

咖啡酸苯乙酯对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞炎症因子分泌的抑制作用

罗文基, 黄丽娟, 陈逸生, 郑志新

(中山大学附属第五医院药学部, 广东省珠海市 519000)

[关键词] 咖啡酸苯乙酯; 巨噬细胞; 炎症因子; 环氧合酶 2; 核转录因子 κ B

[摘要] **目的** 研究咖啡酸苯乙酯(CAPE)对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞炎症因子分泌的影响及其可能机制。**方法** 用不同浓度 CAPE 预处理 THP-1 源性巨噬细胞 2 h,再用 40 mg/L ox-LDL 处理 24 h,ELISA 检测炎症因子 TNF- α ,IL-6 以及 MCP-1 的分泌情况;用 40 mg/L ox-LDL 分别处理 THP-1 源性巨噬细胞不同时间,Western blot 检测细胞 COX-2 蛋白表达的情况;最后,采用 Western blot 分析 CAPE 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 COX-2 蛋白表达、I κ B- α 降解及其 NF- κ B 核转位的影响。**结果** 40 mg/L ox-LDL 可诱导 THP-1 源性巨噬细胞 TNF- α ,IL-6 以及 MCP-1 分泌增多,而 CAPE 明显抑制了 ox-LDL 诱导的细胞炎症因子分泌,呈浓度依赖性($P < 0.05$);随着 ox-LDL 处理时间的延长,THP-1 源性巨噬细胞 COX-2 蛋白表达逐渐增高,以 24 h 最为明显($P < 0.05$),而 CAPE 能抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 COX-2 蛋白表达上调,并可抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 I κ B- α 降解及其 NF- κ B 核转位。**结论** CAPE 对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症因子分泌应具有抑制作用,作用机制可能与其抑制 NF- κ B 激活,下调 COX-2 蛋白表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Caffeic Acid Phenethyl Ester Suppresses Inflammatory Cytokines Secretion in ox-LDL Treated THP-1 Macrophages

LUO Wen-Ji, HUANG Li-Juan, CHEN Yi-Sheng, and ZHENG Zhi-Xin

(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong 519000, China)

[KEY WORDS] Caffeic Acid Phenethyl Ester; Macrophages; Inflammatory Cytokines; COX-2; NF- κ B

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and underlying mechanisms of Caffeic acid phenethyl ester(CAPE) on inflammatory cytokines secretion in oxidized low density lipoprotein (ox-LDL)-stimulated THP-1 macrophages. **Methods** The THP-1 macrophages were preincubated with CAPE at different concentrations for 2 h, and then treated with ox-LDL(40 mg/L) for 24 h. The secret levels of TNF- α , IL-6 and MCP-1 in cells were determined by ELISA. After treated with 40 mg/L of ox-LDL for the indicated times, the expression of COX-2 in THP-1 macrophages was measured by Western blot. Subsequently, THP-1 cells were pretreated with indicated concentrations of CAPE, and then incubated with or without 40 mg/L of ox-LDL for 1 h. The expressions of COX-2, I κ B- α and nuclear NF- κ B were measured by Western blot. **Results** CAPE suppresses the ox-LDL-induced up-regulation of TNF- α , IL-6 and MCP-1 in THP-1 macrophages. The expression of COX-2 was markedly increased by ox-LDL, which, however, could be significantly attenuated by CAPE. CAPE suppresses ox-LDL induced I κ B- α degradation and NF- κ B nuclear translocation in THP-1 macrophages. **Conclusion** CAPE suppresses inflammatory cytokines secretion in ox-LDL treated THP-1 macrophages through inhibition of NF- κ B activation and COX-2 expression.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种累及血管壁的慢性炎症过程。巨噬细胞是 As 发生发展中最主要的炎症细胞类型^[1]。研究证实,氧化型低

密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)作为 As 发病过程中的重要因子,与巨噬细胞之间存在十分重要的交互式应答,巨噬细胞除摄取

[收稿日期] 2012-03-14

[作者简介] 罗文基,主管药师,主要从事医院药学研究。通讯作者郑志新,主管药师,主要从事医院药学研究,E-mail 为 zzheng2000@163.com。

ox-LDL 形成泡沫细胞外,还能被 ox-LDL 激活,释放大量的促炎性细胞因子和趋化因子如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MCP-1 和 MMP 等,参与调节细胞的增殖或凋亡、细胞外基质的合成或降解等过程,导致 As 斑块不稳定和破裂^[2]。因此,研究巨噬细胞炎症因子分泌的调控机制,对于稳定斑块,防治急性冠状动脉综合征的发生具有重要的意义。

