

# 人参皂甙抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 介导的内皮细胞炎症反应

柴 惠<sup>1</sup>, 袁小凤<sup>1</sup>, 沃立科<sup>2</sup>, 张 林<sup>1</sup>, 黄燕芬<sup>1</sup>

(浙江中医药大学 1. 生命科学学院, 浙江省杭州市 310053; 2 附属第一医院, 浙江省杭州市 310006)

[关键词] 人参皂甙; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 血管细胞黏附分子 1; 人脐静脉内皮细胞

[摘要] 目的 探讨人参皂甙 Rb1 能否抑制人脐静脉内皮细胞中肿瘤坏死因子  $\alpha$  引起的细胞炎症反应的发生。方法 将细胞分成四组: 对照组 (不经任何药物处理)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  组、人参皂甙 Rb1 组和肿瘤坏死因子  $\alpha$  加入人参皂甙 Rb1 组, 分别培养 16 h。提取各组细胞 mRNA, 用实时荧光定量 PCR 和流式细胞仪测定血管细胞黏附分子 1 的表达水平; 用标记上 Calcein-AM 的人单核细胞检测人脐静脉内皮细胞单分子层的黏附性; 用超氧化物阴离子荧光探针 DHE 在流式细胞仪上测定超氧阴离子产物, 并用荧光探针 JC-1 检测线粒体膜电位变化。结果 人参皂甙 Rb1 预处理能有效阻止肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导的血管细胞黏附分子 1 mRNA 增高, 并减弱由其导致的单核细胞对人脐静脉内皮细胞的黏附性增加。人参皂甙 Rb1 还能减少肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导的超氧阴离子产物增加, 并抑制由其引起的线粒体膜电位衰减。结论 人参皂甙 Rb1 对炎症及心血管疾病有潜在的治疗作用。

[中图分类号] R28

[文献标识码] A

## Ginsenoside Rb1 Inhibits Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Induced Inflammation of Human Umbilical Vein Endothelial Cell

CHAI Hu<sup>1</sup>, YUAN Xiao-Feng<sup>1</sup>, WO Li-Ke<sup>2</sup>, ZHANG Lin<sup>1</sup>, and HUANG Yan-Fen<sup>1</sup>

(1 Life Science Faculty of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China; 2 the First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China)

[KEY WORDS] Ginsenoside Rb1; Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; Vascular Cell Adhesion Molecule-1; Human Umbilical Vein Endothelial Cell

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether Rb1 could block tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induced inflammation in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). **Methods** HUVEC were treated with TNF- $\alpha$  (0.5  $\mu$ g/L) and/or Rb1 (15 mg/L) for 16 hours. The mRNA level of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) was determined by real-time PCR and flow cytometry, respectively. Human macrophage THP-1 labeled with a fluorescent dye (Calcein-AM) was used for the adhesion assay on HUVEC monolayer. Dihydroethidium (DHE) was used to demonstrate in situ levels of superoxide production. JC-1 dye was used to measure changes in mitochondrial membrane potential. **Results** TNF- $\alpha$  treatment significantly increased the mRNA expression of VCAM-1 in HUVEC, as compared to controls. Rb1 pretreatment blocked the TNF- $\alpha$  induced mRNA expression of VCAM-1, and also effectively blocked THP-1 adhesions. Furthermore, Rb1 reduces TNF- $\alpha$  induced increase of superoxide anion production and inhibits TNF- $\alpha$  induced decrease of mitochondrial membrane potential in HUVEC. **Conclusion** These data suggested that Rb1 might have potential therapeutic effects in controlling inflammation in vascular diseases.

