

灯盏花素对内皮细胞的保护作用及机制

陈建萍¹, 任新生¹, 孙中华², 郭再玉^{1*}(¹天津泰达医院, 天津 300457; ²天津泰达国际心血管病医院, 天津 300457)

摘要 探讨灯盏花素对内皮细胞的保护作用及机制。采用不同浓度的灯盏花素(10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$)对人脐静脉内皮细胞(HUVEC 细胞)预处理 4 h, 再采用氧化型低密度脂蛋白诱导细胞氧化损伤 20 h, 然后检测细胞的改变, 包括采用 MTT 方法检测细胞增殖活力、流式细胞仪检测细胞凋亡及活性氧含量, 以及蛋白免疫印迹及定量 PCR 方法检测细胞信号通路关键分子的改变。实验结果发现, 灯盏花素可以逆转氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞的损伤并呈剂量依赖效应, 并减少内皮细胞的凋亡。为探索灯盏花素的作用机制, 首先检测了细胞与多种浓度及时间(2, 4, 6 h)的灯盏花素预孵育后的活性氧含量改变, 结果发现灯盏花素可剂量及时间依赖地减少活性氧的产生。进一步发现, 细胞信号通路分析发现灯盏花素可促进 BCL-2 的表达, 抑制 BAX 的表达及细胞色素 C 的释放及 caspase-3 的剪切。灯盏花素可减少 Keap1 及激活 Nrf2 的核内转运, 促进下游抗氧化酶 NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1 (NQO1) 和谷胱甘肽-S-转移酶 Mu1 型 (GSTM1) 的基因转录及蛋白表达, 增强 NQO1 酶活。此外, 灯盏花素还可减少 IKK 及 IKB 及抑制 NF- κ B 核内转运, 而促进 eNOS 的表达。本研究表明灯盏花素对氧化型低密度脂蛋白诱导的内皮细胞损伤有保护作用, 其作用可能与其抗氧化作用及抑制 NF- κ B 活化有关。

关键词 灯盏花素; 活性氧; 内皮细胞; 细胞凋亡

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)05-0610-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150516

Protective effects and mechanisms of breviscapine on endothelial cells

CHEN Jianping¹, REN Xinsheng¹, SUN Zhonghua², GUO Zaiyu^{1*}¹Tianjin TEDA Hospital, Tianjin 300457; ²Tianjin TEDA International Cardiovascular Hospital, Tianjin 300457, China

Abstract This study was to investigate the protective effects and mechanisms of breviscapine on endothelial cells. ox-LDL was used to induce oxidative damage on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) for 20 h with or without 4 h pretreatment of various concentrations of breviscapine (10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$), then observe the protective effect and mechanism of breviscapine on endothelial cells insulted by ox-LDL. MTT method was used to detect cell viability, flow cytometry was used to detect cell apoptosis and reactive oxygen species, and Western blot and RT-PCR was used to detect cell signaling pathways. The results showed that breviscapine recovered HUVEC cell viability in a dose-dependent manner which inhibited by ox-LDL, and it also protected cell from apoptosis induced by ox-LDL. To explore the mechanisms of breviscapine, reactive oxygen species (ROS) was determined after pretreatment of various concentrations of breviscapine or different durations (2, 4, 6 h) of breviscapine. Results showed that breviscapine decreased ROS production in a dose- and time-dependent manner. Furthermore, cell signaling pathway analysis showed that breviscapine increased the expression of BCL-2, decreased the expression of BAX and the release of Cytochrome C and cleavage of caspase-3. Breviscapine decreased Keap1 and activated the nuclear import of Nrf2, and subsequently increased the mRNA and protein expression of downstream antioxidant enzyme as NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and glutathione transferase-S-Mu 1 (GSTM1), and increasing the activity of NQO1. Besides, breviscapine decreased IKK and IKB, and inhibited nuclear translocation of NF- κ B, while increasing the expression of eNOS. This study demonstrated that breviscapine has a protective role on ox-LDL-induced endothelial cell injury, which may be related to its antioxidant effects and inhibition of NF- κ B activation.

