

肝素寡糖对脂多糖诱导人脐静脉内皮细胞炎症的影响及分子机制研究

张玲玲, 季璇馨, 刘洁茹, 黄青林, 何书英*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 以脂多糖(LPS)诱导人脐静脉内皮细胞 HUVECs 炎症损伤, 探讨肝素寡糖对炎症的影响及其分子机制。实验分为空白组(0.5%血清培养基)、模型组(LPS + 0.5%血清培养基)及给药组(LPS + 0.5%血清培养基 + 0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ HDO), 采用活性氧实验检测细胞内活性氧簇水平, Western blot 检测 VCAM-1、p38、p-p38 及核转录因子 NF- κ B 等关键蛋白的表达水平。结果显示 0.01、0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 HDO 可抑制 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS 诱导的 HUVECs 炎症因子 VCAM-1 表达水平, 较弱的影响细胞中 NF- κ B 分布, 并下调信号通路中关键蛋白 p38 和 p-p38 表达。结果表明, HDO 可能通过抑制炎症信号通路中关键蛋白的表达水平来抑制炎症因子的表达, 从而起到抗炎作用。

关键词 肝素寡糖; 内皮细胞; 动脉粥样硬化; 抗炎作用; 脂多糖

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)05-0619-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160520

引用本文 张玲玲, 季璇馨, 刘洁茹, 等. 肝素寡糖对脂多糖诱导人脐静脉内皮细胞炎症的影响及分子机制研究[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(5): 619-624.

Cite this article as: ZHANG Lingling, JI Xuanxin, LIU Jieru, *et al.* Effect of heparin-derived oligosaccharide on lipopolysaccharides-induced inflammation in HUVECs and its molecular mechanisms[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(5): 619-624.

Effect of heparin-derived oligosaccharide on lipopolysaccharides-induced inflammation in HUVECs and its molecular mechanisms

ZHANG Lingling, JI Xuanxin, LIU Jieru, HUANG Qinglin, HE Shuying*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract In this study, the effect of heparin-derived oligosaccharide (HDO) on lipopolysaccharides (LPS)-induced inflammation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and the molecular mechanisms were investigated. The generation of intracellular reactive oxygen species (ROS) was detected by 20, 70-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Experiment is divided into blank group (0.5% serum medium), model group (LPS + 0.5% serum medium) and HDO dosing group (LPS + 0.5% serum medium + 0.01, 0.1, 1 mol/L HDO). The intracellular reactive oxygen species level was detected by reactive oxygen species experiment, the level of key regulatory proteins p38 and p-p38 in MAPK pathways and VCAM-1 were determined by Western blot. The results showed that HDO at 0.01, 0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$ could inhibit the expression of VCAM-1 in HUVECs induced by 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS, and reduce the expression of key regulatory proteins p38 and p-p38, but could not obviously affect NF- κ B nuclear translocation. The results all above showed that HDO could decrease the key regulatory proteins expression, and suppress the transcription of VCAM-1, resulting in inhibiting inflammation.

Key words heparin-derived oligosaccharide (HDO); human umbilical vein endothelial cells; atherosclerosis; anti-inflammation; lipopolysaccharides

收稿日期 2016-03-12 ***通信作者** Tel: 13770913790 E-mail: heshuying92@126.com

基金项目 江苏高校品牌专业建设工程资助项目 (No. PPZY2015A057); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 江苏高校优秀科技创新团队资助项目

This study was supported by the Construction Project of Brand Speciality of Jiangsu Higher Education Institutions (No. PPZY2015A057); the Priority Academic Program Development (PAPD) of Jiangsu Higher Education Institutions; and the Innovative Scientific Research Team Fund of Jiangsu Province

