

基于自噬角度探究 A2AR 对内毒素诱导的 Caco-2 肠上皮细胞炎性损伤的影响

陈 禹¹,王小吉²,李 合¹(海南医学院第一附属医院¹ 普通外科,² 肝胆外科,海口 570000)

摘要 目的 探究腺苷 A2A 受体(A2AR)对内毒素脂多糖(LPS)诱导的 Caco-2 肠上皮细胞炎性损伤的影响及机制。方法 首先将 Caco-2 细胞分为对照组、LPS 组(10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 处理 12 h)、A2AR 激动剂(CGS21680)组(10 $\mu\text{mol/L}$ CGS21680 预处理 10 min)、CGS21680 + LPS 组(10 $\mu\text{mol/L}$ CGS21680 预处理 10 min、10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 处理 12 h)、CCK-8 法测定各组细胞活力,ELISA 法测定各组细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)的分泌水平,实时荧光定量 PCR 检测各组细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA 表达水平,Western blot 分析各组细胞中自噬相关蛋白微管相关轻链蛋白 3(LC3)-II/LC3-I、自噬相关蛋白(Beclin1)的蛋白表达水平;再将 Caco-2 细胞分为对照组、LPS 组(10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 处理 12 h)、CGS21680 + LPS 组(10 $\mu\text{mol/L}$ CGS21680 预处理 10 min、10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 处理 12 h)、CGS21680 + LPS + 雷帕霉素(Rapa)组(10 $\mu\text{mol/L}$ CGS21680 预处理 10 min、10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 与 5 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 处理 12 h)、CCK-8 法测定各组细胞活力,ELISA 法测定各组细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的分泌水平。**结果** 与对照组比较,LPS 组 Caco-2 细胞活力显著降低($P < 0.05$),上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平显著升高($P < 0.05$),细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA 相对表达量均显著上调($P < 0.05$),并检测到 LC3-II/LC3-I 比值与 Beclin1 蛋白相对表达量显著上调($P < 0.05$);与 LPS 组比较,CGS21680 + LPS 组 Caco-2 细胞活力显著升高($P < 0.05$),上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平显著降低($P < 0.05$),细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA 相对表达量均显著下调($P < 0.05$),且 LC3-II/LC3-I 比值与 Beclin1 蛋白相对表达量显著下调($P < 0.05$);此外,与 CGS21680 + LPS 组比较,CGS21680 + LPS + Rapa 组 Caco-2 细胞活力又显著降低($P < 0.05$),上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平也显著升高($P < 0.05$)。**结论** 使用 A2AR 激动剂能够减轻内毒素 LPS 诱导的 Caco-2 肠上皮细胞炎性损伤,提高细胞活力,这可能与抑制自噬水平有关。

关键词 腺苷 A2A 受体;Caco-2 肠上皮细胞;炎症性肠病;脂多糖;细胞损伤;自噬

中图分类号 R 574

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1636-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.019

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种慢性、进行性和非特异性胃肠道炎症性疾病^[1]。近年来,我国 IBD 的发病率逐年增加,由其引发的结直肠癌患病风险也随之增加^[2]。内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌外膜的主要成分,越来越多的研究^[3-4]表明,LPS 刺激后可触发炎症信号级联反应,减少紧密连接蛋白的表达,导致肠道通透性增加并破坏肠上皮屏障功能。

腺苷是一种嘌呤核苷,通过代谢活跃的细胞释放到细胞外空间,并与其受体 A1、A2A、A2B 和 A3 结合,在各种病理生理过程中发挥重要作用^[5]。腺苷 A2A 受体(adenosine A2A receptor, A2AR)属于

Gs 蛋白偶联受体家族,是人肠上皮细胞中主要表达的腺苷受体。已知在动物 IBD 模型中,激活 A2AR 能够抑制慢性炎症并缓解内脏疼痛^[6]。但 A2AR 对肠上皮细胞炎症的调节作用及机制尚不明确。该研究以 Caco-2 肠上皮细胞为研究对象,通过内毒素 LPS 诱导 Caco-2 细胞模拟体外 IBD 模型,观察激活 A2AR 对肠上皮细胞炎性损伤的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 Caco-2 细胞购于中国科学院(上海)细胞库,A2AR 激动剂 CGS21680 购于上海联迈生物工程有限公司,自噬激活剂雷帕霉素(rapamycin, Rapa)购于北京康瑞纳生物科技有限公司,LPS 购于上海源叶生物科技有限公司,胎牛血清和 1% 青链霉素双抗购于美国 HyClone 公司,DMEM 培养基购于美国 Gibco 公司,CCK-8 试剂盒购于广

