

Forschungsschwerpunkt 2009: Sekundäre Pflanzenstoffe

Technische Universität Kaiserslautern – Fachbereich Chemie

Einfluss von Anthocyanen aus Heidelbeeren auf die Expression entzündungsrelevanter Gene bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)

Fragestellung: Im Rahmen des Projektes 2009/21 mit dem Titel ‚Einfluss von Anthocyanen aus Heidelbeeren auf die Expression entzündungsrelevanter Gene bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)‘ wurde der Einfluss von Anthocyanen aus Wildheidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.) auf die Entzündung im Darmepithel untersucht. Ziel war es zu prüfen, inwieweit präventive Wirkungen von Anthocyanen auf den Darm mit einer Beeinflussung bestimmter Entzündungsparameter verbunden sind.

Methodik: Hierzu wurde ein *in vitro* Testsystem etabliert, welches zur Untersuchung entzündungshemmender Wirkungen von Heidelbeerextrakten und entsprechenden Einzelverbindungen (Anthocyane (Glycoside) und Anthocyanidine (Aglyka)) geeignet ist. Als Modell diente die humane Kolonepithelzelllinie T84. Diese wurde spezifisch mittels human rekombinanten Cytokinen (TNF- α (10 ng/ml), IL-1 β (5 ng/ml), IFN- γ (10 ng/ml)) stimuliert, um die inflammatorischen Genexpression *in vitro* zu induzieren. Als entzündungsrelevante Markergene wurden TNF- α , IL-8 und IP-10 (CXCL10) näher betrachtet.

Ergebnisse: Mittels HPLC-DAD konnten 15 verschiedene Anthocyane (Glykoside) im verwendeten Heidelbeerextrakt (Kaden, Biochemicals GmbH) nachgewiesen und quantifiziert werden. Um den Beitrag der Einzelverbindungen auf den entzündungshemmenden Einfluss des Gesamtextraktes zu evaluieren, wurden ausgewählte Einzelsubstanzen zusätzlich zum Extrakt untersucht. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass der Gesamtextrakt konzentrationsabhängig (2,5 – 25 μ g/ml) sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene die entzündungsrelevanten Cytokine TNF- α und IP-10 (CXCL10) signifikant hemmte. Anhand der untersuchten Einzelverbindungen konnten bestimmte Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden. So zeigten Cyanidinglycoside in Abhängigkeit der Zuckerkonjugation (-glucose (-glc), -arabinose (-ara), -galactose (-gal)) unterschiedlich repressives Potential (Cy-ara > Cy-glc > Cy-gal) auf IP-10 (CXCL10) und TNF- α , wohingegen es bei Peonidinglycosiden (Peo-glc, Peo-gal, Peo-ara) in Abhängigkeit der Zuckerkonjugation teilweise zum völligen Wirkverlust kam (nur Peonidinglucosid erwies sich als aktiv). Malvidinglycoside (Ma-glc, Ma-gal) und Petunidin-3-*O*-glucosid (Pt-glc) zeigten kein signifikant repressives Potential auf die untersuchten entzündungsrelevanten Markergene im getesteten Konzentrationsbereich (25 – 100 μ M). Delphinidin-3-*O*-glucosid erwies sich ebenfalls als konzentrationsabhängiger Inhibitor inflammatorischer Genexpression.

Um den Einfluss der Aglykonstruktur auf die Wirkung der einzelnen Anthocyane (Glycoside) näher zu bestimmen, wurden zusätzlich die entsprechenden Anthocyanidine (Aglyka) auf ihr repressives Potential hin untersucht. Auch hier ließ sich ein Zusammenhang zwischen dem Substitutionsmuster der Anthocyanidine und der antiinflammatorischen Wirkung ableiten. So zeigt sich eine vom Hydroxylierungs- bzw. Methoxylierungsmuster abhängige repressive Regulation der untersuchten entzündungsrelevanten Gene (TNF- α , IL-8 und IP-10 (CXCL 10)), wobei diese in der Reihenfolge Delphinidin > Petunidin \approx Cyanidin > Peonidin > Malvidin, d.h. mit abnehmender Anzahl an Hydroxylgruppen, abnahmen.

