

伪原薯蓣皂苷对 Ox-LDL 诱导人脐静脉内皮细胞 COX-2 表达的影响及机制研究

李迪迪, 陈 扬, 谭婉贤, 邹文俊*

成都中医药大学, 成都 610000

摘要:为探究伪原薯蓣皂苷对 Ox-LDL 诱导的内皮细胞 COX-2 表达的影响。体外培养人脐静脉内皮细胞 (HUVEC), 加入伪原薯蓣皂苷预处理细胞 24 h, 再以氧化低密度脂蛋白 (Ox-LDL) 诱导 HUVEC 细胞表达 COX-2; 采用 Real-time PCR 和 western blot 分别检测了 COX-2 的 mRNA 和蛋白表达水平, 以及与 COX-2 炎症信号通路相关的激酶活性。结果显示, 伪原薯蓣皂苷剂量依赖的下调 COX-2 的表达, 同时抑制 p38MAPK 的激酶活性。这些结果表明, 伪原薯蓣皂苷可能通过抑制 TLR2/p38MAPK 通路而抑制内皮细胞炎症介质 COX-2 的表达, 提示其对内皮细胞的抗炎效应。

关键词:伪原薯蓣皂苷; 低密度氧化脂蛋白; 人脐静脉内皮细胞; 环氧合酶-2; TLR2/p38MAPK 通路

中图分类号: R965.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.7.004

Effect of Pseudoprotodioscin on OX-LDL-induced COX-2 Expression in HUVEC

LI Di-di, CHEN Yang, TAN Wan-xian, ZOU Wen-jun*

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610000, China

Abstract: Pseudoprotodioscin is the main active compound of Di'aoXinXue Kang capsules. To explore the effect of pseudoprotodioscin on cyclooxygenase-2 (COX-2) expression induced by OX-LDL in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), HUVEC cells were cultured *in vitro*. After pretreatment with different concentrations of pseudoprotodioscin for 24 h, OX-LDL was added for the induction of COX-2 expression. The expressions of COX-2 mRNA was detected by Real-time PCR, and the expression of COX-2 protein and the phosphorylation of mitogen activated protein kinase (MAPK) associated with COX-2 inflammatory signaling pathway were determined by Western blot. Our results showed that pseudoprotodioscin can inhibit OX-LDL-induced COX-2 expression in HUVEC dose-dependently, and inhibit TLR2 expression and p38MAPK activity. These results indicated that pseudoprotodioscin inhibited OX-LDL-induced COX-2 expression possibly via affecting the TLR2 / p38MAPK pathway, suggesting its anti-inflammatory effect on vein endothelial cells.

Key words: Pseudoprotodioscin; OX-LDL; human umbilical vein endothelial cells; cyclooxygenase-2; TLR2/P38MAPK pathway

动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 是心血管疾病发病的主要原因。大量研究表明 AS 是一种慢性炎症, 氧化低密度脂蛋白 (Oxidized low-density lipoprotein, Ox-LDL) 引起的内皮损伤伴随多种炎症因子及细胞因子交互作用^[1], 以及脂质代谢异常、血流动力学改变是动脉粥样硬化发生和发展的重要基

础^[2]。地奥心血康胶囊是一种广泛用于治疗心血管疾病的中成药制剂, 临床主要用于预防和治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病 (冠心病)、心绞痛等疾病, 其主要成分包括伪原薯蓣皂苷, 薯蓣皂苷, 原薯蓣皂苷等, 其中伪原薯蓣皂苷含量最高, 也是地奥心血康胶囊的质量控制标准成分^[3]。本课题组前期研究发现, 地奥心血康胶囊具有显著的抗炎活性, 体内外均可减少 PGE2 和 TNF- α 水平, 其抗炎机制可能与抑制 NF- κ B/COX-2 通路有关^[3,4], 但缺乏抗炎及其机制的深入研究, 尤其缺乏伪原薯蓣皂苷对

Ox-LDL 刺激血管组织炎症如内皮损伤的保护作用。本文采用体外培养人脐静脉内皮细胞 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), 以 Ox-LDL 刺激环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 的表达, 研究了伪原薯蓣皂苷对 HUVEC 细胞 COX-2 表达的影响, 并进一步研究了伪原薯蓣皂苷对 COX-2 相关信号通路的影响, 为探讨地奥心血康胶囊发挥抗炎活性的物质基础以及其作用机制提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

