

Efectos antiinflamatorios del extracto seco de hojas de hiedra: influencia en la actividad transcripcional del factor de transcripción nuclear kappa B (NFκB, por sus siglas en inglés)

Janka Schulte - Michels¹ · Christina Keksel¹ · Hanns Häberlein¹ · Sebastian Franken¹

Recibido el 31 de enero de 2018/Aceptado el 2 de mayo de 2018
©The Author(s) 2018

Resumen

EA 575[®] es un extracto seco de hojas de hiedra (DER 5-7.5:1, 30% de etanol) utilizado contra las enfermedades del tracto respiratorio inferior asociadas con la tos productiva. EA 575[®] mejora los síntomas asociados con enfermedades bronquiales inflamatorias crónicas. En comparación con sus propiedades broncoespasmodolíticas y secretolíticas, los efectos antiinflamatorios de EA 575[®] casi no se han evaluado. Por lo tanto, abordamos la cuestión de si el efecto antiinflamatorio de EA 575[®] se debe a un impacto en la ruta del NFκB. La translocación nuclear del NFκB se visualizó mediante inmunofluorescencia en las células J774. 2 y HEK293. En esta última, se utilizó un indicador basado en luciferasa para monitorear la actividad transcripcional del NFκB. La fosforilación de RelA y su inhibidor IκB se midieron mediante análisis Western Blot. Además, los cambios en la estabilidad del complejo NFκB:IκB se mostraron mediante la complementación del fragmento de proteína. La actividad transcripcional disminuida del NFκB bajo tratamiento con EA 575[®] también se demostró para una línea celular epitelial de pulmón humana y monocítica. EA 575[®] es capaz de inhibir la actividad transcripcional del NFκB mediante la inhibición parcial de su translocación al núcleo después de la estimulación con TNFα. Además, la fosforilación de IκBα se reduce, mientras que la fosforilación de RelA mejora después de la preincubación con EA 575[®], lo que da como resultado una mayor estabilidad del complejo NFκB: IκBα. EA 575[®] tiene un impacto regulador en la ruta del NFκB, posiblemente al cambiar la especificidad de IKK de IκBα a RelA, lo que resulta en una mayor estabilidad del complejo NFκB: IκBα y una translocación de RelA reducida en el núcleo.

Palabras clave: NFκB · Hedera helix · Receptor β₂-Adrenérgico · Inflamación de las vías respiratorias · EA 575[®]

Introducción

EA 575[®] es un extracto seco de hojas de hiedra (DER 5-7.5: 1, 30% de etanol) que se utiliza para mejorar los síntomas asociados con afecciones bronquiales inflamatorias crónicas y la inflamación aguda del tracto respiratorio acompañada de tos. Sus efectos broncoespasmodolíticos y secretolíticos han sido probados en estudios clínicos (Lang et al. 2015). El mecanismo de acción se basa en una mayor capacidad de respuesta β₂-adrenérgica del tracto respiratorio mediada por la inhibición de la fosforilación mediada por GRK2 de los receptores β₂-adrenérgicos activados, lo que resulta en una disminución de la internalización de los receptores β₂-adrenérgicos bajo condiciones estimulantes (Sieben et al. 2009; Schulte- Michels et al. 2016b). El efecto antiinflamatorio de EA 575[®] es menos examinado. Como hemos demostrado anteriormente,

EA 575[®] puede reducir la liberación de IL-6 inducida por LPS de los macrófagos murinos (J774. 2) (Schulte-Michels et al. 2016a). Además de los hallazgos de los experimentos de cultivo celular, también hay una creciente evidencia de modelos animales con respecto al efecto antiinflamatorio de los constituyentes de las hojas de hiedra helix. La rutina y el ácido clorogénico reducen el edema plantar inducido por carragenina en ratas (Selloum et al. 2003; dos Santos et al. 2006). La rutina también inhibe los estados de artritis aguda y crónica en ratas (Guardia et al. 2001). A través de un modelo de ratón de asma alérgica inducida por ovoalbúmina, se demostró que el ácido clorogénico reduce la síntesis de citoquinas específicas de las células IgE y Th2 como la IL-4 y la IL-5 (Kim et al. 2010). Además, el ácido clorogénico protege a los ratones contra la lesión pulmonar inducida por LPS (Zhang et al. 2010).

Hocaoglu et al. (2012) demostraron que un extracto seco de hojas de hiedra mostró propiedades antiinflamatorias en un modelo de asma inducido crónico en ratones (Hocaoglu et al. 2012). En comparación con el placebo, el recuento de células caliciformes fue significativamente menor y el grosor de la membrana basal se redujo en los estudios histopatológicos de pulmón cuando los ratones se trataron por vía oral con el extracto seco de hojas de hiedra. Süleyman y colaboradores también encontraron

✉ Sebastian Franken
sfranken@uni-bonn.de

¹ Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Rheinische Friedrich-Wilhelms-University, Nussallee 11, 53115 Bonn, Alemania

un efecto antiinflamatorio para un extracto de hiedra enriquecido con saponinas en pellet de algodón e inflamación aguda y crónica inducida por carragenina en ratas (Süleyman et al.2003).

Un aspecto importante de casi todos los procesos inflamatorios es el factor de transcripción NFκB. En condiciones no estimulantes, el NFκB se mantiene inactivo en el citosol mediante complejación con su inhibidor IκBα. La estimulación de, por ejemplo, macrófagos con TNFα o LPS activa la quinasa IκB (IKK), que a su vez fosforila a IκBα, dando como resultado una división del complejo NFκB:IκBα. El NFκB liberado puede así ser translocado en el núcleo, donde induce la transcripción de diferentes citoquinas (Hayden y Ghosh 2012). Debido a su relevancia para los procesos inflamatorios, cuestionamos si la liberación reducida de IL-6 de los macrófagos murinos pretratados con EA 575® podría ser causada por un impacto en la ruta del NFκB.

