

# 白鹤冲剂对肿瘤坏死因子- $\alpha$ 刺激的血管内皮细胞核因子- $\kappa$ B 激活的影响

于健宁<sup>1</sup> 奚九一<sup>2</sup>

**摘要** 目的:研究白鹤冲剂对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)活化、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达的影响,以探讨白鹤冲剂治疗血管炎的机制。方法:以细胞 ELISA 法、间接免疫荧光法分别观察白鹤冲剂对 HUVEC 中 NF- $\kappa$ B 活化以及 ICAM-1 表达的影响。结果:白鹤冲剂能抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )刺激的 HUVEC 的 NF- $\kappa$ B 的活化及 ICAM-1 表达。结论:白鹤冲剂可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 活化从而有效地调控与炎症过程密切相关的黏附分子的基因表达,发挥治疗血管炎的重要作用。

**主题词** 内皮细胞/药物作用 NF- $\kappa$ B/药物作用 @ 白鹤冲剂

**Effect of Baihe Instant Granules on NF- $\kappa$ B of Vascular Endothelial Cells Activated by TNF- $\alpha$**

Yu Jianning<sup>1</sup>, Xi Jiuyi<sup>2</sup>

(1. Zhejiang Provincial Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Hangzhou 310003; 2. Shanghai Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine)

**Objective:** To study on effects of Baihe Instant Granules on NF- $\kappa$ B activation and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression of human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC) to explore the mechanism of Baihe Instant Granules for treatment of vasculitis. **Methods:** Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation and ICAM-1 expression of HUVEC were detected with cellular ELISA and indirect immunofluorescence staining method. **Results:** Baihe Instant Granules could inhibit activation of NF- $\kappa$ B stimulated by tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and ICAM-1 expression in HUVEC. **Conclusion:** Baihe Instant Granules play important therapeutic action on vasculitis possibly by inhibiting NF- $\kappa$ B activation to effectively regulate ICAM-1 expression which is closely related with inflammatory course.

**Key Words** Endothelial cells/drug effect; NF- $\kappa$ B/drug effect; @ Baihe Instant Granules

白鹤冲剂是奚九一教授治疗多种血管炎的基础方,临床观察具有很好的疗效,我们试图从核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)的角度初步揭示其作用机制。NF- $\kappa$ B 作为重要的核转录因子,是一序列特异性的 DNA 结合蛋白,在体内各种组织细胞内广泛存在。它可与多种基因的启动子或增强子特定区域结合,进而广泛参与多种炎症相关基因表达的调控,从而对炎症过程产生重要影响。

## 1 实验材料

人脐静脉内皮细胞株 ECV304,购自中国医学科学院上海细胞生物研究所细胞库;RPMI Medium 1640, GibcoBRL 公司产品;小鼠抗人 NF- $\kappa$ B p65 (Mouse IgG<sub>1</sub>)单克隆抗体, BD 公司产品;兔抗小鼠 IgG-FITC, Sigma 公司产品;Hoechst NO. 33258 (bisBENZIMIDE), Sigma 公司产品;Triton X-100 Amresco 公司产品;肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),

PeproTech 公司产品;小鼠抗人 CD<sub>54</sub> 单克隆抗体 (Mouse IgG<sub>1</sub>), BD 公司产品;绵羊抗小鼠 IgG-HRP, 华美生物工程公司产品;DMSO, Calbiochem 公司产品;白鹤冲剂(白英 30g, 白花蛇舌草 30g, 仙鹤草 30g, 党参 15g, 茯苓 15g)乙醇提取液即挥发酒精成分的上述生药浓缩液,浓度为 1g 生药/ml,调节 pH7.35,由上海市中西医结合脉管病研究所制备;雷公藤内酯醇,由中国医学科学院皮肤病研究所(南京)提供;多功能酶标仪为芬兰 Labsystem 公司产品。

