

二苯乙烯苷对同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞 MCP-1、ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响

李军, 王国荣, 王燕, 解砚英, 牟艳玲, 姚庆强

(山东省医学科学院药物研究所 山东省罕见病重点实验室, 山东省济南市 250062)

[关键词] 同型半胱氨酸; 动脉粥样硬化; 血管内皮细胞; 细胞黏附分子; 二苯乙烯苷

[摘要] **目的** 观察何首乌二苯乙烯苷对同型半胱氨酸诱导培养的人脐静脉内皮细胞株单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)、细胞间黏附分子 1 (ICAM-1) 和血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) mRNA 表达的影响。**方法** 在人脐静脉内皮细胞的培养基中加入不同浓度的二苯乙烯苷处理 2 h 再加入 3.0 mmol/L 同型半胱氨酸作用 36 h。Hoechst33342 核染色检测细胞核损伤; 以 RT-qPCR 检测不同浓度二苯乙烯苷处理对同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞 MCP-1、ICAM-1 及 VCAM-1 mRNA 表达的影响。**结果** 10 μmol/L 浓度以内, 二苯乙烯苷预孵育呈浓度依赖性降低 3.0 mmol/L 同型半胱氨酸所致人脐静脉内皮细胞核损伤加重, 抑制同型半胱氨酸所致 MCP-1、ICAM-1 及 VCAM-1 mRNA 的表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 二苯乙烯苷具有明显抑制同型半胱氨酸所致人脐静脉内皮细胞 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达增加的作用。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Effects of Tetrahydroxystilbene Glucoside on MCP-1, ICAM-1 and VCAM-1 Expression Induced by Homocysteine in HUVEC

LI Jun, WANG Guo-Rong, WANG Yan, XIE Yan-Ying, MU Yan-Ling, and YAO Qing-Qiang

(Institute of Materia Medica of Shandong Academy of Medical Sciences & Key Laboratory of Rare and Uncommon Diseases of Shandong Province, Jinan, Shandong 250062, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Atherosclerosis; Vascular Endothelial Cell; Cell Adhesion Molecule; Tetrahydroxystilbene Glucoside

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of tetrahydroxystilbene glucoside (TSG) on monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) mRNA expression of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) injured by homocysteine (Hcy). **Methods** HUVEC were treated with different concentration of TSG for 2 hours then treated with Hcy. Cell nucleus damage was detected by Hoechst33342 stain. mRNA expression levels of MCP-1, ICAM-1 and VCAM-1 were detected by RT-qPCR. **Results** Preincubation with TSG could attenuate the nucleolus damage of HUVEC induced by Hcy. While TSG concentration is less than 10 μmol/L, TSG showed a concentration dependent in decreasing the damage of Hcy on HUVEC. TSG decreased MCP-1, ICAM-1 and VCAM-1 mRNA expression that were increased by Hcy in HUVEC. **Conclusion** MCP-1, ICAM-1 and VCAM-1 mRNA expressions which were increased by Hcy in HUVEC in vitro can be reduced by TSG.

研究表明血浆同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 水平升高是冠心病、脑血管疾病以及外周阻塞性血管疾病等心脑血管疾病的一个重要独立危险因素^[1-3]。Hcy 可诱导培养的血管内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、细胞间

黏附分子 1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) mRNA 表达增加, 损伤血管内皮细胞, 促进动脉粥样斑块形成^[4]。

何首乌二苯乙烯苷 (tetrahydroxystilbene glucos-

[收稿日期] 2011-11-05

[基金项目] 山东省自然科学基金项目 (ZR2008C317)

[作者简介] 李军, 博士, 助理研究员, 研究方向为分子药理学, E-mail 为 ykyljun@126.com。通讯作者姚庆强, 博士, 硕士生导师。

ide, TSG) 可有效抑制高脂血症模型大鼠的血脂升高,降低主动脉、冠状动脉和颈总动脉脂质条纹面积,减少肝脏中的脂质沉积^[5]。TSG 还能促进血管内皮细胞释放 NO 并具有很强的抗氧化特性^[6],抑制 ox-LDL 所致单核细胞分泌黏附分子的增加,抑制内皮细胞与单核细胞的黏附^[7,8]。目前关于 TSG 对 Hcy 所致血管内皮细胞损伤的干预作用、对 Hcy 所致血管内皮细胞黏附分子增加的干预作用不明。

