

# 阿魏酸通过抑制核因子 $\kappa$ B 信号途径降低肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的人血管内皮细胞氧化应激及黏附分子表达

沈涛, 朱玉萍, 阮杨, 曹原, 满永, 王抒, 黎健

(卫生部北京医院 卫生部北京老年医学研究所 卫生部老年医学重点实验室, 北京市 100730)

[关键词] 阿魏酸; 抗氧化剂; 内皮细胞; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 细胞黏附分子

[摘要] **目的** 通过检测人脐静脉内皮细胞的氧化应激、细胞黏附分子和炎症相关信号分子表达, 探讨阿魏酸在肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 诱导的血管内皮损伤中的保护作用 and 机制。**方法** 以人脐静脉内皮细胞为研究模型, 给予阿魏酸预处理, 在基础或者 TNF- $\alpha$  刺激条件下, 蛋白质免疫印记法检测细胞间黏附分子 1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 表达和炎症相关细胞信号分子; MTT 法检测内皮细胞活性; Hoechst 33342 细胞核染色检测细胞凋亡比率; 以 DHE 染色检测氧自由基 (ROS) 生成; 单核细胞和血管内皮细胞黏附实验检测血管内皮细胞的黏附功能; 以蛋白质免疫印记法和细胞免疫荧光实验检测核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的活化。**结果** TNF- $\alpha$  可以明显增加血管内皮细胞氧自由基生成及 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达, 并且可以明显激活 NF- $\kappa$ B, 促进其核转位。阿魏酸可以明显抑制 TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞氧自由基生成及 ICAM-1 和 VCAM-1 表达升高, 抑制 NF- $\kappa$ B 活化和核转位。**结论** 阿魏酸可以通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号途径减轻 TNF- $\alpha$  导致的血管内皮细胞氧自由基增高、黏附分子表达, 抑制炎症因子导致的细胞损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Ferulic Acid Suppresses Oxidative Stress and Cell Adhesive Molecule Expression by Blocking Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation in Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Treated Human Vascular Endothelial Cells

SHEN Tao, ZHU Yu-Ping, RUAN Yang, CAO Yuan, MAN Yong, WANG Shu, and LI Jian

(The Key Laboratory of Geriatrics, Beijing Hospital & Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] Ferulic Acid; Antioxidants; Endothelial Cell; Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; Cell Adhesive Molecule

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and mechanism of ferulic acid (FA) on the expression of adhesion molecules and oxidative stress in tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-treated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** An endothelial cell model of adhesion function damage was established by administration of TNF- $\alpha$ . The level of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) was determined by Western blot. HUVEC viability and apoptosis were detected by MTT and Hoechst 33342 staining. Reactive oxygen species (ROS) production was measured by DHE staining. Adhesion assay of monocyte and HUVEC was used to detect endothelial cell adhesive function. Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation was detected by Western blot and immunofluorescence staining. **Results** The TNF- $\alpha$  treatment caused a significant increase of ROS generation and the expression of ICAM-1 and VCAM-1 in HUVEC, which was associated with a dramatic augmentation in phosphorylation of I- $\kappa$ B and relocation of NF- $\kappa$ B into the nuclei. However, TNF- $\alpha$ -induced ROS generation, ICAM-1 and VCAM-1 upregulation and NF- $\kappa$ B relocation could be attenuated by pretreatment of ferulic acid. **Conclusion** Ferulic acid could suppress TNF- $\alpha$ -induced adhesion molecule expression by blocking NF- $\kappa$ B signal and inhibiting ROS generation in HUVECs, suggesting that ferulic acid could be a novel drug candidate for the prevention and treatment of atherosclerosis.

