

蒙花苷对TNF- α 诱导的血管内皮细胞炎症损伤及TLR4/I κ B α /NF- κ B信号通路的影响

吴亚军¹, 苏洁¹, 黄浦俊², 陈国杨², 陈素红^{1,2,3}, 吕圭源^{1*} (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.温州医科大学, 温州 325035; 3.浙江工业大学, 杭州 310014)

摘要: 目的 探讨蒙花苷对血管内皮细胞的保护作用和机制。方法 MTT 法检测肿瘤坏死因子(TNF- α)和蒙花苷对人脐静脉内皮细胞(EA.hy926)活性的影响; 采用 TNF- α (50 ng·mL⁻¹)刺激 EA.hy926, 加入不同浓度(5, 15 和 25 μ mol·L⁻¹)蒙花苷处理 24 h, DAPI 染色法测定 EA.hy926 细胞与单核细胞(THP-1)的黏附能力; Western blot 法检测细胞中 Toll 样受体(TLR4)、核因子- κ B 抑制蛋白(I κ B α)、核因子- κ B(NF- κ B)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)蛋白的表达; RT-PCR 法检测 ICAM-1、VCAM-1 mRNA 的表达; ELISA 法检测细胞上清液中白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6)和白介素-8(IL-8)的含量。结果 蒙花苷可显著抑制 TNF- α 刺激 EA.hy926 细胞与 THP-1 细胞间黏附作用, 降低 EA.hy926 细胞分泌的炎症因子 IL-1、IL-6 和 IL-8 水平。Western blot 和 RT-PCR 结果表明蒙花苷能减少 EA.hy926 细胞中 TLR4、NF- κ B、ICAM-1、VCAM-1 的蛋白表达量及 ICAM-1、VCAM-1 mRNA 的表达量, 同时能升高细胞中 I κ B α 的蛋白表达量。结论 蒙花苷能缓解血管内皮细胞炎症损伤, 其作用机制可能主要是通过抑制 TLR4/I κ B α /NF- κ B 信号通路发挥效用。

关键词: 蒙花苷; TNF- α ; EA.hy926; 炎症; I κ B α /NF- κ B

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2017)05-0637-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.05.001

引用本文: 吴亚军, 苏洁, 黄浦俊, 等. 蒙花苷对 TNF- α 诱导的血管内皮细胞炎症损伤及 TLR4/I κ B α /NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 637-643.

Buddleoside Prevents TNF- α -induced Human Aortic Endothelial Cells Inflammatory Injury Through Inhibiting TLR4/I κ B α /NF- κ B Signaling Pathway

WU Yajun¹, SU Jie¹, HUANG Pujun², CHEN Guoyang², CHEN Suhong^{1,2,3}, LYU Guiyuan^{1*} (1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 3.Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protective effect and mechanism of buddleoside on human aortic endothelial cells. **METHODS** MTT assay was used to detect the viability of EA.hy926 in TNF- α and buddleoside. EA.hy926 cells were treated with TNF- α (50 ng·mL⁻¹) for inflammatory injury model. After being pretreated with different concentrations(5, 15, 25 μ mol·L⁻¹) of buddleoside for 24 h, DAPI staining was used to evaluate the effect of buddleoside on adhesion of EA.hy926 and THP-1. The protein expression of TLR4, I κ B α , NF- κ B, ICAM-1 and VCAM-1 were tested by Western blot method respectively. The mRNA expression of ICAM-1 and VCAM-1 were tested by RT-PCR method respectively. ELISA method was used to measure the levels of IL-1, IL-6 and IL-8. **RESULTS** Buddleoside could inhibit the adhesion of TNF- α stimulated EA.hy926 cell and THP-1 cell. ELISA results showed that buddleoside reduced IL-1, IL-6 and IL-8 production in TNF- α -stimulated EA.hy926. Buddleoside significantly decreased TLR4, NF- κ B, ICAM-1 and VCAM-1 protein expression in TNF- α -stimulated EA.hy926 cell. In addition, buddleoside increased I κ B α protein expression. RT-PCR result showed buddleoside decreased ICAM-1 and VCAM-1 mRNA expression in TNF- α -stimulated EA.hy926 cell. **CONCLUSION** Buddleoside can alleviate the inflammatory injury of vascular endothelial cells, and its mechanism may be mainly through the inhibition of TLR4/I κ B α /NF- κ B signaling pathway.

