

牛蒡子苷减轻脂多糖诱导人鼻咽上皮细胞炎症损伤的作用[△]

聂发龙*,赵显芳,朱紫陌,江自鲜,代蓉,李秀芳*(云南中医药大学中药学院,昆明 650500)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)12-1436-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.12.05



摘要 目的 探讨牛蒡子苷(ARC)减轻脂多糖(LPS)诱导的人鼻咽上皮细胞NP-69炎症损伤的作用。方法 采用MTS法测定0.000 1、0.001、0.01、0.1、1.0、10 μmol/L ARC作用24 h对NP-69细胞增殖的影响。采用划痕实验分别检测经0.01、0.1、1.0 μmol/L ARC作用24 h和经0.01、0.1、1.0 μmol/L ARC预处理24 h+1.0 μg/mL LPS刺激24 h后NP-69细胞的迁移情况。以LPS刺激建立NP-69细胞炎症损伤模型,检测上清液中一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素6(IL-6)、IL-1β水平以及细胞中脂质紧密连接蛋白1(ZO-1)、β-防御素3(BD3)、Janus激酶1(JAK1)、信号转导及转录活化因子3(STAT3)mRNA和蛋白的相对表达量。结果 与正常组比较,0.000 1、0.001、0.01、0.1、1.0、10 μmol/L ARC作用24 h对NP-69细胞增殖均无影响($P>0.05$)。0.1、1.0 μmol/L ARC均可显著提高细胞的迁移率($P<0.05$)。对LPS刺激NP-69细胞造成的炎症损伤,ARC(1.0 μmol/L)能显著减少NO、TNF-α、IL-6的释放($P<0.05$),同时能显著上调ZO-1、BD3 mRNA和蛋白的表达并下调STAT3 mRNA和蛋白的表达($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论 ARC具有明显减轻LPS致NP-69细胞炎症损伤的作用,并可增强炎症环境下鼻黏膜上皮屏障的物理及免疫防御功能;上述作用可能与抑制IL-6/JAK1/STAT3信号通路相关。

关键词 牛蒡子苷;脂多糖;NP-69细胞;炎症反应;鼻黏膜上皮屏障

Effects of arctiin relieving inflammatory injury of human nasopharyngeal epithelial cells induced by lipopolysaccharide

NIE Falong, ZHAO Xianfang, ZHU Zimo, JIANG Zixian, DAI Rong, LI Xiufang (College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effect of arctiin (ARC) relieving lipopolysaccharide (LPS) induced inflammatory injury of human nasopharyngeal epithelial cells NP-69. **METHODS** The effects of 24 h treatment of 0.000 1, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10 μmol/L ARC on the proliferation of NP-69 were determined by MTS method. After 0.01, 0.1, and 1.0 μmol/L ARC was applied to NP-69 for 24 h and NP-69 was pre-treated with 0.01, 0.1 and 1.0 μmol/L ARC for 24 h, and then stimulated with 1.0 μg/mL LPS for 24 h, scratch tests were used to detect cell migration in both experiments. LPS stimulated NP-69 to establish an inflammation injury model. The levels of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor α (TNF-α) interleukin-6 (IL-6), and IL-1β in cell supernatants were detected, and mRNA and protein expression of zonula occludens protein 1 (ZO-1), β-defensin 3 (BD3), Janus kinase 1 (JAK1), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in cell supernatant were also detected. **RESULTS** Compared with normal group, 0.000 1, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10 μmol/L ARC had no effect on the proliferation of NP-69 after 24 h treatment ($P>0.05$). ARC (0.1, 1.0 μmol/L) could significantly promote the rate of cell migration ($P<0.05$). For the inflammatory injure of NP-69 cells stimulated by LPS, ARC (1.0 μmol/L) could significantly reduce the release of NO, TNF-α and IL-6 ($P<0.05$), significantly increased mRNA and protein expression of ZO-1 and BD3 but decreased mRNA and protein expression of STAT3 ($P<0.01$ or $P<0.05$). **CONCLUSIONS** ARC has the effect of reducing the inflammatory injury of NP-69 cells induced by LPS, promoting the physical and immune defense ability of the nasal mucosa epithelial barrier under inflammatory environment. The mechanism of action may be related to inhibiting IL-6/JAK1/STAT3 signaling pathway.