2024-08-25 接收

基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(编号:22A200079)

作者简介:陈 禹,男,本科,主治医师,通信作者,E-mail:sghytkorean@163.com

州赖德生物技术有限公司,肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的 ELISA 检测试剂盒购于武汉华美生物工程有限公司,TRIzol 试剂盒和 SuperScript VILO™ cDNA 合成试剂盒购于美国 Thermo 公司,2 × SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司,RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL plus 均购于上海碧云天生物研究所,兔抗 LC3 II/LC3- I 多克隆抗体和兔抗 Beclin1 多克隆抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司,兔抗 GAPDH 多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的二抗购于英国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、分组与处理 将 Caco-2 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液的 DMEM 培养基中,置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养,隔 2 d 换液 1 次,待 Caco-2 细胞生长至密度达 90% 时,消化收集细胞。Caco-2 细胞以 1 × 10⁵ 个/孔的密度种植于 96 孔板中,待完全贴壁后进行分组处理,具体分组处理如下:① 对照组,使用常规培养基培养细胞;② LPS 组,使用 10 μg/ml LPS 处理细胞 12 h;③ A2AR 激动剂 (CGS21680) 组,使用 10 μmol/L CGS21680 预处理细胞 10 min,换用常规培养基培养;④ CGS21680 + LPS 组,使用 10 μmol/L CGS21680 预处理细胞 10 min,换用 10 μg/ml LPS 处理细胞 12 h。

1.2.2 CCK-8 法测定细胞活力 将 Caco-2 细胞分组处理后,置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养,分别在培养 24、48、72 h 时,使用 CCK-8 法检测细胞活力,每孔加入 10 μl CCK-8,混匀后继续培养 2 h,采用多功能酶标仪测定波长 450 nm 处每孔细胞的光密度 (optical density, OD) 值,计算细胞活力,公式为:细胞活力 (%) = [OD 各处理组/OD 对照组] × 100%。

1.2.3 ELISA 法测定炎症细胞因子分泌水平 收集各处理组 Caco-2 细胞的培养上清液,采用 ELISA 法测定各样本上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平,严格按照相应试剂盒说明书操作。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测炎症相关基因的表达水平 收集按 1.2.1 项处理后的 Caco-2 细胞,PBS 洗涤后,加入适量 TRIzol 试剂液裂解细胞,提取总 RNA。进行 cDNA 第一链合成实验,按照 SuperScript VILO™ cDNA 合成试剂盒说明书,反转录合成

第一链 cDNA,保存于 -20 °C。Primer Premier 5 软件设计基因引物序列,采用 2 × SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒,配置反应体系对各目的基因序列进行扩增,反应条件为:95 °C 10 min,1 个循环;95 °C 15 s,60 °C 30 s,45 个循环。实验重复 3 次,以 β -actin 为内参,2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析各目的基因在细胞中的相对表达量。各基因使用的引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列

Tab.1 Sequence of gene primers

Gene	Sequence (5'-3')
TNF- α	F:ACGGCATGGATCTCAAAGAC R:TTGGTTGTAGAGGCCAAGGACCT
IL-1 β	F:GCTGCTCCAAACCTTTGAC R:AGCTTCTCCACAGCCACAAT
IL-6	F:CCGGAGAGGAGACTTCACAG R:CATTCCACGATTCCCAGA
β -actin	F:TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC R:TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG

1.2.5 Western blot 分析自噬相关蛋白表达 收集按 1.2.1 项处理后的 Caco-2 细胞,添加 RIPA 裂解液在 4 °C 下孵育细胞 20 min,以 12 000 r/min 离心 10 min,根据 BCA 法试剂盒说明书对蛋白浓度进行检测,煮沸 10 min 变性,取等量 30 μg 蛋白上样,通过电泳分离后转移到硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 30 min 后,与稀释后的一抗 (1 : 1 000) 于 4 °C 孵育过夜,使用的一抗分别为兔抗 LC3 II/LC3- I 多克隆抗体、兔抗 Beclin1 多克隆抗体。次日,TBST 充分洗膜,将膜与稀释后的辣根过氧化物酶标记的对应二抗 (1 : 5 000) 37 °C 孵育 2 h,TBST 洗膜后,ECL plus 显影,使蛋白条带可视化,通过 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,并以 GAPDH 为内参进行标准化处理,以目的蛋白灰度值与 GAPDH 蛋白灰度值的比值表示目的蛋白相对表达量。

