

Diplacone 通过抑制氧化应激作用及 NF- κ B 信号通路活性降低 Hcy 诱导的血管内皮细胞损伤

陈洪娜^{1,2,3,4}, 李军^{2,3,4}, 王福文^{2,3,4}

(1. 济南大学 山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东省济南市 250200; 2. 山东省医学科学院药物研究所, 3. 国家卫生部生物技术药物重点实验室, 4. 山东省罕见病重点实验室, 山东省济南市 250062)

[关键词] Diplacone; 同型半胱氨酸; 人脐静脉内皮细胞; NF- κ B 信号通路; 细胞凋亡

[摘要] 目的 采用高同型半胱氨酸血症(HHcy)诱导体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC), 建立血管内皮细胞炎性损伤模型, 通过 Diplacone 预处理, 在之前实验的基础上进一步探讨 Diplacone 对血管内皮细胞可能的保护作用机制。方法 以 HUVEC 为研究对象, 经过不同浓度的 Diplacone 预孵育 2 h 后, 加入 2 mmol/L 同型半胱氨酸(Hcy)继续处理 12 h, 流式细胞术检测细胞凋亡率; 通过检测活性氧(ROS)细胞比率和抗氧化指标超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性及 MDA 含量的变化反应细胞氧化应激水平。Western blot 和 qRT-PCR 检测核因子 κ B(NF- κ B)蛋白和 mRNA 表达水平的变化。结果 与对照组比较, 2 mmol/L Hcy 模型组细胞凋亡率显著增加, ROS 细胞比率和 MDA 含量显著升高, 抗氧化指标 SOD、GSH-Px 的活性显著降低, NF- κ B 的蛋白和 mRNA 表达水平逐渐升高。与 2 mmol/L Hcy 模型组比较, 0.1~10 μ mol/L Diplacone 预处理后细胞凋亡率逐渐降低; 氧化应激指标 ROS 细胞比率和 MDA 含量降低, 抗氧化指标 SOD、GSH-Px 的活性增加; NF- κ B 的蛋白和 mRNA 表达水平逐渐降低。结论 Diplacone 具有抑制 Hcy 诱导的 HUVEC 内皮损伤的作用, 且作用机制可能是通过降低氧化应激作用和抑制 NF- κ B 信号通路活性而降低细胞凋亡率, 抑制细胞凋亡。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Diplacone reduces homocysteine-induced vascular endothelial cell injury by inhibiting oxidative stress and NF- κ B signaling pathway

CHEN Hongna^{1,2,3,4}, LI Jun^{2,3,4}, WANG Fuwen^{2,3,4}

(1. University of Jinan & School of Medicine and Life Sciences, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong 250200, China; 2. Institute of Materia Medica, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong 250062, China; 3. Key Laboratory of Biotech-Drugs, National Ministry of Health, Jinan, Shandong 250062, China; 4. Key Laboratory of Rare Diseases in Shandong, Jinan, Shandong 250062, China)

[KEY WORDS] Diplacone; homocysteine; human umbilical vein endothelial cells; NF- κ B signaling pathway; cells apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** In this experiment, human umbilical vein endothelial cells were induced by HHcy in vitro, and the inflammatory damage model of vascular endothelial cells was established, the effect of Diplacone on human umbilical vein endothelial cells was observed by pretreatment with Diplacone, and further explored the possible protective mechanism of Diplacone on vascular endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were used as the research object and were preincubated by Diplacone with different concentrations for 2 h, then 2 mmol/L Hcy was added to continue incubating for 12 h, changes of cell apoptosis rate were detected by flow cytometry; the level of oxidative stress was detected by ROS cell rate, MDA, GSH-Px, SOD in cells; protein expression and mRNA levels of NF- κ B were detected by Western blot. **Results** Compared with control group, cell apoptosis rates were increased, oxidative stress indexes including ROS cell rate and MDA were increased and the activities of GSH-Px and SOD were decreased; the expression of NF- κ B

[收稿日期] 2018-04-08

[修回日期] 2018-06-07

[基金项目] 山东省医学科学院医药卫生科技创新工程

[作者简介] 陈洪娜, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 1010927603@qq.com。通信作者李军, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 ykyljun@126.com。

protein and mRNA increased significantly. After human umbilical vein endothelial cells were preincubated by Dipalacone with different concentrations, compared with Hcy model group, cell apoptosis rates were decreased in 0.1~10 $\mu\text{mol/L}$; oxidative stress indexes including ROS cell rate and MDA were decreased and the activities of GSH-Px and SOD were increased; the expression of NF- κB protein and mRNA decreased significantly in 0.1~10 $\mu\text{mol/L}$ Dipalacone.

Conclusion Dipalacone can inhibit Hcy-induced endothelial damage in human umbilical vein endothelial cells and the mechanism may be through reducing oxidative stress and inhibiting the activity of NF- κB signaling pathway to reduce cell apoptosis rate and inhibit cell apoptosis.