KEYWORDS arctiin; lipopolysaccharide; NP-69; inflammation; nasopharyngeal epithelial barrier

上呼吸道感染(upper respiratory tract infection, URTI)是鼻、咽、喉急性炎症的总称,是危害人类健康的常见疾病之一,且大多由病毒和细菌感染所致^[1-2]。作

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81860724);云南省科技厅科技计划项目[No.202001AZ070001-001、No.2019FF002(-054)]

* 硕士研究生。研究方向:中药药理与应用。E-mail:1169716958@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药药理与应用。E-mail:sofinelxf@163.com

为与外界直接相连的器官,鼻咽上皮细胞在呼吸时会暴露于空气当中,容易受到病毒、细菌、真菌等病原微生物攻击,作为机体防御URT I的首道屏障,鼻咽上皮细胞对维持上呼吸道的稳定具有重要作用^[3]。病原微生物致感染或炎症信号增强等多种因素的作用会导致鼻黏膜上皮细胞受到损伤并发生功能紊乱,进而易使外界病原体或机会致病菌进入黏膜,最终引发URT I^[4]。牛蒡子为菊科植物牛蒡 *Arctium lappa* L.的干燥成熟果实,是中医临

床治疗 URTI 的常用药材,牛蒡子苷(arctiin, ARC, 化学结构式见图 1) 是其活性成分之一^[9]。研究发现, ARC 具有抗炎、抗病毒、保护肝脏、改善内皮细胞损伤的作用^[6-9]。基于 ARC 在抗炎和保护细胞方面均具有较好的作用,考虑到上皮细胞是先天免疫和炎症反应的重要参与者之一^[10],本课题组推测 ARC 可能具有改善鼻黏膜上皮细胞炎症损伤的作用。因此,本研究采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激人鼻咽上皮细胞 NP-69 复制炎症损伤模型,从抗炎、促进受损上皮细胞迁移等方面探讨 ARC 对人鼻咽上皮细胞炎症损伤的改善作用,旨在为后续深入研究 ARC 在增强鼻黏膜上皮屏障中的作用奠定基础。

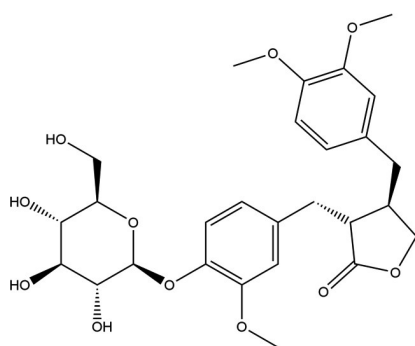


图 1 ARC 的化学结构式

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括 Infinite M200 Pro 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司)、311 型二氧化碳(CO₂)细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、Ti-S 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司)、Mx3005P 型实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, q-PCR)仪(美国 Agilent 公司)、Bio Spectrum 型凝胶成像系统(美国 Spectrum 公司)、SN310C 型高压蒸汽灭菌器(日本 Yamato 公司)、XS125A 型分析天平(瑞士 Precisa 公司)、CF16RX 型低温高速离心机(日本 Hitachi 公司)、UPH-III-20T 型超纯水系统(四川优普超纯科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

ARC 对照品(批号 LE207100, 纯度 98%)购自北京百灵威科技有限公司;LPS(批号 O19M4009V)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;RPMI 1640 培养基(批号 2103012)购自美国 Bimake 公司;青链霉素双抗(批号 1744939)购自美国 Gibco 公司;BCA 蛋白浓度检测试剂盒(批号 P0010)购自上海碧云天生物技术有限公司;MTS 细胞增殖试剂盒(批号 0000408248)购自美国 Promega 公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒(批号 20210727)购自北京索莱宝科技有限公司;人肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent

assay, ELISA)试剂盒[批号分别为 20210105(H052-1-2)、20210105(H007-1-2)、20210105(H002-1-2)]均购自南京建成生物工程研究所;TRIZOL 试剂、RNA 逆转录试剂盒、胎牛血清(批号分别为 15596-018、k1622、1601001)均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;鼠源胞质紧密连接蛋白 1(zonula occludens protein 1, ZO-1)单克隆抗体、鼠源信号转导及转录活化因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)单克隆抗体、鼠源 Janus 激酶 1(Janus kinase 1, JAK1)单克隆抗体、鼠源 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 G 二抗、灵敏 ECL 化学发光增强试剂盒(批号分别为 21773-1-AP、10003218、10004856、20536-1-AP、SA00001-1、B500023)均购自美国 Proteintech 公司;鼠源 β -防御素 3(β -defensins 3, BD3)多克隆抗体(批号 GR3207641-3)购自英国 Abcam 公司;q-PCR 检测试剂盒(批号 31598800)购自瑞士 Roche 公司;其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 细胞

人鼻咽上皮细胞株 NP-69(货号 49415)购自苏州北纳创联生物技术有限公司。

2 方法

2.1 NP-69 细胞增殖的检测

取对数生长期的 NP-69 细胞,制成细胞悬液,计数并调整细胞密度至 4×10^5 个/mL,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μ L。将细胞分为空白组(只加培养基,不加细胞)、正常组(正常培养细胞)、不同浓度(0.000 1、0.001、0.01、0.1、1.0、10 μ mol/L^[11])ARC 组,每组设置 6 个复孔。ARC 组细胞加入含相应浓度药物的完全培养基(即含 10% 胎牛血清及 1% 青链霉素双抗的 RPMI 1640 培养基,下同),正常组加入完全培养基,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。每孔加入 MTS 试剂 20 μ L,同条件孵育 2 h 后,使用酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔的光密度(optical density, OD)值,按下式计算细胞增殖率:细胞增殖率(%)=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(正常组 OD 值-空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

