

旋覆花内酯抑制血管平滑肌细胞炎症应答与 阻断 NF- κ B 活化有关

刘月平 韩梅* 温进坤 郑斌

(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 应用免疫细胞化学染色及 Western 印迹检测血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC) 环加氧酶-2 (cyclo-oxygenase-2, COX-2) 表达、NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B- α) 水平和 NF- κ B p65 核转位的变化; 电泳迁移率改变分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 确定旋覆花内酯(1-o-acetylbritannilactone, ABL) 对核内 NF- κ B p65 与 DNA 调控元件的结合活性的影响。结果表明, 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 处理的 VSMC, p65 核转位加快, 细胞核内的 NF- κ B p65 水平快速升高, 同时伴有 I κ B- α 的减少; 用 ABL 预处理 VSMC 后, LPS 诱导的 p65 核转位增加及 I κ B- α 减少受到明显抑制, 抑制作用呈剂量依赖性。EMSA 结果显示, LPS 处理 VSMC, 其核蛋白与含有 NF- κ B 结合位点的探针的结合活性升高; 而用 ABL 预处理的 VSMC, LPS 诱导的核蛋白与探针结合活性的升高受到明显抑制。进而, ABL 对 NF- κ B 活化启动的下游炎症基因 COX-2 表达也具有较强的抑制效果。因此, ABL 是一种抗炎物质, 通过抑制 NF- κ B 活化和炎症基因 COX-2 的表达而减弱或消除 LPS 诱导的 VSMC 炎症应答反应。

关键词 旋覆花内酯; 血管平滑肌细胞; NF- κ B; 炎症反应

动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄和高血压等心血管疾病是由多种因素对血管内皮刺激所触发的慢性炎症反应, 伴随发生的血小板活化和聚集、单核细胞黏附及炎症介质的释放和由此导致的 VSMC 由中膜向内膜下迁移和增殖均属于炎症相关事件。VSMC 作为主要的细胞成分, 在血管炎性病发生发展过程中, 约有上百种基因表达出现异常, 进而引起细胞表型与功能的改变。基因调控区序列同源性比对分析发现, 在炎症因子诱导下 VSMC 表达异常的基因大多受核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的反式激活^[1]。因此, 调制血管细胞 NF- κ B 活性, 阻断炎症应答信号通路, 减少血管损伤部位炎症介质的释放, 已成为目前研究新型抗心血管疾病药物的重要策略。欧亚旋覆花是一种用于治疗偏头痛的传统中药, 具有消炎、镇痛、活血化瘀的功效, 我们用有机溶剂萃取法从欧亚旋覆花中分离得到一种具有抗炎镇痛作用的单体——旋覆花内酯(1-o-acetylbritannilactone, ABL), 并证实 ABL 对 LPS 诱导的单核/巨噬细胞活化和 COX-2 基因表达具有显著抑制作用^[2]。而 VSMC 是单核/巨噬细胞源性炎症因子作用的主要靶细胞, 为确定 ABL 对 VSMC 炎症应答的影响, 本研究观察 ABL 对 LPS 诱导的 VSMC NF- κ B 活化及其下游基因

表达的抑制效应, 并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

ABL 由我校药学院分离及鉴定, 其化学结构见图 1。SD 大鼠由河北省实验动物中心提供; DMEM 培养基购自 Promega; 引物由上海生工生物技术公司合成, 凝胶阻滞分析系统 (Promega); NF- κ B p65 多克隆抗体、COX-2 单克隆抗体、I κ B- α 单克隆抗体购自 Santa Cruz; [γ -³²P]ATP 购自北京福瑞生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 采用 5 周龄 SD 大

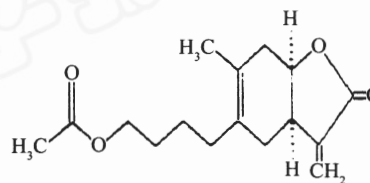


图1 ABL 化学结构式

收稿日期: 2006-10-12 接受日期: 2006-11-28
国家自然科学基金 (No.30472167) 和河北省自然科学基金 (No. C2005000722) 资助项目
* 通讯作者。Tel: 0311-86265563, E-mail: hanmei@hebm.edu.cn

鼠, 取其胸腹主动脉, 按贴块法分离培养 VSMC, 待 VSMC 爬满瓶底后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取 4~6 代细胞进行实验。传代培养的细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中生长至 70%~80% 汇合时, 无血清饥饿培养 24 h, 使细胞处于静止期, 分别加入 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 或用不同浓度(5、10、20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 的 ABL 预温育 1 h 后, 再加 LPS 处理不同时间, 收集细胞用于下列实验。