[收稿日期] 2013-01-22

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目 (81200221) 和国家人力资源和社会保障部留学回国人员科研启动基金

[作者简介] 沈涛, 博士, 助理研究员, 研究方向为动脉粥样硬化。朱玉萍, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化。通讯作者黎健, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化和糖尿病, E-mail 为 lijian@bjhmoh.cn。

在动脉粥样硬化起始和发展过程中,物理损伤、氧化型低密度脂蛋白、炎症因子、缺血缺氧等因素导致内皮细胞损伤是关键的始动环节,在动脉粥样硬化的发病中发挥重要的作用。大量实验研究发现,早期的动脉粥样硬化与血管内皮细胞的炎症、氧化应激和黏附因子的表达密切相关<sup>[1,2]</sup>。阿魏酸(ferulic acid)是桂皮酸的衍生物之一,它在阿魏、当归、川芎、升麻、酸枣仁等中药材中的含量较高,是这些中药的有效成分之一。阿魏酸是一种抗氧化剂,其苯环上的羟基是抗氧化的活性基团,也可以消除自由基,抑制氧化反应和自由基反应,以及与生物膜磷脂结合,保护膜脂质等拮抗自由基对组织的损害,并具有抗炎作用<sup>[3-6]</sup>。本研究拟观察阿魏酸对肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )诱导的血管内皮细胞氧化应激、黏附因子表达的影响,探讨阿魏酸对内皮细胞保护的相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

阿魏酸由成都西亚化学试剂公司购买,色谱纯。MTT 试剂盒、Hoechst 33342 购自美国 Sigma 公司。细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、Bcl-2、Bax 和 GAPDH 抗体(均为兔抗人一抗)购自美国 Santa Cruz 公司。p-I- $\kappa$ B、I- $\kappa$ B、p-NF- $\kappa$ B 和 NF- $\kappa$ B 抗体(均为兔抗人一抗)购自美国 Cell Signal Technology 公司。重组人 TNF- $\alpha$  购自美国 Peprotech 公司。HRP 标记的二抗购自美国 CST 公司。

### 1.2 人脐静脉内皮细胞的原代培养

取健康胎儿剖宫产的脐带,用 PBS 冲洗脐静脉至无血迹,注入 I 型胶原酶(1 g/L),室温消化 30 min 后,用 20% 胎牛血清的 M199 溶液冲洗,液体一并收集入离心管,1500 r/min 离心 15 min,离心后弃去上清,用含 20% 胎牛血清 M199 完全培养基调整细胞浓度后置于培养瓶中培养。实验所用为第 4~6 代细胞。

### 1.3 细胞传代培养与分组处理

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)用含有 2 mmol/L 谷氨酰胺、 $10^5$  U/L 青霉素、 $10^5$  U/L 链霉素和 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。于实验前 48 h,将细胞计数后,接种到 6 孔板或 24 孔板中培养,加药前用含 2% 胎牛血清的 DMEM 培

养 16~24 h 同步化。将细胞按如下分组处理:(1) TNF- $\alpha$  对内皮细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响:①量效实验:内皮细胞同步化后,用 0、10、20、40、80 mg/L 的 TNF- $\alpha$  处理 24 h,收集蛋白质用于检测;②时效实验:内皮细胞同步化后,用 40 mg/L 的 TNF- $\alpha$  分别处理 0、12、24、36、48 和 72 h,收集细胞提取蛋白质用于检测。(2)阿魏酸对内皮细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 表达影响的量效实验:内皮细胞同步化后,分别用 0、10、50 和 100 g/L 阿魏酸预处理细胞 4 h 后,用 40 mg/L 的 TNF- $\alpha$  分别处理 24 h,收集细胞提取蛋白质。(3)阿魏酸对 TNF- $\alpha$  处理的内皮细胞的保护实验:实验分对照组、TNF- $\alpha$  处理组(40 mg/L TNF- $\alpha$  处理 24 h)和阿魏酸预处理组(50 g/L 阿魏酸预处理 4 h 后用 40 mg/L TNF- $\alpha$  处理 24 h)。

