

小檗碱通过 JNK 通路降低内脏脂肪素诱导人脐静脉内皮细胞分泌 IL-6 和 TNF- α 的研究

万强^{1,2}, 周凤华², 崔小冰³, 刘中勇^{1*}, 贾钰华^{2*}

1. 江西中医药大学附属医院 心血管内科, 江西 南昌 330006

2. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515

3. 南方医科大学中西医结合医院, 广东 广州 510315

摘要: 目的 研究 c-Jun 氨基端激酶 (JNK) 信号转导通路对内脏脂肪素 (内脂素) 诱导人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 分泌白细胞介素-6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的调控作用及小檗碱的干预作用。方法 体外培养 HUVEC, 用内脂素不同质量浓度 (0、50、100、200 $\mu\text{g/L}$) 及不同时间 (0、6、12、24、48 h) 作用 HUVEC, MTT 法检测 HUVEC 增殖; 流式细胞仪检测 HUVEC 凋亡; ELISA 法检测 HUVEC 上清液中 IL-6 及 TNF- α 的量; Western blotting 法检测 HUVEC 中 p-JNK、Bax、Bcl-2 蛋白表达; 并用小檗碱 (50 $\mu\text{mol/L}$) 及 JNK 通路特异性抑制剂 SP600125 (10 $\mu\text{mol/L}$) 干预 HUVEC, 检测小檗碱的干预作用。结果 与对照组相比, 100 $\mu\text{g/L}$ 内脂素可显著抑制 HUVEC 增殖, 诱导 HUVEC 凋亡, 诱导 HUVEC 分泌 IL-6 及 TNF- α 的量显著增高, 并可显著增加 HUVEC 内 p-JNK 及 Bax 蛋白表达, 减少 HUVEC 内 Bcl-2 蛋白表达; 与内脂素组相比, 小檗碱及 SP600125 均可显著减轻内脂素对 HUVEC 增殖的抑制及其诱导的 HUVEC 凋亡, 降低内脂素诱导 HUVEC 上清液中 IL-6 及 TNF- α 的量并能降低 HUVEC 中 p-JNK 及 Bax 蛋白的表达, 增加 HUVEC 内 Bcl-2 蛋白表达。结论 小檗碱可减少 IL-6 及 TNF- α 的分泌, 减轻内脂素诱导的 HUVEC 损伤, 其机制可能与抑制 JNK 信号转导通路有关。

关键词: 小檗碱; 内脏脂肪素; c-Jun 氨基端激酶; 人脐静脉内皮细胞; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)07-1012-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.07.014

Study on berberine of reducing IL-6 and TNF- α secreted in HUVEC induced by visfatin through JNK signal pathway

WAN Qiang^{1,2}, ZHOU Feng-hua², CUI Xiao-bing³, LIU Zhong-yong¹, JIA Yu-hua²

1. Department of Cardiovascular Disease, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

2. College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

3. Chinese-Western Integrated Medicine Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510315, China

Abstract: Objective To study the regulation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway on interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) secreted in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) induced by visfatin and the intervention of berberine. **Methods** HUVEC was cultured for the *in vitro* experiment, visfatin was added at different concentration (0, 50, 100, and 200 $\mu\text{g/L}$) and in different times (0, 6, 12, 24, and 48 h) to observe the effect on HUVEC. MTT assay was used to detect the proliferation of HUVEC, apoptosis rate was measured by Flow Cytometer, the contents of IL-6 and TNF- α in HUVEC supernatant were determined by enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) assay, and the protein expressions of p-JNK, Bax, and Bcl-2 in HUVEC lysate were determined by Western blotting. Berberine (50 $\mu\text{mol/L}$) and SP600125 (10 $\mu\text{mol/L}$) were added to interfere HUVEC and to detect the effect of berberine. **Results** Compared with the control group, visfatin (100 $\mu\text{g/L}$) could significantly decrease the proliferation of