KEY WORDS: buddleoside; TNF- α ; EA.hy926; inflammation; I κ B α /NF- κ B

高血压是目前最常见的心血管疾病之一, 已成为全球范围内的重大公共卫生问题。现已证明,

高血压病几乎影响到患者所有的组织器官, 并最终会导致动脉硬化、心肌缺血、脑卒中以及肾衰

基金项目: 国家自然科学基金(81274123); 浙江省重点实验室项目(2012E10002); 浙江省教育厅项目(Y201431439)

作者简介: 吴亚军, 男, 硕士生 Tel: 15068896285 E-mail: 546026929@qq.com *通信作者: 吕圭源, 教授, 博导 Tel: (0571)86613601 E-mail: lv.gy@263.net

竭等疾病的发生^[1-2]。近年来研究发现内皮细胞损伤导致的功能障碍与多种心血管疾病的发生发展密切相关,包括高血压、糖尿病、动脉粥样硬化等^[3]。内皮是血管的重要组成部分,一方面可调节正常生理过程,如释放小分子物质 NO、PGI₂ 调节血管张力;另一方面可以形成和分泌生长调节分子和细胞因子;提供一个对白细胞非黏附性表面。内皮表达黏附分子与白细胞相互作用,通过启动基因多效性 NF- κ B 转录因子活化使各种细胞因子产生,参与并扩大炎症反应,从而引起血管内皮细胞功能障碍^[4]。血管内皮细胞功能障碍与高血压病的发生及转归密切相关,血管内皮细胞损伤既是高血压的重要病理结果,同时又是导致高血压发生的致病因素,为“内皮-高血压-心血管事件”链启动因子和载体^[5],因此预防和逆转血管内皮功能损伤已成为高血压治疗的新靶点。野菊花(*Chrysanthemum indicum* L.)性微寒,味苦辛,清热解毒^[6],具有抗炎、保护心脏、降压等作用^[7-8]。蒙花苷(buddleoside, BUD)是野菊花主要活性成分之一,是一种天然黄酮类化合物,研究已发现 BUD 具有血管保护作用^[9-11]。因此本实验利用肿瘤坏死因子(TNF- α)刺激人脐静脉内皮细胞(EA.hy926),体外模拟血管内皮细胞炎症损伤模型,研究 BUD 抑制内皮细胞炎症损伤的保护作用及机制。

1 材料与仪器

1.1 细胞株

EA.hy926 细胞、单核细胞(THP-1)均购于中国科学院细胞库。

1.2 药物和试剂

BUD(上海同田生物技术股份有限公司,批号:15060528,纯度 $\geq 98\%$); TNF- α (杭州联科生物技术有限公司,批号:9630001A50); MTT(美国 SIGMA 公司,批号:MKEJ2415V,纯度:98%); DMEM 高糖培养液(上海立菲生物技术有限公司,批号:8114157); RPMI.1640 培养液(杭州吉诺生物医药技术有限公司,批号:15070607); 胎牛血清(FBS,澳大利亚 GEMINI,批号:A96D22E); 二甲基亚砜(DMSO,上海生工生物,批号:0929SJ50); 白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6)和白介素-8(IL-8)ELISA 检测试剂盒(批号分别为 CK-10081H, CK-E10140H, CK-E10139H)均购于上海源叶生物科技有限公司; 细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)、donkey

anti-mouse IgG-B、donkey anti-rabbit IgG-B、donkey anti-goat IgG-B 均购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; GAPDH、Toll 样受体(TLR4)、核因子- κ B 抑制蛋白(I κ B α)、核因子- κ B(NF- κ B)均购于美国 Cell Signaling Technology 公司; M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒(批号: C1317KA4223)、Taq DNA Polymerase(批号: 13600001)均购于 Sangon Biotech 公司。

1.3 仪器

IX71 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus); MiniChem II 化学发光成像仪(北京赛智创业科技有限公司); Tanon 1600 紫外凝胶成像系统(上海天能公司); BJ-2CD 超净工作台(上海博迅实业有限公司); Thermo Scientific Series 8000 恒温培养箱(Thermo scientific); Power Wave 340 酶联免疫检测仪(美国 Bio-TeR)。

2 方法

2.1 细胞培养和药物处理

先把 EA.hy926 细胞培养于 DMEM 培养液(含 10% FBS、青霉素 1×10^5 U $\cdot$ L⁻¹、链霉素 100 mg $\cdot$ L⁻¹); 单核细胞(THP-1), 培养于 RPMI 1640 培养液(含 10% FBS、200 mg $\cdot$ L⁻¹ D-葡萄糖、300 mg $\cdot$ L⁻¹ L-谷氨酸、2 000 mg $\cdot$ L⁻¹ 碳酸氢钠、100 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 青霉素、100 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 链霉素); 均置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2 d 换液, 取对数生长期细胞备用。BUD 溶于 DMSO, 配成 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ 置于 4 $^{\circ}$ C 保存。TNF- α 溶于无菌 PBS 溶液, 浓度为 10 μ g $\cdot$ mL⁻¹。所用药物实验时均取无血清培养液稀释到所需浓度。

2.2 MTT 法测 TNF- α 和 BUD 对 EA.hy926 细胞活性的影响

取对数生长期的 EA.hy926 细胞, 按每孔 1×10^4 个于 100 μ L 培养液中接种于 96 孔板, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度 TNF- α (10, 20, 40, 50, 100, 200 和 400 ng $\cdot$ mL⁻¹)溶液或不同浓度 BUD(1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 和 50 μ mol $\cdot$ L⁻¹)溶液各 200 μ L, 空白组和对照组加入等体积的无血清培养液, 每组设 8 个复孔。孵育 24 h 后, 弃上清, 每孔加入 100 μ L MTT(0.5 mg $\cdot$ mL⁻¹), 在培养箱中继续孵育。4 h 后弃上清, 加入 150 μ L DMSO, 在摇床上震荡 10 min 使结晶充分溶解后, 在 570 nm 处测各孔的 OD 值。细胞存活率(%)=(给药组 OD 值-空白组

OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)×100%。

2.3 DAPI 染色法检测 EA.hy926 细胞与单核细胞 (THP-1)的黏附能力

取对数生长期的 EA.hy926 细胞,按每孔 1.5×10^4 于 100 μL 培养液中接种于 96 孔板,分为对照组, TNF- α (50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)组, TNF- α +BUD (50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ +5, 15 和 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组。取 350 万 THP-1 细胞用 DAPI(5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)进行染色,置于培养箱中孵育过夜。EA.hy926 细胞长至 80%左右,加入各浓度药物继续孵育 24 h。随后,将荧光标记的 THP-1 细胞以每孔 5×10^4 加入 96 孔板中,置于培养箱中孵育 30 min 后, PBS 轻柔清洗 3 遍。在荧光倒置显微镜 200×倍镜下随机拍取 10 个视野,利用 Image-Pro Plus 5.1 software 软件进行统计计数。

2.4 ELISA 法检测 EA.hy926 细胞上清液炎症因子

取对数生长期的 EA.hy926 细胞,按每孔 1.5×10^4 于 100 μL 培养液中接种于 96 孔板,分为对照组, TNF- α (50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)组, TNF- α +BUD (50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ +5, 15 和 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组,每组设 8 个复孔,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。待细胞贴壁后,加入各浓度药物继续孵育。24 h 后收集细胞上清液离心后进行 ELISA 实验,测定 IL-1、IL-6 和 IL-8 含量。所有操作方法均参照试剂盒说明书进行。

2.5 Western blot 检测蒙花苷对 TLR4、NF- κ B、ICAM-1、VCAM-1 和 I κ B α 蛋白的影响

取对数生长期的 EA.hy926 细胞配制成细胞悬液,分别接种于 60 mm×15 mm 培养皿中,待细胞长至 80%左右,分为对照组, TNF- α (50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)组, TNF- α +BUD(50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ +5, 15 和 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组。待细胞贴壁,加入各浓度药物孵育。24 h 后弃去上清,用 PBS 小心洗涤一次,胰酶消化,离心收集细胞,离心后的细胞用蛋白裂解液裂解,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后,取上清,BCA 法蛋白定量后加入 5×Loading buffer 上样缓冲液,95 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴加热 30 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,湿法转至 PVDF 膜上。室温下用封闭液封闭 2 h 后,加入按比例稀释的一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,再与二抗(1:1 000)反应。孵育 30 min 后再用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。最后采用化学发光成像仪曝光成像, Image J 软件进行灰度分析。

2.6 RT-PCR 检测蒙花苷对 ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达的影响

取对数生长期的 EA.hy926 细胞配制成细胞悬液,分别接种于 60 mm×15 mm 培养皿中,待细胞长至 80%左右,分为对照组, TNF- α (50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)组, TNF- α +BUD(50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ +5, 15 和 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组。待细胞贴壁,加入各浓度药物孵育。24 h 后弃去上清,用 PBS 小心洗涤一次,胰酶消化,离心收集细胞,加 Trizol 提取总 RNA,逆转录为 cDNA 后,进行聚合酶链反应。取 1 μL cDNA 为模版进行扩增,加入 1.5 μL dNTP, 1.5 μL buffer(Mg^{2+}), 1.5 μL 上游引物, 1.5 μL 下游引物, 0.15 μL TaqDNA, 0.9 μL DMSO, 加灭菌双蒸水至总体积 15 μL 。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶 90 V 电泳 45 min,紫外凝胶成像分析仪观察其结果并拍照, ImageJ 软件进行灰度分析。引物见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer Sequence

基因	序列
GAPDH	正向: CAGCGACACCCACTCCTC
	反向: TGAGGTCCACCACCCTGT
ICAM-1	正向: TGTGACCAGCCCAAGTTGTT
	反向: AGTCCAGTACACGGTGAG
VCAM-1	正向: GGCGCCTATACCATCCGAAA
	反向: TGCTTCTACAAGACTATATGACCCC

