

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2017.10.001

· 论 著 ·

BBI 抑制 LPS 诱导的肠道上皮细胞炎症因子的表达

古 俊, 郭 乐, 刘金彪, 霍文哲

(武汉大学基础医学院, 湖北 武汉 430071)

[摘 要] **目的** 探讨大豆来源的胰蛋白酶抑制剂(BBI)对 LPS 诱导的肠道上皮细胞炎症因子表达的抑制作用及其机制。**方法** 用 MTT 法检测 LPS 和 BBI 对肠道上皮细胞的毒性作用。先用 BBI 预处理肠道上皮细胞,再用 LPS 刺激,采用实时荧光定量 PCR 检测细胞内炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 和 MCP-1)的表达,通过 NF- κ B-luc 荧光素酶质粒和蛋白质印迹法(Western Blot)检测 NF- κ B 的活性。**结果** LPS 最大浓度(10 000 ng/mL)和 BBI 最大浓度(1 000 μ g/mL)对细胞均无毒性作用。LPS 处理可显著地上调肠道上皮细胞炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 和 MCP-1)的表达,其上调作用和 LPS 的浓度成正相关;LPS 处理肠道上皮细胞 3 h 后炎症因子表达最高,随时间延长有所下降;LPS 对肠道上皮细胞炎症因子的上调作用具有剂量和时间效应;BBI 预处理肠道上皮细胞 6 h 时,BBI 对 LPS 诱导肠道上皮细胞炎症因子表达的抑制作用最明显,且具有剂量效应。**结论** 通过对肠道上皮细胞内 NF- κ B 的抑制,BBI 能够显著地抑制 LPS 诱导炎症因子的表达。

[关 键 词] 胰蛋白酶抑制剂; BBI; 肠道上皮细胞; 炎症反应; NF- κ B

[中图分类号] R574 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2017)10-0893-06

BBI inhibits LPS-induced expression of inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells

GU Jun, GUO Le, LIU Jin-biao, HUO Wen-zhe (School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effect and mechanism of soybean-derived Bowman-Birk inhibitor (BBI) on LPS-induced expression of inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells. **Methods** Cytotoxicity effect of LPS and BBI on intestinal epithelial cells was analyzed by MTT assay. Intestinal epithelial cells were pretreated with BBI, followed by LPS stimulation, expression of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-8, and MCP-1) was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction; the activation of NF- κ B was measured by pNF- κ B-luc system and Western Blot. **Results** The maximum concentration of LPS (10 000 ng/mL) and BBI (1 000 μ g/mL) had no cytotoxicity effect on intestinal epithelial cells. LPS could potently up-regulate the expression of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-8, and MCP-1), the up-regulation was positively correlated to the concentration of LPS; LPS-induced expression of inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells could achieve the highest level, then decreased over time. The up-regulation of LPS on inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells had dose-time effect; when intestinal epithelial cells were pretreated by BBI for 6 hours, the inhibitory effect of BBI on LPS-induced expression of inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells was most obvious, and had dose-time effect. **Conclusion** BBI can potently inhibit LPS-induced expression of inflammatory cytokines through inhibiting NF- κ B in intestinal epithelial cells.

[Key words] Bowman-Birk inhibitor; BBI; intestinal epithelial cell; inflammation; NF- κ B

[Chin J Infect Control, 2017, 16(10): 893-898]

[收稿日期] 2017-07-13

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 81271334, No. 81571962); 国家传染病防治重大科技专项(No. 2012ZX10004501-001-004)