本研究应用 TSG 干预 Hcy 诱导培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC),研究 MCP-1、ICAM-1 及 VCAM-1 mRNA 相关基因的表达,初步探讨 TSG 干预 Hcy 诱导 HUVEC 损伤的可能分子作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

HUVEC 株由山东省医学科学院药物所药理室提供;TSG 为山东省药物研究所分离,纯度 99%;Hcy 购自 Sigma 公司;DMEM 培养基、胰蛋白酶和 EDTA 混合液购自 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;Hoechst33342 细胞核凋亡检测试剂盒购自碧云天生物公司;RNA 提取试剂购自 Promega 公司;逆转录及 SYBR Green I Real Time PCR 试剂购自大连宝生物公司;引物合成由上海博彩生物公司合成。

1.2 细胞培养及实验分组

HUVEC 的培养和传代方法参照文献[9],实验采用 3~5 代细胞。将 HUVEC 按 2×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板内,以含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养,待细胞长至 50% 时,更换为无血清培养基培养 24 h,使细胞同步化于 G_0 期(细胞同步化)后,进行以

下实验。实验一分为以下 5 组:正常培养基组、Hcy 1.0 mmol/L 组、Hcy 3.0 mmol/L 组、Hcy 5.0 mmol/L 组和 Hcy 10.0 mmol/L 组,加入 Hcy 培养 36 h 后进行 Hoechst 33342 核染色检测。按 Hoechst 33342 染色试剂盒说明进行细胞染色,荧光显微镜下进行核酸染色的细胞核凋亡形态观察,计算凋亡率。实验重复 5 次。根据其损伤程度,筛选 3.0 mmol/L Hcy 进行正式实验。实验二分为以下处理组:正常培养基组、Hcy 3.0 mmol/L 组、TSG(0.1、1、10 及 100 μ mol/L) 预孵育 2 h 再各加 Hcy 3.0 mmol/L 继续培养组。培养 36 h 后进行 Hoechst 33342 核染色检测。

1.3 RT-qPCR 检测相关基因的表达

将 HUVEC 按 1×10^5 个/孔的密度接种于 25 mL 培养瓶,以含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养,待细胞长至相互接触,改换无血清培养基培养 24 h,使细胞同步化于 G_0 期(细胞同步化)后,分为下列实验组:正常对照组、Hcy 组(Hcy 3.0 mmol/L)、TSG(0.1、1、10 及 100 μ mol/L) 预孵育 2 h 再各加 Hcy 3.0 mmol/L 继续培养 12 h 组。各处理组重复 5 次。实验结束后倾去上清液,以 PBS 快速洗涤 3 次,参照 Trizol 试剂说明裂解细胞备以提取 RNA。引物序列见表 1。实时定量 PCR 25 μ L 反应体系由以下成份组成:12.5 μ L 2 \times Power SYBR[®] Green PCR Master Mix, 1.0 μ mol/L 上、下游引物,1 μ L 逆转录产物,水构成。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 10 min;循环反应为 95 $^{\circ}$ C 8 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 40 个循环,在各循环的 60 $^{\circ}$ C 40 s 步骤进行荧光检测;最后为融解曲线步骤。每个样品目的基因的表达值与其内参基因表达域值的差 Δ Ct 为其相对表达量。各处理组目的基因的 Δ Ct 与正常对照组目的基因的 Δ Ct 差值计为 $\Delta\Delta$ Ct,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示为目的基因在药物处理组的表达量与在正常组表达量的比值。

表 1. 实时定量 PCR 检测基因的引物序列

Table 1. Real-time quantitative PCR primer sequences

引物	片段位置	登录号
ICAM-1 (196 bp)		
正义 5'-CTCTCGCTCTGTACC-3'	3018-3033	NM_000201.2
反义 5'-GGAAGTCTGGGCAATGT-3'	3213-3197	NM_000201.2
VCAM-1 (127 bp)		
正义 5'-AAGCAAAGGGAGCACTGGGTTG-3'	2591-2612	NM_080682.1
反义 5'-TCTGATGAACAACTTCGTGAAAC-3'	2717-2694	NM_080682.1
MCP-1 (120 bp)		
正义 5'-AGCAGCAAGTGTCCCAAAGA-3'	239-258	NM_002982.3
反义 5'-TTGGGTTTGCTTGTCCAGGT-3'	358-339	NM_002982.3
GAPDH (254 bp)		
正义 5'-AACGAATTTGGCTACAGC-3'	1048-1066	NM_002046.3
反义 5'-AGGGTACTTTATTGATGGTACAT-3'	1301-1278	NM_002046.3

