

丹参酮 II A 对内皮细胞环氧合酶 2 表达的影响及相关机制

王红艳¹, 蔡凡¹, 徐春亮², 曹久妹¹, 陈晓南¹, 吴方¹

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院老年病科, 2. 上海交通大学医学院
中国科学院上海生命科学研究院健康科学研究中心, 上海市 200025)

[关键词] 丹参酮 II A; 环氧合酶 2; 血管紧张素 II; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 核因子 κ B

[摘要] **目的** 探讨丹参酮 II A 对主动脉内皮细胞环氧合酶 2 (COX-2) 表达的影响及相关机制。**方法** 体外培养人主动脉内皮细胞株并分为三组: 血管紧张素 II (100 nmol/L) 组、血管紧张素 II (100 nmol/L) + 丹参酮 II A (1 μ mmol/L) 组及对照组, 共培养 10 min、1 h 及 2 h 后分别收集细胞, 运用实时荧光定量 PCR 检测 COX-2 mRNA 的表达量, Western blot 检测 COX-2、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK)、磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK)、核因子 κ B (NF- κ B) 及磷酸化 NF- κ B (p-NF- κ B) 蛋白表达的变化。**结果** 在血管紧张素 II 的作用下, 内皮细胞内 COX-2 mRNA 和蛋白表达水平明显增加 ($P < 0.01$), 且 p-p38MAPK 和 p-NF- κ B 水平也同步提高 ($P < 0.01$)。加用丹参酮 II A 处理后, 内皮细胞 COX-2 mRNA 和蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.01$), p-p38MAPK 和 p-NF- κ B 水平也受到明显抑制 ($P < 0.01$)。**结论** 丹参酮 II A 明显抑制主动脉内皮细胞 COX-2 的表达, 其机制可能与抑制 p38MAPK、NF- κ B 的磷酸化有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effect of Tanshinone II A on Endothelial Cells' Cyclooxygenase-2 Expression and the Relative Mechanisms

WANG Hong-Yan¹, CAI Fan¹, XU Chun-Liang², CAO Jiu-Mei¹, CHEN Xiao-Nan¹, and WU Fang¹

(1. Department of Geriatrics, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China; 2. Institute of Health Sciences, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University & Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China)

[KEY WORDS] Tanshinone II A; Cyclooxygenase-2; Angiotensin II; p38 Mitogen-activated Protein Kinase; Nuclear Factor- κ B

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Tanshinone II A on endothelial cells' cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and the relative mechanisms. **Methods** Human aortic endothelial cells were incubated in vitro and then co-cultured with angiotensin II (100 nmol/L), Tanshinone II A (1 μ mmol/L) and no drugs respectively for 10 minutes, 1 hour and 2 hours. The expressions of COX-2 mRNA were measured by real time-PCR and COX-2, p38MAPK, p-p38MAPK, NF- κ B and p-NF- κ B protein levels were measured by Western blot assay. **Results** Angiotensin II could induce the expression of COX-2 mRNA and protein ($P < 0.01$) as the same as the phosphorylation of p38MAPK and NF- κ B ($P < 0.01$). Incubating human aortic endothelial cells with angiotensin II and Tanshinone II A suppressed the expression of COX-2 ($P < 0.01$) and the phosphorylation of p38MAPK and NF- κ B was also decreased ($P < 0.01$).

Conclusion Tanshinone II A could suppress the expression of COX-2 and it may be achieved through inhibiting the phosphorylation of p38MAPK and NF- κ B.

近些年的研究表明, 动脉粥样硬化不仅仅是脂质代谢异常产生的病变, 血管炎症性损伤也是其发

生的重要原因^[1]。环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 作为一种炎症因子不仅具有催化花生四烯

[收稿日期] 2014-02-13

[基金项目] 上海市科委基金资助 (124119a6800); 上海市公共卫生重点学科建设计划项目 (12GWEX1002)

[作者简介] 王红艳, 硕士研究生, 主要从事血栓性疾病研究。蔡凡, 硕士研究生, 医师, 主要从事老年血栓性疾病研究。徐春亮, 博士研究生, 主要从事间充质干细胞与肿瘤相关研究。通讯作者吴方, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事血栓性疾病研究。

