

• 研究论文 •

曲古抑菌素 C 通过上调 Krüppel 样转录因子 2 抑制 TNF α 诱导的内皮细胞炎症

雷丽娟[#], 陈明华[#], 李迎红, 姜新海, 王伟志, 赵丽萍, 王晨吟, 陈渝川, 张语嫣, 巫晔翔, 李顺旺, 韩江雪, 李依宁, 盛任, 张煜皓, 张晶, 余利岩*, 司书毅*, 许艳妮*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 国家新药(微生物)筛选实验室, 国家卫生健康委员会抗生素生物工程重点实验室, 北京 100050)

摘要: Krüppel 样转录因子 2 (Krüppel-like factor 2, KLF2) 在内皮细胞炎症、血栓形成、血管生成以及巨噬细胞的炎症和极化等过程中发挥调节作用, 上调 KLF2 的表达具有防治动脉粥样硬化的潜力。本研究利用 KLF2 表达上调剂筛选模型, 从一株链霉菌 CICC 203909 的大米发酵次级代谢产物中分离得到一个 KLF2 小分子上调剂曲古抑菌素 C (trichostatin C, TSC)。TSC 可以显著抑制肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 诱导的单核细胞 (THP-1) 黏附到人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 上; Western blot 实验结果表明, TSC 具有抑制血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 的作用, 从而减轻内皮细胞炎症; 过表达组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 质粒转染和分子对接实验结果表明, TSC 通过抑制 HDAC 4/5/7 来上调 KLF2 的表达。综上, TSC 通过抑制 HDAC 4/5/7 上调 KLF2 的表达从而减轻 TNF α 诱导的内皮细胞炎症, 具有预防和治疗动脉粥样硬化的潜力。

关键词: 曲古抑菌素 C; Krüppel 样转录因子 2; 内皮细胞炎症; 动脉粥样硬化; 血管细胞黏附分子-1; 组蛋白去乙酰化酶

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)08-2375-09

Trichostatin C attenuates TNF α -induced inflammation in endothelial cells by up-regulating Krüppel-like factor 2

LEI Li-juan[#], CHEN Ming-hua[#], LI Ying-hong, JIANG Xin-hai, WANG Wei-zhi, ZHAO Li-ping, WANG Chen-yin, CHEN Yu-chuan, ZHANG Yu-yan, WU Ye-xiang, LI Shun-wang, HAN Jiang-xue, LI Yi-ning, SHENG Ren, ZHANG Yu-hao, ZHANG Jing, YU Li-yan*, SI Shu-yi*, XU Yan-ni*

(NHC Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics, National Center for Screening Novel Microbial Drugs, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Krüppel-like transcription factor 2 (KLF2) plays a key regulatory role in endothelial inflammation, thrombosis, angiogenesis and macrophage inflammation and polarization, and up-regulation of KLF2 expression

收稿日期: 2022-12-22; 修回日期: 2023-01-17.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2022-JKCS-10, 2019-RC-HL-009, 2021-1-I2M-030); 京津冀基础研究合作专项 (19JCZD-JC63900); 国家自然科学基金面上资助项目 (81973328).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-63187118, E-mail: yly@cpc.ac.cn;

Tel: 86-10-63180604, E-mail: sisymb@hotmail.com;

Tel: 86-10-63180623, E-mail: xuyanniwendeng@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1406

has the potential to prevent and treatment atherosclerosis. In this study, trichostatin C (TSC) was obtained from the secondary metabolites of rice fermentation of *Streptomyces* sp. CPCC 203909 as a KLF2 up-regulator by using a high throughput screening model based on a *KLF2* promoter luciferase reporter assay. TSC significantly inhibited the adhesion of tumor necrosis factor- α (TNF α) induced monocytes (THP-1) to human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Western blot results showed that TSC decreased TNF α induced the protein expression increase of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and thereby inhibited endothelial inflammation. The results of histone deacetylase (HDAC) overexpression and molecular docking experiments showed that TSC upregulated the expression of KLF2 by inhibiting subtypes of HDAC 4/5/7. In conclusion, this study suggests that TSC up-regulates the expression of KLF2 through inhibiting HDAC 4/5/7 and thus inhibits TNF α induced endothelial inflammation, and it has the potential to prevent and treat atherosclerosis.

Key words: trichostatin C; Krüppel-like factor 2; endothelial inflammation; atherosclerosis; vascular cell adhesion molecule-1; histone deacetylase

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是全球范围内引起死亡的主要原因^[1,2], 在中国城乡居民疾病死亡构成比中占首位, 并且 CVD 患病率在我国处于持续上升阶段^[3]。动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种慢性血管炎症性疾病, 是 CVD 的病理基础^[4,5]。内皮细胞炎症在动脉粥样硬化的发生发展中起着重要作用, 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 等刺激可诱导内皮细胞炎症, 内皮细胞表面表达血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 和细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1), VCAM-1 和 ICAM-1 表达增加促进了单核细胞的黏附以及迁移到内皮下血管间隙, 单核细胞吞噬内化修饰的脂蛋白后最终变成泡沫细胞, 促进斑块的发展^[6-8]。

Krüppel 样转录因子 2 (Krüppel-like factor 2, KLF2) 是一种由层流剪切应力诱导的 DNA 结合转录因子^[9,10], 有研究发现 *klf2* 杂合子小鼠的动脉粥样硬化斑块面积显著增加^[11]。KLF2 可以增加内皮细胞中内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、一氧化氮 (nitrogen monoxide, NO)、血栓调节素 (thrombomodulin, TM) 的表达, 抑制 VCAM-1、ICAM-1、白介素-1 β 、核因子 κ B 等的表达。此外, 他汀类降血脂药物可以通过上调 KLF2 的表达而发挥抗动脉粥样硬化作用^[12]。因此, KLF2 是内皮细胞中一个有前景的抗动脉粥样硬化靶点^[13,14], 筛选能够上调 KLF2 的小分子化合物并研究其抑制内皮细胞炎症的药理作用及机制, 对于防治动脉粥样硬化等 CVD 有着重要意义。

