

痰瘀同治方含药血清对 ox-LDL 损伤人脐静脉内皮细胞 NF- κ B 和 ICAM-1 表达的影响

马悦颖, 刘建勋*, 李澎, 朱盛, 林成仁

(中国中医科学院西苑医院实验研究中心, 北京 100091)

[摘要] 目的: 观察痰瘀同治方含药血清对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)损伤的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)核因子- κ B(NF- κ B)的活化和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达的影响, 探讨痰瘀同治方抗动脉粥样硬化的分子机制。方法: SD 大鼠随机分为正常组, 痰瘀同治方低、中、高剂量组(24, 48, 72 g·kg⁻¹·d⁻¹)和辛伐他汀组(18 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 制备含药血清。体外培养 HUVECs, 实验分为 6 组: ①正常组; ②模型组; ③痰瘀同治方低剂量组; ④痰瘀同治方中剂量组; ⑤痰瘀同治方高剂量组; ⑥辛伐他汀组。其中①、②组用 20% 正常鼠血清, ③~⑥组用 20% 各组含药血清, 除正常组外其余各组加入 100 mg·L⁻¹ ox-LDL 刺激 3 h 或 24 h 后进行各项指标测定。Real-time PCR 法检测 HUVECs NF- κ B p65 和 ICAM-1 mRNA 表达, Western blotting 检测 ICAM-1 蛋白表达, 细胞免疫荧光法检测 NF- κ B p65 核移位变化。结果: HUVECs 经 ox-LDL 刺激后 NF- κ B p65 和 ICAM-1 的表达与正常组比较均明显升高($P < 0.01$)。痰瘀同治方和辛伐他汀含药血清能显著降低 NF- κ B p65 mRNA 表达及抑制其核移位($P < 0.05$), 降低 ICAM-1 mRNA 和蛋白表达($P < 0.05$), 其中以辛伐他汀和痰瘀同治方大剂量含药血清作用尤为显著($P < 0.01$)。结论: 痰瘀同治方能够通过抑制血管内皮细胞 NF- κ B 通路, 降低 ICAM-1 表达, 进而减少炎症反应, 这可能是其抗动脉粥样硬化分子机制之一。

[关键词] 痰瘀同治方; 动脉粥样硬化; 血管内皮细胞; 核因子- κ B; 细胞间黏附分子-1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0140-05

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111226.1610.001 **[网络出版时间]** 2011-12-26 16:10

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111226.1610.001.html>

[收稿日期] 20111011(012)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑“重大新药创制专项课题”(2009ZX09502-017, 2009ZX09301-005, 2009ZX 09301-005-2-6)

[第一作者] 马悦颖, 博士生, 从事中药药理学研究, E-mail: myy0717@163.com

[通讯作者] * 刘建勋, 博士生导师, 研究员, 从事中药药理学研究, Tel: 010-62835601, E-mail: liujx0324@sina.com

- [4] Sparrow M P, Hande S A, Friedman S, et al. Effect of allopurinol on clinical outcomes in inflammatory bowel disease nonresponders to azathioprine or 6-mercaptopurine[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007, 5(2):209.
- [5] Tuzun A, Erdil A, Inal V, et al. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease [J]. Clin Biochem, 2002, 35: 569.
- [6] Dotan I, Rachmilewitz D. Probiotics in inflammatory bowel disease; possible mechanisms of action [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2005, 21(4):426.
- [7] 陈爱民, 刘永芬, 熊雯雯, 等. 芪仙汤对溃疡性结肠炎患者血清 TNF- α , IL-8 的影响及疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8):255.
- [8] 曹珊, 白娟. 慢性溃疡性结肠炎的中医辨证施治经验[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1):227.
- [9] 徐世杰, 肖诚, 周桂琴等. 实验性脾虚瘵证的黏膜免疫学机制研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(12):35.
- [10] 刘勇, 陈娟. 参苓白术散治疗小儿秋季腹泻 45 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1):181.
- [11] 雒福东, 孔鹏飞. 参苓白术散桃花汤合保留灌肠治疗溃疡性结肠炎疗效观察[J]. 实用中医内科杂志, 2011, 25(2):54.

