

姜黄素对 TNF- α 诱导的 HUVEC 表达 ICAM-1 的调节作用

施颖琦^{1,2}, 于成功^{2*}

(¹南通市第一人民医院消化内科, 江苏 南通 226000; ²南京医科大学鼓楼临床学院消化内科, 江苏 南京 210008)

[摘要] 目的: 细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM)-1 在炎症性肠病患者肠道炎症的发生中起着十分重要的作用。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 可诱导内皮细胞 ICAM-1 的过度表达。本研究通过姜黄素干预人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), 观察姜黄素是否能够影响 TNF- α 诱导 ICAM-1 的表达。方法: 从新生儿脐带中获取 HUVEC 进行原代培养, 取第 3~5 代的细胞, 并将其分成 3 个实验组: 空白对照组, 不做处理; TNF- α 组, 加入 10 ng/ml TNF- α 干预 3 h; 姜黄素组, 先加入 10 μ mol/L 姜黄素干预 2 h, 再加入 10 ng/ml TNF- α 干预 3 h。通过流式细胞仪检测 3 组 HUVEC 细胞表面 ICAM-1 的表达量; 同时通过免疫荧光技术观察 3 组细胞表达 ICAM-1 的荧光强度; Real-time PCR 技术检测 3 组细胞中 ICAM-1 mRNA 的表达。结果: ①流式细胞检测发现, TNF- α 组中 HUVEC 表面 ICAM-1 的表达较空白对照组明显增加[(88.69 \pm 3.14)% vs (9.82 \pm 1.21)%, $P < 0.01$]; 姜黄素组中 ICAM-1 表达[(41.85 \pm 8.39)%]较 TNF- α 组明显下降($P < 0.01$), 但高于空白对照组($P < 0.01$); ②免疫荧光检测也显示, TNF- α 组中 HUVEC 细胞表面 ICAM-1 的表达强度明显高于空白对照组, 而姜黄素组 ICAM-1 的表达强度较 TNF- α 组减弱。③Real-time PCR 显示, TNF- α 组中 ICAM-1 mRNA 的表达较空白对照组增加(34.70 \pm 14.99 vs 1.03 \pm 0.26, $P < 0.05$); 姜黄素组中 ICAM-1 mRNA 表达(15.34 \pm 8.42)较 TNF- α 组下降($P < 0.01$), 比空白对照组增加($P < 0.05$)。结论: 姜黄素可抑制 TNF- α 诱导的 HUVEC 表面 ICAM-1 蛋白的表达, 这与其能够抑制细胞内 ICAM-1 mRNA 的表达有关。

[关键词] 细胞间黏附分子-1; 肿瘤坏死因子- α ; 人脐静脉内皮细胞; 炎症性肠病

[中图分类号] Q256

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)11-1476-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20141104

Effects of curcumin on ICAM-1 expression of TNF- α -stimulated human umbilical vein endothelial cells

Shi Yingqi^{1,2}, Yu Chenggong^{2*}

(¹Gastrointestinal Department, Nantong First People's Hospital, Nantong 226000; ²Gastrointestinal Department, the Drum Tower Hospital of NJMU, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 plays a very important role in intestinal inflammation of patients with inflammatory bowel disease. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) induces overexpression of ICAM-1 in endothelial cells. The aims of study were to investigate the effects of curcumin on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and to observe whether curcumin can influence expression of ICAM-1 induced by TNF- α . **Methods:** HUVECs were obtained from umbilical cord of newborns and cultured and generated from primary to the fifth generation. The third to fifth generation of cells were selected and divided into three experimental groups, including control group, TNF- α group with 10 ng/ml TNF- α intervention for 3 hours and curcumin group. In curcumin group, HUVEC was cultured with 10 μ mol/L curcumin for 2 hours and then continued to culture for 3 hours after adding 10 ng/ml TNF- α . The expression of ICAM-1 was detected by flow cytometry and immunofluorescence. Flow cytometry was performed to detect the expression of ICAM-1 on HUVEC surface in the three groups. Meanwhile, immunofluorescence was performed to observe the fluorescence intensity of the expression of ICAM-1. The expression of ICAM-1 mRNA was measured by Real-time PCR. **Results:** ①The expression of ICAM-1 in HUVEC in the TNF- α group was significantly increased than that in the control group [(88.69 \pm 3.14)% vs (9.82 \pm 1.21)%, $P < 0.01$]. The expression of ICAM-1 in the curcumin group [(41.85 \pm 8.39)%] was significantly de-