1.2.6 自噬激活剂干预处理细胞 将 Caco-2 细胞以 1 × 10⁵ 个/孔的密度种植于 96 孔板中,置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养至完全贴壁后,进行如下分组处理:① 对照组,使用常规培养基培养细胞;② LPS 组,使用 10 μg/ml LPS 处理细胞 12 h;③ CGS21680 + LPS 组,使用 10 μmol/L CGS21680 预处理细胞 10 min,换用 10 μg/ml LPS 处理细胞 12 h;④ CGS21680 + LPS + Rapa 组,使用 10 μmol/L CGS21680 预处理细胞 10 min,换用 10 μg/ml LPS 与 5 μmol/L Rapa 处理细胞 12 h。结束后收集各组

细胞,采用 CCK-8 法测定细胞活力,具体方法同 1.2.2 项内容;并采用 ELISA 法测定各样本上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的分泌水平,具体方法同 1.2.3 项内容。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism(8.0.1 版)软件进行数据统计分析并制作统计图。所有数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组数据差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较进行 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A2AR 激动剂抑制 LPS 导致的 Caco-2 细胞活力下降 CCK-8 检测结果显示,在 24、48、72 h 同一时间点下,4 组 Caco-2 细胞的活力差异均有统计学意义($F_{24\text{h}} = 568.342, P < 0.001; F_{48\text{h}} = 679.026, P < 0.001; F_{72\text{h}} = 895.451, P < 0.001$)。LPS 组 Caco-2 细胞活力显著低于对照组($P < 0.05$),CGS21680 组 Caco-2 细胞活力与对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$);与 LPS 组比较,CGS21680 + LPS 组 Caco-2 细胞活力显著升高($P < 0.05$)。见图 1。

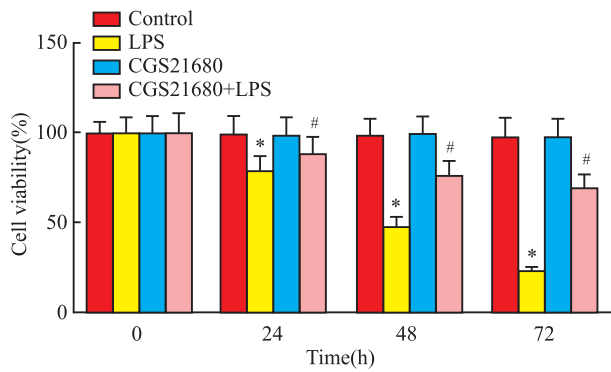


图 1 不同时间点各组 Caco-2 细胞活力检测结果

Fig.1 Results of Caco-2 cell viability detection at different time points in each group

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs LPS group.

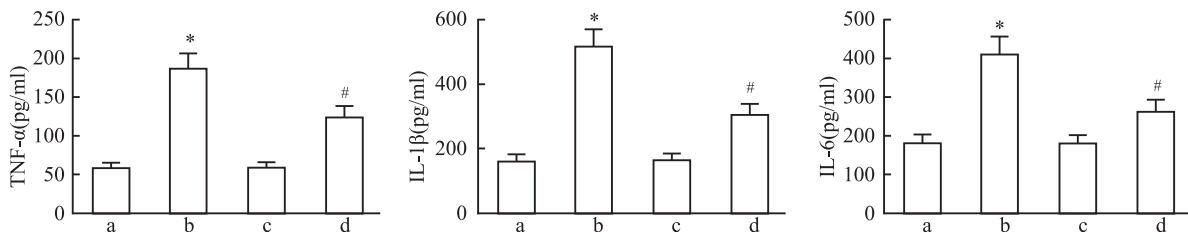


图 2 各组 Caco-2 细胞炎症细胞因子分泌水平检测结果

Fig.2 The results of inflammatory cytokine secretion levels of Caco-2 cells in each group

a: Control; b: LPS; c: CGS21680; d: CGS21680 + LPS; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs LPS group.

