

# 蒜氨酸与大蒜素抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的炎症反应对比

柴惠, 马建龙, 江婷婷, 余军伟, 凌超, 叶文晶, 沃兴德

(浙江中医药大学生命科学院, 浙江省杭州市 310053)

[关键词] 蒜氨酸; 大蒜素; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 细胞间黏附分子1; 人脐静脉内皮细胞; 大鼠胸主动脉平滑肌细胞

[摘要] **目的** 比较蒜氨酸与大蒜素对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的炎症反应的抑制作用,并进一步探讨蒜氨酸能否取代大蒜素的抗动脉粥样硬化作用。**方法** 将细胞分成10组:对照组、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 组(1  $\mu\text{g/L}$ )、蒜氨酸组、大蒜素组、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (1  $\mu\text{g/L}$ ) + 蒜氨酸(5 mg/L, 10 mg/L, 30 mg/L)组、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (1  $\mu\text{g/L}$ ) + 大蒜素(5 mg/L, 10 mg/L, 30 mg/L)组,分别培养16 h。提取各组细胞mRNA,用实时定量PCR测定细胞间黏附分子1的表达水平;用虎红染色法检测人单核细胞与人脐静脉内皮细胞的黏附性;用划线法和MTT法分别检测大蒜素和蒜氨酸对平滑肌细胞迁移和增殖作用的影响。**结果** 蒜氨酸和大蒜素预处理都能有效抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的细胞间黏附分子1表达量的增高,并减弱由其导致的单核细胞对人脐静脉内皮细胞的黏附性增加,同时能抑制由肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的平滑肌细胞迁移和增殖作用。**结论** 蒜氨酸与大蒜素对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 介导的炎症反应及动脉粥样硬化均有一定的抑制作用,并且效果相近,因此蒜氨酸一定程度上可以取代大蒜素。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

## Comparative Study of Alliin and Allicin Inhibit Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Induced Inflammation

CHAI Hui, MA Jian-Long, JIANG Ting-Ting, YU Jun-Wei, LING Chao, YE Wen-Jing, and WO Xing-De

(Life Science Faculty of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

[KEY WORDS] Alliin; Allicin; Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; Intercellular Cell Adhesion Molecule-1; Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC); Rat Thoracic Aorta Smooth Muscle Cells

[ABSTRACT] **Aim** To compare alliin and allicin's effect in inhibiting tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induced inflammation, and to investigate whether alliin can substitute allicin in resisting atherosclerosis. **Methods** Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) were divided into ten groups and treated for 16 hours as follows: Control (treated without any drugs), TNF- $\alpha$  (1  $\mu\text{g/L}$ ), alliin (10 mg/L), allicin (10 mg/L), TNF- $\alpha$  (1  $\mu\text{g/L}$ ) and alliin (5 mg/L, 10 mg/L, 30 mg/L), TNF- $\alpha$  (1  $\mu\text{g/L}$ ) and allicin (5 mg/L, 10 mg/L, 30 mg/L). The mRNA expression level of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) was determined by real-time PCR. THP-1 adhesion to HUVEC was measured by rose Bengal staining. Migration function and MTT text were used to demonstrate the effects of alliin and allicin on the smooth muscle cell's migration and proliferation. **Results** TNF- $\alpha$  treatment significantly increased the mRNA expression of ICAM-1 in HUVEC, while alliin and allicin pretreatment all blocked the TNF- $\alpha$  induced mRNA expression of ICAM-1, and also effectively blocked THP-1 adhesions. Further more, alliin and allicin inhibited TNF- $\alpha$  induced contractile fiber cell's migration and proliferation functions. However, allicin was a bit more effective than alliin. **Conclusion** Both alliin and allicin can inhibit TNF- $\alpha$  induced inflammation and atherosclerosis, and alliin may substitute allicin in resisting atherosclerosis to a certain extent.

