

诱导 11β -HSD1 表达对 GC 保护血管内皮炎性损伤作用的影响

王兴友 王丽娜 陈晓琳 陈杭薇

摘要 目的 探讨诱导 11β -HSD1 的表达在 GC 保护血管内皮炎性损伤中的影响。方法 用甘草次酸(GA)诱导人脐静脉内皮细胞 11β -HSD1 的表达,观察 GA 作用后体外培养的人脐静脉内皮细胞在 LPS 和(或)Dex 刺激下 IL-6 等炎症细胞因子的分泌及发生凋亡的变化,同时观察不同浓度的 GA 对人脐静脉内皮细胞 11β -HSD1 的表达的诱导情况。结果 GA 单独作用于人脐静脉内皮细胞时,能够上调 11β -HSD1mRNA 的表达。GA 与 GC(Dex)合用也可促进 11β -HSD1mRNA 的表达。GA 能显著抑制 LPS 诱导的 HUVEC 分泌 IL-6 和 sICAM-1,同时显著降低 LPS 诱导的 HUVEC 的细胞凋亡率。结论 GA 通过诱导 11β -HSD1 表达,可增强 GC 抑制 IL-6 等前炎症细胞因子的产生,加强对血管内皮细胞炎性损伤的保护。

关键词 糖皮质激素 糖皮质激素受体 人脐静脉血管内皮细胞 11β 羟基类固醇脱氢酶 1 甘草次酸

Effect of GC on Protection of the Inflammatory Injury in HUVEC by Inducing the Expression of 11β -HSD 1. Wang Xingyou, Wang Lina, Chen Xiaolin, Chen Hangwei. Department of Respiratory Medicine, General Hospital of Beijing Military Region, Beijing 100700, China

Abstract Objective To explore the effect of GC on protection of the inflammatory injury in HUVEC by inducing the expression of 11β -HSD 1. **Methods** The expression of 11β -HSD1 was induced with glycyrrhetic acid (GA) in human umbilical vein endothelial cells, then we observed the secretion of IL-6 and other inflammatory cytokines and the apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells stimulated by LPS and (or) Dex, as well as observed the situation of different concentrations of GA on the induction of 11β -HSD1 expression human umbilical vein endothelial cell. **Results** The GA alone can increase the expression of 11β -HSD1mRNA in human umbilical vein endothelial cells. Combination of GA and GC (Dex) could also contribute to the expression of 11β -HSD1mRNA. GA can significantly inhibit the secretion of IL-6 and sICAM-1, while significantly reduce the apoptosis rate in HUVEC with LPS injury. **Conclusion** Through the induction of 11β -HSD1 expression, GA can enhance the effect of GC on inhibition of IL-6 and other proinflammatory cytokine production, and strengthen the protection of the inflammatory injury of the vascular endothelial cells.

Key words Glucocorticoid; Glucocorticoid receptor; Vascular endothelial cell; 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type1; Glycyrrhizic acid

根据我们前期研究,初步表明糖皮质激素(GC)能有效保护脂多糖(LPS)诱导的血管内皮炎性损伤^[1]。鉴于 11β -HSD 是目前公认的 GC 受体前调节的关键物质,其两型同工酶 11β -HSD1 和 11β -HSD2 在人脐静脉内皮细胞中均有组成性表达,同时我们前面的实验表明内毒素和糖皮质激素对 11β -HSD 的表达均有影响^[2]。因此通过干预人脐静脉内皮细胞内的 11β -HSD 表达,必定会对细胞炎症反应有所影响。甘草次酸(glycyrrhizic acid, GA)作为 11β -HSD 的传统抑制剂,在其他组织细胞对 11β -HSD 表达影响的研究已有很多报道,有研究表明应用甘草

次酸类药物,可抑制嗜酸细胞阳离子蛋白与气道上皮细胞的结合从而减轻气道炎症^[3]。但目前有关其对血管内皮细胞 11β -HSD 影响的研究尚未见报道,鉴于 11β -HSD1 可增强细胞内 GC 的活性,而 11β -HSD2 则降低细胞内 GC 的活性。因此我们推测,甘草次酸的抗炎作用既与抑制 11β -HSD2 表达有关,也与增强 11β -HSD1 表达有关。我们已初步证实甘草次酸对血管内皮细胞 11β -HSD2 表达的抑制可增强 GC 的抗炎作用(将另文发表),本实验拟观察甘草次酸(GA)能否诱导人脐静脉内皮细胞 11β -HSD1 表达,从而增强 GC 的抗炎作用。

