

# 黄芩苷对 HT-29 细胞炎症模型 PI3K/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响及机制探讨

蒋寅<sup>1</sup>, 刘军楼<sup>1</sup>, 朱磊<sup>2</sup>, 沈洪<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210046; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 观察黄芩苷对人结肠癌上皮细胞株 HT-29 的炎症模型中磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (Akt)/核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路的影响, 并探讨其机制。方法: 以肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$  及脂多糖 (LPS) 共同诱导 HT-29 细胞, 建立细胞炎症模型。实验分为 6 组, 空白组加入完全培养基孵育, 实验过程中不予任何药物干预, 模型组给予 hTNF (20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 黄芩苷孵育 12 h 后, 再给 LPS (1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 孵育 15 h; 柳氮磺胺吡啶组在模型组的基础上, 加入柳氮磺胺吡啶 (SASP, 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); 黄芩苷组在模型组基础上给予不同剂量 (1, 10, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 黄芩苷孵育 24 h。噻唑蓝 (MTT) 法检测黄芩苷 (1, 10, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对细胞生长的影响; 免疫印迹 (Western blot) 法检测黄芩苷 (1, 10, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对 PI3K, Akt, NF- $\kappa$ B 等蛋白表达, 酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测黄芩苷 (1, 10, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对细胞上清中 TNF- $\alpha$ , 白细胞介素 (IL)-6 等含量的影响。结果: 与模型组比较, 黄芩苷组、柳氮磺胺吡啶组的细胞上清液中 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1 分泌量明显减少 ( $P < 0.05$ ), 且两药联合应用对 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1 分泌量的减弱效应更强 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 黄芩苷组 (1, 10, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 柳氮磺胺吡啶组 (500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 中的 PI3K 蛋白磷酸化水平, Akt 磷酸化水平, NF- $\kappa$ B 活化入核水平, 环氧化酶-2 (Cox-2) 蛋白,  $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 蛋白, 天冬氨酸蛋白水解酶-9 (Caspase-9) 蛋白, 人凋亡相关因子配体 (FasL) 蛋白表达均明显减少 ( $P < 0.05$ )。结论: 黄芩苷能减轻 HT-29 细胞炎症反应, 抑制 PI3K 磷酸化, 下调 Akt 的活化, 抑制 NF- $\kappa$ B 的活化入核, 从而抑制 TNF- $\alpha$ , IL-6 等炎症因子的分泌, 发挥其抗炎效应, 提示黄芩苷可能通过抑制 Akt 的活化, 抑制 NF- $\kappa$ B 的核转位, 发挥其抗炎作用。

**[关键词]** 黄芩苷; 炎症; 丝氨酸苏氨酸蛋白激酶; 核转录因子- $\kappa$ B

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0118-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120118

## Effect of Baicalin on PI3K/NF- $\kappa$ B Signaling Pathways and Its Underlying Mechanism in HT-29 Cells Inflammation Model

JIANG Yin<sup>1</sup>, LIU Jun-lou<sup>1</sup>, ZHU Lei<sup>2</sup>, SHEN Hong<sup>1,2\*</sup>

(1. The First Clinical Medical School, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;  
2. Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of baicalin on Phosphatidylinositol 3-kinase/threonine protein kinase/nuclear factor- $\kappa$ B (PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B) signaling pathways in cell inflammation models of human colon carcinoma epithelial cell line (HT-29). **Method:** Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and lipopolysaccharides (LPS) were used to induce HT-29 cells and establish cells inflammation models. This experiment was divided into six groups: complete medium was used in the blank control group, without any drug intervention during experiment, the cells in model control group were incubated with hTNF (20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 12 h, then incubated with LPS (1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 15 h, the cells in positive medicine group were also incubated with salazosulfapyridine (SASP, 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h on the basis of the processing method in model group, cells in baicalin groups

**[收稿日期]** 20151215(012)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年项目 (81403344); 国家中医药行业科研专项 (20147001); 江苏省临床医学科技专项 (BL2014100)