酸代谢的作用,其表达量的增加可以诱导单核-内皮细胞的黏附性增加、降低动脉粥样硬化斑块的稳定性,与动脉粥样硬化的发生和发展密切相关。丹参酮 II A 是临床上最常用的活血化瘀中药丹参的主要成分之一,已经证实具有舒张血管、保护心肌和保护内皮细胞等多种功效^[2],但其具体机制尚不明确。本研究拟通过体外细胞实验探究丹参酮 II A 对 COX-2 表达量的影响及作用机制,为临床抗动脉粥样硬化的治疗提供理论与实验依据。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

人主动脉内皮细胞株、胎牛血清购自 Hyclone 公司,DMEM 低糖培养基购自 Invitrogen 公司,血管紧张素 II (angiotension II, Ang II) 购自 Proteach 公司,丹参酮 II A 购自上海源叶生物技术有限公司,总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司,cDNA 合成试剂盒购自大连 TaKaRa 公司,Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) 购自 Roche 公司,BCA 法蛋白定量试剂盒购自 Biotek 公司,COX-2 兔抗人多克隆抗体、磷酸化核因子 κ B (phosphorylation of nuclear factor- κ B, p-NF- κ B) 抗体、核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 抗体、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase, p-p38MAPK) 抗体、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 抗体、GAPDH 一抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自 Cell Signaling 公司。离心机购自 Eppendorf 公司,普通 PCR 仪和 real-time PCR 仪购自 ABI 公司,全自动洗片机购自 GLUNE&JENSEN 公司,扫描仪购自惠普公司。

1.2 细胞培养及分组

人主动脉内皮细胞株培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,每天换液,90% 汇合时消化传代;以 5×10^5 个细胞/孔接种于 12 孔板,进行 mRNA 表达检测;以 1×10^6 个细胞/孔接种于 6 孔板,进行蛋白表达检测。培养的细胞随机分为三组:①对照组:DMEM 培养基;②Ang II 组:加入终浓度为 100 nmol/L Ang II;③Ang II + 丹参酮 II A 组:加入终浓度为 100 nmol/L Ang II 和终浓度为 1 μ mol/L 丹参酮 II A。培养 10 min 后检测 p38MAPK、p-p38MAPK、NF- κ B 和 p-NF- κ B 蛋白表达的变化;培养 1 h 后检测 COX-2 mRNA 表达的变化;培养 2 h 后检测 COX-2 蛋白表达的变化。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应检测 mRNA 表达

收集细胞,提取细胞总 RNA,逆转录为 cDNA。real-time PCR 实验中引物序列:COX-2 上游 5'-CCC ACC CAT GTC AAA ACC GA-3',下游 5'-CCG GGT ACA ATC GCA CTT ATA CT-3';GAPDH 上游 5'-ATG GGG AAG GTG AAG GTC G-3',下游 5'-GGG GTC ATT GAT GGC AAC AAT A-3',按 Real Master Mix (SYBR Green) 说明书配置反应体系。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s。反应在 ABI 7000 定量荧光仪上进行,应用比较 Ct 法进行相对定量,COX-2 mRNA 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 1000$ 来表示。

1.4 Western blot 检测蛋白表达

收集细胞,RIPA 裂解,BCA 法测定蛋白浓度,100 $^{\circ}$ C 变性 10 min。蛋白上样量为每孔 60 μ g,80 V,30 min;100 V,1 h;100 V,2 h 转至 NC 膜;5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h;一抗 (COX-2 按 1:500; p38MAPK、p-p38MAPK、NF- κ B、p-NF- κ B 按 1:1000; GAPDH 按 1:2000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗 3 次;HRP 标记的二抗 (1:5000) 室温孵育 2 h,TBST 洗 3 次;显影。GAPDH 为内参照,COX-2、p38MAPK、p-p38MAPK、NF- κ B、p-NF- κ B 蛋白表达量以同 GAPDH 表达量的比值表示。

1.5 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,三组间比较采用 One-way ANOVA 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹参酮 II A 对内皮细胞 COX-2 mRNA 表达的影响

