

姜黄素通过 NF- κ B/miR33a 通路对 ox-LDL 刺激 THP-1 巨噬细胞分泌的影响及机制

钟毅^{1*}, 谢发江², 冯健¹, 查克岚¹, 郑舒展¹, 李家富¹, 范忠才¹

¹西南医科大学附属第一医院心血管内科, 泸州 646000; ²达州市中心医院心血管内科, 达州 635000

摘要:为研究姜黄素对 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞炎症因子 IL-6、TNF- α 的分泌及相关机制。本实验分别予姜黄素、miR33a inhibitor、吡咯烷二硫代甲酸铵 (ammonium pyrrolidinedithiocarbamate, PDTTC) 处理氧化型低密度脂蛋白 (oxidized lowdensity lipoprotein, ox-LDL) 刺激的人单核细胞白血病细胞 (human acute monocytic leukemia cell line, THP-1) 型巨噬细胞, RT-qPCR 测定微型 RNA33a (MicroRNA33a, miR33a) 的表达, Western blot 检测细胞核内 NF- κ B p65 的表达、I κ B α 和 p-I κ B α 的表达, ELISA 测定 IL-6、TNF- α 的浓度。结果显示与空白对照组相比, ox-LDL 组 miR33a、NF- κ B p65、p-I κ B α 的表达及 p-I κ B α /I κ B α 的比值及 IL-6、TNF- α 的浓度增加 ($P < 0.05$), I κ B α 的表达减少 ($P < 0.05$); 而与 ox-LDL 组相比, ox-LDL + 姜黄素组 miR33a、NF- κ B p65、p-I κ B α 的表达及 p-I κ B α /I κ B α 的比值及 IL-6、TNF- α 的浓度减少 ($P < 0.05$), I κ B α 的表达增加 ($P < 0.05$)。姜黄素可能抑制 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞 IL-6、TNF- α 的分泌, 其机制可能是通过下调 NF- κ B/miR33a 信号通路。

关键词: THP-1 巨噬细胞; NF- κ B; miR33a; 姜黄素; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R966; R543.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)12-2032-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.12.002

Curcumin down-regulates ox-LDL-stimulated secretion of inflammatory factors in THP-1 macrophages by inhibiting NF- κ B/miR33a signaling pathway

ZHONG Yi^{1*}, XIE Fa-jiang², FENG Jian¹, ZHA Ke-lan¹, ZHENG Shu-zhan¹, LI Jia-fu¹, FAN Zhong-cai¹

¹Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;

²Department of Cardiology, Dazhou Central Hospital, Dazhou 635000, China

Abstract: To investigate the effect of curcumin on the secretion of IL-6 and TNF- α in THP-1 macrophages stimulated by oxidized lowdensity lipoprotein (ox-LDL) and its related mechanism. THP-1 macrophages, derived from human monocytic leukemia cells, were stimulated by ox-LDL and then treated with curcumin, MicroRNA33a (miR33a) inhibitor and ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (PDTTC). RT-qPCR was applied to test expression of miR33a. Western blot was used to detect the protein expression of NF- κ B, I κ B α and p-I κ B α . The concentration of IL-6, TNF- α in the supernatant was determined by ELISA. Compared with the control group, the expression of miR33a, the protein expression of NF- κ B p65, I κ B α , p-I κ B α /I κ B α and the concentration of IL-6 and TNF- α were increased, while the protein expression of I κ B α were decreased in ox-LDL group ($P < 0.05$); Compared with ox-LDL group, the expression of miR33a, NF- κ B p65 protein, p-I κ B α protein, p-I κ B α /I κ B α and the concentration of IL-6 and TNF- α were significantly decreased, while the protein expression of I κ B α were increased in ox-LDL + curcumin group ($P < 0.05$). Curcumin may inhibit the secretion of IL-6, TNF- α in THP-1 macrophages stimulated by ox-LDL through down-regulating the NF- κ B/miR33a signaling pathway.

Key words: THP-1 macrophages; NF- κ B; miR33a; curcumin; IL-6; TNF- α

收稿日期: 2019-03-19 接受日期: 2019-10-22

基金项目: 国家自然科学基金 (31300946); 泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作项目 (2018LZXNYD-ZK48)

* 通信作者: Tel: 86-018283097928; E-mail: zhongyi1982529@163.com

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是血管系统的一种炎症性疾病, 在动脉壁内巨噬细胞的聚集有助于炎症性 AS 斑块的进展^[1]。巨噬细胞膜表面的凝集素样氧化低密度脂蛋白受体-1 (lectin-like oxi-

dized low-density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 与 ox-LDL 结合并活化促发巨噬细胞产生大量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及促炎因子, 包括 IL-6、TNF- α 、MCP-1 等, 这一系列过程形成恶性循环, 加速 AS 的进展, 以阻断炎症反应为靶点的治疗显示了良好抗 AS 效果^[2]。

