

艳山姜挥发油调控 NF- κ B 信号抑制 LPS 诱导 HAECs 炎性损伤

林丹, 石廷雨, 杨红, 吴国萍, 付凌云, 陶玲, 沈祥春*
(贵州医科大学天然药物资源优效利用重点实验室, 贵阳 550025)

[摘要] 目的:研究艳山姜挥发油(essential oil of *Alpinia zerumber* fructus,EOAZF)对脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells,HAECs)炎性损伤的保护作用。方法:体外传代培养 HAECs,先用不同剂量 EOAZF(0.05,0.1 mg·L⁻¹)和阿司匹林(0.5 mmol·L⁻¹)预处理 1 h,另设空白组,再与 LPS(5 mg·L⁻¹)共同作用 12 h。采用噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活性;苏木素-伊红染色进行细胞形态学观察;细胞划痕修复实验分析 HAECs 划痕修复能力;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1,VCAM-1),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4,TLR4),核转录因子- κ B 抑制蛋白激酶(inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase,IKK),磷酸化 NF- κ B 抑制蛋白激酶(phospho-inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase,p-IKK)蛋白的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测细胞中 TLR4 和 VCAM-1 mRNA 的表达;免疫荧光法观察 NF- κ B p65 的核转位情况。结果:与空白组比较,LPS 能诱导 HAECs 形态学损伤,降低细胞存活率及划痕修复能力,同时上调 VCAM-1,Caspase-3,TLR4,IKK 及 P-IKK 的表达。免疫荧光实验结果分析表明 LPS 能够诱导 NF- κ B p65 的核转位。与模型组比较,EOAZF 预处理后,能够改善 LPS 诱导的 HAECs 形态学损伤,提高细胞存活率及划痕修复能力,抑制 VCAM-1,Caspase-3,TLR4,IKK 及 P-IKK 的表达及 NF- κ B p65 的核转位。结论:EOAZF 对 LPS 诱导的 HAECs 炎性损伤具有保护作用,其机制与调控 TLR4/IKK/NF- κ B-p65 信号有关。

[关键词] 艳山姜挥发油;脂多糖;阿司匹林;内皮细胞损伤;Toll 样受体 4;核转录因子- κ B

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0139-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181929

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180717.0917.001.html>

[网络出版时间] 2018-07-18 17:02

Effect of Essential Oil of Fructus *Alpinia zerumber* in Inhibiting Inflammatory Injury of Human Aortic Endothelial Cells Induced by Lipopolysaccharide by Regulating NF- κ B Signaling

LIN Dan, SHI Ting-yu, YANG Hong, WU Guo-ping, FU Ling-yun, TAO Ling, SHEN Xiang-chun*
(Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicine Resources,
Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of essential oil of *Alpinia zerumber* fructus (EOAZF) on the inflammatory injury of human aortic endothelial cells (HAECs) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Method:** HAECs were cultured *in vitro*. HAECs were pre-treated with different doses of EOAZF (0.05,

[收稿日期] 20180501(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360650);贵州省留学人员科技活动经费项目(黔人项目资助合同[2013]02号);贵州省高等教育科技创新团队项目(黔教合人才团队字[2014]31);贵州省科技创新团队项目(黔科合人才团队[2015]4025号);贵州省高层次创新型人才百层次人才项目(贵州省科技厅黔科合人才[2015]4029号);贵阳市科技基金项目(筑科合同[20151001]药07号)

[第一作者] 林丹,在读硕士,从事心血管药理学研究,E-mail: 1270435326@qq.com

[通信作者] *沈祥春,博士,教授,从事心血管系统药物药理与功能天然产物化学生物学研究,Tel: 0851-88416149, E-mail: shenxiangchun@126.com

