

丁苯酞对A β ₁₋₄₂诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的保护作用及机制研究[△]

黄江^{1,2*}, 姜鲜³, 宋大强¹, 刘明华¹, 章卓^{1#} (1.西南医科大学药学院药理教研室, 四川泸州 646000; 2.西南医科大学附属中医院药剂科, 四川泸州 646000; 3.西南医科大学附属第一医院麻醉科, 四川泸州 646000)

中图分类号 R361[†].3; R967 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)04-0483-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.04.14

摘要 目的: 研究丁苯酞对 β -淀粉样蛋白1-42(A β ₁₋₄₂)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)凋亡的保护作用及其机制。方法: 将HUVEC分为正常对照组、A β ₁₋₄₂组、TAK242组(10 nmol/L)、二甲基亚砜(DMSO)组(1% DMSO)和丁苯酞低、中、高浓度组(40、80、160 μ g/L), 除正常对照组和DMSO组外, 其余各组细胞均加入50 μ mol/L A β ₁₋₄₂培养HUVEC 24 h, 同时TAK242组、DMSO组和丁苯酞低、中、高浓度组细胞还加入相应浓度的药物作用30 min, 每个浓度3个复孔。CCK-8法测定细胞活力, Hoechst 33342/PI双染法观察细胞凋亡情况, 膜联蛋白(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)流式细胞仪检测细胞凋亡率, Western blot法检测细胞中果蝇样受体4(TLR4)、环氧合酶2(COX-2)蛋白表达, ELISA法检测细胞中白细胞介素1(IL-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量。结果: 与正常对照组比较, A β ₁₋₄₂组细胞活力减少、凋亡率增加, TLR4、COX-2蛋白表达和IL-1、TNF- α 含量增加; 与A β ₁₋₄₂组比较, TAK242组和丁苯酞低、中、高浓度组细胞活力增加、凋亡率减少, TLR4、COX-2蛋白表达和IL-1、TNF- α 含量减少, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 丁苯酞可改善A β ₁₋₄₂所致的HUVEC凋亡, 其机制可能与抑制TLR4、COX-2和炎症因子表达有关。

关键词 β -淀粉样蛋白1-42; 人脐静脉内皮细胞; 细胞凋亡; 机制

Protective Effect of Butylphthalide on Human Umbilical Vein Endothelial Cell Apoptosis Induced by A β ₁₋₄₂ and Its Mechanism

HUANG Jiang^{1,2}, JIANG Xian³, SONG Daqiang¹, LIU Minghua¹, ZHANG Zhuo¹ (1. Pharmacology Teaching and Research Section, School of Pharmacy, Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Affiliated TCM Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China; 3. Dept. of Anesthesiology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the protective effect of butylphthalide on the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by A β ₁₋₄₂ and its mechanism. **METHODS:** HUVECs were divided into normal control group, A β ₁₋₄₂ group, TAK242 group (10 nmol/L), DMSO group (1% DMSO) and butylphthalide low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups (40, 80, 160 μ g/L). Except for normal control group and DMSO group, other groups were given 50 μ mol/L A β ₁₋₄₂ to culture HUVECs for 24 h. TAK242 group, DMSO group and butylphthalide low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups were given relevant concentration of drugs for 30 min, with 3 holes for each concentration. The cell viability was determined by CCK-8 assay; cell apoptosis was observed by Hoechst 33342/PI double staining; the cell apoptotic rate was detected by Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) flow cytometry; the protein expression of TLR-4 and COX-2 were determined by Western blot assay; the contents of IL-1 and TNF- α were detected by ELISA. **RESULTS:** Compared with normal control group, cell viability of HUVECs were decreased in A β ₁₋₄₂ group; while apoptotic rate, protein expression of TLR4 and COX-2, the contents of IL-1 and TNF- α were increased. Compared with A β ₁₋₄₂ group, cell viability of HUVECs were increased in TAK242 group and butylphthalide low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups; while apoptotic rate, protein expression of TLR4 and COX-2, the contents of IL-1 and TNF- α were decreased, with statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSIONS:** Butylphthalide can reduce HUVECs apoptosis induced by A β ₁₋₄₂, which may be related with inhibiting the expression of TLR4, COX-2 and inflammatory factors.

