

[文章编号] 1007-3949 (2011) 19-03-0187-05

• 实验研究 •

## 黄芪水提取物对 TNF- $\alpha$ 诱导的小鼠动脉 内皮细胞 VCAM-1 表达的影响

游 洋<sup>1,2</sup>, 段 岩<sup>2</sup>, 张效林<sup>2</sup>, 康 建<sup>2</sup>, 闫承慧<sup>2</sup>, 张秀莉<sup>3</sup>, 丰加涛<sup>3</sup>, 韩雅玲<sup>2</sup>

(1. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁省沈阳市 110032; 2. 沈阳军区总医院心研所, 辽宁省沈阳市 110840; 3. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁省大连市 116023)

[关键词] 黄芪水提取物; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 核因子  $\kappa$ B; 血管细胞黏附分子 1

[摘要] 目的 探讨黄芪水提取物对肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 诱导的小鼠动脉内皮细胞 VCAM-1 表达的影响及机制。方法 建立体外 THP-1 细胞与小鼠动脉内皮细胞黏附实验体系, 在施加 TNF- $\alpha$  刺激之前, 采用不同浓度黄芪水提取物及不同预先黄芪水提取物孵育时间进行分组干预, 并检测 THP-1 细胞对小鼠动脉内皮细胞的黏附率; ELISA 检测细胞培养上清液中 VCAM-1 表达的变化。Western blot 检测 VCAM-1 表达的变化及核转录因子 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的核转运。结果 TNF- $\alpha$  刺激下, 小鼠动脉内皮细胞 VCAM-1 和 NF- $\kappa$ B 的表达水平显著升高, 而经黄芪水提取物预处理后, 可具有抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 VCAM-1 表达及 NF- $\kappa$ B p65 蛋白核转移的作用, 并表现一定剂量依赖性及时效依赖性, 其中 120 mg/L 的黄芪水提取物预孵 4~8 h 可明显减少单核细胞对内皮细胞的黏附率, VCAM-1 表达明显下调 ( $P < 0.05$ ), NF- $\kappa$ B 表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。结论 黄芪水提取物可拮抗 TNF- $\alpha$  诱发的内皮细胞 VCAM-1 的表达, 降低单核细胞的黏附能力, 从而减轻血管内皮细胞损伤, 其机制可能通过抑制转录因子 NF- $\kappa$ B 的活化有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effects of Astragali Radix Extract on the Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression of Mice Vascular Endothelial Cell Induced by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

YOU Yang<sup>1,2</sup>, DUAN Yan<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-Lin<sup>2</sup>, KANG Jian<sup>2</sup>, YAN Cheng-Hui<sup>2</sup>, ZHANG Xiu-Li<sup>3</sup>, FENG Jia-Tao<sup>3</sup>, and HAN Ya-Ling<sup>2</sup>

(1. The Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM Shenyang, Liaoning 110032, China, 2. Cardiovascular Research Institute, General Hospital of Shenyang Military Region Shenyang, Liaoning 110840, China, 3. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences Dalian, Liaoning 116023, China)

[KEY WORDS] Astragali Radix Extract; Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; Nuclear Factor- $\kappa$ B; Vascular Cell Adhesion Molecule-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effect of Astragali radix extract on vascular cell adhesion molecule-1 expression of mice vascular endothelial cell against tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). **Methods** Adhesion model was established by THP-1 cells and mice endothelial cell in vitro. The cells were pretreated by different dose and different time of Astragali radix extract before induced by TNF- $\alpha$ , and the adhesion rate were detected. The levels of vascular endothelial cell adhesion molecule VCAM-1 in the cell culture were determined with ELISA. The expression of VCAM-1 and NF- $\kappa$ B subunit (p65) were evaluated by Western blot. **Results** The expression of VCAM-1 and NF- $\kappa$ B was increased obviously after induced by TNF- $\alpha$ ; While the expression of VCAM-1 and the effect of NF- $\kappa$ B p65 protein nuclear translocation induced by TNF- $\alpha$  were inhibited after pretreatment of Astragali radix extract in a dose- and time-dependent manner. The reduction of adhesion of monocytes to endothelial cells, the down-regulation of the expression of VCAM-1 and reduc-

[收稿日期] 2011-3-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30770793, 30971218, 81070097) 和辽宁省自然科学基金项目 (20092088) 资助

[作者简介] 游洋, 博士研究生, 研究方向为心血管疾病的基础与临床, E-mail 为 petergemma@163.com。段岩, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病的基础与临床, E-mail 为 dy0113@sina.com。通讯作者韩雅玲, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的基础、临床及介入治疗, E-mail 为 hanyl@126.com。

tion of the expression of NF- $\kappa$ B were apparent ( $P < 0.05$ ) at the concentration of 120 mg/L preincubated 4 ~ 8 h.

