

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

李晨, 赵爽, 徐旖旎, 陈妍, 沈祥春*, 张彦燕*

(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(EOFAZ)对转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)间质转分化的干预保护作用。方法:采用TGF- β_1 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 孵育48 h)诱导建立内皮-间质转化(EndMT)细胞模型。实验分组为正常组,模型组($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1),EOFAZ高剂量组($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 + $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EOFAZ)及EOFAZ低剂量组($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 + $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EOFAZ)。EOFAZ于造模前干预给药2 h,加入TGF- β_1 共孵育复制EndMT细胞模型。倒置显微镜下观察细胞形态,划痕实验分析细胞迁移能力,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测EOFAZ对内皮细胞特异性标志物血管内皮细胞钙黏素(VE-cadherin),间充质细胞特异性标志物 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),锌指转录因子(Snail)及核转录因子- κ B(NF- κ B) p-p65蛋白表达的影响。结果:TGF- β_1 诱导孵育后,细胞形态多呈长梭形,并可见明显的细胞丝状伪足,细胞间的紧密连接减少;划痕实验结果表明模型组细胞迁移能力增强($P < 0.01$);VE-cadherin蛋白表达显著减少($P < 0.01$), α -SMA,Snail,NF- κ B p-p65蛋白表达量明显增多($P < 0.01$)。EOFAZ高、低剂量组干预给药后,能够明显抑制TGF- β_1 诱导的细胞迁移能力($P < 0.01$),同时能增加VE-cadherin的表达,降低 α -SMA,Snail及NF- κ B p-p65蛋白的表达。结论:艳山姜挥发油对TGF- β_1 诱导的HUVECs间质转分化具有干预保护作用,其机制与抑制NF- κ B p65的磷酸化激活有关。

[关键词] 艳山姜挥发油; 转化生长因子- β_1 ; 人脐静脉内皮细胞; 内皮-间质转化; 核转录因子- κ B; 划痕实验

[中图分类号] R285.5;R945;TG115.21+5.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)22-0160-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017220160

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1115.008.html>

[网络出版时间] 2017-09-06 11:15

Protective Effect of Essential Oil from Fructus *Alpinia zerumbet* Against Endothelial-mesenchymal Transition in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by TGF- β_1

LI Chen, ZHAO Shuang, XU Yi-ni, CHEN Yan, SHEN Xiang-chun*, ZHANG Yan-yan*

(Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicinal Resources, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effect of essential oil from fructus *Alpinia zerumbet* (EOFAZ) on endothelial-mesenchymal transition (EndMT) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1). **Method:** HUVECs were cultured *in vitro* and the EndMT cell model was reproduced by $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 incubated for 48 h. The experiment was divided into four groups, such as normal group, model group ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1), EOFAZ high dose group ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 + $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EOFAZ) and EOFAZ low dose group ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 + $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EOFAZ). After pre-incubation

[收稿日期] 20170429(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102664,81560811);贵州省高等学校科技创新人才团队建设项目(黔教合人才团队字[2014]31);贵州省高层次创新型人才百层次人才项目(黔科合人才[2015]4029号)

[第一作者] 李晨,在读硕士,从事心血管药理学研究,E-mail:243268459@qq.com

[通讯作者] *张彦燕,硕士,副教授,从事心血管系统药物药理研究,Tel:0851-88416149,E-mail:chinazyzy201@163.com;

