

大黄素通过调控 TLR4/NF- κ B 通路对脂多糖诱导血管内皮细胞氧化损伤的保护作用研究

孙攀兴¹, 邱春光²

1. 河南省焦作煤业集团有限公司中央医院 心内科, 河南 焦作 454000

2. 郑州大学第一附属医院 心内科, 河南 郑州 450052

摘要: 目的 研究大黄素对脂多糖(LPS)诱导人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)氧化损伤的保护作用及机制。方法 运用CCK-8细胞活力检测法筛选LPS体外诱导HUVEC细胞氧化损伤模型浓度及大黄素给药浓度。取HUVEC细胞,分为对照组、模型组(1 μ g/L LPS)、吡咯烷二硫代氨基甲酸铵(PDTC, 阳性药, 10 μ mol/L)组和大黄素低、高剂量(40、80 μ mol/L)组,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养24 h。ELISA法测定各组细胞上清液中一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量;采用Western Blotting法检测各组细胞中Toll样受体(TLR4)、核因子 κ B(NF- κ B p65)、TNF- α 蛋白的表达。结果 LPS浓度为1 μ g/L,作用24、48 h, HUVEC细胞存活率分别为64.8%、51.2%;40、80 μ mol/L大黄素作用24、48 h对HUVEC细胞存活率无显著影响,选择1 μ g/L作为LPS造模浓度,40、80 μ mol/L作用24 h作为大黄素给药条件。与对照组比较,模型组HUVEC细胞增殖活力显著下降,NO、MDA、ROS、TNF- α 含量显著升高,TLR4、NF- κ B p65、TNF- α 蛋白表达升高($P < 0.01$);与模型组比较,40、80 μ mol/L大黄素给药后HUVEC细胞生存率显著升高,NO、MDA、ROS、TNF- α 含量显著降低,TLR4、NF- κ B p65、TNF- α 蛋白表达显著降低($P < 0.05, 0.01$)。结论 大黄素对LPS诱导的HUVEC细胞氧化损伤具有显著保护作用,其作用机制可能与调控TLR4/NF- κ B通路、抑制炎症有关。

关键词: 大黄素; 血管内皮细胞; 氧化损伤; 脂多糖; TLR4/NF- κ B通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)06-1040-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.06.010

Protective effect of emodin on lipopolysaccharide induced oxidative damage of vascular endothelial cells by regulating TLR4/NF- κ B pathway

SUN Panxing¹, QIU Chunguang²

1. Department of Cardiology, Central Hospital of Henan Jiaozuo Coal Industry Group Co., Ltd., Jiaozuo 454000, China

2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To study the protective effect and mechanism of emodin (EM) on oxidative damage of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** CCK-8 cell viability test was used to screen the concentration of LPS induced oxidative damage model and emodin. HUVEC cells were divided into control group, model group (1 μ g/L LPS), pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC, positive drug, 10 μ mol/L) group and emodin low and high dose (40, 80 μ mol/L) group, and cultured in 37 $^{\circ}$ C and 5% CO₂ incubator for 24 h. ELISA was used to determine the contents of nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species (ROS) and tumor necrosis factor (TNF- α) in the supernatant of each group and the western blotting was used to detect the expression of Toll-like receptor (TLR4), nuclear factor- κ B (NF- κ B p65), TNF- α protein expression in each group of HUVEC cells. **Results** Compared with control group, the proliferative activity of HUVEC cells in LPS-induced model group decreased significantly, the contents of NO, MDA, ROS and TNF- α increased significantly, and the expressions of TLR4, NF- κ B p65, TNF- α and IL-6 increased significantly ($P < 0.01$). After different concentrations of EM administration, the proliferation activity of HUVEC cells increased, the contents of NO, MDA, ROS and TNF- α decreased significantly, and the expressions of TLR4, NF- κ B p65, TNF- α decreased significantly ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** EM

收稿日期: 2019-05-06

基金项目: 河南省科技发展计划(142102310084)

第一作者: 孙攀兴(1982—), 主治医师, 研究方向为冠心病、高血压。Tel: 13839165632 E-mail: 1733623852@qq.com

has a protective effect on LPS-induced oxidative damage in HUVEC endothelial cells, the mechanism may be related to the regulation of TLR4/NF- κ B pathway, inhibit inflammation.