Zudem konnten weitere entzündungsrelevante Cytokine (I-TAC, sICAM-1, GRO- α und IL-1 β) neben den auf Transkriptionsebene untersuchten Genen mittels humanem Cytokin-Array

identifiziert werden, welche durch Coinkubation mit Wildheidelbeerextrakt (*Vaccinium myrtillus* L.) bzw. Cyanidin Cl⁻ repressiv reguliert wurden.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass verschiedene Anthocyane (Glykoside), sowie deren Aglyka (Anthocyanidine) *in vitro* Inhibitoren proinflammatorischer Genexpression und Proteintranslation sind und damit maßgeblich zum antiinflammatorischen Potential des Gesamtheidelbeerextraktes beitragen. Heidelbeeren bzw. Extrakte hieraus könnten somit nutritiv als Transkriptions-basierende Inhibitoren proinflammatorischer Genexpression, welche mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) assoziiert ist, ihr präventives Potential entfalten.

„Influence of blueberry anthocyanins on inflammatory gene expression associated with inflammatory bowel diseases (IBD)“

Influence of blueberry anthocyanins on inflammatory gene expression associated with inflammatory bowel diseases (IBD)

Purpose: In the project (no. 2009/21) “Influence of anthocyanins from bilberries on inflammatory gene expression associated with inflammatory bowel diseases (IBD)” we evaluated the inhibitory effects of a bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract, anthocyanins within it and the corresponding aglycones on gastrointestinal inflammation. This was done by examining their *in vitro* effects on the expression of selected genes known to be strongly regulated during inflammation.

Methods: For this purpose, we established an *in vitro* test system using the human colonic epithelial cell line T84. To induce inflammatory gene expression cells were stimulated with a cytokine mixture consisting of human recombinant TNF- α , IL-1 β and IFN- γ . Changes in expression levels of proinflammatory marker genes, encoding proteins such as TNF- α , IL-8 and IP-10 (CXCL10), were then examined at both the RNA and protein levels using real-time PCR and a human cytokine antibody array analysis, respectively.

Results: The entire bilberry extract investigated significantly inhibited both the transcription and translation of the proinflammatory marker genes TNF- α and IP-10 (CXCL10) in a dose-dependent manner (2.5 – 25 μ g/ml). Fifteen anthocyanins (glycosides of anthocyanidins) within it were identified and quantified by High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection, then the effects of each of these compounds were measured and their structure-activity (effect)-relationships were analyzed. Cyanidin glycosides (-glucose (-glc), -arabinose (-ara), -galactose (-gal)) showed diverse repressive effects on IP-10 (CXCL10) and TNF- α — (Cy-ara > Cy-glc > Cy-gal) on IP-10 (CXCL10) and TNF- α . The inhibitory activity of peonidin glycosides (Peo-glc, Peo-gal, Peo-ara) depended on the sugar moiety (only Peo-glc was an active compound). Delphinidin 3-*O*-glucoside also proved to be a concentration-dependent inhibitor of inflammatory gene expression. In contrast, malvidin glycosides (Ma-glc, Ma-gal) and petunidin 3-*O*-glucoside (Pt-glc) showed no significant inhibitory effect on the examined proinflammatory genes.

To investigate the influence of the aglycone structures on the inhibitory effects of the anthocyanins (glycosides) we also tested the corresponding anthocyanidins (aglyca). The results revealed a correlation between the substitution pattern of the anthocyanidins and their anti-inflammatory activity. Strong dependence on the hydroxylation and methoxylation patterns on the inhibition of the investigated proinflammatory genes — TNF- α , IL-8 and IP-10 (CXCL 10) — was observed. The inhibitory activity decreased with reductions in the number of hydroxyl groups in the order delphinidin > petunidin \approx cyanidin > peonidin > malvidin. Using a human cytokine antibody array proinflammatory cytokines could be down-regulated by co incubation with the bilberry extract or cyanidin. The extract and the

compound cyanidin also affected expression levels of other cytokines involved in inflammatory responses (I-TAC, sICAM-1, GRO- α and IL-1 β).

Conclusion: In summary, we have shown that a bilberry extract, single anthocyanins (glycosides) within it, as well as their corresponding aglycones (anthocyanidins) possess antiinflammatory activity *in vitro*, acting as transcription-based inhibitors of the expression of proinflammatory genes associated with inflammatory bowel diseases (IBDs). In the future, bilberries or anthocyanin-rich extracts could potentially be used to inhibit the development of IBD.

Autor: Prof. Dr. Elke Richling