

槲皮素对 TNF_α 诱导的内皮细胞与中性粒细胞粘附的抑制作用林 勇*, 高存记¹, 黎 健², 汪 钟¹(首都医科大学药理教研室, 北京 100054; ¹ 中国医学科学院, 中国协和医科大学基础医学研究所, 北京 100005;² 卫生部老年医学研究所生化室, 北京 100005)

摘要 目的: 研究槲皮素对 TNF_α 诱导的内皮细胞与中性粒细胞粘附的抑制作用及作用机制。方法: 用髓过氧化物酶法测定中性粒细胞与内皮细胞的粘附, ELISA 法测定内皮细胞粘附分子的表达。结果: TNF_α 通过增加/诱导内皮细胞 ICAM-1, VCAM-1 及 E-selectin 的表达而剂量、时间依赖性地增加内皮细胞与中性粒细胞的粘附。槲皮素可剂量依赖性地抑制上述粘附, 其作用机制为抑制 TNF_α 诱导内皮细胞上述 3 种粘附分子的表达。结论: 槲皮素通过抑制 ICAM-1, VCAM-1 及 E-selectin 的表达而降低 TNF_α 诱导的内皮细胞与中性粒细胞的粘附。

关键词 槲皮素; 内皮细胞; 中性粒细胞

中性粒细胞与内皮细胞的粘附是其向血管外移行的第一步, 是多种与炎症有关的疾病发生、发展的重要原因^[1-3]。中性粒细胞与内皮细胞的粘附是一种复杂的细胞表面分子间的相互作用, 内皮细胞上的 3 种粘附分子: 细胞间粘附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞粘附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 及 E-选择素 (E-selectin) 是介导其与中性粒细胞粘附的最关键的粘附分子^[4]。缺血再灌等炎症反应可引起中性粒细胞及内皮细胞释放细胞因子 (如 TNF_α , IL-1)^[5], 这些因子反过来又刺激内皮细胞, 增加其表面上粘附分子的表达, 导致中性粒细胞的粘附。

槲皮素为黄酮类化合物, 前期实验表明可抑制中性粒细胞与血小板粘附, 但对中性粒细胞与内皮细胞的粘附是否有影响, 以及影响的机理值得探讨。

材 料 与 方 法

材料及试剂 人脐带, 来自北京医院产科新生儿; 人血, 来自北京医院健康自愿者。

槲皮素 (Fluka), 加 NaOH 溶解后, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释至所需浓度, 加 HCl 中和。M199 培养基、胎牛血清、纤维连接蛋白、胶原酶 (II 型)、胰酶和 HEPES (Gibco 产品); 鼠抗人 ICAM-1 单克隆

抗体、鼠抗人 VCAM-1 单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗鼠单克隆抗体 (北京中山生物公司); 鼠抗人 E-selectin 单克隆抗体 (R&D System); 十六烷基三甲基溴化铵 (HTAB) (北京西中化工厂); 邻联茴香胺 (dianisidin) (Fluka), 加 HCl 溶解后, 用 pH 6.0 的 PBS 稀释至所需浓度, 再用 NaOH 调至 pH 6.0。

人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的培养 将 0.1% 胶原酶 (PBS 配制) 约 8 mL 注入约 25 cm 脐静脉中, 于室温下消化 20~30 min, 离心 ($800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 8 min)。加 M199 培养液 (含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内皮细胞生长因子) 5 mL, 种入铺有纤维连接蛋白的培养瓶内, 置 CO_2 孵育箱培养, 传 2 代后进行实验。

中性粒细胞分离 在枸橼酸钠抗凝血中加入 1/10 体积的 6% 右旋糖苷 (dextran T500), 终浓度为 0.6%。在 37°C 水浴中静置 30~40 min, 使红细胞沉淀。将上层白细胞加于 3 mL 淋巴细胞分离液上 (比重 1.077), 离心 ($2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30~40 min), 底层为中性粒细胞。将其取出后加入双蒸水 1 mL 溶血 30 s, 使混杂的红细胞破膜, 再加入 $2 \times \text{PBS}$ 1 mL, 混匀, 使中性粒细胞恢复等渗状态, 离心 ($800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 用 PBS 洗 3 次, 悬浮于 M199 培养液中。