### 1.4 免疫印记法检测黏附分子和信号转导通路

处理后的细胞,用 RIPA 细胞裂解液裂解细胞,超声破碎后用 15000 g 离心 20 min,收集上清测定蛋白浓度,取蛋白样品与 5X 蛋白上样缓冲液混匀,100℃水浴 5 min。配制并灌注 12% 的分离胶和 5% 浓缩胶,每孔上样蛋白 50~60  $\mu$ g。电泳转膜完毕,用 8% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗 4℃摇床过夜。TBST 洗涤 10 min 5 次,加入 HRP 标记二抗室温孵育 1.5 h, TBST 洗涤 10 min 5 次, ECL 发光显影。分别检测黏附分子 VCAM-1 和 ICAM-1 表达,以及信号通路 NF- $\kappa$ B、I- $\kappa$ B、Bax 和 Bcl-2 表达,蛋白质上样内参 GAPDH。结果用 ImageJ 软件进行条带的灰度分析和统计。

### 1.5 MTT 法检测细胞活力

使用第 4~6 代 HUVEC 种于 24 孔板,同步化处理后用 50 g/L 阿魏酸预处理 4 h,40 mg/L TNF- $\alpha$  处理 24 h。换新的培养基,加入 MTT 0.5 g/L 4 h,去掉培养基,以 PBS 洗 3 次,加入 400  $\mu$ L DMSO,充分裂解细胞,用酶标仪 490 nm 测定 OD 值。每次实验安排 3 孔,取平均值。以对照组的细胞存活为 1,其他各组细胞相对存活率 =  $\frac{\text{OD}_{490\text{实验组}}}{\text{OD}_{490\text{对照组}}}$ ,实验重复 4 次。

### 1.6 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡

培养的细胞用 70% 甲醇和 30% 丙酮固定,用 10 mmol/L 的 Hoechst 33342 细胞核染色。随机选 10 个视野 500~700 细胞照相,通过图像分型计数细胞核深染、胞质浓缩、染色质成团块状及凋亡小体出现的细胞比率。实验重复 4 次。

### 1.7 DHE 染色检测原位氧自由基

10  $\mu$ mol/L DHE (Sigma) 与处理后的 HUVEC

37℃ 共孵育 30 min,用培养基洗 3 次,换为新的培养基,倒置荧光显微镜拍照,用 ImageJ Plus 软件分析氧自由基荧光强度并统计。实验重复 4 次。

1.8 单核细胞与内皮细胞黏附实验

HUVEC 用 6 孔板培养到 90% ~ 95% 融合,用阿魏酸预处理 4 h,再加入 TNF-α 处理 24 h。人单核细胞系 U937 用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基培养,加入含 50 mg/L 的 MTT 37℃ 孵育 2 h 进行细胞标记。处理后的 HUVEC 加入 1 × 10<sup>6</sup>/孔 MTT 标记的 U937 细胞共培养 30 min,用 37℃ RPMI1640 培养基洗 3 次。黏附的细胞用 400 μL DMSO 裂解,并用 490 nm 吸收光检测。

1.9 免疫荧光实验检测 NF-κB 活化

细胞接种于 6 孔板内的无菌玻片上,密度达到 60% ~ 70% 时,换为含 2% 血清的培养基同步化 24 h,阿魏酸处理 4 h 后,再加入 TNF-α 刺激 8 h。以 4% 多聚甲醛固定 10 min,再加入 0.2% Triton X-100/PBS 室温处理 15 min。用 5% 兔血清 37℃ 封闭 2 h,加入抗 NF-κB 抗体 4℃ 过夜。用 PBS 洗玻片 5 min × 5 次后,加入 Alexa 488 标记的抗兔 IgG 抗体 37℃ 0.5 h。用 DAPI 复染细胞核。荧光显微镜照相。

1.10 统计学方法

计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,以 Prism 5.0 软件分析、作图。进行多组结果比较时采用单因素方差分析 (one way ANOVA),采用 Student-Newman-Keuls 进一步行组间两两比较的分析检验,比较两组结果时采用组间 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 阿魏酸可以抑制 TNF-α 诱导的 HUVEC 中 ICAM-1 和 VCAM-1 表达

