

藁本内酯上调 miR-181b 减轻氧化低密度脂蛋白 诱导人脐静脉内皮细胞炎症损伤

黄志勇¹, 田广永¹, 曹 玲², 詹坚宏², 赵丹丹², 于云红³, 周凤华^{2*}

(1. 南方医科大学第三附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 广州 510630; 2. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515;
3. 广东省人民医院中医科, 广州 510080)

【摘要】 目的 研究藁本内酯(ligustilide, LIG)减轻氧化低密度脂蛋白(oxidative low density lipoprotein, ox-LDL)诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)损伤作用机制。**方法** 将细胞随机分为5组, 对照组(正常培养细胞不加干预)、模型组(100 $\mu\text{mol/L}$ ox-LDL 干预24 h)、LIG低浓度组、LIG中浓度组、LIG高浓度组。其中, LIG低、中、高浓度组细胞分别以10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 预先孵育2 h, 再用100 $\mu\text{mol/L}$ ox-LDL 干预24 h。CCK8法检测各组细胞活力, ELISA检测细胞培养液中肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、细胞间黏附分子1(ICAM-1)和血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)的含量。qRT-PCR检测细胞内TNF- α 、IL-6、ICAM-1、VCAM-1、NF- κB 及miR-181b的mRNA水平; Western blotting测定细胞NF- κB 的表达量。**结果** 与对照组相比, 模型组细胞存活率明显下降, 凋亡率增高, 细胞上清中TNF- α 、IL-6、ICAM-1及VCAM-1的浓度升高。LIG能显著提高细胞存活率, 抑制细胞凋亡, 并且能降低细胞内炎症因子水平, 尤其是中、高浓度组, 与模型组相比差异有显著性($P < 0.01$)。此外, LIG能明显降低细胞内NF- κB 转录及翻译水平, 上调miR-181b的表达, 与模型组相比差异有显著性($P < 0.01$)。激活或抑制细胞内miR-181b表达, 能有效调节细胞内炎症因子水平。**结论** 藁本内酯明显减轻ox-LDL诱导HUVEC损伤, 其机制可能是通过上调miR-181b抑制NF- κB 表达, 从而减轻ox-LDL诱导的细胞炎症损伤。

【关键词】 藁本内酯; 人脐静脉内皮细胞; 氧化低密度脂蛋白; miR-181b; 炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 07-0018-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.07.004

Ligustilide alleviates inflammatory reactions induced by ox-LDL in HUVECs through upregulation of miR-181b

HUANG Zhiyong¹, TIAN Guangyong¹, CAO Ling², ZHAN Jianhong², ZHAO Dandan², YU Yunhong³, ZHOU Fenghua^{2*}

(1. Department of E. N. T., the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, China. 2. College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515.
3. Department of Traditional Chinese Medicine, Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080)

【Abstract】 Objective To study the molecular mechanism of ligustilide (LIG) in HUVEC injury induced by ox-LDL. **Methods** HUVECs were randomly divided into five groups: control group (untreated cells), model group (cells treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ ox-LDL for 24 h), and LIG groups (cells pre-treated with 10, 20, or 40 $\mu\text{mol/L}$ LIG for 2 h and then exposed to 100 $\mu\text{mol/L}$ ox-LDL for 24 h). Cell viability was measured by CCK8 assays. Levels of inflammatory

【基金项目】 国家自然科学基金项目(编号:81774213, 81403339); 广东省中管局课题(编号:81373810)。

【作者简介】 黄志勇(1979—), 男, 主治医师, 硕士, 研究方向: 睡眠呼吸暂停综合征的机制研究。E-mail: 13016049108@163.com

【通信作者】 周凤华(1986—), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 缺血性心血管疾病的中医药防治研究。E-mail: wendyzhou515@126.com

cytokines TNF- α and IL-6, and ICAM-1 and VCAM-1 were assayed by ELISAs. mRNA levels of TNF- α , IL-6, ICAM-1, VCAM-1, and miR-181b were determined by qRT-PCR and the protein level of NF- κ B by Western blotting. **Results** Compared with the control group, ox-LDL induced apoptosis and inflammatory cytokine secretion in HUVECs ($P < 0.01$). LIG protected cells and reduced apoptosis. Moreover, LIG reduced the secretion of inflammatory cytokines compared with the model group ($P < 0.01$). LIG also upregulated miR-181b expression and downregulated its target gene, NF- κ B. Inhibition of miR-181b mostly reduced the effect of LIG on inflammation in HUVECs. **Conclusions** LIG reduces damage by ox-LDL in HUVECs, partly through inhibiting expression of NF- κ B via miR-181b to reduce the inflammatory reaction induced by ox-LDL.