近年来,心血管疾病一直威胁着许多中老年人的健康,而动脉粥样硬化的发生是心血管疾病产生的一个重要原因,它的发生会引起多种疾病,包括脑血栓、冠心病、心肌梗死等,严重的甚至引起死亡。研究发现内皮损伤是动脉粥样硬化发生过程中的始动环节^[1-2]。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)又称高半胱氨酸,是蛋氨酸代谢的中间产物,Hcy在人体内正常的浓度范围为5~15 $\mu\text{mol/L}$,而高同型半胱氨酸血症(hyperhomocystinemia, HHcy)是指Hcy高于正常均数2倍以上^[3]。大量流行病学调查和临床病例研究发现HHcy是动脉粥样硬化发生的独立危险因素^[4],HHcy可直接或间接通过氧化应激^[5]、激活核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB)^[6]信号通路等多种方式来诱导黏附分子等的大量表达,从而引起内皮细胞损伤、凋亡以及造成动脉粥样硬化的发生和发展。Dipalacone是从毛泡桐果中提取的一种天然香叶烯基黄酮类化合物^[7],研究发现,Dipalacone具有很多生物功能,包括抗生物毒素、抗菌和较强的抗炎、抗氧化作用^[8],而动脉粥样硬化是一种慢性炎症反应^[9],因此考虑Dipalacone在防治动脉粥样硬化方面可能具有临床意义。我们之前已经探究过,Dipalacone具有对Hcy诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用^[10]。本研究则是在之前实验的基础上,通过检测细胞凋亡率、细胞氧化应激作用以及NF- κB 信号通路中NF- κB 蛋白和mRNA的变化规律,探讨Dipalacone对Hcy致血管内皮细胞损伤的保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

HUVEC株(山东省医学科学院药物研究所药理学提供);Dipalacone(山东省医学科学院药物研究所天然药物研究室分离的化合物,纯度>95%);Hcy(Sigma公司);胎牛血清、DMEM培养基和胰蛋白酶(Gibco公司);PBS(Solarbio公司);Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、活性氧(reactive oxygen species,ROS)检测试

剂盒、丙二醛(methanedicarboxylic aldehyde,MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)和BCA蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术有限公司);NF- κB 、 β -actin抗体(Cell Signaling Technology);二抗(中杉金桥公司);qRT-PCR试剂盒购自TOYOBO公司;引物序列由铂尚生物合成。

1.2 细胞培养、分组及处理

HUVEC使用含10%胎牛血清的DMEM培养基于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养。HUVEC呈梭形,铺路石状镶嵌排列,每2天换一次液,按传统方法传代到2~3代后用于后续实验,待细胞正常生长汇合至50%,用PBS清洗3遍,换无血清培养基培养24 h。吸出培养基,再次用PBS清洗3遍。将培养的HUVEC分为对照组(不加Hcy)、2 mmol/L Hcy组、Dipalacone预处理组,其中Dipalacone预处理组设置0.1 $\mu\text{mol/L}$ Dipalacone+2 mmol/L Hcy组、1 $\mu\text{mol/L}$ Dipalacone+2 mmol/L Hcy组、10 $\mu\text{mol/L}$ Dipalacone+2 mmol/L Hcy组和100 $\mu\text{mol/L}$ Dipalacone+2 mmol/L Hcy组。Dipalacone预孵育2 h,再以2 mmol/L Hcy继续孵育12 h。

1.3 Annexin V-FITC染色法检测细胞凋亡

细胞经前期培养以及给药处理后,吸至离心管内,加入胰酶消化1 min,加入之前保留的培养液,将细胞吹下,移至1.5 mL EP管中,离心(1000 g,5 min),重悬计数,弃上清,染色,室温下避光孵育20 min,使用流式细胞仪检测,检测条件:Ex=488 nm,Em=530 nm。

1.4 ROS检测

细胞经培养、给药处理后,胰酶消化,离心(3000 r/min,5 min),沉淀细胞,加入PBS重悬细胞并计数,再次离心,按照1000000/mL的细胞浓度加入稀释好的DCFH-DA(1:1000),37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内孵育20 min。用无血清培养基洗3遍,以充分除去未进入细胞内的DCFH-DA。使用流式细胞仪进行检测,在488 nm激发波长处检测绿色荧光。

1.5 GSH-Px、SOD活性和MDA含量检测

细胞经培养、给药处理后,冰浴PBS清洗3遍,

用细胞刮收集细胞,离心沉淀细胞后,加入裂解液,冰上裂解 2 h,4 ℃ 离心 (14000 r/min,10 min),取上清。BCA 测蛋白浓度。后续实验根据碧云天提供的说明书进行操作。