收稿日期: 2014-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81460680, 81373574); 江西省科技计划项目 (20135BBG70002); 广州市海珠区科技计划项目 (2013-cg-35)

作者简介: 万强 (1985—), 男, 医师, 博士, 主要从事心血管病的实验及临床研究。Tel: 15521119606 E-mail: wanqiang109559140@163.com

*通信作者 刘中勇 (1962—), 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事中西医结合诊治心血管疾病研究。

Tel: 13803527962 E-mail: liuzhongyong2014@163.com

贾钰华 (1959—), 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事心血管病证的中西医结合诊治研究。

Tel: 18520041049 E-mail: yhjia_smu@163.com

HUVEC, induce HUVEC apoptosis, and increase the IL-6 and TNF- α contents in HUVEC supernatant. Meanwhile, it could increase p-JNK and Bax expression, decrease Bcl-2 expression after 24 h. Compared with visfatin group, berberine and SP600125 could increase the proliferation of HUVEC while decrease the IL-6 and TNF- α contents in HUVEC supernatant, restrain p-JNK and Bax expression while increase Bcl-2 expression in HUVEC. **Conclusion** Berberine could decrease the contents of IL-6 and TNF- α in HUVEC supernatant and ease the injury induced by visfatin, the protective mechanism is related to the inhibition of JNK signal pathway activation.

Key words: berberine; visfatin; c-Jun N-terminal kinase; human umbilical vein endothelial cell; interleukin-6; tumor necrosis factor- α

内脏脂肪素(内脂素, visfatin)是在腹部内脏脂肪组织中发现并分离出的一种脂肪细胞因子^[1]。既往研究结果证实内脂素与动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的形成密切相关,并可诱导与 AS 有关的炎症因子的分泌^[2-4]。小檗碱(berberine)又称黄连素,是一种常见的异喹啉生物碱,存在于小檗科等 4 个科 10 个属的众多植物中。研究表明其可通过抗炎、抑制氧化应激、调节血脂、抗血栓等多途径发挥抗 AS 效应^[5-6]。c-Jun 氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)通路的激活可通过诱导内皮细胞凋亡、损伤血管内皮、促进炎症因子的释放等参与 AS 的形成^[7]。内皮细胞损伤及损伤后持续性炎症反应是 AS 的始动因素之一^[8],小檗碱能否通过调控 JNK 通路,减少炎症因子的分泌,从而减轻由内脂素诱导的内皮细胞损伤尚未得知。本研究采用内脂素诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)损伤,加以小檗碱及 JNK 通路特异性抑制剂 SP600125 干预,检测细胞增殖及上清液中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的量及 p-JNK、Bax、Bcl-2 蛋白的表达,探讨小檗碱抗 AS 作用机制是否通过抑制 JNK 通路,减轻内脂素诱导的 HUVEC 损伤得以实现。

1 材料

1.1 细胞与试剂

HUVEC 细胞株(Cascade Biologics 公司);胎牛血清(杭州四季青生物公司);DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司);二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司);MTT 干粉、p-JNK 抗体、Bax 抗体、Bcl-2 抗体(美国 Cell Signal Technology 公司);IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒(美国 eBioscience 公司);重组人内脂素细胞因子(美国 Peprotech 公司,5 μ g 加入 0.5 mL 超纯水中充分溶解);盐酸小檗碱(质量分数 \geq 98%,批号 211-195-9,上海信域生物技术有限公司,20 mg 溶于 1 000 μ L DMSO 中);JNK

通路特异性抑制剂 SP600125(批号 129-56-6,美国 Tocris Bioscience 公司,2.5 mg 溶于 935 μ L DMSO 中);Annexin V-FITC 试剂盒(美国 Bio Vision 公司)。

