

表没食子儿茶素没食子酸酯对晚期糖基化终产物诱导 HUVEC 凋亡的影响及可能的作用机制

刘婷婷, 孟馨, 金智一, 贾楠

(中国医科大学附属第一医院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 表没食子儿茶素没食子酸酯; 晚期糖基化终产物; 人脐静脉内皮细胞; 细胞凋亡; 氧化应激

[摘要] 目的 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对晚期糖基化终产物(AGE)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)凋亡的影响及可能的作用机制。方法 用 200 mg/L AGE 培养 HUVEC 24 h;以 50、100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 预处理 8 h 后再用 200 mg/L AGE 作用于 HUVEC;对照组用 200 mg/L 牛血清白蛋白作用于 HUVEC 24 h。噻唑蓝比色法测定细胞活性, Hoechst-33258 染色观察 HUVEC 形态变化, Annexin V-FITC/PI 双标记法流式细胞仪检测细胞凋亡, 活性氧检测以反映 HUVEC 内氧化应激水平。结果 与对照组相比, AGE 组 HUVEC 发生染色质固缩、核碎裂等细胞凋亡的形态学改变, 细胞活性降低($P < 0.01$), 细胞凋亡率升高($P < 0.01$), 细胞内活性氧水平增加($P < 0.01$)。EGCG 预处理后能够使细胞凋亡的形态学改变明显减轻, 细胞活性升高($P < 0.01$), 细胞凋亡率减低($P < 0.01$), 活性氧水平降低($P < 0.01$); EGCG 作用呈浓度依赖性。结论 EGCG 呈浓度依赖性抑制 AGE 诱导的 HUVEC 凋亡, 这一作用可能通过抑制 HUVEC 内氧化应激反应而实现。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Epigallocatechin-3-gallate on Advanced Glycosylation End Product-induced Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cell and the Possible Mechanism

LIU Ting-Ting, MENG Xin, JIN Zhi-Yi, and JIA Nan

(Department of Endocrine, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Epigallocatechin-3-gallate; Advanced Glycosylation End Product; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Cell Apoptosis; Oxidative Stress

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on advanced glycosylation end product (AGE) induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and the possible mechanism.

Methods HUVEC was incubated with 200 mg/L AGE for 24 h in the presence or absence of different concentrations of EGCG (50, 100 $\mu\text{mol/L}$) for further 8 h. The same concentration and action time of unmodified bovine serum albumin (BSA) was put into use as control group. Cell viability was evaluated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

Morphological change in HUVEC was observed by Hoechst-33258 staining, and cell apoptosis was analysed by Annexin V-FITC/PI double staining assay. Oxidative stress in HUVEC was evaluated by reactive oxygen species (ROS).

Results Compared with BSA, AGE induced obvious morphological changes of cell apoptosis, such as chromatin pyknosis, karyorrhexis, reduced cell viability ($P < 0.01$), increased apoptosis rate ($P < 0.01$), enhanced oxidative stress reaction ($P < 0.01$). Pretreatment with EGCG (50, 100 $\mu\text{mol/L}$) in a concentration-dependent manner increased cell viability ($P < 0.01$), relieved the morphological changes of cell apoptosis, decreased AGE-induced apoptosis and ROS production ($P < 0.01$).

Conclusion Our findings indicated that EGCG decreased AGE-induced apoptosis in HUVEC via the inhibition of oxidative stress reaction.

