

牛蒡根水提取物对高血压患者血清致伤血管内皮细胞 TLR4、NF-κB 表达的影响

刘鑫¹, 马维红², 邓晓兰¹, 夏行¹

(1. 桂林医学院研究生学院, 广西 桂林 541004;

2. 桂林医学院附属医院, 广西 桂林 541004)

【摘要】 目的 探究牛蒡根水提取物对高血压患者血清致伤血管内皮细胞 Toll 样受体-核转录因子(TLR-NF-κB)信号转导通路的影响。**方法** 选取 2014 年 12 月至 2016 年 1 月于桂林医学院附属医院诊治的高血压病患者 40 例纳入高血压组, 选择健康体检者 40 例纳入对照组。分别采用两组研究对象的血清干预人脐静脉内皮细胞(HUVEC-C) 24 h, 应用不同浓度的牛蒡根水提取物干预高血压患者血清诱导的 HUVEC-C TLR4 表达(24 h)及核转录因子(NF-κB)活化(2 h)。将细胞连续培养 24 h 后将细胞蛋白提取, 并用免疫印迹(Western blot)技术检测细胞内 TLR4 蛋白及 NF-κB 抑制因子 I-κBα 蛋白的表达。**结果** ①高血压组细胞提取蛋白中的 TLR-4 水平为(0.670 1±0.091 18), 明显高于对照组(0.224±0.030 97), I-κBα 水平为(0.291 5±0.054 92), 明显低于对照组的(0.543 7±0.089 97), 差异均有统计学意义(P<0.05); ②牛蒡根水提取物干预低剂量组、中剂量组及高剂量组细胞蛋白中的 TLR-4 表达水平分别为(0.270 9±0.061 39)、(0.455 1±0.035 12)、(0.428 7±0.045 89), 均低于高血压组的(0.670 1±0.091 18), 同时高于对照组的(0.224±0.030 97); I-κBα 表达水平为(0.4795±0.057 43)、(0.360 85±0.060 85)、(0.310 00±0.049 10), 高于高血压组的(0.291 5±0.054 92), 同时低于对照组的(0.543 7±0.089 97), 差异均有统计学意义(P<0.05)。**结论** 经 TLR-NF-κB 信号途径介导的免疫紊乱和炎症反应可能是高血压病血管内皮损伤的机制之一, 牛蒡根水提取物可通过抑制细胞 TLR-4、NF-κB 的表达, 从而抑制炎症因子的表达来达到保护血管内皮细胞的作用。

【关键词】 牛蒡; 高血压; 血管内皮细胞; Toll 样受体 4; 核转录因子

【中图分类号】 R544.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2017)03-0352-04

Effect of burdock root aqueous extract on TLR4, NF-κB expression in vascular endothelial cells in patients with hypertension. LIU Xin¹, MA Wei-hong², DENG Xiao-lan¹, XIA Xing¹. 1. Graduate School, Guilin Medical College, Guilin 541004, Guangxi, CHINA; 2. The Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541004, Guangxi, CHINA

【Abstract】 Objective To explore the effect of burdock root aqueous extract on toll-like receptor 4-nuclear factor κB (TLR-NF-κB) signal pathway in vascular endothelial cells in patients with hypertension. **Methods** From December 2014 to January 2016, we enrolled 40 patients of essential hypertension in the Affiliated Hospital of Guilin Medical College (the hypertension group) and 40 cases healthy individuals (the control group). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC-C) were induced with serum collected from the two groups of subjects for 24 h. Different doses of

基金项目: 广西中医药民族医药传承创新专项立项课题(编号: GZLC14-38); 2014 年国家级大学生创新创业训练计划项目(编号: G201410601005); 广西壮族自治区大学生创新创业训练项目(编号: 201410601019)

通讯作者: 马维红。E-mail: gxgylq@126.com

tant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons [J]. Médecine Sciences M/S, 2005, 21(5): 556-557.

[11] Jones DG, Devon RM. An ultrastructural study into the effects of pentobarbitone on synaptic organization [J]. Brain Research, 1978, 147(1): 47-63.

