

Z-藁本内酯对人脐静脉内皮细胞保护作用及其机制研究

王迎超¹, 黄怡¹, 王毅¹, 王怡², 张萌^{2*}

1. 浙江大学药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058

2. 天津中医药大学 现代中药国家重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 通过观察 Z-藁本内酯对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 及核因子- κ B (NF- κ B) 表达的影响, 探讨其对炎症因子损伤内皮细胞的保护作用及其机制。方法 向体外培养的 HUVEC 中加入 TNF- α 10 ng/mL 造成细胞损伤, 同时加入不同浓度 (5、10、20 μ mol/L) 的 Z-藁本内酯, 共同孵育 24 h, MTT 法检测各组细胞活力, ELISA 法测定细胞培养液中 ICAM-1 和 VCAM-1 的量, Western blotting 法检测各组细胞 NF- κ B 蛋白表达。结果 与对照组比较, TNF- α 可造成 HUVEC 明显损伤 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著增加 HUVEC 中 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达 ($P < 0.01$)。与模型组比较, Z-藁本内酯可以剂量相关地降低 ICAM-1 ($P < 0.01$) 和 VCAM-1 ($P < 0.05$) 的表达, 显著减少细胞 NF- κ B 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。结论 Z-藁本内酯可减轻 TNF- α 对 HUVEC 的损伤, 其作用机制可能与通过抑制 NF- κ B 的激活, 进而减少 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达有关。

关键词: Z-藁本内酯; 人脐静脉内皮细胞; 肿瘤坏死因子- α ; 细胞间黏附分子-1; 血管细胞黏附分子-1; 核转录因子- κ B

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)09-1157-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.09.017

Protection of Z-ligustilide on human umbilical vein endothelial cells and its mechanism

WANG Ying-chao¹, HUANG Yi¹, WANG Yi¹, WANG Yi², ZHANG Meng²

1. Institute of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

2. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of Z-ligustilide on the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and nuclear factor kappa B (NF- κ B), and to investigate the protection on endothelial cells injured by inflammatory cytokines and its mechanism. **Methods** TNF- α (10 ng/mL) was added to *in vitro* cultured HUVEC to induce the cell injury. After co-incubated with the different concentration (5, 10, and 20 μ mol/L) of Z-ligustilide for 24 h, the cell viability in each group was measured by MTT. The levels of ICAM-1 and VCAM-1 were assayed using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Western blotting was used to detect the expression of NF- κ B protein of cell in each group. **Results** TNF- α could induce the obvious injury of HUVEC compared with the control group ($P < 0.05$, 0.01), and increase the expression of ICAM-1 and VCAM-1 in HUVEC ($P < 0.01$). Compared with the model group, Z-ligustilide could dose-dependently reduce the expression of ICAM-1 ($P < 0.01$) and VCAM-1 ($P < 0.05$) and obviously decrease the NF- κ B expression ($P < 0.05$). **Conclusion** Z-ligustilide could attenuate TNF- α -induced injury in HUVEC via suppressing the activation of NF- κ B and inhibiting the excessive expression of ICAM-1 and VCAM-1.

Key words: Z-ligustilide; human umbilical vein endothelial cells; tumor necrosis factor- α ; intercellular adhesion molecule-1; vascular cell adhesion molecule-1; nuclear factor kappa B

血管内皮细胞具有多种生物学功能, 它所产生和分泌的多种生物活性物质具有维持血管张力、调节血压、抗血栓形成等作用。血管内皮细胞损伤是动脉粥样硬化 (AS) 发病的始动环节, 损伤后的内

皮细胞合成和分泌血管活性物质的功能和细胞因子间平衡遭到破坏。白细胞特别是单核细胞与活化血管内皮细胞黏附并迁移聚集于内膜下, 摄取氧化低密度脂蛋白形成泡沫细胞, 而大量的泡沫细胞堆积

收稿日期: 2012-08-16

基金项目: 科技部国际合作课题 (2009DFB30510)