[基金项目] 南京市医学科技发展项目(ZKX10014)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: chenggong_yu2000@yahoo.com

creased than that in the TNF- α group ($P < 0.01$), but higher than that in the control group ($P < 0.01$). ②The immunofluorescence results also showed that the expression intensity of ICAM-1 in the TNF- α group was significantly higher than that in the control group. The expression intensity of ICAM-1 in the curcumin group was decreased than that in the TNF- α group. ③The expression of ICAM-1 mRNA in the TNF- α group was increased than that in the control group (34.70 ± 14.99 vs 1.03 ± 0.26 , $P < 0.05$). The expression of ICAM-1 mRNA in the curcumin group (15.34 ± 8.42) was significantly decreased than that in the TNF- α group ($P < 0.01$), but higher than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The results showed that curcumin could inhibit the expression of ICAM-1 protein in HUVEC induced by TNF- α . The effect may be related to the inhibition of ICAM-1 mRNA expression.

[Key words] intercellular adhesion molecule-1; tumor necrosis factor- α ; human umbilical vein endothelial cells; inflammatory bowel disease

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(11): 1476-1480]

细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM)-1 属黏附分子中的免疫球蛋白超家族, 主要表达于内皮细胞, 参与炎症和免疫反应, 在正常肠组织中, ICAM-1 通常低水平表达, 而在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)患者的肠组织中, ICAM-1 表达和分布明显增加, 且与组织的炎症程度密切相关^[1-2]。

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 可增加血管内皮细胞 ICAM-1 的分泌, 并促进中性粒细胞黏附内皮细胞, 从而刺激局部炎症反应。姜黄素为草本植物姜黄根茎中的生物活性成分, 既往研究表明, 姜黄素可以抑制 TNF- α 、TNF- α 受体 TNFR I 及 TNFR II^[3]、核转录因子(NF- κ B)^[4-6], 并磷酸化促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)等促炎性因子, 但是否可通过对上述促炎性因子的抑制进而抑制 ICAM-1 的表达尚不清楚。

本研究利用静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)为研究对象, 观察不同因素对血管内皮细胞 ICAM-1 表达的影响。选用 HUVEC 主要是考虑到其更接近肠血管内皮细胞, 且取材经济方便、操作简单, 与动脉内皮细胞生物学特征相似。本研究通过 TNF- α 刺激 HUVEC 观察 ICAM-1 的表达; 并通过流式细胞技术、免疫荧光及 Real-time PCR 检测姜黄素干预后 HUVEC 中 ICAM-1 的表达, 了解姜黄素是否能抑制 TNF- α 诱导的 ICAM-1 表达, 为 IBD 提供新的药物治疗策略。

1 材料和方法

1.1 材料

在无菌条件下, 健康产妇分娩后立即取新生儿脐带。长度 > 20 cm, 放入 4℃ 脐带保存液中, 2 h 内送至细胞培养室。

1.2 方法

1.2.1 HUVEC 细胞的分离与原代培养

在无菌条件下取新生胎儿脐带, 将输液软管一端插入脐静脉, 将脐带另一端用止血钳夹闭, 向脐静脉中灌入含 0.25% EDTA 的胰酶, 37℃ 水浴中孵育 12 min, 然后将细胞-酶溶液收集于 50 ml 离心管中。细胞接种培养箱中培养。

1.2.2 VIII 因子相关抗原免疫荧光鉴定 HUVEC 细胞

在 6 孔培养板内放置无菌盖玻片 2.4 cm × 2.4 cm, 每孔中种植 2 ml 含有 4×10^5 个细胞的第 3 代内皮细胞悬液。待内皮细胞生长至近融合状态时, 取出盖玻片, 进行间接免疫荧光检查, 一抗为兔抗人 VIII 因子单克隆抗体, 同时以不加一抗的细胞作为阴性对照。二抗为羊抗兔 IgG-FITC, DAPI 染核后立即在荧光显微镜下观察, 摄片。

