

· 基础研究 ·

山姜素对肺微血管内皮细胞损伤保护机制

王振冉¹ 李 扬² 唐 博³

摘要 目的 研究山姜素对急性人肺微血管内皮细胞(human pulmonary microvascular endothelial cells, HPMECs)损伤的保护机制。**方法** 应用不同浓度的 LPS(0.01、0.1、1.0、10 mg/L)作用于 HPMECs, 确定造模最佳浓度。应用山姜素(40、80、160、320 mg/L)干预 HPMECs 损伤模型, 另选择正常 HPMECs 为对照组, 每组 3 个重复样本, 观察各组 HPMECs 存活率, 检测细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、TNF- α 、水通道蛋白-1(APQ-1)蛋白及 mRNA 表达。**结果** 与对照组比较, 模型组 ICAM-1 及 TNF- α 蛋白表达升高, AQP-1 蛋白及 mRNA 表达降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 80、160 mg/L 山姜素组细胞存活率升高, ICAM-1 及 TNF- α 蛋白表达降低, AQP-1 蛋白及 mRNA 表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 山姜素通过下调 ICAM-1、TNF- α 蛋白表达并上调 APQ-1 蛋白及 mRNA 表达, 从而对急性 HPMECs 损伤起保护作用。

关键词 山姜素; 水通道蛋白; 人肺微血管内皮细胞; 损伤

Protection Mechanism of Alpinetin on Pulmonary Microvascular Endothelial Cells Injury WANG Zhen-ran¹, LI Yang², and TANG Bo³ 1 Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guangxi (541001); 2 Department of Oncology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guangxi (541001); 3 Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guangxi(541001)

ABSTRACT Objective To explore the protection mechanisms about Alpinetin to acute human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMECs) injury. **Methods** Different concentration of LPS (0.01, 0.1, 1.0, 10 mg/L) was applied to the HPMECs to induce acute HPMECs injury. The HPMECs models ($n = 3$) were intervened by Alpinetin(40, 80, 160, 320 mg/L). Normal HPMECs were selected as control group. The viability of HPMECs was observed, mRNA and protein expression of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), TNF- α , APQ-1 were detected. **Results** Compared with control group, the protein expression of ICAM-1, TNF- α were increased, the protein and mRNA expression of APQ-1 and the viability of HPMECs were decreased in model group ($P < 0.05$). Compared with model group, ICAM-1 and TNF- α protein expressions were significantly inhibited in Alpinetin(80, 160 mg/L) group, the mRNA and protein expression of APQ-1 and the viability of HPMECs were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Alpenitin could protect the HPMECs injury by down-regulated protein expression of ICAM-1, TNF- α and up-regulated the mRNA and protein expression of APQ-1.

KEYWORDS Alpinetin; APQ-1; HPMECs; injury

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是指各种致病因素引起的进行性缺氧甚至呼吸衰竭,其实质为肺

部过度的炎症反应所致的急性肺部综合征^[1],而肺血管内皮细胞损伤是 ALI 的主要表现。如果在 ALI 初期没有控制疾病进展,最终将导致急性呼吸窘迫综合征,其病死率达 50%^[2]。目前认为控制肺部炎症因子释放导致的级联反应是治疗 ALI 的根本,临床多应用糖皮质激素治疗 ALI,但糖皮质激素治疗价值仍存在争议,尤其是其免疫抑制带来的重症感染等副作用不可忽视。因此越来越多的研究集中于发现新的不良反应小的抗炎药物,山姜素是一种天然的黄酮类化合物,主

基金项目:广西卫生厅中医药科技专项项目(No.GZPT13-45)

作者单位:1.广西桂林医学院附属医院胃肠外科(广西 541001);

2.广西桂林医学院附属医院肿瘤内科(广西 541001);3.广西桂林医学院附属医院肝胆外科(广西 541001)