动脉粥样硬化是大、中动脉内膜出现含胆固醇、类脂肪等的黄色物质, 多由脂肪代谢紊乱、神经血管功能失调引起。常导致血栓形成、供血障碍等<sup>[1,2]</sup>。有报道称动脉粥样硬化实际上是一种炎症疾病<sup>[3]</sup>。人参皂甙 Rb1 曾被报道指出具有包括抗炎、抗肿瘤在内的广泛生物学活性<sup>[3-5]</sup>。本研究旨

在探讨人参皂甙 Rb1 能否抑制肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 引起的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 炎症反应的发生。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和仪器

实验所用 HUVEC 及其配套培养基、1640 培养基、PBS 溶液、胎牛血清 (FBS)、胰酶-EDTA 溶液及胞浆荧光标记物 Calcein-AM 为 Cambrex 公司产品; RNA 提取试剂盒为 Ambion 公司产品; cDNA 合成试剂盒与线粒体膜电位检测试剂盒为 Bio-Rad 公司产品; 琼脂糖、二甲基亚砜 (DMSO)、溴化乙锭 (EB)、

[收稿日期] 2009-02-12 [修回日期] 2009-05-02

[基金项目] 浙江省自然科学基金 (Y2080844) 资助

[作者简介] 柴惠, 博士, 讲师, 研究方向为中药抗心血管疾病的分子机制, E-mail 为 hui\_cha@gmail.com。袁小凤, 硕士, 讲师, 研究方向为调脂中药的蛋白组学研究。沃立科, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药抗心血管疾病的分子机制。

人参皂甙 Rb1(货号 G0777, 5 mg)及 TNF- $\alpha$ (货号 T6674 10  $\mu$ g)为 Sigma公司产品,其中 Rb1和 TNF- $\alpha$ 粉末用 PBS溶液溶解。实时定量 PCR 仪购自 Bio-Rad公司;二氧化碳培养箱为 Foma 331Q 倒置荧光显微镜为 Olympus BX41;低温超速离心机为 Beckman Coulter A-21R;超纯净水系统为 Bamstead 数码凝胶图像定位分析系统为 Kodak DEAS 290/Ver 3.5;流式细胞仪为 BD 公司 FACSCalibur。

## 1.2 人脐静脉内皮细胞的培养及分组

将原代 HUVEC 培养于 75 mL 培养瓶中,加入含 10% 热灭活 FBS 的完全培养基 10~15 mL,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 和 100% 饱和湿度的培养箱中培养。2~3 天换液一次,待细胞生长成单层达 80%~85% 培养面积后,分装冻存。6~7 代 HUVEC 用于实验。将第 6 代 HUVEC 培养于含 10% 热灭活 FBS 的完全培养基中,在 6 孔板中生长至密度为每孔  $1.0 \times 10^6$  个细胞时,换成含 0.5% 热灭活 FBS 的 EBM-2 饥饿培养 8 h。将 HUVEC 细胞分成四组:对照组(不经任何药物处理)、TNF- $\alpha$  (0.5  $\mu$ g/L)组、人参皂甙 Rb1 (15  $\mu$ g/L)组和 TNF- $\alpha$  (0.5  $\mu$ g/L) + 人参皂甙 Rb1 (15  $\mu$ g/L)组。将四组细胞分别用于以下实验,每组实验设置 3 个复孔。

## 1.3 实时荧光定量聚合酶链反应

用试剂盒提取 HUVEC 总 RNA 后用核酸紫外分析仪测浓度。分别取 2.5  $\mu$ g 总 RNA,逆转录成 cDNA。在实时定量 PCR 仪上检测 mRNA 和 PCR 产物的表达水平。样品与实时定量 PCR 混合液及特异性引物混和后,加入 96 孔板进行实时定量 PCR 反应。反应条件:95℃预培养 3 min, 95℃ 20 s, 54℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环,最后 72℃反应 10 min。VCAM-1 引物上游 5'-ATG CCT GGG AAG ATG GTC GTG A-3', 下游 5'-TGG AGC TGG TAG ACC CTC GCT G-3'。内参 GAPDH 引物上游 5'-CGA CAG TCA GCC GCA TCT TC-3', 下游 3'-CGC CCA ATA CGA CCA AAT CCG-5'。每个样品按相同条件重复 3 次,与内参 GAPDH 均一化消除实验误差后取平均值。

