

[文章编号] 1007-3949(2011)19-06-0479-04

• 实验研究 •

## 二苯乙烯苷通过核因子 $\kappa$ B 信号通路抑制过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡

龙石银, 高细强, 张彩平, 乔新惠, 黄良珠, 佟 丽, 陈武哲, 田 英

(南华大学生物化学与分子生物学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 二苯乙烯苷; 人脐静脉内皮细胞; 细胞凋亡; 核因子  $\kappa$ B /  $\kappa$ B 信号通路

[摘要] 目的 研究二苯乙烯苷对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的保护作用, 探讨二苯乙烯苷是否通过核因子  $\kappa$ B 信号通路调节凋亡相关基因的表达来抑制细胞凋亡。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞, 实验分为对照组、过氧化氢组和二苯乙烯苷组, 采用显微镜观察细胞形态, MTT 法检测细胞增殖率, 流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blot 检测核因子  $\kappa$ B p65、 $\kappa$ B、bcl-2 蛋白的表达。结果 过氧化氢能显著抑制内皮细胞增殖, 增加细胞凋亡率; 并增加核因子  $\kappa$ B p65 蛋白的表达, 降低 bcl-2 和  $\kappa$ B 蛋白的表达。二苯乙烯苷预处理后显著增加氧化损伤内皮细胞的增殖率, 并降低细胞凋亡率; 与过氧化氢组相比, 二苯乙烯苷组核因子  $\kappa$ B p65 蛋白的表达显著降低, bcl-2 和  $\kappa$ B 蛋白的表达显著升高 ( $P < 0.01$ )。结论 二苯乙烯苷对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞凋亡具有保护作用, 其机制可能与其抑制核因子  $\kappa$ B /  $\kappa$ B 信号通路并上调 bcl-2 蛋白的表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effects of 2, 3, 5, 4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-Glucoside on Apoptosis of HUVEC Induced by $H_2O_2$ and the Mechanism Involved NF- $\kappa$ B Signaling Pathway

LONG Shi-Yin, GAO Xi-Qiang, ZHANG Cai-Ping, QIAO Xin-Hui, HUANG Liang-Zhu, TONG Li, CHEN Wu-Zhe, and TIAN Ying

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] 2, 3, 5, 4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-Glucoside, Human Umbilical Vein Endothelial Cell, Apoptosis, NF- $\kappa$ B /  $\kappa$ B Signaling Pathway

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effect of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside (TSG) on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) apoptosis induced by  $H_2O_2$  and further explore whether this effect is related to the NF- $\kappa$ B signaling pathway and the expression of apoptosis-related protein. **Methods** HUVEC were divided into three groups: control group,  $H_2O_2$  group and TSG group. The proliferation and apoptosis rates of HUVEC were detected by MTT and flow cytometry respectively. The protein expression of NF- $\kappa$ B p65,  $\kappa$ B and bcl-2 were assessed by Western blot. **Results** According to the MTT and flow cytometry, the proliferation rate of HUVEC decreased significantly compared with control group ( $P < 0.01$ ), while the apoptosis rate increased obviously ( $P < 0.01$ ) after treating with  $H_2O_2$ . The proliferation rate of TSG pretreatment group increased significantly ( $P < 0.01$ ) while the apoptosis rate decreased obviously ( $P < 0.01$ ) compared with  $H_2O_2$  group. Compared with  $H_2O_2$  group, Western blot analysis revealed that the expression of NF- $\kappa$ B p65 was declined and the level of  $\kappa$ B and bcl-2 were increased significantly after pretreated by TSG ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** TSG has a protective effect on the HUVEC apoptosis induced by  $H_2O_2$  and this molecular mechanism may be associated with its inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B /  $\kappa$ B signaling pathway and the up-regulating expression of bcl-2 protein.