咖啡酸苯乙酯 (caffeic acid phenethyl ester, CAPE) 是蜂胶主要活性组分之一,也可人工合成。CAPE 具有多种药理作用,如抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗 As 及免疫调节等^[3,4],而且 CAPE 虽对肿瘤细胞具有选择性的抑制作用,但对正常细胞几乎没有毒性作用,CAPE 是一种疗效好、副作用小的天然药物。研究表明,CAPE 可抑制 NF- κ B 活化,调节炎症介质的产生而发挥抗炎作用^[5,6]。因此,本研究采用 ox-LDL 刺激的 THP-1 源性巨噬细胞作为实验模型,观察 CAPE 对于 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症因子分泌的影响,并初步探讨可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人单核细胞株(THP-1)购自中科院上海细胞生物所细胞中心;CAPE、佛波酯(PMA)、NF- κ B 抑制剂 PDTC 购自 Sigma 公司;RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司;酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒购自 R&D Systems 公司;兔抗人 COX-2、I κ B α 、NF- κ Bp65 一抗购自 Bioword 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自美国 Abcam 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

健康人血浆购自珠海市中心血站。按照文献[7]方法制备低密度脂蛋白,210 mL 健康人血浆置超速离心机进行序列超速离心,制备 LDL。然后用含 10 μ mol/L CuSO₄ 的 PBS 溶液将 LDL 氧化修饰成 ox-LDL,最后,采用 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定修饰程度,过滤除菌,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 细胞培养

THP-1 细胞用含有 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中静置培养。培养液中加入羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)10 mmol/L 和青霉素、链霉素各 1.0 $\times 10^5$ U/L,每次实验前用 160 nmol/L 佛波酯孵育 24 h,使其诱导分化成巨噬细胞。

1.4 酶联免疫吸附法

细胞分成 6 组:空白对照组;40 mg/L ox-LDL 处理组;10 μ mol/L CAPE + 40 mg/L ox-LDL 处理组;20 μ mol/L CAPE + 40 mg/L ox-LDL 处理组;40 μ mol/L CAPE + 40 mg/L ox-LDL 处理组;60 μ mol/L CAPE + 40 mg/L ox-LDL 处理组,实验终点时,按照说明书方法,将试剂盒提供的原倍标准品在 EP 管中加入标准品稀释液倍比稀释。分别设空白孔、标准品孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品孔中加入稀释好的标准品 50 μ L;在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ L,然后再加待测样品 10 μ L,混匀,室温孵育 30 min。弃去液体,甩干,重复洗板 3 次,拍干。每孔加酶标试剂 50 μ L,空白孔除外,混匀,室温孵育 30 min。弃去液体,甩干,重复洗板 3 次,拍干。每孔先加显色剂 A 50 μ L,再加入显色剂 B50 μ L,轻轻晃动混匀,37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 分钟。取出酶标板,每孔加终止液 50 μ L,终止反应,在 450 nm 波长下测量读值。

1.5 Western blot

收集处理后的细胞,用蛋白提取试剂盒,分别提取细胞总蛋白及核蛋白,用 BCA 法进行蛋白质定量。取 40 μ g 蛋白质进行 10% SDS-PAGE 分离,蛋白质电转移至 PVDF 上,BSA 室温封闭 2 h,加入一抗,分别为兔抗人 COX-2 抗体(1:1000)、兔抗人 I κ B α 抗体(1:1000)、兔抗人 NF- κ B p65 抗体(1:1000),室温孵育 12 h,TBST 缓冲液洗膜 30 min;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 2 h;TBST 洗膜 30 min,然后用 Western blot 荧光检测试剂激发荧光,显示于 X 光片,显影,定影后进行图像分析。

1.6 统计学处理

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 15.0 进行统计处理,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 判定有无统计学意义。

2 结果

2.1 CAPE 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞炎症因子分泌的影响

分别用 0、10、20、40 和 60 μ mol/L CAPE 预处理 THP-1 源性巨噬细胞 2 h,再用 40 mg/L ox-LDL 处理 24 h,ELISA 检测炎症因子 TNF- α 、IL-6 以及 MCP-1 的分泌情况。结果显示,40 mg/L ox-LDL 可诱导细胞 TNF- α 、IL-6 以及 MCP-1 分泌增多,而 20、40 和 60 μ mol/L CAPE 明显抑制了 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 TNF- α 、IL-6 以及 MCP-1 的

