

# 艳山姜挥发油抑制 JNK1/2/3 磷酸化对 ox-LDL 诱导的 HAECs 损伤的影响

文波, 令狐克刚, 徐旖旎, 张彦燕, 罗红, 陶玲, 陈妍\*, 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:研究艳山姜挥发油对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导人主动脉内皮细胞(HAECs)损伤的保护作用,并分析可能的作用机制。方法:实验分为空白组(无血清内皮细胞培养基),模型组(200 mg·L<sup>-1</sup> ox-LDL),艳山姜挥发油高剂量组(200 mg·L<sup>-1</sup> ox-LDL + 100 μg·L<sup>-1</sup>艳山姜挥发油)和低剂量组(200 mg·L<sup>-1</sup> ox-LDL + 10 μg·L<sup>-1</sup>艳山姜挥发油)共4组。艳山姜挥发油预保护1 h,继续加入 ox-LDL 共同作用24 h,采用噻唑盐(MTT)法分析细胞存活率,苏木精-伊红(HE)染色法进行形态学观察;采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测培养上清液乳酸脱氢酶(LDH)外漏量,Western blot 分析 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)1/2/3、p-JNK1/2/3 蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应分析 JNK1/2/3 mRNA 表达水平。结果:艳山姜挥发油能显著提高 HAECs 的存活率,改善细胞的病理损伤,减少 LDH 外漏量,抑制 JNK1/2/3 蛋白磷酸化,但对 JNK1/2/3 蛋白和 mRNA 水平无显著影响。结论:艳山姜挥发油改善 ox-LDL 诱导的 HAECs 损伤,其作用机制与抑制 JNK1/2/3 蛋白磷酸化相关。

**[关键词]** 艳山姜;挥发油;氧化低密度脂蛋白;人主动脉内皮细胞;c-Jun 氨基末端激酶

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)22-0112-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220112

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151022.1345.010.html>

**[网络出版时间]** 2015-10-22 13:45

**Inhibitory Effect of Essential Oil from Fructus *Alpinia zerumbet* on HAECs Injury of ox-LDL-induced by Down-regulation Phosphorylation of JNK1/2/3** WEN Bo, LINGHU Ke-gang, XU Yi-ni, ZHANG Yan-yan, LUO Hong, TAO Ling, CHEN Yan\*, SHEN Xiang-chun\* (Key Laboratory of Optimal Utilization for Natural Medicine Resources, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate protective effect of essential oil from Fructus *Alpinia zerumbet* (EOFAZ) on human aortic endothelial cells (HAECs) injury induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), and explore its possible mechanism. **Method:** Experiment was randomly divided into 4 groups as following: blank group (serum free ECM), model group (200 mg·L<sup>-1</sup> of ox-LDL), EOFAZ with high dose group (200 mg·L<sup>-1</sup> of ox-LDL + 100 μg·L<sup>-1</sup> of EOFAZ) and low dose group (200 mg·L<sup>-1</sup> of ox-LDL + 10 μg·L<sup>-1</sup> of EOFAZ). Pretreated with EOFAZ for 1 h and continue added ox-LDL for 24 hours. Then 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) method was employed to analyze cell survival rate and HE staining was used to observe morphology. Leakage of lactate dehydrogenase (LDH) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Expression of c-Jun N-terminal kinase 1/2/3 (JNK1/2/3) and phosphorylation-JNK1/2/3 (p-JNK1/2/3) protein was detected by Western blot analysis and JNK1/2/3 mRNA level was detected by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Result:** EOFAZ could

**[收稿日期]** 20150908(017)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360650,81560811);贵州省留学人员科技活动项目(黔人资合[2013]02号);教育部科学技术研究重点项目(21116);贵州省中药现代化专项(黔科合中药字[2012]5051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);贵州省高等学校创新能力提升计划项目(黔教合协同创新字[2013]04);贵州省高层次创新型人才项目(黔科合人才[2015]4029);贵州省科技创新团队项目(黔科合人才团队[2015]4025号)

**[第一作者]** 文波,在读硕士,从事心血管药物药理研究,Tel:15085969694,E-mail:562940926@qq.com

**[通讯作者]** \*陈妍,博士,副教授,从事天然药物活性研究,Tel:0851-88416160,E-mail:457335071@qq.com;

\*沈祥春,教授,博士生导师,从事中药民族药活性及效应机制研究,Tel:0851-88416149,E-mail:shenxiangchun@126.com

significantly enhance survival rate of HAECs, ameliorate pathological injury of cells, decrease LDH leakage content and inhibit phosphorylation of JNK1/2/3, but it had no effect on expression level of JNK1/2/3 protein and mRNA. **Conclusion:** EDFAZ can ameliorate HAECs injury status induced by ox-LDL, and its mechanism may be related to inhibition of phosphorylation of JNK1/2/3.