肝素寡糖 (heparin-derived oligosaccharide, HDO) 是指由低分子量肝素分离纯化得到, 但生物活性与普通肝素不同的一种低分子量和窄分子量分布的寡糖。动脉粥样硬化 (AS) 可引发一系列心脑血管疾病, 而血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMCs) 的大量增殖是导致 AS 的重要因素, 而 HDO 具有抑制 VSMCs 增殖的作用。本实验室前期研究发现, HDO 可以显著抑制 10% 新生牛血清 (NCS) 诱导的细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 的活化, 并阻滞细胞从 G_1 期向 S 期转化, 从而显著抑制 10% NCS 诱导的 VSMCs 的增殖^[1-2]。此外, 还发现 HDO 能抑制由血管内皮生长因子 (VEGF) 和血小板衍生因子 (PDGF) 诱导的 VSMCs 的增殖, 主要是通过抑制 PKC、MAPK 和 Akt/PI3K 信号通路中关键蛋白的表达, 来抑制原癌基因表达以及细胞 G_1 /S 期的转换^[3-5]。本实验室前期主要研究 HDO 抑制 VSMCs 增殖及其分子机制, 然而 HDO 对脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 引起的 HUVECs 炎症损伤的保护作用和分子机制尚未做研究, 因此本实验以 LPS 建立内皮细胞炎症损伤模型, 初步探讨 HDO 对 LPS 诱导的 HUVECs 炎症和分子机制的影响。

内皮细胞受到炎症损伤时会使单核细胞通过黏附因子聚集在内皮细胞表面的能力增强, 同时促进其进入血管壁中。研究发现单核细胞可通过多种方式促进粥样斑块的形成, 其中主要有 3 种黏附分子参与单核细胞的黏附, 包括血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 和内皮细胞选择素 (E-selectin)^[6]。在动脉粥样硬化的病理过程中, 内皮细胞损伤被认为是第一步, 引起这种损伤的因素包括氧化低密度脂蛋白 (OX-LDL)、血管紧张素 II (Ang II)、晚期糖基化终末产物 (AGEs)、LPS 和剪切应力等^[7]。在 OX-LDL 存在的情况下, 革兰阴性菌细胞壁成分 LPS 能引发泡沫细胞的形成^[8]。内皮细胞受到炎症损伤可改变内皮细胞分泌功能以及减弱其抗氧化能力, 导致活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的过度产生, 然后引起一系列蛋白激酶的依次磷酸化, 例如

MAPK 和 I κ B 激酶通路, 最终激活 NF- κ B^[9], 被激活的 NF- κ B 会促使炎症因子的表达^[10], 炎症因子表达于细胞表面或分泌至细胞外, 继而引发单核细胞黏附^[11], 而清除胞内 ROS 以及抑制 NF- κ B 的活性可以作为血管疾病炎症治疗的一个很好的方法。因此, 此次研究把炎症信号通路中的关键蛋白和 ROS 作为研究对象, 探讨 HDO 抑制 LPS 诱导的 HUVECs 炎症反应的机制。

1 材料

1.1 试剂

相对分子质量 3 000 左右的肝素寡糖 (本实验室制备); 高糖 DMEM 培养基、新生牛血清、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); LPS (日本 Sigma 公司); Western/IP 细胞裂解液、ECL 检测液试剂盒、ROS 检测试剂盒、碘化丙啶 (PI)、4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染色液 (上海碧云天生物技术有限公司); β -actin 抗体、VCAM-1 抗体、NF- κ B (p65) 抗体、p38MAPK 抗体、p-p38MAPK 抗体 (北京博奥森生物有限公司); 羊抗兔 IgG HRP、FITC 荧光标记的二抗 (美国 Bio-world 公司)。

1.2 仪器

荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 细胞株

人脐静脉内皮细胞株 (HUVECs) 由中国药科大学生命科学与技术学院徐寒梅教授实验室提供。

2 方法

2.1 细胞培养

15% 新生牛血清 (NBCS) 的高糖 DMEM 培养基, 培养条件: 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱, 传代周期为 2~3 d。

