

巴西苏木素调控自噬对高糖诱导血管内皮细胞损伤的影响

刘 婷¹, 佟晓哲²

(1. 锦州医科大学, 辽宁省锦州市 121000; 2. 锦州医科大学附属第一医院中医科, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] 巴西苏木素; 糖尿病大血管病变; 自噬

[摘要] **目的** 探讨巴西苏木素对高糖诱导血管内皮细胞损伤的保护作用及其可能机制, 为中药苏木治疗糖尿病大血管病变提供实验依据。**方法** 培养人脐静脉内皮细胞, 采用 MTT 法确定巴西苏木素浓度, 高糖诱导损伤后加入巴西苏木素, 透射电镜观察自噬体; 小管形成实验观察血管生成; 蛋白免疫印迹检测自噬相关基因 BECLIN1、LC3-II、p62 蛋白的表达。**结果** 选定用于实验的巴西苏木素浓度为 15 mg/L; 透射电镜显示高糖组细胞中自噬体数量较对照组少, 而巴西苏木素组细胞中自噬体数量较对照组和高糖组多; BECLIN1、LC3-II 的蛋白表达在高糖组较对照组低, 在巴西苏木素组较高糖组高 ($P < 0.05$); p62 的蛋白表达在高糖组较对照组高, 在巴西苏木素组较对照组和高糖组低 ($P < 0.05$)。**结论** 巴西苏木素可能通过调控自噬而对高糖诱导血管内皮细胞损伤发挥保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of autophagy on high glucose induced injury of vascular endothelial cells in Brazilin

LIU Ting¹, TONG Xiao-Zhe²

(1. Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[KEY WORDS] Brazilin; Diabetic macrovascular disease; Autophagy

[ABSTRACT] **Aim** To study the protective effect and possible mechanism of Brazilin on high glucose induced vascular endothelial cell injury, and to provide experimental basis for the treatment of diabetic macrovascular disease with traditional Chinese medicine hematoxylin. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured, the concentration of Brazilin was determined by MTT method, high glucose induced injury after joining Brazilin, autophagy body was observed by transmission electron microscopy (TEM), tubule formation test was used to observe angiogenesis, the protein expression of autophagy related genes BECLIN1, LC3-II and p62 was detected by Western blot. **Results** The concentration of Brazilin was 15 mg/L. Transmission electron microscopy showed that the number of autophagic cells in high glucose treatment group was less than that in normal group, but the number of autophagy in the cells of Brazilin group was higher than that in normal group and high glucose treatment group. The expression of BECLIN1 and LC3-II protein in high glucose treated group was lower than that in normal group, the expression of BECLIN1 and LC3-II protein in Brazilin group was higher than that in high glucose treatment group ($P < 0.05$); the expression of p62 protein in high glucose treated group was higher than that in normal group, the expression of p62 protein in Brazilin group was lower than that in normal group and high glucose treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion** Brazilin may play a role of protection in high glucose induced vascular endothelial cell injury through regulating autophagy.

糖尿病大血管病变是糖尿病主要并发症之一, 近年来其发病率在我国已呈快速上升趋势, 高糖诱

导“内皮损伤学说”是糖尿病大血管并发症发生的关键^[1-3]。因此保护血管内皮, 对防治糖尿病血管

[收稿日期] 2016-11-04

[修回日期] 2017-02-24

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(2015020343)

[作者简介] 刘婷, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合防治内分泌疾病, E-mail 为 906071148@qq.com。通讯作者佟晓哲, 医学博士, 主任医师, 研究方向为中西医结合防治内分泌疾病, E-mail 为 27286557@qq.com。