[收稿日期] 2014-05-23

[修回日期] 2014-11-04

[基金项目] 辽宁百千万人才工程入选资助项目(2012921033);辽宁省教育厅项目(L2011133);辽宁省自然科学基金(联合基金)(2013021022)

[作者简介] 刘婷婷, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病大血管并发症, E-mail 为 lttatemu91@sina.com。金智一, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病大血管并发症, E-mail 为 wangningmeibaoyu@126.com。通讯作者孟馨, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为糖尿病大血管并发症, E-mail 为 mengxin72@126.com。

大血管并发症是糖尿病患者致死致残的主要原因,其病理基础是动脉粥样硬化,主要与糖尿病患者长期高糖环境下引起的晚期糖基化终产物(advanced glycosylation end product, AGE)的增加有关。AGE 是非酶糖基化反应的终末产物,是蛋白质、脂质或核酸等大分子在没有酶参与的情况下自发的与葡萄糖或其他还原单糖反应所生成的稳定的共价化合物^[1]。研究表明,AGE 的积聚触发氧化应激反应、炎症反应和细胞凋亡反应,从而引起内皮细胞功能障碍^[2]。而内皮细胞功能障碍是血管病变的基础,也是导致糖尿病血管功能障碍的主要原因^[3]。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是黄烷醇类物质即儿茶素的主要成分,亦是茶叶中多酚类物质的主要组成部分,具有很强的抗氧化、抗肿瘤、抗突变等作用^[4-5]。本研究旨在探讨 EGCG 对 AGE 诱导的内皮细胞功能障碍的影响及可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)株 CRL-1730 购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购自于 Hyclone 公司,AGE 购自 Abcam 公司,细胞凋亡 Hoechst 染色试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所,噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国 Sigma 公司。

1.2 人脐静脉内皮细胞培养及分组

HUVEC 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基于 37℃、5% CO₂、100% 湿度孵箱中培养,2 天换液 1 次,3~4 天用胰蛋白酶消化传代 1 次。将细胞接种于培养板内,待细胞贴壁生长至 90% 融合状态,用无血清 RPMI-1640 培养液孵育 12 h 使其同步化。实验分组:(1)对照组:200 mg/L 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)作用 HUVEC 24 h(此组又称 BSA 组);(2)AGE 组:200 mg/L AGE 作用 HUVEC 24 h;(3)50 μmol/L EGCG + AGE 组:50 μmol/L EGCG 预处理 HUVEC 8 h 后再加入 200 mg/L AGE 作用 24 h;(4)100 μmol/L EGCG + AGE 组:100 μmol/L EGCG 预处理 HUVEC 8 h 后再加入 200 mg/L AGE 作用 24 h。

1.3 细胞活性测定

应用 MTT 比色法测定细胞活性。收集对数期细胞,调整细胞浓度,将细胞接种于 96 孔板,每孔加入 100 μL,使每孔细胞数为 8×10^3 个,培养 12 h 后加入上述浓度梯度的药物继续培养 24 h,每孔设置 5 个复孔,同时设置调零孔、对照孔。培养结束后吸去上清液,加入 5 g/L MTT 20 μL,继续培养 4 h,吸去孔内培养液,每孔加入 150 μL DMSO,在摇床上低速震荡 10 min,在酶联免疫检测仪 490 nm 波长处测量各孔吸光度(absorbance, A)值。

1.4 Hoechst-33258 染色检测细胞凋亡

将细胞接种于盖玻片上,收集各组 HUVEC,固定液固定,Hoechst-33258 染色 5 min,荧光显微镜下观察细胞凋亡。

1.5 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡

收集各组 HUVEC,用 PBS 重悬细胞 2 次,细胞悬液中加入 Annexin V-FITC 和 PI 室温下避光孵育 15 min,随即进行流式细胞仪检测。

1.6 活性氧检测

用无血清细胞培养液 RPMI-1640 按 1:1000 比例稀释双氯荧光素(2',7'-dichlorofluorescein-diacetate, DCFH-DA),使其终浓度为 10 μmol/L。收集预处理的细胞,悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中,37℃ 细胞培养箱内孵育 20 min,用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,同时设置阳性对照,于阳性对照孔内加入 Rosup(活性氧阳性对照试剂)刺激细胞 30 min 后进行流式细胞仪检测。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,总体及组间差异采用 One-way ANOVA-LSD 方法进行分析。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞生长情况

