

旋覆花内酯对人血管内皮细胞环加氧酶 2 和细胞间粘附分子 1 表达的影响

陈英珠, 温进坤, 韩梅, 张婧群

(河北医科大学基础医学研究所, 河北省石家庄市 050017)

[关键词] 药理学; 旋覆花内酯对血管内皮细胞的作用; Western 印迹; 环加氧酶 2; 细胞间粘附分子 1; 核因子 κ B; 脂多糖

[摘要] 目的观察旋覆花内酯对脂多糖诱导的人血管内皮细胞核因子 κ B 激活及促炎基因环加氧酶 2 和细胞间粘附分子 1 表达的影响。方法应用 Western 印迹检测血管内皮细胞间粘附分子 1 和细胞核中 P65 水平, 以逆转录-聚合酶链反应技术检测环加氧酶 2 基因表达的活性。结果 12.5、25 和 50 μ mol/L 的旋覆花内酯分别使脂多糖诱导的环加氧酶 2 mRNA 表达水平降低 35.85%、42.46% 和 53.46%; 使细胞间粘附分子 1 的表达分别降低 9.77%、40.87% 和 46.83%。旋覆花内酯能够拮抗脂多糖诱导的核因子 κ B 亚单位 P65 核移位, 用该化合物预处理细胞后再用脂多糖诱导时, 细胞核内的 P65 水平不再升高。结论旋覆花内酯通过抑制核因子 κ B 的活化而抑制促炎基因环加氧酶 2 和细胞间粘附分子 1 在血管内皮细胞中的表达。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effects of 1- σ Acetylbritannilactone on Cyclo-Oxygenase-2 and Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Human Vascular Endothelial Cells

CHEN Ying-Zhu, WEN Jin-Kun, HAN Mei, and ZHANG Di-Qun

(Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medical Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

[KEY WORDS] 1- σ Acetylbritannilactone; Vascular Endothelial Cells; Cyclo-Oxygenase-2; Intercellular Adhesion Molecule-1; Nuclear Factor- κ B; Lipopolysaccharide; Western Blotting

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of 1- σ acetylbritannilactone (ABL) isolated from *Inula Britannica* F on activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and cyclo-oxygenase-2 (COX-2) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human vascular endothelial cells (ECV304) treated with lipopolysaccharide (LPS). **Methods** ICAM-1 and nuclear P65 in protein extracts from ECV304 cells were detected by Western blotting. COX-2 mRNA was assayed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** After ECV304 cells were incubated with 12.5, 25, 50 μ mol/L ABL for 1 h, COX-2 mRNA level in ECV304 cells treated with LPS was reduced by 35.85%, 42.46% and 53.46%, respectively. Expression of ICAM-1 was decreased by 9.77%, 40.87% and 46.83%, respectively, compared with control group. ABL could antagonize the nuclear translocation of P65, and the increase in nuclear P65 induced by LPS no longer occurred following treatment with ABL. **Conclusions** ABL inhibits COX-2 and ICAM-1 expression in vascular endothelial cells by inhibiting NF- κ B activation.

旋覆花(*Inula Britannica* F)为菊科旋覆花属植物,是具有降气、消痰、止呕和抗炎功效的常用中药。我们在对旋覆花药效物质基础进行研究过程中,从其氯仿抽提物中分离得到一种结构属于苯并呋喃酮衍生物的单体成分旋覆花内酯(1- σ acetylbritannilactone, ABL),经小鼠扭体、热板、甩尾和福尔马林舔足等实验,证实其具有抑制炎症疼痛的作用。我们

以往用体外培养的单核/巨噬细胞研究其作用机制时发现,ABL通过抑制核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)与相应作用位点结合,降低环加氧酶 2(cyclo-oxygenase-2, COX-2)和诱导型一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase, iNOS)基因表达的活性以及前列腺素 2(prostaglandin 2, PGE2)和一氧化氮(Nitrogen monoxide, NO)的合成,发挥其抗炎作用^[1]。基于慢性炎症反应以及血管内皮细胞与单核细胞粘附是动脉粥样硬化发生发展的核心和关键^[2],本研究在证明 ABL 能够抑制单核/巨噬细胞合成和释放炎症因子的基础上^[1],进一步观察 ABL 对血管内皮细胞促炎基因 COX-2 和细胞间粘附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达及核因子 κ B 活化的