1.2 仪器

Macromax 型低温高速离心机(美国 Thermo Electron 公司);HS-840-U 型超净台(苏净集团安泰公司);MK3 型酶标定量测定仪(德国 Thermo 公司);TS100-F 型 Eclipse Ti 荧光倒置显微镜(日本尼康公司);241-220 型恒温细胞培养箱(德国 Heraeus 公司);JY-SCZ2 型 SDS 电泳系统(北京君意东方电泳设备有限公司);ECHO-PLUS 型全自动生化仪(意大利爱康公司);2000MM 型 Kodak Image Station 成像系统(美国 KODAK 公司);1703940 型半干转膜仪(美国 Bio-rad 公司);FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 Becton Dicknson 公司)。

2 方法

2.1 实验分组及处理

内脂素不同质量浓度组:分别以 0、50、100、200 μ g/L 内脂素作用 HUVEC 24 h。内脂素作用不同时间组:以 100 μ g/L 内脂素分别作用 HUVEC 0、6、12、24、48 h。药物干预组的细胞分为 4 组:①对照组;②内脂素组:加入内脂素 100 μ g/L 刺激 24 h;③内脂素+小檗碱组:加入 50 μ mol/L 小檗碱^[9]预孵育 1 h 后再加入内脂素 100 μ g/L 刺激 24 h;④内脂素+SP600125 组:加入 SP600125(终浓度为 10 μ mol/L^[10])预处理细胞 30 min,再给予内脂素 100 μ g/L 刺激 24 h。

2.2 MTT 法检测细胞增殖

将 HUVEC 以每孔 1×10^4 接种于 96 孔板,24 h 后撤除血清,细胞分组同“2.1”项,每组设 6 个复孔。干预结束后,加 20 μ L MTT (5 g/L)于 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,每孔加 150 μ L DMSO 摇床上低速振荡 10 min,至形成的结晶物完全溶解,在酶联检测仪 570 nm 处测各孔吸光度(A)值。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

将 HUVEC 以每孔 2×10^5 接种于 12 孔板,24 h

后换无血清培养液再培养 24 h, 细胞分组同“2.1”项, 每组设 6 个复孔, 收集细胞, 加入 Annexin V-FITC 及 PI 双染, 流式细胞仪检测 HUVEC 凋亡率。

2.4 HUVEC 培养上清液 IL-6 及 TNF- α 定量测定

取对数生长的 HUVEC 以 1×10^5 /mL 接种于培养皿, 细胞分组同“2.1”项。收集细胞培养上清液, ELISA 法检测上清液中 IL-6 及 TNF- α , 具体操作参照试剂盒说明书。

2.5 HUVEC 中 p-JNK、Bax、Bcl-2 蛋白表达的测定

细胞分组同“2.1”项, 提取细胞总蛋白, BCA 法测蛋白量, 每孔上样量为 20 μ L, 加入上样缓冲液, PCR 仪内 99.9 $^{\circ}$ C 变性 5 min。制备 12% 分离胶及 5% 浓缩胶, 上样电泳, 100 mA 转膜 1 h, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗膜后以 1 : 1 000 稀释的一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日 TBST 洗膜后以 1 : 2 000 稀释的二抗室温孵育 1 h, ECL 法显色成像, 所获图像用 Image Tool 3.0 测定, 分析条带积分吸光度值, 以 β -actin 为内参。

2.6 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计处理, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间采用 *t* 检验, 多组间采用单因素方差分析检验和 Bonferroni 检验。

3 结果

3.1 内脂素不同质量浓度及不同作用时间对 HUVEC 的作用

3.1.1 对 HUVEC 增殖的影响 与对照组相比, 50、100、200 μ g/L 内脂素作用 24 h 均可显著抑制 HUVEC 增殖 ($P < 0.01$); 内脂素 100 μ g/L 与 200 μ g/L 组差异无统计学意义, 见表 1。与对照组相比, 100 μ g/L 内脂素作用 12、24、48 h 后均能显著抑制 HUVEC 增殖 ($P < 0.01$); 100 μ g/L 内脂素作用 24 h