2.2 ARC 对 NP-69 细胞迁移影响的检测

取对数生长期的 NP-69 细胞,制成细胞悬液,计数并调整细胞密度至 4×10^5 个/mL,接种于 6 孔培养板中,每孔 2 mL。将细胞分为正常组和不同浓度(0.01、0.1、1.0 μ mol/L,浓度参考“2.1”项下结果设置)ARC 组,每组设置 3 个复孔。ARC 组细胞用含相应浓度药物的完全培养基培养 24 h,正常组用完全培养基培养 24 h。用无菌枪头在皿底作等宽的直线划痕,并用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次。分别在同条件培养 0、24 h 时于倒置显微镜下观察、拍照并采集图片,采用 Image J V1.8.0 软件分析划痕宽度并计算细胞迁移率:细胞迁移率(%)=(0 h 划痕宽度-24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

2.3 ARC对LPS刺激的NP-69细胞迁移影响的检测

取对数生长期的NP-69细胞,制成细胞悬液,计数并调整细胞密度至 4×10^5 个/mL,接种于6孔培养板中,每孔2 mL。同条件培养至细胞铺满孔板底部。将细胞分为正常组、LPS组($1.0 \mu\text{g/mL}$ ^[11])和不同浓度(0.01、0.1、 $1.0 \mu\text{mol/L}$,浓度参考“2.1”项下结果设置)ARC组,每组设置3个复孔。ARC组细胞用含相应浓度药物的完全培养基培养24 h,正常组和LPS组用完全培养基培养24 h;随后,ARC组和LPS组细胞用相应浓度的LPS刺激24 h。用无菌枪头在皿底作等宽的直线划痕,并用无菌PBS清洗3次。分别在刺激0、24 h时于倒置显微镜下观察、拍照并采集图片,采用Image J V1.8.0软件分析划痕宽度并按“2.2”项下方法计算细胞迁移率。

2.4 ARC对LPS刺激的NP-69细胞上清液中NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平影响的检测

取对数生长期的NP-69细胞,制成细胞悬液,计数并调整细胞密度至 4×10^5 个/mL,接种于6孔培养板中,每孔2 mL。将细胞分为正常组、LPS组($1.0 \mu\text{g/mL}$ ^[11])和不同浓度(0.1、 $1.0 \mu\text{mol/L}$,浓度参考“2.1”项下结果设置)ARC组,每组设置6个复孔。ARC组细胞用含相应浓度药物的完全培养基培养24 h,正常组和LPS组用完全培养基培养24 h;随后,ARC组和LPS组用相应浓度的LPS刺激24 h。收集各组细胞上清液,检测其中NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平,严格按照各试剂盒说明书方法操作。

2.5 ARC对LPS刺激的NP-69细胞中ZO-1、BD3、JAK1、STAT3 mRNA表达影响的检测

同“2.4”项下方法进行细胞分组(每组设置6个复孔)及干预,于LPS刺激24 h后收集各组细胞,采用TRIZOL法提取RNA,采用q-PCR法检测细胞中ZO-1、BD3、JAK1、STAT3 mRNA的表达水平:PCR扩增体系包括上/下游引物各 $0.6 \mu\text{L}$ 、cDNA $1.0 \mu\text{L}$ 、ddH₂O $7.8 \mu\text{L}$ 。扩增程序为95℃预变性15 min;95℃变性10 s,60℃退火30 s,共45个循环。随后,进行溶解曲线分析,以 β -actin为内参,以正常组为参照,运用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法确定各目的基因mRNA的相对表达量。目的基因的引物信息如表1所示(内参略)。

表1 目的基因的引物信息

目的基因	引物序列(5'→3')	引物长度/bp	产物长度/bp
ZO-1	上游引物:CAACATACAGTGACGCTTCACA	22	105
	下游引物:CACTATTGACGTTTCCCACTC	22	
BD3	上游引物:CTTCCTGTTTTGGTGCCTGT	21	128
	下游引物:TGCCGATCTGTTCTCCTTTG	21	
JAK1	上游引物:TCAGTGTGGCGTCATTCTCC	20	93
	下游引物:CAGTGAGCTGGCATCAAGGA	20	
STAT3	上游引物:CAGCAGCTTGACACACGGTA	20	150
	下游引物:AAACACCAAGTGGCATGTGA	21	

