

苦瓜蛋白通过阻止核因子 κ B 核转位抑制炎症因子生成

黄贤生¹, 王仁², 马小峰², 陈娜平¹, 张凯², 王佐²

(1. 汕头大学医学院附属第一医院心血管内科, 广东省汕头市 515041;

2. 南华大学心血管病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 苦瓜蛋白; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 炎症因子; 核因子 κ B; I κ B

[摘要] **目的** 研究苦瓜蛋白对载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠炎症因子核因子 κ B (NF- κ B) 蛋白核转位的影响, 探讨苦瓜蛋白抗炎症的分子机制。**方法** 40 只 6 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠, 随机分为普食组、高脂高胆固醇组、高脂高胆固醇苦瓜蛋白组、普食苦瓜蛋白组。12 周后眼球采血, ELISA 测定血浆中炎症因子 NF- κ B、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-6 和 γ 干扰素 (IFN- γ) 及抗炎因子 IL-10 的水平, 免疫组织化学检测主动脉壁 I κ B 表达, RT-PCR 和 Western blot 检测 NF- κ B 和 I κ B 表达。**结果** ApoE^{-/-} 小鼠经高脂高胆固醇饲料喂养 12 周后, 血液中炎症因子 NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 水平均显著高于普食组 ($P < 0.01$, $n = 5$), 但抗炎因子 IL-10 仍维持较高水平。经苦瓜蛋白干预后, 血清中炎症因子水平下降, 而抗炎因子 IL-10 水平并不上升。RT-PCR 以及 Western blot 检测结果表明, 苦瓜蛋白显著降低高脂高胆固醇饲料喂养小鼠动脉血管壁细胞核内 NF- κ B 蛋白水平, 阻止其核转位。与普食组比较, 高脂高胆固醇组 I κ B 被显著降解 (0.19 ± 0.05 比 0.74 ± 0.15 , $P < 0.05$, $n = 5$), 但其经苦瓜蛋白干预后, 这种降解作用得到显著的抑制 (0.19 ± 0.05 比 0.36 ± 0.07 , $P < 0.01$, $n = 5$)。**结论** 苦瓜蛋白通过减少 I κ B 降解抑制 NF- κ B 蛋白核转位而发挥抑制炎症因子生成的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Inhibitory Effect of Momordicin on Inflammatory Factors Generation by Preventing Nuclear Translocation of Nuclear Factor-kappa B

HUANG Xian-Sheng¹, WANG Ren², MA Xiao-Feng², CHEN Na-Ping¹, ZHANG Kai², and WANG Zuo²

(1. Department of Cardiovascular Medicine, the First Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University; 2. Institute of Cardiovascular Disease, Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Momordicin; ApoE^{-/-} Mice; Inflammatory Factor; Nuclear Factor-kappa B; Inhibitor Kappa B

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of momordicin on nuclear translocation of inflammatory factor nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in ApoE^{-/-} mice and further analyze the molecular mechanisms related to momordicin anti-inflammatory. **Methods** 40 male ApoE^{-/-} mice, 6 weeks old, were randomly divided into four groups: normal food group, high fat high cholesterol group, high fat high cholesterol and momordicin group, normal food and momordicin group. After feeding 12 weeks, all mice were removed eyeball in order to obtain blood preparation. Level of inflammatory factors (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ) and anti-inflammatory factors (IL-10) were measured by ELISA, I κ B expression of aorta was analyzed by immunohistochemistry. Gene and protein expression was analyzed by semi-quantitative RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** After fed with high fat high cholesterol about 12 weeks, inflammatory factors (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ) level increased compared with normal food group ($P < 0.01$, $n = 5$), but the level of IL-10 can not be up-regulated. After momordicin treating, inflammatory factors level decreased, yet IL-10 can not increase. Not only momordicin inhibited p65 mRNA transcription compared with high fat high cholesterol group, but also the nuclear level of NF- κ B of momordicin treat group were obviously lower than high fat high cholesterol group in artery wall, nuclear translo