并发症具有重要理论意义。自噬是细胞在应激情况下用来维持内环境稳定和存活的重要机制,对血管内皮细胞和平滑肌细胞起到保护的作用。巴西苏木素作为中药苏木的主要有效成分,前期实验中已证实其可用于糖尿病大血管病变的治疗^[4],本研究通过细胞培养、透射电镜观察自噬体、小管生成实验、免疫印迹等方法探讨巴西苏木素调控高糖诱导的血管内皮细胞自噬的作用及机制,为中药苏木治疗糖尿病大血管病变提供新靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株(ScienCell公司);巴西苏木素纯品(四川维克奇生物科技有限公司);DMEM F-12 培养液、胎牛血清、青/链霉素双抗(HyClone公司);MTT 试剂盒(碧云天公司);Mateigel 基质胶(BD公司);兔抗人 Beclin1 抗体、兔抗人 p62 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);兔抗人 LC3 多克隆抗体(CST公司)。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养

将冻存管取出,置于 37℃ 水浴至无冰,立即将细胞液转移入试管中,离心去上清,加入 2~3 mL 细胞培养液轻轻混匀,在细胞培养皿中加入 10 mL 培养液,将混匀的细胞悬液滴加至培养液中,吹吸混匀,置于 37℃、0.5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后换液,传代,传至第 3~4 代时用于实验。

1.3 实验分组

对照组:细胞正常培养至单层 70% 左右;高糖组:待培养皿中细胞生长至单层 70% 左右时,每皿加入浓度为 33.3 mmol/L 葡萄糖溶液 100 μ L,建立高糖诱导人脐静脉内皮细胞损伤体外模型;巴西苏木素组:待培养皿中细胞生长至单层 70% 左右时,每皿加入浓度为 33.3 mmol/L 葡萄糖溶液 100 μ L,并将 DMEM F-12 培养液换成含 15 mg/L 的含药培养液,继续培养。

1.4 MTT 法确定巴西苏木素药物浓度

将细胞铺板接种于 96 孔板,调整细胞密度为 5×10^6 个/L,每孔 200 μ L 细胞悬液,设培养基空白组和细胞对照组,边缘孔用无菌磷酸缓冲盐溶液(PBS)填充,铺板后 37℃ 孵育过夜。添加巴西苏木素浓度为 2.5、5、10 及 15 mg/L 的含药培养基培养细胞,24 h 后以上每孔加入 10 μ L MTT 溶液,37℃ 孵育 4 h,每孔各加入 100 μ L Formazan 溶解液,在细胞培养箱内继续孵育,直至在普通光学显微镜下

观察发现 Formazan 全部溶解,于紫外分光光度计 570 nm 测定吸光度。采用 SPSS 17.0 统计软件,组间两两比较采用 *t* 检验,并确定最佳药物浓度,重复实验 3 次。

1.5 透射电镜观察细胞中的自噬结构

每 10 mm 培养皿中加 1.5 mL 0.25% 胰酶消化细胞,2.5 mL 培养液终止消化,1500 r/min 离心 5 min,弃上清,加 1 mL 预冷 PBS 吹打均匀,转入 1.5 mL EP 管,离心 5 min,弃上清,留沉淀。细胞收集后,固定、脱水、包埋、切片,采用日本日立公司 H-7650 透射电镜观察。

1.6 小管形成实验观察血管生成

4℃ 冰箱预冷枪头、培养板等 24 h,将融化后的 Matrigel 基质胶加入 96 孔板,每孔 60 μ L,37℃ 孵育 1 h。96 孔板中,每孔接种 100 μ L 密度为 1×10^7 /L 细胞悬液,分为对照组和巴西苏木素组,巴西苏木素组加入浓度为 15 mg/L 的含药培养基,每组设 3 个复孔。分别于 2 h、4 h、8 h 倒置显微镜下观察内皮细胞形成小管样结构的情况,并拍照。

1.7 Western blot 检测 Beclin1、LC3-II 和 p62 的蛋白表达

裂解细胞提取蛋白,定量后煮沸 5 min 变性,半干转膜法将蛋白条带转至 PVDF 膜。常温封闭 2 h, TBST 洗膜,一抗工作液(Beclin1 为 1:500, LC3-II 为 1:1000, p62 为 1:500) 4℃ 过夜, TBST 洗膜,常温孵育二抗 1 h, TBST 洗膜,显影并分析各条带灰度。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组两两比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 巴西苏木素药物浓度的确定

