

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.32.006

白藜芦醇对 β 淀粉样蛋白_{1~42} 刺激内皮细胞炎症因子表达的影响*

李焱平¹, 刘礼富¹, 胡高强¹, 张 静², 姜 鲜^{2△}

(1. 四川省泸县人民医院检验科 646100; 2. 泸州医学院附属医院麻醉科, 四川泸州 646000)

[摘要] 目的 探索白藜芦醇对 β 淀粉样蛋白_{1~42} ($A\beta_{1~42}$) 刺激内皮细胞炎症因子 IL-1、IL-6 与 TNF- α 表达影响。方法 5×10^4 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{1~42}$ 刺激人脐静脉内皮细胞(HUVEC)24 h, 同时给予白藜芦醇 160、80、40、20 $\mu\text{g/L}$ 干预, CCK-8 法检测 HUVEC 细胞活性; ELISA 法检测 IL-1、IL-6 和 TNF- α 水平。结果 与模型组比较, 白藜芦醇各浓度组可以明显提高 $A\beta_{1~42}$ 刺激后 HUVEC 细胞活性, 抑制 $A\beta_{1~42}$ 致 HUVEC 的 IL-1、IL-6 与 TNF- α 表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 20 $\mu\text{g/L}$ 以上浓度白藜芦醇可减少 $A\beta_{1~42}$ 致 HUVEC 炎症因子 IL-1、IL-6 与 TNF- α 的表达。

[关键词] 内皮细胞; 白藜芦醇; β 淀粉样蛋白_{1~42}; 炎症因子

[中图分类号] R966

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)32-4481-02

The effects of resveratrol on the express of inflammatory factors of human umbilical vein endothelial cells induced by $A\beta_{1~42}$ *

Li Yanping¹, Liu Lifu¹, Hu Gaoqiang¹, Zhang Jing², Jiang Xian^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Luxian County, Luzhou, Sichuan 646100, China;

2. Department of Anesthesiology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of resveratrol on the express of inflammatory factors (IL-1, IL-6, TNF- α) of human umbilical vein endothelial cells(HUVEC) induced by $A\beta_{1~42}$. **Methods** HUVEC were stimulated with $A\beta_{1~42}$ 5×10^4 $\mu\text{mol/L}$, last 24 h and administrated with resveratrol 160, 80, 40, 20 $\mu\text{g/L}$, HUVEC viability were detected by CCK-8; the concentration of IL-1, IL-6 and TNF- α were detected by ELISA. **Results** Compared with model group, 160, 80, 40, 20 $\mu\text{g/L}$ resveratrol could increase HUVEC survival rate, reduced HUVEC damage by $A\beta_{1~42}$, inhibited the concentration of IL-1, IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$). **Conclusion** Resveratrol over 20 $\mu\text{g/L}$ could reduce the release of IL-1, IL-6 and TNF- α of HUVEC inducing by $A\beta_{1~42}$.

[Key words] endothelial cell; resveratrol; beta amyloid peptide_{1~42}; inflammatory factors

β 淀粉样蛋白(β amyloid protein, $A\beta$) 沉积导致血管内皮损伤是阿尔茨海默病(alzheimer disease, AD)发病机制之一^[1]。白藜芦醇是多年生草本植物蓼科蓼属虎杖的根茎中的提取物, 分子式为 $C_{14}H_{12}O_3$, 相对分子质量为 228.25, 白色针状晶体^[2]。广泛存在于葡萄、花生、虎杖等天然食物或药物中, 以虎杖中含量最高, 具有抗炎、抗血小板聚集、抗氧化等生物药理活性^[3-4]。但是白藜芦醇能否减少 $A\beta_{1~42}$ 致人脐静脉内皮细胞(HUVEC)炎症因子释放, 提高 $A\beta_{1~42}$ 刺激后 HUVEC 活性目前还不清楚。据此, 本文通过观察不同剂量白藜芦醇对 $A\beta_{1~42}$ 刺激后 HUVEC 细胞活性及炎症因子 IL-6、IL-1、TNF- α 释放关系, 为白藜芦醇用于治疗 AD 提供科学依据。

1 材料与与方法

1.1 试剂与仪器 HUVEC 细胞株(上海拜力生物试剂有限公司); 白藜芦醇(成都普瑞法科技开发有限公司, 批号: 20130409, 纯度大于 95%); IL-1、TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒(晶美生物工程有限公司); $A\beta_{1~42}$ (北京奥普森有限公司); CCK-8 试剂盒(碧云天生物技术研究); 超净工作台(苏州净化设备有限公司, SW-CJ-1F 型); 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司, CKX41 型); 酶标仪(美国 BIO-RAD 公司, 550 型)。

