

· 论 著 ·

Nrf2 活化下调 AGEs 诱导的内皮细胞活性氧水平*

刘洪彬¹, 于世勇^{2△}

(1. 重庆市九龙坡区第五人民医院内科 401329; 2. 第三军医大学新桥医院心内科, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨激活红系衍生的核因子 2 相关因子 2(Nrf2)对晚期糖基化终末产物(AGEs)作用下的内皮细胞内活性氧(ROS)水平的影响。方法 培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs),通过 Nrf2 激动剂莱菔硫烷(SFN)激活 Nrf2,观察 AGEs 刺激下 HUVECs 细胞 ROS 生成情况。结果 Nrf2 活化可显著降低 AGEs 刺激后内皮细胞 ROS 水平($P < 0.05$)。结论 增强 Nrf2 信号通路活性,能起到拮抗 AGEs 诱导内皮细胞氧化损伤的作用,从而为动脉粥样硬化尤其是糖尿病心血管并发症的防治提供新的思路和靶点。

关键词:内皮细胞;活性氧;红系衍生的核因子 2 相关因子 2;晚期糖基化终末产物

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.33.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)33-3329-02

Activation of Nrf2 decreased reactive oxygen species in endothelial cells stimulated by advanced glycation end products*

Liu Hongbin¹, Yu Shiyong^{2△}

(1. Department of Internal Medicine, the Fifth People's Hospital of Jiulongpo District, Chongqing 401329, China;

2. Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the role of Nrf2 activation in the generation of intracellular ROS in endothelial cells stimulated by AGEs. Methods Human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) were cultured and incubated with AGEs and intracellular ROS was measured with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCF-DA). Sulforaphane was used to activate Nrf2. The role of Nrf2 in the generation of ROS was observed. Results Nrf2 activation inhibited the generation of intracellular ROS significantly($P < 0.05$). Conclusion Enhancement of Nrf2 pathway can reduce the AGEs-induced oxidative injury of endothelial cells, and indicate a potential target for the inhibition of the atherogenic signals triggered by AGEs.

Key words: endothelial cells; reactive oxygen species; nuclear factor-erythroid 2-related factor 2; advanced glycation end products

晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)主要通过增加细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成引起血管内皮细胞损伤,从而触发和加重动脉粥样硬化^[1-3]。近年来研究表明,病理状态下,细胞受到损伤因素的作用发生氧化损伤时其抗氧化基因的表达会代偿性上调,一定程度上拮抗氧化损伤^[1-2],而红系衍生的核因子 2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)信号通路在细胞抗氧化反应中发挥中枢调控作用^[3]。因此,采取措施增强 Nrf2/ARE 信号通路活性,可能起到拮抗 AGEs 诱导内皮细胞氧化损伤的作用。为此,本研究以体外培养内皮细胞为实验模型,通过 Nrf2 激动剂莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)激活 Nrf2/ARE 信号通路,观察 AGEs 作用下内皮细胞活性氧水平变化。

1 材料与与方法

1.1 试剂 DMEM 培养基、I 型胶原酶、优质胎牛血清购自 Gibco 公司,内皮细胞生长添加剂(ECGS)购自 BD Bioscience 公司,D-葡萄糖、牛血清蛋白(BSA)、二氯二氢荧光素二乙酯(DCF-DA)、SFN 购自 Sigma 公司,兔多克隆 Nrf2 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司, β -actin 兔多克隆抗体、辣根酶标记山羊抗兔 IgG、FITC 标记山羊抗兔 IgG 购自中杉金桥生物技术公司。

1.2 AGEs 的制备 参照 Horiuchi 等^[4]的方法将 1.6 g 牛血清蛋白与 3.0 g D-葡萄糖溶于 10 mL 0.5 mmol/L (pH 7.4)磷酸二氢盐缓冲液(PBS)中,0.22 μ m 微孔膜过滤除菌,37 $^{\circ}$ C 孵育 90 d,实验前用 0.5 mmol/L (pH 7.4) PBS 透析 48 h 去除未结合的葡萄糖。紫外荧光分光光度计检测其激发光波长峰

值为 370 nm,发射光波长峰值为 440 nm,符合 AGEs 特征性荧光光谱。考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,以蛋白浓度代表 AGEs 的浓度。