[作者简介] 古俊(1992-), 男(汉族), 湖北省襄阳市人, 硕士, 主要从事天然免疫抗 HIV 研究。

[通信作者] 霍文哲 E-mail: wenzheho@whu.edu.cn

慢性系统性炎症及免疫激活是促进人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)感染和艾滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)进展的主要因素之一。由于肠道中存在大量被细菌及其产物激活的 $CD4^+$ T 细胞—HIV-1 感染的主要靶细胞,肠道系统成为病毒进入机体后的首要和主要场所^[1]。由于受到 HIV-1 的攻击,肠道内大量的 $CD4^+$ T 细胞死亡,防御力降低,菌群失调,细菌及其产物如内毒素(LPS)大量增加^[2-3]。上述变化引起肠道炎症,肠壁黏膜通透性增加,细菌及其产物 LPS 易位(Microbial translocation),进入血液循环^[4]。LPS 能刺激单核巨噬细胞产生和释放包括 TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 和 MCP-1 在内的炎性因子,造成全身性炎症和免疫激活(systemic inflammation and immune activation)^[5-6]。因此,机体内更多 $CD4^+$ T 细胞被激活,成为 HIV-1 的靶细胞,病毒得以大量繁殖, $CD4^+$ T 细胞被逐渐消耗,疾病进程加速^[7]。尽管抗逆转录病毒治疗(antiretroviral therapy, ART)能显著地抑制感染者体内 HIV-1 的复制,降低发病率和病死率,但患者体内的慢性炎症和免疫激活依然存在^[8],是导致 HIV-1 在感染者体内持续存在, $CD4^+$ T 细胞不断丢失的主要原因^[9]。因此,干预 HIV-1 感染造成的肠道炎症及免疫激活是目前 AIDS 研究的重点。

胰蛋白酶抑制剂(soybean-derived Bowman-Birk inhibitor, BBI)是大豆中富含的一类具有耐酸性的胰蛋白酶抑制剂,存在于豆奶等许多豆制品中,具有较好的抗炎功效^[10]。口服 BBI 即显示出良好的免疫调节作用,对自身免疫性疾病有较好的潜在治疗效果^[11]。我们的前期工作显示,BBI 能显著地激活巨噬细胞内抗病毒天然免疫,从而抑制 HIV-1 的感染和复制^[12]。本研究以抑制细菌内毒素 LPS 造成的肠道上皮细胞炎症为目的,选择既有抗炎作用又能抑制 HIV-1 的天然产物 BBI,研究 BBI 是否能抑制 LPS 诱导的肠道上皮细胞炎性因子的表达,并探讨相关机制。

1 材料与方法

1.1 试剂 LPS 购于美国 InvivoGen 公司,其效价为 10^6 EU/mg(endotoxin unit/mg),用无内毒素的水溶解 LPS($10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$),保存于 -80°C ;BBI 购于美国

Sigma-Aldrich 公司,其纯度 $>90\%$,用高压灭菌双蒸水溶解 BBI($10 \text{ mg}/\text{mL}$),保存于 -80°C ;TRI-reagent 购于美国 Sigma-Aldrich 公司;SsoAdvanced™ Universal Inhibitor-Tolerant SYBR®Green Supermix 购于美国 BIO RAD 公司;3-(4, 5-二甲基噻唑-2) 2, 5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, 噻唑蓝, MTT]购于上海生物工程有限公司,用 PBS 溶解 MTT($5 \text{ mg}/\text{mL}$),保存于 -20°C 。

1.2 毒性实验 用 MTT 法检测 LPS 和 BBI 对肠道上皮细胞(HT-29 细胞,人直肠癌细胞系)的毒性作用。在 96 孔细胞培养板(Corning, USA)中按 10^4 个/孔培养肠道上皮细胞,12 h 后用不同浓度的 LPS (0, 0.1, 1, 10, 100, 1 000, 10 000 ng/mL)或 BBI(0, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理细胞 72 h。按体积比 1 : 10 混合 MTT 溶液和 DMEM(Gibco, USA)培养基,每孔加入 $100 \mu\text{L}$,4 h 后弃上清,加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO,700 r/min 震荡 10 min,用全自动多功能酶标仪(在波长 490 nm 处)检测吸光度值。