2.7 统计学处理

检测结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为显著性差异,有统计学意义。

3 结果

3.1 TNF- α 和 BUD 对 EA.hy926 细胞活性的影响

为了排除药物的干扰,首先分析 TNF- α 和 BUD 对细胞活力的直接影响,结果见图 1。图 1A 结果显示,与对照组相比,除 400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TNF- α 外其他浓度对细胞活力无明显影响。在此基础上选用 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TNF- α 作用于 EA.hy926 细胞建立理想的体外血管内皮细胞炎症损伤模型。图 1B 中 MTT 结果表明,随着浓度的增加, BUD 对 EA.hy926 细胞增殖的抑制作用逐渐增强,当浓度增至 30, 40 和 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, BUD 对 EA.hy926 细胞已有较强的细胞毒性,可明显抑制 EA.hy926 细胞的增殖($P < 0.01$)。为了排除药物的细胞毒性对最终抗炎药效的干扰,本研究后续实验所采用 BUD 浓度为 5, 15 和 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 BUD 对 TNF- α 刺激后 EA.hy926 与 THP-1 细胞黏附的影响

将 50 ng·mL⁻¹ TNF- α 与 EA.hy926 孵育 24 h 后, EA.hy926 与 THP-1 细胞的黏附数比对照组明显增

加($P<0.01$); 而当加入 5, 15 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BUD 作用 24 h 后, THP-1 细胞的黏附数显著低于 TNF- α 组($P<0.01$)。结果见图 2~3。

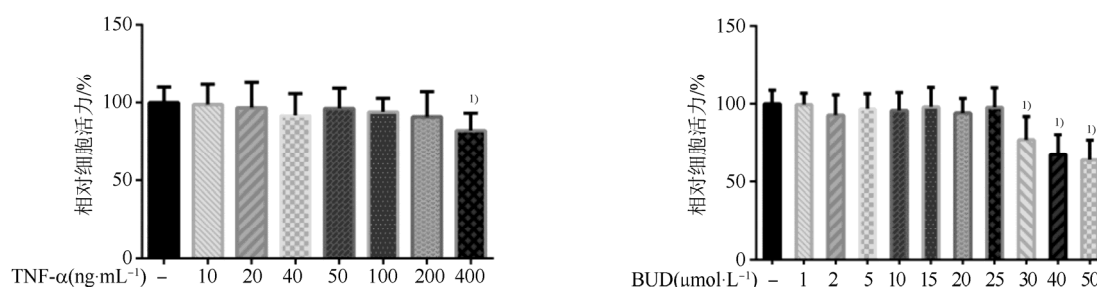


图 1 TNF- α 和蒙花苷对 EA.hy926 细胞活力的影响($n=8$, $\bar{x}\pm s$)
与对照组相比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 1 The cytotoxicity effect of TNF- α and buddleoside on EA.hy926 ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$.

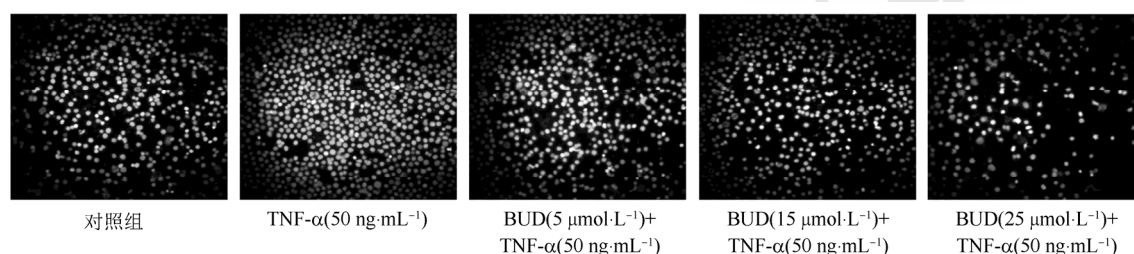


图 2 BUD 对 EA.hy926 和 THP-1 黏附的影响(200 $\times$)

Fig. 2 The effect of buddleoside on adhesion of EA.hy926 and THP-1 (200 $\times$)

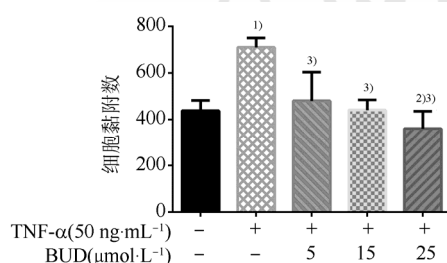


图 3 BUD 对 EA.hy926 和 THP-1 黏附的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)
与对照组相比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$; 与 TNF- α 组相比较, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 The effect of buddleoside on adhesion of EA.hy926 and THP-1 ($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$; compared with TNF- α group, ³⁾ $P<0.01$.

3.3 BUD 对 TNF- α 刺激 EA.hy926 细胞分泌炎症因子的影响

经 TNF- α 诱导 EA.hy926 细胞分泌炎症因子 IL-1、IL-6 和 IL-8 的水平与对照组相比显著增加($P<0.01$)。与 TNF- α 组相比, 孵育不同浓度的 BUD 24 h 后, IL-1、IL-6 和 IL-8 呈浓度依赖性降低。结果见图 4。

