

梓醇对 NF- κ B 活化减轻 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤的影响

刘江月^{*}, 张代娟, 李文涛, 郭军堂
(潍坊医学院, 山东 潍坊 261053)

[摘要] **目的:**观察梓醇对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导 EA. hy926 细胞炎症因子的影响,并从核因子- κ B(NF- κ B)的活化角度探讨其可能的作用机制。**方法:**将常规培养的 EA. hy926 细胞随机分为空白组,梓醇组($0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),ox-LDL 组($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),梓醇高、低剂量组($0.5, 0.05\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),各药物组先孵育 24 h,空白组与 ox-LDL 组给予空白配培养基孵育 24 h,孵育后加入 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ox-LDL 继续培养 24 h。逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)检测细胞中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),血管细胞黏附分子-1(VCAM-1) mRNA 和蛋白的表达;噻唑蓝(MTT)法检测细胞活性;Hoechst 细胞核染色检测细胞凋亡比率;Western blot 和 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测 NF- κ B 的活化。**结果:**与空白组比较,梓醇保护组细胞损伤明显减轻,TNF- α , VCAM-1 mRNA 及蛋白表达均显著降低,NF- κ B 活化明显受抑制,且呈剂量依赖性($P < 0.05$)。**结论:**梓醇能够有效减轻 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞炎症反应,保护 EA. hy926 细胞,其机制可能与其抑制 NF- κ B 活化有关。

[关键词] 梓醇; 炎症因子; 核因子- κ B; 肿瘤坏死因子- α ; 血管细胞黏附分子-1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0118-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180118

Effect of Catalpol on NF- κ B Activation and Reducing Endothelial Cells Injury Induced by ox-LDL

LIU Jiang-yue^{*}, ZHANG Dai-juan, LI Wen-tao, GUO Jun-tang
(Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of catalpol on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) induced inflammatory cytokine in EA. hy926 cells and to explore its possible mechanism from the prospective of nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation. **Method:** Humane endothelial cell line EA. hy926 was cultured and randomly divided into blank group, catalpol group ($0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), ox-LDL group ($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), catalpol high-dose group ($0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), and low-dose group ($0.05\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). The mRNA and protein expression levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in EA. hy926 cells were detected by RT-PCR and Western blot respectively. Viability and apoptosis ratio of EA. hy926 cells were detected by MTT and Hoechst staining respectively. NF- κ B activation was detected by Western blot and ELISA. **Result:** As compared with the blank group, EA. hy926 cells were injured very slightly in catalpol protection group, and the mRNA and protein expression levels of TNF- α and VCAM-1 were significantly reduced and NF- κ B activation was inhibited in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Therefore, catalpol can effectively reduce ox-LDL-induced inflammatory response in EA. hy926 cells, which may be related to inhibition of NF- κ B activation.

[Key words] catalpol; inflammatory factors; nuclear factor- κ B; tumor necrosis factor- α ; vascular cell adhesion molecule-1

[收稿日期] 20150918(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81300688);山东省自然科学基金项目(ZR2015HL126,ZR2011HM014);山东省中医药管理局项目(2013-237);潍坊医学院国内访学项目

[通讯作者] *刘江月,硕士,讲师,从事糖尿病血管并发症的防治研究,Tel:13626362182,E-mail:jiangyue7879@126.com

动脉粥样硬化(AS)是糖尿病大血管病变的基本病理改变。氧化应激的主要产物氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)是诱导糖尿病早期血管内皮功能障碍,启动糖尿病血管AS发展的关键因子。ox-LDL可导致内皮炎性损伤和功能障碍^[1]。核因子- κ B(NF- κ B)是炎症反应网络的枢纽,参与炎症反应过程中多种信号途径的转导^[2]。因此,通过药物调控NF- κ B的活化,对于防治ox-LDL诱导的内皮细胞炎症反应具有重要的意义。梓醇是地黄的有效活性成分-环烯醚萜类化合物^[3],具有降低血糖、保护神经等^[4-5]多种药理作用。笔者研究发现,梓醇能够保护糖尿病早期血管内皮功能^[6]。为进一步明确其作用机制,本研究通过观察梓醇对ox-LDL诱导EA.hy926细胞炎症因子的影响,从抑制NF- κ B活化的角度探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 细胞株 人脐静脉内皮细胞株 EA.hy926 购于上海拜力生物科技有限公司(美国 ATCC 公司)。