1.2.2 核蛋白提取及电泳迁移率改变分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 不同条件处理的细胞用冷 PBS 洗涤 3 次后, 按文献^[3]方法提取核蛋白, 用改良的 Lowry 法进行蛋白质定量。EMSA 按照 Promega 公司的试剂盒说明书进行。将含有 NF- κB 顺式作用元件模体(5'-AGTTGAGGGGACTT-TCCCAGGC-3') 的双链寡核苷酸片段用 [γ -³²P]ATP 进行 5' 末端标记。取 0.1 pmol 标记探针(2 000 cpm) 与 5 μg 核蛋白在 20 μl 结合缓冲液 [20% 甘油, 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ MgCl₂, 2.5 mmol/L EDTA, 2.5 mmol/L DTT, 250 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 2 μg poly(DI-dC)] 中室温反应 20 min, DNA-核蛋白复合物经 5% PAGE 分离后, 于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 放射自显影。

1.2.3 细胞总蛋白提取及 Western 印迹 收集各组细胞用冷 PBS 洗涤 3 次后, 将细胞重悬于细胞裂解液 (1% NP40, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10% 甘油, 1 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L PMSF) 中, 冰浴 30 min, 使细胞充分裂解。4 $^{\circ}\text{C}$, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 用改良的 Lowry 法进行蛋白定量。取等量蛋白质样品经 SDS-PAGE 分离后, 电印迹至 PVDF 膜, 按文献^[4]方法, 将印迹的 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中封闭, 依次与第一抗体、第二抗体结合, 抗体结合区带用化学发光法检测。

1.2.4 细胞免疫化学染色 培养在玻片上的 VSMC 经 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 洗 3 次。1% Triton X-100 室温透化处理 20 min, PBS 洗 3 次。5% 正常羊血清封闭后, 分别加入抗 p65 (1:200)、抗 I κB - α (1:200) 或抗 COX-2 (1:200) 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜, PBS 洗 3 次。滴加生物素-辣根过氧化物酶标记的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, PBS 洗 3 次。DAB 显色后, 于镜下观察。阴性对照用 PBS 替代一抗, 随机选取 5 个视野, 计数核 p65 阳性染色细胞。

1.2.5 MTT 分析 生长于 96 孔板中的 VSMC 用不同浓度的 ABL 分别处理 1 h、16 h 后, 每孔加入 20 μl 5 g/L MTT, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4 h, 弃去培养基, 每孔加

入 100 μl 二甲基亚砷静置 10 min, 用酶标仪 490 nm 处测定各组细胞(6 个孔)的 A 值, 以此表示细胞的相对活力。

1.2.6 统计学处理 实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间资料应用单因素方差 (One way ANOVA) 分析, 各项统计均用 SPSS 10.0 软件在计算机上完成。

2 结果

2.1 ABL 抑制 LPS 诱导的 VSMC NF- κB 核转位

Western 印迹结果显示, 在处于静止期的 VSMC 中, NF- κB p65 在胞浆和胞核的分布均较少。给予 LPS 刺激后, VSMC 核内的 NF- κB p65 水平逐渐升高, 于刺激 10 min 时达高峰, 1 h 后逐渐降低, (结果未显示)。用不同浓度(5、10、20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 的 ABL 预处理 VSMC 后, LPS 诱导的 p65 水平升高及核转位增加受到明显抑制(图 2A), 抑制作用的强度呈剂量依赖性。免疫组化染色可见, LPS 处理的 VSMC, 其细胞内 p65 在核内的分布明显增多, 核内出现较多的棕黄色阳性颗粒。不同浓度(5、10、20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 的 ABL 预处理的 VSMC 再用 LPS 刺激后, 核 p65 阳性染色的细胞数明显减少(图 2B)。在上述 LPS 或 ABL 刺激条件下, 细胞的相对活力无明显差异, 说明这些变化并非细胞毒作用。结果表明 ABL 可抑制 LPS 诱导的 NF- κB p65 表达与核转位。

2.2 ABL 抑制 LPS 诱导的 VSMC I κB - α 降解

NF- κB 的核转位是继发于 I κB - α 磷酸化降解之后的事件。为了确定 ABL 抑制 NF- κB 核转位的上游机制, 本研究进一步观察了 ABL 处理后, 由 LPS 诱导的 I κB - α 降解的变化。结果显示, LPS 处理的 VSMC, 其胞内 I κB - α 水平明显降低。而且, LPS 诱导 I κB - α 减少幅度与 NF- κB 核转位速率具有明显的正相关关系。而用不同剂量 ABL (10、20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 预处理的 VSMC, LPS 诱导的 I κB - α 减少受到明显抑制, 与未经 ABL 预处理的细胞比较, 胞浆 I κB - α 水平未出现明显的降低(图 3)。提示 ABL 可能具有抑制 I κB - α 降解, 提高其稳定性的作用。