Key words breviscapine; reactive oxygen species; endothelial cells; cell apoptosis

This work was supported by the Joint Research Program of Municipal Bureau of Health of Tianjin Binhai New Area (No. 2012BWKL026)

灯盏花素(breviscapine)是从灯盏花全株植物中提取的黄酮成分,作为中药提取物广泛应用于临床治疗心脑血管缺血性疾病,如脑栓塞、脑溢血等所致后遗症病人。药理学研究表明,灯盏花素具有扩张心脑血管、改善微循环及抗血小板聚集的作用^[1]。灯盏花素可抑制蛋白激酶C(PKC)及改善糖尿病肾病^[2],还可抑制PKC通路介导的心肌肥大^[3-4]。此外,灯盏花素可抑制饮食诱导的高胆固醇血症^[5],以及通过抑制ERK1/2 MAPK通路来抑制平滑肌细胞的增殖^[6],提示其在动脉粥样硬化治疗中具有一定的应用前景。

氧化损伤是导致动脉粥样硬化发生的重要机制之一,它通过活性氧可以攻击内皮细胞的蛋白质、核酸及脂质,破坏细胞的正常结构及功能,导致血管病变的发生发展^[7-8]。活性氧导致的脂质过氧化进一步导致动脉粥样硬化的发生发展^[9-10]。鉴于脂质过氧化在动脉粥样硬化发病中的重要作用及灯盏花素的药用价值,本研究探索了灯盏花素对内皮细胞受到脂质过氧化损伤的保护作用及机制,为其在防治动脉粥样硬化中的作用提供理论基础。

1 材料

1.1 试剂

灯盏花素(上海同田生物技术有限公司);抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、活性氧检测试剂盒、Annexin V及PI双染检测试剂盒、线粒体分离试剂盒及核蛋白分离试剂盒(江苏碧云天生物技术有限公司);eNOS、Bcl-2、Bax、caspase-3、细胞色素C、NF- κ B、GAPDH、Nrf2、NAD(P)H:醌氧化还原酶1(NQO1)、谷胱甘肽-S-转移酶Mu1型(GSTM1)、Keap1、IKK、IKB、pIKB及H3的抗体(美国Abcam公司);BCA蛋白定量试剂盒(美国Life Technologies公司);SYBR荧光定量试剂盒(大连宝生物工程技术有限公司);胎牛血清(美国Gibco公司);DEME培养基(美国Invitrogen公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

SPECTRA MAX190酶标仪(美国Sunnyvale公

司);FACS-Calibur流式细胞仪(美国BD公司)。

1.3 细胞株

HUVEC细胞株购于美国ATCC细胞库,在含10%的胎牛血清的DMEM培养基中,置于37℃ 5% CO₂培养箱中培养。

2 方法

2.1 MTT法检测细胞增殖活力

灯盏花素用DMSO配成20 mmol/L的母液,实验时用培养液稀释至相应的浓度。HUVEC接种于96孔培养板,每孔5 000个细胞,实验组分别给予终浓度为40,20,10 μ mol/L的灯盏花素,以0.1% DMSO为溶剂对照。在灯盏花素抗氧化的实验中,先用不同浓度的灯盏花素预处理细胞4 h后,然后再加入20 μ g/mL氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)再孵育20 h。加药作用后,每孔加入5 mg/mL MTT 20 μ L,孵育4 h,弃培养液,然后每孔加入DMSO 150 μ L,摇匀10 min,然后置酶标仪在波长490 nm处测定每孔吸收度,以对照组细胞为100%,其他组根据吸收度进行相应的换算。每组设4个复孔,重复测定3次。

2.2 Annexin V和PI双染检测细胞的凋亡

将HUVEC细胞按每孔 4×10^5 细胞的密度接种于6孔培养板中,待细胞贴壁过夜后加入灯盏花素使终浓度为40,20,10 μ mol/L,预处理4 h,然后再加入20 μ g/mL ox-LDL再孵育24 h。胰酶消化收集细胞,4℃ 1 000 r/min离心5 min,弃上清液;用预冷的PBS洗2次,细胞重悬于冷的1 \times 结合缓冲液。然后每0.5 mL结合缓冲液加入annexin-V-FITC染色溶液5 μ L和溴化丙啶(PI)染色溶液5 μ L,室温避光孵育10 min,用流式细胞仪检测。

2.3 活性氧的检测

活性氧检测试剂盒是一种利用荧光探针DCFH-DA进行活性氧检测的试剂盒。将HUVEC细胞接种至6孔板的培养板中,细胞密度为每毫升 1×10^5 个,种板过夜后,细胞加入不同浓度的灯盏花素(10,20,40 μ mol/L)或5 mmol/L NAC预处理4 h,然后加入20 μ g/mL ox-LDL再孵育20 h,对照为0.1% DMSO。更换培养液,内含10 μ mol/L

