

尿酸减轻氧化应激诱导的血管内皮细胞损伤

孙海斌

(郑州大学第五附属医院病理科,河南省郑州市 450000)

[关键词] 尿酸; 人脐静脉内皮细胞; 氧化应激; 核转录相关因子 2

[摘要] **目的** 探讨尿酸对氧化应激情况下的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)有无保护作用以及其可能的机制。**方法** 将人脐静脉内皮细胞分为四组:不做任何处理的对照组、单纯叔丁基过氧化氢(t-BHP)组、单纯尿酸组和尿酸+t-BHP组。MTT 试验计算各组细胞存活率。DCFH-DA 探针检测各组细胞内活性氧(ROS)水平。流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。荧光定量 PCR 技术检测各组细胞核转录相关因子 2(Nrf2)mRNA 表达变化。Western blot 技术检测各组细胞胞浆与胞核中 Nrf2 蛋白表达水平。**结果** MTT 试验发现,尿酸+t-BHP 组细胞存活率(78.5%±7.6%)显著高于单纯 t-BHP 组($P < 0.05$)。尿酸+t-BHP 组细胞内 ROS 水平以及细胞凋亡率都明显低于单纯 t-BHP 组($P < 0.05$)。各组 Nrf2 的 mRNA 表达水平差异均无显著性($P > 0.05$),但单纯尿酸组与尿酸+t-BHP 组细胞核内 Nrf2 明显增多。**结论** 尿酸对氧化应激下的血管内皮细胞具有保护作用,其机制可能为尿酸增加了血管内皮细胞中 Nrf2 的核内转移。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Uric Acid Attenuates Oxidative Stress-Induced Injury in Vascular Endothelial Cells

SUN Hai-Bin

(Department of Pathology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China)

[KEY WORDS] Uric Acid; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Oxidative Stress; NF-E2-related Factor 2

[ABSTRACT] **Aim** To explore the protective effect of uric acid on human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) injury induced by oxidative stress and its underlying mechanism. **Methods** HUVEC were divided into four groups: control group, tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-treated group, uric acid-treated group, t-BHP plus uric acid-treated group. Cell viability was evaluated by MTT assay. Intracellular reactive oxygen species (ROS) level was detected by DCFH-DA fluorescence probe. Cell apoptosis was determined by flow cytometry. NF-E2-related factor 2 (Nrf2) expressions in the mRNA and protein level were analyzed by qRT-PCR and Western blot, respectively. **Results** t-BHP treatment caused significant decline in cell viability of HUVEC, which was attenuated by uric acid treatment. Moreover, intracellular ROS level was down-regulated in t-BHP plus uric acid-treated group compared with t-BHP-treated group. Cell apoptosis rate exhibited similar trend. All four groups exhibited similar Nrf2 mRNA level. However, the nuclear translocation of Nrf2 was elevated significantly in both uric acid-treated group and t-BHP plus uric acid-treated group. **Conclusions** Uric acid could prevent HUVEC from oxidative stress possibly via Nrf2 nuclear translocation and activation.

血管内皮细胞的损伤是多种心血管疾病的始发因素,如动脉粥样硬化的发生、发展就与血管内皮的损伤密切相关^[1]。其中诸如吸烟等多种原因造成的氧化应激是血管内皮损伤的重要原因。氧化应激为常见的应激损伤,由氧化/抗氧化失衡引起,主要表现为细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成增多,清除下降。活性氧簇主要有:超氧阴离子、羟自由基、H₂O₂等。这些物质的增

多会损伤线粒体,引起 ROS 的进一步增多,形成恶性循环^[2]。在此过程中,细胞内膜出现脂质过氧化,通透性异常增高。同时伴有 Caspase 通路、丝裂原活化蛋白激酶通路的异常激活,引起细胞凋亡^[3]。尿酸(uric acid, UA)具有强大的抗氧化作用,可以清除超氧阴离子、羟自由基等强氧化物^[4],但尿酸能否拮抗氧化应激保护血管内皮尚不确定,其具体机制也尚不明确。核转录相关因子 2(NF-

