

香鳞毛蕨对脂多糖诱导的人真皮微血管内皮细胞增殖及 mRNA 表达的影响

李亚俊 陈微淙 彭 冰 薛 妍 李 萍

摘 要 **目的** 研究香鳞毛蕨醇提物对脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导的人真皮微血管内皮细胞 (human dermal microvascular endothelial cells, HDMEC) 炎症反应的影响。**方法** 分别用 0、0.4、2 和 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 LPS 作用于人真皮微血管内皮细胞, 孵育 24h 建立微血管内皮细胞炎症模型。实验分为 HDMEC 空白对照组、LPS 模型组和 LPS + 香鳞毛蕨药物组, 分别进行药物处理, 观察不同剂量香鳞毛蕨醇提物处理对各组 HDMEC 细胞增殖和炎症相关基因 mRNA 表达的影响。**结果** 香鳞毛蕨醇提物可以抑制 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS 刺激下的微血管内皮细胞的增殖 ($P < 0.05$), 并降低脂多糖所诱升的血管内皮生长因子 VEGF 以及炎症相关基因 NF- κ B、VCAM-1 的表达水平 ($P < 0.01$)。**结论** 香鳞毛蕨醇提物可能通过抑制炎症相关基因的表达来抑制微血管内皮细胞的炎症增殖。

关键词 微血管内皮细胞 脂多糖 香鳞毛蕨 炎症 基因表达

中图分类号 R2 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.12.008

Dryopteris Extract Inhibited LPS Induced Proliferation and Inflammatory Gene Expression in Human Dermal Microvascular Endothelial Cells. Li Yajun, Chen Weicong, Peng Bin, et al. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing Key Laboratory of Clinic and Basic Traditional Chinese Medicine on Psoriasis, Beijing 100010, China

Abstract Objective To study the anti-inflammation effect of *Dryopteris fragrans* (L.) Schott. extract (Herbs, in brief) on lipopolysaccharides (LPS) treated dermal microvascular endothelial cells. **Methods** Human dermal microvascular endothelial cells (HDMECs) were divided into control group; LPS group, which were treated with 0.4, 2 and 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 24 hours, respectively; and LPS + Herbs group, which were pre-treated with 10 times diluted *Dryopteris fragrans* (0, 0.1 and 1mg/ml, respectively) for 1 hour, then treated with LPS for 24 hours, respectively. Changes of cell proliferation and expression in inflammatory associated genes in each group were detected. **Results** *Dryopteris fragrans* inhibited proliferation of HDMEC induced by 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS ($P < 0.05$), accompanied with down-regulation of VEGF gene expression ($P < 0.01$). The expression of NF- κ B, VCAM-1 also decreased in LPS treated HDMEC when the cells were pre-treated with *Dryopteris fragrans* ($P < 0.01$). **Conclusion** *Dryopteris fragrans* (L.) Schott. extract may inhibit LPS induced inflammatory reaction of microvascular endothelial cells by regulating the expression of inflammation associated genes.

Key words Microvascular endothelial cells; Lipopolysaccharides; *Dryopteris*; Inflammation; Gene expression

香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans* (L.) Schott. 为鳞毛蕨科鳞毛蕨属植物, 落叶性多年生草本, 在我国主要分布于东北、华北的高寒地区^[1]。黑龙江省北部居民用香鳞毛蕨水提取物涂擦患处, 治疗银屑病、皮炎、痤疮等多种皮肤病, 有皮肤病克星之称^[2], 然而其作用机制尚不清楚。

炎症反应在多种皮肤疾病的发生、发展中扮演重要角色, 其病理过程包括炎症细胞的浸润、真皮层微血管内皮细胞的增殖等环节。炎症反应发生后, 血管内皮的细胞间黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 表达增高, 其与血流中白细胞表面黏附分子相互作用, 介导白细胞穿越血管壁^[3]; 而血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 为内皮细胞增殖的标志物, 其表达水平可以在一定程度上体现细胞的增殖情况^[4]。脂多糖是革兰阴性细菌细胞壁中的成分, 其可影响内皮细胞的增殖并诱导分泌促炎因子, 因而常作为细胞炎症模型的诱导药物。在脂多糖所诱导的炎症环