1.6 Western blot 测定相关凋亡蛋白的表达

细胞经相应处理,收集细胞,经离心、裂解,提取蛋白于 4℃ 保存;使用 BCA 试剂盒测蛋白浓度;配胶;调整蛋白总上样量为 50 μg,与适量上样缓冲液混合,100 ℃ 加热 5 min 使其变性,SDS-PAGE 电泳;冰浴电转到裁剪好的 PVDF 膜上,TBS-T 洗膜 3×5 min;5%BSA 摇床室温封闭 1 h;NF-κB(1:1000)抗体置于 4 ℃ 孵育过夜,次日,TBS-T 洗膜 3×5 min;加入对应的二抗(1:10000)于摇床上室温孵育 3 h,TBS-T 洗膜 3×5 min;避光,在 PVDF 蛋白膜上滴加 ECL 发光液,显影;采用 Image J 2x 软件进行灰度值半定量分析。

1.7 qRT-PCR 对相关基因 mRNA 表达的检测

Trizol 法裂解细胞,并制备 RNA 样品,根据逆转录说明书合成 cDNA,与 real-time PCR 反应体系混合均匀并进行扩增反应,使用 PCR 仪进行检测。NF-κB 正义链为 5'-AAT TGC CCC GGC AT-3',反义链为 5'-

TCC CGT AAC CGC GTA-3';GAPDH 正义链为 5'-AAC GAA TTT GGC TAC AGC-3',反义链为 5'-AGG GTA CTT TAT TGA TGG TAC AT-3'。设置反应程序为:95 ℃ 预处理 60 s,后进行 40 次循环,循环条件为 95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 45 s。目的基因的相对表达量按照公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算得出。

1.8 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异比较采用方差分析及 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Diplacone 对 Hcy 诱导的 HUVEC 凋亡率的影响

Annexin V/PI 双染法结果表明,2 mmol/L Hcy 孵育 HUVEC 12 h,与对照组比较,细胞凋亡率显著增加($P<0.01$);与 2 mmol/L Hcy 组比较,1 μmol/L Diplacone 和 10 μmol/L Diplacone 预处理后细胞凋亡率显著降低($P<0.01$),0.1 μmol/L Diplacone 组和 100 μmol/L Diplacone 预处理后细胞凋亡率无明显变化(图 1)。