[收稿日期] 2004-10-27 [修回日期] 2005-02-15

[基金项目] 国家自然科学基金(30472167)资助课题

[作者简介] 陈英珠,博士研究生,副研究员,研究方向为心血管病分子生物学。通讯作者温进坤,医学博士,教授,博士研究生导师,长期从事心血管病生物化学与分子生物学研究,电话为 0311-6265563, E-mail 为 WJK@hebm.u.edu.cn。韩梅,医学博士,教授,博士研究生导师,长期从事心血管病生物化学与分子生物学研究。

影响,探讨其抗血管内皮细胞炎症反应的效应及作用靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

旋覆花内酯由本课题组分离及鉴定,其化学结构见图 1(Figure 1)。人脐静脉内皮细胞株 ECV304 购自武汉细胞中心。M199 培养基购自 GIBCO 公司; P65 多克隆抗体、ICAM-1 单克隆抗体及发光试剂为 Santa Cruz 产品;脂多糖系 Sigma 产品;聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物由上海生工生物工程有限公司合成;其余化学及生物化学试剂为进口或国产分析纯。

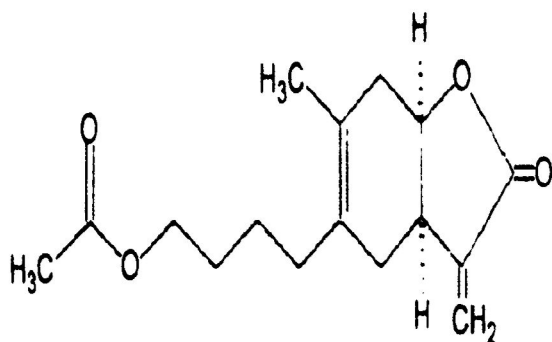


图 1. 旋覆花内酯的化学结构

Figure 1. Chemical structure of 1- α -acetylbritannilactone

1.2 细胞培养

ECV304 细胞置于含 10% 新生小牛血清的 M199 培养基中于 37℃、5% CO₂ 孵育箱中进行培养,细胞生长至 70% 汇合时,换成含 2% 新生小牛血清的培养基,饥饿培养 24 h 使细胞同步于静止期。分别加入 0、12.5、25 和 50 μ mol/L 的 ABL 孵育 1 h,然后各加入 100 μ g/L 脂多糖继续培养 6、18 和 24 h 后,从各组细胞中分别提取细胞总蛋白、核蛋白或 RNA。

1.3 MTT 法测细胞活力

于 96 孔板中生长的 ECV304 细胞与不同浓度的 ABL 孵育 1 h 后,加入 100 μ g/L 脂多糖继续培养 24 h。每孔加入 20 μ L 5 g/L 的 MTT, 37℃ 孵育 4 h,弃去培养基,每孔加入 100 μ L 二甲基亚砷静置 10 min,用酶标仪于 490 nm 波长处测定各组细胞(8 个孔)的光密度。

1.4 Western 印迹分析

ECV304 细胞总蛋白提取按文献[1]方法,用 RIPA 细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150

mmol/L NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L NaVO₄, 1 mmol/L PMSF) 裂解细胞后,离心分离上清,用改良的 Lowry 法测定蛋白含量。取 60 μ g 蛋白样品,进行 SDS-PAGE 分离,通过电转移将蛋白印迹到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭膜上的非特异性位点后,依次与 ICAM-1 单克隆抗体(1:200)和辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗(1:10 000)进行反应,化学发光法显色。ECV304 细胞核蛋白提取按照文献[1]方法进行。取 40 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 分离,经转膜、封闭后依次与 P65 多克隆抗体(1:200)和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:10 000)进行反应,化学发光法显色。