各浓度组间有统计学差异($P < 0.05$)。巴西苏木素浓度为 15 mg/L 时,增殖率最高且细胞毒性小,因此实验选择 15 mg/L 巴西苏木素干预 24 h(图 1)。

2.2 细胞中的自噬结构

高糖组细胞中自噬体数量较对照组少,而巴西苏木素组细胞中自噬体数量较对照组和高糖组多,结果表明高糖能够明显抑制血管内皮细胞的自噬活性(图 2)。

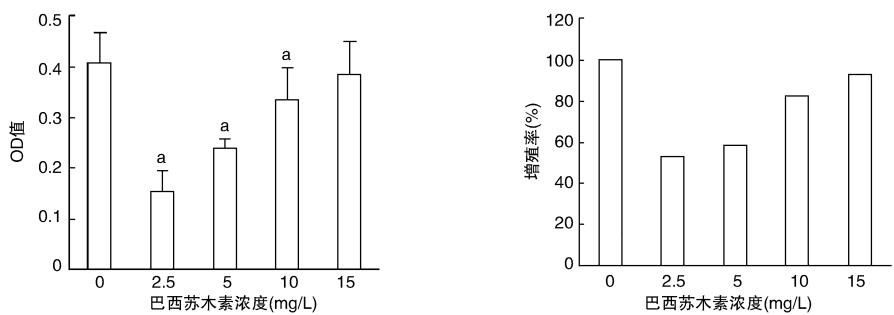


图 1. MTT 法确定巴西苏木素药物浓度 a 为 $P<0.05$, 与 0 mg/L 巴西苏木素组比较。

Figure 1. MTT method was used to determine Brazilin drug concentration

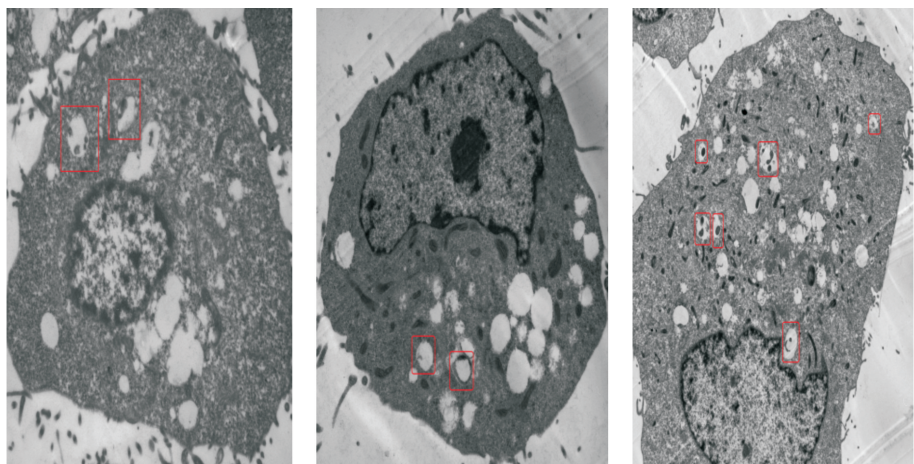


图 2. 透射电镜下各组自噬体数量 (12000×) 从左到右依次为对照组、高糖组、巴西苏木素组。红色方框指示的为自噬体。

Figure 2. Transmission electron microscopy showed autophagy body number (12000×)