[收稿日期] 2011-02-28

[基金项目] 浙江省大学生科研创新团队资助项目(1160100634)

[作者简介] 柴惠, 博士, 副教授, 研究方向为中药抗心血管疾病的分子机制, E-mail 为 hui.chai@gmail.com。马建龙, 在校学生, 在校期间曾主持“浙江省大学生科技创新活动计划项目”一个, 主持浙江中医药大学校级课题一个, 研究方向为中药抗心血管疾病的分子机制, E-mail 为 ma\_jianlong@126.com。江婷婷, 在校学生, E-mail 为 jiang\_tingting1989@126.com。通讯作者沃兴德, 硕士, 教授, 享受国务院特殊津贴, 研究方向为脂质代谢与动脉粥样硬化, E-mail 为 woxtcm@126.com。

近十年来,人们逐渐认识到动脉粥样硬化(As)等心血管疾病与炎症反应有着十分密切的关系,炎症反应很可能是从机制上连接高胆固醇血症与 As 的纽带<sup>[1-3]</sup>。大蒜素是从大蒜中提取的一种含硫化物,是大蒜的主要有效成分。近年来,大蒜素在防治心血管疾病领域的研究已受到极大的关注。然而,大蒜素具有极强的刺激性气味,很难为公众所接受,使其临床应用受到很大的限制。蒜氨酸<sup>[4]</sup>是大蒜素的前体,无臭无味,如果能将蒜氨酸取代大蒜素,则有望大大提高大蒜的药用价值并开发出一种调脂和抗 As 的新药。目前,国内外对蒜氨酸的抗 As 作用研究非常少,但也有极少数学者对其进行了相关研究,如 Sangeetha 等<sup>[5,6]</sup>曾报道,蒜氨酸对异丙肾上腺素诱导的心肌梗死大鼠具有一定的保护作用,并进一步发现用蒜氨酸预处理可以逆转由异丙肾上腺素诱导的线粒体功能变化。本研究从不同的角度在细胞和分子水平上比较了大蒜素和蒜氨酸抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的炎症反应 RPMI 效果,旨在探讨蒜氨酸能否取代大蒜素的抗 As 作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和仪器

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自上海拜力生物科技有限公司(ATCC Number: CRL-1730<sup>TM</sup>);大鼠胸大动脉平滑肌细胞(A7r5)和人单核细胞(THP-1)均购自中国科学院细胞库;DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)为 GIBCO 公司产品;RPMI1640 培养基、PBS 溶液、胰酶-EDTA 均购自吉诺生物医药技术有限公司;TNF- $\alpha$ (货号 300-01A, 10  $\mu$ g)为 PeproTech 公司产品;虎红为 Sigma 公司产品(R-3877, 5 g);蒜氨酸、大蒜素均购自陕西慈缘生物技术有限公司;Gold View I 型核酸染色剂为 Solarbio 公司产品(货号:G8140);SYBR Premix Ex Taq GC 购自宝生物工程(大连)有限公司;cDNA 合成试剂盒为 Fermentas 公司产品;双色实时定量 PCR 仪、酶标仪、MyCycler PCR 仪等购自 Bio-Rad 公司;数码凝胶图像处理系统为 Tanon 4100;二氧化碳培养箱为 Thermo 3111;低温超速离心机为 Heraeus Labofuge 400R。

### 1.2 活性因子及黏附性测定

1.2.1 人脐静脉内皮细胞培养及分组 将原代 HUVEC 培养于 75 mL 培养瓶中,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基 10~15 mL,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 和 100% 饱和湿度的培养箱中培养。2~3 天换液一次,待细胞生长成 90% 致密度后,传代或分装冻存。

6~7 代 HUVEC 用于实验。将第 6 代 HUVEC 培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,待细胞生长成 90% 致密度后,换成含 0.5% FBS 的 DMEM 培养基饥饿处理 8 h。将 HUVEC 细胞分成 10 组:对照组(不经任何药物处理)、TNF- $\alpha$ (1  $\mu$ g/L)组、蒜氨酸(10 mg/L)组、大蒜素组(10 mg/L)、TNF- $\alpha$ (1  $\mu$ g/L) + 蒜氨酸(5 mg/L、10 mg/L、30 mg/L)组和 TNF- $\alpha$ (1  $\mu$ g/L) + 大蒜素(5 mg/L、10 mg/L、30 mg/L)组,用于以下实验。