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (7152035); 北京市“翱翔计划”项目

作者单位: 100010 北京, 首都医科大学附属北京中医医院、北京市中医研究所、银屑病中医临床基础研究北京市重点实验室 (李亚俊、彭冰、薛妍、李萍); 北京市第一六二中学 (陈微淙)

通讯作者: 李亚俊, 副研究员, 电子信箱: liyj1102big@126.com

境下,脐静脉内皮细胞的核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 表达升高^[5],后者对 VCAM-1 和 VEGF 的基因表达具有调控作用。人皮肤微血管由单层内皮细胞组成,蛋白质组学研究提示微血管内皮细胞与脐静脉内皮细胞的蛋白表达并不完全相同,与之相应,它们的生物学功能也不尽相同^[6]。目前,尚未见有关香鳞毛蕨对皮肤微血管内皮细胞影响的报道。

本研究以 LPS 诱导的人真皮微血管内皮细胞 (human dermal microvascular endothelial cells, HDMEC) 的炎性反应为模型,观察香鳞毛蕨提取物对 LPS 刺激下的微血管内皮细胞的影响,并检测炎症相关基因表达变化。研究发现,香鳞毛蕨醇提物可以抑制 LPS 诱导的 HDMEC 细胞的增殖,并降低 VEGF、VCAM-1 及 NF- κ B 基因的表达,可能具有炎症抑制作用。

材料与方法

1. 原代细胞:人真皮微血管内皮细胞 (human dermal microvascular endothelial cells, HDMEC, 美国 ScienCell 公司)。

2. 主要药物和试剂:香鳞毛蕨全草于 2013 年 8 月采自黑龙江五大连池市,经北京中医药大学中药学院高增平教授鉴定为香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans* (L.) Schott., 凭证标本 (DF0110802) 保存于北京市中医研究所。脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS, 购自美国 Sigma 公司)。

3. 香鳞毛蕨醇提物制备:由北京市中医研究所中药研究室制备,参照文献[7]。香鳞毛蕨粗粉,用 95% 乙醇浸 0.6h 后超声,经抽滤、减压浓缩至无乙醇味,制成混悬液,药物浓度按照生药量计,为 0.7g/ml。临用前用无血清的培养基进行梯度稀释。

4. 微血管内皮细胞培养:人真皮微血管内皮细胞 (HDMEC, 美国 ScienCell 公司),用含有 5% 胎牛血清,1% 内皮细胞生长添加剂 ECGS 的内皮细胞培养基 ECM (美国 ScienCell 公司),于 5% CO₂、37℃ 恒温孵箱培养。

5. CCK-8 法检测 HDMEC 细胞增殖:将培养的 HDMEC 细胞浓度调至 5×10^4 个/ml,接种于 96 孔培养板上,每孔 100 μ l。于 5% CO₂、37℃ 恒温孵箱培养。设立空白组, LPS 模型组, 香鳞毛蕨处理组。其中,空白组:ECM 培养基;不同剂量 LPS 模型组,0.4、2、10 μ g/ml LPS;香鳞毛蕨处理组,香鳞毛蕨醇提物 (0、0.1、1mg/ml) 处理 1h 后,分别用 0.4、2 和 10 μ g/ml

的 LPS 进行刺激,孵育 24h,采用 CCK-8 法检测各组细胞活性。按照 CCK-8 试剂盒说明书 (中国 Dojindo 公司),每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液,培养箱内孵育 4h。酶标仪测定 450nm 处的吸光度。细胞抑制率的计算,细胞抑制率 = (LPS 组 A 值 - 香鳞毛蕨组 A 值) / LPS 组 A 值 $\times 100\%$ 。

