

熊果酸对脂多糖诱导的 THP-1 细胞的作用及其机制

陈虹, 杨杰, 崔伟曦, 王强*

(中国药科大学中药分析教研室, 南京 210009)

摘要 探讨熊果酸对 THP-1 细胞的保护作用及其机制。以脂多糖诱导的 THP-1 炎症细胞为模型, 观察不同浓度的熊果酸 (10, 30, 50 $\mu\text{mol/L}$) 对细胞黏附、迁移功能的影响, RT-PCR 法检测 MCP-1、CCR2 mRNA 的表达, 继而探讨 NF- κ B 活性。结果显示, 与模型组比较, 熊果酸 (30, 50 $\mu\text{mol/L}$) 能够显著降低 THP-1 细胞与人纤维连接蛋白的黏附, 各给药组均能显著降低 THP-1 细胞的迁移, 降低 MCP-1、CCR2 mRNA 的表达并下调 NF- κ B 活性。初步判断, 熊果酸对脂多糖诱导的 THP-1 炎症细胞的保护功能可能是通过下调 NF- κ B 活化及降低 MCP-1、CCR2 表达而实现的。

关键词 熊果酸; THP-1 细胞; MCP-1; NF- κ B

中图分类号 R285 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2011)05-0447-05

Effects and mechanism of ursolic acid on lipopolysaccharide-induced THP-1 cells

CHEN Hong, YANG Jie, CUI Wei-xi, WANG Qiang*

Department of Chinese Materia Medica Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The present research is to explore the protective effects and mechanism of ursolic acid (UA) on THP-1 cells. The effects of UA at different concentration (10, 30, 50 $\mu\text{mol/L}$, respectively) on THP-1 adhesion and migration capability were observed after cell inflammation model induced by lipopolysaccharide. The mRNA expression of MCP-1 and CCR2 was detected by RT-PCR. Moreover, the effect of UA on NF- κ B activity was investigated. Compared with the model group, UA (30 and 50 $\mu\text{mol/L}$) significantly decreased the cell adhesion to fibronectin. All dosages of UA significantly inhibited THP-1 cells migration. In the meantime, UA downregulated the expression of MCP-1 and CCR2 and mediated NF- κ B activity. Therefore, UA exerts its protective effects on THP-1 cells by, partly at least, the inhibition of NF- κ B activity accompanied with decreased MCP-1 and CCR2 expression.

Key words ursolic acid; THP-1 cells; MCP-1; NF- κ B

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30873379)

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是动脉血管壁对损伤和刺激的慢性炎症和免疫反应。血液中的单核细胞在损伤部位聚集、黏附、迁移和穿过血管内皮, 进而活化和分化为巨噬细胞^[1]。单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 是一个作用极强的单核细胞趋化因子, 不仅具有吸附单核细胞移动的功能, 而且对血管内皮细胞黏附分子的表达亦具有调节作用^[2]。文献报道 MCP-1 基因缺陷小鼠

可显著降低动脉粥样硬化斑块的发展, 提示通过抑制 MCP-1 的表达可以降低动脉粥样硬化风险^[3]。

熊果酸 (ursolic acid, UA) 又名乌索酸、乌苏酸, 属于 α -香树脂烷 (α -amyrin) 型五环三萜类化合物^[4]。研究表明 UA 具有抗肿瘤、抗 HIV、抗糖尿病、增强免疫力、降脂、抗炎、抗氧化等多种生物学效应, 其中抗肿瘤方面的报道最多。近年来 UA 的

* 收稿日期 2011-04-01 * 通讯作者 Tel/Fax: 025-83271397 E-mail: qwang49@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 30873379)

抗心血管疾病活性成为下一个研究热点^[5],而作为待开发的抗心血管疾病的药物,相关机制研究报道较少。

本研究在细胞水平探讨了熊果酸对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 THP-1 单核细胞增殖、黏附、迁移等功能的影响,并从 MCP-1 及其受体-趋化因子受体 2 (CCR2) 的 mRNA 水平及 NF- κ B 信号途径对其相关机制作了初步探讨。