[**Key words**] *Alpinia zerumbet*; essential oil; oxidized low density lipoprotein; human aortic endothelial cells; c-Jun N-terminal kinase

血管内皮细胞已成为在生理、病理过程中发挥重要作用的多功能“器官”,其结构和功能异常与各种心血管系统疾病的发生密切相关<sup>[1-2]</sup>,主要表现为舒张和收缩因子、促凝和抗凝物质、生长抑制和生长促进物质的生成释放不平衡等。这些不平衡与氧化应激反应密不可分。据文献<sup>[3-5]</sup>报道氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)能促进氧化应激反应的进行,通过激活细胞特异性受体、诱导相关基因和蛋白的表达,使内皮细胞受损或功能失调、脂代谢异常、内膜受损、脂点脂纹形成,继而出现纤维斑块和粥样斑块,导致心血管疾病的发生。艳山姜挥发油具有抗心肌缺氧、抗动脉粥样硬化、抗溃疡等药理作用<sup>[6-7]</sup>。前期研究发现艳山姜挥发油对内皮细胞损伤具有保护作用<sup>[8-10]</sup>,但其作用机制尚不清楚。c-Jun 氨基末端激酶(JNK)又被称为应激活化蛋白激酶,是哺乳类细胞中丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号通路家族成员之一,在细胞分化、细胞凋亡、应激反应等生理和病理过程中起着重要作用。本实验基于前期研究水平,探索艳山姜挥发油通过抑制 JNK1/2/3 蛋白磷酸化发挥对 ox-LDL 诱导人主动脉内皮细胞(HAECs)氧化损伤的改善作用,为该部位的临床开发提供参考。

## 1 材料

ELX800 型酶联免疫检测仪(美国 GE 公司),CFX 型凝胶成像系统仪和 Universal Hood II 型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司)。

艳山姜采集自贵州省贞丰县连环乡,经贵州医科大学陈祖云教授鉴定为姜科植物 *Alpinia zerumbet* 的干燥成熟果实,采用水蒸气蒸馏法提取艳山姜挥发油,得率 1.3%。人主动脉内皮细胞(HAECs),内皮细胞培养基(ECM),胰酶消化液,中和液和冻存液均购自美国 Sciencell 公司;氧化低密度脂蛋白(ox-LDL,北京协生生物科技有限责任公司),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(齐一生物科技上海有限公司),四甲基偶氮唑盐(MTT,美国 Sigma 公司),抗 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)1/2/3 和 p-JNK1/2/3 多克

隆抗体(美国 ImmunoWay 公司),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 Bioworld 公司),增强化学发光法(ECL)试剂盒(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 HAECs 培养** 从超低温冰箱中取出 HAECs 后立即放入 37 °C 水浴中解冻,转入含 ECM(由 5% 灭活胎牛血清,100 U 青霉素,100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素配制而成)3 mL 的培养瓶中,于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 恒温饱和湿度的培养箱中培养,隔天换液 1 次,用 3~6 代细胞进行实验。

**2.2 分组与处理** 试验分为 4 组,包括空白组(无血清 ECM),模型组(200 mg·L<sup>-1</sup> ox-LDL),艳山姜挥发油高剂量组(200 mg·L<sup>-1</sup> ox-LDL + 100 μg·L<sup>-1</sup> 艳山姜挥发油)和艳山姜挥发油低剂量组(200 mg·L<sup>-1</sup> ox-LDL + 10 μg·L<sup>-1</sup> 艳山姜挥发油)。按上述分组进行给药,处理结束后进行指标检测。

**2.3 MTT 法分析细胞存活率** 按 2.2 项下方法分组,加入艳山姜挥发油预处理 1 h,继续加 ox-LDL 作用 24 h。96 孔板中每孔加 5 g·L<sup>-1</sup> MTT 20 μL 置于培养箱孵育 4 h,小心吸去孔内液体,每孔加入二甲亚砜 150 μL,震荡 10 min 后于 490 nm 处测定各孔吸光度 A,按(A<sub>试验组</sub> - A<sub>调零组</sub>)/(A<sub>空白组</sub> - A<sub>调零组</sub>) × 100% 计算细胞存活率。