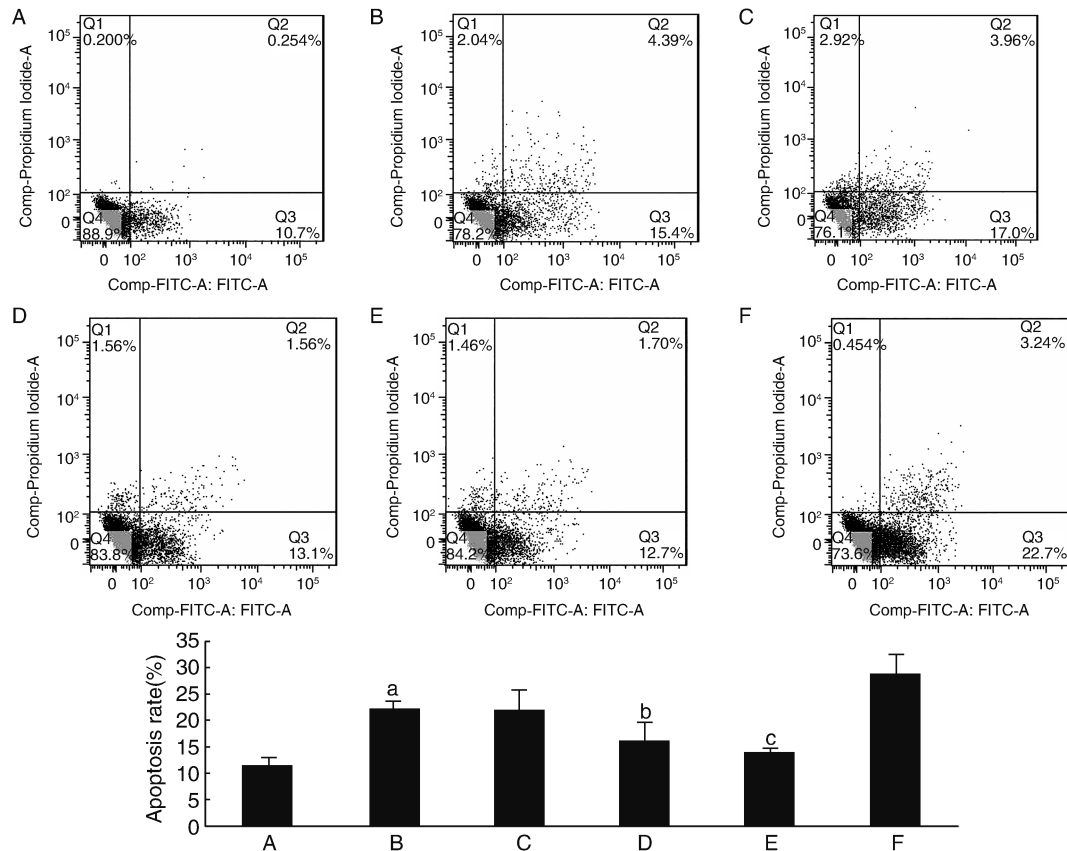


图 1. Diplacone 对 Hcy 诱导的 HUVEC 凋亡率的影响($n=3$) a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,c 为 $P<0.01$,与 2 mmol/L Hcy 组比较。A 为 Control,B 为 2 mmol/L Hcy 组,C 为 0.1 μmol/L Diplacone+2 mmol/L Hcy 组,D 为 1 μmol/L Diplacone+2 mmol/L Hcy 组,E 为 10 μmol/L Diplacone+2 mmol/L Hcy 组,F 为 100 μmol/L Diplacone+2 mmol/L Hcy 组。

Figure 1. Effect of diplacone on the apoptosis rate of Hcy induced HUVEC($n=3$)

2.2 Diplacone 对 Hcy 诱导的 HUVEC 中 ROS 细胞比率的影响

流式细胞术检测结果表明,与对照组比较,2 mmol/L Hcy 组 ROS 细胞比率显著升高 ($P < 0.05$);

与 2 mmol/L Hcy 组相比,0.1 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 预处理后 ROS 细胞比率无明显变化,1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 预处理后 ROS 细胞比率显著降低 ($P < 0.05$; 图 2)。