2.2 建立人脐静脉内皮细胞炎症损伤模型

于六孔板中将 HUVECs 以每毫升 2×10^5 个细胞的浓度接种, 待细胞长至 70%~80% 时, 无血清培养基饥饿处理细胞 12 h。将细胞分为空白组 (PBS + 0.5% 血清培养基)、模型组 [LPS (10, 25,

50,100,150,200 $\mu\text{g/mL}$) + 0.5% 血清培养基], 24 h 后用 PBS 洗涤, 加入裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度并定量, 10% SDS-PAGE 电泳后将蛋白电转到 PVDF 膜上, 配制 5% 脱脂奶粉室温封闭膜 1.5 h, VCAM-1 抗体 4℃ 孵育过夜, TBST 室温洗涤 10 min, 洗 3 次, 室温避光, 羊抗兔二抗孵育 1 h, TBST 洗涤同前, 显影使用 ECL 化学发光法, 拍照使用化学发光成像系统^[12]。采用 Image J 软件进行分析, 蛋白表达量用吸收度表示, 结果表示用目标条带吸收度与内参吸收度的比值^[13]。

2.3 ROS 水平检测

于 96 孔板中将 HUVECs 以每毫升 1×10^4 个细胞的浓度接种, 培养条件同“2.1”项。将细胞分为空白对照组 (PBS + 0.5% 血清培养基)、模型组 (100 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 0.5% 血清培养基)、实验组 (100 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 0.5% 血清培养基 + 0.01, 0.1, 1 $\mu\text{mol/L}$ HDO)。用无血清培养基稀释 DCFH-DA, 使其终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。24 h 后, PBS 洗涤一遍孔板, 并每孔加入稀释好的 DCFH-DA 100 μL , 避光孵育 20 min, 在 37℃ 细胞培养箱中进行。为充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA, 用无血清培养基洗涤细胞 2~3 次, 注意避光。结果观察和拍照使用荧光显微镜完成。

2.4 Western blot 法测定信号通路中关键蛋白的表达水平

于 6 孔板中将 HUVECs 以每毫升 2×10^5 个细胞的浓度接种, 细胞培养和分组同上。24 h 后取出孔板, PBS 洗涤, 提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度并定量, 经 10% 或 12% SDS-PAGE 电泳后将蛋白电转移到 PVDF 膜上, 室温下 5% 脱脂奶粉封闭膜 1.5 h, VCAM-1、p38、p-p38 及 NF- κB (p65) 抗体湿盒内 4℃ 孵育过夜, 室温下 TBST 洗涤 10 min, 洗 3 次, 室温羊抗兔二抗避光孵育 1 h, TBST 洗涤^[12-13], 进行 Western blot 检测。

2.5 免疫荧光法检测人脐静脉内皮细胞中 NF- κB 的分布

将 HUVECs 接种于 24 孔板中, 接种浓度为每毫升 2×10^5 个细胞, 细胞培养和分组同上, 24 h 后取出孔板, 室温 PBS 洗涤孔板, 4% 多聚甲醛室温固定 45 min, PBS 室温洗涤 3 min, 洗 3 次, 0.3% PBS/Triton-X-100 室温处理 20 min, 洗涤, 湿盒内 5% BSA, 37℃ 封闭 30 min, 加 NF- κB 一抗稀释液,

置于湿盒中 4℃ 孵育过夜, 洗涤同前, 加入 FITC 标记的二抗, 置于湿盒中 37℃ 避光孵育 45 min, 洗涤, 用 DAPI 进行核染, 时间 5 min, 洗涤, 使用荧光显微镜观察结果并拍照^[13]。