[责任编辑 聂淑琴]

Effects of Serum Containing Tanyu Tongzhi Fang on Expression of NF- κ B and ICAM-1 in HUVECs Injured by Ox-LDL

MA Yue-ying, LIU Jian-xun*, LI Peng, ZHU Sheng, LIN Cheng-ren
(Experimental Research Center, Xiyuan Hospital, China Academy of
Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] Objective: To explore the anti-atherosclerosis (AS) effect of serum containing Tanyu Tongzhi Fang (TYTZF) on the activation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) injured by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Method:** SD rats were equally divided into five groups in random: the control group, TYTZF low dose group, TYTZF middle dose group, TYTZF high dose group (24, 47, 72 g·kg⁻¹·d⁻¹) and simvastatin group (18 mg·kg⁻¹). After administration, the serum was taken for testing. HUVECs were treated with serum containing TYTZF and simvastatin respectively and incubated with ox-LDL (100 mg·L⁻¹) for an additional 3 h or 24 hours. The mRNA levels of NF- κ B p65 and ICAM-1 were measured by real-time PCR and the protein expression of ICAM-1 was detected by Western blotting. The activation of NF- κ B p65 was observed with immunofluorescence method. **Result:** The expression of NF- κ B p65 and ICAM-1 in serum containing TYTZF group and simvastatin group were significantly lower than that in modle group ($P < 0.05$), especially in the high-dose serum containing TYTZF group and simvastatin group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The mechanism of TYTZF anti-AS may be related to the inhibitory effect of NF- κ B pathway, thereby reducing the expression of ICAM-1 in vascular endothelial cells.

[Key words] Tanyu Tongzhi Fang; atherosclerosis; vascular endothelial cell; NF- κ B; ICAM-1

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是众多心脑血管疾病共同的病理基础,严重危害人类健康。目前普遍认为,AS是血管内皮损伤导致的慢性炎症反应性血管疾病。核因子- κ B(NF- κ B)是调节炎症反应的一个重要信号分子,血管内皮细胞中NF- κ B的激活是血管内皮细胞受损的始动机制之一,NF- κ B激活后可刺激血管内皮细胞分泌多种细胞因子,如细胞间黏附分子-1(ICAM-1)等,这些因子的表达上调促进和加速了AS进程。本室前期研究表明痰瘀同治方有显著的抗AS作用^[1-2],本研究采用氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)损伤人脐静脉内皮细胞(HUVECs)病理模型,旨在观察痰瘀同治方是否可以通过阻断NF- κ B通路,抑制ICAM-1表达,减少AS炎症反应,为痰瘀同治方应用于临床治疗AS提供科学的理论依据。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠30只,体重300~350g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.2 药物和试剂 痰瘀同治方:主要由人参、丹参、

黄连、川芎等组成,采用水提醇沉法提取干粉(1g干粉相当于17.5g生药),由西苑医院基础室提供;辛伐他汀片(批号100243)购自默沙东制药有限公司;M200培养基(批号M-200-500)和LSGS添加剂(批号S-003-10)购自Cascade Biologics公司;ox-LDL(批号20100301)购自北京协生生物科技有限公司;RT Master Mix(批号DRR036S),SYBR Premix Ex Taq(批号DRR036A)购自TaKaRa公司;引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;NF- κ B p65(批号ab38481),ICAM-1(批号ab2213)兔抗人多克隆一抗购自Abcam公司;SuperSignal West Femo Maximum Sensitivity Substrate(批号34094)购自Pierce Biotechnology公司,IG-FITC羊抗兔二抗购自Invitrogen(批号81-6111);其他试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器 TH4-200型倒置相差显微镜(日本Olympus公司),CO₂培养箱(Sanyo公司),荧光定量PCR仪(Roter Gene公司),垂直电泳仪(美国Bio-Rad公司),Chem Doc XRS+(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 痰瘀同治方含药血清制备 将 SD 大鼠随机分为 5 组:①正常组;②痰瘀同治方低剂量组;③痰瘀同治方中剂量组;④痰瘀同治方高剂量组;⑤辛伐他汀组。其中正常组给予蒸馏水,②~④组动物给药量按生药量计算为痰瘀同治方 24,48,72 g·kg⁻¹·d⁻¹,辛伐他汀组 18 mg·kg⁻¹·d⁻¹。每组 6 只,按 10 mL·kg⁻¹ 体重 ig 给药,2 次/d,连续 5 d。末次给药 1 h 后,腹主动脉取血并分每组离血清,56 °C 灭活 30 min,微孔过滤除菌,-70 °C 冰箱冻存备用。