E2-related factor 2, Nrf2) 可以通过抗氧化反应元件 (ARE) 调控一系列抗氧化酶的表达, 是体内内源性抗氧化系统中至关重要的一条通路, 受其调控的酶主要有血红素加氧酶 1、醌氧化还原酶 1、谷胱甘肽过氧化物酶等。因而多个研究都表明, Nrf2 的活性与氧化应激有关, 起到对抗氧化应激的作用^[5]。本研究使用叔丁基过氧化氢 (tert-butyl hydroperoxide, t-BHP) 诱导人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 氧化应激, 研究尿酸是否具有抗氧化应激保护血管内皮细胞的作用, 并从 Nrf2 活性方面探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

HUVEC 细胞株 (上海研谨生物科技有限公司), RPMI1640 培养基和胎牛血清 (赛默飞世尔生物化学制品有限公司), 尿酸、t-BHP、MTT 试剂、碘化丙啶 (PI)、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒以及 DCFH-DA 荧光探针 (Sigma 公司), RNA 提取试剂盒 (美国 QIAGEN 公司), ImProm-II[®] 反转录试剂盒及 GO Taq[®] qPCR Master Mix [普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司], 核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒 (南京凯基生物技术公司), BCA 蛋白定量分析盒以及 ECL 化学发光显色试剂盒 (北京普利莱生物技术公司), 小鼠抗人 Nrf2 多克隆抗体以及小鼠抗人 GAPDH 多克隆抗体 (Abcam 公司)。

1.2 细胞培养和实验分组

HUVEC 的培养采用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基。培养环境为 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱。细胞消化采用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰酶, 选取状态良好的对数期细胞进行试验。制备细胞悬液, 以 1×10^7 /L 密度接种入 96 孔板, 每孔 150 μL。于 37℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 细胞贴壁后, 将细胞分组: ①对照组: 不做任何处理; ②单纯 t-BHP 组: 采用 60 μmol/L t-BHP 处理 24 h 诱导氧化应激; ③单纯尿酸组: 仅以 200 μmol/L 的尿酸处理; ④尿酸 + t-BHP 组: 加入 200 μmol/L 尿酸后, 再以 60 μmol/L t-BHP 处理 24 h。

1.3 MTT 试验检测细胞存活率

细胞按分组方案处理 24 h 后, 每孔加入 15 μL MTT 试剂, 继续培养 4 h 后取出, 小心吸取各孔中的液体, 加入 100 μL DMSO, 置于摇床 10 min, 使其充分溶解。测定各孔在 490 nm 处的吸光度。并按公

式: 细胞存活率 = 实验组吸光度 / 对照组吸光度, 计算各组细胞存活率。

1.4 细胞内 ROS 的测定

细胞完成处理后, 按照试剂盒说明书进行测定。使用无血清 RPMI1640 培养基洗涤细胞, 加入 10 μmol/L DCFH-DA 探针, 37℃ 孵育 0.5 h。荧光分光光度计检测细胞内荧光水平, 激发波长设为 485 nm, 发射波长设为 533 nm。光密度代表 ROS 水平。

1.5 细胞凋亡的检测

细胞完成处理后, 使用预冷冰 PBS 洗涤细胞, 加入 5 μL Annexin V、10 μL PI, 常温避光静置 10 min 后, 使用流式细胞仪分析细胞凋亡率。

1.6 Nrf2 的 mRNA 水平分析

细胞处理后, 使用 ImProm-II[®] 反转录试剂盒对提取出的 RNA 进行反转录, 以合成 cDNA。反转录体系参照试剂盒提供的说明书。使用 GO Taq[®] qPCR Master Mix 试剂盒对上述合成的 cDNA 进行 PCR 扩增。Nrf2 的上游引物为 5'-ATTGCCTGTAAGTCCTGGTCA-3', 下游引物为 5'-ACTGCTCTTTGGACATCATTTGG-3'; GAPDH 的上游引物为 5'-ACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAG-3', 下游引物为 5'-TTCAAGGGGTCTACATGGCAACTG-3'。反应体系和方案参照试剂盒说明书。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析各样本的 Nrf2 相对表达情况。