En este documento describimos la influencia de EA 575® en la actividad transcripcional del NFκB en diferentes líneas celulares derivadas del sistema inmune y epitelial utilizando un sistema celular indicador de Nanoluc. La translocación nuclear del NFκB después de la estimulación de TNFα se examina mediante microscopía de inmunofluorescencia; la fosforilación de IκBα y la estabilidad del complejo NFκB:IκBα se investigan mediante análisis Western Blot y un ensayo de complementación de fragmentos de proteínas, respectivamente. Nuestro objetivo es elucidar el modo de acción antiinflamatorio del extracto seco de hojas de hiedra EA575®, y comprender mejor su efecto benéfico en las condiciones bronquiales inflamatorias crónicas.

Materiales y métodos

Químicos

El ensayo de Luciferasa Nano-Glo® se obtuvo de Promega (Promega GmbH, Mannheim). El extracto seco de hojas de hiedra EA 575® (CID-100048) se obtuvo de Engelhard (Engelhard Arzneimittel GmbH & Co. KG Niederdorfelden).

Las sustancias de referencia de rutina, hederacósido C, hederacósido D y α-hederina se obtuvieron de Phytolab (Vestenbergsgreuth, Alemania).

Todos los demás reactivos se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania), si no se indica lo contrario.

Caracterización de EA 575® por análisis de HPLC.

El extracto seco de hojas de hiedra EA 575® (DER 5-7.5: 1, 30% de etanol) (número de lote CID-100048) se obtuvo de Engelhard Arzneimittel GmbH & Co. KG (Niederdorfelden, Alemania). La composición química y las propiedades farmacológicas de los ingredientes relevantes se han informado anteriormente (Sieben et al. 2009; Greunke et al.2015; Schulte-Michels et al. 2016a, b). Para una caracterización adicional, EA 575® se disolvió en 50% de EtOH en una concentración de 40.8 mg/ml. EA 575® se analizó en un sistema de HPLC Agilent Series 1200 equipado con un desgasificador

(G1322A), una bomba cuaternaria (G1311A), un automuestreador (G1329A) y un detector de matriz de fotodiodos (G1315D) utilizando una columna LiChrospher RP-18 (5 μm, 125 × 4 mm, Merck, Darmstadt). El solvente A fue H₂O/acetonitrilo (44/2, m/m) ajustado a un pH 2.0 con ácido fosfórico al 85%. El solvente B fue acetonitrilo. Se utilizó el siguiente gradiente lineal: 0–9 min B al 0%, 9–10 min a B al 6%, 10–25 min B al 15%, 25–50 min B al 60%, 50–51 min B al 100%, 51–65 min B al 100%. Velocidad de flujo: 0–50, 51–65 min a 1.5 ml/min. Detección: 205 nm. La identificación de los constituyentes se llevó a cabo mediante la comparación de los espectros UV de las sustancias de referencia y sus tiempos de retención correspondientes. Los cromatogramas se registraron y evaluaron utilizando el software Agilent Chemstation versión B.04.01.

Cultivo celular

La línea celular J774.2 de macrófagos de ratón se obtuvo de Sigma-Aldrich (Cat. Nr.: 85011428). Las células J774.2 se cultivaron en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) sin rojo de fenol (Life Technologies, Carlsbad, CA) complementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 μg/ml de estreptomina, 2 mM de L-Glutamina (Life Technologies) y 10% de suero de ternera fetal (Life Technologies). Las células se mantuvieron mediante diluciones de diez veces con medio fresco cada 2-3 días.

Las células renales embrionarias humanas (HEK 293) obtenidas de DSMZ (No. ACC 305) (Braunschweig, Alemania) se cultivaron en medio DMEM (Life Technologies, Carlsbad, CA) complementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 μg/ml de estreptomina, y suero de ternera fetal al 10%. Las células se mantuvieron mediante diluciones triples con medio fresco cada 2-3 días.

Se obtuvieron células de leucemia monocítica aguda (THP-1) de DSMZ (No. ACC 16) y se mantuvieron en medio RPMI complementado con suero de ternera fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 100 μg/ml de estreptomina, 50 μM de β-mercaptoetanol y 5 ml de Glutamax 100 × (Life Technologies GmbH, Darmstadt). Las células THP-1 se mantuvieron mediante diluciones triples con medio fresco cada 2-3 días.

Las células derivadas del epitelio de pulmón humano (A549) obtenidas de DSMZ (No. ACC 107) se cultivaron en medio DMEM/F12 (Life Technologies, Carlsbad, CA) complementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 μg/ml de estreptomina y 10% suero de ternera fetal. Las células se mantuvieron mediante diluciones triples con medio fresco cada 2-3 días.

Inmunofluorescencia

Las células J774.2 o HEK293 se sembraron en cubreobjetos recubiertos con poli-d-lisina (PDL) en una densidad de 100.000 células por pocillo. A una densidad celular de 90%, el medio se cambió a y medio libre de suero y antibióticos. Las células J774.2 se incubaron con

80 µg/ml de células EA 575® HEK293 con 240 µg/ml de EA 575® durante la noche. El medio libre de suero sirvió como control. A la mañana siguiente, se agregaron 100 ng/ml de LPS y 25 ng/ml de TNFα a las células J774.2 y células HEK293, respectivamente, y se continuó la incubación durante otros 50 min. Posteriormente, las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS, se permeabilizaron con metanol enfriado con hielo y se bloquearon con BSA al 5% en PBS complementado con Triton X-100 al 0.3%. La inmunotinción se realizó con el anticuerpo ReIA (tecnología de señalización celular, # 6956) en una dilución de 1:800 durante la noche y un anticuerpo secundario acoplado a Cy3 en una dilución de 1:400 durante 1.5 h en la oscuridad. Además, las células se incubaron con Hoechst 33528 para tinción nuclear. Las imágenes se tomaron en un microscopio Zeiss Axiovert 200 M con un objetivo LCI Plan-Neofluar 63 x/1.30 Imm Korr Ph 3 M27 y una cámara AxioCam MR.