1.2.2 人脐静脉内皮细胞总 RNA 提取 弃细胞原液,用 PBS 清洗 3 遍,加 200  $\mu$ L Trizol,室温静置裂解 5 min,再用细胞刮刀刮下并转移到无 RNA 酶的 1.5 mL Eppendorf 管中;加 200  $\mu$ L 氯仿充分混匀,室温静置 10 min,于 4 $^{\circ}$ C、12 kr/min 离心 15 min;吸取上清液至另一新的无 RNA 酶的 1.5 mL Eppendorf 管中,加入等体积异丙醇,轻轻混匀,-20 $^{\circ}$ C 放置 20 min,再 4 $^{\circ}$ C、12 kr/min 离心 10 min;弃上清,加 1 mL DEPC 水配制的 75% 乙醇清洗,4 $^{\circ}$ C、7.5 kr/min 离心 5 min;弃上清,敞口挥发剩余乙醇,再用 20  $\mu$ L DEPC 水溶解 RNA,并用核酸紫外分析仪测定浓度。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应 根据 cDNA 合成试剂盒说明,分别取 2.5  $\mu$ g 总 RNA,逆转录成 cDNA。在实时定量 PCR 仪上检测 mRNA 和 PCR 产物的表达水平。样品与实时定量 PCR 混合液及特异性引物混和后,加入 8 联管进行实时定量 PCR 反应。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预培养 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 反应 10 min。ICAM-1 引物上游 5'-TGA ACA GAG TGG AAG ACA TAT GCC-3',下游 5'-TCA GAT GCG TGG CCT AGT GTT-3'。内参 GAPDH 引物上游 5'-CGA CAG TCA GCC GCA TCT TC-3',下游 3'-CGC CCA ATA CGA CCA AAT CCG-5'。每个样品按相同条件重复 3 次,与内参 GAPDH 均一化消除实验误差后取平均值。

1.2.4 人单核细胞与人脐静脉内皮细胞的黏附性测定 将第 6 代 HUVEC 接种于 96 孔板中,每孔约 7000 个细胞。待细胞长成 80% 致密度后,饥饿处理 8 h(含 0.5% FBS 的 DMEM 培养基培养),再用药物预处理半小时,再加入 TNF- $\alpha$  共处理 16 h。在 HUVEC 中加入 THP-1 细胞  $1.3 \times 10^5$  个/孔(刚好能将底面铺满),37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 1 h。用 PBS 洗去未黏附细胞,加入 0.25% 虎红 100  $\mu$ L/孔,室温作用 10 min,洗去游离虎红,加乙醇-PBS(1:1)200  $\mu$ L/孔,室温作用 1 h。酶标仪 570 nm 测吸光度(A 值),最后用实验孔 A 值减去空白孔(未加 THP-1)A 值表示黏附量。

### 1.3 大鼠胸大动脉平滑肌细胞增殖和迁移测定

#### 1.3.1 大鼠胸大动脉平滑肌细胞的培养及分组

将原代 A7r5 培养于 75 mL 培养瓶中,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基 10 ~ 15 mL,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 和 100% 饱和湿度的培养箱中培养。2 ~ 3 天换液一次,待细胞长成 90% 致密度后,传代或分装冻存。8 ~ 10 代 A7r5 用于实验。将第 8 代 A7r5 培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,在 96 孔板中(增殖实验)长成约 70% 致密度或 6 孔板中(迁移实验)长成约 80% 致密度时,换成含 0.5% FBS 的 DMEM 饥饿培养 8 h。将细胞分 10 组:对照组(不经任何药物处理)、TNF- $\alpha$  (10  $\mu$ g/L) 组、蒜氨酸(10 mg/L) 组、大蒜素(10 mg/L) 组、TNF- $\alpha$  (10  $\mu$ g/L) + 蒜氨酸(5 mg/L、10 mg/L、30 mg/L) 组和 TNF- $\alpha$  (10  $\mu$ g/L) + 大蒜素(5 mg/L、10 mg/L、30 mg/L) 组,用于以下实验。每组实验设置相应复孔。需用药物处理的组先用蒜氨酸或大蒜素处理 30 min,再加 TNF- $\alpha$  共处理 16 h。

#### 1.3.2 MTT 法测定大鼠胸大动脉平滑肌细胞的增殖

10 组不同处理的 A7r5 培养于 96 孔板中,待处理结束后,每孔加入 MTT 溶液(5 g/L) 20  $\mu$ L,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 和 100% 饱和湿度的培养箱中继续孵育 3 ~ 5 h;终止培养,弃去上清液,每孔加入 150  $\mu$ L DMSO,震荡 10 min,使甲臜充分溶解;选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔的 A 值,记录结果。用 SPSS 17.0 软件分析结果。

