

# 姜黄素抑制NLRP-3表达对抗肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的人血管内皮细胞炎症

赵芸<sup>1,2</sup>, 韩秀敏<sup>1</sup>, 赵明<sup>1</sup>, 孙英慧<sup>3</sup>, 朱鲜阳<sup>1</sup>, 张端珍<sup>1</sup> (解放军沈阳军区总医院, <sup>1</sup>先心病内科, <sup>3</sup>医学实验科, 辽宁省沈阳市 110016; <sup>2</sup>大连医科大学, 辽宁省大连市 116044)

## 文章亮点:

- 1 在前期研究验证姜黄素对细胞氧化应激炎症有重要作用的基础上, 以血管内皮细胞为模型, 运用现代分子生物学技术, 探讨姜黄素对抗肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的血管内皮细胞炎症损伤的作用。本研究发现姜黄素可以有效抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 炎性刺激对内皮细胞的病理性损伤。
- 2 肺动脉高压是国内外研究的热点和难题, 治疗方法很少且价格昂贵, 姜黄素作为一种可以调节内皮细胞炎症稳态的重要化合物, 有望成为药物治疗的研发选择。

## 关键词:

组织构建; 血管内皮细胞; 姜黄素; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 炎性小体; 核转录因子 $\kappa B$

## 主题词:

内皮细胞; 血管; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; NF- $\kappa B$

## 基金资助:

辽宁省科学计划项目(2011225021)

## 摘要

背景: 前期研究表明, 姜黄素对细胞氧化应激炎症有重要作用。

目的: 拟进一步阐明姜黄素在血管内皮细胞病理性炎症反应中的生物学作用及机制。

方法: 以人血管内皮细胞为细胞模型, 应用肿瘤坏死因子 $\alpha$ (10  $\mu g/L$ )作为刺激因子, 姜黄素(0, 50, 100  $\mu mol/L$ )孵育 24 h 作为干预治疗组。应用 HRP 标记的 BSA 检测内皮细胞通透性, 应用罗丹明标记的鬼笔碱染色检测 F-actin 变化, 酶联免疫吸附实验检测细胞分泌白细胞介素 1 $\beta$  的变化, 进一步通过免疫荧光染色检测细胞内核转录因子 $\kappa B$  蛋白表达和转位; 应用 Western blot 方法检测炎症小体相关基因 NLRP-3 和 caspase-1 的表达。

结果与结论: HRP-BSA 检测提示, 姜黄素可呈剂量依赖性对抗刺激引起的血管内皮细胞通透性增加。同时, 抑制 F-actin 应力纤维的形成。ELISA 检测发现, 姜黄素治疗后, 可呈剂量依赖性抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激引起的血管内皮细胞白细胞介素 1 $\beta$  分泌。同时, 免疫荧光分析证实, 肿瘤坏死因子 $\alpha$  刺激后, 对照组血管内皮细胞中核转录因子 $\kappa B$  表达持续增高且发生明显的入核转位现象, 而 100  $\mu g/L$  姜黄素干预组细胞中炎症递质转录因子核 $\kappa B$  表达定位无明显改变。Western blotting 结果证实, 炎症小体调控基因 NLRP3 和 caspase-1 表达在姜黄素干预组受到明显抑制。结果表明姜黄素可通过减少核转录因子 $\kappa B$  的表达对抗肿瘤坏死因子 $\alpha$  刺激引起的炎症小体活化和白细胞介素 1 $\beta$  分泌, 对抗细胞病理性炎症损伤发生。

赵芸, 韩秀敏, 赵明, 孙英慧, 朱鲜阳, 张端珍. 姜黄素抑制 NLRP-3 表达对抗肿瘤坏死因子 $\alpha$  诱导的人血管内皮细胞炎症[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(38):6165-6171.

## Protection of curcumin against tumor necrotic factor- $\alpha$ -mediated inflammatory injury of vascular endothelial cells

Zhao Yun<sup>1,2</sup>, Han Xiu-min<sup>1</sup>, Zhao Ming<sup>1</sup>, Sun Ying-hui<sup>3</sup>, Zhu Xian-yang<sup>1</sup>, Zhang Duan-zhen<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Congenital Heart Disease, General Hospital of Shenyang Military Area Command of PLA, Shenyang 110016, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China; <sup>3</sup>Department of Experimental Medicine, General Hospital of Shenyang Military Area Command of PLA, Shenyang 110016, Liaoning Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Previous studies have shown that, curcumin plays a crucial role on the inflammation in cells caused by oxidative stress.

**OBJECTIVE:** To elucidate the biological effect and mechanism of curcumin in the pathological inflammation reaction in vascular endothelial cells.

**METHODS:** Human vascular endothelial cells were taken as the cell models. Tumor necrosis factor (10  $\mu g/L$ ) treatment was used to induce the inflammation of cells. Curcumin (0, 50, 100  $\mu g/L$ ) treatment for 24 hours was used to intervene the cells. The intercellular hyperpermeability of the vascular endothelial cell monolayers was examined by HRP-conjugated bovine serum albumin, and intercellular filamentous actin stress fiber formation was examined by rhodamin-phalloidin staining. ELISA assay was used to detect the secretion of interleukin-1 $\beta$  in vascular endothelial cells. Immunofluorescence staining was applied to investigate the expression and

赵芸, 女, 1988年生, 山东省泰安市人, 汉族, 2014年大连医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事结构性心脏病和肺动脉高压的诊断与治疗研究。

通讯作者: 韩秀敏, 博士, 主任医师, 解放军沈阳军区总医院先心病内科, 辽宁省沈阳市 110016

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.38.017  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)38-06165-07

稿件接受: 2014-06-18

Zhao Yun, Master, Physician, Department of Congenital Heart Disease, General Hospital of Shenyang Military Area Command of PLA, Shenyang 110016, Liaoning Province, China; Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Corresponding author: Han Xiu-min, M.D., Chief physician, Department of Congenital Heart Disease, General Hospital of Shenyang Military Area Command of PLA, Shenyang 110016, Liaoning Province, China

Accepted: 2014-06-18

translocation of nuclear factor- $\kappa$ B. Western blot analysis reflected the expression of NLRP3 and caspase-1.