倒置相差显微镜下,HUVEC 呈鹅卵石样贴壁排列成单层细胞,细胞胞浆丰富,为梭形或多角形,细胞核清晰可见(图 1)。

2.2 噻唑蓝比色法测定细胞活性

用噻唑蓝比色法分别测定 200 mg/L BSA、200 mg/L AGE 作用 HUVEC 24 h 后的细胞活性,及 50、100 μmol/L EGCG 预处理 8 h 对细胞活性的影响。结果显示,AGE 组较 BSA 组细胞活性明显降低($25.66\% \pm 0.36\%$ 比 $52.33\% \pm 4.94\%$, $P < 0.01$),50 μmol/L EGCG + AGE 组、100 μmol/L EGCG + AGE 组与 AGE

组比较,细胞活性呈浓度依赖性明显升高($32.13\% \pm 5.56\%$ 比 $25.66\% \pm 0.36\%$, $P < 0.05$; $49.74\% \pm 3.93\%$ 比 $25.66\% \pm 0.36\%$, $P < 0.01$;图2)。

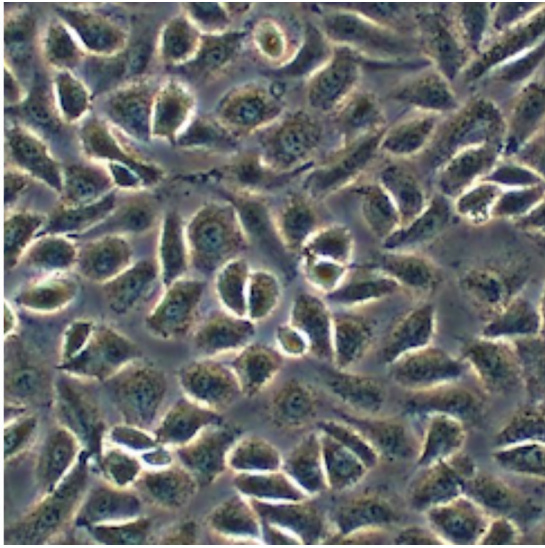


图1. 倒置相差显微镜下人脐静脉内皮细胞形态($\times 100$)
Figure 1. Morphology of HUVEC in inverted phase contrast microscope ($\times 100$)

2.3 Hoechst-33258 染色检测细胞凋亡

应用 Hoechst-33258 染色检测细胞凋亡,200 mg/L AGE 作用 HUVEC 24 h 后,细胞表现出明显的染色质固缩、核碎裂等细胞凋亡的形态学改变;经过 50、100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 预处理后细胞凋亡的形态

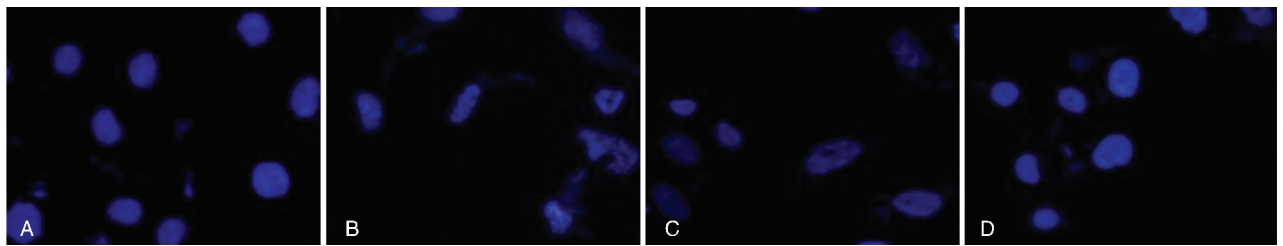


图3. 荧光显微镜下观察 EGCG 预处理后 HUVEC 凋亡的形态学改变 A 为 BSA 组,B 为 AGE 组,C 为 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG + AGE 组,D 为 100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG + AGE 组。

Figure 3. Morphological changes of HUVEC apoptosis after pretreated by EGCG under fluorescence microscope