0.1 mg·L⁻¹) and aspirin (0.5 mmol·L⁻¹) for 1 h, then incubated with lipopolysaccharide (LPS) (5 mg·L⁻¹) for 12 h. The effect of EOAZF on the cell viability of HAECs induced by LPS was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the cell morphology, and wound healing assay was used to analyze the ability of HAECs wound healing ability. Western blot was used to detect the protein expressions of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), cysteine aspartase-3 (Caspase-3), Toll like receptor 4 (TLR4), nuclear factor kappa B inhibitory protein kinase (IKK) and phosphorylated nuclear factor kappa inhibitory protein kinase (p-IKK), and real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expressions of TLR4 and VCAM-1. The nuclear translocation of nuclear factor kappa-B p65 (NF-κB p65) was observed by immunofluorescence. **Result:** Compared with control group, LPS induced HAECs morphological damage, decreased cell viability and wound healing ability, and increased the expressions of VCAM-1, Caspase-3, TLR4, IKK and p-IKK. Immunofluorescence results showed that LPS induced nuclear translocation of NF-κB p65. Compared with model group, the pre-treatment of EOAZF improved the morphological damage of HAECs induced by LPS, increased cell viability and wound healing ability, inhibited the expressions of VCAM-1, Caspase-3, TLR4, IKK and p-IKK, as well as significantly inhibited the nuclear transposition of NF-κB p65. **Conclusion:** EOAZF has the protective effect on the inflammatory injury of HAECs induced by LPS, and its mechanism may be related to the regulation of TLR4/IKK/NF-κB p65 signaling.

[**Key words**] essential oil of *Alpinia zerumber* fructus; lipopolysaccharide; aspirin; endothelial cell injury; Toll like receptor 4; nuclear factor-kappa B

心血管疾病 (cardiovascular diseases, CVDs) 的高发病率和高死亡率不仅严重危害到人们的身心健康,也给国家和人民带来了巨大的经济负担^[1]。心血管疾病的发生发展与恶化均与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 密切相关,近年来研究证实 AS 是一种慢性炎症疾病,血管内皮细胞 (vascular endothelial cells, VECs) 的炎性损伤的病理过程贯穿 AS 发生发展的全过程。因此开展药物对血管内皮细胞炎性损伤保护作用的研究在心血管疾病的预防和治疗中具有重要的意义^[2-3]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 为最常用的内皮细胞炎性损伤诱导因子,引起内皮细胞形态和功能的变化,使内皮细胞分泌多种炎症活性物质,包括炎症细胞因子、细胞黏附分子、细胞凋亡因子,如血管细胞黏附分子-1 (vascular adhesion molecule-1, VCAM-1) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 等^[4]。脂多糖 (LPS) 是 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 的生理配体,二者结合后可通过激活髓性分化因子 88 (MyD88) 使核转录因子-κB (nuclear factor kappa B, NF-κB) 抑制蛋白激酶 (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase, IKK) 发生磷酸化,激活 NF-κB 信号通路^[5]。NF-κB 信号通路与机体的炎症反应关系最为密切,可调控大多数免疫炎症基因的转录^[6]。

贵州产民族药艳山姜为姜科山姜属植物艳山姜的干燥成熟果实,具有温中燥湿、行气止痛、截疟之

功效,已被 2003 年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》收录^[7]。研究提示艳山姜主要活性成分为挥发油,其可能作为治疗心血管疾病的潜在药物,具有较大的开发和利用价值,是一种具有开发潜力的特色民族药物。实验室前期证明艳山姜挥发油 (essential oil of *Alpinia zerumbet* fructus, EOAZF) 对氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 或 LPS 诱导的内皮细胞损伤具有保护作用,但作用机制尚不明确^[8-10]。本实验基于 NF-κB 信号通路进一步研究 EOAZF 对 LPS 诱导人主动脉内皮细胞 (human aortic endothelial cells, HAECs) 炎性损伤的保护作用及作用机制,发现 EOAZF 通过调控 NF-κB 信号抑制 LPS 诱导 HAECs 炎性损伤,为 EOAZF 在改善血管内皮细胞功能和防治 AS 上提供新的理论依据,为艳山姜药物资源的合理配置与使用提供实验基础与理论指导,推进区域特色药用资源的保护和产业化,对促进贵州中药民族药资源为主体的创新药物的研制具有一定社会意义和经济价值。