**RESULTS AND CONCLUSION:** HRP-bovine serum albumin detection results showed that, curcumin inhibited the intercellular hyperpermeability of the vascular endothelial cell monolayers and the formation of robust intercellular filamentous actin in a dose-dependent manner. ELISA assay showed that curcumin protected vascular endothelial cells against tumor necrotic factor- $\alpha$ -induced interleukin- $1\beta$  secretion in a dose-dependent manner. Meanwhile, the nuclear factor- $\kappa$ B expression was increased and the translocation of nuclear factor- $\kappa$ B into the nuclei was obviously seen in vascular endothelial cells induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ , but the translocation was not changed in 100  $\mu$ g/L curcumin-treated cells. Furthermore, western blot analysis revealed that the expression of NLRP3 and caspase-1 were inhibited in curcumin-treated cells. Curcumin can inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced activation of inflammasome and secretion of interleukin- $1\beta$  in vascular endothelial cells by down-regulating the expression of nuclear factor- $\kappa$ B, thus prevent pathological inflammatory injury in cells.

**Subject headings:** endothelial cells; blood vessels; tumor necrosis factor-alpha; nuclear factor- $\kappa$ B

**Funding:** Science and Technology Plan of Liaoning Province, No. 2011225021

Zhao Y, Han XM, Zhao M, Sun YH, Zhu XY, Zhang DZ. Protection of curcumin against tumor necrotic factor-alpha-mediated inflammatory injury of vascular endothelial cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(38):6165-6171.

## 0 引言 Introduction

流行病学调查显示, 心血管疾病发病率在国内逐年递增, 成为严重危害国民健康的主要疾病之一, 也是目前世界及国内疾病致死的重要原因。血管内皮细胞是构成血管壁保护的重要组成部分, 血管内皮损伤和功能障碍是肺动脉高压、高血压和冠状动脉性心脏病等多种血管疾病的早发病理过程。因此探讨调节血管内皮细胞生理病理功能的分子机制, 以血管内皮损伤和功能障碍作为靶点进行干预研究已成为当前血管疾病防治研究热点之一。

肺动脉高压是由于多种因素导致肺动脉血管重构, 肺动脉阻力增加, 最终导致心衰的一种临床综合征<sup>[1]</sup>。越来越多的研究表明, 肺血管内皮损伤是引起肺动脉收缩和特征性病理改变的首要因素, 保护肺血管内皮细胞, 改善内皮功能或恢复内源性血管活性物质间的平衡, 恢复血管内皮结构和功能的完整性, 延缓或逆转肺血管的重构, 已成为治疗肺动脉高压的重要目标之一<sup>[2-6]</sup>。大量研究证实, 血流动力学改变、氧化应激、炎症和免疫反应等诸多外源性病理因素刺激均可导致血管内皮损伤; 同时, 这些外源性病理因素刺激血管内皮细胞活化, 导致其自身稳态调控障碍, 进一步加重了血管内皮损伤和功能障碍, 加速了血管疾病的演进。因此, 炎症在疾病的进展过程中是一个关键的因素, 针对引起血管内皮损伤的外源性病理因素进行了积极的药物干预研究, 能够在一定程度上增强和改善了血管内皮功能, 延缓血管性疾病的病程进展。

炎症的发生发展是一种多重复杂的过程, 不仅有淋巴细胞、树状细胞、巨噬细胞等多种细胞参与, 还有血清中的白细胞介素 $1\beta$ 、白细胞介素6、白细胞介素8或肿瘤坏死因子 $\alpha$ 等多种细胞因子及CCL-2/MCP-1、CCL-5/RANTES等炎症趋化因子的参与<sup>[2-3, 5]</sup>。其中, 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 在免疫细胞协调全身系统炎症的过程中发挥重要作用, 如果肿瘤坏死因子 $\alpha$ 分泌失调会出现各式各样的炎症性疾病。有研究显示姜黄素可以抑制肿瘤坏

死因子 $\alpha$ 的生成并调整肿瘤坏死因子 $\alpha$ 对其他因子的诱导作用, 进而抑制炎症反应的发生与发展<sup>[7]</sup>。

姜黄素是从姜黄、郁金、莪术等植物中提取的一种中药单体, 属于生物多酚化合物<sup>[8-10]</sup>。已有研究显示, 姜黄素具有抗炎、抗氧化、促细胞凋亡和抑制细胞增殖等药理作用, 这些作用理论上可有效拮抗肺动脉高压的发生与发展, 但是其具体作用机制不甚清楚<sup>[11-12]</sup>。近年来, 大量的研究证实姜黄素是一种天然的HO-1强诱导剂, 其抗氧化损伤与组织细胞保护作用可能主要依赖于对HO-1蛋白的诱导表达来实现<sup>[13-14]</sup>。但迄今为止, 姜黄素表达对抗内皮细胞氧化损伤的报道较少, 而且国内外尚未见姜黄素表达对内皮细胞活性调控的相关研究报道。因此, 实验以血管内皮细胞作为模型, 运用现代分子生物学技术, 观察姜黄素对抗肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的血管内皮细胞炎症损伤的作用, 并初步探讨其可能的机制。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 单一样本观察。