姜黄素是一种具有抗心律失常、抗动脉粥样硬化、抗炎、抗纤维化、抗病毒、抗肿瘤等多种药效的多酚类化合物, 被广泛用于体内外研究^[3-7]。研究显示姜黄素通过调控靶向激活蛋白-1 (activator protein 1, AP-1) 和 NF- κ B 抑制单核细胞和肺泡巨噬细胞的细胞因子的表达^[8,9]。在活化的巨噬细胞中姜黄素能够下调一氧化氮 (nitric oxide, NO), 环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 以及多种白介素家族分子 (IL-1, IL-2, IL-5, IL-8, IL-12, IL-18) 等^[10-14]。姜黄素能够阻断炎症诱导下人肺泡巨噬细胞 TNF- α 、IL-6、IL-8、MCP-1 等多种炎症因子表达^[9]。尽管越来越多的证据显示姜黄素可能通过阻断 I κ B α 激酶而减少 NF- κ B 转录进而发挥抗炎效应^[3,4,6,9], 但是姜黄素并非 NF- κ B 特异性阻滞剂, 其抗炎效应主要通过影响多条途径实现, 目前尚未完全清楚。本研究以 THP-1 巨噬细胞作为实验对象, 于细胞水平探讨姜黄素影响 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞 IL-6、TNF- α 的分泌及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料、药品与试剂

1.1.1 实验细胞株

THP-1 细胞来源于美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)

1.1.2 主要实验试剂

姜黄素、PDTIC、佛波酯 (Phorbol- 12- myristate-13- acetate, PMA) 购自美国 Sigma 公司; RPMI- 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 人 ox- LDL 购自广州奕源生物科技有限公司; 细胞计数试剂盒 CCK- 8 购自日本 DOJINDO 公司; BCA 蛋白浓度测试试剂盒购自武汉阿斯本公司; 抗 GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司产品; Trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; 实时计量 PCR 逆转录试剂盒购自日本 TOYOBO 公司; 兔源抗 NF- κ B p65、I κ B α 、p-I κ B α 抗体购自美国 CST 公司; miR33a inhibitor 和 control sequence 购自上海吉玛公司; IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司。

1.1.3 实验仪器

Cytomat 10 C 细胞培养箱、TSE400D 超低温冰箱、Multiskan GO 全波长酶标仪、Multifuge X3 台式超速离心机、Micro CL 冷冻离心机、9700PCR 仪均为美国 Thermo Fisher 公司产品; HH- 4 型恒温水浴锅、江南仪器厂均为苏州净化公司产品; 倒置生物显微镜、TS100- F 倒置显微镜均为日本 Nikon 公司产品; DYCP- 36 型电泳仪为北京六一仪器厂公司产品; 微量移液器为法国 Gilson 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 THP-1 细胞的培养及 THP-1 巨噬细胞的诱导分化

以 10% FBS、1% 青、链霉素的 RPIM-1640 培养液, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期细胞, 以浓度为 160 nmol/L PMA 的完全培养基孵育 48 h, 诱导其分化为 THP-1 巨噬细胞。

1.2.2 姜黄素的配制及毒性检测

取适量姜黄素粉末融于 DMSO 溶剂中, 配制成浓度为 50 mmol/L 保存液, -20 $^{\circ}$ C 条件下保存, 使用时用培养基稀释配制成所需浓度, 并且保证 DMSO 最终在培养基中浓度不超过 0.1%。

调整细胞浓度为 1×10^5 /mL 的悬液, 按每孔 10 000 个细胞接种于 96 孔板, 置于上述培养箱中 48 h 以贴壁。加入含不同终浓度的姜黄素 (0、5、10、20、40、80 μ mol/L) RPMI-1640 培养液处理 24 h, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液培养 4 h, 按照 CCK-8 试剂盒说明书步骤, 检测细胞活性, 筛选出下一步实验所需姜黄素合适的浓度以排除其毒性作用而导致实验结果的误差。

1.2.3 姜黄素对 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞 miR33a 的表达及 IL-6、TNF- α 的分泌影响

将前述含 PMA 细胞培养基更换为终浓度 50 μ g/mL 的 ox-LDL 无血清 RPMI-1640 培养液, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 48 h 后, 再进行相应的干预。

实验分组: 空白对照组、ox-LDL 组、ox-LDL + 姜黄素组, 加入相应处理后继续在上述条件中培养 48 h^[15]。其中姜黄素浓度以 1.2.2 检测结果为准。

