

油酰乙醇胺通过过氧化物酶体增植物激活受体 α 途径抑制单核-内皮细胞的黏附作用

李莹, 王英, 曾臻, 杨丙晔, 罗浩虹

(厦门医学院生物制药室, 福建省厦门市 361023)

[关键词] 油酰乙醇胺; 过氧化物酶体增植物激活受体 α ; 单核细胞; 内皮细胞; 黏附; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨过氧化物酶体增植物激活受体 α (PPAR α) 激动剂油酰乙醇胺 (OEA) 对单核-内皮细胞黏附作用的影响。方法 采用 Western blot 检测 OEA 对脂多糖诱导 THP-1 细胞中基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 和 MMP-9 蛋白表达及对肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导人脐静脉内皮细胞中血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 和细胞间黏附分子 1 (ICAM-1) 蛋白表达的影响。采用 TNF- α 诱导的单核-内皮细胞黏附模型, 用 PPAR α 阻断剂 MK886 阻断 PPAR α 信号通路后, 检测 THP-1 细胞的黏附和 VCAM-1 蛋白的表达。结果 40 $\mu\text{mol/L}$ OEA 显著抑制 MMP-2、MMP-9、VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达。OEA 对 TNF- α 诱导的单核-内皮细胞黏附具有直接的抑制作用。MK886 部分逆转了 OEA 对单核-内皮细胞黏附的抑制作用及对 VCAM-1 蛋白表达的抑制作用。结论 OEA 能够抑制单核-内皮细胞的黏附, 其机制可能与 PPAR α 途径相关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Oleylethanolamide inhibits monocyte-endothelial cell adhesion through peroxisome proliferator-activated receptor α pathway

LI Ying, WANG Ying, ZENG Zhen, YANG Bingye, LUO Haohong

(Biopharmaceutical Laboratory, Xiamen Medical College, Xiamen, Fujian 361023, China)

[KEY WORDS] oleylethanolamide; peroxisome proliferator-activated receptor α ; monocyte; endothelial cell; adhesion; atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) agonist oleylethanolamide (OEA) on the adhesion of monocytes to endothelial cells. **Methods** Western blot was used to detect the effects of OEA on the expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in lipopolysaccharide-induced THP-1 cells and the expressions of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) in human umbilical vein endothelial cells induced by tumor necrosis factor α (TNF- α). The adhesion of THP-1 cells and the expression of VCAM-1 protein were detected by TNF- α -induced monocyte-endothelial cell adhesion model after PPAR α blocker MK886 blocked PPAR α signaling pathway. **Results** 40 $\mu\text{mol/L}$ OEA significantly inhibited MMP-2, MMP-9, VCAM-1 and ICAM-1 protein expression. OEA had a direct inhibitory effect on the monocyte-endothelial cell adhesion induced by TNF- α . MK886 partially reversed the inhibitory effect of OEA on monocyte-endothelial cell adhesion and VCAM-1 protein expression. **Conclusion** OEA can inhibit the adhesion of monocytes to endothelial cells, and its mechanism may be related to PPAR α pathway.

单核细胞与内皮细胞的相互作用是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的起始环节及早期炎症的典型特征之一^[1]。单核-内皮细胞的相互作用产生多种黏附分子和细胞因子, 如细胞间黏附分子 1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细

胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 等, 与 As 的发生、发展密切相关^[2-4]。ICAM-1 和 VCAM-1 属于免疫球蛋白超家族的成员, 参与白细胞与内皮细胞的黏附, 引起血管炎症性反应^[5]。

[收稿日期] 2018-04-13

[修回日期] 2018-06-19

[基金项目] 福建省自然科学基金 (2016D024)

[作者简介] 李莹, 博士, 讲师, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 yanglc00@163.com。

MMP 是由炎性细胞分泌的一组酶,可以降解纤维帽中的胶原,使纤维帽变薄,斑块不稳定性增加,易于破裂^[6]。因此,抑制 MMP 的分泌在维持粥样斑块稳定性中十分重要。

油酰乙醇胺(oleoylethanolamide, OEA)是一种内源性的过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α) 高亲和配体,已证实 OEA 具有神经保护、抗炎及降血脂等多方面的药理活性^[7-8]。我们前期的研究^[9]也表明, OEA 通过抑制核因子 κ B 和 ERK/AP-1/STAT3 信号途径降低脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 THP-1 细胞炎症反应。但 OEA 对单核-内皮细胞相互作用的影响还不清楚。因此,本研究旨在探讨 OEA 对单核-内皮细胞相互作用是否有影响,从而进一步阐明其抗 As 的新机制。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