HUVEC 细胞购自“Life Technologies”; 伪原薯蓣皂苷购自中国食品药品检定研究院, 经 HPLC 鉴定, 纯度为 92% (批号 20151227)。

主要试剂: Ox-LDL (广州奕源生物科技)、Tris、Rnase free water (Sigma); Trizol Reagent (Invitrogen); 全蛋白提取试剂盒 (凯基生物), dNTP MIX、oligo (dt)15 primer、Random primers、M-MLV RT 5 × Buffer (Promage), SYBR Select Master Mix (life technology)。

主要仪器: 实时定量基因扩增荧光检测仪: Bio-Rad CFX96 touch q-PCR system (Bio-Rad, California, 美国); 化学发光成像仪: Thermo Fisher Scientific,

Massachusetts, 美国。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和药物处理

采用内皮细胞培养基 (含体积分数为 5% FBS、体积分数为 1% 双抗, 体积分数为 1% EGCSF) 中于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 HUVEC 细胞, 待细胞生长至对数期, 接种至 6 孔板中, 接种密度为 1 × 10⁵/孔, 细胞生长至 80% 满, 弃去培养液, 加入含不同剂量伪原薯蓣皂苷 (PBS 溶解和稀释) 的培养基继续培养 24 h, 然后加入 Ox-LDL 刺激 HUVEC 细胞 4 h 或 24 h, 收集细胞, 分别用于 mRNA 和蛋白表达检测。

1.2.2 Real-time PCR

Ox-LDL 刺激 HUVEC 细胞 4 h 后, 采用 Trizol 法收集细胞中总 RNA, 测定吸光度 A_{260/280} 在 1.8 ~ 2.0, 表明其纯度满足 Real-time PCR 实验需求, 用于反转录及基因的扩增实验。反转录条件为 25 °C 10 min, 42 °C 1 h, 95 °C 10 min, 以 GAPDH 为内参采用 SYBR Green 染料法荧光定量 PCR 检测 TLR2、COX-2 mRNA 的表达, 反应体系如表 1, 反应条件为 50 °C 2 min, 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 15 sec, 60 °C 退火 1 min, 重复 40 个循环。各引物序列如下表 2。

表 1 Real-time PCR 反应体系

Table 1 Reaction system for real-time PCR

试剂 Reagent	使用量 Usage amount (μL)	终浓度 Final concentration
SYBR Green QPCR Master Mix (2 ×)	5	1 ×
Sense primer (10 μM)	0.4	0.4 μM
Antisense primer (10 μM)	0.4	0.4 μM
RNase Free Water	3.2	
DNA template	1	

表 2 Real-time PCR 检测的引物序列

Table 2 Primer sequence for real-time PCR analysis

基因 Gene	物种 Species	上游引物 Sense primer	下游引物 Antisense primer
TLR2	human	ATCCTCCAATCAGGCTTCTCT	GGACAGGTCAAGGCTTTTACA
COX2	human	TGCACTATGGTTACAAAAGCTGG	TCAGGAAGCTCCTTATTTCCCTT
GAPDH	human	AGGTCGGTGTGAGGTCA	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

1.2.3 Western blot

Ox-LDL 刺激 HUVEC 细胞 24 h 后,收集 HUVEC 细胞,加入含 1 mM PMSF 的 RIPA 细胞裂解液裂解细胞,于 4 °C 下 12000 rpm 离心 15 min 后,收集上清液,采用 BCA 法测定总蛋白浓度并稀释至等浓度;加入 5 × 上样缓冲液,沸水煮 10 min 变性,-20 °C 保存。10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后,转至 PVDF 膜上,5% BSA 室温封闭 2 h,加入用 PBST 稀释的一抗,过夜孵育,PBST 洗涤 4 次,10 min/次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 2 h;PBST 洗涤 4 次,10 min/次;ECL (Thermo Fisher Scientific) 发光试剂盒检测特异性蛋白条带。本实验采用 β -actin 作为对照,以 Image J 软件计算蛋白条带灰度值,蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值/相应 β -actin 蛋白灰度值。

1.3 统计分析

所有实验均重复三次。各组数据均用均数 ± 标

准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 18.0 单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 继而采用 N-K 检验进行显著性差异分析, $P < 0.05$ 则表示差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 伪原薯蓣皂苷对 HUVEC 细胞 COX-2 表达的影响