[12] Güldner FH. Sexual dimorphisms of axo-spine synapses and postsynaptic density material in the suprachiasmatic nucleus of the rat [J]. Neuroscience Letters, 1982, 28(2): 145-150.

[13] Wang Q, Xu J, Rottinghaus GE, et al. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils [J]. Brain Research, 2002, 958(2): 439-447.

[14] Witte AV, Kerti L, Margulies DS, et al. Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults [J]. Journal of Neuroscience, 2014, 34(23): 7862-7870.

[15] Hurley LL, Akinfiresoye L, Kalejaiye O, et al. Antidepressant effects of resveratrol in an animal model of depression [J]. Behavioural Brain Research, 2014, 268(2): 1-7.

[16] Anastácio JR, Netto CA, Castro CC, et al. Resveratrol treatment has neuroprotective effects and prevents cognitive impairment after chronic cerebral hypoperfusion [J]. Neurological Research, 2014, 36(7): 627-633.

[17] Bourne JN, Harris KM. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines [J]. Annual Review of Neuroscience, 2008, 31(1): 47-67.

[18] Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behavior [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2009, 10(12): 861-872.

[19] Zhao J, Harada N, Kurihara H, et al. Cilostazol improves cognitive function in mice by increasing the production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus [J]. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics, 2011, 330(1): 2-12.

[20] Silva AJ. Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory [J]. Journal of Neurobiology, 2003, 54(1): 224-237.

(收稿日期: 2016-09-29)

burdock root aqueous extract were used to intervene TLR4 expression (24 h) and activation (2 h) in HUVEC-C induced by serum from patients with hypertension. The cells were continuously cultured for 24 h, and then the protein was extracted. The expression of TLR4 protein and NF- κ B inhibitor I- κ B α was detected by Western blot. **Results** (1) The TLR-4 level in the hypertension group was significantly higher than that in the control group, (0.670 1 \pm 0.0911 8) *vs* (0.224 \pm 0.030 97), while I- κ B α level in the hypertension group was significantly lower, (0.291 5 \pm 0.054 92) *vs* (0.543 7 \pm 0.089 97), with statistically significant differences (P <0.05). (2) The TLR-4 levels in the intervention groups with low-dose, middle-dose, and high-dose burdock root aqueous extract were (0.270 9 \pm 0.061 3), (0.455 1 \pm 0.035 1), (0.428 7 \pm 0.045 89), which were significantly lower than (0.670 1 \pm 0.0911 8) in hypertension group and significantly higher than (0.224 \pm 0.030 97) in the control group. (3) The I- κ B α levels in the intervention groups with low-dose, middle-dose, and high-dose burdock root aqueous extract were (0.479 5 \pm 0.057 43), (0.360 85 \pm 0.060 85), (0.310 00 \pm 0.049 10), respectively, which were significantly higher than (0.291 5 \pm 0.054 92) in the hypertension group and significantly lower than (0.543 7 \pm 0.089 97) in the control group. The above differences were all statistically significant (P <0.05). **Conclusion** Immune disorders and inflammatory response mediated by TLR-NF- κ B signal pathways may be one of the mechanisms of vascular endothelial injury in hypertensive disease. Burdock root aqueous extract can inhibit the expression of TLR-4, NF- κ B, thereby inhibiting the expression of inflammatory cytokines to protect vascular endothelial cells.

【Key words】 Burdock; Hypertension; Vascular endothelial cells; Toll like receptor 4 (TLR-4); Nuclear factor κ B (NF- κ B)

