文章编号:1000-5404(2012)13-1255-04

论著

白藜芦醇对 TNF-α 诱导的血管内皮细胞炎性反应的影响

陈明亮,易 龙,金 鑫,谢 琦,周 曦,陈春烨,张 婷,王 丽,糜漫天 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院营养与食品安全研究中心,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆市医学营养研究中心)

[摘要] **目的** 观察白藜芦醇对 TNF-α 刺激引起的内皮细胞炎症反应的影响,并围绕 TNFR1 探索相关作用机制。**方法** 不同浓度(0.01、0.1、1、2.5、5、10、20、50、100、200、400 ng/ml)TNF-α 处理人血管内皮细胞株 EA.hy926,24 h 后 MTT 法和 ELISA 法分别检测细胞增殖活力和细胞培养液中 sICAM-1 释放水平;白藜芦醇(浓度为 0.1、1、10 μmol/L)预处理 24 h 后,再用 TNF-α(10 ng/ml)处理 24 h,利用 ELISA 法检测细胞培养液中 sICAM-1 释放水平,qRT-PCR 法检测 ICAM-1 mRNA 和 TNFR1 mRNA 表达水平。**结果** 高浓度 TNF-α(≥100 ng/ml)刺激 EA.hy926 细胞后,细胞增殖活力显著下降($P<0.05$),当 TNF-浓度为 200 ng/ml 时,与对照组比较细胞增殖活力下降约 59.7%;浓度为 10 ng/ml 的 TNF-α 刺激内皮细胞后,细胞的 ICAM-1 及 TNFR1 mRNA 表达明显上调($P<0.05$);白藜芦醇预处理内皮细胞后可明显下调 TNFR1 mRNA 表达水平($P<0.05$),并显著抑制 TNF-α 诱导的 ICAM-1 的表达($P<0.05$),且抑制作用随着浓度的增加而增强。**结论** 白藜芦醇可能通过抑制 TNFR1 表达,进而抑制 TNF-α 刺激引起的炎性因子释放,减轻内皮炎性损伤。

[关键词] 动脉粥样硬化;白藜芦醇;血管内皮细胞;炎性反应;ICAM-1;TNFR1
[中图法分类号] R151.2; R364.5; R543 [文献标志码] A

Effect of resveratrol on TNF-α-induced vascular endothelial inflammation *in vitro*

Chen Mingliang, Yi Long, Jin Xin, Xie Qi, Zhou Xi, Chen Chunye, Zhang Ting, Wang Li, Mi Mantian (Research Center for Nutrition and Food Safety, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing Research Center of Medical Nutrition, College of Preventive Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the inhibitory effects of resveratrol on TNF-α induced inflammatory damage in vascular endothelial cell line EA.hy926. **Methods** After the endothelial EA.hy926 cells were treated with TNF-α of different concentrations (0.01, 0.1, 1, 2.5, 5, 10, 20, 50, 100, 200, and 400 ng/ml) for 24 h, cell viability and sICAM-1 release in the supernatant were measured by MTT and ELISA assay, respectively. Cells were pretreated with resveratrol of different concentrations (0.1, 1, and 10 μmol/L) for 24 h, and then incubated with TNF-α (10 ng/ml) for another 24 h. sICAM-1 level in the the supernatant was determined by sICAM-1 ELISA kit. The mRNA expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and tumor necrosis factor receptor-1 (TNFR1) were measured by qRT-PCR assay. **Results** After treated with TNF-α at high concentration (≥100 ng/ml), cell viability was decreased significantly. Cell viability incubated with 200 ng/ml TNF-α was decreased by about 59.7% compared with control. When treated with a low concentration of TNF-α (10 ng/ml), the mRNA levels of ICAM-1 and TNFR1 were increased markedly ($P<0.05$). However, resveratrol pretreatment significantly ($P<0.01$) inhibited the increase of ICAM-1 and TNFR1 mRNA expression induced by TNF-α in a dose-dependent manner. **Conclusion** Resveratrol might inhibit the TNF-α-induced inflammatory cytokine release and alleviate endothelial inflammation by inhibiting TNFR1-mediated signaling pathway.