**试验及地点:** 实验于2013年在解放军沈阳军区总医院医学实验中心进行。

**材料:**

姜黄素抑制NLRP-3表达对抗肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的人血管内皮细胞炎症实验所用试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
抗核转录因子 $\kappa$ B p65 单克隆抗体	北京中杉金桥生物技术公司
Human 白细胞介素 $1\beta$ ELISA 检测盒	美国 R&D 公司
抗 CASP-1, NLRP-3 抗体	ABCAM 公司
Biotin-BSA 和 Rhodamin-phalloidin	美国 GE 公司
人动脉血管内皮细胞系	ATCC

**实验方法:**

**细胞培养:** 人动脉血管内皮细胞系购自ATCC, 本室已长期保存。细胞以含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基进行培养, 每3 d进行传代。血管内皮细胞分别设置空

白对照组、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激组(肿瘤坏死因子 $\alpha$  10  $\mu\text{g/L}$ )和姜黄素给药治疗组(含0, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素的培养基孵育24 h)。

**肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的内皮细胞单层通透性的影响:** 参照Essler等<sup>[15]</sup>建立的方法, 用示踪剂Biotin-BSA检测内皮细胞单层通透性变化。将内皮细胞接种在Transwell chamber多聚碳脂滤膜的弥散模型中, 每个小室铺 $3\times 10^5$ 个细胞, 生长4 d达到细胞融合成单层后用于实验。

细胞先用姜黄素(50和100  $\mu\text{mol/L}$ )分别预处理24 h后, 在上室中加入Biotin-BSA使其为终浓度为100 mg/L, 将细胞分为2组: ①在上室中加入终浓度为10  $\mu\text{g/L}$ 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 分别培养10, 30, 60, 90, 120 min。②在上室中加入终浓度为20  $\mu\text{g/L}$ 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 分别培养10, 30, 60, 90, 120 min。分别从下室取60  $\mu\text{L}$ 培养基置于96孔板, 加入链霉亲和素-过氧化物酶, TMB显色, Bio-Rad 550型酶标仪在波长470 nm处检测吸光度以反映内皮细胞单层通透性的变化。

**免疫荧光法检测F-actin肌动蛋白的分布:** 参照文献[16], 血管内皮细胞( $3\times 10^6$ /孔)接种于载玻片小室中, 先用姜黄素(50和100  $\mu\text{mol/L}$ )分别预处理24 h后, 加入浓度为10  $\mu\text{g/L}$ 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 作用30 min, 用40 g/L多聚甲醛固定15 min, 0.2% Triton X-100通透15 min, 加入1%BSA封闭1 h, 用Rhodamin-Phalloidin 100 ng/L进行F-actin肌动蛋白染色, 荧光倒置显微镜下观察。

**免疫荧光检测核转录因子 $\kappa\text{B}$ 表达及定位:** 将细胞先用姜黄素(50和100  $\mu\text{mol/L}$ )分别预处理24 h后, 培养在清洁灭菌的盖玻片上至30%融合, 加入浓度为10  $\mu\text{g/L}$ 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 作用30 min, 后用37  $^{\circ}\text{C}$ 的PBS洗涤3次, 40 g/L多聚甲醛室温固定30 min, 0.05% Triton X-100室温通透1 h, 37  $^{\circ}\text{C}$  PBS洗涤3次, 体积分数5%山羊血清封闭20 min, 弃掉血清加入小鼠核转录因子 $\kappa\text{B}$  p65单克隆抗体(1:100), 4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS洗涤3次, 加入山羊抗小鼠荧光标记二抗(1:100)室温避光孵育2 h, PBS增加洗涤时间洗涤3次, DAPI染细胞核, 30%甘油-PBS封固, 在荧光倒置显微镜下照像、观察细胞核转录因子 $\kappa\text{B}$ 核内转位表达情况。

**Western Blot检测:** 收获肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和姜黄素(50和100  $\mu\text{mol/L}$ )不同干预组细胞, 提取细胞总蛋白。采用BCA法测定细胞蛋白的浓度, 并进行10%SDS-PAGE、转至PVDF膜上、5%脱脂奶粉封闭、一抗二抗结合、显色。一抗分别为抗CASP-1和抗NLRP-3多克隆抗体(1:2 000), 二抗为HRP标记山羊抗小鼠IgG(1:2 000)。按ECL试剂盒说明书进行显影, 检测细胞炎症小体相关基因NLRP-3、Caspase-1的表达情况。

**酶联免疫吸附实验(ELISA)测细胞分泌白细胞介素 $1\beta$ 的变化:** 将空白对照组、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激组(肿瘤坏死因子 $\alpha$  10  $\mu\text{g/L}$ )和姜黄素给药治疗组血管内皮细胞在

30 mm培养皿中培养融合至90%左右, 弃去培养基, 无菌PBS洗涤3次, 在空白对照组加无血清的DMEM 1 mL(以最少的液体覆盖细胞表面)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激组加入以无血清DMEM配制的肿瘤坏死因子 $\alpha$  10  $\mu\text{g/L}$ 溶液1 mL、姜黄素给药治疗组加入以无血清DMEM配制的肿瘤坏死因子 $\alpha$  10  $\mu\text{g/L}$ 、姜黄素(50, 100  $\mu\text{mol/L}$ )的溶液1 mL。置37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% $\text{CO}_2$ 的细胞培养箱继续培养24 h后收集上清, 进行白细胞介素 $1\beta$ 的ELISA检测。实验前以细胞计数结果校对上样量, 使上样量保持一致, 根据ELISA试剂盒(R&D)说明书进行。紫外透射仪读取结果, 每次实验读数取3个, 此实验重复3次。

