

# 盐酸苄丝肼对脂多糖所致人脐静脉内皮细胞炎症的影响及其机制研究

杨 薇, 王绍达, 秦淑杰, 吴 纲, 何书英\*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

**摘要** 通过脂多糖(LPS)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)建立体外炎症模型, 进一步验证盐酸苄丝肼的抗炎作用, 并探究盐酸苄丝肼抗炎抗动脉粥样硬化的相关分子机制。实验分为空白组(PBS + 0.5% FBS DMEM 培养基)、模型组[LPS(500 μg/mL) + 0.5% FBS DMEM 培养基]及给药组[LPS(500 μg/mL) + 盐酸苄丝肼 + 0.5% FBS DMEM 培养基], 采用Western blot、ELISA和qPCR检测HUVECs细胞中炎症因子血清淀粉样蛋白P(SAP)、TNF-α、MCP-1蛋白和mRNA的表达水平。采用Western blot检测p65/p-p65、p38/p-p38、IκBα/p-IκBα和AKT/p-AKT的表达水平及p65、p38、IκBα的入核情况。结果显示, 盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)能显著抑制促炎细胞因子SAP、TNF-α和MCP-1的蛋白及其mRNA的表达, 在下调p65/p-p65、p38/p-p38、IκBα/p-IκBα和AKT/p-AKT的蛋白表达的同时抑制p65、p38、IκBα的核转位, 从而抑制相关基因的转录活性。

**关键词** 盐酸苄丝肼; 人脐静脉内皮细胞; 炎症因子; 动脉粥样硬化; 脂多糖

**中图分类号** R965    **文献标志码** A    **文章编号** 1000-5048(2018)05-0624-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180516

引用本文 杨薇, 王绍达, 秦淑杰, 等. 盐酸苄丝肼对脂多糖所致人脐静脉内皮细胞炎症的影响及其机制研究[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(5):624-631.

Cite this article as: YANG Wei, WANG Shaoda, QIN Shujie, et al. Effects and molecular mechanism of benserazide hydrochloride on LPS-induced inflammation in human umbilical vein endothelial cells[J]. J China Pharm Univ, 2018, 49(5):624-631.

## Effects and molecular mechanism of benserazide hydrochloride on LPS-induced inflammation in human umbilical vein endothelial cells

YANG Wei, WANG Shaoda, QIN Shujie, WU Gang, HE Shuying\*

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

**Abstract** In this article, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were induced by lipopolysaccharides (LPS) to establish an *in vitro* inflammation model to further verify the anti-inflammation effects of benserazide hydrochloride and to explore the molecular mechanisms involving in the anti-inflammation and anti-atherosclerosis of benserazide hydrochloride. The experiments were divided into blank groups (PBS + 0.5% FBS DMEM medium), model group [LPS (500 μg/mL) + 0.5% FBS DMEM medium] and drug group [LPS(500 μg/mL) + benserazide hydrochloride + 0.5% FBS DMEM medium]. Western blot, ELISA and qPCR were used to detect the protein and mRNA expression levels of inflammatory cytokines SAP, TNF-α and MCP-1 in HUVECs cells. The expression levels of p65/p-p65, p38/p-p38, IκBα/p-IκBα, AKT/p-AKT and the nuclear translocations of p65, p38 and IκBα were detected by Western blot. The results showed that benserazide hydrochloride ( $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-11}$  mol/L) could significantly inhibit the protein and mRNA expression of pro-inflammatory cytokines SAP, TNF-α and MCP-1. Besides, it could down-regulate the protein expression of p65/p-p65, p38/p-p38, IκBα/p-IκBα and AKT/p-AKT in the signal pathway while inhibiting the nuclear translocation of p65, p38 and IκBα, thereby inhibiting the transcriptional activity of the related genes.

**Key words** benserazide hydrochloride; human umbilical vein endothelial cells; inflammatory cytokines; atherosclerosis; lipopolysaccharides

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种严重危害人类健康的心血管常见疾病,可诱发脑血管病、冠心病和血栓栓塞性疾病等缺血性心脑血管病<sup>[1]</sup>。目前认为,动脉粥样硬化的发生是由于细胞因子和血管细胞间的相互作用,在各种危险因子的作用下,血管内皮细胞损伤致使多种生长调节因子、细胞因子和血管活性物质的表达、激活紊乱<sup>[2]</sup>,并改变平滑肌细胞基因的表达致使其异常增殖,从而引起血管腔狭窄和痉挛,使血管局部产生的一种过度的慢性炎性增生反应。在这个过程中,大量的炎性细胞因子参与其中,对AS的发生和发展起到了至关重要的作用<sup>[3]</sup>,如肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、血清样淀粉蛋白P(serum amyloid P, SAP)、单核细胞趋化蛋白1(monomocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)等。

MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路是介导炎症反应相关通路中最常见的两条通路,其关键蛋白被磷酸化激活后可导致通路中的相应蛋白发生核转位,从而调控下游基因的转录活性。在 AS 病变的早期, NF- $\kappa$ B 激活内皮细胞分泌 MCP-1 和 IL-8,介导单核细胞和淋巴细胞向管壁运动,促进炎症的发生和内皮细胞的损伤<sup>[4]</sup>。由此可见,抑制促炎性细胞因子的合成及其相关信号通路关键蛋白的表达是控制 AS 的有效手段之一。

盐酸苄丝肼(benserazide hydrochloride)是外周脱羧酶抑制药,与左旋多巴联合应用制成复方制剂多巴丝肼<sup>[5]</sup>,在临幊上常用于帕金森病的治疗。本实验室前期动物实验研究表明,盐酸苄丝肼可显著降低 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉根、主动脉弓的动脉斑块面积,并可显著下调与 AS 相关的炎症因子的表达(结果待发表)。故本研究通过脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导人脐静脉内皮细胞建立体外炎症模型,以进一步评估盐酸苄丝肼的体外抗炎活性,并探究盐酸苄丝肼抗动脉粥样硬化的相关机制。

## 1 材 料

### 1.1 试 剂

高糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶、青霉素链霉素

双抗(美国 Gibco 公司);胎牛血清(以色列 Biological Industries 公司);盐酸苄丝肼(美国 Alfa Aesar 公司, CAS: 14919-77-8, AR: 98%, 批号: C10006404)、LPS(美国 Sigma 公司);四甲基偶氮唑盐(合肥 Bio-sharp 公司);RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);ECL 检测液试剂盒(博士德生物工程有限公司);核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);人 MCP-1 ELISA 检测试剂盒(武汉六合生物技术有限公司);人 TNF- $\alpha$  ELISA 检测试剂盒(深圳达科为生物技术有限公司);Trizol 溶液(美国 Invitrogen 公司);反转录合成一体试剂盒(5 × ALL-In-One RT MasterMix)、快速 EvaGreen 荧光定量 PCR 预混试剂盒(EvaGreen 2 × qPCR MasterMix)、96 孔 qPCR 板(加拿大 ABM 公司);PCR 引物(通用生物系统有限公司);GAPDH 抗体(美国 Abways 公司);HRP 标记山羊抗兔 IgG(H + L)(麦约尔生物技术有限公司)。抗 SAP 抗体、抗 I $\kappa$ B $\alpha$  抗体、抗 p-I $\kappa$ B $\alpha$ (phospho S36)抗体、抗 p38 抗体(英国 Abcam 公司);p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) 抗体(美国 Affinity Biosciences 公司);兔抗 NF $\kappa$ B p65 抗体、兔抗 p-NF $\kappa$ B p65 (Thr254) 抗体(北京博奥森生物技术有限公司);抗 AKT 抗体、抗 p-AKT (Ser473) 抗体(美国 CST 公司);Lamin b1 抗体(美国 Signalway 抗体公司)。

### 1.2 仪 器

TGL-20M 高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司);Synergy 2 型微孔板分析仪(美国 Bio-Tek 公司);化学发光成像系统、MyCycler<sup>TM</sup> Thermal Cycler System(美国 Bio-Rad 公司);480 II 型 Real-Time qPCR 仪(瑞士 Roche 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 药物配制

盐酸苄丝肼性质极不稳定,对光照、温度、溶剂的 pH 变化很敏感,故本实验采用生理盐水作为溶剂,配制初始浓度为  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 的盐酸苄丝肼

溶液,在配药过程中避光处理,并采用0.22 μm微孔滤器对药物进行过滤,于超净台中配制完成后在容器表面包裹锡箔纸并置于4℃避光保存。

## 2.2 细胞培养

采用含有10%胎牛血清(FBS)的高糖DMEM培养基,加入0.5%青霉素链霉素双抗溶液,培养条件:37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱,传代周期为2~3 d<sup>[6]</sup>。

## 2.3 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)急性炎症模型的建立

将HUVECs以每孔2×10<sup>5</sup>个细胞的密度接种于无菌6孔板中,待细胞生长至80%细胞密度时,将细胞分为空白组(PBS+0.5%FBS DMEM培养基)和模型组、模型组[LPS(300、500、700、900 μg/mL)+0.5%FBS DMEM培养基],每组设置3个复孔,培养24 h。取上清液,离心,并将离心后的细胞上清液转移到新的EP管中,于-20℃冰箱保存,并用试剂盒检测不同实验组中TNF-α水平的变化情况。

## 2.4 MTT测定盐酸苄丝肼的细胞毒性

将HUVECs按每孔1×10<sup>3</sup>个细胞的密度接种于96孔培养板,培养24 h后,将细胞分为空白组(0.5%FBS DMEM培养基)、给药组(0.5%FBS DMEM培养基+1×10<sup>-6</sup>、1×10<sup>-7</sup>、1×10<sup>-8</sup>、1×10<sup>-9</sup>、1×10<sup>-10</sup>、1×10<sup>-11</sup>、1×10<sup>-12</sup> mol/L盐酸苄丝肼),每组设置6个复孔。孵育24 h后,每孔加入5 mg/mL MTT溶液20 μL,37℃孵育4 h后,弃去细胞培养液,每孔加入DMSO 150 μL,溶解结晶,于水平摇床振荡混匀10 min后于490 nm处测定各孔吸收度。