2.2 HUVECs 原代培养 取健康产妇脐带,PBS 反复冲洗干净后,血管钳夹闭一端,另一端插入钝化针头并用血管钳固定,用注射器注入 1% I 型胶原酶约 15 mL,充满脐带后由血管钳夹闭两端,37 °C 下消化 12 min。收集消化液于离心管中,用 PBS 充分冲洗脐静脉,将消化液与冲洗液离心(1 500 r·min⁻¹,10 min)。小心弃去上清,加入完全培养液 5 mL (M200 培养基添加 50 × 的 LSGS 和 100 × 青霉素混合液),轻轻吹打使细胞悬浮,将细胞置于培养瓶中,37 °C 5% CO₂ 孵箱中培养。12 h 后弃去培养液,PBS 洗 3 遍,加入新的培养基继续培养。原代细胞长至 80% 融合后,用 0.25% 胰酶消化,传代。培养的血管内皮细胞进行 VIII 因子相关抗原鉴定,2~5 代细胞用于实验研究。

2.3 分组 取对数生长的 HUVECs 接种于培养板内。实验分为 6 组:①正常组(20% 正常鼠血清);②模型组(20% 正常鼠血清预处理 2 h 后加入 100 mg·L⁻¹ ox-LDL);③痰瘀同治方低剂量组;④痰瘀同治方中剂量组;⑤痰瘀同治方高剂量组;⑥辛伐他汀组。其中③~⑥组用各组含药血清(体积分九为 20%)预处理 2 h 后加入 100 mg·L⁻¹ ox-LDL。各组细胞继续培养 3 h 或 24 h 后进行各项指标测定。

2.4 Real-time PCR 检测 NF-κB p65, ICAM-1 mRNA 表达 将 HUVECs 接种于 6 孔板内,经上述实验干预 24 h 收集细胞。用 Trizol 提取细胞总 RNA,测定(A_{260/280}) 比值。以反转录试剂盒逆转录为 cDNA,应用 SYBR Green I 荧光染料进行 Real-time PCR 反应,以 GAPDH 为内参照。扩增条件为 95 °C 30 s 变性,(95 °C 5 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s) 共 40 个循环。所用引物序列(NF-κB p65:上游:5'-AGTGCAGAGGAAACGTCAGAA-3',下游:5'-CATTTTACCACTTGGCAGGAA-3';ICAM-1:上游:5'-TGAAGGCCACCCAGAGGACAAC-3',下游:5'-CCCATTATGACTGCGGCTGCTGCTACC-3';GAPDH:

上游 5'-TCACCAGGGCTGCTTTTA-3',下游 5'-GAAGATGGTGATG GGATTT-3')。用 2^{-ΔΔCT} 法计算基因表达水平。

2.5 Westren blotting 检测 ICAM-1 蛋白表达 将 HUVECs 接种于 6 孔板内,经上述实验干预后 24 h 收集细胞。按试剂盒说明提取总蛋白,BCA 法进行蛋白定量,以 GAPDH 为内参照蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,PVDF 膜转印,5% BSA 封闭 1 h,ICAM-1 一抗(1:1 000)、GAPDH 一抗(1:3 000)4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜,二抗(1:10 000)室温孵育 1 h, TBST 洗膜后,SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate 滴在 PVDF 膜正面相应蛋白相对分子质量区域上,放入 Chem Doc XRS + 仪器中显影,蛋白条带用 Image Lab 软件自动分析。