3 结果

3.1 LPS 诱导建立人脐静脉内皮细胞炎症损伤模型

用不同剂量的 LPS 与人脐静脉内皮细胞进行孵育。提取细胞总蛋白后采用 Western blot 方法检测炎症因子 VCAM-1 表达水平, 以确定建立人脐静脉内皮细胞炎症损伤模型所需的 LPS 用量。如图 1 所示, 与空白对照组相比, 加入 10~25 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 能使人脐静脉内皮细胞表达少量炎症因子 VCAM-1 ($P < 0.05$), 50~150 $\mu\text{g/mL}$ 能明显增加细胞中炎症因子的表达 ($P < 0.01$), 且表达量无明显差异, 最终选用 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS, 后续实验也将用 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS 孵育细胞。

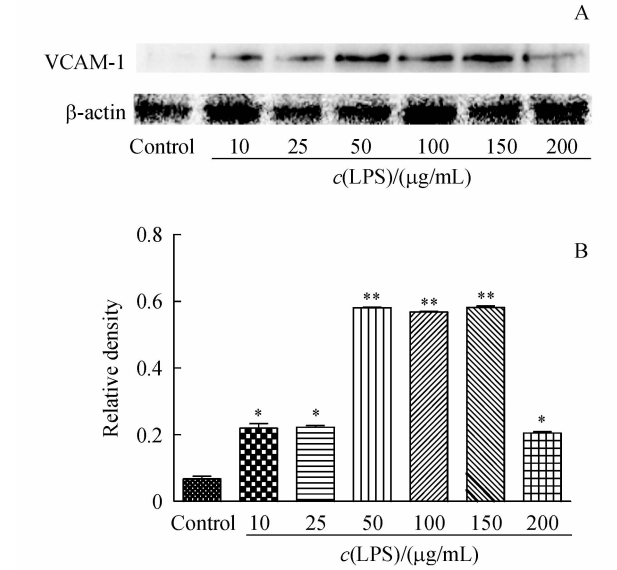


Figure 1 Inflammation model was established by lipopolysaccharides (LPS) and then vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) protein in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was analyzed by Western blot ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A; Western blot assay; B; Densitometric analysis of the relative proteins taking β -actin as reference

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 肝素寡糖对细胞内活性氧的影响

为了检测肝素寡糖对细胞在 LPS 诱导刺激下产生活性氧的影响, 使用 DCFH-DA 荧光探针亮度的强弱来表示细胞中活性氧水平高低, 如图 2 所示

正常的 HUVECs 中产生的活性氧很少, 荧光亮度较弱, 但在 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的刺激下, 细胞内活性氧明显上升, 荧光亮度较强。但在不同浓度的肝素寡糖的干预下, 细胞中活性氧的水平逐渐降低, 荧光亮度逐渐减弱。

3.3 Western blot 法测定肝素寡糖对 LPS 诱导的 VCAM-1、p38MAPK、p-p38MAPK、NF- κ B 蛋白表达的影响

如图 3 所示, 在正常的 HUVECs 中 VCAM-1、

p38MAPK 和 p-p38MAPK 的表达量很少, 细胞胞浆中 NF- κ B 表达量较多, 但在 LPS 的诱导刺激下, HUVECs 中的 VCAM-1、p38MAPK 和 p-p38MAPK 表达量明显上升 ($P < 0.01$), 细胞胞浆中 NF- κ B 表达量有所下降 ($P < 0.01$)。在不同浓度肝素寡糖的干预下, 细胞中 VCAM-1、p38MAPK 和 p-p38MAPK 的表达量明显下降, 细胞胞浆中的 NF- κ B 的表达量有不明显的升高 ($P < 0.05$)。