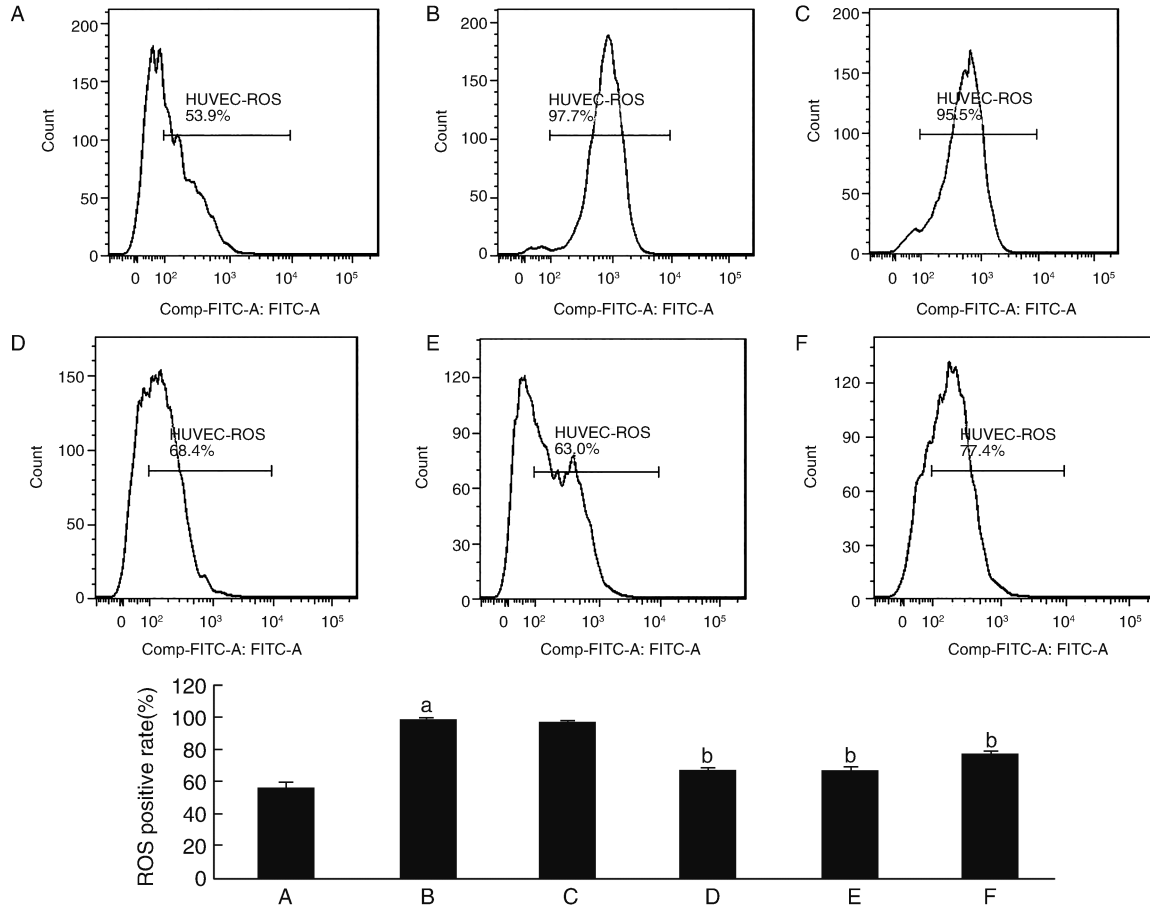


图 2. Diplacone 对 Hcy 诱导的 ROS 细胞比率的影响 ($n = 3$) a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 2 mmol/L Hcy 组比较。A 为 Control, B 为 2 mmol/L Hcy 组, C 为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone + 2 mmol/L Hcy 组, D 为 1 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone + 2 mmol/L Hcy 组, E 为 10 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone + 2 mmol/L Hcy 组, F 为 100 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone + 2 mmol/L Hcy 组。

Figure 2. Effect of Diplacone on ROS cell ratio induced by Hcy ($n = 3$)

2.3 Diplacone 对 Hcy 诱导的 HUVEC 中 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响

与对照组比较,2 mmol/L Hcy 组 MDA 含量显著升高, SOD、GSH-Px 的活性显著降低 ($P < 0.05$)。与 2 mmol/L Hcy 组比较,0.1 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 预处理后 GSH-Px 活性无明显变化,1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 预处理后 GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.05$); 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 预处理后 SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$), 100 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 预处理则无明显变化; 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 预处理后 MDA 含量显著降低。通过上述结果可以看出,1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 可升高

GSH-Px 活性, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 可逐渐升高 SOD 活性, 各浓度均可降低 MDA 含量 (图 3)。

2.4 Diplacone 对 Hcy 诱导的 HUVEC 中 NF- κ B 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,与对照组比较,2 mmol/L Hcy 组 NF- κ B 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 2 mmol/L Hcy 组比较, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 预处理后 NF- κ B 蛋白表达水平虽无明显变化,1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 预处理则显著降低 NF- κ B 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 但 100 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 预处理与 10 $\mu\text{mol/L}$ 预处理比较有升高趋势。通过上述结果可以看出,0.1

$\mu\text{mol/L} \sim 10 \mu\text{mol/L}$ Diplacone 可逐渐降低 Hcy 诱导的 HUVEC NF- κB 蛋白表达水平(图 4)。

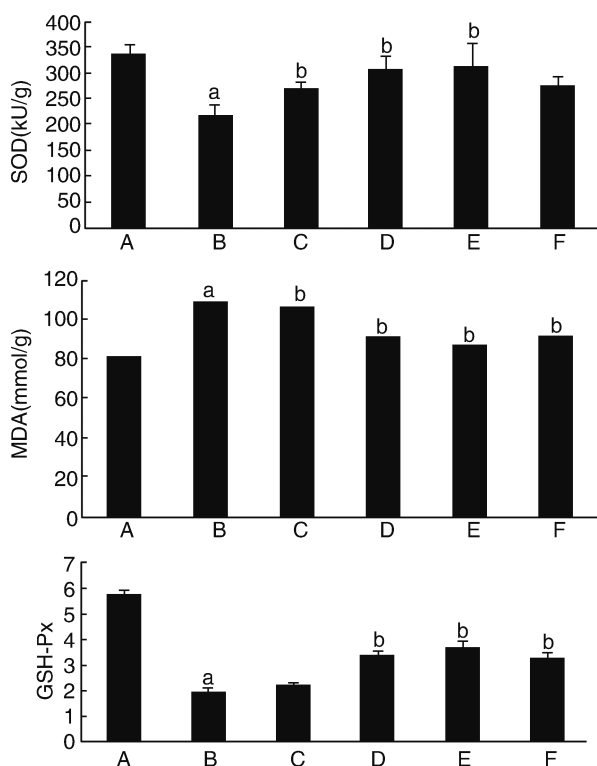


图 3. Diplacone 对 Hcy 诱导的 HUVEC 中抗氧化指标的影响($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 2 mmol/L Hcy 组比较。A 为 Control, B 为 2 mmol/L Hcy 组, C 为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone+2 mmol/L Hcy 组, D 为 1 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone+2 mmol/L Hcy 组, E 为 10 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone+2 mmol/L Hcy 组, F 为 100 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone+2 mmol/L Hcy 组。

Figure 3. Effect of Diplacone on antioxidant indexes induced by Hcy in HUVEC($n=3$)