材料与方法

基金项目:“十一五”军队科技攻关基金资助项目(08G006)

作者单位:100700 北京军区总医院呼吸内科

1. 实验材料:(1)主要仪器:PCR 扩增仪, Lambda Bio20 紫外分光光度计, AlphaImager™2200 型凝胶成像仪, 台式冷

冻离心机,Power AC 电泳仪,金属浴。(2)主要试剂:总 RNA 提取试剂盒,AMV 反转录酶,Taq DNA 聚合酶,Oligo(dT)15,dNTP, RNA 酶抑制剂, DNA marker, 甘草次酸,脂多糖,糖皮质激素,ELISA 试剂盒。

2. 实验方法:(1)细胞分组及处理:1)GA 对单纯血管内皮细胞 11β-HSD1 表达的影响:为了观察不同浓度 GA 对 11β-HSD1 的基因转录的影响,用 10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻³mol/L 的 GA 分别与血管内皮细胞共培养 24h,不接触 GA 的细胞作对照;2)GA 对炎性损伤的血管内皮细胞的效应观察:①LPS 致伤组:在培养细胞中加入 100ng/ml 的 LPS“致伤”24h;②GA 保护组:先加 10⁻⁶mol/L GA 2h 后,再用 100ng/ml 的 LPS 处理细胞 24h;③GA-GC 复合组:在培养细胞中先后加入 10⁻⁶mol/L GA 和 Dex 2h 后,再用 100ng/ml 的 LPS 处理细胞 24h;④GC 保护组:不加 GA,在培养细胞中先后加入 10⁻⁶mol/L Dex 2h 后,再用 100ng/ml 的 LPS 处理细胞 24h;⑤单纯 GA 组:在培养细胞中先后加入 10⁻⁶mol/L GA 后,再继续培养 24h ;⑥空白对照组:不用 GA、LPS 和 Dex 的正常培养细胞作正常对照。上述各组观察时相到后分别搜集细胞和培养上清进行有关指标的检测。(2)HUVEC 内 11β-HSD1 的 mRNA 表达的检测:11β-HSD1 引物由上海博亚生物技术有限公司合成,各基因引物序列见表 1^[4,5]。然后按 RT-PCR 常规合成相应的 PCR 产物,将电泳图像保存于计算机用 Bandscan 软件进行图像分析,计算人脐静脉内皮细胞内 11β-HSD1 的 mRNA 与 β-actin mRNA 的灰度比值。(3)IL-6 和 sICAM-1 的检测:参照文献[1]进行。(4)HUVEC 原位细胞凋亡的检测:参照文献[1]进行。

表 1 PCR 引物的序列及其产物长度		
目标基因	引物(5'→3')	产物大小
11β-HSD1	上游引物 AGGAAAGCTCATGGGAGGACTAG	88bp
	下游引物 ATGGTGAATATCATCATGAAAAAGATTC	
β-actin	上游引物 GTCACCAACTGGGACGACA	468bp
	下游引物 TGGCCATCTCTTGCTCGAA	

3. 统计学方法:使用 SPSS 11.0 软件包进行,全部数据都以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异用方差分析,组内差异比较采用 *t* 检验。结果百分率采用 χ^2 检验进行分析,用二变量(Bivariate)Pearson 相关系数进行相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 表示差异具有非常显著性意义。

结 果

1. GA 对 HUVEC11β-HSD1 的 mRNA 表达的影响:(1)GA 对血管内皮细胞 11β-HSD1 mRNA 的影响:在正常培养的细胞可检测到较少量的 11β-HSD1 mRNA,甘草次酸在一定剂量范围(10⁻⁸~10⁻³mol/L)与细胞血管内皮共培养 24h,可引起 11β-HSD1 mRNA 明显增加,并随着剂量的增高,逐渐形

成平台(表 2)。(2)GA 对地塞米松和 LPS 诱导 11β-HSD1 mRNA 表达的影响:GA 本身能明显诱导 11β-HSD1 mRNA 的表达,GA 对 Dex 诱导的 11β-HSD1 mRNA 表达有促进作用,而对 LPS 诱导的 11β-HSD1 mRNA 表达则没有促进作用,详见表 3。