作者简介: 王迎超 (1989—), 男, 硕士研究生。E-mail: chaoyingwang@163.com

*通信作者 张萌 E-mail: zhangm7@163.com

最终形成 AS。

许多中药及其活性成分能够保护 TNF- α 损伤的血管内皮细胞,进而发挥抗 AS 作用^[1-2]。Z-藁本内酯是川芎和当归中主要的内酯类化合物,也是其主要活性成分。药理研究表明,Z-藁本内酯有良好的抗炎、镇痛和保护大脑缺血再灌注损伤等作用^[3-7],但其对 AS 的作用鲜见报道。本实验采用体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC),建立肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的炎症损伤模型,通过研究 Z-藁本内酯对 HUVEC 细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 及核因子- κ B (NF- κ B) 的表达,探讨 Z-藁本内酯的内皮保护作用及其机制。

1 材料

1.1 药品和试剂

Z-藁本内酯(质量分数>98%),上海融禾医药科技有限公司,批号 110825。二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝(MTT),Sigma 公司;高糖 M199 培养基、胰蛋白酶、I 型胶原酶、胎牛血清(FBS),Gibco 公司;TNF- α ,Prospec 公司;ICAM-1、VCAM-1 ELISA 试剂盒,NF- κ B 抗体,R&D 公司; β -actin 抗体,碧云天生物技术研究;核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒,南京凯基科技发展有限公司。SDS-PAGE 浓缩胶和分离胶自制。

1.2 仪器

ELx800 酶标仪,美国 BioTek 公司;DYY-6C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;iBlot™ Gel Transfer System,美国 Invitrogen 公司;UMAX-2100XL 扫描仪,北京志和利华科贸有限公司。

1.3 细胞

HUVEC,由浙江大学医学院附属妇产科医院提供脐带,自行消化分离细胞。

2 方法

2.1 细胞培养

HUVEC 细胞置于含 12.5% FBS 的高糖 M199 培养基中,于 37℃、5% CO₂ 恒温培养,每 2 d 换液 1 次,待细胞生长至 80% 融合时,0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化传代,传代比例 1:2,3~4 d 传代 1 次。所有实验均采用对数生长期细胞进行。

2.2 TNF- α 致 HUVEC 损伤浓度筛选

调整对数生长期 HUVEC 浓度为 2.0×10^5 /mL,以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中。24 h 后,待细胞贴壁生长至融合,更换无血清高糖 M199 培养液同步化处理 12 h。将细胞分成对照组(给予完全培养

液,即 M199+12.5% FBS),TNF- α 1.25、2.5、5、10 ng/mL 组(均同时加入完全培养液),各组细胞于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,吸弃培养液,每孔加入 MTT 稀释液(0.5 mg/mL)100 μ L,37℃、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 4 h 后弃 MTT 液,每孔加入 100 μ L DMSO 以溶解甲臞,混匀后,酶标仪测定 550 nm 处吸光度(A)值。

2.3 MTT 法检测 HUVEC 活力

实验分为对照组(给予完全培养液,即 M199+12.5% FBS),模型组(加入 TNF- α 10 ng/mL),Z-藁本内酯低、中、高浓度组(在给予 TNF- α 10 ng/mL 的同时,分别加入 Z-藁本内酯 5、10、20 μ mol/L),于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,吸弃培养液,每孔加入 MTT 稀释液(0.5 mg/mL)100 μ L,37℃、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 4 h,弃掉 MTT 液,每孔加入 100 μ L DMSO 溶解甲臞,混匀后,酶标仪测定 550 nm 处 A 值。

2.4 ELISA 检测 ICAM-1 和 VCAM-1 的量

将 HUVEC 以 1×10^6 /孔接种在 6 孔板中,待细胞贴壁融合后,更换无血清 M199 培养液同步化处理 12 h,用含有不同浓度(5、10、20 μ mol/L) Z-藁本内酯和 TNF- α (终浓度为 10 ng/mL) 的 M199 完全培养液在 37℃ 培养 24 h,收集上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书测定 ICAM-1 和 VCAM-1 的量。先分别向酶标板中加入辣根过氧化物酶标记的 ICAM-1 和 VCAM-1 单克隆抗体,同时加入待测样品上清液 100 μ L,室温孵育 1.5 h,洗涤液洗板 4 次,于反应孔内加入底物溶液室温避光反应 20~30 min,50 μ L 终止液终止反应,并于 450 nm 波长处读取 A 值。按照试剂盒说明随行标准曲线测定各组 ICAM-1 和 VCAM-1 的量。