1.2 药物及试剂 梓醇对照品(上海铭睿科技有限公司,批号 110808201306);噻唑蓝(MTT);Hoechst 染色试剂盒及肿瘤坏死因子- α (TNF- α),血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)的蛋白质免疫印迹(Western blot)及逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒(碧云天生物技术研究,批号分别为 3329A29,C0003,R014A,X76446);NE-PER 细胞核及细胞质萃取试剂盒(北京益奥柏科贸有限公司,批号 78833),NF- κ B p65 试剂盒(上海通蔚实业有限公司,批号 YM-S0382);TNF- α ,VCAM-1,NF- κ B,I κ B 一抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 990392W,14J18,13A15-2,0943-1)。

1.3 仪器 DYCZ-25D 型电泳仪(北京市六一仪器厂),T100 型梯度 PCR 仪、转膜仪、凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基加入 1×10^5 U·L⁻¹ 青霉素和链霉素,于 5% CO₂ 37 °C 恒温培养箱传代培养。生长良好的 EA.hy926 细胞接种于 6 孔板,随机分为空白组,梓醇组(0.5 mmol·L⁻¹),ox-LDL 组(100 mg·L⁻¹),梓醇高剂量组(0.5 mmol·L⁻¹),梓醇低剂量组(0.05 mmol·L⁻¹)。

2.2 指标检测

2.2.1 RT-PCR 检测细胞 TNF- α , VCAM-1 mRNA 的表达 EA.hy926 细胞接种于 6 孔板,梓醇组、梓

醇高、低剂量组加入不同浓度梓醇孵育 24 h 后,ox-LDL 组、梓醇高、低剂量组加入终质量浓度 100 mg·L⁻¹ 的 ox-LDL 继续培养 24 h,收集细胞,提取总 RNA,按说明书操作合成 cDNA,进行 PCR 扩增,以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参,引物设计见表 1。

表 1 TNF- α ,VCAM-1 引物

Table 1 Primer of TNF- α , VCAM-1

基因名称	引物序列
TNF- α	上游 5'-AGTCCGGCAGACAATCCTTGCA-3'
	下游 5'-ATCCACGCGAATGACGCTCTGG-3'
VCAM-1	上游 5'-TTCCTAGCGTGTACCCCTTGACC-3'
	下游 5'-CAGAAAGAGGCTGTAGCTCCCCGT-3'

2.2.2 Western blot 检测细胞 TNF- α , VCAM-1, I κ B 及 NF- κ B p65 蛋白的表达 EA.hy926 细胞接种与药物处理同 RT-PCR 实验,收集细胞后,加入 RIPA 裂解液提取总蛋白,采用 NE-PER 细胞核及细胞质萃取试剂盒分别提取胞浆、胞核蛋白,所有蛋白电泳、转膜后,5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后加一抗(1:500),4 °C 过夜,洗涤缓冲液(TBST)漂洗 3 次,加入二抗孵育 1 h,化学发光反应,显影定影,图像分析。

2.2.3 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞 NF- κ B p65 DNA 结合活性 细胞处理同前,收集细胞后提取核蛋白,采用的 Trans AMTM NF- κ B p65 试剂盒检测 NF- κ B 的 DNA 结合活性,按试剂盒说明进行操作,于 450 nm 处测定吸光度 A。