[收稿日期] 2012-11-10

[基金项目] 国家自然科学基金(30070934)和湖南省教育厅基金(08C747)资助

[作者简介] 黄贤生, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 705229580@qq.com。王仁, 讲师, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化机制及防治, E-mail 为 wangren73@yahoo.com.cn。通讯作者王佐, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为动脉粥样硬化机制和防治及 Lp(a) 对内皮祖细胞的损伤机制, E-mail 为 smt121101@163.com。

cation of NF- κ B was inhibited by momordicin treating. I κ B in high fat high cholesterol group was remarkably reduced compared with normal food group (0.19 ± 0.05 vs 0.74 ± 0.15 , $P < 0.05$, $n = 5$), but this reduction can be obviously inhibited by momordicin intervention (0.19 ± 0.05 vs 0.36 ± 0.07 , $P < 0.01$, $n = 5$). **Conclusions** The role of momordicin anti-inflammatory factors generation is related to inhibiting degradation of I κ B, which inhibits nuclear translocation of NF- κ B.

苦瓜 (*Momordica charantia* L) 属于葫芦科植物, 性味苦寒。长期以来, 苦瓜不但作为一种日常食用蔬菜, 而且在很多地方作药物使用。本课题组从苦瓜果肉中分离到一种 28 kDa 的苦瓜蛋白^[1], 研究发现该蛋白通过上调 ATP 结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 表达, 从而抑制 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞的形成, 降低细胞内胆固醇及胆固醇酯水平^[2], 能有效地防治载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生和发展进程^[3]。As 是一种多种因素导致的慢性炎症反应性疾病, 炎症贯穿于 As 发生和发展的全过程。我们在进行苦瓜蛋白治疗急性病毒性心肌炎的时候, 同时又发现苦瓜蛋白对 CVB3 病毒引起小鼠急性病毒性心肌炎有明显的治疗作用^[4], 这为苦瓜蛋白在心血管领域的防治功能奠定了坚实的理论基础, 但其抗炎的机制尚不明确, 本实验在复制 ApoE^{-/-} 小鼠 As 模型的基础上, 探讨苦瓜蛋白通过抑制 I κ B 蛋白降解进而抑制 NF- κ B 蛋白核转位发挥抗炎作用的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

6 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠购自北京大学医学部实验动物中心; 新鲜本地产苦瓜购自衡阳市市郊; β -actin 抗小鼠一抗、辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊二抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗及 Western blot 荧光检测试剂盒均购自武汉博士德公司; ELISA 试剂盒购自 eBioscience 公司; BCA 蛋白含量测定试剂购自 HyClone-Pierce 公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验分组及苦瓜蛋白提取

雄性 18 g 左右的 6 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠 40 只, 随机分为四组: 普食组、高脂高胆固醇组、高脂高胆固醇苦瓜蛋白组及普食苦瓜蛋白组。普食组为正常饲料喂养、PBS 每 2 天 0.1 mL 腹腔注射; 高脂高胆固醇组为高脂高胆固醇饲料喂养、PBS 每 2 天 0.1 mL 腹腔注射; 高脂高胆固醇苦瓜蛋白组为高脂高胆固醇饲料喂养、苦瓜蛋白每 2 天 0.1 mL 腹腔注射; 普食苦瓜蛋白组为正常饲料喂养、苦瓜蛋白每 2 天 0.1 mL 腹腔注射。高脂饲料为正常饲料添加

2% 胆固醇、10% 猪油。12 周后, 各组小鼠用 20% 乌拉坦 0.2 ~ 0.3 mL 腹腔麻醉眼球采血。

苦瓜蛋白提取: 将新鲜苦瓜果皮用剪刀剪碎后匀浆, 4 $^{\circ}$ C 冰箱中用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液浸泡过夜, 低温离心机上 8000 r/min 离心 15 min 后取上清 (每个离心管装 50 mL), 50000 截流分子量超滤, 以除去分子量大于 50000 kDa 的非目标部分, 将获得粗提物在聚乙二醇 6000 中脱水。为除去分子量少于 8000 kDa 的低分子部分, 采用的透析袋膜截流分子量为 8000, 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 0.1 mol/L 磷酸缓冲液透析过夜。最后用 SCX 阳离子交换色谱粗分离, 反相色谱监测纯度, SDS-PAGE 鉴定其分子量, 所得分离液冷冻真空干燥成浅黄色粉末, 密封低温保存备用。