1.2.3 试验分组

根据文献, 将姜黄素干预浓度定为 10 μ mol/L^[7]; TNF- α 浓度定为 10 ng/ml^[8]。实验共分为 3 个组: ①空白对照组: HUVEC 中不加任何试剂; ②TNF- α 组: TNF- α (10 ng/ml) 孵育 HUVEC 3 h; ③姜黄素组: 先加入 10 μ mol/L 姜黄素预处理 2 h, 然后加入 10 ng/ml TNF- α 孵育 3 h。

1.2.4 流式细胞仪检测

收集细胞悬液, 测定细胞悬液浓度, 加入 PE-抗人 ICAM-1 抗体 10 μ l, 同型对照抗体为 PE-鼠 IgG1 (κ), 置于 37℃ 避光孵育 30 min, 上机检测。

1.2.5 免疫荧光

在 6 孔培养板内放置无菌盖玻片, 种植细胞悬液。待内皮细胞生长至近融合状态时, 加入 PE-抗人 CD54 抗体, DAPI 染核后, 荧光显微镜下观察 3 组细胞, 摄片。

1.2.6 Real-time PCR 检测 3 组细胞中 ICAM-1 mRNA

NA 变化

提取3组细胞RNA,细胞完成相应处理后,用TRIzol提取各处理组细胞总RNA,逆转录合成cDNA第1链,取RT-PCR产物cDNA进行PCR扩增,通过Real-time PCR法,检测ICAM-1 mRNA的表达。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式^[9]、设定空白对照组的表达量为1,求得内参基因GAPDH、目标基因ICAM-1各自的相对cDNA表达量,即代表其mRNA的相对表达量。

1.3 统计学方法

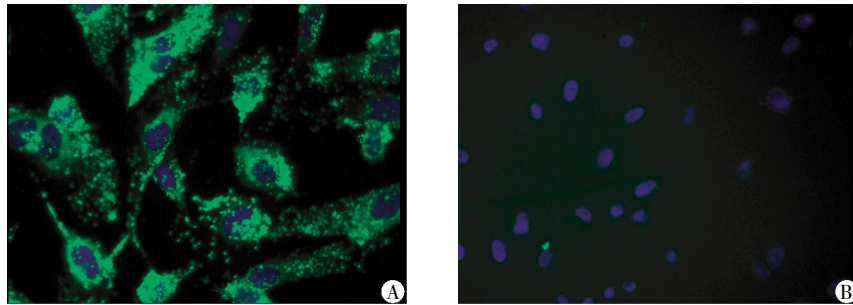
采用SPSS13.0统计软件进行统计学处理。所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间差异比

较用方差分析, $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VIII因子相关抗原免疫荧光鉴定HUVEC细胞

VIII因子能与血管性假血友病因子(Von willebrand factor, VwF)结合形成复合物,VwF主要由血管内皮细胞合成,VIII因子可作为鉴定血管内皮细胞的特异性标志。原代培养的HUVEC在接种后4~5h开始贴壁生长,约在24h后细胞完全贴壁。3~5d生长至80%融合状态。用第VIII因子相关抗原免疫荧光染色发现,绝大多数原代培养细胞为第VIII因子相关抗原阳性(图1),提示为血管内皮细胞。



A:兔抗人VIII因子抗体+羊抗兔IgG-FITC+DAPI免疫荧光染色,见胞浆有绿色荧光的内皮细胞;B:阴性对照仅加PBS、二抗及DAPI,仅见有蓝色荧光胞核的内皮细胞。

图1 VIII因子相关抗原免疫荧光检查鉴定HUVEC细胞

Figure 1 Immunofluorescence for identifying HUVEC cells with factor VIII related antigen