KEYWORDS A β ₁₋₄₂; Human umbilical vein endothelial cells; Cell apoptosis; Mechanism

[△] 基金项目: 四川省科技厅一般项目(No.2014S20071); 泸州市科技局科技支撑计划项目(No.2013LZLY-J52)

* 主管药师, 硕士研究生。研究方向: 分子药理学。电话: 0830-3162291。E-mail: 354699170@qq.com

通信作者: 副教授, 硕士。研究方向: 分子药理学。电话: 0830-3162291。E-mail: zhhuozhang100@163.com

β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)的沉积导致脑血管内皮损伤可能是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发病机制之一, 可能与A β 致血管内皮细胞凋亡, 产生炎症反应以及内皮功能障碍等有关^[1]。人体内最常见的亚型是A β ₁₋₄₀和A β ₁₋₄₂。果蝇样受体4(Toll-

like receptor-4, TLR4)是机体参与炎症信号的重要受体之一,特异性配体可以激活TLR4信号通路,激活环氧合酶2(Cyclooxygenase-2, COX-2),释放炎症因子白细胞介素1(Interleukin 1, IL-1)、肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor α , TNF- α)^[2]。A β 诱导血管内皮细胞凋亡也可能与TNF- α 、IL-1的释放及COX-2等基因改变有关^[3]。丁苯酞(Butylphthalide)具有神经功能保护作用,能抑制TLR4表达及炎症介质释放^[4]。据此笔者通过体外培养人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)研究丁苯酞是否能减轻A β ₁₋₄₂诱导的HUVEC凋亡,探讨其保护效应与TLR4/COX-2表达的关系,为了解丁苯酞保护A β 所致血管内皮损伤的机制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

PAC300型垂直型电泳槽和湿式电转膜槽转膜仪(美国Bio-Rad公司);SW-CJ-1F型超净工作台(苏州净化设备有限公司);CKX41型倒置相差显微镜(日本Olympus公司);SpectraMaxM3型酶标仪(美国MDS公司);TCS SP5型激光共聚焦扫描显微镜(德国Leica公司);SBK-YLQX-003552型流式细胞仪(美国BD公司);MR23i型超低温离心机(美国Thermo Fisher公司)。

1.2 药品与试剂

丁苯酞软胶囊(石药集团恩必普药业有限公司,批号:20151011,规格:每粒100 mg);兔TLR4多克隆抗体、兔COX-2多克隆抗体(美国Abcam公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)、CCK-8试剂盒(碧云天生物技术研究所);A β ₁₋₄₂多肽(北京奥普森有限公司);TLR4阻滞剂TAK242(美国MCE公司,批号:20151112,纯度:98.10%);IL-1、TNF- α 试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司);Hochest 33342、碘化丙啶(PI)、膜联蛋白(Annexin)V-异硫氰酸荧光素(FITC)(碧云天生物技术有限公司)。

1.3 细胞

HUVEC购自上海拜力生物试剂有限公司。

2 方法

2.1 CCK-8法检测HUVEC细胞活力

A β ₁₋₄₂在37℃下孵育1周使其变为聚集状态备用。HUVEC常规培养。将HUVEC分为正常对照组、A β ₁₋₄₂组、TAK242组(10 nmol/L)、二甲基亚砜(DMSO)组(1% DMSO)和丁苯酞低、中、高浓度组(40、80、160 μ g/L)。除正常对照组和DMSO组外,其余各组细胞均加入50 μ mol/L A β ₁₋₄₂培养24 h,同时TAK242组、DMSO组和丁苯酞低、中、高浓度组细胞还加入相应浓度的药物作用30 min,每个浓度3个复孔。24 h后每孔细胞加入CCK-8 10 μ L继续培养1 h。酶标仪450 nm波长处测定光密度(OD),以OD值的大小评价细胞活力。TAK242用

DMSO溶解,DMSO终浓度小于1%。

2.2 Hochest 33342/PI双染法观察HUVEC凋亡情况

将HUVEC分为正常对照组、A β ₁₋₄₂组、TAK242组和丁苯酞低、中、高浓度组(40、80、160 μ g/L),同“2.1”项下方法加药培养24 h后,Hochest 33342/PI双染检测HUVEC凋亡情况。具体方法:收集培养24 h后的细胞悬浮于1 mL培养基中,加入10 μ L Hochest 33342贮存液(100 mg/L,蒸馏水溶解),染色15 min;冰上冷却,3 000 \times g离心5 min,去上清,细胞重悬于1 mL磷酸盐缓冲液(PBS)中,加5 μ L PI液(1 g/L,蒸馏水溶解),混匀;显微镜下观察细胞核,蓝色为正常细胞,亮蓝色为凋亡细胞,红色为死亡细胞。