1.2 CCK-8 法检测白藜芦醇对 $A\beta_{1~42}$ 干预后 HUVEC 细胞活性影响 将 $A\beta_{1~42}$ 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 周使其变为聚集状态

用, HUVEC 细胞株采用 RPMI 1640+10% 胎牛血清+青链霉素培养^[5]。将对数生长期的 HUVEC 按 $1 \times 10^5/\text{L}$ 接种。每个浓度 3 个复孔, 选择 $A\beta_{1~42}$ 5×10^4 $\mu\text{mol/L}$ 刺激 24 h 作为 HUVEC 细胞凋亡模型, 将细胞分为模型组($A\beta_{1~42}$ + 细胞), 白藜芦醇组(白藜芦醇 160、80、40、20 $\mu\text{g/L}$ + $A\beta_{1~42}$ + 细胞), 阴性组(细胞 + 培养基), 24 h 后每孔加入 CCK-8 10 μL 继续培养 1 h, 酶标仪 450 nm 波长下检测各孔吸光度值, 以 OD_{450} 值反应细胞活力情况, 连续重复 3 次。

1.3 ELISA 法检测白藜芦醇对 $A\beta_{1~42}$ 干预后 HUVEC 的 IL-1、IL-6 和 TNF- α 影响 将各组处理 24 h 后取上清液, 严格按照说明书进行操作, 450 nm 处测量 OD_{450} 值。

1.4 统计学处理 用 SPSS16.0 统计软件进行分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 白藜芦醇对 $A\beta_{1~42}$ 刺激 HUVEC 后细胞活性影响 阴性组细胞活性明显强于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 白藜芦醇各亚组均可改善 $A\beta_{1~42}$ 刺激后 HUVEC 细胞活性, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。

2.2 白藜芦醇对 $A\beta_{1~42}$ 刺激 HUVEC 的 IL-1、IL-6 和 TNF- α 影响 与模型组比较, 阴性组 IL-1、IL-6 和 TNF- α 表达较低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。白藜芦醇各亚组干预后可减

* 基金项目: 四川省科技厅-泸州医学院联合项目(14JC0181); 泸州市科技局课题(2012S37)。 作者简介: 李焱平(1975—), 主管检验师, 本科, 主要从事生化检验工作。 △ 通讯作者, E-mail: 18989131890@163.com。

少 $A\beta_{1-42}$ 刺激后 HUVEC 的 IL-1、IL-6 和 TNF- α 的分泌,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 1。

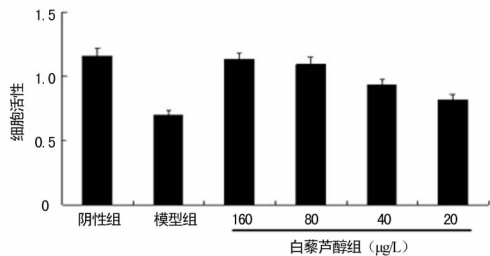


图 1 白藜芦醇对 $A\beta_{1-42}$ 刺激 HUVEC 后细胞活性情况

表 1 白藜芦醇对 $A\beta_{1-42}$ 刺激 HUVEC 后 IL-1、IL-6 和 TNF- α 的影响 ($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	IL-1	IL-6	TNF- α
阴性组	43.21±0.77**	37.27±1.53**	288.64±27.21**
模型组	694.52±13.27	767.11±16.54	1 657.35±47.88
白藜芦醇组			
20 μg/L	397.51±23.18*	479.43±13.03*	1 210.17±33.21*
40 μg/L	347.23±7.86**	417.37±21.34*	1 042.55±17.34*
80 μg/L	297.55±14.56**	345.51±17.23**	971.26±18.22**
160 μg/L	197.47±21.34**	219.17±9.51**	744.31±33.57**