**主要观察指标:** ①姜黄素对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的血管内皮细胞单层通透性的影响。②姜黄素对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 引起的血管内皮细胞肌动蛋白F-actin重排的影响。③姜黄素对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激后细胞炎症因子白细胞介素 $1\beta$ 的影响。④姜黄素抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激后细胞核转录因子 $\kappa\text{B}$ 核内转位表达。

**统计学分析:** 实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 使用SPSS 16.0统计软件, 组间比较用单因素方差分析。

## 2 结果 Results

**2.1 姜黄素降低了肿瘤坏死因子 $\alpha$ 所引起的血管内皮细胞单层的通透性增加** 分别用10  $\mu\text{g/L}$ 和20  $\mu\text{g/L}$ 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 与血管内皮细胞作用后, 可见质量浓度大于10  $\mu\text{g/L}$ 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 在30 min时可明显增加血管内皮细胞单层通透性( $P < 0.05$ ), 给予姜黄素(50, 100  $\mu\text{mol/L}$ )干预后, 血管内皮细胞单层通透性明显低于未处理组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。其中, 以姜黄素100  $\mu\text{mol/L}$ 变化最为显著(图1)。因此, 以血管内皮细胞单层通透性变化差异显著的工作浓度10  $\mu\text{g/L}$ 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 为后续实验中的工作浓度, 进行F-actin的染色。

**2.2 姜黄素对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 引起的血管内皮细胞肌动蛋白F-actin重排的影响** 荧光倒置显微镜下观察, 经质量浓度为10  $\mu\text{g/L}$ 的肿瘤坏死因子 $\alpha$ 作用30 min后, 肌动蛋白F-actin解聚, 微丝网状有序排列消失, 血管内皮细胞肌动蛋白细胞骨架排列紊乱, 以细胞中央为主, 细胞周边明显形成应力纤维。

应用姜黄素100  $\mu\text{mol/L}$ 分别处理后, 可见血管内皮细胞中肌动蛋白细胞骨架排列略紊乱, 细胞周边偶有应力纤维形成, 姜黄素处理组血管内皮细胞中肌动蛋白F-actin的改变, 是与其通透性改变相符合, 见图2。

**2.3 姜黄素可减少肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激后细胞炎症因子白细胞介素 $1\beta$ 的分泌** ELISA试剂盒检测细胞上清中的白细胞介素 $1\beta$ 。结果显示空白对照组细胞中没有明显的白细胞介素 $1\beta$ 表达; 肿瘤坏死因子 $\alpha$  10  $\mu\text{g/L}$ 刺激12 h后, 内皮细胞白细胞介素 $1\beta$ 分泌量均有明显升高; 给予不同质量浓度姜黄素干预后, 显著抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激细胞中白细胞

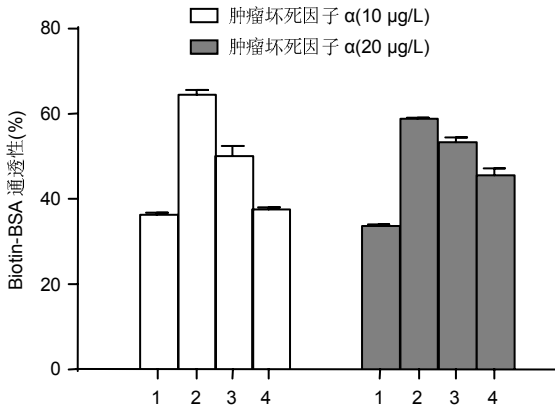


图1 姜黄素降低了肿瘤坏死因子 $\alpha$ 所引起的血管内皮细胞单层的通透性增加

Figure 1 Curcumin reduced intercellular hyperpermeability of the vascular endothelial cell monolayers induced by tumor necrosis factor- $\alpha$

图注: 1 为对照组, 2 为肿瘤坏死因子 $\alpha$ 组, 3 为肿瘤坏死因子+姜黄素 1 组(姜黄素 50  $\mu\text{mol/L}$ ), 4 为肿瘤坏死因子+姜黄素 2 组(姜黄素 100  $\mu\text{mol/L}$ )。给予姜黄素干预后, 血管内皮细胞单层通透性明显低于未处理组( $P < 0.05$ )。以 100  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素变化最为显著。

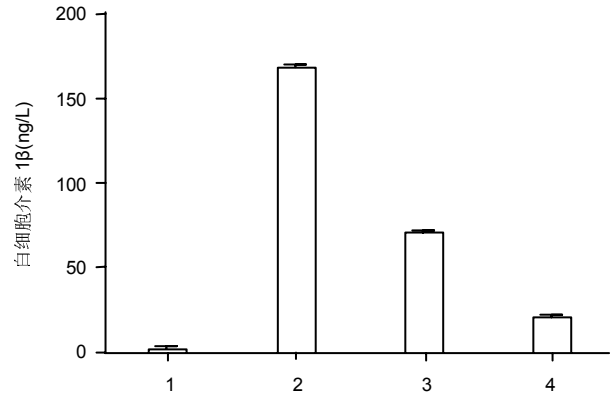


图3 ELISA 检测 3 组细胞上清中白细胞介素 1 $\beta$  分泌量的变化  
Figure 3 Secretion of interleukin-1 $\beta$  in the supernatant as detected by ELISA

