· 实验研究 ·

番茄红素对脂多糖诱导巨噬细胞炎症反应影响*

冯丹，朱艳娜，王冬亮，尹逸，罗小琴，陈维清，凌文华

摘　要：目的　探讨番茄红素对脂多糖（LPS）所诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应的影响。**方法**　采用 Griess 法和酶联免疫吸附测定（ELISA）法检测一氧化氮（NO）和白介素-6（IL-6）的生成水平，半定量逆转录-聚合酶链反应（RT-PCR）和免疫印迹（Western-blot）法检测诱导型一氧化氮合酶（iNOS）和 IL-6 的基因表达量及 iNOS 的蛋白表达量。**结果**　番茄红素中、高剂量组 NO 分别生成（40.6 ± 1.5）、（26.6 ± 1.3）μmol/L，均明显低于阳性对照组的（56.3 ± 2.5）μmol/L（$F = 18.3$，$P < 0.01$）；番茄红素低、中、高剂量组 IL-6 分泌量分别为（508.3 ± 39.5）、（469.2 ± 66.9）、（335.5 ± 72.9）pg/mL，均明显低于阳性对照组的（603.4 ± 16.8）pg/mL（$F = 92.6$，$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），且其 iNOS 和 IL-6 基因及蛋白表达水平也均明显低于阳性对照组。**结论**　番茄红素能够降低 LPS 所诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中 iNOS、IL-6 及其产物 NO、IL-6 的表达水平，提示其可能对于治疗各种炎症相关性疾病如动脉粥样硬化等有着重要意义。

关键词：番茄红素；巨噬细胞；炎症；诱导型一氧化氮合酶（iNOS）；白介素-6（IL-6）

中图分类号：R 151.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-0580（2012）11-1460-03

Effects of lycopene on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in macrophages

FENG Dan, ZHU Yan-na, WANG Dong-liang, et al（*Key Laboratory of Diet and Health of Guangdong Province, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province* 510080, China）

Abstract: Objective　To investigate the effects of lycopene on inflammatory responses to lipopolysaccharide（LPS）in RAW264.7 macrophages. **Methods**　Reverse transcription-PCR（RT-PCR）was used to detect inducible nitric oxide synthase（iNOS）and interleukin-6（IL-6）gene expression. Western blot was used to analyze iNOS protein expression. Additionally, the LPS-induced nitric oxide（NO）and IL-6 release in macrophages were assayed with Griess and enzyme-linked immunosorbert assay（ELISA）. **Results**　The NO contents of moderate and high dose lycopene treatment groups were 40.6 ± 1.5 and 26.6 ± 1.3 μmol/L and significantly lower than that of control group（56.3 ± 2.5 μmol/L; $F = 18.3$, $P < 0.01$）. The contents of IL-6 were 508.3 ± 39.5, 469.2 ± 66.9, and 335.5 ± 72.9 pg/mL for low moderate, and high dose lycopene treatment groups, respectively, and significantly lower than that of the control group（603.4 ± 16.8; $F = 92.6$, $P < 0.05$）. Lycopene inhibited LPS-induced iNOS and IL-6 expression with NO and IL-6 release in macrophages. **Conclusion**　Lycopene can cause inhibition of LPS-induced iNOS and IL-6 at mRNA and protein levels together with the decreases in NO and IL-6 production, indicating that it can be used as a potential anti-inflammatory reagent to treat inflammatory-related diseases such as atherosclerosis.

Key words: lycopene; macrophage; inflammation; inducible nitric oxide synthase; interleukin-6

番茄红素是一种脂溶性的类胡萝卜素，广泛存在于番茄、胡萝卜、西瓜和番石榴等蔬菜和瓜果中，具有抗氧化、抗肿瘤和降胆固醇等多种生物活性[1]。有研究表明，血浆中番茄红素水平与一些慢性疾病如心血管疾病和癌症的发生率呈负相关[2-4]；炎症反应与一些慢性疾病如动脉粥样硬化、癌症的发生发展密切相关[5-6]，但番茄红素对炎症反应的调节作用目前尚不十分清楚。本研究拟通过建立脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型，探讨番茄红素对巨噬细胞炎症反应的影响，以了解番茄红素的抗炎作用。