2.2.4 MTT 法检测细胞活力 取对数生长期的 EA.hy926 细胞处理后接种于 96 孔板,每组设 6 个复孔,梓醇组、梓醇高、低剂量组加入不同浓度梓醇孵育 24 h 后,ox-LDL 组、梓醇高、低剂量组加入终质量浓度 100 mg·L⁻¹ 的 ox-LDL 继续培养 24 h。换新的培养基,加入 MTT(0.5%),继续培养 4 h 后,加入 150 μ L 二甲基亚砜(DMSO),用酶标仪 490 nm 测定 A。以空白组的细胞存活为 1,其他各组细胞相对存活率 = $A_{\text{实验组}}/A_{\text{空白组}}$ 。

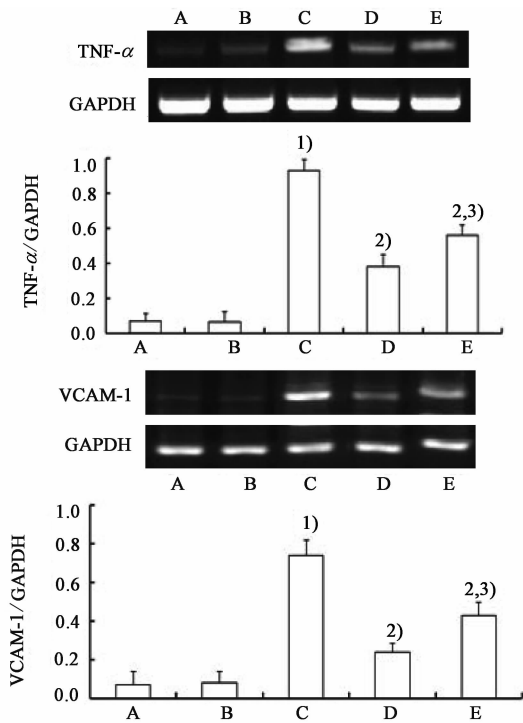
2.2.5 Hoechst 染色检测细胞凋亡 培养的细胞药物处理后,用固定液固定,加入 0.5 mL Hoechst 33258 染色液染色。荧光显微镜下观察拍照,图像分型计数胞质浓缩、染色质成团块状及凋亡小体出现的细胞比率。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间采用单因素方差分析,两组间采用 SNK-q 进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统

计学意义。

3 结果

3.1 对 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞 TNF- α , VCAM-1 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 梓醇组 TNF- α , VCAM-1 mRNA 的表达无明显变化, ox-LDL 组 TNF- α , VCAM-1 mRNA 的表达均明显上调 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 梓醇高、低剂量组明显下调 TNF- α , VCAM-1 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 且梓醇高剂量优于梓醇低剂量 ($P < 0.05$), 提示梓醇抑制 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞 TNF- α , VCAM-1 mRNA 的表达且呈剂量依赖性。见图 1。



A. 空白组; B. 梓醇组; C. ox-LDL 组; D. 梓醇 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; E. 梓醇 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组。与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 ox-LDL 组比较²⁾ $P < 0.05$; 与梓醇 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较³⁾ $P < 0.05$ (图 2 ~ 7 同)

图 1 梓醇对 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞 TNF- α , VCAM-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of catalpol on expression of TNF- α and VCAM-1 mRNA in EA. hy926 cells induced by ox-LDL ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 对 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞 TNF- α , VCAM-1 蛋白表达的影响 与空白组比较, 梓醇组 TNF- α , VCAM-1 蛋白的表达无明显变化, ox-LDL 组 TNF- α , VCAM-1 蛋白的表达均明显上调 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 梓醇高、低剂量组明显降低 TNF- α , VCAM-1 蛋白的表达 ($P < 0.05$); 与梓醇低剂量组比较, 梓醇高剂量组 TNF- α , VCAM-1 蛋白表达更明显降低 ($P < 0.05$), 提示梓醇抑制 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞 TNF- α , VCAM-1 蛋白的表达且呈剂