2.2 A2AR 激动剂抑制 LPS 导致的 Caco-2 细胞炎症因子分泌水平升高 ELISA 测定结果显示,4 组 Caco-2 细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平差异均有统计学意义($F = 441.173, P < 0.001; F = 832.405, P < 0.001; F = 724.226, P < 0.001$)。与对照组比较,LPS 组 Caco-2 细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平显著升高($P < 0.05$),CGS21680 组 Caco-2 细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平差异均无统计学意义($P > 0.05$);与 LPS 组比较,CGS21680 + LPS 组 Caco-2 细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平显著降低($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 A2AR 激动剂抑制 LPS 导致的 Caco-2 细胞炎症相关基因表达水平上调 实时荧光定量 PCR 检测结果显示,4 组 Caco-2 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA 相对表达量差异均有统计学意义($F = 97.742, P < 0.001; F = 170.526, P < 0.001; F = 134.558, P < 0.001$)。与对照组比较,LPS 组 Caco-2 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA 相对表达量均显著上调($P < 0.05$),CGS21680 组 Caco-2 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA 相对表达量差异均无统计学意义($P > 0.05$);与 LPS 组比较,CGS21680 + LPS 组 Caco-2 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA 相对表达量显著下调($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 A2AR 激动剂改善 LPS 导致的 Caco-2 细胞自噬过度 Western blot 分析结果显示,4 组 Caco-2 细胞中 LC3-II/LC3-I 比值与 Beclin1 蛋白相对表达量差异均有统计学意义($F = 68.935, P < 0.001; F = 112.176, P < 0.001$)。与对照组比较,LPS 组 Caco-2 细胞中 LC3-II/LC3-I 比值与 Beclin1 蛋白相对表达量显著上调($P < 0.05$),而 CGS21680 组 Caco-2 细胞中 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin1 蛋白相对表达量差异无统计学意义($P > 0.05$);与 LPS 组比较,CGS21680 + LPS 组 Caco-2 细胞中 LC3-II/LC3-I 比值与 Beclin1 蛋白相对表达量显著下调($P < 0.05$)。见图 4。

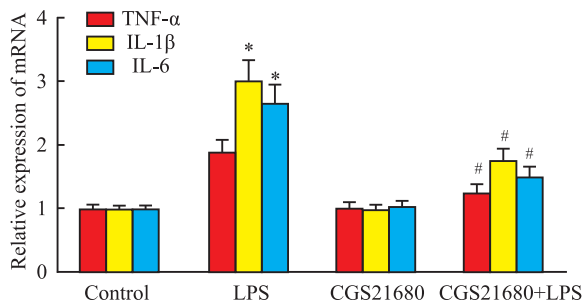


图3 各组 Caco-2 细胞中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的 mRNA 表达检测结果

Fig.3 The results of mRNA expression of TNF-α, IL-1β, IL-6 in Caco-2 cells in each group

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs LPS group.

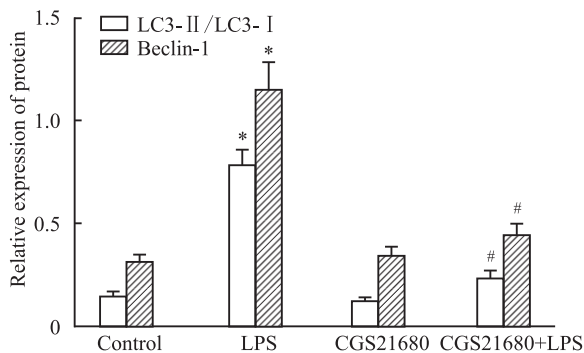
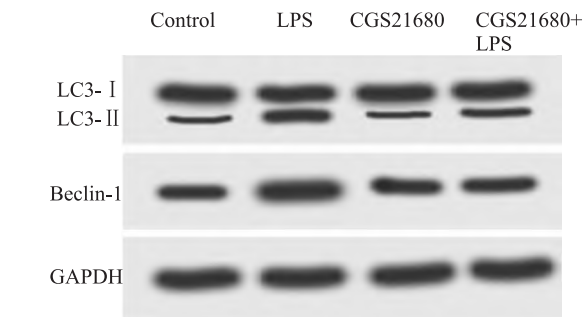


图4 各组 Caco-2 细胞中 LC3-II/LC3-I 比值与 Beclin1 蛋白表达检测结果

Fig.4 The results of LC3-II/LC3-I ratio and Beclin1 protein expression in Caco-2 cells in each group

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs LPS group.