* 基金项目：国家"十一五"科技支撑计划项目（2008BAI58B06）
作者单位：中山大学公共卫生学院广东省营养膳食与健康重点实验室，广东 广州 510080
作者简介：冯丹（1978 -），女，湖北广水人，讲师，博士，研究方向：慢性病营养防治与流行病学。
通讯作者：凌文华，E-mail: lingwh@mail.sysu.edu.cn

1　材料与方法

1.1　**材料**　RAW264.7 细胞株（武汉大学中国细胞典藏中心）；番茄红素、LPS、一氧化氮（nitric oxide，NO）检测试剂（美国 Sigma 公司）；ReverTra Ace-a-TM 试剂盒（日本 Toyobo 公司）；DNA 链合成试剂盒（日本 Takara 公司）；诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）抗体（美国 Santa Cruz 公司）；酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（比利时 Biosourse 公司）。

1.2　**方法**

1.2.1　**细胞培养及分组**　将 RAW264.7 细胞接种入 25 cm^2 细胞培养瓶，加入含 10% 胎牛血清的达尔伯克改良伊格尔培养基（Dulbecco's modified eagle medium，DMEM）培养基（青霉素 100 U/mL，链霉素 100 μg/mL）4 ~ 5 mL，置于 37 ℃ 细胞培养箱中，

5% CO_2、饱和湿度条件下培养。每 2 ~ 3 d 换液 1 次。用 0.25% 胰蛋白酶和 0.1% 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)混合消化液(1∶1)消化传代培养。实验时,更换新鲜培养基并分别加入终浓度为 1、5、10 μmol/L 的番茄红素孵育细胞 1 h,再加入终浓度为 1 μg/mL 的 LPS 处理细胞 24 h 作为高、中、低剂量组,0.1% 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)处理 25 h 作为空白对照组,而 0.1% DMSO 处理 1 h 后,再用 1 μg/mL LPS 处理细胞 24 h 作为阳性对照组,每组设定 3 个平行孔,结果取均值。

1.2.2　细胞内 iNOS、白介素-6(interleukin-6, IL-6) mRNA 表达 cDNA 第一链的合成参照 ReverTraAce-a-TM 试剂盒说明书进行。iNOS、IL-6 和 GAPDH 的 PCR 扩增引物由上海生工生物工程公司合成,其序列为: iNOS(F: 5′-TCACTGGGACAGCACAGA-AT-3′, R: 5′-TGTGTCTGCAGATGTGCTGA-3′); IL-6(F: 5′-CTGGTGACAACCACGGCCTTCCCTA-3′, R: 5′-TTGGATCACGCAATACGCATCGTA-3′); GAPDH(F: 5′-ATGACAACAGCCTCAAGATCATCAG-3′, R: 5′-CTGGTGGTCCAGGGGTCTTACTC-CT-3′)。PCR 反应条件为: 94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s [58 ℃ 30 s(iNOS); 60 ℃ 30 s(IL-6); 60 ℃ 30 s(GADPH)], 72 ℃ 1 min, 循环 30 次, 72 ℃ 10 min。取 PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳后凝胶成像系统上观察、拍照。

1.2.3　细胞内 iNOS 蛋白表达　采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹(Western blot)法[7]。

1.2.4　细胞中 NO 及 IL-6 表达水平　采用常规 Griess 法[8]检测 RAW264.7 巨噬细胞培养基中 NO 的含量; 参照说明书采用 ELISA 法检测 RAW264.7 巨噬细胞培养基中 IL-6 的含量。

1.3　统计分析　采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。多组均数比较采用方差齐性检验和单因素方差分析,各组间均数两两比较采用 Bonferroni 法。检验水准为 $P < 0.05$。

2　结　果

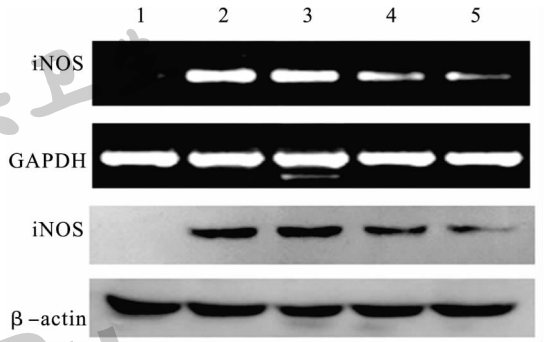
2.1　各组细胞 NO 和 IL-6 生成情况(表 1)　与空白对照组比较,阳性对照组 NO 和 IL-6 分泌量明显增加($F = 26.4$, $P < 0.001$); 番茄红素低剂量组 NO 分泌量与阳性对照组比较,差异无统计学意义,番茄红素中、高剂量组 NO 分泌量均明显低于阳性对照组($F = 18.3$, $P < 0.01$); 番茄红素低、中、高剂量组 IL-6 分泌量均明显低于阳性对照组($F = 92.6$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1　各组细胞培养基上清液中 NO、IL-6 含量