量依赖性。见图 2。

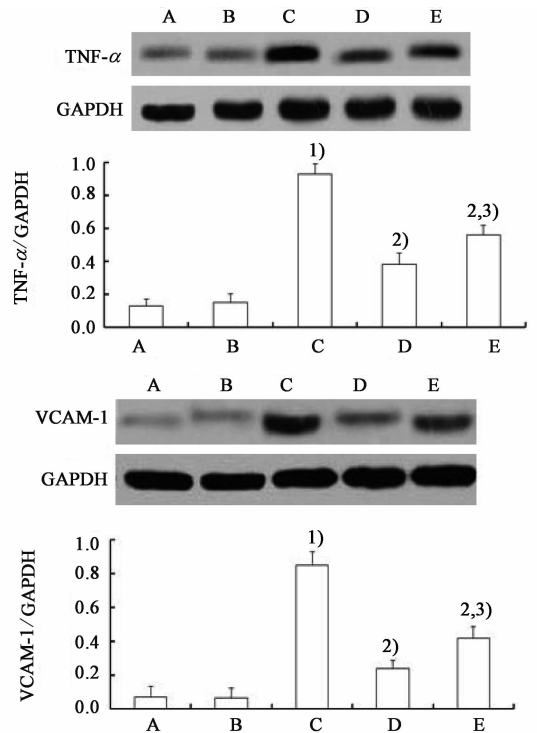


图 2 梓醇对 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞 TNF- α , VCAM-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of catalpol on expression of TNF- α and VCAM-1 protein in EA. hy926 cells induced by ox-LDL ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 对 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞 NF- κ B, I κ B 蛋白表达的影响 与空白组比较, 梓醇组核内 NF- κ B 蛋白表达无明显变化, ox-LDL 组 NF- κ B 蛋白表达明显增多 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 梓醇高、低剂量组明显降低 NF- κ B 蛋白表达, 且两组间有显著差异 ($P < 0.05$)。与空白组比较, 梓醇组 I κ B 蛋白表达无明显变化, ox-LDL 组 I κ B 蛋白表达明显增多 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 梓醇高、低剂量组明显降低 I κ B 蛋白表达, 且两组间有显著差异 ($P < 0.05$)。见图 3, 4。

3.4 对 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞 NF- κ B DNA 结合活性的影响 与空白组比较, 梓醇组 NF- κ B DNA 结合活性无明显变化, ox-LDL 组 NF- κ B 结合活性明显升高 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 梓醇高、低剂量组 NF- κ B DNA 结合活性均显著受抑制, 且两组间有显著差异 ($P < 0.05$)。见图 5。

3.5 对 oxLDL 诱导 EA. hy926 细胞损伤的影响 MTT 结果显示, 与空白组比较, 梓醇组细胞存活率无明显变化, ox-LDL 组细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 梓醇高、低剂量组明显升高细胞存活率, 且两组间有显著差异 ($P < 0.05$)。

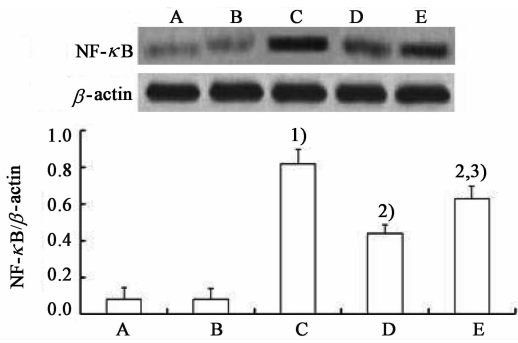


图 3 梓醇对 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞 NF-κB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of catalpol on expression of NF-κB protein in EA. hy926 cells induced by ox-LDL ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

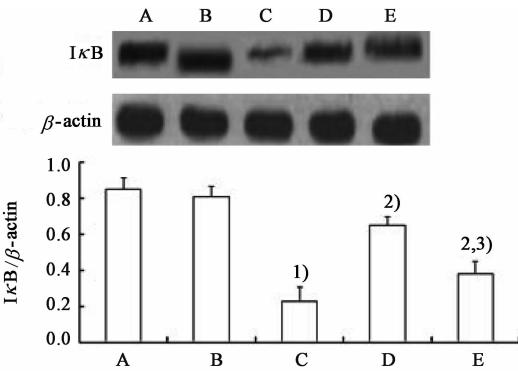


图 4 梓醇对 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞 IκB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of catalpol on expression of IκB protein in EA. hy926 cells induced by ox-LDL ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

