

[文章编号] 1007-3949(2003)11-07-0613-04

·实验研究·

阿魏酸抑制培养人内皮细胞粘附分子的表达

王晓岚, 胡晓慧, 盛茗, 沈飞, 李佩霞, 阮长耿

(苏州大学附属第一医院, 江苏省血液研究所; 江苏省苏州市 215006)

[关键词] 药理学; 阿魏酸抗动脉粥样硬化的分子机制; 流式细胞术; 内皮细胞; 动脉粥样硬化; P-选择素; E-选择素

[摘要] 观察阿魏酸对活化的人脐静脉内皮细胞表达粘附分子的影响,以探讨其抗动脉粥样硬化的部分分子机制。用 10 mg/L 脂多糖刺激培养的人脐静脉内皮细胞 4 h,诱导其表达 E-选择素;用 300 μ mol/L 过氧化氢刺激内皮细胞 2 h,诱导其表达 P-选择素。部分细胞在刺激前 30 min 用 0.21、0.41 或 0.62 mmol/L 阿魏酸预处理。用流式细胞术检测内皮细胞粘附分子表达水平,用逆转录聚合酶链反应检测内皮细胞 E-选择素 mRNA 表达水平。结果发现,阿魏酸抑制内皮细胞 E-选择素及 P-选择素表达,同时抑制 E-选择素 mRNA 表达。提示阿魏酸抗动脉粥样硬化作用可能与其抑制内皮细胞粘附分子表达有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Inhibitive Effects of Ferulic Acid on Adhesion Molecules Expression on Cultured Human Endothelial Cells

WANG Xiao-Lan, HU Xiao-Hui, SHENG Ming, SHEN Fei, LI Pei-Xia, and RUAN Chang-Geng

(Jiangsu Institute of Hematology, First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

[KEY WORDS] Endothelial Cell; Atherosclerosis; P-selectin; E-selectin; Ferulic Acid; Flow Cytometry

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of ferulic acid (FA) on the expression of adhesion molecules on activated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and to elucidate the molecular mechanisms of its anti-atherosclerosis effect.

Methods Cultured HUVEC were treated with FA (0.21, 0.41 and 0.62 mmol/L respectively) and stimulated with 10 mg/L lipopolysaccharide (LPS) 30 min later. Expression of E-selectin was detected by flow cytometry (FCM) after 4 h. Expression of E-selectin mRNA was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Cultured HUVEC were treated with FA (0.21, 0.41 and 0.62 mmol/L respectively) and stimulated with H_2O_2 (300 μ mol/L) 30 min later. After 2 h, expression of P-selectin on HUVEC surface was detected by FCM.

Results FA could inhibit E-selectin and P-selectin expression on activated HUVEC. It could also suppress the expression of E-selectin mRNA in activated HUVEC. **Conclusions** The inhibitive effects of ferulic acid on the expression of adhesion molecules on activated HUVEC may probably contribute to its anti-atherosclerosis effects.

粘附分子介导的单核细胞与内皮细胞粘附、跨内皮迁移及内膜血管新生在动脉粥样硬化的发生发展过程中起重要作用。活性氧修饰低密度脂蛋白产生过氧化脂质,氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)或轻度修饰的低密度脂蛋白(minimally modified low density lipoprotein, mm-LDL)能诱导血管内皮细胞表达 P-选择素(P-selectin)、血管细胞粘附分子 1(vascular cellular adhesion molecule-1, VCAM-1)、细胞间粘附分子 1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白 1

(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)^[1-4],从而促进单核细胞与动脉内膜的粘附、迁移并吞噬脂质成为泡沫细胞。随着病变发展,增厚的内膜深处缺氧而诱导血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达^[5],斑块中的巨噬细胞释放金属基质蛋白酶降解细胞外基质,从而诱导血管新生;新生的血管内皮有 E-选择素、VCAM-1 和 ICAM-1 的表达^[6],介导单核-巨噬细胞进一步向病变部位迁移,使病灶中炎细胞浸润增加,加重动脉粥样硬化病变。已有研究发现,阿魏酸能够降低胆固醇,抗脂质过氧化,抗血小板聚集及血栓形成,抑制动脉平滑肌细胞增殖,拮抗内皮素,从而具有抗动脉粥样硬化作用^[7-12],但阿魏酸对内皮细胞粘附分子表达的影响尚未见报道。本实验对此进行了观察,试图阐述阿魏酸抗动脉粥样硬化的新的分子机制。