DCFH-DA,37 ℃细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。最后用流式细胞仪进行检测(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm)。以平均荧光强度代表活性氧的含量,每组设 3 个复孔。在不同预处理时间的实验中,用灯盏花素(20 μmol/L)分别预孵育 2,4,6 h,然后加入 20 μg/mL ox-LDL 再孵育 20 h,对照为 0.1% DMSO,每组 3 个复孔,最后也采用上述方法进行检测。

2.4 蛋白免疫印迹分析

HUVEC 细胞接种至 6 孔板,每孔的细胞数为 5×10^5 个,种板过夜后,第 2 天加药,40 μmol/L 灯盏花素预处理细胞 4 h 后,然后加入 20 μg/mL ox-LDL 再孵育 20 h。用蛋白裂解液(RIPA)收集细胞的总蛋白直接用于蛋白免疫印迹分析,包括 eNOS、Bcl-2、Bax、caspase-3、NQO1、GSTM1。此外,细胞样本用线粒体分离试剂盒及核蛋白分离试剂盒,分别分离无线粒体的胞浆及细胞核,再用于细胞色素 C、NF-κB、IKB、pIKB、IKK、Nrf2 及 Keap1 蛋白免疫印迹分析。蛋白免疫印迹方法简述如下:每孔细胞总蛋白的上样量为 10 μg,用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后用转移至硝酸纤维素膜。用 5% 脱脂奶粉的含 0.1% 的 Tris 缓冲液(TBST)室温封闭 2 h,再用一抗在 4 ℃孵育过夜。一抗用 TBST 洗涤后,再用相应的二抗在室温孵育 1 h,最后用相应灵敏度的 ECL 发光剂进行发光。

2.5 NQO1 的活性测定

HUVEC 细胞接种于 10 cm 的培养皿,每皿的

细胞数为 5×10^6 个。24 h 后,加入不同浓度的灯盏花素(10,20,40 μmol/L)预处理 4 h,然后加入 20 μg/mL ox-LDL 再孵育 20 h,对照为 0.1% DMSO。细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,再刮下来并离心收集细胞沉淀冻存于 -80 ℃,用于酶活测定。NQO1 的活性测定采用文献的报道方法^[11],即反应体系中含有甲萘醌(menadione)及 MTT,通过反应产生 NADPH,进一步还原 MTT 产生 610 nm 波长的蓝色物质,通过酶标仪检测吸收度。总蛋白含量用 BCA 方法进行定量,并对 NQO1 酶活进行校准。

2.6 定量 PCR

HUVEC 细胞接种于 6 孔板,每孔细胞数为 4×10^5 个。24 h 后,加入不同浓度的灯盏花素(10,20,40 μmol/L)预处理 4 h,然后加入 20 μg/mL ox-LDL 再孵育 20 h,对照为 0.1% DMSO。样品总 RNA 提取采用 Trizol 提取方法。通过 A_{260}/A_{280} 测定 RNA 浓度和纯度,取总 RNA 1 μg 逆转录成 cDNA。

定量 PCR 的 Nrf2、NQO1、GSTM1 及内参 β-actin 基因的引物见表 1。采用 SYBR 荧光法进行检测,反应体系包含如下:引物(0.4 μmol/L),模版(1 μL),混合反应液为 12.5 μL 及补水至 25 μL。至 PCR 反应条件:94 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 30 s,60 ℃延伸 1 min,重复 40 个循环。PCR 结果用内参基因 β-actin 进行校准,计算 $\Delta\Delta CT$,对照组的基因表达设定为 1,其他组的基因表达进行相应的转换。实验每组 3 个重复孔,重复 3 次实验。

Table 1 Real-time PCR primers

Gene	Forward primer	Reverse primer
Nrf2	5'-CTTCCAGCTATGGAGACACA-3'	5'-GGTGTTTTAGGACCATTCTG-3'
NQO1	5'-CCGAGTCTGTTCTGGCTTAT-3'	5'-GGGAAGTGAATATCACAAAG-3'
GSTM1	5'-TCCCAATCTGCCCTACTTGA-3'	5'-TGCTCTCCCCACACAGGTGTG-3'
β-actin	5'-GATCAGCAAGCAGGAGTATG-3'	5'-TGTCAGAAAGGGTCTAACG-3'

2.7 统计学分析

每组的数据用 $\bar{x} \pm s$ 标准差表示,多组间的计量资料用 One-Way ANOVA 分析,采用 SPSS 13.0 软件进行统计, $P < 0.05$ 为统计学有显著差异。