1.7 Nrf2 的蛋白水平分析

细胞处理后, 使用核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒分别提取胞浆蛋白和胞核蛋白。蛋白定量分析盒确定蛋白浓度, 以保证每孔上样量为 30 μg。蛋白样本上样缓冲液混匀后煮沸 5 min 后上样。配置 12% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 恒定电泳电压为 110 V, 时间为 1 h。电泳完成后, 裁剪 PVDF 膜并构建转膜装置, 转膜条件为恒流 250 mA, 1.5 h。转膜完成后, 5% 脱脂奶粉室温封闭膜 1 h。分别使用小鼠抗人 Nrf2 抗体 (1:500)、小鼠抗人 GAPDH 抗体 (1:500) 4℃ 孵育 12 h。PBST 洗涤三次以去除未结合的一抗。ECL 化学发光显色试剂盒显色, 仪器扫描并分析蛋白条带。

1.8 统计学分析

数据分析采用 SPSS 17.0 统计学软件。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 多个均数的两两比较采用 LSD 法分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 尿酸可降低 t-BHP 对 HUVEC 的活性抑制

MTT 试验显示,60 $\mu\text{mol/L}$ 的 t-BHP 可以显著降低 HUVEC 的存活率。UA + t-BHP 组的细胞存活率较单纯 t-BHP 组显著升高($P < 0.05$)。而单纯尿酸组的细胞存活率与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$;表 1)。

2.2 尿酸可减轻 t-BHP 诱导的 ROS 积累

荧光分光光度计检测结果发现,单纯 t-BHP 组细胞内 ROS 水平较对照组明显增高($P < 0.05$)。尿酸 + t-BHP 组细胞内 ROS 水平较单纯 t-BHP 组显著降低($P < 0.05$),但仍高于对照组($P < 0.05$;表 1)。

2.3 尿酸可拮抗 t-BHP 诱导的 HUVEC 凋亡

流式细胞术检测发现,单纯 t-BHP 组细胞凋亡率

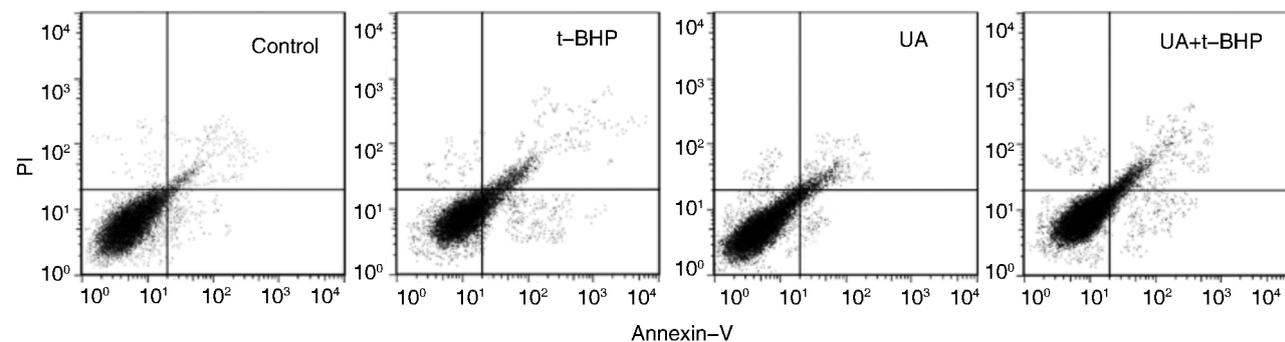


图 1. 尿酸对 t-BHP 诱导的 HUVEC 凋亡的影响

Figure 1. The influence of uric acid on apoptosis of HUVEC induced by t-BHP

2.4 尿酸处理不会影响 HUVEC 的 Nrf2 mRNA 表达,但会增加核内 Nrf2 表达

尿酸处理后,单纯 t-BHP 组、单纯尿酸组及尿酸 + t-BHP 组与对照组比 HUVEC 的 Nrf2 mRNA 表达(0.94 ± 0.15 、 1.08 ± 0.13 及 0.96 ± 0.10 比 1.00)无统计学差异($P > 0.05$),提示尿酸处理不会影响 Nrf2 的总体表达。Western blot 检测结果显示,与对照组和单纯 t-BHP 组相比,尿酸处理使核内 Nrf2 蛋白的表达增多,提示尿酸处理后,入核 Nrf2 增多(图 2 和表 2)。