6. PCR-凝胶电泳法检测 VEGF mRNA 表达:分别对 HDMEC、2 μ g/ml 和 10 μ g/ml LPS-HDMEC 以及 1mg/ml 香鳞毛蕨醇提物预处理 1h 的 LPS-HDMEC 提取 RNA,反转录合成 cDNA。简言之,采用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,分别经三氯甲烷、异丙醇以及 75% 的乙醇分离、纯化得到 RNA,用无 RNase DEPC 处理水溶解,紫外分光光度计 (Nanovue) 定量。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性。取 1 μ g RNA,在 20 μ l 反应体系中进行反转录。RNA 与引物在 65℃ 孵育 5min 后,冰浴 2min,按照反转录试剂盒 (中国 Transgen Biotech 公司) 说明书加入反应试剂,25℃ 孵育 10min,42℃ 孵育 30min,85℃ 加热 5min 失活,合成第 1 链 cDNA。基因组 DNA 于反转录过程中予以去除。以 $5 \times$ PCR buffer 4 μ l; dNTP 2 μ l, Mg²⁺ 1.5 μ l, 500nmol/L 引物 2 μ l, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l (美国 Qiagen 公司),以及适量的 cDNA 和水配成 20 μ l 扩增体系,于 PCR 仪 (美国 ABI 公司) 中,退火温度 58℃,扩增 30 循环。以人 GAPDH 作为参考基因,PCR 引物如下:VEGF-f, AGGCCAGCACATAG-GAGAGA; VEGF-d, TACCGGGATTCTTTCGCGCTT; GAPDH-f, AGAAGGCTGGGGCTCATTTG; GAPDH-d, AGGGGCCATCCACAGTCTTC。采用 1.2% 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测,其中,VEGF 的扩增产物长 141bp, GAPDH 的扩增产物长 258bp。

7. 实时定量 PCR 法 (real-time PCR) 检测 VEGF、VCAM-1 和 NF- κ B mRNA 表达:以 $2 \times$ PCR TaqMix 5 μ l; 500nmol/L 的 real-time PCR 引物对 (NF- κ B、VEGF、VCAM-1 和内参基因 GAPDH) 各 2 μ l,以及适量 cDNA 模版配成的 PCR 体系,采用两步法,于荧光定量 PCR 仪上扩增 40 循环,分析 Ct 值以及熔解曲线。计算 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 进行数据分析。real-time PCR 引物序列如下:GAPDH-f, GCACCACCAACTGCTTAGCA; GAPDH-d, GGCATGGACTGTGGTCATGAG; VEGF-f, GGCCAGCACATAGGAGAGA; VEGF-d, TACCGGGATTCTTTCGCGCTT; VCAM-1-f, AAGATGGTCGTGATCCTTGG; VCAM-1-d, GGTGCTGCAAGTCAATGAGA; NF- κ B-f, CACCT-

TCATTCTCAACTTGTG; NF- κ B-d, CACCACATCT-TCCTGCTTAGTG。

8. 统计学方法: 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 香鳞毛蕨醇提取物对 HDMEC 细胞增殖的影响: 与 HDMEC 空白对照组比较, $2\mu\text{g/ml}$ LPS 刺激下的 HDMEC 增殖略有增加, 而 1mg/ml 香鳞毛蕨醇提取物预处理可以抑制该浓度 LPS 所诱导的微血管内皮细胞增殖, 抑制率达 21.57%, 与 $2\mu\text{g/ml}$ LPS 模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。镜下见 HDMEC 细胞呈鹅卵石状; $2\mu\text{g/ml}$ LPS 的刺激下, HDMEC 细胞形状略微变长、细胞密度有所增加; 而香鳞