[收稿日期] 2011-04-08

[基金项目] 国家自然科学基金 (30800474) 资助; 湖南省科技厅项目 (2008sk3072, 2010SK3037, 湘科条字 [2009] 130-19); 湖南省教育厅项目 (09C832); 湖南省研究生创新项目 (CX2010B385) 资助

[作者简介] 龙石银, 副教授, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化, Email为 longshiyin@126.com。通讯作者田英, 博士, 教授, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化, Email为 uscty@163.com。

动脉粥样硬化 (As) 是一种慢性血管炎性病变, 血管内皮细胞凋亡是 As 发生的始动因素<sup>[1]</sup>。氧化应激可致内皮细胞凋亡, 通过内皮细胞数量减少而使单层内皮通透性增加, 这种内皮完整性的破坏促进脂质迁移和沉积, 单核细胞和平滑肌细胞迁移至内膜, 进一步损伤血管和促进动脉粥样斑块形成<sup>[2]</sup>。何首乌的水溶性成分二苯乙烯苷 (TSG) 具有抗氧化、降脂、抗 As 等作用, 但机制尚未明确<sup>[3]</sup>。NF- $\kappa$ B / I $\kappa$ B 途径被认为是炎症及凋亡信号转导的关键, 其调控的基因在炎症和凋亡中起重要作用<sup>[4,5]</sup>。因此, 本研究通过观察 TSG 对过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 诱导人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 凋亡的保护作用, 从细胞分子水平探讨 TSG 抑制内皮细胞凋亡的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

HUVEC 细胞株 (编号 C-003-5C) 购自中国科学院细胞生物学研究所上海细胞库; TSG (编号 110844-200908) 为中国药品生物制品检定所产品; RPM I-1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 胰蛋白酶、DMSO 购自 Amresco 公司; MTT 购自 Sigma 公司; 蛋白裂解液购自碧云天生物技术研究公司; 抗 NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B、GAPDH 抗体购自博士德生物工程有限公司; 抗 bcl-2 单克隆抗体购自 CST 公司; 其余均为国产试剂 (分析纯级)。

### 1.2 细胞培养及分组

HUVEC 用含 10% 胎牛血清的 RPM I-1640 培养基在 37℃、5%  $CO_2$ 、95% 饱和湿度条件下培养。实验分为三组: 对照组; ④ $H_2O_2$  组: 以 300  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  诱导内皮细胞凋亡; ④TSG 组: 10  $\mu$ mol/L TSG 预处理 24 h 后, 再加 300  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  孵育 24 h。

### 1.3 MTT 检测细胞增殖活力

取对数生长期细胞, 以  $1 \times 10^7$  个 /L 密度接种

在 96 孔板中, 待细胞长到对数生长期后, 用无血清培养基同步 12 h, 再换新鲜培养基, 按分组要求给予不同的处理因素, 每组设 6 个平行复孔。培养 24 h 后, 每孔加 MTT 20  $\mu$ L (5 g/L), 培养 4 h 后弃上清, 加 DMSO 150  $\mu$ L /孔, 待紫色结晶完全溶解后, 用酶标仪在波长 490 nm 处测定吸光度值, 细胞增殖率 (%) = 试验组 OD 值 / 对照组 OD 值  $\times 100\%$ 。

### 1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率

TSG 处理细胞 24 h 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞, 离心, 去上清, PBS 漂洗 2 遍, 加入冰预冷的 75% 乙醇固定, 4℃ 过夜, PI 单染检测细胞凋亡率。

### 1.5 Western blot 检测 NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B 及 bcl-2 蛋白的表达

收集各组细胞, 用细胞裂解液裂解细胞后提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白含量。每组取 60  $\mu$ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离, 转移到 PVDF 膜上, 用含 5% 牛奶的封闭液封闭 12 h 加入 1:1000 稀释的抗 NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B、bcl-2、GAPDH 一抗, 4℃ 孵育过夜, TBST 缓冲液 (0.05% Tween20 的 TBS 缓冲液) 洗膜 10 min  $\times 3$  次, 以 1:5000 稀释 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1~2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min, 化学发光试剂显色, 胶片显影, 扫描胶片后用凝胶图像分析系统测光密度值。

### 1.6 统计学方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析及 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TSG 预处理对内皮细胞形态的影响

