

## 抗衰老 Klotho 蛋白对过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用及其机制

王均鹏<sup>1</sup>, 孟丽霞<sup>2</sup>, 潘黎明<sup>1</sup>, 吕云波<sup>1</sup>, 李俊明<sup>1</sup>

(三峡大学 1.人民医院心血管内科, 2.第一临床医学院宜昌市中心人民医院心血管内科, 湖北省宜昌市 443000)

[关键词] Klotho 蛋白; 过氧化氢; 人脐静脉内皮细胞; 氧化损伤

[摘要] **目的** 研究抗衰老 Klotho 蛋白对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)氧化损伤的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的影响及其作用机制。**方法** 用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVEC 构建氧化损伤模型。将 HUVEC 设置对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组、不同浓度(1、10、100 μg/L)Klotho 蛋白组、丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(AKT)作用组。噻唑蓝法检测细胞存活率;特定试剂盒检测乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量;酶联免疫吸附法检测一氧化氮(NO)、内皮素 1(ET-1)、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)、核因子 κB(NF-κB)的含量;SA-β-半乳糖苷酶染色检测细胞衰老情况;流式细胞术检测活性氧(ROS)和细胞凋亡;Western blot 检测 Bcl-2、Bax、NF-κB p65 及 p-AKT 的表达变化。**结果** 与对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞存活率显著下降,LDH、MDA 含量显著增加,SOD、GSH 活性显著下降,NO 含量下降,ET-1、ICAM-1、VCAM-1、NF-κB、细胞衰老率、ROS 含量和细胞凋亡率显著增加,Bax 蛋白表达上升而 Bcl-2 蛋白表达显著降低,NF-κB p65 磷酸化水平显著升高而 p-AKT/AKT 水平下降(均  $P < 0.05$ )。在不同浓度 Klotho 蛋白组,细胞存活率逐渐上升,LDH、MDA 含量逐渐下降,SOD、GSH 活性随之上升,NO 含量上升,ET-1、ICAM-1、VCAM-1、NF-κB、细胞衰老率、ROS 含量和细胞凋亡率逐渐下降,Bax 蛋白、NF-κB p65 磷酸化水平逐渐下降,Bcl-2 蛋白、p-AKT/AKT 水平逐渐上升(均  $P < 0.05$ )。AKT 作用组上述指标的检测结果显示与 Klotho 蛋白组相反。**结论** 抗衰老 Klotho 蛋白能提升 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 HUVEC 的存活率,增强细胞功能和抗氧化作用,减少细胞炎症反应、衰老和凋亡,其通过抑制 Bax、NF-κB p65 及促进 Bcl-2、p-AKT/AKT 而发挥作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Protective effect of anti-aging Klotho protein on hydrogen peroxide induced oxidative damage in human umbilical vein endothelial cells and its mechanism

WANG Jun-Peng<sup>1</sup>, MENG Li-Xia<sup>2</sup>, PAN Li-Ming<sup>1</sup>, LV Yun-Bo<sup>1</sup>, LI Jun-Ming<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, People's Hospital, 2. Department of Cardiology, Central People's Hospital, China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443000, China)

[KEY WORDS] Klotho protein; Hydrogen peroxide; Human umbilical vein endothelial cell; Oxidative damage

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of anti-aging Klotho protein on oxidative damage induced by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and its mechanism. **Methods** The oxidative damage model was built by HUVEC treated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. HUVECs were divided into control group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damage group, different concentrations (1, 10, 100 μg/L) Klotho protein groups and serine-threonine protein kinase (AKT) action group. Cell survival rate was detected by methyl thiazolyl tetrazolium assay. Lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and reduced glutathione (GSH) content were detected by specific Kit. The content of nitric oxide (NO), endothelin-1 (ET-1), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and nuclear factor-kappa B (NF-κB) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. SA-beta galactosidase staining was used to detect cell senescence. Reactive oxygen species (ROS) and cell apoptosis were determined by flow cytometry. Expression of Bcl-2, Bax, NF-κB p65 and p-AKT were detected by Western blot. **Re-**

[收稿日期] 2016-11-07

[修回日期] 2017-01-12

[基金项目] 宜昌市医疗卫生科技计划项目(A16-301-17)

[作者简介] 王均鹏, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管病基础与临床, E-mail 为 wangjunpengsci@163.com。通讯作者李俊明, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管病, E-mail 为 wjp7811@126.com。