3.4 BUD 对 TNF- α 刺激后 EA.hy926 细胞 TLR4、NF- κ B、ICAM-1、VCAM-1 和 I κ B α 蛋白表达的影响

TNF- α 刺激 EA.hy926 细胞后能显著升高 TLR4、NF- κ B、ICAM-1 和 VCAM-1 的蛋白表达量($P<0.01$), 同时也能显著降低 I κ B α 的蛋白表达量($P<0.01$); 以不同浓度 BUD 处理细胞后, 能有效抑制 ICAM-1、VCAM-1、TLR4 和 NF- κ B 的表达($P<0.01$), 同时促进 I κ B α 的蛋白表达量显著性升高并呈剂量依赖性, 结果见图 5。表明 BUD 能够降低 TLR4、NF- κ B、ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达量, 同时升高 I κ B α 蛋白表达量。

3.5 BUD 对 TNF- α 刺激后 EA.hy926 细胞 ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达的影响

TNF- α 刺激 EA.hy926 细胞后能显著升高 ICAM-1 和 VCAM-1 的 mRNA 表达量($P<0.05$, $P<0.01$)。以不同浓度 BUD 处理细胞后, 能有效抑制 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 的表达。表明 BUD 能够降低 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 的表达量。结果见图 6。

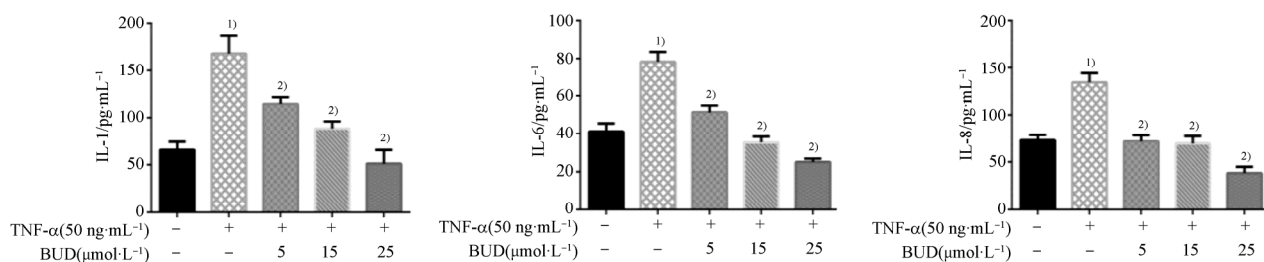


图4 BUD对TNF- α 刺激后EA.hy926中炎症因子的影响($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与TNF- α 组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 The effect of buddleioside on inflammatory factors of TNF- α stimulation EA.hy926 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with TNF- α group, ²⁾ $P<0.01$.

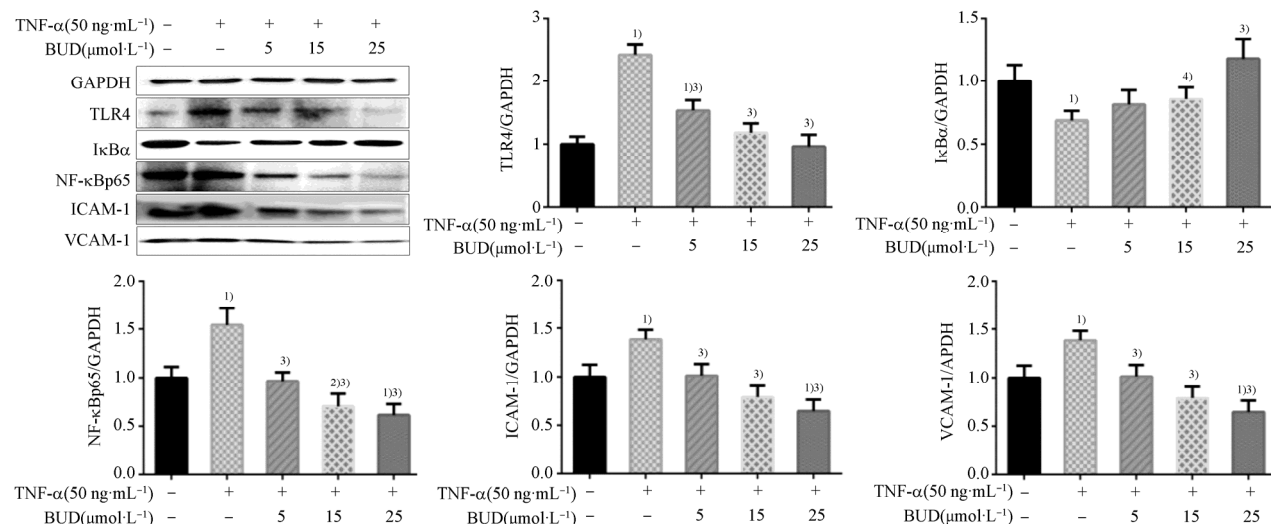


图5 BUD对EA.hy926细胞中蛋白表达量的影响($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

与对照组相比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$; 与TNF- α 组相比较, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 5 The protein expression in EA.hy926 cell ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$; compared with TNF- α group, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.05$.