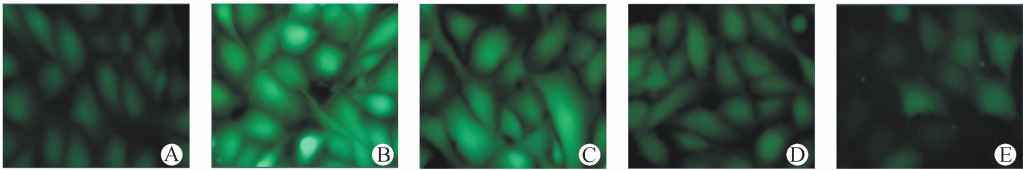


Figure 2 Inhibitory effect of heparin-derived oligosaccharide (HDO) on lipopolysaccharides (LPS) induced reactive oxygen species (ROS) overproduction. HUVECs were detected using a 20,70-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe
A: Control; B: Model (LPS 100 $\mu\text{g/mL}$); C: LPS + HDO (0.01 $\mu\text{mol/L}$); D: LPS + HDO (0.1 $\mu\text{mol/L}$); E: LPS + HDO (1 $\mu\text{mol/L}$)

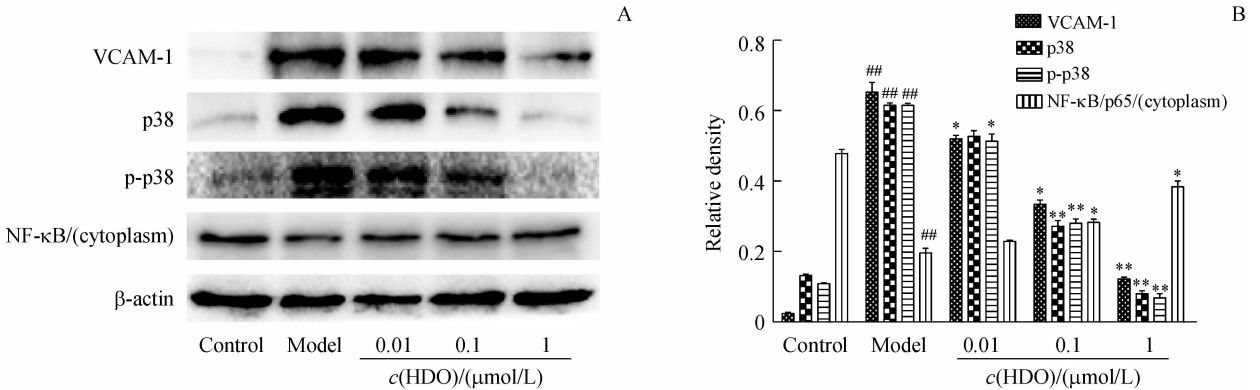


Figure 3 Effect of heparin-derived oligosaccharide (HDO) on VCAM-1, p38, p-p38 and NF- κ B proteins in HUVECs analyzed by Western blot ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
A: Western blotting assay; B: Densitometric analysis of the relative proteins taking β -actin as reference
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

3.4 免疫荧光法检测肝素寡糖对 LPS 诱导的 NF- κ B 在细胞中分布的影响

DAPI 与双股 DNA 结合, 发射蓝色荧光, FITC 呈黄绿色荧光。NF- κ B 在细胞中分布的情况使用 FITC 标记的羊抗兔 IgG 检测。如图 4 所示, 正常的细胞即空白对照组中, NF- κ B 都集中分布在细胞质中, 荧光强度较强, 细胞核中 NF- κ B 相对较少, 荧光强度相对较弱, 叠加后可看到有绿色荧光分布在核周围。模型组中 NF- κ B 都集中分布在细胞核中, 荧光强度相对较强, 细胞质中相对较少, 荧光强度相对较弱。加入不同浓度的肝素寡糖后, 细胞核中荧光强度有所减弱。

4 讨论

普通肝素 (standard heparin, SH) 解聚可得低分子肝素 (low molecular weight heparin, LMWH), 平均相对分子质量为 5 000。与 SH 比, LMWH 的优点有: 抗 FXa 作用强、抗 F II a 作用弱、生物利用度高等^[14]。不同聚合度的 HDO 可和不同的蛋白因子作用而呈现不同的生物学活性^[1]。

本实验室前期动物实验研究表明, HDO 具有抗炎活性, 具体表现为抑制炎症因子 VCAM-1 的表达。本实验主要通过 LPS 诱导 HUVECs, 建立炎症模型后, 研究 HDO 在内皮细胞中抗炎作用的分子