Key words: emodin; human umbilical vein endothelial cells (HUVEC); oxidative damage; lipopolysaccharide; TLR4/NF- κ B signaling pathway

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是临床中心血管疾病常见的病理状态,是冠心病、脑梗死、外周血管病的主要原因^[1-2]。血管内皮细胞对于血管健康发挥着重要作用,血管内皮细胞结构和功能的改变是多种心血管疾病的共同病理基础^[3-4]。血管内皮细胞能够产生许多因子,如一氧化氮(NO)等,从而发挥调节血管渗透性、血管张力及炎症反应,维持血管功能生理平衡,对于预防AS及其他心血管疾病具有重要作用^[5-6]。研究表明,血管内皮功能紊乱与心血管疾病的发生关系密切。慢性炎症及氧化应激是血管内皮细胞损伤及血管内皮功能紊乱的主要诱因,而血管内皮细胞损伤是AS发生的关键因素。因此预防血管内皮细胞损伤成为了防治AS等心血管疾病的重要途径。

大黄素是蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的重要活性成分^[7],其分子结构中具有多个酚羟基,大量研究证实,大黄素具有显著的抗氧化、抗炎作用^[8-9]。Luo等^[10]研究表明,大黄素能够通过抑制核转录因子 κ B(NF- κ B)发挥显著的抗炎作用。此外,大黄素还具有利尿、舒张血管及抗肿瘤作用,对肝癌、胃癌、肺癌等多种恶性肿瘤具有抑制作用^[11-14]。近年来,中药活性成分治疗心血管疾病的作用受到广泛关注,因此本实验运用脂多糖(LPS)诱导建立人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)损伤模型,探讨大黄素对LPS诱导血管内皮细胞氧化损伤的保护作用及机制,为大黄素的应用研究提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

人脐静脉血管内皮细胞株(HUVEC),购自中国科学院上海细胞研究所。

1.2 药品与主要试剂

大黄素(批号518-82-1,质量分数>96%)、吡咯烷二硫代氨基甲酸铵(批号A106037,质量分数>99%),购自上海阿拉丁试剂有限公司;脂多糖(购自美国Sigma-Aldrich公司,批号L2880,质量分数>98%);胎牛血清(批号10099-141,FBS)、DMEM高糖培养基(批号12491-015)、胰蛋白酶、青-链霉素(批号15070063),购自美国Gibco公司;CCK-8试剂盒(购

自日本同仁化学研究所,批号CK04);一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A012-1、A003-3、E004、H052);TLR-4(批号14358)兔单克隆抗体、NF- κ B p65(批号8242)兔单克隆抗体、TNF- α (批号11948)兔单克隆抗体、 β -actin(批号4970)兔单克隆抗体、辣根过氧化物酶-羊抗兔IgG二抗(批号7074),购自美国CST公司;BCA蛋白定量试剂盒(批号23227)、ECL超敏化学发光液(批号34580)、哺乳动物蛋白抽提试剂(批号78501),购自美国Thermo Fisher Scientific公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶试剂盒(批号18D250),购自美国EpiZyme Scientific公司;生理盐水(批号SBJ-1203,南京森贝伽生物公司);其余试剂均为实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 主要仪器

酶标仪(xMark)、Trans-Blot蛋白转膜系统、细胞计数器(TC20),购自美国伯乐公司;离心机(5415D,德国Eppendorf公司);分析天平(AX504,瑞士梅特勒-托利多公司);涡旋仪(Vortex Mixer);CellSens图像采集系统(Olympus);超声仪(BQS-100A,杭州宝珀超声波科技公司);超声破碎仪(ZQ-650Y,上海争巧科学仪器有限公司);CO₂细胞培养箱(日本三洋公司);无菌操作台(苏州净化)。