毛蕨处理组的内皮细胞维持鹅卵石状 (图 1)。

表 1 香鳞毛蕨醇提取物对不同浓度脂多糖处理的 HDMEC 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LPS 剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	香鳞毛蕨剂量 (mg/ml)	A 值	抑制率 (%)
HDMEC 空白对照	—	—	0.45 ± 0.11	
LPS 模型 A	0.4	—	0.46 ± 0.07	
香鳞毛蕨 A1	0.4	0.1	0.47 ± 0.05	-2.17
香鳞毛蕨 A2	0.4	1	0.47 ± 0.02	-2.17
LPS 模型 B	2	—	0.51 ± 0.08	
香鳞毛蕨 B1	2	0.1	0.44 ± 0.07	13.73
香鳞毛蕨 B2	2	1	$0.40 \pm 0.05^*$	21.57
LPS 模型 C	10	—	0.44 ± 0.07	
香鳞毛蕨 C1	10	0.1	0.42 ± 0.05	4.55
香鳞毛蕨 C2	10	1	0.40 ± 0.02	9.09

与 LPS 模型 B 组比较, $^* P < 0.05$

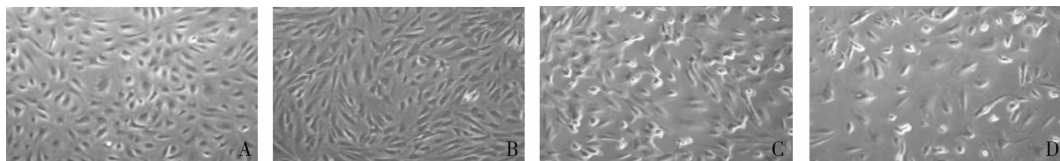


图 1 香鳞毛蕨醇提取物对 $2\mu\text{g/ml}$ 脂多糖处理的 HDMEC 细胞形态的影响 ($\times 100$)

A. HDMEC 空白对照; B. LPS 模型组, $2\mu\text{g/ml}$ 处理细胞 24h; C. 0.1mg/ml 香鳞毛蕨预处理; D. 1mg/ml 香鳞毛蕨预处理

2. 香鳞毛蕨醇提取物对 LPS 诱导 VEGF 基因表达的影响: 鉴于细胞增殖实验结果提示香鳞毛蕨醇提取物可以抑制 $2\mu\text{g/ml}$ LPS 诱导下的 HDMEC 的增殖, 在本研究中, 分别用 PCR-电泳和 real-time PCR 两种方法检测 VEGF mRNA 水平, 观察药物对脂多糖刺激下 HDMEC 细胞中 VEGF 基因表达的影响。用 real-time PCR 法对各组 VEGF 基因的表达进行定量, 结果表明, 经 1mg/ml 香鳞毛蕨醇提取物预孵育 1h 的 HDMEC, 其 VEGF 基因表达水平低于单独用 LPS 刺激的细胞, 与 $2\mu\text{g/ml}$ 和 $10\mu\text{g/ml}$ LPS 处理组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2)。琼脂糖凝胶电泳结果也显示, 在 HDMEC 细胞中, 在 $2\mu\text{g/ml}$ 和 $10\mu\text{g/ml}$ LPS 刺激下, HDMEC 细胞可以检测到 VEGF 的 PCR 产物 (图 2 中 1、3 加样孔), 而经 1mg/ml 香鳞毛蕨预孵育 1h 处理的 VEGF 条带不可见 (图 2 中 2、4 加样孔); 而上述两组数据中 GAPDH 条带的信号强度相近, 提示 VEGF 基因表达水平下降。

3. 香鳞毛蕨醇提取物对 LPS 诱导 HDMEC 炎症相关基因 mRNA 表达的影响: 进一步观察 1mg/ml 香鳞毛蕨醇提取物处理对 LPS 刺激的 HDMEC 细胞中炎症

