

# 旋覆花内酯抑制炎症因子介导的内皮细胞与单核细胞的黏附

李睿 刘彬 郑斌 韩梅 温进坤\*

(河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050017)

**摘要** 为了观察旋覆花内酯 (1-O-acetylbritannilactone, ABL) 乙酰化衍生物 ABLO<sub>2</sub> 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) / 干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 刺激的内皮细胞 ECV304 活化及其与 RAW264.7 单核 / 巨噬细胞相互作用的影响, 采用 Western 印迹检测核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 活化以及 NF- $\kappa$ B 依赖的黏附分子的表达水平, 应用电泳迁移率改变分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 检查 ABLO<sub>2</sub> 预处理及 LPS/IFN- $\gamma$  诱导对 NF- $\kappa$ B 与 DNA 结合活性的影响。结果显示, ABLO<sub>2</sub> 显著抑制 LPS/IFN- $\gamma$  诱导的 NF- $\kappa$ B 核转位和 DNA 结合活性, 同时 ABLO<sub>2</sub> 降低 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白 (I $\kappa$ B) 激酶 (I $\kappa$ B kinases, IKK) 的活性, 抑制 I $\kappa$ B 的磷酸化及降解; ABLO<sub>2</sub> 还通过减少血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、基质金属蛋白酶-9 (metalloproteinase-9, MMP-9)、黏蛋白-c (tenascin-c) 的表达, 进而减弱单核细胞与内皮细胞之间的黏附作用。研究表明, ABLO<sub>2</sub> 通过抑制 IKK 活性及 I $\kappa$ B 降解而抑制 NF- $\kappa$ B 活化, 进而起到抑制 NF- $\kappa$ B 依赖的黏附分子表达及细胞黏附作用。

**关键词** 旋覆花内酯乙酰化衍生物 ABLO<sub>2</sub>; ECV304 细胞; 核因子- $\kappa$ B; 黏附分子; 细胞黏附

动脉粥样硬化是一种血管慢性炎症性疾病<sup>[1]</sup>。当血管内膜受损时, 损伤部位浸润的白细胞、单核细胞和血小板释放多种细胞因子, 这些细胞因子不仅可激活内皮细胞, 而且可刺激单核细胞浸润及内皮细胞合成、分泌多种黏附因子, 如骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)等, 从而加剧血小板和单核细胞与内皮细胞之间的黏附, 促进炎症因子的释放, 加重血管炎性反应<sup>[2,3]</sup>。已有研究证实, 炎症因子可激活靶细胞内的核因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B), 活化的 NF- $\kappa$ B 是介导炎症反应的关键转录调控因子<sup>[1]</sup>。因此, 抑制 NF- $\kappa$ B 活化, 减少血管损伤部位炎症介质的释放, 已成为防治动脉粥样硬化的新策略。旋覆花内酯(1-O-acetylbritannilactone, ABL)是从欧亚旋覆花(*Inula britannica* L.)中分离得到的一种具有抗炎作用的单体化合物。以往研究证实, ABL 具有抑制单核 / 巨噬细胞活化和血管平滑肌细胞炎症应答的作用<sup>[4-6]</sup>。为了进一步增强 ABL 的生物利用度, 我们用人工合成法对 ABL 进行乙酰化修饰, 并得到 ABL 的乙酰化衍生物 ABLO<sub>2</sub>。本研究观察 ABLO<sub>2</sub> 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) / 干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 诱导的内皮细胞活化及其与单核细胞相互作用的影

响, 并对其作用机制进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

ABLO<sub>2</sub> 的化学结构见图 1。DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 凝胶阻滞分析试剂盒购自 Promega 公司; 抗 NF- $\kappa$ B、基质金属蛋白酶-9 (metalloproteinase-9, MMP-9)、OPN、VCAM-1、GAPDH 多克隆抗体, 抗 I $\kappa$ B $\alpha$ 、黏蛋白-c (tenascin-c) 单克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司; 抗 IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ 、p-IKK $\alpha$ / $\beta$  多克隆抗体, 抗 p-I $\kappa$ B $\alpha$  单克隆抗体均购自 Cell Signaling

