

黄芪多糖对脂多糖诱导肠上皮细胞 IPEC-J2 氧化应激和炎症反应的缓解作用

崔海燕,纪龙翔,朱宇晴,李卫国

(河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007)

摘要:为探究黄芪多糖对脂多糖诱导 IPEC-J2 细胞炎症反应的影响,将 IPEC-J2 细胞分为对照组、LPS 处理组、ASP 处理组和 ASP+LPS 处理组,分别检测各组细胞活力、抗氧化指数、相关炎症因子含量和 mRNA 表达水平。结果表明当 10 mg/L LPS 作用细胞 12 h 后,显著降低了细胞活力。当 100 mg/L ASP 预处理细胞 4 h 后显著提高了细胞的存活率。与对照组相比,LPS 组显著提高了 MDA 含量并降低了 SOD、CAT 酶活力,显著上调细胞上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 的含量以及细胞内三者基因 mRNA 的表达水平,显著下调了 IL-10 基因 mRNA 的表达。而采用 ASP 预处理 4 h 后可显著降低细胞内 MDA 含量及提高 SOD 和 CAT 酶活力,且显著下调 IL-6、IL-8 和 TNF- α 的含量和细胞内三者基因 mRNA 的表达及显著上调 IL-10 基因的表达。试验表明 ASP 可缓解 LPS 引起的氧化应激和炎症反应,抑制 IL-6、IL-8 和 TNF- α 含量及其基因表达,促进 IL-10 基因表达,从而发挥抗氧化和抗炎作用。

关键词:黄芪多糖;IPEC-J2 细胞;脂多糖;氧化应激;炎症

中图分类号:Q955

文献标志码:A

肠道是集消化、吸收、内分泌、免疫和防御功能于一体的器官,肠道黏膜屏障是阻止外界环境中有害物质侵入机体的一道天然屏障。当肠道炎症发生时,会引起肠粘膜坏死、通透性增加以及肠粘膜屏障功能降低^[1]。脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,LPS 刺激可破坏猪肠道上皮细胞间的紧密连接,损坏肠道的完整性而引发疾病^[2]。黄芪是一种传统的补益中药,含有黄酮类和皂苷等生物活性成分,其中黄芪多糖(Astragalus polysaccharides,ASP)具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤和免疫调节等功能^[3]。已有研究大多关注 ASP 的抗炎作用,关于 ASP 对 LPS 诱导 IPEC-J2 氧化应激和炎症的保护作用研究较少。本研究通过建立猪肠道上皮细胞 LPS 损伤模型,探讨 ASP 对 LPS 刺激 IPEC-J2 的细胞活力、抗氧化相关指标及炎症相关基因表达的影响,以期 ASP 的抗炎作用机制以及在畜牧业中的应用提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料

黄芪多糖(质量分数>90%)购自北京索莱宝生物有限公司,脂多糖(LPS)购自 Sigma-Aldrich 公司。高糖 DMEM 培养基和胎牛血清(FBS)购自 Biological Industries 公司。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和丙二醛(MDA)购自南京建成生物工程研究所。白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)和肿瘤坏死因子(TNF- α)ELISA 检测试剂盒购自武汉酶免生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组

猪小肠上皮细胞 IPEC-J2 系由河南农业大学牧医工程学院馈赠。IPEC-J2 细胞培养液为质量分数 10%FBS

收稿日期:2021-03-15;修回日期:2021-07-17.

基金项目:国家自然科学基金(31702349);河南省科技攻关计划(182102310248).

作者简介:崔海燕(1986-),女,河南禹州人,河南师范大学硕士研究生,主要从事细胞与分子生理学研究及生理学教学工作,E-mail:moercui@163.com.

通信作者:李卫国,E-mail:liwg0618@htu.cn.

和1%青霉素-链霉素的高糖DMEM培养基,接种于25 cm²培养瓶中,并放在37℃、体积分数5% CO₂的培养箱中培养.将原装LPS粉末溶解在磷酸盐缓冲液中,配成1 g/L母液.ASP和LPS均采用基础培养基稀释成不同浓度,现配现用.