2.3 巴西苏木素促进细胞血管生成

巴西苏木素组细胞在培养 8 h 后形成明显的小管样结构,且小管间交联成网,小管样结构显著多于对照组,说明巴西苏木素促进内皮细胞形成小管(图 3)。

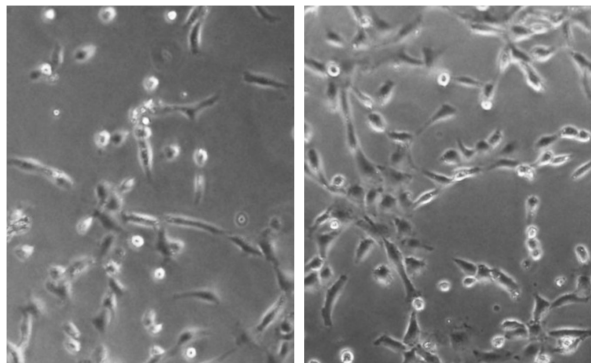


图 3. 显微镜下细胞小管生成情况 (200×) 从左到右依次为对照组、巴西苏木素组。

Figure 3. The number of autophagic bodies in each group under transmission electron microscope (200×)

2.4 Beclin1、LC3- II 和 p62 的蛋白表达

Beclin1、LC3- II 的蛋白表达在高糖组低于对照

组,在巴西苏木素组高于高糖组,且 Beclin1 增高较为显著。p62 的蛋白表达在高糖组高于对照组,在巴西苏木素组低于对照组和高糖组 ($P<0.05$;图 4)。

3 讨 论

业已证实高糖引起的血管内皮细胞损伤是糖尿病血管并发症发生的重要病理基础,探索高糖引发血管内皮细胞损伤的作用机制及其防治措施对于控制糖尿病大血管并发症具有十分重要的现实意义。自噬是指细胞将受损变性的蛋白质以及损伤细胞器运输到溶酶体进行消化降解,以实现细胞本身的代谢需要和相关细胞器的更新,并且以胞质内出现自噬体为特征的细胞自我消化过程,是细胞在应激情况下用来维持内环境稳定和存活的重要机制^[5]。在糖尿病血管并发症的发病过程中,自噬对血管内皮细胞和平滑肌细胞起到了保护的作用。自噬受一系列基因的调控,Beclin1 是自噬体形成过程中所必需的分子,可介导自噬蛋白定位于吞噬泡,继而调控自噬体的形成与成熟;LC3- II 与 p62 是细胞内自噬的标记物^[6]。因此,本研究通过检测自

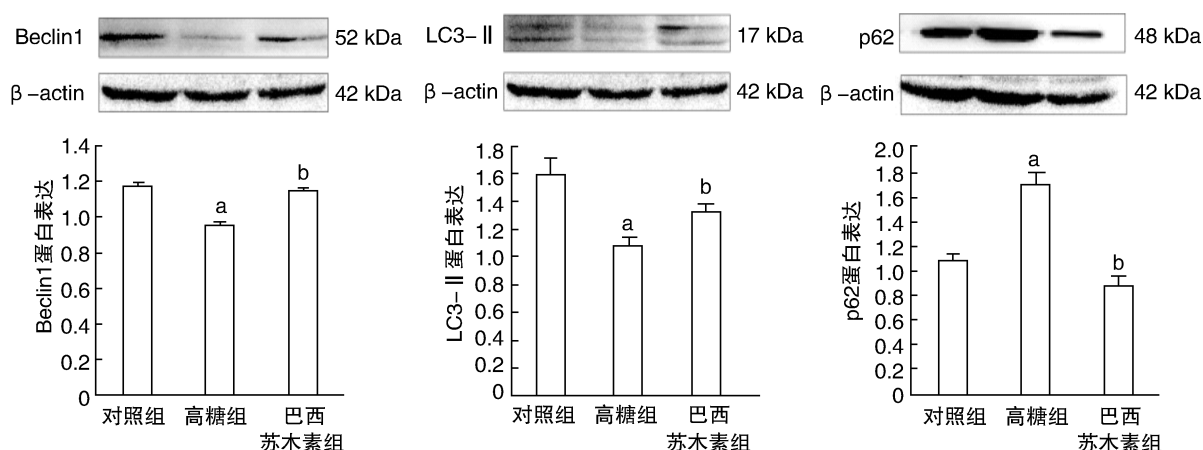


图 4. Beclin1、LC3-II 和 p62 的蛋白表达 ($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与高糖组比较。