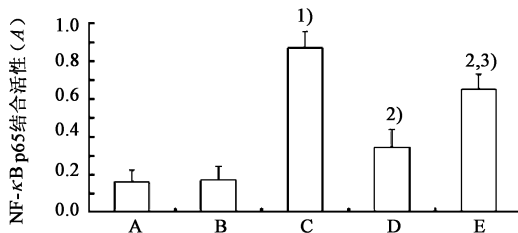


图 5 梓醇对 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞 NF-κB DNA 结合活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of catalpol on binding activity of NF-κB DNA in EA. hy926 cells induced by ox-LDL ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

见图 6。Hochest33258 染色结果显示,与空白组比较,梓醇组细胞无明显变化,ox-LDL 组细胞凋亡明显增高;与 ox-LDL 组比较,梓醇高、低剂量组明显降低细胞凋亡。见图 7。

4 讨论

血管内皮损伤是 T2DM 大血管病变的始动环节。ox-LDL 是低密度脂蛋白暴露于氧化应激环境中的主要产物,也是体内氧化应激的重要标志物。

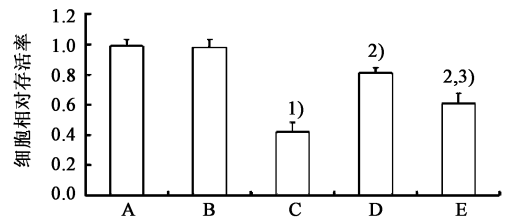


图 6 梓醇对 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of catalpol on survival rate of EA. hy926 cells induced by ox-LDL ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

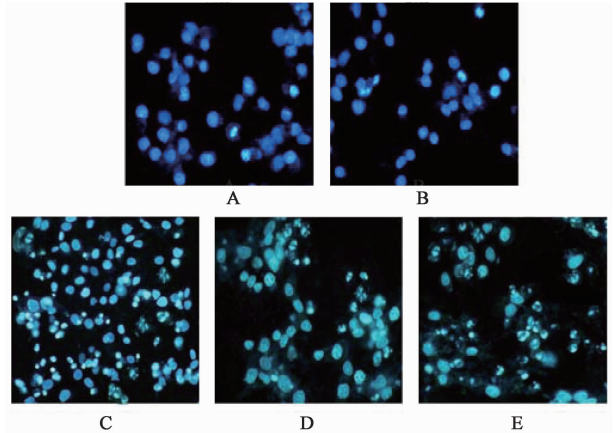


图 7 梓醇对 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞凋亡的影响 (Hochest33258, $\times 200$)

Fig. 7 Effect of catalpol on apoptosis of EA. hy926 cells induced by ox-LDL (Hochest33258, $\times 200$)

研究表明,ox-LDL 是导致 T2DM 内皮细胞损伤的关键因子之一,可导致内皮炎性损伤和功能障碍。Yi 等^[7]报道,ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞 ICAM-1 表达增多及内皮功能障碍。本研究以 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞,发现细胞生存率明显降低,凋亡显著增高,细胞受损伤明显,同时 TNF-α, VCAM-1 等炎性相关因子 mRNA 及蛋白表达均明显升高,证实了 ox-LDL 对内皮细胞的炎性损伤作用。梓醇是地黄的主要活性成分之一,具有抗氧化、抗炎等多种药理学作用,Choi 等^[8]研究发现梓醇能够抑制 AGEs 诱导的 THP-1 细胞 TNF-α, VCAM-1 的大量生成,本研究发现梓醇可剂量依赖性抑制 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞 TNF-α, VCAM-1 的表达,减轻 EA. hy926 细胞损伤,提示糖尿病时高糖高脂等代谢紊乱系通过氧化应激途径导致糖尿病早期内皮炎性损伤的发生,梓醇可能通过抑制炎症反应保护内皮细胞。