加入 Ang II 后,COX-2 mRNA 的表达明显增加。丹参酮 II A 和 Ang II 同时孵育内皮细胞后,COX-2 mRNA 的表达受到显著抑制,与 Ang II 组相比,Ang II + 丹参酮 II A 组 COX-2 mRNA 表达降低 66.70% ($P < 0.01$;表 1)。

2.2 丹参酮 II A 对内皮细胞 COX-2 蛋白表达的影响

加入 Ang II 后,COX-2 蛋白表达明显增加。丹参酮 II A 和 Ang II 同时孵育内皮细胞后,COX-2 蛋白表达显著降低;与 Ang II 组相比,Ang II + 丹参酮 II A 组 COX-2 蛋白表达降低 55.73% ($P < 0.01$;表 1 和图 1)。

表 1. 丹参酮 II A 对内皮细胞 COX-2 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 1. The effect of Tanshinone II A on the expression of COX-2 mRNA and protein ($\bar{x} \pm s, n=4$)

分 组	COX-2 mRNA	COX-2 蛋白
对照组	0.960 ± 0.189	0.025 ± 0.034
Ang II 组	7.759 ± 0.009 ^b	1.082 ± 0.029 ^b
Ang II + 丹参酮 II A 组	2.584 ± 0.196 ^{bc}	0.479 ± 0.034 ^{ac}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 Ang II 组比较。

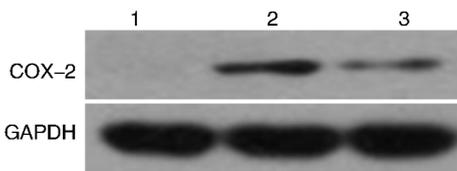


图 1. 丹参酮 II A 对 COX-2 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为 Ang II 组, 3 为 Ang II + 丹参酮 II A 组。

Figure 1. The effect of Tanshinone II A on the expression of COX-2 protein

2.3 丹参酮 II A 对 p38MAPK 及其磷酸化蛋白表达的影响

加入 Ang II 后, p38MAPK 蛋白表达没有发生变化, 但是 p-p38MAPK 与对照组相比明显增加, 为对照组的 3.30 倍 ($P < 0.01$); 加入丹参酮 II A 后, p-p38MAPK 蛋白表达受到显著抑制, 与 Ang II 组相比降低 48.57% ($P < 0.01$; 表 2 和图 2)。

2.4 丹参酮 II A 对 NF-κB 及其磷酸化蛋白表达的影响

加入 Ang II 后, p-NF-κB 与对照组相比明显增加, 为对照组的 5.08 倍 ($P < 0.01$)。加入丹参酮 II A 后, Ang II 诱导产生的 p-NF-κB 受到抑制, 与 Ang II 组相比降低 67.06% ($P < 0.01$; 表 3 和图 3)。

表 2. 丹参酮 II A 对 p38MAPK 和 p-p38MAPK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2. The effect of Tanshinone II A on the expression of p38MAPK and p-p38MAPK protein ($\bar{x} \pm s, n=4$)

分 组	p-p38MAPK	p38MAPK
对照组	1.270 ± 0.032	3.380 ± 0.023
Ang II 组	4.186 ± 0.128 ^a	3.412 ± 0.017
Ang II + 丹参酮 II A 组	2.153 ± 0.072 ^{ab}	3.430 ± 0.045

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 Ang II 组比较。

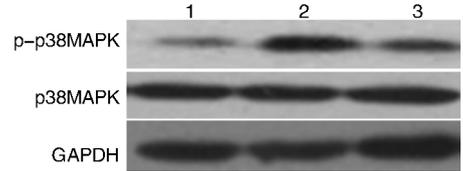


图 2. 丹参酮 II A 对 p38MAPK 和 p-p38MAPK 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为 Ang II 组, 3 为 Ang II + 丹参酮 II A 组。

Figure 2. The effect of Tanshinone II A on the expression of p38MAPK and p-p38MAPK protein

表 3. 丹参酮 II A 对 NF-κB 和 p-NF-κB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3. The effect of Tanshinone II A on the expression of NF-κB and p-NF-κB protein ($\bar{x} \pm s, n=4$)