图注: 1 为对照组, 2 为肿瘤坏死因子 $\alpha$ 组, 3 为肿瘤坏死因子+姜黄素 1 组(姜黄素 50  $\mu\text{mol/L}$ ), 4 为肿瘤坏死因子+姜黄素 2 组(姜黄素 100  $\mu\text{mol/L}$ )。结果显示给予不同浓度姜黄素干预后, 显著抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激细胞中白细胞介素 1 $\beta$  的分泌。

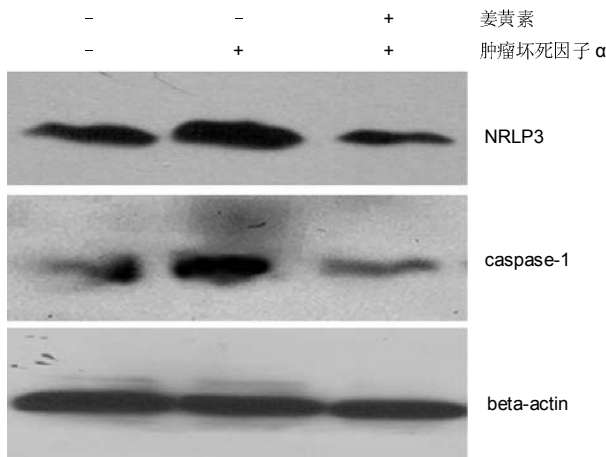
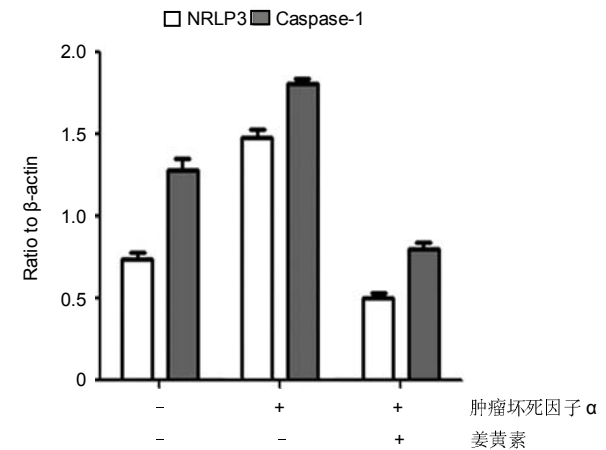


图5 Western blotting 检测姜黄素干预对抗肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激细胞中 NLRP3 和 Caspase-1 表达

Figure 5 Curcumin reduced the expression of NLRP3 and Caspase-1 in cells after stimulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  detected by western blot analysis

图注: 与肿瘤坏死因子 $\alpha$ 单纯干预组比较, 姜黄素治疗组细胞中炎症小体相关基因 NLRP3 和 CASP-1 的表达显著减少。



介素 1 $\beta$  的分泌, 下降幅度呈明显的剂量依赖性趋势。充分说明姜黄素能够显著抑制炎症刺激时血管内皮细胞中白细胞介素 1 $\beta$  的分泌, 见图 3。

**2.4 姜黄素抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激后细胞核转录因子 $\kappa\text{B}$ 核内转位表达** 应用荧光显微镜观察可见, 正常内皮细胞中核转录因子 $\kappa\text{B}$ 仅在细胞核外表达。给予质量浓度为 10  $\mu\text{g/L}$  的肿瘤坏死因子 $\alpha$  刺激 30 min 时, 可见核转录因子 $\kappa\text{B}$ 迅速入核表达; 而姜黄素治疗组细胞中核转录因子 $\kappa\text{B}$ 绝大多数在核外表达, 没有核转录因子 $\kappa\text{B}$ 大量入核现象发生; 提示在肿瘤坏死因子 $\alpha$ 短时炎性刺激过程中, 姜黄素对核转录因子 $\kappa\text{B}$ 这一经典的入核促炎信号有抑制作用, 结果

见图 4。

**2.5 姜黄素抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激后细胞炎症小体相关基因的活化** 目前研究发现, 白细胞介素 1 $\beta$  的剪切活化与炎症小体的激活密切相关。因此, 实验进一步应用 Western blot 分析检测姜黄素干预前后, 血管内皮细胞中炎症小体相关基因的表达变化情况。

结果发现, 与肿瘤坏死因子 $\alpha$ 单纯干预组比较, 姜黄素治疗组细胞中炎症小体相关基因 NLRP3 和 CASP-1 的表达显著减少, 见图 5。这个结果进一步提示姜黄素对内皮细胞分泌炎症因子白细胞介素 1 $\beta$  的调控作用与其对抗炎症小体的基因活化有关。

### 3 讨论 Discussion

血管内皮不仅是人体最大的内分泌、旁分泌器官, 还是许多活性物质的靶器官, 在调节血管收缩舒张状态、维持凝血及纤溶系统平衡、抑制血小板聚集、抑制炎症细胞与血管内皮细胞间的黏附以及调控血管平滑肌生长等方面具有重要生理功能。在许多病理状态时, 这些功能发生异常改变, 即为血管内皮损伤和功能障碍。目前研究已知, 引起血管内皮损伤的病理机制很多, 其中研究较明确的多为外源性病理性损伤因素, 包括炎症及免疫反应、氧化应激、高血压、高凝状态等, 而炎症和氧化应激及其相关的分子调控机制是研究的热点。近年, 学者们提出了一个新的观点, 维持血管内皮完整和稳态是一个主动的生物学过程, 除了外源性损伤外, 血管内皮自稳态调节在其中同样起着极为重要的作用<sup>[17]</sup>。从血管内皮自稳态调节角度寻找在各种病理性损伤时, 维持血管内皮自稳态的关键“调控分子”或“信号转导系统”是当前血管性疾病领域的一个全新研究方向。