0 ~ 40 mg/L 的 TNF-α 以浓度依赖的形式上调细胞黏附分子的表达,过高的 TNF-α 浓度可以导致内皮细胞急性损伤和死亡,黏附分子合成相应减少 (图 1A)。我们同时检测了 40 mg/L TNF-α 作用不同时间点 (0、12、24、48 和 72 h) HUVEC 中黏附分子的表达情况,发现在 TNF-α 处理 24 h 时,细胞黏附分子表达最高 (图 1B)。因此,我们选用 40 mg/L 的 TNF-α 作用 24 h 作为研究条件。我们进一步检测抗氧化剂阿魏酸是否能抑制 TNF-α 诱导的黏附分子的表达,结果发现 0 ~ 100 g/L 的阿魏酸剂量依赖性降低 40 mg/L TNF-α 诱导的细胞黏附分子表达 (图 1C)。其中,以 50 g/L 的阿魏酸可以显著降低

黏附分子表达,其抑制效应达到最大 (*P* < 0.01,表 1)。因此在下面的研究中,我们选用 50 g/L 的阿魏酸做其保护机制的研究。上述结果提示,阿魏酸可以抑制 TNF-α 诱导的内皮细胞黏附分子表达。

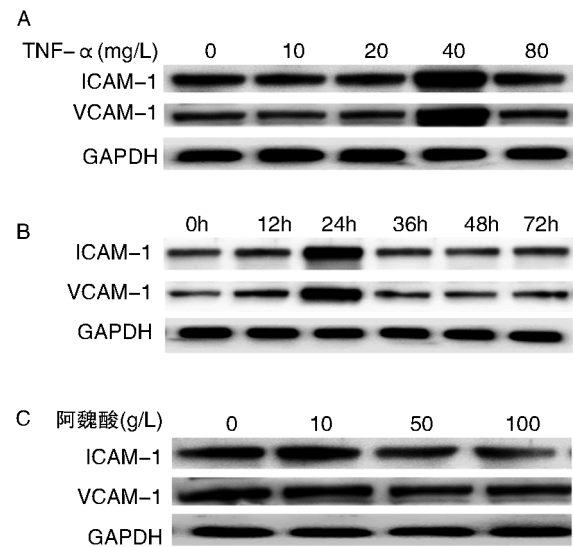


图 1. 阿魏酸抑制 TNF-α 诱导的 ICAM-1 和 VCAM-1 表达  
A 为不同剂量的 TNF-α 诱导内皮细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达;B 为 40 mg/L TNF-α 处理不同时间对 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响;C 为不同剂量的阿魏酸对 40 mg/L TNF-α 处理的血管内皮细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响。

Figure 1. Ferulic acid inhibits ICAM-1 and VCAM-1 expression induced by TNF-α

表 1. 不同剂量阿魏酸对 TNF-α 诱导的 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响 (*n* = 3)

Table 1. Effect of different concentration of ferulic acid on expression of ICAM-1 and VCAM-1 induced by TNF-α (*n* = 3)

阿魏酸浓度 (g/L)	ICAM-1	VCAM-1
0	1	1
10	1.10 ± 0.33	0.98 ± 0.15
50	0.54 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.11 <sup>a</sup>
100	0.43 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.18 <sup>a</sup>

a 为 *P* < 0.05,与 0 g/L 阿魏酸组比较。

2.2 阿魏酸可以抑制 TNF-α 诱导的血管内皮细胞氧化应激

DHE 染色显示,40 mg/L TNF-α 可以显著提高血管内皮细胞的氧自由基水平,而阿魏酸预处理内皮细胞 4 h 后,可以明显抑制氧自由基的生成 (图 2)。以上实验证实,阿魏酸可以通过抑制氧自由基的生成,保护血管内皮细胞。



