

米诺环素对人脐静脉内皮细胞-单核细胞黏附的抑制作用及其机制研究

陈莉*, 朱乃军, 袁媛(苏州市食品药品检验所, 江苏苏州 215104)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4381-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.20

摘要 目的:研究米诺环素(MC)对肿瘤坏死因子 α (TNF- α)诱导内皮细胞-单核细胞黏附的抑制作用及其机制。方法:通过酶消化法从人脐带中获得原代人脐静脉内皮细胞(HUVECs)。将HUVECs细胞分为空白对照组、模型组和MC低、中、高剂量(1、10、100 $\mu\text{mol/L}$)组,药物作用2 h后,除空白对照组外其余各组均加入10 ng/ml TNF- α 诱导HUVECs与单核THP-1细胞的黏附,复制内皮细胞-单核细胞黏附模型。荧光显微镜观察黏附细胞数,荧光酶标仪测定其荧光强度;流式细胞仪检测细胞间黏附分子1(ICAM-1)的表达;Western blot法检测细胞核及细胞浆转录因子(NF)- κ B p65蛋白的表达。结果:与空白对照组比较,模型组黏附细胞数及其荧光强度、ICAM-1表达、细胞核NF- κ B p65蛋白表达均增加,细胞浆NF- κ B p65蛋白表达减弱,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,MC低、中、高剂量组黏附细胞数及其荧光强度、ICAM-1表达均降低;MC中、高剂量组细胞核NF- κ B p65蛋白表达减弱,细胞浆NF- κ B p65蛋白表达增强,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:MC能显著地减少TNF- α 诱导的内皮细胞-单核细胞的黏附,其机制可能与降低HUVECs细胞表面ICAM-1的表达、抑制NF- κ B p65蛋白的表达有关。

关键词 米诺环素;内皮细胞;单核细胞;黏附;黏附分子;转录因子- κ B p65

Study on Inhibitory Effects of Minocycline on HUVECs-lymphomonocyte Adhesion and Its Mechanism

CHEN Li, ZHU Nai-jun, YUAN Yuan (Suzhou Institute for Food and Drug Control, Jiangsu Suzhou 215104, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effects of minocycline (MC) on TNF- α induced monocyte-endothelial adhesion and the relative mechanism. METHODS: Primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated from human umbilical veins with enzyme digestion. HUVECs were divided into blank control group, model group, MC low-dose, medium-dose and high-dose groups (1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$). After treated for 2 h, 10 ng/ml TNF- α was employed to stimulate monocytes THP-1 adhesion with HUVECs except for blank control group, in order to induce monocyte-endothelial adhesion model. The number of adherent cell was observed by fluorescence microscope, and fluorescence intensity was detected by microplate reader. Flow cytometry was adopted to detect the expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1. The expressions of NF- κ B p65 protein in cell nucleus and cytoplasm were detected by Western blot. RESULTS: Compared with blank control group, the number and fluorescence intensity of adherent cell, the expression of ICAM-1 and the protein expression of NF- κ B p65 in nucleus were all increased in model group, while the protein expression of NF- κ B p65 in cytoplasm was weakened, with statistical significance ($P < 0.01$). Compared with model group, the number and fluorescence intensity of adherent cell, the expression of ICAM-1 were all decreased in MC low-dose, medium-dose and high-dose groups; the protein expression of NF- κ B p65 in nucleus was weakened in MC medium-dose and high-dose groups, while the protein expression of NF- κ B p65 in cytoplasm was heightened, with statistical significance ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). CONCLUSIONS: MC can inhibit TNF- α induced monocyte-endothelial adhesion by a likely mechanism of reducing the expression of ICAM-1 in HUVECs and inhibiting the expression of NF- κ B p65 protein.