2.6 免疫荧光检测 NF-κB p65 核移位变化 将 HUVECs 接种于激光共聚焦皿内,贴壁生长 24 h 后,进行上述实验干预后 3 h,取出细胞用 PBS 冲洗,95% 乙醇固定。NF-κB p65 一抗(1:100)放在湿盒内 4 °C 过夜。PBS 冲洗后,加入 IG-FITC 二抗(1:100)4 °C 1 h,0.01% DAPI 复染细胞核,甘油封片后,荧光显微镜观察。

2.7 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 SPSS 13.0 统计软件处理。多组间计量资料比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 HUVECs 鉴定 从人脐静脉上分离下来的内皮细胞起初呈圆形或椭圆形,多呈小团存在,4 h 细胞开始贴壁。培养 2~3 d 后,细胞生长融合形成排列紧密的单层细胞,细胞呈典型铺路石样排列。VIII 因子抗体免疫荧光染色后的阳性细胞占总细胞数 95% 以上,细胞呈短梭形或多角形,胞浆丰富,内含绿色荧光染色。

3.2 对 ox-LDL 刺激后 HUVECs NF-κB p65, ICAM-1 mRNA 表达影响 与正常组相比,模型组 NF-κB p65, ICAM-1 mRNA 表达显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,痰瘀同治方 3 个剂量组和辛伐他汀组 NF-κB p65, ICAM-1 mRNA 表达低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),且痰瘀同治方 3 个剂量组存在一定剂量依赖性,其中以辛伐他汀组和痰瘀同治方高剂量组作用更为显著($P < 0.01$)。见表 1。

3.3 对 ox-LDL 刺激后 HUVECs ICAM-1 蛋白表达影响 与正常组相比,模型组 ICAM-1 蛋白表达明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,痰瘀同治方 3 个剂量组和辛伐他汀组 ICAM-1 蛋白表达明显低于模

表 1 痰瘀同治方对 ox-LDL 刺激后 HUVECs NF- κ B p65, ICAM-1 mRNA 表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

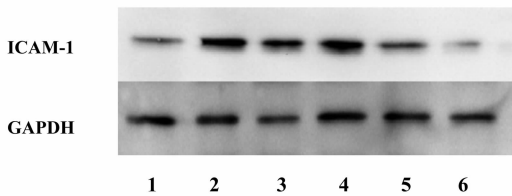
组别	药物剂量 /g·kg ⁻¹	NF- κ B p65 /GAPDH	ICAM-1 /GAPDH
正常	-	1.00 ± 0.87	1.00 ± 0.38
模型	-	5.55 ± 1.51 ¹⁾	4.06 ± 0.60 ¹⁾
痰瘀同治方	24	2.80 ± 0.57 ²⁾	2.83 ± 0.44 ²⁾
	48	2.16 ± 0.59 ²⁾	2.01 ± 0.64 ²⁾
	72	1.50 ± 0.18 ³⁾	1.75 ± 0.45 ³⁾
辛伐他汀	18 × 10 ⁻³	1.32 ± 0.48 ³⁾	1.19 ± 0.27 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

型组 ($P < 0.05$)。见表 2,图 1。

表 2 痰瘀同治方对 ox-LDL 刺激后 HUVECs ICAM-1 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	药物剂量/g·kg ⁻¹	ICAM-1/GAPDH
正常	-	0.36 ± 0.10
模型	-	1.44 ± 0.27 ¹⁾
痰瘀同治方	24	0.94 ± 0.07 ²⁾
	48	0.82 ± 0.12 ²⁾
	72	0.49 ± 0.07 ³⁾
辛伐他汀	18 × 10 ⁻³	0.26 ± 0.05 ³⁾



1. 正常组;2. 模型组;3. 痰瘀同治方(24 g·kg⁻¹);
4. 痰瘀同治方(48 g·kg⁻¹);5. 痰瘀同治方(72 g·kg⁻¹);
6. 辛伐他汀组(18 mg·kg⁻¹) (图 2 同)