与作用 6、12 h 相比对 HUVEC 增殖抑制作用差异显著 ($P < 0.01$), 与作用 48 h 相比差异无显著性, 见表 2。

3.1.2 诱导 HUVEC 凋亡的影响 与对照组相比, 100、200 μ g/L 内脂素作用 24 h 均可显著诱导 HUVEC 凋亡 ($P < 0.01$), 见表 1。与对照组相比, 100 μ g/L 内脂素作用 12、24、48 h 后均能显著诱导 HUVEC 凋亡 ($P < 0.01$), 见表 2。

3.1.3 对 HUVEC 分泌 IL-6 及 TNF- α 的影响 与对照组相比, 100、200 μ g/L 内脂素作用 24 h 均可显著诱导 HUVEC 分泌 IL-6 及 TNF- α ($P < 0.01$), 100 μ g/L 内脂素诱导 HUVEC 分泌 TNF- α 水平显著高于 200 μ g/L 内脂素组 ($P < 0.01$), 见表 1。与对照组相比, 100 μ g/L 内脂素作用 6 h 后即可显著诱导 HUVEC 分泌 TNF- α ($P < 0.05$), 作用 24 h 后达峰值 ($P < 0.01$), 作用 48 h 后分泌 TNF- α 呈下降趋势, 但与作用 24 h 组无显著差异; 100 μ g/L 内脂素作用 12 h 后可显著诱导 HUVEC 分泌 IL-6 ($P < 0.01$), 作用 24 h 后达峰值 ($P < 0.01$), 较 12 h 组有显著提高 ($P < 0.01$), 作用 48 h 后分泌 IL-6 呈下降趋势, 较作用 24 h 组有显著差异 ($P < 0.01$), 见表 2。

3.1.4 对 HUVEC 中 p-JNK、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 与对照组相比, 100、200 μ g/L 内脂素作用 24 h 后均可显著提高 HUVEC 中 p-JNK、Bax 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 并显著减少 Bcl-2 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 见表 1 与图 1。与对照组相比, 100 μ g/L 内脂素作用 12 h 后可显著提高 HUVEC 中 p-JNK、Bax 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 作用 24 h 后达到峰值 ($P < 0.01$), 并显著减少 HUVEC 中 Bcl-2 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 见表 2 与图 2。

表 1 内脂素不同质量浓度对 HUVEC 增殖、凋亡、分泌 IL-6 及 TNF- α 和 p-JNK、Bax、Bcl-2 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of visfatin at different concentration of on proliferation, apoptosis, IL-6 and TNF- α contents, p-JNK, Bax, and Bcl-2 expression in HUVEC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	细胞增殖(A)	细胞凋亡率/%	IL-6/(ng·L ⁻¹)	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	p-JNK	Bax	Bcl-2
对照	—	0.87 \pm 0.11	14.34 \pm 3.67	351.76 \pm 12.86	170.47 \pm 4.54	0.38 \pm 0.02	0.24 \pm 0.04	0.92 \pm 0.04
内脂素	50	0.69 \pm 0.09 ^{***}	19.57 \pm 4.39 ^{▲▲}	361.62 \pm 14.99 ^{▲▲}	177.25 \pm 4.43 ^{▲▲}	0.42 \pm 0.02 ^{▲▲}	0.30 \pm 0.03 ^{▲▲}	0.84 \pm 0.03 [▲]
	100	0.43 \pm 0.06 ^{**}	44.76 \pm 4.53 ^{**}	588.11 \pm 14.21 ^{**}	421.73 \pm 8.12 ^{**}	0.81 \pm 0.03 ^{**}	0.82 \pm 0.02 ^{**}	0.63 \pm 0.04 ^{**}
	200	0.47 \pm 0.09 ^{**}	47.53 \pm 3.97 ^{**}	521.97 \pm 12.81 ^{***}	387.24 \pm 7.22 ^{**▲▲}	0.74 \pm 0.03 ^{**}	0.63 \pm 0.02 ^{**▲▲}	0.48 \pm 0.03 ^{**▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与内脂素 100 μ g/L 组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$, 表 2 同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs 100 μ g/L visfatin group, Table 2 is same