2.2 HUVEC细胞表面ICAM-1表达的流式细胞仪检测结果

以PE-鼠IgG1(κ)作为同型对照,表达率为0.6%~1.5%,表明PE-抗人ICAM-1抗体对细胞的非特异性染色较少(图2A);空白对照组、TNF- α 组、姜黄素组经PE-抗人ICAM-1染色后,表达率不同(图2B~D)。经统计分析,TNF- α 组ICAM-1表达较空白对照组增加[(88.69±3.14)% vs (9.82±1.21)%, $P < 0.01$];姜黄素组中ICAM-1表达(41.85±8.39)%较TNF- α 组下降($P < 0.01$),但仍比空白对照组增加($P < 0.01$)。以上说明姜黄素可抑制细胞表面ICAM-1的表达。

2.3 免疫荧光观察HUVEC表面ICAM-1的表达

400倍荧光显微镜免疫荧光检测显示,PE-抗人ICAM-1孵育后,TNF- α 组HUVEC红色荧光强度较空白对照组明显增强;姜黄素组HUVEC红色荧光强度较TNF- α 组弱。表明TNF- α 可刺激HUVEC表面ICAM-1的表达,姜黄素可抑制TNF- α 诱导的ICAM-1表达(图3)。

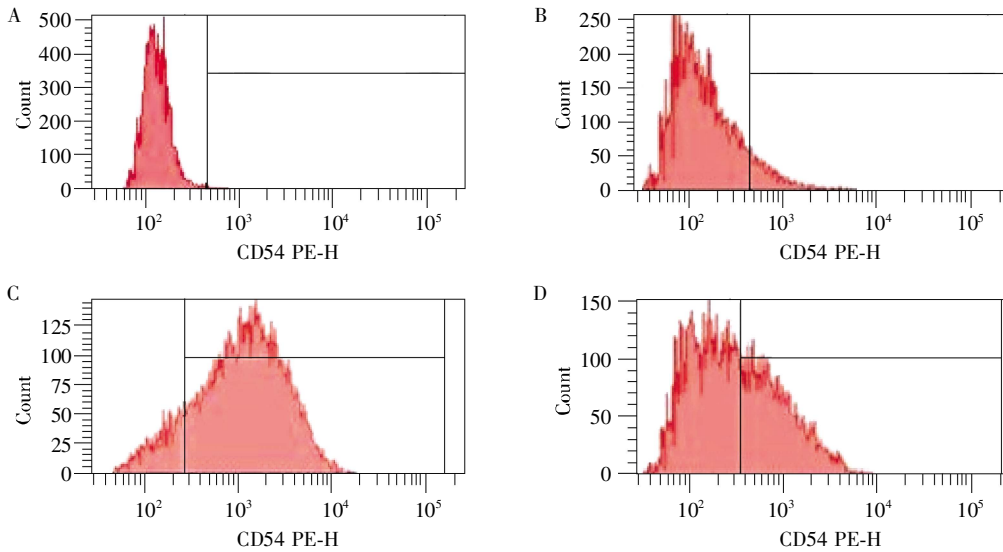
2.4 免疫荧光观察HUVEC表面ICAM-1的表达

结果经统计分析后显示,TNF- α 组HUVEC中ICAM-1表达较空白对照组增加(34.70±14.99 vs 1.03±0.26, $P < 0.05$);姜黄素组HUVEC中ICAM-1表达(15.34±8.42)较TNF- α 组下降($P < 0.01$),但仍比空白对照组增加($P < 0.05$);表明姜黄素能抑制TNF- α 诱导的ICAM-1 mRNA的表达。

3 讨论

IBD包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC),是一类以肠道炎症为主要表现的慢性复发性肠道自身免疫性疾病。IBD是临床常见病和疑难病之一,近年来其发病率在我国明显升高。由于其发病机制仍未完全阐明且治疗手段有限,因此该病的治疗颇为棘手,常易复发。因此,阐明IBD的发病环节并以此寻找新的有效治疗靶点已成为目前的研究热点。