本研究利用 KLF2 表达上调剂筛选模型从一株链霉菌 CPCC 203909 的大米发酵次级代谢产物中分离得到一个小分子化合物曲古抑菌素 C (trichostatin C, TSC), 其能显著上调 KLF2 的表达, 有效减少 TNF α 诱导的单核细胞黏附和 VCAM-1 的表达, 从而抑制内皮

细胞炎症, 具有抗动脉粥样硬化的前景。

材料与方 法

主要仪器 链霉菌 CPCC 203909 保藏于中国医学科学院医药生物技术研究所中国药学微生物菌种保藏管理中心; 恒温摇床 (上海捷呈实验仪器有限公司); HPX-9162MBE 恒温培养箱 (亚速旺上海商贸有限公司); BXM-30R 蒸汽灭菌锅 (上海化科实业有限公司); KQ5200E 超声清洗机 (昆山市超声仪器有限公司); DLSB-20 低温冷却循环泵 (郑州长城科工贸有限公司); SHZ-B-III 循环水式真空泵 (郑州恒岩仪器有限公司); Agilent 1200 分析型高效液相色谱、Agilent LC-MSD-Trap/SL1100 系列液相色谱-质谱联用仪 (美国 Agilent 公司); Waters G2-XS Q-TOF 质谱仪 (美国 Waters 公司); Shimadzu 20AT 分析型高效液相色谱仪、Shimadzu SPD-M20A 型紫外检测器 (日本 Shimadzu 公司); 核磁共振波谱仪 Bruker AVIIIHD-600MHz (美国 Bruker 公司); 中压快速制备色谱仪 Flash RF150 (环球香港科技有限公司); 反相分析色谱柱 Capcell Pak AQ (5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm) (日本资生堂公司); 反相半制备色谱柱 (X Charge C18 10 μ m, 10 mm \times 250 mm) (华谱科仪科技有限公司); 二氧化碳 (CO₂) 恒温细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); FTC-3000 实时荧光定量 PCR 仪 (加拿大 Funplyn Biotech 公司); EnVision 多功能酶标仪 (美国 Perkin Elmer 公司)。

主要试剂 ISP medium 2 培养基 (美国 Becton, Dickinson 公司); DMEM 高糖培养基、RPMI 1640 培养基、BCA 法蛋白浓度测定试剂盒、Lipofectamine 2000 脂质体来源于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 内皮细胞培养基来源于美国 ScienCell 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 来源于美国 Gibco 公司; 细胞增殖毒性检测试剂盒 (CCK-8)、RIPA (radio immuno-

precipitation assay) 细胞裂解液购买于普利莱基因技术有限公司; 重组人 TNF α 来源于美国 R&D Systems 公司; VCAM-1 一抗购买于英国 Abcam 公司; ICAM-1 一抗购买于美国 Cell Signaling Technology 公司; 山羊抗兔、山羊抗鼠的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 增强型 HRP 底物化学发光液 (ECL) 购自美国 Millipore 公司; RNA 提取试剂盒 QIAGEN RNeasy Mini kit 购买于德国 Qiagen 公司; cDNA 反转录试剂盒购买于北京全式金生物技术有限公司; RNA 荧光定量试剂盒 FastStart Universal SYBR Green Master Mix 购自瑞士 Roche 公司; 荧光素酶检测试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 质粒 (带 Flag 标签) (HDAC1, #13820; HDAC2, #36830; HDAC3, #13819; HDAC4, #13821; HDAC5, #13822; HDAC6, #13823; HDAC7, #13824; HDAC8, #13825) 购买于美国 Addgene 公司。

菌株发酵 在 28 °C 条件下, 把链霉菌 CICC 203909 接种于 ISP medium 2 (0.4% 酵母膏、1.0% 麦芽膏、0.4% 右旋糖和 2.0% 琼脂) 斜面培养基上, 复苏的菌株培养 2 天后接种到含有已灭菌 100 mL A2 液体培养基 (1.0% 葡萄糖、3.0% 可溶性淀粉、2.0% 棉籽粉、0.3% 酵母膏、0.3% 硫酸铵、0.1% 硫酸镁、0.1% 磷酸氢二钾、0.1% 氯化钠和 0.5% 碳酸钙) 的 500 mL 三角瓶内, 在 180 r·min⁻¹、28 °C 的摇床内培养 2 天后将其作为种子液。250 袋培养袋内含有 50 g 大米和 50 mL 去离子水, 封口后用高压灭菌锅进行灭菌 (121 °C, 30 min), 待大米培养基冷却后, 在超净台中每袋培养基加入 5 mL 种子液, 28 °C 培养箱中培养 30 天。

分离纯化 将链霉菌 CICC 203909 发酵结束后的大米发酵物用 95% 乙醇超声提取 2 次, 将提取液过滤后进行减压浓缩, 得到粗提物的混悬水溶液, 然后用乙酸乙酯萃取 3 次, 将萃取液减压浓缩后得到 111.36 g 粗浸膏。将粗浸膏进行硅胶柱层析, 二氯甲烷-甲醇梯度 (1:0~0:1, v/v) 进行第一次的分离, 甲醇洗脱部分得到 4 个组分 (A~D)。A 组分用闪式 C18 柱分离, 以 35% 乙腈 (含有 0.1% 三氟醋酸) 流动相洗脱, 分成 4 个亚组分 (A1~A4)。A3 经半制备高效液相色谱 (X Charge C18, 10 mm × 250 mm; 35% 乙腈-含 0.1% 三氟醋酸的水等度洗脱; 1 mL·min⁻¹) 制备得化合物 TSC (8.62 mg)。TSC 的结构经紫外检测器、核磁共振波谱仪、液相色谱-质谱联用仪进行鉴别与确定。

细胞培养 非洲绿猴 SV40 转化的肾细胞 (COS-7) 由实验室前期保存^[15,16], 培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中; 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein

endothelial cells, HUVECs) 购买于德国 PromoCell 公司, 培养于内皮细胞培养基 (#34823, ScienCell 公司), 6 代以内的 HUVECs 用于实验; 人急性单核细胞白血病细胞 (THP-1) 购买于中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心, 培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基。所有的细胞均于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