1.3 ELISA 测定血浆中炎症因子和抗炎因子水平

根据试剂盒说明书测定炎症因子白细胞介素 1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6、 γ 干扰素 (interferon-gamma, IFN- γ) 和抗炎因子 IL-10 的水平。一抗溶解于包被液 (pH 9.6 碳酸盐缓冲液), 100 μ L/孔包被 ELISA 亲和 96 孔板 4 $^{\circ}$ C 过夜, 10% FCS/PBS 封闭 2 h。PBS-T 洗板 3 次后, 加入 100 μ L/孔样品 (1:10 ~ 1:100 稀释), 室温 1 h, PBS-T 洗 3 次, 加入 Biotin 化抗体 (1 ~ 5 mg/L), 室温放置 1 h, PBS-T 洗 5 次, 加入 Avidin-HRP (1:1000 稀释, 100 μ L/孔) 室温放置半小时, TMB 显色系统显色, 测 OD₄₉₂ 或 OD₄₅₀ 值, 根据标准曲线确定细胞因子水平。

1.4 核蛋白提取

参照 Zhang^[5] 和 Deryckere^[6] 等方法进行。为减少核蛋白的降解, 所有步骤尽可能地在冰上进行。具体操作如下: ①剪取 100 mg 血管, 冰冷的 PBS 洗数次, 以洗去黏附的血细胞。将洗净的血管置 1.5 mL 的 EP 管中, 加入 0.5 mL A 液 (10 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl₂ · 6H₂O, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L DTT, 临用前加 1 mmol/L PMSF 和 10 mg/L Leupeptin, Aprotinin), 眼科剪剪碎后再用塑料匀浆棒匀浆 5 min, 4000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃上清, -80 $^{\circ}$ C 放置 5 min; ②400 μ L A 液重悬, 吹打数次, 冰上放置 2 min; ③往 EP 管中加入 NP-40, 至终浓度为 0.6%, 涡旋 4 min; ④台盼兰来检验细胞破碎程度; ⑤5000 r/min 离心 5 min 后, 弃上清; ⑥核沉淀物重悬

于 100 μ L 冰冷的 C 液 (20 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.9, 0.42 mol/L NaCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.2 mmol/L EDTA, 25% (V/V) 甘油, 0.5 mmol/L DTT, 临用前加 1 mmol/L PMSF 和 10 mg/L Leupeptin、Aprotinin); ⑦4 $^{\circ}C$, 剧烈摇动 45 min; ⑧15000 r/min 离心 10 min, 收集上清, EP 管分装, -70 $^{\circ}C$ 保存备用。

1.5 RT-PCR、Western blot 检测 NF- κ B 及 I κ B 的表达

TRIZOL 试剂提取总 RNA 后反转录成为 cDNA, 取 1.0 μ L 逆转录产物进行 PCR。鼠 GAPDH 引物为上游 5'-CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG-3', 下游 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3', 扩增片长 513 bp; 鼠 NF- κ B p65 亚基引物为上游 5'-TGGCT-TCCTTTCCGTGTAA-3', 下游 5'-CCTTGGTGACCAGG-GAGATT-3', 扩增片长 705 bp; 反应体系 50 μ L, 退火温度 58 $^{\circ}C$, 共 30 个循环, 琼脂糖凝胶电泳。

超低温冰箱中取出小鼠主动脉, 在冰上用眼科镊小心剥离血管外组织后, 眼科剪剪碎组织, 研磨棒磨碎。低温提取并定量, 100 $^{\circ}C$ 蛋白水浴变性蛋白 10 min, 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳 2~3 h, 转 PDVF 膜, 丽春红染色。37 $^{\circ}C$ 封闭液封闭 2 h, 4 $^{\circ}C$ 孵育 NF- κ B 和 I κ B 的一抗过夜, TBST 洗 3 次后, 室温孵育二抗 1 h, TBST 洗 3 次, 暗室显影压片。