通讯作者:唐 博, Tel: 18807730791, E-mail: dytangbo @ 163.com

DOI: 10.7661/j.cjtm.20170204.018

要存在于姜科植物中,如姜黄、豆蔻、郁金等,其作为中药提取物已成为近年来研究热点。研究表明其可以抑制幽门螺杆菌、葡萄球菌以及大肠杆菌,可明显抑制血小板的聚集及各种炎症因子释放从而起到抗炎、抗氧化作用^[3,4]。山姜素具有毒性低安全性较高的特点,预实验发现其对 LPS 诱导的 ALI 有保护作用,本实验旨在对山姜素保护 ALI 作用机制进行进一步观察。

材料与方法

1 细胞 人肺微血管内皮细胞(human pulmonary microvascular endothelial cells, HPMECs)购自 American Type Culture Collection (ATCC)。

2 药物 山姜素(黄色粉末,以二甲基亚砷溶解,纯度为 99%)购自北京华威锐科化工有限公司,HWG08035。青链霉素混合液(其中青霉素 10 000 IU/mL,链霉素 10 000 μg/mL)购自北京索莱宝科技有限公司,批号:20150730。

3 试剂及仪器 ICAM-1、TNF-α、水通道蛋白-1(APQ-1)鼠抗人一抗、兔抗鼠二抗购自美国 Santa Cruz 公司;LPS、MTT 购自美国 Sigma 公司;酶标仪(型号:Rayto RT6000)购自深圳雷杜生命科学股份有限公司;RNAiso Plus 和 RT-PCR 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司。

4 模型制备、细胞分组及培养方法 HPMECs 接种于 25 cm² 培养瓶中,500 mL ECM 培养基中添加青霉素-链霉素 5 000 IU,胎牛血清 50 mL,于 37 ℃、5% CO₂,培养箱中培养。将细胞以 1 × 10⁵ 个/mL 密度接种于 96 孔板中。细胞贴壁生长后,置于 5% CO₂ 培养箱中,细胞分为 4 组每组各设 6 个孔,分别加入不同浓度的 LPS (0.01、0.1、1.0、10 mg/L) 以确定诱导急性 HPMECs 损伤模型的最适浓度。向模型组中分别加入不同浓度的山姜素(40、80、160、320 mg/L),每组各设 6 个孔,继续培养 48 h。将正常生长的未做任何处理的 HPMECs 设为对照组,设 6 个孔。

5 检测指标及方法

5.1 细胞存活率检测 每孔加入 MTT (5 mg/mL) 溶液 20 μL,于 CO₂ 孵育箱中培养 4 h 后弃去培养液,每孔加入 150 μL DMSO,室温振荡 10 min,酶标仪检测各孔 OD 值(A570 nm)。

5.2 Western Blot 检测蛋白表达 BCA 法定量后上样。进行 SDS-PAGE 分离。半干法将蛋白转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉 4 ℃ 封闭过夜。TBST 洗膜,加入一抗 37 ℃ 杂交 1 h,TBST 漂洗。加入二抗,37 ℃ 杂交 1 h,TBST 漂洗后显色 5 min,放射自显影。采用 Quantity One 进行光密度值分析测定,结果以样品光密度值/β-actin 光密度值表示。

5.3 RNA 提取和 RT-PCR 检测 提取各组细胞总 RNA,提取步骤参照 RNAiso Plus 说明书进行。计算浓度后,使用 RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 反应,步骤参照其说明书进行。

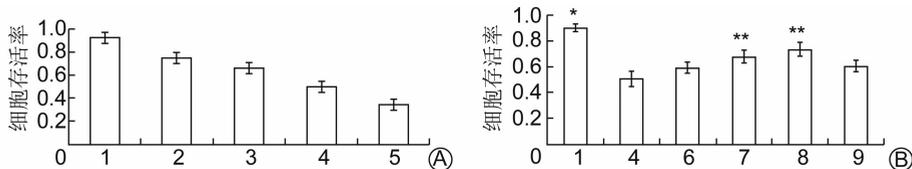
6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 分析软件,均值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对照组与模型组间、不同浓度山姜素与模型组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组细胞存活率比较(图 1) 随着 LPS 浓度的增加,HPMECs 存活率逐渐降低,其中 1.0 mg/L LPS 为最佳造模剂量。与模型组比较,80、160 mg/mL 山姜素组细胞存活率升高(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。