**sults** Compared with the control group, the survival rate of HUVEC was significantly decreased, the contents of LDH and MDA were significantly increased, the activities of SOD and GSH were significantly decreased, the ET-1, ICAM-1, VCAM-1, NF- $\kappa$ B, ROS, cell senescence rate and apoptosis rate were significantly increased, the expression of Bax protein and phosphorylation level of NF- $\kappa$ B p65 were significantly increased but Bcl-2 protein and p-AKT/AKT decreased, in  $H_2O_2$  damage group (all  $P < 0.05$ ). In different concentrations of Klotho protein groups, the cell survival rate was gradually increased, the contents of LDH and MDA were gradually decreased, the activities of SOD and GSH were increased, NO content was increased, the ET-1, ICAM-1, VCAM-1, NF- $\kappa$ B, ROS, cell senescence rate and apoptosis rate were gradually decreased, the Bax protein and phosphorylation level of NF- $\kappa$ B p65 were gradually decreased, the Bcl-2 protein and p-AKT/AKT were gradually increased (all  $P < 0.05$ ). The results of the above indexes in AKT action group were contrary to those of Klotho protein groups. **Conclusions** Anti-aging Klotho protein can enhance the HUVEC survival rate after  $H_2O_2$  induced oxidative damage, promote cell function and antioxidation, reduce cell inflammatory reaction, aging and apoptosis. It plays roles through inhibiting Bax, NF- $\kappa$ B p65 and promoting Bcl-2, p-AKT/AKT.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是多种心脑血管疾病的主要诱因之一,它已严重威胁到中老年人的生命健康<sup>[1]</sup>。目前大量研究表明<sup>[2]</sup>,血管内皮细胞受到氧化损伤是多种心血管疾病尤其 As 形成和发展的主要病理原因,因此临床上较多开展针对血管氧化损伤保护和修复因素的研究以防治 As 等心血管疾病。Klotho 蛋白被认为是一种抗衰老调节激素,对多种靶器官发挥重要生理调节效应。Klotho 基因缺失的动物会明显表现如人类衰老的症状,包括提前引发 As 等心血管疾病。Mitobe 等<sup>[3]</sup>在对小鼠肾脏内髓集合管 3 细胞的培养中发现,在过氧化氢(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )诱导的氧化应激状态下,Klotho 蛋白表达降低而凋亡细胞增加,提示 Klotho 蛋白具有抗氧化和抗凋亡作用。但目前针对抗衰老 Klotho 蛋白在血管内皮细胞氧化损伤及修复中发挥的作用及其机制尚未见研究。本课题利用  $H_2O_2$  氧化损伤人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)构建血管内皮细胞氧化损伤模型,观察不同浓度 Klotho 蛋白对氧化损伤血管内皮细胞的影响,从抗氧化应激和细胞凋亡方面探讨作用机制,并揭示其是否通过丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine protein kinase, AKT)信号通路发挥作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

HUVEC 购自中国科学院上海细胞库;RPMI-1640 细胞培养基、胎牛血清、含 0.25% EDTA 的胰酶购自美国 Hyclone 公司;重组人源 Klotho 蛋白、噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砷、双氢罗丹明 123 购自美国 Sigma 公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialde-

hyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒购自南京建成生物公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)、内皮素 1(endothelin-1, ET-1)酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自武汉华美生物公司;细胞间黏附分子 1(inter-cellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、核因子  $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) ELISA 检测试剂盒购自厦门慧嘉生物科技公司;膜联蛋白 V/碘化丙啶(Annexin-V/PI)细胞凋亡检测试剂盒购自北京碧云天生物公司;多克隆兔抗人 AKT、p-AKT、NF- $\kappa$ B p65、Bcl-2、Bax 及  $\beta$ -actin 抗体购自北京博奥森生物公司;HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗、ECL 化学发光试剂购自中杉金桥公司。

### 1.2 实验分组及 MTT 法检测 HUVEC 存活率

复苏 HUVEC,在含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 细胞培养基中培养,置于含 5%  $CO_2$ 、37℃的培养箱中,连续传代 2 次使细胞生长活力一致。经过前期预实验,用含 100  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  的细胞培养基体外培养贴壁 70%的 HUVEC 4 h,构建血管内皮细胞氧化损伤模型。HUVEC 经过一致氧化损伤后,分组为: $H_2O_2$  损伤组,1、10、100  $\mu$ g/L Klotho 蛋白组,AKT 作用组(同时加入 100  $\mu$ g/L Klotho 蛋白和 1:1000 的 AKT 抑制剂),同时设置对照组(无  $H_2O_2$  损伤)。将各组处理细胞接种于 96 孔板中,分别作用 24、48 h,用 MTT 法检测各组 HUVEC 经不同诱导处理后在  $H_2O_2$  作用下的细胞存活率。HUVEC 存活率 =  $OD_{570\text{ nm}}$ (处理组)/ $OD_{570\text{ nm}}$ (对照组)  $\times 100\%$ 。

### 1.3 HUVEC 抗氧化指标测定

将各组 HUVEC 接种于 6 孔板,经过相同诱导处理 24 h 后,分别提取细胞培养上清液,于 -20℃ 中冻存,按照试剂盒说明方法分别检测各组细胞中

LDH、MDA、SOD、GSH 含量变化。

#### 1.4 ELISA 测定 HUVEC 功能因子和炎症因子

按照分组方法诱导处理 HUVEC, 收集各组细胞上清培养液, 按照文献[3]方法制作标准曲线, 分别检测各组 HUVEC 在 Klotho 蛋白诱导处理后分泌 NO、ET-1 功能因子的含量。收集各组细胞, 分别加入  $5 \times 10^{-4}$  L 的总蛋白提取液, 冰上作用 5 min 后, 12000 r/min 离心, 收集各组 HUVEC 中总蛋白, 测定蛋白浓度, ELSIA 测定各组 HUVEC 中 ICAM-1、VCAM-1、NF- $\kappa$ B 等炎症因子的含量。

#### 1.5 SA- $\beta$ -半乳糖苷酶染色检测 HUVEC 衰老

各组 HUVEC 接种于 24 孔板中, 100  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  诱导氧化损伤细胞 4 h, 经过不同浓度 Klotho 蛋白诱导处理后, 用 PBS 洗涤 1 次, 加 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗涤 1 次, 加入 SA- $\beta$ -半乳糖苷酶染色液, 37 $^{\circ}$ C 染色 12 h, 显微镜下观察各组 HUVEC 衰老情况, 计数各组 HUVEC 衰老细胞数, 细胞衰老阳性率 = (单位视野下诱导处理组衰老细胞数 / 未处理对照组衰老细胞数)  $\times 100\%$ 。