[**Key words**] atherosclerosis; resveratrol; EA.hy926; inflammation; intercellular adhesion molecule-1; tumor necrosis factor receptor-1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81172670) and the Project of Chongqing Key Laboratory (2006CA1003).
Corresponding author: Mi Mantian, Tel: 86-23-68752292, E-mail: mimt@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81172670);重庆市重点实验室资助项目(2006CA1003)
[通信作者] 糜漫天,电话:(023)68752292,E-mail: mimt@sina.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)引起的心脑血管疾病已经成为导致人类死亡的主要原因之一。AS是一个多因素、多阶段的病理过程,发病机制复杂,至今尚未完全阐明。氧化损伤-炎性反应学说是目前较公认的解释AS发病机理的重要学说,该学说认为血管内皮细胞氧化应激损伤是AS发生的始发环节,而炎性反应是促进AS病理进程的重要因素[1]。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor alpha, TNF-α)是与AS发生、发展密切相关的重要炎性介质,它通过细胞膜上特异性的肿瘤坏死因子受体-1(tumor necrosis factor receptor-1,TNFR1)诱导内皮细胞炎性损伤、细胞凋亡及内皮功能障碍[2-5]。流行病学调查发现,多种植物性食物中广泛存在的多酚类植物化学物——白藜芦醇(resveratrol, RSV)具有潜在的心血管保护和抗AS效应[6-7]。近年来研究表明,白藜芦醇具有显著的抗氧化活性,能明显清除自由基,增强内皮细胞抗氧化能力,但其对内皮炎性损伤的影响及其相关机制尚未完全阐明[8-10],特别是对TNFR1表达及其调控的炎症信号通路的影响,研究甚少。本研究以人血管内皮细胞株EA.hy926为研究对象,围绕TNFR1的表达及其介导的炎性因子分泌,探讨白藜芦醇对TNF-α刺激引起的内皮炎性反应的影响,并揭示其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 重组人肿瘤坏死因子alpha(TNF-α),反式白藜芦醇(trans-resveratrol),二甲基亚砜(DMSO),四甲基偶氮唑盐[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide,MTT]均购自美国sigma公司。DMEM液体培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司。逆转录酶AMV、Oligo(dT)$_{18}$、dNTP、2×SYBR Master Mix实时荧光定量反应试剂盒购自杭州博日生物科技有限公司。qRT-PCR引物由北京赛百盛生物工程公司合成。sICAM-1 ELISA检测试剂盒购自上海百沃公司。白藜芦醇以DMSO溶解,储备浓度100 mmol/L,分装后于-20 ℃避光保存。

1.1.2 细胞株 人血管内皮细胞株EA.hy926购自美国ATCC,用DMEM培养基加10%的胎牛血清于37℃、5% CO_2、100%饱和湿度培养。

1.2 方法

1.2.1 MTT法检测细胞增殖能力 取对数生长期的EA.hy926细胞,以2.5×10^4/ml接种于96孔板,每孔200 μl。接种24 h细胞贴壁后,以不同浓度(0.01、0.1、1、2.5、5、10、20、50、100、200、400 ng/ml)TNF-α处理,并设正常对照组,每组各设置4个平行。处理24 h后,每孔加入5 mg/ml的MTT 20 μl,继续孵育4 h后,用酶标仪在490 nm处检测各组细胞的吸光度值[D(490)]。以空白组细胞增殖活力为100%,其他各组细胞增殖活力=[处理组D(490)/空白组D(490)]×100%。

1.2.2 ELISA法检测细胞培养液上清液中sICAM-1含量 取对数生长期的EA.hy926细胞,以2.5×10^4/ml接种于96孔板,每孔200 μl。细胞贴壁后,以不同浓度(5、10、50、100 ng/ml)的TNF-α处理,并设正常对照组。以不同浓度(0.1、1、10 μmol/L)的白藜芦醇预处理EA.hy926细胞24 h后,吸弃培养基后分别加入10 ng/ml TNF-α继续孵育24 h,对照组细胞以0.1% DMSO处理。每组分别设3个平行孔。按照sICAM-1 ELISA检测试剂盒说明书检测sICAM-1的含量。