1 材料

1.1 药品与试剂

人单核细胞系 THP-1 细胞(中科院上海细胞库);熊果酸(上海融禾医药科技发展有限公司,纯度大于 98%);RPMI-1640 液体培养基(美国 Gibco 公司);小牛血清(奥地利 PAA 公司);噻唑蓝 MTT(美国 Amresco 公司);细菌脂多糖,人纤维连接蛋白(美国 Sigma 公司);牛血清白蛋白(德国 Roche 公司);Transwell 小室(美国 Corning Costa 公司);TransAM 蛋白提取试剂盒、TransAM NF- κ B family 试剂盒(美国 Active Motif 公司);BCA 蛋白测定试剂盒(上海碧云天公司);苏木精-伊红染液(南京建成生物工程研究所);重组人 MCP-1(英国 Prospec 公司);其余化学试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

Z-323K 冷冻离心机(德国 Hermle 公司);细胞培养箱(德国 Heraeus 公司);酶标仪(奥地利 Sunrise 公司);Axiovert 40 CFL 倒置荧光显微镜(德国 Zeiss 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

THP-1 细胞悬浮培养于含有 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中,在 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中常规培养。实验前换无血清培养基饥饿 1 h,在实验中空白对照组均给予等体积 RPMI-1640 培养基。取处于对数生长期的细胞进行后续实验。

2.2 细胞增殖实验

将 THP-1 细胞以每毫升 1×10^5 个接种于 96 孔板,加入不同浓度的 UA(10, 30, 50 μ mol/L),另设空白对照组,每组设 3 个复孔,重复 3 次。在培养箱中作用 24 h 后,加入无血清 RPMI-1640 培养基和 5 mg/mL MTT 溶液(9:1),37 °C、5% CO₂ 细胞

培养箱中孵育 3 h;弃去上述培养液,加入 DMSO,微量振荡器振荡 10 min 溶解蓝紫色结晶,酶标仪测定吸收度(测定波长 570 nm,参比波长 650 nm)并记录 A_{570} 。

2.3 黏附实验

将 THP-1 细胞以每毫升 1×10^5 个接种于 96 孔板,加入不同浓度的 UA(10, 30, 50 μ mol/L),另设空白对照组和模型组,在培养箱中作用 24 h 后,模型组和给药组给予 10 μ g/mL LPS 诱导 3 h。将经上述处理过的 THP-1 细胞以每毫升 5×10^5 个接种于预先以 10 μ g/mL 人纤维连接蛋白 4 °C 包被过夜的 96 孔板中,每组设 3 个复孔,37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 3 h;将细胞液吸出,MTT 法显色,酶标仪测定吸收度。实验至少重复 3 次,比较 UA 对细胞的黏附率的影响。实验平行做两份,且至少重复 3 次。黏附率(%) = 各组吸收度/空白对照组吸收度 $\times 100$ 。

2.4 迁移实验

THP-1 细胞的迁移实验在 Transwell 小室中测定,Transwell 小室分上、下两室,之间以 8 μ m 聚碳酸酯膜分隔开。将 THP-1 细胞以每毫升 5×10^5 个接种于 24 孔板,预先给予不同浓度的熊果酸(10, 30, 50 μ mol/L),并设空白组和模型组,在培养箱中孵育 24 h 后,模型组和给药组给予 LPS 刺激 3 h。然后将经上述处理后的细胞以每毫升 5×10^6 个接种于 Transwell 小室的上室,下室中加入含 50 ng/mL 重组人 MCP-1 的培养基作为趋化物,置于培养箱中孵育 3 h 后取出,吸去上室中的细胞培养液,并用棉签擦净聚碳酸酯膜的上表面,迁移至膜下表面的细胞用苏木精-伊红(HE)染液染色并在显微镜下观察。计数 10 个视野中的细胞数,取平均值。实验平行做两份,且至少重复 3 次。细胞迁移率(%) = 各组迁移至膜下表面的细胞数/空白组迁移至膜下表面的细胞数 $\times 100$ 。

2.5 MCP-1 mRNA、CCR2 mRNA 表达的测定

将 THP-1 细胞以每毫升 5×10^5 个接种于 6 孔板,加入不同浓度的熊果酸(10, 30, 50 μ mol/L),另设空白对照组和模型组,在培养箱中作用 24 h 后,模型组和给药组给予 10 μ g/mL LPS 诱导 3 h。每组 1×10^6 个细胞,由 Trizol 提取液,以氯仿/异丙醇法抽提各组细胞总 RNA, $A_{260/280}$ 测定 RNA 纯度。逆转录合成 cDNA。于 PCR 反应体系 25 μ L 中加