#### 1.6 流式细胞术检测 HUVEC 中活性氧和细胞凋亡变化

各组 HUVEC 经过分组诱导处理 24 h 后, 消化、离心, 收集细胞。用 PBS 重悬细胞并洗涤 2 次, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^9$  个/L, 在各组细胞中加入 1  $\mu$ mol/L 的双氢罗丹明 123, 室温避光孵育 1 h; 细胞中产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 可以将双氢罗丹明 123 氧化成罗丹明 123 而发出荧光, 可被流式细胞仪检测。孵育结束后离心收集细胞, PBS 洗涤 2 次后上样, 用流式细胞术检测各组 HUVEC 中荧光阳性率, 以反映细胞中 ROS 含量变化。按照 Annexin-V/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明, 在每组细胞中加入  $5 \times 10^{-6}$  L 的 FITC 标记的 Annexin-V 及  $10 \times 10^{-6}$  L 的 PI 共孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次, 离心细胞并用 150  $\mu$ L PBS 重悬, 立即用流式细胞仪检测各组 HUVEC 经不同浓度 Klotho 蛋白处理对  $H_2O_2$  诱导细胞凋亡的影响。

#### 1.7 Western blot 检测 HUVEC 中 Bcl-2、Bax 及 p-AKT 变化

各组 HUVEC 经过诱导处理 24 h 后, 离心收集细胞。用 RIPA 强蛋白裂解液提取各组细胞中总蛋白。BCA 法测定各组细胞中总蛋白浓度。每组上样 30  $\mu$ g 总蛋白, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 1.5 h 后转 PVDF 膜, 封闭后孵育多克隆兔抗人 Bcl-2、Bax、AKT、p-AKT、NF- $\kappa$ B p65 及  $\beta$ -actin 一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜。TBST 洗涤 3 次, 室温孵育山羊抗兔 IgG 二抗 2 h。孵育结束后 TBS-T 洗涤 3 次, 利用 ECL 化学发

光法显影检测。Quantity One 软件分析各目的蛋白的相对表达量。

#### 1.8 统计学分析

所有数据采用 SPSS 17.0 进行统计分析, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。在方差齐性条件下多组间比较采用单因素 (One-way ANOVA) 分析, 多组间的两两比较采用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Klotho 蛋白促进 $H_2O_2$ 氧化损伤后 HUVEC 存活率

MTT 检测发现, 抗衰老 Klotho 蛋白能够显著提升  $H_2O_2$  氧化损伤后 HUVEC 存活率 (图 1)。与对照组相比,  $H_2O_2$  损伤组继续培养 24、48 h 时细胞存活率显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与  $H_2O_2$  损伤组相比, 1、10、100  $\mu$ g/L Klotho 蛋白组继续培养 24、48 h 时细胞存活率逐渐上升 ( $P < 0.05$ ); AKT 作用组细胞存活率显著低于 Klotho 蛋白组 ( $P < 0.05$ )。说明抗衰老 Klotho 蛋白能够提升  $H_2O_2$  氧化损伤后 HUVEC 的存活, 并与 AKT 信号通路相关。

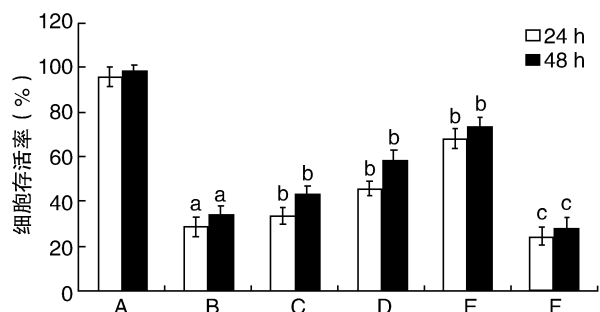


图 1. Klotho 蛋白对  $H_2O_2$  氧化损伤后 HUVEC 存活率的影响 ( $n=6$ ) A 为对照组, B 为  $H_2O_2$  损伤组, C 为 1  $\mu$ g/L Klotho 蛋白组, D 为 10  $\mu$ g/L Klotho 蛋白组, E 为 100  $\mu$ g/L Klotho 蛋白组, F 为 AKT 作用组。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与  $H_2O_2$  损伤组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 100  $\mu$ g/L Klotho 蛋白组比较。

Figure 1. Effect of Klotho protein on the survival rate of HUVEC after  $H_2O_2$  oxidative damage ( $n=6$ )

### 2.2 Klotho 蛋白对 $H_2O_2$ 氧化损伤后 HUVEC 抗氧化指标的影响

经过检测发现, 抗衰老 Klotho 蛋白能够提升  $H_2O_2$  氧化损伤后的 HUVEC 抗氧化能力 (表 1)。与对照组相比,  $H_2O_2$  损伤组 LDH、MDA 含量显著增加, SOD、GSH 活性显著下降 ( $P < 0.05$ ); 当不同浓度 Klotho 蛋白作用于  $H_2O_2$  氧化损伤后的 HUVEC 时,

各组 LDH、MDA 含量逐渐下降,SOD、GSH 活性逐渐上升( $P<0.05$ ),趋于对照组水平;AKT 作用组 LDH、MDA 含量显著高于 100  $\mu\text{g/L}$  Klotho 蛋白组,SOD、GSH 活性显著低于 100  $\mu\text{g/L}$  Klotho 蛋白组( $P<0.05$ )。

表 1. Klotho 蛋白对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 HUVEC 抗氧化指标的影响( $n=6$ )  
Table 1. Effect of Klotho protein on antioxidant indexes of HUVEC after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative damage ( $n=6$ )