1.3 细胞培养 用 DMEM 完全培养基[含 10% 胎牛血清(Gibco, USA)、1%青-链霉素双抗、和 1%谷氨酰胺]培养肠道上皮细胞,置于 37°C 5% CO_2 细胞培养箱中培养。在 48 孔细胞培养板(Corning, USA)中按 10^5 个/孔培养肠道上皮细胞 24 h 后,用 LPS($10 \text{ ng}/\text{mL}$)处理细胞 0、3、6、12 或 24 h,此外用不同浓度的 LPS(0, 0.1, 1, 10 ng/mL)处理细胞 3 h。在 BBI 抑制实验中,先用 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ BBI 处理细胞不同时间(0、1、3、6、12 h),或不同浓度 BBI (25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)预处理细胞 6 h,再用 LPS ($10 \text{ ng}/\text{mL}$)处理细胞 3 h。

1.4 逆转录和实时定量 PCR 检测炎性因子 mRNA 用 Tri-reagent 提取细胞总 RNA,并用 NAN-ODROP 2000 超微量分光光度计(Thermo Scientific)检测 RNA 浓度。根据厂家(Promega 公司)说明书方法,用 AMV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂和随机引物对 RNA 进行逆转录。逆转录反应条件为 37°C 1 h,然后 95°C 5 min 终止反应,反应产物 4°C 保存。实时荧光定量 PCR 用 SYBR Green Supermix(Bio-Rad 公司)试剂盒,反应条件为 95°C 1 min, 95°C 5 s \rightarrow 60°C 10 s, 40 个循环。所使用的引物见表 1。Ct 值相对 GAPDH 进行均一化,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 的表达水平。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time PCR

基因名称	正向引物	反向引物
GAPDH	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA	GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT
TNF-α	TGTAGCCCATGTTGTAGCAAACC	GAGGACCTGGGAGTAGATGAGGTA
IL-1β	CCTGTCCTGCGTGTTGAAAGA	GGGAACTGGGCAGACTCAAA
IL-8	GGCACAAACTTTCAGAGACAG	ACACAGAGCTGCAGAAATCAGG
MCP-1	CATAGCAGCCACCTTCATTCC	TCTGCACTGAGATCTTCCTATTGG

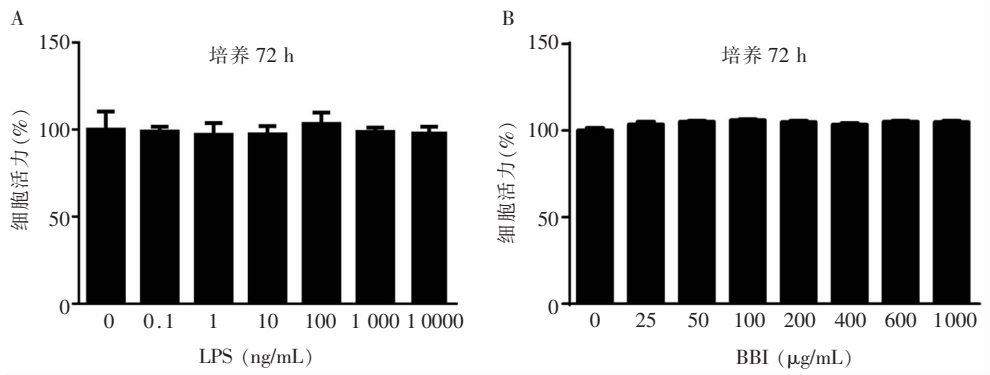
1.5 荧光素酶实验 pNF-κB-Luc 质粒含有 NF-κB 启动子,启动子下游连接荧光素酶基因。用 12 孔细胞培养板培养肠道上皮细胞(3×10^5 个/孔),待细胞长满孔底 80%后转染质粒。按照厂家说明书用 lip3000 转染试剂(InvivoGen, USA)转染质粒,转染 6 h 后用 $1 \times$ PBS 洗 2 次, BBI(25、50、100 μg/mL)预处理细胞 6 h 后,再用 LPS(10 ng/mL)处理细胞, 12 h 后用 $1 \times$ PBS 洗涤细胞 2 次,加入 100 μL 的 $1 \times$ cell lysis buffer(Promega, USA)裂解细胞。通过检测细胞中 pNF-κB-Luc 质粒表达的荧光素酶活性检测细胞中 NF-κB 的激活情况。荧光素酶活性用荧光素酶试剂盒(Promega, USA)在全自动多功能酶标仪上检测。荧光素酶活性检测结果用处理组和未处理组检测值的比值,即相对光单位表示。