Generación de plásmidos para complementación de fragmentos de proteínas.

La generación de plásmidos de complementación de fragmentos de proteínas, pCDNAHygr_cVenus-ReIA y pCDNA zeo_1kBa-nVenus, ya se describió en otro apartado (Yu et al. 2003) y fue construida por GeneArt (Thermo Fisher), de acuerdo con la publicación mencionada.

Generación de plásmido indicador de NFκB

Para la generación de una construcción de expresión de Nanoluciferasa bajo el control de la secuencia de unión de NFκB, se usó el vector pNF-KB-D2EGFP (Clontech) como plantilla. La proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) desestabilizada se eliminó del vector mediante PCR introduciendo un nuevo sitio XhoI (cebador directo: 5'TCGGATATCTCGAGCCGGAATTCG GGAAGCTTC-3'); cebador inverso: 5'-GTTTCAGGGG GAGGTGT-3'). El marco de lectura abierto que codifica la Nanoluciferasa desestabilizada se cortó del vector pNL1.2 [*NlucP*] (Promega) utilizando BamHI/XhoI y se introdujo en el vector pNF-KB utilizando los mismos sitios de restricción.

Transfección

Las células HEK 293 se transfectaron mediante el método de fosfato de calcio. En resumen, las células se sembraron en placas de 12 pocillos y se dejaron unir durante al menos 24 h. Antes de la transfección, el medio se cambió a 900 µl de medio fresco. Se mezcló 1 µg de ADN con 6.5 µl de CaCl₂ 2 M y 50 µl de agua estéril. La dilución se añadió gota a gota a 2 x HBS y después de media hora de reposo se agregó a las células. Después de 24 h, el medio se cambió a DMEM fresco que contenía antibiótico para la selección (750 µg/ml de geneticina).

Las células THP-1 se transfectaron mediante la tecnología de electroporación de Amaxa, Nucleofector® II. Para cada transfección, se diluyeron 2 x 10⁶ células en una solución amortiguadora apropiada de fabricación propia (5 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂, 15 mM de HEPES, 150 mM de Na₂HPO₄/

NaH₂PO₄/150 mM a pH 7.2, NaCl 50 mM) con 1 µg de ADN y se transfectaron con el programa T-020. Posteriormente, se transfirieron a un medio RPMI fresco completamente complementado. Veinticuatro horas más tarde, el medio se cambió a un medio completo que contenía 700 µg/ml de geneticina para la selección con cambios de medio cada 2-3 días. Después de 1 semana de selección, las células sobrevivientes se analizaron para determinar la expresión del transgén.

Las células A549 se transfectaron utilizando polietilenimina ramificada (PEI, # 408727, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania). Por lo tanto, 50,000 células se sembraron en las cavidades de una placa de 12 pocillos. Se diluyeron 2 µg de ADN en 40 µl de 150 mM de NaCl y se agregaron 3.3 µl de una solución de PEI de 1 mg/ml y la mezcla se agitó inmediatamente durante 10 segundos. Después de 10 min a temperatura ambiente (RT, por sus siglas en inglés), la mezcla de ADN/PEI se aplicó gota a gota a las células y se incubó durante la noche. El medio del día siguiente se cambió a DMEM/F12 fresco que contenía antibiótico para la selección (500 µg/ml de geneticina).

Medición de la activación de NFκB a través de un sistema indicador basado en Nanoluciferasa

Las células que expresaban Nanoluciferasa se sembraron en placas LumiNunc™ de 96 pocillos y se dejaron crecer durante 24 h. El medio se cambió a medio libre de suero antes de la incubación. La incubación con EA 575® se realizó con las concentraciones indicadas de EA 575® durante 8 h, respectivamente. Después de 5 h, las concentraciones indicadas de TNFα o LPS (células THP-1) se agregaron durante 3 h. La medición de la actividad de la luciferasa se realizó utilizando el sistema de ensayo de Luciferasa Nano-Glo® (Promega, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis Western Blot

Las células HEK 293 se sembraron en placas de 12 pocillos y se dejaron crecer hasta una confluencia de 80 a 90% en medio de crecimiento completo. Antes de la incubación, el medio se cambió a medio libre de suero. Las células se incubaron con 240 µg/ml de EA 575® durante 8 h y con 25 ng/ml de TNFα durante 10 min. Después de la incubación, las células se recogieron con 100 µl de solución amortiguadora HEPES de 10 mM por pocillo que contenía cóctel inhibidor de fosfatasa (Merck, Darmstadt, Alemania) y cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania). Las soluciones celulares se sonificaron durante 15 segundos y se lisaron al forzarlas a través de una cánula de 30 G. Para separar los residuos celulares, la solución se centrifugó a 15,000 g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se diluyó en 4 x solución amortiguadora de muestra y 20 µl de las muestras se separaron en un gel de acrilamida al 10% con 80 V en el gel de carga y 120 V en el gel de resolución. La inmunotransferencia se realizó con 200 mA por gel durante 45 min. Para la normalización, la membrana se tiñó después de la inmunotransferencia con tinción de proteína total REVERT™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (LI-COR®). La intensidad se midió en un lector Odyssey LI-COR®

en canal 700 nm. Posteriormente, la mancha se eliminó y la membrana se bloqueó con la solución amortiguadora de bloqueo Odyssey durante 1 hora. La inmunotinción se realizó utilizando el anticuerpo fosfo-I κ B α (Cells Signaling Technology, #9246) o el anticuerpo fosfo-ReIA (Cell Signaling Technology, #3033), respectivamente, en una dilución de 1: 1000 en la solución amortiguadora de bloqueo Odyssey diluida 1:1 con TBS y Tween 20 al 0.1%. Después, la membrana se lavó tres veces en TBS/Tween 20 y se incubó en un anticuerpo secundario (LI-COR[®] Goat anti Rabbit-DyLight 800, 1:10,000) diluido en solución amortiguadora de bloqueo Odyssey 1: 1 con TBS, Tween 20 al 0.1% y SDS al 0.01% durante 1 h. La membrana se lavó tres veces en TBS y se midió en un lector Odyssey LI-COR[®] en un canal de 800 nm. La concentración de proteína se normalizó a través de la intensidad de la banda pI κ B α /p-ReIA dividida por el factor de normalización de la tinción de proteína total REVERT[™].