中性粒细胞与内皮细胞粘附的测定^[6] 将内皮细胞接种于 96 孔板, 每孔 3×10^4 细胞, 24 h 后换液一次, 与 TNF_α 孵育一定时间, 加入人外周血中性粒细胞 ($5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) 100 μL , 孵育 30 min, 用 PBS

收稿日期: 1998-10-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39470808)

* Tel: (010) 63051653, E-mail: linyong55@hotmail.com

林勇 男, 36 岁, 讲师

100 μL 洗孔 3 次,以洗去未粘附的中性粒细胞。每孔加 0.5% HTAB(用 pH 6.0 的 PBS 配制) 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 加入含 0.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 的 0.63 mmol 的 dianisidin 200 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 7 min, 450 nm 测吸光度 A 值。槲皮素于 TNF_α 激活前 30 min 加入。

ELISA 法测定内皮细胞表面粘附分子^[7] 接种内皮细胞于 96 孔板,每孔 3×10^4 细胞,24 h 后换液 1 次,与 TNF_α 孵育 6 h 后,加 1% 多聚甲醛 100 μL ,固定 30 min,用 PBS 洗 3 次,加入 1:100 稀释的鼠抗人 ICAM-1(或 VCAM-1, E-selectin)单克隆抗体 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,控干,用含 0.05% Tween 20 的 PBS 洗 3 次,加入 1:500 稀释的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的兔抗鼠单克隆抗体 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。用含 Tween 20 的 PBS 洗 3 次,加入 0.04% 邻苯二胺(pH 5.0) 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min,加终止液 50 μL (浓硫酸 20 mL,水 160 mL),490 nm 测 A 值。空白对照不加鼠抗人 ICAM-1(或 VCAM-1, E-selectin)单克隆抗体。槲皮素于 TNF_α 激活前 30 min 加入。

数据处理 数据用均数 \pm 标准差表示,以 t 检验分析组间均数的差异性。

结 果

1 TNF_α 诱导的内皮细胞与中性粒细胞的粘附

未激活的内皮细胞与中性粒细胞的粘附率很低,460 nm A 值为 0.268 ± 0.11 , TNF_α ($100\sim 1000$ $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$) 剂量依赖性地增加内皮细胞与中性粒细胞的粘附(图 1)。 TNF_α 为 500 $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,粘附的中性粒细胞数约为静息状态的 3 倍。 TNF_α 激活内皮细胞后 2 h,中性粒细胞与其粘附开始增加,6 h 粘附率最高,460 nm A 值为 0.765 ± 0.13 ,粘附率比静息状态的内皮细胞增加了 185.82%。12 h 后略有下降,但直至 24 h 仍显著高于未激活的内皮细胞与中性粒细胞的粘附(图 2)。

2 槲皮素对内皮细胞与中性粒细胞粘附的影响

槲皮素($1\sim 500$ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 剂量依赖性地抑制 TNF_α 诱导的内皮细胞与中性粒细胞的粘附。槲皮素 1, 10, 100 及 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对粘附的抑制率分别为: 8.7%, 25.8%, 36.4% 和 49.5%(图 3)。

3 内皮细胞 ICAM-1, VCAM-1 及 E-selectin 的表达

未激活的内皮细胞表面有少量 ICAM-1 及

VCAM-1 表达,490 nm 的 A 值分别为: 0.266 ± 0.03 和 0.142 ± 0.02 , 无 E-selectin 的表达, A 值为 0.11 ± 0.01 (与空白对照的 A 值相同)。 TNF_α (500 $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$) 可增加/诱导内皮细胞上述 3 种粘附分子的表达(表 1)。