**Conclusion** Astragali radix extract can inhibit the TNF- $\alpha$ -induced expression of VCAM-1 and reduce the adhesion of monocytes, by which the damage to vascular endothelial cells was relieved. The mechanism may be related to the role of inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种多因素引起的, 以高度特异性的细胞分子反应为特征的慢性炎症过程<sup>[1]</sup>, 炎症细胞与血管内皮细胞的黏附是 As 重要的始动环节之一。血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 是存在于内皮细胞表面的重要的黏附分子, 可促进白细胞向内皮细胞的黏附, 是 As 发生的始动环节。而炎症因子如 TNF- $\alpha$  被认为在诱导血管内皮细胞表达黏附分子, 促进白细胞向内皮细胞滚动、黏附及内皮下移行等, 参与炎症反应及 As 的病理过程<sup>[2]</sup>。黄芪是传统中药, 对多种疾病尤其是心血管疾病有很高的应用价值, 日趋成为中西医结合防治 As 研究的热点<sup>[3]</sup>。但其防治 As 发生的分子机制仍待阐明。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品与试剂

肿瘤坏死因子  $\alpha$  (Sigma 公司); 山羊抗小鼠 VCAM-1 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司); DMEM、新生小牛血清、胰酶 (Gibco 公司); VCAM-1 ELISA 检测试剂盒 (R&D 公司); 山羊抗小鼠 NF- $\kappa$ B p65 抗体及辣根过氧化物标记的兔抗山羊 IgG (Santa Cruz 公司); 黄芪水提取物由中国科学院大连化学物理研究所辽宁省天然药物重点实验室提供。

### 1.2 小鼠动脉内皮细胞培养

小鼠动脉内皮细胞购于美国 ATCC 公司。培养基含 20% 小牛血清, 50 mg/L FCS, 100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素。每 3 天换液 1 次, 细胞呈铺路石状, 4 ~ 5 天细胞生长汇合后, 用 0.25% 胰酶消化传代, 按  $1 \times 10^9$  个/L 密度接种于 6 孔板、24 孔板中; 2 ~ 3 天后待每孔约 80% 细胞铺满后, 换用不含 FCS 的培养液, 48 h 后用于实验。

### 1.3 分组

体外培养的小鼠动脉内皮细胞随机分成 5 组: 空白对照组 (正常培养); TNF- $\alpha$  组; 黄芪水提取物低浓度组 (30 mg/L); 黄芪水提取物中浓度组 (60 mg/L); 黄芪水提取物高浓度组 (120 mg/L)。所有黄芪水提取物各组在培养孔中分别将黄芪水提取物预先孵育 1、2、4、6 和 8 h 后再加入 TNF- $\alpha$  (10  $\mu$ g/L) 共同培养 4 h, 然后用于检测; 对照组、TNF- $\alpha$

组取相同时间段一起检测。

### 1.4 THP-1 细胞与小鼠动脉内皮细胞的黏附实验

以体外培养的小鼠动脉内皮细胞为黏附对象。加入 THP-1 细胞 (购于中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所细胞中心) 而建立黏附实验体系, 在 24 孔板上生长至致密融合的单层血管内皮细胞后, 按实验分组不同而施加不同的干预因素。用 10% FCS-DMEM 液洗涤后做黏附实验: 在相应孔中加入 THP-1 细胞, 浓度  $2 \times 10^9$  个/L, 0.5 mL/孔。将培养板置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 60 min 后, 加入含 0.1 mol/L EDTA 的 DMEM 液洗涤 2 次, 收集各孔上清液及洗涤液, 混合后计数细胞, 计算出黏附百分率。黏附百分率 = (1 - 未黏附细胞数/加入细胞总数), 每一标本设 10 个复孔。

