

表没食子儿茶素没食子酸酯对 IL-4 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞诱导型一氧化氮合酶和精氨酸酶-1 表达的影响

刘 敏,肖 鹏,李卫国,王坤英

(河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007)

摘 要:为探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对白介素-4(IL-4)刺激的巨噬细胞精氨酸酶 1(Arg-1)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达的影响.将 6~8 周龄 Balb/c 小鼠经无血清 DMEM 培养基刺激后,收集腹腔巨噬细胞用于体外培养.体外培养的巨噬细胞经 20 ng/mL IL-4 和不同浓度 EGCG 处理后,用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测 Arg-1 和 iNOS 的 mRNA 表达水平和含量.结果显示 IL-4 和 EGCG 单独处理均可显著刺激 Arg-1 的表达和抑制 iNOS 的表达,而 EGCG(12.5~50 μ M)增强 IL-4 刺激的 Arg-1 表达和 IL-4 对 iNOS 表达的抑制作用,且存在剂量依赖效应.上述结果提示 EGCG 以剂量依赖方式促进 IL-4 刺激的 Arg-1 表达、抑制 iNOS 的表达.

关键词:表没食子儿茶素没食子酸酯;腹腔巨噬细胞;精氨酸酶 1;诱导型一氧化氮合酶

中图分类号:Q291;Q786;R392.12

文献标志码:A

巨噬细胞作为先天性免疫的主要参与者,与炎症发生、宿主防御、创伤修复等病理生理过程密切相关.根据激活后的表型与功能不同,巨噬细胞被分为经典激活的巨噬细胞(classically activated macrophages, CAM 或 M1)和替代激活的巨噬细胞(alternatively activated macrophages, AAM 或 M2),这称之为巨噬细胞极化(macrophage polarization).M1 巨噬细胞由细菌脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)或 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)诱导产生,分泌肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和白介素-6(interleukin-6, IL-6)等促炎因子,发挥杀菌、促进机体防御和清除受损组织的作用;M2 巨噬细胞由 Th2 细胞因子 IL-4/IL-13 诱导产生,分泌白介素-10(interleukin-10, IL-10)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等抗炎因子,与伤口愈合、细胞增殖和肿瘤发生等生理病理过程相关^[1-3].此外,作为巨噬细胞极化的重要标志, M1 巨噬细胞高表达的诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)与 M2 型巨噬细胞高表达的精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1),可以相互竞争底物 L-精氨酸,产生不同的代谢物并对巨噬细胞的功能发挥不同的作用. iNOS 分解 L-精氨酸生成瓜氨酸和一氧化氮(nitric oxide, NO),在机体抵御细胞内病原体的感染中起到重要作用;Arg-1 催化 L-精氨酸生成多胺和脯氨酸,参与胶原的合成^[4-5].

研究显示表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)是绿茶多酚的主要活性成分,具有抗氧化、抗癌、抗炎等多种生物学作用^[6-8].有研究指出,在巨噬细胞中 EGCG 通过与细胞膜表面的 67 LR 结合,阻断 MAPK 和 NF- κ B 信号通路,进而降低炎症因子的表达,发挥抗感染、抗过敏、抗氧化、抗肿瘤等多种作用^[9].但是,EGCG 能否改变小鼠巨噬细胞内与精氨酸代谢相关的 Arg-1 和 iNOS 的表达,目前尚缺乏实验证据.因此,本研究拟以体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞为材料,运用实时荧光定量 PCR(real time quan-

收稿日期:2016-04-26;修回日期:2016-06-10.

基金项目:河南省科技攻关计划项目(122102310282)

第 1 作者简介:刘 敏(1991-),女,河南卫辉人,河南师范大学硕士研究生,研究方向为细胞免疫学,E-mail: 761486646@qq.com.

通信作者:李卫国(1963-),男,河南安阳人,河南师范大学教授,博士,主要从事细胞生理学与细胞免疫学研究,E-mail:liwg0618@htu.cn.

titative PCR, RT-qPCR)和酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),分析 EGCG 能否对 IL-4 刺激的巨噬细胞与精氨酸代谢相关的 Arg-1 和 iNOS 表达产生影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 Balb/c 小鼠,雌雄比为 1:1,6~8 周龄,体质量在 20~25g,购自新乡华兰生物工程股份有限公司。