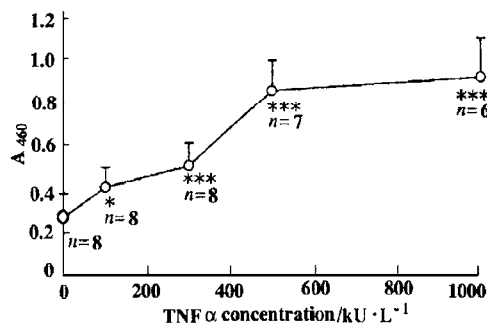


Fig 1 The effect of TNF_α on endothelial-neutrophil adhesion. Human umbilical vein endothelial cells were stimulated with different concentration of TNF_α for 6 h and then incubated with neutrophils. Adhesive neutrophils were measured by testing neutrophil myeloperoxidase activity. $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control.

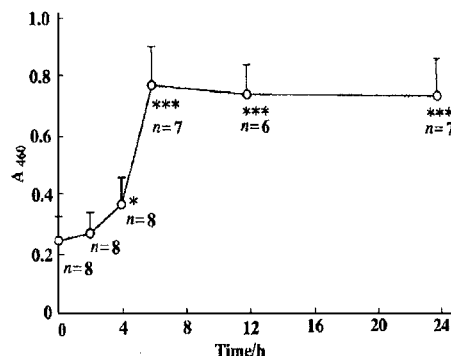


Fig 2 Time course of TNF_α induced endothelial-neutrophil adhesion. Human umbilical vein endothelial cells were stimulated with TNF_α (500 $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$) for different periods of time, then incubated with neutrophils. Adhesive neutrophils were measured by testing neutrophil myeloperoxidase activity. $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control.

4 槲皮素对内皮细胞 ICAM-1, VCAM-1 及 E-selectin 表达的影响

槲皮素 $1\sim 500$ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可剂量依赖性地抑制 TNF_α 诱导的 ICAM-1, VCAM-1 及 E-selectin 的表达,而对 ICAM-1 表达的抑制作用最强。槲皮素在 1, 10, 100 及 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对 ICAM-1 表达的抑制率分别为 $8.32\% \pm 2.17\%$, $17.61\% \pm 4.29\%$, $25.38\% \pm 4.77\%$ 和 $36.35\% \pm 6.43\%$ (图 4)。槲皮素对 TNF_α 诱导的 VCAM-1 的表达的抑制作用略低于其对 ICAM-1 表达的抑制作用。上述

浓度槲皮素的抑制率分别为 4.11% ± 2.31%, 11.64% ± 3.82%, 22.60% ± 5.82% 和 32.37% ± 7.59%。槲皮素对 E-selectin 的抑制作用最低, 其抑

制率分别为: 2.10% ± 1.24%, 4.92% ± 2.16%, 12.34% ± 3.22% 和 29.29% ± 5.23%。

Tab 1 The effect of TNF α on endothelial cell expression of adhesion molecules

Group	ICAM-1	VCAM-1	E-selectin
Control	0.266 ± 0.03 (n = 8)	0.142 ± 0.02 (n = 8)	0.110 ± 0.01 (n = 6)
TNF α stimulated	0.569 ± 0.02 *** (n = 6)	0.483 ± 0.023 *** (n = 8)	0.349 ± 0.03 *** (n = 7)

Human umbilical vein endothelial cells were stimulated with TNF α (500 kU·L $^{-1}$) for 6 h and then adhesive molecules were tested by ELISA. $\bar{x} \pm s$, *** P < 0.001, compared with control.

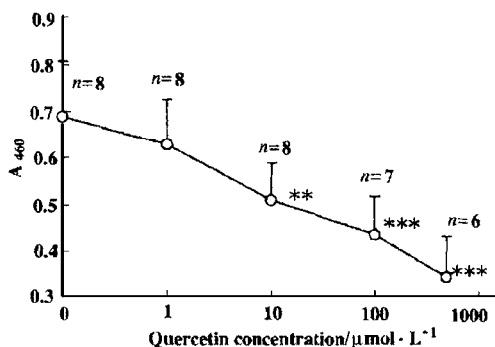


Fig 3 Effect of quercetin on TNF α induced endothelial-neutrophil adhesion. Human umbilical vein endothelial cells were treated with different concentration of quercetin for 30 min, then stimulated with TNF α 500 kU·L $^{-1}$ for 6 h and finally incubated with neutrophils. Adhesive neutrophils were measured by testing neutrophil myeloperoxidase activity. $\bar{x} \pm s$, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs control.