2.3 Annexin V-FITC流式细胞仪检测HUVEC凋亡率

同“2.2”项下分组加药培养HUVEC 24 h,消化收集细胞,冷PBS洗2次,悬浮于Annexin V混合缓冲液(1 \times 10⁶ mL⁻¹)中。取100 μ L细胞悬液加5 μ L Annexin V-FITC和5 μ L PI,轻摇细胞,室温下暗处放置15 min,1 h内流式细胞仪分析细胞凋亡率。

2.4 Western blot法检测HUVEC中TLR4、COX-2蛋白表达

采用Western blot法检测HUVEC中TLR4、COX-2蛋白表达。同“2.2”项下分组加药培养HUVEC 24 h,冰上裂解10 min,4℃下12 000 \times g离心10 min,取上清备用。采用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度,采用8%分离胶和4%的浓缩胶,加蛋白样后十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,电转120 min,与兔TLR4多克隆抗体、兔COX-2多克隆抗体4℃孵育过夜,TBST缓冲液洗膜3次,加入HRP标记山羊抗兔IgG(1:2 000),孵育,洗膜,显影。以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参,用图像分析仪扫描,Image Pro-plus软件测定蛋白条带OD,以相应蛋白与内参OD值的比值评价蛋白表达。

2.5 ELISA法检测HUVEC中IL-1、TNF- α 含量

同“2.2”项下分组加药培养HUVEC 24 h,收集细胞上清,4℃下1 500 \times g离心10 min,按ELISA法,以IL-1、TNF- α 试剂盒说明书操作,酶标仪于450 nm波长处测定IL-1、TNF- α 含量。

2.6 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法采用单因素方差分析,组间比较采用SNK法。计数资料采用率表示,统计方法采用卡方检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞活力

正常对照组、A β ₁₋₄₂组、TAK242组、DMSO组和丁苯酞低、中、高浓度组细胞的OD值分别为0.99 \pm 0.12、0.79 \pm 0.07、0.94 \pm 0.11、1.02 \pm 0.09、0.92 \pm 0.04、0.97 \pm 0.03、0.99 \pm 0.07。与正常对照组比较,A β ₁₋₄₂组细胞OD

值明显降低;与Aβ₁₋₄₂组比较,TAK242组和丁苯酞低、中、高浓度组细胞的OD值均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。正常对照组与DMSO组比较细胞的OD值无明显变化($P>0.05$)。

3.2 细胞凋亡情况

Hochest 33342/PI 双染显示,正常对照组细胞形态呈圆形,细胞核呈淡蓝色,几乎无凋亡细胞;Aβ₁₋₄₂组多数细胞细胞核呈亮蓝色,凋亡细胞较多,还可见红色细胞核的死亡细胞;丁苯酞高浓度组凋亡细胞较少,丁苯酞中、低浓度组和TAK242组可见少量凋亡细胞。各组细胞凋亡染色图见图1。

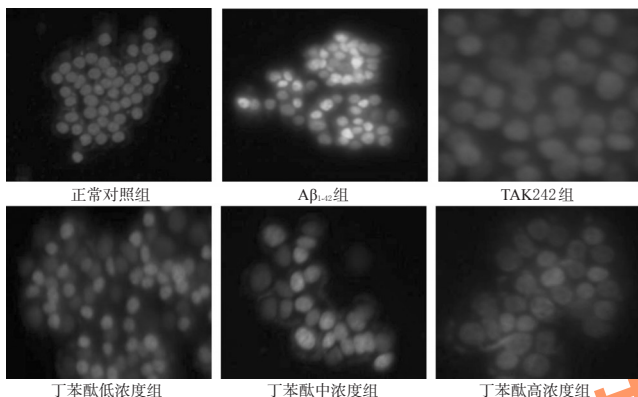


图1 各组细胞凋亡染色图(Hochest 33342/PI,×200)