2.5 验证自噬在 A2AR 激动剂改善 LPS 导致的 Caco-2 细胞炎性损伤中的作用 CCK-8 法检测结果显示,在同一时间点下,4 组 Caco-2 细胞的活力差异均有统计学意义 ($F_{24h} = 587.532, P < 0.001; F_{48h} = 712.096, P < 0.001; F_{72h} = 887.684, P < 0.001$)。与对照组比较,LPS 组 Caco-2 细胞活力显著降低 ($P < 0.05$);与 LPS 组比较,CGS21680 + LPS 组 Caco-2 细胞活力显著升高 ($P < 0.05$);而 CGS21680 + LPS + Rapa 组 Caco-2 细胞活力又显著低于 CGS21680 +

LPS 组 ($P < 0.05$)。见图 5。

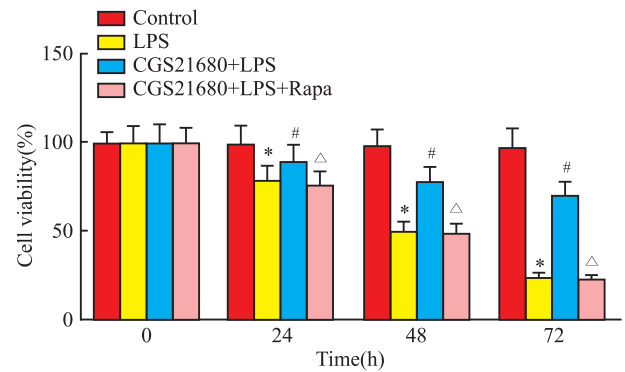


图5 自噬激活剂干预下不同时间点各组 Caco-2 细胞活力检测结果

Fig.5 The results of Caco-2 cell viability detection in each group at different time points under the intervention of autophagy activator

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs LPS group; Δ $P < 0.05$ vs CGS21680 + LPS group.

ELISA 法检测结果显示,4 组 Caco-2 细胞上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的水平差异均有统计学意义 ($F = 488.507, P < 0.001; F = 925.693, P < 0.001; F = 718.046, P < 0.001$)。LPS 组 Caco-2 细胞上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的水平较对照组显著升高 ($P < 0.05$);CGS21680 + LPS 组细胞上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的水平较 LPS 组显著降低 ($P < 0.05$);CGS21680 + LPS + Rapa 组细胞上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的水平则显著高于 CGS21680 + LPS 组 ($P < 0.05$)。见图 6。

3 讨论

IBD 病因和发病机制复杂,包括环境、遗传、免疫因素以及肠道微生物群。肠上皮细胞是肠上皮组织的关键组成部分,维持着肠道物理屏障,有助于防止病原体、毒素和过敏原从胃肠道腔进入循环系统,在机体防御功能中起着重要作用^[7]。肠道通透性的增加会导致免疫稳态的破坏和肠道炎症的增加,从而加重或延续危重疾病,因此,保护肠道屏障是维持胃肠道健康的重要治疗策略。LPS 作为炎症反应的关键介质,可激活促炎细胞因子如 TNF-α、IL-1β、IL-6 等释放,造成肠上皮屏障损伤^[8]。TNF-α 是一种中枢促炎细胞因子,参与 IBD 的发病机制,其在体内外均可降低肠黏膜间紧密连接蛋白的表达,导致肠上皮细胞通透性增加^[9]。在肠黏膜损伤期间,IL-1β 通过刺激 T 细胞增殖触发局部黏膜中的免疫应答,并将中性粒细胞募集到损伤或感染部位,诱导其他促炎细胞因子和趋化因子的产生与释放,加重

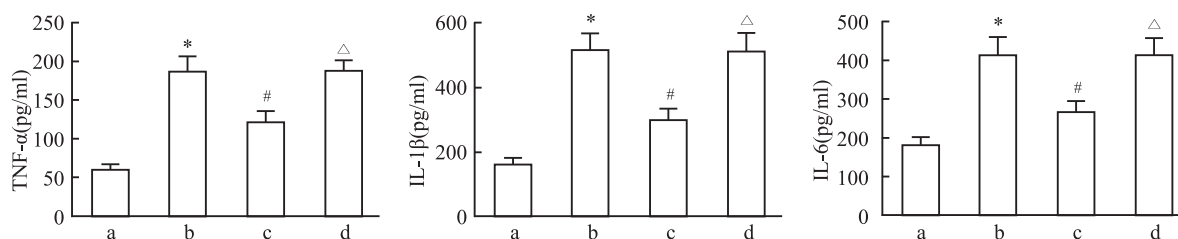


图6 各组 Caco-2 细胞炎症细胞因子分泌水平检测结果

Fig. 6 The results of inflammatory cytokine secretion levels of Caco-2 cells in each group

a: Control; b: LPS; c: CGS21680 + LPS; d: CGS21680 + LPS + Rapa; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs LPS group; ^ $P < 0.05$ vs CGS21680 + LPS group.