近年来,随着人口的老齡化、社会生活节奏的改变以及饮食等不良习惯导致高血压病罹患率激增。高血压病属慢性进行性心血管综合征,是导致脑卒中、冠心病、心力衰竭等心血管疾病的高危因素,致残、致死率较高,严重影响患者生活质量^[1]。高血压发病与多种因素有关,血管内皮损伤是重要的始动因子,同时也是内皮-高血压-心血管事件链的载体,因此,抑制血管内皮细胞损伤可有效防治高血压病的发生发展。牛蒡又称东洋参,2年生菊科草本直根类植物。有研究报道,牛蒡根具有抗炎、抗氧化、抗过敏、降压等功能^[2-3],但国内外就牛蒡根水提取物对血管内皮细胞保护作用的具体机制研究甚少。本研究旨在观察牛蒡根水提取物对高血压病患者血管内皮细胞 Toll 样受体-核转录因子(TLR-NF- κ B)信号通路的影响,探讨其对高血压病血管内皮细胞保护作用及其分子机制,为牛蒡根水提取物用于临床高血压病的防控和治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取桂林医学院附属医院于2014年12月至2016年1月期间收治的40例高血压患者(2、3级)纳入高血压组,其中男性24例,女性16例,年龄55~75岁,平均(64.40 \pm 6.54)岁;平均收缩压(166.80 \pm 10.68) mmHg (1 mmHg=0.133 kPa),平均舒张压(107.40 \pm 6.19) mmHg,符合世界卫生组织/国际高血压学会诊断标准。入选患者均排除继发性高血压、恶性肿瘤、糖尿病、结缔组织病、心功能不全、高脂血症、冠心病以及合并高血压肾病、高血压心脏病等靶器官损伤者,并排除入组前1周服用影响血压药物的患者。选取同期未合并高血压的健康体检者40例纳入对照组,其中男性28例,女性12例,年龄50~77岁,平均(62.43 \pm 7.59)岁,两组受检者的年龄、性别比较差异均无统计学意义(P >0.05),具有可比性。

1.2 血清的收集 所有受检者均抽取空腹静脉血并将其置于无菌带帽不抗凝干燥试管中,自凝后

4 $^{\circ}$ C、2 000 r/min、离心15 min,然后取上清液置于恒温水浴箱56 $^{\circ}$ C灭活30 min,保存在-20 $^{\circ}$ C条件下待测。

1.3 实验材料及仪器 人脐静脉内皮细胞株(HUVEC-c)购自南华大学实验中心;牛蒡根水提取物(西安昌岳生物科技有限公司,批号:20140106,规格10:1);DMEM培养基购自Gibco公司;细胞RIPA裂解液购自碧云天公司,蛋白彩虹Marker购自THERMO公司。TLR-4一抗购自Abcam公司。I- κ B α 一抗购自博士德公司。内参 β -actin购自中杉金桥公司。二抗购自中杉金桥公司。ECL发光液购自中杉金桥公司。PVDF膜购自索莱宝公司。SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(4 \times)购自于碧云天公司,20 \times TBS购自索莱宝公司。Tween-20购自索莱宝公司。甘氨酸购自索莱宝公司。

MDF-U73V超低温冰箱(日本松下公司)、Cmc8037 30 L液氮罐(美国Thermo公司)、ML4002精密天平(德国梅特勒-托利多公司)、Allegra 64R高速冷冻离心机、气套式CO₂培养箱311、W-CJ-2FD双人单面超净工作台(苏州净化设备公司)、Allegra 64R高速冷冻离心机、美国贝克曼库尔特公司生产的Allegra X-22R冷冻离心机、Bio-Rad公司生产的S垂直电泳槽及垂直蛋白转印槽以及化学发光凝胶成像仪(Bio-Rad公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养与实验分组 将人脐静脉内皮细胞株(HUVEC-c)培养于环境为10%胎牛血清、1%双抗的高糖DMEM培养液中,条件37 $^{\circ}$ C、5%CO₂。隔天换液,以0.25%胰酶消化传代后,按条件培养基不同分别转种于培养皿中,分组为健康对照组(对照组)、高血压致病组(高血压组)、低剂量药物干预组(低剂量组)、中剂量药物干预组(中剂量组)、高剂量药物干预组(高剂量组)。

1.4.2 母液与条件培养基配制 牛蒡根水提取物的配制:将10:1牛蒡根水提取物粉剂500 mg溶于50 mL DMEM中,配制成浓度为10 mg/mL的母液,并于4 $^{\circ}$ C避光保存。条件培养基配制按照实验分组配制