1.2.3 qRT-PCR检测细胞ICAM-1和TNFR1 mRNA表达水平 以不同浓度(0.1、1、10 μmol/L)的白藜芦醇预处理EA.hy926细胞24 h后,吸弃培养基后分别加入10 ng/ml TNF-α继续孵育24 h,对照组细胞以0.1% DMSO处理。用Trizol总RNA提取试剂提取各组细胞总RNA,核酸蛋白分析仪测定D(260)/D(280)及总RNA浓度。各组分别取2 μg总RNA,按照常规方法进行逆转录反应后,cDNA产物置于-20 ℃保存。qPCR反应体系包括:cDNA 4 μl、2×SYBR Master Mix 12.5 μl、引物各1 μl、*Taq*酶0.15 μl、三蒸水6.35 μl。以MYIQ单色实时荧光定量PCR仪进行qPCR反应,每组各2个平行。分别绘制目的基因和内参照基因(GAPDH、β-actin、β-2-microglobulin)的溶解曲线和标准曲线,检测各基因qPCR反应的特异性和扩增效率。以IQ 5.0软件对实验结果进行分析,以各组目的基因表达水平与内参照基因表达水平几何平均的比值为该基因校正表达水平(Normalized Fold Expression)。

表1 各基因引物序列

基因	引物序列	产物大小(bp)
ICAM-1	正义链:5′-CAGAACGGGTGGAACT-3′	
	反义链:5′-GGCAGCGTAGGGTAAG-3′	69
TNFR1	正义链:5′-TGGTTTGCGAGGATGA-3′	
	反义链:5′-GGAGTGCCAAGTTTCTATT-3′	189
β-actin	正义链:5′-ACCAACTGGGACGATATGGAGAAGA-3′	
	反义链:5′-ACGACCAGAGGCATACAGGGACAA-3′	324
GAPDH	正义链:5′-TGCACCACCAACTGCTTAG-3′	
	反义链:5′-GATGCAGGGATGATGTTC-3′	616
β-2-microglobulin	正义链:5′-AGATGAGTATGCCTGCCGTGT-3′	
	反义链:5′-TCAACCCTCCATGATGCTGCTTAC-3′	96

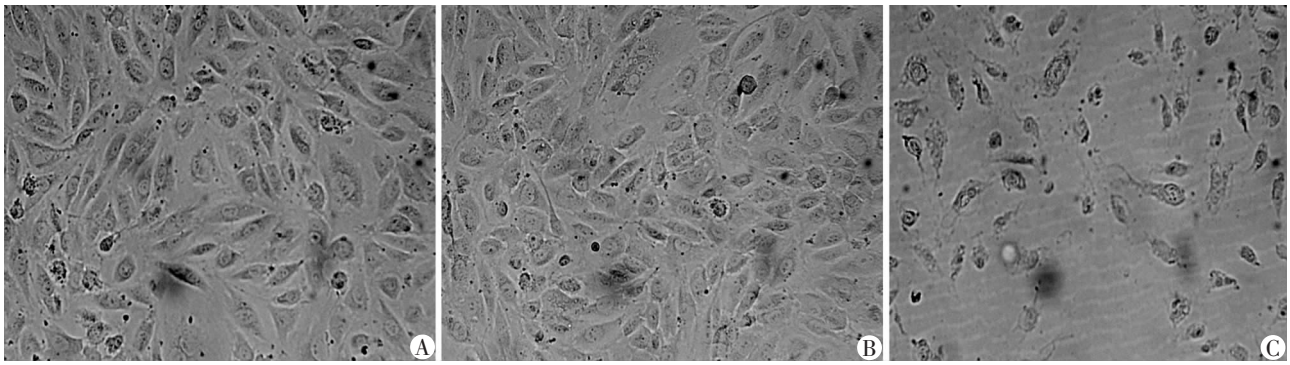
1.3 统计学分析

以$\bar{x}\pm s$表示计量数据,采用SPSS 13.0统计软件对数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 TNF-α对内皮细胞形态的影响