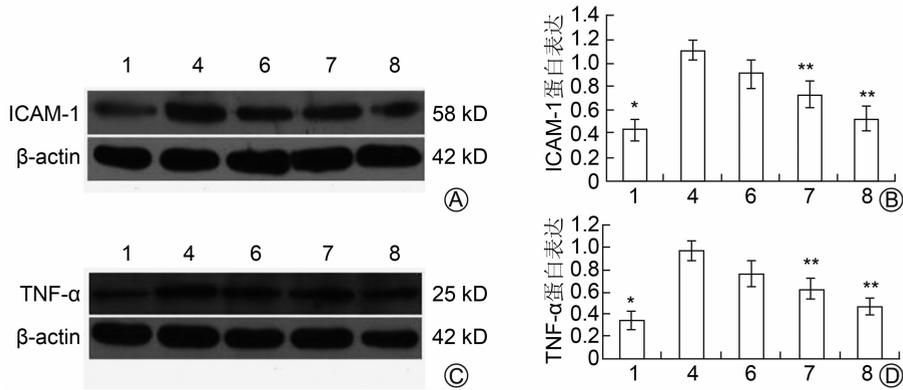
2 各组 ICAM-1 及 TNF-α 蛋白表达比较(图 2) 与对照组比较,模型组 ICAM-1 及 TNF-α 蛋白表达升高(*P* < 0.05)。与模型组比较,80、160 mg/L 山姜素组 ICAM-1 及 TNF-α 蛋白表达降低(*P* < 0.01)。

3 各组 AQP-1 mRNA 及蛋白表达比较(图 3) 与对照组比较,模型组 AQP-1 蛋白及 mRNA 表达降低(*P* < 0.05)。与模型组比较,80、160 mg/L 山姜素组 AQP-1 蛋白及 mRNA 表达升高(*P* < 0.01)。



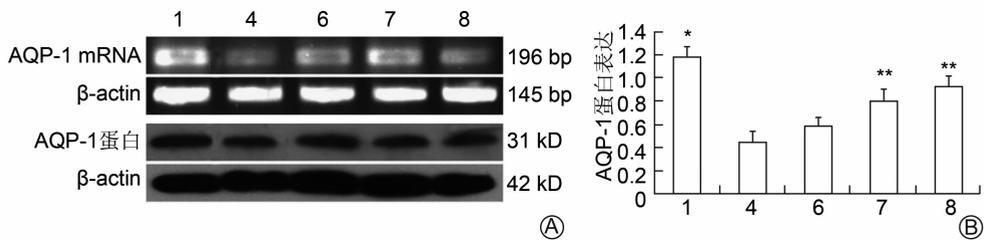
注:A 为不同浓度的 LPS 对 HPMECs 存活率的影响;1 为对照组;2 为 0.01 mg/L LPS 组;3 为 0.1 mg/L LPS 组;4 为 1.0 mg/L LPS 组;5 为 10 mg/L LPS 组;B 为不同浓度山姜素对 HPMECs 的影响;1 为对照组;4 为模型组;6 为 40 mg/L 山姜素组;7 为 80 mg/L 山姜素组;8 为 160 mg/L 山姜素组;9 为 320 mg/L 山姜素组;与模型组比较,* *P* < 0.05,** *P* < 0.01