2.5 Western blotting 法检测 NF- κ B 表达

实验分组与处理同“2.4”项。收集细胞上清液后,细胞用预冷 PBS 清洗,按照核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒说明提取细胞核蛋白。将等量蛋白样品与上样缓冲液 1:1 混合,94℃ 水浴 10 min 使蛋白充分变性,10% SDS-PAGE 进行电泳,电泳结束后将蛋白移至 PVDF 膜上,室温下 10% 牛奶封闭 2 h,分别与 NF- κ B 抗体(1:500)、Actin 抗体(1:1000) 4℃ 共同孵育过夜,T-PBS 洗 15 min,共洗 3 次。用对应的辣根过氧化物酶结合的二抗(1:10000) 室温孵育 2 h,T-PBS 洗 3 次,每次 15 min,ECL 显色后曝光。蛋白条带用 UMAX-2100XL 扫描仪

扫描, Quantity One 软件计算条带灰度值。

2.6 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 TNF- α 致 HUVEC 损伤浓度筛选

向体外培养的 HUVEC 加入 TNF- α 后, 细胞活力降低, 且降低程度随 TNF- α 质量浓度的增加而加强, 细胞存活率与对照组相比显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见图 1。当 TNF- α 质量浓度为 10 ng/mL 时, 细胞存活率约 83%, 因此确定在后续实验中采用 TNF- α 质量浓度为 10 ng/mL。

3.2 对 TNF- α 损伤的 HUVEC 活力的影响

与对照组相比, TNF- α 明显降低 HUVEC 活力

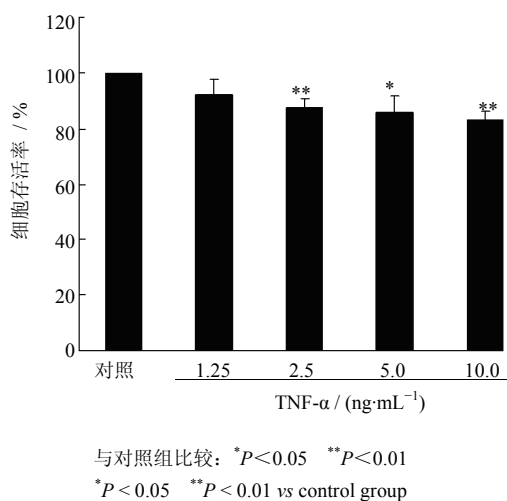
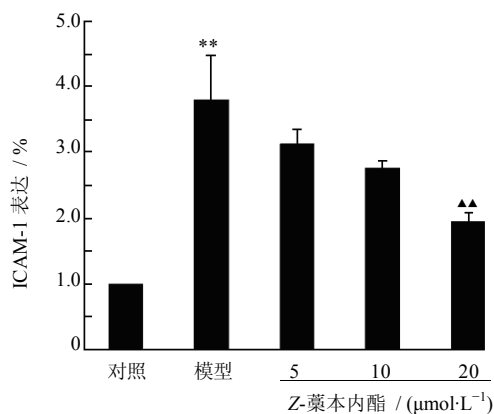


图 1 TNF- α 对 HUVEC 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of TNF- α on cell viability of HUVEC

($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs model group

图 3 Z-藜本内酯对 TNF- α 损伤的 HUVEC 中 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of Z-ligustilide on expression of ICAM-1 and VCAM-1 in HUVEC injured by TNF- α ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

($P < 0.01$); 而 Z-藜本内酯 1~100 $\mu\text{mol/L}$ 与 TNF- α 共同作用于 HUVEC 时, HUVEC 活力强于模型组, 且与对照组相比无统计学差异, 提示 Z-藜本内酯抑制黏附分子分泌及降低 NF- κB 表达的作用不是通过其细胞毒作用产生的。结果见图 2。后续实验选择 Z-藜本内酯 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 3 个浓度进行。