**2.4 艳山姜挥发油对细胞损伤形态学的改变** 将细胞接种于 6 孔板,按 2.2 项下方法分组给药后进行苏木精-伊红(HE)染色,按说明书指示方法稍微进行改进,染色后于倒置相差显微镜下拍照观察。

**2.5 酶联免疫吸附剂测定法(ELISA)检测 LDH 外漏量** 将 HAECs 接种于 96 孔板,按 2.2 项下方法处理后收集培养液上清,于 -20 °C 冰箱保存备测。参照试剂盒说明书检测培养上清液中 LDH 外漏量。

**2.6 Western blot 检测 JNK1/2/3 和 p-JNK1/2/3 蛋白的表达** 各组细胞加入裂解液,冰上裂解约 20 min 后离心(12 000 r·min<sup>-1</sup>, 20 min)取上清,采用 BCA 试剂盒定量处理后上样,用 12% 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离总蛋白,随后用湿转法转移至聚偏氟乙烯膜上,用 1% 牛

血清白蛋白 (BSA) 封闭 1 h, 加入稀释比率为 1:1 000 的 JNK1/2/3, p-JNK1/2/3 抗体过夜后洗膜加入相应的二抗 (1:5 000 稀释), 室温孵育 1.5 h, ECL 法显影, 凝胶图像处理系统拍照并分析条带灰度值。GAPDH 用于蛋白内参标化。

**2.7 qRT-PCR 分析 JNK1/2/3 mRNA 表达水平**  
采用 Trizol 法裂解细胞提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 加入上、下游引物进行 PCR 扩增反应。JNK1/2/3 引物 (100 bp) 序列上游 5'-TGGACTTGGAGGAGAGAACC-3', 下游 5'-CATTGACAGACGACCATGATG-3'。GAPDH 引物 (138 bp) 序列上游 5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3', 下游 5'-GAA GGCTGGGGCTCATT-3'。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 40 次。根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法, 选择 GAPDH 为内参, 对 JNK1/2/3 mRNA 水平进行分析。

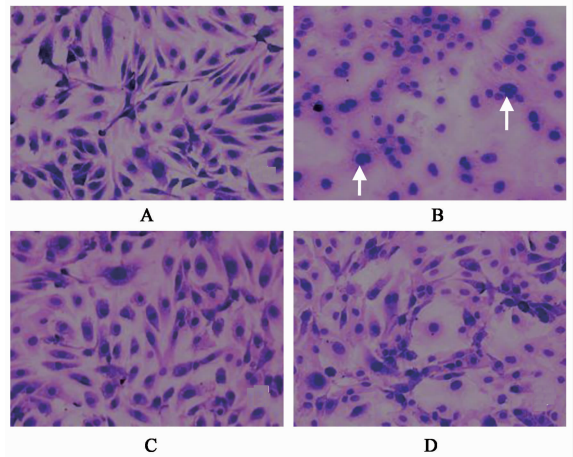
**2.8 统计学处理** 各组所得数据采用 SPSS 17.0 统计学软件进行处理。两组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 艳山姜挥发油对 ox-LDL 诱导的 HAECs 损伤存活率的影响** ox-LDL 作用 24 h 后, 空白组、模型组和艳山姜挥发油高、低剂量组的 *A* 分别为  $0.438 \pm 0.033$ ,  $0.289 \pm 0.023$ ,  $0.405 \pm 0.039$ ,  $0.362 \pm 0.028$ , 存活率分别为 100%, 66.0%, 92.5%, 82.6%。模型组与空白组相比, *A* 极显著降低; 与模型组相比, 艳山姜挥发油高、低剂量组的 *A* 明显提高, 提示艳山姜挥发油能明显提高细胞存活率。

**3.2 艳山姜挥发油对 HAECs 细胞形态的影响**  
HE 染色后, 胞核染成蓝色, 胞浆染成淡粉红色。空白组细胞数目较多, 染色形态清晰, 胞间连接紧密, 成多角形或梭型。模型组细胞数目明显减少, 形态模糊, 细胞收缩变圆, 胞间隙明显增大, 核浓缩, 包体膨大, 形态异于正常, 表现出细胞损伤的典型病理学改变。与模型组比较, 艳山姜挥发油高、低剂量组细胞形态不同程度地改善了 ox-LDL 导致的细胞损伤。

提示艳山姜挥发油能明显改善 ox-LDL 对 HAECs 的损伤形态, 见图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 高剂量组; D. 低剂量组 (图 2 同)