## 2.5 Western blot和ELISA测定HUVECs细胞中相关炎症因子的表达水平

将HUVECs以每孔2×10<sup>5</sup>个细胞的密度接种于无菌6孔板中,待细胞生长至80%细胞密度时,将细胞分为空白组(PBS+0.5%FBS DMEM培养基)、模型组[LPS(500 μg/mL)+0.5%FBS DMEM培养基],给药组[LPS(500 μg/mL)+盐酸苄丝肼(1×10<sup>-9</sup>、1×10<sup>-10</sup>、1×10<sup>-11</sup> mol/L)+0.5%FBS DMEM培养基],每组设置3个复孔,培养24 h。取上清液,离心,并将离心后的细胞上清液转移到新的EP管中,于-20℃冰箱保存,并用试剂盒检测不同实验组中TNF-α和MCP-1水平的

变化情况。余下的各组细胞用胰酶消化后,4℃离心收集细胞沉淀,用RIPA裂解液裂解细胞提取蛋白,并用Western blot测定不同实验组中SAP蛋白的表达水平。

## 2.6 qPCR测定HUVECs细胞中相关炎症因子mRNA的表达水平

将HUVECs以每孔2×10<sup>5</sup>个细胞的密度接种于无菌6孔板中,细胞培养和分组同“2.5”项,每组设置3个复孔。培养24 h后,取出孔板,弃去上清液,用冷0.01 mol/L PBS洗涤2遍,每管加入Trizol 1 mL,混匀,静置10 min后,加入氯仿200 μL,剧烈混匀15 s,室温静置5 min。4℃,12 000 r/min离心15 min。取上层水相(约500 μL)置于另一EP管中,加异丙醇500 μL,混匀,-20℃放置30 min。4℃,12 000 r/min离心15 min。弃去上清液,加入预冷75%乙醇(DEPC水配制)1 mL,4℃,12 000 r/min离心10 min。弃去上清液,置于超净台室温干燥3 min,待乙醇挥发后加入DEPC水20 μL溶解RNA,用Synergy 2型微孔板分析仪测定RNA浓度,按照反转录合成一体试剂盒说明书将各组分RNA反转录成cDNA,保存于-20℃。快速EvaGreen荧光定量PCR预混试剂盒说明书,在96孔qPCR板中依次加入各试剂,每组设置4个复孔,使用Real-Time qPCR仪检测,反应条件设置为:95℃、10 min(预变性);95℃、15 s(变性);60℃、60 s(退火/延伸);扩增40个循环。得出各组分的Ct,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算。

## 2.7 Western blot测定HUVECs细胞信号通路中关键蛋白的表达水平

将HUVECs以每孔2×10<sup>5</sup>个细胞的密度接种于无菌6孔板中,细胞培养和分组同上,每组设置3个复孔。培养24 h后,取出孔板,弃去上清液,用冷0.01 mol/L PBS洗涤2遍,胰酶消化后4℃离心收集细胞沉淀,再用冷0.01 mol/L PBS洗涤沉淀2遍,每管加入RIPA裂解液(含广谱蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂)150 μL于冰上裂解细胞30 min,4℃离心,将上清液转移到新的EP管中,即为细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度并定量,经10%或12%SDS-PAGE电泳分离蛋白,半干转法将蛋白电转移到PVDF膜上,室温下5%脱脂奶粉封闭膜2 h,与GAPDH、IκBα、p-IκBα(phospho S36)、p38、p-p38 MAPK(Thr180/Tyr182)、NFκB

p65、p-NF $\kappa$ B p65 (Thr254)、AKT、p-AKT 抗体湿盒内 4 ℃孵育过夜。第2天,室温下 TBST 洗涤 (10 min  $\times$  4),室温山羊抗兔二抗避光孵育 1.5 h, TBST 洗涤 (10 min  $\times$  3), ECL 化学发光法显影, Bio-Rad 成像系统拍照,并用 Image-J 进行条带灰度分析。

### 2.8 核蛋白和胞浆蛋白提取

细胞处理及分组同上,培养 24 h 后,取出孔板,弃去上清液,用冷 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 遍,胰酶消化后 4 ℃,1 500 r/min 离心 3 min 收集细胞沉淀,再用冷 0.01 mol/L PBS 洗涤沉淀 2 遍;用移液枪尽可能弃去上清液,勿留残液,估计细胞压积(离心后的紧实细胞体积,约 50~100  $\mu$ L),使用试剂盒提取核蛋白以及胞浆蛋白,BCA 蛋白定量后分装并保存于 -80 ℃,避免反复冻融。

### 2.9 统计学分析

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,统计学差异均采用 GraphPad Prism 5 进行分析,显著性差异用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为有显著性差异,  $P < 0.01$  为有极显著性差异。

