

槲皮素对 TNF- α 诱导内皮细胞炎症因子表达的影响

江颖娟 蒋作锋 吴小兰 吴文法 黄珮 余慧文

【摘要】 目的 分析槲皮素对 IL-6、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 以及核转录因子- κ B p65 (NF- κ B p65) 蛋白表达的影响以探讨其对血管内皮功能的作用。**方法** 将培养的人脐静脉血管内皮细胞 (HUVEC) 分为空白对照组 (Control 组)、TNF- α 组 (含 10 ng/ml TNF- α)、Q10 组 (TNF- α + 10 μ mol/L 槲皮素)、Q20 组 (TNF- α + 20 μ mol/L 槲皮素) 及 Q50 组 (TNF- α + 50 μ mol/L 槲皮素)。采用 MTT 法检测各组细胞活力。采用 ELISA 法检测培养液中 IL-6、ICAM-1 的蛋白含量, 采用蛋白免疫印迹法检测细胞 NF- κ B p65 蛋白的表达水平。**结果** Control 组、TNF- α 组及不同浓度的槲皮素组细胞活力比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 Control 组比较, TNF- α 组 ICAM-1、IL-6 蛋白含量均较高 (P 均 < 0.01); 与 TNF- α 组相比, 不同浓度的槲皮素组 ICAM-1、IL-6 蛋白含量均下降 (P 均 < 0.05), 且随着槲皮素浓度的增加, 其对 ICAM-1、IL-6 蛋白表达的抑制作用更强。TNF- α 组 NF- κ B p65 蛋白表达水平较 Control 组高 ($P < 0.01$); 与 TNF- α 组相比, 不同浓度的槲皮素组 NF- κ B p65 蛋白的表达均受抑制 (P 均 < 0.05), 且随着槲皮素浓度的增加, 其对 NF- κ B p65 蛋白表达的抑制作用更强。**结论** 槲皮素对 ICAM-1、IL-6 及 NF- κ B p65 均有抑制作用, 其可能通过抑制 NF- κ B p65 蛋白的表达降低内皮细胞分泌 IL-6、ICAM-1 水平, 从而实现对血管内皮功能的保护作用。

【关键词】 槲皮素; 肿瘤坏死因子- α ; 人脐静脉内皮细胞; 核转录因子- κ B; 白介素-6; 细胞间黏附分子-1

Effect of quercetin on the expression of inflammatory cytokines in endothelial cells induced by TNF- α

Jiang Yingjuan, Jiang Zuofeng, Wu Xiaolan, Wu Wengfa, Huang Pei, Yu Huiwen. Guangzhou Red Cross Hospital, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510220, China

Corresponding author, Yu Huiwen

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of quercetin upon the expression of IL-6, intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), nuclear transcription factor- κ B p65 (NF- κ B p65) proteins, aiming to investigate the effect upon vascular endothelial function. **Methods** The human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured and assigned into the control group, TNF- α group (10 ng/ml TNF- α), Q10 group (TNF- α + 10 μ mol/L quercetin), Q20 group (TNF- α + 20 μ mol/L quercetin) and Q50 group (TNF- α + 50 μ mol/L quercetin). MTT assay was adopted to detect the viability of HUVEC in each group. ELISA was used to quantitatively measure the expression levels of IL-6 and ICAM-1 proteins. Western blot was performed to measure the expression levels of NF- κ B p65 protein. **Results** No statistical significance was noted in the viability of HUVEC in the control group, the TNF- α group and different concentrations of quercetin groups ($P > 0.05$). Compared with the control group, the expression levels of ICAM-1 and IL-6 proteins in the TNF- α group were significantly up-regulated (all $P < 0.01$). Compared with the TNF- α group, the expression levels of ICAM-1 and IL-6 proteins were considerably down-regulated in different concentrations of quercetin groups (all $P < 0.05$). The expression levels of ICAM-1 and IL-6 proteins were declined along with the increasing concentration of quercetin, suggesting the inhibitory effect upon the expression of ICAM-1 and IL-6 proteins was stronger. In the TNF- α group, the expression level of NF- κ B p65 protein was remarkably up-regulated compared with that in the control group ($P < 0.01$). The expression levels of NF- κ B p65 protein were significantly suppressed in differ-

ent concentrations of quercetin groups (all $P < 0.05$) and the inhibitory effect was strengthened along with the elevated concentration of quercetin, indicating the inhibitory effect upon the expression of NF- κ B p65 protein was more evident. **Conclusions** Quercetin exerts an inhibitory effect upon the expression of ICAM-1, IL-6 and NF- κ B p65 proteins. Quercetin might down-regulate the levels of IL-6 and ICAM-1 through inhibiting the expression of NF- κ B p65 protein in endothelial cells, thereby protecting the vascular endothelial function.