细胞活力检测 将处于对数生长期的 HUVECs 接种于 96 孔细胞培养板中, 待细胞贴壁后吸弃原有培养基, 加入含有不同浓度 TSC 的培养基 (0、1.0、2.5、5.0、10、20 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 37 °C 培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 后在 37 °C 培养 2 h, 检测其在 450 nm 波长处的吸光值。

单核细胞黏附实验 将 HUVECs 接种于 6 孔细胞培养板中, 不同浓度 TSC (0、0.1、1.0、5.0 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 18 h 后, 10 ng·mL⁻¹ TNF α 加入培养基中继续刺激 6 h。然后加入 0.5 mL THP-1 细胞 (细胞密度为每毫升 4×10^6 个) 继续孵育 30 min。用不含 FBS 的 RPMI 1640 培养基轻轻漂洗 3 次以移除未黏附在 HUVECs 上的 THP-1 细胞。显微镜拍照后对 HUVECs 上黏附的 THP-1 细胞数量进行定量。

蛋白印迹分析 RIPA 裂解液裂解细胞后提取细胞中总蛋白, BCA 检测试剂盒测定细胞中蛋白浓度并将其定量到相同浓度。将制备好的蛋白样品利用 SDS-PAGE 电泳进行分离, 然后利用湿转法的步骤将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 上, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 孵育相应的一抗 4 °C 摇床过夜, TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min。孵育相应的二抗, 室温 1 h, TBST 漂洗 3 次, 使用蛋白发光液在 Tanon 5200 全自动化学发光图像分析系统成像。用 Image J 软件对蛋白条带进行扫描定量。

实时定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 不同浓度的 TSC (0、0.1、1.0、5.0 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 HUVECs 24 h 后收集细胞。用 QIAGEN RNeasy 试剂盒提取细胞中的总 RNA, 利用 cDNA 反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录为 cDNA, -20 °C 保存。用相应的引物以及荧光定量试剂盒对靶基因的 mRNA 水平进行测定 [以 *ACTB* (编码 β -actin) 为内参]。实验中涉及的引物序列如下: 人 *KLF2* (forward: 5'-TGGAGGCCAAGCCAAAG-3', reverse: 5'-CGAACTCTTGGTGTAGGTCTTG-3'); 人 *VCAM1* (forward: 5'-GATTGGTGACTCCGTCTCATT-3', reverse: 5'-CCTTCCCATTCAGTGGACTATC-3'); 人 *ICAM1* (forward: 5'-GTAGCAGCCGAGTCATAAT-3', reverse: 5'-GGGCTGTTGTAGTCTGTATTT-3'); 人

ACTB (forward: 5'-GGACCTGACTGACTACCTCAT-3', reverse: 5'-CGTAGCACAGCTTCTCCTTAAT-3')。

细胞转染和荧光素酶活性检测 KLF2 荧光素酶活性按照文献^[15,16]所述方法进行检测。将处于对数生长期的 COS-7 细胞接种于 96 孔白底细胞培养板中, 利用脂质体将 KLF2 荧光素酶报告质粒 (每孔 0.2 μg) 转染进 COS-7 细胞中, 6 h 后加入含有不同浓度 TSC (0.001、0.01、0.1、1.0、2.5、5.0、10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的培养基继续培养 24 h。利用荧光素酶检测试剂盒和酶标仪测定 KLF2 的荧光素酶活性。对于 HDAC 抑制活性的检测, 将不同亚型的 HDAC 过表达质粒与 KLF2 报告质粒共同转染接种于 96 孔板的 COS-7 细胞中, 接下来的实验操作如上述所示。

分子对接实验 利用 ChemDraw 14.0 软件得到 TSC 的三维结构示意图, 使用 Discovery Studio 4.5 软件对 TSC 和 HDAC4 (PDB 编码: A69)、HDAC5 (PDB 编码: 5UWI) 和 HDAC7 (PDB 编码: 3C10) 进行分子对接。通过 LibDock 的得分对受体-配体的亲和力进行评估。

统计学分析 所有实验数据均以平均值 \pm 标准误差 (mean \pm SEM) 表示, 采用 GraphPad Prim 8 软件进行统计学分析, 组间统计学差异采用 one-way ANOVA 和 student's *t* 检验进行比较, $P < 0.05$ 时认为其具有统计学意义。

结果

1 化合物 TSC 的分离纯化与结构鉴定

本研究利用实验室前期建立的 KLF2 表达上调剂筛选模型^[15,16]筛选得到链霉菌 CICC 203909, 通过 KLF2 活性追踪、硅胶柱层析、闪式 C18 柱及半制备高

效液相色谱, 从该菌株的大米发酵次级代谢产物中分离纯化得到了一个能上调 KLF2 表达的活性化合物。该化合物为白色无定形粉末, ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 465.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_8$ 。¹H NMR (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$) δ_{H} : 5.87 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-2), 7.27 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-3), 5.97 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-5), 4.54 (1H, dq, $J=9.6, 6.0$ Hz, H-6), 7.86 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-9, 13), 6.72 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-10, 12), 1.93 (3H, s, 4-Me), 1.27 (3H, d, $J=6.5$ Hz, 6-Me), 3.05 (3H, s, N-Me₂), 3.34 (1H, d, $J=10.8, 6.6$ Hz, H-2'), 3.40 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-3'), 3.28 (1H, t, $J=9.6$ Hz, H-4'), 3.34 (1H, m, H-5'), 3.67 (1H, dd, $J=12.0, 2.4$ Hz, H-6'), 3.91 (1H, dd, $J=12.0, 6.0$ Hz, H-6'); ¹³C NMR (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$) δ_{C} : 167.0 (C-1), 116.3 (C-2), 147.8 (C-3), 134.4 (C-4), 142.7 (C-5), 41.8 (C-6), 201.4 (C-7), 124.8 (C-8), 132.1 (C-9, 13), 112.1 (C-10, 12), 155.6 (C-11), 12.9 (4-Me), 18.4 (6-Me), 40.2 (M-Me₂), 107.8 (C-1'), 73.2 (C-2'), 77.6 (C-3'), 71.4 (C-4'), 28.5 (C-5'), 62.9 (C-6')。以上数据与文献^[17]报道基本一致, 故鉴定化合物为曲古抑菌素 C (TSC) (图 1A、B)。此外, 细胞毒性实验结果显示, TSC 在 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内没有明显的细胞毒性 (图 1C), 后续实验均在 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内进行。