显微镜下,  $H_2O_2$  组内皮细胞间隙变大, 皱缩变圆, 细胞数减少, 细胞碎片增多; 而 TSG 组与  $H_2O_2$  组相比细胞数目逐渐增多, 细胞形态逐渐趋于规则饱满 (图 1)。

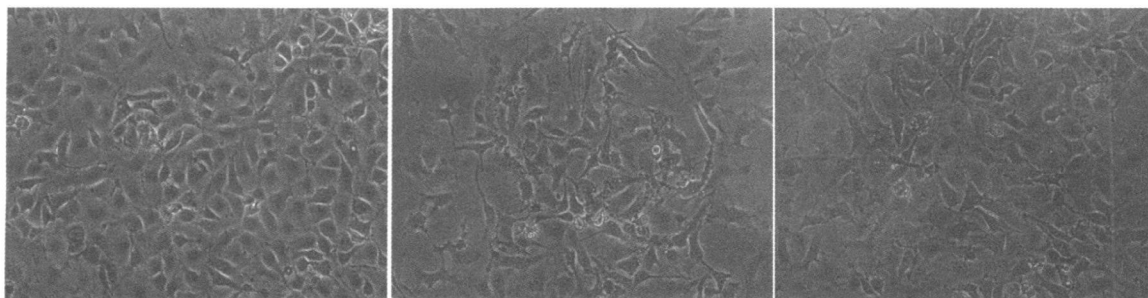


图 1. 内皮细胞形态 ( $\times 100$ ) 从左至右分别为对照组、 $H_2O_2$  组、TSG 组。

Figure 1. Morphology of endothelial cell

## 2.2 内皮细胞增殖率

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组细胞增殖率与对照组比较显著下降 ( $P < 0.01$ ), TSG 组细胞增殖率较 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组显著升高 ( $P < 0.01$ ), 表明 TSG 预处理能改善 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对内皮细胞的损伤, 增加内皮细胞的生存率 (表 1)。

表 1. TSG 对内皮细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 1. Effect of TSG on endothelial cell proliferation

| 分 组                             | 吸光度值                        | 细胞增殖率                      |
|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 对照组                             | 0.778 ± 0.055               | 100.0% ± 4.2%              |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组 | 0.528 ± 0.034 <sup>a</sup>  | 67.9% ± 3.7% <sup>a</sup>  |
| TSG 组                           | 0.605 ± 0.036 <sup>ab</sup> | 77.8% ± 3.1% <sup>ab</sup> |

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较。

## 2.3 内皮细胞凋亡率

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用后, 内皮细胞凋亡率较对照组明显升高 ( $P < 0.01$ ); 而 TSG 预处理后细胞凋亡率较 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组降低 ( $P < 0.01$ ), 表明 TSG 能抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的内皮细胞凋亡 (表 2)。

表 2. TSG 处理后内皮细胞凋亡率 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 2. Effect of TSG on the rate of endothelial cell apoptosis

| 分 组                             | 细胞凋亡率                     |
|---------------------------------|---------------------------|
| 对照组                             | 2.0% ± 0.2%               |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组 | 28.6% ± 3.5% <sup>a</sup> |
| TSG 组                           | 14.9% ± 3.2% <sup>b</sup> |

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较。

## 2.4 TSG 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的内皮细胞 NF-κB p65、IκB、bcl-2 蛋白表达的影响

与对照组比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理内皮细胞 24 h 后 NF-κB p65 蛋白的表达增加, IκB、bcl-2 蛋白的表达减少; 经 TSG 预处理后, 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较, TSG 可显著降低 NF-κB p65 蛋白的表达, 升高 IκB、bcl-2 蛋白的表达 ( $P < 0.01$ ; 图 2 和 3)。

## 3 讨 论

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 属活性氧族, 能引起血管内皮细胞损伤, 导致内皮功能障碍<sup>[6]</sup>。内皮细胞损伤又是 As 发生的始动因素, 内皮细胞过度凋亡会促进 As 斑块糜烂, 继发血栓形成<sup>[1,4]</sup>, 因此, 保护血管内皮细胞和抑制内皮细胞凋亡成为防治 As 的研究热点。