#### 1.3.3 划线法测定大鼠胸大动脉平滑肌细胞的迁移

将 A7r5 种到 6 孔板上(提前在 6 孔板底部画一条过直径的细线作为标记),待细胞生长至约 90% 密度时进行饥饿处理。倒置显微镜下用无菌细胞刮将 6 孔板上线的一侧的细胞刮除,再用 PBS 轻洗 2 ~ 3 次,吸去残液。药物处理 24 h 后(具体分组见 1.3.1 平滑肌细胞培养及分组)在倒置相差显微镜下观察并测定移行最远的 A7r5 至刮线边缘的距离,即作为 A7r5 的迁移距离。每个药物浓度重复 3 次,每次观察 3 个高倍视野,取平均值。

#### 1.4 统计学处理

结果用 SPSS 17.0 统计软件处理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  为差异有显著性, $P < 0.01$  为差异有极显著性。

## 2 结果

### 2.1 蒜氨酸和大蒜素对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的人脐静脉内皮细胞细胞间黏附分子 1 表达的影响

荧光定量 PCR 结果显示,TNF- $\alpha$  作用 16 h 后,可

使 HUVEC 细胞 ICAM-1 mRNA 的表达明显增强( $P < 0.01$ );而用蒜氨酸或大蒜素预处理后,ICAM-1 mRNA 的表达则明显弱于 TNF- $\alpha$  单独处理组;蒜氨酸组和大蒜素组作用差异无显著性(表 1)。

表 1. 蒜氨酸和大蒜素对 TNF- $\alpha$  诱导的 ICAM-1 mRNA 表达的抑制作用

Table 1. Alliin and allicin inhibit the expression of ICAM-1 mRNA induced by TNF- $\alpha$

分 组	ICAM-1 mRNA
对照组	0.011 $\pm$ 0.000
蒜氨酸 10 mg/L 组	0.013 $\pm$ 0.001
大蒜素 10 mg/L 组	0.011 $\pm$ 0.000
TNF- $\alpha$ 1 $\mu$ g/L 组	0.490 $\pm$ 0.007 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ 1 $\mu$ g/L + 蒜氨酸 5 mg/L 组	0.407 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ 1 $\mu$ g/L + 蒜氨酸 10 mg/L 组	0.255 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ 1 $\mu$ g/L + 蒜氨酸 30 mg/L 组	0.092 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ 1 $\mu$ g/L + 大蒜素 5 mg/L 组	0.334 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ 1 $\mu$ g/L + 大蒜素 10 mg/L 组	0.223 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ 1 $\mu$ g/L + 大蒜素 30 mg/L 组	0.082 $\pm$ 0.000 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较。

### 2.2 蒜氨酸和大蒜素对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的人脐静脉内皮细胞与人单核细胞黏附性的影响

TNF- $\alpha$  可以大大增强 HUVEC 和 THP-1 的黏附作用( $P < 0.01$ ),而蒜氨酸和大蒜素可有效抑制由 TNF- $\alpha$  诱导的黏附性增加,并在一定浓度范围内随着蒜氨酸和大蒜素浓度的增加抑制作用增强。大蒜素和蒜氨酸的作用效果相似(表 2)。

表 2. 蒜氨酸和大蒜素对 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVEC 和 THP-1 黏附作用的抑制

Table 2. Alliin and allicin inhibit the adhesion of HUVEC and THP-1 induced by TNF- $\alpha$

分 组	THP-1 与 HUVEC 的黏附 (A 值)
对照组	0.118 $\pm$ 0.018
蒜氨酸 10 mg/L 组	0.118 $\pm$ 0.036
大蒜素 10 mg/L 组	0.123 $\pm$ 0.027
TNF- $\alpha$ 1 $\mu$ g/L 组	0.347 $\pm$ 0.021 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ 1 $\mu$ g/L + 蒜氨酸 5 mg/L 组	0.265 $\pm$ 0.027 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ 1 $\mu$ g/L + 蒜氨酸 10 mg/L 组	0.218 $\pm$ 0.008 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ 1 $\mu$ g/L + 蒜氨酸 30 mg/L 组	0.181 $\pm$ 0.012 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ 1 $\mu$ g/L + 大蒜素 5 mg/L 组	0.277 $\pm$ 0.013 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ 1 $\mu$ g/L + 大蒜素 10 mg/L 组	0.206 $\pm$ 0.005 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ 1 $\mu$ g/L + 大蒜素 30 mg/L 组	0.153 $\pm$ 0.020

