

[文章编号] 1007-3949(2010)18-01-0011-04

• 实验研究 •

7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮通过下调核因子 κ B和磷酸化细胞外信号调节激酶1/2的表达抑制血管内皮细胞与单核细胞的黏附

王莉¹、李严兵¹、彭田红¹、陈胜华¹、吕运成¹、徐菁¹、符晓华²、曹建国²、郑兴³

(南华大学 1. 医学院解剖学教研室, 3 药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001;

2 湖南师范大学医学院, 湖南省长沙市 410013)

[关键词] 染料木黄酮; 衍生物; 动脉粥样硬化; 黏附; 核因子 κ B; 磷酸化细胞外信号调节激酶1/2

[摘要] 目的 研究7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮对氧化诱导的血管内皮细胞与单核细胞黏附的影响,并初步探讨其作用机制。方法 蛋白定量分析法测定内皮细胞与单核细胞的黏附率,酶联免疫吸附法检测E选择素、细胞间黏附分子1的释放,Western Blotting检测核因子 κ B、磷酸化细胞外信号调节激酶1/2的表达。结果 1.0 mmol/L H₂O₂ 孵育内皮细胞24 h,内皮细胞与单核细胞的黏附增多,E选择素和细胞间黏附分子1的释放增加,核因子 κ B和磷酸化细胞外信号调节激酶1/2表达上调。用7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮预处理后可见内皮细胞与单核细胞的黏附率降低,E选择素和细胞间黏附分子1的释放减少,核因子 κ B和磷酸化细胞外信号调节激酶1/2的表达下调。结论 7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮对氧化诱导的血管内皮细胞与单核细胞黏附及黏附分子E选择素、细胞间黏附分子1的释放有明显抑制作用,其作用机制可能与下调核因子 κ B和磷酸化细胞外信号调节激酶1/2的表达有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

The Anti-Adhesive Effects of 7-Difluoromethyl-5,4'-Dimethoxygenistein on Monocytes/Endothelial Cells Through Down-Regulating the Expression of Nuclear Factor- κ B and Phosphorylated Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2

WANG Li¹, LI Yan-Bing¹, PENG Tian-Hong¹, CHEN Sheng-Hua¹, LY Yun-Cheng¹, XU Jing¹, FU Xiaohua², CAO Jian-Guo², ZHENG Xing³

(1 Department of Anatomy, College of Medicine, University of South China, Hengyang 421001; 2 College of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410013; 3 Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Genistein Derivatives; Atherosclerosis; Adhesion; Nuclear Factor- κ B; Phosphorylated Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of 7-difluoromethyl-5,4'-dimethoxygenistein (dFMGEN) on the adhesion of monocytes to H₂O₂-induced endothelial cells and its molecular mechanism. **Methods** The effects of dFMGEN on the adhesion rate of monocytes and endothelial cells were examined by measuring protein content. The expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in H₂O₂-induced endothelial cells were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The effects of dFMGEN on the expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) were determined using Western Blotting. **Results** When endothelial cells were treated with 1.0 mmol/L H₂O₂ for 24 h, the adhesion rate was added, the release of E-selectin and ICAM-1 were increased, and the expression of NF- κ B and p-ERK1/2 were up-regulated. After pretreating with dFMGEN, results showed that dFMGEN can inhibit the adhesion between monocytes and endothelial cells induced by H₂O₂, reduce the release of E-selectin and ICAM-1, and down-regulate the expression of NF- κ B and p-ERK1/2.

Conclusion dFMGEN effectually inhibits the adhesion between monocytes and endothelial cells induced by H₂O₂, which is probably due to the inhibition of the expression of E-selectin and ICAM-1 and down-regulation of NF- κ B and p-ERK1/2.

[收稿日期] 2009-10-25 [修回日期] 2009-12-10

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30971270)、湖南省教育厅科研基金重点项目(05A035)和湖南省自然科学基金项目(07JJ3047)

[作者简介] 王莉, 硕士, 讲师, 主要从事药物筛选及作用机制的研究, E-mail为 wangli179@sina.com。通讯作者郑兴, 博士, 副教授, 主要从事新药研究与开发, E-mail为 zhengxing9166@sohu.com。

血管内皮细胞功能受损是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)形成早期的始动环节^[1], 而内皮细胞表达黏附分子并与单核细胞发生黏附是内皮细胞功能受损的表现之一。研究表明, 氧化应激产生的活性氧在As中扮演着重要角色^[2,3]。染料木黄酮