Ensayo de complementación de fragmentos de proteínas.

Las células HEK que expresan de forma estable I κ B α -nVenus y c Venus-ReIA se sembraron en una placa negra de 96 pocillos (CellCarrier[™], Perkin Elmer, Massachusetts, EUA) en medio de crecimiento total y se dejaron crecer hasta una confluencia de aproximadamente 90%. Después de alcanzar la confluencia, el medio se cambió a solución amortiguadora HBSS que contenía HEPES de 20 mM y se preincubó con la concentración indicada de EA 575[®] durante 5 h. Posteriormente, las células se estimularon con 10 ng/ml de TNF α y se midió la disminución de la intensidad de la fluorescencia durante 3 h cada 60 min en un lector Perkin Elmer EnSight[™] con excitación a 515 nm y emisión a 550 nm. Además, la confluencia celular se midió en el canal de transmisión. Los datos fueron registrados y evaluados por el software Kaleido[™].

Evaluación de los datos estadísticos.

La evaluación de los datos estadísticos se realizó con ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Los resultados se consideraron significativos para valores p de al menos < 0.05 .

Resultados

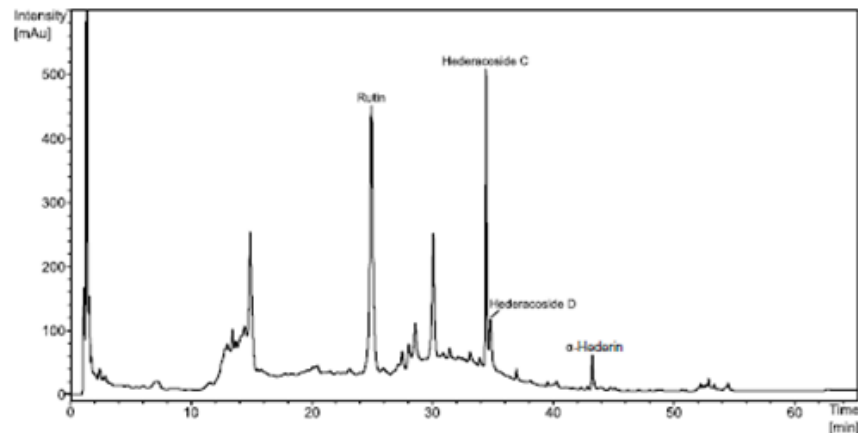
Análisis de EA 575[®] por HPLC

La composición de EA 575[®] (DER 5-7.5: 1, 30% de etanol) se caracterizó por análisis de huellas digitales por HPLC. Las siguientes sustancias podrían identificarse mediante la comparación de los espectros UV y los tiempos de retención de las sustancias de referencia correspondientes: rutina, hederacósido C, hederacósido D y α -hederina (Fig. 1).

Inhibición parcial de la translocación de NF κ B en el núcleo

Como se mostró anteriormente, la pre-incubación con EA 575[®] reduce la secreción de IL-6 de la línea celular J774.2 de macrófagos murinos (Schulte-Michels et al. 2016a). Para examinar si esta reducción se logra mediante una inhibición de la translocación nuclear de NF κ B, realizamos un ensayo de inmunofluorescencia en la subunidad ReIA de NF κ B en células J774.2. La incubación con 25 ng/ml de TNF α durante 50 min mostró un cambio considerable de NF κ B (detectado por la fluorescencia del anticuerpo secundario conjugado con Cy3) desde el citosol hasta el núcleo (Fig. 2b) en comparación con las células incubadas solo en medio libre de suero (Fig. 2a). La preincubación durante la noche con 80 μ g/ml de EA 575[®] redujo de manera visible la señal localizada en el núcleo después de 50 minutos de estimulación (Fig. 2c). En paralelo, se examinó la translocación nuclear de NF κ B en células epiteliales renales embrionarias humanas

Fig. 1 HPLC análisis de huellas digitales de EA 575[®]. Los ingredientes del extracto seco de hojas de hiedra se separaron en una columna RP-18. Los componentes principales se identificaron mediante comparación con los tiempos de retención y la absorbancia de los estándares de referencia. Las sustancias identificadas son rutina, hederacósido C, hederacósido D y α -hederina.