图 1 不同剂量组艳山姜挥发油对 HAECs 形态的影响 (HE,  $\times 200$ )

Fig.1 Effects of essential oil from *Fructus Alpinia zerumbet* with different dose on morphology of HAECs (HE,  $\times 200$ )

**3.3 艳山姜挥发油对 HAECs 中 LDH 外漏量的影响** 空白组、模型组和艳山姜挥发油高、低剂量组的 LDH 外漏量分别为  $(68.49 \pm 11.25)$ ,  $(102.23 \pm 13.26)$ ,  $(77.35 \pm 15.48)$ ,  $(83.43 \pm 12.26)$   $U \cdot L^{-1}$ 。与空白组相比, 模型组 LDH 外漏量明显增加; 与模型组相比, 艳山姜挥发油高、低剂量组的 LDH 外漏量明显降低, 提示艳山姜挥发油可抑制 ox-LDL 诱导损伤的 HAECs 中 LDH 外漏量的增加。

**3.4 Western blot 分析 JNK1/2/3 和 p-JNK1/2/3 蛋白的表达** Western blot 分析结果显示, 与空白组比较, 模型组 p-JNK1/2/3 蛋白表达显著增加, 提示 ox-LDL 促进 JNK1/2/3 蛋白磷酸化。与模型组比较, 艳山姜挥发油高剂量组和低剂量组 p-JNK1/2/3 蛋白表达显著降低, 且差异分别具有极显著性和显著性, 提示艳山姜挥发油通过抑制 JNK1/2/3 蛋白磷酸化发挥对细胞的保护作用。而各组 JNK1/2/3 总蛋白量之间无统计学意义, 提示各药物对 JNK1/2/3 总蛋白量无显著影响。见表 1 和图 2。

表 1 艳山姜挥发油对 HAECs 中 JNK1/2/3 及 p-JNK1/2/3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of essential oil from *Fructus Alpinia zerumbet* on expression of JNK1/2/3 and p-JNK1/2/3 proteins in HAECs ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 / $\mu g \cdot L^{-1}$	蛋白量表达相对比值 (归一化)		
		p-JNK1/2/3/GAPDH	JNK1/2/3/GAPDH	p-JNK1/2/3/JNK1/2/3
空白	-	1	1	1
模型	$2.0 \times 10^5$	$1.876 \pm 0.257^{1)}$	$1.084 \pm 0.072$	$1.556 \pm 0.398^{1)}$
艳山姜挥发油	100	$1.134 \pm 0.139^{3)}$	$0.852 \pm 0.187$	$1.087 \pm 0.113^{3)}$
	10	$1.428 \pm 0.323^{3)}$	$0.987 \pm 0.126$	$1.387 \pm 0.294^{2)}$

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

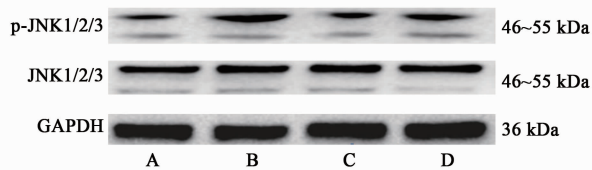


图 2 艳山姜挥发油对 ox-LDL 诱导 HAECs 损伤的 JNK1/2/3 及 p-JNK1/2/3 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of essential oil from *Fructus Alpinia zerumbet* on expression of JNK1/2/3 and p-JNK1/2/3 proteins in HAECs induced injury by ox-LDL

**3.5 qRT-PCR 分析 JNK1/2/3 mRNA 水平** qRT-PCR 分析显示,用艳山姜挥发油干预后,各组 JNK1/2/3 mRNA 水平均无统计学意义。提示各药物对 JNK1/2/3 mRNA 表达水平无影响,艳山姜挥发油仅通过影响 JNK1/2/3 蛋白磷酸化发挥保护作用。

#### 4 讨论

ox-LDL 作用于动脉内皮细胞可引起多种损伤因子产生和释放,刺激血管内皮受损或功能失调,脂点和脂纹形成,导致脂代谢紊乱,继而出现纤维斑块和粥样斑块,促进动脉粥样硬化形成<sup>[11]</sup>。LDH 是细胞损伤标志物,其外漏量提示细胞损伤程度。JNK 是 MAPK 信号家族中的关键成员之一,与类风湿性关节炎、哮喘、心血管疾病、癌症、神经退行性疾病、眼部等疾病密切相关<sup>[12]</sup>。JNK 信号通路可被不同的刺激或刺激物所激活,如炎症细胞因子和应激因子缺血再灌注、紫外照射、氧化损伤、高渗环境损伤等<sup>[13-14]</sup>,从而导致 JNK 磷酸化蛋白增加,一系列底物如转录因子、蛋白激酶、胞浆和胞核蛋白等活化,引发炎症反应、细胞分化、细胞周期停滞、凋亡、衰老及 RNA 剪接调控等。且这种活化作用通常具有组织细胞特异性,持续长时间磷酸化会引起细胞凋亡。

