

neuroprotective in global brain ischemia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(26):15769-15774.

[6] ZHANG W, NARAYANAN M, FRIEDLANDER R M. Additive neuroprotective effects of minocycline with creatine in a mouse model of ALS [J]. *Ann Neurol*, 2003, 53(2):267-270.

[7] WU D C, JACKSON-LEWIS V, VILA M, *et al.* Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(5):1763-

1771.

[8] FERRER I, FRIGULS B, DALFO E, *et al.* Caspase-dependent and caspase-independent signaling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat [J]. *Neuropathol App Neurobiol*, 2003, 29(5):472-475.

[9] LEE J M, ZIPFEL G J, CHOI D W. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms [J]. *Nature*, 1999, 399(6738 Suppl):A7-14.

白藜芦醇对纤维蛋白上调大鼠 脑血管内皮细胞白细胞介素-6 表达的影响

薛 峥,程明珍,胡晓晴,张苏明

(华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科,武汉 430030)

[摘要] 目的 观察白藜芦醇(resveratrol, Res)对体外大鼠脑血管内皮细胞与纤维蛋白共培养高表达白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)转录及蛋白水平的影响。方法 大鼠脑血管内皮细胞分离后培养,加入 $1.0\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 纤维蛋白和不同浓度白藜芦醇,通过RT-PCR检测脑血管内皮细胞中IL-6转录水平,应用酶联免疫方法(ELISA)定量检测培养基中的IL-6水平。结果 加入不同浓度(0, 1, 5, 10, 25和 $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的白藜芦醇24 h后,25和 $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 白藜芦醇组培养基中IL-6水平显著降低(均 $P < 0.01$);RT-PCR结果显示,25和 $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 白藜芦醇组大鼠脑血管内皮细胞中IL-6 mRNA显著下调(均 $P < 0.01$)。结论 白藜芦醇可降低纤维蛋白导致的大鼠脑血管内皮细胞中IL-6的表达。

[关键词] 白藜芦醇;纤维蛋白;脑血管内皮细胞;白细胞介素-6

[中图分类号] R743.31;R286

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2009)02-0178-04

The Effect of Resveratrol on Expression of Interleukin-6 Induced by Fibrin in Rat Brain Vascular Endothelial Cells

XUE Zheng, CHENG Ming-zhen, HU Xiao-qing, ZHANG Su-ming (Department of Neurology, Tongji Hospital Affiliated with the Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of Resveratrol on expression of interleukin-6 (IL-6) induced by fibrin in rat brain vascular endothelial cells. **Methods** The concentration of IL-6 was measured by Elisa kit and the mRNA of IL-6 was measured by RT-PCR after cultured with $1.0\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ fibrin polymerization on rat brain vascular endothelial cells in the presence or absence of different concentration of resveratrol ($0-50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). **Results** After 24 h of incubation, 25 and $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of resveratrol could significantly reduce IL-6 protein expression ($P < 0.01$) and IL-6 mRNA level ($P < 0.01$) induced by fibrin compared to the control group. **Conclusion** Resveratrol is potent inflammatory cytokine inhibitor which could reduce IL-6 expression in the co-culture of rat brain vascular endothelial cells with fibrin.

KEY WORDS Resveratrol; Fibrin; Rat brain vascular endothelial cells; Interleukin-6

白藜芦醇(resveratrol)化学名称为3, 5, 4-三羟基苯二烯,在植物中分布很广,主要存在于葡萄、藜芦、虎

杖等植物中,为多酚类化合物。具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等生物学活性,文献证实白藜芦醇在心血管系统和抗肿瘤方面具有重要作用^[1-3]。近期研究提示,白藜芦醇在脑缺血后发挥脑神经细胞保护作用^[4,5]。但在神经系统炎性病变方面的研究甚少。中枢神经系统感染时,血管通透性增加,纤维蛋白原沉积于血管内皮细胞,活化内皮细胞,启动下游的炎性反应过程^[6,7]。笔者前期的体外研究证实,纤维蛋白与大鼠脑血管内皮细胞共培养,上调内皮细胞表达炎性因子白细胞介