## 2 方法

2.1 药物配制方法:TNF- $\alpha$ :以含 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释成 100ng/ml<sup>[1]</sup>。白鹤冲剂乙醇提取液:用培养液稀释成 50mg/ml 和 100mg/ml 两个浓度备用。雷公藤内酯醇:于实验前用 DMSO 溶解后,以培养液配成 10 $\mu$ mol/L 浓度,0.22 $\mu$ m 微孔滤膜除菌待用<sup>[2]</sup>。

2.2 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的培养:人脐静脉内皮细胞株 ECV304 以含 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养液用常规方法进行培养,实验用 3~5 代。

2.3 间接免疫荧光法观察 HUVEC 中 NF- $\kappa$ B 活化移位

1 浙江省中西医结合医院肾内科,杭州市环城东路 208 号 (310003)

2 上海市中西医结合医院

收稿日期:2004-05-12;修回日期:2004-07-21

2.3.1 HUVEC 的药物处理:将圆形玻璃细胞爬片置于 24 孔板中,总计 15 孔。将  $(0.5 \sim 1.5) \times 10^6$  的浓度接种于 24 孔板中,置于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  培养箱中培养。待接种的 HUVEC 在玻璃细胞爬片上形成单层后分为 5 组,每组 3 复孔。A 组为正常对照组(不含任何药物);B 组为 TNF- $\alpha$  刺激组(不含任何治疗药物);C 组为 TNF- $\alpha$  + 白鹤冲剂大剂量组(100mg/ml);D 组为 TNF- $\alpha$  + 白鹤冲剂小剂量组(50mg/ml);E 组为 TNF- $\alpha$  + 雷公藤内酯醇组。每种药物加样量为每孔 500 $\mu\text{l}$ (各组药物浓度见药物配制),药物作用 12 小时后进行实验观察。

2.3.2 实验方法<sup>[3,4]</sup>:(1)细胞爬片以冷 PBS( $4^\circ\text{C}$ )浸洗 2 次。(2) $-20^\circ\text{C}$  甲醇固定 5 分钟,自然晾干。(3)温 PBS 浸洗 2 次。(4)0.05% Triton X-100 透膜 10 分钟。(5)温 PBS 浸洗 2 次。(6)滴加小鼠抗人 NF- $\kappa\text{B}$  p65 单克隆抗体(1:50), $37^\circ\text{C}$  染色湿盒内孵育 1 小时。(7)PBS 浸洗 2 次。(8)滴加荧光染液(FITC 标记的兔抗小鼠 IgG 抗体 1.0 $\mu\text{l}$ ;0.5mg/ml 的 Hoechst 33258 1.0 $\mu\text{l}$ ;抗体稀释液 98 $\mu\text{l}$ )每片约 30 $\mu\text{l}$ , $37^\circ\text{C}$  染色湿盒内孵育 1 小时。(9)PBS 浸洗 2 次。(10)50%缓冲甘油封片。(11)荧光显微镜观察(FITC 吸收峰值 495nm,发射峰值 525nm;Hoechst 33258 吸收峰值 343nm,发射峰值 480nm)。阳性细胞计数:每个样本随机选取 3 个视野,倒置荧光显微镜下计数 200 个细胞,计算阳性细胞百分率。

## 2.4 HUVEC 表面 ICAM-1(CD54)表达的检测

2.4.1 HUVEC 的药物处理:细胞接种于 96 孔板形成单层后(培养条件同前),实验分组和用药方法同 NF- $\kappa\text{B}$  活化移位实验中对 HUVEC 的处理。每组 3 复孔,每种药物加样量为每孔 100 $\mu\text{l}$ 。药物处理 20 小时后进行实验。