* : $P<0.05$; ** : $P<0.01$, 与模型组比较。

3 讨 论

白藜芦醇在脑缺血及再灌注损伤、神经退行性疾病和癫痫发作等神经系统疾病的防治上有一定作用^[6-7]。 $A\beta$ 致血管内皮炎症反应,细胞凋亡可能是产生 AD 的原因之一^[8]。但 $A\beta$ 如何致血管内皮的过程与机制目前并未完全清楚,有人认为可能与 $A\beta$ 致血管内皮细胞细胞凋亡,产生炎症反应等有关^[9]。研究显示 $A\beta$ 聚集和沉积激活小胶质细胞并产生 TNF- α ,诱导胞内产生过多氧自由基,损伤神经元^[10]。胶质细胞的活化还可导致 IL-1 的过度表达和释放,继而诱发 IL-6、 γ -干扰素(interferon- γ 、INF- γ)等细胞因子的表达^[11],这些分子通过作用于胶质细胞或神经元,形成交互作用影响胶质细胞或神经元,促成了慢性炎症产物贯穿 AD 病理损伤的不同阶段,并在病理发展的全过程中发挥作用^[12-14]。

HUVEC 较为稳定,易于实验操作,故本研究选择 HUVEC 作为研究。CCK-8 结果显示白藜芦醇 4 个浓度组可以增加 $A\beta$ 刺激血管内皮细胞后存活率,减轻 $A\beta$ 致血管内皮细胞损伤;抑制 $A\beta$ 致 HUVEC 的 IL-1、IL-6 与 TNF- α 表达。

综上所述,白藜芦醇能提高 $A\beta$ 刺激后 HUVEC 细胞活性,此作用可能与减少炎症因子 IL-1、IL-6 与 TNF- α 的产生有关,在防治 AD 上有一定意义。

参考文献

[1] Karch CM, Jeng AT, Nowotny P, et al. Expression of novel Alzheimer's disease risk genes in control and Alzheimer's disease brains[J]. PLoS One, 2012, 7(11):e50976.

[2] Pirola L, Frojdo S. Resveratrol: one molecule, many targets[J]. IUBMB Life, 2008, 60(5):323-332.

[3] Nakata R, Takahashi S, Inoue H. Recent advances in the study on resveratrol[J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(3):273-279.

[4] Bass TM, Weinkove D, Houthoofd K, et al. Effects of resveratrol on lifespan in Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans[J]. Mech Ageing Dev, 2007, 128(10):546-552.

[5] Shen WX, Chen JH, Lu JH, et al. TGF- β 1 Protection against $A\beta_{1-42}$ -Induced Neuroinflammation and Neurodegeneration in Rats[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(12):22092-22108.

[6] Tomasello B, Grasso S, Malfa G, et al. Double-Face Activity of Resveratrol in Voluntary Runners: Assessment of DNA Damage by Comet Assay[J]. J Med Food, 2012, 15(5):441-447.

[7] Frozza RL, Bernardi A, Hoppe JB, et al. Lipid-core nanocapsules improve the effects of resveratrol against Abeta-induced neuroinflammation[J]. J Biomed Nanotechnol, 2013, 9(12):2086-2104.

[8] Maier JA. Endothelial cells and magnesium: implications in atherosclerosis[J]. Clin Sci (Lond), 2012, 122(9):397-407.

[9] Zhang R, Xu J, Liu YY, et al. Propofol may protect PC12 cells from β -amyloid25-35 induced apoptosis through the GSK-3 β signaling pathway[J]. Chin Med J, 2013, 126(10):1884-1889.

[10] Yang YM, Shang DS, Zhao WD, et al. Microglial TNF- α -dependent elevation of MHC class I expression on brain endothelium induced by amyloid-beta promotes T cell transendothelial migration[J]. Neurochem Res, 2013, 38(11):2295-2304.

[11] Frozza RL, Bernardi A, Hoppe JB, et al. Lipid-core nanocapsules improve the effects of resveratrol against Abeta-induced neuroinflammation[J]. J Biomed Nanotechnol, 2013, 9(12):2086-2104.

[12] Song SY, Jung YY, Hwang CJ, et al. Inhibitory effect of ent-Saichinone on amyloidogenesis via inhibition of STAT3-mediated NF- κ B activation in cultured astrocytes and microglial BV-2 cells[J]. J Neuroinflammation, 2014, 11:118.

[13] Xiong Z, Thangavel R, Kempuraj D, et al. Alzheimer's disease: evidence for the expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in the brain[J]. J Alzheimers Dis, 2014, 40(2):297-308.

[14] Mitsuhashi M, Taub DD, Kapogiannis D, et al. Aging enhances release of exosomal cytokine mRNAs by $A\beta_{1-42}$ -stimulated macrophages[J]. FASEB J, 2013, 27(12):5141-5150.