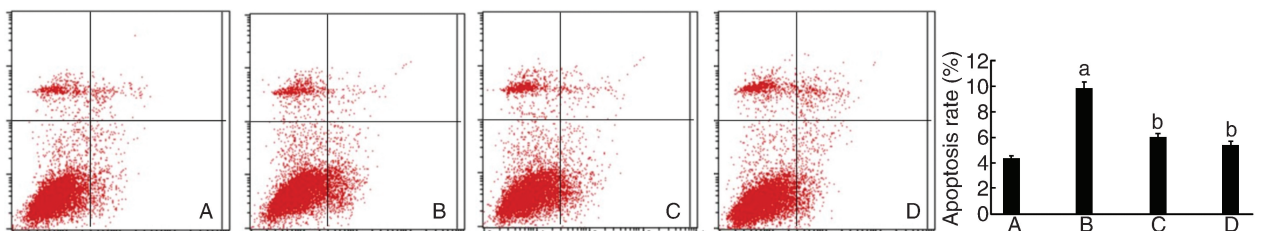


图4. Annexin V-FITC/PI 双标记法检测 EGCG 对 HUVEC 凋亡率的影响 A 为 BSA 组,B 为 AGE 组,C 为 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG + AGE 组,D 为 100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG + AGE 组。a 为 $P < 0.01$,与 BSA 组比较;b 为 $P < 0.01$,与 AGE 组比较。

Figure 4. Apoptosis rate in HUVEC detected by Annexin V-FITC/PI double staining

学改变明显减轻(图3)。结果证明,EGCG 能够减轻 AGE 诱导的细胞凋亡的形态学改变。

2.4 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡

应用流式细胞仪检测 HUVEC 活性,如图(4A、3B)所示,AGE 组与 BSA 组比较,细胞凋亡率明显增加($9.86\% \pm 2.00\%$ 比 $4.34\% \pm 0.70\%$, $P < 0.01$);而用 50、100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 预处理 HUVEC 后,与 AGE 组比较,细胞凋亡率呈浓度依赖性显著降低($5.98\% \pm 1.09\%$ 比 $9.86\% \pm 2.00\%$, $5.40\% \pm 0.92\%$ 比 $9.86\% \pm 2.00\%$,均 $P < 0.01$;图4)。结果证明,EGCG 能够降低 AGE 诱导的细胞凋亡率。

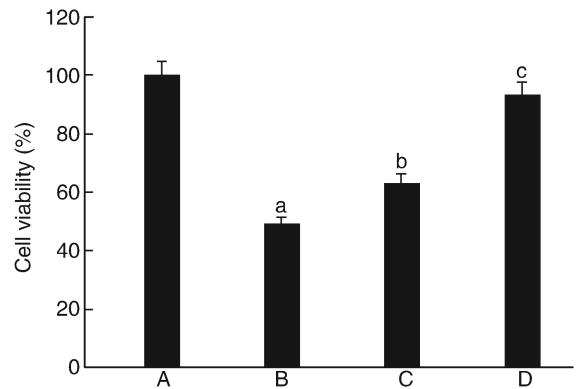


图2. EGCG 对 HUVEC 活性的影响 A 为 BSA 组,B 为 AGE 组,C 为 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG + AGE 组,D 为 100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG + AGE 组。a 为 $P < 0.01$,与 BSA 组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与 AGE 组比较。

Figure 2. Effect of EGCG on HUVEC viability

2.5 活性氧检测

AGE 与细胞内高水平的氧化应激反应有关^[6], AGE 诱导的 ROS 产生过多与细胞凋亡及内皮细胞功能障碍相关^[7]。我们的结果显示:AGE 使 HUVEC 内 ROS 产生明显增多,AGE 组与 BSA 组比较差异显著 ($95.57\% \pm 0.46\%$ 比 $79.55\% \pm 3.75\%$, $P < 0.01$);用 50、100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 预处理 HUVEC 后,与 AGE 组比较,ROS 呈浓度依赖性明显降低 ($82.84\% \pm 2.99\%$ 比 $95.57\% \pm 0.46\%$, $P < 0.05$; $78.55\% \pm 3.74\%$ 比 $95.57\% \pm 0.46\%$, $P < 0.01$;图 5)。