2 化合物 TSC 上调 KLF2 mRNA 的表达水平

利用 KLF2 表达上调剂筛选模型^[15,16], 本研究测定了 TSC 对 KLF2 的调节作用。研究结果显示, TSC 在 10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时上调 KLF2 的活性超过 80 倍, EC_{50} 为 1.38 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 2A)。RT-qPCR 实验结果表明, TSC 能剂量依赖性增加 HUVECs 中 KLF2 的 mRNA 水平, 并且给予 HUVECs 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TSC 处理 24 h 后, HUVECs 中 KLF2 的 mRNA 水平能够上升 1.5 倍左右

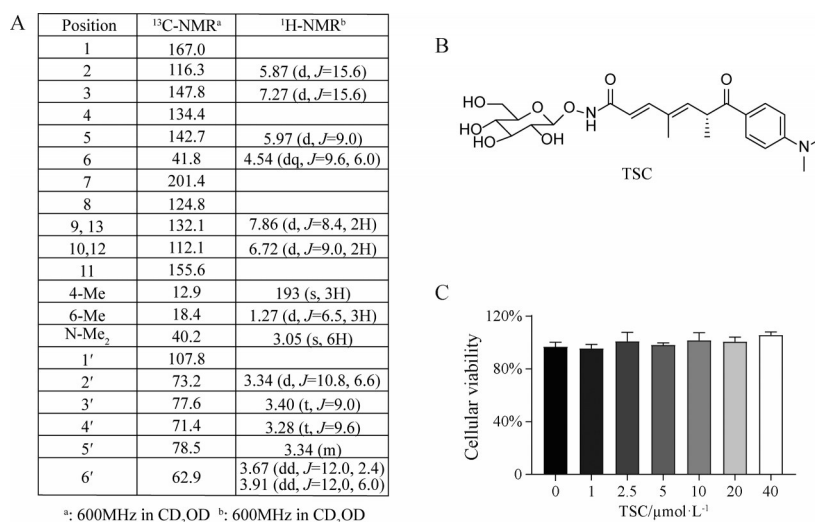


Figure 1 TSC was identified as a KLF2 activator. A: ¹H-NMR and ¹³C-NMR data of TSC; B: Structure of TSC; C: Effect of TSC on HUVECs viability. $n = 3$, mean \pm SEM. TSC: Trichostatin C; HUVECs: Human umbilical vein endothelial cells; KLF2: Krüppel-like factor 2

(图2B); 此外, TNF α 刺激可以降低 HUVECs 中 *KLF2* 的 mRNA 水平, TSC (5 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理后能够逆转 TNF α 诱导的 *KLF2* mRNA 水平的下调 (图2C)。结果表明, TSC 能上调 HUVECs 中 *KLF2* 的 mRNA 水平。

3 化合物 TSC 减少 TNF α 诱导的单核细胞黏附于内皮细胞

本研究利用 TNF α 刺激内皮细胞构建内皮细胞炎症模型^[7,18]。研究结果发现,与对照组相比, TNF α 刺激能够显著增加单核细胞 (THP-1) 黏附到 HUVECs 上的数量; 与 TNF α 刺激组相比, TSC (5 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 HUVECs 24 h 后可以显著减少 TNF α 诱导的 THP-1 黏附数量的增加 (图3A、B)。

4 化合物 TSC 减少 TNF α 诱导的 VCAM-1 的表达

本研究利用 TNF α 刺激的内皮细胞^[7,18], 考察 TSC 对 TNF α 刺激后 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白以及 mRNA 水平的影响。如图4A~C所示, TNF α 刺激后, VCAM-1 和 ICAM-1 的蛋白及 mRNA 水平均显著升高, 表明 TNF α 能够诱导内皮细胞炎症。给予不同浓度的 TSC 处理 HUVECs 24 h 后, 与 TNF α 刺激组相比, TSC 能够浓度依赖性地降低 VCAM-1 的蛋白及 mRNA 水平, 但没有降低 ICAM-1 的蛋白及 mRNA 水平。因此, 本研究认为 TSC 对 TNF α 刺激所导致的内皮细胞炎症和单

核细胞黏附数量增多的抑制作用主要依赖于增加 *KLF2* 的表达, 以及减少黏附分子 VCAM-1 的表达。

5 化合物 TSC 通过抑制 HDAC4、HDAC5 和 HDAC7 上调 *KLF2*

有研究发现, 抑制 HDAC 的活性能够上调 *KLF2* 的表达, 发挥减弱内皮细胞炎症的作用^[19,20]。为了研究 HDAC 亚型与 *KLF2* 表达之间的关系, 本研究首先将 HDAC 1~8 亚型过表达质粒与 *KLF2* 报告质粒共同转染进 COS-7 细胞中, 通过检测荧光值反映 HDAC 是否会影响 *KLF2* 的表达。如图 5A 所示, HDAC4、HDAC5 或 HDAC7 能够抑制 *KLF2* 的荧光素酶活性, 本研究认为, HDAC4、HDAC5 或 HDAC7 可以抑制 *KLF2* 的表达。接下来, 本研究继续探索了 TSC 对于 HDAC4、HDAC5 和 HDAC7 的作用。如图 5B 所示, TSC 逆转了由 HDAC4、HDAC5 或 HDAC7 引起的 *KLF2* 荧光素酶活性抑制, 这表明 TSC 对 HDAC4、HDAC5 和 HDAC7 亚型有抑制作用, 进而上调 *KLF2* 水平。