### 1.5 培养液中内皮细胞黏附分子 1 的测定

用 ELISA 检测培养液中 VCAM-1 浓度。细胞接种于 24 孔板中, 当培养至亚融合状态, 换 DMEM + 0.1% FCS 培养液, 孵育 24 h 使细胞静息。按分组情况加入干预因素。各时间点收集培养液上清液, -20℃ 保存。根据 ELISA 的原理: 酶标记的抗原或抗体与待测样品结合形成抗原抗体复合物, 酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性, 又保留酶的活性, 加入酶反应的底物后, 底物被酶催化成为有色产物, 产物的量与标本中受检物质的量直接相关, 故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。本研究采用 VCAM-1 的 ELISA 试剂盒按说明书操作, 检测上清液中 VCAM-1 浓度。

### 1.6 Western blot 检测小鼠动脉内皮细胞内皮细胞黏附分子 1 及核因子 $\kappa$ B 含量变化

细胞接种于培养板中, 当培养至亚融合状态, 换 0.1% FCS-DMEM 培养液, 孵育 24 h 使细胞静息。按分组情况加入干预因素。各时间点收集细胞, 采用 Western blot 方法进行蛋白定量。蛋白样品 SDS-PAGE (上样量 25  $\mu$ L) 后, 行半干式电转移到 NC 膜上, 再依此将 NC 膜进行封闭, 1:1 000 山羊抗小鼠 VCAM-1 或 NF- $\kappa$ B 一抗孵育, 1:2 000 兔抗山羊辣根过氧化物标记的二抗孵育及 ECL 显色。

### 1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间计量资料的比较采用方差分析, 组间比较

用 LSD 法,  $P < 0.05$  认为差异具有显著性。

2 结 果

2.1 黄芪水提取物对 THP-1 细胞与小鼠动脉内皮细胞黏附的影响

TNF- $\alpha$  刺激可使 THP-1 细胞与小鼠动脉内皮细胞黏附率显著增加。而黄芪水提取物则显著抑制 TNF- $\alpha$  刺激的 THP-1 细胞与小鼠动脉内皮细胞黏附率, 这种抑制作用呈现明显的剂量依赖效应。在 TNF- $\alpha$  刺激下, 60 mg/L、120 mg/L 黄芪水提取物可明显减少白细胞对内皮细胞的黏附率 ( $P < 0.05$ ; 表 1 和图 1)。

表 1. 黄芪水提取物对 TNF- $\alpha$  刺激后 THP-1 细胞与小鼠动脉内皮细胞黏附率

Table 1. Adhesion rate of THP-1 cells and mice endothelial cell by Astragali radix extract induced by TNF- $\alpha$

分 组	<i>n</i>	黏附率 ( $\bar{x} \pm s$ )
空白对照组	10	22.5% $\pm$ 6.6%
TNF- $\alpha$ 组	10	36.7% $\pm$ 10.6%
TNF- $\alpha$ + 30 mg/L 黄芪水提取物组	10	32.6% $\pm$ 9.2%
TNF- $\alpha$ + 60 mg/L 黄芪水提取物组	10	26.1% $\pm$ 6.9% <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ + 120 mg/L 黄芪水提取物组	10	23.8% $\pm$ 10.0% <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与 TNF- $\alpha$  组比较。

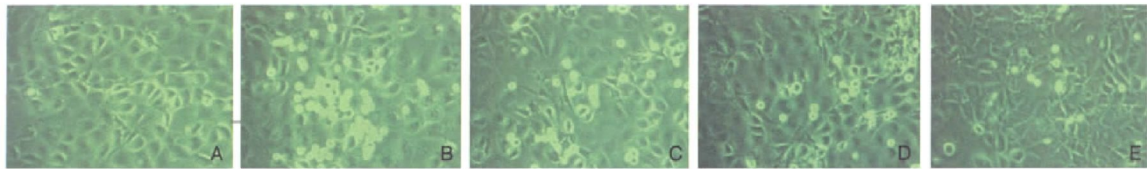


图 1. 不同黄芪水提取物干预下 THP-1 细胞与小鼠动脉内皮细胞黏附实验 ( $\times 100$ ) A 为空白对照组, B 为 TNF- $\alpha$  组, C ~ E 组分别为 TNF- $\alpha$  + 30 mg/L、60 mg/L 和 120 mg/L 黄芪水提取物浓度组。