OEA、非诺贝特(fenofibrate)、LPS、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、MK886、BCECF AM pH 荧光探针[BCECF:2,7-双(2-羧基乙基)-5(6)-羧基荧光素]、 β -actin 一抗(美国 Sigma 公司);RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco 公司);BCA 蛋白含量测定试剂盒(美国 Thermo 公司);MMP-2、MMP-9、ICAM-1、VCAM-1 等抗体(美国 Millipore 公司);ECL 化学发光显色试剂盒(杭州联科生物公司)。

1.2 细胞培养

THP-1 细胞购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所细胞中心。将 THP-1 细胞接种在含有 10% 胎牛血清、0.05 mmol/L 2-巯基乙醇、100 u/L 链霉素和 100 u/L 青霉素的 RPMI 1640 培养基,37℃、5%CO₂ 培养箱培养。实验分为:对照组、LPS 诱导组、LPS+OEA(40 μ mol/L)组和 LPS+非诺贝特(100 μ mol/L;阳性对照药)组。

新生儿脐带(厦门大学附属第一医院提供并已签署知情同意书)用 I 型胶原酶消化,DMEM 完全培养基于 37℃、5%CO₂ 培养箱培养,得到第 1 代人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC),用胰酶消化传代。实验分为:对照组、TNF- α 诱导组、TNF- α +OEA(40 μ mol/L)组和 TNF- α +非诺贝特(100 μ mol/L;阳性对照药)组。

1.3 Western blot 检测

将 OEA(40 μ mol/L)及非诺贝特(100 μ mol/L)

分别加入 THP-1 细胞培养液中孵育 1 h 后,然后用 LPS(1 mg/L)诱导 24 h。收集 THP-1 细胞,提取总蛋白,取上清液测定蛋白浓度。每孔上样 30 μ g, SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,将蛋白转印到 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,分别加入稀释过的 MMP-2、MMP-9、ICAM-1 和 VCAM-1 抗体,冰箱 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入稀释过的二抗 37℃ 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 ECL 显色。

1.4 THP-1 细胞荧光标记

收集 THP-1 细胞,加入无血清 RPMI 1640 培养液至细胞数密度为 1×10^9 个/升,吹打均匀。每 1000 μ L 悬液加 BCECF 8 μ L,吹打均匀,移至培养板,37℃ 孵育 30 min,1000 r/min 离心 5 min,弃上清液。加入含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 重悬细胞,悬液细胞密度约为 1×10^9 个/升。

1.5 THP-1 黏附实验

取 HUVEC,以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔细胞培养板,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 12 h 后,阻断剂组加入 MK886(2.5 μ mol/L)孵育 40 min 后,阻断剂组与给药组分别加入 OEA(40 μ mol/L),随后加入 TNF- α (20 μ g/L)孵育 7 h;避光,用冷 PBS 洗 1 遍,加入用荧光探针标记的 THP-1 细胞悬液(100 微升/孔);37℃ 与 HUVEC 孵育 30 min,避光,弃去培养液,用 PBS 轻洗 3 遍,以除去未黏附的 THP-1 细胞,显微镜下观察拍照;每孔加入 1% SDS 裂解液 200 μ L,避光裂解 20 min,用酶标仪检测各孔的荧光强度,激发波长为 488 nm,发射波长为 535 nm。

1.6 统计学方法

采用 Graphpad Prism 5 软件进行统计分析,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间比较采用 One way-ANOVA,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 OEA 抑制 LPS 诱导 THP-1 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达

与对照组相比,LPS 诱导 THP-1 细胞 24 h 后,细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达明显增加($P < 0.001$)。40 μ mol/L OEA 和 100 μ mol/L 非诺贝特均显著抑制 LPS 诱导的 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达($P < 0.01$),OEA 和非诺贝特对 MMP-2 的抑制率分别为 47.31%和 52.84%,对 MMP-9 的抑制率分别为 39.43%和 46.14%(图 1)。