Figure 4. The expression of Beclin1, LC3-II and p62 protein ($n=3$)

噬相关分子的蛋白表达亦可反映自噬活性的变化。

中医认为,糖尿病大血管并发症相当于“血痹”、“脱疽”等疾病。燥热灼伤津液,炼液为痰,痰浊内生,与瘀血共结于脉络,而见“血痹、脱疽”,治法为活血化痰祛瘀。苏木为豆科云实属植物,具有活血散结、镇静止痛等功效。巴西苏木素属于高异黄酮类化合物的衍生物,是苏木的主要有效成分,对大鼠离体动脉、人脐静脉上皮细胞和肠系膜动脉具有血管舒张作用,其作用机制与 NO 的释放和 cGMP 合成有关^[7-9]。我们在前期研究中发现巴西苏木素可在大鼠的血液中有表达^[10]。迄今为止,关于高糖对血管内皮细胞自噬活性的影响及其在诱导血管内皮细胞损伤中的作用研究报道较为少见。本研究在高糖诱导人脐静脉内皮细胞损伤体外模型中观察高糖对人脐静脉内皮细胞自噬活性的影响,结果发现,高糖处理的细胞中自噬体数量以及自噬正调控相关基因 Beclin1 和自噬标志性分子 LC3-II 的蛋白表达水平较正常对照细胞明显降低,负调控相关基因 p62 较正常对照细胞明显增加,提示高糖对血管内皮细胞的自噬活性同样具有明显抑制作用。

综上所述,本研究证实了巴西苏木素对高糖诱导的血管内皮细胞损伤具有保护作用,揭示了高糖能抑制血管内皮细胞自噬活性,并与其诱导血管内皮细胞损伤作用密切相关。这不仅对揭示自噬在高糖诱导血管内皮细胞损伤中的作用具有重要理论意义,亦为以自噬为靶点防治糖尿病大血管并发症提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] Sena CM, Pereira AM, Seica R. Endothelial dysfunction: A major mediator of diabetic vascular disease [J]. *Biochim*

Biophys Acta, 2013, 1832(12): 2 216-231.

- [2] Francesco P, Beckman JA, Creager MA, et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I [J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(31): 2 436-443.
- [3] Gilbert RE. Endothelial loss and repair in the vascular complications of diabetes: pathogenetic mechanisms and therapeutic implications [J]. *Circ J*, 2013, 77(4): 849-856.
- [4] Tong XZ, Zhu H, Shi Y, et al. An LC/MS/MS method for simultaneous quantitation of two homoisoflavones: protosapannin B and brazilin with hypoglycemic activity in rat plasma and its application to a comparative pharmacokinetic study in normal and streptozotocin-treated rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(2): 682-690.
- [5] 李 靛, 谢 巍. 我国动脉粥样硬化基础研究近三年进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(11): 1 182-188.
- [6] 张启梅, 王颖超. 沙棘黄酮调控动脉粥样硬化大鼠自噬相关蛋白的表达 [J]. *云南中医学院学报*, 2014, 37(4): 13-16.
- [7] Hu CM, Kang JJ, Lee CC, et al. Induction of vasorelaxation through activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by brazilin [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 468(1): 37-45.
- [8] Xie YW, Ming DS, Xu HX, et al. Vasorelaxing effects of *Caesalpinia sappan* involvement of endogenous nitric oxide [J]. *Life Sci*, 2000, 67(15): 1 913-918.
- [9] Sasali Y, Suzuki M, Matsumoto T, et al. Vasorelaxant activity of *Sappan Lignum* constituents and extracts on rat aorta and mesenteric artery [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(9): 1 555-560.
- [10] Tong X, Lv G, Huang J, et al. Gr-1+CD11b+myeloid cells efficiently home to site of injury after intravenous administration and enhance diabetic wound healing by neoangiogenesis [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(6): 1 194-202.

(此文编辑 文玉珊)