为了研究 TSC 与 HDAC4、HDAC5 和 HDAC7 蛋白相互作用的模式, 本研究使用 Discovery Studio 4.5 软件对 TSC 与 HDAC4、HDAC5 和 HDAC7 蛋白分别进行了分子对接实验。实验结果显示, TSC 与 HDAC4、HDAC5 和 HDAC7 蛋白相互作用的 Libdock

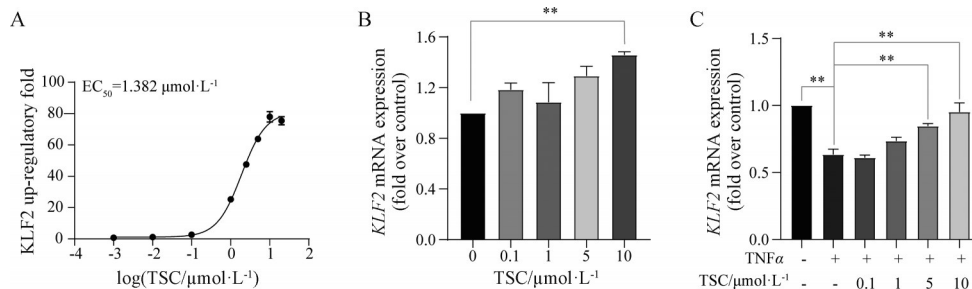


Figure 2 TSC upregulated the mRNA level of *KLF2*. A: Dose response curve of TSC on *KLF2* activity; B: TSC upregulated *KLF2* mRNA levels in HUVECs; C: TSC upregulated *KLF2* mRNA levels in HUVECs treated with TNF α . $n = 3$, mean \pm SEM. ** $P < 0.01$. TNF α : Tumor necrosis factor α

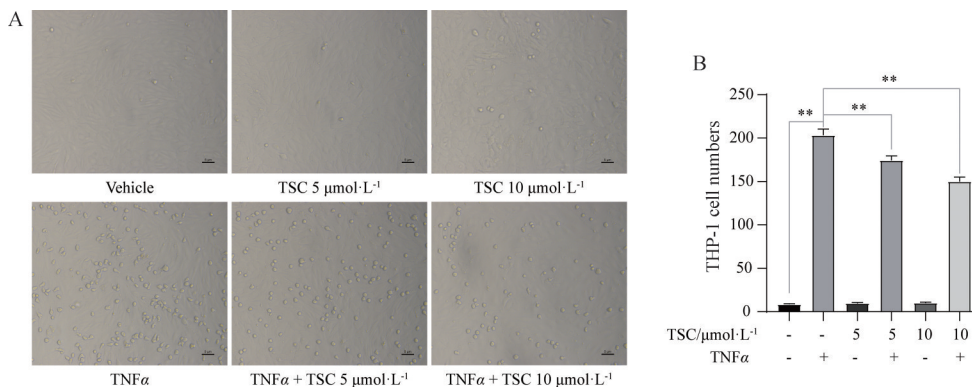


Figure 3 TSC attenuated monocyte adhesion to HUVECs. A: Representative images of THP-1 adhesion to HUVECs after treatment with TSC and TNF α ; B: Quantification results of THP-1 adhesion to HUVECs after treatment with TSC and TNF α . $n = 3$, mean \pm SEM. ** $P < 0.01$

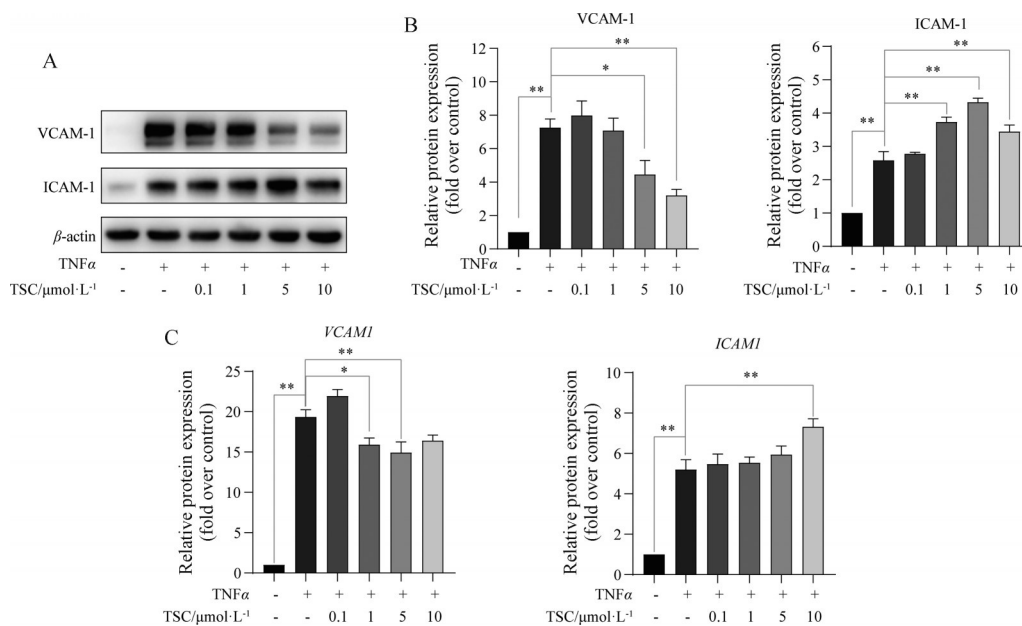


Figure 4 TSC attenuated the expression of VCAM-1 in HUVECs. A: Representative Western blot of protein expression of VCAM-1 and ICAM-1 after treatment with TSC and TNFα; B: Quantification of protein expression of VCAM-1 and ICAM-1 after treatment with TSC and TNFα; C: mRNA level of *VCAM1* and *ICAM1* after treatment with TSC and TNFα. *n* = 3, mean ± SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01. VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1; ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1