3 结 果

3.1 灯盏花素对 ox-LDL 造成的损伤有保护作用

实验结果显示 HUVEC 细胞与不同浓度的灯

盏花素(10,20,40 μmol/L)共同孵育 48 h 后,细胞的增殖活力无显著改变(图 1-A),可见灯盏花素的作用缓和,并不影响内皮细胞的增殖活力。鉴于 ox-LDL 在内皮细胞病变过程中起着重要的促进作用,因此本研究考察灯盏花素是否对内皮细胞受到 ox-LDL 的损伤存在保护作用。结果发现,ox-LDL 刺激 20 h 后,内皮细胞的增殖活力显著减少,而在加入灯盏花素预处理后,细胞的增殖活力显著受到

改善,并呈剂量依赖效应(图 1-B)。这一结果表明,灯盏花素虽然本身对正常条件下内皮细胞的增

殖活性无显著影响,但它可以改善刺激因子 ox-LDL 造成的内皮细胞损伤。

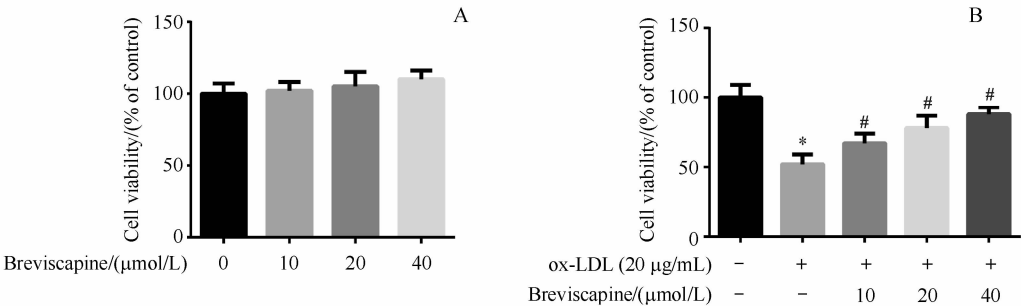


Figure 1 Effect of breviscapine on viability of HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
A: Breviscapine had no significant effect on viability of HUVEC cells; B: Breviscapine improved the decrease of HUVEC cell viability induced by ox-LDL. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs ox-LDL group

3.2 灯盏花素可抑制 ox-LDL 诱导的细胞凋亡

由图 2-A 可见,ox-LDL 刺激 HUVEC 细胞 20 h 后,DMSO(0.1%)组 HUVEC 细胞大量凋亡,早期凋亡及晚期凋亡的细胞比率共达 30.97%,而在灯

盏花素预处理的各组细胞中,凋亡细胞的比率显著下降,呈剂量相关性(图 2-B)。以上结果表明灯盏花素可抑制 ox-LDL 诱导的细胞凋亡反应。

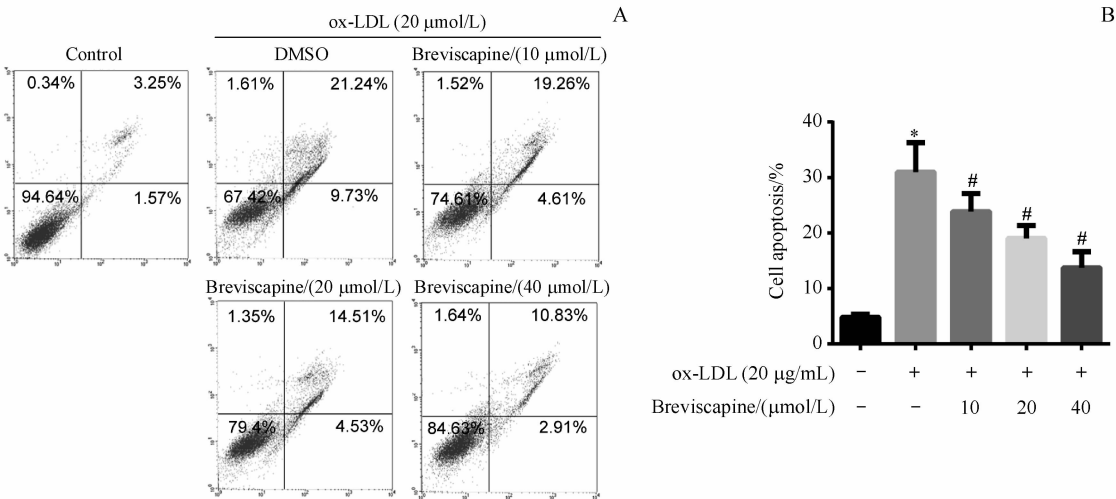


Figure 2 Effect of breviscapine on apoptosis of HUVEC cells
A: Breviscapine decreased the cell apoptosis induced by ox-LDL in a dose-dependent manner; B: Statistical analysis of HUVEC cells apoptosis ($\bar{x} \pm s, n = 3$). * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs ox-LDL group