[收稿日期] 2002-12-10

[修回日期] 2003-11-05

[作者简介] 王晓岚,女,1962 年出生,助理研究员,研究方向为血栓与止血;E-mail: wangxl@sytu.edu.cn。胡晓慧,女,1976 年出生,在读博士研究生,研究方向为血栓与止血。阮长耿,男,1939 年出生,教授,博士研究生导师,研究方向为血栓与止血;为本文通讯作者,电话和传真:86-510-6510-1708, E-mail: smckhmb@public1.sz.js.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

阿魏酸为上海试剂一厂产品,川芎嗪为无锡第七制药厂产品,阿司匹林为 Sigma 公司产品,脂多糖为 Calbiochem 公司产品。E-选择素单克隆抗体由美国 Oklahoma 大学 Health Sciences 中心惠赠,荧光素标记的第二抗体为 Immunotech 公司产品,P-选择素单克隆抗体(荧光素标记)苏州-51(SZ-51)由本研究室研制。Trizol 试剂为 Gibco BRL 公司产品,寡核苷酸引物、四种脱氧核苷酸、Taq 脱氧核糖核酸聚合酶及引物为上海生物工程公司产品,鼠白血病毒逆转录酶为 Promega 公司产品,核糖核酸酶抑制剂为华美公司产品。

1.2 人脐静脉内皮细胞培养及鉴定

无菌取新生儿脐带,以 0.1% 胶原酶消化,收集细胞,以含 20% 新生牛血清的 1640 培养基(Gibco 公司产品)常规培养 4~7 d 至融合,以 20% 人血清代替 20% 牛血清培养第 2 代内皮细胞至融合用于实验。用抗人血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)抗体(SZ-29,本研究室研制)对细胞进行荧光染色,以鉴定血管内皮细胞。

1.3 流式细胞术

内皮细胞分别以阿魏酸(终浓度分别为 0.41 或 0.62 mmol/L,经细胞毒实验该浓度对内皮细胞无明显毒性)、川芎嗪(终浓度为 3.68 mmol/L,经细胞毒实验确定)、阿司匹林(终浓度为 4 mmol/L,经细胞毒实验及参考文献[13]确定,用作阳性对照药)预处理,30 min 后加入脂多糖(终浓度 10 mg/L),继续培养 4 h(药物保留在培养基中)。以 0.125% 胰蛋白酶和 0.02% 乙二胺四乙酸(ethylene diamine-tetraacetic acid, EDTA)消化为单细胞悬液,洗涤,离心,弃上清,加入 E-选择素单克隆抗体(终浓度 10 mg/L),4℃ 放置 30 min。以含 0.5% 牛血清白蛋白平衡盐溶液洗涤,加入荧光素标记的羊抗鼠抗体(1:100 稀释),4℃ 避光孵育 30 min,洗涤同前,重悬细胞。流式细胞仪(Coulter 公司产品)测 E-选择素表达阳性细胞百分数和平均荧光强度,每个标本读取 5 000 个细胞。共重复 4 次实验。

分别用 0.21、0.41 及 0.62 mmol/L 阿魏酸预处理内皮细胞,30 min 后以过氧化氢(H_2O_2 , 终浓度 300 μ mol/L)刺激 2 h(药物保留在培养基中)。以 0.02% EDTA 消化后吹打成单细胞悬液,1% 多聚甲醛 100 μ L 室温固定 10 min,洗涤后加入荧光素标记的 SZ-51 40 μ L,4℃ 放置 30 min(避光)。洗涤后重悬细胞,

用流式细胞仪测 P-选择素表达。共重复 5 次实验。

每次实验使用同一脐带来源的融合的第 2 代内皮细胞,以保证除处理不同外其它实验条件相对一致。每次均设单纯脂多糖或过氧化氢刺激的内皮细胞作为空白对照组(因脂多糖能有效上调人 E-选择素表达,却不能诱导人 P-选择素表达,而过氧化氢则能诱导 P-选择素表达)。