KEYWORDS Minocycline; Endothelial cells; Monocyte; Adhesion; Adhesion molecule; NF- κ B p65

血管内皮细胞的损伤在动脉粥样硬化(AS)形成过程中具有重要作用^[1]。在AS形成早期,损伤的内皮细胞会促进单核细胞募集和黏附,单核细胞随后穿过内膜迁移至内膜下分化成巨噬细胞,摄取氧化低密度脂蛋白形成泡沫细胞,在血管壁上形成脂肪条纹。单核细胞与血管内皮细胞黏附是AS形成过程中最早的现象之一,也是AS发生的重要环节。而黏附分子如细胞间黏附分子1(ICAM-1)在介导单核细胞及淋巴细胞与血管壁黏附、聚集、迁移过程中起到了极其重要的作用。

米诺环素(MC)是一种广谱的四环素类抗菌药物。近期研究发现,除抗菌作用外MC还可有效减少AS中斑块的形

成。因此,笔者考察MC对内皮细胞损伤及内皮细胞-单核细胞黏附的影响,旨在进一步研究MC抗AS的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

BD FACSCalibur 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);SH1000 酶联免疫检测仪(日本 CORONA 公司);DY-CP-31DN 电泳仪(北京市六一仪器厂);Gel Catcher 2850 凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);5804R 台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Wallac Multilabel Counter 1420 荧光酶标仪(芬兰 PE 公司)。

1.2 药品与试剂

MC(美国 Sigma 公司,批号:014K1207、078K1053,规格:

* 主管药师。研究方向:药学。电话:0512-68222721。E-mail: chenli7710@126.com

250 mg/瓶);胞浆和核蛋白提取试剂(批号:SINP001)、二辛可酸(BCA)试剂盒(批号:CHEM001)均购自唯奥基因科技有限公司;肿瘤坏死因子 α (TNF- α ,美国Peprotech公司,批号:0607B25);兔抗人NF- κ B p65抗体、兔抗人lamin B抗体、兔抗人 β -actin抗体、辣根酶标记二抗(美国Santa Cruz公司);PE标记的兔抗人ICAM-1抗体(美国Abcam公司);M200培养基(北京清源浩生物科技有限公司);细胞裂解液[含20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)、137 mmol/L NaCl、2 mmol/L 乙二胺四乙酸、1 mmol/L 氟化钠、1% Triton X-100、0.5% 脱氧胆酸钠、0.1% 十二烷基磺酸钠、10% 甘油]。

1.3 细胞

单核细胞THP-1购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 原代人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)的获取与培养^[2]

在无菌条件下取新生儿脐带20~30 cm,剪去钳痕和凝血块阻塞部分,找到脐静脉。一端用带有胶管的玻璃管结扎固定,经胶管接注射器,用磷酸盐缓冲液(PBS)灌洗。待脐静脉内的残血除净后,将另一端用止血钳夹闭,向脐静脉内灌注0.25%胰蛋白酶8~10 ml,将夹闭的脐静脉放入已灭菌的大平皿中,37℃孵育20 min,在此期间经常翻动使酶溶液在血管内流动以促使其内皮细胞与酶均匀接触。取出脐静脉后轻轻挤压管壁,将含有内皮细胞的酶溶液注入50 ml离心管中,再以20 ml M200培养基冲洗管腔,流出液也并入离心管中,1 200 r/min离心10 min(离心半径12 cm),弃上清液,加入含有低血清生长添加剂(LSGS)的M200培养基,充分吹打混匀成细胞悬液。取少量细胞悬液在血细胞计数板上计数。最后调整细胞数,以约 8×10^4 ml⁻¹细胞密度置于5% CO₂中,37℃静止培养24 h后更换培养液,除去未贴壁的细胞。每隔2~3 d换液1次,以维持细胞的营养和内环境的稳定,试验用细胞为第2~5代。

2.2 单核细胞的培养^[2]

单核细胞THP-1为悬浮生长细胞,用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液培养、传代。离心弃上层液,得THP-1细胞。用不含Ca²⁺和Mg²⁺的Hank's平衡缓冲液稀释成 1×10^6 ml⁻¹细胞密度的悬液待用。