入模板 cDNA 1 μL 进行 PCR 扩增, 18S 作为内参, 实验重复 3 次。引物由北京赛百盛公司合成。18S 上游引物: 5'-GATATGCTCATGTGCTGTTG-3', 下游引物: 5'-AATCTTCTTCAGTCGCTCCA-3', 236 bp, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 共 29 个循环; MCP-1 上游: 5'-GATGCAATCAATGCCCCAGT-3', 下游: 5'-TTGCTTGTCCAGGTGGTCCAT-3', 205 bp, 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 共 27 个循环; CCR2 上游: 5'-CCACATCTCGTTCTCGGTTTATCAG-3', 下游: 5'-CGTGGAAAATAAGGGCCACAG-3', 582 bp, 95 $^{\circ}\text{C}$ 9 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 共 31 个循环。PCR 产物经含 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溴化乙锭 (EB) 染色液的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳扫描图像用 Quantity one 软件进行密度分析, 分别以目的条带扩增产物电泳条带总灰度与 18S 电泳条带总灰度之比表示各自 mRNA 的相对强度。

2.6 NF- κB 活性测定

将 THP-1 细胞以每毫升 5×10^5 个接种于 6 孔板, 加入 UA 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 另设空白对照组和模型组, 在培养箱中作用 24 h 后, 模型组和给药组给予 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 诱导 3 h。按试剂盒要求提取细胞核蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。每组取核蛋白 10 μg 按照 TransAM 试剂盒要求测定 NF- κB 家族 5 个转录因子的活性: 将核蛋白加于预包被有 NF- κB 特异的寡核苷酸双链探针的 96 孔板中, 轻微震荡 1 h, 洗板后, 分别加入 p65、p50、c-Rel、p52 和 RelB 单抗反应 1 h; 洗板后, 加入辣根过氧化物酶交联的二抗及展开液, 酶标仪测定吸收度 (测定波长 450 nm, 参比波长 655 nm) 并定量。以吸收度表示被测样品 NF- κB DNA 结合活性的相对值。每组设 3 个复孔, 重复 4 次。

2.7 统计分析

实验所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 以表示。用 SPSS 13.0 进行统计处理, 组间比较采用方差分析及 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 判定为有显著性差异。

3 结果

3.1 UA 对 THP-1 细胞增殖的影响

与空白对照组相比, 熊果酸 10, 30, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 孵育 24 h 虽能抑制 THP-1 细胞增殖, 但无统计学意义 (图 1)。提示在此浓度范围内熊果酸的作用与其细胞毒性无关。

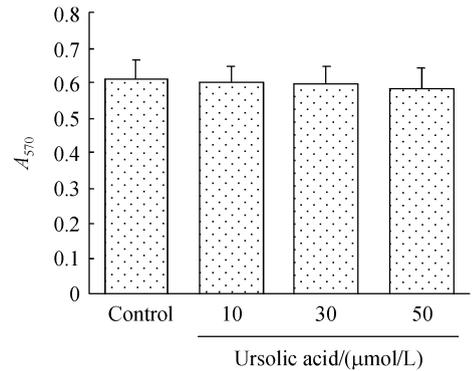


Figure 1 Effect of ursolic acid on THP-1 proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

3.2 UA 对 LPS 诱导的 THP-1 细胞黏附功能的影响

与空白对照组相比, 用 LPS 处理的 THP-1 细胞模型组与人纤维连接蛋白的黏附率显著增高 [$(126.11 \pm 6.37)\%$, $P < 0.01$], 预先与不同浓度的 UA 孵育能降低黏附水平, 其中与模型组相比, 低浓度 UA 组 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 黏附率为 $(117.69 \pm 5.87)\%$, 无显著差异, 而中浓度 UA 组 (30 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 黏附率 $(96.11 \pm 10.53)\%$ 和高浓度 UA 组 (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 黏附率 $(94.41 \pm 8.38)\%$ 都存在显著性差异 ($P < 0.001$), 高、中浓度组间无显著差异 (图 2)。提示 UA 能降低由 LPS 刺激而升高的 THP-1 细胞与人纤维连接蛋白的黏附率。