表 2 各处理组 HDMEC 细胞 VEGF mRNA 相对表达值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LPS 剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	香鳞毛蕨剂量 (mg/ml)	VEGF ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$)
HDMEC 空白对照	—	—	1.000 ± 0.029
LPS 模型 B	2	—	1.161 ± 0.002
香鳞毛蕨组 B2	2	1	$0.750 \pm 0.017^{**}$
LPS 模型 C	10	—	0.966 ± 0.019
香鳞毛蕨组 C2	10	1	$0.291 \pm 0.017^*$

与 LPS 模型 B 组比较, $^{**} P < 0.01$; 与 LPS 模型 C 组比较, $^* P < 0.05$

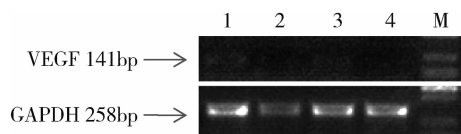


图 2 VEGF 基因 RT-PCR 产物电泳凝胶成像图

相关基因表达的影响。Real-time PCR 结果显示, 与正常的微血管内皮细胞相比, 在 LPS 刺激下, HDMEC 细胞 NF- κ B、VCAM-1 表达上升; 香鳞毛蕨醇提取物预处理可以抑制 $2\mu\text{g/ml}$ LPS 所诱导的 NF- κ B、VCAM-1 表达升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 3)。

表 3 各处理组 HDMEC 细胞炎症相关 mRNA 相对表达值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LPS 剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	香鳞毛 蕨剂量 (mg/ml)	NF- κ B ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$)	VCAM-1 ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$)
HDMEC 空白对照	-	-	1.000 $\pm$ 0.007	1.025 $\pm$ 0.281
LPS 模型 B	2	-	1.563 $\pm$ 0.391	2.332 $\pm$ 0.764
香鳞毛蕨组 B2	2	1	0.625 $\pm$ 0.298 **	0.962 $\pm$ 0.154 **
LPS 模型 C	10	-	1.128 $\pm$ 0.259	1.262 $\pm$ 0.672
香鳞毛蕨组 C2	10	1	0.883 $\pm$ 0.361	1.756 $\pm$ 0.580

与 LPS 模型 B 组比较, ** $P < 0.01$

讨 论

香鳞毛蕨具有抑制真菌生长、抑制肿瘤细胞增殖、止痒、抗过敏等多种药理作用,在东北民间被用于炎性皮肤病疾病的治疗^[8]。近年的研究提示,香鳞毛蕨提取物具有抑制 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应的作用^[7]。然而,其对炎性环境下皮肤微血管内皮细胞活化的影响尚未见报道。本研究采用脂多糖诱导的人真皮微血管内皮细胞(HDMEC)炎性反应的细胞模型模拟致炎因素刺激下内皮细胞的功能状态,探究香鳞毛蕨对炎性环境下微血管内皮细胞的作用。结果表明,香鳞毛蕨醇提物可以降低 LPS 刺激下的皮肤微血管内皮细胞的增殖以及 VEGF、NF- κ B、VCAM-1 基因的表达水平,提示其具有抑制微血管内皮细胞炎性增殖的作用。

皮肤炎性反应过程涉及炎性细胞浸润和毛细血管扩张增生等多个病理环节,与之相应的是微血管内皮细胞生长相关基因以及炎症相关基因的激活^[9]。其中 NF- κ B 在内皮细胞活化过程中发挥重要作用^[10]。在 VEGF 和 VCAM-1 基因的启动子区均有 NF- κ B 的结合位点,在炎性诱导情况下的内皮细胞 NF- κ B 上调,进而促进 VEGF 和 VCAM-1 的转录^[11,12]。由此推测,香鳞毛蕨对 LPS 诱导激活的 HDMEC 血管内皮生长因子 VEGF 和细胞间黏附分子 VCAM-1 的表达调节作用可能通过 NF- κ B 通路发挥作用。

