

二苯乙烯苷对 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞 P 选择素和 E 选择素表达的影响

张彩平, 丁岚, 田英, 周永强, 龙石银, 田汝芳, 韩瑛

(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; 内皮细胞; 动脉粥样硬化; P 选择素; E 选择素

[摘要] 目的 研究二苯乙烯苷(TSG)对 H_2O_2 诱导损伤的人脐静脉内皮细胞 P 选择素和 E 选择素表达的影响。方法 运用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)分别检测 P 选择素和 E 选择素的 mRNA 和蛋白表达。结果 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用人脐静脉内皮细胞 24 h, P 选择素和 E 选择素的 mRNA 和蛋白表达水平均明显上调, 与空白对照组比较, 差异具有显著性($P < 0.01$), 但 TSG 预处理人脐静脉内皮细胞 4 h 后再加 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 24 h, H_2O_2 诱导的内皮细胞 P 选择素和 E 选择素的 mRNA 和蛋白表达水平降低, 与 H_2O_2 处理组比较, 差异有显著性($P < 0.05$)。结论 TSG 通过降低黏附分子 P 选择素和 E 选择素的表达可保护内皮细胞免受氧化应激损伤, 影响动脉粥样硬化进程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of TSG on Expression of E-Selectin, P-Selectin in Vascular Endothelial Cell Induced by H_2O_2

ZHANG Cai-Ping, DING Lan, TIAN Ying, ZHOU Rong-Qiang, LONG Shi-Yin, TIAN Ru-Fang, and HAN Ying

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

[KEY WORDS] 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-Glucoside; Endothelial Cells; Atherosclerosis; P-Selectin; E-Selectin

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (TSG) on expression of adhesion molecules P-selectin, E-selectin induced by H_2O_2 in human umbilical vein endothelial cells. **Methods**

The expression of P-selectin, E-selectin mRNA and protein were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) respectively. **Results** Treating endothelial cells with

200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , the expression of E-selectin, P-selectin mRNA and protein level were significantly higher ($P < 0.01$).

Pretreated with TSG for 4 h, the expression of P-selectin, E-selectin mRNA and protein induced by H_2O_2 were significantly inhibited in endothelial cells ($P < 0.05$). **Conclusions** TSG probably can protect human umbilical vein endothelial cells from oxidative stress by decreasing expression of adhesion molecules.

中药何首乌为蓼科蓼属植物,水溶性成分 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D 葡萄糖苷(简称二苯乙烯苷, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside, TSG)是何首乌的主要药效成分^[1-5]。药理试验表明 TSG 具有抗炎、抗氧化、增强免疫力等多种生物活性。近年来其抗动脉粥样硬化保护内皮细胞免受损伤引起了人们的广泛关注,但其抗炎、抗氧化作

用的具体机制仍不十分明了。我们课题组前期实验已证实,氧化应激可上调人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)核因子 κB (NF- κB) 的表达,而 TSG 能抑制 H_2O_2 诱导的 HUVEC NF- κB 的表达上调^[6]。由于黏附分子是 NF- κB 的靶基因, NF- κB 转位进入细胞核可促进黏附分子的表达,我们假设 H_2O_2 通过上调 NF- κB 的表达,

[收稿日期] 2011-08-16

[基金项目] 国家自然科学基金(30800474)资助;湖南省科技厅项目(2010SK3037)、湖南省教育厅重点项目(11A104)和湖南省研究生创新项目(CX2010B385, CX2011B378)资助

[作者简介] 张彩平,讲师,研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化, E-mail 为 zhangcpin@163.com。通讯作者龙石银,博士,副教授,研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化, E-mail 为 longshiyin@126.com。

进而促进黏附分子的表达,导致单核细胞与内皮细胞的黏附,而 TSG 能抑制此作用。为此,本研究旨在通过观察 TSG 对 H_2O_2 诱导的 HUVEC 中 P 选择素和 E 选择素表达的影响,探讨 TSG 在单核细胞黏附到内皮细胞中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

HUVEC(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、辛伐他汀(中国药品生物制品检定所);RPMI-1640 培养基(GIBCO 公司);胰蛋白酶、DMSO、EDTA- Na_2 、Tris(Amresco 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);MTT、DEPC(Sigma 公司);Agarose(Spanish 分装);Trizol(碧云天生物技术研究所);RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(MBI 公司); $2 \times$ Taq PCR MasterMix、100 bp Marker[天根生化科技(北京)有限公司];E 选择素、P 选择素 ELISA 检测试剂盒(博士德生物工程有限公司);梯度 PCR 仪(Eppendorf 公司);凝胶成像系统(Tanon 公司);酶联免疫检测仪(ELX800, BIOTEK 公司),其余为国产分析纯试剂。