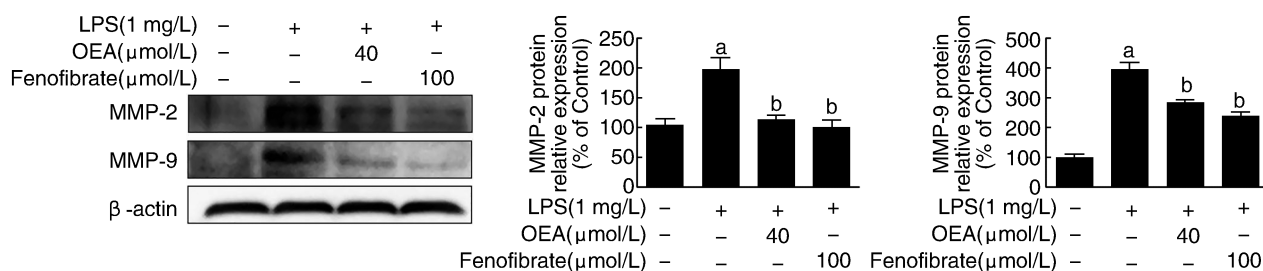


图 1. OEA 抑制 LPS 诱导 THP-1 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达 ($n=3$) MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达量以占对照组的百分率表示。a 为 $P<0.001$, 与对照组相比; b 为 $P<0.01$, 与 LPS 诱导组相比。

Figure 1. OEA inhibits LPS induced expression of MMP-2 and MMP-9 protein in THP-1 cells ($n=3$)

2.2 OEA 抑制 TNF- α 诱导 HUVEC 中 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达

与对照组相比, TNF- α 诱导 HUVEC 24 h 后, 细胞中 VCAM-1 和 ICAM-1 的蛋白表达明显上升 ($P<0.001$)。40 $\mu\text{mol/L}$ OEA 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特

均显著抑制 TNF- α 诱导的 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达 ($P<0.01$), OEA 和非诺贝特对 VCAM-1 的抑制率分别为 37.91% 和 40.89%, 对 ICAM-1 的抑制率分别为 19.62% 和 22.69% (图 2)。

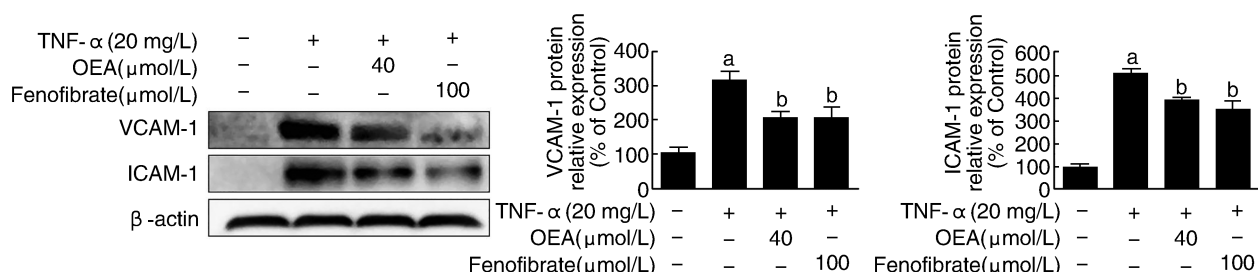


图 2. OEA 抑制 TNF- α 诱导 HUVEC 中 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达 ($n=3$) VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达量以占对照组的百分率表示。a 为 $P<0.001$, 与对照组相比; b 为 $P<0.01$, 与 TNF- α 诱导组相比。

Figure 2. OEA inhibits TNF- α induced expression of VCAM-1 and ICAM-1 protein in HUVECs ($n=3$)

2.3 OEA 抑制 TNF- α 诱导 THP-1 细胞黏附 HUVEC 的作用与 PPAR α 相关

与对照组相比, TNF- α 诱导的 HUVEC 对 THP-1 细胞的黏附显著提高了 40.48% ($P<0.001$)。40 $\mu\text{mol/L}$ OEA 组 THP-1 细胞黏附量相对 TNF- α 诱导组下降了 44.13% ($P<0.001$), 而 PPAR α 阻断剂 MK886 组与 40 $\mu\text{mol/L}$ OEA 组相比, TNF- α 诱导的 HUVEC 对 THP-1 细胞黏附量上升了 36.44% ($P<0.05$), 提示 MK886 逆转了 OEA 抑制 THP-1 细胞黏附的作用 (图 3)。上述实验结果说明 OEA 抑制 THP-1 细胞的黏附作用与 PPAR α 途径相关。

2.4 OEA 抑制 TNF- α 诱导 HUVEC 中 VCAM-1 的表达与 PPAR α 相关

为了进一步观察 OEA 抑制 TNF- α 诱导的 VCAM-1 表达是否与 PPAR α 相关, 我们采用 PPAR α 阻断剂 MK886 与 OEA 共同孵育 TNF- α 诱导的 HUVEC。结果显示, MK886 部分逆转了 OEA