1.4 逆转录聚合酶链反应

融合的第 2 代内皮细胞分别以阿魏酸、川芎嗪及阿司匹林预处理,方法同前。30 min 后以脂多糖(10 mg/L)刺激 4 h(单纯脂多糖刺激为对照组)。以 Trizol 试剂提取内皮细胞总核糖核酸,紫外分光光度计测核糖核酸样本 $A_{260\text{ nm}}$ 及 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ [A:吸光度(absorbance)]。2 μ g 总 RNA 以鼠白血病毒逆转录酶在 25 μ L 反应体系 37℃ 反应 1 h,逆转录 mRNA 为 cDNA。取逆转录产物 2 μ L 加入聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)体系,以 Taq DNA 聚合酶在 50 μ L 反应体系中进行聚合酶链反应。E-选择素 cDNA 上游引物为 5'-CTCTGACAGAAGAAGCCAAG-3',下游引物为 5'-ACTTCAGTCCACTGAAGCCA-3',可扩增 255 bp 的 cDNA 片断(382~636 碱基间序列,跨越外显子 3 和 4)。以 β_2 -微球蛋白为内参照(330 bp)。聚合酶链反应:94℃ 变性 1 min→55℃ 退火 40 s→72℃ 延伸 40 s,共 30 个循环。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,条带经光密度扫描,E-选择素与 β_2 -微球蛋白 cDNA 的比值表示 E-选择素 mRNA 的表达水平。同一次实验使用同一脐带来源细胞,共取 3 批细胞进行重复实验。

1.5 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, n 代表实验次数。荧光阳性细胞百分比经平方根反正弦变换,平均荧光强度经对数变换,采用配伍组方差分析及 q 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 阿魏酸等药物对 E-选择素表达的影响

0.41 和 0.62 mmol/L 阿魏酸、3.68 mmol/L 川芎嗪、4 mmol/L 阿司匹林对脂多糖(10 mg/L)诱导的内皮细胞 E-选择素表达均有抑制作用(表 1, Table 1)。

2.2 阿魏酸对 P-选择素表达的影响

0.21、0.41 和 0.62 mmol/L 阿魏酸对过氧化氢诱导的内皮细胞 P-选择素表达均有抑制作用(表 2, Table 2)。

表 1. 阿魏酸对脂多糖活化内皮细胞 E-选择素表达的影响

Table 1. Effects of ferulic acid on E-selectin expression in HUVEC activated by lipopolysaccharide ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

分 组	百分比	荧光强度
对照组	65.39% \pm 7.76%	1.09 \pm 0.08
阿魏酸 (0.41 mmol/L)	57.24% \pm 10.27% ^a	0.97 \pm 0.19 ^a
阿魏酸 (0.62 mmol/L)	56.54% \pm 5.72% ^a	0.94 \pm 0.13 ^b
川芎嗪 (3.68 mmol/L)	56.95% \pm 4.71% ^a	0.98 \pm 0.13 ^a
阿司匹林 (4 mmol/L)	54.31% \pm 9.61% ^a	0.89 \pm 0.16 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 2. 阿魏酸对过氧化氢活化内皮细胞 P-选择素表达的影响

Table 2. Effects of ferulic acid on P-selectin expression on HUVEC activated by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

分 组	百分比	荧光强度
对照组	41.83% \pm 7.48%	0.99 \pm 0.21
阿魏酸 (0.21 mmol/L)	34.71% \pm 8.24%	0.78 \pm 0.21 ^a
阿魏酸 (0.41 mmol/L)	33.07% \pm 4.84%	0.75 \pm 0.21 ^a
阿魏酸 (0.62 mmol/L)	33.06% \pm 10.51%	0.73 \pm 0.23 ^a

a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.3 阿魏酸等药物对 E-选择素信使核糖核酸表达的影响

逆转录聚合酶链反应产物经琼脂糖凝胶电泳,待测的 E-选择素及内部参照物 β_2 -微球蛋白均在预期位置显现特异性的条带(图 1, Figure 1)。经相对定量及统计学分析,显示 0.41 及 0.62 mmol/L 阿魏酸、3.68 mmol/L 川芎嗪及 4 mmol/L 阿司匹林均能抑制脂多糖诱导的 E-选择素信使核糖核酸表达上调,0.21 mmol/L 阿魏酸的抑制作用无统计学意义(表 3, Table 3)。

表 3. 阿魏酸对脂多糖活化的内皮细胞 E-选择素信使核糖核酸表达的影响

Table 3. Effects of ferulic acid on E-selectin mRNA expression in HUVEC activated by lipopolysaccharide ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	吸光度值
对照组	0.818 \pm 0.076
阿魏酸 (0.21 mmol/L)	0.705 \pm 0.106
阿魏酸 (0.41 mmol/L)	0.452 \pm 0.080 ^b
阿魏酸 (0.62 mmol/L)	0.411 \pm 0.111 ^b
川芎嗪 (3.68 mmol/L)	0.471 \pm 0.099 ^b
阿司匹林 (4 mmol/L)	0.381 \pm 0.117 ^b