2 方法

2.1 细胞培养

HUVEC细胞用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM高糖培养基(以下简称“培养基”),在37 $^{\circ}$ C、CO₂浓度为5%的培养箱中培养。

2.2 药物配置

大黄素溶液配制:精密称取大黄素对照品27.0 mg溶于1 mL二甲基亚砜(DMSO)中,配成浓度为100 mmol/L的大黄素对照品母液,过0.22 μ m微孔滤膜,-20 $^{\circ}$ C保存。用时取适量母液用培养基稀释成浓度为10 mmol/L的工作液。

LPS溶液配制:精密称取LPS对照品2.0 mg溶于1 mL培养基中,配成质量浓度为2.0 g/L的LPS

对照品溶液,过0.22 μm微孔滤膜,-20℃保存。

2.3 造模/给药浓度筛选

2.3.1 LPS造模浓度筛选 取对数生长期HUVEC细胞,以细胞数5 000/孔均匀铺于96孔板中;设置空白组(不接种细胞)、对照组及不同浓度(0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 μg/L)的LPS组,每组6个复孔。给药24、48 h后,每孔加入10 μL CCK-8试剂后继续培养2 h。酶标仪450 nm波长处测定各组吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3.2 大黄素给药浓度筛选 取对数生长期HUVEC细胞,以细胞数3 000/孔,将细胞均匀铺于96孔板中;设置空白组(不接种细胞)、对照组及不同浓度(20、40、80、120、160 μmol/L)的大黄素组,每组6个复孔,每孔体积100 μL。按“2.3.1”项所述方法检测不同浓度大黄素给药24、48 h后对HUVEC细胞存活率的影响。

2.4 分组及给药

HUVEC细胞以细胞数 6×10^4 个接种于100 mm细胞培养皿中,设对照组、模型组(1 μg/L LPS)、PDTC(阳性药,10 μmol/L)和大黄素低、高剂量(40、80 μmol/L)组。对照组加入培养基,其余组分别加入含相应终浓度LPS或LPS+大黄素的培养基,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h后用于检测分析。

2.5 大黄素对LPS诱导HUVEC细胞存活率的影响

取HUVEC细胞,按“2.4”项方法造模给药后,按“2.3.1”项CCK-8法检测各组细胞存活率,考察大黄素对LPS诱导HUVEC细胞存活率的影响。

2.6 大黄素对HUVEC细胞上清液中NO、MDA、ROS、TNF-α含量的影响

取HUVEC细胞,按“2.4”项方法造模给药后,收集上清液,应用相应试剂盒检测NO、MDA、ROS、TNF-α的含量。

2.7 大黄素对LPS诱导HUVEC细胞中TLR4/NF-κB通路相关蛋白表达的影响

取HUVEC细胞,按“2.4”项方法造模给药,收集细胞,提取蛋白,BCA试剂盒测定各组蛋白浓度。取40 μg蛋白样品经过SDS-PAGE电泳分离后,转至PVDF膜(0.45 μm)上,5%脱脂牛奶封闭1 h后,TLR4、NF-κB p65、TNF-α等一抗(1:1 000)在4℃条件下摇床孵育过夜,TBST清洗3次,每次10 min,二抗(1:10 000)室温孵育1 h,用TBST清洗3次,每次10 min,ECL显色后运用GBOX成像分析系统获得

条带,以β-actin作为内参。采用Image J 1.8图像软件进行灰度值分析。

2.8 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验进行组间比较。

3 结果

3.1 LPS造模及大黄素给药浓度筛选

运用CCK-8细胞活力检测法筛选LPS造模浓度及大黄素给药浓度,结果见图1、2。随着LPS浓度增大,作用时间增长,HUVEC细胞存活率依次降低,当LPS浓度为1 μg/L,作用24、48 h,HUVEC细胞存活率分别为64.8%、51.2%;不同浓度大黄素对HUVEC细胞存活率影响较小,40、80 μmol/L大黄素作用24、48 h对HUVEC细胞存活率无显著影响,因此选择1 μg/L作为LPS造模浓度,40、80 μmol/L作用24 h作为大黄素给药条件。