*沈祥春,博士,教授,从事心血管药物药理与功能天然产物化学生物学研究,Tel:0851-88416149,E-mail:sex@gmc.edu.cn

with EOFAZ ($4, 2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) for 2 h, the EndMT cell model was reproduced. The cell morphology was observed under inverted microscope, and the cell migration ability was analyzed by scratch test. Western blot was used to detect the specific protein expression of vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), α -smooth muscle actin (α -SMA), zinc finger transcription factor (Snail) and nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) p-p65. **Result:** After incubation with TGF- β_1 , the cell morphology of HUVECs was long spindle shape with visible cells of filamentous pseudopodia, the close connection between cells were reduced, and the cell migration ability of the model group was significantly increased ($P < 0.01$), and the protein expression of VE-cadherin were down-regulated significantly ($P < 0.01$). On the contrary, the expression of α -SMA, Snail and NF- κ B p-p65 was significantly increased ($P < 0.01$). Pretreatment with high dose of EOFAZ, the cell migration ability was significantly inhibited; meanwhile, the expression of VE-cadherin was significantly increased ($P < 0.01$), and expression of α -SMA, Snail and NF- κ B p-p65 protein were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** EOFAZ has protective effect on EndMT in HUVECs induced by TGF- β_1 , and the mechanism is related to inhibition of phosphorylation of NF- κ B p65.

[**Key words**] essential oil from fructus *Alpinia zerumbet*; transforming growth factor- β_1 ; human umbilical vein endothelial cells; endothelial-mesenchymal transition; nuclear transcription factor- κ B; scratch test

内皮-间质转化 (endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT) 属于上皮-间质转化的特殊类型,其主要特征是内皮细胞间丢失黏附连接及极性,向间充质细胞发生转化的过程,并获得间充质细胞表型,细胞迁移能力及分泌胶原能力增加^[1]。研究报道,间充质细胞除了由成纤维细胞及肌成纤维细胞组成,还可大部分由内皮细胞通过 EndMT 过程向间充质细胞转分化,进一步导致血管内皮功能紊乱,成为动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的重要危险因素之一^[2]。研究表明转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 是诱发 EndMT 的强效因子^[3],因此,本研究以 EndMT 为切入点,利用 TGF- β_1 诱导人脐静脉内皮细胞建立 EndMT 模型,积极寻找和发现对 EndMT 具有干预调控作用的创新药物,可能是防治 AS 的有效途径之一。

艳山姜是姜科山姜属植物的干燥成熟果实^[4],是贵州少数民族的习用药物,具有温中燥湿、行气止痛、截疟之功效^[5]。艳山姜主要成分为挥发油和黄酮类等,具有抗氧化、抗炎及抗动脉粥样硬化等药理作用。近年来,本课题组开展了大量关于艳山姜挥发油的心血管药理活性研究工作,证实其主要通过调控血管内皮功能稳态来发挥保护作用。前期研究发现艳山姜对脂多糖诱导损伤的内皮细胞具有保护作用,对自发性高血压大鼠胸主动脉血管纤维化重构具有抑制作用,作用机制均与抑制核转录因子- κ B (NF- κ B) 的激活有关。国内外研究显示 NF- κ B 为调控 EndMT 的关键因子,故本课题组推测艳山姜挥发油是否基于调控 NF- κ B 信号来介导 EndMT 过

程,进而发挥其保护内皮功能的稳态作用,目前未见相关研究报道。

本实验采用 TGF- β_1 诱导人脐静脉内皮细胞发生内皮-间质转分化的细胞模型,观察细胞形态学变化、细胞迁移能力、细胞内皮及间充质标志物的表达,分析锌指转录因子 (Snail) 及 NF- κ B 表达,探讨艳山姜挥发油对血管内皮细胞发生间质转分化的保护作用,为艳山姜资源的合理利用与开发提供实验依据。

1 材料

80-2 型离心机 (上海手术器械厂), XDS-1B 型实验室倒置显微镜 (重庆光电仪器有限公司), CFX 型凝胶成像系统仪和 170-3930 型垂直电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司), IX51 型免疫荧光显微镜 (美国 Olympus 公司)。

艳山姜采集自贵州省贞丰县连环乡,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副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挥发油,计算得率 1.0%^[6];准确称取艳山姜挥发油溶于少量二甲基亚砜 (DMSO) 中,加入培养基配制 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 母液,过滤除菌后于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,用时以培养基稀释至不同质量浓度 (DMSO 质量分数 $< 0.2\%$)。人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 和内皮细胞培养液、胰蛋白酶、冻存液 (美国 Sciencell 公司,批号分别为 19195, 21429, 1804461, 19671), 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1 , 美国 Peprotech 公司,批号 0716209-1), 血管内皮细胞钙粘素 (VE-cadherin) 及锌指转录因子 (Snail) 抗体 (美