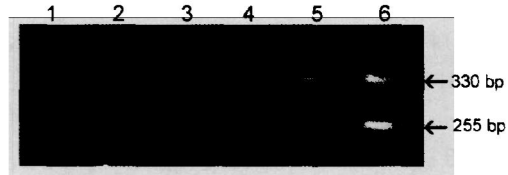
b: $P < 0.01$, 与对照组比较。图 1. 阿魏酸对内皮细胞 E-选择素信使核糖核酸表达的影响
泳道 1: 4 mmol/L 阿司匹林; 泳道 2: 0.62 mmol/L 阿魏酸; 泳道 3: 0.41 mmol/L 阿魏酸; 泳道 4: 0.21 mmol/L 阿魏酸; 泳道 5: 3.68 mmol/L 川芎嗪; 泳道 6: 10 mg/L 脂多糖。

Figure 1. Effect of ferulic acid on E-selectin mRNA expression in HUVEC detected by RT-PCR

3 讨论

E-选择素及 VCAM-1 在静止的内皮细胞很少表达,脂多糖刺激血管内皮细胞可诱导肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1 等细胞因子的产生,这两种细胞因子通过各自的信号转导途径活化核因子 κB ,活性氧也参与活化过程^[14],促进炎症相关粘附分子(如 E-选择素、VCAM-1 及 ICAM-1)的基因转录和蛋白质合成(但对 P-选择素无这种调节作用),介导单核细胞的粘附及跨内皮迁移^[13,15,16]。肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1 还可直接损伤内皮细胞,抑制血栓调节素的合成,促进血小板活化因子产生,有利于凝血和血栓形成;损伤的内皮通透性升高,血中胆固醇易穿透内膜而在血管壁沉积,白细胞介素 1 还可增高血甘油三酯水平。血小板活化因子除促血栓形成作用外,也可促进血管平滑肌细胞增殖^[17],还可活化白细胞粘附分子 CD (cluster of differentiation) 11/CD18,通过与内皮细胞上的受体 ICAM-1、ICAM-2 结合介导白细胞与内皮的粘附。上述各环节均可促进动脉粥样硬化的发生发展。

活性氧(如 H_2O_2)可诱导内皮细胞 P-选择素从胞内韦一帕(Weibel-Palade, W-P)小体膜上迁移至胞膜表面(但无转录水平的上调和新蛋白质的合成)^[18],P-选择素与单核细胞或粒细胞膜上的配体结合,介导单核细胞或粒细胞沿内皮的滚动和初期粘附,为牢固粘附和跨内皮迁移打下基础。

E-选择素不仅参与动脉粥样硬化的形成,也参与病变进展过程中的血管新生。体外实验显示,阻止 E-选择素与其配体结合,会抑制内皮细胞的增殖和管型生长^[6,19,20]。新生血管的管壁发育不成熟而易破裂,导致斑块内出血和血栓形成,从而引发不稳定型心绞痛、脑缺血短暂发作甚至发生心肌梗死或脑梗死^[21]。

我们在实验中发现,0.62 mmol/L 阿魏酸对脂多糖(10 mg/L)刺激内皮细胞 4 h 诱导的 E-选择素表达有抑制作用(在转录及翻译水平),抑制程度与阳性对照药 4 mmol/L 阿司匹林相当^[15];0.41 mmol/L 阿魏酸及 3.68 mmol/L 川芎嗪也有抑制作用。据报道,川芎嗪对鼠内皮细胞 ICAM-1 有抑制作用^[22],我们在此尝试它是否对人内皮细胞 E-选择素表达有影响。阿魏酸 0.21、0.41 及 0.62 mmol/L 对过氧化氢(300 μ mol/L)刺激内皮细胞 2 h 诱导的 P-选择素表达有抑制作用。0.62 mmol/L 阿魏酸对 VCAM-1 的表达也有轻度抑制作用(数据未显示),但阿魏酸对 ICAM-1 的表达无抑制作用(数据未显示)。推测阿魏酸对内皮细胞粘附分子的抑制与其抗氧化作用有关^[23]。由于 P-选择素及 E-选择素参与动脉粥样硬化的形成和发展,因此初步认为阿魏酸对内皮细胞选择素家族成员的抑制是其抗动脉粥样硬化作用的部分分子机制。

[参考文献]