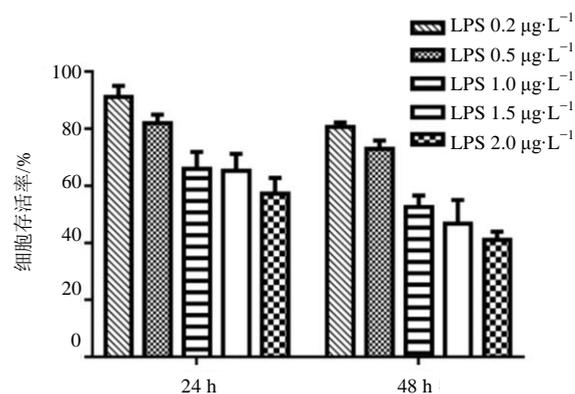


图1 不同浓度LPS对HUVEC细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 1 Effect of different concentrations of LPS on HUVEC cell viability ($\bar{x} \pm s, n=6$)

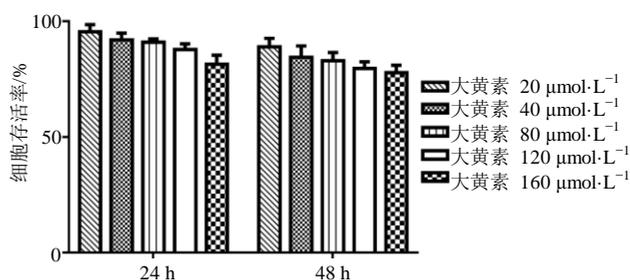


图2 不同浓度大黄素对HUVEC细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 2 Effect of different concentrations of 大黄素 on HUVEC cell viability ($\bar{x} \pm s, n=6$)

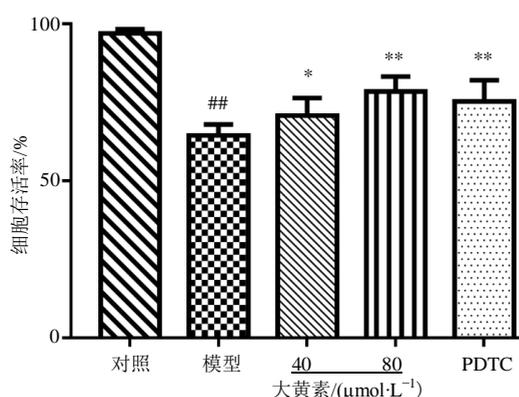
3.2 大黄素对LPS诱导HUVEC细胞存活率的影响

结果如图3所示,与对照组比较,1 μg/L LPS诱导的模型组HUVEC细胞存活率(66.5%)显著降低($P < 0.01$);LPS诱导后给予40、80 μmol/L大黄素

给药干预后细胞存活率分别为74.2%、78.8%，与模型组比较显著升高($P < 0.05, 0.01$)。结果表明，大黄素对LPS诱导的HUVEC细胞氧化损伤具有一定的保护作用。