【Key words】 ligustilide, LIG; human umbilical vein endothelial cells, HUVEC; oxidative low density lipoprotein, ox-LDL; miR-181b; inflammation

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种与内皮损伤、炎症因子介导、脂质沉积浸润有关的慢性炎症反应^[1-2]。虽然 AS 的发病机制复杂,但内皮细胞损伤是其公认的始动环节。氧化低密度脂蛋白(oxidative low density lipoprotein, ox-LDL)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- α)、白介素 6(IL-6)、白介素 8(IL-8)等均可损伤或激活内皮细胞,导致细胞的通透性增加,表面黏附分子如细胞黏附分子 1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)和 E-选择素等表达增加,单核细胞通过内皮黏附分子黏附于损伤内皮表面,迁移为巨噬细胞,从而过度摄取脂质形成泡沫细胞,大量泡沫细胞堆积于血管内壁,最终导致 AS 的发生^[3-5]。

藁本内酯(ligustilide, LIG),又名东当归酊内酯,是川芎和当归中主要的内酯类化合物,也是其主要的活性成分。LIG 在神经保护、抗肿瘤、心脑血管、循环系统及免疫功能等方面均有较强的药理作用。有研究表明 LIG 具有一定的抗 AS 作用^[6],但其作用机制并不明确。本课题采用 ox-LDL 诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)损伤模型,通过研究 LIG 对 HUVEC 内炎症细胞因子表达调控作用,探讨 LIG 保护内皮细胞及抗 AS 的药理机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

第二代人源 HUVEC 细胞(批号 ZQ00446,上海中乔新舟科技公司)。

1.2 主要试剂与仪器

药物:藁本内酯(纯度 $> 98\%$,批号 111737-201608,广州市药检所,化学结构见图 1)用适量二甲亚砜(DMSO)溶解后,再用 PBS 稀释;ox-LDL(批号 YB-002,广州奕源生物公司)。

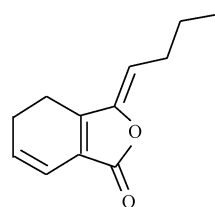


图 1 藁本内酯化学结构

Figure 1 Structure of ligustilide

其他试剂:DMEM/F12 培养基、胎牛血清(批号 03/17、F7676,美国 Gibco 公司);CCK8 试剂盒(批号 CK04,上海东仁科技公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号 40302ES20,南京凯基生物公司);TNF- α 、IL-6、ICAM-1 及 VCAM-1 ELISA 试剂盒(批号 CSB-E04740h、CSB-E04638h、CSB-E04574h、CSB-E04753h,武汉华美生物公司);RNAiso Plus、Prime ScriptTM RT Reagent Kit、SYBR Premix Ex TaqTM(批号 9109、RR037A、RR420A, Takara 公司);兔抗 NF- κ B p65 抗体、兔抗 GAPDH、小鼠抗兔二抗(批号 8242、5174S、14708s,美国 CST 公司);miR-181b mimics、miR-181b inhibitor(批号 5632、5634,上海吉玛制药公司)。引物均由广州天骏公司合成。

仪器:超净台(香港力康生物医疗集团);细胞培养箱、MK3 型酶标定量测定仪、反转录仪及荧光定量 PCR 系统(美国 Thermo 公司);Echo-Plus 型全自动生化仪(意大利爱康公司);流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);TS100-F 型 Eclipse Ti 荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司);Image Station 2000MM 多功能成像系统(美国 Kodak 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞分组