分 组	LDH(kU/L)	MDA(μmol/g pro)	SOD(kU/g pro)	GSH(kU/g pro)
对照组	0.34±0.06	3.45±0.55	235.72±11.57	103.56±7.99
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤组	1.28±0.05 <sup>a</sup>	8.88±0.45 <sup>a</sup>	73.57±13.11 <sup>a</sup>	51.24±8.78 <sup>a</sup>
1 μg/L Klotho 蛋白组	0.84±0.07 <sup>b</sup>	7.83±0.57	98.91±10.35 <sup>b</sup>	62.81±8.06 <sup>b</sup>
10 μg/L Klotho 蛋白组	0.61±0.05 <sup>b</sup>	6.34±0.44 <sup>b</sup>	136.82±10.59 <sup>b</sup>	73.57±7.43 <sup>b</sup>
100 μg/L Klotho 蛋白组	0.47±0.05 <sup>b</sup>	4.57±0.52 <sup>b</sup>	188.39±9.74 <sup>b</sup>	89.37±8.15 <sup>b</sup>
AKT 作用组	0.99±0.07 <sup>c</sup>	7.92±0.53 <sup>c</sup>	89.48±11.36 <sup>c</sup>	44.55±7.33 <sup>c</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较;c 为  $P<0.05$ ,与 100  $\mu\text{g/L}$  Klotho 蛋白组比较。

2.3 Klotho 蛋白对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 HUVEC 功能因子和炎性因子的影响

ELISA 检测发现,抗衰老 Klotho 蛋白能够促进 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 HUVEC 功能恢复,减少相关炎性因子的分泌(表 2)。与对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组 HUVEC 上清中 NO 含量显著下降,ET-1 含量显著上升,胞内炎性因子 ICAM-1、VCAM-1、NF- $\kappa$ B 含量均

显著上升( $P<0.05$ );当不同浓度 Klotho 蛋白作用于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后的 HUVEC 时,各组细胞上清中 NO 含量逐渐上升,ET-1 含量逐渐下降,同时胞内炎性因子 ICAM-1、VCAM-1、NF- $\kappa$ B 含量逐渐下降( $P<0.05$ );AKT 作用组 NO 含量显著低于 100  $\mu\text{g/L}$  Klotho 蛋白组,ET-1、ICAM-1、VCAM-1、NF- $\kappa$ B 含量显著高于 100  $\mu\text{g/L}$  Klotho 蛋白组( $P<0.05$ )。

表 2. Klotho 蛋白对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 HUVEC 功能因子和炎性因子的影响( $n=6$ )  
Table 2. Effect of Klotho protein on HUVEC functional factors and inflammatory factors after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative damage ( $n=6$ )

分 组	NO(μmol/L)	ET-1(μmol/L)	ICAM-1(mg/g pro)	VCAM-1(mg/g pro)	NF-κB(mg/g pro)
对照组	145.66±13.45	340.85±21.06	0.86±0.19	2.02±0.23	78.55±10.23
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤组	44.81±10.03 <sup>a</sup>	1255.35±25.66 <sup>a</sup>	7.25±0.22 <sup>a</sup>	8.33±0.42 <sup>a</sup>	157.66±18.37 <sup>a</sup>
1 μg/L Klotho 蛋白组	62.56±9.55 <sup>b</sup>	904.63±19.78 <sup>b</sup>	5.91±0.30 <sup>b</sup>	6.82±0.31 <sup>b</sup>	104.65±13.50 <sup>b</sup>
10 μg/L Klotho 蛋白组	83.33±9.96 <sup>b</sup>	786.92±20.96 <sup>b</sup>	3.47±0.32 <sup>b</sup>	4.36±0.28 <sup>b</sup>	96.38±10.25 <sup>b</sup>
100 μg/L Klotho 蛋白组	109.85±10.51 <sup>b</sup>	615.57±22.32 <sup>b</sup>	2.14±0.24 <sup>b</sup>	3.35±0.35 <sup>b</sup>	87.95±8.97 <sup>b</sup>
AKT 作用组	53.57±8.96 <sup>c</sup>	997.37±25.76 <sup>c</sup>	8.22±0.31 <sup>c</sup>	7.48±0.32 <sup>c</sup>	114.57±11.59 <sup>c</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较;c 为  $P<0.05$ ,与 100  $\mu\text{g/L}$  Klotho 蛋白组比较。

2.4 Klotho 蛋白对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 HUVEC 衰老的影响

SA- $\beta$ -半乳糖苷酶染色检测发现,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 HUVEC 衰老细胞明显增加,而 Klotho 蛋白作用后,各组 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 HUVEC 衰老细胞逐渐减少(图 2)。与对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组 HUVEC 细胞衰老率显著上升( $P<0.05$ );不同浓度 Klotho 蛋白组 HUVEC 细胞衰老率逐渐下降( $P<0.05$ );AKT 作用组 HUVEC 细胞衰老率明显高于 Klotho 蛋白组( $P<0.05$ )。

2.5 Klotho 蛋白对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 HUVEC ROS 的影响

流式细胞术检测发现,抗衰老 Klotho 蛋白能减

少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVEC 产生 ROS(图 3)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组 HUVEC 产生大量 ROS,ROS 阳性率显著高于对照组( $P<0.05$ );不同浓度 Klotho 蛋白作用于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤后的 HUVEC 时,细胞中 ROS 阳性率逐渐下降( $P<0.05$ );但 AKT 作用组 HUVEC 中 ROS 阳性率仍处于较高水平,显著高于 Klotho 蛋白组( $P<0.05$ )。

2.6 Klotho 蛋白对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 HUVEC 凋亡的影响

流式细胞术检测发现,抗衰老 Klotho 蛋白能减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 细胞凋亡(图 4)。与对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组 HUVEC 细胞凋亡率显著增加( $P<0.05$ );不同浓度 Klotho 蛋白作用于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤的