表 2 内脂素作用不同时间对 HUVEC 增殖、凋亡、分泌 IL-6 及 TNF-α 和 p-JNK、Bax、Bcl-2 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of visfatin in different time on proliferation, apoptosis, IL-6 and TNF-α contents, p-JNK, Bax, and Bcl-2 expression in HUVEC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	作用时间/h	细胞增殖(A)	细胞凋亡率/%	IL-6/(ng·L ⁻¹)	TNF-α/(ng·L ⁻¹)	p-JNK	Bax	Bcl-2
对照	—	0.83±0.09	14.72±3.43	343.85±12.13	165.41±9.04	0.31±0.01	0.33±0.03	0.89±0.04
内脂素	6	0.67±0.11 ^{**▲▲}	17.61±3.63 ^{▲▲}	351.20±11.52 ^{▲▲}	199.87±9.62 ^{*▲▲}	0.38±0.02 ^{▲▲}	0.38±0.04 ^{▲▲}	0.52±0.03 ^{**▲}
	12	0.63±0.08 ^{**▲▲}	29.34±3.84 ^{**▲}	395.01±10.16 ^{**▲▲}	268.19±11.50 ^{**▲▲}	0.52±0.02 ^{***▲▲}	0.53±0.03 ^{**▲▲}	0.47±0.05 ^{**▲}
	24	0.45±0.07 ^{**}	42.84±4.28 ^{**}	593.06±11.96 ^{**}	395.34±12.59 ^{**}	0.88±0.03 ^{**}	0.92±0.05 ^{**}	0.32±0.04 ^{**}
	48	0.48±0.11 ^{**}	58.53±4.69 ^{**▲▲}	533.66±10.61 ^{**▲▲}	379.11±13.99 ^{**}	0.81±0.04 ^{**}	0.75±0.04 ^{**▲▲}	0.38±0.04 ^{**}

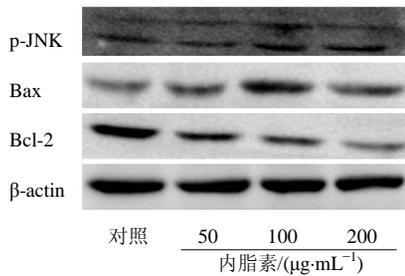


图 1 内脂素不同质量浓度对 HUVEC 中 p-JNK、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effects of visfatin at different concentration on p-JNK, Bax, and Bcl-2 expression in HUVEC

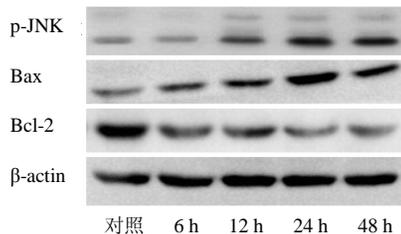


图 2 内脂素作用不同时间对 HUVEC 中 p-JNK、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of visfatin in different time on p-JNK, Bax, and Bcl-2 expression in HUVEC