对 VCAM-1 蛋白表达的抑制作用 ($P<0.01$; 图 4), 进一步说明 OEA 通过 PPAR α 途径抑制 TNF- α 诱导的 HUVEC 中黏附因子的表达。

3 讨论

单核、淋巴细胞迁移、渗入到局部损伤血管是 As 炎症反应的早期事件, 此时单核细胞黏附于内皮表面的数量是正常组织的 10~15 倍^[3-4, 10]。在单核细胞与内皮细胞相互作用过程中, 单核细胞通过与内皮细胞直接接触促进黏附分子的分泌, 从而进一步增强二者的黏附和相互作用^[11]。

MMP 是一类对细胞外基质具有降解活性的蛋白酶超家族, 其中 MMP-2 和 MMP-9 与 As 斑块的不稳定性相关^[12]。细胞黏附分子是介导细胞与外基质间或细胞间相互作用的众多分子的统称, 是免疫应答、炎症发生、凝血等一系列重要生理和病理过

程的分子基础。血管内皮损伤后,白细胞特别是单核细胞与内皮细胞的黏附是 As 形成过程中的早期关键事件^[4]。大量实验研究证明,动脉硬化时,ICAM-1、VCAM-1 及其受体表达显著增加。ICAM-1

和 VCAM-1 均可促进单核细胞与血管内皮的黏附,从而参与 As 的发生、发展^[4,13]。因此,抑制 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达有助于延缓 As 的发生、发展过程。

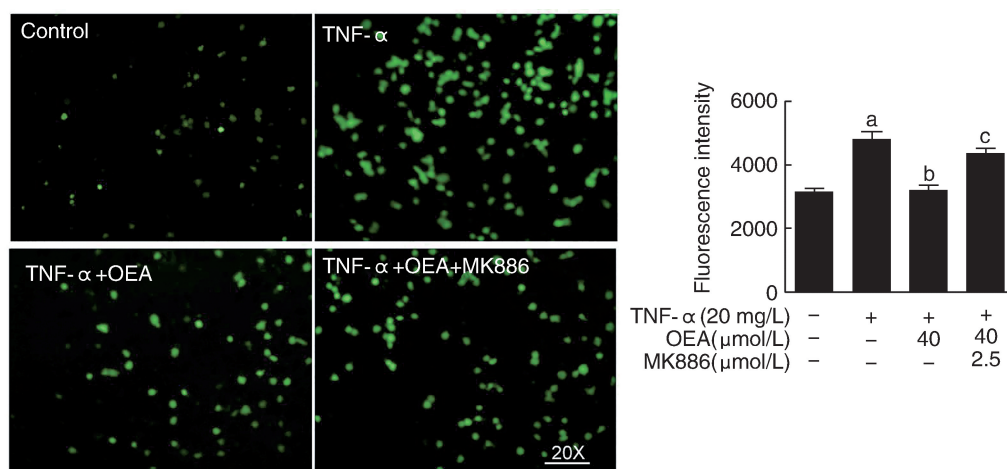


图 3. OEA 抑制 TNF- α 诱导 THP-1 细胞黏附 HUVEC 的作用与 PPAR α 相关 ($n=3$) 显微镜图的放大倍数为 20 倍。a 为 $P<0.001$, 与对照组相比; b 为 $P<0.001$, 与 TNF- α 诱导组相比; c 为 $P<0.01$, 与 TNF- α +OEA 组相比。

Figure 3. Inhibitory effect of OEA on TNF- α induced THP-1 cell adhesion to HUVEC is related to PPAR α ($n=3$)

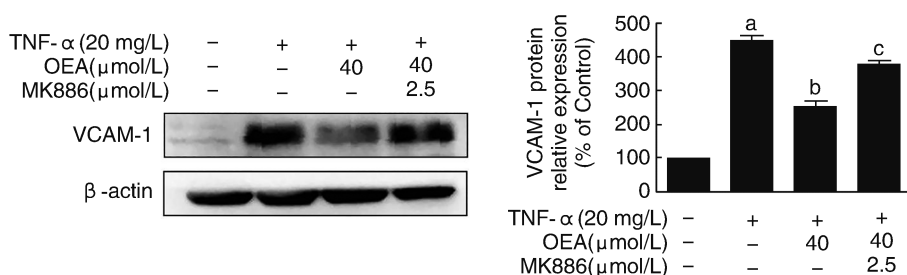


图 4. OEA 抑制 TNF- α 诱导 HUVEC 中 VCAM-1 的表达与 PPAR α 相关 ($n=3$) VCAM-1 蛋白表达量以占对照组的百分率表示。a 为 $P<0.001$, 与对照组相比; b 为 $P<0.001$, 与 TNF- α 诱导组相比; c 为 $P<0.01$, 与 TNF- α +OEA 组相比。