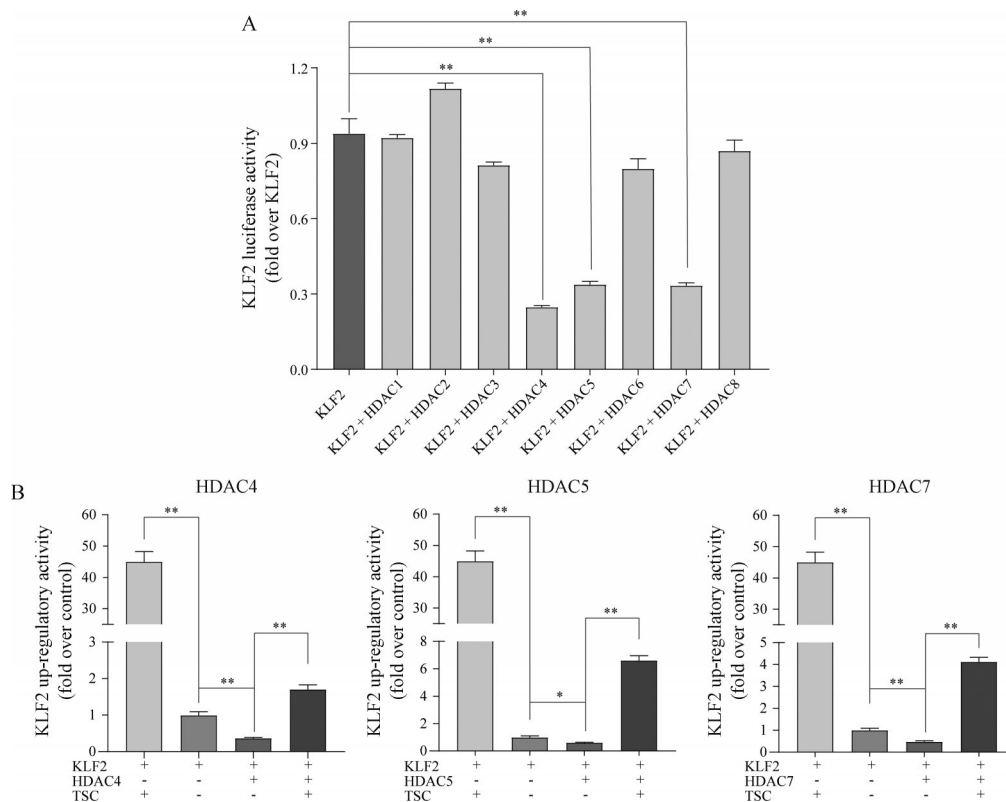


Figure 5 Effect of TSC on HDAC-modulated KLF2 expression in COS-7 cells. A: Effect of HDACs on KLF2 expression; B: Effect of TSC on HDACs and KLF2. *n* = 3, mean ± SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01. HDAC: Histone deacetylase

得分分别为128.86、161.68和126.29,表现出较强的亲和力和范德华力是其主要的相互作用力(图6)。综上所述,化合物TSC通过抑制HDAC4、HDAC5和HDAC7