2.3 内皮细胞活力的检测

HUVECs细胞随机分为空白对照(仅给予PBS)组、模型(仅给予TNF- α)组、MC对照(仅给予100 μ mol/L MC)组和MC低、中、高剂量(1、10、100 μ mol/L)组。各组细胞接种于96孔板中培养,细胞密度为 5×10^4 个/孔,加入各剂量MC培养2 h,除空白对照组和MC对照组外,其余各组加入10 ng/ml TNF- α 继续培养6 h。采用MTT法考察细胞活力。实验结束前4 h每孔加入20 μ l MTT,检测时弃去上清液,加入100 μ l 二甲基亚砜,轻轻振荡10 min后,用酶标仪在570 nm波长下测定吸光度值,以每0.001 mm²培养皿上的细胞数为准,考察HUVECs细胞活力。

2.4 内皮细胞-单核细胞黏附情况的观察及检测

取HUVECs细胞,随机分为空白对照(仅给予PBS)组、模型(仅给予TNF- α)组和MC低、中、高剂量(1、10、100 μ mol/L)组(分组下同)。与各剂量MC作用后,除空白对照组外,其余各组加入10 ng/ml TNF- α 诱导与THP-1细胞(用荧光探针BCECF-AM标记)的黏附,37℃孵育,复制内皮细胞-单核细胞黏附模型,用荧光显微镜观察黏附细胞数。为了将各组黏附细胞数进行量化比较,分别向各组细胞中加入裂解液,裂解后用荧光

酶标仪测定其荧光强度,考察各组TNF- α 诱导的HUVECs细胞与THP-1细胞黏附情况。

2.5 内皮细胞表面ICAM-1表达的检测

取各组第1~2代HUVECs细胞与各剂量MC作用并复制内皮细胞-单核细胞黏附模型后,加入PE标记的兔抗人ICAM-1抗体,避光孵育30 min后,采用流式细胞仪检测;空白对照组不加上述荧光标记抗体。每次计数10 000个细胞,测定各组细胞荧光强度,检测各组HUVECs细胞表面ICAM-1的表达。

2.6 内皮细胞NF- κ B p65蛋白表达的检测

分别提取各组HUVECs细胞胞浆和胞核中NF- κ B p65蛋白,据BCA试剂盒说明书操作,采用Western blot法检测NF- κ B p65蛋白表达。常规电泳、转膜、封闭后加入NF- κ B p65、lamin B和 β -actin抗体,4℃轻摇过夜,洗膜,加入辣根过氧化物酶标记二抗,将均匀混合后的发光液滴加到膜上,于凝胶扫描成像系统下扫描,ChemiScope analysis软件系统检测目的条带的光密度值,考察细胞核及细胞浆中NF- κ B p65蛋白的表达。

2.7 统计学处理

采用Graphpad 5.0软件处理试验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素分析其正态分布,两组间比较用 t 检验,多组间比较用Dunnett- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 内皮细胞活力的变化

与空白对照组比较,在给予不同剂量的MC及TNF- α 后,各组细胞荧光强度间的差异无统计学意义($P > 0.05$),表明MC对HUVECs细胞活力没有影响,由此排除了MC对HUVECs细胞的细胞毒作用。

3.2 内皮细胞-单核细胞黏附的变化

与空白对照组比较,模型组经TNF- α 诱导的HUVECs细胞和THP-1细胞的黏附细胞数及其荧光强度明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,MC低、中、高剂量组的黏附细胞数及其荧光强度明显下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);其中,MC低剂量组与中剂量组细胞荧光强度的差异无统计学意义($P > 0.05$),而MC中剂量组与高剂量组细胞荧光强度的差异有统计学意义($P < 0.05$)。试验结果表明,MC能够减少TNF- α 诱导的HUVECs细胞和THP-1细胞黏附,且高剂量MC的抑制作用强于中、低剂量,该作用具有一定的剂量依赖性,结果见图1、图2。

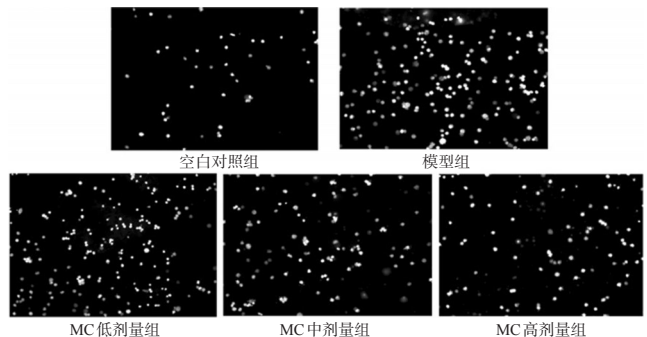


图1 各组内皮细胞-单核细胞黏附的荧光显微镜图($\times 100$)
Fig 1 Fluorescence microgram of endothelial cells and monocytes adhesion in each group($\times 100$)