## 3 结果

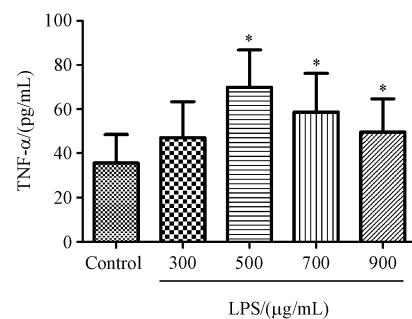
### 3.1 LPS 诱导 HUVECs 炎症模型的建立

为了确定构建 HUVECs 炎症模型所需的 LPS 剂量,将细胞分为空白组和模型组(分别加入 300、500、700、900  $\mu$ g/mL LPS),共同孵育 24 h 后吸取细胞上清液,通过 ELISA 法检测细胞上清液中 TNF- $\alpha$  水平的变化。如图 1 所示,与空白组相比,当 LPS 质量浓度在 300~500  $\mu$ g/mL 之间时,TNF- $\alpha$  的表达量随着 LPS 质量浓度的升高而升高,当 LPS 质量浓度在 500~900  $\mu$ g/mL 之间时,TNF- $\alpha$  的表达量随着 LPS 浓度的升高反而出现下降的趋势。综合数据分析结果,与空白组相比,所有加入 LPS 的模型组均能刺激细胞分泌更多的 TNF- $\alpha$ ,当 LPS 质量浓度为 500  $\mu$ g/mL 时,细胞分泌的 TNF- $\alpha$  最多,且与空白组相比有显著性差异( $P < 0.05$ ),因此,最终选用 500  $\mu$ g/mL 的 LPS 为本实验后续造模浓度。

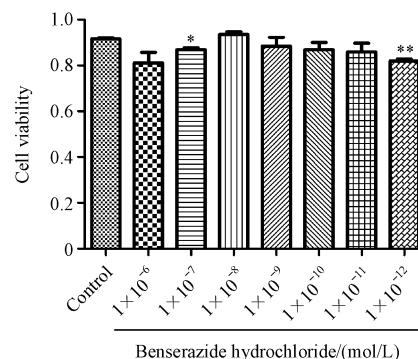
### 3.2 不同浓度盐酸苄丝肼对 HUVECs 的细胞毒性

不同浓度盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$ 、 $1 \times 10^{-12}$  mol/

L)作用 HUVECs 24 h 后,结果如图 2 所示,盐酸苄丝肼浓度为  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 组与空白组相比有显著性差异( $P < 0.05$ ),而  $1 \times 10^{-12}$  mol/L 组有极显著性差异( $P < 0.01$ ),除此之外,其余浓度对 HUVECs 的生长均没有显著影响,因此结合数据分析结果所呈现的不同浓度盐酸苄丝肼对 HUVECs 生长影响的稳定性,选用  $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L 3 个浓度作为后续实验的盐酸苄丝肼给药浓度。



**Figure 1** Inflammation model was established by lipopolysaccharides (LPS) and then the expression level of TNF- $\alpha$  in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was analyzed by ELISA ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
\*  $P < 0.05$  vs model group (LPS-treated group)



**Figure 2** Cytotoxicity of different concentrations of benserazide hydrochloride on HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

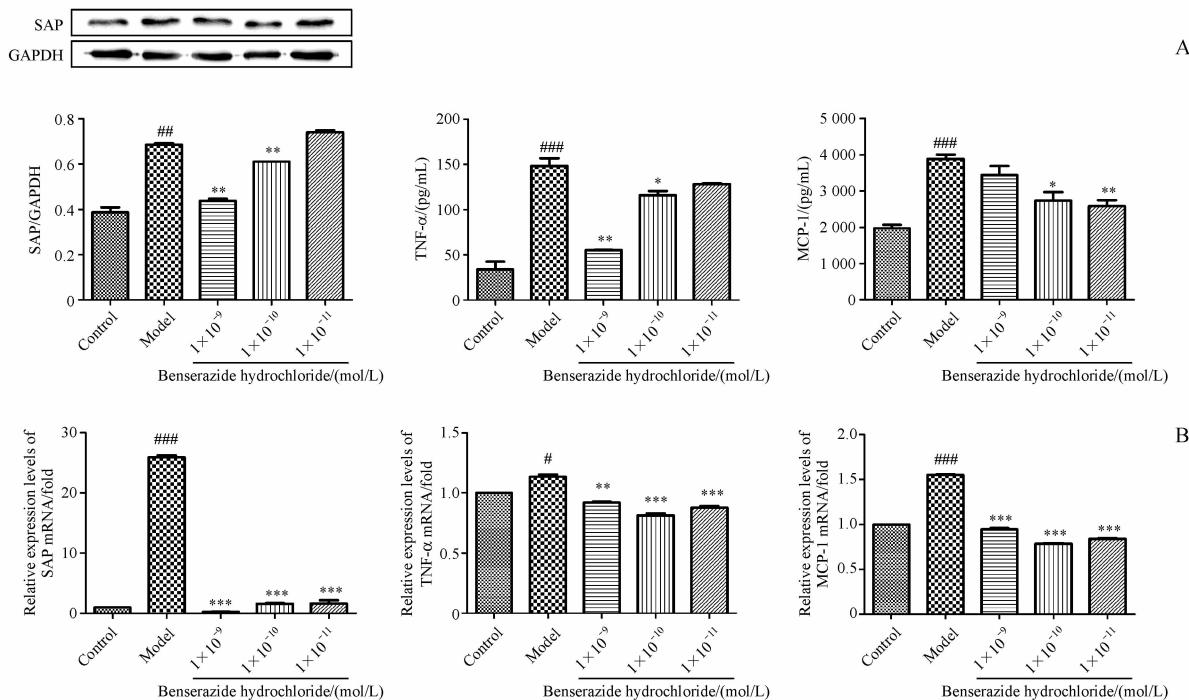
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group