分泌($P < 0.05$),其中,以 60 $\mu\text{mol/L}$ CAPE 效果最为显著(图 1)。

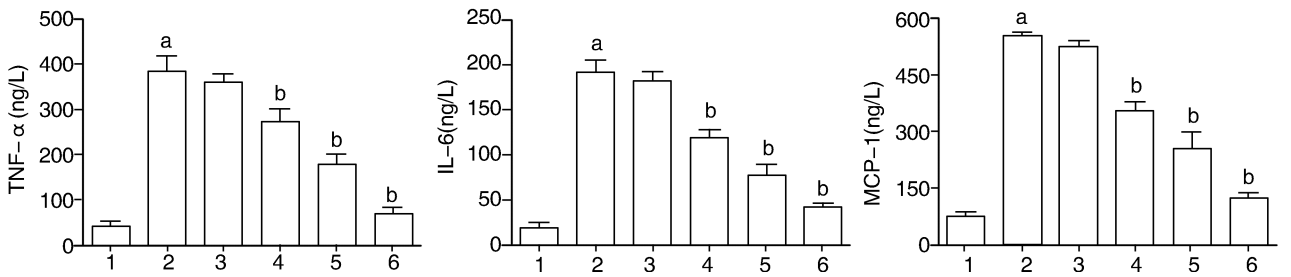


图 1. 不同浓度 CAPE 对对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞炎症因子分泌的影响 1 为空白对照组,2 为 40 mg/L ox-LDL 处理组,3 为 10 $\mu\text{mol/L}$ CAPE + 40 mg/L ox-LDL 处理组,4 为 20 $\mu\text{mol/L}$ CAPE + 40 mg/L ox-LDL 处理组,5 为 40 $\mu\text{mol/L}$ CAPE + 40 mg/L ox-LDL 处理组;6 为 60 $\mu\text{mol/L}$ CAPE + 40 mg/L ox-LDL 处理组;a 为 $P < 0.05$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 40 mg/L ox-LDL 处理组比较, $n = 3$ 。

Figure 1. Effects of CAPE on ox-LDL-induced secretion of TNF- α , IL-6 and MCP-1 in THP-1-derived macrophages

2.2 ox-LDL 对 THP-1 源性巨噬细胞中 COX-2 蛋白表达的影响

采用 Western blot 检测了 40 mg/L ox-LDL 分别处理 THP-1 源性巨噬细胞 0、1、4、8、12、24 h 后 COX-2 蛋白表达的情况。结果显示,随着 ox-LDL 处理时间的延长,COX-2 蛋白表达逐渐增高,以 24 h 最为明显(图 2)。

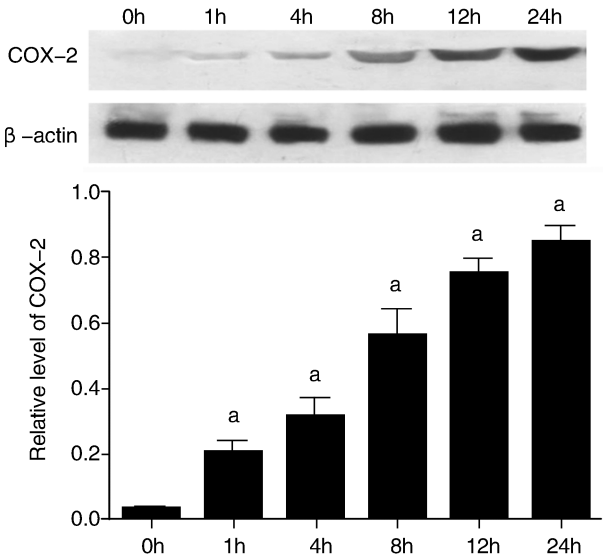


图 2. ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞不同时间 COX-2 蛋白表达情况 a 为 $P < 0.05$,与 0 h 组比较, $n = 3$ 。

Figure 2 The expression of COX-2 protein in THP-1-derived macrophages treated with 40 mg/L of ox-LDL for the indicated times