TSG 抗 As 作用主要是通过改善内皮细胞功能、抑制血小板聚集和血管平滑肌细胞增殖、抑制黏附

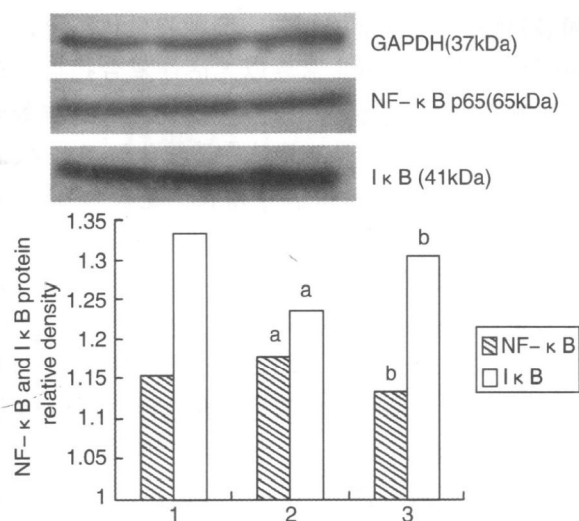


图 2. TSG 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的内皮细胞 NF-κB p65、IκB 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组, 3 为 TSG 组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较。

Figure 2. Effects of TSG on NF-κB p65 and IκB expression of HUVEC induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

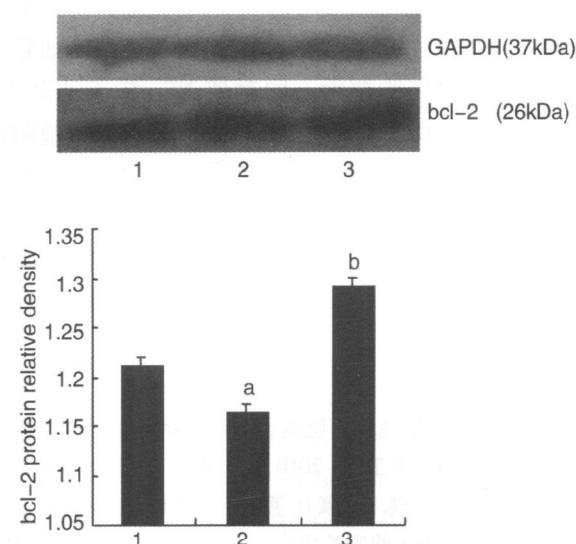


图 3. TSG 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的内皮细胞 NF-κB bcl-2 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组, 3 为 TSG 组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较。

Figure 3. Effects of TSG on bcl-2 expression of HUVEC induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

分子和炎性分子的表达等实现<sup>[3,5]</sup>。本课题组前期研究表明 TSG 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 氧化损伤具有保护作用, 可能是通过抑制 NF-κB 活化而降低炎性因子的表达来实现<sup>[5]</sup>, 但 TSG 是否通过 NF-κB 信号通路调节相关凋亡基因的表达来抑制细胞凋亡尚未见文献报道。NF-κB 是具有多种基因转录调控作用的转录因子, 与炎症反应、免疫应答以及细胞的增