表 2 GA 对血管内皮细胞 11β-HSD1 mRNA 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	GA 浓度(mol/L)	11β-HSD1 mRNA/β-actin mRNA
对照组	0	0.03 ± 0.004
低剂量组	10 ⁻⁸	0.04 ± 0.005
常规剂量组	10 ⁻⁷	0.08 ± 0.002 *
大剂量组	10 ⁻⁶	0.16 ± 0.02 *△
高剂量组	10 ⁻⁵	0.26 ± 0.04 *△#
超高剂量组	10 ⁻³	0.31 ± 0.07 *△

与对照组相比,* $P < 0.05$;与低剂量组相比,△ $P < 0.05$;与大剂量、超高剂量组相比,# $P < 0.05$

表 3 大剂量 GA(浓度为 10⁻⁶mol/L)对 HUVEC 的 11β-HSD1 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	11β-HSD1 mRNA/β-actin mRNA
空白对照组	0.03 ± 0.004
LPS 致伤组	0.38 ± 0.06
GA 保护组	0.41 ± 0.07 *
GA-GC 复合组	0.42 ± 0.09 *△▲
GC 保护组	0.28 ± 0.03
单纯 GA 组	0.16 ± 0.02 #

与单纯 GA 组比,* $P < 0.05$;与 GC 保护组比,△ $P < 0.05$;与空白对照组比,# $P < 0.01$;与 GA 保护组及 LPS 致伤组比,▲ $P > 0.05$

2. GA 对 HUVEC 分泌 IL-6 和 sICAM-1 的影响:在 LPS 的刺激下,HUVEC 分泌 IL-6 和 sICAM-1 的量明显增多。而 GA 和 Dex 均能抑制二者的分泌,GA 与 Dex 合用可显著抑制 IL-6 和 sICAM-1 的分泌。具体见表 4。

表 4 大剂量 GA(浓度为 10⁻⁶mol/L)对 HUVEC 的 IL-6 和 sICAM-1 分泌的影响($\bar{x} \pm s$,pg/ml)

组别	IL-6 含量	sICAM-1 含量
空白对照组	63.2 ± 6.3	23.2 ± 2.7
LPS 致伤组	606.1 ± 17.3	516.8 ± 15.1
GA 保护组	436.2 ± 11.8 *	383.2 ± 6.3 *
GA-GC 复合组	168.6 ± 21.9 △	26.3 ± 2.9
GC 保护组	66.3 ± 5.1	216.5 ± 12.2 △
单纯 GA 组	286.5 ± 11.3 △	156.3 ± 11.3 △

与致伤组比,* $P < 0.05$,△ $P < 0.01$

3. GA 对 HUVEC 发生原位凋亡的影响:GA 和 Dex 均能明显抑制 LPS 诱导的血管内皮细胞凋亡,二

者合用表观上增加了对 HUVEC 凋亡的抑制效应,但统计学上与单独应用 Dex 的作用并无差异,具体见表 5。

表 5 大剂量 GA(浓度为 10^{-6} mol/L)对 HUVEC 的发生凋亡的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	细胞凋亡率
空白对照组	1.2 ± 0.4
LPS 致伤组	36.7 ± 3.9
GA 保护组	$23.5 \pm 1.7^{\Delta}$
GA-GC 复合组	$12.6 \pm 0.6^{* \Delta \#}$
GC 保护组	$13.2 \pm 0.9^{*}$
单纯 GA 组	1.6 ± 0.3

与 LPS 致伤组比, $^{*} P < 0.01$, $^{\Delta} P < 0.05$; 与 GA 保护组比, $^{\#} P < 0.05$; 与 GC 保护组比, $^{\Delta} P > 0.05$