如下:①空白对照组:含 20%健康人血清浓度的正常培养基;②高血压致病组:含 20%高血压患者血清浓度的正常培养基;③低剂量药物干预组(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛蒡根水提取物质量浓度):50 μL 牛蒡根水提取物母液+200 μL 高血压患者血清+9 750 μL 普通培养基;④中剂量药物干预组(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛蒡根水提取物质量浓度):100 μL 牛蒡根水提取物母液+200 μL 高血压患者血清+9 700 μL 普通培养基;⑤高剂量药物干预组(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛蒡根水提取物质量浓度):200 μL 牛蒡根水提取物母液+200 μL 高血压患者血清+9 600 μL 正常培养液。

1.4.3 TLR4 以及 I- κ B 蛋白表达强度检测 采用 Western blot 方法检测,方法:各组细胞采用不同条件的培养基,培养 48 h (条件要求:37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2),将上清液弃去,其细胞采用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗两遍,总蛋白用细胞裂解液进行提取。各组蛋白浓度采用 BCA 法进行鉴定。取约总蛋白(50 μg)将其通过煮沸变性,SDS-PAGE 电泳并利用电转移至 PVDF 膜,然后采用膜双蒸水漂洗,再将其放容器中(含有封闭液)置于室温摇床上 3 h。加入用一抗稀释液稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜。用 TBS/T 于室温脱色摇床上洗膜 3 次。然后再讲封闭液稀释的二抗加入并进行孵育,大约 2 h,进行 3 次 TBS/T 洗膜。先将膜与 ECL 进行反应,然后置于化学发光凝胶成像仪上予以显影,后续图像分析。

1.5 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计学软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两样本均数比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

高血压组细胞提取蛋白中的 TLR-4 明显高于对照组,I- κ B α 水平明显低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。药物干预组各组均能有效抑制 TLR4 蛋白的表达,均低于高血压致病组,差异均有统计学意义($P<0.05$);并且以低剂量组抑制效果最好,差异均有统计学意义($P<0.05$);中、高剂量组表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。而药物干预组各组 I- κ B α 蛋白的表达,均高于高血压致病组,低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);并且低剂量组高于中、高剂量组,差异均有统计学意义($P<0.05$);中、高剂量组表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1 和图 1。

表 1 各组细胞提取蛋白中的 TLR-4 及 I- κ B α 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	TLR-4	I- κ B α
对照组	40	0.224 \pm 0.030 97 ^b	0.543 7 \pm 0.089 97 ^b
高血压组	40	0.670 1 \pm 0.091 18 ^a	0.291 5 \pm 0.054 92 ^a
低剂量组	40	0.270 9 \pm 0.061 39 ^{ab}	0.479 5 \pm 0.057 43 ^{ab}
中剂量组	40	0.455 1 \pm 0.035 12 ^{abc}	0.360 85 \pm 0.060 85 ^{abc}
高剂量组	40	0.428 7 \pm 0.045 89 ^{abc}	0.310 00 \pm 0.049 1 ^{abc}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与高血压组相比较,^b $P<0.05$;与低剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