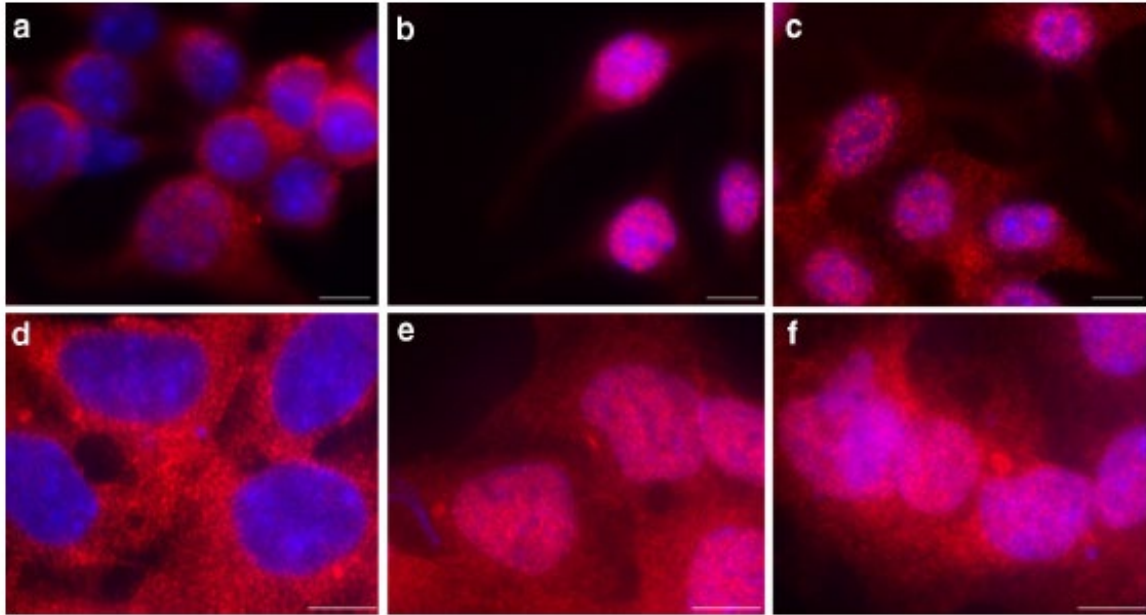


Fig. 2 NFκB inmunoteñido en rojo con anticuerpo primario anti-RelA y anticuerpo secundario acoplado a Cy3 mostrado en J774.2 (a-c), así como células HEK 293 (d-f). Núcleo teñido en azul con Hoechst 33258. (a + d) células no estimuladas, (b + e) células estimuladas con 100 ng/ml de LPS (J774.2) o 25 ng/ml de TNFα (HEK293) durante 50 min, y (c + f) células preincubadas con 80 μg/ml (J774.2) o 240 μg/ml de EA 575® (HEK293) durante la noche y luego estimuladas con 100 ng/ml de LPS (J774.2) o 25 ng/ml de TNFα (HEK293) durante 50 min. Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes. Las barras de escala corresponden a 10 μm.

(HEK 293; Fig. 2d-f). La reducción de la translocación también se detectó en estas células, aunque el efecto no fue tan pronunciado como en la línea celular de macrófagos.

Ensayo de reportero NFκB basado en nanoluciferasa

Como lo demostraron anteriormente El-Guendy y sus colegas, la actividad transcripcional de NFκB se puede medir a través de un ensayo del gen indicador de NFκB (El-Guendy y Sinai 2008). Las células HEK 293 Nano-PEST transfectadas de manera estable mostraron un aumento de casi 25 veces en la actividad de la nanoluciferasa después de la estimulación con 25 ng/ml de TNFα durante 3 h. Este aumento podría reducirse de manera significativa y dependiente de la dosis en 31.0, 34.7 y 42.1% después de 8 h de preincubación con concentraciones de EA 575® de 40, 80 y 240 μg/ml, respectivamente (Fig. 3).

Western blot contra IκBα y RelA fosforilados

La desintegración del complejo NFκB:IκBα se induce por la fosforilación de IκBα mediada por IKKβ, que también fosforila la subunidad RelA de NFκB. Por lo tanto, medimos tanto la fosforilación de IκBα en Ser32 como la fosforilación de RelA en Ser536. La preincubación con 240 μg/ml de EA 575® durante 8 h pudo impedir significativamente la fosforilación inducida por TNFα de IκB α en Ser32 (Fig. 4). La fosforilación de RelA en Ser536 incrementó después de la preincubación con 240 μg/ml de EA 575® y la estimulación con TNFα. Una diferencia significativa en la fosforilación de RelA entre hiedra

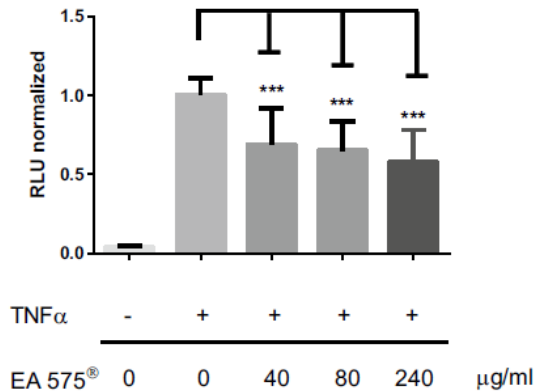


Fig. 3 Se incubaron células HEK 293 transfectadas de manera estable con un plásmido indicador de NFκB basado en Nanoluciferasa durante 8 h con las cantidades indicadas de EA 575® o solvente solo. Después de 5 h de preincubación, las células se estimularon durante 3 h más con 25 ng/ml de TNFα o se dejaron sin estimular. Los resultados representan la media ± SD (n ≥ 30, *** p < 0.001).

pretratada y células de control se pudo ver después de 10 minutos de incubación con TNFα (Fig. 5).

Ensayo de complementación de fragmentos de proteínas

Se cree que la reducción de la fosforilación de IκBα es un factor estabilizador para el complejo NFκB:IκBα. Por lo tanto, evaluamos

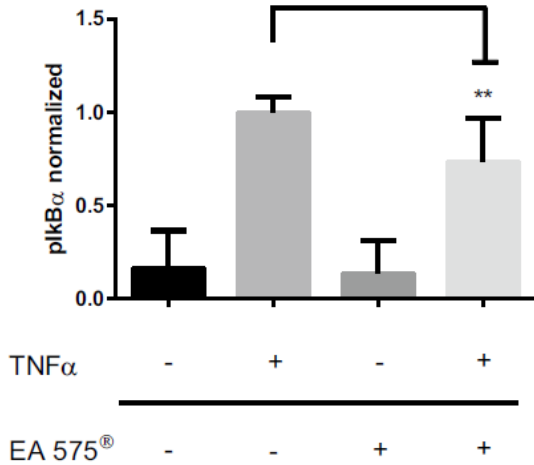


Fig. 4 Fosforilación de IκBα en Ser32 antes y después de la estimulación con 25 ng/ml de TNFα durante 10 min y con o sin tratamiento previo con 240 μg/ml de EA 575® durante 8 h. Los resultados representan la media ± SD ($n \geq 8$, ** $p < 0.01$)