表 2. 尿酸对 t-BHP 诱导 HUVEC 的 Nrf2 蛋白水平的影响

Table 2. The influence of uric acid on Nrf2 protein level of HUVEC induced by t-BHP

| 分组 | 胞浆 Nrf2 | 胞核 Nrf2 |
|--------------|----------------------|----------------------|
| 对照组 | 0.81 ± 0.13 | 0.29 ± 0.06 |
| 单纯 t-BHP 组 | 0.76 ± 0.09 | 0.28 ± 0.09 |
| 单纯尿酸组 | 0.20 ± 0.03^{ab} | 0.43 ± 0.08^{ab} |
| 尿酸 + t-BHP 组 | 0.25 ± 0.04^{ab} | 0.45 ± 0.07^{ab} |

a 为 $P < 0.05$,与对照组相比;b 为 $P < 0.05$,与单纯 t-BHP 组相比。

($23.8\% \pm 3.1\%$)较对照组($9.2\% \pm 1.6\%$)明显增高,尿酸 + t-BHP 组细胞凋亡率($19.9\% \pm 1.8\%$)较单纯 t-BHP 组显著降低,但仍高于对照组($P < 0.05$);单纯尿酸处理($10.6\% \pm 2.1\%$)不影响细胞凋亡率(图 1)。

表 1. 尿酸对 t-BHP 诱导 HUVEC 生存率及 ROS 积累的影响

Table 1. The influence of uric acid on proliferation inhibition and ROS accumulation of HUVEC induced by t-BHP

| 分组 | 细胞存活率 | ROS 水平 |
|--------------|-------------------------|---------------------|
| 对照组 | 100% | 60.0 ± 8.6 |
| 单纯 t-BHP 组 | $56.2\% \pm 9.0\%^a$ | 81.0 ± 9.1^a |
| 单纯尿酸组 | $96.7\% \pm 11.6\%$ | 63.0 ± 10.6 |
| 尿酸 + t-BHP 组 | $78.5\% \pm 7.6\%^{ab}$ | 75.0 ± 8.2^{ab} |

a 为 $P < 0.05$,与对照组相比;b 为 $P < 0.05$,与单纯 t-BHP 组相比。

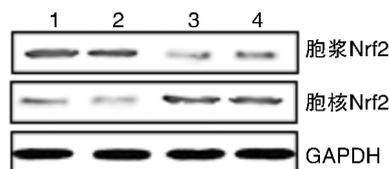


图 2. 尿酸对 HUVEC 的细胞浆和细胞核 Nrf2 表达的影响 1 为对照组,2 为单纯 t-BHP 组,3 为单纯尿酸组,4 为尿酸 + t-BHP 组。

Figure 2. The effect of uric acid on Nrf2 expression of HUVEC in the cytoplasm and nucleus induced by t-BHP

3 讨论

氧化应激过程可产生大量的 ROS,这些 ROS 损伤细胞的机制较为复杂。研究表明 ROS 对脂质、蛋白质、核酸、线粒体等细胞器均能造成影响,并可引起膜通透性改变、凋亡调控相关蛋白异常、DNA 损伤、能量代谢障碍,进而出现细胞功能减弱、丧失以及细胞凋亡^[6,7]。ROS 除了直接损伤细胞外,还可

以增加炎性因子的表达,因为氧化应激的通路和炎性反应中的多个通路有交叉。氧化应激的过程常伴发炎性反应,进一步损伤血管内皮。因而对抗氧化应激是防治血管内皮损伤的重要环节^[8]。