3.3 内皮细胞表面ICAM-1表达的变化

与空白对照组比较,模型组经TNF- α 诱导后的HUVECs细胞表面ICAM-1的表达明显增加,差异有统计学意义($P <$

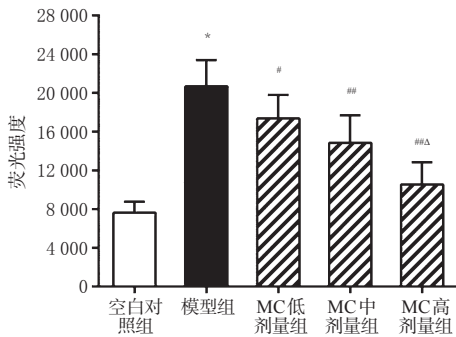


图2 各组内皮细胞-单核细胞黏附检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:与空白对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与MC中剂量组比较, $\Delta P<0.05$

Fig 2 Adhesion of endothelial cells and monocytes in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note: vs. blank control group, * $P<0.01$; vs. model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; vs. MC medium dose group, $\Delta P<0.05$

0.01)。与模型组比较,MC低、中、高剂量组ICAM-1表达明显下降,差异均有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);且MC低、中、高剂量组之间ICAM-1表达的差异也有统计学意义($P<0.01$)。这表明MC对ICAM-1表达的抑制作用呈剂量依赖性,结果见图3。

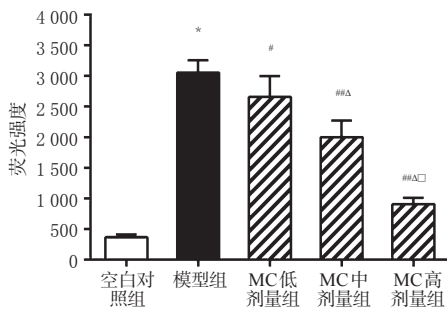


图3 各组细胞ICAM-1表达检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:与空白对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与MC低剂量组比较, $\Delta P<0.01$;与MC中剂量组比较, $\square P<0.01$

Fig 3 Expression of ICAM-1 in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note: vs. blank control group, * $P<0.01$; vs. model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; vs. MC low dose group, $\Delta P<0.01$; vs. MC medium dose group, $\square P<0.01$

3.4 内皮细胞NF- κ B p65蛋白表达的变化

与空白对照组比较,模型组细胞核及细胞浆内NF- κ B p65蛋白的表达均有明显变化,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,MC中、高剂量组细胞核中NF- κ B p65蛋白表达减弱,而细胞浆中该蛋白的表达增强,差异均有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。该结果表明MC对NF- κ B p65蛋白的表达有明显的抑制作用,结果见图4、图5。

4 讨论

TNF- α 是一种常见的促炎因子,在人AS斑块中可检测到,其主要通过损伤内皮细胞、促进单核细胞与内皮细胞的黏附及向内膜下迁移等环节促进AS形成^[4]。本试验以TNF- α 作为诱导剂,诱导内皮细胞损伤,促使其与单核细胞黏附。结果显示,MC能抑制TNF- α 诱导的内皮细胞和THP-1细胞间黏附。