3.3 大黄素对LPS诱导HUVEC细胞上清液中NO、MDA、ROS、TNF- α 含量的影响

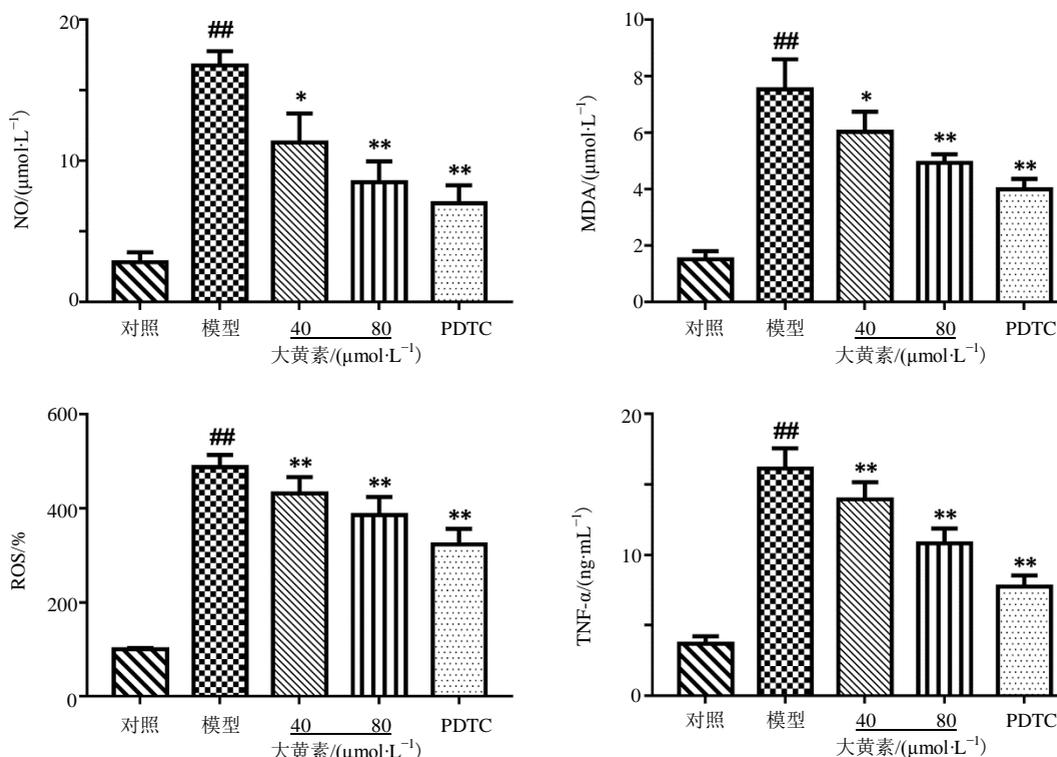
结果如图4所示，与对照组比较，LPS诱导的模



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

图3 大黄素对LPS诱导HUVEC细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Effect of EM on survival rate of HUVEC cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n=6$)



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

图4 大黄素对LPS诱导HUVEC细胞上清液中NO、MDA、ROS、TNF- α 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effects of EM on content of No, MDA, ROS and TNF- α in supernatant induced by LPS in HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

型组细胞上清液中NO、MDA、ROS、TNF- α 含量显著升高($P < 0.01$);低、高剂量的大黄素给药后均能显著降低NO、MDA、ROS、TNF- α 的含量,与模型组比较差异显著($P < 0.05, 0.01$)。结果表明,大黄素对LPS诱导HUVEC细胞氧化损伤具有改善作用。

3.4 大黄素对LPS诱导HUVEC细胞中TLR4/NF- κ B通路相关蛋白表达的影响

结果如图5所示,与对照组比较,模型组中TLR4、NF- κ B p65、TNF- α 等蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,不同浓度大黄素给药作用后, HUVEC细胞中TLR4、NF- κ B p65、TNF- α 等蛋白表达均显著降低($P < 0.05, 0.01$)。结果表明,大黄素能够通过作用于TLR4/NF- κ B通路,抑制炎症因子的释放。

4 讨论

炎症反应和氧化应激是血管内皮细胞氧化损伤的主要原因^[15-16]。血管内皮细胞炎症反应在血管内皮细胞氧化损伤过程中发挥着关键作用。Toll样受体4(TLR4)是机体中参与免疫调节的重要蛋白分子^[17-18]。而LPS能够通过TLR4激活NF- κ B信号通路,诱发炎症反应促使炎症因子TNF- α 、IL-6释放^[19-20],激活一氧化氮合酶(iNOS),造成大量NO、