【Key words】 Quercetin; Tumor necrosis factor- α ; Human umbilical vein endothelial cell; Nuclear transcription factor- κ B; Interleukin-6; Intracellular adhesion molecule-1

动脉粥样硬化是一种慢性动脉疾病,是冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)、脑血管病和血栓栓塞性疾病等缺血性心脑血管病的主要病理基础。动脉粥样硬化发病机制较为复杂,目前尚未完全清楚。近年来越来越多的研究提示动脉粥样硬化实质上为血管受损后发生的一种炎症过程^[1]。因此,使用具有抗炎活性的药物可能成为治疗动脉粥样硬化的新方法。

槲皮素是一种天然的黄酮类化合物,存在于多种植物的花、叶、果实中,具有抗病毒、抗肿瘤、降血糖、降血压等多种作用^[2-3]。近期有研究显示槲皮素能抑制牙龈上皮细胞内多种细胞炎症因子的表达,初步证实槲皮素具有一定的抗炎、抗氧化应激的作用,但槲皮素能否抑制炎症状态下内皮细胞相关炎症因子的表达目前尚不清楚^[4]。在本研究中,笔者采用人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)为研究对象,初步探讨了槲皮素对 TNF- α 诱导下 HUVEC 分泌的细胞炎症因子的影响,为槲皮素治疗动脉粥样硬化提供理论基础及依据。

材料与方法

一、材料、试剂和仪器

HUVEC 购自上海艾研科技有限公司。槲皮素、DMEM 低糖培养基、胰蛋白酶购自 Sigma 公司;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。细胞核蛋白提取试剂盒购自南京 Bioworld 生物公司。核转录因子- κ B p65 (NF- κ B p65) 抗体及辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自 Santa Cruz 公司。MTT 试剂盒购自碧云天生物技术公司、TNF- α 购自武汉博士德生物公司。IL-6、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) ELISA 检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。PMI1640 3K15 低温离心机购自美国 Sigma 公司。TDL-50B 低速台式离心机购自上海安亭科学仪器厂。细胞培养瓶、离心管(15 ml)、12 孔培养板均购自美国 Corning 公司。

二、细胞培养和分组

在 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清), 37℃、

5% 二氧化碳培养箱中培养 HUVEC, 将其分为空白对照组(Control 组)、TNF- α 组(含 10 ng/ml TNF- α), 和不同浓度的槲皮素组, 各槲皮素组由不同浓度的槲皮素(10 μ mol/L、20 μ mol/L、50 μ mol/L) 预处理 2 h, 然后加入 TNF- α (浓度同上) 和不同浓度的槲皮素(浓度同上) 共孵育 24 h, 各分组分别简称 Q10 组、Q20 组及 Q50 组。

三、内皮细胞活力的检测

采用 MTT 法检测细胞活力: 实验结束前 4 h 每孔加入 20 μ l MTT, 检测时弃去上清液, 加入 100 μ l 二甲基亚砜, 轻轻振荡 10 min 后, 用酶标仪在 570 nm 波长下测定吸光度值, 检测 HUVEC 活力。

四、ELISA 法检测细胞炎症因子 ICAM-1、IL-6 蛋白含量

各组培养 48 h 后收集细胞培养上清液。从冰箱取出试剂盒, 室温复温平衡 30 min。配置标准品、加标准品和待测样本, 37℃ 恒温箱温育 30 min。弃去液体, 用洗涤液洗板 5 次。加入酶标试剂 50 μ l (ICAM-1 试剂盒) 或 100 μ l (IL-6 试剂盒), 于 37℃ 恒温箱温育 30 min (ICAM-1 试剂盒) 或 60 min (IL-6 试剂盒)。洗板 5 次。依序每孔先后加入 A、B 显色剂各 50 μ l, 于 37℃ 避光显色 15 min。每孔加终止液 50 μ l 终止反应。用 450 nm 波长测量各孔的吸光度值。根据标准品的浓度及对应的吸光度值明确具体含量, ICAM-1 蛋白含量采用 ng/ml 表示、IL-6 蛋白含量采用 pg/ml 表示。各组实验重复 3 次。

五、蛋白免疫印迹法检测 NF- κ B p65 蛋白的表达

分别提取各组 HUVEC 核中 NF- κ B p65 蛋白, 据 BCA 试剂盒说明书操作, 采用蛋白免疫印迹法检测 NF- κ B p65 蛋白含量。常规电泳、转膜、封闭后加入 NF- κ B p65 和 β -actin 抗体, 于 4℃ 轻摇过夜, 洗膜, 加入二抗于室温孵育 1 h, 用 TBST 清洗后, 用 Odyssey 凝胶成像系统扫描成像, 用 Image J 图象分析系统进行灰度分析, 以目的产物与