图 1 各组细胞存活率比较



注:A、B 为 ICAM-1 表达; C、D 为 TNF-α 表达; 1 为对照组; 4 为模型组; 6 为 40 mg/L 山姜素组; 7 为 80 mg/L 山姜素组; 8 为 160 mg/L 山姜素组; 与模型组比较, *P < 0.05, **P < 0.01

图 2 各组 ICAM-1 及 TNF-α 蛋白表达比较



注: A 为 AQP-1 mRNA 及蛋白表达; B 为各组 AQP-1 蛋白表达比较; 1 为对照组; 4 为模型组; 6 为 40 mg/L 山姜素组; 7 为 80 mg/L 山姜素组; 8 为 160 mg/L 山姜素组; 与模型组比较, *P < 0.05, **P < 0.01

图 3 各组 AQP-1 mRNA 及蛋白表达比较

讨 论

ALI 是急性炎症反应, 典型表现为血管内皮损伤。山姜素作为黄酮类中药提取物, 具有抗炎、抗氧化及毒性低等特点^[5]。本研究构建了 ALI 细胞模型, 探讨山姜素对 ALI 的保护作用。ALI 主要病理改变是肺泡毛细血管膜的急性损伤, 研究表明中性粒细胞等炎细胞的浸润是导致这一损伤的关键, 由此引起的炎细胞的释放等进一步反应最终造成肺组织的严重损伤^[6,7]。因此本实验重点研究了山姜素保护 ALI 后细胞因子的表达变化。ICAM-1 是免疫球蛋白家族, 正常情况下在肺组织不表达或低表达^[8], 本实验结果表明, 当 HPMECs 受到 LPS 诱导的损伤后, 1.0 mg/L LPS 组 ICAM-1 表达明显高于对照组及山姜素组, 可能是 ICAM-1 与活化的中性粒细胞表面的整合素结合而造成进一步的炎症级联反应导致^[9,10]。随后本研究对 TNF-α 的表达进行了分析, 发现 TNF-α 在 ALI 模型也呈现高表达, 山姜素可以通过下调其表达从而保护 ALI。Literal A 等^[11]证实了黄酮类化合物下调 TNF 从而保护 ALI, 可见 TNF 是诱导过度炎症反应的关键因子, 其可能通过刺激

IL-8 的表达加重 ALI^[12]。更具体的机制仍有待于进一步研究。本研究检测了 ALI 后 APQ-1 表达, 与孙小聪等^[13]的研究结果相似, 山姜素可以通过上调 APQ-1 的表达对 ALI 起保护作用。研究表明肺泡内液体的清除障碍是 ALI 的主要因素之一, 而 APQ-1 的主要功能是清除支气管周围的水分^[14]。虽然 APQ-1 对于肺损伤的保护作用仍然存在争议^[15], 但研究表明在 ALI 时 APQ-1 表达下降, 通过干预使其表达上调后可以对 ALI 起到保护作用。

综上所述, 山姜素通过降低炎症因子的释放, 增加 APQ-1 的表达对 LPS 诱导的 ALI 起保护作用。山姜素可能对 ALI 炎症信号转导通路起作用, 有可能成为新的治疗 ALI 的高效药物, 其具体的抗炎机制有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] 顾晓凌, 宋勇. 线粒体 DNA 在急性肺损伤发生、发展中的作用[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2012, 5(4): 348-350.
 [2] Beasley MB. The pathologist's approach to acute lung injury[J]. Arch Pathol Lab Med, 2010, 134(5): 719-727.
 [3] He W, Li Y, Xue C, et al. Effect of Chinese medicine