[收稿日期] 2008-03-12

[作者简介] 薛 峥(1973-),女,河南新乡人,主治医师,硕士,主要从事神经系统感染性疾病和脑血管疾病研究。电话:(0)13545221273, E-mail: xuezheng@tjh. tjmu. edu. cn。

[通讯作者] 胡晓晴(1958-),女,湖北武汉人,副主任医师,副教授,主要从事脑血管疾病和神经肌肉疾病研究。电话:027-83663224, E-mail: xqhu@tjh. tjmu. edu. cn。

素-6(interleukin-6, IL-6)。白藜芦醇是否可以下调高表达的神经炎性因子 IL-6 起到神经保护作用,笔者未见相关报道。笔者在本试验通过体外 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 纤维蛋白与鼠脑血管内皮细胞共培养,上调表达 IL-6,同时加入不同浓度(0, 1, 5, 10, 25 和 $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)白藜芦醇,共培养 24 h 后,检测鼠脑血管内皮细胞中 IL-6 的基因以及蛋白水平,探讨白藜芦醇对鼠脑血管内皮细胞中高表达 IL-6 的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料 Wistar 大鼠(同济医学院实验动物中心提供)。倒置相差显微镜(Olympus 公司),超净工作台(苏州净化仪器厂),胎牛血清(Gibco 公司),内皮细胞生长添加剂(ECGS),纤维蛋白原(Sigma 公司)和凝血酶(Sigma 公司),白藜芦醇(Sigma 公司),大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(R&D 公司),Trizol(Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠脑血管内皮细胞的分离与培养^[8] 取 < 7 d 的 Wistar 胎鼠,无菌条件下取出大鼠脑组织。收集大脑皮质,剪成 $1 \sim 1.5 \text{ mm}^3$ 小块。移入玻璃匀浆器中匀浆,将匀浆液移入 15% 葡聚糖溶液中, $10\ 000 \text{ g}$ 高速离心 13 min,弃去上清液,收集沉淀中的血管。在获得的血管层内加入 4 mL 培养液后,加入 II 型胶原酶 1 mL ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴消化。在倒置显微镜下观察,看到血管段呈现“串珠”样时,终止消化, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃去上清液。在倒置显微镜下调整微血管密度为 $8 \times 10^3 \cdot (\text{cm}^2)^{-1}$, 植入 1% 明胶包被的培养瓶中,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% 二氧化碳培养箱中孵育。每 3 d 换培养液 1 次,一般 7 ~ 10 d 形成单细胞层。然后去培养液,加入 0.125% 胰酶和 0.02% EDTA 室温下消化 5 min。离心、弃去上清液后加入 5 mL 培养液,将细胞悬液接种于 24 孔和 96 孔板内,细胞密度为 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% 二氧化碳培养箱中孵育。细胞传至第 3 ~ 6 代,100% 融合时用于实验。

1.2.2 大鼠脑血管内皮细胞与纤维蛋白、白藜芦醇共培养 大鼠脑血管内皮细胞融合后(约 1×10^6 VEC/T25 Flask)在含 10% 的胎牛血清培养基中静置过夜。次日吸去培养基,再加入 10% 不含肝素钠的血清,纤维蛋白原和凝血酶加入培养皿中,使纤维蛋白的终浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,凝血酶浓度为 $0.08 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将培养皿置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中 15 min,纤维蛋白原可以聚合成纤维蛋白。同时加入不同浓度白藜芦醇:0, 1, 5, 10, 25 和 $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。24 h 后,分别收获对照组和不同浓度白藜芦醇处理的大鼠脑血管内皮细胞培养基和细胞裂解液。

1.2.3 酶联免疫方法测定 IL-6 使用美国 R&D 公司

的大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒,按照说明书操作。步骤如下:①在每个反应孔中加入 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 经标本稀释液稀释后的标本或标准品,加膜覆盖,室温静置 2 h。②冲洗 2 遍后加入 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 检测抗体到每个反应孔,加膜覆盖,室温静置 2 h。③冲洗 2 遍后加入 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 辣根过氧化物酶工作液到每个反应孔,避光室温静置 20 min。④冲洗 2 遍后加入 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 显影工作液到每个反应孔,避光室温静置 20 min。⑤加入 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 停止反应液到每个反应孔,轻轻敲击反应板混合标本。⑥读取吸光度值,绘制标准工作曲线,计算 IL-6 浓度。