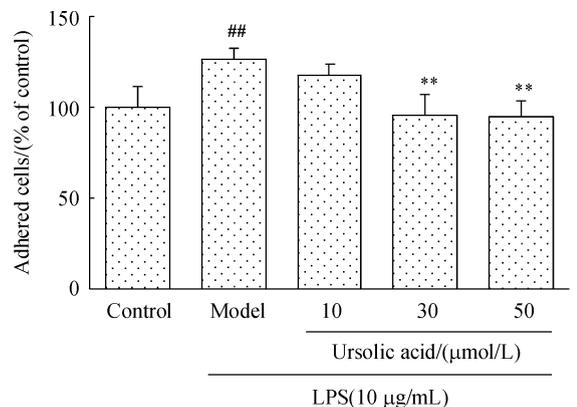


Figure 2 Effect of ursolic acid on lipopolysaccharide (LPS)-induced THP-1 cells adhesion capability ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.01$ vs model group

3.3 UA 对 LPS 诱导的 THP-1 细胞迁移功能的影响

给予 LPS 刺激的 THP-1 细胞模型组与空白组相比, 经 MCP-1 趋化而迁移至 Transwell 小室聚碳酸酯膜下表面的 THP-1 细胞的数量明显增加 [$(167.28 \pm 11.91)\%$, $P < 0.01$], 而预先与 UA 共孵育的 THP-1 细胞迁移率则较模型组显著减少。其中低浓度 UA 组 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 迁移率 $(131.34 \pm$

12.82)% ($P < 0.05$), 中浓度 UA 组 (30 $\mu\text{mol/L}$) 迁移率 (128.38 \pm 9.72)% ($P < 0.05$)。高浓度 UA 组 (50 $\mu\text{mol/L}$) 迁移率 (88.76 \pm 6.44)% ($P < 0.01$)。高、中浓度组间存在显著性差异 ($P < 0.01$) (图 3)。提示 UA 可显著降低 LPS 刺激而升高的 THP-1 细胞的迁移率, 且作用呈剂量依赖性, 以高浓度 (50 $\mu\text{mol/L}$) 最为显著。

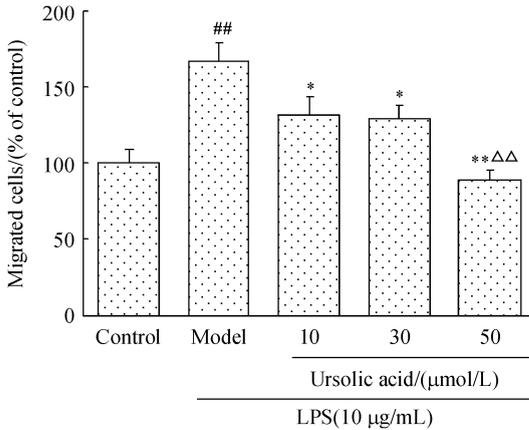


Figure 3 Effect of ursolic acid on LPS-induced THP-1 cells migration capability ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs 30 $\mu\text{mol/L}$ ursolic acid group

3.4 UA 对 LPS 诱导的 THP-1 细胞中 MCP-1、CCR2 mRNA 表达的影响

未受 LPS 刺激的 THP-1 细胞有少量 MCP-1、CCR2 mRNA 表达, 而在 LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) 刺激 3 h 后, MCP-1、CCR2 mRNA 表达均有显著增加 ($P < 0.01$); UA 高 (50 $\mu\text{mol/L}$)、中浓度 (30 $\mu\text{mol/L}$) 给药组 MCP-1 mRNA 表达较模型组显著降低 ($P < 0.05$), UA 各剂量组 CCR2 mRNA 表达均较模型组显著下降 ($P < 0.05$) (图 4)。提示 UA 可以降低 LPS 刺激而升高的 MCP-1、CCR2 mRNA 表达水平。

3.5 UA 对 LPS 诱导的 THP-1 细胞中 NF- κ B 活性的影响

THP-1 细胞经 LPS 刺激后, NF- κ B 家族中 p65, p50, p52, Rel B 的活性显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, UA 高浓度 (50 $\mu\text{mol/L}$) 可显著降低 p65, p50, c-Rel 的活性 ($P < 0.01$) (图 5)。提示 UA 高浓度可以抑制 LPS 刺激而升高的 NF- κ B 活性。