a 为  $P < 0.05$ ,b 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较。

### 2.3 蒜氨酸和大蒜素对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的大鼠胸大动脉平滑肌细胞增殖和迁移的影响

培养的 A7r5 经 TNF- $\alpha$  作用后,其迁移和增殖

作用均明显增强,与对照组比较,差异有极显著性( $P < 0.01$ );用蒜氨酸或大蒜素预处理后,迁移和增殖作用均得到有效控制,其中,当药物浓度为 30 mg/L 时接近于对照组;大蒜素的作用效果略优于蒜氨酸(表 3 和图 1)。

表 3. 蒜氨酸和大蒜素抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 A7r5 增殖和迁移作用

Table 3. Alliin and allicin inhibit HUVEC's proliferation and migration induced by TNF- $\alpha$

分 组	细胞增殖 (A 值)	迁移距离 ( $\mu\text{m}$ )
对照组	0.275 $\pm$ 0.019	215.4 $\pm$ 26.5
大蒜素 10 mg/L 组	0.278 $\pm$ 0.003	216.7 $\pm$ 25.1
蒜氨酸 10 mg/L 组	0.292 $\pm$ 0.006	219.1 $\pm$ 24.6
TNF- $\alpha$ 10 $\mu\text{g/L}$ 组	0.412 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	320.4 $\pm$ 42.1 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ 10 $\mu\text{g/L}$ + 大蒜素 5 mg/L 组	0.353 $\pm$ 0.015 <sup>b</sup>	302.5 $\pm$ 23.4 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ 10 $\mu\text{g/L}$ + 大蒜素 10 mg/L 组	0.298 $\pm$ 0.016	265.1 $\pm$ 13.3 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ 10 $\mu\text{g/L}$ + 大蒜素 30 mg/L 组	0.297 $\pm$ 0.034	241.6 $\pm$ 21.3
TNF- $\alpha$ 10 $\mu\text{g/L}$ + 蒜氨酸 5 mg/L 组	0.396 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	308.3 $\pm$ 26.6 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ 10 $\mu\text{g/L}$ + 蒜氨酸 10 mg/L 组	0.328 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	276.6 $\pm$ 30.3 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ 10 $\mu\text{g/L}$ + 蒜氨酸 30 mg/L 组	0.298 $\pm$ 0.016	246.8 $\pm$ 27.5

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

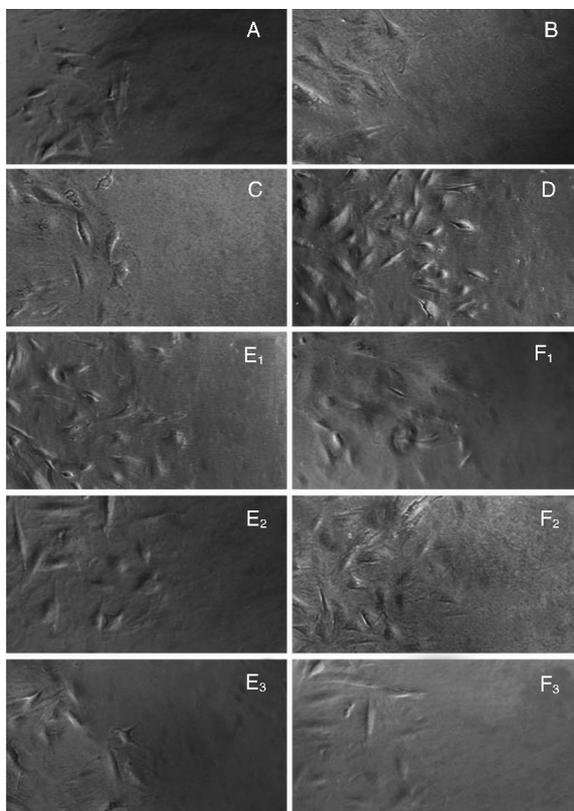


图 1. 蒜氨酸和大蒜素抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 A7r5 迁移作用

A 为对照组, B 为蒜氨酸组, C 为大蒜素组, D 为 TNF- $\alpha$  组, E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub> 为 TNF- $\alpha$  + 蒜氨酸(5 mg/L、10 mg/L、30 mg/L)组, F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>3</sub> 为 TNF- $\alpha$  + 大蒜素(5 mg/L、10 mg/L、30 mg/L)组。