1.2.2 MTT法检测LPS和ASP对IPEC-J2细胞活力的影响

取对数生长期的IPEC-J2细胞,胰酶消化后以每孔 1×10^4 cells接种到96孔板中,每孔加100 μL细胞悬液.培养箱孵育24 h后,分别加入不同质量浓度LPS(0, 0.5, 1.0, 10.0和100.0 mg/L)和ASP(0, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0和200.0 mg/L),每组6个重复.之后向每孔中添加10 μL 噻唑蓝(MTT)溶液(5 g/L),孵育4 h.小心除去上清液,每孔中加入150 μL 二甲基亚砜(DMSO)溶解.震荡10 min充分混匀后用酶标仪检测490 nm波长和参考波长630 nm下的吸光度值.细胞存活率 = $(A_{\text{实验孔}490} - A_{\text{实验孔}630}) / (A_{\text{对照孔}490} - A_{\text{对照孔}630})$.

1.2.3 ASP对IPEC-J2细胞SOD和CAT酶活力及MDA含量的影响

取对数生长期的IPEC-J2细胞,胰酶消化后以每孔 5×10^5 cells在6孔板中培养细胞,每孔加2 mL细胞悬液.培养箱孵育24 h后,弃去旧培养基,按以下分组进行处理:空白对照组,LPS处理组,ASP处理组,ASP+LPS处理组.LPS组表示只加10.0 mg/L LPS处理12 h,ASP组表示只加100.0 mg/L ASP处理4 h,ASP+LPS组表示先用100.0 mg/L ASP处理4 h后再用10.0 mg/L LPS处理12 h,每组3个重复.处理相应时间后收集细胞,然后按照相应试剂盒的实验步骤测定各处理组SOD,CAT酶活力及MDA含量.

1.2.4 ELISA法检测细胞上清液中IL-6,IL-8,TNF-α的含量

取对数生长期的IPEC-J2细胞,用胰酶消化后以每孔 5×10^5 cells在6孔板中培养细胞,每孔加2 mL细胞悬液,培养箱孵育24 h后,弃去旧培养基,经过上述对照组,LPS组,ASP组,ASP+LPS组4个处理细胞后,分别收集细胞上清液后按照相应试剂盒说明书测定其IL-6,IL-8和TNF-α含量,之后向每孔加入1 mL Trizol裂解细胞,-80℃保存.

1.2.5 实时定量PCR检测细胞IL-6,IL-8,TNF-α和IL-10基因的相对表达量

按照Trizol试剂盒(Invitrogen,美国)法提取RNA,-80℃保存备用.采用TB GREEN反转录试剂盒(Takara,日本)生成cDNA.PCR扩增条件为95℃预变性300 s,之后95℃ 15 s,60℃ 20 s和72℃ 20 s,35个循环.所有引物均,GAPDH,F: ATGACCACAGTCCATGCCATC,R: CCTGCTTCACCACCTTCT-TG; IL-6, F: GCTCTCTGTGAGGCTGCAGTTC, R: AAGGTGTGGAATGCGTATTTATGC; IL-8, F: GACCCCAAGGAAAAGTGGGT, R: TGACCAGCACAGGAATGAGG; TNF-α, F: TTCCAGCTGGC-CCCTTGAGC, R: GAGGGCATTGGCATAACCCAC; IL-10, F: GACGTAATGCCGAAGGCAGA, R: TG-GAGCTTGCTAAAGGCACT,引物方向均为3'至5',上海生物工程技术股份服务公司合成.以GAPDH作为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析每个基因的相对表达量.

1.3 数据统计与分析

所有数据均使用SPSS 20.0一般线性模型通过单方差分析(ANOVA)进行统计分析,均用平均值±标准差表示,并使用Duncan检验进行多重比较. $P < 0.05$ 表示差异显著.