前期研究发现艳山姜挥发油可通过 NO 合成酶 (NOS)-NO 系统发挥对血管内皮功能异常的调控作用<sup>[15]</sup>,本文采用 ox-LDL 诱导活化体外培养的 HAECs,建立血管内皮细胞氧化损伤模型。采用艳山姜挥发油进行干预,通过检测 JNK1/2/3 总蛋白及磷酸化蛋白表达探索该部位的保护作用机制。结果表明艳山姜挥发油显著提高了 ox-LDL 诱导 HAECs 的存活率,改善其病理状态,减少 LDH 的外漏量。此外,艳山姜挥发油还显著下调 JNK1/2/3 蛋白磷酸化水平而不影响 JNK1/2/3 总蛋白和 mRNA 的表达水平,发挥对 ox-LDL 诱导损伤 HAECs 的保护作用,提示艳山姜挥发油通过影响 JNK 信号转导通路减少 ox-LDL 诱导 HAECs 的损伤。

#### [参考文献]

- [1] Lee S, Kim I T, Park H B, et al. High-sensitivity C-reactive protein can predict major adverse cardiovascular events in Korean patients with type 2 diabetes [J]. J Korean Med Sci, 2011, 26(10): 1322-1327.
- [2] 李萍. 血管内皮细胞病理生理作用的研究进展 [J]. 微循环学杂志, 2014, 24(4): 1-7.
- [3] 吕铁伟, 孙慧超, 张蕾, 等. ox-LDL 抑制大鼠骨髓间充质干细胞的体外增殖和 Oct-4 表达 [J]. 重庆医学, 2014, 43(14): 1737-1740.
- [4] Chu L, Hao H, Luo M, et al. Ox-LDL modifies the behaviour of bone marrow stem cells and impairs their endothelial differentiation via inhibition of Akt phosphorylation [J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(2): 423-432.
- [5] 文波, 张彦燕, 徐旖旎, 等. 卡维地洛对 ox-LDL 诱导的人主动脉内皮细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 贵阳医学院学报, 2015, 40(8): 789-792.
- [6] 张彦燕, 令狐克刚, 陈妍, 等. 正交试验法研究艳山姜挥发油保护脂多糖诱导 HUVEC 损伤的活性组分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(20): 9-12.
- [7] Shen X C, Tao L, Li W K, et al. Evidence-based antioxidant activity of the essential oil from *Fructus A. zerumbet* on cultured human umbilical vein endothelial cells' injury induced by ox-LDL [J]. BMC Complement Altern Med, 2012, doi: 10.1186/1472-6882-12-174.
- [8] Tao L, Hu H S, Shen X C. Endothelium-dependent vasodilatation effects of the essential oil from *Fructus Alpinia zerumbet* on rat thoracic aortic rings *in vitro* [J]. Phytomedicine, 2013, 20(5): 387-393.
- [9] Chen Y, Li D, Xu Y, et al. Essential oils from *Fructus A. zerumbet* protect human aortic endothelial cells from apoptosis induced by ox-LDL *in vitro* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, doi: 10.1155/2014/956824.
- [10] 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.
- [11] 郭云亮, 陈鹏翔, 郭子林. ox-LDL 与动脉粥样硬化的关系研究进展 [J]. 济宁医学院学报, 2014, 37(4): 298-302.
- [12] 程崑, 李涛. JNK 通路研究现状 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2014, 35(7): 1038-1041.
- [13] 魏娜, 贺海波, 张长城, 等. JNK 信号通路及细胞凋亡关系的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(7): 807-812.
- [14] 朱文浩, 刘璐, 高颖. 益肾达络饮对 EAE 小鼠 p-JNK1/2, JNK1/2, COX-2 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 101-105.
- [15] 沈祥春, 李万奎, 陶玲. 艳山姜挥发油对氧化低密度脂蛋白诱导人脐静脉血管内皮细胞损伤及 NOS-NO 的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(24): 1937-1940.

[责任编辑 刘德文]