2.3 ABL 抑制 LPS 诱导的 p65 与 DNA 顺式元件的相互作用。

为了确定 ABL 是否影响核内 NF- κB p65 与 DNA 调控元件的结合活性, 以 5' 末端标记的含有 NF- κB 结合模体的双股寡核苷酸为探针, 分别与不同条件处理的 VSMC 核蛋白进行结合反应。DNA-核蛋白复合物经电泳分离后, 放射自显影可见, LPS 刺激的 VSMC

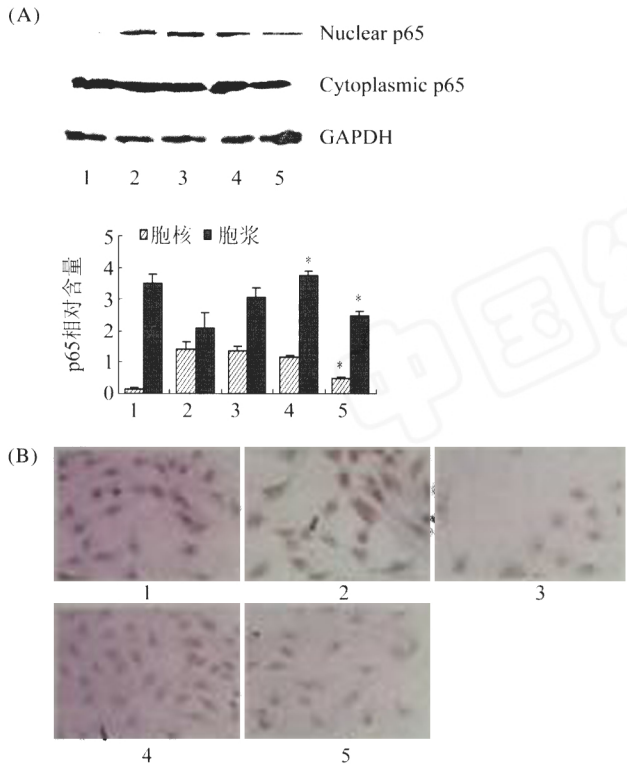


图2 ABL对LPS诱导的VSMC NF- κ B p65核转位的抑制作用
(A) ABL抑制LPS诱导的NF- κ B p65核转位的Western印迹;(B)免疫细胞化学染色(SP, 200 \times)。1: 未经任何处理的VSMC; 2~5: ABL (0、5、10、20 μ mol/L)预温育1 h后再换用LPS刺激1 h。与LPS处理组相比, * $P < 0.05$ 。

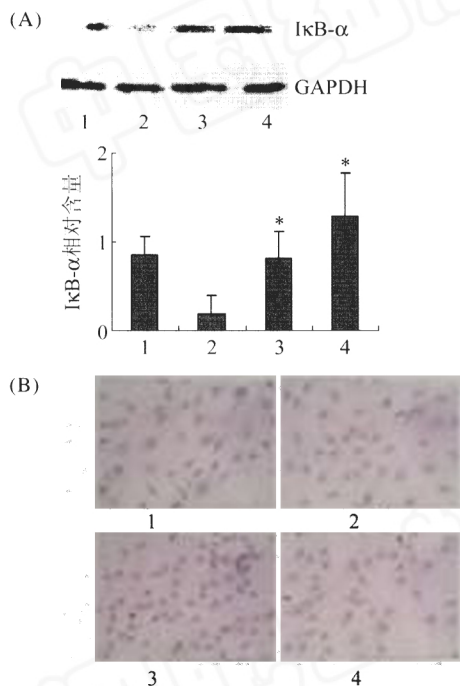


图3 ABL抑制LPS诱导的VSMC I κ B- α 的降解

(A) I κ B- α 的Western印迹分析;(B) I κ B- α 免疫细胞化学染色(SP, 200 \times)。1: 未经任何处理的VSMC; 2~4: ABL (0、10、20 μ mol/L)预温育1 h后再换用LPS刺激1 h。与LPS处理组相比, * $P < 0.05$ 。