2 结 果

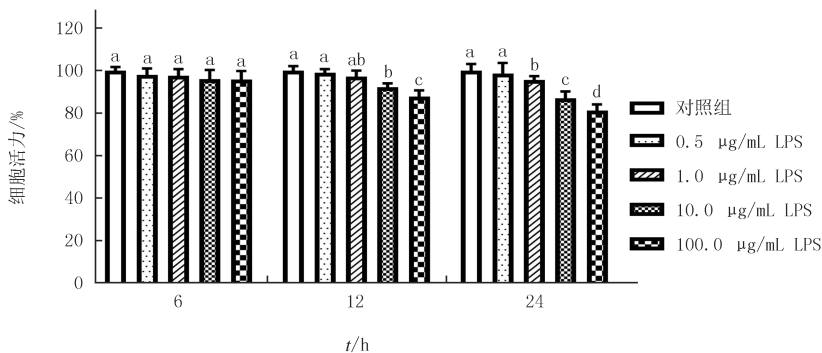
2.1 LPS对IPEC-J2细胞活力的影响

由图1可知,不同浓度的LPS作用不同时间对IPEC-J2细胞活力显示不同的抑制作用,当LPS作用6 h时,LPS对IPEC-J2细胞活力的抑制作用不显著($P > 0.05$);当LPS作用12 h时,随着LPS浓度的增加,IPEC-J2细胞活力逐渐降低,且在质量浓度为10.0 mg/L时显著降低了细胞活力($P < 0.05$).而当LPS作用24 h时,在质量浓度为1.0 mg/L时显著降低了细胞活力($P < 0.05$),但比10.0 mg/L LPS作用12 h的细胞活力略高.因此,考虑到对细胞的损伤程度,选择10.0 mg/L LPS作用12 h为后期IPEC-J2细胞的损伤模型.

2.2 ASP对IPEC-J2细胞活力的影响

如图2所示,当ASP作用4 h时,随着ASP质量浓度的增大,细胞活力呈现增加趋势,且当ASP质量浓

度为100.0 mg/L时,细胞活力达到最大值,显著促进了细胞增殖($P < 0.05$).而当 ASP 作用时间为 1,2,8,12 和24 h时,随着 ASP 质量浓度的增加,对 IPEC-J2 细胞增殖作用不显著($P > 0.05$).因此,后续实验选择 ASP 的作用时间为 4 h,作用质量浓度为 50.0,100.0 和 200.0 mg/L.



注:相同小写字母代表差异不显著,不同小写字母代表差异显著.下同.

图1 不同浓度LPS作用不同时间对IPEC-J2细胞活力的影响

Fig.1 The effect of different concentrations of LPS for different time on the viability of IPEC-J2 cells

2.3 ASP 减轻 LPS 致 IPEC-J2 细胞的损伤

如图 3 所示,10.0 mg/L LPS 显著降低了细胞活力($P < 0.05$).而与 LPS 组相比,ASP 与 LPS 共作用提高了细胞活力,且在 ASP 质量浓度为 100.0 mg/L 时,显著提高了细胞活力($P < 0.05$).因此,选择 100.0 mg/L ASP 作为缓解 LPS 对细胞损伤的最佳质量浓度进行后续实验.

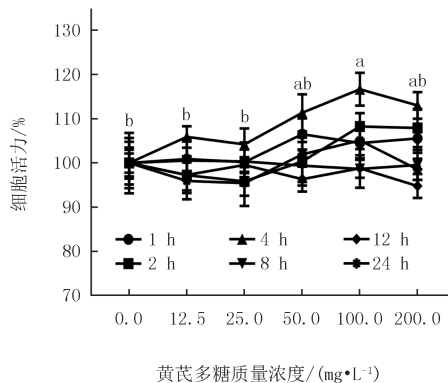


图2 ASP对IPEC-J2细胞活力的影响

Fig.2 The effect of ASP on the viability of IPEC-J2 cells

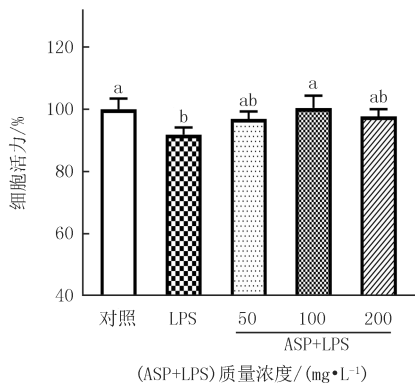


图3 ASP和LPS联合处理对IPEC-J2细胞活力的影响

Fig.3 The effect of the combination of ASP and LPS on the viability of IPEC-J2 cells