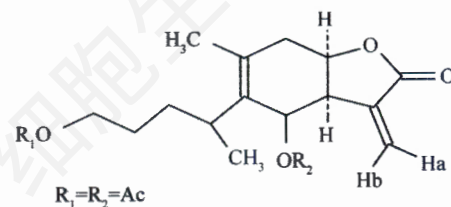


图 1 ABLO<sub>2</sub> 化学结构式<sup>[5]</sup>

收稿日期: 2008-07-21 接受日期: 2008-09-01

国家自然科学基金(No.30670845)和河北省自然科学基金(No.C2007000831)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 0311-86265563, Fax: 0311-86266180, E-mail: wjk@hebm.edu.cn

公司; [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 购自北京福瑞生物工程公司。ECV304 人脐静脉内皮细胞株、RAW264.7 小鼠单核/巨噬细胞株由 ATCC 提供。

## 1.2 细胞培养及实验分组

ECV304 与 RAW264.7 细胞均培养于含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基中。当 ECV304 生长至 70%~80% 融合时, 换成无血清培养基, 饥饿培养 24 h, 使细胞同步于静止期。用不同浓度 ABLO<sub>2</sub> (10  $\mu$ mol/L、20  $\mu$ mol/L、50  $\mu$ mol/L) 预处理 ECV304 细胞 2 h, 加入 LPS (10  $\mu$ g/ml) 和 IFN- $\gamma$  (20 IU) 刺激细胞 10 min、30 min、60 min, 收集细胞用于检测 NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$  和 IKK; 刺激 6 h、12 h、24 h, 收集细胞用于检测 NF- $\kappa$ B 依赖的黏附分子。

## 1.3 电泳迁移率改变分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

按聂磊等<sup>[7]</sup>报道的方法, 提取各组细胞核蛋白, 用改良的 Lowry's 法进行蛋白质定量。以含有 NF- $\kappa$ B 结合模体的双链寡脱氧核苷酸为探针, 用 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 进行 5' 末端标记, 将标记探针与 5  $\mu$ g 核蛋白在结合缓冲液中室温反应 20 min, 以 100 倍过量的非标记探针作为特异性竞争结合对照。DNA-核蛋白复合物经 5% PAGE 分离后, 于 -70  $^{\circ}$ C 放射自显影。

## 1.4 细胞总蛋白提取及 Western 印迹

收集各组 ECV304 细胞, 按韩梅等<sup>[8]</sup>的方法用冷 PBS 洗涤 3 次后, 将细胞重悬于裂解液(1% NP40, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10% 甘油, 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mmol/L PMSF) 中, 冰浴 30 min, 使细胞充分裂解。4  $^{\circ}$ C, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 进行蛋白质定量。各组取等量蛋白质, 经 8% SDS-PAGE 分离后, 电转移至 PVDF 膜上。依次与一抗、二抗进行结合反应, 用 ECL 发光法检测抗体结合区带。

## 1.5 细胞黏附实验

将 ECV304 细胞按  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种于包被了 2% 明胶的 96 孔板中, 加入 20  $\mu$ mol/L ABLO<sub>2</sub> 预处理 2 h, 用无血清培养基洗去 ABLO<sub>2</sub>; 同时, 用 LPS/IFN- $\gamma$  刺激 RAW264.7 细胞 30 min (作为激活的 RAW264.7 细胞) 将其接种至单层内皮细胞表面 ( $5 \times 10^4$  个/ml, 200  $\mu$ l/孔), 继续共温育 30 min。弃去培养基, 用 PBS 洗去未黏附的细胞。用 4% 多聚甲醛固定后, 于高倍镜下随机计数 5 个视野中黏附的巨噬细胞数, 以此表示细胞黏附活性。实验重复 3 次。

## 1.6 统计学处理

实验结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行组间方差分析, 以  $P < 0.05$  表示统计学上有显著差异。