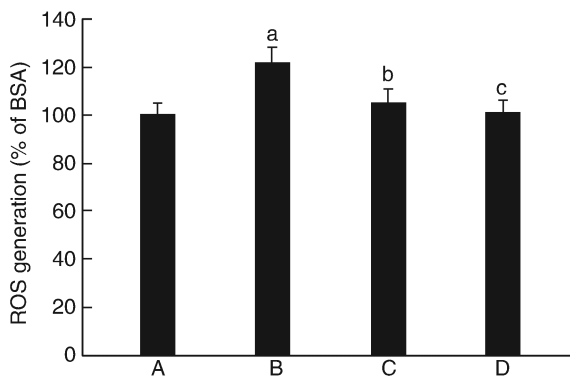


图 5. EGCG 对 AGE 诱导的细胞内氧化应激反应的影响
A 为 BSA 组, B 为 AGE 组, C 为 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG + AGE 组, D 为 100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG + AGE 组。a 为 $P < 0.01$, 与 BSA 组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 AGE 组比较。

Figure 5. Effect of EGCG on AGE induced intracellular levels of oxidative stress reaction

3 讨论

血管内皮被认为是调节血管紧张度和结构功能的主要组成部分,并维持血管舒张和收缩的平衡,但这种平衡能被很多内源性或外源性因素所破坏,如 AGE、高血糖、低密度脂蛋白氧化物及许多炎症因子,从而导致内皮细胞损伤^[8]。

AGE 是影响内皮细胞功能的主要因素,可通过诱导细胞凋亡、触发炎症及氧化应激反应、调控病理的信号传导通路来诱导内皮细胞功能障碍^[9]。因此减少 AGE 诱导的内皮损伤可能是治疗内皮细胞功能障碍的有效办法。本研究通过细胞染色从形态学上证实 AGE 能够诱导 HUVEC 产生染色质固缩、核碎裂等凋亡的形态学改变,Annexin V-FITC/PI 双标记法流式细胞仪检测发现 AGE 与对照组相比能够明显增加细胞凋亡率。AGE 诱导的氧化应激反应在内皮细胞损伤的病理生理反应中起到重要作用,这可能与 ROS 的激活相关。糖基化

终产物受体 (receptor for AGE, RAGE) 可被 AGE 激活^[10],过去的研究证明,AGE-RAGE 相互作用能够激活 ROS,适量的 ROS 对维持细胞正常起到正面的影响作用,然而过量的 ROS 能够对蛋白质造成氧化性损伤最终导致细胞凋亡^[11-12]。通过细胞内 ROS 的检测发现,AGE 使细胞内 ROS 水平明显提高,从而推测 AGE 通过此机制参与了细胞的凋亡。

众所周知,EGCG 是一种具有抗氧化、抗肿瘤、清除氧自由基功能的生物活性物质,然而其机制尚未十分清楚。本研究证实 EGCG 能够减轻 AGE 诱导的细胞凋亡的形态学改变,降低细胞凋亡率。并通过对细胞内 ROS 的检测证实,EGCG 作用后 ROS 水平呈现明显降低,由此证实 EGCG 能够通过降低细胞内 ROS 水平,减轻氧化应激反应来抑制细胞凋亡。

越来越多的证据证明,AGE 与 RAGE 相互作用诱导 ROS 产生,进而激活核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB)^[13]。NF- κB 是重要的核转录因子,在许多外界刺激介导的细胞信息的转录调控中起重要作用,参与多种基因的表达和调控。在未受刺激细胞,NF- κB 以其抑制蛋白 I κB (inhibitory κB) 结合的形式存在于细胞质内,多种刺激因素如紫外线、炎症因子、内毒素等都可以使 I κB 被 I κB 激酶降解,从而释放和激活 NF- κB ,激活的 NF- κB 进入细胞核,与 DNA 结合,诱导特异 mRNA 产生,最后转录产生和释放各种细胞因子。许多刺激因素激活 NF- κB 的同时能诱导氧化应激,一些证据表明 ROS 可以激活 NF- κB ,而一些抗氧化剂能够抑制 NF- κB 的活化^[14]。大量研究证明,绿茶中的儿茶素尤其是 EGCG 能够清除氧自由基达到抗氧化目的,并能抑制 NF- κB 的活化^[15-16]。