图 1 痰瘀同治方含药血清对 ox-LDL 刺激后 ICAM-1 蛋白表达影响

3.4 对 ox-LDL 刺激后 HUVECs NF- κ B p65 核移位影响 NF- κ B p65 核移位是 NF- κ B 活化的标志,免疫荧光图像可见,正常 HUVECs 内 NF- κ B p65 (绿色)主要在胞浆内表达,胞核内极少表达,NF- κ B p65 转位到细胞核后荧光叠加呈灰白色。与正常组相比,模型组胞核内 NF- κ B p65 大量表达,说明 ox-LDL 使 NF- κ B p65 活化并进入核内,启动转录活性。与模型组相比,痰瘀同治方 3 个剂量组和辛伐他汀组胞核内 NF- κ B p65 表达明显减少,以辛伐他汀组和痰瘀同治方大剂量组抑制作用更加明显。见图 2。

4 讨论

中医学认为 AS 属于“瘀血”、“痰浊”的范畴,中医学认为 AS 的形成外则与饮食不节,嗜好烟酒,多逸少劳,内则与脾胃肾脏功能失调有关。在辨证上多属本虚标实,由于心、脾、肾的亏损,造成气机紊乱,气血失和,导致气滞血瘀,痰浊内生,进而脉络闭塞,引起心、肝、脾、肺、肾各脏腑阴阳失衡及肢体的气血失调。痰瘀同治方主要由人参、丹参、黄连、川芎等药物组成,具有益气活血、化痰逐瘀功效。该方益气温阳以固本,化痰通络以治标,共奏标本兼治的功效,临床上用于治疗高血脂和冠心病等。

Ross 于 1999 年在他的损伤反应学说的基础上明确提出“AS 是一种炎症性疾病”,指出 AS 的发生是由于血管内皮细胞(VEC)和平滑肌细胞(SMC)受到各种危险因素,特别是 ox-LDL 的损伤,使血管局部产生的一种过度的慢性炎性增生反应^[3]。血管内皮细胞除发挥血液与血管壁间的屏障作用外,还具有非常活跃的内分泌功能,在调节血管张力、维持血液平衡方面有重要作用,是众多动脉粥样硬化危险因素作用的重要靶点^[4]。由于血管内皮损伤是 AS 的始动因素,因此本研究采用 ox-LDL 损伤血管内皮细胞作为病理模型进行 AS 研究。

NF- κ B 是一种分布和作用十分广泛的细胞转录因子,控制着细胞因子、黏附分子及生长因子等基因表达^[5]。NF- κ B 激活后,导致炎症相关因子的过度表达,引起明显的炎症反应。同时,炎症介质和细胞因子的产生和释放增多,又进一步激活 NF- κ B,导致最初炎症信号不断放大,作用时间延长,进一步加重炎症反应。Yuqing Wu 等^[6]研究发现 NF- κ B 诱导 ICAM-1 产生和释放增多,可能是促皮质释放激素(CRH)加速 LDL 受体基因敲除(LDLr^{-/-})小鼠 AS 进展的分子机制之一。Wei Zhang 等^[7]通过临床观察研究进一步证实,主动脉 NF- κ B 表达和临床致 AS 风险因素(如吸烟、高血糖、高血压、高血脂等)密切相关,并可以作为 AS 的炎症标志物之一。ICAM-1 是 Rothlein 等^[8]于 1986 年在研究淋巴细胞黏附时发现。Davies 等^[9]研究证明,AS 发生过程的不同时期,黏附分子的表达量也不同,其 ICAM-1 在 AS 患者的脂纹期主要表达于动脉内皮细胞表面,可促进 AS 早期血液中游走的单核细胞向内皮细胞黏附,进入炎症部位,而随着病变的进展,黏附分子在内皮的表达逐渐减弱,而在纤维斑块中其表达增强,提示 ICAM-1 是 AS 早期的病理变化及斑块进展的潜在机制。

