

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-07-0510-04

二苯乙烯苷对 H_2O_2 诱导人脐静脉内皮细胞核因子 κB 、
肿瘤坏死因子 α 表达的影响

龙石银, 崔慧辉, 张彩平, 乔新惠, 田英, 田汝芳, 佟丽, 黄良珠

(南华大学生物化学与分子生物学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 二苯乙烯苷; 人脐静脉内皮细胞; 过氧化氢; 氧化应激; 核因子 κB

[摘要] 目的 研究二苯乙烯苷对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用, 并探讨其作用机制。方法 以不同浓度 (0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$) 的二苯乙烯苷孵育体外培养人脐静脉内皮细胞 4 h 后, 用 200 $\mu\text{mol/L}$ 的过氧化氢作用内皮细胞 24 h 采用电镜观察、MTT 等方法测定各组细胞活力; RT-PCR 检测核因子 κB 、 $I\kappa B$ 、肿瘤坏死因子 α mRNA 的表达, Western blot 检测核因子 κB 、 $I\kappa B$ 蛋白的表达, ELISA 检测上清中肿瘤坏死因子 α 蛋白的表达。结果 与空白对照组比较, 过氧化氢能明显造成内皮细胞损伤 ($P < 0.01$), 引起细胞活性降低。与过氧化氢损伤组比较, 不同浓度组二苯乙烯苷均可以提高过氧化氢诱导损伤的人脐静脉内皮细胞活性, 降低核因子 κB 、肿瘤坏死因子 α mRNA 及蛋白水平的表达, 其中以 1 $\mu\text{mol/L}$ 二苯乙烯苷组的作用最明显, 其差异有显著性 ($P < 0.01$), 但对 $I\kappa B$ 的 mRNA 及蛋白水平差异均无显著性。结论 二苯乙烯苷对过氧化氢所致的人脐静脉内皮细胞损伤有保护作用, 其机制可能与下调核因子 κB 、肿瘤坏死因子 α 的表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside on the Expression of NF- κB and TNF- α in Human Umbilical Vein Endothelial Cell Injured by H_2O_2

LONG Shi-yin, CUI Hui-hui, ZHANG Cai-ping, QIAO Xin-hui, Tian Ying, TIAN Ru-fang, TONG Li, and HUANG Liang-zhu

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (TSG); Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Hydrogen Peroxide; Oxidative Stress; NF- κB [ABSTRACT] **Aim** To study the protective effect of tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (TSG) on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) injury induced by H_2O_2 and explore the related mechanism of action. **Methods**HUVEC were treated with TSG (0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$) for 4 hours then exposed to 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 24 hours. Cell viability was determined by electron microscope observation and MTT assay. Gene expression of NF- κB , $I\kappa B$ and TNF- α were measured by RT-PCR. Protein levels were examined by Western blot and ELISA. **Results** Induced by H_2O_2 , proliferation of HUVEC were inhibited. After treated by different concentrations of TSG, the proliferation of HUVEC were increased compared with the model group. The expression of NF- κB and TNF- α were remarkably down-regulated ($P < 0.01$), and there were no effect for the expression of $I\kappa B$. **Conclusion** TSG have a protective effect on the HUVEC impairment induced by H_2O_2 , and the potential mechanism of action may be associated with downregulating the expression of NF- κB and TNF- α .

二苯乙烯苷 (tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside, TSG) 是何首乌中主要的水溶性药效成分, 研究证实, TSG 具有较强的抗氧化作用, 它能抑制脂质过氧化、提高清除氧自由基的能力, 也能降低心、脑缺血再灌注导致的氧化损伤; 还具有调脂、抗炎、

舒血管和改善内皮功能等多方面的药理作用^[1-5], 但其作用机制尚不清楚。

血管内皮细胞是血液与血管壁之间的结构和功能屏障, 受损后的血管内皮细胞功能失调, 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 及相关心血管疾病的发生、发展中起着非常重要的作用, 因此对血管内皮细胞功能的损伤与保护研究显得尤为重要。氧化应激和炎症是 As 发生的两个关键因素, 它们相互调控, 相互影响^[6,7]。活性氧能引起血管内皮损伤和细胞功能障碍。因此, 本实验采用过氧化氢 (H_2O_2) 体外诱导人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endo-

[收稿日期] 2010-05-18 [修回日期] 2010-06-17

[基金项目] 国家自然科学基金 (30800474); 湖南省教育厅 (08B065, 09C832); 湖南省科技厅 (湘科条字 [2009] 130)