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐者用LSD检验,方差不齐者用Dunnett T3检验。

2 结果

2.1 TSG对Hcy所致HUVEC细胞核形态学改变的影响

正常HUVEC胞核Hoechst33342染色呈均匀的

蓝色荧光,细胞核规则。以3.0 mmol/L Hcy 孵育HUVEC 36 h,细胞核具凋亡形态特点即胞核中染色体凝集、边聚化、胞核呈亮蓝色荧光的细胞比例增多(图1)。

与Hcy组相比,TSG可明显减轻Hcy诱导的内皮细胞核形态损伤,表现为细胞核中染色体凝集、边聚化的细胞比例减少,细胞核形态正常的细胞增多。显示TSG抑制Hcy所致HUVEC细胞核损伤的作用,其中TSG 10 $\mu\text{mol/L}$ 降低Hcy所致HUVEC的损伤作用最好(图1)。

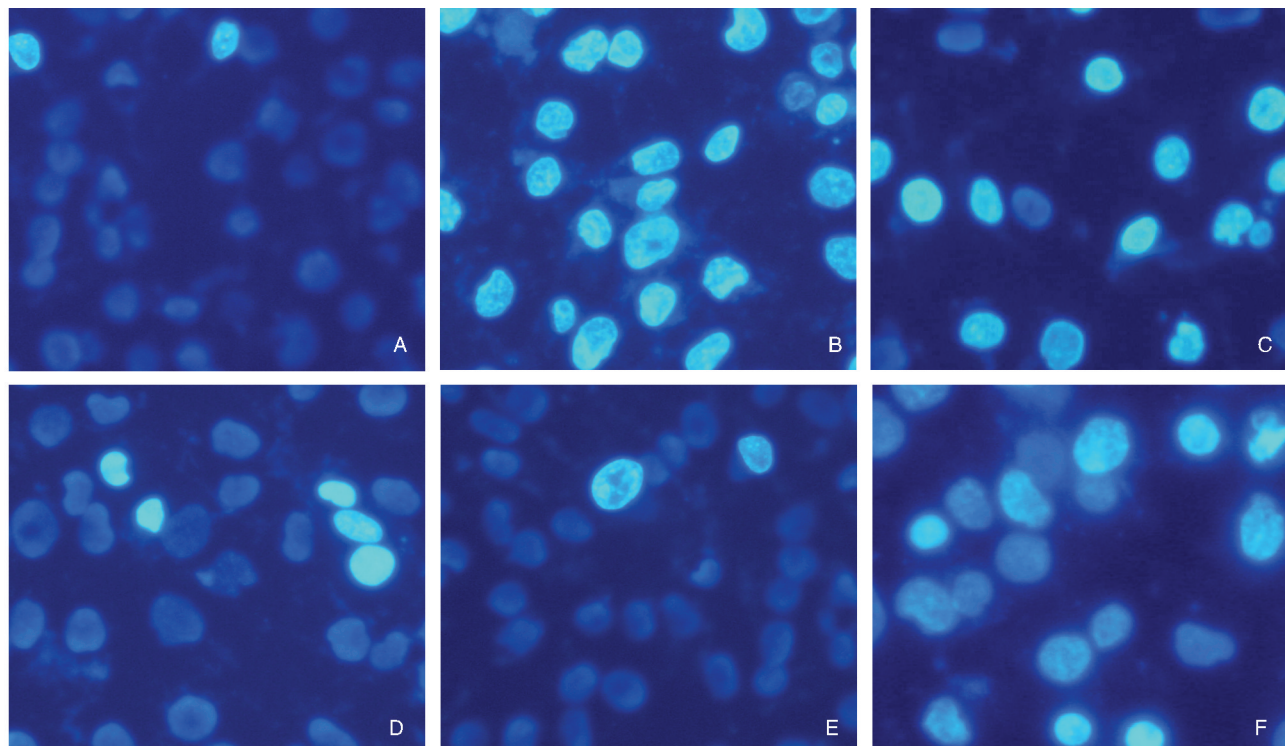


图1. TSG对Hcy所致HUVEC细胞凋亡的影响 A为对照组,B为Hcy 3.0 mmol/L组,C为TSG 0.1 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L组,D为TSG 1 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L组,E为TSG 10 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L组,F为TSG 100 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L组。