表 3 小檗碱及 SP600125 对内脂素抑制 HUVEC 增殖，诱导 HUVEC 凋亡，促进分泌 IL-6 及 TNF-α，调节 p-JNK、Bax、Bcl-2 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of berberine and SP600125 on proliferation, apoptosis, IL-6 and TNF-α contents, p-JNK, Bax, and Bcl-2 expression in HUVEC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C/(μmol·L ⁻¹)	细胞增殖(A)	细胞凋亡率/%	IL-6/(ng·L ⁻¹)	TNF-α/(ng·L ⁻¹)	p-JNK	Bax	Bcl-2
对照	—	0.83±0.11	15.24±3.68	356.77±11.09	176.41±13.70	0.74±0.23	0.55±0.04	0.89±0.05
内脂素	—	0.42±0.08 ^{**}	46.62±3.87 ^{**}	585.97±9.96 ^{**}	405.91±16.71 ^{**}	0.93±0.19 ^{**}	0.87±0.06 ^{**}	0.42±0.04 ^{**}
内脂素+SP600125	10	0.65±0.10 ^{**▲▲}	28.53±2.65 ^{**▲▲}	462.56±16.07 ^{**▲▲}	285.86±13.16 ^{**▲▲}	0.37±0.17 ^{**▲▲}	0.51±0.04 ^{▲▲}	0.78±0.06 ^{*▲}
内脂素+小檗碱	50	0.77±0.09 ^{▲▲}	22.84±3.05 ^{**▲▲}	398.68±13.12 ^{**▲▲}	221.62±18.96 ^{**▲▲}	0.53±0.21 ^{**▲▲}	0.47±0.03 ^{▲▲}	0.63±0.05 ^{**▲}

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01; 与内脂素组比较: ▲P<0.05 ▲▲P<0.01
*P<0.05 **P<0.01 vs control group; ▲P<0.05 ▲▲P<0.01 vs visfatin group

3.2 小檗碱的干预作用

3.2.1 对内脂素抑制 HUVEC 增殖的干预作用 与内脂素组相比，50 μmol/L 小檗碱和 10 μmol/L SP600125 作用 24 h 均可显著减轻内脂素对 HUVEC 增殖的抑制作用 (P<0.01)，见表 3。

3.2.2 对内脂素诱导 HUVEC 凋亡的干预作用 与内脂素组相比，50 μmol/L 小檗碱和 10 μmol/L SP600125 作用 24 h 均可显著减少由内脂素诱导的 HUVEC 凋亡 (P<0.01)，见表 3。

3.2.3 对内脂素诱导 HUVEC 分泌 IL-6 及 TNF-α 的干预作用 与内脂素组相比，50 μmol/L 小檗碱和 10 μmol/L SP600125 作用 24 h 均可显著降低内脂素诱导 HUVEC 分泌 IL-6 及 TNF-α 水平 (P<0.01)，见表 3。

3.2.4 对内脂素影响 HUVEC 中 p-JNK、Bax、Bcl-2 蛋白表达的干预作用 与内脂素组相比，50 μmol/L 小檗碱和 10 μmol/L SP600125 作用 24 h 均可显著降低 HUVEC 中 p-JNK、Bax 蛋白的表达，并显著增加 HUVEC 中 Bcl-2 蛋白的表达 (P<0.01)，见表 3 与图 3。

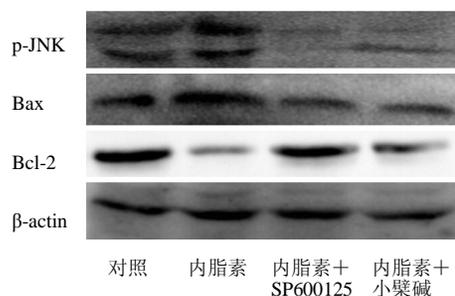


图3 SP600125及小檗碱预处理后加入内脂素刺激24 h对HUVEC中p-JNK、Bax、Bcl-2表达的影响

Fig. 3 Effects of SP600125 and berberine preprocessing before visfatin stimulating for 24 h on p-JNK, Bax, and Bcl-2 expression in HUVEC