1.6 免疫组织化学检测动脉壁 I κ B

取出冰冻切片, 室温放置 30 min 后, 4 $^{\circ}C$ 丙酮固

定 10 min; 滴加 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 10 min 后弃去, 重复 3 次, 使标本保持一定湿度; 0.3% TritonX-100 37 $^{\circ}C$ 湿盒内 10~30 min; 二抗血清封闭液 (5% 绵羊血清, PBS 稀释) 100~200 μ L, 37 $^{\circ}C$ 封闭 10~15 min, 倾去血清, 勿洗; 滴加 1:100 一抗, 37 $^{\circ}C$ 水浴 1 h, PBS 洗涤 5 min \times 3 次; 生物素化兔抗羊二抗 37 $^{\circ}C$ 20 min, PBS 洗 3 min \times 3 次; 滴加 SABC, 4 $^{\circ}C$ 20 min; PBS 洗 5 min \times 4 次; DAB 显色试剂盒显色, 用蒸馏水洗后, 苏木素复染, 1% 盐酸水溶液分色数秒, 流水洗 2 h 左右; 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.7 统计学处理方法

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 12.0 进行统计处理, 组间比较采用方差分析及 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 苦瓜蛋白对血液中炎症因子和抗炎因子水平的影响

经高脂高胆固醇饲料喂养 12 周后, 小鼠血液中炎症因子 NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 水平均显著高于普食组 ($P < 0.01$, $n = 5$), 但抗炎因子 IL-10 水平仍保持在较高的水平; 经苦瓜蛋白干预后, 血清中炎症因子水平下降, 而抗炎因子 IL-10 水平并不上升 (表 1)。

表 1. 苦瓜蛋白对 ApoE $^{-/-}$ 小鼠循环炎症因子和抗炎因子水平的影响 (ng/L, $n = 5$)

Table 1. Effect of momordicin on inflammatory factors and anti-inflammatory factors in ApoE $^{-/-}$ mice (ng/L, $n = 5$)

细胞因子	普食组	高脂高胆固醇组	高脂高胆固醇苦瓜蛋白组	普食苦瓜蛋白组
NF- κ B	2.89 \pm 0.45	12.24 \pm 2.17 ^a	6.13 \pm 1.05 ^b	1.12 \pm 0.12 ^{acd}
IL-1 β	2.56 \pm 0.32	11.34 \pm 1.47 ^a	5.78 \pm 0.92 ^b	1.32 \pm 0.15 ^{acd}
IL-6	7.14 \pm 0.76	47.23 \pm 8.76 ^a	19.63 \pm 3.11 ^b	3.69 \pm 0.77 ^{acd}
TNF- α	3.44 \pm 0.41	27.25 \pm 2.53 ^a	13.74 \pm 2.06 ^b	1.91 \pm 0.08 ^{acd}
IFN- γ	1.21 \pm 0.09	9.63 \pm 1.54 ^a	4.27 \pm 1.67 ^b	0.47 \pm 0.04 ^{acd}
IL-10	14.31 \pm 0.68	34.17 \pm 5.33 ^a	32.28 \pm 7.52	13.94 \pm 3.86

a 为 $P < 0.01$, 与普食组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与高脂高胆固醇组比较; d 为 $P < 0.01$, 与高脂高胆固醇苦瓜蛋白组比较。

2.2 苦瓜蛋白对 NF- κ B 表达的影响

2.2.1 苦瓜蛋白对 NF- κ B mRNA 表达的影响

高脂高胆固醇饲料喂养 12 周后, 其动脉血管组织 NF- κ B mRNA 与普食组相比显著升高 (图 1), 统计分析表明两者之间差异有显著性 (1.57 \pm 0.15 比 0.67 \pm 0.17, $P < 0.01$), 而苦瓜蛋白对其抑制作用不明显 (1.46 \pm 0.08 比 1.57 \pm 0.15, $P > 0.05$); 普食组有一定的 NF- κ B mRNA 表达 (0.67 \pm 0.17), 而