2.4 ASP 对 LPS 致 IPEC-J2 细胞内 SOD,CAT 酶活力和 MDA 含量的影响

由图 4 可知,LPS 处理组的 SOD 和 CAT 酶活力显著降低($P < 0.05$),MDA 含量显著升高($P < 0.05$),而 ASP 单独处理组对 SOD,CAT 活力及 MDA 含量无显著差异($P > 0.05$);与 LPS 组相比,ASP 组和 ASP+LPS 组均显著提高了 SOD 和 CAT 酶活力($P < 0.05$),且显著降低了 MDA 含量($P < 0.05$).

2.5 ASP 对 IPEC-J2 细胞上清液中 IL-6,IL-8 和 TNF-α 含量的影响

如图 5 所示,添加 LPS 显著增加细胞上清液中 IL-6,IL-8 和 TNF-α 的含量($P < 0.05$),单独添加 ASP 显著降低了 TNF-α 的含量($P < 0.05$),但对上清液中 IL-6 和 IL-8 的含量影响不显著($P > 0.05$).与单独添加 LPS 组相比,ASP 组和 ASP+LPS 组均可以显著降低细胞上清液中 IL-6,IL-8 和 TNF-α 的含量($P < 0.05$).

2.6 ASP 对 LPS 致 IPEC-J2 细胞炎症相关基因表达的影响

如图 6 所示,添加 LPS 显著上调 IL-6、IL-8 和 TNF-α 基因的相对表达量($P < 0.05$),显著下调了 IL-10 基因.单独添加 ASP 显著下调 IL-6 基因的表达量($P < 0.05$),对 IL-8 和 TNF-α 基因的表达量无显著差异

($P > 0.05$). 与 LPS 组相比, ASP 组和 ASP+LPS 组显著下调了 IL-6, IL-8 和 TNF- α 基因 ($P < 0.05$), 显著上调了 IL-10 基因 ($P < 0.05$).