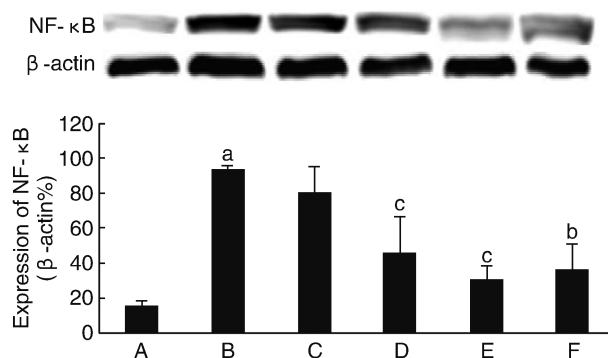


图 4. Diplacone 对 Hcy 诱导的 NF- κB 蛋白表达的影响($n=3$) a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, c 为 $P<0.01$, 与 2 mmol/L Hcy 组比较。A 为 Control, B 为 2 mmol/L Hcy 组, C 为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone+2 mmol/L Hcy 组, D 为 1 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone+2 mmol/L Hcy 组, E 为 10 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone+2 mmol/L Hcy 组, F 为 100 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone+2 mmol/L Hcy 组。

Figure 4. Effect of diplacone on NF- κB protein expression induced by Hcy($n=3$)

2.5 Diplacone 对 Hcy 诱导的 HUVEC 中 NF- κB mRNA 表达的影响

qRT-PCR 检测结果显示, 与对照组比较, 2 mmol/L Hcy 组 NF- κB mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$); 与 2 mmol/L Hcy 组比较, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 和 1 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 预处理后 NF- κB mRNA 表达水平虽无明显变化, 但有降低趋势; 10 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 预处理则显著降低 NF- κB mRNA 表达水平($P<0.05$), 100 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 预处理则无明显变化。通过上述结果可以看出, 0.1~10 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 可逐渐降低 Hcy 诱导的 NF- κB mRNA 表达水平, 结果大致与 Western blot 检测蛋白表达水平结果一致(图 5)。

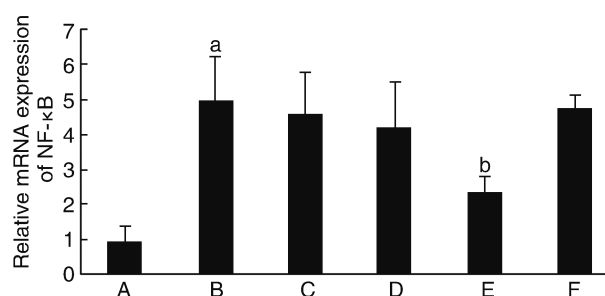


图 5. Diplacone 对 Hcy 诱导的 NF- κB mRNA 表达的影响($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 2 mmol/L Hcy 组比较。A 为 Control, B 为 2 mmol/L Hcy 组, C 为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone+2 mmol/L Hcy 组, D 为 1 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone+2 mmol/L Hcy 组, E 为 10 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone+2 mmol/L Hcy 组, F 为 100 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone+2 mmol/L Hcy 组。

Figure 5. Effect of diplacone on NF- κB mRNA expression induced by Hcy($n=3$)

3 讨论

氧化应激是指机体或细胞在危险因素的刺激下, 自身氧化产生的氧自由基促使体内 ROS 蓄积而引起的氧化-抗氧化系统失衡, 从而产生的氧化损伤过程^[11]。近年研究表明, ROS 可引起血管损伤, 且在动脉粥样硬化发展过程中扮演重要角色^[12]。研究显示, 高 Hcy 可致内皮血管壁产生多种 ROS, 导致内皮细胞通透性增强以及内皮依赖性血管收缩舒张功能障碍^[13], 从而促进黏附分子的表达, 导致血管内皮损伤及动脉粥样硬化的发生发展。SOD 是生物体内重要的抗氧化酶, 在生物界分布广泛, 它的作用机制主要是将超氧阴离子转化为过氧化氢, 维持体内的氧化系统平衡, 从而保护机体和细胞免受超氧自由基和 ROS 的氧化损害。研究发现,