本实验证实 EGCG 能够明显减轻 AGE 诱导的细胞凋亡的形态学改变,增加细胞活性,降低细胞凋亡率,减少细胞内 ROS 产生,从而证实 EGCG 能够减轻细胞内氧化应激反应,这可能是 EGCG 抑制细胞凋亡的机制所在。本实验未对 EGCG 抑制 AGE 诱导的细胞凋亡的深入机制及涉及的信号传导通路进行研究,但通过 EGCG 可降低 ROS 产生推测,EGCG 可能是通过 NF- κB 信号传导通路来抑制 AGE 诱导的细胞凋亡,这需以后进一步实验证实。

[参考文献]

- [1] Takeuchi M, Iwaki M, Takino J, et al. Immunological detection of fructose-derived advanced glycation end-products [J]. Lab Invest, 2010, 90(7): 1 117-127.
- [2] Jiang J, Chen P, Chen J, et al. Accumulation of tissue ad-

- vanced glycation end products correlated with glucose exposure dose and associated with cardiovascular morbidity in patients on peritoneal dialysis[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 224(1): 187-194.
- [3] Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury [J]. *Circulation*, 2006, 114 (6): 597-605.
- [4] Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. critical reviews in food science and nutrition[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2003, 43(1): 89-143.
- [5] Hollman PC, Feskens EJ, Katan MB. Tea flavonols in cardiovascular disease and cancer epidemiology[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999, 220(4): 198-202.
- [6] Torreggiani M, Liu H, Wu J, et al. Advanced glycation end product receptor-1 transgenic mice are resistant to inflammation, oxidative stress, and post-injury intimal hyperplasia[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(4): 1 722-732.
- [7] Wagener FA, Dekker D, Berden JH, et al. The role of reactive oxygen species in apoptosis of the diabetic kidney [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(12): 1 451-458.
- [8] Versari D, Daghini E, Viridis A, et al. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157 (4): 527-536.
- [9] Han SH, Kim YH, Mook-Jung I. RAGE: the beneficial and deleterious effects by diverse mechanisms of actions [J]. *Mol Cells*, 2011, 31(2): 91-97.
- [10] Ojima A, Matsui T, Maeda S, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) inhibits signaling pathways of advanced glycation end products (AGE) in endothelial cells via its antioxidative properties [J]. *Horm Metab Res*, 2012, 44(7): 501-505.
- [11] Brownlee M. Preventing kidney cell suicide [J]. *Nat Med*, 2007, 13(11): 1 284-285.
- [12] Yamagishi S, Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2010, 3(2): 101-108.
- [13] Zhang X, Song Y, Han X, et al. Liquiritin attenuates advanced glycation end products-induced endothelial dysfunction via RAGE/NF- κ B pathway in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 374 (1-2): 191-201.
- [14] Orr AW, Hahn C, Blackman BR, et al. P21-activated kinase signaling regulates oxidant-dependent NF-kappa B activation by flow [J]. *Circ Res*, 2008, 103 (6): 671-679.
- [15] Pan MH, Lin-Shiau SY, Ho CT, et al. Suppression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappa B activity by theaflavin-3,3'-digallate from black tea and other polyphenols through down-regulation of I kappa B kinase activity in macrophages [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59 (4): 357-367.
- [16] Nomura M, Ma W, Chen N, et al. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced NF-kappa B activation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate and theaflavins [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21 (10): 1 885-890.

[此文编辑 陈如意(实习)/曾学清]