4 讨论

单核/巨噬细胞在动脉粥样硬化等炎症相关性

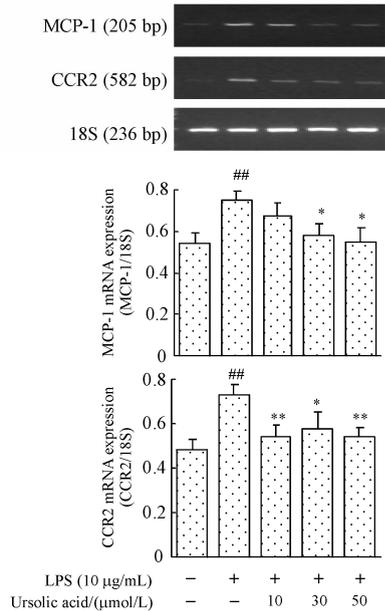


Figure 4 Effects of ursolic acid on mRNA levels of MCP-1 and CCR2 in LPS-induced THP-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

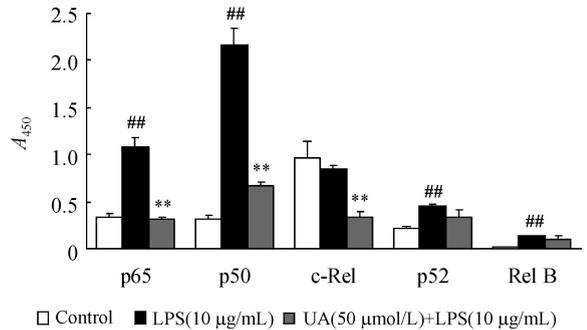


Figure 5 Effects of ursolic acid on LPS-induced activation of NF- κ B family members ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

疾病的发生、发展过程中起着重要作用^[6], 而大量的研究表明单核细胞的趋化主要是由单核细胞趋化蛋白 MCP-1 来实现的。MCP-1 属于趋化细胞因子家族中的 β 家族 (即 C-C 亚家族) 成员之一, 能够特异性地作用于外周血中的单核细胞, 招引其迁移至内皮下, 构成了动脉粥样硬化发生、发展的重要机制^[7]。MCP-1 的趋化作用通过其特异性受体 CCR2 完成, 因此, 阻断 MCP-1 及 CCR2 的作用有助于阻止早期血管炎症反应和稳定斑块。

单核/巨噬细胞细胞的增殖、黏附、迁移是其功能性的体现, 本研究首先考察 UA 对 LPS 诱导的 THP-1 细胞炎症模型的功能性的影响, 结果表明 UA 预先孵育 24 h 可降低 LPS 刺激而升高的细胞

黏附、迁移水平,其中以高浓度(50 $\mu\text{mol/L}$)最为显著,且对细胞增殖能力无影响。为证实 UA 的这一效应通过降低 MCP-1 及 CCR2 表达来实现,通过 RT-PCR 实验,结果显示 UA 能够显著抑制 LPS 刺激而升高的 MCP-1、CCR2 mRNA 的表达。