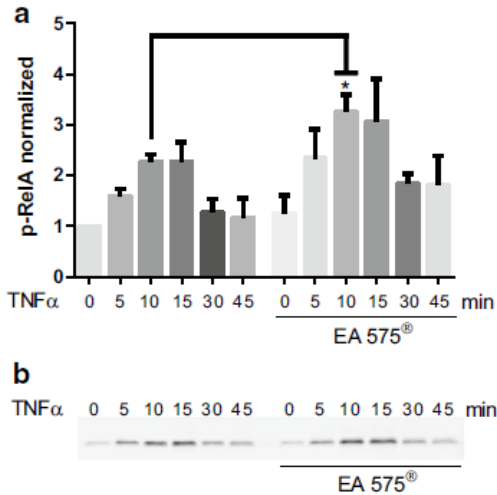


Fig. 5 Fosforilación de RelA en Ser536 (p-RelA) en células HEK después de la estimulación con 25 ng/ml de TNFα durante diferentes periodos de tiempo con o sin tratamiento previo con 240 μg/ml de EA 575®. **a** Análisis cuantitativo del análisis Western blot. Los resultados representan la media ± SD ($n \geq 3$, * $p < 0.05$). **b** Resultado representativo del análisis Western Blot de p-RelA.

mediante un ensayo de complementación de fragmentos de proteínas si la preincubación con EA 575® mejora la estabilidad de NFκB:IκBα bajo condiciones estimulantes de TNFα. En este ensayo, la unión de IκBα a NFκB da como resultado la complementación de la proteína fluorescente Venus. A su vez, la desintegración del complejo conduce a una reducción de la fluorescencia de Venus detectada

(Yu et al.2003). Como se muestra en la Fig. 6, la intensidad de la fluorescencia disminuyó en un 47.4% después de la estimulación con 10 ng/ml de TNFα durante 3 h. Después de la preincubación con 160 μg/ml de EA 575® durante 8 h, la intensidad de fluorescencia inducida por TNFα se redujo al 60.8%, lo que representa el 8.2% del complejo conservado.

Efectos de EA 575® en diferentes tipos de células

Para evaluar más a fondo el efecto regulador observado de EA 575®, evaluamos THP-1 como una línea celular monocítica humana, así como células A549 derivadas de epitelio pulmonar humano. Las células se transfectaron de forma estable con el indicador NFκB basado en nanoluciferasa. Como se puede observar en la Fig. 7, ambos tipos de células mostraron niveles aumentados de Nanoluciferasa después de la aplicación de TNFα, que se redujo significativamente cuando las células se preincubaron con 240 μg/ml de EA 575®. En comparación con las células incubadas solo con TNFα, la respuesta inflamatoria se redujo a 75 y 88% para las células THP-1 y A549, respectivamente.

Discusión

El extracto seco de hojas de hiedra EA 575® está bien establecido para la mejora de los síntomas asociados con las enfermedades bronquiales inflamatorias crónicas, así como para el tratamiento de infecciones inflamatorias agudas del tracto respiratorio acompañadas de tos. Los mecanismos moleculares detrás de esta actividad antiinflamatoria de EA 575® aún no se han investigado satisfactoriamente.

EA 575® reduce la cantidad de IL-6 secretada de los macrófagos de ratón (Schulte-Michels et al. 2016a). Como se puede derivar de nuestro trabajo, esta reducción se logra a través de

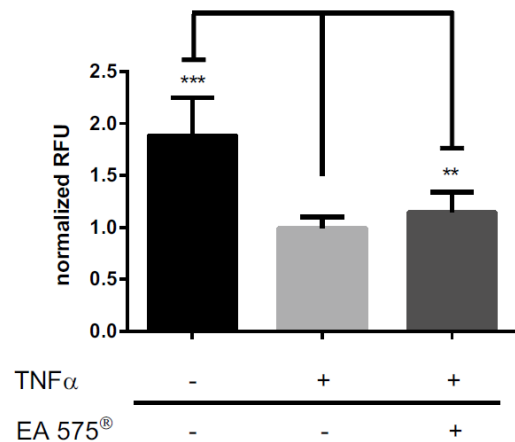


Fig. 6 Medición de la intensidad de la fluorescencia de las células HEK 293 transfectadas de manera estable con cVenus-RelA e IκBα-nVenus antes y después de la estimulación con 10 ng/ml de TNFα y con o sin tratamiento previo con 160 μg/ml de EA 575® durante 8 h. Los resultados representan la media ± SD ($n \geq 23$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

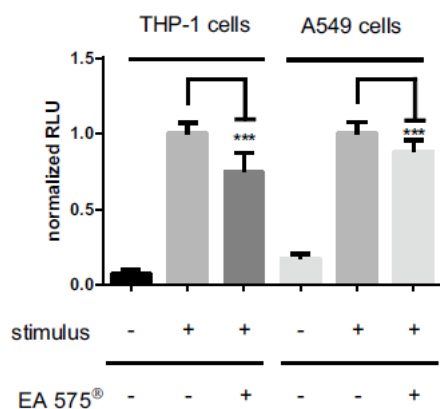


Fig. 7 Actividad de NFκB en las células THP-1 y A549 Nano-PEST después de la estimulación con 10 ng/ml de LPS o 5 ng/ml de TNFα, respectivamente, y con o sin tratamiento previo utilizando 240 μg/ml de EA 575[®]. Los datos se muestran como media ± SD de tres experimentos independientes ($n \geq 16$, *** $p < 0.001$)