亚型,上调内皮细胞中KLF2的水平,抑制VCAM-1的表达,减少单核细胞黏附到内皮细胞上的数量,进而抑制内皮细胞炎症。

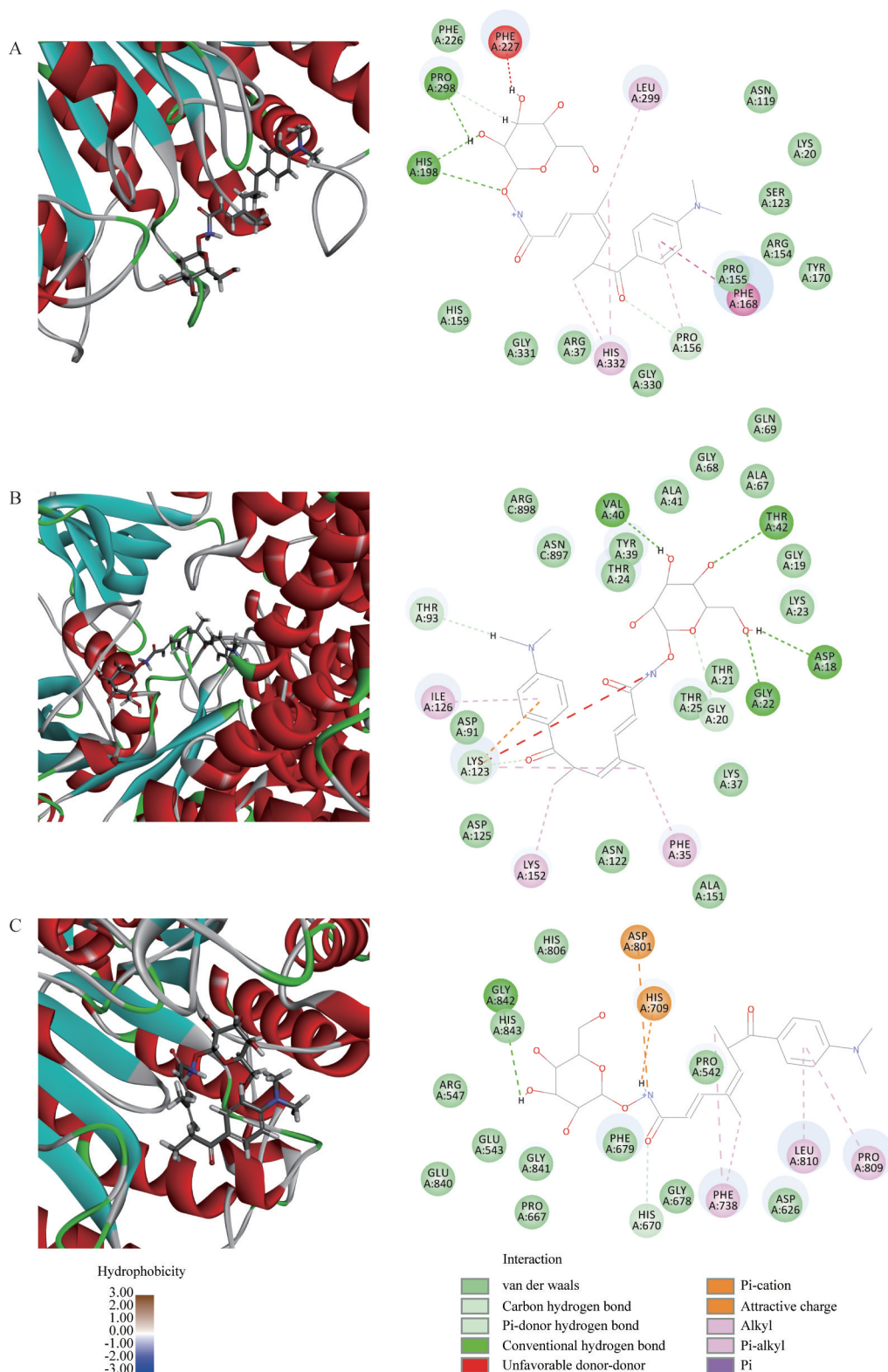


Figure 6 Molecular docking analysis between HDAC4, HDAC5, and HDAC7 proteins with TSC by Discovery Studio 4.5. 3D and 2D modes of the interaction pocket between TSC with HDAC4 (A), TSC with HDAC5 (B), and TSC with HDAC7 (C)

讨论

动脉粥样硬化是一种由脂质代谢紊乱引起的慢性炎症性疾病,是冠心病、稳定性心绞痛和缺血性心脏病等多种CVD的基础^[21,22]。炎症会促使内皮细胞分泌

VCAM-1和ICAM-1等黏附分子,吸引血液循环中的单核细胞黏附到内皮细胞,促进动脉粥样硬化的发生发展^[18,23]。KLF2作为动脉粥样硬化的一种保护因子,可以抑制黏附分子VCAM-1和ICAM-1的表达,减弱

内皮细胞炎症及单核细胞黏附^[24]。因此,发现 KLF2 小分子上调剂可能会对炎症引起的内皮功能障碍甚至动脉粥样硬化起到预防和治疗作用。

本研究利用 KLF2 表达上调剂筛选模型,筛选得到一株链霉菌 CPCC 203909,该菌株大米发酵的次级代谢产物具有上调 KLF2 的活性。通过活性追踪,分离纯化得到了一个活性化合物,经过与文献对比确定其结构为 TSC。本研究发现,TSC 能够上调 HUVECs 中 KLF2 的 mRNA 水平,并且逆转 TNF α 刺激诱导的 KLF2 mRNA 水平下降,显著抑制 TNF α 刺激所导致的黏附分子 VCAM-1 的表达和单核细胞黏附。有研究表明,HDAC4、HDAC5 和 HDAC7 能够抑制 KLF2 的表达,曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA) 作为 HDAC 泛抑制剂可以抑制 VCAM-1 的表达^[19,25-27]。本研究发现,TSC 也表现出抑制 HDAC4、HDAC5 和 HDAC7 的活性,进而上调 KLF2 的表达,抑制 VCAM-1 的表达。目前,对 TSC 的研究主要集中在肿瘤领域,TSC 具有一定的组蛋白去乙酰化酶抑制活性,可以诱导小鼠白血病细胞分化^[28,29],抑制 KM12 人结肠癌细胞的生长^[30]。

TSC 是 TSA 的结构类似物,它在 TSA 的羟肟基团上连接了一个阿尔法构型的葡萄糖。实验室前期从链霉菌 CPCC 203909 中分离并鉴定了化合物 TSA,研究发现 TSA 显著上调 B 类 I 型清道夫受体 (scavenger receptor class B type I, SR-BI) 及其人类同源物 CLA-1 以及 ATP 结合盒转运体 A1 (ABCA1) 的 mRNA 和蛋白水平,剂量依赖性增加小鼠巨噬细胞 (RAW 264.7) 对高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) 的摄取及对胆固醇的排出^[31,32]。曲古抑菌素 D (trichostatin D, TSD) 是 TSC 的结构类似物,两者的结构在于糖的构型不同。本课题组前期从链霉菌 CPCC 203909 分离得到 TSD,发现其可以上调 SR-BI 和 CLA-1 表达,增加 RAW264.7 对 DiI-HDL 的结合^[33];实验室前期还发现 TSD 可以上调 KLF2 的表达,通过 NOD 样受体蛋白 3 信号通路在内皮细胞中发挥抗炎作用^[34]。此外,本课题组前期已经发表他汀类药物辛伐他汀和阿托伐他汀对 KLF2 的上调作用,其在 KLF2 模型上的 EC₅₀ 分别为 1.74 和 5.14 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,最大上调倍数分别为 7.8 和 12.4 倍^[15,34]。由此可见,TSC 对 KLF2 的调节作用要优于辛伐他汀和阿托伐他汀。基于以上结果推测,TSC 等 HDAC 抑制剂具有预防和治疗动脉粥样硬化的潜力。

综上所述,本研究从链霉菌 CPCC 203909 大米发酵次级代谢产物中成功分离得到化合物 TSC,并证明了 TSC 通过抑制 HDAC4、HDAC5 和 HDAC7 上调内皮细胞中 KLF2 的表达,从而抑制 TNF α 诱导的内皮细胞炎症,具有预防和治疗动脉粥样硬化的潜力。