2.3 CAPE 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 COX-2 蛋白表达的影响

分别用 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ CAPE 及 25 $\mu\text{mol/L}$ NF- κB 抑制剂 PDTC 预处理 THP-1 源性巨噬细胞 2

h 后,用 40 mg/L ox-LDL 处理 24 h,Western blot 检测细胞 COX-2 蛋白表达。结果显示,CAPE 能抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 COX-2 蛋白表达上调,且随着 CAPE 浓度的增加,抑制作用越明显,同样,PDTC 预处理也能抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 COX-2 蛋白表达上调,60 $\mu\text{mol/L}$ CAPE 的抑制效应与 25 $\mu\text{mol/L}$ PDTC 抑制效应相当,两者差异无统计学意义(图 3)。

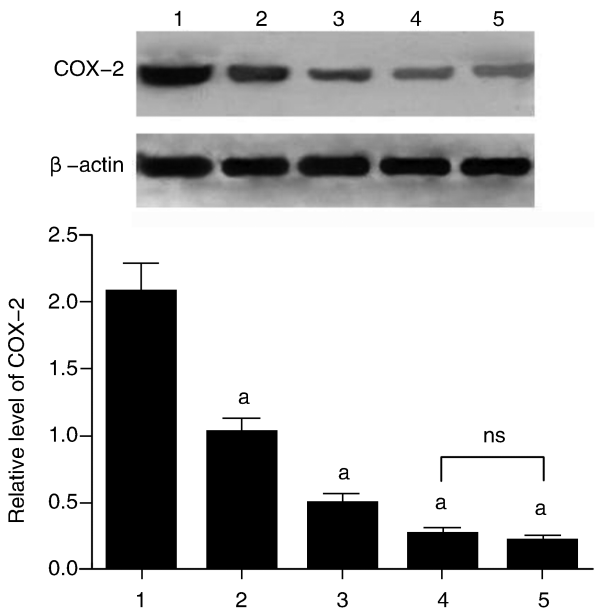


图 3. 不同浓度 CAPE 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 COX-2 蛋白表达的影响 1 为 40 mg/L ox-LDL 处理组,2 为 20 $\mu\text{mol/L}$ CAPE + 40 mg/L ox-LDL 处理组,3 为 40 $\mu\text{mol/L}$ CAPE + 40 mg/L ox-LDL 处理组,4 为 60 $\mu\text{mol/L}$ CAPE + 40 mg/L ox-LDL 处理组,5 为 20 $\mu\text{mol/L}$ PDTC + 40 mg/L ox-LDL 处理组;a 为 $P < 0.05$,与 40 mg/L ox-LDL 处理组比较, $n = 3$ 。

Figure 3. Effects of CAPE on ox-LDL induced COX-2 protein expression in THP-1 derived macrophages

2.4 CAPE 对 ox-LDL 诱导 THP-1 源性巨噬细胞 IκB-α 降解及其 NF-κB 核转位的影响

用 60 μmol/L CAPE 预处理 THP-1 源性巨噬细胞 2 h 后,加或不加 40 mg/L ox-LDL 处理 1 h,收集细胞并提取蛋白,采用 Western blot 检测细胞中 IκB-α 的表达以及细胞核内 NF-κB p65 的表达。结果表明,与 ox-LDL 处理相比,CAPE + ox-LDL 处理组细胞核内 NF-κB p65 蛋白的表达明显减少($P < 0.05$;图 4)。而且,CAPE 可抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 IκB-α 降解($P < 0.05$;图 5)

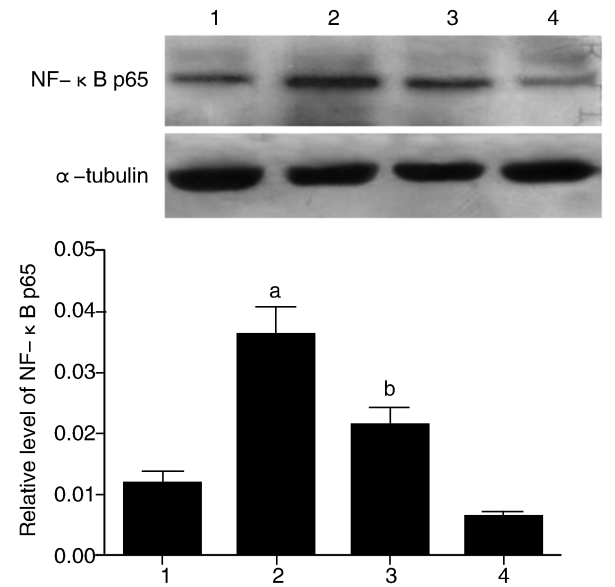


图 4. CAPE 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 NF-κB p65 蛋白表达的影响 1 为空白对照组,2 为 40 mg/L ox-LDL 处理组,3 为 60 μmol/L CAPE + 40 mg/L ox-LDL 处理组,4 为 60 μmol/L CAPE 处理组;a 为 $P < 0.05$,与空白对照组比较,b 为 $P < 0.05$,与 40 mg/L ox-LDL 处理组比较, $n = 3$ 。