细胞间的黏附主要是由黏附分子介导的,其中ICAM-1是介导内皮与单核细胞黏附的主要黏附分子之一^[5]。研究显示,

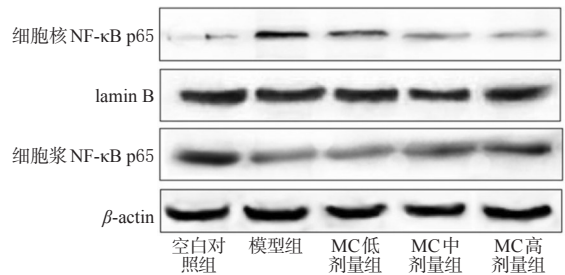


图4 各组细胞细胞核及细胞浆中NF- κ B p65蛋白表达电泳图
Fig 4 Electrophoretogram of NF- κ B p65 protein expression in nucleus and cytoplasm in each group

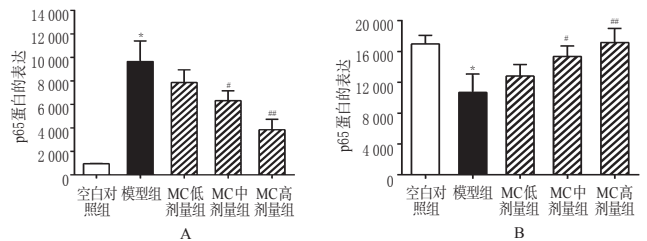


图5 各组细胞NF- κ B p65蛋白表达检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

A.细胞核;B.细胞浆

注:与空白对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$

Fig 5 Protein expression of NF- κ B p65 in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A.nucleus;B.cytoplasm

Note: vs. blank control group, * $P<0.01$; vs. model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

ICAM-1在AS的发生发展中起着重要的作用。在AS的早期病灶中,ICAM-1主要参与单核细胞向内皮细胞黏附、迁移等;在进展期,则促进已迁入病灶的单核细胞滚动、T淋巴细胞的激活,并增加其他细胞与细胞间的相互作用。研究发现,敲除ICAM-1基因的小鼠经高脂饮食后AS斑块定量较对照组下降50%~70%^[6]。这表明降低ICAM-1的表达,可抑制单核细胞的黏附和迁移,进而减轻炎症损伤。流式细胞仪检测的结果也显示,MC能抑制HUVECs表面ICAM-1的表达,与细胞黏附试验结果相一致。

目前认为,ICAM-1表达上调的分子机制主要与NF- κ B的活化有关^[7]。有研究表明,NF- κ B能够调节多种炎症和免疫基因的表达,导致AS的发生。研究发现人类和动物AS病灶粥样瘤内膜、中膜的平滑肌细胞、巨噬细胞、内皮细胞里均有活化的NF- κ B存在;而在正常的血管壁中几乎没有发现活化的NF- κ B^[8]。NF- κ B激活后可调节多种与AS形成、发展有关的炎症因子的转录和表达,如趋化因子、黏附分子、细胞因子、生长因子及多种生物活性物质,导致AS及不稳定斑块的形成,其活化程度与疾病进展程度相关。故认为斑块中NF- κ B的活化是斑块破裂的敏感标志物之一。静息状态下,NF- κ B由p65、p50亚基与其抑制蛋白I- κ B构成二聚体,以失活状态存在于胞质中^[9];被激活时,NF- κ B便从细胞浆移位至细胞核中,并暴露其核定位序列,与炎症反应调节蛋白基因启动子区域中特定的 κ B序列结合^[10],调控多种与AS形成、发展有关的炎症因子和生物活性物质的转录和表达,从而加剧AS的形成。本试验发现MC能够抑制NF- κ B p65蛋白的表达,从而抑制NF- κ B通路。由此推测,MC减少内皮细胞-单核细胞黏附及黏附分子ICAM-1表达的作用可能与其对NF- κ B p65蛋白转移的抑制作

具有抗氧化活性的北五味子内生真菌的筛选及鉴定

赵 玥*, 秦 源, 李 娜, 李志鹏, 范志强, 于祥勇, 贾景明*(沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

中图分类号 R282.71 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4384-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.21