1 材料

1.1 细胞 人主动脉内皮细胞 (HAECs) 株,美国 Science Cell 公司,批号 16103。

1.2 试剂 LPS (美国 Sigma 公司,批号 114M4009V);阿司匹林 (中国食品药品检定研究院,批号 840130);VCAM-1 抗体,TLR4 抗体,IKK α/β 抗体 (英国 MDL 公司,批号分别为 160320,

160322, 160629); Caspase-3 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体(美国 ImmunoWay 公司,批号分别为 B0401, B0503); 磷酸化-IKK α/β (p-IKK α/β) 抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号 4230); 总 RNA 提取试剂盒, 逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 AK901, AK5301); 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 试剂盒, SYBR Green Supermix (美国 Bio-Rad 公司,批号 172-5124); NF- κ B 激活核转运检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 SN368)。

1.3 EOAZF 的提取和配制 艳山姜的果实采集于贵州省贞丰县,经贵州医科大学药学院生药学与药用植物学教研室龙庆德教授鉴定为姜科山姜属植物 *Alpinia zerumbet* 的干燥成熟果实。水蒸气蒸馏法提取,用无水硫酸钠除水后于 4 °C 长期保存。取艳山姜挥发油 50 μ L (约为 44.5 mg) 于 10 mL 的离心管中,加入二甲基亚砜 (DMSO) 4 400 μ L 完全溶解,可得到质量浓度为 $1 \times 10^7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EOAZF 母液,1.5 mL 的棕色离心管分装于 4 °C 冰箱中保存,临用时用无血清培养基稀释成所需浓度。最终, DMSO 的含量不超过 0.1%。

1.4 仪器 JB-CJ-1FXS 型洁净工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司); HF90 型二氧化碳培养箱(上海力申科学仪器有限公司); 3020-426 型多功能全波长酶标仪(美国 Thermo 公司); CFX 型蛋白电泳仪及凝胶成像系统, Universal Hood II 型 Real-time PCR 系统仪(美国 Bio-Rad 公司); XDS-2B 型倒置显微镜(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 HAECs 培养 体外传代培养 HAECs, 常规方法复苏 HAECs, 加入含有 5% 胎牛血清, 1% 内皮细胞生长因子和 1% 青霉素/链霉素的内皮细胞培养基后于 37 °C, 5% CO₂ 的湿热培养箱中培养。视具体情况换液及传代培养, 取对数生长期细胞用于实验。实验所用细胞均为 3~6 代。

2.2 实验分组 实验分为 5 组, 分别为空白组(无血清 ECM), 模型组(LPS, 5 mg·L⁻¹ LPS), EOAZF 高剂量组(5 mg·L⁻¹ LPS + 0.1 mg·L⁻¹ EOAZF), EOAZF 低剂量组(5 mg·L⁻¹ LPS + 0.05 mg·L⁻¹ EOAZF), 阳性药阿司匹林组(5 mg·L⁻¹ LPS + 0.5 mmol·L⁻¹ Asp)。

2.3 噻唑蓝(MTT) 比色法检测 HAECs 细胞存活率 取对数生长期的 HAECs 接种于 96 孔细胞培养板中。待细胞长满后, 弃上清, 无血清内皮细胞培养基

(ECM) 孵育 12 h。先用不同浓度的 EOAZF 或阿司匹林预处理 1 h, 然后加入 LPS 孵育 12 h。采用 MTT 法用多功能全波长酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔吸光度 A, 每组重复 6 个复孔, 实验重复 3 次。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{药物组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.4 细胞划痕修复实验 取对数生长期的 HAECs 接种于 24 孔细胞培养板中, 待细胞贴壁良好且生长融合至 80%~90% 时, 弃上清, 无血清 ECM 孵育 12 h。用 10 μ L 的移液枪头在培养板孔中划直线, 先用不同浓度的 EOAZF 或阿司匹林预处理 1 h, 然后加入 LPS 孵育 12 h。观察 0, 12, 24 h 3 个时间点细胞的划痕宽度并拍照。计算细胞划痕修复能力。各组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

$$\text{细胞划痕修复能力} =$$

$$\frac{\text{实验组 } 0 \text{ h 宽度} - \text{实验组 } 12 \text{ h 宽度}}{\text{空白组 } 0 \text{ h 宽度} - \text{空白组 } 12 \text{ h 宽度}} \times 100\%$$