1.2 细胞培养及分组

HUVEC 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 $37^\circ C$ 、5% CO_2 、95% 饱和湿度条件下培养。实验分为四组:空白对照组; H_2O_2 组(200 $\mu mol/L$ H_2O_2 作用 24 h);辛伐他汀组(阳性药物对照组,5 $\mu mol/L$ 辛伐他汀预处理 4 h 后 200 $\mu mol/L$ H_2O_2 作用 24 h);TSG 组(1 $\mu mol/L$ TSG 预处理 4 h 后 200 $\mu mol/L$ H_2O_2 再作用 24 h)。

1.3 RT-PCR 检测内皮细胞 P 选择素和 E 选择素 mRNA 的表达

根据引物设计软件 Premier 5 设计引物,Genbank Blast 确定其特异性,由上海生物工程公司合成。引物序列为人 GAPDH 上游 5'-TGTCGCTGTTGAAGT-CAGAG-3',下游 5'-TCACCATCTTCCAGGAGCGAG-3',预计产物长度 648 bp;人 P 选择素上游 5'-ATA-AGCCAATAGCGATGA-3',下游 5'-AAGGACTCGGCT-CAAAT-3',预计产物长度 363 bp;人 E 选择素上游 5'-TCCGCCAGCCTCAGAAT-3',下游 5'-CCTCACAAAC-CCTTGG-3',预计产物长度 407 bp。按照试剂盒说明逆转录合成 cDNA。各处理组提取的总 RNA 各取 5 μg , $65^\circ C$ 预变性 3 min,依次加入 $5 \times$ buffer 4 μL ,25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μL ,10 mmol/L dNTP 2 μL ,oligoT

0.5 g/L 1 μL ,AMVnase (2×10^8 U/L) 1 μL ,加无 RNA 酶水至 20 μL , $42^\circ C$ 保温 60 min; $70^\circ C$ 5 min 终止反应。逆转录产物按每管 3 μL 分装于无菌离心管中, $-80^\circ C$ 保存备用。取各处理组第一链 cDNA 1.0 μL 为模板,依次加入 $2 \times$ Mastermix 12.5 μL ,上、下游引物(10 $\mu mol/L$)各 1.0 μL ,dd H_2O 9.5 μL ,构建 25 μL 反应体系。混匀后放入 PCR 仪中扩增。反应参数为 $94^\circ C$ 预变性 3 min, $94^\circ C$ 变性 30 s,GAPDH $60^\circ C$ 退火 30 s(P 选择素 $51^\circ C$ 退火 30 s,E 选择素 $57^\circ C$ 退火 30 s), $72^\circ C$ 延伸 1 min,共 30 个循环。 $72^\circ C$ 延伸 10 min, $4^\circ C$ 保存。各处理组实验重复三次,PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖电泳,凝胶成像系统拍摄,扫描灰度分析结果。

1.4 ELISA 检测内皮细胞 P 选择素和 E 选择素蛋白的表达

按 ELISA 试剂盒说明,分别取各组上清 100 μL 用于细胞上清液中 P 选择素和 E 选择素检测。操作步骤参照试剂说明书进行,酶联免疫仪 450 nm 处测吸光度值(A)。绘制标准曲线,根据样品 A 值在 Curve Expert 1.3 软件上算出相应 P 选择素和 E 选择素含量。

1.5 统计学分析

实验所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,全部数据经方差齐性分析后,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TSG 对 P 选择素 mRNA 及蛋白表达的影响

内皮细胞经 H_2O_2 刺激 24 h 后 P 选择素的 mRNA 及蛋白表达明显升高,与空白对照组相比差异有显著性($P < 0.01$)。辛伐他汀组(阳性药物对照组)用辛伐他汀预处理 4 h 后加 H_2O_2 处理 24 h,引起 P 选择素的 mRNA 及蛋白表达较 H_2O_2 组明显降低,差异有显著性($P < 0.01$);而内皮细胞经 TSG 预处理 4 h 后 P 选择素的 mRNA 及蛋白表达明显降低,与 H_2O_2 组比较差异有显著性($P < 0.01$),与阳性药物对照组结果一致(图 1 和表 1)。

2.2 TSG 对 E 选择素 mRNA 及蛋白表达的影响

内皮细胞经 H_2O_2 刺激 24 h 后 E 选择素 mRNA 及蛋白表达明显升高,与空白对照组相比差异有显著性($P < 0.01$)。辛伐他汀组(阳性药物对照组),用辛伐他汀预处理 4 h 后加 H_2O_2 处理 24 h,引起 E

选择素 mRNA 及蛋白表达明显降低,与 H_2O_2 组比较差异有显著性 ($P < 0.01$); 而细胞经 TSG 预处理 4 h 后 E 选择素 mRNA 及蛋白表达明显降低,与 H_2O_2 组相比较差异有显著性 ($P < 0.01$), 与阳性药物对照组结果一致 (图 2 和表 2)。