Figure 4. Effects of CAPE on ox-LDL-induced nuclear NF-κB-p65 protein expression in THP-1-derived macrophages

3 讨论

CAPE 是一种从蜂胶中提取的中药单体,具有多种药理作用。研究表明,CAPE 有显著的抗炎作用,CAPE 对胸膜炎,耐药性化脓性眼内膜炎、杆菌大肠性肾盂肾炎等都有明显疗效^[10,11]。Hishikawa 等^[12]在高脂喂养的 apoE 基因敲除小鼠中发现,予以 CAPE 能明显延缓 As 的发生发展,作者认为 CAPE 抗 As 的作用与其抑制 NF-κB 激活,减少全身性氧化应激有关。在 As 斑块区,ox-LDL 能激活巨噬细胞,使其释放各种炎症因子,进一步损伤内皮功能、招募炎性细胞、刺激血管平滑肌细胞增殖,影

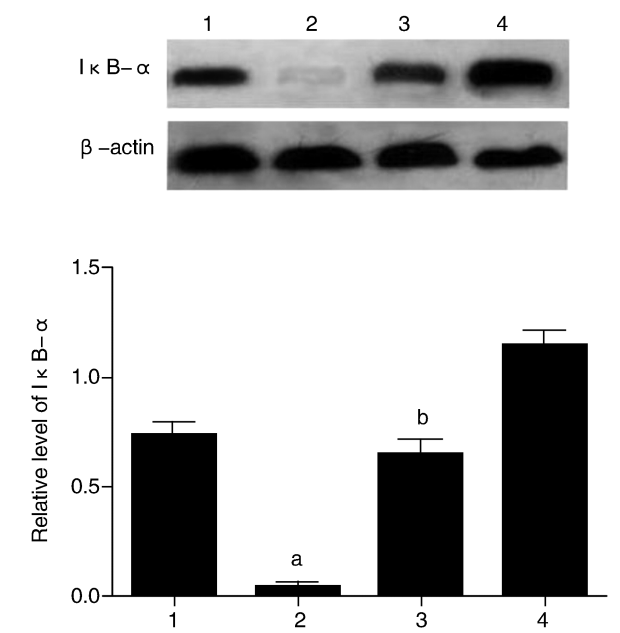


图 5. CAPE 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 IκB-α 蛋白降解的影响 1 为空白对照组,2 为 40 mg/L ox-LDL 处理组;3. 60 μmol/L CAPE + 40 mg/L ox-LDL 处理组;4. 60 μmol/L CAPE 处理组;a 为 $P < 0.05$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 40 mg/L ox-LDL 处理组比较, $n = 3$ 。

Figure 5 Effects of CAPE on oxLDL-induced IκB-α degradation in THP-1-derived macrophages

响细胞外基质的合成或降解,从而加速斑块不稳定和破裂,导致急性冠状动脉综合征发生,严重危及患者的生命。本实验发现在 ox-LDL 刺激 THP-1 源性巨噬细胞后,多种炎症因子如 TNF-α, IL-6 以及 MCP-1 分泌明显增加,而 CAPE 预处理明显抑制了 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞炎症因子的分泌。

COX-2 是一种诱导型酶,在各种刺激因子作用下表达可迅速上调,参与各种炎症^[8]。有研究证实,在 As 过程中,COX-2 表达增加,可调节炎症因子的分泌,促进血管炎症反应^[9]。研究已证实,COX-2 与 As 发生、发展密切相关,其在 As 血管中的单核-巨噬细胞、内皮细胞中表达明显增强,尤其在斑块处的巨噬细胞最为显著,COX-2 表达增加,可引起炎症因子的分泌增加,促进血管炎症反应^[13]。本实验结果也表明,在 ox-LDL 刺激下,THP-1 源性巨噬细胞中 COX-2 蛋白呈时间依赖性上调。随后,我们用不同浓度 CAPE 预处理 THP-1 源性巨噬细胞,结果发现 CAPE 能抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 COX-2 蛋白表达上调,这提示 CAPE 对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症因子分泌的抑制作用与其下调 COX-2 蛋白表达有关。