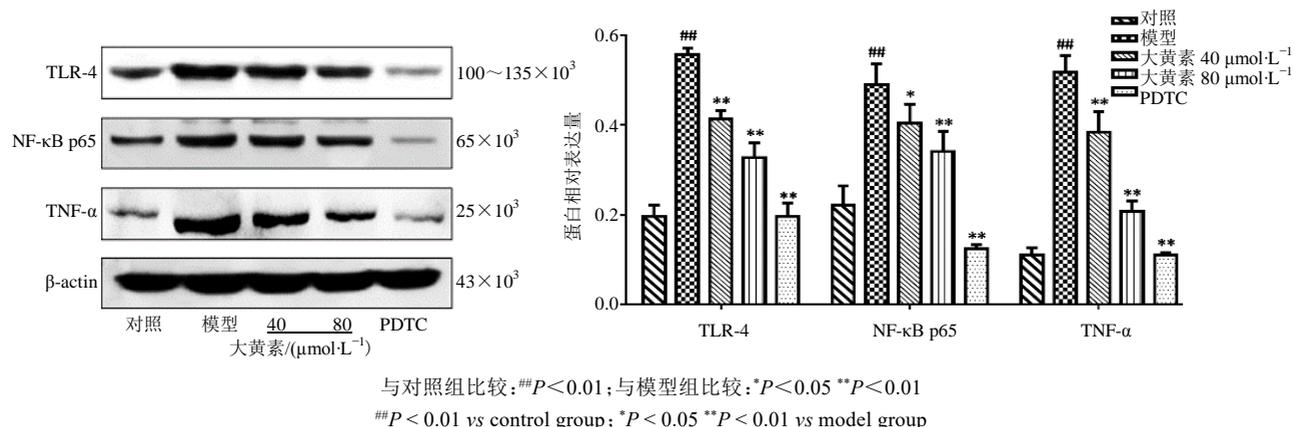


图5 大黄素对LPS诱导HUVEC细胞中TLR4/NF-κB通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of emodin on expression of TLR4/NF-κB pathway related proteins in HUVEC cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

MDA、ROS生成^[21],引起严重的炎症反应和氧化应激,导致血管内皮细胞功能障碍和组织氧化损伤,进一步促使血管内皮细胞衰老、死亡,诱导血管内皮功能紊乱,进而诱发动脉粥样硬化、冠心病等心血管疾病^[22-23]。因此抑制血管内皮细胞慢性氧化损伤,促进血管内皮细胞功能平衡,对于预防动脉粥样硬化等心血管疾病具有重要作用。

大黄素作为一种天然抗氧化活性成分,具有显著的抗炎作用。本实验运用LPS诱导HUVEC细胞氧化损伤,考察大黄素对LPS诱导氧化损伤的保护作用。研究表明,大黄素能够通过抑制TLR4/NF-κB信号通路,抑制TLR4、NF-κB p65蛋白的表达及TNF-α、IL-6等炎症因子的释放,降低血管内皮细胞中NO、MDA、ROS水平,从而抑制炎症反应及氧化应激,发挥对LPS诱导HUVEC细胞氧化损伤的保护作用。

大黄素对LPS诱导的血管内皮细胞氧化损伤具有保护作用,其作用机制可能是通过抑制LR4/NF-κB信号通路活化从而抑制炎症反应和氧化应激。因此,大黄素在心血管疾病预防及保护作用领域具有一定的应用研究价值。

参考文献

[1] 李秀丹,石立力,姜晓艳.血管平滑肌细胞自噬与糖尿病动脉粥样硬化关系的研究进展[J].临床心血管病杂志,2019,35(1):92-95.
 [2] 战云,张英杰,冷彬.黄芪甲苷通过TLR4/NF-κB通路改善脂多糖诱导的急性血管内皮损伤[J].中药药理与临床,2018,34(3):77-80.
 [3] 刘倩,韦建瑞,张雷,等.枸杞多糖通过抑制NF-κB信号通路保护脂多糖损伤的人脐静脉血管内皮细胞增殖活性与分泌功能[J].暨南大学学报:自然科学与医学