肠道炎症反应^[10]。IL-6 作为一种多效性促炎细胞因子,在 IBD 患者结肠黏膜和血清中其水平明显升高,并与肠屏障功能障碍和肠上皮细胞凋亡有关^[11]。本研究结果显示,经过 LPS 诱导的 Caco-2 细胞活力显著降低,细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平显著升高,细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA 相对表达量均显著上调,这与先前的研究^[12]结果一致,由此进一步说明 LPS 诱导肠上皮细胞发生炎性损伤的作用。

A2AR 是腺苷受体的一种特殊亚型,其作用与其他三种亚型不同。在缺血性结肠炎大鼠结肠组织中 A2AR 表达升高,而使用聚脱氧核糖核苷酸 (polydeoxyribonucleotide, PDRN) 进一步提高了 A2AR 表达,从而抑制炎症因子和环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 表达,对缺血性结肠炎具有治疗效果^[13];艾灸可增加 UC 模型小鼠结肠组织中 A2AR 的表达,此外,A2AR 激动剂可增强肠上皮细胞的细胞活力,抑制细胞炎性因子 TNF- α 和 IL-6 的产生,这可能进一步影响嘌呤核苷酸代谢途径,减轻 UC 小鼠肠道炎症^[14]。在本研究中,使用 A2AR 激动剂 CGS21680 处理再经 LPS 诱导后,Caco-2 细胞活力显著升高,细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平显著降低,细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA 相对表达量也均显著下调。由此说明,在 LPS 诱导的炎性损伤下,A2AR 能提高肠上皮细胞活力,降低细胞炎性因子释放水平,对肠上皮细胞起到保护作用。

自噬是一个动态的细胞内降解过程,该过程可将过量、受损或老化的蛋白质和细胞内病原体隔离在称为“自噬体”的双膜囊泡中,以维持细胞稳态并适应不利环境^[15]。自噬与炎症之间存在相互调节作用,功能性自噬的丧失会促进炎症小体活化和炎

症因子的分泌,从而导致对炎症的易感性更高^[16]。越来越多的研究^[17-18]证据表明,自噬失调与 IBD 发生及进展有关,可能是 IBD 治疗的新靶点。自噬的过度激活伴随着肠道炎症反应和肠上皮损伤,促进了肠上皮细胞的凋亡和促炎细胞因子的产生^[19]。LPS 是肠上皮细胞自噬的主要引发剂,并促进细胞损伤和凋亡^[20]。本研究结果显示,经过 LPS 诱导的 Caco-2 细胞中,自噬标志物 LC3-II/LC3-I 比值与 Beclin1 蛋白相对表达量显著上调,提示 LPS 促进 Caco-2 细胞自噬,这与先前的研究^[21-22]结果一致。而本研究通过进一步检测发现,A2AR 激动剂 CGS21680 处理再经 LPS 诱导的 Caco-2 细胞中自噬标志物 LC3-II/LC3-I 比值与 Beclin1 蛋白相对表达量显著下调,因此推测,A2AR 改善肠上皮细胞炎性损伤的作用可能与抑制过度自噬有关。为了验证该结论,本研究在 A2AR 激动剂 CGS21680 处理再经 LPS 诱导的同时,加入自噬激活剂 Rapa 进行干预,经检测发现,此处理下 Caco-2 细胞活力显著下降,同时细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平显著升高。该结果表明了 A2AR 通过抑制肠上皮细胞过度自噬,从而减轻 LPS 诱导下肠上皮细胞的炎性损伤。

综上所述,本研究表明在内毒素 LPS 诱导的 Caco-2 肠上皮细胞损伤模型中,使用 A2AR 激活剂处理能够提高 Caco-2 肠上皮细胞活力,降低促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平,该作用可能与其抑制细胞过度自噬有关。但关于 A2AR 对肠黏膜屏障功能及其能否在体内对肠道黏膜炎性反应起到改善效应,均有待后续进行实验研究。