2.5 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞 VCAM-1, Caspase-3, TLR4, IKK, 磷酸化 IKK (p-IKK) 蛋白的表达 取对数生长期的 HAECs 接种于 24 孔细胞培养板中, 待细胞贴壁良好且生长融合至 80%~90% 时, 弃上清, 无血清 ECM 孵育 12 h。用不同浓度的 EOAZF 或孵育阿司匹林预处理 1 h, 后加入 LPS 孵育 12 h。细胞用 PBS 洗 3 次, 加入适当裂解液提取蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定浓度。将蛋白 25 μ g 在 10% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 上依次进行电泳, 转膜和封闭, 加入一抗 (VCAM-1 为 1:1 000, Caspase-3 为 1:1 000, TLR4 为 1:1 000, IKK 为 1:1 000, p-IKK 为 1:1 000, GAPDH 为 1:1 万) 4 °C 下过夜孵育。洗膜缓冲液 (TBST) 将膜洗 3 次后用二抗 (1:7 000) 孵育 1 h。再次洗膜后通过 ECL 化学发法进行显色, 凝胶成像系统成像, 用 Image-Lab 软件对蛋白条带灰度值进行分析。实验重复 3 次。

2.6 Real-time PCR 检测 HUVECs 中 VCAM-1 和 TLR4 mRNA 表达 取对数生长期 HAECs 接种于 6 孔细胞培养瓶中, 待细胞贴壁良好且生长融合至 90% 时, 弃上清, 无血清 ECM 孵育 12 h。先用不同浓度的 EOAZF 或阿司匹林预处理 1 h, 然后加入 LPS 孵育 12 h。根据试剂盒说明书进行总 RNA 的提取, 然后将提取的 RNA 进行反转录合成 cDNA, 加入上游及下游引物进行 PCR 反应。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 40 次。以 GAPDH 为内参

基因,采用 CFX-Manager 软件进行统计。引物序列见表 1,实验重复 3 次。

表 1 TLR4, VCAM-1 和 GAPDH 的引物序列

Table 1 Primer sequence of TLR4, VCAM-1 and GAPDH

| 引物名称 | 引物序列 | 引物长度/bp |
|--------|-------------------------------|---------|
| TLR4 | 上游 5'-GAGAAGACACCACTGCCTCA-3' | 20 |
| | 下游 5'-GACATCATCTGGCATCATC-3' | 20 |
| VCAM-1 | 上游 5'-AAGCCGATCACAGTCAAGTG-3' | 22 |
| | 下游 5'-TCTTGGTTTCCAGGGACTTC-3' | 19 |
| GAPDH | 上游 5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3' | 16 |
| | 下游 5'-GAAGGCTGGGGCTCATT-3' | 14 |

2.7 免疫荧光检测 NF- κ B p65 核移位情况 取对数生长期 HAECs 接种于 6 孔细胞培养瓶中,待细胞贴壁良好且生长融合至 80% ~ 90% 时,弃去上清,无血清 ECM 孵育 12 h。先用不同浓度的 EOAZF 或阿司匹林预处理 1 h,然后加入 LPS 孵育 12 h。根据试剂盒说明书进行操作,荧光显微镜下观察, NF- κ B p65 的染色为红色荧光,细胞核的 DAPI 染色为蓝色荧光。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 LPS 诱导 HAECs 细胞活性损伤的影响 与空白组比较,细胞经 LPS 损伤后,细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,0.05,0.1 mg·L⁻¹ 的 EOAZF 及 0.5 mmol·L⁻¹ 的阿司匹林预保护 1 h 后,均能提高细胞存活率 ($P < 0.05, P < 0.01$),提示 EOAZF 能提高 LPS 诱导损伤的 HAECs 细胞存活率。见表 2。