[作者简介] 龙石银, 博士, 副教授, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化, Email为 longshiyin@126.com。崔慧辉, 硕士研究生, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化, Email为 zbinghui@163.com。通讯作者田英, 博士, 教授, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化, Email为 uscty@163.com。

thelial cells HUVEC)损伤,观察 TSG 对氧化损伤的内皮细胞活性及 NF- κ B、IKB、TNF- α 基因表达的影响,初步探讨 TSG 保护内皮细胞的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人脐静脉内皮细胞株 (HUVEC) 购自中国科学院细胞生物学研究所上海细胞库, TSG 为中国药品生物制品检定所产品 (编号: 110844)。RPM I-1640 培养基购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 胰蛋白酶、MTT、DMSO 购自 Amresco 公司, 逆转录试剂盒购自 MBI 公司, NF- κ B、IKB、 β -actin 抗体、显色试剂盒及 TNF- α ELISA 检测试剂盒等购自博士德生物工程有限公司, 其余均为国产试剂 (分析纯级)。

1.2 人脐静脉内皮细胞体外培养

人脐静脉内皮细胞株接种于无菌培养瓶中, 加入适量含 10% 的胎牛血清 RPM I-1640 培养液, 于 37℃、5% CO₂、95% 空气饱和湿度的培养箱中培养。根据相差显微镜下细胞呈单层鹅卵石样排列、免疫组织化学法 (PAP 法) 染色细胞第 (II) 因子相关抗原呈阳性, 确定培养细胞为内皮细胞。待细胞生长至培养瓶的 80% 左右, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 轻柔吹打成单细胞悬液, 按 1:4 的比例接种传代, 每 2~3 天换液一次, 4~5 天传代一次。

1.3 实验分组及方法

以 MTT 法筛选不同浓度 (0.25、50、100、200、400、800、1600 μ mol/L) H₂O₂ 对 HUVEC 生长活性的影响, 确定了能显著抑制细胞增殖, 又不引起细胞死亡的 H₂O₂ 氧化损伤浓度为 200 μ mol/L。实验分为: (1) 空白对照组; (2) H₂O₂ 组: 以终浓度为 200 μ mol/L 的 H₂O₂ 造模; (3) 阳性对照组: 以 5 μ mol/L 辛伐他汀预处理 4 h 后, 加 H₂O₂ 200 μ mol/L 孵育 24 h; (4) TSG + H₂O₂ 组: 不同浓度的 TSG (0.1、1、10 μ mol/L) 预处理 4 h 后, 加 H₂O₂ 200 μ mol/L 孵育 24 h。

1.4 MTT 法检测细胞活力

取 80% 满培养瓶的培养 HUVEC, 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 1×10^7 个/L 为接种密度、每孔 200 μ L 接种在 96 孔培养板中。待长到对数生长期, 倾去培养液, 用 PBS 缓冲液洗 1~2 遍。无血清培养基同步 12 h 用 PBS 缓冲液洗 1~2 遍, 换新鲜培养液。按分组要求给以不同的处理因素, 每组设 6 个平行孔, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 倾去培

养液, 用 PBS 缓冲液洗 1~2 遍, 换新鲜培养液每孔 150 μ L, 同时每孔加 MTT 20 μ L (5 mg/mL), 培养 4 h 后弃上清, 每孔加 DMSO 150 μ L, 震荡 15 min 在酶联免疫仪波长 490 nm 处测定吸光度值。

1.5 RT-PCR 检测 NF- κ B、IKB 和 TNF- α 的表达

收集各组细胞, 提取细胞总 RNA, 鉴定 RNA 完整性及纯度; 按照 MBI 公司逆转录试剂盒合成 cDNA 第一链, PCR 扩增各基因。NF- κ B 上游引物为 5'-TCG TTT CCG TTA TGTA TGT-3', 下游引物为 5'-CCT TGG GTC CAG CAG TTA-3', 扩增片段为 227 bp。IKB 上游引物为 5'-TCA CCA ACC AGC CAG AAA T-3', 下游引物为 5'-CAT CAG CAC CCA AGG ACA C-3', 扩增片段为 267 bp。TNF- α 上游引物为 5'-AGT GAC AAG CCT GTA GCC C-3', 下游引物为 5'-GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC-3', 扩增片段为 443 bp。GAPDH 上游引物为 5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3', 下游 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3', 扩增片段为 648 bp。反应参数为: 95℃预变性 4 min, 95℃变性 30 s, NF- κ B、TNF- α 及 GAPDH 54~8℃退火 30 s (IKB 61℃退火 30 s), 72℃延伸 1 min, 30 个循环后 72℃延伸 10 min, 4℃保存。1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统拍摄照片, 并对各目的 DNA 条带进扫描, 以 GAPDH 为内参, 分析各基因相对表达水平。