## 2 结果

### 2.1 ABLO<sub>2</sub> 抑制 LPS/IFN- $\gamma$ 诱导的 NF- $\kappa$ B 核转位及 DNA 结合活性

Western 印迹结果显示, 在未经处理的对照 ECV304 细胞核蛋白中, 即有 NF- $\kappa$ B p65 存在, LPS/IFN- $\gamma$  刺激 10 min、30 min、60 min 后, 核内 NF- $\kappa$ B p65 的水平呈进行性升高(图 2A)。用 20  $\mu$ mol/L ABLO<sub>2</sub> 预处理的 ECV304 细胞, 核内 p65 水平明显低于 LPS/IFN- $\gamma$  处理组, 提示 ABLO<sub>2</sub> 可抑制 LPS/IFN- $\gamma$  诱导的 NF- $\kappa$ B p65 核转位。为了确定 ABLO<sub>2</sub> 是否影响 NF- $\kappa$ B p65 与 DNA 调控元件的结合活性, 以 5' 末端标记的含有 NF- $\kappa$ B 结合模体的双股寡核苷酸为探针, 分别与不同条件处理的 ECV304 细胞核蛋白进行结合反应。DNA-核蛋白复合物经电泳分离后, 放射自显影结果可见, LPS/IFN- $\gamma$  刺激 ECV304 细胞 30 min 后, 核蛋白可与探针形成明显的 DNA-核蛋白复合物滞后迁移区带, 该区带可被 100 倍过量的非标记探针所消除, 说明核蛋白与 DNA 结合具有特异性。用不同浓度 ABLO<sub>2</sub> (10  $\mu$ mol/L、20  $\mu$ mol/L、50  $\mu$ mol/L) 预处理的细胞, 其核蛋白与探针结合形成的迁移区带明显减弱, 且 ABLO<sub>2</sub> 对 NF- $\kappa$ B 结合活性的抑制效应具有剂量依赖关系(图 2B)。

### 2.2 ABLO<sub>2</sub> 抑制 LPS/IFN- $\gamma$ 诱导的 I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化和降解

为了确定 ABLO<sub>2</sub> 抑制 NF- $\kappa$ B 核转位的上游机制, 本研究进一步观察了 LPS/IFN- $\gamma$  处理对 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化及降解的影响。Western 印迹分析结果显示, 未处理的内皮细胞中含有较高水平的 I $\kappa$ B $\alpha$ , 其磷酸化水平相对较低。用 LPS/IFN- $\gamma$  刺激细胞 10 min、30 min、60 min 后, I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化水平快速、短暂升高, 而 I $\kappa$ B $\alpha$  含量变化与其磷酸化程度呈相反趋势。用 20  $\mu$ mol/L ABLO<sub>2</sub> 预处理 ECV304 细胞后, LPS/IFN- $\gamma$  诱导的 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化及降解受到明显抑制, 与未经 ABLO<sub>2</sub> 预处理的细胞相比, I $\kappa$ B $\alpha$  保持较高的水平(图 3)。在此基础上, 进一步用抗磷酸化 IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  抗体检测了 ABLO<sub>2</sub> 对 IKK (I $\kappa$ B 激酶复合体) 磷酸化水平的影响。结果显示, 给予 LPS/IFN- $\gamma$  刺激后, IKK 磷酸化水平呈时间依赖性升高; 用 ABLO<sub>2</sub> 预处理后, IKK 磷酸化水平比单纯 LPS/IFN- $\gamma$  刺激组降低 70 %