Fig 1 Cell apoptosis staining in each group (Hochest 33342/PI,×200)

3.3 细胞凋亡率

正常对照组、Aβ₁₋₄₂组、TAK242组和丁苯酞低、中、高浓度组细胞的凋亡率分别为0.89%、21.89%、1.81%、11.12%、5.32%、2.31%。与正常对照组比较,Aβ₁₋₄₂组细胞的凋亡率明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与Aβ₁₋₄₂组比较,TAK242组和丁苯酞低、中、高浓度组细胞的凋亡率均明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。

3.4 细胞中TLR4、COX-2蛋白表达

与正常对照组比较,Aβ₁₋₄₂组细胞中TLR4、COX-2蛋白表达明显增强,差异有统计学意义($P<0.01$)。与Aβ₁₋₄₂组比较,TAK242组和丁苯酞低、中、高浓度组细胞中TLR4、COX-2蛋白表达均明显减弱,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组细胞中TLR4、COX-2蛋白表达的电泳图见图2,测定结果见表1。

3.5 细胞中IL-1、TNF-α含量

与正常对照组比较,Aβ₁₋₄₂组细胞中IL-1、TNF-α含量明显增加,差异有统计学意义($P<0.01$)。与Aβ₁₋₄₂组比较,TAK242组和丁苯酞低、中、高浓度组细胞中IL-1、TNF-α含量均明显减少,差异有统计学意义($P<0.01$)。各组细胞中IL-1、TNF-α含量的测定结果见表2。

4 讨论

尽管血管因素在AD的发生和进展中的作用越来越引起人们的重视,但Aβ致血管内皮损伤机制目前并未

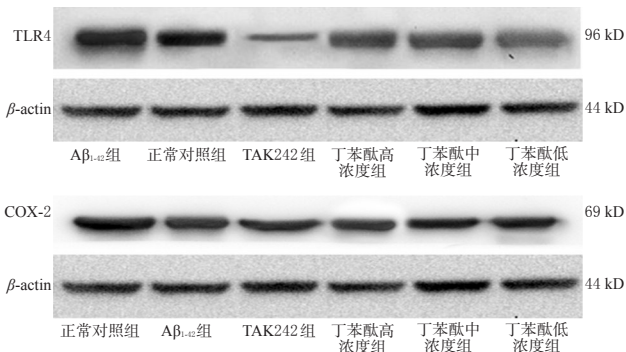


图2 各组细胞中TLR4、COX-2蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoresis of protein expression of TLR4 and COX-2 in HUVECs of each group

表1 各组细胞中TLR4、COX-2蛋白表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Determination results of protein expression of TLR4 and COX-2 in HUVECs of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TLR4/ β -actin	COX-2/ β -actin
正常对照组	0.72 ± 0.11	0.84 ± 0.11
Aβ ₁₋₄₂ 组	0.95 ± 0.07*	1.12 ± 0.07*
TAK242组	0.21 ± 0.02###	0.75 ± 0.02###
丁苯酞高浓度组	0.77 ± 0.07###	0.85 ± 0.06###
丁苯酞中浓度组	0.82 ± 0.04###	0.93 ± 0.02#
丁苯酞低浓度组	0.87 ± 0.03###	0.96 ± 0.04#

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与Aβ₁₋₄₂组比较,## $P<0.05$,### $P<0.01$

Note: vs. normal control group, * $P<0.01$; vs. Aβ₁₋₄₂ group, ## $P<0.05$, ### $P<0.01$

表2 各组细胞中IL-1、TNF-α含量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \text{pg/mL}$)

Tab 2 Determination results of the contents of IL-1 and TNF-α in HUVECs of each group ($\bar{x} \pm s, n=3, \text{pg/mL}$)

组别	IL-1	TNF-α
正常对照组	453.40 ± 12.31	361.17 ± 27.71
Aβ ₁₋₄₂ 组	1 150.56 ± 38.77*	1 290.97 ± 67.57*
TAK242组	680.55 ± 31.22###	710.56 ± 22.67###
丁苯酞高浓度组	715.23 ± 22.47###	780.55 ± 26.31###
丁苯酞中浓度组	789.15 ± 14.72###	856.31 ± 33.41###
丁苯酞低浓度组	815.34 ± 22.76###	890.59 ± 25.78###