1.5 RNA 提取与逆转录—聚合酶链反应

按异硫氰酸胍—酚—氯仿一步法^[3]提取被不同浓度 ABL 和脂多糖处理的细胞中的总 RNA,以 Oligo (dT)₁₆ 为引物,按照 PE 公司 Taqman 逆转录说明书进行逆转录后,用 COX-2 上、下游引物进行 PCR。COX-2 上、下游引物序列分别为 5'-ATT CTT TGC CCA GCA CTT CA-3', 5'-TCT TTG ACT GTG GGA GGA TA-3', 扩增片段长度为 207 bp,以 GAPDH 为内参照。

1.6 统计学方法

实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间资料应用单因素方差(One way ANOVA)分析,各项统计均用 SPSS 10.0 软件在计算机上完成。

2 结果

2.1 旋覆花内酯对 ECV304 细胞活力的影响

用 12.5、25 和 50 μ mol/L 旋覆花内酯处理 ECV304 细胞 24 h 后,以 MTT 法检测细胞活力,与对照组细胞相比,在所检测的浓度范围内,ABL 对 ECV304 细胞活力没有影响(表 1, Table 1),提示 ABL 对细胞没有明显的毒性。

表 1. 旋覆花内酯对 ECV304 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effects of ABL on cells viability of ECV

分 组	旋覆花内酯 (μ mol/L)	脂多糖 (100 μ g/L)	A ₄₉₀
对照组	0	0.179 \pm 0.021	
实验组	0	100	0.174 \pm 0.023
	12.5	100	0.175 \pm 0.029
	25.0	100	0.180 \pm 0.033
	50.0	100	0.183 \pm 0.018

2.2 旋覆花内酯抑制环加氧酶 2 mRNA 表达

脂多糖 (100 $\mu\text{g/L}$) 刺激 ECV304 细胞 0、6、18 和 24 h 后, 用逆转录-聚合酶链反应均能检测到 COX-2 mRNA 表达。从图 2 (Figure 2) 可以看出, 在脂多糖刺激前 COX-2 基因即有一定的表达活性, 脂多糖刺激 18 h 其表达活性明显升高 (达对照细胞的 140%), 24 h 表达活性开始下降。在此基础上, 选择脂多糖刺激 18 h 作为观察不同浓度 ABL 影响 COX-2 mRNA 表达的时间点, 如图 2 (Figure 2) 所示, 在脂多糖刺激细胞前加入 12.5、25 和 50 $\mu\text{mol/L}$ ABL 均能抑制脂多糖诱导的 COX-2 mRNA 表达, 3 种浓度 ABL 处理的细胞其 COX-2 mRNA 表达水平与对照细胞相比, 分别降低 35.85%、42.46% 和 53.46%。50 $\mu\text{mol/L}$ ABL 对 COX-2 mRNA 表达的抑制作用最强。

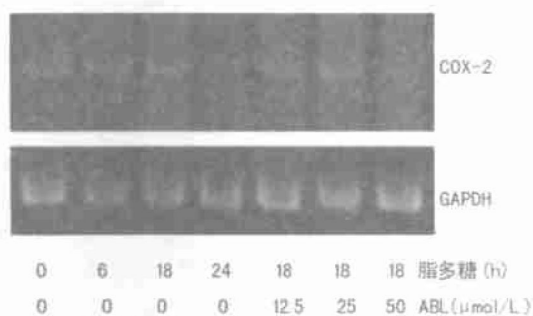


图 2. 旋覆花内酯对脂多糖诱导的 ECV304 细胞中环加氧酶 2 mRNA 表达的影响

Figure 2. Effects of 1- α -acetylbritannilactone on COX-2 mRNA expression in ECV304 treated by LPS