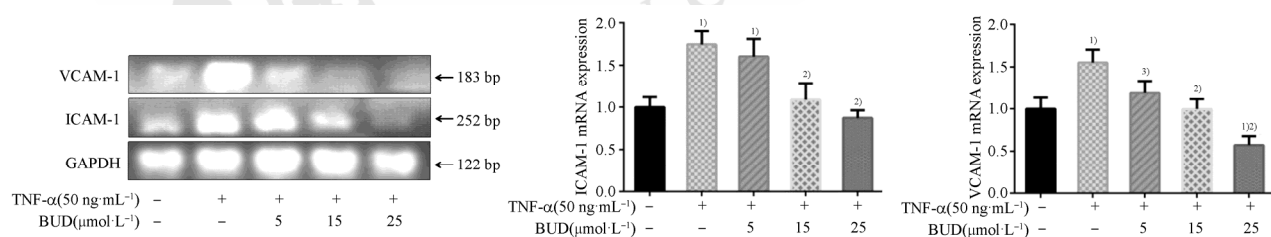


图6 BUD对EA.hy926细胞中ICAM-1、VCAM-1 mRNA表达的影响($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

与对照组相比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与TNF- α 组相比较, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 6 The effect of BUD on the mRNA expression (ICAM-1, VCAM-1) in EA.hy926 cell ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with TNF- α group, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.05$.

4 讨论

近年来研究表明内皮细胞损伤导致的功能障碍与多种心血管疾病的发生和发展有着密切联系, 包括高血压、冠状动脉性心脏病、糖尿病等。高血压是一个明显的慢性低级别炎症过程, 整个过程充斥着炎症细胞系统的激活^[12]。在炎症因子的刺激下, 血管内皮细胞既能募集炎症细胞到血

管损伤部位, 又可通过旁分泌的方式影响血管的结构和功能变化。对此有研究^[13]指出炎症细胞激活参与了高血压形成发展的整个流程, 并证明对于高血压患者可以利用抑制炎症细胞因子生成的药物有效抑制炎症信号通路, 同时达到降压的目的, 这样为高血压及其并发症的治疗提供了新的研究方向。故本实验从抗炎的角度出发, 探讨 BUD

保护血管内皮细胞的作用和机制,进而为其预防和治疗高血压及伴随症奠基科学依据。

前期实验研究发现脂多糖(LPS)也会引起血管内皮细胞炎症损伤^[9],为了从多角度去模拟内皮细胞炎症损伤,本实验利用 TNF- α 刺激 EA.hy926 细胞。LPS 介导的主要受体是 TLR4^[14],而 TNF- α 是由巨噬细胞/单核细胞活化产生的一种细胞因子,在炎症反应、细胞免疫、肿瘤免疫等多种生理和病理过程中发挥关键作用。越来越多的证据表明 TNF- α 是血管炎症级联反应的关键细胞因子,TNF- α 能侵入血管内皮细胞,从而引发细胞外基质的沉积和血管内皮炎症损伤^[15]。Kanaji 等^[16]研究表明,TNF- α 可通过 NF- κ B 信号通路调节内皮细胞的损伤及重塑。张竞之等^[17]通过不同实验研究表明 TLR4-NF- κ B 信号途径介导的炎症反应和免疫紊乱是高血压病发病机制之一。NF- κ B 为一个转录因子蛋白家族,最常见的 NF- κ B 二聚体是 p65 与 p50 组成的异二聚体。NF- κ B 的抑制单位 I κ B 通过其 C 末端特定的锚蛋白重复序列与 NF- κ B 结合,并覆盖 NLS 阻止 NF- κ B 向细胞核内转移。在静息的细胞中,NF- κ B 和 I κ B 形成复合体,以无活性形式存在于胞浆中。当细胞受细胞外信号刺激后,I κ B 激酶复合体(I κ B kinase, IKK)活化将 I κ B 磷酸化,使 NF- κ B 暴露核定位位点。游离的 NF- κ B 迅速移位到细胞核,与特异性 κ B 序列结合,诱导相关基因转录^[18]。同时 TNF- α 能激发 NF- κ B 通路促进 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达^[19]。因此,本实验应用 TNF- α 刺激人脐静脉内皮细胞,激活 TLR4/I κ B α /NF- κ B 信号通路,从而引起 ICAM-1、VCAM-1 等炎性因子的表达。同时用 BUD 进行干预,观察其对 TLR4/I κ B α /NF- κ B 通路和 ICAM-1、VCAM-1 等相关炎性因子的影响。

本实验利用 TNF- α 刺激 EA.hy926 细胞,体外模拟血管内皮细胞炎症损伤模型,探讨 BUD 抑制内皮细胞炎症损伤的保护作用及机制。实验结果表明,TNF- α 刺激 EA.hy926 细胞中 ICAM-1 和 VCAM-1 过量表达,诱导 THP-1 和 EA.hy926 的黏附,同时刺激 EA.hy926 分泌 IL-1、IL-6、IL-8 等相关炎性因子,而经 BUD 处理后能有效抑制 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达,减弱 THP-1 和 EA.hy926 细胞间的黏附作用,同时降低 IL-1、IL-6 和 IL-8 的分泌水平,进而发挥其抑制血管内皮细胞炎症损伤的作用。TNF- α 刺激 EA.hy926 细胞后,