取对数生长期细胞进行实验,将细胞随机分为 5 组:对照组、模型组(100 μ mol/L ox-LDL 干预 24 h)、

LIG 低浓度组、LIG 中浓度组、LIG 高浓度组。其中, LIG 低、中、高浓度组细胞分别以 10、20、40 μmol/L 预先孵育 2 h,再用 100 μmol/L ox-LDL 干预 24 h。分别检测细胞增殖及凋亡情况。

1.3.2 细胞增殖实验

将第 3 代对数增长长期细胞按 1×10^5 /mL 密度接种于 96 孔板上,每组 6 个孔,常规培养 24 h 后更换培养基,分为空白组、阴性对照组、模型组、LIG 低中高浓度组,其中 LIG 每组分别加入 10、20、40 μmol/L LIG 预先孵育 2 h,每孔再加入 5 g/L 的 CCK-8 液 10 μL,置于培养箱孵育 1 ~ 2 h,然后于酶标仪 460 nm 处检测 OD 值。计算公式如下:存活率(%) = $(As - Ab)/(Ac - Ab) \times 100\%$,其中,As、Ab 和 Ac 分别是实验组(含有细胞的培养基和药物)、空白组(不含细胞的培养基)和阴性对照组的吸光度(含有细胞的培养基)。

1.3.3 细胞凋亡检测

细胞分组干预后离心收集,加入 100 μL binding buffer 混匀,再加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 染色液,轻轻混匀,室温避光反应 10 min,再加入 400 μL binding buffer 混匀,立即上流式细胞仪检测(激发波长 488 nm,发射波长 530 nm),计算细胞凋亡指数。

1.3.4 炎性细胞因子检测

采用 ELISA 法,将细胞接种于 10 cm 细胞皿,细胞分组处理同前。培养终止后,吸出培养液,用 PBS 充分洗涤后将其转移到离心管,用 PBS 稀释到 10×10^6 /mL, -20℃ 过夜(两轮反复冻融破坏细胞),4℃、 5×10^4 r/min 离心 5 min,取上清液按说明书进行操作,分别计算细胞中 TNF-α、IL-6、ICAM-1 及 VCAM-1 的浓度。

1.3.5 实时荧光定量 PCR

提取细胞总 RNA,合成 cDNA:总反应体系 20 μL,组成为 14 μL 模板 RNA,2 μL enzyme mix,5 × RT 缓冲液 4 μL,42℃ 反应 60 min,95℃ 反应 5 min,将合成好的 cDNA 保存于 -20℃。荧光定量 PCR:总反应体系 20 μL 由 2 × PCR 反应混合物 10 μL、cDNA 1 μL、目的基因引物 0.5 μL、20 × SYBR 1 μL 与 H₂O 7.5 μL 组成。95℃ 反应 10 min,再转向 95℃ 10 s,60℃ 1 min 共 40 个循环。目的基因与内参 GAPDH 的引物序列见表 1,相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,实验重复 3 次。

表 1 目的基因与内参的引物序列	
Table 1 Primer sequences for target genes and the internal control gene	
基因名 Gene name	引物序列 Primer sequences
TNF-α	F: 5'-TGTGGACCTCTCTGTGATGG-3' R: 5'-AGCTCTTGTGAACGGGATGT-3'
IL-6	F: 5'-GGTCTTGAGAGATGGCTTGC-3' R: 5'-AATTGGCAAAGCCGTAGTTG-3'
NF-κB	F: 5'-CTGGAAGCACGAATGACAGA-3' R: 5'-TTTCAAGTTGGATGCATTGG-3'
miR-181b	F: 5'-GGTCACAATCAACATTTCATTG-3' R: 5'-AACATGTACAGTCCATGGATG-3'
GAPDH	F: 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3' R: 5'-TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT-3'