2.3 旋覆花内酯抑制细胞间粘附分子 1 表达

Western 印迹分析结果显示, 脂多糖 (100 $\mu\text{g/L}$) 刺激 ECV304 细胞 6 h 时, ICAM-1 表达明显升高, 18 h 达到高峰, 达对照组的 6.33 倍, 24 h 略有下降, 但仍高于基础水平 (图 3, Figure 3)。12.5、25 和 50 $\mu\text{mol/L}$ ABL 均能抑制脂多糖诱导的 ICAM-1 表达, 细胞被 3 种浓度的 ABL 预处理后, 其 ICAM-1 的表达量与对照细胞 (只用脂多糖刺激的细胞) 相比, 分别降低 9.77%、40.87% 和 46.83%。以 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABL 抑制效果最为明显 (图 4, Figure 4)。

2.4 旋覆花内酯抑制核因子 κB 激活

如图 5 (Figure 5) 所示, 未经脂多糖处理的 ECV304 细胞核中 P65 含量较低; 脂多糖诱导 1 h 后, 核内 P65 显著升高, 达对照组的 4.24 倍。加入 50 $\mu\text{mol/L}$ ABL 预孵育 1 h, 脂多糖诱导的 P65 升高受到

抑制, 核内 P65 水平接近于对照组细胞。提示 ABL 具有抑制核因子 κB 激活的作用。

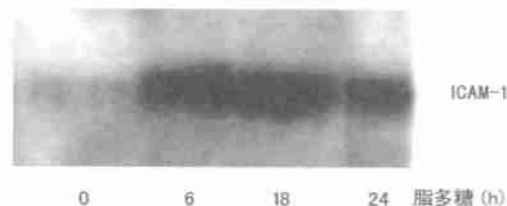


图 3. 脂多糖对 ECV304 细胞间粘附分子 1 表达的影响

Figure 3. Effects of LPS on intercellular adhesion molecule-1 protein expression in ECV304

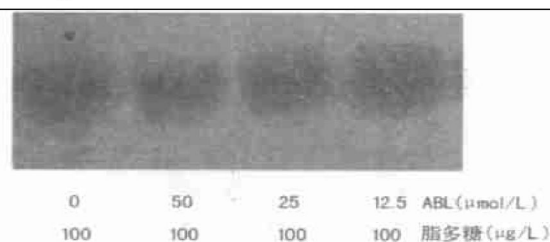


图 4. 旋覆花内酯对脂多糖诱导的 ECV304 细胞间粘附分子 1 表达的影响

Figure 4. Effects of 1- α -acetylbritannilactone on intercellular adhesion molecule-1 expression in ECV304 treated with LPS

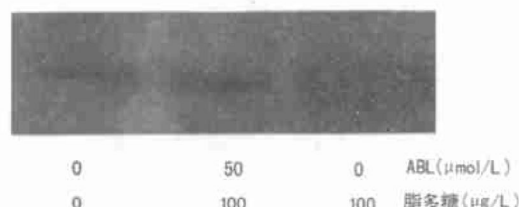


图 5. 旋覆花内酯对脂多糖诱导的 ECV304 中核因子 κB 激活的影响

Figure 5. Effects of 1- α -acetylbritannilactone on the activation of NF- κB in ECV304 stimulated with LPS

3 讨论

旋覆花内酯是我们从中药旋覆花中提取分离的具有抗炎活性的单体化合物。前期研究证明, 该化合物能有效抑制 RAW 264.7 巨噬细胞合成炎症介质 NO 和 PGE₂, 并发现其作用机制与抑制核转录因子核因子 κB 活化及 iNOS 和 COX-2 基因表达有关^[1]。慢性炎症反应是动脉粥样硬化、血管成形术