1.2.4 脂质体转染及检测

将提前设计的 miR33a inhibitor 以脂质体转染法将其转染入 THP-1 巨噬细胞, 阻断 miR33a 的表达, 另外使用 control sequence 与之对照, 排除非序列特异性对实验的干扰。实验分组: 空白对照组、ox-LDL 组; ox-LDL + miR33a inhibitor 组、ox-LDL +

control sequence 组;按照 Lipofectamin™2000 转染试剂盒说明书进行转染操作。

1.2.5 姜黄素介导 miR33a 的表达影响 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞 IL-6、TNF- α 的分泌

实验分组:空白对照组、ox-LDL 组、ox-LDL + 姜黄素组、ox-LDL + control sequence 组、ox-LDL + control sequence + 姜黄素组、ox-LDL + miR33a inhibitor 组、ox-LDL + miR33a inhibitor + 姜黄素组。

1.2.6 姜黄素对 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞 NF- κ B/miR33a 信号通路的影响

采用 50 μ m · mL⁻¹ NF- κ B 信号通路阻断剂 PDTC 预处理细胞,阻断 NF- κ B 的活化。实验分组:空白对照组、ox-LDL 组、ox-LDL + 姜黄素组、ox-LDL + 姜黄素组 + PDTC 组。

1.2.7 姜黄素介导 NF- κ B/miR33a 信号通路影响 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞 IL-6、TNF- α 的分泌

实验分组:空白对照组、ox-LDL 组、ox-LDL + 姜黄素组、ox-LDL + miR33a inhibitor 组、ox-LDL + PDTC 组、ox-LDL + miR33a inhibitor + 姜黄素组、ox-LDL + 姜黄素组 + PDTC 组、ox-LDL + control sequence 组。

1.2.8 RT-qPCR 检测 miR33a 的表达

按照 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA,按逆转录试剂盒操作获取 cDNA;使用 RT-qPCR 试剂盒测定 mRNA 量。miR-33a-5p 引物序列:上游 5'-GGTGCATTGTAGTTGCATTGC-3', 下游 5'-GCCACGAGCAAAAAGCTTGT-3'。内参照 U6 引物序列上游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3', 下游 5'-AACGCTTCAC-GAATTTGCGT-3'。反应条件:预变性 95 $^{\circ}$ C 1 min,变性 95 $^{\circ}$ C 15 s,退火 58 $^{\circ}$ C 20 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 20 s,共 40 个循环。用 $\Delta\Delta$ Ct 来计算基因的表达水平,具体公式如下: Δ Ct = 目的基因 Ct 值 - GAPDH 基因 Ct 值; $\Delta\Delta$ Ct = 实验组 Δ Ct - 对照组 Δ Ct;实验组基因相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta$ Ct}。Stem-loop 技术提前处理样本 miRNA,此后再按照传统 RT-qPCR 检测。

1.2.9 Western blot 检测 NF- κ B p65、I κ B α 、p-I κ B α 的表达

收集细胞,加入 RIPA 裂解液提取总蛋白,按 BCA 蛋白浓度定量试剂盒说明测定样品蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,每孔上样量 40 μ g,按浓缩胶 80 V、分离胶 120 V 进行恒压电泳,切去相应胶带,300 mA 恒流转印至 PVDF 膜;置于 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,除去封闭液后加入抗 NF- κ B

p65 (1:2 000)、I κ B α (1:1 000)、p-I κ B α (1:1 000)、GAPDH (1:10 000)一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜 10 min (3 次;加入 HRP 标记的山羊抗鼠抗体 (1:10 000) 室温孵育 1.5 h,TBST 洗膜 10 min (3 次,化学发光法定影显色,用 Image Lab 软件进行条带分析。

1.2.10 ELISA 测定 IL-6、TNF- α 的浓度

收集细胞悬液,以 2 000 rpm 离心 20 min,收集的上清液-20 $^{\circ}$ C 保存备用。按 ELISA 试剂盒说明检测 IL-6、TNF- α 的浓度。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。数据以均数(标准差($\bar{x} \pm s$))表示,多样本均数间的比较采用 one-way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 时视为其组间差异具有统计学显著性。

2 结果

2.1 姜黄素毒性检测

与空白对照组相比,姜黄素的浓度在 5-40 μ mol/L 时对细胞活性影响差异无统计学显著性($P > 0.05$),而当姜黄素浓度达 80 μ mol/L 时,THP-1 巨噬细胞活性下降($P < 0.05$)(见图 1)。根据实验结果我们选择以姜黄素浓度 20 μ mol/L 作为下一步姜黄素干预实验的基础。

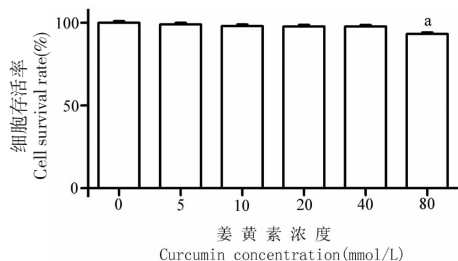


图 1 姜黄素对细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effect of curcumin on cell viability($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$ 。Note:^a $P < 0.05$ vs control group.