Shishodia 等^[8]发现,UA 可抑制 TNF- α 、佛波酯、冈田酸、 H_2O_2 和香烟所致的 NF- κB 的激活作用,并且无细胞特异性。它还可抑制 NF- κB 与 DNA 的结合作用,同时,抑制 I $\kappa\text{B}\alpha$ 的降解,I $\kappa\text{B}\alpha$ 磷酸化,I $\kappa\alpha$ 激酶的激活,p65 磷酸化,p65 亚基的核转移,NF- κB 依赖性报告基因的表达等;另一方面,绝大多数炎症反应通过 NF- κB 途径介导^[9],因此推测 UA 通过抑制 NF- κB 的活化而起到降低 THP-1 细胞黏附、迁移和抑制 MCP-1、CCR2 mRNA 表达的作用。NF- κB 是与免疫球蛋白重链和 k 轻链基因增强子序列(5'-GGGACTTTC-3')特异结合的核蛋白因子。在哺乳动物细胞中有两组共 5 种 Rel/NF- κB 家庭成员: NF- $\kappa\text{B}1$ (p50)、NF- $\kappa\text{B}2$ (p52)为一组,另一组包括 Rel A (p65)、Rel B、c-Rel^[10]。本研究选择 UA 高浓度(50 $\mu\text{mol/L}$)研究对 NF- κB 活性的影响。NF- κB 活性测定方法采用 TransAM NF- κB 活性检测试剂盒,该试剂盒基于 ELISA 法,检测方法同传统的凝胶电泳迁移率实验(EMSA)原理相同,无放射性污染;灵敏度为 EMSA 的 40 倍,较 Western blot 法更适合大规模快速筛选^[11]。LPS 刺激后,p65 蛋白磷酸化并发生核转移至核内激发多种炎症基因的转录^[12],UA 可显著降低 p65 蛋白的活化;LPS 诱导的 p50 上调被认为是细胞耐受 LPS 所必须的步骤^[13],UA 下调 p50 活性,可能与其降低了 LPS 对细胞造成的损伤有关。另外,UA 显著降低了 c-Rel 的活性,c-Rel 被认为与调控凋亡有关^[14],这一作用与 UA 的抗凋亡活性相符。

本实验通过观察熊果酸对 LPS 诱导的 THP-1 细胞炎症模型黏附、迁移功能的影响,进而探讨其作用机制。结果显示,熊果酸可显著下调 LPS 诱导升高的 MCP-1、CCR2 mRNA 表达,这一作用可能是通过抑制 NF- κB 活化而体现出来的。

参考文献

[1] 徐斌(Xu B). 巨噬细胞移动抑制因子在动脉粥样硬化中的作用研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志(*Chin J Arterio-*

scler),2004,12(2):238-240.

- [2] 王凤荣(Wang FR),杨关林(Yang GL),张哲(Zhang Z),等.单核细胞趋化蛋白-1与动脉粥样硬化的研究进展[J]. 中国实用内科杂志(*Chin J Pract Intern Med*),2002,22(12):756-757.
- [3] Gu L,Okada Y,Clinton SK,et al. Absence of Monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density receptor-deficient mice [J]. *Mol Cell*,1998,2(2):275-281.
- [4] 郑开波(Zheng KB),孙成斌(Sun CB),毛海立(Mao HL),等.熊果酸化学结构修饰与构效关系的研究进展[J]. 中国药科大学学报(*J China Pharm Univ*),2009,40(6):580-584.
- [5] 王建梅(Wang JM),向敏(Xiang M),吴萍萍(Wu PP),等.熊果酸抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖的作用及其机制[J]. 中国药科大学学报(*J China Pharm Univ*),2010,41(6):66-69.
- [6] Kindt TJ,Osborne BA,Goldsby RA. *Kuby Immunology*[M]. 6th ed. San Francisco: WH Freeman,2007:348.
- [7] Yla-Herttuala S,Lipton BA,Rosenfeld ME,et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1991,88(12):5252-5256.
- [8] Shishodia S,Majumdar S,Banerjee S,et al. Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of I $\kappa\text{B}\alpha$ kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1 [J]. *Cancer Res*,2003,63(15):4375-4383.
- [9] Fan J,Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *J Atheroscler Thromb*,2003,10(2):63-71.
- [10] 李红(Li H),杜群(Du Q),王汝俊(Wang RJ),等.溃疡结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 NF- κB DNA 结合活性的作用[J]. 世界华人消化杂志(*World Chin J Digestol*),2008,16(6):663-666.
- [11] Renard P,Ernest I,Houbion A,et al. Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NF- κB [J]. *Nucleic Acids Res*,2001,29(4):E21.
- [12] O'Connor W Jr,Harton JA,Zhu X,et al. Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF- κB suppressive properties [J]. *J Immunol*,2003,171(12):6329-6333.
- [13] Kastenbauer S,Ziegler-Heitbrock HW. NF- $\kappa\text{B}1$ (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression [J]. *Infect Immun*,1999,67(4):1553-1559.
- [14] Bernard D,Monte D,Vandenbunder B,et al. The c-Rel transcription factor can both induce and inhibit apoptosis in the same cells via the upregulation of MnSOD [J]. *Oncogene*,2002,21(28):4392-4402.