2.6 ARC对LPS刺激的NP-69细胞中ZO-1、BD3、JAK1、STAT3蛋白表达影响的检测

同“2.4”项下方法进行细胞分组(每组设置6个复孔)及干预,于LPS刺激24 h后收集各组细胞,采用

Western blot法检测细胞中ZO-1、BD3、JAK1、STAT3蛋白的表达情况:于各组细胞中加入细胞裂解液(含1%蛋白酶抑制剂的裂解液)100 μL ,冰上裂解5 min后,以14 000 r/min离心5 min,取上清液采用BCA法检测细胞总蛋白浓度后进行高温变性。取变性蛋白30 μg 进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(分离胶电压为70 V,浓缩胶电压为110 V,电泳时间为90 min),然后转移到聚偏二氟乙烯膜(电流为200 mA;转膜时间根据蛋白分子量决定,一般1 kDa蛋白转膜1 min)上,用5%脱脂奶粉于室温摇床上封闭2 h,加入相应一抗(目的蛋白的稀释比例均为1:500, β -actin的稀释比例为1:2 000),4℃孵育过夜;用TBST缓冲液洗膜5 min \times 4次,加入二抗(稀释比例为1:2 000),室温下摇床孵育2 h;用TBST缓冲液洗膜5 min \times 4次,以ECL显色后于凝胶成像系统上成像并拍照,利用Image J V1.8.0软件进行图像灰度值处理,以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的灰度值比值作为前者的相对表达量。

2.7 统计学方法

分别采用SPSS 23.0、Graphpad Prism 8.0软件进行统计分析,绘图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验(方差齐)或Tamhane's T^2 分析(方差不齐)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 ARC对NP-69细胞增殖率的影响

在0.000 1、0.001、0.01、0.1、1.0、 $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度下,ARC对NP-69细胞均无明显毒性;ARC组细胞增殖率与正常组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见图2。

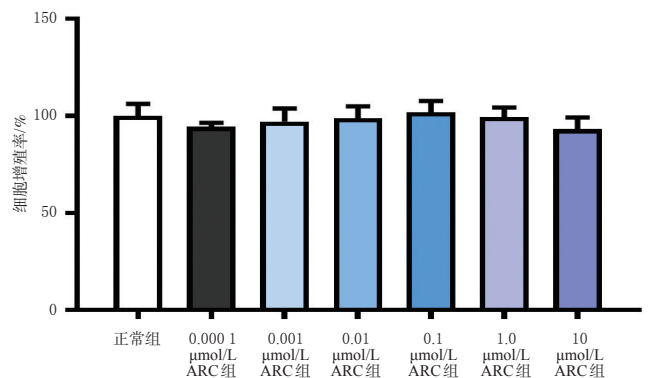


图2 ARC对NP-69细胞增殖率影响的检测结果($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.2 ARC对NP-69细胞迁移的影响

与正常组比较,经0.1、 $1.0 \mu\text{mol/L}$ ARC干预后,细胞的迁移率均显著升高($P<0.05$)。结果见表2、图3。

表2 ARC对NP-69细胞迁移率影响的检测结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	细胞迁移率/%	组别	细胞迁移率/%
正常组	28.85 ± 0.77	0.1 $\mu\text{mol/L}$ ARC组	40.82 ± 1.64^a
0.01 $\mu\text{mol/L}$ ARC组	31.50 ± 0.70	1.0 $\mu\text{mol/L}$ ARC组	41.86 ± 0.33^a

a:与正常组比较, $P<0.05$

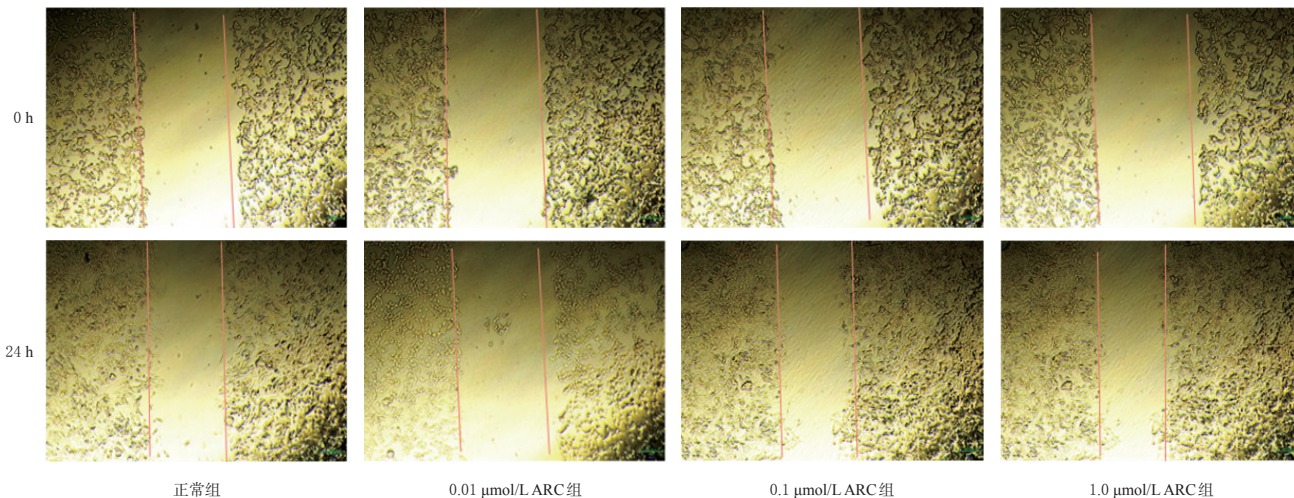


图3 ARC对NP-69细胞迁移影响的显微图(×40)