**[第一作者]** 蒋寅, 硕士, 从事消化道疾病研究, Tel: 15195993035, E-mail: 1005011926@qq.com

**[通讯作者]** \* 沈洪, 主任医师, 从事消化道疾病研究, Tel: 13851872859, E-mail: shenhong999@163.com

were incubated with different doses (1, 10, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) of baicalin for 24 h on the basis of the processing method in model group. MTT assay was used to detect the effect of baicalin (1, 10, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) on cell growth, Western blot was used to measure the effect of baicalin (1, 10, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) on protein expression levels of PI3K, Akt and NF- $\kappa$ B, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the effect of baicalin (1, 10, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) on TNF- $\alpha$ , interleukin (IL) -6 levels in cell supernatant. **Result:** As compared with the model group, the secretion levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, and IL-1 in the cell supernatant were reduced in baicalin (1, 10, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) groups and SASP (500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) group ( $P < 0.05$ ), and the combined application of these two medicines reduced more secretion of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, and IL-1 levels in the cell supernatant ( $P < 0.01$ ). As compared with the model group, the PI3K protein phosphorylation levels, phosphorylated Akt levels and the activated NF- $\kappa$ B levels were reduced in baicalin groups (1, 10, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), and SASP (500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) group ( $P < 0.05$ ). As compared with the model group, the cyclooxygenase-2 (Cox-2),  $\beta$ -catenin, Caspase-9 and FasL protein expression levels were reduced in baicalin (1, 10, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) groups and SASP (500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Baicalin can reduce HT-29 cell inflammation, inhibit PI3K phosphorylation, down-regulate Akt activation, inhibit the activation of NF- $\kappa$ B, and thus inhibit the secretion of TNF- $\alpha$ , IL-6 and other inflammatory factors to play its anti-inflammatory effect. It suggested that baicalin may play its anti-inflammatory effect by inhibiting the activation of Akt and inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathways.

[**Key words**] baicalin; inflammation; serine/threonine protein kinase; nuclear transcription factor- $\kappa$ B

溃疡性结肠炎(UC)是重要的结肠癌前病变和难治性疾病,病情反复发作增加了结直肠癌发生的危险性<sup>[1]</sup>。目前溃疡性结肠炎西医治疗药物主要是针对炎症细胞因子,通过抑制炎症因子的产生发挥抗炎作用。近期研究发现磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt)信号通路在肠道炎症和肿瘤反应中发挥着重要作用,对于细胞增殖、分化和凋亡调节非常必要,PI3K/Akt 信号通路可能同时参与了 UC 的炎症及癌变过程<sup>[2-6]</sup>。本课题组前期研究发现清肠化湿方能降低溃疡性结肠炎小鼠模型结肠组织中核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)表达,调控结肠组织 NF- $\kappa$ B/环氧化酶-2(Cox-2)通路、过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ )/NF- $\kappa$ B 通路;抑制促炎因子白细胞介素(IL)-2, IL-1 $\beta$ 的分泌,促进抑炎因子 IL-10 的分泌,降低肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 含量,发挥抗溃疡性结肠炎的效应<sup>[7-9]</sup>。黄芩作为清肠化湿方的主要药物,集清热燥湿于一体,祛黏滞之湿热,故为临证首选。黄芩苷是从黄芩根中提取分离出来的一种黄酮类化合物,具有抑菌、抗炎、抗变态及解痉作用,是黄芩中主要的活性物质。本实验在前期基础上,通过建立人结肠癌细胞 HT-29 的炎症模型,考察了黄芩苷对 HT-29 细胞炎症模型中炎症因子释放的影响及其机制,为进一步阐明黄芩及清肠化湿方的抗炎药理作用靶点及开发相关类似物的抗炎中药提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人结肠癌上皮细胞株(HT-29)购自中国科学院上海细胞库。

**1.2 药物与试剂** 黄芩苷(南京泽朗生物公司,纯度 98%,批号 131206),柳氮磺胺吡啶(SASP,上海三维制药有限公司,批号 H31020450),1640 培养基(Gibco 公司,批号 1567145),胎牛血清(Biological Industries 公司,批号 1418110),噻唑蓝(MTT, Biosharp 公司,批号 0793),hTNF, LPS, PI3K, Akt, p-Akt, NF- $\kappa$ B 一抗(Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 8902, 14011, 9655, 11848, 11962, 8242), BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo 公司,批号 PG201361), IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(南京森贝伽生物公司,批号分别为 20141206, 20141208, 20141209, 20141211)。