3.3 对 TNF- α 损伤的 HUVEC 中 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响

对照组 HUVEC 中 ICAM-1 和 VCAM-1 表达量较低, 而模型组中 ICAM-1 和 VCAM-1 表达量均显著增加 ($P < 0.01$), 表明炎症因子损伤内皮细胞后细胞黏附因子表达均显著增加。Z-藜本内酯干预后, 可以浓度相关地抑制 ICAM-1 和 VCAM-1 的过度表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见图 3。

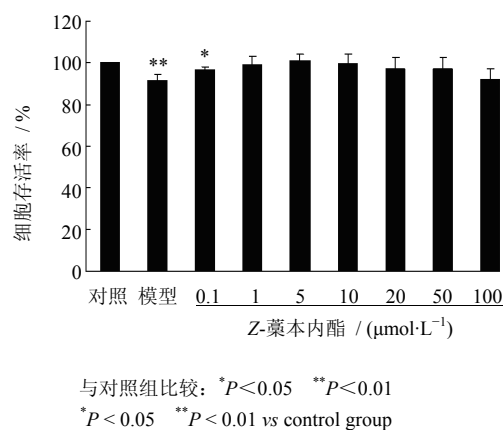
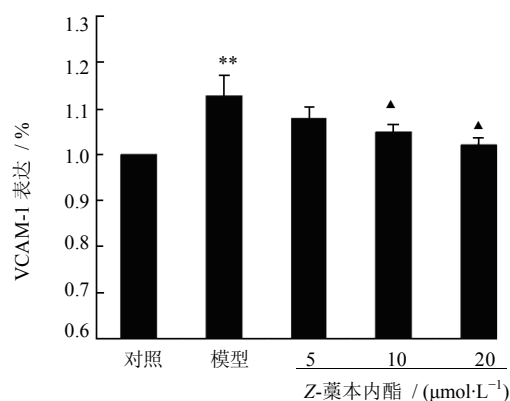


图 2 Z-藜本内酯对 TNF- α 损伤的 HUVEC 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of Z-ligustilide on HUVEC viability injured by TNF- α ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



3.4 对 TNF- α 损伤的 HUVEC NF- κ B 表达的影响

与对照组相比, TNF- α 10 ng/mL 作用于正常 HUVEC, 显著增加细胞核内 NF- κ B 蛋白表达 ($P < 0.05$)。与模型组相比, Z-藁本内酯可降低 TNF- α 损伤的 HUVEC 中 NF- κ B 蛋白表达, 并呈浓度相关, 浓度达 20 μ mol/L 时, 作用显著 ($P < 0.05$)。结果见图 4。

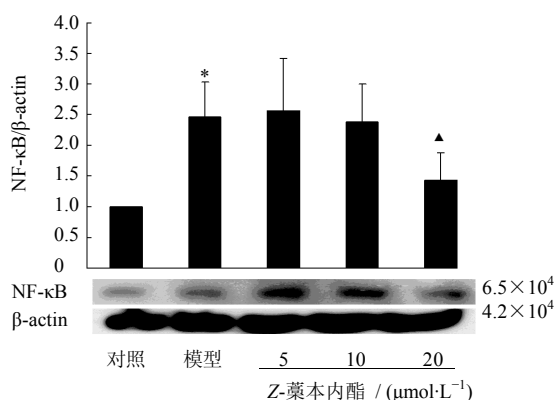


图4 Z-藁本内酯对 TNF- α 损伤的 HUVEC 中 NF- κ B 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Z-ligustilide on expression of NF- κ B in HUVEC injured by TNF- α ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

近年来对血管内皮的研究使人们重新认识血管内皮功能和多种心血管疾病的发病机制, 发现多种药物能调整内皮细胞的内环境及其分泌功能, 从而逆转内皮功能障碍^[8]。本实验发现, TNF- α 10 ng/mL 可以显著降低 HUVEC 活力; 而 Z-藁本内酯在浓度大于 0.01 μ mol/L 且与 TNF- α 共同作用于 HUVEC 时, 未造成细胞活力明显降低, 高浓度时可以提高 HUVEC 存活率, 表明 Z-藁本内酯抑制 ICAM-1 和 VCAM-1 分泌及降低 NF- κ B 表达的作用不是通过其细胞毒作用而产生的^[9]。