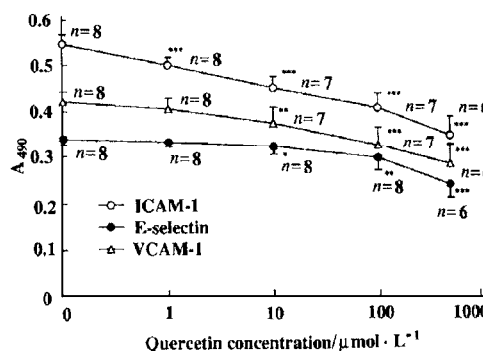


Fig 4 Effect of quercetin on TNF α induced endothelial cell expression of adhesion molecules. Human umbilical vein endothelial cells were treated with different concentrations of quercetin for 30 min, then stimulated with TNF α 500 kU·L $^{-1}$ for 6 h and finally adhesive molecules were tested by ELISA. $\bar{x} \pm s$, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs control.

讨 论

血管内皮在调节白细胞与其粘附并向血管外移过程中既是个主动过程又是个被动过程, 这个调节过程及其复杂^[8]。炎症性细胞因子如 TNF α 和 IL-1 等, 可引起内皮细胞表达与白细胞粘附的最重要的 3 种粘附分子 ICAM-1, VCAM-1 和 E-selectin, 使内皮细胞从相对惰性状态变成炎症反应状态^[9]。中性粒细胞与内皮细胞的粘附在炎症反应中所起的作用已被众多的体内、体外研究所证实。而抑制其粘附是防治各种与炎症有关的疾病包括血栓形成、缺血再灌、动脉粥样硬化、经皮腔内血管成形术后再狭窄的重要环节^[10~12]。抗粘附分子单克隆抗体, 从细胞膜上提取的可溶性粘附分子, 人工合成的与粘附分子结合位点具有高亲和力的肽链以及应用基因敲除技术敲掉粘附分子基因等均可预防急、慢性炎症引起的组织损伤。目前报道的可抑制白细胞与内皮细胞粘附的药物还很少^[13,14]。因此研究这

类药物不论是对基础研究还是对临床应用都具有重要的意义。

髓过氧化物酶为白细胞内含有的一种特殊的过氧化物酶, 具有细胞特异性, 除中性粒细胞外, 单核细胞内也含有髓过氧化物酶, 而内皮细胞内则不含此酶。将未粘附的中性粒细胞洗去后, 髓过氧化物酶量便与粘附在内皮细胞上的中性粒细胞数成正比。经 HTAB 处理后, 中性粒细胞噻苯胺蓝颗粒中的髓过氧化物酶便会释放出来, 此酶在 H₂O₂ 存在下, 催化底物 dianisidin 生成棕色的物质, 最大吸收在 460 nm 处, 在反应温度及反应时间恒定的情况下, 460 nm 吸光度与髓过氧化物酶量成正比。

未激活的内皮细胞与中性粒细胞的粘附率很低, TNF α 剂量、时间依赖性地增加内皮细胞与中性粒细胞的粘附, 内皮细胞与中性粒细胞的粘附由内皮细胞表面 ICAM-1, VCAM-1 及 E-selectin 介导。静息状态的内皮细胞表面有少量 ICAM-1 及

VCAM-1 的表达, 无 E-selectin 的表达, TNF_α 可增加/诱导内皮细胞上述 3 种粘附分子的表达。这些粘附分子表达的增加是内皮细胞与中性粒细胞粘附增加的原因。

槲皮素剂量依赖性地抑制中性粒细胞与 TNF_α 激活的内皮细胞的粘附, 通过 ELISA 法证实, 槲皮素抑制这两种细胞粘附的机理是由于抑制了内皮细胞表面 ICAM-1, VCAM-1 及 E-selectin 的表达。