**1.3 主要仪器** BSC-1300-B1 型细胞超净台(苏州市华宁净化设备有限公司), MCO-15AC 型恒温细胞培育箱(日本 SANYO 公司), LD24-1.2 型低温台式离心机(北京京立离心机有限公司), Mini Protean 3 Cell 型垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组** 实验细胞分为 6 组,空白组加入完全培养基孵育,模型组给予 hTNF(20  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )孵育 12 h 后,再给脂多糖(LPS, 1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )孵育 15 h<sup>[10]</sup>;柳氮磺胺吡啶组在模型组的基础上加入 SASP(500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ );黄芩苷组在模型组基础上给予不同剂

量黄芩苷( $1, 10, 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )孵育 24 h。

**2.2 MTT 法检测 HT-29 细胞增殖** HT-29 细胞使用含有 10% 胎牛血清的 1640 完全培养基,  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中常规培养。取对数期细胞, 调整细胞密度为  $8 \times 10^4$  个/孔, 种入 96 孔板, 每孔  $200 \mu\text{L}$  细胞悬液, 常规培养至细胞增长至 80% 左右时, 分别加入黄芩苷( $0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1\ 000, 10\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ); 加入 SASP( $0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 空白组给予培养基, 孵育 24 h, 之后弃上清, 每孔加入含 MTT( $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的培养基  $100 \mu\text{L}$  继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入二甲基亚砜(DMSO)  $150 \mu\text{L}$  震荡 10 min, 在  $490 \text{ nm}$  波长下测定吸光度  $A$ , 计算细胞增殖抑制率。

**2.3 ELISA 法检测细胞上清中 TNF- $\alpha$ , IL-6 含量**

HT-29 细胞造模后, 给予不同剂量黄芩苷及 SASP 作用 24 h 后, 收集细胞上清液,  $2\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取上清。按试剂盒步骤检测细胞上清中 TNF- $\alpha$ , IL-6 水平。

**2.4 免疫印迹法 (Western blot) 检测 PI3K, Akt, NF- $\kappa\text{B}$  蛋白表达** HT-29 细胞造模后, 给予不同剂量黄芩苷及 SASP 作用 24 h 后, 采用细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒分别提取胞浆蛋白与核蛋白,  $-80^\circ\text{C}$  冰箱过夜后对每个样本进行蛋白定量, 蛋白上样, 凝胶电泳, 转膜, 封闭 2 h, 洗膜。然后  $4^\circ\text{C}$  一抗( $1:1\ 000$ )孵育过夜, 洗膜。二抗室温孵育 2 h, 洗膜。发光液显色, 凝胶成像系统成像。

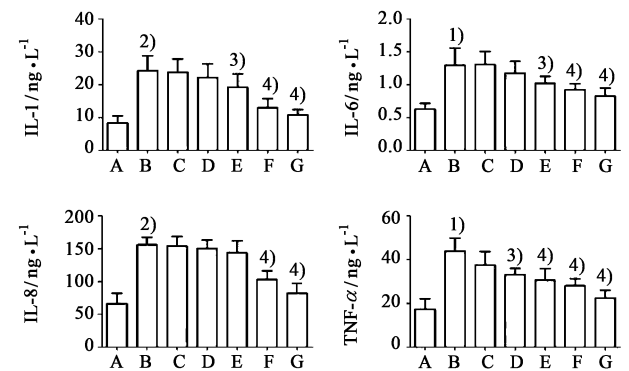
**2.5 统计学分析** 采用 Graphpad 5.0 软件进行统计学分析, 计量结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较均采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 黄芩苷对 HT-29 细胞的增殖影响** 与正常组比较, 黄芩苷在  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度内对 HT-29 细胞的增殖没有显著性影响,  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的浓度开始对 HT-29 细胞的产生明显抑制效应 ( $P < 0.05$ ), 柳氮磺胺吡啶从  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  开始对 HT-29 细胞的增殖产生明显抑制效应 ( $P < 0.05$ )。考虑受试药物需对 HT-29 增殖没有显著性影响, 因此, 后续实验选取黄芩苷  $1, 10, 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  作为受试浓度, 柳氮磺胺吡啶选取  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作为受试浓度。