1.2 主要试剂

DMEM 培养液购自北京索莱宝科技有限公司,血清购自浙江天杭生物科技有限公司,重组小鼠 IL-4 购自艾美捷科技有限公司,EGCG 购自成都普瑞法生物有限公司,RNA 提取试剂盒购自广州美基生物科技有限公司,cDNA 第一链合成试剂盒和 RT-qPCR 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司,RT-qPCR 引物由上海生物工程有限公司合成,小鼠 Arg-1 和 iNOS 的 ELISA 试剂盒购自北京冬歌博业生物科技有限公司。

1.3 小鼠腹腔巨噬细胞的分离与培养

小鼠腹腔巨噬细胞的分离参照尹美珍等^[10]方法略加修改。将收集的小鼠腹腔巨噬细胞离心弃上清后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM(含青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μ g/mL)悬浮细胞。经台盼兰染色计数后,调至实验所需细胞浓度 10^6 个/mL。将细胞铺于 6 孔培养板中,每孔 2 mL,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 12 h 后,用无血清培养基冲洗未贴壁细胞后继续培养过夜。

1.4 实验分组

实验分为对照组(仅加入无血清培养基),IL-4 处理组(无血清培养基中加 20 ng/mL IL-4),EGCG 处理组(无血清培养基中加 50 μ M EGCG),IL-4 和 EGCG 共处理组(无血清培养基中先加入不同浓度 EGCG 孵育 2 h 后,再加入 20 ng/mL IL-4 孵育)共 6 组,其中的 EGCG 浓度分别为 12.5 μ M、25 μ M 和 50 μ M。按上述分组,细胞孵育 24 h,每组均设置 6 个重复。孵育结束后,分组收集细胞,一部分细胞用于总 RNA 提取、反转录和 RT-qPCR 实验;另一部分细胞用于 ELISA 实验。

1.5 小鼠腹腔巨噬细胞 Arg-1 和 iNOS 基因表达的 RT-qPCR 分析

依照制造商提供的操作说明进行 RNA 提取、反转录和 RT-qPCR。将细胞收集后,加入适量的裂解液,4 $^{\circ}$ C 静置 5 min 后混匀,装入 Hipure DNA mini Column II 中,离心过滤去除 DNA。加乙醇至滤液中混匀,移入 Hipure RNA mini Column I 中,离心吸附 RNA。加 500 μ L 洗涤液至 RNA 柱中离心,弃滤出液,将 RNA 柱装入 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中,加 15-50 μ L 的 DEPC 水至 RNA 柱的膜中央,室温静置 1 min,离心后即得 RNA 提取液。检测 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光度(A)值,以确定 RNA 的纯度和浓度,并用琼脂糖凝胶电泳进一步检测 RNA 的完整性。

取质量为 500 ng 的 RNA 1 μ L,5 \times qRT superMix(内含逆转录反应所需的所有组分,buffer、dNTP Mix, Hiscript[®] Reverse Transcriptase, RNase inhibitor, Random primers/Oligo dT primer mix)2 μ L,加无 RNase 的 ddH₂O 至 10 μ L,严格依照反转录试剂盒说明书进行 cDNA 第一条链的合成。

Arg-1, iNOS 和 β -actin 基因的 PCR 扩增:按照标准荧光定量 PCR 引物设计原则,使用 primer 5.0 程序设计引物(表 1)。RT-qPCR 反应体系:10 μ L AceQ[™] qPCR SYBR[®] Green Master Mix, 0.4 μ L Primer 1 (10 μ M), 0.4 μ L Primer 2 (10 μ M), 0.4 μ L ROX Reference Dye 1, 2 μ L 模板 DNA, 加灭菌蒸馏水至 20 μ L。RT-qPCR 反应条件:目的基因和内参基因的反应条件相同,95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s, 40 个循环。依照制造商的操作说明在罗氏 Light Cycler[®] 96 荧光定量 PCR 仪上完成,实验数据按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算,并进行统计学分析。

1.6 小鼠腹腔巨噬细胞 Arg-1 和 iNOS 的 ELISA 分析

所有检测严格依照制造商提供的操作说明进行。各实验组细胞孵育结束后,弃培养液。用预热 PBS 清洗后,每孔加入 150 ~ 250 μ L 裂解液,4 $^{\circ}$ C 静置 30 min,将裂解后的样品按 10 000 ~ 14 000 g 离心 3~5 min,

取上清检测 Arg-1 和 iNOS 的含量. 制作标准曲线并依序测定样品的 A₄₅₀ 值, 计算出样品的实际浓度.