3.3 灯盏花素可减少内皮细胞的活性氧含量

实验结果显示,ox-LDL 诱导刺激的 HUVEC 细胞活性氧含量显著增加,而阳性对照药物 NAC 及灯盏花素预处理组的含量显著减少,灯盏花素对活性氧的含量随着剂量浓度的增加,抑制逐渐增强(图 3-A)。同时在灯盏花素有效的剂量浓度(20 μmol/L)下,发现灯盏花素在预孵育 2 h 后起效,而在 4 h 及 6 h 后作用较为显著(图 3-B)。这些结果显示灯盏花素具有抑制 ox-LDL 诱导细胞活性氧含量,并存在剂量依赖效应。

3.4 灯盏花素抑制氧化反应及凋亡信号通路分子的表达

如图 4-A 所示,在 ox-LDL 的刺激下,抗氧化的 eNOS 及 Bcl-2 蛋白表达减少,而使用灯盏花素预处理,eNOS 及 Bcl-2 均有所恢复。促凋亡蛋白 Bax 及凋亡剪切蛋白 caspase-3 的含量在 ox-LDL 刺激下增加,而使用灯盏花素预处理,其表达有所减少,这些分子的改变显示灯盏花素对凋亡反应的抑制作用。

细胞色素 C 从线粒体释放至胞浆是线粒体调

亡途径的关键事件。本研究结果显示,胞浆内的细胞色素 C 在 ox-LDL 刺激下释放增加,而使用灯盏花素预处理可抑制细胞色素 C 的释放(图 4-B),与前面的结果一致。

另外,图 4-B 显示,活性氧诱导的炎症反应因子 NF-κB 在 ox-LDL 的刺激下,胞浆内的 NF-κB 含量减少,胞核内的 NF-κB 的含量增加,提示 ox-LDL 诱导 NF-κB 的核内转运,激活 NF-κB 诱导的炎症反应。由于 NF-κB 的核内转运受其抑制因子 IKB

影响,本研究结果发现 IKB 在 ox-LDL 刺激下减少,而使用灯盏花素预处理,IKB 增加,从而抑制 NF-κB 的核内转运。IKB 是通过上游的激酶 IKK 磷酸化调节,IKB 磷酸化后再进一步通过泛素化蛋白酶体途径降解,本研究结果发现灯盏花素可以减少 IKK 及 pIKB 的表达,从而有利于抑制胞浆中 NF-κB 的激活。以上结果可见,在加入灯盏花素的情况下,NF-κB 的核内转运受到显著的抑制,提示灯盏花素还具有抑制炎症反应的作用。

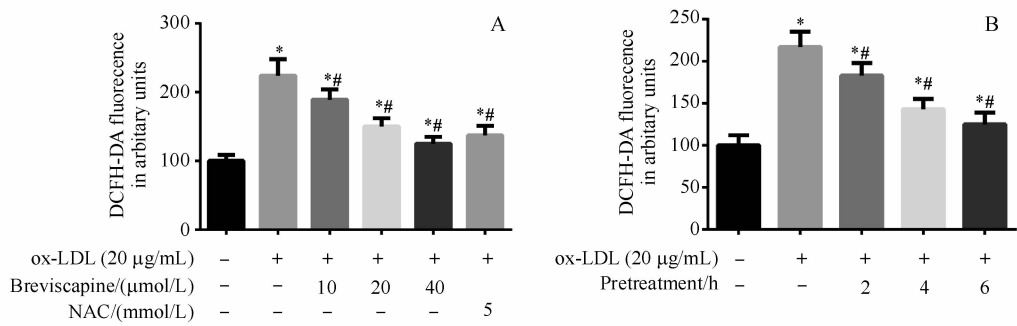


Figure 3 Effect of breviscapine on reactive oxygen species (ROS) in HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
A: HUVEC cells was pretreated with various concentrations of breviscapine or *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) for 4 h, then incubated with ox-LDL for 20 h, the cellular ROS was determined by DCF probe under the flow cytometry, the average fluorescent intensity represents the ROS level; B: HUVEC cells was pretreated with 20 μmol/L of breviscapine for 2, 4 and 6 h, then incubates with ox-LDL for 20 h, the cellular ROS was determined by flow cytometry
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs ox-LDL group