4 讨论

近年来AS在我国引起的心脑血管疾病发病率与死亡率正逐年增加。慢性炎症反应在AS的形成和发展过程中起了关键作用，抗炎治疗是防治AS的重要策略。内脂素是近几年新发现的与炎症有关的脂肪细胞因子^[1]，与AS形成过程密切相关，AS患者血清内脂素的量显著高于正常人群^[2]，在同时患有代谢综合征和2型糖尿病患者中，高内脂素水平与高颈动脉AS形成密切相关，内脂素水平可作为测定颈动脉中膜厚度的指标^[11-12]，在AS患者不稳定粥样斑块巨噬细胞内，内脂素的量也显著增加^[13]。本课题组近期研究发现空气悬浮颗粒可通过上调载脂蛋白E基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠体内内脂素表达诱导炎症和氧化应激的发生，促进AS的发生^[14]，内脂素还可通过上调清道夫受体(SR)-A和CD-36的表达，诱导胆固醇堆积至巨噬细胞以促进AS的形成^[15]。内皮细胞损伤及损伤后持续性炎症反应可致白细胞黏附迁移、平滑肌细胞增殖、脂质沉积，从而促进AS形成^[8]。本研究结果证实内脂素可显著诱导HUVEC分泌炎症因子IL-6及TNF- α 的量增加，抑制HUVEC增殖并诱导HUVEC凋亡。

JNK信号转导途径是MAPKs超家族成员之一，相对分子质量分别为 4.6×10^4 和 5.4×10^4 。JNK信号通路能被IL-1、TNF- α 及生长因子等多种细胞因子所激活。与普通ApoE^{-/-}小鼠对比，JNK2基因敲除的ApoE^{-/-}小鼠能通过影响SR，使其发生的AS性病理性损害明显减少，使用SP600125抑制JNK通路同样也可达到抗AS的效果^[16]，显示JNK通路在AS的形成过程中起到了重要作用。TNF- α 诱导

的单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)基因表达可通过JNK信号通路参与由血流振荡剪切力介导的血管炎症反应，从而导致AS的发生^[17]。紊乱的血流剪切力作用于血管内皮细胞能够迅速通过激活JNK通路，使核转录因子- κ B(NF- κ B)活性上调而增加MCP-1等炎症因子的表达促进AS发生^[18]。JNK通路可调控细胞凋亡^[7]，促凋亡蛋白Bax及抗凋亡蛋白Bcl-2的相互作用是细胞凋亡的调控中心，其相对比值在决定细胞存亡中起关键作用。本研究证实内脂素刺激HUVEC后，可增加Bax蛋白表达并减少Bcl-2蛋白表达，表明内脂素对HUVEC的促凋亡作用可能是通过上调Bax与Bcl-2相对比值来实现的。

近年来研究证实小檗碱能通过调脂、抗血管内皮损伤、抗炎、抗血栓等多环节发挥抗AS作用^[5]，其抗AS效应还与JNK通路密切相关。环氧合酶-2(COX-2)可加快稳定性AS斑块向不稳定性AS斑块转化，其表达水平的增高是促进AS形成的重要环节之一^[19]，AS斑块的主要成分之一是单核细胞，研究证实小檗碱可通过JNK通路抑制人外周血单核细胞中COX-2 mRNA及蛋白的表达，以抑制AS斑块的形成^[20]。本研究加用小檗碱和SP600125干预后显示二者均可显著减轻内脂素对于HUVEC增殖的抑制，减少内脂素诱导的HUVEC凋亡，抑制HUVEC中p-JNK、Bax蛋白的表达并增加HUVEC中Bcl-2蛋白的表达，降低由内脂素诱导的HUVEC分泌炎症因子IL-6及TNF- α 。证实小檗碱对内脂素促炎症反应的干预作用可能通过抑制JNK信号转导通路来实现，小檗碱的抗AS作用机制可能通过减少内皮细胞的损伤和抗AS慢性炎症得以实现。

本研究结果表明，内脂素可诱导HUVEC分泌炎症因子IL-6及TNF- α ；小檗碱可显著抑制IL-6及TNF- α 分泌，减轻由内脂素诱导的HUVEC损伤，其机制与抑制JNK通路有关。