2.2 姜黄素对 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞 miR33a 的表达及 IL-6、TNF- α 的分泌影响

与空白对照组相比,ox-LDL 组 miR33a 的表达及 IL-6、TNF- α 的浓度增加($P < 0.05$);与 ox-LDL 组相比,ox-LDL + 姜黄素组 miR33a 的表达及 IL-6、TNF- α 的浓度减少($P < 0.05$)(见图 2)。

2.3 姜黄素通过介导 miR33a 的表达影响 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞 IL-6、TNF- α 的分泌

2.3.1 miR33a inhibitor 和 control sequence 的脂质体转染检测

与空白对照组相比,ox-LDL 组 miR33a 的表达

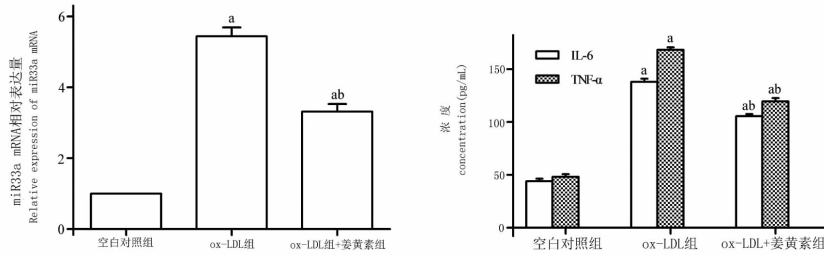


图2 姜黄素对 miR33a 的表达及 IL-6、TNF- α 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of curcumin on expression of miR33a and secretion of IL-6, TNF- α ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与 ox-LDL 组相比,^b $P < 0.05$ 。Note:^a $P < 0.05$ vs control group;^b $P < 0.05$ vs ox-LDL group.

增加 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组相比, ox-LDL + miR33a inhibitor 组 miR33a 的表达下降 ($P < 0.05$), 而 ox-LDL + control sequence 组 miR33a 的表达与 ox-LDL 组差异无统计学显著性 ($P > 0.05$); 与 ox-LDL + miR33a inhibitor 组相比, ox-LDL + control sequence 组 miR33a 的表达增加 ($P < 0.05$) (见图 3)。通过脂质体转染的方式, miR33a inhibitor 能够有效抑制 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞 miR33a 的表达, 为下一步探索姜黄素介导 miR33a 的表达影响 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞 IL-6、TNF- α 的分泌提供了实验基础。

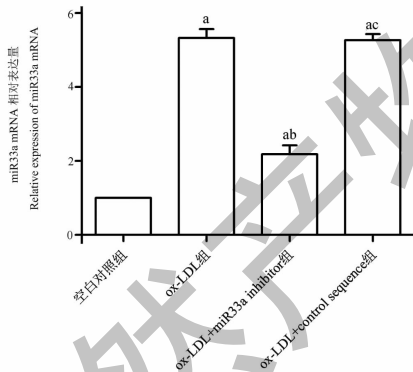


图3 脂质体转染检测 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 detection of Liposome transfection ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与 ox-LDL 组相比,^b $P < 0.05$;与 ox-LDL + miR33a inhibitor 组相比,^c $P < 0.05$ 。Note:^a $P < 0.05$ vs control group;^b $P < 0.05$ vs ox-LDL group;^c $P < 0.05$ vs ox-LDL + miR33a inhibitor group.

2.3.2 姜黄素通过介导 miR33a 的表达下调 IL-6、TNF- α 的分泌

与空白对照组相比, ox-LDL 组 IL-6、TNF- α 的浓度增加 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组相比, ox-LDL + 姜黄素组、ox-LDL + miR33a inhibitor 组、ox-LDL + 姜黄素 + miR33a inhibitor、ox-LDL + control sequence +

姜黄素组 IL-6、TNF- α 的浓度减少 ($P < 0.05$), 而 ox-LDL + control sequence 组 IL-6、TNF- α 的浓度差异无统计学显著性 ($P > 0.05$); 与 ox-LDL + 姜黄素组相比, ox-LDL + 姜黄素 + miR33a inhibitor 组 IL-6、TNF- α 的浓度进一步减少 ($P < 0.05$), 而 ox-LDL + 姜黄素 + control sequence 组 IL-6、TNF- α 的浓度差异无统计学显著性 ($P > 0.05$) (见图 4)。提示姜黄素通过介导 miR33a 的表达下调 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞 IL-6、TNF- α 的分泌, 为进一步探索其上游信号分子奠定实验基础。