作者贡献: 司书毅、许艳妮、余利岩、陈明华和雷丽娟构思并设计实验和论文撰写。雷丽娟、许艳妮和陈明华进行论文实验和数据分析;雷丽娟、陈渝川、张语嫣、巫晔翔、张煜皓和张晶参与化合物的分离纯化工作;雷丽娟、李迎红和赵丽萍参与分子对接实验;雷丽娟、姜新海、王伟志、王晨吟、李顺旺、韩江雪、李依宁和盛任参与分子生物学实验及数据分析工作。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Badimon L, Chagas P, Chiva-Blanch G. Diet and cardiovascular disease: effects of foods and nutrients in classical and emerging cardiovascular risk factors [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26: 3639-3651.
- [2] Zuo X, Luo JQ, Jiang XH, et al. The anti-atherosclerotic effect and mechanism study of berberine in hyperlipidemic *ApoE*^{-/-} mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 104-110.
- [3] Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases in China 2021: an updated summary [J]. *Biomed Environ Sci*, 2022, 35: 573-603.
- [4] Nitsa A, Toutouza M, Machairas N, et al. Vitamin D in cardiovascular disease [J]. *In Vivo*, 2018, 32: 977-981.
- [5] Pastorino S, Baldassari S, Ailuno G, et al. Two novel PET radiopharmaceuticals for endothelial vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) targeting [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 1025.
- [6] Meng B, Li Y, Ding Y, et al. Myeloid-derived growth factor inhibits inflammation and alleviates endothelial injury and atherosclerosis in mice [J]. *Sci Adv*, 2021, 7: eabe6903.
- [7] Jia M, Li Q, Guo J, et al. Deletion of BACH1 attenuates atherosclerosis by reducing endothelial inflammation [J]. *Circ Res*, 2022, 130: 1038-1055.
- [8] Jiang S, Han YX, Jiang JD, et al. The anti-atherosclerotic effect and mechanism of puerarin [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 966-971.
- [9] Niu N, Xu S, Xu Y, et al. Targeting mechanosensitive transcription factors in atherosclerosis [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2019, 40: 253-266.
- [10] Zhuang T, Liu J, Chen X, et al. Endothelial Foxp1 suppresses atherosclerosis via modulation of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Circ Res*, 2019, 125: 590-605.
- [11] Atkins GB, Wang Y, Mahabeleshwar GH, et al. Hemizygous deficiency of Krüppel-like factor 2 augments experimental atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2008, 103: 690-693.
- [12] Niedzielski M, Broncel M, Gorzelak-Pabiś P, et al. New possible pharmacological targets for statins and ezetimibe [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110388.
- [13] Angolano C, Kaczmarek E, Essayagh S, et al. A20/TNFAIP3 increases ENOS expression in an ERK5/KLF2-dependent manner to support endothelial cell health in the face of

- inflammation [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 651230.
- [14] Li W, Li Y, Zhao Y, et al. The protective effects of aloperine against ox-LDL-induced endothelial dysfunction and inflammation in HUVECs [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48: 107-115.
- [15] Xu Y, Xu S, Liu P, et al. Suberanilohydroxamic acid as a pharmacological Krüppel-like factor 2 activator that represses vascular inflammation and atherosclerosis [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6: e007134.
- [16] Xu Y, Liu P, Xu S, et al. Tannic acid as a plant-derived polyphenol exerts vasoprotection *via* enhancing KLF2 expression in endothelial cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 6686.
- [17] Tsuji N, Kobayashi M. Trichostatin C, a glucopyranosyl hydroxamate [J]. *J Antibiot*, 1978, 31: 939-944.
- [18] Meng Q, Pu L, Lu Q, et al. Morin hydrate inhibits atherosclerosis and LPS-induced endothelial cells inflammatory responses by modulating the NF κ B signaling-mediated autophagy [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 100: 108096.
- [19] Das M, Laha D, Kanji S, et al. Induction of Krüppel-like factor 2 reduces K/BxN serum-induced arthritis [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23: 1386-1395.
- [20] Lee DY, Lin TE, Lee CI, et al. MicroRNA-10a is crucial for endothelial response to different flow patterns *via* interaction of retinoid acid receptors and histone deacetylases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114: 2072-2077.
- [21] Sanchez-Rodriguez E, Egea-Zorrilla A, Plaza-Díaz J, et al. The gut microbiota and its implication in the development of atherosclerosis and related cardiovascular diseases [J]. *Nutrients*, 2020, 12: 605.
- [22] Chen X, Li X, Xu X, et al. Ferroptosis and cardiovascular disease: role of free radical-induced lipid peroxidation [J]. *Free Radic Res*, 2021, 55: 405-415.
- [23] Zheng SG, Zhao MQ, Ren YN, et al. Effects of crocetin on VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells and monocyte-endothelial cell adhesion [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 34-38.
- [24] Deng Y, Lei T, Li H, et al. ERK5/KLF2 activation is involved in the reducing effects of puerarin on monocyte adhesion to endothelial cells and atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864: 2590-2599.
- [25] Choi M, Lee SM, Lee JW, et al. Yeast beta-glucan mediates histone deacetylase 5-induced angiogenesis in vascular endothelial cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 211: 556-567.
- [26] Inoue K, Kobayashi M, Yano K, et al. Histone deacetylase inhibitor reduces monocyte adhesion to endothelium through the suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 2652-2659.
- [27] Kwon IS, Wang W, Xu S, et al. Histone deacetylase 5 interacts with Krüppel-like factor 2 and inhibits its transcriptional activity in endothelium [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 104: 127-137.
- [28] Yoshida M, Nomura S, Beppu T. Effects of trichostatin on differentiation of murine erythroleukemia cells [J]. *Cancer Res*, 1987, 47: 3688-3691.
- [29] Kohge T, Gohda E, Okamura T, et al. Promotion of antigen-specific antibody production in murine B cells by a moderate increase in histone acetylation [J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, 56: 1359-1364.
- [30] Li X, Yoshida M, Beppu T, et al. Modulation of growth and differentiation of human colon carcinoma cells by histone deacetylase inhibitory trichostatin [J]. *Int J Oncol*, 1996, 8: 431-437.
- [31] Bao Y, Yang Y, Wang L, et al. Identification of trichostatin A as a novel transcriptional up-regulator of scavenger receptor BI both in HepG2 and RAW 264.7 cells [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 204: 127-135.
- [32] Xu Y, Xu Y, Bao Y, et al. Identification of dehydroxytrichostatin A as a novel up-regulator of the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) [J]. *Molecules*, 2011, 16: 7183-7198.
- [33] Xu Y, Xu YN, Wu YX, et al. Study of isolation, identification and biological activity of human high density lipoprotein receptor CLA-1 up-regulator 9179D [J]. *Chin J Antibiotics (中国抗生素杂志)*, 2012, 37: 377-382.
- [34] Lei L, Chen M, Wang C, et al. Trichostatin D as a novel KLF2 activator attenuates TNF α -induced endothelial inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 13477.