### 3.3 盐酸苄丝肼对 LPS 诱导的 HUVECs 细胞中 SAP、TNF- $\alpha$ 和 MCP-1 的蛋白和 mRNA 表达的影响

在 LPS(500  $\mu$ g/mL)/LPS + 盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)作用 HUVECs 24 h 后,取细胞上清液,用 ELISA 检测 TNF- $\alpha$  和 MCP-1 的表达水平,余下的细胞提取总蛋白后用 Western blot 检测 SAP 的表达水平,同时,用 Trizol 试剂提取细胞 RNA,通过 qPCR 检测细胞 SAP、TNF- $\alpha$  和 MCP-1 mRNA 的表达水平。如图 3-A 所示,与空白组相比,模型组的 SAP、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 的表达水平

显著升高( $P < 0.01$ )；而与模型组相比,给药组使SAP、TNF- $\alpha$ 、MCP-1的表达水平均出现下降的趋势。当盐酸苄丝肼浓度为 $1 \times 10^{-9}$  mol/L时,与模型组相比,SAP、TNF- $\alpha$ 减少的量最多且有极显著性差异( $P < 0.01$ ),MCP-1则无明显差异;当盐酸苄丝肼浓度为 $1 \times 10^{-10}$  mol/L时,与模型组相比,SAP( $P < 0.01$ )、TNF- $\alpha$ ( $P < 0.05$ )和MCP-1( $P < 0.05$ )均具有显著性差异;当盐酸苄丝肼浓度为 $1 \times 10^{-11}$  mol/L时,与模型组相比,仅有MCP-1出现极显著性差异( $P < 0.01$ ),而SAP和TNF- $\alpha$ 则无明显差异。与此同时,盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)对于SAP和TNF- $\alpha$ 表达

的抑制作用具有相似的浓度依赖性。如图3-B所示,模型组的SAP( $P < 0.001$ )、TNF- $\alpha$ ( $P < 0.05$ )和MCP-1( $P < 0.001$ )mRNA的表达量相较于空白组均出现了明显的升高趋势,且具有显著性差异;加入盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)作用后均使SAP、TNF- $\alpha$ 和MCP-1 mRNA的表达量明显下降,且与模型组相比具有极显著性差异( $P < 0.001$ )。除TNF- $\alpha$ 外,给药组SAP和MCP-1 mRNA的下降趋势与其蛋白下降趋势相似。图3的结果表明,盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)能下调SAP、TNF- $\alpha$ 和MCP-1蛋白及mRNA的表达。



**Figure 3** Effect of different concentrations of benserazide hydrochloride on the expression level of inflammatory cytokines in LPS-stimulated HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

A: Protein level of SAP, TNF- $\alpha$  and MCP-1 in different groups measured by Western blot and ELISA; B: mRNA level of SAP, TNF- $\alpha$  and MCP-1 in different groups measured by qPCR

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model group (LPS-treated group)