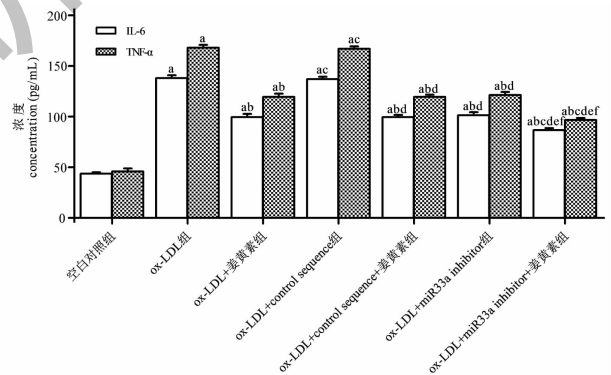


图4 姜黄素通过介导 miR33a 的表达降低 IL-6、TNF- α 的分泌 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Curcumin reduces the secretion of IL-6 and TNF-1 by mediating the expression of miR33a ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与 ox-LDL 组相比,^b $P < 0.05$;与 ox-LDL + 姜黄素组相比,^c $P < 0.05$;与 ox-LDL + control sequence 组相比,^d $P < 0.05$;与 ox-LDL + control sequence + 姜黄素组相比,^e $P < 0.05$;与 ox-LDL + miR33a inhibitor 组相比,^f $P < 0.05$ 。Note:^a $P < 0.05$ vs control group;^b $P < 0.05$ vs ox-LDL group;^c $P < 0.05$ vs ox-LDL + curcumin group;^d $P < 0.05$ vs ox-LDL + control sequence group;^e $P < 0.05$ vs ox-LDL + control sequence + curcumin group;^f $P < 0.05$ vs ox-LDL + miR33a inhibitor group

2.4 姜黄素介导 NF- κ B/miR33a 信号通路影响 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞 IL-6、TNF- α 的分泌

2.4.1 姜黄素抑制 NF- κ B/miR33a 信号通路

与空白对照组相比, ox-LDL 组 miR33a、NF- κ B p65、p-I κ B α 的表达及 p-I κ B α /I κ B α 的比值增加(P

<0.05), I κ B α 的表达减少($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组相比, ox-LDL + 姜黄素组、ox-LDL + PDTC 组 miR33a、NF- κ B p65、p-I κ B α 的表达及 p-I κ B α /I κ B α 的比值减少($P < 0.05$), I κ B α 的表达增加($P < 0.05$)(见图 5)。