NF- κ B 作为一个转录调控因子,可以调控多个炎症基因的表达。有研究证明,COX-2 基因的表达受 NF- κ B 的调控,抑制 NF- κ B 的激活可以抑制 LPS、TNF- α 所诱导的 COX-2 的表达^[14,15]。本研究也发现 NF- κ B 抑制剂 PDTC 可抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 COX-2 蛋白表达上调,CAPE 具有同样的作用。那 CAPE 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞中 NF- κ B 的活性是否具有抑制作用呢? NF- κ B 以异源二聚体存在于细胞胞浆中,其 p50、p65 亚基与它的抑制蛋白 I κ B 结合后,I κ B 磷酸化后发生降解,导致 NF- κ B 活化并从细胞浆易位至细胞核内^[16-17]。本研究发现 CAPE 可抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 I κ B- α 降解及 NF- κ B 核转位,这说明 CAPE 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞中 NF- κ B 激活具有抑制作用。

综上所述,CAPE 对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症因子分泌具有抑制作用,作用机制可能与其抑制 NF- κ B 激活,下调 COX-2 蛋白表达有关。但是还需通过体内实验进一步明确 CAPE 在 As 中的抗炎作用及其确切机制。

[参考文献]

- [1] Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Cell*, 2011, 145(3): 341-355.
- [2] Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, et al. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice[J]. *Circ J*, 2010, 74(2): 213-220.
- [3] Boudreau LH, Maillet J, LeBlanc LM, et al. Caffeic acid phenethyl ester and its amide analogue are potent inhibitors of leukotriene biosynthesis in human polymorphonuclear leukocytes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31 833.
- [4] Yang YH. Caffeic Acid phenethyl ester possessing various immunomodulatory effects is a potentially effective therapy for asthma [J]. *Pediatr Neonatol*, 2011, 52 (6): 307-308.
- [5] Song JJ, Lim HW, Kim K, et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on H₂O₂ induced oxidative and inflammatory responses in human middle ear epithelial cells [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2012, 76 (5): 675-679.
- [6] Khan M, Elango C, Ansari MA, et al. Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects

rat brain following transient focal cerebral ischemia[J]. *J Neurochem*, 2007, 102(2): 365-377.

- [7] 唐朝克, 易光辉, 王佐, 等. 干扰素- γ 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出和 ABCA1 表达的影响[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2004, 31(2): 127-133.
- [8] Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target[J]. *Annu Rev Med*, 2002, 53: 35-57.
- [9] Cuccurullo C, Fazio Mezzetti A, Cipollone F. COX-2 expression in atherosclerosis: the good, the bad or the ugly [J]? *Curr Med Chem*, 2007, 14(15): 1 595-605.
- [10] Yildirim O, Yilmaz A, Oz O, et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester on treatment of experimentally induced methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* endophthalmitis in a rabbit model [J]. *Cell Biochem Funct*, 2007, 25(6): 693-700.
- [11] Celik S, Gorur S, Aslantas O, et al. Caffeic acid phenethyl ester suppresses oxidative stress in *Escherichia coli*-induced pyelonephritis in rats [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 297(1-2): 131-138.
- [12] Hishikawa K, Nakaki T, Fujita T. Oral flavonoid supplementation attenuates atherosclerosis development in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(2): 442-446.
- [13] 邓平, 赵水平. 环氧合酶 2 在动脉粥样硬化炎症中的意义和他汀类药物的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12(2): 241-245.
- [14] Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(11): 837-848.
- [15] Chen CC, Chiu KT, Chan ST, et al. Conjugated polyhydroxybenzene derivatives block tumor necrosis factor-alpha-mediated nuclear factor-kappaB activation and cyclooxygenase-2 gene transcription by targeting IkappaB kinase activity [J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 60 (6): 1 439-448.
- [16] 王锡煌, 王挹青, 宋晶金. 血管生成素 1 通过核因子 κ B 传导通路调节内皮祖细胞炎症因子表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(4): 309-313.
- [17] 龙石银, 高细强, 张彩平, 等. 二苯乙炔苷通过核因子-B 信号通路抑制过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(6): 479-492.

(此文编辑 李小玲)