Figure 1. Adhesion experiment of THP-1 cells and mice endothelial cell pretreated by different dose of Astragali radix extract ( $\times 100$ )

2.2 黄芪水提取物对抗 TNF- $\alpha$  诱导小鼠动脉内皮细胞培养液中 VCAM-1 的表达

TNF- $\alpha$  刺激下, 小鼠动脉内皮细胞培养液中 VCAM-1 的表达水平显著升高, 在黄芪水提取物不同浓度及不同孵育时间的干预作用下, 可明显降低

培养液中 TNF- $\alpha$  诱导的 VCAM-1 表达量。在 TNF- $\alpha$  刺激下, 120 mg/L 浓度黄芪水提取物预先孵育 4 ~ 8 h, 可明显降低小鼠动脉内皮细胞培养上清液中 VCAM-1 表达量 ( $P < 0.05$ ; 图 2)。

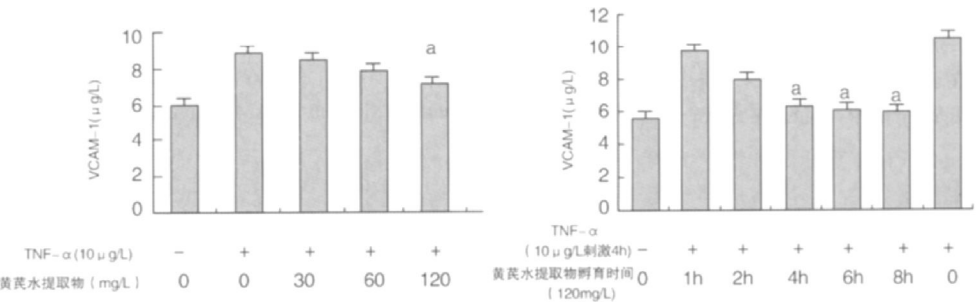


图 2. 不同黄芪水提取物浓度及不同孵育时间对 TNF- $\alpha$  诱导小鼠动脉内皮细胞培养液中血管细胞黏附分子 1 的影响 ( $n = 3$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与 TNF- $\alpha$  组比较。

Figure 2. The effect of vascular endothelial cell adhesion molecule VCAM-1 in the cell culture pretreated by different dose and time of Astragali radix extract induced by TNF- $\alpha$

### 2.3 黄芪水提取物对抗 TNF- $\alpha$ 诱导小鼠动脉内皮细胞 VCAM-1 和核因子 $\kappa$ B 的表达增加

TNF- $\alpha$  刺激下,小鼠动脉内皮细胞中 VCAM-1 的表达水平显著升高。而黄芪水提取物干预可明显抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 VCAM-1 表达,并且这种抑制呈现明显的时间和剂量依赖效应。其中,120 mg/L 浓度黄芪水提取物预先孵育 4~8 h 可明显减少 TNF-

$\alpha$  刺激的内皮细胞 VCAM-1 的表达 ( $P < 0.05$ ; 图 3A, 图 3B)。进一步利用 Western blot 检测黄芪水提取物对内皮细胞中 VCAM-1 表达的抑制作用是否与其对核转录因子 NF- $\kappa$ B 的调控相关,与 TNF- $\alpha$  组比较,黄芪水提取物显著抑制了 TNF- $\alpha$  刺激的内皮细胞中 NF- $\kappa$ B 的表达 ( $P < 0.05$ ; 图 3C)。