国 CST 公司,批号分别为 D87F2, C15D3), α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 抗体 (英国 Abcam 公司,批号 ab32575), β -肌动蛋白 (β -actin, 美国艾菲公司,批号 T0022)。

2 方法

2.1 分组及给药 传代培养 HUVECs, 分为 4 组, 分别为正常组 [内皮细胞培养基 (ECM), pH 7.2 ~ 7.5], 模型组 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β_1 , 48 h), 艳山姜挥发油 (EOFAZ) 高剂量组 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β_1 + $4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EOFAZ), EOFAZ 低剂量组 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β_1 + $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EOFAZ)。待细胞长至 85% 左右, 采用含 2% 胎牛血清的培养基同步化 12 h, EOFAZ 干预保护 2 h 后加入 TGF- β_1 共孵育 48 h 复制内皮-间质转化的细胞模型。

2.2 倒置显微镜观察细胞形态学改变 取对数生长期的细胞制成悬液, 以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁生长至融合状态, 按 2.1 项下方法分组给药, 并置于倒置显微镜下进行形态学观察、拍照。

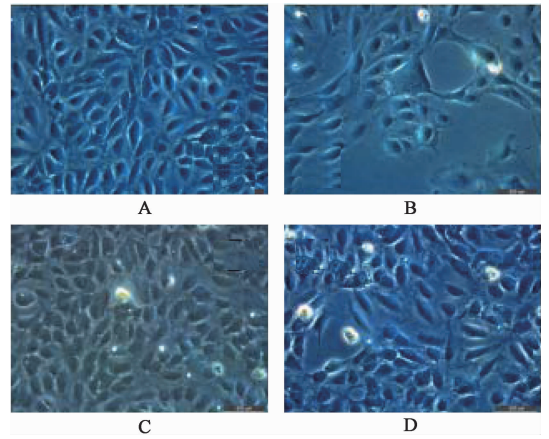
2.3 划痕实验分析细胞迁移能力 将细胞悬液以 1×10^4 个/孔接种于 24 孔板中, 细胞覆盖率达 80% 左右, 按 2.1 项下方法分组给药处理。采用 $10 \mu\text{L}$ 的微量移液枪在 24 孔板内垂直划痕, 用磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4, 下同) 洗涤 3 次, 随后更换含 10% 血清的完全培养基于倒置显微镜下观察 0 ~ 24 h 细胞迁移情况。随机选择 5 个标记点, 选取 12 h 细胞迁移情况进行数据测定并计算迁移率。迁移率 = (0 h 划痕距离平均值 - 12 h 划痕距离平均值) / 0 h 划痕距离平均值。

2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 分析相关蛋白的表达 各组细胞处理后分别经预冷 PBS 冲洗 3 次, 加入细胞裂解液 [含 $100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲基磺酰氟 (PMSF)] 提取细胞总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取蛋白样品 $30 \mu\text{g}$ 进行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 分离并转移至聚偏氟乙烯膜, 1% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h。加入一抗 (1:1 000) 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶偶联的二抗 (1:5 000), 室温孵育 1 h, 增强化学发光法 (ECL) 暗室显影。利用 ImageLab 4.0 软件分析条带灰度值。

2.5 统计分析 各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理。采用 Student's *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 EOFAZ 对 TGF- β_1 诱导 HUVECs 形态变化的影响 正常组细胞生长融合后呈铺路石状排列, 细胞间连接紧密; TGF- β_1 诱导后细胞形态多为长梭形, 并可见较明显的细胞丝状伪足伸出, 细胞间连接减少; EOFAZ 给药后细胞形态可不同程度地接近于正常组。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. EOFAZ 高剂量组; D. EOFAZ 低剂量组 (图 2, 3 同)

