

脉络宁注射液对脂多糖诱导人脐静脉内皮细胞的 NF- κ B/TF 通路的影响

王桂香¹, 邓敏贞², 黎同明^{2*}

(1. 广东药学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] 目的: 研究脉络宁注射液对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 的核转录因子- κ B (NF- κ B)/组织因子 (tissue factor, TF) 通路的干预作用。方法: HUVECs 在 5% CO₂ 37 °C 条件培养于含 10% 胎牛血清、0.5% 双抗和 10 μ g·L⁻¹ 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的 DMEM 低糖培养基中, 5 mg·L⁻¹ LPS 诱导 HUVECs 24 h 后形成的炎症细胞模型, 采用 MTT 法观察脉络宁注射液对炎症细胞模型活性的影响, 从而确定脉络宁治疗组的低、中、高剂量; 采用 ELISA 法检测白介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的活性; 采用 Western blotting 检测 NF- κ B 和 TF 的含量。结果: 与模型对照组比较, 脉络宁治疗组的作用增加显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但在 12 mg·L⁻¹ 后有趋于平稳或下降, 则确定脉络宁低、中、高剂量组分别是 4, 8, 12 mg·L⁻¹; 脉络宁各剂量组的 IL-6 和 TNF- α 的含量都有显著降低 ($P < 0.01$) 和显著降低炎症细胞模型的 NF- κ B 和 TF 的蛋白表达 ($P < 0.01$)。结论: 脉络宁注射液的抗炎作用与其拮抗 NF- κ B/TF 活化有一定的关系。

[关键词] 脉络宁注射液; 脂多糖; 人脐静脉内皮细胞; 核转录因子- κ B; 组织因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2014) 03-0133-04

[doi] 10.11653/syfyj2014030133

Intervention Effects of Mailuoning Injection on NF-kappa B and Tissue Factor Pathway of Umbilical Vein Endothelial Cells of Human Induced by Lipopolysaccharide

WANG Gui-xiang¹, DENG Min-zhen², LI Tong-ming^{2*}

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the intervention effects of Mailuoning injection on the nf-kappa B (NF- κ B) and tissue factor (TF) pathway of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Method:** HUVECs were cultured in a low-glycemic DMEM containing 10% fetal bovine serum, 0.5% penicillin and streptomycin and 10 μ g·L⁻¹ basic fibroblast growth factor (bFGF) at 37 °C. The inflammation cell model of HUVECs was induced by 5 mg·L⁻¹ LPS treatment for 24 hours. The activity of the inflammatory cell model after the treatment of Mailuoning injection was observed by MTT, so as to determine the low, middle, high doses group on Mailuoning injection. And the activities of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were detected by ELISA. Besides, using Western blotting for detection of NF- κ B and TF content. **Result:** Compared with the model group, effect of Mailuoning in treatment group increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). But the effect was stable or falling at the dose of 12 mg·L⁻¹, so the low,

[收稿日期] 20130516(004)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目 (K2100027)

[第一作者] 王桂香, 博士, 讲师, 从事中西医结合药理研究, E-mail: wgx306@aliyun.com

[通讯作者] * 黎同明, 教授, 从事中医方剂学研究, E-mail: ltmwqx@aliyun.com

middle and high dose group of Mailuoning was determined as 4, 8, 12 mg·L⁻¹, respectively. The level of IL-6 and TNF- α and the NF- κ B and TF protein expression of the inflammatory cell model were significantly reduced by each dose group of Mailuoning ($P < 0.01$). **Conclusion:** Mailuoning injection has a certain relationship between the anti-inflammatory effect and its antagonist of NF- κ B and TF.

[**Key words**] Mailuoning injection; lipopolysaccharide; human umbilical vein endothelial cell; NF- κ B; TF

脉络宁注射液是在著名医方“四妙勇安汤”的基础上,以中医理论为指导,采用中西医结合的方法研究成的中药复方注射剂,由金银花、牛膝、玄参、石斛组成,具有清热养阴、活血化瘀、补益肝肾的功效,临床用于心脑血管缺血和血栓性疾病^[1]。鉴于核转录因子(NF- κ B)的活化与炎症反应、动脉粥样硬化等疾病的密切关系^[2],本实验研究以人脐静脉内皮细胞为平台,以炎症信号通道蛋白为靶点,从分子药理学角度上探讨脉络宁注射液干预致炎因子脂多糖(LPS)诱导NF- κ B(p65)和组织因子(TF)表达及白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的变化水平,试图阐明脉络宁注射液抗炎的分子机制。