参考文献

- [1] Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, *et al.* Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin [J]. *Science*, 2005, 307(5708): 426-430.
- [2] Kong Q X, Xia M, Liang R Q, *et al.* Increased serum visfatin as a risk factor for atherosclerosis in patients with ischaemic cerebrovascular disease [J]. *Singapore Med J*, 2014, 55(7): 383-387.
- [3] Liu S W, Qiao S B, Yuan J S, *et al.* Visfatin stimulates

- production of monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-6 in human vein umbilical endothelial cells [J]. *Horm Metab Res*, 2009, 41(4): 281-286.
- [4] Gouranton E, Romier B, Marcotorchino J, *et al.* Visfatin is involved in TNF α -mediated insulin resistance via an NAD(+)/Sirt1/PTP1B pathway in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Adipocyte*, 2014, 3(3): 180-189.
- [5] 贾燕珺, 李建军. 小檗碱的抗动脉粥样硬化作用及其机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(4): 364-368.
- [6] 陈玲, 寇俊萍, 余伯阳. 小檗碱抑制组织因子活性和静脉血栓形成的实验研究 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1389-1392.
- [7] Sozen E, Karademir B, Yazgan B, *et al.* Potential role of proteasome on c-jun related signaling in hypercholesterolemia induced atherosclerosis [J]. *Redox Biol*, 2014, 2: 732-738.
- [8] Vanhoutte P M. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis [J]. *Circ J*, 2009, 73(4): 595-601.
- [9] 郭玉双, 邵明柏. 黄连素对人脐静脉内皮细胞分泌一氧化氮的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2013(17): 4184-4186.
- [10] 宋锦秋, 陈晓春, 张静, 等. 凝聚态 A β_{25-35} 可通过 JNK/p38 MAPK 途径诱导胎鼠皮层神经元 Tau 蛋白过度磷酸化 [J]. 解剖学报, 2007, 38(5): 532-536.
- [11] Zhong M, Tan H W, Gong H P, *et al.* Increased serum visfatin in patients with metabolic syndrome and carotid atherosclerosis [J]. *Clin Endocrinol*, 2008, 69(6): 878-884.
- [12] Kadoglou N P, Sailer N, Moutzouglou A, *et al.* Visfatin (nampt) and ghrelin as novel markers of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2010, 118(2): 75-80.
- [13] Dahl T B, Yndestad A, Skjelland M, *et al.* Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization [J]. *Circulation*, 2007, 115(8): 972-980.
- [14] Wan Q, Cui X, Shao J, *et al.* Beijing ambient particle exposure accelerates atherosclerosis in ApoE knockout mice by upregulating visfatin expression [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2014, 19(5): 715-724.
- [15] Zhou F, Pan Y, Huang Z, *et al.* Visfatin induces cholesterol accumulation in macrophages through up-regulation of scavenger receptor-A and CD36 [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2013, 18(5): 643-652.
- [16] Ricci R, Sumara G, Sumara I, *et al.* Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis [J]. *Science*, 2004, 306(5701): 1558-1561.
- [17] Chen X L, Grey J Y, Thomas S, *et al.* Sphingosine kinase-1 mediates TNF- α -induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: upregulation by oscillatory flow [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(4): H1452-H1458.
- [18] Cuhlmann S, Vander Heiden K, Saliba D, *et al.* Disturbed blood flow induces RelA expression via c-Jun N-terminal kinase 1: A novel mode of NF- κ B regulation that promotes arterial inflammation [J]. *Circ Res*, 2011, 108(8): 950-959.
- [19] Cipollone F, Rocca B, Patrono C. Cyclooxygenase-2 expression and inhibition in atherothrombosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(2): 246-255.
- [20] 陈实, 姜昕, 郭毅, 等. JNK 及 p38MAPK 在小檗碱抑制人外周血单核细胞 COX-2 表达中的作用 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2008, 34(7): 437-439.