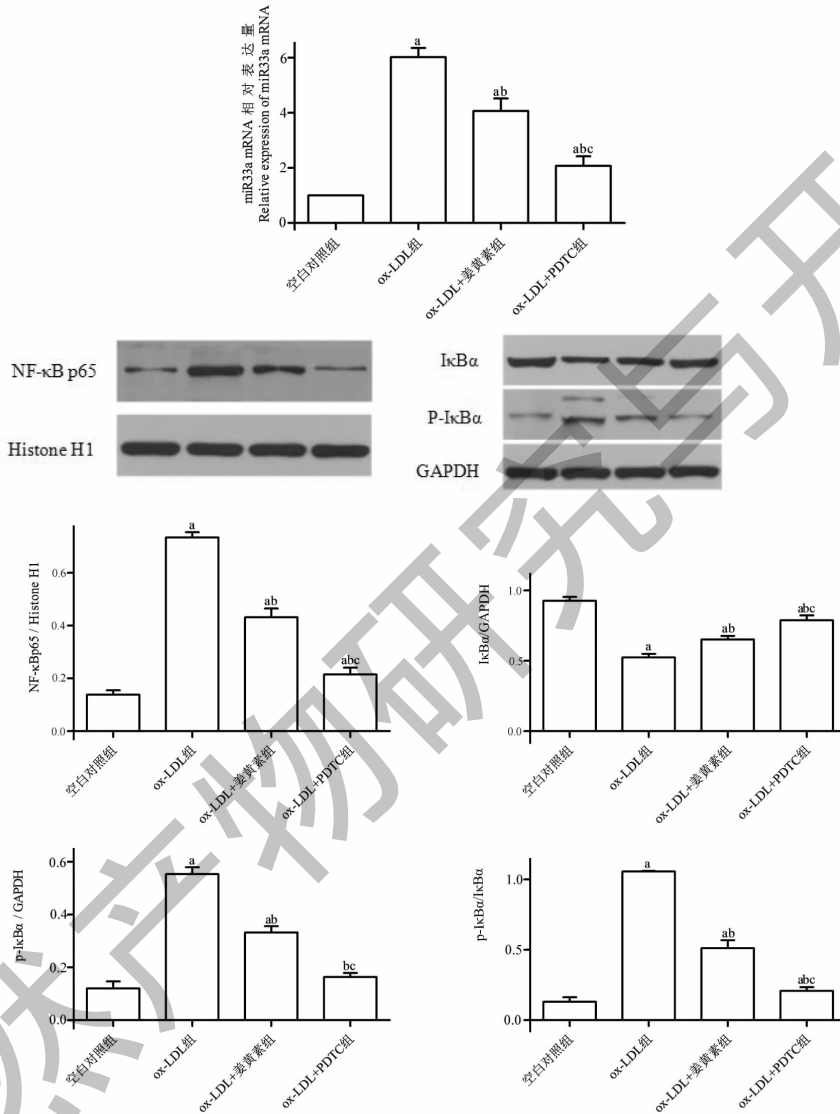


图 5 姜黄素对 NF- κ B/miR33a 信号通路的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of curcumin on NF- κ B/miR33a signaling pathway($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与 ox-LDL 组相比,^b $P < 0.05$;与 ox-LDL + 姜黄素组相比,^c $P < 0.05$ 。Note:^a $P < 0.05$ vs control group;^b $P < 0.05$ vs ox-LDL group;^c $P < 0.05$ vs ox-LDL + curcumin group.

2.4.2 姜黄素通过调控 NF- κ B/miR33a 信号通路下调 IL-6、TNF- α 的分泌

与空白对照组相比, ox-LDL 组 IL-6、TNF- α 的浓度增加($P < 0.05$);与 ox-LDL 组相比, ox-LDL + 姜黄素组、ox-LDL + miR33a inhibitor 组、ox-LDL + PDTC 组 IL-6、TNF- α 的浓度减少($P < 0.05$),而 ox-

LDL + control sequence 组 IL-6、TNF- α 的浓度差异无统计学显著性($P > 0.05$);与 ox-LDL + 姜黄素组相比或 ox-LDL + PDTC 组相比, ox-LDL + 姜黄素 + PDTC 组 IL-6、TNF- α 的浓度进一步减少($P < 0.05$);与 ox-LDL + 姜黄素组或 ox-LDL + miR33a inhibitor 组相比, ox-LDL + 姜黄素 + miR33a inhibitor 组

IL-6、TNF- α 的浓度进一步减少($P < 0.05$) (见图 6)。

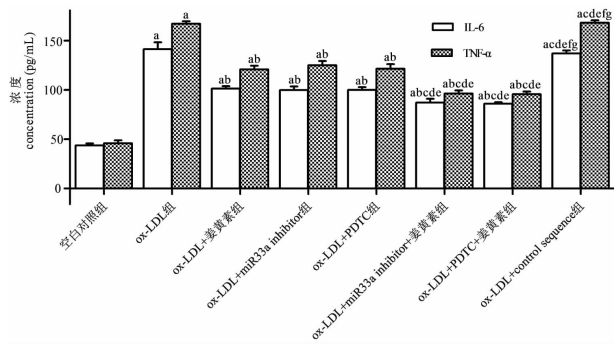


图 6 姜黄素通过抑制 NF- κ B/miR33a 信号通路下调 IL-6、TNF- α 的分泌($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Curcumin reduces the secretion of IL-6, TNF-1 by inhibiting NF- κ B/miR33a signaling pathway($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与 ox-LDL 组相比,^b $P < 0.05$;与 ox-LDL + 姜黄素组相比,^c $P < 0.05$;与 ox-LDL + miR33a inhibitor 组相比,^d $P < 0.05$;与 ox-LDL + PDTC 组相比,^e $P < 0.05$;与 ox-LDL + miR33a inhibitor + 姜黄素组相比,^f $P < 0.05$;与 ox-LDL + PDTC + 姜黄素组相比,^g $P < 0.05$ 。Note:^a $P < 0.05$ vs control group;^b $P < 0.05$ vs ox-LDL group;^c $P < 0.05$ vs ox-LDL + curcumin group;^d $P < 0.05$ vs ox-LDL + miR33a inhibitor group;^e $P < 0.05$ vs ox-LDL + PDTC group;^f $P < 0.05$ vs ox-LDL + miR33a inhibitor + curcumin group;^g $P < 0.05$ vs ox-LDL + PDTC + curcumin group.