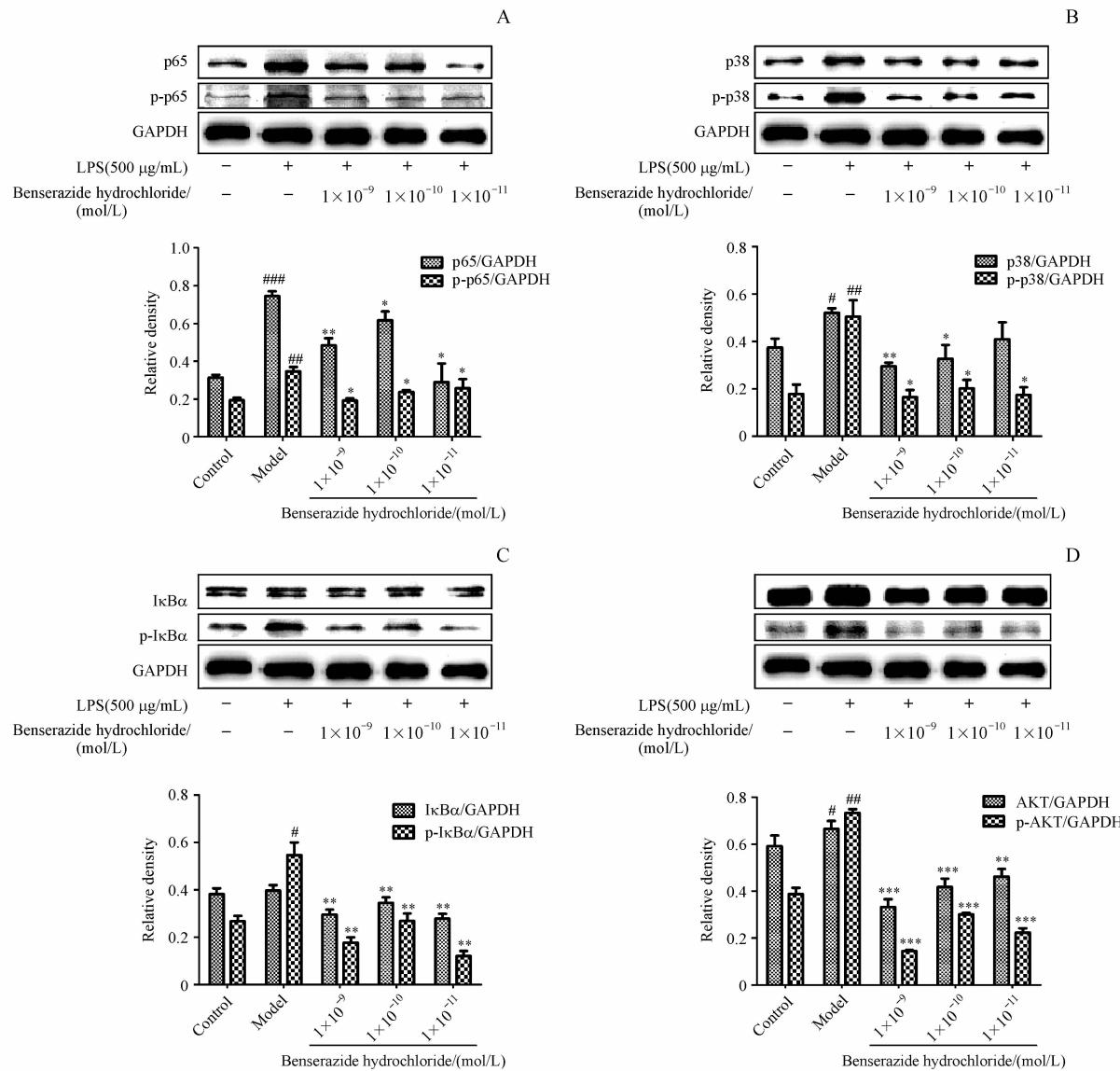
### 3.4 盐酸苄丝肼对LPS诱导的HUVECs细胞信号通路中关键蛋白表达的影响

如图4所示,在LPS的刺激下,除了I $\kappa$ B $\alpha$ (如图4-C),p65、p38、AKT及其磷酸化蛋白p-p65、p-p38、p-AKT和p-I $\kappa$ B $\alpha$ 的表达量有了明显的上升趋势,且均具有显著性差异( $P < 0.01/P < 0.001/P < 0.05$ )。在不同浓度的盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)作用下,p65/p-p65、I $\kappa$ B $\alpha$ /p-

I $\kappa$ B $\alpha$ 、AKT/p-AKT和p-p38表达水平都受到了不同程度的抑制,且均具有显著性差异( $P < 0.01/P < 0.001/P < 0.05$ )。当盐酸苄丝肼浓度为 $1 \times 10^{-11}$  mol/L时,相较于模型组,虽然对p38的表达有抑制作用而无显著性差异,但盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)的这种抑制作用表现出了浓度依赖性(如图4-B)。除此之外,盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)对p-

p65 和 AKT 的表达也表现出了浓度依赖性的抑制作用(如图4-A,D)。信号通路关键蛋白的磷酸化水平在一定程度上可以反映出该条通路的激活程度以及信号转导的情况,图4所有数据表明,盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)在抑

制非磷酸化蛋白 p65、p38、I<sub>K</sub>B $\alpha$  和 AKT 的表达的同时也能显著抑制其对应的磷酸化蛋白 p-p65、p-p38、p-I<sub>K</sub>B $\alpha$  和 p-AKT 的表达,说明盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)能抑制 AKT/NF- $\kappa$ B 通路及 p38 MAPK 部分通路的激活。



**Figure 4** Effect of different concentrations of benserazide hydrochloride on activation of AKT/NF- $\kappa$ B, MAPK signaling in LPS-induced HUVECs measured by Western blot ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

A: Protein level of p65 and p-p65; B: Protein level of p38 and p-p38; C: Protein level of I<sub>K</sub>B $\alpha$  and p-I<sub>K</sub>B $\alpha$ ; D: Protein level of AKT and p-AKT  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model group (LPS-treated group)