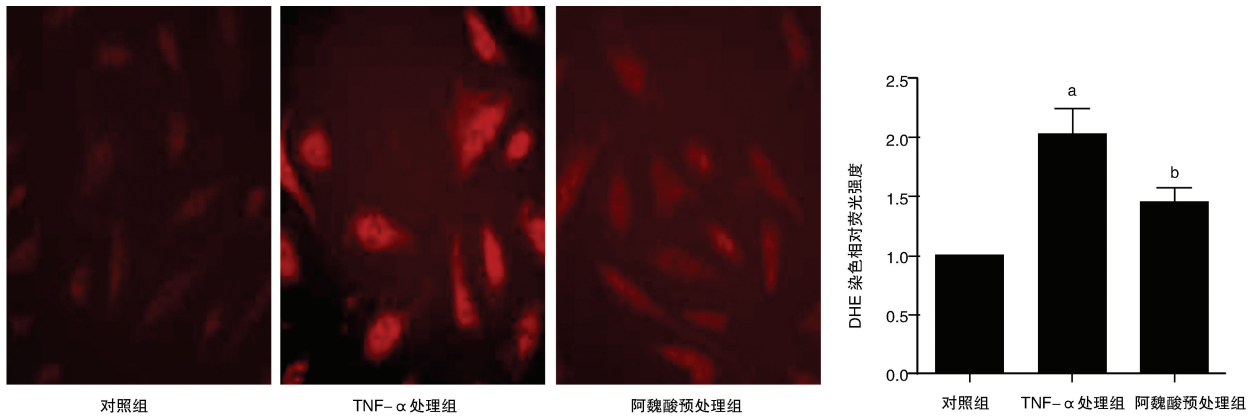


图 2. 阿魏酸抑制 TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞氧化应激 ( $n=4$ )      a 为  $P<0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 TNF- $\alpha$  处理组比较。  
Figure 2. Ferulic acid attenuates TNF- $\alpha$ -induced HUVEC oxidative stress ( $n=4$ )

2.3 阿魏酸减轻 TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞损伤和凋亡

MTT 结果显示, 与对照组比较, TNF- $\alpha$  处理内皮细胞后, 细胞的生存率明显降低; 以 50 g/L 阿魏酸预处理内皮细胞后, 细胞生存率明显提高 (图 3)。此外, 以 Hoechst 33342 检测细胞浓聚和凋亡小体结果显示, TNF- $\alpha$  导致的内皮细胞凋亡增高, 而阿魏酸可以明显抑制细胞凋亡的发生, 差异有统计学意义 (图 4)。

2.4 阿魏酸减轻 TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞与单核细胞黏附增加

TNF- $\alpha$  处理内皮细胞后, 内皮细胞与人单核细胞系 U937 细胞黏附实验发现, 与对照组比较, TNF- $\alpha$  处理组细胞与单核细胞黏附明显增加 ( $P<0.05$ ); 以 50 g/L 阿魏酸预处理内皮细胞后, 单核细胞黏附明显减少, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ ; 图 5)。

2.5 阿魏酸通过抑制 NF- $\kappa$ B 途径下调细胞黏附分子的表达

蛋白质免疫印记实验显示, 40 mg/L TNF- $\alpha$  可以促进 ICAM-1 和 VCAM-1 表达并伴随 NF- $\kappa$ B 和 I- $\kappa$ B 磷酸化增高。以 50 g/L 阿魏酸预处理后, 则可以明显降

低 ICAM-1 和 VCAM-1 表达, 并明显降低 I- $\kappa$ B 和 NF- $\kappa$ B 的磷酸化水平。此外, 阿魏酸还可以减低 Bax 的表达水平 (图 6 和表 2)。细胞免疫荧光实验检测 NF- $\kappa$ B 的核转位发现, 正常 HUVEC NF- $\kappa$ B 大部分位于细胞质内; 40 mg/L TNF- $\alpha$  刺激后, NF- $\kappa$ B 发生明显的核转位, 细胞质的 NF- $\kappa$ B 明显减少, 并转移到细胞核内; 而阿魏酸预处理后, NF- $\kappa$ B 核转位的现象明显减轻 (图 7)。以上实验证实, 阿魏酸可以通过抑制 NF- $\kappa$ B 和 I- $\kappa$ B 磷酸化和活化及核转位, 抑制黏附分子表达。