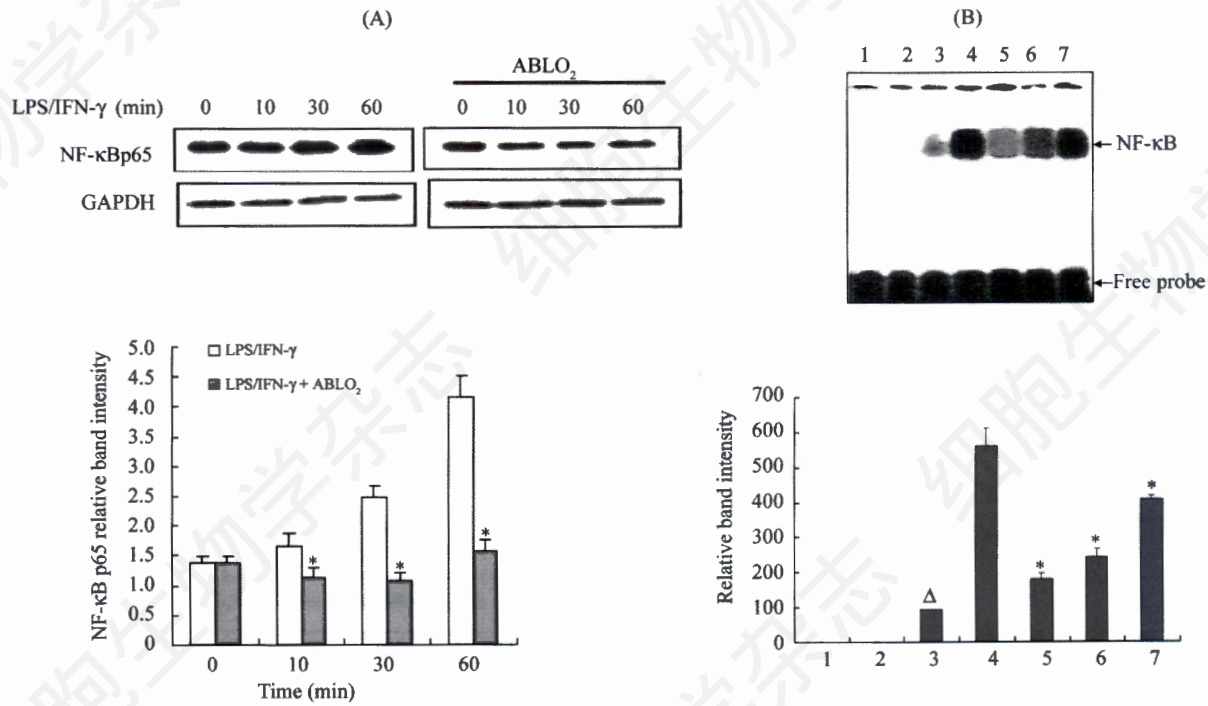


图2 ABLO<sub>2</sub>抑制LPS/IFN-γ诱导的NF-κB核转位及DNA结合活性

A: Western印迹分析显示核蛋白中NF-κB的变化; B: EMSA。1: 空白对照组; 2: 100倍过量的非标记探针; 3: 未处理组; 4: LPS/IFN-γ刺激组; 5~7: ABLO<sub>2</sub> (50 μmol/L、20 μmol/L、10 μmol/L)预处理后再用LPS/IFN-γ刺激组。与LPS/IFN-γ处理组相比, \**P*<0.05, Δ*P*<0.01。