References

- 1 Rothlein R, Czajkowski M, Kishimoto TK. Intercellular adhesion molecule-1 in the inflammatory response. *Chem Immunol*, 1991, **50**:135
- 2 Wayne SC. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Semin Hematol*, 1993, **30**(Suppl 4):45
- 3 Albelda ST, Wayne SC, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *Fed Am Soc Exp Biol J*, 1994, **8**:504
- 4 Van de Stolpe A, Van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med*, 1996, **74**:13
- 5 Pietersma A, Koster JF, Sluiter W. Effect of hypoxia on adherence of granulocytes to endothelial cells *in vitro*. *Heart Circ Physiol*, 1994, **36**:H874
- 6 Hassall DG, Bath PMW, Gladwin A-M, *et al.* CD11/CD18 cell surface adhesion glycoproteins: Discordance of monocyte function and expression in response to stimulation. *Exp Cell Res*, 1991, **196**:346

- 7 Kacimi R, Karkiner JS, Koudssi F, *et al.* Expression and regulation of adhesion molecules in cardiac cells by cytokines, response to acute hypoxia. *Circ Res*, 1998, **82**:576
- 8 Arnould BT, Michiels C, Remacle J. Hypoxic human umbilical vein endothelial cells induce activation of adherent polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, 1994, **83**:3705
- 9 Klein CL, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. Comparative studies on vascular endothelium *in vitro*. *Pathobiology*, 1995, **63**:1
- 10 Jang Y, Lincoff AM, Plow EF. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 1994, **24**:1591
- 11 Miles DW, Happerfield LC, Bobrow LG. Adhesion molecules expression and leucocyte trafficking following immunotherapy with recombinant interleukin-2. *Histopathology*, 1996, **28**:301
- 12 Foster CA. VCAM-1/ α 4-integrin adhesion pathway: Therapeutic target for allergic inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol*, 1996, **98**:S270
- 13 Gille J, Paxtron LLL, Lawley TJ. Retinoic acid inhibits the regulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 by cultured dermal microvascular endothelial cells. *J Clin Invest*, 1997, **99**:492
- 14 Huang ZH, Bates FJ, Ferrante JV. Inhibition of stimulus-induced endothelial cell intercellular adhesion molecule-1, E-selectin and vascular cellular adhesion molecule-1 expression by arachidonic acid and its hydroxy and hydroperoxy derivatives. *Circ Res*, 1997, **80**:149

QUERCETIN INHIBITS TNF_α INDUCED ENDOTHELIAL-NEUTROPHIL ADHESION

Lin Yong(Lin Y), Gao Cunji(Gao CJ)¹, Li Jian(Li J)² and Wang Zhong(Wang Z)¹

(Department of Pharmacology, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054;

¹Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005; ²Institute of Gerontology, Ministry of Health, Beijing 100005)

ABSTRACT AIM: To study the effect of quercetin on TNF_α induced endothelial-neutrophil adhesion and its mechanism. **METHODS:** Cell adhesion was measured by testing neutrophil myeloperoxidase activity; expression of adhesion molecules was measured by ELISA. **RESULTS:** The adhesion rate of unactivated human umbilical endothelial cells (EC) to neutrophils was very low. TNF_α ($100 \sim 1000 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$) increased the adhesion of EC to neutrophils both dose- and time-dependently. Quercetin ($1 \sim 500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) dose-dependently inhibited the adhesion of TNF_α stimulated EC to neutrophils. The expression of ICAM-1 and VCAM-1 on the surface of resting EC was very low and no E-selectin expression was detectable. TNF_α increased the expression of these adhesion molecules and resulted in upregulation of endothelial-neutrophil adhesion. **CONCLUSION:** Quercetin inhibited TNF_α -stimulated endothelial-neutrophil adhesion by suppressing the expressions of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin.

KEY WORDS quercetin; endothelial cell(EC); neutrophil