2.4.2 细胞 ELISA 法检测 ICAM-1<sup>[5]</sup>:将药物处理的 HUVEC 以 PBS 浸洗 2 次后进行细胞 ELISA 实验:(1)4%多聚甲醛  $4^\circ\text{C}$  固定细胞 40 分钟,PBST 洗 3 次。(2)2%BSA—PBS 200 $\mu\text{l}$ /孔封闭 40 分钟,PBST 洗 3 次。(3)加入小鼠抗人 CD54 单克隆抗体 50 $\mu\text{l}$ /孔(1:200), $37^\circ\text{C}$  孵育 1 小时后,PBST 洗 3 次。(4)加入 HRP 标记绵羊抗小鼠二抗 100 $\mu\text{l}$ /孔(1:1000), $37^\circ\text{C}$  孵育 1 小时,PBST 洗 3 次。(5)加入邻苯二胺底物液 200 $\mu\text{l}$ /孔,室温避光 15 分钟,加入 2mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50 $\mu\text{l}$ /孔终止反应。(6)酶标仪 492nm 测 A 值。

2.5 统计学方法:所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用计算机统计软件 SPSS10.0 中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析,并用 LSD 程序进行两两比较,用 Regression 程

序进行相关性检验。

## 3 结果

3.1 白鹤冲剂对 HUVEC 中 NF- $\kappa\text{B}$  活化的影响:在倒置荧光显微镜下可见单纯培养基培养的 HUVEC 胞浆内均匀的黄绿色荧光,细胞中央部分无荧光着色,同一视野下 Hoechst 33258 染色(淡蓝色荧光)显示 NF- $\kappa\text{B}$  p65 荧光缺如部分为细胞核。说明未受刺激的 HUVEC 其 NF- $\kappa\text{B}$  p65 分布于细胞浆内,处于抑制状态;经 TNF- $\alpha$  刺激后,细胞核内出现较强的 NF- $\kappa\text{B}$  p65 荧光染色,且胞浆中 p65 荧光染色也明显加深,表明 NF- $\kappa\text{B}$  被激活并进入细胞核内;分别经白鹤冲剂、雷公藤内酯醇处理后,细胞核内 NF- $\kappa\text{B}$  p65 荧光染色显著减少,胞浆中 p65 荧光染色也趋于正常。

表 1 示,白鹤冲剂大、小剂量组和雷公藤内酯醇组 NF- $\kappa\text{B}$  活化细胞数比 TNF- $\alpha$  刺激组明显减少( $P < 0.01$ );白鹤冲剂大剂量组比小剂量组对 NF- $\kappa\text{B}$  活化抑制作用更强( $P < 0.01$ );白鹤冲剂大剂量组与雷公藤内酯醇组比较,差异无显著性( $P > 0.05$ );雷公藤内酯醇组与白鹤冲剂小剂量组比较差异有显著性( $P < 0.01$ )。

表 1 各组血管内皮细胞中 NF- $\kappa\text{B}$  活化细胞数比较( $\%, \bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 每组观察视野数 | NF- $\kappa\text{B}$ 阳性细胞数 |
|-----|---------|----------------------------|
| A 组 | 9       | $7.74 \pm 1.68$            |
| B 组 | 9       | $83.33 \pm 4.24^*$         |
| C 组 | 9       | $22.89 \pm 2.77^{*\Delta}$ |
| D 组 | 9       | $35.72 \pm 4.90^{*\Delta}$ |
| E 组 | 9       | $24.83 \pm 3.42^{*\Delta}$ |

与 A 组比较,  $*P < 0.01$ ;与 B 组比较,  $\Delta P < 0.01$

3.2 白鹤冲剂对 HUVEC 表面 ICAM-1 表达的影响:表 2 示, TNF- $\alpha$  与 HUVEC 共同孵育后, B 组 ICAM-1 表达显著增强,同其他组比较差异有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );白鹤冲剂大剂量组比雷公藤内酯醇组对 ICAM-1 表达的抑制作用更强( $P < 0.01$ ),但雷公藤内酯醇组与白鹤冲剂小剂量组比较差异无显著性( $P > 0.05$ )。