**3.2 黄芩苷对 HT-29 细胞上清液中炎症因子水平的影响** 与正常组比较, 模型组 IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  分泌明显增高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与模型组比较, 黄芩苷 ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组、柳氮磺胺吡啶组能剂量依赖性的抑制 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  的分泌 ( $P <$

$0.05, P < 0.01$ ); 且黄芩苷 ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 与柳氮磺胺吡啶联用后能显著抑制 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  的分泌, 效应要强于单用两种药物的效应。与模型组比较, 黄芩苷组对 IL-8 也有一定的抑制效应。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C ~ E. 黄芩苷( $1, 10, 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )组; F. 柳氮磺胺吡啶( $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组; G. 黄芩苷( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + 柳氮磺胺吡啶( $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组(图 2 ~ 4 同)。与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$

图 1 黄芩苷对 HT-29 细胞 IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  水平的影响 ( $x \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effect of baicalin on IL-1, IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  levels in HT-29 cells ( $x \pm s, n = 3$ )

**3.3 黄芩苷对 HT-29 细胞 PI3K/AKT 通路蛋白表达的影响** 与正常组比较, 模型组中磷酸化的 PI3K 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 黄芩苷 ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组、柳氮磺胺吡啶组的磷酸化 PI3K 蛋白水平明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 且两药物联用后效应强于单用。与正常组比较, 模型组中的磷酸化 Akt (T308, S473 磷酸化位点) 蛋白水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 黄芩苷 ( $10, 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组、柳氮磺胺吡啶组的磷酸化 Akt 蛋白水平被明显抑制 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 两药联用抑制效应强于单用。见表 1, 图 2。

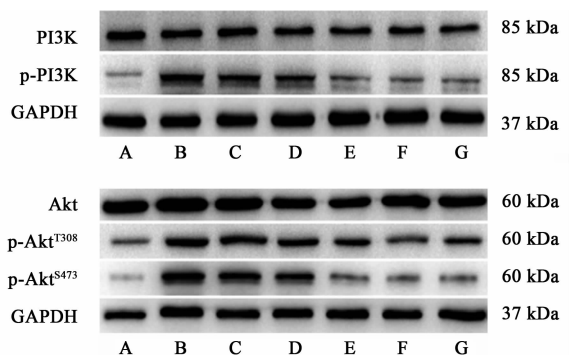


图 2 黄芩苷对 HT-29 细胞 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达的影响  
Fig. 2 Effect of baicalin on protein expression of PI3K/AKT signaling pathways in HT-29 cells

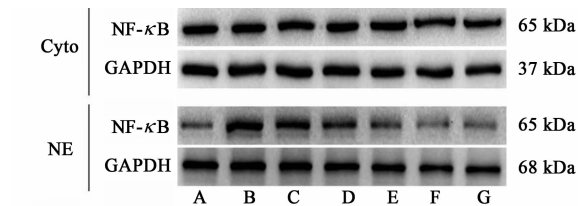
表 1 黄芩苷对 HT-29 细胞 PI3K/AKT 信号通路蛋白水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of baicalin on protein expression of PI3K/AKT signaling pathways in HT-29 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	PI3K	p-PI3K	Akt	p-Akt <sup>T308</sup>	p-Akt <sup>S473</sup>
A	100.25 ± 2.85	101.34 ± 3.12	103.14 ± 1.12	104.38 ± 2.52	105.30 ± 6.02
B	101.22 ± 1.23	290.25 ± 8.95 <sup>1)</sup>	108.25 ± 6.65	300.95 ± 11.85 <sup>2)</sup>	297.25 ± 12.15 <sup>2)</sup>
C	107.25 ± 4.15	270.35 ± 9.95	109.12 ± 2.23	280.45 ± 6.45	288.44 ± 14.45
D	105.56 ± 2.75	255.65 ± 11.76	102.54 ± 5.11	235.15 ± 12.21 <sup>3)</sup>	250.23 ± 10.55 <sup>3)</sup>
E	101.25 ± 6.85	200.22 ± 17.52 <sup>3)</sup>	102.26 ± 7.31	200.22 ± 11.35 <sup>3)</sup>	222.39 ± 15.75 <sup>3)</sup>
F	102.31 ± 9.33	190.09 ± 21.35 <sup>3)</sup>	105.65 ± 3.34	180.44 ± 9.53 <sup>4)</sup>	178.58 ± 11.97 <sup>4)</sup>
G	100.11 ± 5.81	150.21 ± 11.25 <sup>4)</sup>	107.25 ± 8.75	168.21 ± 15.88 <sup>4)</sup>	159.28 ± 12.80 <sup>4)</sup>