机制。ROS 被认为是细胞内的第二信使,它在 AS 病变和介导细胞凋亡中起着非常重要的作用^[15],同时 ROS 也是细胞内的氧化信号,将细胞外的刺激因素(高脂血症、糖尿病、吸烟)与细胞内的 AS 基因产物(炎症因子和黏附分子)联系在一起,通过 ROS 实验检测 HDO 干预后细胞中 ROS 的水平,检测结果表明 HDO 可以抑制炎症反应时期细胞内 ROS 的产生。细胞内过度产生的 ROS 导致下游的

一系列蛋白激酶、酪氨酸激酶和有丝分裂原激活蛋白激酶磷酸化,Western blot 结果表明 HDO 可抑制炎症反应信号通路中关键蛋白 p38 的表达及 p38 的磷酸化。当受到外界刺激 NF-κB 被激活后会由胞质进入胞核,与 DNA 元件结合协助转录炎症因子^[16]。免疫荧光实验检测结果表明 HDO 对 NF-κB 在细胞中分布的影响较弱,NF-κB 也许并不是 HDO 的有效作用靶点。

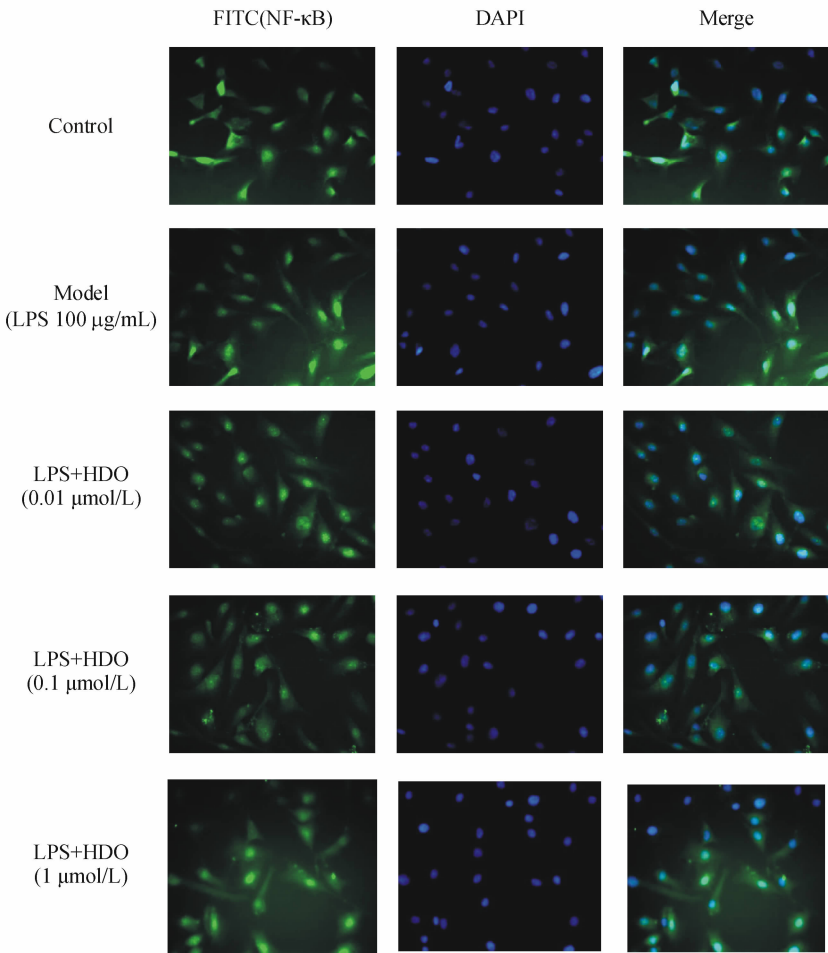


Figure 4 Heparin-derived oligosaccharide(HDO) changes the distribution of NF-κB in the nucleus and cytoplasm