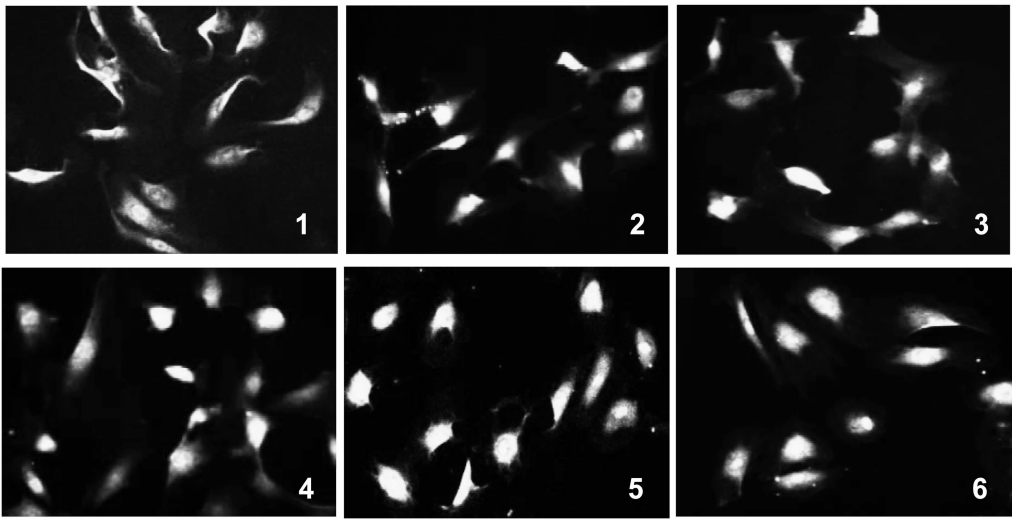


图 2 痰瘀同治方对 ox-LDL 刺激后 HUVECs NF- κ B p65 核移位影响

本研究显示, ox-LDL 损伤的血管内皮细胞 NF- κ B p65 和 ICAM-1 表达明显升高, 痰瘀同治方可抑制 NF- κ B p65 活化, 降低 ICAM-1 表达, 提示痰瘀同治方通过阻断 NF- κ B 信号通路, 从而降低下游靶基因 ICAM-1 表达, 减轻炎症反应, 进而发挥抗 AS 作用。但是, ox-LDL 是直接作用于 NF- κ B 及其靶基因, 还是通过其他信号效应分子间接作用, 以及痰瘀同治方下调 NF- κ B p65 和 ICAM-1 的具体机制, 还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 李磊, 刘建勋, 李欣志, 等. 痰瘀同治方对兔动脉粥样硬化对氧磷酶活性及炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8):53.

[2] 王建辉. 大鼠颈总动脉粥样硬化易损斑块形成与化痰逐瘀解毒方的干预[D]. 北京: 中国中医科学院, 2011.

[3] Ross R. Atherosclerosis; an inflammatory disease [J]. N Engl J Med, 1999, 340(2):115.

[4] Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function; a critical determinant in atherosclerosis? [J].

Circulation, 2004, 109(1):1127.

[5] Lawrence T, Gilroy D W, Colville-Nash P R, et al. Possible new role for NF-kappa B in the resolution of inflammation[J]. Nat Med, 2001, 7:1291.

[6] Wu Y Q, Zhang R J, Zhou C H, et al. Enhanced expression of vascular cell adhesion molecule-1 by corticotrophin-releasing hormone contributes to progression of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice[J]. Atherosclerosis, 2009, 203: 360.

[7] Zhang Wei, Shan Xing Shan, Lin Sun Xue. Overexpression of activated nuclear factor- κ B in aorta of patients with coronary[J]. Atherosclerosis Clin Cardiol, 2009, 32(12):42.

[8] Rothlein R, Dustin M L, Marlin S D, et al. A human intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) distinct from LFA-1[J]. J Immunol, 1986, 137(4):1270.

[9] Davies M J, Gordon J L, Gearing A J H, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis[J]. J Pathol, 1993, 171(3):223.

[责任编辑 聂淑琴]