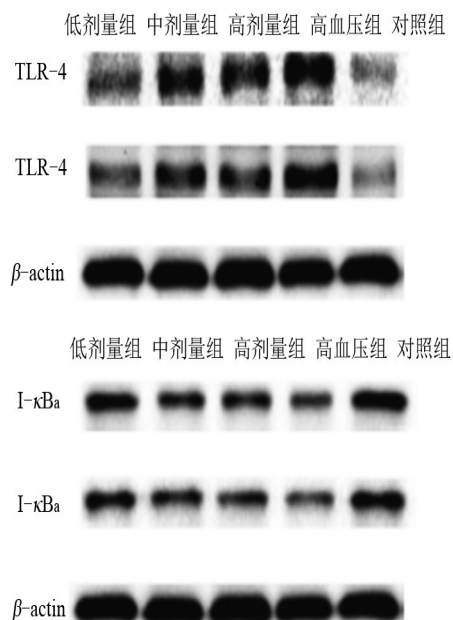


图 1 TLR4 及 I- κ B α 蛋白表达结果

3 讨论

近年调查结果显示,我国高血压患病率达 29.6%,治疗率为 24.7%,但有效控制率仅占 6.1%,并且难治性高血压占高血压患者总数的 30%~40%,高血压的预防、控制与治疗是目前临床上亟待解决的一大难题^[4]。有研究表明,高血压病与血管内皮细胞受损、免疫功能紊乱、炎症因子的表达改变有关^[5],并且,使用抑制炎症细胞因子类药物作用于高血压患者,可有效抑制炎症信号通路达到降低血压的效果,同时具有抗炎作用的降压药物还具有保护更多靶器官的优势。血管内皮损伤是高血压和其他心血管疾病及其相关并发症发生发展过程中的重要环节,因此,血管内皮损伤可作为高血压病治疗的重要靶点。

高血压病患者血管内皮细胞损伤的重要分子生物学机制之一是通过 TLR-NF- κ B 介导的免疫功能失衡和炎症反应加强。张竞之等^[6]通过对中药提取物丹皮酚对高血压病患者血管内皮细胞 TLR-NF- κ B 信号通路的影响研究中发现,该信号通路介导的炎症反应是高血压病血瘀证形成的重要机制之一。Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 作为一种跨膜受体,是 Toll 样受体家族中的重要成员,与配体结合后通过一系列级联反应介导炎症反应^[7-8]。TLRs 信号通路的下游受体 JNK (c-Jun N-terminal kinase, c-Jun 氨基末端激酶) 是 MAPK 通路中一条重要的路径,介导机体炎症及氧化应激反应。Bomfim 等^[9]研究发现,抑制 TLR4 的表达可达到降低血压的目的。MyD88 是 TLR-NF- κ B 信号通路具有关键调节作用的蛋白,TLR4 激活后信号通路传递至下游的途径主要有 2 条,即髓样分化因子 88 (MyD88) 依赖性和非依赖性转导途径^[10],NF- κ B 是非 MyD88 途径的关键信号,依赖胞内信号转导途径激

活NF- κ B,而NF- κ B则进一步激活下游的单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、TNF- α 等多种炎症因子基因的转录与表达,以致血管内皮损伤而发生高血压事件。NF- κ B是一种由P65和P50组成的异源二聚体复合物,广泛存在于哺乳动物组织细胞中的核转录因子,可与多种靶基因发生特异性结合后在免疫和炎症反应中发挥作用。Youhua等^[11]发现通过药物逆转AGES诱导的NF- κ B的磷酸化修饰,可抑制氧化应激并阻止HUVEC-c的凋亡。正常情况下,NF- κ B通常与其内源性抑制剂I- κ B结合,以无活性的形式存在于细胞内。当细胞受到炎性刺激后,NF- κ B可通过TLR4激发的信号进行转导,激活I- κ B激酶,使得I- κ B被降解(I- κ B的降解来反映NF- κ B的活化),经降解后的I- κ B又作用于NF- κ B,启动相关基因转录程序,使相关细胞因子释放发挥炎症效应^[12-13],释放的细胞因子正反馈作用于NF- κ B,进一步放大炎症反应。