1.6 蛋白质印迹法(Western Blot) 在 6 孔板中按 1×10^6 个/孔培养 HT-29 细胞,进行处理后按照说明书用 RIPA 裂解液(碧云天)提取细胞蛋白。用 10% SDS-PAGE 胶分离 20 μg 蛋白,然后转移至

PVDF 膜,用稀释后的 Phospho-NK-κB(Ser536)抗体(1 : 1000)(碧云天)4℃孵育过夜,充分洗涤后用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗孵育,再用增强型化学发光剂 ECL(碧云天)在化学发光成像仪上显影。用 Image J 图像分析软件进行分析。

2 结果

2.1 LPS 和 BBI 对肠道上皮细胞无毒性作用 用不同浓度的 LPS 或 BBI 处理肠道上皮细胞 72 h, MTT 法检测细胞活性,将未处理的细胞在波长 490 nm 处的吸光度值定为 1.0,以此计算处理细胞和未处理细胞的百分比值,重复 3 次实验,每次实验的三个复孔取均值 ± 标准差,见图 1。处理的细胞和未处理细胞的活性相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),LPS 最大浓度(10 000 ng/mL)和 BBI 最大浓度(1 000 μg/mL)对细胞均无毒性作用。



A:不同浓度 LPS 处理肠道上皮细胞 72 h;B:不同浓度 BBI 处理肠道上皮细胞 72 h

图 1 LPS 和 BBI 对肠道上皮细胞细胞的毒性作用

Figure 1 Cytotoxicity effect of LPS and BBI on intestinal epithelial cells

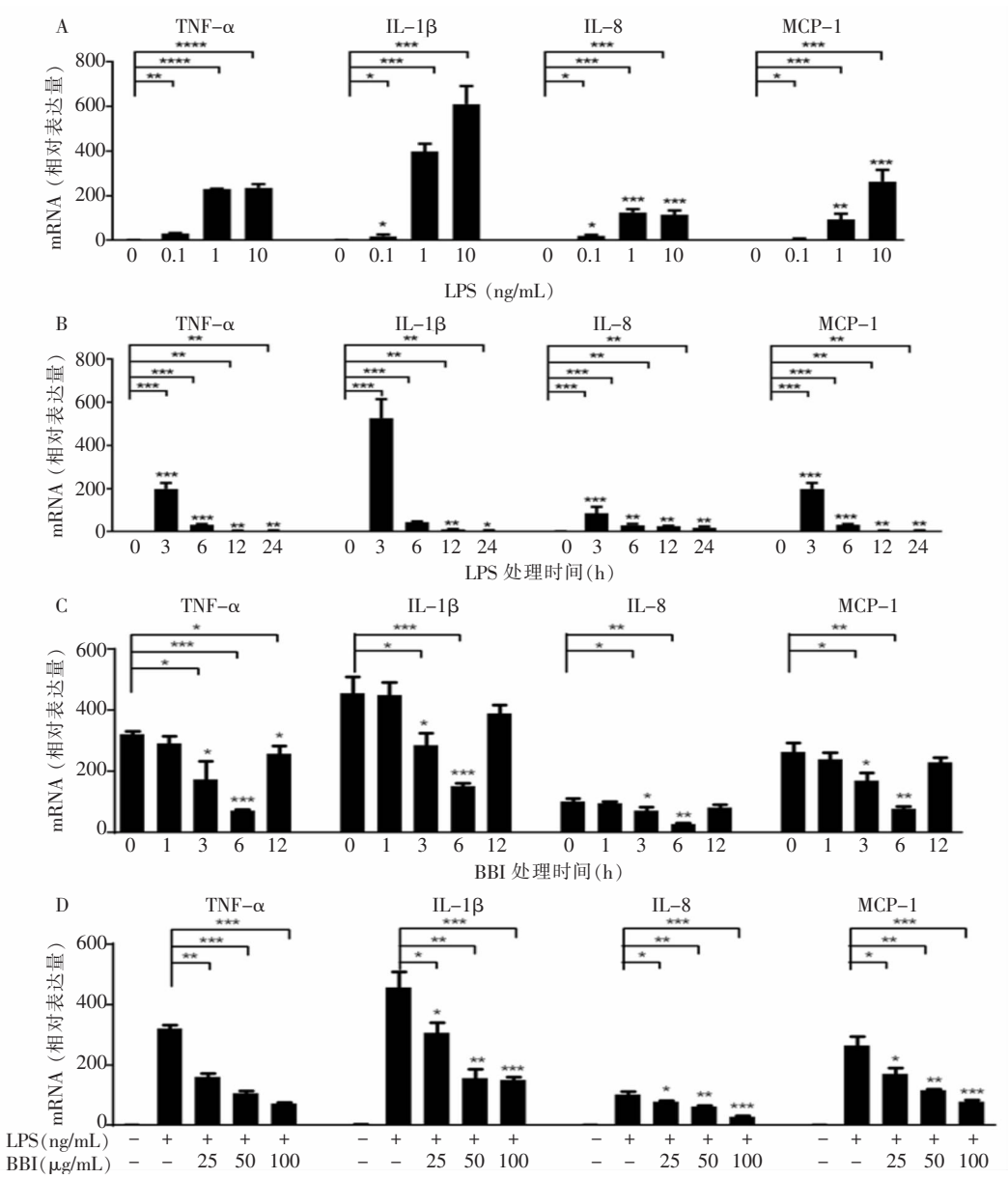
2.2 BBI 抑制 LPS 诱导的炎症因子的表达 提取细胞总 RNA,实时荧光定量 PCR 检测细胞 TNF-α、IL-1β、IL-8、MCP-1 和内参 GAPDH 的 mRNA 表达水平,数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算,重复 3 次实验,取均

值 ± 标准差。见图 2。LPS 处理可显著地上调肠道上皮细胞炎症因子(TNF-α、IL-1β、IL-8 和 MCP-1)的表达,其上调作用和 LPS 的浓度成正相关(图 2A)。LPS 处理肠道上皮细胞 3 h 后炎症因子表达

最高,随时间延长有所下降(图 2B)。LPS 对肠道上皮细胞炎性因子的上调作用具有剂量和时间效应。BBI 预处理肠道上皮细胞 6 h 时,BBI 对 LPS 诱导肠道上皮细胞炎性因子表达的抑制作用最明显,且具有剂量效应(图 2D)。