1.6 Western blot 检测核因子 κ B、IKB 蛋白的表达

收集各组细胞, 用细胞裂解液裂解细胞后提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白质含量。每组取 50 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离, 转移到硝酸纤维素膜上, 用 5% 封闭液 4℃封闭 1~2 h, 加入一抗 (兔抗人 NF- κ B、IKB 多克隆抗体, GAPDH 单克隆抗体, 1:1000) 室温振荡 4 h 或者 4℃孵育过夜 (GAPDH 单抗室温下孵育 45 min), TBST 缓冲液 (0.05% Tween20 的 TBS 缓冲液) 洗膜 10 min \times 3 次, 以 1:5000 稀释 HRP 标记的二抗, 室温孵育 (NF- κ B、IKB 蛋白孵育 1 h 内参 GAPDH 孵育 45 min), 常规洗膜, 化学发光试剂显色, 胶片显影, 扫描胶片后用凝胶图象分析系统测光密度值。

1.7 ELISA 检测肿瘤坏死因子 α 蛋白表达

各组分别处理后收集上清, 按试剂盒操作说明检测 TNF- α 蛋白表达, 用酶标仪在 450 nm 处测定 OD 值。

1.8 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计方法采用单因素方差分析及 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 二苯乙烯苷对氧化损伤内皮细胞活性的影响

过氧化氢可引起人脐静脉内皮细胞活性降低,抑制率为 $59.1\% \pm 6.81\%$,与空白对照组差异有显著性 ($P < 0.01$);而不同浓度 TSG 组均可抑制过氧化氢损伤引起的活性降低,提高细胞的生长活性,与 H_2O_2 损伤组比较,差异有显著性 ($P < 0.01$; 表 1)。

表 1 不同浓度二苯乙烯苷对氧化损伤的人脐静脉内皮细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	细胞活力
空白对照组	0.977 ± 0.044
H_2O_2 损伤组	0.498 ± 0.075^a
TSG $0.1 \mu\text{mol/L} + H_2O_2$ 组	0.764 ± 0.089^b
TSG $1 \mu\text{mol/L} + H_2O_2$ 组	0.761 ± 0.099^b
TSG $10 \mu\text{mol/L} + H_2O_2$ 组	0.695 ± 0.117^b

a 为 $P < 0.01$ 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.01$ 与 H_2O_2 损伤组比较。

2.2 二苯乙烯苷对氧化损伤内皮细胞核因子 κB 表达的影响

RT-PCR 检测结果显示,与 H_2O_2 损伤组比较,辛伐他汀组、不同浓度 TSG 组均可降低 NF- κB mRNA 的表达,且差异有显著性 ($P < 0.01$)。Western blot 结果显示,辛伐他汀组、 $1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组 NF- κB 蛋白表达较 H_2O_2 损伤组显著降低 ($P < 0.05$; 图 1 和表 2)。

2.3 二苯乙烯苷对氧化损伤内皮细胞 κB 表达的影响

RT-PCR 及 Western blot 检测结果显示,各组间 κB mRNA、蛋白的表达差异均无显著性 ($P > 0.05$; 图 2 和表 3)。

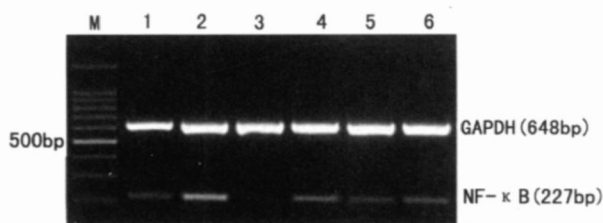


图 1 二苯乙烯苷对内皮细胞核因子 κB mRNA 表达的影响

M 为分子量标准,1 为空白对照组,2 为 H_2O_2 损伤组,3 为辛伐他汀组,4 为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组,5 为 $1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组,6 为 $10 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组。

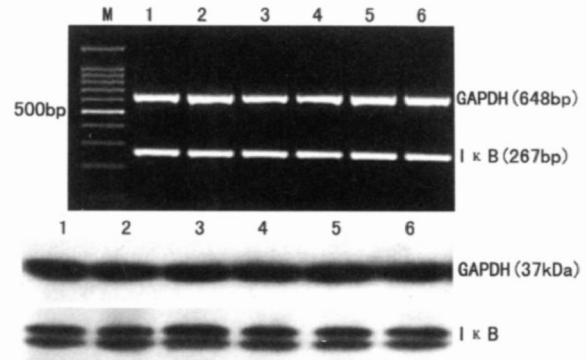


图 2 二苯乙烯苷对内皮细胞 κB 表达的影响 上图为 mRNA 的表达,下图为蛋白的表达。1 为空白对照组,2 为 H_2O_2 损伤组,3 为辛伐他汀组,4 为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组,5 为 $1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组,6 为 $10 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组。