版,2017,38(3):240-246.
 [4] 卿即娜,陈红阳,尹琳洁,等.血管内皮细胞衰老与心血管疾病的相关性[J].中国动脉硬化杂志,2019,27(2):161-168.
 [5] 陈德才,王雅,马从乾,等.miR-23b通过MAPK信号通路对H₂O₂诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J].中国老年学杂志,2019,39(1):136-141.
 [6] 陈笑梅,牟雅琳,吕鹏,等.miRNAs调控动脉粥样硬化相关细胞功能研究进展[J].厦门大学学报:自然科学版,2018,57(5):593-601.
 [7] 高红刚,周菊华.大黄素抗炎作用及相关机制研究进展[J].济宁医学院学报,2016,39(5):348-352.
 [8] 蔡鹏飞,刘明华,冯林林,等.β₁(1-42)诱导HUVEC细胞凋亡最适浓度与时间选择[J].泸州医学院学报,2014,37(2):169-171.
 [9] 周洁,张红,何芳,等.LPS诱导HUVEC细胞凋亡最适浓度与时间选择[J].四川生理科学杂志,2013,35(3):97-99.
 [10] Luo S, Deng X, Liu Q, et al. Emodin ameliorates ulcerative colitis by the flagellin-TLR5 dependent pathway in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 59: 269-275.
 [11] Ding Q H, Ye C Y, Chen E M, et al. Emodin ameliorates cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting NF-kappaB and Wnt/beta-catenin signaling *in-vitro* and *in-vivo* [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 61: 222-230.
 [12] Meng G, Liu Y, Lou C, et al. Emodin suppresses lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory responses and NF-kappaB activation by disrupting lipid rafts in CD14-negative endothelial cells [J]. Br J Pharmacol, 2010, 161(7): 1628-1644.
 [13] 熊思敏,张金晓,康玮,等.大黄素诱导人肝癌HepG2细胞线粒体凋亡作用研究[J].药物评价研究,2018,41

- (5): 773-779.
- [14] 刘畅, 罗英花, 蒋雪园, 等. 大黄素对人肝癌 Huh7 细胞的凋亡作用及机制研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(3): 367-371.
- [15] Zhang L, He D, Li K, et al. Emodin targets mitochondrial cyclophilin D to induce apoptosis in HepG2 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 222-228.
- [16] Zu C, Qin G, Yang C, et al. Low dose Emodin induces tumor senescence for boosting breast cancer chemotherapy via silencing NRARP [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(4): 973-978.
- [17] Endler A, Chen L, Li Q, et al. Int6/eIF3e silenced HIF2 α stabilization enhances migration and tube formation of HUVECs via IL-6 and IL-8 signaling [J]. *Cytokine*, 2013, 62(1): 115-122.
- [18] Swamynathan S, Loughner C L, Swamynathan S K. Inhibition of HUVEC tube formation via suppression of NF κ B suggests an anti-angiogenic role for SLURP1 in the transparent cornea [J]. *Exp Eye Res*, 2017, 164: 118-128.
- [19] Wang N, Meng X, Liu Y, et al. LPS promote Osteosarcoma invasion and migration through TLR4/HOTAIR [J]. *Gene*, 2019, 680: 1-8.
- [20] Sun X, Zeng H, Wang Q, et al. Glycyrrhizin ameliorates inflammatory pain by inhibiting microglial activation-mediated inflammatory response via blockage of the HMGB1-TLR4-NF- κ B pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 369(1): 112-119.
- [21] Liu J, Du L. PERK pathway is involved in oxygen-glucose-serum deprivation-induced NF- κ B activation via ROS generation in spinal cord astrocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467(2): 197-203.
- [22] Zhao Y, Evans M A, Allison M A, et al. Multisite atherosclerosis in subjects with metabolic syndrome and diabetes and relation to cardiovascular events: the multi-ethnic study of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2019, 282: 202-209.
- [23] Choi E S, Yoon J J, Han B H, et al. Ligustilide attenuates vascular inflammation and activates Nrf2/HO-1 induction and, NO synthesis in HUVECs [J]. *Phytomedicine*, 2018, 38: 12-23.