表 2 EOAZF 对 LPS 诱导细胞损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of EOAZF on HAECs cell injury induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

| 组别 | 质量浓度 /mg·L ⁻¹ | 12 h 存活率 | 24 h 存活率 | 36 h 存活率 |
|-------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 正常 | - | 100 | 100 | 100 |
| 模型 | 5 | 70.1 ± 2.9 ¹⁾ | 70.9 ± 1.2 ¹⁾ | 63.8 ± 1.3 ¹⁾ |
| EOAZF | 0.05 | 80.0 ± 4.7 ²⁾ | 83.6 ± 2.1 ²⁾ | 67.0 ± 2.7 ²⁾ |
| | 0.1 | 84.1 ± 2.8 ²⁾ | 87.8 ± 1.6 ²⁾ | 72.4 ± 2.3 ²⁾ |
| 阿司匹林 | 0.5 ⁴⁾ | 81.6 ± 3.2 | 85.1 ± 1.6 ²⁾ | 72.1 ± 3.1 ³⁾ |

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ 表示单位为 mmol·L⁻¹。

3.2 对 LPS 诱导 HAECs 细胞划痕修复能力的影响 与空白组比较,细胞经 LPS 损伤后,HAECs 划痕修复能力显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,0.05,0.1 mg·L⁻¹ 的 EOAZF 及 0.5 mmol·L⁻¹ 的阿司匹林预处理后,能够显著提高细胞划痕修复能力 ($P < 0.01$)。见表 3 和图 1。

表 3 EOAZF 对 LPS 诱导 HAECs 划痕修复能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of EOAZF on wound healing ability of HAECs induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 质量浓度/mg·L ⁻¹ | 细胞划痕修复能力/% |
|-------|-------------------------|--------------------------|
| 正常 | - | 100 |
| 模型 | 5 | 40.7 ± 1.3 ¹⁾ |
| EOAZF | 0.05 | 62.5 ± 1.7 ²⁾ |
| | 0.1 | 74.3 ± 2.1 ²⁾ |
| 阿司匹林 | 0.5 ³⁾ | 71.2 ± 3.2 ²⁾ |

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;³⁾ 表示单位为 mmol·L⁻¹(表 4,5 同)。

3.3 对 LPS 诱导 HAECs 中 VCAM-1 及 TLR4 mRNA 表达的影响 与空白组比较,LPS 诱导后其表达显著增加 VCAM-1 及 TLR4 mRNA 表达 ($P < 0.01$);与模型组比较,0.05,0.1 mg·L⁻¹ 的 EOAZF 及 0.5 mmol·L⁻¹ 的阿司匹林能够显著抑制 VCAM-1 及 TLR4 mRNA 的表达 ($P < 0.01$)。见表 4。

3.4 对 LPS 诱导 HAECs 中 VCAM-1, Caspase-3, TLR4, p-IKK/IKK 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组 HAECs 经 LPS 刺激 12 h 后 VCAM-1, Caspase-3, TLR4, p-IKK/IKK 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,0.05,0.1 mg·L⁻¹ 的 EOAZF 及 0.5 mmol·L⁻¹ 的阿司匹林可显著抑制 VCAM-1, Caspase-3, TLR4, p-IKK/IKK 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。见图 2,表 5。

3.5 对 LPS 诱导 HAECs 中 NF- κ B p65 蛋白的核移位的影响 经 LPS 处理后,NF- κ B p65 蛋白核移位明显增加,而 0.05,0.1 mg·L⁻¹ 的 EOAZF 及 0.5 mmol·L⁻¹ 的阿司匹林预处理后,能明显抑制 LPS 引起的核移位。见图 3。