SOD 在治疗动脉硬化方面发挥了重要的作用,它通过清除脂质过氧化物,减轻氧自由基对组织细胞的过氧化损伤,降低脂质形成 ox-LDL,从而保护血管内皮免受氧自由基的损伤,防止动脉粥样硬化的形成^[14]。GSH-Px 是一种主要的抗氧化酶,它在谷胱甘肽抗氧化系统中占有重要的地位^[15],主要功能是清除脂类氢过氧化物,它的减少会严重导致机体抗氧化能力降低,致使脂质过氧化物增多,增加血管损伤及后续血栓形成的概率,并进一步促进动脉粥样硬化的发生发展。MDA 是氧自由基作用于脂质发生过氧化反应得到的毒性终产物,其含量直接反映体内脂质过氧化程度,并可间接反映机体清除氧自由基的能力^[16]。近来研究揭示,当血管内皮受到危险因素刺激时,机体产生过多的氧自由基,作用于脂质产生过多的 MDA 毒性产物,促使脂质沉积于血管壁,加重动脉血管内皮细胞损伤,并致动脉硬化化的发生^[17]。之前我们的研究发现 Diplacone 对 Hcy 诱导损伤的 HUVEC 具有保护作用,且有资料表明其具有很好的抗氧化功能,因此在本研究中,我们复制 Hcy 诱导损伤的 HUVEC 模型,采用流式细胞术检测在给药前后细胞凋亡率的变化,又通过检测 ROS 细胞比率、MDA 含量以及抗氧化指标 SOD、GSH-Px 活性水平在给药前后的变化,研究 Diplacone 对氧化应激损伤的作用。结果表明,与对照组比较,Hcy 明显增加了 HUVEC 的凋亡率,加重了氧化应激作用,使 ROS 细胞比率和 MDA 含量增加,抗氧化指标 SOD、GSH-Px 活性水平显著降低,这说明 Hcy 可通过增加氧化应激作用,增加内皮细胞的损伤作用,引起细胞凋亡。当使用不同浓度 Diplacone 预处理 Hcy 后发现,Diplacone 在 1~10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度内逐渐降低了细胞的凋亡率,且在一定浓度上降低了 ROS 细胞比率和 MDA 含量,升高抗氧化指标 SOD 和 GSH-Px 活性水平,这说明 Diplacone 可以通过降低由 Hcy 诱导氧化应激损伤对 HUVEC 起到一定的保护作用。

NF- κ B 是一种活跃的转录因子,它是由 p65 和 p50 构成的异二聚体,是 NF- κ B 家族中最有效力的基因转录活化子,而具有调控相关基因表达功能的是 p65 亚基。当 Hcy 激活 NF- κ B 时,活化的 NF- κ B 与其靶基因的 κ B 位点结合,p65 亚基被释放并转入细胞核内调控一系列黏附分子以及凋亡基因的表达^[18],对内皮细胞造成损害,并进一步促进动脉粥样硬化的发生。有研究表明,HHcy 可能通过激活 NF- κ B 上调血管黏附细胞分子^[18],当炎症被激活时,NF- κ B 与这些黏附分子基因启动子区域的 NF-

κ B 位点结合,通过巨噬细胞释放 TNF- α 刺激血管内皮细胞表面黏附分子 ICAM-1 等表达上调,从而参与炎症反应的调节。由于 NF- κ B 参与内皮细胞的多种炎症反应,因此本研究通过 Western blot 和 qRT-PCR 检测了 NF- κ B 信号通路中 NF- κ B 蛋白和 mRNA 给药前后的变化。结果显示,与对照组比较,Hcy 显著升高了 NF- κ B 的蛋白和 mRNA 表达水平,这说明 Hcy 可通过增加 NF- κ B 蛋白和 mRNA 表达水平抑制 NF- κ B 信号通路的激活,增加内皮细胞的损伤作用。当用不同浓度 Diplacone 预处理 HUVEC 后发现,0.1 $\mu\text{mol/L}$ ~10 $\mu\text{mol/L}$ Diplacone 呈浓度依赖性降低了 Hcy 诱导的 NF- κ B 的蛋白和 mRNA 表达水平,这说明 Diplacone 可通过降低 Hcy 诱导的 HUVEC NF- κ B 蛋白和 mRNA 表达水平,抑制 NF- κ B 信号通路的激活,从而对内皮细胞产生保护作用。

综上所述,Diplacone 可有效地降低由 Hcy 诱导的 HUVEC 的损伤作用,作用机制可能通过降低氧化应激作用和抑制 NF- κ B 信号通路的激活,从而降低细胞凋亡率,抑制细胞凋亡及后续动脉粥样硬化的发生发展。本研究可为临床研究提供参考,但是其具体的机制以及药物的作用靶点并不清楚,还需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] Yamauchi H, Higashi T, Kagawa S, et al. Impaired perfusion modifies the relationship between blood pressure and stroke risk in major cerebral artery disease[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2013, 84(11): 1226-1232.
- [2] Dong Y, Fernandes C, Liu Y, et al. Role of endoplasmic reticulum stress signalling in diabetic endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2017, 14(1): 14-23.
- [3] Wang R, Wang Y, Mu N, et al. Activation of NLRP3 inflammasomes contributes to hyperhomocysteinemia-aggravated inflammation and atherosclerosis in apoE-deficient mice[J]. *Labor Invest*, 2017, 97(8): 922-934.
- [4] Bonciani D, Antiga E, Bonciolini V, et al. Homocysteine serum levels are increased and correlate with disease severity in patients with lupus erythematosus[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2016, 34(1): 76-81.
- [5] Vacek TP, Rehman S, Neamtu D, et al. Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms[J]. *Vas Health Risk Manag*, 2015, 11(default): 173-183.
- [6] Liu M, Yu P, Jiang H, et al. The essential role of Pin1 via NF- κ B signaling in vascular inflammation and atherosclerosis