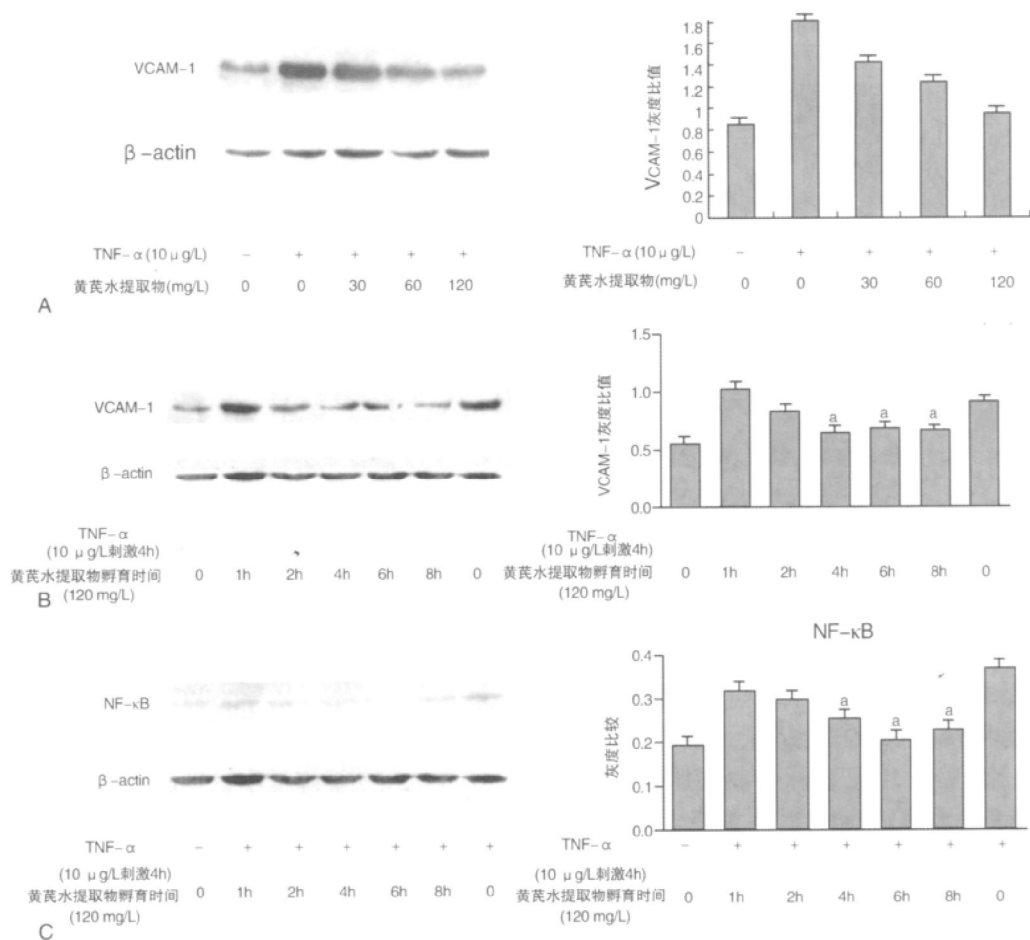


图 3. TNF- $\alpha$  诱导小鼠动脉内皮细胞 VCAM-1 表达及 NF- $\kappa$ B 的含量变化 ( $n = 3$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与 TNF- $\alpha$  组比较。

Figure 3. The expression of VCAM-1 and NF- $\kappa$ B of mice vascular endothelial cell VCAM-1 induced by TNF- $\alpha$

### 3 讨论

As 被认为是一种进行性免疫炎症反应,炎症因子通过刺激血液中的单核细胞与内皮细胞发生黏附,继而穿越动脉内皮细胞层进入内膜。内皮功能紊乱被认为是冠心病等心血管疾病发生的始动因素<sup>[1]</sup>。

细胞黏附分子是一类表达于细胞表面介导细胞之间或细胞与基质之间相互接触、结合的糖蛋白。VCAM-1 是免疫球蛋白超家族中的成员之一,在 As 中起重要作用<sup>[4-6]</sup>。正常情况下 VCAM-1 在白细胞

和内皮细胞有表达水平低,在 TNF- $\alpha$  等炎症因子的刺激下表达明显上调<sup>[7,8]</sup>。激活的白细胞黏附到血管内皮,通过一系列机制促进 EC 损伤、血管内皮功能障碍,从而使 VCAM-1 等黏附分子表达进一步增加,致使大量的白细胞黏附和浸入血管壁,形成恶性循环<sup>[9-11]</sup>。

黄芪是传统中药,祖国医药认为黄芪有补气升阳、利水消肿、益气固表之功效,而将其归属“补气”之药,其化学成分包括皂甙类、多糖类、黄酮类以及各种氨基酸、微量元素和胆碱、 $\beta$  谷甾醇、甜菜碱等,它的作用也非常广泛,对多种疾病尤其是心血管疾