## 1.4 THP-1 单核细胞与人脐静脉内皮细胞的黏附性测定

将 HUVEC 按上述分四组后培养于 6 孔板中,THP-1 在含 10% 热灭活 FBS 的 RPMI 1640 培养基中与荧光标记 Calcein-AM (4  $\mu$ mol/L)反应 30 min。用 PBS 轻轻洗去多余 Calcein-AM,将 THP-1 与不同处理组细胞在摇床上反应 1 h。用含 1% 热灭活 FBS 的 PBS 冲洗 2 次,去除未黏附细胞。每组随机选取

3 个视野,在荧光显微镜下拍照。用计数软件 ImagePro 对每个被拍视野中与 HUVEC 黏附的荧光细胞进行计数。

## 1.5 细胞超氧阴离子产物分析

将 HUVEC 细胞按上述分四组后培养于含 10% 热灭活 FBS 的完全培养基中,在 24 孔板中生长至密度为每孔  $2.0 \times 10^5$  个细胞时饥饿 8 h。用 PBS 洗 2 遍。在每个孔中加入 5 mL 终浓度为 3  $\mu$ mol/L DHE,在 CO<sub>2</sub> 培养箱内反应 30 min 后,用含 3% FBS 和 0.1% NaN<sub>3</sub> 的冰 PBS 洗 3 次。在流式细胞仪上检测连接 DHE 荧光探针的细胞数目。除去背景值后,统计 10000 个细胞中的平均荧光强度 (MFI)。最后结果用 BD Biosciences 公司的 CelQuest software 软件分析。

## 1.6 线粒体膜电位检测

四组不同处理的 HUVEC 培养于 24 孔板中,每孔  $2 \times 10^5$  个细胞,用 PBS 洗 2 遍后,加入预热的 JC-1 于 37℃反应 15 min。用 1 倍的反应缓冲液洗 2 次,在流式细胞仪上观察细胞染色情况。除去背景值后,统计 10000 个细胞中的平均荧光强度 (MFI)。最后结果用 CelQuest software 软件分析。

## 1.7 统计学方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 Student's *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 人参皂甙 Rb1 对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子 1 表达的影响

对照组 VCAM-1 mRNA 表达量为  $0.026 \pm 0.001$ ;与对照组相比, TNF- $\alpha$  组 VCAM-1 mRNA 表达显著增加 ( $0.291 \pm 0.093$ ,  $P < 0.01$ ), Rb1 组 VCAM-1 mRNA 表达无明显差异 ( $0.019 \pm 0.003$ ,  $P > 0.05$ ), TNF- $\alpha$  + Rb1 组 VCAM-1 mRNA 表达显著增加 ( $0.162 \pm 0.072$ ,  $P < 0.05$ , 图 1)。

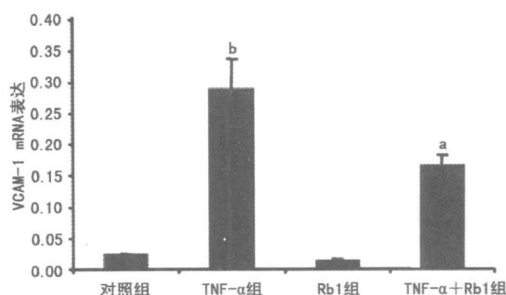


图 1 人参皂甙 Rb1 抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVEC VCAM-1 的表达 a 为  $P < 0.05$  b 为  $P < 0.01$  与对照组比较。