使细胞中 TLR4 蛋白含量增加,继而引发 I κ B α 的降解,随后与 NF- κ B 解离,活化的 NF- κ B 迅速移位到细胞核,与特异性 κ B 序列结合,诱导相关基因转录,使 NF- κ B 蛋白含量增加。而经 BUD 处理后能抑制 TLR4 的活化,同时能促进 I κ B α 蛋白的表达,进一步抑制 NF- κ B 的表达,使 ICAM-1、VCAM-1 和相关炎性因子水平降低,缓解血管内皮细胞的炎症损伤。

总之,BUD 能降低血管内皮细胞炎症损伤中 TLR4 和 NF- κ B 蛋白水平以及升高 I κ B α 的表达,继而下调 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达,同时降低 IL-1、IL-6 和 IL-8 的分泌水平。综上所述,笔者认为 BUD 缓解血管内皮细胞的炎症损伤机制主要是通过抑制 TLR4/I κ B- α /NF- κ B 信号通路的活化,继而减少炎性黏附因子和炎性因子的水平,减弱血管内皮细胞炎症损伤程度,从而达到预防和治疗高血压的效果。机制示意图见图 7。

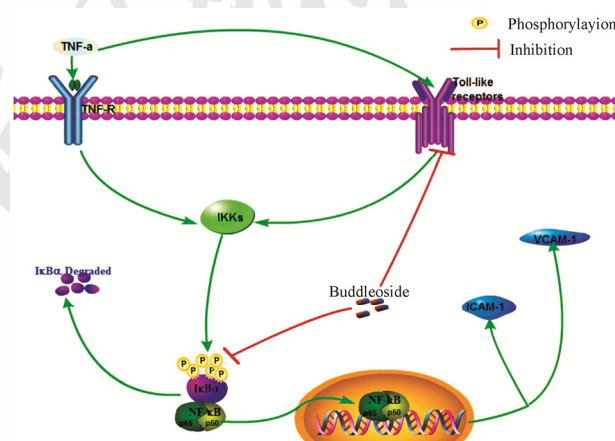


图 7 BUD 抗血管内皮细胞炎症损伤机制图

Fig. 7 The mechanism image of buddleioside anti-vascular endothelial cell inflammatory injury

REFERENCES

- [1] REIBIS R K, HUBER M, KAROFF M, et al. Target organ damage and control of cardiovascular risk factors in hypertensive patients [J]. Herz, 2015, 40(Suppl 2): 209-216.
- [2] XUE Y, IQBAL N, CHAN J, et al. Biomarkers in hypertension and their relationship with myocardial target-organ damage [J]. Curr Hypertens Rep, 2014, 16(12): 502.
- [3] GOON P K, LIP G, BOOS C J, et al. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer [J]. Neoplasia, 2006, 8(2): 79-88.
- [4] LIU Y L, LIU G T. Relation of vascular endothelial inflammatory reaction and atherosclerosis and its enlightenment for research of anti-atherosclerotic drug [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2001, 17(04): 361-364.
- [5] HIRSCH A T. Vascular disease, hypertension, and prevention:

- “from endothelium to clinical events” [J] J Am Coll Cardiol, 2003, 42(2): 377-379.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2015: 314.
- [7] LIU D D, MIAO M S. Modern research and characteristics analysis on *Chrysanthemum Indicum* [J]. China J Chin Med(中医学报), 2014, 29(4): 551-553
- [8] ZHANG J Y, ZHANG L, LI J, et al. Effects of total flavonoids of *Chrysanthemum indicum* on free radical in adjuvant arthritic rats [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35(3): 344-347.
- [9] XU H T, SU J, WU Y J, et al. Effect of buddleoside on lipopolysaccharide-induced inflammatory injury of vascular endothelial cells [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2016, 32(1): 29-32.
- [10] LV G Y, ZHANG Y P, GAO J L, et al. Combined antihypertensive effect of luteolin and buddleoside enriched extracts in spontaneously hypertensive rats [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(2): 507-513.
- [11] ZHANG L J, LI S, CHEN G N, et al. Vasodilatory and anti-inflammatory mechanisms of extract of *Chrysanthemum Indicum* [J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2009(5): 60-63.
- [12] MIGUEL C D, RUDEMILLER N P, ABAIS J M, et al. Inflammation and hypertension: new understandings and potential therapeutic targets [J]. Curr Hypertens Rep, 2015, 17(1): 507. Doi: 10.1007/s11906-014-0507-z.
- [13] SAVOIA C, SCHIFFRIN E L. Inflammation in hypertension [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2006, 15(2): 152-158.
- [14] ZHONG J H, WANG Z L, LIU Y C, et al. Effects of Tripterygium Glycosides tablets on the expression of TLR4 and NF- κ B of colonic mucosa in mice with ulcerative colitis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(1): 23-27.
- [15] GERTHOFFER W T. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration [J]. Circ Res, 2007, 100(5): 607-621.
- [16] KANAJI N, SATO T, NELSON A, et al. Inflammatory cytokines regulate endothelial cell survival and tissue repair functions via NF- κ B signaling [J]. J Inflamm Res, 2011(4): 127-138.
- [17] ZHANG J Z, CHEN L G, HU X Q, et al. Influence of astragalus polysaccharide on the expression of toll-like receptor 4 and nuclear transcription factor- κ B in essential hypertension patients with blood stasis syndrome [J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2011, 52(15): 128-131.
- [18] BARNES P J, KARIN M. Nuclear factor- κ B: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases [J]. New Engl J Med, 1997(336): 1066-1071.
- [19] SU J Y, LI X M. Effects of naringin on cerebral vasospasm and apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(1): 42-45.
- 收稿日期: 2016-09-28
(本文责编: 曹粤锋)