表1 小鼠腹腔巨噬细胞 β-actin, Arg-1 和 iNOS 基因引物设计

引物名称	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
β-actin	上游:CGTTGACATCCGTAAAGACCTC	183
	下游:AGCCACCGATCCACACAGA	
Arg-1	上游:CTTGGGAAGACAGCAGAGGAGGT	114
	下游:AAGGTAGTCAGTCCCTGGCTTATG	
iNOS	上游:CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	95
	下游:CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG	

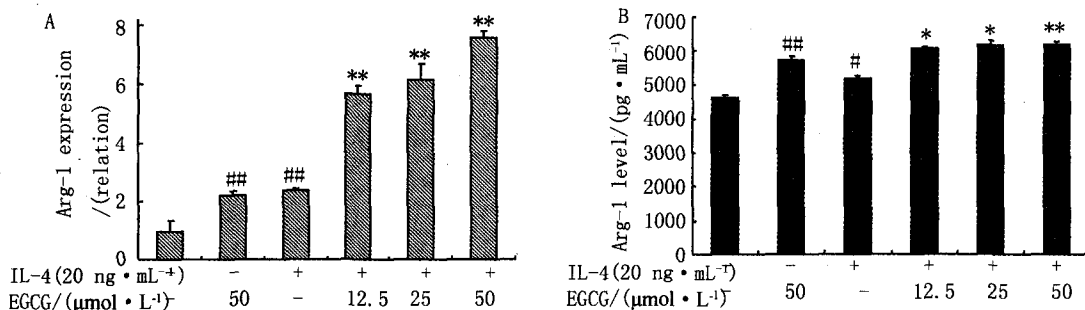
1.7 统计学分析

所有实验数据用均数±标准差表示, 统计处理用 SPSS14.0 软件进行单因素方差分析, Excel 作图, P<0.05 为显著差异, P<0.01 为极显著差异.

2 结果

2.1 EGCG 促进 IL-4 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞 Arg-1 表达和生成

RT-qPCR 检测结果显示, 体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞单纯用 20 ng/mL 的 IL-4 或 50 μM 的 EGCG 刺激后, 与对照组相比, Arg-1 的 mRNA 表达水平均显著上调, 分别升高 2.3 倍和 2.19 倍; 而用不同浓度 EGCG(12.5 μM, 25 μM 和 50 μM) 分别处理小鼠腹腔巨噬细胞 2 h 后, 再用 20 ng/mL IL-4 孵育 24 h, 与单纯用 IL-4 刺激相比, 其 Arg-1 的 mRNA 水平分别升高 2.4 倍、2.59 倍和 3.18 倍, 具有极显著差异. 这些结果表明 EGCG 能增强 IL-4 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞 Arg-1 基因表达, 且具有剂量依赖性(图 1A). ELISA 检测结果也显示, 体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞单纯用 20 ng/mL 的 IL-4 或 50 μM 的 EGCG 刺激后, 其 Arg-1 的蛋白水平分别为 5205 pg/mL 和 5735 pg/mL, 与对照组相比均升高, 存在显著性差异. 而用不同浓度 EGCG(12.5 μM, 25 μM 和 50 μM) 分别处理小鼠腹腔巨噬细胞 2 h 后, 再用 20 ng/mL IL-4 孵育 24 h; 结果显示, 与单纯用 IL-4 刺激相比, 其 Arg-1 含量随 EGCG 浓度增大而逐渐增大, 上升至 6068 pg/mL、6172 pg/mL 和 6210 pg/mL, 存在显著性差异和极显著性差异. 这些结果表明 EGCG 也能增强 IL-4 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞 Arg-1 的生成, 具有剂量依赖性(图 1B). 提示 EGCG 能够以剂量依赖方式增强 IL-4 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞 Arg-1 的基因表达和蛋白生成.



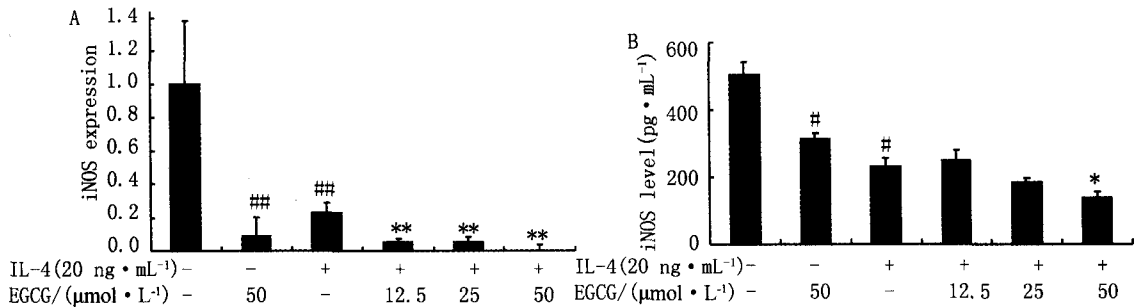
A. Arg-1 mRNA 相对表达量; B. Arg-1 蛋白生成量, #p<0.05, ##p<0.01 与对照组细胞相比; *P<0.05, **p<0.01, 与 IL-4 刺激组细胞相比.