4 讨论

国内外研究表明,动脉粥样硬化是心血管疾病的主要风险因素,预计到 2020 年,将成为世界首要致死原因^[11]。血管内皮细胞的炎性损伤是 AS 早期阶段中的关键事件,炎症贯穿着 AS 的始终。LPS 是诱导内皮细胞炎性损伤的重要分子,参与了炎症和

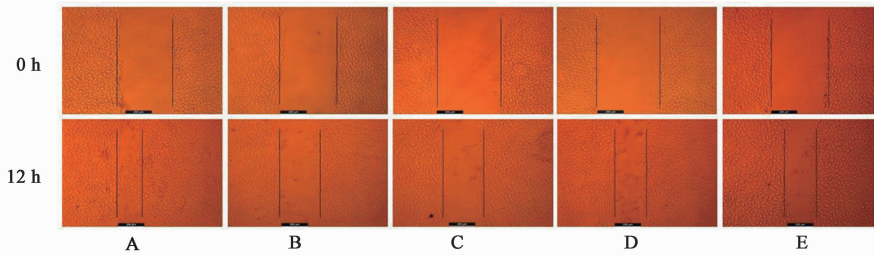


图 1 EOAZF 对 LPS 诱导 HAECs 划痕修复能力的影响(倒置显微镜, ×50)
A. 空白组; B. LPS 5 mg·L⁻¹组; C. EOAZF 0.05 mg·L⁻¹组; D. EOAZF 0.1 mg·L⁻¹组; E. 阿司匹林 0.5 mmol·L⁻¹组(图 2,3 同)

Fig. 1 Effects of EOAZF on wound healing ability of HAECs induced by LPS(inverted microscope, ×50)

AS 的病变过程^[12]。因此,开展对 LPS 诱导内皮细胞炎性损伤的研究具有非常重要的意义。

表 4 EOAZF 对 LPS 诱导 HAECs 中 VCAM-1, TLR4 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of EOAZF on mRNA expression of VCAM-1, TLR4 in LPS induced HAECs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 质量浓度/mg·L ⁻¹ | VCAM-1 | TLR4 |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 正常 | - | 1 | 1 |
| 模型 | 5 | 4.2 ± 1.8 ¹⁾ | 3.5 ± 3.7 ¹⁾ |
| EOAZF | 0.05 | 2.2 ± 1.9 ²⁾ | 2.1 ± 1.2 ²⁾ |
| | 0.1 | 1.7 ± 1.3 ²⁾ | 1.8 ± 1.9 ²⁾ |
| 阿司匹林 | 0.5 ³⁾ | 1.8 ± 1.4 ²⁾ | 1.4 ± 2.3 ²⁾ |

表 5 EOAZF 对 LPS 诱导 HAECs 中 VCAM-1, Caspase-3, TLR4, p-IKK/IKK 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of EOAZF on protein expression of VCAM-1, Caspase-3, TLR4, p-IKK/IKK in LPS induced HAECs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 质量浓度/mg·L ⁻¹ | VCAM-1/GAPDH | Caspase-3/GAPDH | TLR4/GAPDH | p-IKK/IKK |
|-------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常 | - | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 模型 | 5 | 240.8 ± 3.7 ¹⁾ | 210.8 ± 3.8 ¹⁾ | 150.8 ± 1.7 ¹⁾ | 250.6 ± 2.8 ¹⁾ |
| EOAZF | 0.05 | 150.3 ± 3.1 ²⁾ | 140.5 ± 3.3 ²⁾ | 110.6 ± 1.6 ²⁾ | 140.8 ± 2.9 ²⁾ |
| | 0.1 | 125.5 ± 1.4 ²⁾ | 110.8 ± 1.4 ²⁾ | 100.5 ± 2.1 ²⁾ | 100.8 ± 1.6 ²⁾ |
| 阿司匹林 | 0.5 ³⁾ | 140.7 ± 1.3 ²⁾ | 115.6 ± 3.2 ²⁾ | 125.4 ± 1.8 ²⁾ | 105.6 ± 1.7 ²⁾ |