图 1 EOFAZ 对 TGF- β_1 诱导 HUVECs 形态学的影响 ($\times 200$)

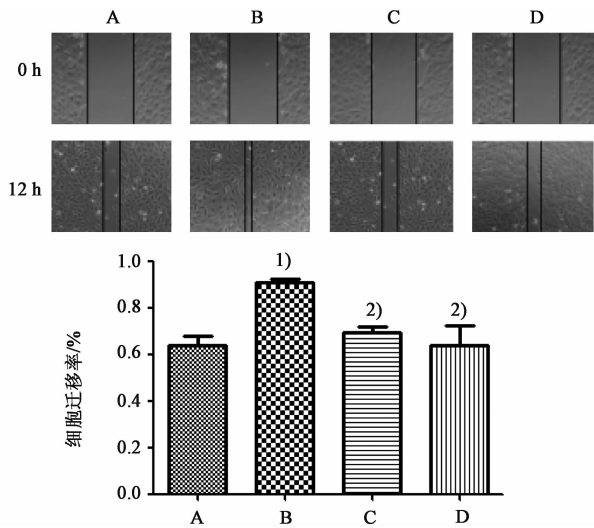
Fig. 1 Effect of EOFAZ on cell morphology of HUVECs induced by TGF- β_1 ($\times 200$)

3.2 EOFAZ 对 TGF- β_1 诱导 HUVECs 迁移能力的影响 正常组, 模型组, EOFAZ 高、低剂量组 12 h 细胞迁移率分别为 (63.9 ± 4.5)%, (90.8 ± 1.0)%, (69.2 ± 2.0)%, (64.0 ± 6.1)%。TGF- β_1 作用后细胞迁移能力显著增加 ($P < 0.01$); 预先给予 EOFAZ 孵育后, 与模型组比较, EOFAZ 高、低剂量组细胞迁移能力明显降低 ($P < 0.01$)。见图 2。

3.3 EOFAZ 对内皮细胞相关蛋白表达的影响 内皮细胞经 TGF- β_1 诱导后, 与正常组相比, VE-cadherin 表达显著降低 ($P < 0.01$), α -SMA, Snial 及 NF- κ B p-p65 的表达显著增加 ($P < 0.01$); EOFAZ 高剂量组干预作用后, 与模型组比较, 能够明显增加内皮标志物 VE-cadherin 的蛋白表达 ($P < 0.01$), 降低间充质标志物 α -SMA, Snial 及 NF- κ B p-p65 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。见图 3。

4 讨论

血管内皮细胞是血液及血管壁之间的屏障, 研究发现血管内皮结构及功能障碍贯穿于心血管疾病的发生发展过程中^[7]。血管内皮细胞在细胞因子的作用下可向间充质细胞转分化, 细胞形态由长梭



与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (图 3 同)
图 2 EOFAZ 对 $TGF-\beta_1$ 诱导 HUVECs 12 h 后迁移率的影响
Fig. 2 Effect of EOFAZ on cell migration rate of HUVECs induced by $TGF-\beta_1$ after 12 h