微血管内皮细胞增殖以及 NF- κ B 通路的激活,不仅见于炎性皮肤病疾病,也发生于其他与炎症病理过程直接、间接相关的疾病中,比如肿瘤、类风湿性关节炎等。从作用机制出发,香鳞毛蕨醇提物可抑制微血管内皮细胞炎性增殖,提示该药物可能具有更广泛的药理作用。

香鳞毛蕨的主要成分间苯三酚类衍生物,在乙醇提取物中具有较高浓度^[13]。其中,绵马酚为香鳞毛

蕨的特征性化学成分,也是发挥药效的主要成分^[14]。然而,香鳞毛蕨醇提物作为一种中草药提取物,成分复杂多样^[15]。目前已经报道了香鳞毛蕨中分离的 75 种化合物,包括间苯三酚类、萜类、黄酮类、苯丙素类以及挥发油类等多种,因而,香鳞毛蕨醇提物可能存在多靶点多效应的协同或拮抗作用^[8]。在今后的研究中,对香鳞毛蕨醇提物进一步分离纯化以及进行药理活性研究,可以确定影响微血管内皮细胞功能的具体活性成分和作用机制,从而减少毒性不良反应。

参考文献

- 1 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 5 卷[M]. 北京: 科学出版社,2000: 152
- 2 沈志滨, 金哲雄, 张德连, 等. 香鳞毛蕨的生药学研究[J]. 中草药, 2002, 33(7): 661-663
- 3 Lu ZY, Chen WC, Li YH, *et al.* TNF- α enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human bone marrow mesenchymal stem cells via the NF- κ B, ERK and JNK signaling pathways[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1): 643-648
- 4 李金海, 陈辉春, 戴华卫, 等. 脂多糖对人脐血内皮祖细胞增殖及凋亡的影响[J]. 温州医科大学学报, 2015, 45(2): 115-118
- 5 付海燕, 胡占升, 杜红阳, 等. 白藜芦醇衍生物 TMS 对脂多糖诱导人脐静脉内皮细胞中一氧化氮、血管细胞间黏附分子-1 及核转录因子- κ B 表达的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(8): 808-813
- 6 Dib H, Chafey P, Clary G, *et al.* Proteomes of umbilical vein and microvascular endothelial cells reflect distinct biological properties and influence immune recognition[J]. Proteomics, 2012, 12(15-16): 2547-2555
- 7 Peng B, Bai RF, Li P, *et al.* Two new glycosides from Dryopteris fragrans with anti-inflammatory activities[J]. J Asian Nat Prod Res, 2016, 18(1): 59-64
- 8 朱冲冲, 彭冰, 曾祖平, 等. 香鳞毛蕨的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(10): 1418-1423
- 9 党宁宁, 赵天恩. 微血管内皮细胞在皮肤炎症中的作用[J]. 临床皮肤科杂志, 2000, 29(1): 63-64
- 10 Ferran C, Millan MT, Csizmadia V, *et al.* Inhibition of NF- κ B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 214(1): 212-223
- 11 Walton CB, Matter ML. Chromatin immunoprecipitation assay: examining the interaction of NF κ B with the VEGF promoter[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1332: 75-87
- 12 Modlich U, Pugh CW, Bicknell R. Increasing endothelial cell specific expression by the use of heterologous hypoxic and cytokine-inducible enhancers[J]. Gene Ther, 2000, 7(10): 896-902
- 13 范华倩, 沈志滨, 陈艳芬, 等. 香鳞毛蕨不同提取液体外抗真菌作用研究[J]. 中药材, 2012, 35(12): 1981-1985
- 14 刘海燕, 杜文钊, 宋国强, 等. 香鳞毛蕨药材的质量标准研究[J]. 广东药学院学报, 2016, 32(1): 36-40
- 15 李文馨, 胡海清, 陆昕. 香鳞毛蕨研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(4): 985-988, 993

(收稿日期:2017-04-28)
(修回日期:2017-05-05)