NF-κB 信号通路是对氧化应激最敏感的胞内信号传导途径,是调控转录多种炎性因子的中心环节和共同通路^[9],从转录水平上调控炎症因子、黏附

分子等的表达。研究表明, NF- κ B 信号通路活化在糖尿病及其并发症的发生中起着重要作用。Huang 等^[10]研究发现 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞 ICAM-1 和 E-selectin 的表达, 这种诱导作用可能系通过 NF- κ B 异常激活和核移位, 最终引起黏附分子、趋化因子等基因表达的上调。研究表明许多抗炎的植物化学物质是通过抑制 NF- κ B 激活减轻炎症反应。例如, 番茄红素抑制通过抑制 I κ B 磷酸化和 NF- κ B 的核移位抑制 TNF- α 诱导人脐静脉内皮细胞 ICAM-1 的表达^[11]。隐丹参酮通过抑制 NF- κ B 的核移位和活化抑制 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达^[12]。本研究结果显示梓醇呈剂量依赖性抑制 I κ B 磷酸化, NF- κ B 的核移位和 DNA 结合能力, 提示梓醇可能是通过抑制 NF- κ B 的活化发挥抗炎作用。

综上所述, 本研究首次报道了梓醇对 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞的保护作用, 其机制可能与梓醇抑制 NF- κ B 的活化减轻炎症反应有关。

[参考文献]

[1] Eren E, Yilmaz N, Aydin O, et al. Anticipatory role of high density lipoprotein and endothelial dysfunction: an overview [J]. *Open Biochem J*, 2014, 31(8): 100-106.

[2] Madonna R, De Caterina R. Relevance of new drug discovery to reduce NF- κ B activation in cardiovascular disease[J]. *Vascul Pharmacol*, 2012, 57(1): 41-47.

[3] 董焱, 陈长勋. 梓醇药理作用的研究进展[J]. *中成药*, 2013, 35(5): 1047-1051.

[4] Huang W J, Niu H S, Lin M H. Antihyperglycemic effect of catalpol in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(6): 1170-1172.

[5] Xu G, Xiong Z, Yong Y, et al. Catalpol attenuates MPTP induced neuronal degeneration of nigro-striatal dopaminergic pathway in mice through elevating glial

cell derived neurotrophic factor in striatum [J]. *Neuroscience*, 2010, 167(1): 174-184.

[6] 刘江月. 梓醇抑制 NADPH 氧化酶保护 2 型糖尿病早期血管内皮功能 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(15): 2936-2942.

[7] Yi L, Jin X, Chen C Y, et al. Chemical structures of 4-oxo-flavonoids in relation to inhibition of oxidized low-density lipoprotein (LDL)-induced vascular endothelial dysfunction [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(9): 5471-5489.

[8] Choi H J, Jang H J, Chung T W, et al. Catalpol suppresses advanced glycation end-products-induced inflammatory responses through inhibition of reactive oxygen species in human monocytic THP-1 cells [J]. *Fitoterapia*, 2013, 86(1): 19-28.

[9] Aguilar E C, Leonel A J, Teixeira L G, et al. Butyrate impairs atherogenesis by reducing plaque inflammation and vulnerability and decreasing NF- κ B activation [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2014, 24(6): 606-613.

[10] Huang C S, Lin A H, Yang T C, et al. Shikonin inhibits oxidized LDL-induced monocyte adhesion by suppressing NF- κ B activation via up-regulation of PI3K/Akt/Nrf2-dependent antioxidation in EA. hy926 endothelial cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 93(3): 352-361.

[11] Hung C F, Huang T F, Chen B H, et al. Lycopene inhibits TNF-R-induced endothelial ICAM-1 expression and monocyte-endothelial adhesion [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 586: 275-282.

[12] Ang K P, Tan H K, Selvaraja M, et al. Cryptotanshinone attenuates *in vitro* oxLDL-induced prelesional atherosclerotic events [J]. *Planta Med*, 2011, 77(16): 1782-1787.

[责任编辑 周冰冰]