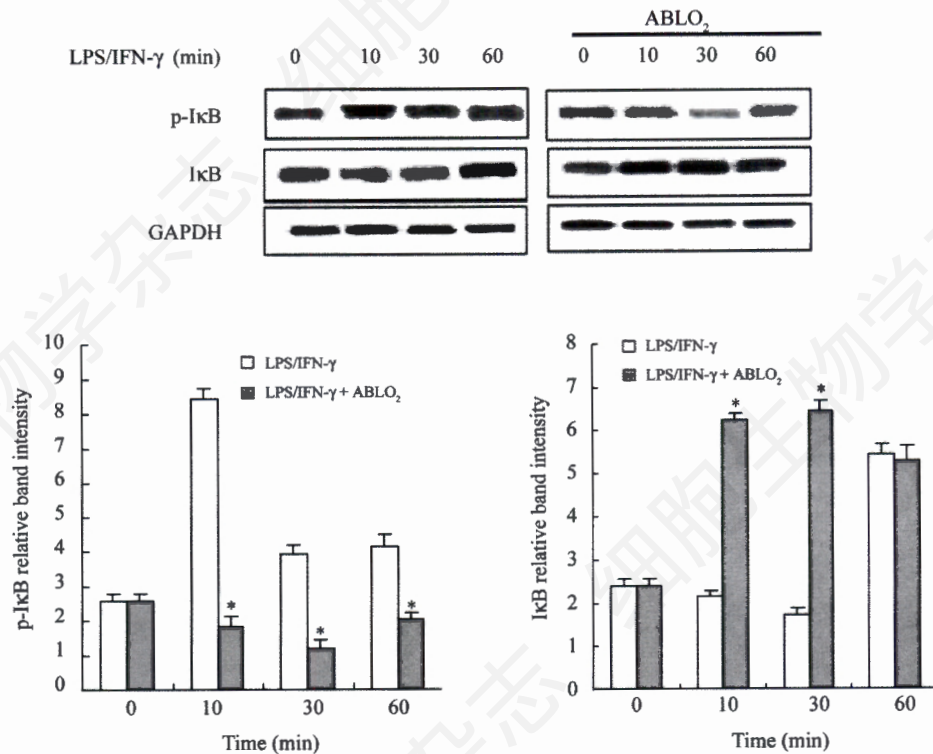


图3 ABLO<sub>2</sub>抑制LPS/IFN-γ诱导的IκBα磷酸化和降解

与LPS/IFN-γ处理组相比, \**P*<0.05。

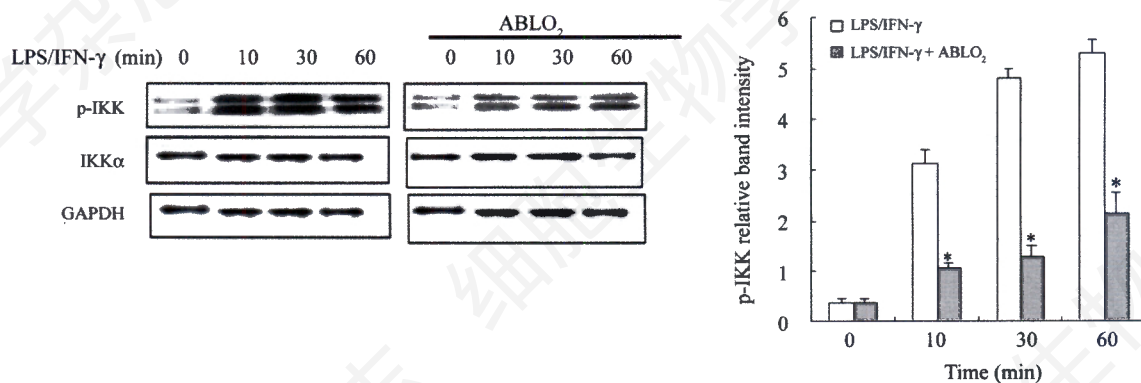


图4 ABLO<sub>2</sub>抑制LPS/IFN- $\gamma$ 诱导的IKK磷酸化  
与LPS/IFN- $\gamma$ 处理组相比, \* $P < 0.05$ 。