殖、转化和凋亡等密切相关。细胞静息状态下, NF- $\kappa$ B 与其抑制蛋白 I $\kappa$ B 家族以无活性复合物形式存在于胞浆中, 当细胞受到外界因素如氧化应激等刺激时, 被激活的 I $\kappa$ B 从三聚体中磷酸化解离出来, 暴露出 p50 亚基上的易位信号和 p65 亚基上 DNA 结合位点, 从而使此异二聚物表现出 NF- $\kappa$ B 活性, 并从细胞质中转位到细胞核中, 与  $\kappa$ B 基序相结合发挥转录调控作用, 在 As 斑块中存在明显的 NF- $\kappa$ B 激活和 I $\kappa$ B $\alpha$  的降解<sup>[7]</sup>; bcl-2 基因是一种重要的凋亡抑制基因, 在细胞凋亡信号转导途径中, NF- $\kappa$ B 信号通路的激活可调节 bcl 家族凋亡相关基因的表达, 内质网应激可诱导 NF- $\kappa$ B 活化并伴有 bcl-2 下调<sup>[8-13]</sup>。本研究中, 300  $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 HUVEC 24 h 后, 能显著抑制内皮细胞增殖, 促进细胞凋亡; 并上调内皮细胞中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平, 同时降低 I $\kappa$ B、bcl-2 蛋白水平, 提示在内皮细胞凋亡的过程中, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可能通过促进 I $\kappa$ B 的降解, 使 NF- $\kappa$ B 信号通路激活, NF- $\kappa$ B p65 活化入核, 调控细胞周期蛋白的表达及抑制凋亡相关基因 bcl-2 的表达, 诱发细胞凋亡。TSG 预处理后明显改善氧化损伤内皮细胞增殖, 抑制内皮细胞凋亡。同时使 NF- $\kappa$ B 表达降低, bcl-2 表达增多。表明在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的内皮细胞凋亡模型中, TSG 可能通过调节内皮细胞 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 信号通路, 抑制 NF- $\kappa$ B 活化, 上调 bcl-2 基因的表达而发挥抗内皮细胞凋亡作用。但 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 通路是否能做为 TSG 抗 As 的靶点还有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 陈亚平. 血管内皮细胞凋亡与动脉粥样硬化研究进展 [J]. 中国医学工程, 2010, 18 (4): 179-180
- [2] 李立平, 韦 瑛. 过氧化氢诱导血管内皮细胞凋亡与 Caspase-3 表达的实验研究 [J]. 陕西医学杂志, 2009, 38 (8): 960-961.
- [3] 崔慧辉, 田 英, 龙石银. 二苯乙烯苷抗动脉粥样硬化的作用和机制 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9 (20): 3968-971.
- [4] Trostorf F, Landgraf C, Kablau M, et al. Increased endo-

thelial cell apoptosis in symptomatic high-grade carotid artery stenosis: preliminary data [J]. Eur J Vasc Endovasc Surg 2007, 33: 65-68

- [5] 龙石银, 崔慧辉, 张彩平, 等. 二苯乙烯苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人脐静脉内皮细胞核因子  $\kappa$ B 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (17): 510-513
- [6] Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms and consequences [J]. Cardiovasc Res 2005, 68 (1): 26-36
- [7] Chen H, Li D, Mehta JL. Modulation of matrix metallo proteinase-1, its tissue inhibitor and nuclear factor-kappa B by losartan in hypercholesterolemic rabbits [J]. J Cardiovasc Pharmacol 2002, 39 (3): 332-339
- [8] Mertens H J, Heineman M J, Evers J L. The expression of apoptosis related proteins Bcl-2 and Bcl-6 in endometrium of ovulatory menstrual cycles [J]. Gynecol Obstet Invest 2002, 53 (4): 224-230
- [9] Ghribi O, Heman MM. A $\beta$ (1-42) and aluminum induce stress in endoplasmic reticular in rabbit hippocampus involving nuclear translocation of gad 153 and NF-kappaB [J]. Brain Res Mol Brain Res 2001, 96 (1-2): 30-38
- [10] Soares MP, Ushava A, Brouard S, et al. Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1 derived carbon monoxide [J]. Antioxid Redox Signal 2002, 4: 321-329
- [11] Motokuni Aoki, Toshie Naito, Ryuichi Morishita, et al. Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF- $\kappa$ B [J]. Hypertension, 2002, 38 (1): 48-55
- [12] Chen G, Chen Y, Chen H, et al. The effect of NF- $\kappa$ B pathway on proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by intermittent high glucose [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 347: 127-133
- [13] Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria-Specificity in membrane targeting for death [J]. Biochim Biophys Acta 2011, 1813 (4): 532-539

(此文编辑 文玉珊)