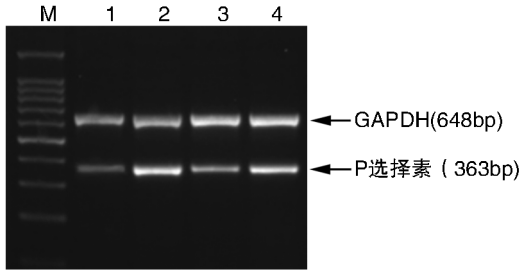


图 1. TSG 对 H_2O_2 诱导的内皮细胞 P 选择素 mRNA 表达的影响 M 为 Marker, 1 为空白对照组, 2 为 H_2O_2 组, 3 为辛伐他汀组, 4 为 TSG 组。

Figure 1. Effect of TSG on expression of P-selectin mRNA induced by H_2O_2 in endothelial cells

表 1. TSG 对 H_2O_2 诱导的内皮细胞 P 选择素 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1. Effect of TSG on expression of P-selectin mRNA and protein induced by H_2O_2 in endothelial cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	P 选择素 mRNA	P 选择素蛋白 (ng/L)
空白对照组	0.402 ± 0.047	36.383 ± 0.839
H_2O_2 组	1.026 ± 0.018 ^a	60.041 ± 3.211 ^a
辛伐他汀组	0.529 ± 0.024 ^b	42.203 ± 0.421 ^b
TSG 组	0.724 ± 0.042 ^b	46.848 ± 1.124 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组相比; b 为 $P < 0.01$, 与 H_2O_2 组相比。

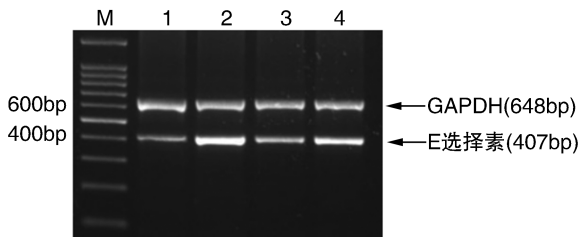


图 2. TSG 对 H_2O_2 诱导的内皮细胞 E 选择素 mRNA 表达的影响 M 为 Marker, 1 为空白对照组, 2 为 H_2O_2 组, 3 为辛伐他汀组, 4 为 TSG 组。

Figure 2. Effect of TSG on expression of E-selectin mRNA induced by H_2O_2 in endothelial cells

表 2. TSG 对 H_2O_2 诱导的内皮细胞 E 选择素 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2. Effect of TSG on expression of E-selectin mRNA and protein induced by H_2O_2 in endothelial cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	E 选择素 mRNA	E 选择素蛋白 (ng/L)
空白对照组	0.549 ± 0.029	7.516 ± 1.287
H_2O_2 组	1.157 ± 0.052 ^a	37.565 ± 3.033 ^a
辛伐他汀组	0.690 ± 0.011 ^b	16.138 ± 0.748 ^b
TSG 组	0.901 ± 0.018 ^b	23.021 ± 3.495 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组相比; b 为 $P < 0.01$, 与 H_2O_2 组相比。

3 讨 论

随着年龄的增长, 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 可引起大、中及小细动脉狭窄, 进而可使所供血的组织器官缺血导致心脑血管疾病发生, 已成为老年人死亡的主要原因之一。针对 As 的发病机制先后提出了脂质浸润学说、血栓形成学说、损伤反应学说等, 其中损伤反应学说逐渐被人们重视, 而其首是动脉血管内皮细胞损伤。随着人们工作生活节奏的加快, 压力也剧增, 同时环境的污染等均导致了氧化应激几率增高。氧化应激使机体产生的活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 损伤动脉内皮细胞, 进而诱导内皮细胞分泌黏附分子使单核细胞与内皮黏附, 而 E 选择素和 P 选择素参与了单核细胞与内皮细胞的最初接触。

研究表明, P 选择素和 E 选择素作为黏附分子家族的成员, 在 As 形成过程中起重要作用, 其水平高低与 As 发生有一定相关性。屈晓冰等^[7] 研究发现, 冠状动脉粥样硬化狭窄的程度越重、范围越大、数量越多, P 选择素水平就越高, 提示 P 选择素可以作为反映冠状动脉粥样硬化程度和数量的指标。P 选择素能介导的白细胞与内皮细胞间的黏附, 导致内皮损伤继而启动 As 进程^[8]。体外实验结果表明, 内皮细胞在抵抗素^[9] 和氧化型低密度脂蛋白^[10] 的刺激下 P 选择素的表达是增加的, 从而诱导细胞黏附分子活化, 提高单核细胞向内皮细胞的黏附功能^[11-14]。而 E 选择素仅表达在内皮细胞上, 在受到炎症刺激后, E 选择素的表达显著增高。炎症发生时, 血管内皮受损, 内皮细胞受到炎症因子肿瘤坏死因子的刺激, 表达大量的 E 选择素, 其通过与白细胞表面的糖蛋白结合, 诱导内皮细胞与白细胞的黏附^[15]。TSG 的抗炎、抗氧化作用在抗 As 保护动脉内皮细胞的研究报道引起了人们的广泛关