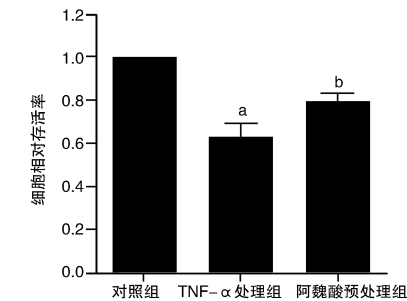


图 3. MTT 检测细胞生存率 ( $n=4$ )      a 为  $P<0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 TNF- $\alpha$  处理组比较。  
Figure 3. Cell survival rate by MTT ( $n=4$ )

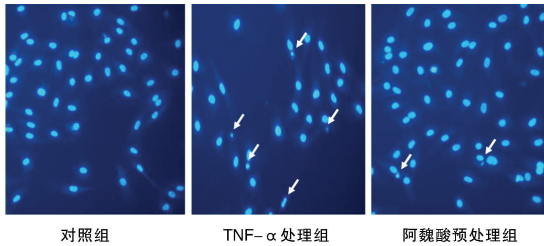
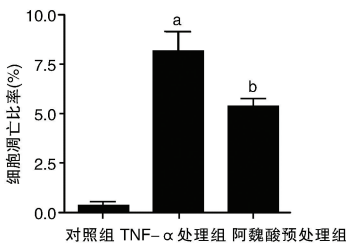


图 4. Hoechst 33342 染色检测血管内皮细胞凋亡 ( $n=4$ )      箭头显示为凋亡小体; a 为  $P<0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 TNF- $\alpha$  处理组比较。

Figure 4. Ferulic acid attenuates TNF- $\alpha$ -induced HUVEC apoptosis ( $n=4$ )



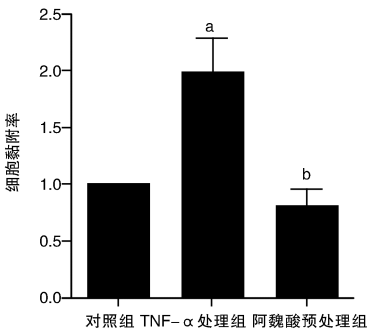


图 5. 阿魏酸抑制 TNF-α 诱导的血管内皮细胞与单核细胞黏附 (n = 4) a 为 P < 0. 05, 与对照组比较; b 为 P < 0. 01, 与 TNF-α 处理组比较。

Figure 5. Ferulic acid attenuates TNF-α-induced monocyte adhesion to HUVEC(n = 4)

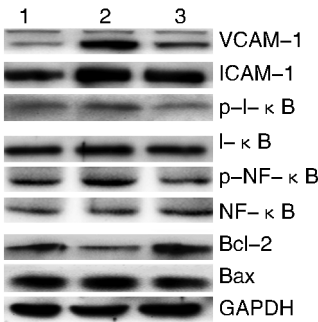


图 6. 蛋白质免疫印迹检测阿魏酸通过 NF-κB 途径抑制 TNF-α 诱导的黏附分子表达 1 为对照组, 2 为 TNF-α 处理组, 3 为阿魏酸预处理组。

Figure 6. Ferulic acid down-regulates the expression of adhesion molecule by inhibition of NF-κB pathway by Western blot