组别	μmol/L	NO(μmol/L)	IL-6(pg/mL)
空白对照组	0	8.2 ± 0.6	104.1 ± 22.5
阳性对照组	0	56.3 ± 2.5[a]	603.4 ± 16.8[a]
番茄红素低剂量组	1	54.3 ± 3.0	508.3 ± 39.5[b]
中剂量组	5	40.6 ± 1.5[c]	469.2 ± 66.9[c]
高剂量组	10	26.6 ± 1.3[c]	335.5 ± 72.9[c]

注: 与空白对照组比较, a $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, b $P < 0.05$, c $P < 0.01$。

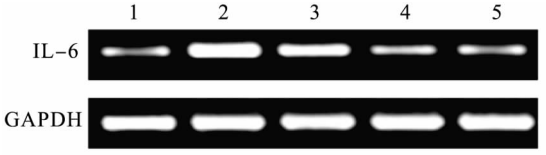
2.2　各组细胞 iNOS mRNA 和蛋白表达情况(图 1)　1、5、10 μmol/L 番茄红素均能降低 LPS 诱导 iNOS mRNA 和蛋白表达,且该作用具有浓度依赖性,表明番茄红素能够通过抑制 iNOS 表达而有效地降低炎症介质 NO 生成。



注: 1: 空白对照组; 2: 阳性对照组; 3 ~ 5: 番茄红素低、中、高剂量组。

图 1　各组细胞 iNOS mRNA 和蛋白表达情况

2.3　各组细胞 IL-6 mRNA 表达情况(图 2)　1、5、10 μmol/L 番茄红素均能明显抑制 LPS 诱导的 IL-6 mRNA 表达,表明番茄红素对 LPS 诱导 IL-6 分泌的抑制作用是通过下调 IL-6 的基因表达而发挥的。



注: 1: 空白对照组; 2: 阳性对照组; 3 ~ 5: 番茄红素低、中、高剂量组。

图 2　各组细胞 IL-6 mRNA 表达情况

3　讨　论

由 iNOS 合成的大量 NO 广泛参与了体内炎症反应和许多急性或慢性炎症性疾病的发生发展[9]。因此,阻断 iNOS 源性的 NO 产生,成为预防各种炎症紊乱性疾病的一个重要的手段,同时干扰 iNOS 源性 NO 的产生也成为众多天然或合成抗炎药物的作用靶点[10-12]。本研究结果表明,1 ~ 10 μmol/L 番茄红素均可明显抑制 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞 iNOS 基因和蛋白表达,有效地降低 NO 的生成。IL-6 不仅为动脉粥样硬化重要临床生物标志物,且由巨噬细胞生成的过量的 IL-6 参与了一些自

中国公共卫生 CPH

主性免疫疾病如类风湿性关节炎和代谢性疾病如肥胖及糖尿病的发生发展，相应的关于阻断 IL-6 生成的药物已应用于临床治疗中，并取得了良好的疗效[13]。本研究发现，番茄红素还能够明显降低 IL-6 这个关键促炎因子的分泌，且其抑制作用是发生在对 IL-6 基因转录水平上的调控。综上所述，番茄红素具有良好的抗炎作用，其中抑制巨噬细胞 iNOS 表达和 IL-6 分泌可能是其发挥抗炎效应和防治某些慢性炎性疾病的重要作用靶点。

参考文献

[1] Kong KW, Khoo HE, Prasad KN, et al. Revealing the power of the natural red pigment lycopene [J]. Molecules, 2010, 15(2): 959 – 987.

[2] Riccioni G. Carotenoids and cardiovascular disease [J]. Curr Atheroscler Rep, 2009, 11(6): 434 – 439.

[3] Rissanen T, Voutilainen S, Nyyssonen K, et al. Low plasma lycopene concentration is associated with increased intima-media thickness of the carotid artery wall [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(12): 2677 – 2681.