表 2 二苯乙烯苷对内皮细胞核因子 κB 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	mRNA 相对表达量	蛋白相对表达量
空白对照组	0.272 ± 0.016	0.835 ± 0.087
H_2O_2 损伤组	0.399 ± 0.048^a	1.041 ± 0.078^c
辛伐他汀组	0.064 ± 0.014^b	0.836 ± 0.158^d
$0.1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组	0.277 ± 0.038^b	0.892 ± 0.121
$1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组	0.177 ± 0.020^b	0.804 ± 0.137^d
$10 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组	0.219 ± 0.011^b	0.897 ± 0.069

a 为 $P < 0.01$ 与空白对照组比较; c 为 $P < 0.05$ 与 H_2O_2 损伤组比较; b 为 $P < 0.01$, d 为 $P < 0.05$ 与辛伐他汀组比较。

表 3 二苯乙烯苷对内皮细胞 κB 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组 别	mRNA 相对表达量	蛋白相对表达量
空白对照组	0.733 ± 0.012	1.237 ± 0.193
H_2O_2 损伤组	0.720 ± 0.076	1.219 ± 0.193
辛伐他汀组	0.703 ± 0.003	1.242 ± 0.209
$0.1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组	0.725 ± 0.008	1.125 ± 0.160
$1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组	0.734 ± 0.006	1.120 ± 0.225
$10 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组	0.731 ± 0.006	1.097 ± 0.179

2.4 二苯乙烯苷对氧化损伤内皮细胞肿瘤坏死因子 α 表达的影响

RT-PCR 电泳结果显示,与 H_2O_2 损伤组比较,辛伐他汀组、不同浓度 TSG 组均可降低 TNF- α mRNA 的表达差异有显著性 ($P < 0.05$),其中 $1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组降低 TNF- α mRNA 的表达作用更明显 ($P < 0.01$)。ELISA 检测结果显示,与空白对照组比较,氧化损伤致内皮细胞上清中 TNF- α 蛋白含量显著升高 ($P < 0.05$);TSG 干预后,与过氧化氢损伤组比较, $1 \mu\text{mol/L}$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$ TSG 组上清中

TNF- α 蛋白含量减少, 但差异无显著性 ($P > 0.05$, 图 3 和表 4)。

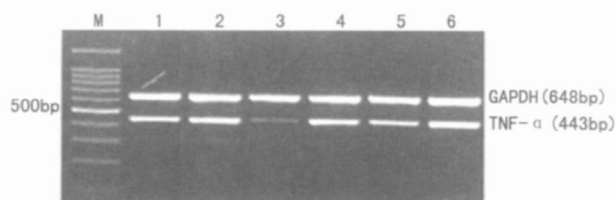


图 3 二苯乙烯苷对内皮细胞肿瘤坏死因子 α mRNA 表达的影响 1 为空白对照组, 2 为 H_2O_2 损伤组, 3 为辛伐他汀组, 4 为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组, 5 为 $1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组, 6 为 $10 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组。

表 4 二苯乙烯苷对内皮细胞肿瘤坏死因子 α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	mRNA 相对表达量	TNF- α (ng/L)
空白对照组	0.649 ± 0.002	9.00 ± 0.22
H_2O_2 损伤组	0.732 ± 0.033^a	32.43 ± 4.31^c
辛伐他汀组	0.172 ± 0.005^b	26.37 ± 1.36^c
$0.1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组	0.691 ± 0.012^d	43.02 ± 3.11^c
$1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组	0.473 ± 0.006^b	26.13 ± 1.72^c
$10 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组	0.691 ± 0.003^d	27.40 ± 6.24^c

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; c 为 $P < 0.05$ 与 H_2O_2 损伤组比较; b 为 $P < 0.01$, c 为 $P < 0.05$ 与辛伐他汀组比较。

3 讨论

氧化应激和炎症是 As 发生的两个关键因素, 氧化应激贯穿于 As 的全过程, 早期始于内皮功能受损, 并通过氧化诱发和加重炎症反应, 炎症又通过炎症细胞等释放大量的活性氧簇和炎症介质促进氧化, 即它们相互调控, 共同作用加重血管内膜损伤, 促进 As 的发生与发展^[6]。 H_2O_2 是一类活性氧, 能直接氧化内皮细胞膜上的脂质、蛋白, 并穿过细胞膜对细胞产生氧化损伤, 诱发一系列损伤后反应。