摘要 目的:对具有抗氧化活性的北五味子内生真菌进行筛选及鉴定。方法:利用组织分离法,从野生北五味子的根、茎、叶及果实中分离内生真菌,分别采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除法及羟自由基清除法筛选具有抗氧化活性的内生真菌;并对菌株的总DNA进行提取,利用通用引物ITS1和ITS4对菌株18S rDNA ITS序列进行扩增和测序,将测序结果进行同源性比对分析,确定活性菌株的分类地位。结果:从北五味子中共分离得到23株内生真菌。其中,从根部分离出的编号为GSR-12的菌株表现出较强的抗氧化活性,其DPPH自由基清除率和羟自由基清除率分别为87.96%和82.31%;经比对分析后鉴定GSR-12为粉红粘帚霉(*Clonostachys rosea*)。结论:分离自野生北五味子根部的1株粉红粘帚霉具有较强的抗氧化活性。

关键词 北五味子;内生真菌;抗氧化活性;鉴定;粉红粘帚霉

Screening and Identification of Endophytic Fungi from *Schisandra chinensis* with Antioxidant Activity

ZHAO Yue, QIN Yuan, LI Na, LI Zhi-peng, FAN Zhi-qiang, YU Xiang-yong, JIA Jing-ming (School of TCM, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To screen and identify endophytic fungi from *Schisandra chinensis* with antioxidant activity. METHODS: The tissue isolation skill was used to isolate endophytic fungi from roots, leaves, stems and fruits of *S. chinensis*. And antioxidant activity of endophytic fungi were screened by DPPH radical scavenging assay and hydroxyl radical scavenging assay. The total DNA were extracted; the 18S rDNA ITS were amplified and sequenced with primer ITS1 and ITS4; the results of sequencing were analyzed comparatively based on homology to confirm the classification of active strains. RESULTS: 23 strains were isolated from *S. chinensis*. GSR-12, isolated from roots of *S. chinensis*, had strong antioxidant activities. The scavenging rate on DPPH and the hydroxyl radical were 87.96% and 82.31% respectively. GSR-12 strain was identified as *Clonostachys rosea* by analyzed comparatively. CONCLUSIONS: 1 strain of *C. rosea*, isolated from roots of *S. chinensis*, has strong antioxidant activity.

KEYWORDS *Schisandra chinensis*; Endophytic fungi; Antioxidant activity; Identification; *Clonostachys rosea*

用有关。

参考文献

- [1] 杨延坤,孙鑫,郑宏.糖萼的内皮保护作用与动脉粥样硬化[J].中国动脉硬化杂志,2013,21(4):381.
- [2] Jeon KI, Xu X, Aizawa T, et al. Vinpocetine inhibits NF-kappaB-dependent inflammation via an IKK-dependent but PDE-independent mechanism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(21):9 795.
- [3] Saito K, Miyazawa M, Nukada Y, et al. Development of an in vitro skin sensitization test based on ROS production in THP-1 cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2013, 27(2):857.
- [4] Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke[J]. *Nat Med*, 2002, 8(12):1 363.
- [5] 黎创幸.丹酚酸B与三七总皂苷配伍对缺氧复氧内皮细胞黏附分子-1表达及对中性粒细胞与内皮细胞黏附率的影响研究[J].中国药房,2006,17(14):1 061.
- [6] Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, et al. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(8):1 517.
- [7] Jia Z, Nallasamy P, Liu D, et al. Luteolin protects against vascular inflammation in mice and TNF- α -induced monocyte adhesion to endothelial cells via suppressing IKB α /NF- κ B signaling pathway[J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(3):293.
- [8] Brand K, Page S, Rogler G, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(7):1 715.
- [9] 贾萍,荣晓凤,丁燕,等.芍药总苷调控巨噬细胞核因子- κ B p65蛋白核转移作用的研究[J].中国药房,2007,18(36):2 811.
- [10] Huang CS, Lin AH, Yang TC, et al. Shikonin inhibits oxidized LDL-induced monocyte adhesion by suppressing NF κ B activation via up-regulation of PI3K/Akt/Nrf2-dependent antioxidation in EA.hy926 endothelial cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 93(3):352.

* 讲师,博士。研究方向:药用菌物资源。电话:024-23986501。E-mail:zhaoyue82@126.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:珍稀濒危药用植物及药用菌物资源。电话:024-23986501。E-mail:jjajingming@163.com

(收稿日期:2015-03-06 修回日期:2015-05-15)

(编辑:邹丽娟)