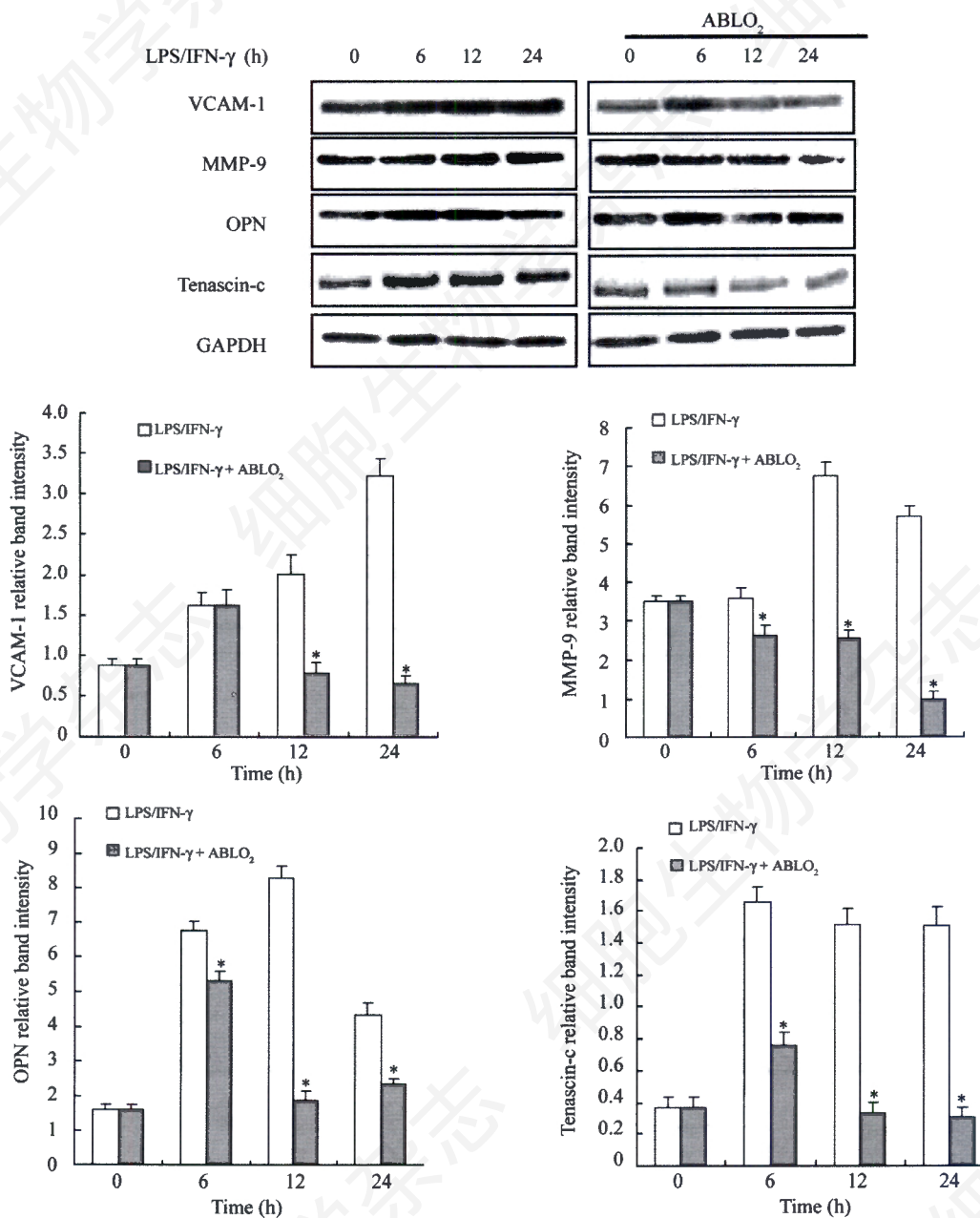


图5 ABLO<sub>2</sub>抑制NF- $\kappa$ B依赖的黏附分子表达  
与LPS/IFN- $\gamma$ 刺激组相比, \* $P < 0.05$ 。

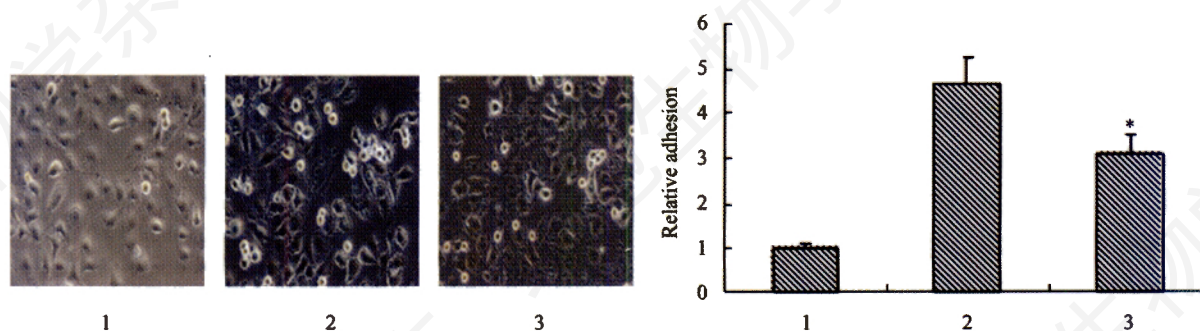


图6 ABLO<sub>2</sub>抑制单核细胞与内皮细胞之间的黏附

1: 对照 ECV304 细胞与 RAW264.7 细胞之间的黏附; 2: LPS/IFN- $\gamma$  刺激 30 min 组; 3: ABLO<sub>2</sub> 预温育 2 h 再用 LPS/IFN- $\gamma$  刺激 30 min。与 LPS/IFN- $\gamma$  刺激组相比, \* $P < 0.05$ 。