(Genistein)具有抗As的作用^[4],但因其肠道吸收少以及体内代谢迅速导致其活性较低而限制了它的临床应用^[5]。为此我们以染料木黄酮为先导化合物,合成了一种具有血管内皮氧化应激损伤保护作用的活性新化学实体即7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮(7-Difluoromethyl-5,4'-dimethoxygenistein, dFMGEN)^[6]。本研究旨在观察dFMGEN对氧化诱导内皮细胞与单核细胞黏附及黏附分子E选择素(E-selectin)、细胞间黏附分子1(ICAM-1)释放的影响,初步探讨其作用机制是否涉及核因子 κ B(NF- κ B)、磷酸化细胞外信号调节激酶1/2(p-ERK1/2)表达的调节。

1 材料和方法

1.1 试剂

染料木黄酮、VitE(美国Sigma公司产品);dFMGEN由本实验室制备^[6];H₂O₂(广东光华化学厂有限公司产品);E选择素、ICAM-1定量酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(上海森雄科技实业有限公司产品);兔抗人核因子 κ B(p65)多抗、鼠抗人 β -actin单抗、兔抗人细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)、p-ERK1/2多抗、辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG抗体(武汉博士德公司产品)。实验中所用其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 细胞培养

人脐静脉内皮细胞(HUVE-12,编号CRL-2480)引自北京大学医学院肿瘤研究所(来源于ATCC细胞库),用含10%新生牛血清的DMEM培养基培养;人单核细胞(THP-1)购于中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库,用含10%新生牛血清的RPMI-1640培养基培养;取对数生长期细胞用于实验。

1.3 实验分组

实验分6组:空白对照组,加入DMEM培养基;④H₂O₂损伤组,加入1mmol/L H₂O₂;④溶媒对照组,在加入1mmol/L H₂O₂前30min加入终浓度为0.01%的DMSO;先导化合物组,在加入1mmol/L H₂O₂前30min加入100 μ mol/L染料木黄酮;dFMGEN组,在加入1mmol/L H₂O₂前30min分别加入0.1、0.3、1、3、10 μ mol/L dFMGEN;阳性药物组,在加入1mmol/L H₂O₂前30min加入50 μ mol/L VitE。

1.4 细胞黏附率测定

采用蛋白定量分析法测定内皮细胞与单核细胞

的黏附率。按照Territo等^[7]所述方法将HUVE-12细胞接种于24孔培养板,生长至单层融合,按上述实验分组处理细胞,置于培养箱中孵育24h。弃原培养基,用DMEM培养基洗涤2次,每孔加入1mL单核细胞混悬液(5×10^8 /L),另取1mL单核细胞混悬液用于测定单核细胞蛋白质含量。24孔培养板置于细胞培养箱中孵育30min后,用含Ca²⁺、Mg²⁺的PBS冲洗2次以去除未黏附的单核细胞。每孔加入1mL 0.2mol/L的NaOH溶解细胞用于蛋白质含量测定。在分光光度计上,采用比色法测定蛋白质含量。取0.1mL细胞溶解液,加入5mL考马斯亮蓝反应液摇匀,2min后595nm测量吸光度,根据标准曲线计算蛋白质含量。黏附率=(内皮细胞和黏附的单核细胞蛋白质总量-内皮细胞蛋白质含量)/加入的单核细胞蛋白质含量 $\times 100\%$ 。

1.5 酶联免疫吸附法检测E选择素和细胞间黏附分子1的释放

取对数生长期的HUVE-12细胞,以 1×10^7 /L接种于24孔培养板,培养至细胞融合率达80%左右时,弃原培养基,换无血清DMEM培养基,同时按上述实验分组处理细胞。置细胞培养箱中继续培养24h在无菌条件下将细胞培养液吸至1mLEP管内,10000r/min 4 $^{\circ}$ C离心15min,再吸取上清液至另一新的1mLEP管内备用。根据ELISA试剂盒的检测步骤逐步操作,再根据测定的样品(样品附于试剂盒内)OD值绘出标准曲线,在曲线图上查出相应的E选择素和ICAM-1的含量。