苦瓜蛋白可显著下调普食组 NF- κ B mRNA 的表达 (0.34 \pm 0.11, $P < 0.05$)。

2.2.2 苦瓜蛋白对 ApoE $^{-/-}$ 小鼠主动脉 NF- κ B 蛋白核转位的影响

ApoE $^{-/-}$ 小鼠经高脂高胆固醇饲料喂养 12 周后, 与普食组比较, 其动脉血管组织细胞核内 NF- κ B 含量明显增多 (1.10 \pm 0.25 比 0.52 \pm 0.09, $P < 0.05$); 苦瓜蛋白干预后, 细胞核内 NF- κ B 含量显著减少 (0.31 \pm 0.05, $P < 0.05$)。普

食组细胞质中能检测到大量的 NF- κ B, 但经高脂高胆固醇饲料喂养 12 周后, 胞质 NF- κ B 含量显著减少 (1.25 ± 0.09 比 1.51 ± 0.25 , $P < 0.05$), 而经苦瓜蛋白处理后, 胞质 NF- κ B 含量显著增加 (2.01 ± 0.36 , $P < 0.05$); 普食组细胞质中虽然能检测到大量的 NF- κ B, 但胞核内仍能检测到一定量的 NF- κ B, 而通常情况下, NF- κ B 位于胞浆内, 且处于无活性状态, 说明此时 NF- κ B 有一定的核转位发生。另外普食苦瓜蛋白组比其它三组 NF- κ B 核转位更少, 胞质 NF- κ B 更多 (图 2)。以上结果揭示苦瓜蛋白良好的抗炎作用与其抑制 NF- κ B 核转位有关。

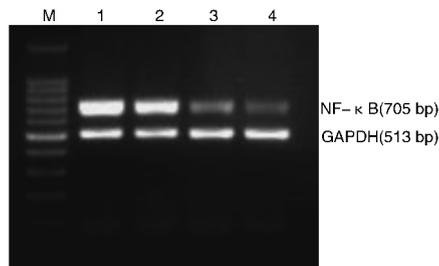


图 1. 苦瓜蛋白对 NF- κ B p65 亚基 mRNA 表达的影响 ($n = 5$) M 为 Marker, 1 为高脂高胆固醇组, 2 为高脂高胆固醇苦瓜蛋白组, 3 为普食组, 4 为普食苦瓜蛋白组。

Figure 1. The effect of momordicin on NF- κ B p65 subunit mRNA expression ($n = 5$)