una translocación nuclear deteriorada de NFκB, que mostramos mediante un ensayo de inmunofluorescencia contra RelA, una subunidad de NFκB. La inhibición de la translocación nuclear de NFκB por los componentes de las hojas de hiedra, por ejemplo, la rutina y los ácidos clorogénico y dicafeoilquinico, ya se mostró en los mastocitos y macrófagos (Kim et al. 2008; Puangpraphant et al. 2011; Hwang et al. 2014). Usando un ensayo del gen indicador de NFκB, podríamos mostrar que EA 575[®] inhibe de manera dependiente de la dosis la actividad transcripcional de NFκB. La disminución de la actividad de NFκB después de la administración de componentes de hiedra ya se demostró. Por ejemplo, la rutina, así como el ácido 3,5 y 4,5- dicafeoilquinico inhiben la transcripción del gen iNOS dependiente de NFκB, y como resultado la síntesis del óxido nítrico, mientras que el ácido clorogénico reduce la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) dependiente de NFκB inducida por LPS en células RAW 264.7 (Shan et al. 2009; Park et al. 2009; Kazłowska et al. 2010). Además, el ácido 3,4-dicafeoilquinico inhibe la expresión de la COX-2 inducida por el forbol-12-miristato-13-acetato en las células RAW264.7 mediante el bloqueo de la actividad catalítica de las quinasas MAP JNK/p38 y la activación de C/EBPβ y AP-1. (Han et al. 2010). El deterioro de la translocación nuclear y la reducción de la actividad transcripcional de NFκB puede deberse a una mayor estabilidad del complejo de proteínas NFκB:IkBα. Para evaluar este problema, realizamos un ensayo de complementación de fragmentos de proteínas en el que se logra la fluorescencia de la proteína Venus tras la unión de IkBα a NFκB. Después de la estimulación con 10 ng/ml de TNFα, la fluorescencia de Venus conservada fue significativamente mayor cuando las células se preincubaron con EA 575[®], lo que demuestra una mayor estabilidad bajo la estimulación con TNFα. La estabilidad del complejo está regulada por la fosforilación de IkBα a través de IKKβ, que se forma junto con IKKα y su subunidad reguladora IKKγ (también llamada NEMO) el complejo IKK.

La fosforilación de IkBα en la serina en la posición 32 (Ser32) conduce a su ubiquitinación y degradación proteasomal y, por consiguiente, a la liberación de NFκB del complejo, lo que le permite translocarse en el núcleo (Scheidereit 2006). Por lo tanto, estábamos interesados en si los efectos observados se debían a la reducción de la fosforilación de IkBα. Un análisis Western Blot frente a IkBα fosforilado en Ser32 indicó una reducción de la fosforilación en este sitio, lo que explica la estabilización del complejo NFκB:IkBα como se muestra en la complementación del fragmento de proteína (ver arriba). Ya se demostró la reducción de la fosforilación celular de IkBα después de la incubación con productos naturales que también existen en EA 575[®], al igual que para el ácido clorogénico en células estrelladas hepáticas (Shi et al. 2013). Además de IkBα, IKKβ también fosforila la subunidad RelA de NFκB en Ser536. De hecho, también encontramos un impacto en la fosforilación de RelA-Ser536 que incrementó después de la preincubación de células con EA 575[®]. La fosforilación de RelA es mucho menos entendida. Además de varios sitios de fosforilación que parecen tener efectos positivos en la actividad transcripcional de RelA, existe una evidencia creciente de que la fosforilación de Ser536 por IKKβ deteriora la translocación nuclear de RelA y, por lo tanto, disminuye su actividad transcripcional (Mattioli et al. 2004; Moreno et al. 2010; Christian et al. 2016). Schröfelbauer et al. mostraron que la fosforilación de IkBα en Ser32 depende de la función estructural de NEMO y que la inhibición de NEMO conduce a un cambio en su especificidad hacia RelA en Ser536, lo cual coincide en buena medida con nuestras observaciones (Schröfelbauer et al. 2012).

Además de los factores secretados por las células inmunitarias, los liberados por las células epiteliales también promueven la inflamación del tejido pulmonar (Mitchell y O'Byrne 2016, 2017; Green y Turner 2017). Consistente con eso, el efecto antiinflamatorio de EA 575[®], detectado en monocitos/macrófagos (THP-1/J774.2) y examinado aquí a detalle en células HEK, también se puede observar en células A 549, una célula epitelial pulmonar humana. Las células objetivo precisas de EA 575[®] en el pulmón inflamado deben ser objeto de estudios futuros.

Tomados en conjunto, nuestros resultados indican que las propiedades antiinflamatorias mostradas anteriormente de EA 575[®] (Schulte-Michels et al. 2016a) son resultado de un efecto regulador en la ruta de NFκB, que probablemente se deba a un cambio de especificidad de IKKβ. Como se discutió anteriormente, esto reduciría la actividad transcripcional de RelA de doble manera, en primer lugar, estabilizando el complejo con su inhibidor y en segundo lugar, reduciendo la translocación de RelA en el núcleo. Si EA 575[®] logra esto mediante la manipulación de la función estructural de la subunidad NEMO reguladora, lo cual lleva a una asociación más fuerte de IKKβ a RelA en comparación con IkBα, debe ser objeto de investigaciones adicionales.

Agradecimientos Este trabajo fue apoyado por una beca de investigación de Engelhard Arzneimittel GmbH & Co.KG, Niederdorfelden, Alemania.

Cumplimiento de estándares de ética

Conflicto de intereses S Franken es empleado de Engelhard Arzneimittel GmbH & Co.KG, Niederdorfelden, Alemania. Todos los demás autores confirman que no existe conflicto de intereses.