血管通透性增高是内皮细胞损伤的一个标志性事件, 是其发生的最初表现和导致其他后续改变的病理基础。血管通透性改变主要取决于内皮细胞屏障功能的改变, 即内皮细胞骨架肌动蛋白形态学改变引发的细胞收缩性变化。当内皮细胞受到各种刺激时, 肌动蛋白发生重组和再分布, 细胞周边肌动蛋白致密带断裂, 细胞中央出现大量平行束状应力纤维, 使收缩力超过黏附力, 细胞收缩致细胞间隙增大、增多, 导致血管通透性升高<sup>[18-19]</sup>。

肿瘤坏死因子 $\alpha$ 是内皮细胞早期分泌的主要促炎细胞因子, 可通过激活白细胞等释放细胞因子间接对内皮发挥作用, 还可通过直接损伤或激活内皮细胞引起内皮细胞功能的变化<sup>[20]</sup>, 最终导致内皮细胞通透性增高, 引发各种炎症性疾病。若能及时清除或抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的生成, 阻断炎症反应的链条, 对逆转炎症反应的发生与发展具有十分重要的意义。

血管内皮在血液与组织间的溶质、激素、白细胞等物质交换方面起主要的作用, 因此, 血管内皮作为一道天然屏障, 如何对其调控并加以保护在当前血管疾病防治研究领域中日益受到高度重视。目前研究表明, 内皮细胞损伤是先天性心脏病相关肺动脉高压的重要发病机制<sup>[21-22]</sup>, 因此保护肺血管内皮细胞, 预防和逆转肺血管内皮细胞功能障碍对于延缓和阻止PAH的发生发展及治疗非常重要。而炎症因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ 由于能引起血管氧化应激、血管重塑、血栓形成、细胞通透性增高、凋亡、血管炎症, 在肺动脉高压的血管内皮损伤过程中起着重要作用<sup>[23-24]</sup>。

迄今为止动脉性肺动脉高压是不可治愈的, Benza等<sup>[25]</sup>、Humbert等<sup>[26]</sup>报道, 患有特发性PAH的患者1, 2, 3年生存率分别为85.7%, 69.6%, 54.9%<sup>[25-26]</sup>。目前用于治

疗肺动脉高压的药物很少, 且价格昂贵, 主要有前列环素类药物、磷酸二酯酶V型(PDE5)抑制剂、内皮素受体拮抗剂等。姜黄素是从植物姜黄、郁金等植物根茎中提取的一种生物多酚化合物, 是这些姜黄属中药最重要的活性成分之一<sup>[13]</sup>。传统医学认为其根茎具有破瘀、行气、消积和通经止痛之功效, 用于治疗关节炎、溃疡、外伤及皮肤银屑等疾病。现代医学研究表明姜黄素具有抗炎、抗氧化应激损伤等药理作用<sup>[14, 27-28]</sup>, 但其具体机制尚未完全阐明。因此, 本实验尝试探讨姜黄素能否对内皮细胞炎症起保护作用, 并尝试探讨其调控作用的分子机制。

实验发现, 姜黄素干预治疗后, 人血管内皮细胞生长状态良好, 没有发生毒性反应。同时, 通过ELISA分析证实, 姜黄素能够呈浓度依赖性的对抗肿瘤坏死因子引起的血管内皮细胞炎症因子白细胞介素 $1\beta$ 的分泌。白细胞介素 $1\beta$ 是细胞损伤的重要炎症反应因子, 其经典的激活通路和核转录因子 $\kappa B$ 基因的核转录调控有关。作为经典的促炎信号在血液循环或局部血管肿瘤坏死因子 $\alpha$ 产物生成中起正反馈调节作用<sup>[29]</sup>。肿瘤坏死因子 $\alpha$ 活化核转录因子 $\kappa B$ 转录, 调节炎症、氧化应激、内皮功能障碍时核转录因子 $\kappa B$ 相关基因的表达, 而在内皮细胞中, 核转录因子 $\kappa B$ 又可诱导肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素6、单核细胞化学吸引物质和黏附因子的表达, 从而损伤血管内皮<sup>[30]</sup>。

本实验发现, 姜黄素干预后, 内皮细胞中核转录因子 $\kappa B$ 核转位现象受到明显抑制, 提示姜黄素可能通过干预了经典抗炎通路从而干预了细胞炎症反应发生。进一步研究发现, 核转录因子 $\kappa B$ 基因转录仅是炎症因子产生的制造者, 多产生为无活性白细胞介素 $1\beta$ 前体, 而目前研究较多的炎症小体活化才是细胞内白细胞介素 $1\beta$ 活化的最终调控者。因此, 作者进一步检测了细胞中炎症小体相关基因CASP1和NLRP3的表达情况。结果发现, 姜黄素干预同时也显著抑制了两个重要炎症小体活化基因的表达, 进一步提示姜黄素对内皮细胞炎症的保护作用, 不仅拮抗了白细胞介素 $1\beta$ 前体的表达, 也对抗了炎症小体对其的剪切活化。

综上所述, 姜黄素作为一种可以调节内皮细胞炎症稳态的重要化合物, 可以有效抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ 炎性刺激对内皮细胞的病理性损伤并及时实现自我修复, 对心血管病防治有重要参考意义。