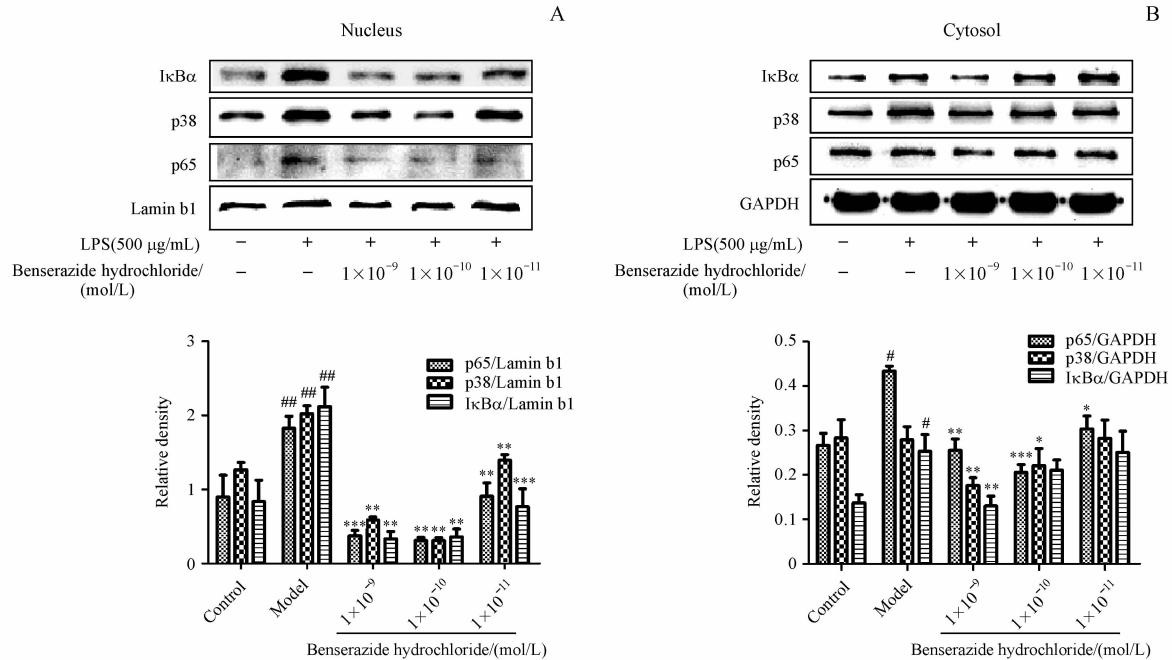
### 3.5 盐酸苄丝肼对 LPS 诱导的 HUVECs 细胞信号通路中 p65、p38 和 I<sub>K</sub>B $\alpha$ 核转位的影响

在 LPS(500 μg/mL)/LPS + 盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)作用 HUVECs 24 h 后,用核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒分别提取不同实验组的核蛋白及其对应的胞浆蛋白,BCA 定量

后用 Western blot 检测细胞核内和胞浆内 p65、p38 以及 I<sub>K</sub>B $\alpha$  的分布情况。如图5所示,正常情况下,p65、p38 及 I<sub>K</sub>B $\alpha$  主要存在于细胞质中;在 LPS 的刺激下,细胞迅速做出应答,这些因子被迅速激活并转位入核,从而激活与该信号通路相关的基因的大量表达,但加入盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、

$1 \times 10^{-11}$  mol/L)后, p65、p38 及 I $\kappa$ B $\alpha$  入核显著减少,且与模型组相比具有极显著性差异( $P < 0.01$ ; $P < 0.001$ ,图 5-A),由此说明,盐酸苄丝肼( $1 \times$

$10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)能明显抑制 p65、p38 及 I $\kappa$ B $\alpha$  的核转位。



**Figure 5** Effect of different concentrations of benserazide hydrochloride on translocation of NF- $\kappa$ B (p65), p38 and I $\kappa$ B $\alpha$  in LPS-induced HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

A: Distribution of p65, p38 and I $\kappa$ B $\alpha$  in nucleus; B: Distribution of p65, p38 and I $\kappa$ B $\alpha$  in cytoplasm

$^{\#} P < 0.05$ ,  $^{\#\#} P < 0.01$ ,  $^{\#\#\#} P < 0.001$  vs control group;  $^* P < 0.05$ ,  $^{**} P < 0.01$ ,  $^{***} P < 0.001$  vs model group (LPS-treated group)

#### 4 讨 论

LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要组成成分之一,当它进入机体时,会诱导免疫细胞的激活,导致促炎性细胞因子的释放,是诱发炎症反应的最主要的病原分子之一<sup>[7]</sup>。本实验室前期动物实验研究已经表明,盐酸苄丝肼可显著降低 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉根、主动脉弓的动脉斑块面积,肝脏 SAP 的表达及其在动脉内膜上的沉积,并可显著下调相关炎性因子的表达,初步显示出盐酸苄丝肼具有良好的抗动脉粥样硬化的潜力(结果待发表)。在此基础上,本研究采用 LPS 刺激人脐静脉内皮细胞建立体外炎症模型,以进一步评估盐酸苄丝肼的体外抗炎活性,并探索其发挥作用的潜在机制。