分 组	p-NF-κB	NF-κB
对照组	0.165 ± 0.013	0.888 ± 0.056
Ang II 组	0.838 ± 0.021 ^a	0.905 ± 0.012
Ang II + 丹参酮 II A 组	0.276 ± 0.013 ^{ab}	0.908 ± 0.023

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 Ang II 组比较。

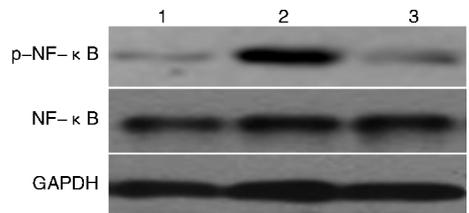


图 3. 丹参酮 II A 对 NF-κB 和 p-NF-κB 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为 Ang II 组, 3 为 Ang II + 丹参酮 II A 组。

Figure 3. The effect of Tanshinone II A on the expression of NF-κB and p-NF-κB protein

3 讨 论

近年的研究表明, 多种炎症因子通过损伤内皮细胞、调节组织代谢活动等导致血管慢性炎症性损伤, 从而参与动脉粥样硬化的全过程。已知多种心脑血管疾病与肾素-血管紧张素系统的激活相关, 肾素-血管紧张素系统活化产生的 Ang II 可以通过调控生长因子、细胞因子和黏附分子等使动脉粥样硬化斑块形成的风险增加, 从而加速心脑血管疾病的进展^[3]。COX-2 是环氧化酶的重要亚型之一, 为诱导型酶, 生理状态下不表达或表达量极低, 但在炎症因子、糖、脂蛋白等诱导下表达量明显增加。本研究发现, 加入 Ang II 后, 内皮细胞中 COX-2 mRNA 及蛋白表达明显增加。诱导产生的 COX-2 可以促进内皮细胞对单核细胞的招募, 且随着 COX-2 表达的上升而进一步加强^[4], 而单核-内皮细胞的黏附是动脉粥样硬化发生的首要环节。已有研究

者在兔动脉粥样硬化模型中证实 COX-2 在动脉粥样斑块中表达增加^[5],使用 COX-2 抑制剂后可明显减少斑块面积^[6],提示抑制 COX-2 的表达在抗动脉粥样硬化的发生和发展中有重要作用。

丹参酮 II A 是临床上常用的活血化瘀中药丹参的主要成分之一,具有舒张血管、保护心肌、抗氧化和保护内皮细胞等多种功效,对心肌梗死、心绞痛和动脉粥样硬化有明显的疗效^[2,7],但其作用机制尚不明确。已有报道指出,丹参酮 II A 可以抑制黏附因子如血管细胞间黏附分子 1、细胞间黏附分子 1 等的表达^[8],从而抑制单核-内皮细胞黏附。也有研究证实,丹参酮 II A 可通过抑制单核细胞趋化蛋白 1、基质金属蛋白酶 9 的表达而减小载脂蛋白 E 缺陷小鼠的斑块面积^[9]。我们的实验结果显示,丹参酮 II A 能明显降低内皮细胞中 COX-2 mRNA 和蛋白的表达量。因此,丹参酮 II A 可能通过对多种炎症因子的抑制对动脉粥样硬化的进展产生影响。

MAPK 信号途径是细胞内一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,存在于大多数细胞内,是细胞将信号传导到细胞内,引起细胞反应的一类重要信号系统。MAPK 磷酸化被激活后发生核转位,从而调控其它因子的产生而发挥相应的作用。Ebrahimian 等^[10]在平滑肌细胞中证实 Ang II 可以迅速引起 p38MAPK 磷酸化。Rohde 等^[11]发现,在单核细胞向泡沫细胞转化时,p38MAPK 的磷酸化程度上升,特异性抑制该激酶可阻断脂肪滴在单核细胞内的聚集。我们的研究结果显示,Ang II 能够显著活化内皮细胞中的 p38MAPK,使其磷酸化水平增加。在使用丹参酮 II A 后,p38MAPK 的磷酸化水平明显降低。因此,丹参酮 II A 抑制内皮细胞中 COX-2 的表达可能是通过抑制 p38MAPK 磷酸化实现的。