Figure 1. Alliin and allicin inhibit HUVEC's migration induced by TNF- $\alpha$

### 3 讨 论

随着现代医学的不断发展,人们逐渐认识到 As 等心血管疾病的病理变化存在变质、渗出和增生等炎症的基本特征,而且贯穿了 As 发生、发展的整个过程,尤其在 As 早期病变形成期和不稳定斑块破裂期,炎症为其中介和中心环节。因此,从抗炎角度入手,通过抑制炎症反应来治疗 As 具有重要意义。本研究显示,用蒜氨酸或大蒜素预处理 HUVEC 可显著减少由 TNF- $\alpha$  诱导的 ICAM-1 mRNA 表达量的增加,并有效减少 THP-1 与 HUVEC 的黏附性。此外,本研究还发现用蒜氨酸或大蒜素预处理 A7r5 可明显抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 A7r5 的增殖和迁移作用。由以上结果可推断蒜氨酸或大蒜素对 TNF- $\alpha$  诱导的炎症和 As 等心血管疾病均有潜在的治疗作用,蒜氨酸在一定程度上可以取代大蒜素。

ICAM-1 是与细胞黏附相关的免疫球蛋白超基因家族成员,一般在内皮细胞表面不表达或低水平表达<sup>[7]</sup>,但脑缺血、TNF- $\alpha$  和 IL-1 能使 ICAM-1 基因表达上调<sup>[8]</sup>。ICAM-1 等黏附分子在介导单核细胞黏附、迁移穿过内膜进入膜下、始动脉硬化早期细胞的行为中起了非常重要的作用<sup>[9,10]</sup>。ICAM-1 表达的蛋白是一种膜表面糖蛋白,能够调节细胞与细胞之间、细胞与细胞外基质间相互作用,并起黏附作用<sup>[11]</sup>。又有报道,在刺激下 ICAM-1 在内皮细胞持续表达,使中性粒细胞与内皮细胞牢固黏附,引起细胞骨架的改变,导致微血栓形成和毛细血管阻塞;同时黏附激活的中性粒细胞释放氧自由基、弹性蛋白酶、蛋白水解酶等细胞毒性物质,加重内皮细胞和心肌细胞的损伤<sup>[12-14]</sup>。正常情况下 HUVEC 与单核细胞的黏附性很小,当 HUVEC 用 TNF- $\alpha$  诱导后,与单核细胞的黏附性显著增加<sup>[15]</sup>。本研究证实了 TNF- $\alpha$  能诱导 HUVEC 中 ICAM-1 mRNA 的过量表达,而蒜氨酸和大蒜素预处理可有效抑制 TNF- $\alpha$  的该作用。研究还发现 TNF- $\alpha$  可刺激 THP-1 黏附到 HUVEC 上,而蒜氨酸和大蒜素预处理能有效减少 TNF- $\alpha$  诱导的黏附性增加。这些数据有力地支持了本研究的荧光定量 PCR 的结果。以上结果表明蒜氨酸和大蒜素能在 As 形成的始动环节起到一定的抑制作用。

增殖和迁移是血管平滑肌细胞重要的生物学行为,参与多种病理过程,其中血管中膜层平滑肌细胞的生物学行为就与血管壁的病变密切相关。动脉内皮损伤后,中膜层的平滑肌细胞在各种炎性因子(如 TNF- $\alpha$ )和细胞因子的诱导下表型发生改变,大

量增殖并迁移到内膜,这一环节是动脉硬化进展的关键环节<sup>[16, 17]</sup>。在本实验中,体外培养的 A7r5 在 TNF- $\alpha$  的刺激下发生异常增殖和迁移,而用蒜氨酸或大蒜素预处理再与 TNF- $\alpha$  共处理,则 A7r5 的异常增殖和迁移均受到抑制。有研究指出平滑肌细胞增殖是由 Bmi-1 基因表达上调所致,当 Bmi-1 基因表达受抑制时平滑肌细胞增殖也受抑制<sup>[18]</sup>。蒜氨酸和大蒜素能抑制 A7r5 的异常增殖,可能就是因为它们能抑制细胞 Bmi-1 基因表达,从而抑制了该细胞的异常增殖。