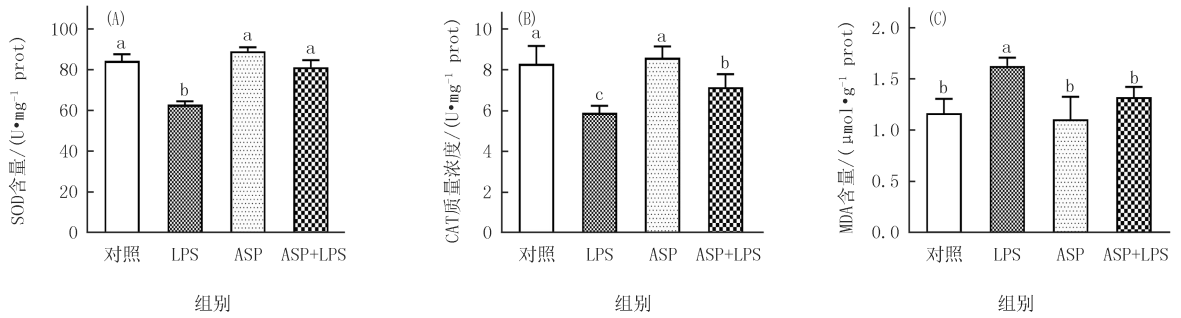


图4 各处理组对细胞内SOD, CAT酶活力和MDA含量的影响

Fig. 4 The effect of each treatment on SOD, CAT enzyme activity and MDA content

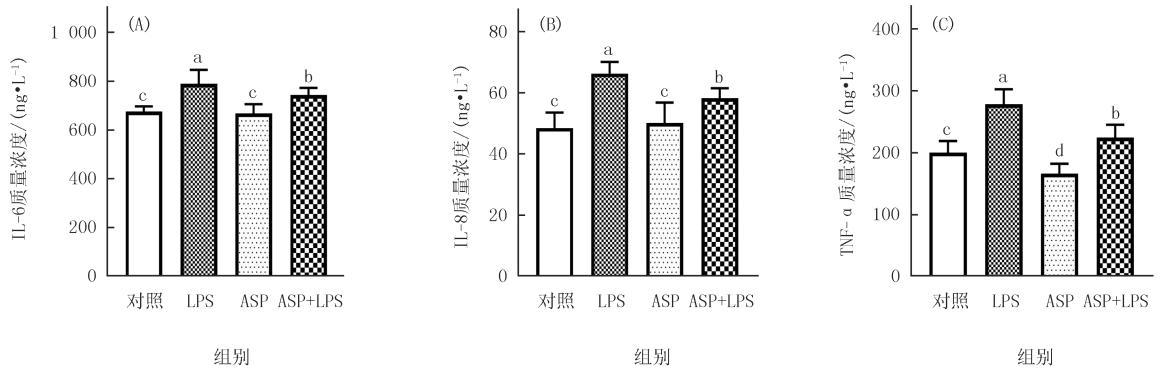


图5 各处理组对细胞上清液中IL-6, IL-8和TNF- α 质量浓度的影响

Fig. 5 Effects of different treatment groups on IL-6, IL-8 and TNF- α content in cell supernatant

3 讨论

黄芪是一味历史悠久、最为常用的中药之一,味甘、性温,有补气固表、利尿之功效.ASP是黄芪的主要生物活性成分,临床研究表明其具有增强机体免疫功能、降血糖、抗应激、抗肿瘤、抗氧化等多种功效^[4].研究发现 ASP 对 LPS 诱导的内皮祖细胞功能损伤具有保护修复作用^[5],腹腔注射 LPS 会造成肉仔鸡的炎症反应,肌肉注射 ASP 可以缓解其引发的炎症损伤,进而提高饲料效率^[6-7].由此可见, LPS 可以诱导机体发生炎症反应,而 ASP 则具有抗炎作用,然而 ASP 对缓解 LPS 诱导猪肠道氧化应激和炎症作用机制尚不清楚.本研究发现随着 LPS 浓度的增大及作用时间的延长对细胞活力的影响越大,且 10.0 mg/L LPS 刺激 IPEC-J2 细胞 12 h 能使细胞活力显著降低,这与 ZHAO 等^[8]的研究结果一致.而 ASP 在作用 4 h 时即可促进 IPEC-J2 细胞的增殖,且用 100.0 mg/L ASP 预孵育细胞 4 h 后可显著提高细胞活力.由此推断 ASP 可能在参与细胞内免疫调节的受损细胞修复中发挥了关键作用.LPS 可刺激细胞产生大量活性氧自由基,从而引发一系列氧化应激和炎症等反应^[9].本研究中, LPS 诱导的 IPEC-J2 细胞中 SOD 和 CAT 活性显著降低,MDA 含量显著升高;而细胞经过 ASP 预处理后显著提高了抗氧化酶活力以及降低了 MDA 含量.这表明 LPS 诱导细胞发生氧化应激反应,且经 ASP 预处理后显著缓解了 LPS 引发的氧化应激反应. TNF- α , IL-6 和 IL-1 β 在肠道中表达上调,与炎症的严重程度相关,且 TNF- α 的过度表达会导致上皮屏障的损伤、上皮细胞凋亡的增加和趋化因子的分泌^[10].研究发现, ASP 通过影响 THP-1 源巨噬细胞 IL-12, IL-10, TNF- α 基因及蛋白的表达水平,从而起到调节细胞免疫功能,抑制肿瘤生长的作用.本研究发现 LPS 可诱导 IPEC-J2 细胞上清液中 IL-6, IL-8, TNF- α 的含量和其 mRNA 水平升高以及 IL-10 mRNA 水平的降低,可见, LPS 可引起猪肠道

上皮细胞的炎症细胞因子表达升高,引起炎症反应,该结果与文献报道结果一致^[11].而当 ASP 预处理 4 h 后可以显著降低促炎因子的表达和提高抗炎因子的表达.此外,LI 等^[12]也发现 ASP 能有效抑制 LPS 诱导 Caco 2 细胞的炎症反应.表明 ASP 能够有效抑制 LPS 诱导的炎症反应,可通过抑制 LPS 刺激引起的炎症因子释放,达到对肠道上皮细胞炎症损伤的保护作用.