核蛋白与探针的结合活性明显升高,由DNA-核蛋白复合物形成的滞后迁移区带可被100倍过量的非标记探针所消除,而经ABL(10、20 μ mol/L)预处理的VSMC, LPS诱导的核蛋白与探针结合活性的升高受到抑制,且ABL的抑制效应具有剂量依赖关系(图4)。

2.4 ABL抑制NF- κ B依赖的炎症基因的表达

为了观察ABL抑制NF- κ B活化后对下游炎症基因表达的影响,本实验检测了炎症标志物COX-2在VSMC中的表达。结果如图5,正常培养的VSMC中



图4 EMSA检测ABL对VSMC NF- κ B-DNA结合活性的影响
1: 游离探针; 2: 100倍未标记NF- κ B寡聚核苷酸冷探针; 3: 对照组; 4~6: ABL (0、10、20 μ mol/L)预温育1 h后再换用LPS刺激60 min。

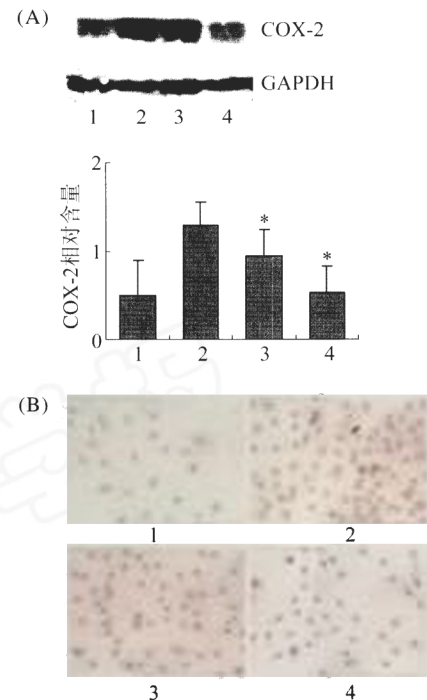


图5 ABL抑制LPS诱导的VSMC COX-2表达

(A) COX-2的Western印迹分析;(B) COX-2的免疫细胞化学染色。1: 未经任何处理的VSMC; 2~4: ABL (0、5、10 μ mol/L)预温育1 h后再换用LPS刺激16 h。与LPS处理组相比, * $P < 0.05$ 。

几乎检测不出 COX-2; LPS 刺激 16 h 后, COX-2 水平明显升高, 约是对照组的 2.6 倍。低剂量(5 $\mu\text{mol/L}$) ABL 预处理的 VSMC, 对 LPS 诱导的 COX-2 表达影响不明显; 而中等剂量(10 $\mu\text{mol/L}$) ABL 即可明显抑制 LPS 对 COX-2 表达的诱导活性($P < 0.05$), COX-2 免疫区带变浅(图 5A), 相对 COX-2 水平下降约 60%, 接近至本底。免疫细胞化学染色也得到相似的结果(图 5B)。

3 讨论

慢性炎症反应是动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄等心血管疾病发生发展的重要原因^[1]。VSMC 是构成各种慢性血管炎症性疾病的主要细胞成分之一。病变局部产生的各种细胞因子和 / 或致炎因子通过自分泌和旁分泌作用来调节 VSMC 的生物行为和功能, 已有研究显示, 参与血管炎症反应的基因多达 160 多种, 其中绝大多数受控于 NF- κ B^[6]。因此, NF- κ B 是血管炎症发生和发展的关键转录调控因子。

通过抑制 NF- κ B 活化而进行的抗炎治疗已成为防治该类心血管疾病的新策略。尽管目前用于治疗的抗动脉粥样硬化药物可通过调整内皮功能而对血管炎症的启动和进展具有一定的缓解作用, 但它们对 VSMC 炎症应答的抑制作用尚不明确^[7]。近年有人试图通过用抑制剂阻断 NF- κ B 活化以达到防治动脉粥样硬化的目的, 结果令人失望^[8]。ABL 是欧亚旋覆花氯仿提取物中含有的一种具有抗炎、止痛的有效单体, 其对单核 / 巨噬细胞的活化及炎性介质的释放具有明显的抑制作用^[2], 本研究从 VSMC 角度观察 ABL 的抗炎机制, 结果显示, ABL 可显著抑制 LPS 诱导的 VSMC NF- κ B 核转位和与顺式元件的结合活性, 其抑制作用的强度呈剂量依赖性。而且证实, ABL 对 NF- κ B 活化的抑制作用与其减少 I κ B- α 降解、提高胞浆 I κ B- α 水平有关, 这是 ABL 抗炎机制与其他类型 NF- κ B 抑制剂不同的特征。并且在整体水平, 给