1.2.4 半定量 RT-PCR 检测 IL-6 mRNA 收集与 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 纤维蛋白和不同浓度白藜芦醇共培养的脑血管内皮细胞,利用 Trizol 提取总 RNA。采用紫外吸收法进行 RNA 定量,各组样品的 RNA $A_{260 \text{ nm}}$ 比 $A_{280 \text{ nm}}$ 吸光度值均在 1.9 ~ 2.0。将 $2 \text{ } \mu\text{g}$ 总 RNA 反转录成相应的 cDNA。

表 1 大鼠 IL-6 和内参照 β -actin 的 RT-PCR 反应引物

引物名称	序列	片段长度/bp
IL-6	FW CCGGAGAGGAGACTTCACAG	473
	RW TGGTCCTTAGCCACTCCTTC	
β -actin	FW ATGCTGGGTATGGGTCAGAA	598
	RW GCAGCTCATAGCTCTTCTCCA	

PCR 条件为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 4 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 1 min, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 扩增 35 个循环;最后一次延伸 $72 \text{ }^\circ\text{C}$, 7 min。取 $5 \text{ } \mu\text{L}$ PCR 产物在含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳。用图像扫描分析系统对各组 PCR 产物与对照作吸光度数值之比,比较各组表达水平的差异。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 软件进行统计学分析,实验数据用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间差异比较用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 不同浓度白藜芦醇下调纤维蛋白诱导的大鼠脑血管内皮细胞 IL-6 蛋白水平的表达 通过 ELISA 试剂盒检测大鼠脑血管内皮细胞和纤维蛋白以及白藜芦醇共培养的培养基中 IL-6 水平,大鼠脑血管内皮细胞与纤维蛋白($1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)共培养 24 h 后培养基中 IL-6 的浓度,和单独无血清培养基组相比显著增加 ($P < 0.01$),见图 1。纤维蛋白 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 白藜芦醇 $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组和纤维蛋白 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 白藜芦醇 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组培养基中 IL-6 的浓度,与纤维蛋白 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组相比显著降低 ($P < 0.01$),见图 1。纤维蛋白 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 白藜芦醇 $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组和纤维蛋白 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 白藜芦醇 $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组培养基中

IL-6 的浓度,与纤维蛋白 1.0 mg · mL⁻¹组相比显著降低($P < 0.05$),见图 1。同时笔者注意到纤维蛋白 1.0 mg · mL⁻¹ + 白藜芦醇 25 μmol · L⁻¹组和纤维蛋白 1.0 mg · mL⁻¹ + 白藜芦醇 50 μmol · L⁻¹组培养基中 IL-6 的浓度,与单独无血清培养基组比较差异无显著性。