1.6 Western Blotting测定核因子 κ B和磷酸化细胞外信号调节激酶1/2的表达

培养HUVE-12细胞至融合率达80%左右时,弃原培养基,换含1%新生牛血清的DMEM培养基,同时按空白对照组、H₂O₂损伤组、10 μ mol/L dFMGEN组处理细胞,30min后再加入1mmol/L H₂O₂,收集H₂O₂处理4h、8h、24h的细胞,用细胞裂解液裂解,12000r/min 4 $^{\circ}$ C离心10min,用BCA试剂进行蛋白定量。取提取的蛋白样品(40 μ g总蛋白/泳道)加入等体积上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C煮5min,10% SDS-PAGE电泳后将蛋白转移至PVDF膜上。用含5%脱脂牛奶的TBST室温下封闭2h,1:200加入核因子 κ B(p65)、 β -actin、ERK1/2、p-ERK1/2一抗于4 $^{\circ}$ C过夜,TBST洗膜3次,每次10min,加入相应的二抗室温孵育1h后,TBST洗膜三次,每次10min。然后在含化学发光剂A、B的溶液中激发荧光,于暗室中压片、显影、定影。结果用图像分析仪分析,以面积和光密度乘积为积分光密度表示结果。

1.7 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件进行分析, 以 One-Way ANOVA 方式行方差分析, 两两比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮对氧化诱导的血管内皮细胞与单核细胞黏附的影响

1 mmol/L H_2O_2 孵育内皮细胞 24 h 后, 能显著增加单核细胞与内皮细胞的黏附。0.1, 0.3, 1, 3, 10 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 预处理内皮细胞后, 细胞黏附率均明显降低, 其作用呈浓度依赖性。染料木黄酮、V iE 也能抑制单核细胞与内皮细胞的黏附, 其效价强度近似于 3 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN, 说明 dFMGEN 的作用强于先导化合物染料木黄酮和阳性药物 V iE (表 1)。

2.2 7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮对氧化诱导的血管内皮细胞释放 E 选择素和细胞间黏附分子 1 的影响

血管内皮细胞经 1 mmol/L H_2O_2 处理 24 h 后, 其 E 选择素和 ICAM-1 的释放量均较空白对照组明显增高 ($P < 0.01$)。dFMGEN 能抑制 H_2O_2 诱导的内皮细胞 E 选择素和 ICAM-1 的释放作用, 且呈浓度依赖性。先导化合物染料木黄酮及阳性对照药 V iE 对 H_2O_2 诱导的内皮细胞 E 选择素和 ICAM-1 的释放也有抑制作用, 但 100 $\mu\text{mol/L}$ 染料木黄酮的效价强度近似于 3 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN, 50 $\mu\text{mol/L}$ V iE 的效价强度近似于 1 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN, 说明 dFMGEN 的作用强于先导化合物染料木黄酮和阳性对照药物 V iE (表 1)。

表 1. dFMGEN 对氧化诱导的内皮细胞与单核细胞黏附以及血管内皮细胞释放 E 选择素和细胞间黏附分子 1 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	黏附率	E 选择素 ($\mu\text{g/L}$)	ICAM-1 ($\mu\text{g/L}$)
空白对照组	35.0% \pm 1.6%	0.84 \pm 0.03	23.39 \pm 2.08
H_2O_2 损伤组	80.9% \pm 2.7% ^a	2.05 \pm 0.09 ^a	46.56 \pm 4.15 ^a
溶媒对照组	86.7% \pm 3.1%	2.51 \pm 0.12	52.90 \pm 4.63
先导化合物组	33.6% \pm 1.4% ^c	0.90 \pm 0.03 ^c	20.63 \pm 2.04 ^c
0.1 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 组	53.0% \pm 2.5% ^c	1.55 \pm 0.07 ^b	31.43 \pm 2.92 ^c
0.3 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 组	47.3% \pm 2.0% ^c	1.39 \pm 0.05 ^c	29.43 \pm 2.78 ^c
1 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 组	41.4% \pm 1.1% ^{cd}	1.17 \pm 0.04 ^{cd}	26.23 \pm 2.47 ^{cd}
3 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 组	36.6% \pm 1.6% ^c	0.95 \pm 0.04 ^c	22.91 \pm 1.86 ^c
10 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 组	30.2% \pm 1.3% ^{ce}	0.80 \pm 0.02 ^{ce}	18.93 \pm 1.49 ^{ce}
阳性药物组	38.2% \pm 1.8% ^c	1.18 \pm 0.05 ^c	26.84 \pm 3.25 ^c

a 为 $P < 0.01$ 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$; c 为 $P < 0.01$ 与 H_2O_2 损伤组比较; d 为 $P < 0.05$ 与 0.1 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 组比较; e 为 $P < 0.05$ 与 1 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 组比较。