2.3 BBI 抑制 LPS 对 NF-κB 的活化 用 10 ng/mL

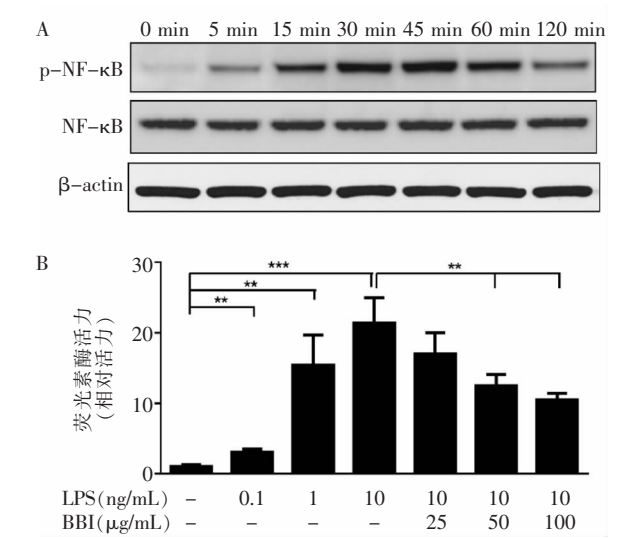
LPS 处理肠道上皮细胞,Western Blot 分别检测细胞中 p-NF-κB、总 NF-κB,以及内参 β-actin,LPS 可激活肠道上皮细胞 NF-κB,LPS 对 NF-κB 的激活在 1 h 内达到峰值(见图 3A)。NF-κB 的激活水平和 LPS 的剂量成正相关,BBI 可显著地抑制 LPS 对 NF-κB 的激活(见图 3B)。



A: 不同浓度 LPS 处理肠道上皮细胞 3 h;B:用 10 ng/mL LPS 处理肠道上皮细胞不同时间;C:先用 100 μg/mL BBI 预处理肠道上皮细胞不同时间(0、1、3、6、12 h),再用 10 ng/mL LPS 处理 3 h;D:不同浓度 BBI 预处理肠道上皮细胞 6 h,再用 10 ng/mL LPS 处理 3 h; * : $P<0.05$; * * : $P<0.01$; * * * : $P<0.001$; * * * * : $P<0.0001$

图 2 BBI 抑制 LPS 诱导肠道上皮细胞炎性因子表达

Figure 2 BBI inhibits LPS-induced expression of inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells



A: 用 10 ng/mL LPS 处理肠道上皮细胞不同时间; B: 将 pNF- κ B-luc 质粒转入肠道上皮细胞后, 按图中所示剂量 LPS 刺激 12 h, 或按图中所示 BBI 剂量预处理 6 h, 再用 10 ng/mL LPS 刺激 12 h, 检测荧光素酶活性; * : $P < 0.01$; * * : $P < 0.001$

图 3 BBI 抑制 LPS 诱导的 NF- κ B 活化
Figure 3 BBI inhibits LPS-induced NF- κ B activation

3 讨论

肠道黏膜炎症是 HIV-1 感染的主要特征之一。肠道炎症会导致肠道菌群失调, 肠壁通透性增加和微生物易位, 细菌产物如 LPS 进入血循环^[13-14]。通过结合到单核巨噬细胞表面 TLR4 和 CD14 受体, LPS 可激活细胞 NF- κ B 信号通路, 刺激细胞产生大量炎症因子^[15], 包括 TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 和 MCP-1, 这些炎症因子被释放到血循环中^[16]。持续性的炎症反应会导致肠道黏膜组织、免疫结构以及天然屏障破坏, 进一步促使肠道微生物易位^[17], 形成恶性循环。除免疫细胞外, 肠道内非免疫细胞也可产生炎症因子^[18-19]。本组数据显示, LPS 可诱导肠道上皮细胞产生大量的炎症因子, LPS 诱导炎症具有剂量和时间效应。与我们先前研究 LPS 诱导脑微血管内皮细胞炎症因子表达结果一致, 炎症因子表达随着时间逐渐降低^[20], 可能是由于 LPS 随时间效应降低, 以及 mRNA 翻译完成后发生降解导致的。LPS 通过 NF- κ B 通路诱导炎症因子的表达, 且 LPS 的促炎作用急促, 在 15 min 时便能显著激活肠道上皮细胞 NF- κ B。BBI 预处理能有效地抑制细胞内 NF- κ B 的激活以及炎症因子的表达。我们推断 BBI 通过抑制 LPS 对 NF- κ B 的激活, 从而抑制 LPS 诱

