G J, Zheng J, Wu J, et al. Beneficial effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on spermatogenesis by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in streptozotocin-induced diabetic male mice [J]. *Food Funct*, 2017, 8(3): 1215-1226
- [14] Van Der Meer J W, Vogels M T, Netea M G, et al. Proinflammatory cytokines and treatment of disease [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 856: 243-251
- [15] Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response [J]. *Annu Rev Immunol*, 1989, 7: 625-655
- [16] 游佳琪.枸杞糖肽及其多酚复配物的生物活性研究[D].上海:华东理工大学,2019
YOU Jiaqi. Study on the biological activity of *Lycium barbarum* glycopeptide and its polyphenol compound [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2019
- [17] 陶瑶,吴琼,王桃梅,等.枸杞ACE抑制肽对SHR大鼠的降压作用及机制研究[A].中国营养学会.中国营养学会第十次特殊营养学术会议论文集[C]//中国营养学会,2017:1
TAO Yao, WU Qiong, WANG Taomei, et al. Study on the antihypertensive effect and mechanism of *Lycium barbarum* ACE inhibitory peptide on SHR rats [A]. Chinese Society of Nutrition. Chinese Nutrition Proceedings of the 10th Special Nutrition Academic Conference of the Society [C]// Chinese Nutrition Society, 2017: 1
- [18] Ferraro M, Gjomarkaj M, Siena L, et al. Formoterol and fluticasone propionate combination improves histone deacetylation and anti-inflammatory activities in bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(7): 1718-1727
- [19] Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors [J]. *Annu Rev Immunol*, 1992, 10: 411-452
- [20] Shi Q, Godschalk R W L, Van Schooten F J. Inflammation and the chemical carcinogen benzo[a]pyrene: partners in crime [J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2017, 774: 12-24
- [21] Park Y R, Park C I, Soh Y. Antioxidant and anti-inflammatory effects of NCW peptide from clam worm (*Marphysa sanguinea*) [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2020, 30(9): 1394
- [22] Nathan C, Xie Q W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls [J]. *Cell*, 1994, 78(6): 915-918
- [23] Nakanishi M, Rosenberg D W. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer [J]. *Semin Immunopathol*, 2013, 35(2): 123-137
- [24] Wang D, Dubois R N. Prostaglandins and cancer [J]. *Gut*, 2006, 55(1): 115-122
- [25] Wallace J L. Prostaglandin biology in inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2001, 30(4): 971-980
- [26] Ryu B, Qian Z-J, Kim S-K. Purification of a peptide from seahorse, that inhibits TPA-induced MMP, iNOS and COX-2 expression through MAPK and NF- κ B activation, and induces human osteoblastic and chondrocytic differentiation [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, 184(3): 413-422
- [27] Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(6): a001651
- [28] Wang Z, Zhang S, Xiao Y, et al. NLRP3 inflammasome and inflammatory diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4063562