后再狭窄等心血管疾病发生发展的重要原因,涉及血管内皮细胞的损伤与激活、粘附分子的表达以及内皮细胞与循环白细胞之间的粘附等一系列复杂的反应过程,其中单核/巨噬细胞、血管内皮细胞合成与释放炎症介质和粘附分子起着关键作用^[4,5]。在动脉粥样硬化斑块中 ICAM-1 的表达明显升高^[5]。在人冠状动脉粥样硬化组织中,复合斑块中 COX-2 表达明显高于纤维斑块,而在非斑块区和正常冠状动脉中均不能检测到 COX-2 的表达^[6]。ABL 对单核/巨噬细胞具有抗炎作用,对血管内皮细胞有无抗炎作用尚不清楚。本文以体外培养的 ECV304 细胞为研究对象,用脂多糖作炎症反应刺激因素,在证实脂多糖能激活核因子 κ B 及上调 COX-2 和 ICAM-1 基因表达的基础上,观察 ABL 对 COX-2 和 ICAM-1 基因表达及核因子 κ B 激活的影响。结果表明,在所观察的浓度范围内(12.5~50 μ mol/L),ABL 能剂量依赖性抑制脂多糖诱导的 COX-2 和 ICAM-1 基因表达,在 ABL 浓度为 50 μ mol/L 时,两种基因的表达活性降低 50% 左右。

核因子 κ B 是介导 COX-2 和 ICAM-1 等促炎基因表达的重要转录因子,由 P50 和 P65 两个亚单位组成。正常情况下,核因子 κ B 与抑制蛋白 I- κ B 相结合,以非活性形式存在于胞质中^[7]。在致炎因素作用下,I- κ B 磷酸化而与核因子 κ B 解离,使后者活化并进入细胞核激活特定基因转录^[8]。动脉粥样硬化斑块核因子 κ B 被激活,而正常组织中它的表达量较低^[9]。转染 I- κ B- α 后,兔子主动脉球囊损伤引起的管腔狭窄可以明显改善^[10]。为揭示 ABL 抑制 COX-2 和 ICAM-1 基因表达是否与影响核因子 κ B 活化有关,我们从被 ABL 和脂多糖处理的 ECV304 细胞中提取核蛋白,检查细胞核内 P65 含量的变化。结果

显示,ABL 能使脂多糖诱导的细胞核内 P65 的升高受到抑制,即显著抑制脂多糖诱导的核因子 κ B 活化及核转位。可见,ABL 对单核/巨噬细胞和血管内皮细胞均具有明显的抗炎作用,其作用机制与抑制核因子 κ B 活化及下调 COX-2、ICAM-1 和 iNOS 基因表达有关。核因子 κ B 及其下游基因 ICAM-1 和 COX-2 参与动脉粥样硬化的形成,ABL 可以抑制其活性,ABL 作为防治心血管病的抗炎药物具有良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] Han M, Wen JK, Zheng B, Zhang DQ. Acetylbromatone suppresses NO and PGE2 synthesis in RAW 264.7 macrophages through the inhibition of iNOS and COX-2 gene expression. *Life Sciences*, 2004, **75**: 675-684
- [2] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156-159
- [3] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801-809
- [4] Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation*, 2000, **102**: 840-845
- [5] O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*, 1996, **93**: 672-682
- [6] 李洪涛,陈倩,吴宗贵,梁春,潘晓明,樊民,等.诱导型环氧化酶在人冠状动脉粥样硬化组织中的分布. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12**: 533-536
- [7] Baeuerle PA, Baltimore D. I- κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science*, 1988, **242**: 540-546
- [8] Chen CC, Rosenbloom CL, Anderson DC, Manning AM. Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I- κ B- α phosphorylation. *J Immunol*, 1995, **155**: 538-545
- [9] Collins T. Endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest*, 1993, **68**: 499-508
- [10] Breuss JM, Cejna M, Bergmeister H, Kadl A, Baumgartl G, Steurer S, et al. Activation of nuclear factor- κ B significantly contributes to lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model. *Circulation*, 2002, **105**: 633-638

(此文编辑 朱雯霞)

《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》 (生物医药类)一览表(2003 年度)

苏州大学学报医学版
天津医药
天津中医药
听力学及言语疾病杂志
同济大学学报医学版
同位素
外科理论与实践

微生物学报
微生物学通报
微循环学杂志
卫生毒理学杂志
卫生研究
胃肠病学
胃肠病学和肝病杂志