尿酸具有抗氧化性,可以清除羟自由基、超氧阴离子和单态氧,同时防止超氧化物歧化酶的失活,因而尿酸被认为可以对抗氧化应激^[9]。已有研究表明尿酸在神经细胞中具有抗氧化作用^[10],但还少有研究报道尿酸是否能拮抗血管内皮细胞中的氧化应激反应,对尿酸清除自由基等氧化物质的机制也尚未阐明。本研究发现尿酸处理降低了 t-BHP 诱导的细胞内 ROS 增多,减少了血管内皮细胞的凋亡,这说明尿酸是可以保护血管内皮细胞免受氧化损伤的。进一步的研究发现尿酸处理降低血管内皮细胞氧化损伤的机制与 Nrf2 的入核增多有关。Nrf2 主要集中于细胞浆内,与细胞质接头蛋白 Keap1 结合形成复合体^[11]。Keap1 是 Nrf2 负性调控因子,它可介导 Nrf2 泛素化被蛋白酶体降解,从而保持 Nrf2 的低活性生理状态。当发生氧化应激或受到其它化学物质刺激时,Nrf2 通过磷酸化与 Keap1 解耦连,进入细胞核,与相关基因的 ARE 序列结合,ARE 为多种抗氧化酶、钙离子稳态蛋白等共同的启动子序列^[12]。Nrf2 与 ARE 结合后,进而诱导其调控的靶基因表达一系列抗氧化酶,发挥抗氧化应激的作用^[13]。这可以解释本研究观察到尿酸处理后,Nrf2 的核内表达增多,可推测 Nrf2 的核内表达增多进一步上调了一系列抗氧化酶,从而缓解 t-BHP 引起的氧化损伤。但本研究未阐明 Nrf2-ARE 通路下游抗氧化酶的表达变化,未来研究可以关注这些抗氧化酶的表达变化。尿酸提高核内 Nrf2 变化的机制也未有研究阐明,但已有研究表明 Nrf2 的出核和入核与非受体酪氨酸激酶 Src 家族有关,Src 激酶家族被阻断可以增加 Nrf2 的入核^[14]。据此推测,尿酸可能通过调节 Src 的活性来影响 Nrf2 的活性。总之,尿酸可以对抗氧化应激,减轻其造成的血管内皮 ROS 增多以及凋亡,其机制可能与 Nrf2 的入核活化有关。

[参考文献]

[1] Pizzi C, Santarella L, Costa MG, et al. Pathophysiological mechanisms linking depression and atherosclerosis: an overview[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2012, 26(4):

775-782.

- [2] Bargagli E, Olivieri C, Bennett D, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: a review[J]. *Respir Med*, 2009, 103(9): 1 245-256.
- [3] 张强弩,焦宗宪. 香烟烟雾引起的氧化应激在肺泡 II 型上皮细胞损伤中的作用[J]. *医学综述*, 2011, 17(17): 2 568-571.
- [4] 杜利君,蒋兴亮. 尿酸与血管内皮损伤关系的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(2): 204-205.
- [5] Xu Y, Duan C, Kuang Z, et al. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin activates NRF2-ARE-mediated transcriptional response via the ROS-EGFR-PI3K-AKT/MEK-ERK MAP kinase signaling in pulmonary epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72 528.
- [6] Yu SM, Kim SJ. Thymoquinone-induced reactive oxygen species causes apoptosis of chondrocytes via PI3K/Akt and p38 kinase pathway [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2013, 238(7): 811-820.
- [7] 林春喜,林建聪,郭润民,等. 硫化氢通过调控 JNK 通路对抗高糖诱导的心肌细胞氧化应激损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(1): 1-5.
- [8] Yara S, Lavoie JC, Beaulieu J F, et al. Iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation causes epigenetic changes in the antioxidant defense in intestinal epithelial cells: impact on inflammation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63 456.
- [9] 宋青青,于玲范,徐丽丽,等. 不同尿酸浓度对人骨髓间充质干细胞成神经分化的影响(英文)[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(6): 847-852.
- [10] Zhu TG, Wang XX, Luo WF, et al. Protective effects of urate against 6-OHDA-induced cell injury in PC12 cells through antioxidant action[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 506(2): 175-179.
- [11] 王前,闫继红,吴波,等. 白藜芦醇促进 Keap1 蛋白降解的可能机制研究[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(7): 2 991-994.
- [12] 姜敏,高振,李凤森. Keap1-Nrf2-ARE 通路与慢性阻塞性肺疾病氧化/抗氧化失衡关系[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33(2): 165-169.
- [13] Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2011, 76(4): 407-422.
- [14] Kannan S, Jaiswal AK. Low and high dose UVB regulation of transcription factor NF-E2-related factor 2 [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(17): 8421-829.

(此文编辑 许雪梅)