注: A. 正常组, B. 模型组, C ~ E. 黄芩苷 (1, 10, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组, F. 柳氮磺胺吡啶 (500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组, G. 黄芩苷 (100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + 柳氮磺胺吡啶 (500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组 (表 2, 3 同)。与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

3.4 黄芩苷对 HT-29 细胞 NF- $\kappa$ B 蛋白入核影响  
与正常组比较, 模型组中 NF- $\kappa$ B 入核显著增加 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 黄芩苷 (10, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组、柳氮磺胺吡啶组 NF- $\kappa$ B 的入核减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 且两药联用抑制入核效应更明显, 胞浆 NF- $\kappa$ B 水平没有显著性变化。见表 2, 图 3。



Cyto. 胞浆; NE. 核

图 3 黄芩苷对 HT-29 细胞 NF- $\kappa$ B 蛋白水平的影响

Fig. 3 Effect of baicalin on protein expression of NF- $\kappa$ B signaling pathways in HT-29 cells

表 2 黄芩苷对 HT-29 细胞 NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of baicalin on protein expression of NF- $\kappa$ B signaling pathways in HT-29 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	NF- $\kappa$ B (Cyto)	NF- $\kappa$ B (NE)
A	100.65 ± 2.85	102.64 ± 4.15
B	101.32 ± 1.24	280.25 ± 18.05 <sup>1)</sup>
C	103.35 ± 3.35	231.30 ± 29.95
D	101.16 ± 2.15	195.05 ± 10.11 <sup>2)</sup>
E	102.25 ± 3.15	190.41 ± 13.12 <sup>2)</sup>
F	104.31 ± 5.39	175.08 ± 11.15 <sup>3)</sup>
G	100.91 ± 9.71	159.21 ± 11.95 <sup>3)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 同)。Cyto. 细胞; NE. 核。

3.5 黄芩苷对 HT-29 炎症模型细胞中的 NF- $\kappa$ B 下游相关蛋白的影响  
与正常组比较, 模型组中 Cox-2,  $\beta$ -catenin, 半胱氨酸蛋白酶-9 (Caspase-9), FasL 蛋白水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 黄芩苷 (100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组、柳氮磺胺吡啶组的 Cox-2, Caspase-9, FasL 的蛋白表达明显减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且

与柳氮磺胺吡啶联用后抑制效应更明显。见表 3, 图 4。

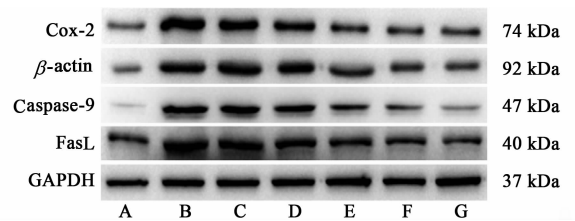


图 4 黄芩苷对 HT-29 细胞 Cox-2,  $\beta$ -catenin, Caspase-9, FasL 蛋白水平的影响

Fig. 4 Effect of baicalin on protein expression of Cox-2,  $\beta$ -catenin, Caspase-9 and FasL in HT-29 cells