以不同剂量伪原薯蓣皂苷预处理 HUVEC 细胞 24 h,再以 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ox-LDL 处理 4 h 或 24 h 后,分别检测 COX-2 mRNA 和蛋白表达水平。实验结果表明,与对照组比较,Ox-LDL 能显著诱导 COX-2 的 mRNA 表达 ($P < 0.01$),而采用 5.82×10^{-5} 、 2.91×10^{-5} 、 1.46×10^{-5} mol/L 伪原薯蓣皂苷预处理可显著抑制 Ox-LDL 诱导的 COX-2 mRNA 的表达 (图 1A),且呈剂量依赖性 ($P < 0.01$);在 COX-2 蛋白表达水平,伪原薯蓣皂苷也能显著抑制 COX-2 表达 (图 1B),并呈剂量依赖性 ($P < 0.01$)。

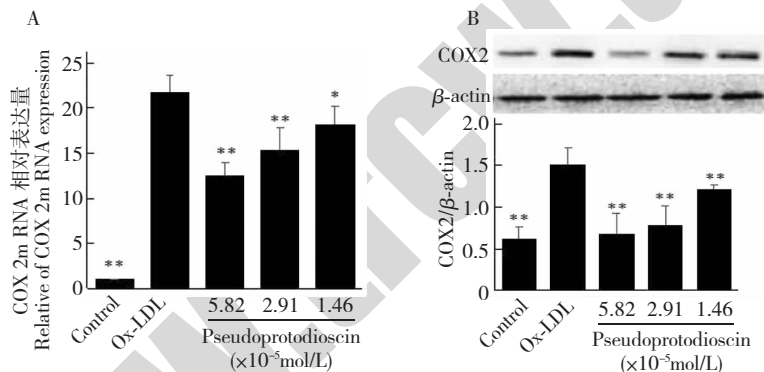


图 1 伪原薯蓣皂苷对 Ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞 COX-2 mRNA 及蛋白表达的影响

Fig. 1 The effect of pseudoprotodioscin on COX-2 protein and COX-2 mRNA expression in Ox-LDL-induced HUVEC cells

注:A. COX-2 mRNA 的相对表达量;B. COX-2 蛋白相对表达量。所有的结果至少独立重复 3 次,结果以均值 ± 标准差表示;与 Ox-LDL 组比较,* $P < 0.05$;与 Ox-LDL 组比较,** $P < 0.01$

Note:(A) The relative expression of COX-2 mRNA, (B) The relative expression of COX-2 protein. The results were representative of at least three independent experiments run in triplicate and expressed as the mean ± SD. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with Ox-LDL group

2.2 伪原薯蓣皂苷对 HUVEC 细胞 TLR2 受体表达的影响

Toll 样受体-2 (Toll-like receptor-2, TLR-2) 为跨膜蛋白,是调控 COX-2 表达的早期信号分子,本研究在伪原薯蓣皂苷抑制 Ox-LDL 诱导 HUVEC 细胞 COX-2 表达的基础上,进一步检测了 TLR2 的表达。实验结果如图 2: 5.82×10^{-5} 、 2.91×10^{-5} 、 1.46×10^{-5} mol/L 伪原薯蓣皂苷预处理均可显著抑制 Ox-LDL 诱导 HUVEC 细胞的 TLR2 表达,无论在 mRNA 水平 (图 2A) 还是蛋白质水平 (图 2B),伪原薯蓣皂苷的

抑制作用均呈现剂量依赖性 ($P < 0.01$)。

2.3 伪原薯蓣皂苷对 HUVEC 细胞 MAPK 通路相关激酶的影响

TLR2 的下游为 MAPK 信号通路,伪原薯蓣皂苷对 TLR2 表达的抑制可能直接影响其下游激酶活性。因此,本研究还检测了 MAPK 通路的主要分子 p38、ERK1/2 和 JNK。由图 3 所示, 5.82×10^{-5} 、 2.91×10^{-5} mol/L 伪原薯蓣皂苷预处理可显著抑制 p38 的磷酸化 (图 3A) ($P < 0.01$),但对 ERK1/2 无显著变化 (图 3B), 2.91×10^{-5} 、 1.46×10^{-5} mol/L 伪原薯