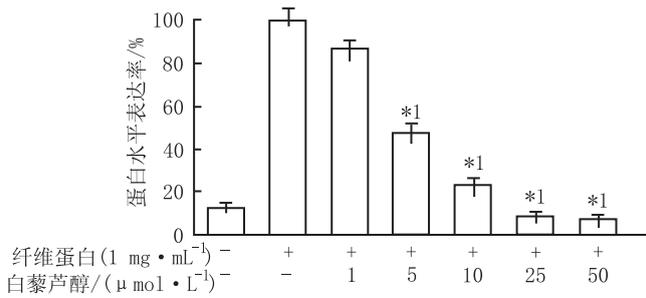


图 1 7 组大鼠脑血管内皮细胞 IL-6 蛋白水平表达情况与空白对照组比较, * $1P < 0.01$

2.2 不同浓度白藜芦醇下调纤维蛋白诱导的大鼠脑血管内皮细胞 IL-6 基因水平的表达 为了研究白藜芦醇下调纤维蛋白诱导的大鼠脑血管内皮细胞 IL-6 表达是否源于转录水平的调控,笔者测定了大鼠脑血管内皮细胞与纤维蛋白及不同浓度白藜芦醇共培养 24 h 血管内皮细胞中 IL-6 的 mRNA 水平。笔者发现大鼠脑血管内皮细胞与纤维蛋白(1.0 mg · mL⁻¹)共培养 24 h 后培养基中 IL-6 的 mRNA 水平,和单独无血清培养基组相比显著增加,见图 1。纤维蛋白 1.0 mg · mL⁻¹ + 白藜芦醇 5 μmol · L⁻¹组和纤维蛋白 1.0 mg · mL⁻¹ + 白藜芦醇 10 μmol · L⁻¹组培养基中 IL-6 的 mRNA 水平,与纤维蛋白 1.0 mg · mL⁻¹组相比显著降低($P < 0.05$),见图 2。纤维蛋白 1.0 mg · mL⁻¹ + 白藜芦醇 25 μmol · L⁻¹组和纤维蛋白 1.0 mg · mL⁻¹ + 白藜芦醇 50 μmol · L⁻¹组培养基中 IL-6 的 mRNA 水平,与纤维蛋白 1.0 mg · mL⁻¹组相比显著降低($P < 0.01$),见图 2。

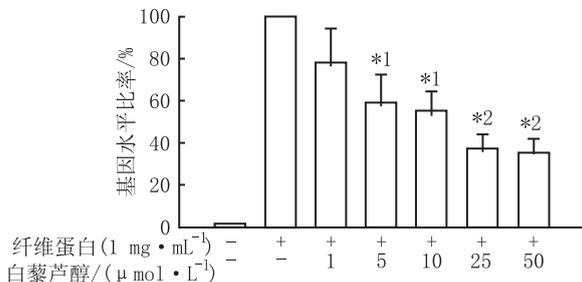


图 2 7 组大鼠脑血管内皮细胞 IL-6 基因水平测定结果与空白对照组比较, * $1P < 0.05$, ** $2P < 0.01$

3 讨论

在中枢神经系统炎症过程,血脑屏障破坏,血管通透性增加,纤维蛋白沉积于血管内皮细胞。笔者前期的研究证实纤维蛋白与大鼠脑血管内皮细胞共培养时,可

以刺激大鼠脑血管内皮细胞中 IL-6 的合成和释放,可能加重炎症反应过程。寻找抗炎效果好而毒性低的药物是中枢神经系统感染研究的一项重要任务。白藜芦醇是广泛存在于葡萄属植物中的一种多酚类化合物,它是许多植物受到感染、紫外线照射或病理状况下产生的一种植物抗毒素。在抗肿瘤、心脏保护、结肠炎和重症胰腺等疾病的治疗领域受到关注和研究^[9-12]。笔者的研究证实,白藜芦醇在神经系统炎症过程中可能起到抑制过度炎症反应达到神经保护的作用。

白藜芦醇是天然植物中提取的酚类化合物,具有多重生理保护作用。目前,白藜芦醇的生理保护机制尚未完全阐明,但是有一点可以肯定:白藜芦醇可以在外周循环抑制单核巨噬细胞系统,从而降低淋巴细胞和自然杀伤细胞的细胞毒性作用^[13,14]。白藜芦醇抑制机体过度免疫反应损害,包括抑制炎性递质的合成和释放,抑制免疫细胞的活化,或者抑制环氧化物酶 COX-1 和 COX-2 等免疫炎性因子合成过程的关键酶,其抑制作用均通过对转录因子 NF-κB 和 AP-1 的蛋白标的下调实现的^[15-17]。在白藜芦醇对心脏的保护机制研究过程中学者发现白藜芦醇可以抑制转录因子 NF-κB 的活性,降低冠状动脉内皮活化后 IL-6 的表达^[18]。遗憾的是,目前缺乏关于白藜芦醇是否在中枢神经系统炎症过程中起到神经保护作用的系统报道。

本实验结果提示,大鼠脑血管内皮细胞与纤维蛋白共培养可以引起 IL-6 表达显著升高,低浓度时白藜芦醇可以降低 IL-6 的合成和释放,高浓度时白藜芦醇可以完全将 IL-6 的浓度降低到生理状态。白藜芦醇对大鼠脑血管内皮细胞高表达 IL-6 的抑制作用呈现剂量依赖性模式。研究结果提示白藜芦醇可以通过抑制 IL-6 的表达部分抑制中枢神经系统炎症反应过程。