图1 EGCG 对 IL-4 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞 Arg-1 表达与生成的影响

2.2 EGCG 增强 IL-4 抑制小鼠腹腔巨噬细胞 iNOS 的表达与生成

运用 RT-qPCR 和 ELISA 检测结果显示, 小鼠腹腔巨噬细胞单纯用 20 ng/mL 的 IL-4 或 50 μM 的 EGCG 刺激后, 与对照组相比, 均可极显著降低 iNOS mRNA 的相对表达水平和蛋白含量, 其中 mRNA 水平分别下降 4.34 倍和 12.5 倍; 蛋白含量分别下降 2.16 倍和 1.61 倍. 小鼠腹腔巨噬细胞先用不同浓度 EGCG(12.5 μM, 25 μM 和 50 μM) 处理 2 h 后, 再加入 20 ng/mL 的 IL-4 孵育 24 h, 则与单纯用 IL-4 处理

的小鼠腹腔巨噬细胞相比,其 iNOS 的 mRNA 水平显著下降,达到极显著差异,并随 EGCG 浓度增大,具有剂量依赖性;且在 50 μM 时, iNOS 的 mRNA 几乎检测不到(图 2A). 小鼠腹腔巨噬细胞用 12.5 μM 和 25 μM EGCG 处理后,再用 20 ng/mL IL-4 处理,其 iNOS 含量与单独用 IL-4 刺激相比未达到显著性差异;而 50 μM EGCG 处理后,再用 20 ng/mL IL-4 处理,其 iNOS 含量与 IL-4 组对比,达到显著性差异(图 2B). 上述结果提示 EGCG 以剂量依赖方式增强 IL-4 抑制的小鼠腹腔巨噬细胞 iNOS 的表达与生成.



A. iNOS mRNA 相对表达量; B. iNOS 蛋白生成量; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ 与对照组细胞相比; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与 IL-4 刺激组细胞相比.

图2 EGCG 增强 IL-4 抑制的小鼠腹腔巨噬细胞 iNOS 的表达与生成

3 讨论

目前的研究已经证实, M2 型巨噬细胞参与机体众多疾病的免疫及病理生理过程, 与病原微生物感染、肿瘤、超敏反应性疾病及创伤愈合等多种疾病具有相关性. IL-4 通过与 IL-4R α 结合, 使 p38MAPK 磷酸化, 激活 STAT6 和 PI3K 两条信号通路, 致巨噬细胞向 M2 型发生极化, 使 Arg-1 表达上调^[11]. 同时, IL-4 负调控 iNOS 的转录, 也依赖于激活 STAT6 信号通路, 抑制 IRF-1 的表达下调巨噬细胞炎症反应^[12]. EGCG 则通过与巨噬细胞膜表面的 67 LR 结合, 阻断 MAPK 和 NF- κ B 信号通路, 抑制炎症因子的表达, 发挥抗炎、抗肿瘤等多种作用^[9].

本研究中, 用 20 ng/mL 的 IL-4 刺激小鼠腹腔巨噬细胞后, Arg-1 的 mRNA 和蛋白表达显著增强, 这与 Jiménez^[11] 等人研究结果一致. 他们采用腹腔注射 3% 巯基乙酸 2.5 mL 以获得小鼠腹腔巨噬细胞, 20 ng/mL IL-4 刺激 6 h 后, Arg-1 mRNA 水平显著上调, 8~12 h 达到峰值. IL-4 刺激小鼠腹腔巨噬细胞引起 Arg-1 表达增强于 p38MAPK 和 PI3K 信号通路有关, 因为用 p38MAPK 和 PI3K 抑制剂预处理 30 min 后, 再用 IL-4 刺激, 则 Arg-1 的表达与不加抑制剂相比显著下调.