β-actin 灰度值的比值反映 NF-κB p65 表达水平。各组实验重复 3 次。

六、统计学处理

采用 SPSS 16.0 分析数据。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用单因素方差分析，多重比较采用 SNK 法， $P < 0.05$ 为差异有计学意义。

结 果

一、槲皮素对 HUVEC 活力的影响

Control 组、TNF-α 组、Q10 组、Q20 组及 Q50 组的细胞活力分别为 0.819 ± 0.046 、 0.793 ± 0.038 、 0.815 ± 0.056 、 0.788 ± 0.072 及 0.818 ± 0.065 ，TNF-α 组及不同浓度的槲皮素组细胞活力与 Control 组比较差异无统计学意义 ($F = 0.212$ ， $P > 0.05$)，表明槲皮素对 HUVEC 活力没有影响。

二、槲皮素对 ICAM-1、IL-6 蛋白含量的影响

培养 24 h，各组间 ICAM-1、IL-6 蛋白含量比较差异有统计学意义， F 分别为 26.488、185.242， P 均 < 0.001 。其中，与 Control 组比较，TNF-α 组 ICAM-1、IL-6 蛋白含量均较高 (P 均 < 0.01)；与 TNF-α 组相比，不同浓度的槲皮素组 ICAM-1、IL-6 蛋白含量均下降 (P 均 < 0.05)，且随着槲皮素浓度的增加，其对 ICAM-1、IL-6 蛋白表达的抑制作用更强，具有一定的浓度依赖性，见表 1。

表 1 槲皮素对 TNF-α 诱导 HUVEC 分泌的 ICAM-1、IL-6 蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	ICAM-1 (ng/ml)	IL-6 (pg/ml)
Control 组	1.20 ± 0.13	29.74 ± 1.23
TNF-α 组	2.87 ± 0.36^a	84.56 ± 2.56^a
Q10 组	2.43 ± 0.21^b	73.24 ± 3.57^c
Q20 组	1.79 ± 0.14^{cd}	51.97 ± 2.34^{cd}
Q50 组	1.37 ± 0.27^{cd}	35.74 ± 4.33^{cde}

与 Control 组比较，^a 为 $P < 0.01$ ；与 TNF-α 组比较，^b 为 $P < 0.05$ ，^c 为 $P < 0.01$ ；与 Q10 组比较，^d 为 $P < 0.01$ ；与 Q20 组比较，^e 为 $P < 0.01$ ； $n = 3$

三、槲皮素对 TNF-α 诱导 HUVEC 内 NF-κB p65 表达的影响

培养 24 h，各组 NF-κB p65 蛋白表达水平比较差异有统计学意义， $F = 324.823$ ， $P < 0.001$ 。TNF-α 组 NF-κB p65 蛋白表达水平较 Control 组高 ($P < 0.01$)。与 TNF-α 组相比，不同浓度的槲皮素组 NF-κB p65 蛋白的表达均受抑制 (P 均 < 0.05)，且随着槲皮素浓度的增加，其对 NF-κB p65 蛋白的

表达的抑制作用更强，具有一定的浓度依赖性，见图 1。

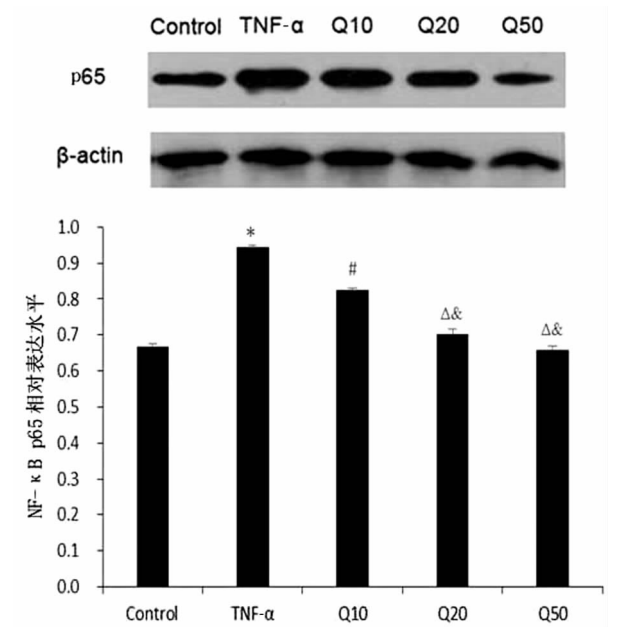


图 1 槲皮素对 TNF-α 诱导 HUVEC 内 NF-κB p65 表达的影响

与 Control 组比较，* 为 $P < 0.01$ ；与 TNF-α 组比较，# 为 $P < 0.05$ ，Δ 为 $P < 0.01$ ；与 Q10 组比较，& 为 $P < 0.01$