1.3.6 免疫印迹实验

提取细胞总蛋白,采用 BCA 法进行定量,按照每孔上样 50 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,积层胶和分离胶浓度分别为 5% 和 12%,采用半干转膜法转膜 70 min,将蛋白从胶上转移到 PVDF 膜上,再用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,一抗 4℃ 孵育过夜(1:2000),二抗 37℃ 孵育 1 h(1:5000),ECL 法显色成像,图像采用 Image Tool 3.0 分析光密度值(IOD),实验设立 GAPDH 为内参照,重复 3 次以上。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,计量资料数据用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。若符合正态分布采用 one-way ANOVA 分析,若不符合正态分布则采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 藁本内酯对 HUVEC 细胞增殖及凋亡的影响

与对照组相比,ox-LDL 能显著诱导 HUVEC 细胞损伤,抑制细胞存活率,促进其凋亡。中、高浓度 LIG 预处理 2 h 能减轻 HUVEC 损伤,与模型组相比差异有显著性($P < 0.01$,表 2),说明 LIG 具有减轻 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤作用。

2.2 藁本内酯对 HUVEC 内炎性细胞因子含量的影响

与对照组相比,ox-LDL 能显著增加细胞内 TNF-α、IL-6、ICAM-1 及 VCAM-1 等促炎细胞因子及细胞黏附分子分泌,进一步诱导细胞损伤。LIG 各浓度组可明显抑制这些细胞因子的分泌,与模型组相比差异有显著性($P < 0.01$,表 3),提示 LIG 可能主要通过抑制炎症因子分泌,减轻细胞炎症反应,从而减轻 ox-LDL 诱导的细胞损伤。LIG 具有一定的抗炎作用,这也与文献报道一致^[7]。

2.3 藁本内酯对 HUVEC 内炎症因子及 miR-181b mRNA 水平的影响

为进一步探讨 LIG 对 TNF-α、IL-6 等炎症因子的表达调控,本研究检测了这些细胞因子的转录水平。中、高浓度 LIG 预处理组能显著降低 TNF-α、IL-6、ICAM-1 及 VCAM-1 的转录水平,与模型组相比差异有显著性($P < 0.01$,表 4),说明 LIG 能降低

TNF-α、IL-6 等炎症因子的转录水平,从而抑制 HUVEC 细胞分泌水平。同时,本研究还检测了炎症重要调节因子 NF-κB 的上游调控 miRNA——miR-181b 的 mRNA 水平,发现 LIG 中、高浓度组可以明显降低 NF-κB 的水平 and 增加 miR-181b 的水平,因此推测 LIG 可能会通过调节 NF-κB 表达起到抗炎作用。

表 2 各组细胞存活率及凋亡率
Table 2 Viability and apoptosis rate of HUVEC in each group

分组 Groups	浓度 (μmol/L) Concentration	细胞存活率 (%) Cell viability	细胞凋亡率 (%) Cell apoptosis rate
对照组 Control group	—	100.00 ± 3.22	5.16 ± 0.79
模型组 Model group	100	61.53 ± 8.43 ^{##}	18.26 ± 2.66 ^{##}
LIG 低浓度组 LIG low concentration group	10	74.31 ± 4.82 ^{*##}	13.61 ± 1.54 ^{*##}
LIG 中浓度组 LIG medium concentration group	20	81.60 ± 9.01 ^{**}	9.15 ± 1.22 ^{**}
LIG 高浓度组 LIG high concentration group	40	86.27 ± 8.27 ^{**}	8.03 ± 2.37 ^{**}

注:与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

表 3 各组细胞内炎症因子的含量
Table 3 Levels of inflammatory cytokines in HUVEC of each group

分组 Groups	浓度 (μmol/L) Concentration	TNF-α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	ICAM-1 (pg/mL)	VCAM-1 (pg/mL)
对照组 Control group	—	65.18 ± 17.03	105.23 ± 15.02	42.55 ± 6.93	73.15 ± 7.38
模型组 Model group	100	421.65 ± 38.15 ^{##}	529.42 ± 31.76 ^{##}	215.38 ± 13.03 ^{##}	327.55 ± 19.61 ^{##}
LIG 低浓度组 LIG low concentration group	10	281.32 ± 24.33 ^{*##}	317.02 ± 23.19 ^{**##}	123.35 ± 8.22 ^{**##}	202.47 ± 15.02 ^{**##}
LIG 中浓度组 LIG medium concentration group	20	162.76 ± 31.56 ^{**#}	204.44 ± 29.01 ^{**}	87.92 ± 9.34 ^{**}	133.82 ± 10.36 ^{**}
LIG 高浓度组 LIG high concentration group	40	112.48 ± 19.38 ^{**}	165.32 ± 16.82 ^{**}	72.88 ± 8.53 ^{**}	109.14 ± 5.87 ^{**}