参考文献

[1] 余畋余,刘道利,汪朝晖,等.肥大细胞调节巨噬细胞极化在炎

- 症性肠病中的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(7): 1152-8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.015.
- [1] Yu T Y, Liu D L, Wang C H, et al. Mast cells regulate inflammatory bowel disease by mediating macrophage polarization [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(7): 1152-8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.015.
- [2] 包云丽, 汪哲, 唐海茹, 等. 1990—2019年中国炎症性肠病疾病负担及变化趋势分析[J]. *中国全科医学*, 2023, 26(36): 4581-6. doi:10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0220.
- [2] Bao Y L, Wang Z, Tang H R, et al. Disease burden and variation tendency of inflammatory bowel disease in China from 1990 to 2019[J]. *Chinese General Practice*, 2023, 26(36): 4581-6. doi:10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0220.
- [3] Gorman A, Golovanov A P. Lipopolysaccharide structure and the phenomenon of low endotoxin recovery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2022, 180: 289-307. doi: 10.1016/j.ejpb.2022.10.006.
- [4] Candelli M, Franza L, Pignataro G, et al. Interaction between lipopolysaccharide and gut microbiota in inflammatory bowel diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6242. doi: 10.3390/ijms22126242.
- [5] Czopik A, Yuan X, Evans S E, et al. Targeting the hypoxia-adenosine link for controlling excessive inflammation [J]. *Anesthesiology*, 2021, 135(1): 15-7. doi: 10.1097/ALN.0000000000003841.
- [6] Hou T, Xiang H, Yu L, et al. Electroacupuncture inhibits visceral pain *via* adenosine receptors in mice with inflammatory bowel disease [J]. *Purinergic Signal*, 2019, 5(2): 193-204. doi: 10.1007/s11302-019-09655-4.
- [7] Oda M, Hatano Y, Sato T. Intestinal epithelial organoids: regeneration and maintenance of the intestinal epithelium [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2022, 76: 101977. doi: 10.1016/j.gde.2022.101977.
- [8] Mohammad S, Thiemermann C. Role of metabolic endotoxemia in systemic inflammation and potential interventions [J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 594150. doi: 10.3389/fimmu.2020.594150.
- [9] Wang J, Macoritto M, Guay H, et al. The clinical response of upadacitinib and risankizumab is associated with reduced inflammatory bowel disease anti-TNF- α inadequate response mechanisms [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2023, 29(5): 771-82. doi: 10.1093/ibd/izac246.
- [10] Mao L, Kitani A, Strober W, et al. The role of NLRP3 and IL-1 β in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2566. doi: 10.3389/fimmu.2018.02566.
- [11] Unger L W, Kaser A. Is IL-6 back in trans signaling for inflammatory bowel disease? [J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(7): 2247-9. doi: 10.1053/j.gastro.2021.03.030.
- [12] Li A, Zhang C, Chi H, et al. 2'-Fucosyllactose promotes *Lactobacillus rhamnosus* KLDS 8001 to repair LPS-induced damage in *Caco-2* cells [J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(5): e14059. doi:10.1111/jfbc.14059.
- [13] Kim S E, Ko I G, Jin J J, et al. Polydeoxyribonucleotide exerts therapeutic effect by increasing VEGF and inhibiting inflammatory cytokines in ischemic colitis rats [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 2169083. doi: 10.1155/2020/2169083.
- [14] Zhu Y, Zhuang Z, Wu Q, et al. CD39/CD73/A2a adenosine metabolic pathway: targets for moxibustion in treating DSS-induced ulcerative colitis [J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(3): 661-76. doi: 10.1142/S0192415X21500300.
- [15] Klionsky D J, Petroni G, Amaravadi R K, et al. Autophagy in major human diseases [J]. *EMBO J*, 2021, 40(19): e108863. doi: 10.15252/embj.2021108863.
- [16] Larabi A, Barnich N, Nguyen H T T. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD [J]. *Autophagy*, 2020, 16(1): 38-51. doi: 10.1080/15548627.2019.1635384.
- [17] Dowdell A S, Colgan S P. Metabolic host-microbiota interactions in autophagy and the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14(8): 708. doi: 10.3390/ph14080708.
- [18] 杨文盛, 吴委, 王静林, 等. 自噬调节策略在炎症性肠病临床前研究中的进展 [J]. *药学报*, 2023, 58(1): 1-8. doi: 10.16438/j.0513-4870.2022-0836.
- [18] Yang W S, Wu W, Wang J L, et al. Autophagy-regulated strategies in pre-clinical studies of inflammatory bowel disease [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 58(1): 1-8. doi: 10.16438/j.0513-4870.2022-0836.
- [19] Su W, Chen Y, Cao P, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes the development of ulcerative colitis by inducing the autophagic cell death of intestinal epithelial [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 594806. doi: 10.3389/fcimb.2020.594806.
- [20] Han C, Ding Z, Shi H, et al. The role of probiotics in lipopolysaccharide-induced autophagy in intestinal epithelial cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(6): 2464-78. doi: 10.1159/000445597.
- [21] Feng Y, Wang Y, Wang P, et al. Short-chain fatty acids manifest stimulative and protective effects on intestinal barrier function through the inhibition of NLRP3 inflammasome and autophagy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(1): 190-205. doi: 10.1159/000492853.
- [22] Li Y, Wang S, Gao X, et al. Octreotide alleviates autophagy by up-regulation of microRNA-101 in intestinal epithelial cell line *Caco-2* [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(4): 1352-63. doi: 10.1159/000493413.