Figure 1. Effects of TSG on HUVEC apoptosis induced by Hcy

2.2 TSG对Hcy所致内皮细胞MCP-1 mRNA表达的影响

3.0 mmol/L Hcy 孵育HUVEC 6 h,MCP-1 mRNA表达显著上调,表达量是正常培养HUVEC的 4.1 ± 1.3 倍。0.1、1、10和100 $\mu\text{mol/L}$ TSG 孵育HUVEC 2 h,再给予3.0 mmol/L Hcy 孵育6 h后,与Hcy 3.0 mmol/L组相比,TSG 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度以下时可浓度依赖性抑制Hcy所致HUVEC MCP-1 mRNA过度表达。10 $\mu\text{mol/L}$ TSG使Hcy所致HUVEC MCP-1 mRNA的表达量降为 2.5 ± 1.1 ($P < 0.01$)。TSG浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时,其抑制Hcy所致HUVEC MCP-1 mRNA表达升高的作用下降(图2)。

2.3 TSG对Hcy所致血管内皮细胞ICAM-1 mRNA表达的影响

3.0 mmol/L Hcy 孵育HUVEC 6 h,ICAM-1 mRNA表达显著上调,表达量是正常培养HUVEC的 2.1 ± 0.8 倍。0.1、1、10和100 $\mu\text{mol/L}$ TSG与HUVEC 孵育2 h后,再给予3.0 mmol/L Hcy 孵育6 h,与Hcy 3.0 mmol/L组相比,TSG 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度以下可浓度依赖性抑制Hcy所致HUVEC ICAM-1 mRNA过度表达。10 $\mu\text{mol/L}$ TSG使Hcy所致HUVEC ICAM-1 mRNA的表达量降为 1.4 ± 0.7 ($P < 0.05$)。TSG浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时,其抑制Hcy所致HUVEC ICAM-1 mRNA的表达量升高的作用下降(图3)。

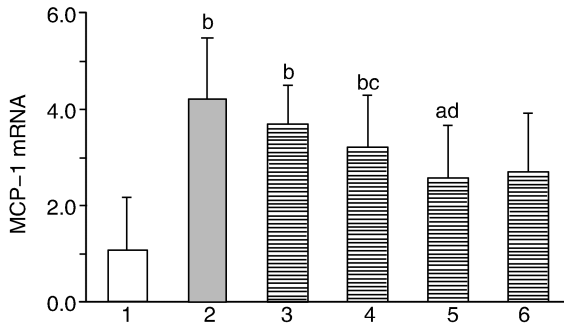


图 2. TSG 对 Hcy 所致 HUVEC MCP-1 mRNA 表达升高的干预作用($\bar{x} \pm s$) 1 为正常培养基组,2 为 Hcy 3.0 mmol/L 组,3 为 TSG 0.1 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L 组,4 为 TSG 1 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L 组,5 为 TSG 10 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L 组,6 为 TSG 100 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L 组。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常培养基组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 Hcy 3.0 mmol/L 组比较。

Figure 2. The inhibition effect of TSG on MCP-1 mRNA up-regulation in HUVEC induced by Hcy

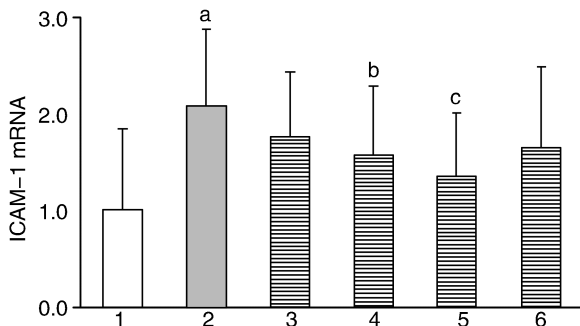


图 3. TSG 对 Hcy 所致 HUVEC ICAM-1 mRNA 表达升高的干预作用($\bar{x} \pm s$) 1 为正常培养基组,2 为 Hcy 3.0 mmol/L 组,3 为 TSG 0.1 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L 组,4 为 TSG 1 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L 组,5 为 TSG 10 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L 组,6 为 TSG 100 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L 组。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常培养基组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 Hcy 3.0 mmol/L 组比较。