- [1] 夏春枝,邓仲端. 脂质过氧化诱导培养的内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1a 和血管细胞粘附分子 1. 中国动脉硬化杂志,2000,8 (3): 202-205
- [2] 张新超,徐成斌,张彤. 氧化型低密度脂蛋白和普伐他汀对人脐静脉内皮细胞细胞间粘附分子 1 表达的影响. 中国动脉硬化杂志,2000,8 (3): 229-232
- [3] Lehr HA, Olofsson AM, Carew TE, Vajkoczy P, von Andrian UH, Hübner C, et al. P-selectin mediates the interaction of circulation leukocytes with platelets and microvascular endothelium in response to oxidized lipoprotein in vivo. *Lab Invest*, 1994, 71 (3): 380-386
- [4] Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein-1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87 (13): 5 134-138
- [5] Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D, et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*, 1996, 87 (8): 3 336-343
- [6] O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*, 1996, 93 (3): 672-682
- [7] Sharma RD. Effect of hydroxy acid on hypercholesterolaemia in rats. *Atherosclerosis*, 1980, 37 (3): 463-468
- [8] 吴东方,张洪,周本宏,蔡鸿生. 阿魏酸钠抗肝脂质过氧化作用机制探讨. 中国中药杂志,1996,21 (5): 297-299
- [9] 徐理纳,欧阳蓉,王建平. 几种活血化淤药和乙酰水杨酸对大鼠动脉壁前列素样物质的生成和血小板聚集性的影响. 中西医结合杂志,1981,1 (1): 36-38
- [10] 徐理纳,欧阳蓉. 阿魏酸抗血栓作用. 中国药理学报,1981,2 (1): 35-37
- [11] 喻红,洪嘉玲,吴东方. 阿魏酸钠对氧化 LDL 所致兔主动脉平滑肌细胞增殖的影响. 中国中药杂志,1999,24 (6): 365-366
- [12] 王峰,季小慎,刘敏,王京媛,李菲,杨连春,等. 咖啡酸和阿魏酸及其类似物对内皮素 1 生物效应的拮抗作用. 中国医院药学杂志,1999,19 (5): 261-263
- [13] Weber C, Erl W, Pietsch A, Weber PC. Aspirin inhibits nuclear factor- κ B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation*, 1995, 91 (7): 1 914-917
- [14] 吴曙光,张洪泉,魏伟. 抗炎免疫药理学进展. 上海:第二军医大学出版社,2001;27-31
- [15] Kapiotis S, Sengenel G, Sperr WR, Baghestanian M, Quehenberger P, Bevec D, et al. Ibuprofen inhibits P-selectin-dependent expression of VCAM-1 and ICAM-1 on human endothelial cells. *Life Sci*, 1996, 58 (23): 2 167-181
- [16] Yao L, Setiadi H, Xia L, Laskik Z, Taylor FB, McEver RP. Divergent inducible expression of P-selectin and E-selectin in mice and primates. *Blood*, 1999, 94 (11): 3 820-828
- [17] 关怀敏,王显,韩跃刚. 炎症与冠心病. 上海:上海中医药大学出版社,1999;328-339
- [18] Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McEver RP, McIntyre TM. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol*, 1991, 112 (4): 749-759
- [19] Kach AE, Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Pulverini PJ. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature*, 1995, 376 (6450): 517-519
- [20] Nguyen M, Folkman J, Bischoff J. 1-Deoxymannojirimycin inhibits capillary tube formation in vitro. *J Biol Chem*, 1992, 267 (36): 26 157-165
- [21] Tenaglia AN, Peters KG, Sketch MH, Annex BH. Neovascularization in atherectomy specimens from patients with unstable angina: implications for pathogenesis of unstable angina. *Am Heart J*, 1998, 135 (1): 10-14
- [22] 张岚,宋欣,李向红. 缺氧/再给氧刺激培养的脑微血管内皮细胞表达细胞间粘附分子 1. 中国应用生理学杂志,1998,14 (1): 14-16
- [23] 陆怡,许彩民,杨洋,潘华珍. 阿魏酸钠对氧化诱导人淋巴细胞凋亡的抑制作用. 中国医学科学院学报,1998,20 (1): 44-48 (此文编辑 曾学清)

·资料·

《中国动脉硬化杂志》创刊 10 周年统计数据(之二)

中国科技论文统计源期刊质量指标

年份	统计源 期刊数	平均影 响因子	我刊影 响因子	排序	平均总 被引频次	总被引 频次	排序	地区 分布数	基金 论文比
1997	1214		0.276	不详		66	不详		
1998	1286		0.112	743		45	不详		
1999	1365		0.387	178		106	800+		
2000	1411	0.240	0.275	415	192.2	102	746	21	0.35
2001	1447	0.264	0.262	525	227	137	685	21	0.31
2002	1534	0.294	0.348	445	278	192	673	22	0.41