To explore the effect of A2AR on endotoxin-induced inflammatory injury of Caco-2 intestinal epithelial cells from the perspective of autophagy

Chen Yu¹, Wang Xiaoji², Li He¹

(¹Dept of General Surgery, ²Dept of Hepatobiliary Surgery,

The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570000)

Abstract *Objective* To explore the effect and mechanism of adenosine A2A receptor (A2AR) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory injury of Caco-2 intestinal epithelial cells. *Methods* Caco-2 cells were divided into control group, LPS group (treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 12 h), A2AR agonist (CGS21680) group (pretreated with 50 nmol/L CGS21680 for 10 min), CGS21680 + LPS group (pretreated with 50 nmol/L CGS21680 for 10 min, treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 12 h), cell viability was determined using CCK-8 assay, the secretion levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) in cell supernatant of each group were determined using ELISA. mRNA expression levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in cells of each group were detected by real-time fluorescence quantitative PCR, the protein expression levels of microtubule associated light chain protein 3 (LC3)-II/LC3-I and autophagy associated protein (Beclin1) in cells of each group were analyzed using Western blot analysis. Caco-2 cells were then divided into control group, LPS group (pretreated with 50 nmol/L CGS21680 for 10 min), CGS21680 + LPS group (pretreated with 50 nmol/L CGS21680 for 10 min, treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 12 h), CGS21680 + LPS + Rapa group (pretreated with 50 nmol/L CGS21680 for 10 min, treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS and 5 $\mu\text{mol/L}$ Rapa for 12 h), cell viability was determined using CCK-8 assay, the secretion levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in cell supernatant of each group were determined using ELISA. *Results* Compared with the control group, the viability of Caco-2 cells in LPS group significantly decreased ($P < 0.05$), the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in supernatant significantly increased ($P < 0.05$), the mRNA relative expressions of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in cells significantly increased ($P < 0.05$), the LC3-II/LC3-I ratio and the relative expression of Beclin1 protein were significantly up-regulated ($P < 0.05$). Compared with LPS group, the viability of Caco-2 cells in CGS21680 + LPS group significantly increased ($P < 0.05$), the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in supernatant significantly decreased ($P < 0.05$), the mRNA relative expression levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in cells were significantly down-regulated ($P < 0.05$), and the ratio of LC3-II/LC3-I and the relative expression of Beclin1 protein were significantly down-regulated ($P < 0.05$). In addition, compared with CGS21680 + LPS group, the viability of Caco-2 cells in CGS21680 + LPS + Rapa group significantly decreased ($P < 0.05$), and the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the supernatant also significantly increased ($P < 0.05$). *Conclusion* A2AR agonist can reduce the inflammatory injury of Caco-2 intestinal epithelial cells induced by LPS and improve cell viability, which may be related to its inhibition of autophagy.

Key words adenosine A2A receptor; Caco-2 intestinal epithelial cells; inflammatory bowel disease; lipopolysaccharide; cell damage; autophagy

Fund program Healthcare Scientific Research Project in Hainan Province(No. 22A200079)

Corresponding author Chen Yu, E-mail: sghytkorean@163.com