HUVEC 后,细胞凋亡率逐渐下降( $P<0.05$ );而 ATK 作用组 HUVEC 细胞凋亡率高于 Klotho 蛋白组( $P<0.05$ )。

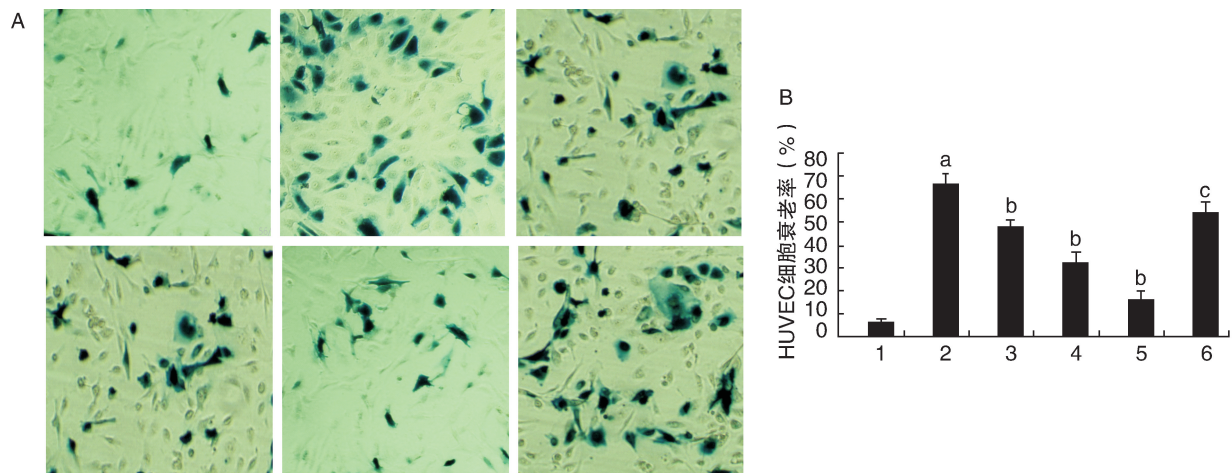


图 2. Klotho 蛋白对  $H_2O_2$  氧化损伤后 HUVEC 细胞衰老的影响 ( $n=6$ ) A 为 SA- $\beta$ -半乳糖苷酶染色图 (200 $\times$ ), 从左到右, 上排为对照组、 $H_2O_2$  损伤组、1  $\mu g/L$  Klotho 蛋白组, 下排为 10  $\mu g/L$  Klotho 蛋白组、100  $\mu g/L$  Klotho 蛋白组、AKT 作用组; B 为 HUVEC 细胞衰老率的统计图, 1 为对照组, 2 为  $H_2O_2$  损伤组, 3 为 1  $\mu g/L$  Klotho 蛋白组, 4 为 10  $\mu g/L$  Klotho 蛋白组, 5 为 100  $\mu g/L$  Klotho 蛋白组, 6 为 AKT 作用组。a 为  $P<0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.05$ , 与  $H_2O_2$  损伤组比较; c 为  $P<0.05$ , 与 100  $\mu g/L$  Klotho 蛋白组比较。

Figure 2. Effect of Klotho protein on HUVEC senescence after  $H_2O_2$  oxidative damage ( $n=6$ )