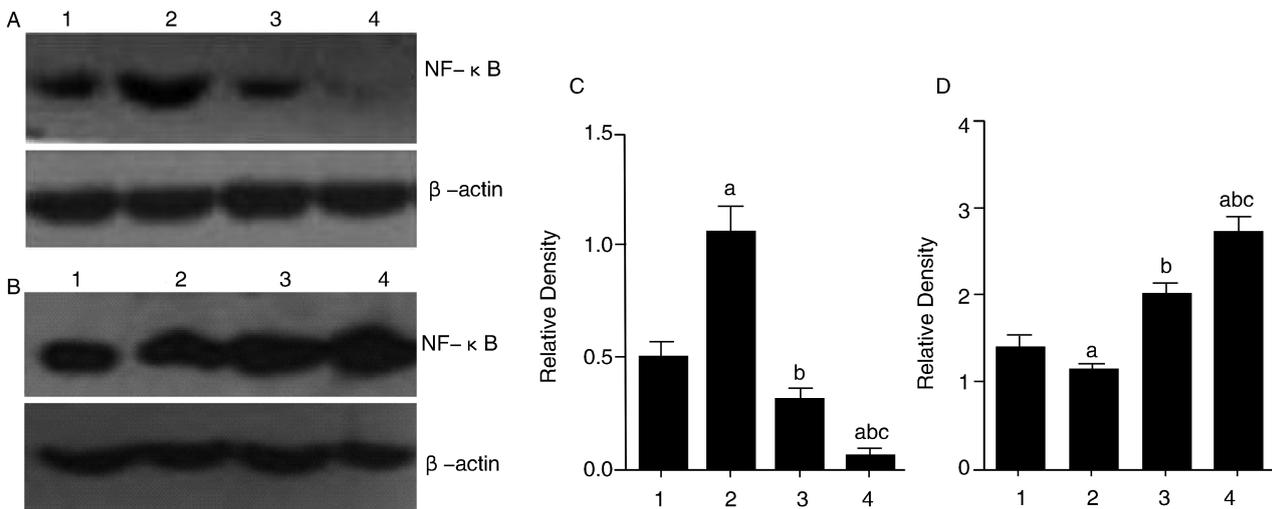


图 2. 苦瓜蛋白对 ApoE^{-/-} 小鼠血管组织 NF- κ B 蛋白核转位的影响 ($n = 5$) A 为胞核内 NF- κ B; B 为胞质内 NF- κ B; C 为胞核内 NF- κ B 统计图; D 为胞质内 NF- κ B 统计图。1 为普食组, 2 为高脂高胆固醇组, 3 为高脂高胆固醇苦瓜蛋白组, 4 为普食苦瓜蛋白组。a 为 $P < 0.05$, 与普食组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高脂高胆固醇组比较; c 为 $P < 0.05$, 与高脂高胆固醇苦瓜蛋白组比较。

Figure 2. Effect of momordicin on NF- κ B protein translocation in ApoE^{-/-} mice vascular tissues ($n = 5$)

2.3 苦瓜蛋白对 I κ B 降解的抑制作用

为进一步探索苦瓜蛋白对 NF- κ B 核转位的影响, 我们检测了影响 NF- κ B 活性进而促使其转位的 I κ B 激酶变化情况。经过 Western blot (图 3) 方法检测, ApoE^{-/-} 小鼠经高脂高胆固醇饲料喂养 12 周后, 其动脉血管组织 I κ B 与普食组比较降解明显, 统计分析表明两者之间差异有显著性 (0.19 ± 0.05 比 0.74 ± 0.15 , $P < 0.05$, $n = 5$), 但经苦瓜蛋白干预后, 这种降解得到显著抑制 (0.19 ± 0.05 比 0.36 ± 0.07 , $P < 0.01$, $n = 3$); 苦瓜蛋白这种抑制 I κ B 降解的作用在普食苦瓜蛋白组也得以体现, 与普食组比较, 其 I κ B 水平更高, 两组之间差异有显著性 (0.89 ± 0.09 比 0.74 ± 0.15 , $P < 0.05$, $n = 5$), 说明即使是普食组也有一定量的 I κ B 降解发生。免疫组织化

学检测结果 (图 4) 与 Western blot 结果一致。

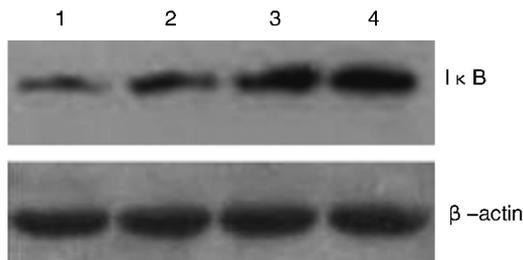


图 3. Western blot 检测苦瓜蛋白对 I κ B 降解的抑制作用 ($n = 5$) 1 为高脂高胆固醇组, 2 为高脂高胆固醇苦瓜蛋白组, 3 为普食组, 4 为普食苦瓜蛋白组。

Figure 3. The inhibitory effect of momordicin on I κ B degradation detected by Western blot ($n = 5$)