讨 论

甘草次酸具有抗炎、抗过敏、镇咳、平喘及祛痰等广泛的药理作用,其中抗炎、抗过敏、平喘的作用与糖皮质激素相似。但至今 GA 与 GC 的内在关系缺乏深入研究,探讨二者的关系将有助于进一步揭示和深化 GC 的抗炎作用机制,为临床合理应用 GC 提供新的思路。以往研究中,甘草次酸已被视为经典的 11β -羟基类固醇脱氢酶的抑制剂。有关 GA 与 11β -羟基类固醇脱氢酶的研究主要涉及其不良反应的产生机制,比如临床应用该药常伴有的假醛固酮增多症(pseudoaldosteronism)就认为与 GA 对 11β -羟基类固醇脱氢酶的抑制有关^[6]。但有关 GA 通过如何调节血管内皮细胞的 11β -羟基类固醇脱氢酶,进而参与炎症调控的研究,迄今未见报道。

长期以来认为 GA 发挥抗炎作用与阿司匹林相似,但与地塞米松不同。GA 抗炎机制被认为与抑制脂氧酶和环氧酶,进而抑制 LTC₄、LTD₄、LTE₄ 及 PGE₂ 等炎性介质的生成有关。但近年认为与调节 T 细胞分泌 IL-5 等细胞因子有关^[7]。在本实验中,我们观察到 GA 能显著抑制 LPS 诱导的 HUVEC 分泌 IL-6 和 sICAM-1,同时显著降低 LPS 诱导的 HUVEC 的细胞凋亡率。因此笔者认为抑制 IL-6 等前炎症细胞因子的产生,减少血管内皮细胞和白细胞的黏附,保护血管内皮细胞的损伤也是 GA 的一个抗炎机制。鉴于 11β -HSD 是 GC 作用的受体前调节的关键物质,GA 又是传统的 11β -HSD 抑制剂,但在本实

验中,我们观察到 GA 并没有对 11β -HSD1 的表达进行抑制,相反却能诱导 11β -HSD1 的表达,故我们推测 GA 主要对 11β -HSD2 表达起抑制作用,而对 11β -HSD1 则主要起诱导作用,也许 GA 对 11β -HSD 的这种双向作用,正是其发挥抗炎作用的根本途径。因此 11β -HSD1 完全可以作为 GA 抗炎等作用的一个靶点。GA 与 GC 合用所增强的抗炎效应与 11β -HSD 的表达情况必定会有联系。

近年来抑制 11β -HSD1 的研究主要是关于代谢疾病,例如肥胖和糖尿病^[8]。本研究发现,GA 单独作用于人脐静脉内皮细胞时,能够上调 11β -HSD1mRNA 的表达。GA 与 GC(Dex)合用也可促进 11β -HSD1mRNA 的表达。同时加强了 GC 对 LPS 诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的抑制作用及炎性细胞因子 IL-6、sICAM-1 分泌的抑制作用,对 GA 对炎症的影响有一定意义。

参考文献

- 1 王兴友,陈杭薇,钱桂生.糖皮质激素对血管内皮炎症性损伤的保护机制[J].解放军医学杂志,2007,32(5):508-512
- 2 Liu Y, Mladinov D, Pietrusz JL, et al. Glucocorticoid response elements and 11β -hydroxysteroid dehydrogenases in the regulation of endothelial nitric oxide synthase expression[J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(1):140-147
- 3 Hao-Teng, Louis JT, Ta-Jen H, et al. Inhibition of the interactions between eosinophil cationic protein and airway epithelial cells by traditional[J]. Chinese herbs, 2010, 4(Suppl 2):S8-S18
- 4 Liu Y, Park F, Pietrusz JL, et al. Suppression of 11β betag-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 with RNA interference substantially attenuates 3T3-L1 adipogenesis[J]. Physiol Genomics, 2008, 32(3):343-351
- 5 Tian Z, Greene AS, Usa K, et al. Renal regional proteomes in young Dahl salt-sensitive rats[J]. Hypertension, 2008, 51(4):899-904
- 6 Kageyama K, Takayasu S, Moriyama T, et al. A case of pseudoaldosteronism, accompanied with hypocalcemia and exaggerated ACTH response[J]. Endocr J, 2004, 51(1):83-87
- 7 Xiu-Min L, Laverne B. Efficacy and mechanisms of action of traditional Chinese medicines for treating asthma and allergy[J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 123(2):297-308
- 8 Stanetty C, Czollner L, Koller I, et al. Synthesis of novel 3-amino and 29-hydroxamic acid derivatives of glycyrrhetic acid as selective 11β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 inhibitors[J]. Bioorg Med Chem, 2010, 18(21):7522-7541

(收稿:2011-12-07)

(修回:2011-12-20)