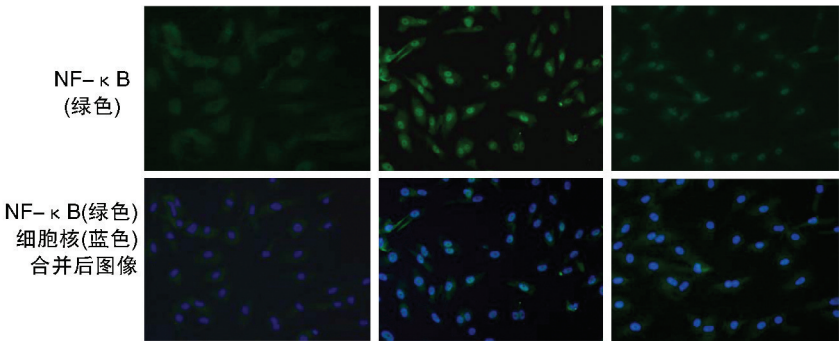


图 7. 细胞免疫荧光实验检测 NF-κB 的核转位 (n = 3) 左为对照组, 中为 TNF-α 处理组, 右为阿魏酸预处理组。

Figure 7. Cell immunofluorescence detection of NF- κ B nuclear translocatiol(n = 3)

炎症参与了动脉粥样硬化的形成、斑块破裂、血栓形成等病理进程。TNF-α 是体内重要的炎症因子之一。炎症细胞的募集在动脉粥样硬化形成早期发挥重要作用。炎症因子 TNF-α 在炎症细胞的募集和活化中十分重要。炎症还可以导致黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 表达增高<sup>[1,7-10]</sup>。多种天然的抗氧化剂可

表 2. 阿魏酸通过 NF-κB 途径抑制 TNF-α 诱导的黏附分子表达 (n = 4)

Table 2. Ferulic acid down-regulates the expression of adhesion molecule by inhibition of NF-κB pathway(n = 4)

指 标	对照组	TNF-α 处理组	阿魏酸预处理组
ICAM-1	1	1. 91 ± 0. 31 <sup>a</sup>	1. 17 ± 0. 20 <sup>c</sup>
VCAM-1	1	2. 15 ± 0. 16 <sup>b</sup>	1. 35 ± 0. 27 <sup>c</sup>
p-I-κB/I-κB	1	2. 71 ± 0. 66 <sup>a</sup>	1. 46 ± 0. 34 <sup>c</sup>
p-NF-κB/NF-κB	1	1. 75 ± 0. 27 <sup>a</sup>	0. 76 ± 0. 25 <sup>d</sup>
Bcl-2	1	0. 50 ± 0. 16 <sup>a</sup>	1. 10 ± 0. 30 <sup>c</sup>
Bax	1	1. 61 ± 0. 24 <sup>a</sup>	0. 85 ± 0. 24 <sup>c</sup>

a 为 P < 0. 05, b 为 P < 0. 01, 与对照组比较; c 为 P < 0. 05, d 为 P < 0. 01, 与 TNF-α 处理组比较。

### 3 讨 论

阿魏酸的化学名称为 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸, 是桂皮酸( 又称肉桂酸, 3-苯基-2-丙烯酸) 的衍生物之一。具有抗血小板聚集、抑制血小板和 5-羟色胺释放、抑制血小板血栓素 A2(TXA2) 的生成、增强前列腺素活性、镇痛以及缓解血管痉挛等作用<sup>[3-6]</sup>。阿魏酸具有抗氧化和抗炎作用, 但是有关阿魏酸在血管内皮细胞的保护机制研究较少。本实验发现阿魏酸预处理血管内皮细胞后, 可以通过抑制 NF-κB 途径降低 TNF-α 诱导的血管内皮细胞氧自由基生成、细胞凋亡、黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达。

以通过抑制氧化应激和炎症, 保护机体, 对抑制动脉粥样硬化早期的形成有重要作用<sup>[11,12]</sup>。本研究对阿魏酸的研究结果显示, TNF-α 可呈剂量依赖性的提高血管内皮细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达。而阿魏酸预处理后, 可以明显抑制 TNF-α 导致的内皮细胞黏附分子的表达。大量实验显示, TNF-α 通过促进细胞