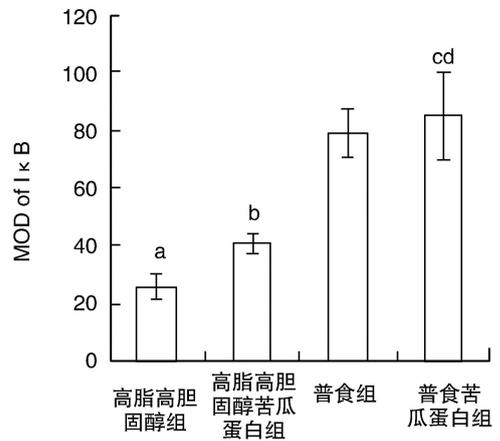
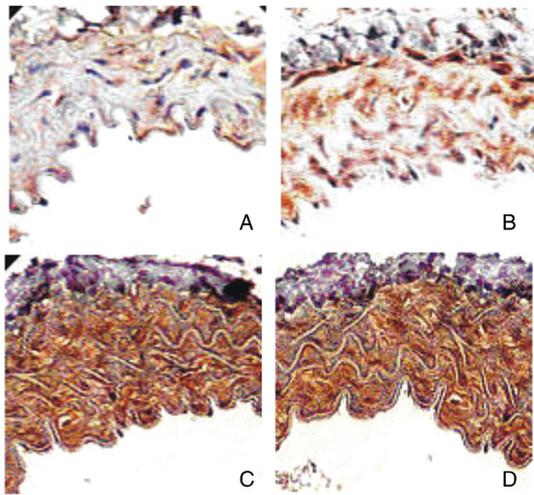


图 4. 免疫组织化学检测苦瓜蛋白对 IκB 降解的抑制作用 ($n=5$) A 为高脂高胆固醇组, B 为高脂高胆固醇苦蛋白组, C 为普食组, D 为普食苦蛋白组。a 为 $P<0.01$, 与普食组比较; b 为 $P<0.05$, c 为 $P<0.01$, 与高脂高胆固醇组比较; d 为 $P<0.01$, 与高脂高胆固醇苦蛋白组比较。

Figure 4. The inhibitory effect of momordicin on IκB degradation analyzed by immunohistochemistry

3 讨论

NF-κB 广泛存在于体内各种细胞中, 是炎症反应中起中心调控作用的转录因子, 同时也是调控多种细胞因子、化学因子、生长因子、细胞黏附分子和某些急性期蛋白基因表达所必需的转录因子, 故已成为抗炎治疗的新热点。细胞在静息状态下, NF-κB 与其抑制蛋白 IκB 家族的成员结合成为异源多聚体 P50-P60-IκBα 或 IκBβ, 以无活性的复合物形式存在于胞质中。IκBβ 通过屏蔽核定位信号和核输出信号抑制 NF-κB 的活性。当细胞受到上游刺激因子作用时, NF-κB 诱导激酶 (NIK) 可被激活, NIK 激活 IκB 激酶 (IKK) [7], IKK 进一步致使 IκB 分子磷酸化降解, NF-κB 与 IκB 三聚体解离释放 NF-κB, 激活 NF-κB 信号途径。NF-κB 移位至细胞核内, 与核内靶基因结合, 启动相关基因的转录, 此过程称 NF-κB 核转位。因此 IκB 磷酸化降解且与 NF-κB 解离是该激活途径的关键所在, 故称之为依赖 IκB Ser 磷酸化经典途径 [8]。另一条非经典途径是激活 NF-κB 诱导激酶导致胞质前体的磷酸化和蛋白酶解加工, 从而激活 NF-κB2, 活化的 NF-κB2 再和 RelB、NIK 组成复合物进入细胞核来调控基因的转录 [9]。受损的内皮细胞表达黏附分子, 调节血液中的单核细胞和 T 淋巴细胞的黏附, T 淋巴细胞释放 IFN-γ、TNF-α 和 IL-1β 等炎症因子, 继而刺激巨噬细胞、平滑肌细胞和内皮细胞的反应。这些炎症因子受 NF-κB 调控, 影响 As 的形成 [10]。本研究发现, 经高脂高胆固醇饲料喂养 12 周后, ApoE^{-/-}