正常EA.hy926细胞呈梭形、椭圆形,排列整齐呈“铺路石”状,胞膜完整且有较强的折光性,细胞贴壁牢固,增殖状态良好。浓度为10 ng/ml TNF-α处理内皮细胞24 h后,细胞未发生明显的形态学改变;当TNF-α浓度为400 ng/ml时,细胞发生明显的形态学改变,细胞皱缩呈不规则形态,细胞膜折光性减弱,胞核固缩,并可见明显的死亡细胞及细胞碎片(图1)。

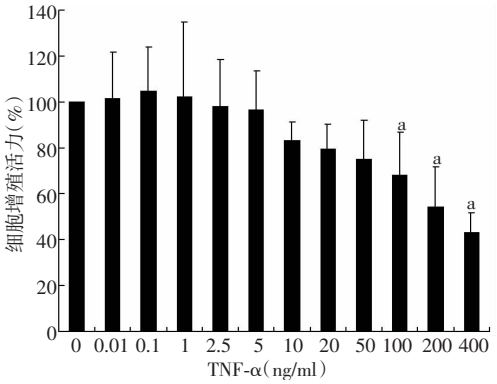


A:对照组;B: 10 ng/ml TNF-α 处理组;C:400 ng/ml TNF-α 处理组

图 1 各组培养 24 h 后 EA. hy926 细胞形态变化 (倒置显微镜 ×100)

2.2 TNF-α 对内皮细胞增殖活力的影响

如图 2 所示,在低浓度(≤50 ng/ml)处理时,TNF-α 对内皮细胞增殖活力的影响不明显($P>0.05$);而在较高处理浓度(≥100 ng/ml)时,与对照组比较,内皮细胞增殖活力显著下降($P<0.05$),TNF-α 浓度为 200 ng/ml 时,与对照组比较细胞增殖活力下降约 59.7%。

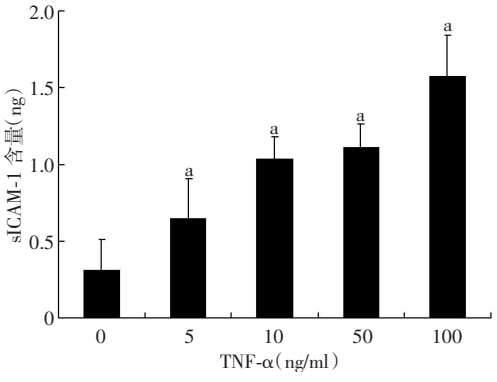


a:$P<0.05$,与 0 ng/ml TNF-α 比较

图 2 TNF-α 对 EA. hy926 细胞活力的影响

2.3 TNF-α 对内皮细胞释放 sICAM-1 的影响

如图 3 所示,与对照组比较,随着 TNF-α 刺激浓度的升高,EA. hy926 细胞中 sICAM-1 表达水平明显增加($P<0.05$)。

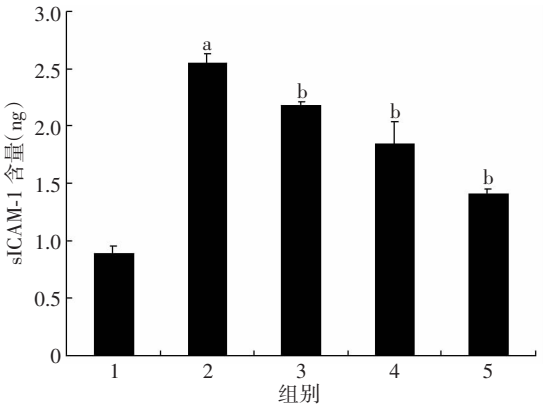


a:$P<0.05$,与 0 ng/ml TNF-α 比较

图 3 ELISA 法检测细胞培养液中 sICAM-1 水平

2.4 白藜芦醇对 TNF-α 刺激引起的内皮细胞 ICAM-1 释放的影响

如图 4 所示,与对照组比较,TNF-α 处理组细胞 sICAM-1 含量显著升高($P<0.05$)。不同浓度的白藜芦醇预处理组与单纯 TNF-α 处理组比较,细胞培养液上清液中 sICAM-1 释放水平明显下降且随处理浓度的增加而降低($P<0.05$)。