1.3 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的分离与培养 在无菌条件下,取健康新生儿脐带,长度不少于 20 cm。用温 PBS 液将脐带表面冲洗干净,剪除破损或有夹痕及血肿部分,用温 PBS 液反复将静脉内残血冲洗干净,再用血管钳夹闭脐带另一端,注入 0.1% I 型胶原酶消化液,使管腔充盈,37 $^{\circ}$ C,作用 15 min。松开一端血管钳,收集脐静脉内的消化液,然后注入温 PBS 再次冲洗管腔,以获得更多的内皮细胞,将消化液和冲洗液一并注入离心管,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 PBS 液,轻轻吹打,使其悬浮后再次离心,以洗去残留的胶原酶溶液,然后向沉淀中加入 DMEM 培养液(内含 20% 优质胎牛血清、50 μ g/mL ECGS、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素),重悬细胞,接种于 50 mL 一次性塑料培养瓶中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度孵箱中培养,24 h 后换液,以后每 2 天换液一次。待细胞融合 70%~80%后,按 1:2 比例传代培养。免疫荧光法检测 VIII 因子相关抗原进行内皮细胞鉴定。实验用第 3 代细胞。

1.4 实验分组与处理 将 HUVECs 接种至 25 mL 培养瓶或 24 孔培养板,待细胞生长至融合状态后,无血清培养液培养 24 h,随机分为 3 组。AGEs 刺激组:加入 600 μ g/mL AGEs 孵育 16 h;AGEs 刺激+SFN 干预组:在加入 AGEs 30 min 前加入 SFN(5 μ mol/L),并与 AGEs 一起与 HUVECs 共同孵育直至最后检测;对照组:加入 600 μ g/mL 的 BSA。所有实验均重复

3 次。

1.5 蛋白质印迹检测 Nrf2 蛋白表达 用 4 °C 预冷的 PBS 轻轻漂洗培养瓶中细胞,然后加入适量 PBS,用细胞刮使细胞脱壁,转移到离心管中,加入 RIPA(含 10 μL PMSF)细胞裂解液,提取蛋白。取 50 μg 细胞蛋白行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转印至硝酸纤维素膜上,用含 5% 封闭液封闭膜 1 h,加入 1:200 稀释的兔多克隆 Nrf2 抗体室温孵育 2 h,TBS 洗膜 5 min×3,加 1:1000 稀释的辣根酶标记山羊抗兔 IgG 二抗,37 °C 孵育 1 h,洗膜 5 min×3 次,ECL 化学发光法压片显影。

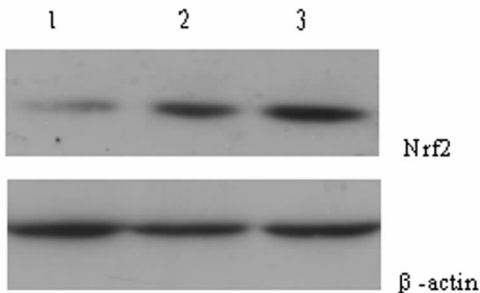
1.6 免疫荧光染色检测 Nrf2 蛋白核转位 细胞接种于 12 孔板,处理结束后吸弃培养板中培养液,4% 多聚甲醛固定 15 min,0.2% Triton X-100 破膜 15 min,10% 山羊血清室温封闭 60 min,加入兔多克隆 Nrf2 抗体(1:100 稀释),4 °C 过夜,加入 FITC 标记山羊抗兔 IgG,37 °C 避光孵育 60 min,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)对细胞核进行复染,荧光显微镜下观察。

1.7 细胞内活性氧的测定 将 HUVECs 与 5 mmol/L DCF-DA 在 37 °C 避光孵育 30 min,PBS 清洗 3 次,流式细胞仪分析荧光强度,即为细胞内 ROS 水平。

1.8 统计学处理 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS10.0 软件进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SFN 对 Nrf2 蛋白表达量的影响 为观察 AGEs 刺激后 Nrf2 蛋白的代偿性表达情况以及 SFN 对 Nrf2 的激动作用,本研究首先采用蛋白质印迹检测了内皮细胞 Nrf2 蛋白的表达。结果显示 AGEs(600 μg/mL,16 h)刺激后,内皮细胞内 Nrf2 蛋白表达上调($P < 0.05$),同时应用 SFN 使 Nrf2 的表达进一步明显增加($P < 0.05$),见图 1。



1:对照组;2:AGEs 刺激组;3:AGEs 刺激+SFN 干预组。

图 1 蛋白质印迹检测 Nrf2 蛋白表达

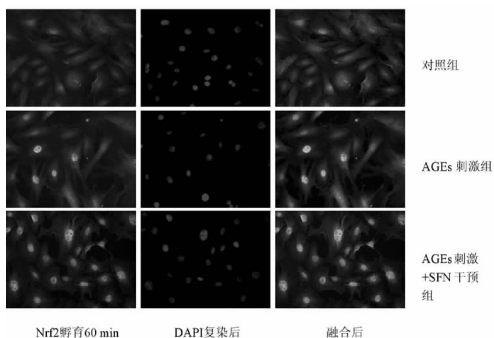


图 2 SFN 对 Nrf2 核转位的影响

2.2 SFN 对 Nrf2 核转位的影响 Nrf2 只有转位进入细胞核,与抗氧化反应元件(antioxidant response elements,ARE)结合,才能激活抗氧化基因的表达,从而发挥抗氧化效能。为此,

本研究采用免疫荧光染色检测了 Nrf2 蛋白的核转位情况。结果显示内皮细胞未受刺激时,Nrf2 分布于细胞质中,AGEs(600 μg/mL,16 h)刺激后,部分细胞 Nrf2 发生核转位,同时应用 SFN 后 Nrf2 核转位明显增加,见图 2。