TSG 具有较强的抗氧化作用, 能提高清除氧自由基的能力, 对血管内皮细胞缺氧复氧损伤具有明显的保护作用^[8-9], 实验结果发现, H_2O_2 造成明显的内皮细胞损伤, 不同浓度 TSG 处理后, 细胞存活率较 H_2O_2 损伤组显著上升, 表明 TSG 能明显改善 H_2O_2 损伤后内皮细胞的活性, 具有抗 H_2O_2 诱导的内皮细胞损伤作用。NF- κ B 是一种具有多向转录调节作用的蛋白因子, 活性氧可以直接激活 NF- κ B, 活化的 NF- κ B 即可作为活性氧诱导动脉粥样硬化反应的介导剂, 进入细胞核后, 诱导靶基因的转录, 促进各种炎症介质释放而导致细胞的损伤。因此

NF- κ B / κ B 途径被认为是炎症信号传导的关键。本研究发现, H_2O_2 刺激可引起内皮细胞中 NF- κ B、TNF- α 的表达上调, 而对 κ B 的表达未见影响; TSG 能显著抑制 H_2O_2 诱导的 HUVEC NF- κ B 和 TNF- α 的表达, 提示 TSG 能通过抗氧化作用而降低 NF- κ B 的表达和减少炎症因子的产生。氧化应激与炎症在 As 发生、发展中始终伴随并相互调控, NF- κ B 活化后可激活炎症相关靶基因, 炎症因子升高后又可进一步激活 NF- κ B^[6, 7, 10], 但在本研究中发现 κ B 的表达均无表达差异, 是否还存在其他因素使 NF- κ B 活化还有待深入研究。

NF- κ B 与 As 发生、发展密切相关, 是对各种相关因子的表达调控的中间环节, 干预 NF- κ B 可作为防治 As 的靶点。研究发现抗氧化剂维生素 E 和维生素 C 能下调冠状动脉内膜 NF- κ B 活性, 使内皮功能恢复正常, 血管紧张素转化酶抑制剂和血管紧张素受体拮抗剂也可以抑制 NF- κ B 的活化, 减轻或阻止 As 的进展^[10-11]。TSG 作为何首乌中主要药效成分, 本实验显示 TSG 能够下调内皮细胞过度表达的 NF- κ B, 提示 TSG 在防治 As 中可能具有一定的应用前景, 但其作用的确切机制尚需进一步研究。

【参考文献】

- [1] Zhang W, Wang YQ, Li F, et al. Effects of 2,3,4',5'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside on expression of ICAM-1, VCAM-1 and VEGF in atherosclerotic rats [J]. *Clin Pharmacol Bull* 2007; 23 (12): 1630-635
- [2] Lv LS, Gu XH, Tang J, et al. Antioxidant activity of stilbene glycosides from polygonum multiflorum [J]. *Food Chemistry* 2007; 104 (4): 1678-681
- [3] 王春英, 张兰桐. 何首乌中有效成分二苯乙烯苷的研究进展 [J]. 河北医科大学学报, 2008; 29 (1): 157-160
- [4] 张伟, 李锋, 王玉琴, 等. 二苯乙烯苷对实验性动脉粥样硬化大鼠血脂和炎症因子的调节作用 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2007; 12 (5): 516-520
- [5] 沈燕, 王春华, 王玉琴, 等. 二苯乙烯苷对动脉硬化大鼠一氧化氮合酶及其基因的调节作用 [J]. *中国中药杂志*, 2008; 33 (8): 919-923
- [6] Bonomini F, Tengattini S, Fabian A, et al. Atherosclerosis and oxidative stress: Histopathology [J]. 2008; 23 (3): 381-390
- [7] 陈瑗, 周玫. 氧化应激-炎症在动脉粥样硬化发生发展中作用研究的新进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; 16 (10): 757-762
- [8] 胡存华, 赵立波, 王晓敏, 等. 二苯乙烯苷增强正常血管内皮细胞抗氧化作用研究 [J]. *医药导报*, 2007; 26 (2): 138-139
- [9] 刘莉萍, 杨耀防, 何明, 等. 二苯乙烯苷对人脐静脉血管内皮细胞缺氧复氧损伤的影响 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009; 13 (7): 1320-1323
- [10] Van der Heiden K, Cuihmann S, Luong le A, et al. Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010; 118 (10): 593-605
- [11] Yates LL, Grecki DC. The nuclear factor-kappaB (NF-kappaB): from a versatile transcription factor to a ubiquitous therapeutic target [J]. *Acta Biochim Pol* 2006; 53 (4): 651-662

(此文编辑 李玲玲)