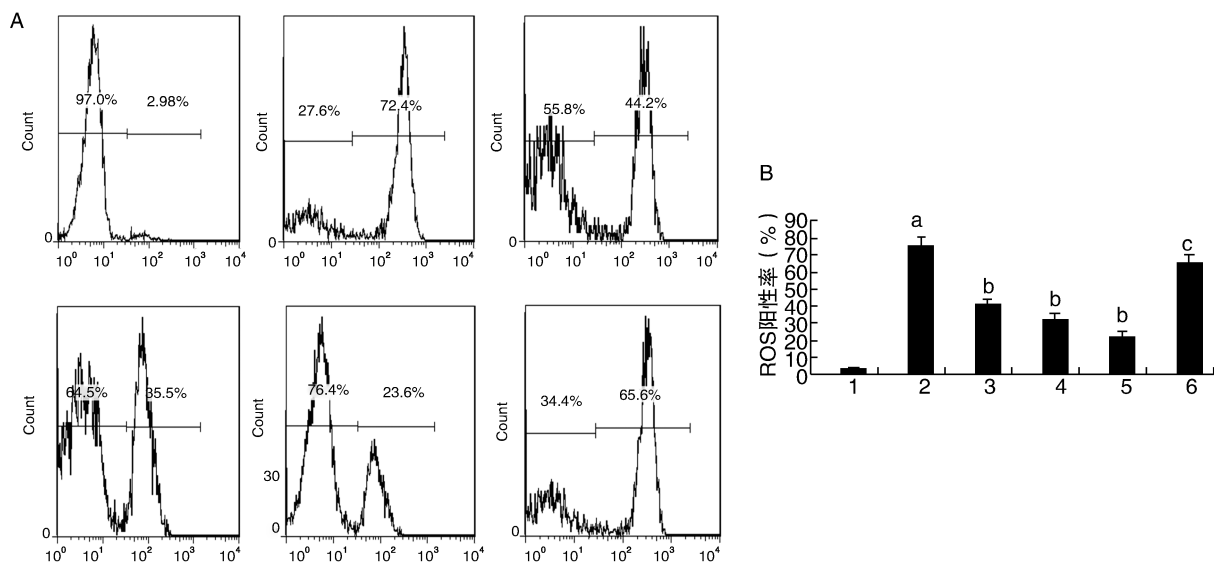


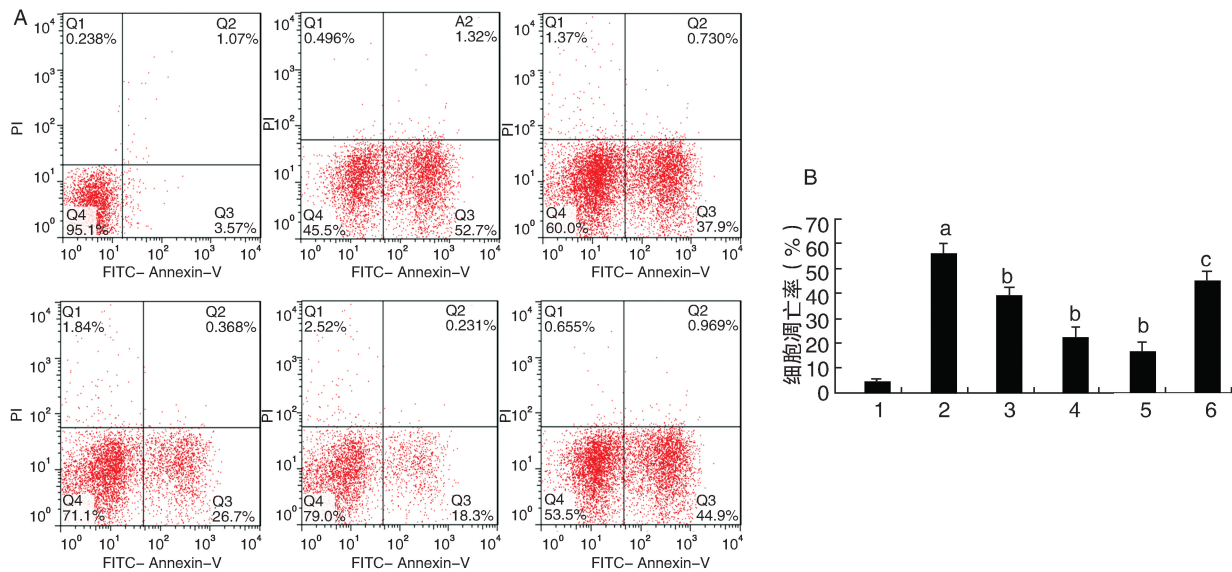
图 3. Klotho 蛋白对  $H_2O_2$  氧化损伤后 HUVEC ROS 的影响 ( $n=6$ ) A 为流式细胞术检测 ROS, 从左到右, 上排为对照组、 $H_2O_2$  损伤组、1  $\mu g/L$  Klotho 蛋白组, 下排为 10  $\mu g/L$  Klotho 蛋白组、100  $\mu g/L$  Klotho 蛋白组、AKT 作用组; B 为 ROS 阳性率的统计图, 1 为对照组, 2 为  $H_2O_2$  损伤组, 3 为 1  $\mu g/L$  Klotho 蛋白组, 4 为 10  $\mu g/L$  Klotho 蛋白组, 5 为 100  $\mu g/L$  Klotho 蛋白组, 6 为 AKT 作用组。a 为  $P<0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.05$ , 与  $H_2O_2$  损伤组比较; c 为  $P<0.05$ , 与 100  $\mu g/L$  Klotho 蛋白组比较。

Figure 3. Effect of Klotho protein on ROS content of HUVEC after  $H_2O_2$  oxidative damage ( $n=6$ )

2.7 Klotho 蛋白对  $H_2O_2$  氧化损伤后 HUVEC 蛋白表达的影响

Western blot 检测发现, 抗衰老 Klotho 蛋白能诱导 HUVEC 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 抑制促凋亡蛋白 Bax 表达, 降低 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化而提高 p-AKT/

AKT 水平 (图 5)。与对照组相比,  $H_2O_2$  损伤组 Bcl-2 蛋白表达显著降低, Bax 蛋白表达显著增加 ( $P<0.05$ ); 当不同浓度 Klotho 蛋白同时作用于  $H_2O_2$  氧化损伤的 HUVEC 时, 细胞中 Bcl-2 蛋白表达逐渐增加, Bax 蛋白表达逐渐下降 ( $P<0.05$ ); 在 AKT 作用



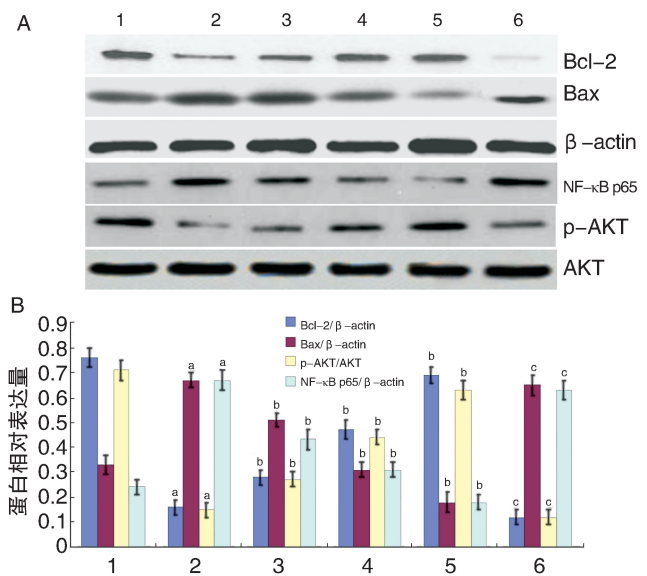
**图 4. Klotho 蛋白对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 HUVEC 细胞凋亡的影响 (n=6)** A 为流式细胞术检测细胞凋亡,从左到右,上排为对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组、1 μg/L Klotho 蛋白组,下排为 10 μg/L Klotho 蛋白组、100 μg/L Klotho 蛋白组、AKT 作用组;B 为细胞凋亡率的统计图,1 为对照组,2 为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组,3 为 1 μg/L Klotho 蛋白组,4 为 10 μg/L Klotho 蛋白组,5 为 100 μg/L Klotho 蛋白组,6 为 AKT 作用组。a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较;c 为  $P<0.05$ ,与 100 μg/L Klotho 蛋白组比较。