**作者贡献:** 试验设计、评估为通讯作者, 实施为第一作者, 辅助试验为第三、四作者, 第一作者成文, 通讯作者审校, 第一作者对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 没有与相关伦理道德相冲突的内容。

**学术术语:** 姜黄素-是从姜科、天南星科中的一些植物的根茎中提取的一种化学成分, 其中, 姜黄约含3%-6%, 是植物界很稀

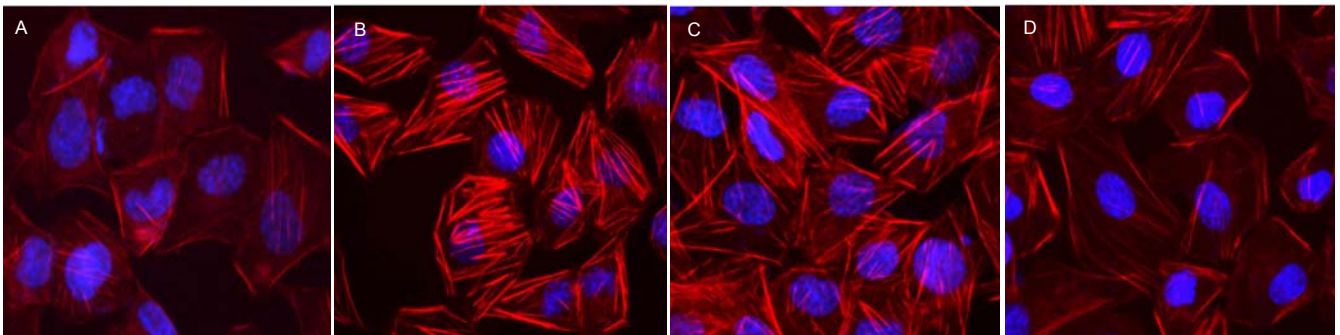


图 2 姜黄素对肿瘤坏死因子  $\alpha$  引起的血管内皮细胞肌动蛋白 F-actin 重排( $\times 400$ )

Figure 2 Curcumin prevented the rearrangement of intercellular filamentous actin induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  ( $\times 400$ )

图注: 图中 A 为对照组, B 为肿瘤坏死因子  $\alpha$ ( $10 \mu\text{g/L}$ )组, C 为肿瘤坏死因子+姜黄素 1 组(姜黄素  $50 \mu\text{mol/L}$ ), D 为肿瘤坏死因子+姜黄素 2 组(姜黄素  $100 \mu\text{mol/L}$ )。结果显示  $100 \mu\text{mol/L}$  姜黄素可以抑制 F-actin 应力纤维的形成。