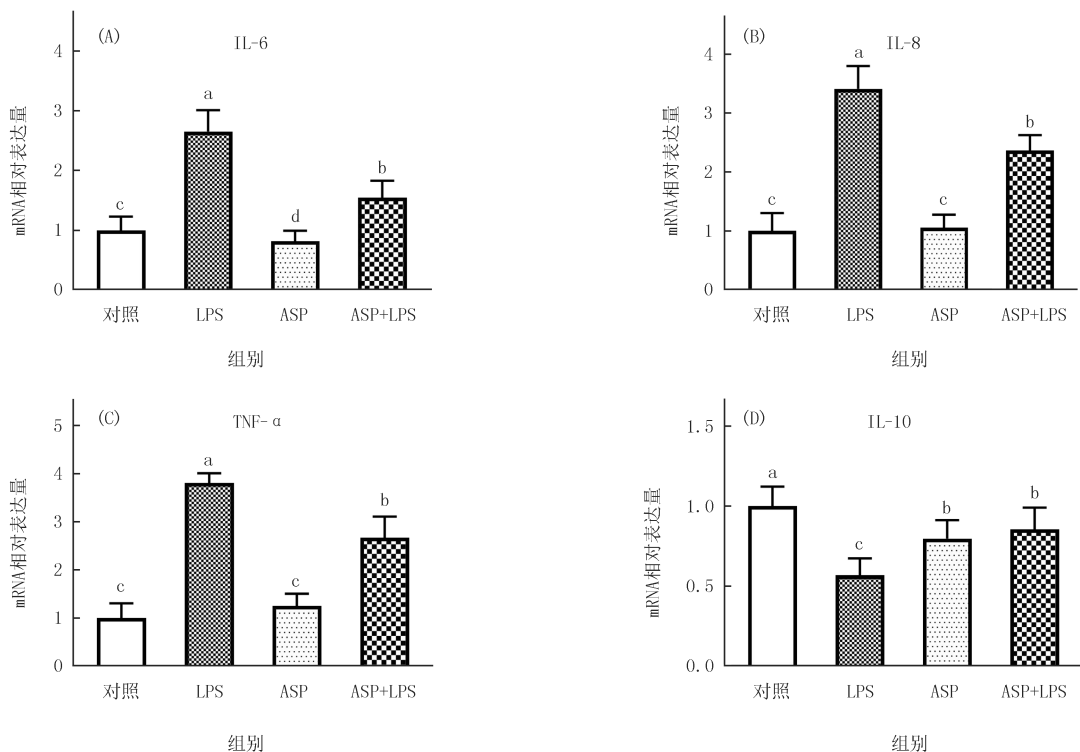


图6 ASP对LPS诱导IPEC-J2细胞IL-6, IL-8, IL-10和TNF- α 基因的相对表达量的影响

Fig. 6 Effects of ASP on mRNA expression levels of IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in LPS-induced IPEC-J2 cells

综上,10.0 mg/L LPS 作用 12 h 可诱导 IPEC-J2 细胞发生氧化应激和炎症反应,而 ASP 处理可显著促进细胞增殖,减少 LPS 对细胞的损伤,显著升高细胞内 SOD 和 CAT 酶活力及降低 MDA 含量,并下调细胞上清液中 IL-6,IL-8, TNF- α 的含量和三者基因的表达,上调 IL-10 基因的表达,从而达到抗炎作用.