与大鼠每天口服(26 mg/kg)旋覆花素, 显著抑制了球囊损伤术后的新生内膜形成及 NF- κ B 激活(另有文章发表)。一些研究显示, 受 NF- κ B 调节的下游基因中既有促炎基因, 也有抑炎基因(I κ B- α 、IL-10)^[9], NF- κ B 特异性抑制剂在抑制血管炎症反应的同时, 也削弱了机体自身的抗炎功能。而 ABL 对 NF- κ B 下游基因表达活性的抑制是具有选择性的。用 ABL 预处理的 VSMC, 致炎因子诱导的 COX-2 表达活性被削弱, 但同时 I κ B- α 的水平并未发现明显的降低。I κ B- α 既是 NF- κ B 转录激活的下游基因之一, 也是 NF- κ B 活化的抑制因子, 通过与 NF- κ B 结合而使后者以非活性形式存在于胞浆中, 各种因素诱导的 I κ B- α 磷酸化及与 NF- κ B 的解离和降解是 NF- κ B 活化的初始步骤^[10,11]。因此, 降低 I κ B- α 磷酸化水平, 提高 I κ B- α 稳定是抑制 NF- κ B 活化的有效途径。ABL 可快速抑制 LPS 诱导的 I κ B- α 降解, 并在较短时间内使其水平恢复至正常状态, 说明 ABL 对 NF- κ B 活性的抑制是具有选择性的。上述结果提示, ABL 对 VSMC 炎症应答具有调制作用, 通过选择性抑制促炎基因表达, 提高 I κ B- α 稳定性而抑制 VSMC 炎症表型的持续, 后者是阻断或缓解动脉粥样硬化和血管再狭窄的发生发展所必需的。因此, ABL 是一种具有良好应用前景的抗血管慢性炎症性疾病的有效单体。

参考文献(References)

- [1] Xanthoulea S et al. *Curr Opin Lipidol*, 2005, **16**: 536
- [2] Han M et al. *Life Sci*, 2004, **75**: 675
- [3] 聂磊等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, **21**: 94
- [4] 韩梅等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, **19**: 250
- [5] Libby P. *Nature*, 2002, **420**: 868
- [6] de Winther MP et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25**: 904
- [7] Jiang B et al. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 1323
- [8] Kanters E et al. *J Clin Invest*, 2003, **112**: 1176
- [9] Zernecke A et al. *Basic Res Cardio*, 2005, **100**: 93
- [10] Lee SJ et al. *Mol Cells*, 2003, **16**: 97
- [11] Levrant S et al. *J Biol Chem*, 2005, **280**: 34878

1-o-acetylbritannilactone Inhibits Inflammatory Response by Suppressing NF- κ B Activation

Yue-Ping Liu, Mei Han*, Jin-Kun Wen, Bin Zheng

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

Abstract Immunocytochemistry and Western blot analysis were adopted to measure the nuclear translocation of NF- κ B p65 and the expression of I κ B- α , cyclo-oxygenase-2 (COX-2). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed to detect DNA-binding activity of NF- κ B in vascular smooth muscle cells (VSMC) pretreated with ABL. Western blot and immunocytochemistry analysis showed that lipopolysaccharide (LPS) treatment resulted in increasing nuclear translocation of NF- κ B p65, and declining levels of I κ B- α in VSMC. However, 1-o-acetylbritannilactone (ABL) pretreatment inhibited the nuclear translocation of p65 and degradation of I κ B- α induced by LPS, and the inhibitory effect of ABL was concentration-dependent. LPS increased the binding of nuclear extracts from VSMC induced by LPS to double strands oligonucleotide probe containing NF- κ B binding site using EMSA. The shift bands were abolished when a 100-fold excess of unlabeled NF- κ B oligonucleotide probe was included. Pretreatment with ABL significantly reduced the nuclear level of NF- κ B and declined the binding activity of nuclear extracts with DNA probe induced by LPS. Furthermore, ABL consequentially inhibited the expression of NF- κ B-dependent COX-2 gene induced by LPS. These results suggest that ABL may be one anti-inflammatory drug which inhibits the expression of COX-2 gene by blocking NF- κ B activation and thus suppresses the inflammatory response to LPS in VSMC

Key words 1-o-acetylbritannilactone; NF- κ B; vascular smooth muscle cells; inflammation

Received: October 12, 2006 Accepted: November 28, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30472167) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2005000722)

*Corresponding author. Tel: 86-311-86265563, E-mail: hanmei@hebmh.edu.cn