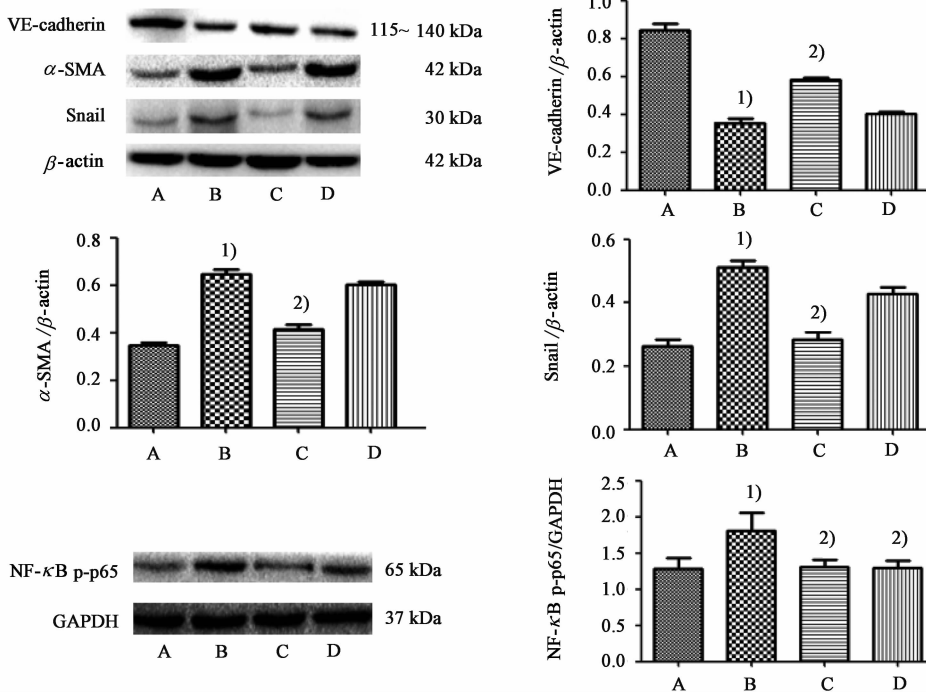


图 3 EOFAZ 对 $TGF-\beta_1$ 诱导 HUVECs 中 VE-cadherin, α -SMA, Snail 及 NF- κ B p-p65 表达的影响
Fig. 3 Effect of EOFAZ on VE-cadherin, α -SMA, Snail and NF- κ B p-p65 expression of HUVECs induced by $TGF-\beta_1$

转录因子 Snail, 锌指 E 盒结合的同源盒蛋白 1 (ZEB1), ZEB2 的表达, 从而诱导参与 EndMT 全过程^[13], 可见 NF- κ B 对诱导和维持 EndMT 过程非常重要^[14]。因此, 本研究以 $TGF-\beta$ /NF- κ B 信号为切入点, 分析 EOFAZ 对 EndMT 过程的干预作用。

前期研究发现, 采用 EOFAZ ($4, 2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理内皮细胞 1.5 ~ 2.5 h 可明显提高内皮细胞存活率, 且其作用无明显差异, 故选择 EOFAZ 预孵育 2 h

形转变为纤维纺锤形, 其分子表型和功能发生明显改变, 内皮细胞特异性蛋白 VE-cadherin 表达减少^[8], 而间质细胞特异性蛋白 α -SMA 表达增多^[9], 促使血管内皮细胞的表型转化, 同时迁移能力进一步增强, 其表型和功能均向成纤维细胞发展。

$TGF-\beta$ 可与其位于细胞膜表面的 II 型受体 ($T\beta R II$) 结合, 并与其 I 型受体 ($T\beta R I$) 形成异聚体复合物, 启动 Smad 依赖和非依赖的信号转导通路, 发挥触发 EndMT 的关键分子作用^[10]。转录生长因子 Snail 属于锌指蛋白家族一员, 其靶基因为 VE-cadherin, 能够直接抑制 VE-cadherin 的表达, 从而被认为是 EndMT 的转录调控因子^[11]。在内皮微环境下, 当细胞受到损伤刺激时, NF- κ B 的抑制蛋白 (I κ B) 磷酸化, NF- κ B 得以激活并移位进入细胞核, 促进 $TGF-\beta$ 转录并持续活化 $TGF-\beta$, 上调 $TGF-\beta$ 的表达水平^[12]。另有研究发现 NF- κ B 可促进 EndMT