1 材料

1.1 细胞株 人脐静脉内皮细胞株(由暨南大学提供)。

1.2 药物与试剂 脉络宁注射液(金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂,批号20111243);脂多糖(LPS,美国Sigma公司,来源于大肠杆菌0111:B4);DMEM/LOW GLUCOSE(1X)(HyClone, Thermo,批号NXC0600);0.25% Trypsin-EDTA(Gibco,批号1079100);双抗(penicillin-streptomycin solution, HyClone, Thermo,批号J112381);碱性成纤维细胞生长因子(bFGF,美国Peprotech公司,批号0704CY081);无支原体胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号110629);MTT(美国Sigma公司);PBS磷酸缓冲液(1 \times , HyClone, Thermo,批号NXB0572);Anti-NF- κ B p65 antibody和Anti-TF antibody(Abcam公司);GAPDH一抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号980592W);二抗:Goat Anti-Mouse IgG(北京博奥森生物技术有限公司,批号900407);RIPA裂解液(强)(碧云天生物技术研究,批号P0013B);苯甲基磺酰氟(PMSF, Amresco,批号0754);BCA试剂盒(Pierce, Thermo,批号LK151115);SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5 \times ,碧云天生物技术研究);ECL超敏发光液(PIERCE,批号EC60534);Human-TNF- α (Biovalue,批号BV-E12052507);Human-IL-6(Biovalue,批号

BV-E12052506)。

1.3 仪器 CT14RD高速低温冷冻离心机(上海天美科学仪器有限公司);RT-2100酶标仪(北京五洲东方科技发展有限公司);电泳装置和转膜装置(美国Bio-Rad)。

2 方法

2.1 细胞培养 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)在5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C条件培养于含10%胎牛血清0.5%双抗和10 μ g·L⁻¹碱性bFGF的DMEM低糖培养基中,待细胞长至80%~90%的密度时,以0.25%胰蛋白酶和0.2%EDTA混合液消化约2min后传代。按上述常规方法培养ECV304细胞株,在脉络宁注射液干预5mg·L⁻¹LPS诱导HUVEC24h后形成的致炎模型实验中,均以等体积的DMEM作空白对照。

2.2 脉络宁注射液作用浓度的选择 已种植在96孔板的细胞,贴壁生长,密度达80%以上后,将培养液(含血清)替换为不含血清的培养液,在此条件下培养24h。再换为1.0mg·L⁻¹LPS的24h后,加入含4,6,8,12,15,30mg·L⁻¹的脉络宁注射液的含血清的细胞培养液。加脉络宁注射液的72h后,每孔加入0.5%新配置的MTT试液20 μ L,放回培养箱中培育。加入MTT4h后,抽干96孔板中的药液,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μ L,使结晶物充分溶解后放入酶标仪,测定其在490nm的吸光度(A)。

2.3 细胞处理 取对数生长期细胞,以1 \times 10⁵/孔接种于6.0孔板,稳定24h后更换培养基。用无血清培养基培养24h作为空白对照组。模型对照组用无血清培养基培养24h,然后加入5mg·L⁻¹LPS孵育24h,脉络宁治疗组分别加入用刷选出的低、中、高浓度的脉络宁注射液预孵育72h,然后加入5mg·L⁻¹LPS孵育24h。给予相应处理后,收集细胞培养液的上清液,用于检测IL-6和TNF- α ,以及收集细胞于-80 $^{\circ}$ C冰箱冻存,用于检测NF- κ B和TF蛋白表达。

2.4 各组细胞总蛋白的提取 上述5组中的细胞,

加入 500 μ L 新鲜配制的冷冻的细胞裂解溶液 [1 mL裂解液加 10 μ L PMSF(100 mmol \cdot L⁻¹)],震荡 15 s,冰浴 10 min,每 10 min,震荡 15 s,共30 min。在 4 $^{\circ}$ C 中 14 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,收集上清液 -80 $^{\circ}$ C 保存。

2.5 生化指标测定 各组细胞培养液,采用竞争性抑制法检测 IL-6 和固相夹心法检测 TNF- α ,严格按酶联免疫分析试剂盒说明书操作。

2.6 Western blotting 检测 NF- κ B 和 TF 的蛋白 提取各组细胞总蛋白,通过 BCA 试剂盒测定总蛋白含量后,每样品 (10 μ g) 16 μ L 与 SDS 上样缓冲液 (5 \times)4 μ L 混匀,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,进行 10% SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白样品,电泳 (恒压 80 V, 20 min,待样品跑完压缩胶;恒压 120 V,80 min,溴酚蓝跑出胶)后经转膜仪 (恒流 200 mA,40 min) 转移至 PVDF 膜 (用前需用甲醇活化 5 min),含脱脂奶粉的封闭液室温封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次, NF- κ B (1:800)、TF(1:800) 和 GADPH(1:2 000) 一抗 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, TBST 洗 3 次,每次 10 min, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗 (1:5 000) 室温反应 2 h, TBST 洗 3 次,每次 10 min,经 ECL 试剂盒中 A、B 液作用, X 线片放射自显影,显影后通过 Quantity One 软件进行扫描摄像、图像灰度分析,计算目的基蛋白与内参 GADPH 的灰度比值,以表示目的蛋白相对含量。