综上所述,HDO 除了具有抑制 VSMCs 增殖的作用,在本实验中还发现 HDO 通过影响炎症反应信号通路中的以下环节:抑制 ROS 的水平,p38 的表达及磷酸化,及较弱的影响 NF-κB 在细胞中的分布,最终抑制炎症因子 VCAM-1 的表达,表现为抗炎作用。

参 考 文 献

[1] Li W,Chen LP,Li L,*et al.* Effect of twelve-degree of polymeriza-

tion heparin oigosaccharide on proliferation in vascular smooth muscle cells[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*(中国临床药理学与治疗学),2011,**16**(8):862-867.
[2] Li L,Gao T,He SY,*et al.* Effect of heparin-derived oligosaccharide on vascular smooth muscle cell proliferation through inhibition of PKC-α expression [J]. *Acta Pharm Sin*(药学报),2012,**47**(8):993-1000.
[3] Li L,Rui X,Liu TF,*et al.* Effect of heparin-derived oligosaccharide on vascular smooth muscle cell proliferation and the signal transduction mechanisms involved [J]. *Cardiovasc Drug Ther*,2012,**26**(6):479-488.

- [4] He SY, Wang HF, Yu DF, *et al.* The mechanisms of heparin-derived oligosaccharide on the inhibition of smooth muscle cells proliferation induced by platelet-derived growth factor[J]. *Acta Pharm Sin* (药科学报), 2015, **50**(8):993-999.
- [5] Li L, Li W, Ren Z, *et al.* Effect of heparin-derived oligosaccharide on vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *Vasc Endovascular Surg*, 2012, **46**(5):393-400.
- [6] Liu X, Pan L, Wang X, *et al.* Leonurine protects against tumor necrosis factor-mediated inflammation in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2012, **222**(1):34-42.
- [7] Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress[J]. *Circ Res*, 2000, **87**(10):840-844.
- [8] Qi M, Miyakawa H, Kuramitsu HK. Porphyromonas gingivalis induces murine macrophage foam cell formation [J]. *Microb Pathog*, 2003, **35**(6):259-267.
- [9] Bao MH, Zhang YW, Zhou HH. Paeonol suppresses oxidized low-density lipoprotein induced endothelial cell apoptosis via activation of LOX-1/p38MAPK/NF- κ B pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, **146**(2):543-551.
- [10] Li P, Wang DW, Liu XD. Tumor necrosis factor- α and its receptors in rheumatoid arthritis[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2011, **42**(3):276-283.
- [11] Chen L, Lai YS, Ji H. Effect of COX/5-LOX dual inhibitor ZLJ-6 on the expression of LPS-induced inflammation factors in macrophage cells[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2012, **43**(1):70-74.
- [12] He SY, Sun J, Liu K, *et al.* Effect of combretastatin A-4 derivative CPU-XT-006 on proliferation, apoptosis and expression of VEGF and bFGF of HUVEC *in vitro*[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2013, **44**(5):451-454.
- [13] He SY, Xiong R, Liu K, *et al.* Molecular mechanisms of combretastatin A-4 amino sugar derivative CPU-XT-008 on inhibiting proliferation of vascular endothelial cells[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2015(5):594-599.
- [14] Niu J, He SY, Li W, *et al.* Preparation of heparin derived oligosaccharides and effect of them on vascular smooth muscle cells proliferation [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2009, **16**:46-49.
- [15] de Nigris F, Lerman A, Ignarro LJ, *et al.* Oxidation-sensitive mechanisms, vascular apoptosis and atherosclerosis [J]. *Trends Mol Med*, 2003, **9**(8):351-359.
- [16] Shang Y, Zhao LY, Lu JK. Relationship between inflammatory cytokines and gastric cancer[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2015, **46**(1):123-128.