[4] Nkondjock A, Ghadirian P, Johnson KC, et al. Dietary intake of lycopene is associated with reduced pancreatic cancer risk [J]. J Nutr, 2005, 135(3): 592 – 597.

[5] Montecucco F, Mach F. Atherosclerosis is an inflammatory disease [J]. Semin Immunopathol, 2009, 31(1): 1 – 3.

[6] Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer [J]. Mutat Res, 2008, 659(1 – 2): 15 – 30.

[7] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids [J]. Anal Biochem, 1982, 126(1): 131 – 138.

[8] 郭红辉，胡艳，刘驰，等. 黑米花色苷对果糖喂养大鼠胰岛素敏感性影响 [J]. 中国公共卫生，2008，24(10): 1200 – 1202.

[9] Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation [J]. Life Sci, 2004, 75(6): 639 – 653.

[10] 王庆，刘驰，郭红辉，等. 花色苷抗炎抗肿瘤相关信号通路研究 [J]. 中国公共卫生，2009，25(7): 800 – 801.

[11] Pergola C, Rossi A, Dugo PC, et al. Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract [J]. Nitric Oxide, 2006, 15(1): 30 – 39.

[12] Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF-kappaB in macrophages by resveratrol [J]. Br J Pharmacol, 1999, 126(3): 673 – 680.

[13] Ding C, Cicuttini F, Li J, et al. Targeting IL-6 in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2009, 18(10): 1457 – 1466.

收稿日期：2011-02-08　　（王奕编辑　周欣琳校对）

中国公共卫生 CPH

· 实验研究 ·

茶多酚对代谢综合征大鼠血管通透性影响*

田翀，龙甲，张睿，任玮叶，应晨江

摘　要：目的　探讨绿茶多酚对高脂膳食诱导代谢综合征大鼠血管通透性升高的干预效果。**方法**　雄性 wistar 大鼠随机分为正常对照、高脂对照、茶多酚低、中、高剂量干预组，断乳后开始给予高脂饮食，达到成年体重后进行茶多酚干预，持续 30 周，测定大鼠体重、脂肪系数、血糖、血脂水平，采用伊文思蓝注射法测定大鼠血管通透性，硝酸根还原酶法测定大鼠血清一氧化氮（NO）水平，采用试剂盒测定内皮型一氧化氮合酶（eNOS）、诱导型一氧化氮合酶（iNOS）活性，制作血管冷冻切片，采用二氢乙啶荧光探针检测其活性氧分子（ROS）水平。**结果**　与对照组（0.16 ± 0.007）μg/mg 比较，高脂组大鼠血管通透性（0.19 ± 0.006）μg/mg 明显升高，与高脂组比较，低、中、高茶多酚组大鼠血管通透性【0.16 ± 0.004）、（0.14 ± 0.010）、（0.15 ± 0.010）μg/mg】明显降低；茶多酚组 ROS 水平明显低于高脂组；与高脂组比较，茶多酚明显上调 eNOS 活性，而下调 iNOS 活性。**结论**　绿茶多酚对代谢综合征大鼠血管通透性升高具有保护作用，其保护效应可能与减轻氧化损伤有关。

关键词： 茶多酚；代谢综合征；血管损伤；活性氧

中图分类号： R 151.1　　**文献标志码：** A　　**文章编号：** 1001-0580(2012)11-1462-03

Effect of green tea polyphenols on vascular hyperpermeability in rats with metabolic syndrome induced by high fat diet

TIAN Chong, LONG Jia, ZHANG Rui, et al (*Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province* 430030, China)

Abstract: Objective　To study the effect of green tea polyphenols (GTPs) on metabolic syndrome-related vascular hyperpermeability in rats. **Methods**　Male Wistar rats were randomly divided into 5 groups: normal control, high fat diet control, low, moderate, and high dose GTPs (100, 200, 400 mg/kg·bw·d) treated groups. GTPs intervention were applied when the body weight of the rats were up to 180 g. After 30 weeks, the permeability of aortic artery were measured with

* 基金项目：国家自然科学基金（30972473）

作者单位：华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系，湖北 武汉 430030

作者简介：田翀（1986 –），女，湖北长阳人，博士在读，研究方向：营养与食品卫生。

通讯作者：应晨江，E-mail: yingchenjiang@yahoo.com