本实验采 HAECs 为研究对象, LPS 建立内皮细胞炎性损伤模型。实验结果表明 0.05, 0.1 mg·L⁻¹ 的 EOAZF 及 0.5 mmol·L⁻¹ 的阿司匹林对 HAECs 进行预处理后, 能够显著提高 LPS 诱导损伤的 HAECs 细胞存活率, 改善 LPS 诱导 HAECs 的形态学损伤以及提高细划痕修复能力。当内皮细胞受到 LPS 诱导后, 会分泌多种炎症活性物质, 例如细胞炎性损伤的标志物之一的 VCAM-1 及凋亡相关蛋白 Caspase-3^[13-14]。本实验采用 Real-time PCR 及 Western blot 检测 LPS 诱导 HAECs 中 VCAM-1 的表达, 结果表明, 0.05, 0.1 mg·L⁻¹ 的 EOAZF 及 0.5 mmol·L⁻¹ 的阿司匹林能够抑制 LPS 诱导 HAECs 中

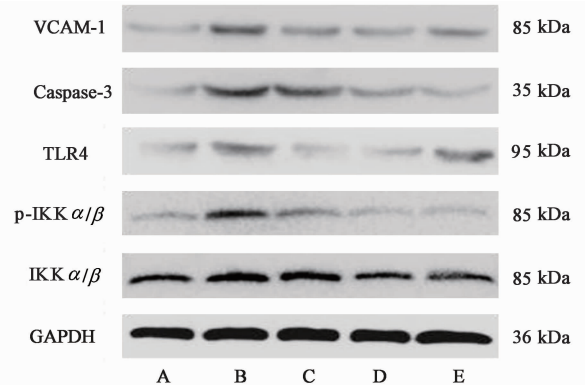


图 2 各组 HAECs 中 VCAM-1, Caspase-3, TLR4, p-IKK/IKK 蛋白的表达电泳($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Electrophoresis of protein expression of VCAM-1, Caspase-3, TLR4, p-IKK/IKK in each group($\bar{x} \pm s, n = 3$)

VCAM-1 的表达, 同时, 还能抑制 Caspase-3 蛋白的表达。这些结果提示了 EOAZF 对 LPS 诱导 HAECs 的炎性损伤具有显著的保护作用。

研究表明, LPS 与配体 TLR4 结合后可通过激活髓性分化因子 88 (MyD88) 使 IKK 磷酸化, 从而激活 NF-κB 信号通。NF-κB 作为重要的核转录因子, 在内皮细胞炎性损伤过程中具有相当关键的调控作用。细胞未受刺激时, NF-κB 二聚体 (p65/p50) 与细胞质中 3 个抑制因子 (IκBα, IκBβ, IκBε) 中的一个结合, 以无活性的状态存在于细胞浆中。细胞受到炎症介质刺激后, IκB 被 IKK 复合物激活, 快速磷酸化并与多个泛素分子相连, 发生泛素化, 从而与

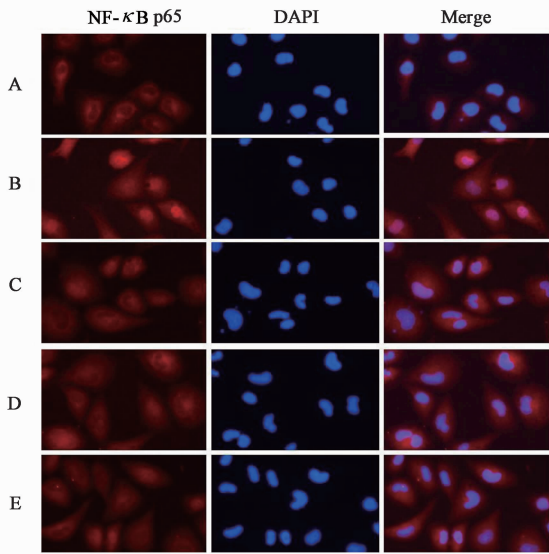


图 3 EOAZF 对 LPS 诱导的 NF- κ B p65 核转位的影响(免疫荧光, $\times 100$)