参 考 文 献

- [1] ERI R D, ADAMS R J, TRAN T V, et al. An intestinal epithelial defect conferring ER stress results in inflammation involving both innate and adaptive immunity[J]. *Mucosal Immunol*, 2011, 4(3): 354-364.
- [2] SONG Z H, TONG G, XIAO K, et al. L-cysteine protects intestinal integrity, attenuates intestinal inflammation and oxidant stress, and modulates NF- κ B and Nrf2 pathways in weaned piglets after LPS challenge[J]. *Innate Immun*, 2016, 22(3): 152-161.
- [3] 胡碧君. 黄芪多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. *中国药业*, 2018, 27(24): 11-14.
HU B J. Study on optimization of extraction process of astragalus polysaccharides and its antioxidant activity[J]. *China Pharm*, 2018, 27(24): 11-14.
- [4] ZHAO D L, ZHANG J L, XU G Q, et al. Artesunate protects LPS-induced acute lung injury by inhibiting TLR4 expression and inducing Nrf2 activation[J]. *Inflammation*, 2017, 40(3): 798-805.
- [5] 张婧, 万晓青, 苏慧丽, 等. 黄芪多糖修复 LPS 诱导的内皮祖细胞功能损伤机制的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 40(4): 446-452.
ZHANG J, WAN X Q, SU H L, et al. Effect of astragalus polysaccharides on LPS-induced EPCs functional damage[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2019, 40(4): 446-452.
- [6] WANG X, SHEN J, LI S, et al. Sulfated Astragalus polysaccharide regulates the inflammatory reaction in LPS-infected broiler chicks[J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 69: 146-150.
- [7] 贾申宗, 林梦君, 卢荣华, 等. 黑水虻油替代豆油对淇河鲫鱼生长性能、血清生化指标和肠道消化酶活力的影响[J]. *河南师范大学学报(自然*

科学版),2022,50(2):129-135.

JIA S Z, LIN M J, LU R H, et al. Effect of replacing soybean oil with black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae oil on the growth performance, serum Biochemical index and intestinal digestive enzyme of Qihe crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. *Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition)*, 2022, 50(2): 129-135.

- [8] ZHAO L, LI M, SUN K, et al. Hippophae rhamnoides polysaccharides protect IPEC-J2 cells from LPS-induced inflammation, apoptosis and barrier dysfunction in vitro via inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 155: 1202-1215.
- [9] MA Y, TANG T, SHENG L, et al. Aloin suppresses lipopolysaccharide induced inflammation by inhibiting JAK1/STAT1/3 activation and ROS production in RAW264.7 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(4): 1925-1934.
- [10] YANG M, LIN H B, GONG S, et al. Effect of Astragalus polysaccharides on expression of TNF- α , IL-1 β and NFATc4 in a rat model of experimental colitis [J]. *Cytokine*, 2014, 70(2): 81-86.
- [11] PASZTI-GERE E, MATIS G, FARKAS O, et al. The effects of intestinal LPS exposure on inflammatory responses in a porcine enterohepatic co-culture system [J]. *Inflammation*, 2014, 37(1): 247-260.
- [12] LI Y, XU Y, PAN C, et al. TRIF is essential for the anti-inflammatory effects of astragalus polysaccharides on LPS-infected Caco2 cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 159: 832-838.

Astragalus polysaccharides alleviate lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammation in IPEC-J2 cells

Cui Haiyan, Ji Longxiang, Zhu Yuqing, Li Weiguo

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: To investigate the effect of astragalus polysaccharides on lipopolysaccharide induced inflammation of IPEC-J2 cells. IPEC-J2 cells were divided into control group, LPS treatment group, ASP treatment group and ASP+LPS treatment group. The cell viability, antioxidant index, inflammatory factors contents and mRNA expression levels of the four groups were detected, respectively. Results showed that cell viability was significantly decreased after the treatment of 10 mg/L LPS for 12 h, when cells were pretreated with 100 mg/L ASP for 4 h, the cell viability was significantly increased. In addition, compared with the control group, the MDA content increased significantly and the SOD and CAT enzyme activities, and the content of IL-6 increased significantly, IL-8 and TNF- α , and un-regulated the mRNA expression of IL-6, IL-8 and TNF- α while down-regulated the mRNA expression of IL-10 significantly. However, MDA, IL-6, IL-8 and TNF- α contents and the mRNA expressions of IL-6, IL-8, TNF- α were significantly reduced and the SOD and CAT activities together with the mRNA expression of IL-10 were significantly increased after the pretreated of ASP for 4 h. Therefore, ASP could alleviate the oxidative stress and inflammatory response caused by LPS, inhibit the contents of IL-6, IL-8 and TNF- α and expression levels of these genes, and promote the expression of IL-10, thereby exerting antioxidant and anti-inflammatory effects.

Keywords: astragalus polysaccharides; IPEC-J2 cells; lipopolysaccharide; oxidative stress; inflammation

[责任编辑 刘洋 杨浦]