病有很高的应用价值,已成为中西医结合防治 AS 研究的热点<sup>[12-16]</sup>。但其对心血管疾病的防治作用的分子机制尚不明确。本研究以保存黄芪生物学活性的黄芪水提取物成份为研究对象,利用 TNF- $\alpha$  诱导的小鼠动脉内皮细胞炎症模型,观察了黄芪水提取物干预对 TNF- $\alpha$  激活的小鼠动脉内皮细胞分泌 VCAM-1 的影响。结果显示,黄芪水提取物抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 VCAM-1 表达和分泌并表现剂量依赖性及时间依赖性,研究提示黄芪水提取物可能通过抑制炎症因子引起的内皮细胞黏附分子表达,起到抗炎、保护血管内皮的作用。NF- $\kappa$ B 是一种重要的核转录因子,是调控内皮细胞 VCAM-1 表达的重要调控因子,在内皮细胞活化中具有重要作用<sup>[17,18]</sup>。本实验用 Western blot 方法证实高浓度的黄芪水提取物(120 mg/L 预先孵育 4~8 h)可明显拮抗细胞核内 TNF- $\alpha$  刺激后 NF- $\kappa$ B p65 的表达。由此推断,黄芪水提取物可能是通过抑制 TNF- $\alpha$  诱导的小鼠动脉内皮细胞中 NF- $\kappa$ B 的激活,从而抑制细胞间黏附分子 VCAM-1 的表达,产生抗炎作用。

相信随着黄芪活性成分对抗心脑血管疾病的作用及其分子机制研究的不断深入,黄芪的药用价值将被更好的开发利用。

#### [参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [2] Abraham E. NF- $\kappa$ B activation [J]. *Crit Care Med*, 2000, 28: 100-104.
- [3] 徐军,齐法莲. 黄芪对心血管疾病的药用价值及作用机制 [J]. *放射免疫学杂志*, 2004, 17(2): 135.
- [4] Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador JM, et al. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes [J]. *J Cell Biol*, 2002, 157(7): 1 233-245.
- [5] Li D, Chen H, Romeo F, et al. Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 302(2): 601-605.
- [6] Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins [J]. *Cell*, 1991, 65(5): 859-873.
- [7] Clark WM, Madden KP, Rothlein R, et al. Reduction of central nervous system ischemic injury by monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule [J]. *J Neurosurg*, 1991, 75(4): 623-627.
- [8] Smith CW, Entman ML, Lane CL, et al. Adherence of neutrophils to canine cardiac myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesion molecule-1 [J]. *J Clin Invest*, 1991, 88(4): 1 216-223.
- [9] Baldwin AS. The NF- $\kappa$ B and I  $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights [J]. *Annu Rev Immunol*, 1996, 14: 649-683.
- [10] Boehm U, Klamp T, Groot M, et al. Cellular responses to interferon- $\gamma$  [J]. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15: 749-795.
- [11] Meroni P L, Raschi E, Testoni C, et al. Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(12): 2 870-878.
- [12] 王兴,陈蓉,刘宝红,等. 黄芪注射液治疗冠心病心绞痛及其对血浆 vWF、CEC 的影响 [J]. *上海中医药杂志*, 2005, 39(7): 12-13.
- [13] Wu Y, Shi X S, Wang S S, et al. Protective role of astragalus polysaccharide on endothelium cells induced by atherosclerosis [J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2005, 9(23): 238-240.
- [14] Li HB, Ge YK, Zhang L, et al. Astragaloside IV improved barrier dysfunction induced by acute high glucose in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Life Sci*, 2006, 79(12): 1 186-193.
- [15] Zhang Y, Hu G, Lin HC, et al. Radix Astragali extract promotes angiogenesis involving vascular endothelial growth factor receptor-related phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in human endothelial cells [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(9): 1 205-213.
- [16] Hu JY, Han J, Chu ZG, et al. Astragaloside IV attenuates hypoxia-induced cardiomyocyte damage in rats by up-regulating superoxide dismutase-1 levels [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36(4): 351-357.
- [17] Ying Z, Kherada N, Kampfrath T, et al. A modified sesamol derivative inhibits progression of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(3): 536-542.
- [18] Kim SJ, Park JH, Kim KH, et al. Effect of NF- $\kappa$ B decoy oligodeoxynucleotide on LPS/high-fat diet-induced atherosclerosis in an animal model [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2010, 107(6): 925-930.

(此文编辑 李小玲)