Acceso abierto Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional de Creative Commons Attribution 4.0

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que permite el uso, la distribución y la reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que otorgue el crédito apropiado al (los) autor (es) original (es) y la fuente proporcione un enlace a la licencia de Creative Commons e indique si se realizaron cambios.

Referencias

- Christian F, Smith EL, Carmody RJ (2016) The regulation of NF- κ B subunits by phosphorylation. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells5010012>
- dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, de Souza GEP (2006) Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull* 29:2236–2240. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.2236>
- El-Guendy N, Sinai AP (2008) Potential problems inherent in cell-based stable NF- κ B-GFP reporter systems. *Mol Cell Biochem* 312:147–155. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9730-8>
- Green CE, Turner AM (2017) The role of the endothelium in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respir Res* 18:20. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0505-1>
- Greunke C, Hage-Hülsmann A, Sorkalla T et al (2015) A systematic study on the influence of the main ingredients of an ivy leaves dry extract on the β 2-adrenergic responsiveness of human airway smooth muscle cells. *Pulm Pharmacol Ther* 31:92–98. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2014.09.002>
- Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE (2001) Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmacologia* 56:683–687
- Han EH, Kim JY, Kim HG et al (2010) Inhibitory effect of 3-caffeoyl-4-dicaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* against phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Chem Biol Interact* 183:397–404. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.11.015>
- Hayden MS, Ghosh S (2012) NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 26:203–234. <https://doi.org/10.1101/gad.18343.4.111>
- Hocaoğlu AB, Karaman O, Erge DO et al (2012) Effect of *Hedera helix* on lung histopathology in chronic asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 11:316–323
- Hwang SJ, Kim Y-W, Park Y et al (2014) Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflamm Res* 63:81–90. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0674-4>
- Kazłowska K, Hsu T, Hou C-C et al (2010) Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentata*. *J Ethnopharmacol* 128:123–130. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.037>
- Kim HP, Park H, Son KH et al (2008) Biochemical pharmacology of biflavonoids: implications for anti-inflammatory action. *Arch Pharm Res* 31:265–273. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1151-3>
- Kim H-R, Lee D-M, Lee S-H et al (2010) Chlorogenic acid suppresses pulmonary eosinophilia, IgE production, and Th2-type cytokine production in an ovalbumin-induced allergic asthma: activation of STAT-6 and JNK is inhibited by chlorogenic acid. *Int Immunopharmacol* 10:1242–1248. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.07.005>
- Lang C, Rottger-Luer P, Staiger C (2015) A valuable option for the

- treatment of respiratory diseases: review on the clinical evidence of the Ivy Leaves Dry Extract EA 575(R). *Planta Med* 81:968–974. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1545879>
- Mattioli I, Sebald A, Bucher C et al (2004) Transient and selective NF- κ B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I κ B kinase β and controls the kinetics of p65 nuclear import. *J Immunol* 172:6336–6344
- Mitchell PD, O'Byrne PM (2016) Epithelial derived cytokines in asthma. *Chest*. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.10.042>
- Mitchell PD, O'Byrne PM (2017) Biologics and the lung: TSLP and other epithelial cell-derived cytokines in asthma. *Pharmacol Ther* 169:104–112. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.06.009>
- Moreno R, Sobotzik J-M, Schultz C, Schmitz ML (2010) Specification of the NF- κ B transcriptional response by p65 phosphorylation and TNF-induced nuclear translocation of IKK ϵ . *Nucleic Acids Res* 38:6029–6044. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq439>
- Park KH, Park M, Choi SE et al (2009) The anti-oxidative and anti-inflammatory effects of caffeoyl derivatives from the roots of *Aconitum koreanum* R. *RAYMOND*. *Biol Pharm Bull* 32:2029–2033
- Puangpraphant S, Berhow MA, Vermillion K et al (2011) Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- κ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. *Mol Nutr Food Res* 55:1509–1522. <https://doi.org/10.1002/mnfr.2011010128>
- Scheidereit C (2006) I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. *Oncogene* 25:6685–6705. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209934>
- Schröfelbauer B, Polley S, Behar M et al (2012) NEMO ensures signaling specificity of the pleiotropic IKK β by directing its kinase activity toward I κ B α . *Mol Cell* 47:111–121. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.04.020>
- Schulte-Michels J, Runkel F, Gokorsch S, Häberlein H (2016a) Ivy leaves dry extract EA 575 \circledast decreases LPS-induced IL-6 release from murine macrophages. *Pharmazie* 71:158–161
- Schulte-Michels J, Wolf A, Aatz S et al (2016b) α -Hederin inhibits G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of β 2-adrenergic receptors. *Phytomedicine* 23:52–57. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.12.001>
- Selloum L, Bouriche H, Tigrine C, Boudoukha C (2003) Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp Toxicol Pathol* 54:313–318. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00260>
- Shan J, Fu J, Zhao Z et al (2009) Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation. *Int Immunopharmacol* 9:1042–1048. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.04.011>
- Shi H, Dong L, Dang X et al (2013) Effect of chlorogenic acid on LPS-induced proinflammatory signaling in hepatic stellate cells. *Inflamm Res* 62:581–587. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0610-7>
- Sieben A, Prenner L, Sorkalla T et al (2009) Alpha-hederin, but not hederacoside C and hederagenin from *Hedera helix*, affects the binding behavior, dynamics, and regulation of β 2-adrenergic receptors. *Biochemistry* 48:3477–3482. <https://doi.org/10.1021/bi802036b>
- Süleyman H, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R (2003) Acute and chronic anti-inflammatory profile of the ivy plant, *Hedera helix*, in rats. *Phytomedicine* 10:370–374. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00260>

Yu H, West M, Keon BH et al (2003) Measuring drug action in the cellular context using protein-fragment complementation assays. *Assay Drug Dev Technol* 1:811–822. <https://doi.org/10.1089/154065803772613444>

Zhang X, Huang H, Yang T et al (2010) Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Injury* 41:746–752. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2010.02.029>