表 2 白鹤冲剂对 HUVEC 表面 ICAM-1 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 每组观察视野数 | ICAM-1 表达                 |
|-----|---------|---------------------------|
| A 组 | 3       | $0.67 \pm 0.08$           |
| B 组 | 3       | $0.82 \pm 0.05$           |
| C 组 | 3       | $0.36 \pm 0.03^{**}$      |
| D 组 | 3       | $0.54 \pm 0.13^*$         |
| E 组 | 3       | $0.67 \pm 0.05^{*\Delta}$ |

与 B 组比较,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ;与 C 组比较,  $\Delta P < 0.01$

3.3 ICAM-1 表达与 NF- $\kappa\text{B}$  活化的关系:HUVEC 表面 ICAM-1 表达随 NF- $\kappa\text{B}$  的活化而增强( $r = 0.999$ ,

$P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

NF- $\kappa$ B 作为重要核转录因子,是一序列特异性的 DNA 结合蛋白,在体内各种组织细胞内广泛存在。它可与多种基因的启动子或增强子特定区域结合,进而广泛参与多种基因表达的调控。

通常所说的 NF- $\kappa$ B 主要指 p50/p65 形成的异源二聚体。静息状态下,NF- $\kappa$ B 二聚体 p65 亚基与其抑制蛋白 I $\kappa$ B 结合,覆盖 p50 蛋白的核定位信号,从而使 NF- $\kappa$ B:I $\kappa$ B 复合体稳定地存在于细胞质中。多种外部信号激活 NF- $\kappa$ B 往往需要先活化 NF- $\kappa$ B 诱导激酶(NIK),活化的 NIK 激活 I $\kappa$ B 激酶(IKK)信号复合体,IKK 信号复合体能使 I $\kappa$ B 家族成员特异的丝氨酸位点磷酸化,磷酸化的 I $\kappa$ Bs 继而被聚泛素化,最终导致 I $\kappa$ Bs 降解,NF- $\kappa$ B 成员脱离 NF- $\kappa$ B:I $\kappa$ B 复合体,由胞浆移位入核,最后与特定目的基因的  $\kappa$ B 位点结合,诱导靶基因转录<sup>[6~8]</sup>。

NF- $\kappa$ B 可被多种刺激因子如细胞因子、免疫刺激剂、脂多糖、紫外线等所激活,NF- $\kappa$ B 活化入核后,与其靶基因中启动子或增强子的  $\kappa$ B 基序结合从而诱导众多与炎症相关的生物活性蛋白基因的表达。黏附分子如 ICAM-1、血管细胞黏附分子(VCAM-1)、选择素 E(E-selectin);细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-2、IL-6、IFN- $\beta$ ;趋化因子如单核细胞趋化因子(MCP-1)、IL-8 等<sup>[9]</sup>,上述因子皆可直接或间接参与炎症反应过程。由于 NF- $\kappa$ B 结合位点位于 ICAM-1 的 5'启动子区域,因此 NF- $\kappa$ B 几乎是各种因素影响血管内皮细胞合成、表达 ICAM-1 的重要通路。已知 ICAM-1 基因启动子上有一个基本的 NF- $\kappa$ B 位点,在 TNF、IL-1 等作用下,能在 30 分钟内使 NF- $\kappa$ B 活化。随后观察到,在上述因素单独或与其他因子协同作用下,使 ICAM-1 在 2~4 小时内表达增加,6~12 小时内达到高峰,而且表达升高与刺激物作用时间及剂量呈正相关。通过不同途径抑制 NF- $\kappa$ B 的活化或清除刺激物,均能相应抑制以上因子的表达或 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[10]</sup>。Wilson 等发现,暴露于生理水平 TNF- $\alpha$  的 HUVEC,其细胞浆和细胞核内 NF- $\kappa$ B 活性与 TNF- $\alpha$  的作用呈剂量、时间依赖关系,并且伴随着 ICAM-1 的表达上调,而这一过程可以被 NF- $\kappa$ B 选择性抑制因子曲霉毒素所抑制<sup>[11]</sup>。我们以间接免疫荧光法观察了 TNF- $\alpha$  刺激 HUVEC 后其 NF- $\kappa$ B 活化的情况及与 ICAM-1 表达的关系,结果显示,经 TNF- $\alpha$  100ng/ml 浓度处理的 HUVEC,其 NF- $\kappa$ B 显著活化,细胞核内和细胞质中都出现被激活的 NF- $\kappa$ B;同时发现