Figure 4. Inhibitory effect of OEA on TNF- α induced VCAM-1 expression in HUVEC is related to PPAR α ($n=3$)

本实验结果显示, 40 $\mu\text{mol/L}$ OEA 显著抑制 LPS 诱导 THP-1 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达及 TNF- α 诱导 HUVEC 中 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达。另外, 我们发现 OEA 对 TNF- α 诱导的单核-内皮细胞黏附具有直接的抑制作用。为探讨 OEA 抑制单核-内皮细胞的黏附是否通过激活 PPAR α 受体, 我们给予 PPAR- α 阻断剂 MK886; 结果表明, MK886 部分逆转了 OEA 抑制单核-内皮细胞黏附的作用。为了进一步观察 OEA 抑制 TNF- α 诱导的 VCAM-1 表达是否与 PPAR α 受体相关, 我们采用 MK886 与 OEA 共同孵育 TNF- α 诱导的 HUVEC, 检

测 VCAM-1 蛋白的表达; 结果表明, MK886 部分逆转了 OEA 对 VCAM-1 蛋白表达的抑制作用。而 VCAM-1 可促进单核细胞与血管内皮的黏附。因此, 我们的结果进一步说明 OEA 抑制 TNF- α 诱导的单核-内皮细胞的黏附作用与 PPAR α 途径相关。以上结果说明 OEA 通过 PPAR α 途径干预单核-内皮细胞的相互作用可能是其发挥抗 As 的机制之一。

综上所述, 本研究证实 OEA 能够抑制单核-内皮细胞的黏附, 其机制可能与 PPAR α 途径相关。我们的结果为 OEA 抗 As 提供了新的实验依据。

[参考文献]

- [1] Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-macrophages and T cells in atherosclerosis[J]. *Immunity*, 2017, 47(5): 621-634.
- [2] Vogel ME, Idelman G, Konaniah ES, et al. Bilirubin prevents atherosclerotic lesion formation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by inhibiting endothelial VCAM-1 and ICAM-1 signaling[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(4): 1-18.
- [3] Santos JCD, Cruz MS, Bortolin RH, et al. Relationship between circulating VCAM-1, ICAM-1, E-selectin and MMP-9 and the extent of coronary lesions[J]. *Clinics*, 2018, 73: e203.
- [4] 李晶, 夏豪, 杨洋, 等. 巨噬细胞在心肌梗死中的双重角色[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2017, 9(6): 758-760.
- [5] Rahman A, Fazal F. Hug tightly and say goodbye: role of endothelial ICAM-1 in leukocyte transmigration[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(4): 823-839.
- [6] Brown BA, Williams H, George SJ. Evidence for the involvement of matrix-degrading metalloproteinases (MMPs) in atherosclerosis[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 147: 197-237.
- [7] Yang LC, Guo H, Zhou H, et al. Chronic oleoylethanolamide treatment improves spatial cognitive deficits through enhancing hippocampal neurogenesis after transient focal cerebral ischemia[J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 94(4): 270-281.
- [8] Xu X, Guo H, Jing Z, et al. N-oleoylethanolamine reduces inflammatory cytokines and adhesion molecules in TNF- α -induced human umbilical vein endothelial cells by activating CB2 and PPAR- α [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2016, 68(4): 280-291.
- [9] Yang L, Guo H, Li Y, et al. Oleoylethanolamide exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced THP-1 cells by enhancing PPAR α signaling and inhibiting the NF- κ B and ERK1/2/AP-1/STAT3 pathways[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34611.
- [10] 张莉峰, 滕军放, 袁学谦, 等. 白藜芦醇通过抑制 TNF- α 表达保护大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(1): 32-36.
- [11] Millar SA, Patel H, Anderson SI, et al. Osteocalcin, vascular calcification, and atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Front Endocrinol*, 2017, 8: 183.
- [12] Dimas GG, Didangelos TP, Grekas DM. Matrix gelatinases in atherosclerosis and diabetic nephropathy: progress and challenges[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, 15(6): 557-565.
- [13] 陈洪娜, 李军, 王福文. 非血脂因素致血管内皮损伤时黏附分子变化的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(3): 341-320.
- (此文编辑 曾学清)