注,但其作用机制仍未明了。以上诸多的研究结果表明内皮细胞损伤后引起黏附分子表达增高,促进 As 的进程,那么 TSG 是否通过此作用机制,抑制黏附分子表达,保护内皮细胞尚未见报道。

我们采用 TSG 作为抗氧化保护剂预孵育体外培养的人内皮细胞后,用 H_2O_2 处理 24 h,观察对黏附分子 P 选择素、E 选择素表达的影响,结果表明 H_2O_2 诱导的 HUVEC 损伤后,内皮细胞中 P 选择素和 E 选择素的 mRNA 水平及培养基中的蛋白含量均较空白对照组明显升高,提示 H_2O_2 刺激下内皮细胞的黏附能力增加,单核细胞易于黏附内皮并向内皮下迁移。而 TSG 药物干预后,P 选择素和 E 选择素表达显著低于 H_2O_2 处理组,其抑制效果和阳性药物辛伐他汀一致,提示 TSG 可通过抑制黏附分子的表达和分泌,降低单核细胞和内皮细胞之间的黏附。我们的实验结果表明 TSG 可能通过抗氧化作用降低 P 选择素和 E 选择素的表达而影响 As 发生的起始环节,TSG 是否通过抑制炎症介质的表达引起黏附分子表达降低而保护内皮细胞免受氧化剂损伤,仍需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Liu QL, Xiao JH, Ma R, et al. Effect of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glycoside on lipoprotein oxidation and proliferation of coronary arterial smooth cells[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9(8): 689-697.
- [2] Lv LS, Gu XH, Tang J, et al. Antioxidant activity of stilbene glycosides from *Polygonum multiflorum* Thunb in vivo [J]. *Food Chem*, 2007, 104(4): 1 678-681.
- [3] Zhang Y, Shen J, Xu J, et al. Inhibitory effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside on experimental inflammation and cyclooxygenase 2 activity[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9(4): 355-363.
- [4] Wang X, Zhao L, Han T, et al. Protective effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside, an active component of *Polygonum multiflorum* Thunb, on experimental colitis in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 578(2-3): 339-348.
- [5] Zhang W, Wang C, Li F, et al. 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-b-D-glucoside suppresses matrix metalloproteinase expression and inflammation in atherosclerotic rats

- [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35: 310-316.
- [6] 龙石银,高细强,张彩平,等.二苯乙烯苷通过核因子 κ B 信号通路抑制过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(6): 479-482.
- [7] 屈晓冰,孙振球,陈美娟,等.冠心病患者 P-选择素水平及其与冠状动脉病变程度间的关系[J]. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(8): 617-621.
- [8] Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, et al. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice[J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(5): 1 037-043.
- [9] Manduteanu I, Pirvulescu M, Gan AM, et al. Similar effects of resistin and high glucose on P-selectin and fractalkine expression and monocyte adhesion in human endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(3): 1 443-448.
- [10] Bai YP, Hu CP, Chen MF. Inhibitory effect of reinoside C on monocyte-endothelial cell adhesion induced by oxidized low-density lipoprotein via inhibiting NADPH oxidase/ROS/NF- κ B pathway [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2009, 380: 399-406.
- [11] Song L, Pacther JS. Culture of murine brain microvascular endothelial cells that maintain expression and cytoskeletal association of tight junction-associated proteins [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2003; 39(7): 313-320.
- [12] Salles I, Broos K, Fontayne A, et al. Development of a high-throughput ELISA assay for platelet function testing using platelet-rich plasma or whole blood [J]. *Thromb Haemost*, 2010, 104(2): 392-401.
- [13] Dudeck A, Leist M, Rubant S, et al. Immature mast cells exhibit rolling and adhesion to endothelial cells and subsequent diapedesis triggered by E- and P-selectin, VCAM-1 and PECAM-1 [J]. *Exp Dermatol*, 2010, 19(5): 424-434.
- [14] Garbaraviciene J, Diehl S, Varwig D, et al. Platelet P-selectin reflects a state of cutaneous inflammation: possible application to monitor treatment efficacy in psoriasis [J]. *Exp Dermatol*, 2010, 13(8): 456-459.
- [15] Nishiwaki Y, Yoshida M, Iwaguro H, et al. Endothelial E-selectin potentiates neovascularization via endothelial progenitor cell-dependent and independent mechanisms [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(3): 512-518.

(此文编辑 许雪梅)