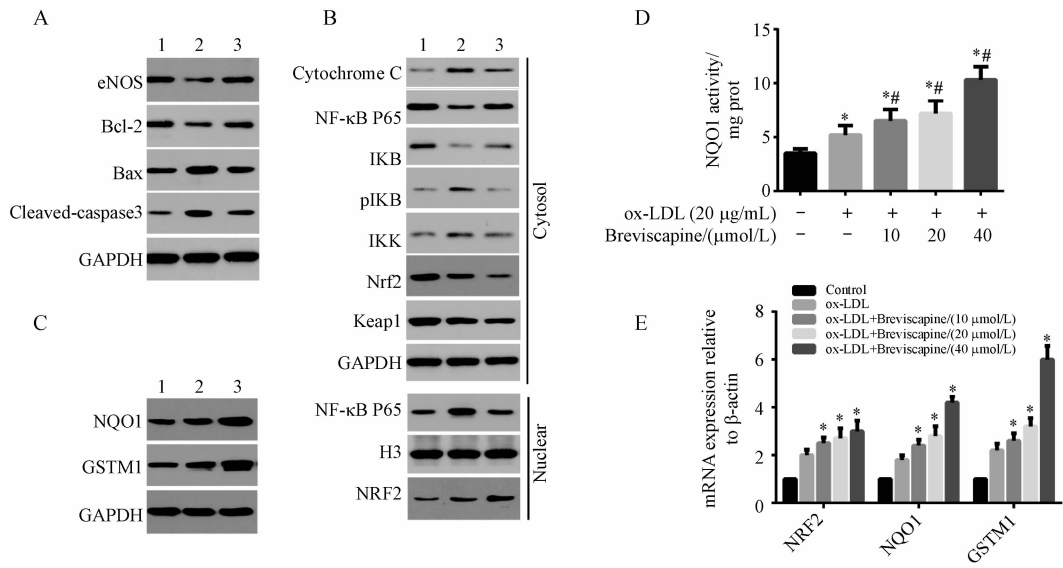


Figure 4 Effect of breviscapine on cell signaling transduction
A: Breviscapine inhibited the decrease of eNOS and Bcl-2 induced by ox-LDL, as well as the increase of Bax and cleavage of caspase-3 (1: control; 2: ox-LDL; 3: ox-LDL + Breviscapine); B: Breviscapine inhibited the release of Cytochrome C and nuclear translocation of NF-κB and Nrf2 induced by ox-LDL, as well as the reversion of the decrease of IKB and the increase of pIKB and IKK, and decreased Keap1 expression; C: Breviscapine increased the expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and glutathione transferase-S-Mu 1 (GSTM1); D: Breviscapine increased the activity of NQO1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$), * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs ox-LDL group; E: Breviscapine increase the mRNA expression of Nrf2, NQO1 and GSTM1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$), * $P < 0.05$ vs ox-LDL group

本研究结果图4-B显示,核转录因 Nrf2 在 ox-LDL 的刺激下有一定的刺激核转运的细胞自身反馈保护作用;而在灯盏花素的作用下,Nrf2 的核转运受到显著的活化,细胞核内的 Nrf2 显著增加,提示 Nrf2 受到灯盏花素的激活。同时本研究也发现 Nrf2 的重要抑制因子 Keap1 (kelch-like ECH-associated protein 1) 也同样在灯盏花素作用后下降,这一变化有利于 Nrf2 的核内转运。为验证下游抗氧化基因诱导效应,本研究检测了 Nrf2 下游关键抗氧化酶的表达,如 NQO1 和 GSTM1 的表达,结果显示这些抗氧化酶的表达显著上升(图4-C),并且促进了 NQO1 的活性(图4-D),随着灯盏花素浓度的增加呈一定的剂量依赖效应,提示 Nrf2 的核转运促进了这些下游蛋白的表达及其酶活。进一步考察灯盏花素对抗氧化酶的基因转录水平影响,结果发现灯盏花素还可促进 Nrf2 的基因转录,并更为显著地促进下游的 NQO1 及 GSTM1 的表达,与蛋白水平的变化一致。以上结果表明灯盏花素对抗氧化体系有显著的增强效应,可能也与其对内皮细胞的保护效应密切相关。