本实验主要通过检测血管内皮细胞中TLR-NF- κ B信号传导通路上TLR4、NF- κ B两个关键因子的表达,以显示血管内皮细胞受损的情况。本研究通过健康对照组血清和高血压病患者血清培养HUVEC-c,结果表明高血压组TLR4表达较对照组升高明显($P<0.05$),I- κ B表达明显低于对照组($P<0.05$),表明高血压病患者存在严重的免疫紊乱和炎症反应。牛蒡根水提取物干预组各组均能有效抑制TLR4蛋白的表达,均低于高血压组,差异具有统计学意义($P<0.05$);低剂量组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),而中、高剂量组TLR4蛋白表达水平与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),可见,低剂量组抑制TLR4的表达效果最好。牛蒡根水提取物干预组各组I- κ B α 蛋白的表达均高于高血压组,并且以低剂量组表达量最高,差异有统计学意义($P<0.05$),而中、高剂量组表达水平升高不明显;与对照组比较,低剂量组I- κ B α 蛋白的表达差异无统计学意义,而中、高剂量组表达水平差异有统计学意义($P<0.05$),即低剂量组上调I- κ B α 蛋白的表达效果最好。牛蒡根水提取物可上调I- κ B α 并抑制TLR4的表达水平,降低细胞内信号传导通路的活性,进而抑制机体免疫功能的紊乱、减轻炎症反应的作用,起到抑制血管内皮损伤的作用。因此,低剂量牛蒡根水提取物对血管内皮细胞有较好的保护作用,其作用机制可能与细胞对血药浓度的敏感性有关,尚需对具体作用机制进行深入的研究探索。

综上所述,高血压是心血管疾病发生发展过程中

最常见的危险因素。近年来,中药以及中西药联合在治疗心血管疾病中发挥重要作用,在基础与临床研究中都取得了很大的进步,由于中药配伍的灵活性,具有降压作用的中药对炎症因子的作用存在多角度、多靶点、多兼顾的优点。但仍存在一些不足,许多中药的药理作用仍未被清楚的认识及恰当的利用,并且目前尚未制订出统一的应用标准。本文就牛蒡根水提取物对血管内皮的保护作用及分子机制做了进一步探索,为高血压病的中医药防治提供了新的思路与方法。

参考文献

- [1] 楚洁,王临虹,徐爱强,等.山东省成年人高血压与高血压前期流行情况影响因素分析[J].中华预防医学杂志,2014,48(1):12-17.
- [2] Sohn EH, Jang SA, Joo H, et al. Anti-allergic and anti-inflammatory effects of butanol extract from *Arctium Lappa* L [J]. Clin Mol Allergy, 2011, 9(1): 4.
- [3] 曹剑锋,张鹏英,王超英,等.牛蒡根水提取物扩血管作用及机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(23):258-261.
- [4] 郭绥峰.临床药师干预对高血压患者用药依从性及血压达标率的影响[J].海南医学,2013,24(15):2211-2212.
- [5] 俞蔚,严静,章一丰,等.浙江三市社区老年人高血压前期和高血压患病及心血管病危险因素调查[J].中华老年医学杂志,2014,33(6):668-671.
- [6] 张竞之,刘吉昌,范志勇,等.从丹皮酚对TLR-NF- κ B信号通路的影响探讨高血压病血瘀证的形成机制[J].广州中医药大学学报,2014,31(3):330-334.
- [7] 丁康,方祝元.信号通路在高血压治疗中的研究进展[J].安徽医科大学学报,2015,50(5):719-722.
- [8] Parker LC, Prince LR, Sabroe I. Translational mini review series on toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity [J]. Clin Exp Immunol, 2007, 147(2): 199-207.
- [9] Bomfim GF, Dos Santos RA, Oliveira MA, et al. Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats [J]. Clin Sci (Lond), 2012, 122(11): 535-543.
- [10] Kfoury A, Virard F, Renno T, et al. Dual function of MyD88 in inflammation and oncogenesis: implications for therapeutic intervention [J]. Curr Opin Oncol, 2014, 26(1): 86-91.
- [11] Xu Y, Feng L, Wang S, et al. Phytoestrogen calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside ameliorates advanced glycation end products-induced HUVEC damage [J]. J Cell Biochem, 2011, 112(10): 2953-2965.
- [12] Lan L, Tao J, Chen A, et al. Electroacupuncture exerts anti-inflammatory effects in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via suppression of the TLR4/NF- κ B pathway [J]. Int J Mol Med, 2013, 31(1): 75-80.
- [13] 陈思,周忠,景胜.高血压病患者外周血Toll样受体-4及细胞毒T淋巴细胞相关抗原-4的表达及临床意义[J].实用医学杂志,2014,30(22):3601-3603.

(收稿日期:2016-05-10)