Fig. 3 Effect of EOAZF on nuclear translocation of NF- κ B p65 induced by LPS (immunofluorescent, $\times 100$)

NF- κ B 解离, NF- κ B p65 的核定位序列暴露, 活化的 NF- κ B-p65 进入细胞核内与相应的 DNA 的特定区域结合, 促进靶基因的序列表达, 如 VCAM-1 和 Caspase-3, 参与细胞各病理生理过程^[15]。结果表明, 0.05, 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EOAZF 和 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的阿司匹林能够抑制 LPS 诱导 HAECs 中 TLR4 的激活, 从而抑制 IKK 复合物的活化。免疫荧光实验结果显示 0.05, 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EOAZF 及 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的阿司匹林可抑制 LPS 诱导 HAECs 中 NF- κ B p65 的核移位。提示 EOAZF 对 LPS 诱导 HAECs 炎症损伤的保护作用与调控 TLR4/IKK/NF- κ B p65 信号有关。

综上所述, EOAZF 能够抑制 LPS 诱导 HAECs 炎症损伤, 其机制可能与调控 TLR4/IKK/NF- κ B p65 信号有关, 为 EOAZF 在改善 VEC 功能和防治 AS 上提供新的理论依据和实验基础。

[参考文献]

[1] 刘海梅, 闫福曼, 徐进文, 等. 白藜芦醇调节 TRPC1/STIM1 介导的 SOCC 抗动脉粥样硬化机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4): 96-102.
[2] DA S I, Barroso M, Moura T, et al. Endothelial aquaporins and hypomethylation: potential implications for atherosclerosis and cardiovascular disease[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1): E130.

[3] 柴毅, 吴颢昕, 陈刚, 等. 补阳还五汤加味预防动脉粥样硬化形成机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 114-120.
[4] Kwon D H, CHA H J, Choi E O, et al. Schisandrin A suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in RAW264.7 macrophages by suppressing the NF- κ B, MAPKs and PI3K/Akt pathways and activating Nrf2/HO-1 signaling[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(1): 264-274.
[5] YU Z, TANG L, CHEN L, et al. Capillarisin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators in BV2 microglial cells by suppressing TLR4-mediated NF- κ B and MAPKs signaling pathway[J]. Neurochem Res, 2015, 40(6): 1095-1101.
[6] YU S, CHEN X, XIU M, et al. The regulation of Jmjd3 upon the expression of NF- κ B downstream inflammatory genes in LPS activated vascular endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 485(1): 62-68.
[7] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2004: 187.
[8] 徐旖旎, 杨红, 李晨, 等. 基于 NOS 信号的艳山姜挥发油对 ox-LDL 诱导 HAECs 损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15): 143-147.
[9] 张彦燕, 文波, 陶玲, 等. 艳山姜挥发油对脂多糖诱导损伤的血管内皮细胞保护作用研究[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(4): 66-68.
[10] 李晨, 赵爽, 徐旖旎, 等. 艳山姜挥发油对 TGF- β_1 诱导人脐静脉内皮细胞间质转分化的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 160-164.
[11] 沈逸枫, 吴炯, 郭玮, 等. 心血管疾病风险评估系统研究进展[J]. 检验医学, 2018, 33(2): 163-169.
[12] 孟哲, 李海禹, 刘宇宙, 等. 积雪草酸通过调节 TLR4 和 PPAR- γ 活性抑制内毒素诱导的血管平滑肌细胞炎症反应[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(1): 60-67.
[13] 季律, 魏盼, 王璨, 等. 麻黄-甘草药对对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞的体外抗炎作用分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 83-88.
[14] 王晓菲, 臧宝霞, 吴伟, 等. 羟基红花黄色素 A 对 LPS 所致内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(12): 1650-1653.
[15] FU Y, GAO R, CAO Y, et al. Curcumin attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 20(1): 54-58.

[责任编辑 周冰冰]