总之,本实验结果提示,虽然纤维蛋白可以通过激活血管内皮细胞上调 IL-6,但是白藜芦醇能够完全抑制 IL-6 合成、下调 IL-6 表达,从而起到抑制白细胞活化和募集等炎症过程,阐明了白藜芦醇在神经炎症过程中神经保护的分子机制。在多种神经系统疾病,血脑屏障破坏,纤维蛋白沉积于脑血管内皮细胞是重要的病理过程。白藜芦醇下调纤维蛋白诱导的 IL-6 的高表达,可能在神经感染性疾病有重要的预防和治疗作用。作为酚类化合物,白藜芦醇具备低生物利用度和快速血浆清除的生物学特性。目前,关于白藜芦醇临床应用研究备受关注的热点之一是白藜芦醇可能成为新型的抗炎药物^[19,20]。本研究提示,白藜芦醇是极有前途的天然药物有效组分,随着进一步深入研究,有望开发出新的治疗中枢神经系统感染性疾病的新药。

[DOI] 10.3870/yydb.2009.02.016

[参考文献]

- [1] BAUR J A, SINCLAIR D A. Therapeutic potential of resveratrol; the *in vivo* evidence [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(6):493-506.
- [2] DAS D K, MAULIK N. Resveratrol in cardioprotection; a therapeutic promise of alternative medicine [J]. *Mol Interv*, 2006, 6(1):36-47.
- [3] DELMAS D, LANCON A, COLIN D. Resveratrol as a chemopreventive agent; a promising molecule for fighting cancer [J]. *Curr Drug Targets*, 2006, 7(4):423-442.
- [4] TSAI S K, HUNG L M, FU Y T. Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats [J]. *J Vasc Surg*, 2007, 46(2):346-353.
- [5] RAVAL A P, DAVE K R, PEREZ-PINZON M A. Resveratrol mimics ischemic preconditioning in the brain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(9):1141-1147.
- [6] QI J, GORALNICK S, KREUTZER D L. Fibrin regulation of interleukin-8 gene expression in human vascular endothelial cells [J]. *Blood*, 1997, 90(9):3595-3602.
- [7] MOESSON M W. Fibrinogen and fibrin structure and functions [J]. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(8):1894-1904.
- [8] ICHIKAWA N, NAORA K, HIRANO H. Isolation and primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells for studying drug transport *in vitro* [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1996, 36(1):45-52.
- [9] ATHAR M, BACK J H, TANG X. Resveratrol; a review of preclinical studies for human cancer prevention [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 224(3):274-283.
- [10] PENUMATHSA S V, THIRUNAVUKKARASU M, KONERU S. Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(3):508-516.
- [11] MARTIN A R, VILLEGAS I, SANCHEZ H M. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model [J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 147(8):873-885.
- [12] LI Z D, MA Q Y, WANG C A. Effect of resveratrol on pancreatic oxygen free radicals in rats with severe acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(1):137-140.
- [13] SINGH N P, HEGDE V L, HOFSETH L J. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) ameliorates experimental allergic encephalomyelitis, primarily via induction of apoptosis in T cells involving activation of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor [J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 72(6):1508-521.
- [14] LEIRO J, ALVAREZ E, GARCIA D, et al. Resveratrol modulates rat macrophage functions [J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(6):767-774.
- [15] DAS S, DAS D K. Anti-inflammatory responses of resveratrol [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2007, 6(3):168-173.
- [16] DELA C A, VILLEGAS I. Resveratrol as an antiinflammatory and anti-aging agent; mechanisms and clinical implications [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49(5):405-430.
- [17] MANNA S K, MUKHOPADHYAY A, AGGARWAL B B. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis; potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation [J]. *J Immunol*, 2000, 164(12):6509-6519.
- [18] CSISZAR A, SMITH K, LABINSKY N. Resveratrol attenuates TNF- α -induced activation of coronary arterial endothelial cells; role of NF- κ B inhibition [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(4):H1694-H1699.
- [19] BUREAU G, LONGPRE F, MARTINOLI M G. Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation [J]. *J Neurosci*, 2007, 10: Epub ahead of print.
- [20] SHANKAR S, SINGH G, SRIVASTAVA R K. Chemoprevention by resveratrol; molecular mechanisms and therapeutic potential [J]. *Front Biosci*, 2007, 12:4839-4854.