**Figure 4. Effect of Klotho protein on cell apoptosis of HUVEC after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative damage (n=6)**

组中,Bcl-2 蛋白表达仍处于较低水平,Bax 蛋白显著高于 Klotho 蛋白组。与对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组 NF-κB p65 磷酸化水平升高而 p-AKT/AKT 水平显著降低 ( $P<0.05$ );不同浓度 Klotho 蛋白组 NF-κB p65 磷酸化水平逐渐降低而 p-AKT/AKT 水平逐渐升高 ( $P<0.05$ );AKT 作用组 NF-κB p65 磷酸化和 p-AKT/AKT 水平无明显变化。

### 3 讨论

血管内皮细胞损伤是多种心血管疾病的病理基础,常常会导致 As 的发生和发展。研究表明血管内皮细胞的损伤与氧化应激有关,当其处于氧化应激状态时会诱导细胞内 ROS 的产生,导致血管内皮损伤及功能障碍<sup>[4]</sup>。过氧化氢作为强氧化剂,可使血管内皮细胞引发脂质过氧化反应,造成细胞氧化损伤,进而促进 As 的发生和发展<sup>[5]</sup>。因此,研究减轻血管内皮细胞氧化损伤对于防治 As 具有重要应用价值。最新研究表明,抗衰老 Klotho 蛋白在动物体内的缺失会导致各种类似衰老的表现如 As、寿命减短、器官萎缩、能量代谢异常等<sup>[6]</sup>。Klotho 蛋白作为一种抗衰老调节激素,能够对多种靶器官发挥生理调节作用<sup>[7]</sup>。但目前关于抗衰老 Klotho 蛋白对血管内皮细胞氧化损伤及修复的作用及其机制尚未见研究。我们利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVEC 构建血管



**图 5. Klotho 蛋白对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 HUVEC 蛋白表达的影响 (n=6)** A 为 Western blot 检测蛋白表达;B 为蛋白相对表达的统计图。1 为对照组,2 为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组,3 为 1 μg/L Klotho 蛋白组,4 为 10 μg/L Klotho 蛋白组,5 为 100 μg/L Klotho 蛋白组,6 为 AKT 作用组。a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较;c 为  $P<0.05$ ,与 100 μg/L Klotho 蛋白组比较。

**Figure 5. Effect of Klotho protein on the protein expression of HUVEC after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative damage (n=6)**

内皮细胞氧化损伤模型,发现 Klotho 蛋白能够显著提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 HUVEC 存活率并具有显著

浓度效应,首次证明 Klotho 蛋白能够减轻血管内皮细胞受到的氧化损伤。

氧化和炎症刺激能够造成血管内皮细胞损伤进而导致 As,其已被学者所公认<sup>[8]</sup>。而血管内皮细胞抗氧化应激能力可通过 LDH、MDA、SOD 及 GSH 等反映。LDH 漏出量的多少可以反映氧化损伤后细胞膜的完整性,同时 MDA 作为机体脂质过氧化的最终产物能够反映机体受活性氧化损伤程度<sup>[9]</sup>。本研究中不同浓度 Klotho 蛋白作用于氧化损伤的 HUVEC,细胞内 LDH 漏出量和 MDA 含量均逐渐下降,显著低于模型组,说明 Klotho 蛋白能维持 HUVEC 细胞完整性并降低其受到氧化损伤。细胞内 SOD 和 GSH 作为抗氧化酶,能对抗氧化应激造成的细胞损伤并修复损伤细胞,其活性可以反映机体抗氧化系统能力<sup>[10]</sup>。本研究中当不同浓度 Klotho 蛋白作用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤的 HUVEC 后,细胞内 SOD 和 GSH 活性均显著上升,说明 Klotho 蛋白有助于 HUVEC 抗氧化能力的恢复。ICAM-1、VCAM-1、NF- $\kappa$ B 等作为内皮细胞炎症相关因子,能促进白细胞向内皮细胞迁移、黏附,在 As 形成中起到重要作用<sup>[11]</sup>。内皮细胞分泌多种血管活性因子包括 NO、ET-1 等,它们参与血管收缩、舒张等生理和病理反应<sup>[12]</sup>。血管损伤时 ET-1 会显著上升,可以反映血管的损伤程度;NO 作为内皮细胞的功能因子其分泌量可以反映血管内皮细胞损伤后的恢复状态<sup>[13]</sup>。为揭示 Klotho 蛋白对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤 HUVEC 后细胞分泌功能因子和炎症因子的影响,本研究对 NO、ET-1、ICAM-1 进行检测发现,不同浓度 Klotho 蛋白均能逐渐提升 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤 HUVEC 后细胞中 NO 分泌量,显著降低 ET-1 和 ICAM-1 的分泌量。本研究证实,Klotho 蛋白能够减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 氧化损伤和炎症反应并逐渐提升细胞功能。

大量研究表明氧化应激可以诱导细胞衰老,目前常用的体外细胞衰老模型即用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化诱导人成纤维细胞获得<sup>[14]</sup>。本研究发现 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 HUVEC 时,细胞中衰老比例显著增加,而当 Klotho 蛋白作用后 HUVEC 衰老细胞显著减少,说明 Klotho 蛋白减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 细胞衰老。ROS 是指 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等活性氧簇,高浓度的 ROS 能够通过氧化应激诱导细胞凋亡<sup>[15]</sup>。血管内皮细胞诱导产生大量 ROS 是造成 As 的重要因素之一<sup>[16]</sup>。本研究利用流式细胞术检测发现,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能够诱导 HUVEC 产生过量 ROS,直接影响细胞存活和功能;当不同浓度 Klotho 蛋白作用于氧化损伤的 HUVEC 后,ROS 显著下降并具有明显浓度效应,说明 Klotho 蛋