3 结论

姜黄素是存在于姜黄中的具有广泛药理学作用的天然多酚类活性物质。我们前期研究发现,姜黄素能通过下调 p38MAPK 及 NF- κ B 的表达抑制 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)促炎因子的过表达^[3,4]。动物实验也证实^[16],每日口服 20 mg/kg 的姜黄素能延缓 ApoE^{-/-}小鼠 AS 的进程,减轻全身炎症反应。这些结论都说明姜黄素具有抗炎及抗 AS 的作用,然而其具体的机制尚未完全阐明。本研究通过体外 ox-LDL 刺激 THP-1 巨噬细胞检测 IL-6、TNF- α 的分泌及 NF- κ B/miR33a 信号通路相关信号分子探讨姜黄素抗炎及抗 AS 的分子机制。

为排除姜黄素对 THP-1 巨噬细胞的毒性作用,影响实验结果的可靠性,本研究采用不同终浓度的姜黄素与 THP-1 巨噬细胞共培养 24 h,结果显示,不同浓度的姜黄素对细胞的活性影响不完全相同。较低浓度(0 ~ 40 μ mol/L)的姜黄素对细胞活性无影响,当浓度达到 80 μ mol/L 时,细胞活性明显下降。本研究中采用 20 μ mol/L 的姜黄素进行干预,该浓度在安全有效范围内,避免了其对 THP-1 巨噬

细胞的毒性作用。

miRNA inhibitor 是经人工克隆生产的 miRNA 特异性阻断剂,能高效、稳定的结合 miRNA,抑制内源性 miRNA 的活性。本研究选用 miR33a inhibitor 转染 THP-1 巨噬细胞,与 miR33a 结合并阻断其表达,并将 miR33a control sequence 以相同的方转染入细胞,与 miR33a inhibitor 形成对照,排除非序列特异性的干扰。结果显示,ox-LDL 显著增加了 THP-1 巨噬细胞 miR33a 的表达,而 miR33a inhibitor 减轻这种现象,提示 miR33a inhibitor 能有效抑制 miR33a 的表达,与之相似,姜黄素也能显著抑制 miR33a 的表达,这为我们下一步研究奠定了基础。

在本研究中,姜黄素或 miR33a inhibitor 能显著下调 IL-6、TNF- α 的分泌,当姜黄素和 miR33a inhibitor 合用时较二者单独使用更能显著下调 IL-6、TNF- α 的分泌,相反,当姜黄素和 control sequence 合用与只使用姜黄素的效果无显著差异,因此姜黄素通过抑制 miR33a 的表达参与调控 IL-6、TNF- α 的分泌,减轻炎症反应,miR33a 扮演着促进炎症的角色。本研究结果与 Rayner 等^[17]研究一致,在给予抗 miR33a 治疗的小鼠中其体内抗炎因子增多,而促炎因子减少,并且循环中炎性巨噬细胞的浓度也明显降低,说明 miR33a 可能是一种促炎 miRNA。有趣的是,Ho 等^[18]发现 miR33a 激活剂 miR33 mimic 能显著降低 NF- κ B 的共激活剂受体相互作用蛋白 140 (Receptor-interacting protein 140, RIP140) mRNA 和蛋白含量,从而减少巨噬细胞 TNF- α 和 IL-1 β 的产生,说明巨噬细胞中 miR33a 又有可能是一种抗炎 miRNA,与本研究结果相反。综上所述,miR33a 参与调节巨噬细胞炎症反应,miR33a 可能存在多种不同的调节机制并且其作用效果可能与巨噬细胞所处的状态相关,仍需进一步研究。

NF- κ B 与 I κ B 在细胞质中结合成复合体,一旦 I κ B α 被激酶依赖性磷酸化而泛化和降解后,游离 NF- κ B 转位进入细胞核,结合在一些促炎因子的 DNA 序列上,促进其表达。姜黄素能抑制多种细胞由 ox-LDL 诱导的炎症反应,抑制活性可能与介导 ox-LDL 刺激的 I κ B α 磷酸化和降解, p65 的磷酸化、核转位以及 NF- κ B 靶向基因的转录有关^[19]。本研究中,观察到 ox-LDL 能显著增加胞核内的 NF- κ B p65 和胞浆内 p-I κ B α 的含量,同时降低胞浆内 I κ B α 的含量, p-I κ B α /I κ B α 比值增大,说明 ox-LDL 使 I κ B α 降解以及 p65 核转位,而姜黄素能逆转这一现象,表明姜黄素能抑制 ox-LDL 刺激的 I κ B 磷酸化,阻断 p65 的核转位,有效的抑制 NF- κ B 信号通路被