TNF- α 是一种单核因子, 主要由活化的单核/巨噬细胞产生。TNF- α 损伤 HUVEC 后, 可使由 HUVEC 合成和分泌的血管活性物质和细胞因子间平衡遭到破坏, 内皮细胞黏附分子和化学趋化因子等表达增加, ICAM-1 和 VCAM-1 可介导循环系统中白细胞特别是单核细胞与活化血管内皮细胞黏附并迁移聚集于内膜下, 摄取脂质形成泡沫细胞, 大量的泡沫细胞堆积最终形成 AS^[10-11]。本研究结果显示, TNF- α

作用于 HUVEC 后, HUVEC 分泌 ICAM-1 和 VCAM-1 的量显著增加, 与文献报道一致^[12]; 而当 Z-藁本内酯干预后, 明显抑制 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达。NF- κ B 是一种多极性转录调节蛋白, 能调节多种参与免疫反应的细胞因子、炎症介质、黏附分子的基因转录过程, 诱导 mRNA 表达。NF- κ B 未被激活时与 I κ B- α 形成一个复合物, 分布在细胞浆中, 当受到 TNF、LPS 等炎症细胞因子刺激后, I κ B- α 将发生磷酸化而迅速降解, NF- κ B 被释放, 激活并进入细胞核, 与 ICAM-1 和 VCAM-1 等黏附分子的启动子和增强子中的 κ B 序列位点特异性结合, 从而启动一系列基因的转录^[13-14]。本研究发现, Z-藁本内酯可抑制 TNF- α 激活 NF- κ B, 有效阻止 NF- κ B 的激活和释放入核, 提示 Z-藁本内酯可能是通过抑制 NF- κ B 的激活, 从而减少内皮细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达, 发挥其内皮保护功能。

参考文献

- [1] Zeng Y, Song J X, Shen X C. Herbal remedies supply a novel prospect for the treatment of atherosclerosis: a review of current mechanism studies [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(2): 159-167.
- [2] Yang Y Y, Hu C J, Chang S M, et al. Aspirin inhibits monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 expression in TNF-alpha stimulated human umbilical vein endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2004, 174(2): 207-213.
- [3] Chung J W, Choi R J, Seo E K, et al. Anti-inflammatory effects of (Z)-ligustilide through suppression of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- kappa B activation pathways [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(4): 723-732.
- [4] Du J, Yu Y, Ke Y, et al. Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 112(1): 211-214.
- [5] Kuang X, Du J R, Liu Y X, et al. Postischemic administration of Z-Ligustilide ameliorates cognitive dysfunction and brain damage induced by permanent forebrain ischemia in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008, 88(3): 213-221.
- [6] Peng H Y, Du J R, Zhang G Y, et al. Neuroprotective effect of Z-ligustilide against permanent focal ischemic damage in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(2): 309-312.
- [7] Wu X M, Qian Z M, Zhu L, et al. Neuroprotective effect of ligustilide against ischaemia-reperfusion injury via up-regulation of erythropoietin and down-regulation of

- RTP801 [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 164(2): 332-343.
- [8] 王 静, 吴时达. 中药对血管内皮功能的保护作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(1): 116-118.
- [9] Yu A L, Lu C Y, Wang T S, *et al.* Induction of heme oxygenase 1 and inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced intercellular adhesion molecule expression by andrographolide in EA. hy926 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(13): 7641-7648.
- [10] 何玉辉, 刘惠亮. 粘附分子与动脉粥样硬化关系的研究进展 [J]. 疑难病杂志, 2006, 5(2): 155-157.
- [11] Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells [J]. *Pharmacol Rep*, 2009, 61(1): 22-32.
- [12] Mochizuki M, Tsuchie Y, Yamada N, *et al.* Effect of sesame lignans on TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in endothelial cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(8): 1539-1544.
- [13] 朱 妮. 核转录因子 NF- κ B 及其抑制剂的研究进展 [J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(7): 869-872.
- [14] Wick G, Grundtman C. *Inflammation and Atherosclerosis* [M]. New York: Springer Wien, 2012.