HUVEC 表面 ICAM-1 表达明显增多,与 NF- $\kappa$ B 的活化显著相关。有文献报道,雷公藤内酯醇能显著降低 T 淋巴细胞 NF- $\kappa$ B 活力<sup>[2]</sup>。因此,我们进而用雷公藤内酯醇为对照,观察了白鹤冲剂对 HUVEC 中 NF- $\kappa$ B 活化的影响,发现白鹤冲剂无论高浓度还是低浓度都能明显抑制 NF- $\kappa$ B 的激活,同时观察到 ICAM-1 表达随之下调,与 NF- $\kappa$ B 的激活呈正相关。故我们认为,白鹤冲剂抑制 ICAM-1 表达是通过 NF- $\kappa$ B 途径起作用的。值得注意的是,虽然白鹤冲剂与雷公藤内酯醇对 NF- $\kappa$ B 的影响差异无显著性,但是两组间 ICAM-1 表达却有显著性差异( $P < 0.05$ ),表明白鹤冲剂对 ICAM-1 的影响还存在其他机制。

总之,白鹤冲剂呈剂量依赖性地抑制 TNF- $\alpha$  对 HUVEC 中 NF- $\kappa$ B 的激活,这可能是其对黏附分子产生影响的重要分子基础。通过抑制 NF- $\kappa$ B 活化从而有效地调控与炎症过程密切相关的某些黏附分子的基因表达,进而对白细胞黏附、穿越 VEC 向炎症部位移行产生影响可能是白鹤冲剂治疗血管炎的重要机制。

#### 参考文献

- 1 金惠铭,刘清行,张国平,等. TNF- $\alpha$  对血管内皮细胞的损伤作用及其分子机制. 中国病理生理杂志,1999,15(8):765.
- 2 刘浩,刘志红,章精,等. 雷公藤内酯醇降低 T 淋巴细胞核因子- $\kappa$ B 的活性. 肾脏病与透析肾移植杂志,1998,7(4):312.
- 3 Marok R, Winyard PG, Coumbe A, et al. Activation of the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B in human inflamed synovial tissue. Arthritis Rheum,1996,39(4):583~591.
- 4 梁敏,侯凡凡,张训. 二巯基化合物激活内血管内皮细胞核因子- $\kappa$ B. 中华肾脏病杂志,2000,16(6):352~356.
- 5 Krakauer T. A sensitive ELISA for measuring the adhesion of leukocytic cells to human endothelial cells. J Immunol Methods,1994,177(1~2):207~213.
- 6 Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, et al. Redox regulation of NF- $\kappa$ B activation. Free Radic Biol Med,1997,22(6):1115~1126.
- 7 May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- $\kappa$ B. Immunol Today,1998,19(2):80~88.
- 8 Brand SJ, Morise Z, Tagerud S, et al. Role of the proteasome in rat indomethacin-induced gastropathy. Gastroenterology,1999;116(4):865~873.
- 9 Bayon Y, Alonso A, Hernandez M, et al. Mechanism of cell signaling in immune-mediated inflammation. Cytokines Cell Mol Ther,1998,4(4):275~286.
- 10 Vandermeeren M, Janssens S, Borgers M, et al. Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced E-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 expression in human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun,1997,234(1):19~23.
- 11 Wilson SJ, Leone BA, Anderson D, et al. Immunohistochemical analysis of the activation of NF- $\kappa$ B and expression of associated cytokines and adhesion molecules in human models of allergic inflammation. J Pathol,1999,189(2):265~272.