小鼠血液中炎症因子 NF-κB、IL-1β、TNF-α、IL-6、IFN-γ 水平均显著高于普食组, 但抗炎因子 IL-10 水平仍保持在较高的水平, 这可能是因为炎症因子反馈性地引起抗炎因子水平升高。经苦瓜蛋白干预后, 炎症因子上升的趋势回落, 抗炎因子与炎症因子之间趋于平衡 (炎症因子由原总和约 94 ng/L 下降至约 41 ng/L, 抗炎因子由原总和 34 ng/L 下降至 32 ng/L)。

本研究通过检测细胞核内 NF-κB 蛋白水平, 发现 As 模型组 (高脂高胆固醇组) 细胞核内 NF-κB 蛋白含量明显增多, 出现明显的核转位变化, 而经苦瓜蛋白干预后, 细胞核内 NF-κB 蛋白含量明显减少, 核转位受到显著的抑制。苦瓜蛋白这种抑制 NF-κB 蛋白核转位的作用不但在苦瓜蛋白干预组得以体现, 而且在苦瓜蛋白预防组 (普食苦瓜蛋白组) 也能见到, 即使是普通饲料喂养的动脉血管壁, 其细胞核 NF-κB 蛋白也保持在一定水平, 而经苦瓜蛋白处理后, 其细胞核 NF-κB 蛋白水平显著下降。这一结果与前面苦瓜蛋白对炎症因子 TNF-α 和 IL-1β 的作用相似。由于 IκB 激酶是 NF-κB 蛋白核转位的关键酶, 故我们进一步分析了细胞内 IκB 蛋白水平, 通过免疫组织化学和免疫印迹发现 As 模型大鼠细胞内 IκB 蛋白明显减少, 而经苦瓜蛋白干预后细胞内 IκB 蛋白降解得到显著抑制, 这个结果与苦瓜蛋白抑制 NF-κB 蛋白核转位的结果是一致的。即使普通饲料喂养的 ApoE^{-/-} 小鼠, 相比于普食苦瓜蛋白组 ApoE^{-/-} 小鼠, 其 IκB 水平还是低了一些, 进一步证实了苦瓜蛋白确实能防止细胞内 IκB 蛋白的降解, 说明通过抑制

I κ B 蛋白的降解进而抑制 NF- κ B 蛋白的核转位是苦瓜蛋白发挥抗炎作用的机制之一。

[参考文献]

- [1] 王佐, 李双杰, 杨永宗. 苦瓜蛋白的分离纯化及其体外抗 CoxB3 型病毒作用的研究[J]. 南华大学学报(医学版), 2002, 30(1): 1-6.
- [2] 王佐, 唐朝克, 吕运成, 等. 苦瓜蛋白对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞形成及三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(1): 27-30.
- [3] 宋砚明, 王佐, 郭正宇, 等. 苦瓜蛋白对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化形成及小肠胆固醇转运相关基因表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(1): 35-38.
- [4] 李双杰, 王佐, 张召才, 等. 苦瓜素对小鼠柯萨奇 B3 病毒心肌炎的治疗作用[J]. 中草药, 2004, 35(10): 155-157.
- [5] Zhang JS, Feng WG, Li CL, et al. NF- κ B regulates the LPS-induced expression of interleukin 12 p40 in murine

peritoneal macrophages: roles of PKC, PKA, ERK, p38 MAPK, and proteasome [J]. Cell Immunol, 2000, 204(1): 38-45.

- [6] Deryckere F, Gannon F. A one-hour miniperparation technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues[J]. Bio Techniques, 1994, 16(3): 405.
- [7] Yamamoto Y, Gaynor RB. I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway[J]. Trends Biochem, 2004, 29(2): 72-79.
- [8] Jawien J, Gajda M, Mateuszuk L, et al. Inhibition of nuclear factor- κ B attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR-double knockout mice[J]. J Physiol Pharmacol, 2005, 56(3): 483-489.
- [9] Brasier AR. The NF- κ B regulatory network [J]. Cardiovasc Toxicol, 2006, 6(2): 111.
- [10] Brasier AR. The nuclear factor- κ B- interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation [J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(2): 211-218.

(此文编辑 许雪梅)