炎症贯穿于 AS 发生和发展的整个过程,在这个过程中,血管内皮细胞、平滑肌细胞以及巨噬细胞都会持续分泌大量的促炎性细胞因子,加重受损部位的炎症反应从而加速 AS 的发展进程,因此检测药物作用后炎症因子的表达水平变化对评估其

抗炎活性有一定意义。综合 Western blot、ELISA 以及 qPCR 的检测结果,可以看出,正常的 HUVECs 细胞只分泌少量的炎症因子,但在 LPS 的刺激下 SAP、TNF- $\alpha$  和 MCP-1 的表达量迅速上升,而不同浓度盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)对 SAP、TNF- $\alpha$  和 MCP-1 的蛋白及 mRNA 的表达水平均具有显著抑制作用,说明盐酸苄丝肼具有良好的体外抗炎活性。

MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路是炎症及炎症相关疾病(如动脉粥样硬化)中发挥主要作用的两条信号通路,已得到广泛研究。El Bekay 等<sup>[8]</sup>的研究发现, p38 MAPK 被激活后,可通过磷酸化或促炎细胞因子(如 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1)而活化 NF- $\kappa$ B。同样 NF- $\kappa$ B 被激活后,也可能通过其促炎细胞因子产物反过来激活 p38 MAPK, NF- $\kappa$ B 与 p38 MAPK 之间形成的相互激活网络可以调控多种炎症介质的基因转录活性,促进 AS 的发展进程<sup>[9]</sup>。因此,本实验在探索盐酸苄丝肼抗炎抗动脉粥样硬化的分子机制时,首先针对 p38 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 这两条信号

通路进行研究。综合 Western blot 测定的盐酸苄丝肼对 LPS 诱导的 HUVECs 细胞信号通路中关键蛋白表达的影响的所有结果,可以看出,盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)对 p65、p38、I $\kappa$ B $\alpha$  和 AKT 的非磷酸化蛋白水平及其对应的磷酸化蛋白水平(即 p-p65、p-p38、p-I $\kappa$ B $\alpha$  和 p-AKT)均具有明显的抑制作用,说明盐酸苄丝肼能抑制 AKT/NF- $\kappa$ B 通路及 p38 MAPK 部分通路的激活。

信号通路被逐级激活后,通常会促使该通路中的蛋白发生核转位,从而调控该通路下游蛋白的基因的转录活性。Western blot 检测到的细胞核内以及胞浆内 p65、p38 和 I $\kappa$ B $\alpha$  的分布情况显示,细胞在正常状态下核内仅分布极少量的 p65、p38 和 I $\kappa$ B $\alpha$ ,但在 LPS 的刺激下,这些因子被迅速激活并转位进入细胞核中,而盐酸苄丝肼( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)能显著抑制 p65、p38、I $\kappa$ B $\alpha$  的核转位。

综上所述,盐酸苄丝肼可能通过抑制 AKT/NF- $\kappa$ B 通路及 p38 MAPK 部分通路的激活和核转位来抑制由其介导的 LPS 所致 HUVECs 细胞中相关促炎性细胞因子的表达,从而起到抗动脉粥样硬化的作用。

#### 参 考 文 献

- [1] García de Tena J. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2005, **352**(16):429–430.
- [2] Li L, Dai M. Vascular endothelial dysfunction and smooth muscle cell proliferation of atherosclerosis [J]. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2010, **26**(2):155–158.
- [3] Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, **79**(3):360–376.
- [4] Zhang ST, Tang HQ, Huang YH, et al. Research progress in the relationship between oxidative stress, inflammation and coronary atherosclerosis [J]. *Youjiang Med J* (右江医学), 2017, **45**(2):235–239.
- [5] Xiong M, Yuan M, Huang HW, et al. Improvements in detection methods and identification of impurities for related substances of benserazide hydrochloride [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2014, **34**(11):2035–2040.
- [6] Zhang LL, Ji XX, Liu JR, et al. Effect of heparin-derived oligosaccharide on lipopolysaccharides-induced Inflammation in HUVECs and its molecular mechanisms [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2016, **47**(5):619–624.
- [7] Ren Y, Xie Y, Jiang G, et al. Apoptotic cells protect mice against lipopolysaccharide-induced shock [J]. *J Immunol*, 2008, **180**(7):4978–4985.
- [8] Zhao YF, Pan SJ, Gao ZZ, et al. Research progress in atherosclerosis inflammatory signaling pathway [J]. *Chin J Geriatr Cardiovas Cerebrovasc Dis* (中华老年心脑血管病杂志), 2014, **16**(12):1332–1334.
- [9] Proctor BM, Jin X, Lupu TS, et al. Requirement for p38 mitogen-activated protein kinase activity in neointima formation after vascular injury [J]. *Circulation*, 2008, **118**(6):658–666.