#### 4 讨论

近年来, PI3K/Akt 信号通路在炎症和肿瘤中的作用日益受到重视, PI3K/Akt 信号传导通路与细胞因子的调控密切相关, 在肠道炎症反应中发挥着重要作用。Akt 是 PI3K 下游的直接靶蛋白, 被磷酸化后, 结合在细胞膜上的 Akt 即完全激活。研究表明 PI3K 参与了 LPS 和十四烷酰佛波醇乙酸酯 (PMA) 刺激诱导的 NF- $\kappa$ B 核易位这一信号途径, Akt 活化后, 促进 NF- $\kappa$ B 激活后进核, 作为转录因子发挥作用, 启动下游的炎症反应, 如 IL-6, TNF- $\alpha$ 。PI3K, Akt 也是抑制肠上皮细胞凋亡的关键信号, 凋亡在炎症后期发挥重要作用。Akt 活化释放的转录因子 FoxO 抑制生长, 促进凋亡的蛋白的表达, 比如凋亡因子 (Fas/FasL), Caspase-9<sup>[11-14]</sup>。柳氮磺胺吡啶作为治疗炎症性肠病的经典药物, 口服吸收后大部分在结肠中被细菌分解为 5-氨基水杨酸和磺胺吡啶。有体外研究表明柳氮磺胺吡啶本身可抑制 NF- $\kappa$ B 的活化, 而 5-氨基水杨酸和磺胺吡啶不能, 其机制主要是通过抑制 IKK (激酶) 的活化, 使 NF- $\kappa$ B 核转位被抑制, 发挥其抗炎效应<sup>[15-16]</sup>。因此, 在本实验中选取柳氮磺胺吡啶作为体外细胞炎症模型的对照药物。

表 3 黄芩苷对 HT-29 细胞 Cox-2,  $\beta$ -catenin, Caspase-9, FasL 蛋白水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of baicalin on protein expression of Cox-2,  $\beta$ -catenin, Caspase-9 and FasL in HT-29 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	Cox-2	$\beta$ -catenin	Caspase-9	FasL
A	102.15 $\pm$ 3.15	103.32 $\pm$ 11.11	106.15 $\pm$ 4.14	102.38 $\pm$ 5.90
B	302.21 $\pm$ 12.53 <sup>1)</sup>	390.55 $\pm$ 18.85 <sup>1)</sup>	368.65 $\pm$ 26.61 <sup>1)</sup>	320.95 $\pm$ 21.89 <sup>1)</sup>
C	307.27 $\pm$ 22.75	370.39 $\pm$ 11.75	309.12 $\pm$ 26.83	290.95 $\pm$ 16.95
D	275.56 $\pm$ 12.75	355.65 $\pm$ 19.16	302.34 $\pm$ 13.11	246.15 $\pm$ 19.01 <sup>2)</sup>
E	221.25 $\pm$ 26.85 <sup>2)</sup>	300.12 $\pm$ 47.52	252.26 $\pm$ 27.41 <sup>2)</sup>	211.12 $\pm$ 21.05 <sup>2)</sup>
F	192.21 $\pm$ 21.03 <sup>3)</sup>	230.19 $\pm$ 31.05 <sup>2)</sup>	195.95 $\pm$ 19.04 <sup>3)</sup>	200.04 $\pm$ 19.20 <sup>2)</sup>
G	130.11 $\pm$ 5.81 <sup>3)</sup>	156.71 $\pm$ 11.25 <sup>3)</sup>	167.25 $\pm$ 28.75 <sup>3)</sup>	198.21 $\pm$ 15.88 <sup>3)</sup>