进行给药处理^[15-16]。应用 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $TGF-\beta_1$ 刺激细胞 24, 48, 72 h 后, 预试验发现 $TGF-\beta_1$ 孵育 48 h 及 72 h 后, 呈现出典型的 EndMT 形态及分子表型异变, 故以 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $TGF-\beta_1$ 刺激 48 h 作为复制 EndMT 的模型条件。 $TGF-\beta_1$ 刺激后可诱导细胞形态由铺路石样向伪纺锤状转变, 并伴有明显的细胞丝状伪足伸出, 迁移能力明显增强, 上调了细胞间充质标志物 α -SMA 及下调 VE-cadherin 的表达, 这些

结果与内皮细胞间质转分化特征一致,表明本研究采用 TGF- β_1 成功建立了 EndMT 细胞模型。给予 EOFAZ 干预保护后,均能够不同程度地抑制上述 EndMT 的系列表型转化。有研究证实 EndMT 的信号转导机制主要是通过 TGF- β_1 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 介导的 TNF- α -NF- κ B-Snail 以及 TGF- β_1 -Smad-Snail 这 2 条途径,Snail 蛋白在其中起着关键性作用^[17]。本研究结果表明经 TGF- β_1 诱导后内皮细胞 NF- κ B p-p65 及 Snail 蛋白的表达增加,而给予 EOFAZ 作用之后可显著抑制 NF- κ B p-p65 的激活,降低 Snail 的蛋白表达。综上所述,EOFAZ 对 TGF- β_1 诱导的 EndMT 具有保护作用,其机制与抑制 NF- κ B p65 的磷酸化激活有关。但内皮间质转分化的关键分子信号机制及艳山姜的干预保护作用机制还有待进一步研究证实。

[参考文献]

[1] CHEN P Y, QIN L F, Baeyens N, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(12):4514-4528.

[2] WANG Z J, HAN Z J, JUN T, et al. Role of endothelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- β_1 in transplant kidney interstitial fibrosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, doi:10.1111/jcmm.13157.

[3] 何光庭,吴洁,黄巧冰. 内皮细胞间质转化的信号调节和生物学意义 [J]. *中国循环杂志*, 2016, 31(6):662-624.

[4] 《贵州植物志》编辑委员会. 贵州植物志. 第4卷 [M]. 成都:四川民族出版社,1989:700-702.

[5] 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,2003:187.

[6] 沈祥春,胡涵帅,肖海涛. GC-MS 发分析艳山姜根茎、茎、叶及果实等部位挥发油化学成分 [J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(8):1399-1403.

[7] Thakor P, SONG W Z, Subramanian R B, et al. Maslinic acid inhibits proliferation of renal cell carcinoma cell lines and suppresses angiogenesis of endothelial cells [J]. *J Kidney Cancer VHL*, 2017, 4(1):16-24.

[8] LI C, DONG F, JIA Y, et al. Notch signal regulates corneal endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(3):786-795.

[9] Medici D, Potenta S, Kalluri R. Transforming growth factor- β_2 promotes Snail-mediated endothelial-to-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling [J]. *Biochem J*, 2011, 437(3):515-520.

[10] 彭敏恋,戴爱国,蒋永亮,等. 内皮间质转化的信号机制 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(12):2382-2385.

[11] WU Y, DENG J, Rychahou P G, et al. Stabilization of snail by NF- κ B is required for inflammation-induced cell migration and invasion [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(5):416-428.

[12] CHEN B C, WAN W L. PKC-and ERK-dependent activation of I κ B kinase by lipopolysaccharide in macrophages; enhancement by P2Y receptor-mediated CaMK activation [J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 134(5):1055-1065.

[13] Freudlsperger C, BIAN Y, Contag W S, et al. TGF- β and NF- κ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers [J]. *Oncogene*, 2013, 32(12):1549-1559.

[14] Pérez L, Muñoz-Durango N, Riedel C A, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition: cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2017, 33:41-54.

[15] 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.

[16] 文波,令狐克刚,徐旖旎,等. 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 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(22):112-115.

[17] 李雨薇,吴焕滢,施茵. 转录因子 Snail 在肠上皮间质转化中的调控作用 [J]. *世界华人消化杂志*, 2016, 24(1):81-88.

[责任编辑 刘德文]