4 讨论

灯盏花素作为活血化瘀药物在临床上广泛使用,显示良好的疗效,其在大量的动物实验中,也显示了其对缺血再灌注损伤的保护作用,这些发现表明灯盏花素的扩血管、改善微循环及抗氧化作用在其药理活性发挥中起着重要的作用。近年来,越来越多的研究显示灯盏花素在心血管疾病中有重要的保护作用,如抑制高脂诱导的胆固醇血症^[5]、抑制血管平滑肌细胞的增殖及运动^[6]。然而,其在心血管疾病中具体的作用机制有待于进一步的深入研究。本研究基于 ox-LDL 导致的内皮细胞损伤在动脉粥样硬化发病中的重要作用,研究了灯盏花素对内皮细胞损伤的保护作用及机制。

本研究中,在一定的浓度下发现灯盏花素对正常培养的内皮细胞的增殖活力无显著作用,但可以抵抗 ox-LDL 对内皮细胞造成的损伤,这一现象提示灯盏花素的抗氧化作用可能对内皮细胞的损伤起到有效的保护作用。有研究显示,灯盏花素对血管平滑肌细胞受到的高糖刺激存在抑制作用^[6],但其有效作用浓度高达 65 $\mu\text{mol/L}$ 及 108 $\mu\text{mol/L}$,因此其在不同的浓度下药理活性有所不同。本研

究结果显示,灯盏花素可显著减轻 ox-LDL 带来的细胞损伤,并有效地减少内皮细胞受 ox-LDL 诱发的凋亡,呈一定的剂量依赖效应。这一结果提示灯盏花素在预防及治疗动脉粥样硬化中的前景,即其可减少内皮细胞的损伤这一发病的起始环节。

本研究探讨了灯盏花素的作用机制。由于 ox-LDL 对细胞的损伤主要是通过诱导氧化损伤及活性氧的产生,诱导细胞凋亡反应及炎症反应的发生。本实验结果表明,灯盏花素有效地减少内皮细胞活性氧的含量,与阳性对照药 NAC 类似。并且,灯盏花素能够逆转凋亡通路的信号蛋白改变,如促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,抑制促凋亡蛋白 Bax 及 caspase-3 的剪切反应,从而抑制凋亡反应的发生。这一凋亡效应可能与通过抑制线粒体细胞色素 C 的释放有关,从而抑制线粒体途径的凋亡通路。灯盏花素还可促进内皮一氧化氮合酶 eNOS 的表达,而 eNOS 在抵抗 ox-LDL 损伤中有重要保护作用^[12-13],提示促进 eNOS 的表达可能在减少细胞凋亡中起作用。本研究也分析了灯盏花素对 NF- κ B 的作用,发现灯盏花素可抑制 NF- κ B 的核转运,提示其可减少 NF- κ B 诱导的炎症反应,这一现象与前期研究报道一致,灯盏花素可抑制肺缺血再灌注损伤引起的炎症因子 ICAM-1 及 IL-18 的表达^[14],抑制胰腺炎症反应中的 PKC 及 NF- κ B 的活性^[15]。结果表明抑制炎症反应是灯盏花素发挥药理活性的重要机制之一。

本研究进一步对灯盏花素的抗氧化作用机制进行探索。众所周知,核转录因子 Nrf2 是抗氧化剂发挥抗氧化作用的关键分子,它受 Keap1 蛋白及泛素降解系统的调控^[16-17]。Nrf2 感受细胞氧化应激的压力,然后通过核转运进入细胞核内启动下游抗氧化基因的表达来抵抗氧化损伤^[18],如促进下游重要抗氧化酶包括 NQO1^[19] 和 GSTM1^[20] 的表达等,NQO1 和 GSTM1 均是细胞内重要的抗氧化酶,对于细胞抵抗氧化应激损伤有重要的作用。本研究结果显示灯盏花素抑制 Keap1 蛋白,促进 Nrf2 的核内转运,并诱导下游抗氧化酶 NQO1 和 GSTM1 的转录及蛋白表达及促进 NQO1 酶活,清除细胞内的活性氧,因此提示灯盏花素的抗氧化作用可能是通过 Nrf2 途径起作用的。

综上所述,灯盏花素对 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤有重要的保护作用,它可以改善内皮细胞的