1:对照组;2:10 ng/ml TNF-α 组;3~5:0.1、1、10 μmol/L 白藜芦醇 + 10 ng/ml TNF-α 组

a:$P<0.05$,与第 1 组比较; b:$P<0.05$,与第 2 组比较

图 4 白藜芦醇对 TNF-α 诱导的内皮细胞 sICAM-1 释放的影响

2.5 白藜芦醇对 TNF-α 刺激引起的内皮细胞 ICAM-1 mRNA 表达的影响

与对照组(0.439 ± 0.004)比较,TNF-α 处理组(5.032 ± 0.500)ICAM-1 mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$)。不同浓度的白藜芦醇预处理组与单纯 TNF-α 处理组比较,细胞 ICAM-1 mRNA 表达水平明显下降,且随处理浓度增加抑制作用更显著($P<0.05$),0.1、1、10 μmol/L 白藜芦醇预处理后,ICAM-1 表达水平分别下降 49.4%、86.7%、91.7%。

2.6 白藜芦醇对 TNFR1 mRNA 表达的影响

与对照组(1.844 ± 0.300)比较 TNF-α 处理组(9.829 ± 0.700),TNFR1 mRNA 表达的水平显著升高($P<0.01$)。白藜芦醇预处理组细胞中 TNFR1 mRNA 表达水平明显下降,且随着处理浓度的增加,TNFR1 表达水平越低($P<0.05$)。相关性统计研究发现,VCAM-1 与 TNFR1 表达水平的变化呈显著的正相关性($P<0.01$),0.1、1、10 μmol/L 白藜芦醇预处理后,TNFR1 表达水平分别下降 80.9%、91.9%、93.1%。

3 讨论

Ross[1] 提出的氧化损伤-炎性反应学说认为氧化

应激损伤和炎性反应是诱发和促进AS病程进展的主要因素。TNF-α是体内存在的与AS发生、发展密切相关的重要炎症因子,能靶向诱导内皮细胞损伤和炎症反应,促进AS进程[2]。自1992年"法国悖论(French paradox)"现象报道以来,白藜芦醇的潜在心血管保护效应及抗AS作用备受关注[6]。近年来研究表明,白藜芦醇对血管内皮细胞氧化损伤有明显的抑制作用,这与它能减少自由基形成和增强细胞的抗氧化能力有关[8-10],但其对内皮细胞炎性反应尤其是对TNF-α诱导的内皮细胞炎性反应的影响,国内外研究较少,机制也未阐明。

本实验利用TNF-α作为炎症因子刺激EA. hy926细胞,模拟了AS发生时的炎症反应对内皮细胞的损伤。结果发现,内皮细胞对TNF-α刺激引起的细胞凋亡有耐受作用,只有在较高浓度TNF-α(≥100 ng/ml)刺激时,其增殖活力才显著下降,可能的原因在于TNF-α能同时影响鞘氨醇激酶(sphingosine kinase, SphK)介导的抗凋亡及鞘磷脂酶(sphingomyelinase)介导的促凋亡信号通路,而这两条相互拮抗的信号通路之间的平衡决定了细胞的去向[11]。然而较低浓度的TNF-α(10 ng/ml)刺激内皮细胞后,就能引起大量炎症因子(ICAM-1)的表达和释放,表明TNF-α对内皮细胞炎性反应的诱导作用是其对内皮细胞生物学活性影响的主要方面。而白藜芦醇预处理后,能显著抑制这一作用。