3.3 ARC对LPS刺激的NP-69细胞迁移的影响

与正常组比较,LPS组出现细胞损伤脱落现象,细胞迁移率显著降低($P<0.01$);与LPS组比较,不同浓度的ARC均可使NP-69细胞的迁移率显著升高($P<0.01$)。结果见表3、图4。

表3 ARC对LPS刺激的NP-69细胞迁移率影响的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞迁移率/%	组别	细胞迁移率/%
正常组	26.86±0.45	0.1 μmol/L ARC组	1.57±0.48 ^a
LPS组	-11.85±0.59 ^a	1.0 μmol/L ARC组	2.26±0.60 ^b
0.01 μmol/L ARC组	3.53±0.30 ^b		

a:与正常组比较, $P<0.01$;b:与LPS组比较, $P<0.01$

3.4 ARC对LPS刺激的NP-69细胞上清液中NO、TNF-α、IL-6、IL-1β水平的影响

与正常组比较,LPS组细胞上清液中NO、TNF-α、IL-6、IL-1β水平均显著升高($P<0.01$)。与LPS组比较,0.1、1.0 μmol/L ARC组细胞上清液中NO、TNF-α、IL-6水平(0.1 μmol/L ARC组除外)均显著降低($P<0.05$);各药物组IL-1β水平虽有降低趋势,但组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见表4。

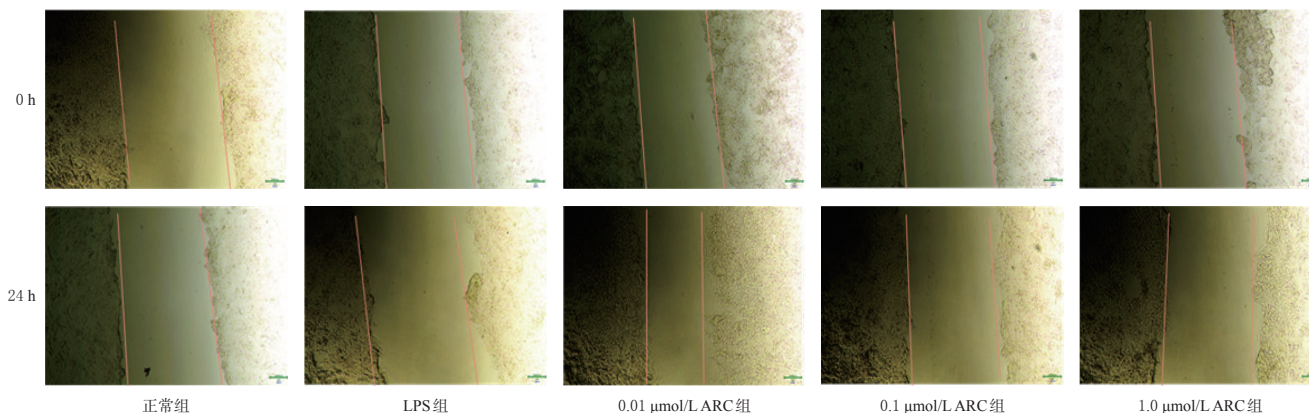


图4 ARC对LPS刺激的NP-69细胞迁移影响的显微图(×40)

3.5 ARC对LPS刺激的NP-69细胞中ZO-1、BD3、JAK1、STAT3 mRNA表达的影响

与正常组比较,LPS组NP-69细胞中ZO-1、BD3 mRNA的相对表达量均显著降低($P<0.01$),STAT3 mRNA的相对表达量显著升高($P<0.01$)。与LPS组比较,1.0 μmol/L ARC组细胞中ZO-1、BD3 mRNA的相对表达量均显著升高($P<0.01$),0.1、1.0 μmol/L ARC组细胞中STAT3 mRNA的相对表达量均显著降低($P<0.01$);各药物JAK1 mRNA的相对表达量虽有降低趋势,但组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见表5。

3.6 ARC对LPS刺激的NP-69细胞中ZO-1、BD3、JAK1、STAT3蛋白表达的影响

与正常组比较,LPS组细胞中ZO-1、BD3蛋白的相对表达量均显著降低($P<0.05$),STAT3蛋白的相对表达量显著升高($P<0.01$)。与LPS组比较,0.1、1.0 μmol/L ARC组细胞中ZO-1、BD3蛋白的相对表达量均显著升高($P<0.01$),1.0 μmol/L ARC组细胞中STAT3蛋白的相对表达量显著降低($P<0.05$);各药物组JAK1蛋白的相对表达量虽有升高趋势,但组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见表6、图5。