2.7 统计学处理 所有结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据用 SPSS 17.0 统计软件处理,组间采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异特别显著。

3 结果

3.1 对 LPS 诱导的炎症细胞模型作用浓度 与模型对照组比较,脉络宁治疗组 4, 6, 8 mg \cdot L⁻¹ 质量浓度的细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$), 12, 30 mg \cdot L⁻¹ 质量浓度的存活率也有显著差异 ($P < 0.05$), 见表 1。后续实验脉络宁低、中、高剂量组分别是 4, 8, 12 mg \cdot L⁻¹。

3.2 对 LPS 诱导炎症细胞模型生化指标的影响 与空白对照组比较,模型对照组的 IL-6, TNF- α 的含量都有显著增加 ($P < 0.01$); 与模型对照组比较,脉络宁各剂量组的 IL-6, TNF- α 的含量都有显著降低 ($P < 0.01$), 且都呈量-效依赖变化, 见表 2。

3.3 对 LPS 诱导的炎症细胞模型的 NF- κ B, TF 表达的影响 与空白对照组比较,模型对照组的 NF- κ B, TF 的蛋白表达明显提高 ($P < 0.01$), 表现为条

表 1 脉络宁注射液对 LPS 诱导的炎症细胞模型的作用浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

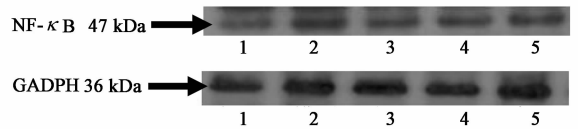
组别	质量浓度/mg \cdot L ⁻¹	A
空白对照	-	0.050 \pm 0.042
模型对照	-	0.806 \pm 0.049 ¹⁾
脉络宁注射液	4	1.162 \pm 0.588 ³⁾
	6	1.258 \pm 0.125 ³⁾
	8	1.326 \pm 0.376 ³⁾
	12	1.427 \pm 0.416 ³⁾
	15	1.222 \pm 0.645
	30	1.179 \pm 0.349 ²⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型对照组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

表 2 脉络宁注射液对 LPS 诱导炎症细胞模型的

组别	剂量/mg \cdot L ⁻¹	IL-6、TNF- α 影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)	
		IL-6	TNF- α
空白对照	-	0.34 \pm 0.15	0.24 \pm 0.21
模型对照	-	4.46 \pm 0.25 ¹⁾	4.19 \pm 0.18 ¹⁾
脉络宁	4.00	2.77 \pm 0.14 ³⁾	2.28 \pm 0.19 ³⁾
	8.00	1.55 \pm 0.17 ³⁾	1.69 \pm 0.18 ³⁾
	12.00	0.62 \pm 0.12 ³⁾	0.78 \pm 0.11 ³⁾

带相对宽,密度大,颜色深,;与模型组对照比较,脉络宁各剂量可以显著降低炎症细胞模型的 NF- κ B, TF 的蛋白表达 ($P < 0.01$), 表现为条带相对较窄,密度较小,颜色较浅,。内参 GAPDH 的蛋白条带宽度、灰度一致,说明各上样孔中总蛋白量相当,见图 1~2,表 3。



1. 空白对照组;2. 模型组;3~5. 脉络宁注射液 4, 8, 12 mg \cdot L⁻¹ 组 (图 2 同)

图 1 脉络宁注射液对 LPS 诱导炎症细胞模型的 NF- κ B 蛋白相对表达的影响

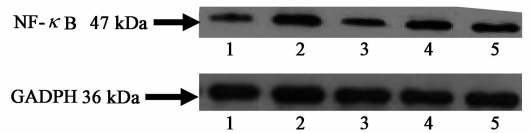


图 2 脉络宁注射液对 LPS 诱导炎症细胞模型的 TF 蛋白相对表达的影响

4 讨论

脉络宁注射液具有滋补肝肾、养阴清热、活血化瘀功效,对肝肾阴虚、阴虚内热、瘀血阻滞证有效,对

表 3 脉络宁注射液对 LPS 诱导炎症细胞模型的 NF-κB, TF 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	NF-κB/GAPDH	TF/GAPDH
空白对照	-	0.52 ± 0.04	0.62 ± 0.05
模型对照	-	0.90 ± 0.06 ¹⁾	0.98 ± 0.07 ¹⁾
脉络宁	4.00	0.78 ± 0.05 ²⁾	0.88 ± 0.06 ²⁾
	8.00	0.75 ± 0.07 ²⁾	0.80 ± 0.08 ²⁾
	12.00	0.65 ± 0.06 ³⁾	0.73 ± 0.07 ³⁾