2.3 Nrf2 活化对 AGEs 诱导的内皮细胞 ROS 水平的影响 流式细胞检测细胞内 ROS 结果显示,AGEs 刺激后 HUVECs 细胞内 ROS 增加($P < 0.01$),而 SFN 能显著降低内皮细胞 ROS 水平($P < 0.01$),见图 3。

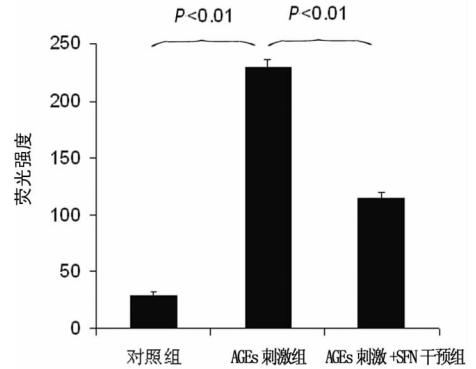


图 3 SFN 对 AGEs 作用下内皮细胞 ROS 的影响

3 讨论

AGEs 在体内形成后难以通过自身代谢或者药物予以清除,因此,采取措施减轻或逆转内皮细胞氧化损伤成为对抗 AGEs 血管损伤效应的难点和热点。清除 ROS、减少细胞内 ROS 的蓄积是最直接的方法,但是临床上多种抗氧化剂(维生素 C、E 和类胡萝卜素等)预防心血管终点事件的大型临床试验结果均以失败告终^[5-9],表明这一治疗途径是有缺陷的。当前的研究证实烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶是内皮细胞 ROS 生成的主要来源^[10-11],阻断 NADPH 氧化酶可能具有防治 AGEs 的血管损伤作用。但是,NADPH 氧化酶体内分布十分广泛,是重要的氧化还原信号调控分子,比如在吞噬细胞抵御微生物的非特异性反应中必不可少,阻断后会引发严重后果。因此,迫切需要寻找新的途径防治内皮细胞氧化损伤。

生理状态下,内皮细胞本身存在抗氧化机制,可以清除过多 ROS,维持细胞氧化还原自稳态。在细胞受到损伤因素的作用发生氧化损伤时其抗氧化基因的表达会代偿性上调,一定程度上拮抗氧化损伤^[1-2]。Ahmed 等^[12]的研究发现在糖尿病时抗氧化酶的表达是增高的,伴有内皮型一氧化氮合酶(eNOS)表达的上调^[13-14]。说明发生糖尿病血管病变时也存在这样一种代偿机制。而 Hink 等^[15]的研究表明虽然 eNOS 表达上调,但一氧化氮(NO)是降低的,说明内皮细胞虽然存在抗氧化机制,但不足以对抗持续增高的 ROS。这就提示,调控细胞内抗氧化酶/蛋白表达,提高细胞抗氧化损伤能力,是对抗 AGEs 致内皮细胞氧化损伤,进而防治动脉粥样硬化的一个新途径。

本研究从 Nrf2 这一细胞抗氧化反应中发挥中枢调控作用的分子入手,结果表明 AGEs 诱导内皮细胞发生氧化损伤时,伴有 Nrf2 蛋白表达和核转位的代偿性增加,但不足以拮抗持续增加的 ROS,采用 SFN 激活 Nrf2 后,观察到 AGEs 作用下内皮细胞 ROS 水平明显降低。提示采取措施增强 Nrf2 信号通路活性,能起到拮抗 AGEs 诱导内皮细胞氧化损伤的作用,达到防治动脉粥样硬化的目的,为动脉粥样硬化尤其是糖尿病心血管并发症的防治提供了新的思路和靶点。(下转第 3334 页)