中国灵芝第一股——本刊协办单位“寿仙谷”上交所主板成功上市

2017年5月10日,首个中国品牌日,寿仙谷股份(603896)在上交所鸣锣上市,在两千多家上证主板企业中,作为灵芝和铁皮石斛国际标准制定承担单位的浙江寿仙谷医药股份有限公司(简称寿仙谷),成为灵芝、铁皮石斛行业的第一股。

寿仙谷秉承“重德觅上药, 诚善济世人”的祖训,在传承基础上,精于科研,勇于创新,为弘扬和发展祖国中医药事业,做出了一定的贡献。

李明焱是中药育种领域成绩斐然的科学家、研究员,担任《中国现代应用药学》杂志编委、浙江省珍稀植物药工程技术研究中心主任,曾获得国家科技进步二等奖。“智械机巧,知而不用”是李明焱非常推崇的价值观,投射到做企业,就是不投机取巧,以科技创新提升药效来增强竞争力。在李明焱的带领下,这家拥有浓厚科研基因的高科技企业,筚路蓝缕百折不回,突破一个个科研难关,三十多年间,寿仙谷先后承担了四十多项国家、省部级科研项目,其中十多项成果填补国内外空白并获国家、省市科技进步奖励。

如同水稻新品种对于国家粮食安全战略的重要性,一个优良的中药材品种,带来的,可能就是一次行业的革命。目前,寿仙谷在灵芝、铁皮石斛、西红花等名贵中药材行业的育种和科研领域独占鳌头,成功选育7个有自主知识产权的新品种。其中,灵芝新品种“仙芝1号”,其有效成分比日本红芝、韩国赤芝提高30%以上。“仙芝1号”作为国内首个有自主知识产权的灵芝新品种,被中国科学院微生物研究所菌物标本馆收藏;寿仙谷运用DNA工程技术等高科技育种手段,成功选育的铁皮石斛新品种“仙斛2号”,其有效成分多糖含量高达58.7%,是《中国药典》标准的两倍,被誉为铁皮石斛中的“超级稻”。寿仙谷独创填补国内外空白的灵芝孢子粉去壁技术,先后获得国家及省10多个科技专项的支持,开发出的灵芝孢子粉产品,有效成分含量提升8倍以上。

凭借育种、深加工的核心技术,以及通过中国有机和欧盟有机双认证的规模化中药材基地,寿仙谷在行业内,率先建立育种、栽培、深加工等一整套完善的中药全产业链,为产品的安全高效提供核心保障。寿仙谷不仅被视为中药行业突破药材品质下降困境的样板企业,也被公认为供给侧改革的标杆企业。

挂牌主板,登陆资本市场,寿仙谷迎来里程碑式的跨越!董事长李明焱在致辞中强调,上市后寿仙谷将把大量资金投入到研发和产品创新,聚焦“从本源上提升免疫力”的关键诉求,把产品做到极致,研发更多安全高效的优质产品,更好地为民众的健康美丽长寿服务。同时,也要与时俱进,用好上市公司平台,通过资本的纽带与中药领域的企业合作,构建业绩增长发动机,加快走出长三角,扩大全国渠道覆盖,让全国的消费者享受寿仙谷优质产品带来的健康价值。

李明焱还强调,寿仙谷一直注重社会责任,作为一家上市企业及国际标准制定承担单位,寿仙谷将继续加大国际科研合作和交流,助力祖国中医药走向世界。中医药事业的前景灿烂而辉煌,寿仙谷的追求漫长而坚定。

寿仙谷拥有核心技术、稀缺的规模化有机国药基地、极致的产品力和市场口碑以及老字号底蕴,企业特点与云南白药、东阿阿胶、广誉远等非常相似,抗风险能力强、市场认同度高,厚积薄发,值得期待。中药股随着时间的累积,它们的价值也会愈发凸显,再加上大健康行业的高成长性,多家证券机构研报披露看好寿仙谷未来长期稳健的增长。

本刊也将继续与李明焱编委进行深入的学术交流,共同搭建产学研平台,为民众健康不懈努力。