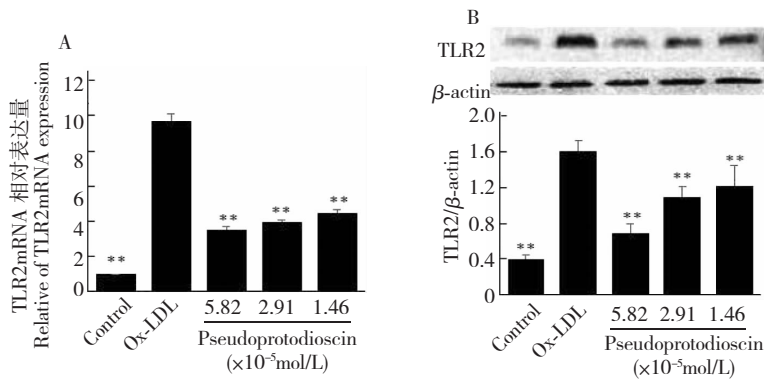


图2 伪原薯蓣皂苷对 Ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞 TLR2 mRNA 及蛋白表达的影响

Fig. 2 The effect of pseudoprotodioscin on TLR2 mRNA and protein expression in Ox-LDL induced HUVEC cells

注: A. TLR2 mRNA 的相对表达量; B. TLR2 蛋白相对含量。所有的结果至少独立重复 3 次, 结果以均值 ± 标准差表示, 与 Ox-LDL 组比较, ** $P < 0.01$

Note: A. The relative expression of TLR2 mRNA; B. The relative expression of TLR2 protein. The results were representative of at least three independent experiments run in triplicate and expressed as the mean ± SD. ** $P < 0.01$, compared with Ox-LDL group

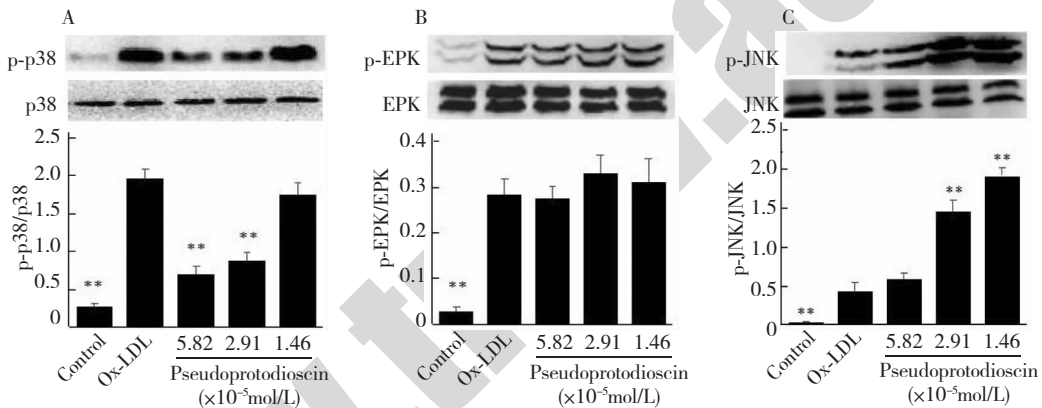


图3 伪原薯蓣皂苷对 Ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞 MAPK 通路的影响

Fig. 3 The effect of pseudoprotodioscin on MAPK pathway in Ox-LDL-induced HUVEC cells

注: A. 伪原薯蓣皂苷对 HUVEC 细胞 p-p38/p38 的影响; B. 伪原薯蓣皂苷对 HUVEC 细胞 p-ERK/ERK 的影响; C. 伪原薯蓣皂苷对 HUVEC 细胞 p-JNK/JNK 的影响。所有的结果至少独立重复 3 次, 结果以均值 ± 标准差表示, 与 Ox-LDL 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: A. p-p38/p38; B. p-ERK/ERK; C. p-JNK/JNK. The results were representative of at least three independent experiments run in triplicate and expressed as the mean ± SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with Ox-LDL group

薯蓣皂苷反而会促进 JNK(图 3C)的磷酸化。

3 讨论与结论

本研究发现, Ox-LDL 能在 mRNA 和蛋白水平明显上调 COX-2 的表达, 而地奥心血康胶囊的主要活性成分伪原薯蓣皂苷能显著抑制 Ox-LDL 诱导的 COX-2 表达, 提示伪原薯蓣皂苷对 Ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞炎症具有拮抗作用。COX-2 是花生四烯酸代谢的限速酶之一, 存在于内皮细胞及其他多种组织中, 当机体受到各种损伤性化学、物理或生物因子刺激会迅速产生并催化前列腺素 (PGs) 的合