Figure 3. The inhibition effect of TSG on ICAM-1 mRNA up-regulation in HUVEC induced by Hcy

2.4 TSG 对 Hcy 所致血管内皮细胞 VCAM-1 mRNA 表达的影响

3.0 mmol/L Hcy 孵育 HUVEC 6 h, VCAM-1 mRNA 表达显著上调,表达量是正常培养 HUVEC 的 3.3 ± 1.2 倍。0.1、1、10 和 100 $\mu\text{mol/L}$ TSG 与 HUVEC 孵育 2 h,再给予 3.0 mmol/L Hcy 孵育 6 h 后,与 Hcy 3.0 mmol/L 组相比,TSG 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度以下可浓度依赖性抑制 Hcy 所致 HUVEC VCAM-1 mRNA 过度表达。10 $\mu\text{mol/L}$ TSG 使 Hcy 所致 HUVEC VCAM-1 mRNA 的表达量降为 2.3 ± 0.9 ($P < 0.05$)。TSG 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,其抑制 Hcy 所

致 HUVEC VCAM-1 mRNA 的表达量升高的作用下降(图 4)。

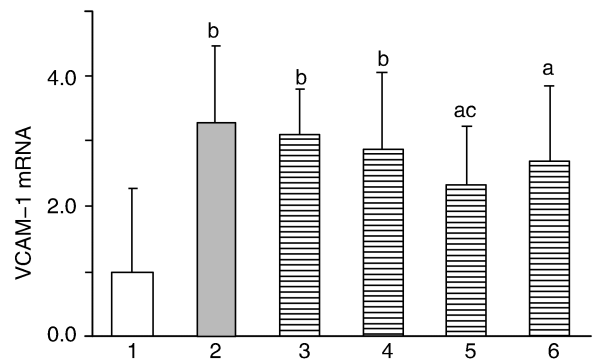


图 4. TSG 对 Hcy 所致 HUVEC VCAM-1 mRNA 表达升高的干预作用($\bar{x} \pm s$) 1 为正常培养基组,2 为 Hcy 3.0 mmol/L 组,3 为 TSG 0.1 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L 组,4 为 TSG 1 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L 组,5 为 TSG 10 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L 组,6 为 TSG 100 $\mu\text{mol/L}$ + Hcy 3.0 mmol/L 组。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常培养基组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 Hcy 3.0 mmol/L 组比较。

Figure 4. The inhibition effect of TSG on VCAM-1 mRNA up-regulation in HUVEC induced by Hcy

3 讨论

内皮细胞相关黏附分子主要包括 ICAM-1、VCAM-1、E 选择素和连接黏附分子(JAM)等。ICAM-1、VCAM-1 均含有与 NF- κ B 的结合位点,参与动脉粥样硬化发生发展过程中的单核细胞浸润与迁移。ICAM-1 可激活内皮细胞、成纤维细胞、组织巨噬细胞等,其主要功能是介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的黏附作用^[10]。MCP-1 属趋化因子 CC 亚家族,可由炎症介质刺激的内皮细胞、单核/巨噬细胞、成纤维细胞、B 细胞和平滑肌细胞等分泌,对单核/巨噬细胞有趋化和激活作用。内皮细胞黏附分子和 MCP-1 在细胞表面的表达遵循转录、翻译和转运到细胞表面。研究发现,Hcy、ox-LDL、VLDL、ox-VLDL 等多种动脉粥样硬化的刺激因素均可诱发黏附分子和单核细胞趋化蛋白的表达^[4,11]。

高浓度的 Hcy 可诱导活性氧的产生,导致细胞脂质过氧化增加、氧化胁迫增强^[12],促进低密度脂蛋白氧化^[13]。通过损伤内皮细胞促进炎症介质释放和促进平滑肌细胞增殖、破坏凝血功能平衡等多方面引起动脉粥样硬化的发生和发展^[4,14]。通过抑制炎症介质的释放也一直是防治动脉粥样硬化的研究热点。本研究也证实了 Hcy 促进内皮细胞凋亡、促进培养的血管内皮细胞 MCP-1、ICAM-1 和