另有研究指出,在动脉粥样硬化患者病灶粥瘤内膜、中膜血管平滑肌细胞、巨噬细胞、内皮细胞里均有活化的 NF- κ B,且不稳定型心绞痛患者白细胞内 NF- κ B 在急性冠状动脉事件之前出现显著而特异地激活,可以对继发性冠状动脉事件起预测作用^[12]。在 Ang II 诱导的平滑肌细胞中发现,NF- κ B 的激活参与 COX-2 表达的调控^[13]。我们的研究结果也显示,Ang II 能活化 NF- κ B,使其磷酸化水平明显增加。在使用丹参酮 II A 后,Ang II 诱导的 NF- κ B 磷酸化水平明显降低。提示丹参酮 II A 通过抑制 NF- κ B 磷酸化从而降低内皮细胞中 COX-2 的表达。

综上所述,丹参酮 II A 能明显抑制内皮细胞 COX-2 的表达,其作用机制可能与抑制 p38MAPK、NF- κ B 的磷酸化水平有关。鉴于 COX-2 高表达对

心脑血管疾病发生、发展的影响,丹参酮 II A 有望在抗动脉粥样硬化中得到更多的应用。当然,具体临床疗效还需要进一步的观察。

[参考文献]

- [1] Wong BW, Meredith A, Lin D, et al. The biological role of inflammation in atherosclerosis [J]. *Can J Cardiol*, 2012, 28 (6): 631-641.
- [2] Gao S, Liu Z, Li H, et al. Cardiovascular actions and therapeutic potential of tanshinone II A [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 220 (1): 3-10.
- [3] Wang RX, Zha J, Xu ZR. Associations of blood pressure level with carotid intima-media thickness and plaque among middle-aged and elderly Chinese hypertensives [J]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2013, 41 (3): 256-261.
- [4] Liu X, Pan L, Wang X, et al. Leonurine protects against tumor necrosis factor- α -mediated inflammation in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 222 (1): 34-42.
- [5] Kuge Y, Takai N, Ishino S, et al. Distribution profiles of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in rabbit atherosclerosis: comparison with plaque instability analysis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30 (9): 1 634-640.
- [6] Raval M, Frank PG, Laury-Kleintop L, et al. Celecoxib combined with atorvastatin prevents progression of atherosclerosis [J]. *J Surg Res*, 2010, 163 (2): e113-e122.
- [7] 杨征,邱敏.丹参酮 II A 的心血管作用及机制研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (4): 372-374.
- [8] Chang CC, Chu CF, Wang CN, et al. The anti-atherosclerotic effect of tanshinone II A is associated with the inhibition of TNF- α -induced VCAM-1, ICAM-1 and CX3CL1 expression [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21 (3): 207-216.
- [9] Xu S, Little PJ, Lan T, et al. Tanshinone II-A attenuates and stabilizes atherosclerotic plaques in apolipoprotein-E knockout mice fed a high cholesterol diet [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 515 (1): 72-79.
- [10] Ebrahimian T, Li MW, Lemarié CA, et al. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in angiotensin II-induced inflammation and hypertension regulation of oxidative stress [J]. *Hypertension*, 2011, 57 (2): 245-254.
- [11] Rohde E, Schallmoser K, Reimisch A, et al. Pro-angiogenic induction of myeloid cells for therapeutic angiogenesis can induce mitogen-activated protein kinase p38-dependent foam cell formation [J]. *Cytotherapy*, 2011, 13 (4): 503-512.
- [12] Inoue T, Kobayashi K, Inoguchi T, et al. Reduced expression of adipose triglyceride lipase enhances tumor necrosis factor α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression in human aortic endothelial cells via protein kinase C-dependent activation of nuclear factor- κ B [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (37): 32 045-053.
- [13] Morinelli TA, Kendall RT, Luttrell LM, et al. Angiotensin II-induced cyclooxygenase 2 expression in rat aorta vascular smooth muscle cells does not require heterotrimeric G protein activation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 330 (1): 118-124.