- [2] 何进才,周小梅,黄涛,等.反向杂交法检测 23 种人乳头瘤病毒型别的研究[J].中华检验医学杂志,2007,30(1):44-47.
- [3] 刘树范.浅析巴氏五级分类法与 TBS 描述性诊断报告方式[J].中国实用妇科与产科杂志,2003,19(3):135-137.
- [4] Munoz N,Bosch FX,Castellsague X,et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective[J]. Int J Cancer, 2004,111(2):278-285.
- [5] 汤福想,刘玉玲,王会娟.妇女宫颈 HPV 感染及基因亚型分布[J].实用预防医学,2010,17(9):1717-1719.
- [6] 赵健,杨英捷,廖泰平. 导流杂交基因芯片技术在人乳头状瘤病毒感染分型检测中的临床应用[J].中华检验医学杂志,2006,12(12):1148-1151.
- [7] An HJ,Cho NH,Lee SY,et al. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus(HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method[J]. Cancer,2003,97(7):1672-1680.
- [8] 朱一剑,丁显平,周仲春,等. 妇科疾病中人乳头瘤病毒感染的分子流行病学调查[J].中国妇幼保健,2007,22(19):2691-2694.
- [9] 关婷,张志文,谢燕芳,等. 人乳头瘤病毒基因型与宫颈上皮内瘤样病变的关系[J].中国妇幼保健,2006,21(7):960-963.
- [10] 毕蕙,赵健,陈锐,等. 人乳头瘤病毒感染亚型与宫颈上皮内瘤变的相关性[J].中国实用妇科与产科杂志,2010,26(5):362-364.
- [11] Lobaton AT,Herrera GR,Rojo AT,et al. Cervical cancer current view of its epidemiology and risk factors[J]. Gynecol Obstet Mex,2004,72:466-474.
- [12] Hrubec KK,Mrad K,Sriha B,et al. HPV types and variants among cervical cancer tumors in three regions of tunisia[J]. J Med Virol,2011,83(4):651-657.
- [13] Datta SD,Koutsky LA,Ratelle S,et al. Human papillomavirus infection and cervical cytology in women screened for cervical cancer in the United States,2003—2005[J]. Ann Intern Med,2008,148:493-500.
- [14] 孟晓峰,刘琳. 河南洛阳地区女性人乳头瘤病毒感染与年龄相关分析[J].中国误诊学杂志,2011,11(12):2880-2881.
- [15] 徐虹,张巨香,施晓华,等. 乐清地区妇女宫颈 HPV 感染及亚型分布调查研究[J].中国现代医生,2009,47(15):17-19.
- [16] Bao YP,Ni L,Smith JS,et al. Human papillomavirus type distribution in women from Asia;a meta analysis[J]. Int J Gynecol Cancer,2008,18(1):71-79.

(收稿日期:2011-08-24 修回日期:2011-09-22)

(上接第 3330 页)

参考文献:

- [1] Mueller CF,Laude K,McNally JS,et al. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2005,25(2):274-278.
- [2] Levonen AL,Vahakangas E,Koponen JK,et al. Antioxidant gene therapy for cardiovascular disease:current status and future perspectives [J]. Circulation, 2008, 117(16):2142-2150.
- [3] Nguyen T,Nioi P,Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress[J]. J Biol Chem,2009,284(20):13291-13295.
- [4] Horiuchi S,Araki N,Morino Y. Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of maillard reaction[J]. J Biol Chem,1991,266(12):7329-7332.
- [5] Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF heart protection study of antioxidant vitamin supplementation in 20536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial[J]. Lancet,2002,360(9326):23-33.
- [6] Yusuf S,Dagenais G,Pogue J,et al. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators [J]. N Engl J Med,2000,342(3):154-160.
- [7] Scheen AJ. Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular diseases. 2nd part:results of clinical trials[J]. Rev Med Liege,2000,55(2):105-109.
- [8] Jialal I,Devaraj S,Vitamin E. Supplementation and cardiovascular events in high-risk patients[J]. N Engl J Med, 2000,342(25):1917-1918.
- [9] Meydani M. Vitamin E and prevention of heart disease in high-risk patients[J]. Nutr Rev,2000,58(9):278-281.
- [10] Dworakowski R,Alom-Ruiz SP,Shah AM. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype[J]. Pharmacol Rep,2008,60(1):21-28.
- [11] Abid MR,Spokes KC,Shih SC,et al. NADPH oxidase activity selectively modulates vascular endothelial growth factor signaling pathways [J]. J Biol Chem, 2007, 282(48):35373-35385.
- [12] Ahmed FN,Naqvi FN,Shafiq F. Lipid peroxidation and serum antioxidant enzymes in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Ann N Y Acad Sci,2006,1084:481-489.
- [13] Ding H,Aljofan M,Triggle CR. Oxidative stress and increased eNOS and NADPH oxidase expression in mouse microvessel endothelial cells[J]. J Cell Physiol,2007,212(3):682-689.
- [14] Su J,Lucchesi PA,Gonzalez-Villalobos RA,et al. Role of advanced glycation end products with oxidative stress in resistance artery dysfunction in type 2 diabetic mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2008,28(8):1432-1438.
- [15] Hink U,Li H,Mollnau H,et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus[J]. Circ Res, 2001,88(2):e14-22.

(收稿日期:2011-08-24 修回日期:2011-09-22)