2.3 7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮对氧化诱导的血管内皮细胞核因子 κB 和磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 表达的影响

血管内皮细胞经 H_2O_2 处理后, 核因子 κB (p65) 蛋白的表达较空白对照组显著上调; 10 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 预处理细胞 4 h、8 h 和 24 h 后可下调氧化诱导的内皮细胞核因子 κB 蛋白的表达, 其作用呈时间依赖性 (图 1 和表 2)。

血管内皮细胞经 H_2O_2 处理后, ERK1/2 蛋白的磷酸化水平较空白对照组上调。10 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 预处理细胞 4 h、8 h 和 24 h 后均可使 ERK1/2 蛋白的磷酸化水平下降 (图 2 和表 2)。

表 2. dFMGEN 对氧化诱导的血管内皮细胞核因子 κB 蛋白和磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	核因子 κB	p-ERK1/2
空白对照组	32.9% \pm 2.0%	55.6% \pm 2.1%
H_2O_2 损伤组	100.0% \pm 2.6% ^a	100.0% \pm 3.4% ^a
dFMGEN 处理 4 h 组	82.3% \pm 2.1%	85.8% \pm 2.2%
dFMGEN 处理 8 h 组	60.6% \pm 2.1% ^{bd}	60.4% \pm 2.0% ^{bd}
dFMGEN 处理 24 h 组	39.6% \pm 1.8% ^{ce}	37.3% \pm 1.1% ^{ce}

a 为 $P < 0.01$ 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$; c 为 $P < 0.01$ 与 H_2O_2 损伤组比较; d 为 $P < 0.05$ 与 dFMGEN 处理 4 h 组比较; e 为 $P < 0.05$ 与 dFMGEN 处理 8 h 组比较。

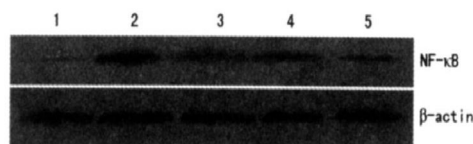


图 1. dFMGEN 下调氧化诱导的血管内皮细胞核因子 κB 蛋白的表达。1 为空白对照组, 2 为 H_2O_2 损伤组, 3~5 分别为 dFMGEN 处理 4 h、8 h 和 24 h 组。

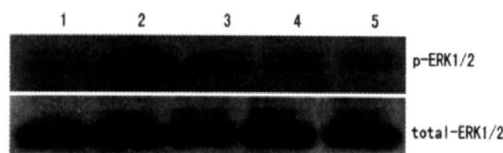


图 2. dFMGEN 抑制氧化诱导的血管内皮细胞细胞外信号调节激酶 1/2 蛋白的磷酸化。1 为空白对照组, 2 为 H_2O_2 损伤组, 3~5 分别为 dFMGEN 处理 4 h、8 h 和 24 h 组。

3 讨论

本研究发现, 氧化应激可明显促进内皮细胞与

单核细胞的黏附; dFMGEN 和先导化合物染料木黄酮及抗氧化剂 V iE 均能有效抑制氧化诱导的血管内皮细胞与单核细胞的黏附,且 dFMGEN 的效价强度高于染料木黄酮和 V iE。ELISA 检测结果证实 H₂O₂ 处理血管内皮细胞 24 h 后, E 选择素和 ICAM-1 的释放增加, dFMGEN 具有抑制氧化诱导的内皮细胞 E 选择素和 ICAM-1 释放的作用,且其作用呈浓度依赖性,表明 dFMGEN 通过抑制黏附分子 E 选择素和 ICAM-1 的释放而发挥拮抗氧化诱导的内皮细胞与单核细胞黏附的作用。

核因子 κ B 是普遍存在于胞浆中的一种核转录因子,它与核因子 κ B 抑制蛋白 (I κ B) 结合呈非活性状态。核因子 κ B 可被许多诱导剂激活,如活性氧等,激活后可促进多种炎症介质如黏附分子 (E 选择素和 ICAM-1 等)、细胞因子等基因的转录,在炎症反应中起重要作用^[8]。被激活的核因子 κ B 与 I κ B 解离,转入核内与靶基因反应元件序列结合,增强其表达。众多的研究表明^[9-12],核因子 κ B 参与炎症和免疫反应、细胞周期调控与分化以及对病毒感染等的反应等。另有研究发现,核因子 κ B 的持续激活与 As 有关^[13]。本研究结果显示 H₂O₂ 可诱导血管内皮细胞核因子 κ B 表达上调, dFMGEN 可下调氧化诱导的内皮细胞核因子 κ B 的表达,推测 dFMGEN 可能通过下调核因子 κ B 的表达,而调控黏附分子 E 选择素和 ICAM-1 的释放。