## 2.2 人参皂甙 Rb1对 TNF- $\alpha$ 诱导的人脐静脉内皮细胞与单核细胞黏附性的影响

对照组 THP-1黏附到 HUVEC 的数量为  $4181 \pm 104$  与对照组相比, TNF- $\alpha$  组细胞黏附性显著增加 ( $14527 \pm 456$ ,  $P < 0.01$ ), Rb1组细胞黏附性无明显变化 ( $4137 \pm 132$ ); TNF- $\alpha$  + Rb1组细胞黏附性为  $6537 \pm 264$ , Rb1对由 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVEC 与单核细胞黏附性增加的抑制作用约为 55% ( $P < 0.05$ )。荧光显微镜拍照结果显示, 人参皂甙 Rb1 预处理可以显著减少由 TNF- $\alpha$  诱导的 THP-1 与 HUVEC 的黏附性增加 (图 2)。

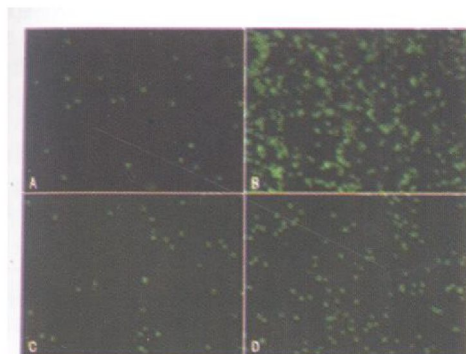


图 2 单核细胞 THP-1 与 HUVEC 的黏附性 A 为对照组, B 为 TNF- $\alpha$  组, C 为 Rb1 组, D 为 TNF- $\alpha$  + Rb1 组。

## 2.3 人参皂甙 Rb1抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的人脐静脉内皮细胞超氧阴离子产物增加

对照组超氧阴离子产物水平为 55.34%, Rb1 组为 49.13%, Rb1 组与对照组相比无显著差异。TNF- $\alpha$  组诱导 HUVEC 超氧阴离子产物水平显著增高, 达到 98.26%。人参皂甙 Rb1 预处理后使 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVEC 超氧阴离子产物水平由 98.26% 减少到 45.32% (图 3)。

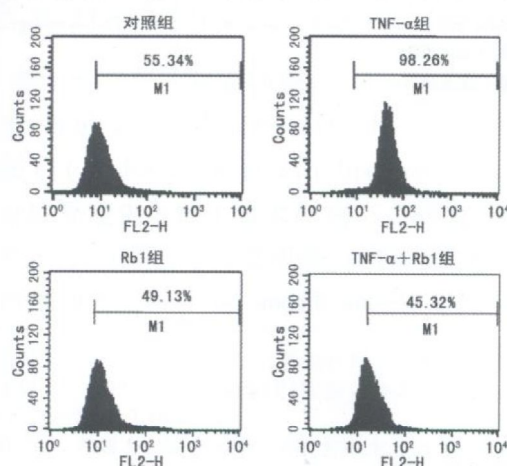


图 3 人脐静脉内皮细胞超氧阴离子产物水平

## 2.4 人参皂甙 Rb1抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的人脐静脉内皮细胞线粒体膜电位衰减

对照组去极化比例为 88.21%, Rb1 组去极化比例为 77.23%, TNF- $\alpha$  组去极化比例为 63.52%, TNF- $\alpha$  组与对照组相比线粒体膜电位显著降低。人参皂甙 Rb1 预处理后去极化比例达到 70.15%, 说明 Rb1 能抑制 TNF- $\alpha$  诱导的线粒体膜电位衰减 (图 4)。