在本研究中, 50 μM EGCG 单独处理小鼠腹腔巨噬细胞可以显著增强 Arg-1 mRNA 和蛋白水平, 并且用 EGCG 预处理后再用 IL-4 孵育, Arg-1 mRNA 和蛋白水平较单独用 IL-4 处理进一步增强, 存在剂量依赖效应. 此外, 本研究结果显示用 IL-4 和 EGCG 单独刺激小鼠巨噬细胞均可抑制 iNOS 的表达, 这与 Hiroi 等人^[13] 的实验结果一致. 他们以小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 为材料, 先用 IL-4 预处理 30 min, 再用 IFN- γ /LPS 刺激 8 h, 然后用 RT-qPCR 检测 iNOS mRNA 水平; 或者用 IL-4 预处理 30 min, 再用 IFN- γ /LPS 刺激 48 h, 然后检测 NO 含量, 结果均显示 IL-4 可以抑制 iNOS mRNA 表达和 iNOS 蛋白生成. 本研究采用 IL-4 和 EGCG 共处理, 结果显示两者可以协同抑制 iNOS 的表达, 且存在剂量依赖效应. 这些结果均表明 EGCG 能够以剂量依赖方式增强 IL-4 刺激的 Arg-1 mRNA 表达和蛋白生成, 也能在 mRNA 和蛋白水平上抑制 iNOS 的表达.

参 考 文 献

- [1] Martinez F O, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27(1): 451-483.
- [2] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas[J]. J Clin Invest, 2012, 122(3): 787-795.

- [3] Mantovani A, Biswas S K, Galdiero M R, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling[J]. *J Pathol*, 2013, 229(2):176-185.
- [4] 朱琳楠,侯玉柱,赵勇.精氨酸酶I及诱生性一氧化氮合酶在巨噬细胞中的分子表达调控[J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(8):748-753.
- [5] He C, Carter A B. The metabolic prospective and redox regulation of macrophage polarization[J]. *J Clin Cell Immunol*, 2015, 6(6):371.
- [6] Singh R, Akhtar N, Haqqi T M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate: inflammation and arthritis [J]. *Life Sci*, 2010, 86(25/26):907-918.
- [7] Singh B N, Shankar S, Srivastava R K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications[J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82(12):1807-1821.
- [8] Riegsecker S, Wiczynski D, Kaplan M J, et al. Potential benefits of green tea polyphenol EGCG in the prevention and treatment of vascular inflammation in rheumatoid arthritis[J]. *Life Sci*, 2013, 93(8):307-312.
- [9] Hong B E, Fujimura Y K, Tachibana H. TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor[J]. *J Immunol*, 2010, 185(1):33-45.
- [10] 尹美珍,李世普,袁琳,等.小鼠腹腔巨噬细胞的分离培养与鉴定[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2006, 27(2):203-205.
- [11] Jimenez-Garcia L, Herránz S, Luque A, et al. Critical role of p38 MAPK in IL-4-induced alternative activation of peritoneal macrophages [J]. *European Journal of Immunology*, 2015, 45(1):273-286.
- [12] Coccia E M, Stellacci E, Marziali G, et al. IFN- γ and IL-4 differently regulate inducible NO synthase gene expression through IRF-1 modulation[J]. *International Immunology*, 2000, 12(7):977-985.
- [13] Hiroi M, Sakaeda Y, Yamaguchi H, et al. Anti-inflammatory cytokine interleukin-4 inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression in the mouse macrophage cell line RAW264.7 through the repression of octamer-dependent transcription[J]. *Mediators inflammation*, 2013(4300):162-171.

Influence of Epigallocatechin Gallate on Expression of Interleukin-4 Stimulated Arginase-1 and Inducible nitric oxide Synthase in Murine Peritoneal Macrophages in Vitro

LIU Min, XIAO Peng, LI Weiguo, WANG Kunying

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

Abstract: To investigate the influence of epigallocatechin gallate (EGCG), a main active constituent in gree tea polyphenals, on the expression of arginase-1 (Arg-1) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) stimulated by interleukin-4 (IL-4) *in vitro* murine peritoneal macrophages. The Balb/c mice with 6-8 weeks age were stimulated with serum-free DMEM medium through intraperitoneal injection, and peritoneal macrophages were collected to culture. After the cultured macrophages *in vitro* were treated with 20 ng/mL IL-4 and various dosage EGCG, respectively, both mRNA level and protein content of Arg-1 and iNOS were detected with RT-qPCR and ELISA *in cultured macrophages in vitro*. The results show that 20 ng/mL IL-4 or/and 12.5 ~ 50 μ mol/L EGCG alone facilitated the Arg-1 expression and suppressed iNOS expression, but EGCG up-regulated the Arg-1 expression elicited by IL-4 and down-regulated the iNOS expression, in dose-depended fashion. These results suggested that EGCG regulated the arginine metabolism in murine macrophages *in vitro*.

Keywords: epigallocatechin gallate (EGCG); peritoneal macrophage; arginase-1 (Arg-1); inducible nitric oxide synthase (iNOS)