清肠化湿法是目前中药治疗溃疡性结肠炎活动期最常用和有效的治疗方法。前期本课题组大量研究发现清肠化湿方能够降低溃疡性结肠炎小鼠模型结肠组织 NF- $\kappa$ B 表达,调控结肠组织 NF- $\kappa$ B/Cox-2 通路,PPAR- $\gamma$ /NF- $\kappa$ B 通路,降低促炎因子的释放。同时能增强紧密连接蛋白-1 (claudin-1) 表达,修复肠黏膜紧密连接,进而恢复肠黏膜屏障功能。黄芩苷作为清肠化湿方的主要药物黄芩中的主要成分,具有抑菌、抗炎、抗变态及解痉作用,并且具有较强的抗肿瘤效应。本文研究发现黄芩苷具有很好的抗炎活性,其作用机制与下调炎症因子 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  的释放;抑制磷酸化的 Akt 的水平,以及抑制 NF- $\kappa$ B 的核转位,部分阐述了黄芩的抗炎机制。对于黄芩苷如何调控 NF- $\kappa$ B 蛋白及其相关激酶,以及对相关抑炎因子的产生,后续还有待继续考察。同时本实验结果显示黄芩苷与西药柳氮磺胺吡啶联用显示出更好的抗炎效应,为临床抗结肠炎用药提供一定指导价值。

[参考文献]

[ 1 ] Eaden J A, Abrams K R, Mayberry J F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a Meta-analysis [J]. Gut, 2001, 48(4) : 526-535.

[ 2 ] Huang X L, Xu J, Zhang X H, et al. PI3K/Akt signaling pathway is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis [J]. Inflamm Res, 2011, 60(8) : 727-734.

[ 3 ] Lee G, Goretsky T, Managlia E, et al. Phosphoinositide 3-kinase signaling mediates beta-catenin activation in intestinal epithelial stem and progenitor cells in colitis [J]. Gastroenterology, 2010, 139(3) : 869-881.

[ 4 ] 伏代刚, 黄晓丽, 甘华田, 等. PTEN/PI3K/AKT 在溃疡性结肠炎炎症-肿瘤序列演进中的作用 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2009, 40(6) : 1021-1023.

[ 5 ] Atreya I, Atreya R, Neurath M F. NF-kappaB in inflammatory bowel disease [J]. J Intern Med, 2008, 263(6) : 591-596.

[ 6 ] Wei J, Feng J. Signaling pathways associated with inflammatory bowel disease [J]. Recent Pat Inflamm

Allergy Drug Discov, 2010, 4(2) : 105-117.

[ 7 ] 沈洪, 刘智群, 朱荃. 清肠化湿方对溃疡性结肠炎 NF- $\kappa$ B/Tolls 通路的影响及其机制 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(9) : 1233-1238.

[ 8 ] 谷静, 沈洪. 清肠化湿方对小鼠骨髓来源树突状细胞生物学特性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13) : 200-204.

[ 9 ] 翟金海, 沈洪, 倪菲菲, 等. 清肠化湿方对实验性小鼠结肠炎结肠黏膜及肠系膜淋巴结树突状细胞的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(10) : 1366-1369.

[ 10 ] Jeong J B, Shin Y K, Lee S H. Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol in RAW264. 7 and HT-29 cells [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 55(3) : 229-233.

[ 11 ] Huang X L, Xu J, Zhang X H, et al. PI3K/Akt signaling pathway is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis [J]. Inflamm Res, 2011, 60(8) : 727-734.

[ 12 ] Schwanke R C, Marcon R, Meotti F C, et al. Oral administration of the flavonoid myricitrin prevents dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice through modulation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. Mol Nutr Food Res, 2013, 57(11) : 1938-1949.

[ 13 ] Gustin J A, Ozes O N, Akca H, et al. Cell type-specific expression of the IkappaB kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF-kappaB activation [J]. J Biol Chem, 2004, 279(3) : 1615-1620.

[ 14 ] Dai C, Zheng C Q, Meng F J, et al. VSL#3 probiotics exerts the anti-inflammatory activity via PI3k/Akt and NF- $\kappa$ B pathway in rat model of DSS-induced colitis [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 374(1/2) : 1-11.

[ 15 ] Wahl C, Liptay S, Adler G, et al. Sulfasalazine: A potent and specific inhibitor of nuclear factor kappaB [J]. J Clin Invest, 1998, 101(5) : 1163-1174.

[ 16 ] Weber C K, Liptay S, Wirth T, et al. Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta [J]. Gastroenterology, 2000, 119(5) : 1209-1218.

[责任编辑 张丰丰]