白能够抑制 HUVEC 产生 ROS。流式细胞术检测也发现,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 HUVEC 细胞凋亡率显著上升,当不同浓度 Klotho 蛋白作用后细胞凋亡率逐渐下降,说明 Klotho 蛋白能通过减少细胞凋亡对氧化损伤的 HUVEC 发挥保护作用。Bcl-2 是抑制细胞凋亡的关键蛋白,其在细胞凋亡信号通路中发挥作用<sup>[17]</sup>。而 Bax 作为促凋亡因子能够诱导细胞凋亡发生,Bax 和 Bcl-2 可通过控制线粒体膜通透性调节凋亡激活物而对细胞凋亡发挥调节作用<sup>[18]</sup>。为揭示抗衰老 Klotho 蛋白抑制 HUVEC 细胞凋亡的机制,本研究利用 Western blot 检测发现,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤 HUVEC 时,Bax 表达水平显著上升,而 Bcl-2 表达则随之下降;当不同浓度 Klotho 蛋白作用氧化损伤的 HUVEC 后,Bax 表达逐渐下降,而 Bcl-2 表达则随之上升,说明 Klotho 蛋白抑制氧化损伤后 HUVEC 细胞凋亡是通过抑制 Bax 及促进 Bcl-2 蛋白表达而发挥作用的。有研究表明 NF- $\kappa$ B p65 活化会促进细胞中炎症反应,引起细胞凋亡,而 AKT 介导 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导细胞氧化损伤作用,当细胞受到适应性保护作用时 AKT 磷酸化水平会显著升高<sup>[19]</sup>。本研究 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 HUVEC 时,细胞受到严重损伤,NF- $\kappa$ B p65 水平升高而 p-AKT/AKT 水平显著降低;随着 Klotho 蛋白作用浓度的升高,HUVEC 中 NF- $\kappa$ B p65 水平显著降低而 p-AKT/AKT 水平随之逐渐上升。本研究中 AKT 抑制剂和 100  $\mu$ g/L Klotho 蛋白同时作用 HUVEC 时,细胞的存活率、抗氧化能力和 ROS 产生及细胞凋亡等均显著弱于单独 100  $\mu$ g/L Klotho 蛋白作用组,说明抗衰老 Klotho 蛋白减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 氧化损伤和炎症反应是通过抑制 NF- $\kappa$ B p65 水平、促进 p-AKT 而发挥作用的。

#### [参考文献]

- [1] 连冠,鱼毛毛,徐璐,等.葡萄籽多酚降血脂及抗动脉粥样硬化的作用及机制[J].中国动脉硬化杂志,2015,23(2):121-126.
- [2] 边宁,龚博君,郭军,等.一氧化氮/诱导型一氧化氮合酶在动脉粥样硬化过程中的作用[J].中国病理生理杂志,2014,30(3):414-418.
- [3] Mitobe M, Yoshida T, Sugiura H, et al. Oxidative stress decreases Klotho expression in a mouse kidney cell line [J]. Nephron Exp Nephrol, 2005, 101(2): 67-74.
- [4] 杜冠华.血管内皮细胞损伤机制及保护药物的研究[J].基础医学与临床,2004,24(3):258-263.
- [5] Hulsmans M, Van Dooren E, Holvoet P. Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis [J]. Curr Atheroscler Rep, 2012, 14(3): 264-276.

- [6] Chen CD, Tung TY, Liang J, et al. Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein Klotho[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(34): 5 579-587.
- [7] Song JH, Lee MY, Kim YJ, et al. Developmental immunolocalization of the Klotho protein in mouse kidney epithelial cells[J]. *Eur J Histochem*, 2014, 58(1): 2 256.
- [8] Sugamura K, Keaney JF. Reactive oxygen species in cardiovascular disease[J]. *Free Radical Bio Med*, 2011, 51(5): 978-992.
- [9] Ntaios G, Gatselis NK, Makaritsis K, et al. Adipokines as mediators of endothelial function and atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 227(2): 216-221.
- [10] Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(1): 124-136.
- [11] Devaraj S, Syed B, Chien A, et al. Validation of an immunoassay for soluble Klotho protein decreased levels in diabetes and increased levels in chronic kidney disease[J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 137(3): 479-485.
- [12] Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho[J]. *Science*, 2005, 309(5742): 1 829-833.
- [13] 李小红, 郭凤霞, 杨沁, 等. 自噬干预对低剪切应力下血管内皮细胞 eNOS 和 ET-1 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(9): 875-880.
- [14] Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23[J]. *Nature*, 2006, 444(7120): 770-774.
- [15] 李鑫, 李大勇, 马贤德, 等. 血管内皮细胞损伤和血清内源性代谢物的变化与动脉硬化闭塞症发病的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(6): 541-546.
- [16] Shimizu H, Bolati D, Adijiang A, et al. Indoxyl sulfate downregulates renal expression of Klotho through production of ROS and activation of nuclear factor- $\kappa$ B[J]. *Am J Nephrol*, 2011, 33(4): 319-324.
- [17] Hu LG, Sun YK, Hu J. Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced endothelium by activating the PI3K/AKT signaling pathway and modulating expression of Bcl-2 and Bax[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 628(1-3): 155-163.
- [18] Ling Y, Lu N, Gao Y, et al. Endostar induces apoptotic effects in HUVECs through activation of caspase-3 and decrease of Bcl-2[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(1): 411-417.
- [19] Xie CL, Pan YB, Hu LQ, et al. Propofol attenuates hydrogenperoxide-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via multiple signaling pathways[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2015, 68(5): 488-495.
- (此文编辑 曾学清)