激活。

已有大量的研究证实 NF- κ B 与炎症相关,而本研究也证实了 miR33a 参与调节炎症反应。Ho 等^[18]发现 miR33a 能识别 NF- κ B 的共激活剂 RIP140 的 3' UTR 而影响炎症因子表达,另外, Kim 等^[20]发现 SIRT6 是 miR3a 的靶向基因,而 SIRT6 又能与 NF- κ B 相互作用并影响 NF- κ B 的靶向基因。因此我们推测 miR33a 与 NF- κ B 在炎症反应的调控方面可能存在相互关系。在本研究中,PDTC 和 miR33a inhibitor 均能显著下调 IL-6、TNF- α 的分泌,并且姜黄素与 PDTC 或 miR33a inhibitor 合用时较单用下调 IL-6、TNF- α 的分泌更为明显,表明 NF- κ B/miR33a 信号通路促进 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞 IL-6、TNF- α 的分泌,而姜黄素通过抑制该信号通路下调 IL-6、TNF- α 的分泌。

综上所述,姜黄素下调 ox-LDL 刺激的 THP-1 巨噬细胞 IL-6、TNF- α 的分泌,其机制可能与抑制 NF- κ B/miR33a 信号通路有关。

参考文献

- Momtazi-Borojeni AA, Abdollahi E, Nikfar B, et al. Curcumin as a potential modulator of M1 and M2 macrophages: new insights in atherosclerosis therapy [J]. *Heart Fail Rev*, 2019; 1-11.
- Hofmann A, Brunssen C, Morawietz H. Contribution of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 and LOX-1 modulating compounds to vascular diseases [J]. *Vascul Pharmacol*, 2018, 107; 1-11.
- Zhong Y, Liu T, Guo Z. Curcumin inhibits ox-LDL-induced MCP-1 expression by suppressing the p38MAPK and NF- κ B pathways in rat vascular smooth muscle cells [J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(1); 61-67.
- Zhong Y, Yu W, Feng J, et al. Curcumin suppresses tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase 2 expression and activity in rat vascular smooth muscle cells via the NF- κ B pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7; 1653-1658.
- Qiu Y, Li JF, Feng J, et al. Effect of acidification environment on proliferation of vascular smooth muscle cells and the influence of curcumin on it [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2018, 30; 199-206.
- Liu C, Zhong Y, Feng J, et al. Review of anti-atherosclerosis effect and mechanism of curcumin [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理)*, 2017, 28; 257262.
- Liu C, Li JF, Feng J, et al. Effect and related mechanism of curcumin on THP-1 cells formed foam cells induced by ox-LDL [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理)*, 2016, 27; 385-392.
- Ye N, Ding Y, Wild C, et al. Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1) miniperspective [J]. *J Med Chem*, 2014, 57; 6930-6948.
- Mohammadi A, Blesso CN, Barreto G E, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in response to curcumin, a diet-derived polyphenol, as an immunomodulatory agent [J]. *J Nutr Biochem*, 2019, 66; 1-16.
- Guimarães MR, Leite FRM, Spolidorio LC, et al. Curcumin abrogates LPS-induced pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. Evidence for novel mechanisms involving SOCS-1, -3 and p38 MAPK [J]. *Arch Oral Biol*, 2013, 58; 1309-1317.
- Srivastava RM, Singh S, Dubey SK, et al. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11; 331-341.
- Lee WH, Loo CY, Young PM, et al. Curcumin nanoparticles attenuate production of pro-inflammatory markers in lipopolysaccharide-induced macrophages [J]. *Pharm Res*, 2016, 33; 315-327.
- Zhao C, Cai Y, He X, et al. Synthesis and anti-inflammatory evaluation of novel mono-carbonyl analogues of curcumin in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. *Eur J Med Chem*, 2010, 45; 5773-5780.
- Zhao C, Yang J, Wang Y, et al. Synthesis of mono-carbonyl analogues of curcumin and their effects on inhibition of cytokine release in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. *Med Chem*, 2010, 18; 2388-2393.
- Zhou J, Zhang DD, Cai HL. The effect of curcumin on cholesterol efflux and ABCA1 expression in THP1 macrophage-derived foam cells [J]. *J Yangtze Univ: Nat Sci (长江大学学报: 自科版)*, 2014, 11(9); 1-5.
- Sikora E, Scapagnini G, Barbagallo M. Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases [J]. *Immun Ageing*, 2010, 7; 1.
- Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121; 2921-2931.
- Ho PC, Chang KC, Chuang YS, et al. Cholesterol regulation of receptor-interacting protein 140 via microRNA-33 in inflammatory cytokine production [J]. *FASEB J*, 2011, 25; 1758-1766.
- Shih VF, Tsui R, Caldwell A, et al. A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling [J]. *Cell Res*, 2011, 21; 86-102.
- Kim HS, Xiao C, Wang RH, et al. Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis [J]. *Cell Metab*, 2010, 12; 224-236.