本研究从 ICAM-1 mRNA 的表达,单核细胞与内皮细胞的黏附情况,以及 A7r5 的增殖和迁移情况这四个方面出发,对比研究了蒜氨酸和大蒜素对它们的影响,从而推测这两种药物对 As 是否具有防治作用。研究表明大蒜素和蒜氨酸的功能相似,对 As 可能都存在潜在的治疗作用。目前,大蒜素的抗 As 作用已得到了普遍认可,而蒜氨酸在抗 As 方面的研究却少之又少。大蒜素具有纯化难、保存易变性、有刺激性气味等缺点,相比之下蒜氨酸易纯化、性质稳定、无臭无味。因此,蒜氨酸在一定程度上可以取代大蒜素的抗 As 作用,本研究为推广蒜氨酸的研究和应用开拓了一个新的空间。

#### [参考文献]

- [1] Chen WF, Deng SL. Curcumin and its analogues as potent inhibitors of low density lipoprotein oxidation: H-atom abstraction from the phenolic groups and possible involvement of the 4-hydroxy-3-methoxyphenyl groups[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 9: 1-10.
- [2] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(1): 685-695.
- [3] Luscher TF, Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator[J]. *Atherosclerosis*, 1995, 118: S81-S90.
- [4] 唐辉,陈坚. 蒜氨酸及其相关活性组分的研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2008, 35(6): 441-446.
- [5] Sangeetha T, Quine SD. Protective effect of S-allyl cysteine sulphoxide (alliin) on glycoproteins and hematology in isoproterenol induced myocardial infarction in male Wistar rats[J]. *Appl Toxicol*, 2008, 28(5): 710-716.
- [6] Sangeetha T, Darlin Quine S. Preventive effect of S-allyl cysteine sulphoxide (Alliin) on mitochondrial dysfunction in normal and isoproterenol induced cardiotoxicity in male Wistar rats: a histopathological study[J]. *Mol Cell Bio-*

*chem*, 2009, 328(1-8).

- [7] Garbacki N, Kinet M, Nusgens B, et al. Proanthocyanidins, from *Ribes nigrum* leaves, reduce endothelial adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1[J]. *J Inflamm*, 2005, 9: 1-12.
- [8] Yin L, Ohtaki H, Nakamachi T, et al. Delayed expressed TNFR1 colocalize with ICAM-1 in astrocyte in mice brain after transient focal ischemia[J]. *Neurosci Lett*, 2004, 370(1): 30-35.
- [9] Zheng SQ, Qian ZY, Tang FT, et al. Suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression by crocetin contributes to attenuation of atherosclerosis in hyper-cholesterolemic rabbits[J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70: 1 192-199.
- [10] 高琳琳,李福荣,康莉,等. 蚤休皂苷对氧化损伤的脐静脉内皮细胞 ICAM-1、VCAM-1 表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2009, 19(13): 1 968-972.
- [11] 唐晓科,杨弘文,聂亚雄,等. 易卒中型肾血管性高血压大鼠脑组织 NF- $\kappa$ B 和 ICAM-1 的动态观察[J]. *中国现代医学杂志*, 2009, 19(3): 333-336.
- [12] He P, Zhang H, Zhu L, et al. Leukocyte-platelet aggregate adhesion and vascular permeability in intact microvessels: role of activated endothelial cells[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(2): 591-599.
- [13] Vinten-Johansen J, Jiang R, Reeves JG, et al. Inflammation, proinflammatory mediators and myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007, 21(1): 123-145.
- [14] Bhindi R, Khachigian LM, Lowe HC, et al. DNazymes targeting the transcription factor Egr-1 reduce myocardial infarct size following ischemia-reperfusion in rats[J]. *J Thromb Haemost*, 2006, 4(7): 1 479-483.
- [15] Zhou Z, Liu Y, Miao AD, et al. Protocatechuic aldehyde suppresses TNF-alpha-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 513: 1-8.
- [16] Zargham R. Preventing restenosis after angioplasty: a multistage approach[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2008, 114(4): 257-264.
- [17] 周晓莉,雷寒. 罗格列酮抑制体外培养大鼠血管平滑肌细胞的增殖和迁移作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(2): 104-108.
- [18] 谢静,李丽娟,谢景,等. 体外培养的平滑肌细胞多梳基因 Bmi-1 的表达变化及其与细胞增殖和细胞周期的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(1): 43-47.

(此文编辑 李小玲)