表4 ARC对LPS刺激的NP-69细胞上清液中NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平影响的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	NO/($\mu\text{mol/L}$)	TNF- α /(pg/L)	IL-6/(ng/L)	IL-1 β /(ng/L)
正常组	5.91 \pm 0.15	41.67 \pm 4.08	8.09 \pm 1.28	3.18 \pm 1.34
LPS组	17.98 \pm 2.37 ^a	154.00 \pm 18.55 ^a	12.15 \pm 0.90 ^a	5.48 \pm 0.36 ^a
0.1 $\mu\text{mol/L}$ ARC组	10.69 \pm 0.31 ^b	123.00 \pm 24.84 ^b	10.85 \pm 1.03	5.32 \pm 0.71
1.0 $\mu\text{mol/L}$ ARC组	10.71 \pm 0.29 ^b	122.50 \pm 9.90 ^b	10.26 \pm 1.03 ^b	5.38 \pm 0.56

a:与正常组比较, $P<0.01$;b:与LPS组比较, $P<0.05$

表5 ARC对LPS刺激的NP-69细胞中ZO-1、BD3、JAK1、STAT3 mRNA相对表达量影响的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	ZO-1 mRNA	BD3 mRNA	JAK1 mRNA	STAT3 mRNA
正常组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
LPS组	0.50 \pm 0.07 ^a	0.07 \pm 0.02 ^a	0.75 \pm 0.08	2.32 \pm 1.15 ^a
0.1 $\mu\text{mol/L}$ ARC组	1.32 \pm 0.22	0.67 \pm 0.16	0.55 \pm 0.15	0.62 \pm 0.43 ^b
1.0 $\mu\text{mol/L}$ ARC组	1.91 \pm 0.66 ^b	1.25 \pm 0.34 ^b	0.48 \pm 0.11	0.42 \pm 0.19 ^b

a:与正常组比较, $P<0.01$;b:与LPS组比较, $P<0.01$

表6 ARC对LPS刺激的NP-69细胞中ZO-1、BD3、JAK1、STAT3蛋白相对表达量影响的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	ZO-1蛋白	BD3蛋白	JAK1蛋白	STAT3蛋白
正常组	0.36 \pm 0.02	0.35 \pm 0.11	0.50 \pm 0.03	0.48 \pm 0.13
LPS组	0.25 \pm 0.05 ^a	0.12 \pm 0.01 ^a	0.46 \pm 0.10	0.82 \pm 0.16 ^b
0.1 $\mu\text{mol/L}$ ARC组	0.84 \pm 0.26 ^c	0.28 \pm 0.19 ^c	0.51 \pm 0.13	0.70 \pm 0.12
1.0 $\mu\text{mol/L}$ ARC组	0.91 \pm 0.24 ^c	0.68 \pm 0.11 ^c	0.54 \pm 0.18	0.56 \pm 0.18 ^d

a:与正常组比较, $P<0.05$;b:与正常组比较, $P<0.01$;c:与LPS组比较, $P<0.01$;d:与LPS组比较, $P<0.05$

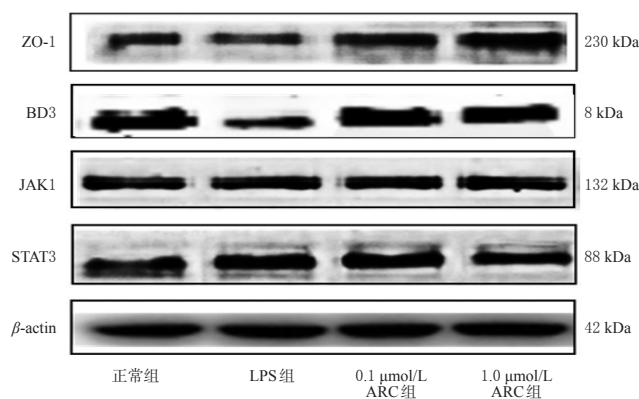


图5 ARC对LPS刺激NP-69细胞中ZO-1、BD3、JAK1、STAT3蛋白表达影响的电泳图

4 讨论

由于引起URTI的高致病性病原体(如冠状病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒等)大多是从口鼻入侵,故覆盖于鼻腔结构的鼻黏膜是机体与病毒接触的首个部位^[12]。鼻上皮细胞与内皮细胞组成细胞片层,构成了鼻黏膜的第1道屏障,其结构和功能的完整性对于防御病原体经鼻入侵、维持机体内环境稳态均具有至关重要的作用^[13]。由于直接与外界相通,鼻黏膜上皮细胞不可避免地经常受到细菌、病毒、吸入颗粒物的损伤。正常情况