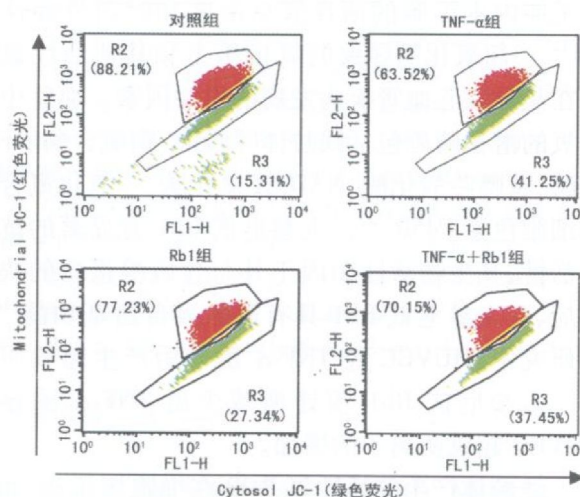


图 4 人脐静脉内皮细胞的线粒体膜电位

## 3 讨论

本研究中, 人参皂甙 Rb1 预处理 HUVEC 可以显著减少 TNF- $\alpha$  诱导的 VCAM-1 mRNA 表达增高, 并有效减少 THP-1 与 HUVEC 的黏附性。人参皂甙 Rb1 能减弱 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVEC 超氧阴离子产物增加, 并抑制 TNF- $\alpha$  诱导的线粒体膜电位衰减。因此可推断人参提取物人参皂甙 Rb1 对 TNF- $\alpha$  介导的炎症和心血管疾病有控制作用。

VCAM-1 是免疫蛋白超家族的成员, 编码细胞表面被细胞因子激活的内皮细胞表达的唾液酸糖蛋白<sup>[6]</sup>。此种 IV 型膜蛋白介导白细胞与内皮细胞的黏附和信号传导, 在冠状动脉血管和类风湿关节炎的病程发展中起作用<sup>[7]</sup>。有报道指出, VCAM-1 的表达很大程度上与 TNF- $\alpha$  的介导相关<sup>[8]</sup>。另有报道, 体外的细胞黏附性实验中, 当 HUVEC 不用 TNF- $\alpha$  诱导时, 与单核细胞的黏附性很小<sup>[9]</sup>。当细胞被 TNF- $\alpha$  诱导后, 与单核细胞 (如人单核细胞 THP-1) 的黏附性显著增加<sup>[10]</sup>。本研究验证了 TNF- $\alpha$  诱导 HUVEC 中 VCAM-1 mRNA 过量表达, 人参皂甙 Rb1 预处理有效抑制 TNF- $\alpha$  的该作用。研究还发现 TNF- $\alpha$  刺激单核细胞 THP-1 黏附到 HUVEC 细胞。人参皂甙 Rb1 预处理能有效减少 TNF- $\alpha$  诱导的

HUVEC黏附性增加。这些实验数据有力支持了本研究的实时定量 PCR 结果。

体内活性氧自由基具有一定的功能,如免疫和信号传导过程。但过多的活性氧自由基就会有破坏行为,导致人体正常细胞和组织损坏,从而诱导多种疾病。如心血管疾病、老年痴呆症、帕金森病和肿瘤<sup>[11]</sup>。在炎症和感染反应中,局部充满了细胞因子,如 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素 1 和干扰素  $\gamma$ 。这些细胞因子使内皮细胞的活性氧呈浓度和时间依赖性增加<sup>[12]</sup>。超氧化物导致的氧化压力和其他活性氧的存在是导致心血管疾病发病的重要因素。血管中活性氧的潜在酶源包括线粒体呼吸链、脂氧合酶、环氧合酶、黄嘌呤氧化酶、NADPH 氧化酶、一氧化氮合酶和细胞色素 P450<sup>[13]</sup>。人参皂甙 Rb1 有显著的抗氧化活性,其生物活性归因于其与含硫醇蛋白的快速反应,且人参皂甙 Rb1 具有清除羟自由基功能<sup>[14]</sup>。本研究中, HUVEC 经 TNF- $\alpha$  诱导后产生超氧阴离子。人参皂甙 Rb1 预处理减少由 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVEC 超氧阴离子的增加。