肝阳亢盛所致中风疗效显著^[3-4]。

在炎症相关疾病致病过程中,均可发现 NF-κB 呈过度激活,大量胞浆内的 NF-κB 复合物易位进入细胞核内,诱导前炎症介质、炎症介质和免疫相关基因的转录与表达^[5]。目前证实,NF-κB 可诱导细胞因子(如 TNF-α, IL-1β 和 IL-6)等至少包括 27 种不同炎症靶基因的过度或持续表达,进而趋化大量的中性粒细胞等炎性细胞浸润、聚积于炎症部位,诱导产生如一氧化氮和前列腺素等炎性效应分子,最终造成炎症反应^[6-8]。而 IL-6 作为一个重要的炎性因子,在炎症反应、抗感染及损伤等过程中发挥多种生物学作用^[9],TNF-α 是炎症反应中起主导作用的炎性因子,可导致血管损伤和血栓形成^[10]。人脐静脉内皮细胞是血管的重要组成部分,在致炎因子刺激下被活化的 NF-κB 炎症信号通道靶分子即可释放大量炎症介质,同时促进多种细胞黏附分子、趋化因子及其相关受体高效表达,是研究药用制剂药理机制和炎症介质相关性的理想模型及其先决条件^[11]。

组织损伤,如创伤、烧伤、手术、组织坏死、癌组织坏死、白血病放疗或化疗后,都可释放大量的 TF 入血;TF 活性和异常表达与多种炎性因子如 IL-6, LPS、干扰素(INF)、内毒素、免疫复合物、黏附分子、佛波酯和丝裂原等密切相关^[12]。在血管性疾病的发病机制中,炎症反应和凝血系统的激活均起着重要作用。在这两个系统中,越来越多的证据显示它们之间有着交联作用,炎症可导致凝血系统的激活,而凝血活动又可影响炎症的反应^[13]。由此可知,TF 在体内广泛分布,是外源性凝血途径的始动因子,在凝血与炎症反应中起重要作用。在炎症反应中,组织因子既是炎症反应的结果,其又起到前炎症介质的作用,加重炎症反应的进程。

本研究结果表明,与模型对照组比较,脉络宁各剂量组的细胞培养液中 TNF-α 及 IL-6 水平和 NF-κB(p65)及 TF 蛋白表达显著降低($P < 0.01$),且量效依赖变化。综上所述,脉络宁注射液对 LPS 诱

导的炎症细胞模型有一定治疗效果,提示有效剂量段脉络宁注射液抗炎机制与干预脂多糖激活炎症信号通道中核转录因子 NF-κB 高效表达有关,以及和外源性凝血的始动因子 TF 表达有关,可为早期炎症形成与预防提供一种新的思路和途径。

[参考文献]

[1] 郭志力. 脉络宁药理研究和临床研究及其在缺血性脑血管病中的应用现状及前景[J]. 中国全科医学, 2004, 24(7): 1849.

[2] 吴亚楠, 赵鹏翔, 马雪梅. NF-κB 研究进展及其与炎症的关系[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(34): 16533.

[3] 刘杨, 林一帆. 中药注射液的临床辨证应用[J]. 中医临床研究, 2011, 3(8): 80.

[4] 王孝文, 胡海涛, 许杰华, 等. 脉络宁注射液治疗半面痉挛的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(19): 1549.

[5] SHIFERA A S. The zinc finger domain of ikkgamma (Nemo) protein in health and disease[J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(10): 2404.

[6] Baker R G, Hayden M S, Ghosh S. NF-κB, inflammation, and metabolic disease[J]. Cell Metabolism, 2011, 13(1): 11.

[7] Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, et al. Multiple signaling pathways regulate NF-kappaB-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells[J]. Blood, 2001, 97(1): 46.

[8] Toby Lawrence. The nuclear factor NF-kB pathway in inflammation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6): 1651.

[9] Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine 40 years in immunology [J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23: 1.

[10] Miller A M, McPhaden A R, Preston A, et al. TNF alpha increases the inflammatory response to vascular balloon injury without accelerating neointimal formation [J]. Atherosclerosis, 2005, 179(1): 51.

[11] 孔祥丽, 阎蓉华, 李绚, 等. 香丹制剂对 LPS 诱导的血管内皮细胞 NF-κB 活性的影响[J]. 四川中医, 2008, 26(1): 31.

[12] Shebuski R J, Kilgore K S. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 300(3): 729.

[13] Levi M, Van der Poll T, Ten Cate H. Tissue factor in infection and severe inflammation. [J]. Semin Thromb Hemost, 2006, 32(1): 29.

[责任编辑 聂淑琴]