氧自由基的生成促进炎症发生。氧自由基可以促进血管内皮细胞黏附分子表达,细胞凋亡增高<sup>[1,7,13,14]</sup>。本实验发现,TNF- $\alpha$  通过促进血管内皮细胞氧自由基生成、活化 Bax 并降低 Bcl-2,导致正常细胞黏附功能异常和细胞损伤发生。然而,阿魏酸可以通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号,显著降低 TNF- $\alpha$  导致的氧化应激、黏附分子表达升高和细胞损伤。

有实验发现,TNF- $\alpha$  可以促进 NF- $\kappa$ B 结合于 VCAM-1 的转录促进区域,促进其转录和表达,从而增强内皮细胞与单核细胞的黏附作用<sup>[15]</sup>。免疫印记实验和细胞免疫荧光实验显示,阿魏酸可以通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号活化和核转位,降低 VCAM-1 和 ICAM-1 在内皮细胞中的表达,从而保护血管内皮细胞。由于本实验是建立在细胞水平上的,对于更为复杂的整体水平生理功能研究还需要进一步完善。

总之,本实验发现 TNF- $\alpha$  可以导致血管内皮细胞氧自由基生成增多、细胞黏附分子表达增高、内皮细胞的损伤和细胞凋亡。而阿魏酸可以通过抑制 NF- $\kappa$ B 途径,减少氧自由基生成,降低黏附分子表达和细胞损伤及凋亡。本研究结果为进一步研究阿魏酸的药理作用及动脉粥样硬化的预防和治疗提供了新的线索。

[参考文献]

[1] Reape TJ, Groot PH. Chemokines and atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 1999, 147(2): 213-225.

[2] Ross R. Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy [J]. *Transplant Proc*, 1993, 25(2): 2 041-043.

[3] Thyagaraju BM, Muralidhara. Ferulic acid supplements abrogate oxidative impairments in liver and testis in the streptozotocin-diabetic rat [J]. *Zoolog Sci*, 2008, 25(8): 854-860.

[4] Picone P, Bondi ML, Montana G, et al. Ferulic acid inhibits oxidative stress and cell death induced by Ab oligomers: improved delivery by solid lipid nanoparticles[J]. *Free Radic Res*, 2009, 43(11): 1 133-145.

[5] Ma ZC, Hong Q, Wang YG, et al. Ferulic acid protects human umbilical vein endothelial cells from radiation in-

duced oxidative stress by phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(1): 29-34.

[6] Ma ZC, Hong Q, Wang YG, et al. Ferulic acid protects lymphocytes from radiation-predisposed oxidative stress through extracellular regulated kinase[J]. *Int J Radiat Biol*, 2011, 87(2): 130-140.

[7] Zhang H, Issekutz AC. Down-modulation of monocyte transendothelial migration and endothelial adhesion molecule expression by fibroblast growth factor: reversal by the anti-angiogenic agent SU6668 [J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(6): 2 219-230.

[8] Johnson LA, Clasper S, Holt AP, et al. An inflammation-induced mechanism for leukocyte transmigration across lymphatic vessel endothelium [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(12): 2 763-777.

[9] Kim SR, Bae YH, Bae SK, et al. Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(5): 886-895.

[10] Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(10): 1 255-262.

[11] 高琳琳, 李福荣, 康莉, 等. 蚤休皂苷对氧化损伤的脐静脉内皮细胞 ICAM-1、VCAM-1 表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2009, 19(13): 1 968-972.

[12] 胥光热, 彭永权, 林静, 等. 槲皮素对人内皮祖细胞增殖和凋亡的影响及机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2012, 22(10): 22-28.

[13] Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis [J]. *Eur Cytokine Netw*, 1998, 9(4): 697-698.

[14] Meyer JW, Holland JA, Ziegler LM, et al. Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells: a potential atherogenic source of reactive oxygen species[J]. *Endothelium*, 1999, 7(1): 11-22.

[15] Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(3): 255-264.

(此文编辑 许雪梅)