注:与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

表 4 各组细胞内炎症因子及 miR-181b mRNA 相对表达量
Table 4 mRNA levels of inflammatory cytokines and miR-181b in each group

分组 Groups	浓度 (μmol/L) Concentration	TNF-α	IL-6	NF-κB	miR-181b
对照组 Control group	—	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.21
模型组 Model group	100	4.65 ± 0.39 ^{##}	5.78 ± 0.47 ^{##}	3.98 ± 0.56 ^{##}	0.34 ± 0.12 ^{##}
LIG 低浓度组 LIG low concentration group	10	2.32 ± 0.31 ^{***}	3.15 ± 0.23 ^{***}	2.25 ± 0.32 ^{**}	0.62 ± 0.18 [*]
LIG 中浓度组 LIG medium concentration group	20	1.76 ± 0.26 ^{**}	1.87 ± 0.36 ^{**}	1.76 ± 0.29 ^{**}	0.74 ± 0.23 ^{**}
LIG 高浓度组 LIG high concentration group	40	1.48 ± 0.18 ^{**}	1.65 ± 0.25 ^{**}	1.42 ± 0.35 ^{**}	0.82 ± 0.16 ^{**}

注:与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

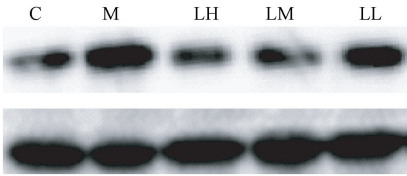
表 5 各组细胞内炎症因子的浓度
Table 5 Concentration of inflammatory cytokines in HUVEC of each group

分组 Groups	浓度 (μmol/L) Concentration	细胞存活率 (%) Cell viability	TNF-α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	NF-κB (pg/mL)
ox-LDL 组 ox-LDL group	100	60.54 ± 5.28	451.22 ± 25.63	549.36 ± 27.82	319.28 ± 24.71
LIG 组 LIG group	20	82.58 ± 9.03 **	173.45 ± 13.42 **	196.52 ± 24.57 **	123.86 ± 18.68 **
miR-181b mimics 组 miR-181b mimics group	0.1	81.21 ± 7.32 **	145.61 ± 15.93 **	178.98 ± 18.33 **	96.03 ± 12.33 **
miR-181b inhibitor 组 miR-181b inhibitor group	0.1	56.33 ± 9.25	482.36 ± 28.56	563.18 ± 35.14	337.42 ± 28.19
LIG + miR-181b inhibitor 组 LIG + miR-181b inhibitor group	20/0.1	72.64 ± 4.19	372.18 ± 19.34	405.42 ± 31.79	235.19 ± 19.32

注:与 ox-LDL 组相比, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the ox-LDL group, ** $P < 0.01$.

2.4 藁本内酯对 HUVEC 内 NF-κB 蛋白表达的调控

本研究采用 Western blotting 法检测了细胞内 NF-κB 的蛋白水平,结果显示,ox-LDL 能显著增加 NF-κB 蛋白表达,而 LIG 则能明显降低其表达,与模型组相比差异有显著性 ($P < 0.01$,图 2)。为进一步探讨 LIG 对 HUVEC 内 NF-κB 调节机制,本研究采用 miR-181b mimics 或 miR-181b inhibitor 分别激活或抑制细胞内 miR-181b 表达,结果发现,miR-181b mimics 可以明显抑制炎症因子 TNF-α、IL-6 及 NF-κB 水平,而 miR-181b inhibitor 结果刚好相反,并且 miR-181b inhibitor 削弱了 LIG 对 HUVEC 细胞炎症因子的调控作用 ($P < 0.01$,表 5),提示 LIG 很可能通过上调 miR-181b 表达,从而下调 NF-κB 表达,抑制细胞内炎症反应。



注:C:对照组;M:模型组;LH:藁本内酯高浓度组;LM:藁本内酯中浓度组;LL:藁本内酯低浓度组。

图 2 各组细胞内 NF-κB 的蛋白含量

Note. C: Control group; M: Model group; LH: High concentration of ligustilide group; LM: Medium concentration of ligustilide group; LL: Low concentration of ligustilide group.