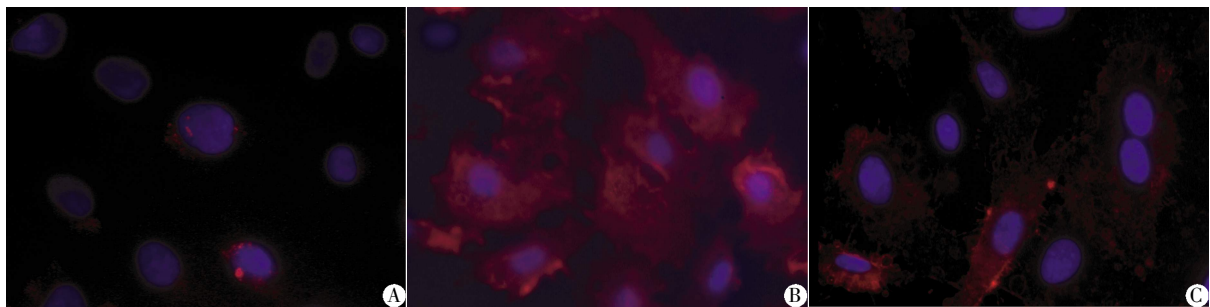
白细胞过度激活是IBD病理过程中的一个重要环节,其主要表现为淋巴细胞在炎症部位聚集,而淋巴细胞的黏附聚集则始于内皮细胞表达黏附分子的增多^[8]。其中淋巴细胞与ICAM-1间的结合起到决



A:空白对照组加入PE-鼠 IgG1(κ)的同型对照结果,表达率 0.6%~1.5%;B:空白对照组 HUVEC 中 ICAM-1 的表达;C:TNF- α 组 HUVEC 中 ICAM-1 的表达;D:姜黄素组 HUVEC 中 ICAM-1 的表达。

图 2 流式细胞检测 HUVEC 细胞表面 ICAM-1 的表达

Figure 2 The expression of ICAM-1 on HUVEC surface detected by flow cytometry



A:空白对照组;B:TNF- α 组;C:姜黄素组。

图 3 免疫荧光观察 HUVEC 表面 ICAM-1 的表达

Figure 3 Observation of the expression of ICAM-1 on HUVEC surface by immunofluorescence test

定性作用。淋巴细胞跨血管内皮细胞迁移是引起病变部位炎症反应的关键步骤。ICAM-1 能够促进淋巴细胞与血管内皮细胞的黏附和淋巴细胞向炎症部位的迁移,共同介导免疫效应细胞与多种细胞间的相互作用,在机体免疫系统中起重要作用^[10-11]。肠黏膜血管内皮细胞表达的 ICAM-1 可以介导淋巴细胞和血管内皮细胞间的黏附,促使淋巴细胞向炎症部位浸润并释放多种炎症因子,而肠黏膜中的炎症因子又可以刺激诱导血管内皮细胞表达 ICAM-1 从而促使更多的淋巴细胞向炎症部位迁移^[11-12];另外 ICAM-1 还可以通过和其他炎症因子共同作用,促进嗜酸性粒细胞产生并释放超氧化物进一步加重炎症反应^[13]。

已发现 ICAM-1 在正常人黏膜中的表达较低而在 IBD 患者中表达明显升高,且与疾病活动指数呈正相关^[1];目前已知有多种因子可以刺激血管内皮细胞表达 ICAM-1,如 TNF- α 、血管内皮生长

因子 A 等^[11,14]。因此寻找影响 ICAM-1 的相关因子并能阻断 ICAM-1 的分泌就可以大大减轻淋巴细胞在炎症部位的聚集和浸润,从而减轻炎症对肠黏膜的破坏作用,所以 ICAM-1 有可能成为治疗 IBD 的新靶点^[15]。已有文献报道表明,在 IBD 小鼠模型中给予 ICAM-1 抗体后,小鼠肠黏膜炎症减轻、淋巴细胞浸润减少、髓过氧化物酶活性减少^[16-17];ICAM-1 的重要组成部分是 $\alpha 4$ 黏合素,针对该黏合素的单克隆抗体(如 Natalizumab)已开始应用于临床,其前期临床试验也得到了初步疗效^[18-19]。但该类抗体仅是使蛋白失活,不能在转录水平干预效应蛋白的合成,且生产工艺复杂,成本高,长期使用患者体内会产成相应抗体而使药效降低,因此寻找针对 ICAM-1 的其他干预措施具有十分重要的临床意义。