活力,减少细胞的凋亡发生。这一作用可能与灯盏花素抑制 NF- κ B 的活化及促进 Nrf2 的核内转运,进而诱导下游抗氧化酶如 NQO1 和 GSTM1 等表达,以清除内皮细胞内的活性氧含量有关。本研究结果显示了灯盏花素对内皮细胞的多重保护效应,也为灯盏花素在心血管疾病的应用中提供了理论基础。

参考文献

- [1] Lin LL, Liu AJ, Liu JG, *et al.* Protective effects of scutellarin and breviscapine on brain and heart ischemia in rats[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, **50**(3): 327–332.
- [2] Qi XM, Wu GZ, Wu YG, *et al.* Renoprotective effect of breviscapine through suppression of renal macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2006, **104**(4): e147–157.
- [3] Yan L, Huang H, Tang QZ, *et al.* Breviscapine protects against cardiac hypertrophy through blocking PKC- α -dependent signaling[J]. *J Cell Biochem*, 2010, **109**(6): 1158–1171.
- [4] Wang M, Zhang WB, Zhu JH, *et al.* Breviscapine ameliorates hypertrophy of cardiomyocytes induced by high glucose in diabetic rats via the PKC signaling pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, **30**(8): 1081–1091.
- [5] Li Q, Wu JH, Guo DJ, *et al.* Suppression of diet-induced hypercholesterolemia by scutellarin in rats[J]. *Planta Med*, 2009, **75**(11): 1203–1208.
- [6] He M, Xue ZM, Li J, *et al.* Breviscapine inhibits high glucose-induced proliferation and migration of cultured vascular smooth muscle cells of rats via suppressing the ERK1/2 MAPK signaling pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, **33**(5): 606–614.
- [7] Moldovan L, Myhre K, Goldschmidt-Clermont PJ, *et al.* Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, **71**(2): 236–246.
- [8] Hsieh HJ, Cheng CC, Wu ST, *et al.* Increase of reactive oxygen species (ROS) in endothelial cells by shear flow and involvement of ROS in shear-induced c-fos expression[J]. *J Cell Physiol*, 1998, **175**(2): 156–162.
- [9] Steinberg D, Witztum JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, **30**: 2311–2316.
- [10] Wiesner P, Choi SH, Almazan F, *et al.* Low doses of lipopolysaccharide and minimally oxidized low-density lipoprotein cooperatively activate macrophages via nuclear factor kappa B and activator protein-1: possible mechanism for acceleration of atherosclerosis by subclinical endotoxemia[J]. *Circ Res*, 2010, **107**(1): 56–65.
- [11] Wagner AE, Ernst I, Iori R, *et al.* Sulforaphane but not ascorbigen, indole-3-carbinole and ascorbic acid activates the transcription factor Nrf2 and induces phase-2 and antioxidant enzymes in human keratinocytes in culture[J]. *Exp Dermatol*, 2010, **19**(2): 137–144.
- [12] Chavakis E, Dernbach E, Hermann C, *et al.* Oxidized LDL inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway[J]. *Circulation*, 2001, **103**(16): 2102–2107.
- [13] Kotamraju S, Hogg N, Joseph J, *et al.* Inhibition of oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in endothelial cells by nitric oxide. Peroxyl radical scavenging as an antiapoptotic mechanism[J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(20): 17316–17323.
- [14] Wang Y, Ji M, Chen L, *et al.* Breviscapine reduces acute lung injury induced by left heart ischemic reperfusion in rats by inhibiting the expression of ICAM-1 and IL-18[J]. *Exp Ther Med*, 2013, **6**(5): 1322–1326.
- [15] Zhang H, Cai CZ, Zhang XQ, *et al.* Breviscapine attenuates acute pancreatitis by inhibiting expression of PKC α and NF- κ B in pancreas[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, **17**(14): 1825–1830.
- [16] Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**(22): 8137–8151.
- [17] Kobayashi A1, Kang MI, Okawa H, *et al.* Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(16): 7130–7139.
- [18] Jain AK, Bloom DA, Jaiswal AK. Nuclear import and export signals in control of Nrf2[J]. *J Biol Chem*, 2005, **280**(32): 29158–29168.
- [19] Dhakshinamoorthy S, Jaiswal AK. Functional characterization and role of Irf2 in antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene[J]. *Oncogene*, 2001, **20**(29): 3906–3917.
- [20] Hayes JD, Chanas SA, Henderson CJ, *et al.* The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin[J]. *Biochem Soc Trans*, 2000, **28**(2): 33–41.