Figure 2 NF-κB protein level in HUVEC of each group

3 讨论

动脉粥样硬化 (AS) 是一种主要累及大中弹力血管的慢性、进行性、炎症性疾病。炎症反应存在于 AS 的各个阶段,从血管内膜的脂质沉积、斑块形

成、进展、再到破裂,血栓形成,核转录因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 是调节炎症最重要的转录因子。因此,抑制 NF-κB 信号可以延缓 AS 斑块的进展^[8-9]。

ox-LDL 既可以诱导血管内皮细胞炎症及氧化损伤,导致其功能降低。同时,ox-LDL 还可以促进单核细胞分化成向巨噬细胞,并与巨噬细胞膜上的特异性受体 Lox-1 结合进入细胞内,越来越多的 ox-LDL 不断被转运至巨噬细胞内后即形成泡沫细胞,大量泡沫细胞堆积到血管内壁即形成 AS 镜下可见的最早病变——脂纹^[10-11]。本实验中,ox-LDL 可促进 HUVEC 细胞分泌 TNF-α、IL-6、ICAM-1 和 VCAM-1 增多,抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡。说明 ox-LDL 可明显诱导 HUVEC 出现炎症样损伤。

冠心病病人血清中 TNF-α 及 IL-6 的水平显著高于正常人群,而在 AS 小鼠的血清中二者水平也明显高于对照组小鼠,可以作为 AS 小鼠炎症的血清标记物。血中 TNF-α 及 IL-6 浓度增高一方面可进一步增强血管及斑块局部的炎症反应,另一方面可不断刺激血管内皮细胞,导致其生理功能受损,血管壁最内层的保护屏障被破坏,从而使得大量炎性细胞迁移、沉积于此。ICAM-1 与 VCAM-1 可介导循环系统中白细胞特别是单核细胞与活化血管内皮细胞黏附并迁移聚集于内膜下,过度摄取脂质形成泡沫细胞,大量的泡沫细胞堆积逐渐形成粥样斑块^[12-13]。

越来越多的研究表明,很多清热解毒及活血化瘀类中药都具有抗 AS 的功效,比如三七、丹参、黄连、虎杖、当归等^[14-16]。藁本内酯即是从中药当归、川芎中提取分离出的活性成分,动物实验表明其具有抗 AS 损伤作用,然而其机制尚不明确。本实验

发现,藁本内酯具有保护 HUVEC 的药理作用。10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ LIG 预处理细胞 2 h,可显著减轻 ox-LDL 诱导的细胞炎症损伤。LIG 不仅能促进 HUVEC 增殖,抑制其凋亡,还能降低细胞内 TNF- α 、IL-6、ICAM-1 与 VCAM-1 等细胞因子的分泌,有效抑制 ox-LDL 诱导的细胞炎症反应。为探讨 LIG 抗炎的具体机制,本研究检测了 HUVEC 细胞内 NF- κB 及其上游 miR-181b 的表达水平。结果显示,ox-LDL 能显著上调炎症调控关键环节 NF- κB mRNA 和蛋白的表达,同时下调 miR-181b 的 mRNA 水平。miR-181b 被证实是 NF- κB 上游的重要调控基因,在多种细胞或组织中均能调节 NF- κB 的表达。为验证 LIG 是否通过 miR-181b 调节 NF- κB 表达,从而降低 HUVEC 细胞炎症反应,本研究分别采用 miR-181b mimics 或 miR-181b inhibitor 上调或下调 miR-181b 水平,再观察细胞增殖及细胞内炎性因子的分泌情况。数据显示,miR-181b mimics 能显著减轻细胞损伤,降低炎性因子 TNF- α 、IL-6、NF- κB 水平;miR-181b inhibitor 则刚好相反。LIG 和 miR-181b inhibitor 共同处理细胞后,削弱了 LIG 的细胞保护作用,同时增加了 TNF- α 、IL-6 与 NF- κB 的浓度,说明 LIG 很可能通过上调 miR-181b 水平从而降低 ox-LDL 诱导 HUVEC 细胞炎症水平,NF- κB 是这一过程的重要中间环节。