- in ApoE^{-/-} mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 644.
- [7] 李传厚, 王晓静, 唐文照, 等. 毛泡桐果化学成分研究[J]. *食品与药品*, 2014, 16(1): 12-14.
- [8] Yoder BJ, Cao S, Norris A, et al. Antiproliferative prenylated stilbenes and flavonoids from *Macaranga alnifolia* from the Madagascar rainforest[J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(3): 342-346.
- [9] Graham A, Allen AM. Mitochondrial function and regulation of macrophage sterol metabolism and inflammatory responses[J]. *World J Cardiol*, 2015, 7(5): 277-286.
- [10] 陈洪娜, 唐文昭, 闫志辉, 等. Diplocone 对同型半胱氨酸致血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(7): 666-670.
- [11] Scherer EB, Da Cunha AA, Kolling J, et al. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2011, 29(7): 693-699.
- [12] Ryu H, Kim Y, Oh E, et al. Hypoxanthine induces cholesterol accumulation and incites atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice and cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(11): 2160-2172.
- [13] O'Brien KM, Dirmeier R, Engle M, et al. Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(Mn SOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(50): 51817-51827.
- [14] Wihastuti TA, Teuku H, Merika S, et al. Inhibition of oxidative stress in hypercholesterolemic rats by soy milk[J]. *J of Cardio Disease Res*, 2016, 7(2): 74-82.
- [15] Goc Z, Szaroma W, Kapusta E, et al. Protective effects of melatonin on the activity of SOD, CAT, GSH-Px and GSH content in organs of mice after administration of SNP[J]. *Chin J Physiol*, 2017, 60(1): 1-10.
- [16] 温先勇, 邓正华. 氧化型低密度脂蛋白丙二醛总抗氧化能力与冠状动脉粥样硬化的关系[J]. *中国心血管病研究杂志*, 2005, 3(7): 586-587.
- [17] 刘虹彬, 温进坤, 韩梅. 氧化应激与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, 25(9): 360-361.
- [18] Chen F, Castranova V, Li Z, et al. Inhibitor of nuclear factor kappaB kinase deficiency enhances oxidative stress and prolongs c-Jun NH2-terminal kinase activation induced by arsenic[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(22): 7689-7693.
- (此文编辑 文玉珊)

(上接第 986 页)

- [18] Jung M, Pfeifer GP. Aging and DNA methylation[J]. *BMC Biol*, 2015, 13: 7.
- [19] Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13: 484-492.
- [20] Chen M, Dasgupta C, Xiong F, et al. Epigenetic upregulation of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel expression in uterine vascular adaptation to pregnancy[J]. *Hypertension*, 2014, 64: 610-618.
- [21] Liao J, Zhang Y, Ye F, Zhang L, et al. Epigenetic regulation of L-type voltage-gated Ca²⁺ channels in mesenteric arteries of aging hypertensive rats[J]. *Hypertens Res*, 2017, 40: 441-449.
- [22] Chen M, Xiao D, Hu XQ, et al. Hypoxia represses ER- α expression and inhibits estrogen-induced regulation of Ca²⁺-activated K⁺ channel activity and myogenic tone in ovine uterine arteries: causal role of DNA methylation[J]. *Hypertension*, 2015, 66: 44-51.
- [23] Garcia Palmieri M. Hypertension in old age[J]. *P R Health Sci J*, 1995, 14: 217-221.
- [24] Isabelle M, Simonet S, Ragonnet C, et al. Chronic reduction of nitric oxide level in adult spontaneously hypertensive rats induces aortic stiffness similar to old spontaneously hypertensive rats[J]. *J Vasc Res*, 2012, 49: 309-318.
- [25] Sueta D, Koibuchi N, Hasegawa Y, et al. Blood pressure variability, impaired autonomic function and vascular senescence in aged spontaneously hypertensive rats are ameliorated by angiotensin blockade[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 236: 101-107.
- [26] Yang Y, Li PY, Cheng J, et al. Function of BK_{Ca} channels is reduced in human vascular smooth muscle cells from Han Chinese patients with hypertension[J]. *Hypertension*, 2013, 61: 519-525.
- [27] 孔祥权, 杨玉雯. 大电导钙激活钾通道的增龄变化及与高血压的关系[J]. *中国心血管病研究*, 2008, 6(1): 70-72.
- [28] Marijic J, Li Q, Song M, et al. Decreased expression of voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels in coronary smooth muscle during aging[J]. *Circ Res*, 2001, 88: 210-216.
- [29] Nishimaru K, Eghbali M, Stefani E, et al. Function and clustered expression of MaxiK channels in cerebral myocytes remain intact with aging[J]. *Exp Gerontol*, 2004, 39: 831-839.
- [30] Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging[J]. *Cell*, 2013, 153: 1194-1217.
- [31] Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. DNA methylation and healthy human aging[J]. *Aging Cell*, 2015, 14: 924-932.
- (此文编辑 文玉珊)