成, 参与炎症反应^[5]。有研究报道, 在动脉粥样硬化进程中, 内皮细胞损伤会导致 COX-2 的表达升高, 促进血管炎症反应, 其通路涉及 TLR2、MAPK/NF- κ B 等^[6,7], 而抑制 COX-2 能显著改善内皮细胞功能^[8]。本研究在伪原薯蓣皂苷抑制 COX-2 表达的基础上, 进一步研究发现伪原薯蓣皂苷也明显下调 Ox-LDL 诱导的 TLR2 表达, 抑制 p38MAPK 激酶活性, 提示伪原薯蓣皂苷可能通过抑制 TLR2/p38MAPK 通路而抑制内皮细胞炎症介质 COX-2 的表达, 进而发挥对内皮细胞的抗炎效应。本研究也发现, 伪原薯蓣皂苷在抑制 p38MAPK 活性的同时,

会上调 p-JNK 表达,这可能与 MAPK 各通路之间存在“交互串联信号”相关,“交互串联信号”通路中蛋白磷酸酶 PP2A 通过去磷酸化作用而抑制 MAPK 活性,同时其活性受到底物 MAPK 活性的正反馈调节^[9,10],因此伪原薯蓣皂苷可能通过抑制 p38 活性,以正反馈形式抑制 PP2A 活性,从而激活 JNK,但相关机制仍需进一步研究。

TLR2 是一类参与非特异性免疫的跨膜蛋白分子,其作为一种炎症受体,可识别包括 Ox-LDL 在内的多种外源性和内源性配体^[11,12],已有研究表明, Ox-LDL 在内皮细胞中,可上调 TLR2 的表达,并激活下游 MAPK、NF- κ B 通路参与多种炎症反应^[13]。MAPK 通路主要分为 ERK1/2, JNK/SAPK, p38MAPK。ERK1/2 调控细胞增殖,分化, JNK/SAPK 调控细胞的应激, p38MAPK 调控细胞的炎症、凋亡。因此,伪原薯蓣皂苷可能通过抑制 TLR2/p38MAPK 通路而抑制 HUVEC 细胞的 COX-2 表达,此结果为探讨地奥心血康胶囊发挥抗炎活性的物质基础以及作用机制提供了一定的依据。

致谢:非常感谢成都中医药大学高小平老师在论文撰写过程中对我的悉心指导!

参考文献

- 1 Wong BW, Meredith A, Lin D, *et al.* The biological role of inflammation in atherosclerosis. *Can J Cardiol*, 2012, 28: 631-641.
- 2 Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, *et al.* Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ*, 2013, 22:399-411
- 3 Yu Y, Li X, Qu L, *et al.* The anti-inflammatory effects of DXXK by inhibiting of Lipopolysaccharide-induced NF- κ B/COX-2 signaling pathway and the expression of inflammatory mediators. *J Ethnopharmacol*, 2016, 178: 199-208
- 4 Li X (李翔), Yu Y (于娅), Huang FH (黄飞鸿), *et al.* Anti-inflammatory and analgesic effects of Diao Xinxuekang. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2015, 37:934-938.
- 5 Funk CD, FitzGerald GA. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50:470-479.
- 6 Napoli C, Aekah C, De Nigris F, *et al.* Chronic treatment with nitric oxide-releasing aspirin reduces plasma low-density lipoprotein oxidation and oxidative stress, arterial oxidation-specific epipes, and atherogenesis in hyperscholes terolemic mice. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99: 12467-12470.
- 7 Burleigh ME, Babaev VR, Yancey PG, *et al.* Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient and C57BL/6 mice. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 39:443-452.
- 8 Mehta JL, Chen J, Yu F, *et al.* Aspirin inhibits Ox-LDL mediated LOX-1 expression and metalloproteinase-1 in human coronary endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 2004, 64: 243-249.
- 9 Avdi NJ, Malcolm KC, Nick JA, *et al.* A role for protein phosphatase-2A in p38 mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem*, 2002, 277:40687-40696.
- 10 Alessi DR, Gomez N, Moorhead G, *et al.* Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr Biol*, 1995, 5:283-295.
- 11 Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, *et al.* Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation*, 2002, 105: 1158-1161.
- 12 Zahringer U, Lindner B, Inamura S, *et al.* TLR2-promiscuous or specific? A critical reevaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology*, 2008, 213: 205-224.
- 13 Peng Q (彭茜), Tang YL (唐雅玲), Xu ZX (徐增祥), *et al.* Platelet factor 4 promotes toll like receptors expression in human umbilical vein endothelial cells. *Chin J Arteriosclerosis* (中国动脉粥样硬化杂志), 2010, 18:465-469.