左右。在相同条件下, ABLO<sub>2</sub> 对 IKK $\alpha/\beta$  的蛋白质水平无明显影响(图 4)。

### 2.3 ABLO<sub>2</sub> 抑制 NF- $\kappa$ B 依赖的黏附分子表达

循环白细胞与血管内皮细胞的黏附是动脉粥样硬化炎症反应的起始环节, 活化的内皮细胞所释放的多种黏附分子是介导细胞黏附的前提条件。许多黏附分子, 如 OPN、VCAM-1、MMP-9 等基因的转录激活大多受到 NF- $\kappa$ B 的调控。为了进一步观察 ABLO<sub>2</sub> 抑制 NF- $\kappa$ B 活化后是否影响这些黏附分子的表达, 本实验检测了 ABLO<sub>2</sub> 预处理细胞后, NF- $\kappa$ B 下游黏附分子表达的变化。Western 印迹结果显示, 在未经处理的 ECV304 细胞中, VCAM-1、OPN、MMP-9、黏蛋白-c 的表达水平均较低, 用 LPS/IFN- $\gamma$  刺激不同时间后, 这些蛋白质的表达水平均有不同程度的升高, 其中 MMP-9、VCAM-1 在刺激 12 h 后明显升高; OPN 和黏蛋白-c 在刺激 6 h 明显升高并维持该水平至 24 h。用 ABLO<sub>2</sub> 预处理细胞后, 能明显抑制 LPS/IFN- $\gamma$  诱导的黏附分子表达(图 5)。

### 2.4 ABLO<sub>2</sub> 抑制单核细胞与内皮细胞的黏附

为了观察 ABLO<sub>2</sub> 抑制黏附分子表达后是否影响单核与内皮细胞之间的黏附作用, 将 LPS/IFN- $\gamma$  激活的 RAW264.7 单核巨噬细胞接种于单层内皮细胞表面, 共温育 30 min 后, 计数黏附的巨噬细胞。如图 6 所示, LPS/IFN- $\gamma$  可显著增强单核细胞与内皮细胞之间的黏附作用, 两种细胞间的黏附活性较对照细胞增加 4.7 倍; 用 ABLO<sub>2</sub> 预处理的内皮细胞, 其与 RAW264.7 细胞的黏附活性受到明显抑制, 比未经预处理的细胞下降 33%(图 6)。

## 3 讨论

动脉粥样硬化发生发展的不同阶段均存在慢性炎症反应<sup>[9]</sup>。在动脉粥样硬化发生早期, 脂质在动脉

壁上的沉积, 以及动脉分支处受血液湍流的冲击, 使血管内皮受损。受损的血管内皮细胞表达各种黏附分子, 后者通过与其配体结合, 介导内皮细胞与单核细胞之间的黏附。在趋化因子和单核/巨噬细胞集落刺激因子的作用下, 与内皮细胞黏附的单核细胞向内膜下迁移, 活化成为巨噬细胞, 并释放 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症细胞因子, 继而刺激血管平滑肌和内皮细胞的炎症反应, 包括环加氧酶-2 (COX-2) 和 NOS 基因表达增强, 前列腺素和一氧化氮合成增加, 以及血清中 C 反应蛋白(CRP)水平升高等, 最终导致血管病变的发生<sup>[10]</sup>。NF- $\kappa$ B 是调控炎症基因表达的重要转录因子<sup>[11]</sup>, 可启动黏附分子、趋化因子、细胞因子、生长因子等 100 多种炎症反应相关基因的表达。静息状态下, NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B 结合, 以非活性形式存在于细胞浆中, 不具有转录活性。当细胞受到致炎因子刺激时, 与 NF- $\kappa$ B 结合的 I $\kappa$ B 在 IKK 的催化下发生磷酸化、继之泛素化降解, NF- $\kappa$ B 被释放并转位入核, 参与启动包括黏附分子在内的多种基因的表达, 进一步加重血管炎症反应<sup>[12,13]</sup>。因此, 抑制内皮细胞的活化和 NF- $\kappa$ B 的激活, 阻断单核细胞与内皮细胞的黏附, 对减缓血管病变进展具有重要意义<sup>[3]</sup>。