VCAM-1 mRNA 表达升高的作用, Hcy 可呈浓度依赖性致培养的血管内皮细胞核损伤。

TSG 具有很强的抗氧化特性^[6], 降低活性氧所致血管内皮细胞损伤^[8,15], 抑制 ox-LDL 所致培养的单核细胞分泌黏附分子的增加。TSG 具有降低血脂、防治高血脂引起的动脉粥样硬化的作用^[16], TSG 可抑制高脂饮食引起的兔单核细胞黏附分子的分泌和抑制内皮细胞与单核细胞黏附^[7]、抑制高脂饮食引起的兔主动脉 ICAM-1、VCAM-1 及 VEGF mRNA 和蛋白表达^[17]。

本研究发现 TSG 预孵育可降低 Hcy 所致培养的 HUVEC MCP-1、ICAM-1 及 VCAM-1 mRNA 表达增加, 抑制 Hcy 所致 HUVEC 细胞核损伤, 降低凋亡细胞比例。TSG 的这一作用的原因还不明确, 但推测其可能与高浓度 Hcy 损伤内皮细胞主要是通过增加氧化损伤、而 TSG 保护高血脂和活性氧所致血管内皮细胞损伤的机制又与其抗氧化特性有关, 但目前缺乏相关研究的直接证据, 还需进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Kazemi MB, Eshraghian K, Omrani GR, et al. Homocysteine level and coronary artery disease [J]. *Angiology*, 2006, 57 (1): 9-14.
- [2] Ciaccio M, Bellia C. Hyperhomocysteinemia and cardiovascular risk; effect of vitamin supplementation in risk reduction [J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2010, 5 (1): 30-36.
- [3] Thiengburanatham S. Hyperhomocysteinemia-induced myocardial injury after coronary artery bypass [J]. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*, 2009, 17 (5): 483-489.
- [4] Seo H, Oh H, Park H, et al. Contribution of dietary intakes of antioxidants to homocysteine-induced low density lipoprotein (LDL) oxidation in atherosclerotic patients [J]. *Yonsei Med J*, 2010, 51 (4): 526-533.
- [5] 田汝芳, 崔慧辉, 龙石银, 等. 二苯乙烯苷的抗动脉粥样硬化作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (7): 606.
- [6] Ye S, Tang L, Xu J, et al. Postconditioning's protection of THSG on cardiac ischemia-reperfusion injury and mechanism [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2006,

26 (1): 13-16.

- [7] Yang PY, Almofti MR, Lu L, et al. Reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits and decrease of expressions of intracellular adhesion molecule-1 and vascular endothelial growth factor in foam cells by a water-soluble fraction of *Polygonum multiflorum* [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 99 (3): 294-300.
- [8] 张伟, 王玉琴, 李锋, 等. 二苯乙烯苷对 ox-LDL 诱导的 U937 细胞 ICAM-1、VCAM-1 及 VEGF 表达的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2008, 24 (5): 667-672.
- [9] 何志勇, 叶小军, 邵胜敏. 同型半胱氨酸对内皮细胞凋亡及 JNK 表达的影响 [J]. *心脑血管病防治*, 2009, 9 (2): 100-102.
- [10] 周丹, 袁宜勤. 细胞间黏附分子-1 与心血管疾病 [J]. *中国民族民间医药*, 2010, 19: 67-8.
- [11] 杨月仙, 刘波, 张茂林. 单核细胞趋化蛋白-1 与动脉粥样硬化及脑梗死的关系 [J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2011, 14 (3): 462-465.
- [12] Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, et al. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289 (6): H2 649-656.
- [13] Tawakol A, Omland T, Gerhard M, et al. Hyperhomocyst(e) inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans [J]. *Circulation*, 1997, 95 (5): 1 119-121.
- [14] Zeng XK, Remick DG, Wang X. Homocysteine induces production of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in cultured human whole blood [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25 (11): 1 419-425.
- [15] 龙石银, 高细强, 张彩平, 等. 二苯乙烯苷通过核因子 κ B 信号通路抑制过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (6): 479-482.
- [16] Wei PF, Jiao CL, Chen DD. The advance of the pharmacological research on *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *Modern Traditional Chinese Medicin*, 2004, 15 (1): 57-58.
- [17] 王玉琴, 沈燕, 王春华, 等. 二苯乙烯苷对动脉粥样硬化大鼠主动脉胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1 及血管内皮生长因子表达的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2008, 22 (5): 329-335.

(此文编辑 文玉珊)