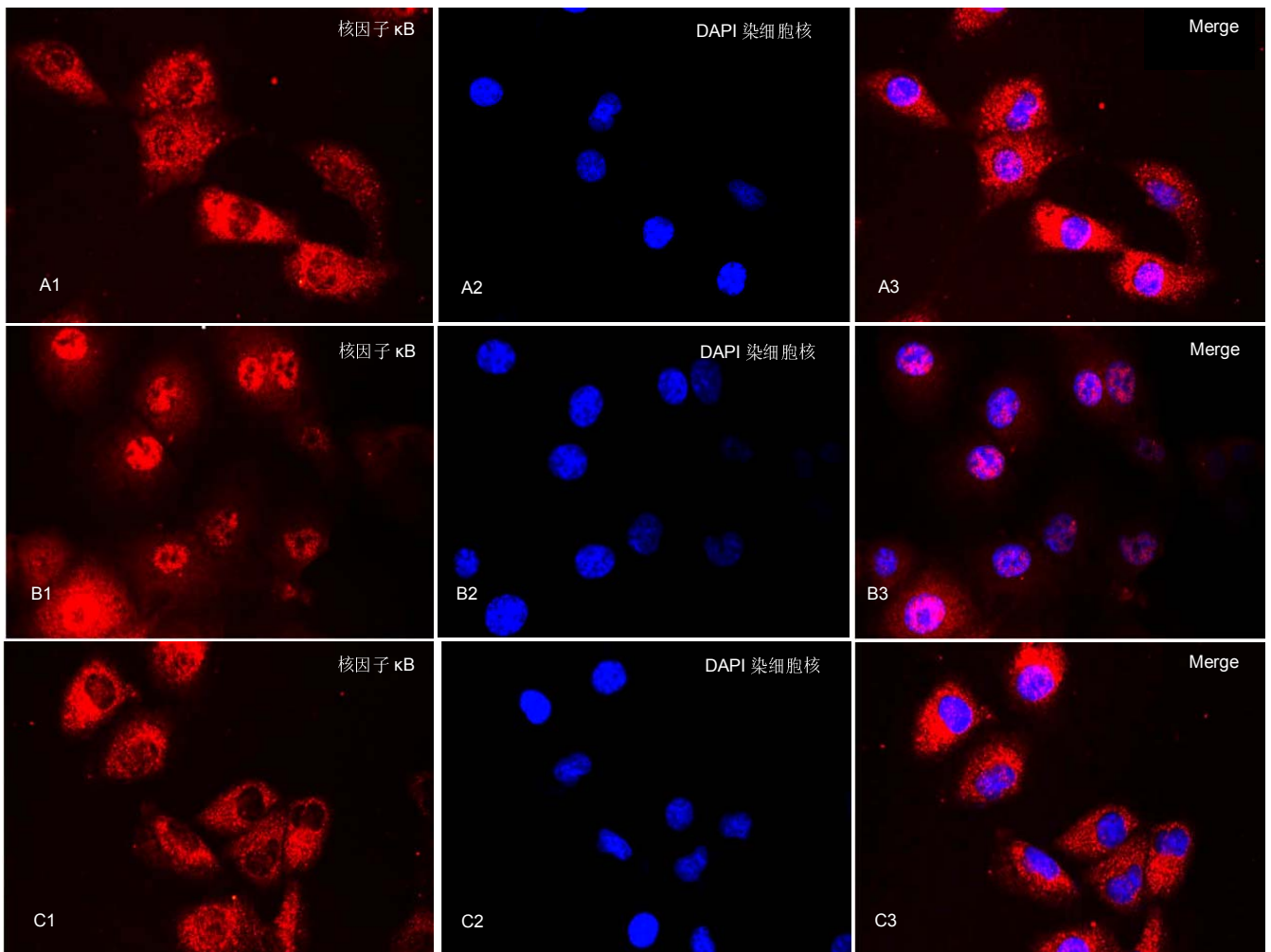


图 4 免疫荧光观察肿瘤坏死因子  $\alpha$  刺激后细胞核转录因子  $\kappa\text{B}$  核转变化( $\times 630$ )

Figure 4 Translocation of nuclear factor- $\kappa\text{B}$  after stimulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  by immunofluorescence ( $\times 630$ )

图注: 图中 A 为血管内皮细胞; B 为血管内皮细胞+肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; C 为血管内皮细胞+肿瘤坏死因子  $\alpha$ +姜黄素。结果提示在肿瘤坏死因子  $\alpha$  短时炎性刺激过程中, 姜黄素对核转录因子  $\kappa\text{B}$  信号有抑制作用。

少的具有二酮的色素, 为二酮类化合物。姜黄素为橙黄色结晶粉末, 味稍苦。不溶于水。在食品生产中主要用于肠类制品、罐头、酱卤制品等产品的着色。医学研究表明, 姜黄素具有降血脂、抗肿瘤、抗炎、利胆、抗氧化等作用。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, et al. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the American College of cardiology foundation task force on expert consensus documents and the American Heart Association: developed in collaboration with the American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, Inc., and the Pulmonary Hypertension Association. *Circulation*.2009;119(16):2250-2294.

- [2] Price LC, Wort SJ, Perros F, et al. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest*, 2012;141(1):210-221.
- [3] Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, et al. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(8):443-455.
- [4] Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*. 2008;118(7):2372-2379.
- [5] McLaughlin VV, Davis M, Cornwell W. Pulmonary arterial hypertension. *Curr Probl Cardiol*. 2011;36(12):461-517.
- [6] Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(Suppl. 1):S43-54.
- [7] Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin. *Curr Drug Targets*. 2011;12(3):332-347.
- [8] Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30:85-94.
- [9] Singh S. From exotic spice to modern drug? *Cell*. 2007;130:765-768.
- [10] Huang MT, Newmark HL, Frenkel K. Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice. *J Cell Biochem Suppl*. 1997;27:26-34.
- [11] Motterlini R, Foresti R, Bassi R, et al. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(8):1303-1312.
- [12] Bronte E, Coppola G, Di Miceli R, et al. Role of curcumin in idiopathic pulmonary arterial hypertension treatment: a new therapeutic possibility. *Med Hypotheses*. 2013;81(5):923-926.
- [13] 石晓东, 尹闻科, 张雄, 等. 姜黄素对SH-SY5Y细胞血红素加氧酶同工酶表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(6): 740-744.
- [14] 陈丽, 刘晓城. 姜黄素对高糖刺激下大鼠肾脏系膜细胞血红素氧合酶-1表达的影响[J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2008, 37(2): 178-180.
- [15] Essler M, Retzer M, Bauer M, et al. Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*. 1999; 274(43): 30361-30364.
- [16] Wojciak-Stothard B, Potempa S, Eichholtz T, et al. Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci*. 2001;114(7):1343-1355.
- [17] Murakami M, Simons M. Regulation of vascular integrity. *J Mol Med*. 2009; 87(6):571-582.
- [18] Bazzoni G. Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall. *Thromb Haemost*. 2006;95(1):36-42.
- [19] Williams MR, Kataoka N, Sakurai Y, et al. Gene expression of endothelial cells due to interleukin-1 beta stimulation and neutrophil transmigration. *Endothelium*. 2008; 15(1):73-165.
- [20] Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med*. 1994;45:491-503.
- [21] Lévy M, Maurey C, Celermajer DS, et al. Impaired apoptosis of pulmonary endothelial cells is associated with intimal proliferation and irreversibility of pulmonary hypertension in congenital heart disease. *Am Coll Cardiol*. 2007;49(7):803-810.
- [22] Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D34-41.
- [23] Ortiz A, Lorz C, Catalán MP, et al. Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure. *Kidney Int*. 2000;57(3):969-981.
- [24] Mathew SJ, Haubert D, Krönke M, et al. Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 12): 1939-1946.
- [25] Benza RL, Miller DP, Gomberg-Maitland M, et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circulation*. 2010;122(2):164-172
- [26] Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexia-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation*. 2010;122(2):156-163.
- [27] Aggarwal BB, Gupta SC, Sung B. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *Br J Pharmacol*. 2013;169(8):1672-1692.
- [28] Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr*. 2010;103(11):1545-1557.
- [29] McGuire TR, Kazakoff PW, Hoie EB, et al. Antiproliferative activity of shark cartilage with and without tumor necrosis factor-alpha in human umbilical vein endothelium. *Pharmacotherapy*. 1996;16(2): 237-244.
- [30] Zhang H, Park Y, Wu J, et al. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116(3): 219-230.