ABLO<sub>2</sub> 是 ABL 的乙酰化衍生物。前期研究发现, 该化合物能有效抑制 RAW264.7 细胞合成炎症介质 NO 和 PGE<sub>2</sub>, 并证实其作用机制与抑制 NF- $\kappa$ B 活化及 iNOS 和 COX-2 基因表达有关<sup>[4]</sup>。在血管平滑肌细胞, ABL 对 NF- $\kappa$ B 活化启动的炎症基因 COX-2 表达也具有较弱的抑制作用<sup>[5]</sup>。然而, ABL 能否调制血管内皮细胞的炎症应答及其作用机制目前尚不清楚。本实验从炎症信号转导通路、黏附分子表达和单核细胞与内皮细胞相互作用角度证实, ABLO<sub>2</sub> 可明显抑制 LPS/IFN- $\gamma$  诱导的内皮细胞 NF- $\kappa$ B 核转位及 DNA

结合活性,降低黏附分子,如OPN、VCAM-1、MMP-9等的表达水平。进一步对ABLO<sub>2</sub>抑制NF-κB活化的作用机制进行研究时发现,ABLO<sub>2</sub>通过降低IκB激酶IKK的活性而抑制IκB的磷酸化及泛素化降解。此外,ABLO<sub>2</sub>通过抑制黏附分子表达,削弱了单核细胞与内皮细胞之间的黏附作用。上述结果表明,ABLO<sub>2</sub>可解除炎症因子诱导的内皮细胞活化,维持内皮细胞的正常功能,抑制单核细胞在损伤部位的募集和向内膜下迁移,对预防和治疗血管炎性疾病具有重要意义,有开发为抗动脉粥样硬化新药的良好前景。

## 参考文献(References)

- [1] Libby P *et al.* *Circulation*, 2002, **105**: 1135
- [2] Dagia NM *et al.* *J Immunol*, 2004, **173**: 2041
- [3] Ross R. *N Engl J Med*, 1999, **340**: 115
- [4] Han M *et al.* *Life Sci*, 2004, **75**: 675
- [5] 刘月平等. *细胞生物学杂志*, 2007, **29**: 267
- [6] Liu B *et al.* *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, **324**: 292
- [7] 聂 磊等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, **21**: 94
- [8] 韩 梅等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, **19**: 250
- [9] Walzog B *et al.* *News Physiol Sci*, 2000, **15**: 107
- [10] Granger DN *et al.* *Hypertension*, 2004, **43**: 924
- [11] Min JK *et al.* *J Immunol*, 2005, **175**: 531
- [12] Hansson GK. *N Engl J Med*, 2005, **352**: 1685
- [13] Bellido C *et al.* *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2006, **16**: 524

## Acetylbritannilactone Inhibits Inflammatory Stimulus-mediated Adhesion between Endothelial Cells and Macrophages

Rui Li Bin Liu Bin Zheng Mei Han Jin-Kun Wen\*

(Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medical Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract** To investigate the effects of 1,6-O<sub>2</sub>-diacetylbritannilactone (ABLO<sub>2</sub>) on the activation of endothelial cell ECV304 and its interaction with macrophages treated with lipopolysaccharide (LPS)/interferon-γ (IFN-γ). Western blot analysis was adopted to measure the nuclear translocation of nuclear factor-κB (NF-κB) and the expression of some adhesion molecules. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was used to detect DNA-binding activity of NF-κB in ECV304 cells pretreated with ABLO<sub>2</sub>. The results showed that ABLO<sub>2</sub> inhibited the NF-κB activation by blocking IκB kinase (IKK) activation, and suppressing inhibitor of NF-κB (IκB) phosphorylation and degradation. In addition, ABLO<sub>2</sub> could inhibit the adhesion between endothelial cells and macrophages by decreasing the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), osteopontin (OPN), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tenascin-c. These results suggest that ABLO<sub>2</sub> is a potent agent to prevent vascular inflammatory disease in the vessel.

**Key words** 1,6-O<sub>2</sub>-diacetylbritannilactone; ECV304; nuclear factor-κB; adhesion molecule; cell adhesion

Received: July 21, 2008 Accepted: September 1, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30670845) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2007000831)

\*Corresponding author. Tel: 86-311-86265563; Fax: 86-311-86266180, E-mail: wjk@hebmu.edu.cn