下,当上皮屏障受损时,上皮细胞将迅速启动伤口修复机制,以保持上皮屏障的完整性,其中上皮细胞快速迁移是上皮屏障修复中最早出现且较为重要的修复途径之一,这一过程对于受损气道上皮细胞的修复和再生格外重要^[14]。上皮细胞迁移受到多种因素的影响,有研究证实炎症反应可明显抑制气道上皮细胞的迁移^[15]。

本研究结果显示,不同浓度(0.1、1.0 $\mu\text{mol/L}$)的ARC均能促进NP-69细胞的迁移,表明该成分具有促进细胞迁移的作用。随后,本研究采用LPS刺激NP-69细胞以复制细胞炎症损伤模型,以细胞划痕实验再次考察ARC对NP-69细胞迁移的影响。结果显示,经LPS刺激后,细胞损伤脱落,细胞迁移率显著降低,说明炎症环境抑制了上皮细胞的黏附和迁移能力;与此同时,细胞上清液中炎症介质NO和炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平均显著升高。经不同浓度ARC预先干预后,NP-69细胞损伤有所恢复,细胞迁移率显著升高,细胞上清液中NO、TNF- α 、IL-6水平均有不同程度降低,提示该成分具有促进上皮屏障损伤愈合的作用。

有研究指出,ZO-1是上皮细胞维持细胞极性的重要结构蛋白,也是鼻黏膜物理屏障的重要构成部分,具有防止病原体入侵的重要作用^[16]。在炎症环境下,NP-69细胞中ZO-1 mRNA和蛋白表达均显著降低,说明上皮屏障结构受损、物理屏障功能减弱;预先给予ARC干预后,ZO-1 mRNA和蛋白的表达得以上调,说明ARC可以增强鼻黏膜上皮细胞的物理屏障功能。

BD主要分布于鼻黏膜上皮及呼吸道黏膜下腺体组织中,是具有独特二硫键的阳离子抗菌肽,其不但可通过靶向细菌细胞膜和病毒外壳蛋白的方式来快速杀灭病原微生物,而且可通过提高免疫细胞的活性及趋化性调节作用来增强呼吸道黏膜的防御功能^[17]。近年来,BD因其独特的组织分布、作用特点及对URTI的影响而受到了学者的广泛关注。本研究结果显示,经LPS刺激后,NP-69细胞中BD3 mRNA和蛋白的表达均显著降低,提示在炎症环境中,上皮屏障的抗菌肽表达减少,屏障的免疫防御功能有所减弱。预先给予ARC干预后,BD3 mRNA和蛋白的表达均明显上调,说明ARC可以提高鼻黏膜上皮屏障的免疫防御功能。

有研究报道,当上皮屏障受损时,在没有任何外界刺激或非上皮细胞参与的情况下,受损部位邻近的上皮细胞能以35~45 $\mu\text{m/s}$ 的速度迅速迁移到受损部位并覆盖受损区域,增加受损区域内的细胞总数,同时可分化为具有不同功能的上皮细胞(如基底细胞、黏液分泌细胞),从而完成对上皮屏障的修复^[18]。上皮细胞的快速迁移是由IL-6/JAK1/STAT3蛋白激酶信号通路介导并精密调控的^[19]。其中,STAT3在多种细胞和组织中都有表达,对调节正常细胞的增殖、分化、生存、凋亡均具有重要作用^[20]。研究表明,特异性敲除STAT3基因的肠上皮细胞不但对葡聚糖硫酸钠盐引起的炎症性肠炎易感,而且使受损上皮屏障的愈合速度也明显减慢^[21]。STAT3可

被多种配体激活,其中IL-6是STAT3的重要细胞内调节分子之一,当细菌或病毒入侵上呼吸道后可诱导呼吸道释放IL-6、IL-8,后者与IL-6受体 α (interleukin-6 receptor alpha,IL-6R α)特异性结合,引起糖蛋白130(glycoprotein 130, gp130)的同源二聚化,JAK与gp130的胞质区交联,使gp130磷酸化,进一步促进了STAT3激活,从而发挥促进细胞增殖、迁移和抑制细胞凋亡等作用;但当STAT3过度表达时,则可引起炎症及肿瘤的发生^[22]。本研究结果显示,NP-69细胞经LPS刺激后,其上清液中IL-6水平明显上升,中下游效应因子JAK1 mRNA和蛋白虽未及时上升(可能与药物作用时效性有关),但同样上调了非磷酸化STAT3 mRNA和蛋白的表达,提示IL-6/JAK1/STAT3信号通路被激活。预先给予ARC干预后,该信号通路受到明显抑制,提示ARC可抑制由STAT3过度激活所造成的炎症反应。

综上所述,ARC具有明显减轻LPS致NP-69细胞炎症损伤的作用,并可增强炎症环境下鼻黏膜上皮屏障的物理及免疫防御功能;上述作用可能与抑制IL-6/JAK1/STAT3蛋白激酶信号通路相关。