导的肠道上皮细胞炎症因子表达。

本研究发现, LPS 能明显地激活肠道上皮细胞内 NF- κ B, 上调肠道上皮细胞表达 TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 和 MCP-1, 此种激活和上调具有剂量和时间效应。天然制剂大豆来源的胰蛋白酶抑制剂 BBI 能抑制 LPS 诱导的肠道上皮细胞 NF- κ B 的激活, 以及炎症因子的表达。高浓度 BBI (1 000 μ g/mL) 对肠道上皮细胞无毒性作用, 而低浓度 BBI (25 μ g/mL) 预处理肠道上皮细胞可显著抑制 LPS 诱导的炎症因子的表达, BBI 对 LPS 的抑制作用具有剂量效应。上述结果为 BBI 抑制 LPS 诱导肠道上皮细胞炎症反应机制提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4(+) T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract [J]. J Exp Med, 2004, 200(6): 761-770.
- [2] Sankaran S, George MD, Reay E, et al. Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration[J]. J Virol, 2008, 82(1): 538-545.
- [3] Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, et al. CD4(+) T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract[J]. J Exp Med, 2004, 200(6): 749-759.
- [4] Shan L, Siliciano RF. Unraveling the relationship between microbial translocation and systemic immune activation in HIV infection[J]. J Clin Invest, 2014, 124(6): 2368-2371.
- [5] Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection[J]. Nat Med, 2006, 12(12): 1365-1371.
- [6] Somsouk M, Estes JD, Deleage C, et al. Gut epithelial barrier and systemic inflammation during chronic HIV infection[J]. AIDS, 2015, 29(1): 43-51.
- [7] Zevin AS, McKinnon L, Burgener A, et al. Microbial translocation and microbiome dysbiosis in HIV-associated immune activation[J]. Curr Opin HIV AIDS, 2016, 11(2): 182-190.
- [8] Harezlak J, Buchthal S, Taylor M, et al. Persistence of HIV-associated cognitive impairment, inflammation, and neuronal injury in era of highly active antiretroviral treatment [J]. AIDS, 2011, 25(5): 625-633.
- [9] Neuhaus J, Jacobs JR, Baker JA, et al. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection[J]. J Infect Dis, 2010, 201(12): 1788-1795.
- [10] Safavi F, Rostami A. Role of serine proteases in inflamma-

- tion: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases[J]. *Exp Mol Pathol*, 2012, 93(3): 428–433.
- [11] Safavi F, Li ZC, Wang LM, et al. Bowman-birk protease inhibitor suppresses GM-CSF, Th17 cells and CNS autoimmune inflammatory demyelination[J]. *J Immunol*, 2016, 1(1): 196–201.
- [12] Ma TC, Zhou RH, Wang X, et al. Soybean-derived Bowman-Birk inhibitor (BBI) inhibits HIV replication in macrophages[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34752.
- [13] Gaulke GA, Porter M, Han YH, et al. intestinal epithelial barrier disruption through altered mucosal microRNA expression in human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus infections[J]. *J Virol*, 2014, 88(11): 6268–6280.
- [14] Gordon MA, Walsh AL, Chaponda M, et al. Bacteraemia and mortality among adult medical admissions in Malawi-Predominance of non-typhi *Salmonellae* and *Streptococcus pneumoniae* [J]. *J Infect*, 2001, 42(1): 44–49.
- [15] Kagan JC. Immunology. Sensing endotoxins from within[J]. *Science*, 2013, 341(6151): 1184–1185.
- [16] Redd AD, Dabirao J, Bream JH, et al. Microbial translocation, the innate cytokine response, and HIV-1 disease progression in Africa[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(16): 6718–6723.
- [17] Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences[J]. *J Pathol*, 2008, 214(2): 231–241.
- [18] Fiocchi C. Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions[J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(4 Pt 1): G769–G775.
- [19] Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognitions shapes intestinal function [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(2): 131–144.
- [20] Li J, Ye L, Wang X, et al. (–)-Epigallocatechin gallate inhibits endotoxin-induced expression of inflammatory cytokines in human cerebral microvascular endothelial cells[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 161.

(本文编辑:左双燕)