讨 论

动脉粥样硬化实质上为血管受损后发生的一种炎症过程。一些炎症相关因子如选择素、白细胞整合黏附分子、促炎症细胞因子等在动脉粥样硬化发生中发挥了关键作用。在动脉粥样硬化的发生过程中，这些细胞因子迅速、大量地表达，参与了白细胞在血管内皮损伤处的迁移和黏附，并促使动脉粥样硬化不断加重^[5]。有研究表明某些药物通过作用于此类因子可发挥抗动脉粥样硬化作用，提示此类因子有作为动脉粥样硬化治疗靶点的可能，为临床上治疗动脉粥样硬化提供新的研究方向^[6]。

ICAM-1 属白细胞整合黏附分子中免疫球蛋白超家族成员，主要分布在白细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等多种细胞上，可促进动脉粥样硬化病变部位的白细胞与血管平滑肌细胞黏附及滞留，促使动脉粥样硬化形成^[7]。IL-6 是介导炎症反应和免疫调节的促炎细胞因子，可促进血管平滑肌增殖，促进内皮细胞黏附分子的表达，还可以增加内皮细胞的通透性，加快动脉粥样硬化进程^[8]。槲皮素能否降低 TNF-α 诱导的内皮细胞 ICAM-1 和 IL-6 的表达，从而对内皮细胞起保护作用，笔者见相关报道

较少。本研究结果显示,在 TNF- α 诱导内皮细胞之前给予槲皮素预处理,可明显降低内皮细胞 ICAM-1 和 IL-6 蛋白的表达,提示槲皮素有可能通过减轻动脉粥样硬化中的炎症反应,延缓动脉粥样硬化过程。

NF- κ B 是炎症过程中的关键调控因子,对多种细胞因子如肿瘤坏死因子等起调节作用,可直接调控细胞因子 IL-6、ICAM-1 的表达,增强其对单核细胞的趋化、黏附作用,促进动脉粥样硬化的发生^[9]。本研究结果显示, TNF- α 可明显诱导内皮细胞 NF- κ B p65 的活化,而槲皮素则可明显抑制 TNF- α 诱导下内皮细胞 NF- κ B p65 的活化,且抑制作用与槲皮素的浓度呈依赖性,这一结果表明槲皮素有可能通过调节 NF- κ B p65 信号通路来改善血管内皮细胞功能。同时也提示槲皮素可能通过抑制 NF- κ B p65 的活化来减少 ICAM-1 和 IL-6 的表达,但其确切机制尚不明确,需行进一步的实验研究。

综上所述,槲皮素可能通过 NF- κ B p65 炎症信号传导通路对血管的炎症反应发挥抑制效应,延缓动脉粥样硬化的发生,本研究为证实槲皮素的抗炎作用提供了新的实验依据。

参 考 文 献

[1] 王晓琦,杜乃立. ACS 相关炎症因子研究进展. 新医学,

2013, 44 (8): 515-518.

- [2] Marunaka Y, Marunaka R, Sun H, Yamamoto T, Kanamura N, Inui T, Taruno A. Actions of quercetin, a polyphenol, on blood pressure. *Molecules*, 2017, 29; 22 (2) pii: E209.
- [3] Kashyap D, Mittal S, Sak K, Singhal P, Tuli HS. Molecular mechanisms of action of quercetin in cancer: recent advances. *Tumour Biol*, 2016, 37 (10): 12927-12939.
- [4] Anand David AV, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of biological importance of quercetin: a bioactive flavonoid. *Pharmacogn Rev*, 2016, 10 (20): 84-89.
- [5] Gisterå A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13 (6): 368-380.
- [6] Huet F, Akodad M, Fauconnier J, Lacampagne A, Roubille F. Anti-inflammatory drugs as promising cardiovascular treatments. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2017, 15 (2): 109-125.
- [7] Khodabandehlou K, Masehi-Lano JJ, Poon C, Wang J, Chung EJ. Targeting cell adhesion molecules with nanoparticles using in vivo and flow-based in vitro models of atherosclerosis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017, 242 (8): 799-812.
- [8] Ridker PM. From C-reactive protein to interleukin-6 to interleukin-1: moving upstream to identify novel targets for atheroprotection. *Circ Res*, 2016, 118 (1): 145-156.
- [9] Xia L, Xie H, Yu Y, Zhou H, Wang T, Yan J. The effects of NF- κ B and c-Jun/AP-1 on the expression of prothrombotic and proinflammatory molecules induced by Anti- β 2GPI in mouse. *PLoS One*, 2016, 11 (2): e0147958.

(收稿日期: 2017-06-01)

(本文编辑: 洪悦民)