- alpinetin on the structure of human serum albumin [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(5): 1837-1845.
- [4] Singh R, Singh S, Kumar S, et al. Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(7): 1216-1223.
- [5] Wang Z, Lu W, Li Y, et al. Alpinetin promotes Bax translocation, induces apoptosis through the mitochondrial pathway and arrests human gastric cancer cells at the G2/M phase [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(3): 915-920.
- [6] Bastarache JA, Ong T, Matthay MA, et al. Alveolar fluid clearance is faster in women with acute lung injury compared to men [J]. *J Critical Care*, 2011, 26(3): 249-256.
- [7] Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury [J]. *Mol Med*, 2011, 17(3-4): 293-307.
- [8] Zhang JS, Tan YR, Xiang Y, et al. Regulatory peptides modulate adhesion of polymorphonuclear leukocytes to bronchial epithelial cells through regulation of interleukins ICAM-1 and NF-kappaB/IkappaB [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2006, 38(2): 119-128.
- [9] 鲍世韵, 伍天崇, 郭跃华, 等. ICAM-1 高表达在大鼠重症急性胰腺炎早期急性肺损伤中的作用 [J]. *广东医学*, 2010, 31(4): 418-419.
- [10] Hartwig IGW, Werner J, Warshaw AL, et al. Membrane-bound ICAM-1 is upregulated by trypsin and contributes to leukocyte migration in acute pancreatitis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 287(6): 1194-1199.
- [11] Literal A, Su F, Norwicki M, et al. Regulation of pro-inflammatory cytokine expression by curcumin in hyaline membrane disease (HMD) [J]. *Life Sci*, 2001, 70(3): 253-267.
- [12] 朱云喜, 梁继河, 李琦, 等. TNF- α 和 IL-8 在兔创伤性急性肺损伤中的意义 [J]. *免疫学杂志*, 1997, 13(3): 149-151.
- [13] 孙小聪, 佟琳, 张媛莉, 等. 水通道蛋白-1、3 在脓毒症大鼠肺组织表达的研究 [J]. *四川医学*, 2013, 34(6): 740-742.
- [14] Song Y, Yang B, Matthay MA, et al. Role of aquaporin water channels in pleural fluid dynamics [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 279(6): C1744-C1750.
- [15] Lai KN, Leung JC, Metz CN, et al. Role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome [J]. *J Pathol*, 2003, 199(4): 496-508.

(收稿: 2016-02-18 修回: 2016-10-12)

责任编辑: 赵芳芳

欢迎订阅 2017 年《中国中西医结合杂志》

《中国中西医结合杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的中西医结合综合性学术期刊。1981 年创刊,由中国科学院院士陈可冀担任总编辑。设有述评、专家论坛、专题笔谈、临床论著、基础研究、临床报道、综述、学术探讨、思路与方法学、临床试验方法学、病例报告、中医英译、会议纪要等栏目。本刊多次获国家科委、中宣部、新闻出版署及国家中医药管理局颁发的全国优秀期刊奖;2001 年被新闻出版署评为“双效期刊”,列入中国期刊方阵;2003—2015 年连续 13 年被评为“百种中国杰出学术期刊”;3 次获中国科协择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助;4 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助;4 次获“中国科协精品科技期刊工程项目期刊”;2015 年 5 月荣获中国科协精品科技期刊 TOP 50 项目。并被多种国内外知名检索系统收录,如:中国科学引文数据库、中国生物医学文献数据库、美国医学索引 (Medline)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich's PD)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、WHO 西太平洋地区医学索引 (WPRIM) 等;为中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,被编入《中文核心期刊要目总览》,每年影响因子及总被引频次在中医药类期刊中均名列前茅。

《中国中西医结合杂志》为大 16 开本,月刊,128 页;铜版纸印刷,彩色插图。国内定价:25.00 元/期。全年定价:300.00 元。国际标准刊号:ISSN 1003-5370,国内统一刊号:CN 11-2787/R,国内邮发代号:2-52,国外代号:M640。国内外公开发行,在各地邮局均可订阅,也可直接汇款至本社邮购。

地址:北京市海淀区西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社,邮政编码:100091;电话:010-62886827, 62876547, 62876548;传真:010-62874291;E-mail:cjim@cjim.cn;网址: <http://www.cjim.cn>。