近年来的研究显示,姜黄素对 IBD 具有一定的治疗作用,Hanai 等^[20]的研究结果显示,口服姜黄

素加柳氮磺胺吡啶或5-氨基水杨酸治疗溃疡性结肠炎6个月后,姜黄素组临床活动指数及结肠镜检查检查结果均较对照组明显改善;但其作用机制尚不十分清楚,其与ICAM-1的关系尚需进一步阐明。有研究表明,姜黄素等作用可能与其能够抑制NF- κ B的活性有关^[21]。本研究的后续实验可对姜黄素干预ICAM-1表达的信号通路进行检测,进一步证明姜黄素抑制ICAM-1表达的机制,为IBD的药物治疗提供新策略。

[参考文献]

- [1] Vainer B, Nielsen OH. Changed colonic profile of P-selectin, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-2, and ICAM-3 in inflammatory bowel disease [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 121(2): 242-247
- [2] Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, et al. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells [J]. *Circulation*, 1998, 98(12): 1164-1171
- [3] Kim YS, Ahn Y, Hong MH, et al. Curcumin attenuates inflammatory responses of TNF- α -stimulated human endothelial cells [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50(1): 41-49
- [4] Leclercq IA, Farrell GC, Sempoux C, et al. Curcumin inhibits NF- κ B activation and reduces the severity of experimental steatohepatitis in mice [J]. *J Hepatol*, 2004, 41(6): 926-934
- [5] Sallh B, Assi K, Templeman V, et al. Curcumin attenuates DNB-induced murine colitis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 285(1): G235-243
- [6] Hanai H, Sugimoto K. Curcumin has bright prospects for the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(18): 2087-2094
- [7] Binion DG, Otterson MF, Rafiee P. Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition [J]. *Gut*, 2008, 57(11): 1509-1517
- [8] Binion DG, Heidemann J, Li MS, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in human intestinal microvascular endothelial cells is regulated by PI 3-kinase/Akt/MAPK/NF- κ B; inhibitory role of curcumin [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 297(2): G259-268
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [10] Yang L, Froio RM, Sciuto TE, et al. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow [J]. *Blood*, 2005, 106(2): 584-592
- [11] Scaldaferrri F, Sans M, Vetrano S, et al. The role of MAPK in governing lymphocyte adhesion to and migration across the microvasculature in inflammatory bowel disease [J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(1): 290-300
- [12] Nakamura S, Ohtani H, Watanabe Y, et al. In situ expression of the cell adhesion molecules in inflammatory bowel disease; Evidence of immunologic activation of vascular endothelial cells [J]. *Lab Invest*, 1993, 69(1): 77-85
- [13] Nagata M, Sedgwick JB, Kita H, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor augments ICAM-1 and VCAM-1 activation of eosinophil function [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 19(1): 158-166
- [14] Scaldaferrri F, Vetrano S, Sans M, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(2): 585-595
- [15] Kaser A, Tilg H. Novel therapeutic targets in the treatment of IBD [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12(5): 553-563
- [16] Picarella D, Hurlbut P, Rottman J, et al. Monoclonal antibodies specific for beta (7) integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RB (high) CD4(+) T cells [J]. *J Immunol*, 1997, 158(5): 2099-2106
- [17] Taniguchi T, Tsukada H, Nakamura H, et al. Effects of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody on dextran sodium sulphate-induced colitis in rats [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1998, 13(9): 945-949
- [18] Sandborn WJ, Colombel JF, Enns R, et al. Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn's disease [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(18): 1912-1925
- [19] Gordon FH, Hamilton MI, Donoghue S, et al. A pilot study of treatment of active ulcerative colitis with natalizumab, a humanized monoclonal antibody to alpha-4 integrin [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002, 16(4): 699-705
- [20] Hanai H, Lida T, Takeuchi K, et al. Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006, 4(12): 1502-1506
- [21] 李伟军, 刘侨侨. 姜黄素对溶血磷脂酰胆碱诱导内皮细胞炎症因子产生的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2009, 14(1): 52-56