研究表明,TNF-a介导的血管内皮细胞炎症反应,主要是TNFR1介导的[3-5]。而TNFR1的表达水平与AS的发生及严重程度紧密相关[12],同时还发现小鼠缺失TNFR1后,能减轻内皮细胞炎性反应,延缓AS的进程[13]。TNF-α与TNFR1结合后,主要通过激活细胞质中的IκB蛋白家族磷酸化,使NF-κB活化,从而促进相关炎性因子释放,诱发血管壁炎症反应[2-3]。其中ICAM-1是内皮细胞释放的最主要的炎症因子之一,正常情况下内皮细胞表达量很低[14]。在AS诱发因素如TNF-α、氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, oxLDL)等作用下,血管内皮细胞能大量产生ICAM-1,引起血液中的白细胞与内皮细胞黏附并进一步介导向血管壁的迁移,促进AS的发生、发展[15]。本研究发现,TNF-α刺激内皮细胞后,其主要受体TNFR1的表达显著上调。白藜芦醇预处理后可显著下调TNFR1的表达水平,同时经相关性统计分析,白藜芦醇对ICAM-1与TNFR1表达水平的影响具有显著的正相关性,实验结果进一步揭示,白藜芦醇可能通过下调TNFR1的表达,从而抑制TNF-α刺激引起的内皮细胞炎症因子的表达,发挥抗炎作用。

本研究发现,白藜芦醇可能通过下调TNF-α在体内的关键受体TNFR1的表达,从而抑制其介导的内皮细胞炎症反应,发挥抗AS的效应。该结果对于进一步揭示白藜芦醇在血管内皮细胞的抗炎作用及机制具有重要意义,对于探索AS防治的新策略具有潜在应用价值。

参考文献:

[1] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.

[2] Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNFalpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure[J]. Pharmacol Ther, 2010, 127(3): 295-314.

[3] McFarlane SM, Pashmi G, Connell MC, *et al*. Differential activation of nuclear factor-kappaB by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly[J]. FEBS Lett, 2002, 515(1/3): 119-126.

[4] Popa C, Netea M G, van-Riel P L, *et al*. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk[J]. J Lipid Res, 2007, 48(4): 751-762.

[5] Madge L A, Pober J S. TNF signaling in vascular endothelial cells[J]. Exp Mol Pathol, 2001, 70(3): 317-325.

[6] Renaud S, de-Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease[J]. Lancet, 1992, 339(8808): 1523-1526.

[7] Dolinsky V W, Dyck J R. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812(11): 1477-1489.

[8] Tang Y, Xu J, Qu W, *et al*. Resveratrol reduces vascular cell senescence through attenuation of oxidative stress by SIRT1/NADPH oxidase-dependent mechanisms[J]. J Nutr Biochem, 2012, 66(12): 251-256.

[9] Rajapakse A G, Yepuri G, Carvas J M, *et al*. Hyperactive S6K1 mediates oxidative stress and endothelial dysfunction in aging: inhibition by resveratrol[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19237.

[10] Frombaum M, Le-Clanche S, Bonnefont-Rousselot D, *et al*. Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases[J]. Biochimie, 2012, 94(2): 269-276.

[11] Xia P, Wang L, Gamble J R, *et al*. Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells[J]. J Biol Chem, 1999, 274(48): 34499-34505.

[12] Blann A D, McCollum C N. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in atherosclerosis: no clear relationship with levels of tumor necrosis factor[J]. Inflammation, 1998, 22(5): 483-491.

[13] Xanthoulea S, Thelen M, Pottgens C, *et al*. Absence of p55 TNF receptor reduces atherosclerosis, but has no major effect on angiotensin II induced aneurysms in LDL receptor deficient mice[J]. PLoS One, 2009, 4(7): e6113.

[14] 朱彦琪, 孙宝贵. 可溶性细胞间粘附分子和可溶性血管细胞粘附分子与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(5): 618-620.

[15] Yang L, Froio R M, Sciuto T E, *et al*. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow[J]. Blood, 2005, 106(2): 584-592.

(**收稿**:2011-12-05;**修回**:2012-01-16)

(编辑 吴培红)