由于时间和经费限制,此次本研究未能在动物水平验证 LIG 抗 AS 的药理作用是否与调控 miR-181b/NF- κB 途径有关,这也将是本课题组后期工作的重要内容。

参考文献:

- [1] Pavillard LE, Marín-Aguilar F, Bullon P, et al. Cardiovascular diseases, NLRP3 inflammasome, and western dietary patterns [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 131: 44–50.
- [2] Fava C, Montagnana M. Atherosclerosis is an inflammatory disease which lacks a common anti-inflammatory therapy: How human genetics can help to this issue. A narrative review. [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 55.
- [3] Lappalainen J, Lindstedt KA, Oksjoki R, et al. OxLDL-IgG immune complexes induce expression and secretion of proatherogenic cytokines by cultured human mast cells [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214(2): 357–363.
- [4] Luo N, Liu J, Chung BH, et al. Macrophage adiponectin expression improves insulin sensitivity and protects against inflammation and atherosclerosis [J]. *Diabetes*, 2010, 59(4): 791–799.
- [5] Foss CA, Sanchez-Bautista J, Jain SK. Imaging macrophage-associated inflammation [J]. *Semin Nucl Med*, 2018, 48(3): 242–245.
- [6] 王迎超. 川芎内酯及其主要成分 Z-藁本内酯抗动脉粥样硬化作用机制研究 [D]. 浙江大学, 2013.
- [7] 林乔, 赵爱国, 陈建南, 等. 藁本内酯的镇痛抗炎作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(11): 165–168.
- [8] Song D, Fang G, Mao SZ, et al. Selective inhibition of endothelial NF- κB signaling attenuates chronic intermittent hypoxia induced atherosclerosis in mice [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 270: 68–75.
- [9] Qin M, Luo Y, Lu S, et al. Ginsenoside F1 ameliorates endothelial cell inflammatory injury and prevents atherosclerosis in mice through A20-mediated suppression of NF- κB signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 953.
- [10] Dai Y, Wu X, Dai D, et al. MicroRNA-98 regulates foam cell formation and lipid accumulation through repression of LOX-1 [J]. *Redox Biol*, 2018, 16: 255–262.
- [11] 张良, 韩丹, 赵诗萌, 等. OX-LDL 与单核巨噬细胞相互作用促进动脉粥样硬化形成 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(4): 31–36.
- [12] Xu W, Pan Y, Xu Q, et al. *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 promotes intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells and monocyte-endothelial cell adhesion through macrophage migration inhibitory factor [J]. *BMC Microbiol*, 2018, 18(1): 16.
- [13] Takahashi Y, Watanabe R, Sato Y, et al. Novel phytopeptide osmotin mimics preventive effects of adiponectin on vascular inflammation and atherosclerosis [J]. *Metabolism*, 2018, 83: 128–138.
- [14] Zhu J, Xu Y, Ren G, et al. Tanshinone IIA Sodium sulfonate regulates antioxidant system, inflammation, and endothelial dysfunction in atherosclerosis by downregulation of CLIC1 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 815: 427–436.
- [15] Zhu L, Zhang D, Zhu H, et al. Berberine treatment increases *Akkermansia* in the gut and improves high-fat diet-induced atherosclerosis in *ApoE*^{-/-} mice [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 268: 117–126.
- [16] Jia C, Xiong M, Wang P, et al. Notoginsenoside R1 attenuates atherosclerotic lesions in ApoE deficient mouse model [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99849.

[收稿日期] 2018–04–12