文献报道,活性氧可使 ERK 1/2 显著活化; ERK 1/2 磷酸化增加内皮细胞与中性粒细胞的黏附,而 ERK 1/2 磷酸化受到抑制时,氧化应激损伤得到一定程度的逆转,表明 ERK 1/2 在氧化应激诱导的内皮细胞与中性粒细胞黏附过程中起重要作用^[14]。本研究证实 H₂O₂ 可诱导血管内皮细胞 p-ERK 1/2 表达上调, dFMGEN 可下调氧化诱导的内皮细胞 p-ERK 1/2 的表达,提示 dFMGEN 可能通过抑制 ERK 1/2 的磷酸化,进而抑制氧化诱导的内皮细胞与单核细胞的黏附。

综上所述, dFMGEN 对氧化诱导的血管内皮细

胞与单核细胞的黏附及黏附分子 E 选择素和 ICAM-1 的表达有明显抑制作用,其作用机制可能与调控核因子 κ B 和 p-ERK 1/2 蛋白的表达有关。这一研究结果表明 dFMGEN 可能具有抗 As 作用,为研制防治心血管疾病新型药物提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis—a perspective for the 1990s [J]. *Nature* 1993; **362** (6423): 801
- [2] 郭芳,丁莉,孙文清,等. DPI 抑制高浓度葡萄糖诱导的人脐静脉内皮细胞活性氧升高及对 NOX 亚单位表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (7): 565-566
- [3] 于世勇,黄岚,宋明宝,等. 晚期糖基化终末产物刺激下内皮细胞活性氧的变化及来源分析 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (11): 857-860
- [4] Wang J, Zhang R, Xu Y, et al. Genistein inhibits the development of atherosclerosis via inhibiting NF- κ B and VCAM-1 expression in LDLR knockout mice [J]. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; **86** (11): 777-784
- [5] Chang YC, Naci MG, Nitiss JL. Metabolites of daizein and genistein and their biological activities [J]. *J Nat Prod* 1995; **58** (12): 1901-905
- [6] Fu XH, Wang L, Zhao H, et al. Synthesis of genistein derivatives and determination of their protective effects against vascular endothelial cell damages caused by hydrogen peroxide [J]. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; **18** (2): 513-517
- [7] Territo MC, Berliner JA, Ahnada L, et al. Beta-very low density lipoprotein pretreatment of endothelial monolayers increases monocyte adhesion [J]. *Arteriosclerosis* 1989; **9** (6): 824-828
- [8] Liu SF, Malik AB. NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; **290** (4): L622-645
- [9] Bourteele S, Oesterle K, Weinzierl AO, et al. A alteration of NF- κ B activity leads to mitochondrial apoptosis after infection with pathological prion protein [J]. *Cell Microbiol* 2007; **9** (9): 2202-217
- [10] Ma G, Khan SI, Benavides G, et al. Inhibition of NF- κ B mediated transcription and induction of apoptosis by melanoides and repandoides [J]. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; **60** (1): 35-43
- [11] Wang X, Hussain S, Wang EJ, et al. Lack of essential role of NF- κ B p50, RelA, and cRel subunits in virus-induced type 1 IFN expression [J]. *J Immunol* 2007; **178** (11): 6770-776
- [12] Yoon H, Liu RH. Effect of selected phytochemicals and apple extracts on NF- κ B activation in human breast cancer MCF-7 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, **55** (8): 3167-173
- [13] Ahn KS, Aggarwal BB. Transcription factor NF- κ B: a sensor for smoke and stress signals [J]. *Ann NY Acad Sci* 2005; **10** (56): 218-233
- [14] 周四桂,徐立朋,廖端芳,等. 环孢霉素 A 通过 ROS-Cyclophilin A-ERK 1/2 信号途径抑制人脐静脉内皮细胞与中性粒细胞黏附 [J]. *生理学报*, 2004, **56** (3): 313-320

(此文编辑 许雪梅)