参考文献

- [1] STOLZ D,PAPAKONSTANTINO E,GRIZE L, et al. Time-course of upper respiratory tract viral infection and COPD exacerbation[J]. Eur Respir J, 2019, 54 (4) : 1900407.
- [2] GRIEF S N. Upper respiratory infections[J]. Prim Care, 2013, 40(3):757-770.
- [3] XU-CHEN X L, WEINSTOCK J, RASTOGI D, et al. The airway epithelium during infancy and childhood: a complex multicellular immune barrier: basic review for clinicians[J]. Paediatr Respir Rev, 2021, 38: 9-15.
- [4] WANG D Y, ECCLES R, BELL J, et al. Management of acute upper respiratory tract infection: the role of early intervention[J]. Expert Rev Respir Med, 2021, 15 (12) : 1517-1523.
- [5] LARSEN S B, COWLEY C J, FUCHS E. Epithelial cells: liaisons of immunity[J]. Curr Opin Immunol, 2020, 62: 45-53.
- [6] GAO Q, YANG M B, ZUO Z. Overview of the anti-inflammatory effects, pharmacokinetic properties and clinical efficacies of arctigenin and arctiin from *Arctium lappa* L[J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(5): 787-801.
- [7] ZHOU B, WENG G H, HUANG Z X, et al. Arctiin prevents LPS-induced acute lung injury via inhibition of PI3K/AKT signaling pathway in mice[J]. Inflammation, 2018, 41(6): 2129-2135.
- [8] ZHOU B X, WANG L X, LIANG Y Y, et al. Arctiin suppresses H9N2 avian influenza virus-mediated inflammation via activation of Nrf2/HO-1 signaling[J]. BMC Complement Med Ther, 2021, 21(1): 289.
- [9] ZHOU Y Y, XIA L, YAO W Q, et al. Arctiin antagonizes triptolide-induced hepatotoxicity via activation of Nrf2 pathway[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 2508952.
- [10] LU L C, ZHANG R, SONG M B, et al. Optimization of extraction and purification of arctiin from *Fructus arctii* and its protection against glucose-induced rat aortic endothelial cell injury[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 69(1): 93-101.
- [11] KIM K, AN S, CHOI B G, et al. Arctiin regulates collagen type 1 α chain 1 mRNA expression in human dermal fibroblasts via the miR-378b-SIRT6 axis[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6): 9120-9124.
- [12] BIAN Y F, DONG Y Y, SUN J J, et al. Protective effect of kaempferol on LPS-induced inflammation and barrier dysfunction in a coculture model of intestinal epithelial cells and intestinal microvascular endothelial cells[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(1): 160-167.
- [13] CHU Y X, WIDJAJA J, HONG J, et al. Effect of sleeve gastrectomy on plasma thioredoxin-interacting protein (TXNIP)[J]. Obes Surg, 2021, 31(11): 4829-4835.
- [14] MARTENS K, SEYS S F, ALPIZAR Y A, et al. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B disrupts nasal epithelial barrier integrity[J]. Clin Exp Allergy, 2021, 51(1): 87-98.
- [15] YOON S, LEUBE R E. Keratin intermediate filaments: intermediaries of epithelial cell migration[J]. Essays Biochem, 2019, 63(5): 521-533.
- [16] XIAO H L, LI D X, LIU M Y. Knowledge translation: airway epithelial cell migration and respiratory diseases[J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(24): 4149-4162.
- [17] MASUDA N, MANTANI Y, YUASA H, et al. Immunohistochemical study on the distribution of β -defensin 1 and β -defensin 2 throughout the respiratory tract of healthy rats[J]. J Vet Med Sci, 2018, 80(3): 395-404.
- [18] PUCHELLE E. Airway epithelium wound repair and regeneration after injury[J]. Acta Otorhinolaryngol Belg, 2000, 54(3): 263-270.
- [19] SRIVASTAVA S, SAMARPITA S, GANESAN R, et al. CYT387 inhibits the hyperproliferative potential of fibroblast-like synoviocytes via modulation of IL-6/JAK1/STAT3 signaling in rheumatoid arthritis[J]. Immunol Invest, 2021: 1-16.
- [20] WILLSON T A, JURICKOVA I, COLLINS M, et al. Deletion of intestinal epithelial cell STAT3 promotes T-lymphocyte STAT3 activation and chronic colitis following acute dextran sodium sulfate injury in mice[J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 19(3): 512-525.
- [21] ZHANG Y, WANG D, XU J, et al. Stat3 activation is critical for pluripotency maintenance[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(2): 1044-1051.
- [22] HANLON M M, RAKOVICH T, CUNNINGHAM C C, et al. STAT3 mediates the differential effects of oncostatin M and TNF α on RA synovial fibroblast and endothelial cell function[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2056.

(收稿日期:2022-01-28 修回日期:2022-04-29)
(编辑:曾海蓉)