线粒体产生的活性氧 ROS 在细胞坏死或/和细胞凋亡过程中担任很重要的角色。已知线粒体膜电位是控制呼吸速率, ATP 合成和产生活性氧时的中心生物能量学参数,其自身被电子转运及质子漏控制。JC-1 是一种无毒的荧光探针,用于监测膜电位。此染料对活细胞及其呼吸无作用<sup>[15]</sup>。JC-1 单体积累选择性的线粒体并继而聚集膜电位<sup>[16]</sup>。本研究中, HUVEC 经 TNF- $\alpha$  和/或人参皂甙 Rb1 处理 16 h 后,用 JC-1 染色并用流式细胞仪分析发现人参皂甙 Rb1 能逆转 TNF- $\alpha$  诱导的膜电位降低。从实验数据推断人参皂甙 Rb1 预处理可抑制由炎症刺激引起的膜电位降低,这可能是人参皂甙 Rb1 抗炎症机理之一。

总之,人参皂甙 Rb1 能有效阻止 HUVEC 中 TNF- $\alpha$  引起的 VCAM-1 mRNA 水平的增高,并减弱

TNF- $\alpha$  引起的 THP-1 与 HUVEC 的黏附性增加,还能抑制 TNF- $\alpha$  引起的 HUVEC 超氧阴离子产物增加和抑制 TNF- $\alpha$  引起的线粒体膜电位衰减。因此推断人参皂甙 Rb1 对 TNF- $\alpha$  引起的炎症及心血管疾病有抑制作用。

#### [参考文献]

- [1] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2002 **105** (9): 1 135-143
- [2] 孙颖,常志文. 趋化因子 CXCL16 与动脉粥样硬化的研究现状 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008 **16** (4): 923-925
- [3] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2005 **352**: 1 685-695
- [4] 吴宏,姜蓉,王亚平. 人参总皂甙诱导人内皮细胞表达造血生长因子的实验研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2001 **26** (4): 361-364
- [5] 解慧梅,胡格,索占伟,等. 人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖对微血管内皮细胞分泌 NO、IL26 和 TNF- $\alpha$  的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2006 **37** (9): 903-907
- [6] Homer SR. ROS: A step closer to elucidating their role in the etiology of light-induced skin disorders [J]. *J Invest Dermatol*, 2004 **122**: xix-xix
- [7] Ohori J, Ushikai M, Sun D, et al. TNF- $\alpha$  upregulates VCAM-1 and NF- $\kappa$ B in fibroblasts from nasal polyps [J]. *Auris Nasus Larynx*, 2007 **34** (2): 177-183
- [8] Migitai H, Satozawa N, Lin JH, et al. ROR $\alpha$ 1 and ROR $\alpha$ 4 suppress TNF- $\alpha$ -induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in human endothelial cells [J]. *FEBS Letters*, 2004 **557**: 269-274
- [9] Zhou Z, Liu Y, Miao AD, et al. Protocatechuic aldehyde suppresses TNF- $\alpha$ -induced ICAM-1 and VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2005 **513**: 1-8
- [10] Miller AA, Drummond GR, Sobey CG. Reactive oxygen species in the cerebral circulation: are they all bad [J]? *Antioxid Redox Signal*, 2006 **8**: 1 113-120
- [11] Rojas A, Figueroa H, Morales MA, et al. Facing up the ROS labyrinth--Where to go [J]? *Curr Vasc Pharmacol*, 2006 **4**: 277-289
- [12] Szilagyi G, Simon L, Koska P, et al. Visualization of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species via double staining [J]. *Neurosci Lett*, 2006 **399**: 206-209
- [13] Shin YW, Bae EA, Kim SS, et al. Effect of ginsenoside Rb1 and compound K in chronic oxazolone-induced mouse dermatitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2005 **5**: 1 183-191
- [14] Legrand O, Perrot JY, Simonin G, et al. JC-1: a very sensitive fluorescent probe to test Pgp activity in adult acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2001 **97**: 502-508
- [15] Gravance CG, Gerner DL, Baumber J, et al. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1 [J]. *Theriogenology*, 2000 **53**: 1 691-703

(此文编辑 文玉珊)