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与Aβ₁₋₄₂组比较,### $P<0.01$

Note: vs. normal control group, * $P<0.01$; vs. Aβ₁₋₄₂ group, ### $P<0.01$

完全清楚。AD血管的异常包括不规则血管形成、微血管密度降低、小动脉和毛细血管萎缩、血管内皮功能退化、脑血管结构改变等^[3]。Toll样受体是机体最重要的模式识别受体之一,其通过启动不同的信号途径参与了机体的天然与获得性免疫调节,目前发现约有12种Toll样受体^[5]。其中TLR4是识别特异性配体LPS的主要受体,是机体参与炎症信号的重要受体之一,TLR4激活后,会启动Myd88依赖和非Myd88依赖的信号通路,激活下游

COX-2 释放, 激发炎症因子, 从而参与炎症反应^[6]。TLR4 可能参与了 AD 的血管内皮细胞凋亡^[7]。有资料显示, LPS 启动的 TLR4 通路参与了 AD 的发生, 比如利用 LPS 腹腔注射和脑内注射, 均发现大鼠海马 tau 蛋白不同位点出现了过度磷酸化的改变^[8]。如果敲除掉与 LPS 连接的 CD14, 则可减少由 A β 诱导的小胶质细胞的激活^[9]。另有研究也发现, A β 能够刺激 TLR4 野生型小鼠大脑分泌更多的炎症因子, 如 TNF- α 、IL-1、IL-10 和 IL-17。同 TLR4 野生型小鼠比较, TLR4 缺乏或者突变的小鼠更容易发生淀粉样沉积和弥散^[10]。由此可知, TLR4 可能与 AD 发生过程中内皮细胞损伤存在一定联系。

丁苯酞在临床上可用于 AD 的防治^[11], 对 A β ₁₋₄₂ 诱导的 HUVEC 凋亡可能具有保护效应。HUVEC 的优点在于较为稳定、易于实验操作, 故本研究选择了 HUVEC 作为研究对象。结果显示, A β ₁₋₄₂ 刺激 HUVEC 后, 细胞凋亡明显增加, 细胞活力下降; 与 A β ₁₋₄₂ 组比较, 丁苯酞作用后减少了 A β ₁₋₄₂ 诱导的血管内皮细胞凋亡率, 提高了细胞活力, 因此其具有一定的保护效应。

进一步研究丁苯酞保护效应是否与抑制 TLR4 表达和炎症因子释放有关。研究结果显示, 与 A β ₁₋₄₂ 刺激后的 HUVEC 比较, 给予 TLR4 阻滞剂的细胞凋亡明显减少, 细胞活力提高, 提示 TLR4 的激活可能参与了 A β ₁₋₄₂ 刺激后的 HUVEC 细胞凋亡。同时, 给予 TLR4 阻滞剂后, 炎症因子 IL-1 和 TNF- α 明显减少, COX-2 表达减少, 提示 A β ₁₋₄₂ 刺激后的 HUVEC 细胞凋亡与炎症因子 IL-1、TNF- α 、COX-2 表达减少有关。丁苯酞作用后减少了 A β ₁₋₄₂ 诱导的 HUVEC 中 TLR4、COX-2 蛋白表达, 也明显减少了炎症因子 IL-1、TNF- α 表达, 推测其保护效应与抑制 TLR4 表达和炎症因子表达有关。

综上所述, TLR4 参与了 A β ₁₋₄₂ 刺激后的 HUVEC 细胞凋亡; 丁苯酞对 A β ₁₋₄₂ 诱导的 HUVEC 细胞凋亡具有明显的保护效应, 其保护效应可能与抑制 TLR4 启动的信号通路中 COX-2 与炎症因子表达有关。其他的 Toll 受体亚型是否也参与了丁苯酞的保护作用值得进一步研究。

参考文献

[1] Karch CM, Jeng AT, Nowotny P, *et al.* Expression of novel Alzheimer's disease risk genes in control and Alzheimer's disease brains[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11):

e50976.

[2] Hwang EH, Kim TH, Oh SM, *et al.* Toll/IL-1 domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF) mediates innate immune responses in murine peritoneal mesothelial cells through TLR3 and TLR4 stimulation[J]. *Cytokine*, 2016, doi:10.1016/j.cyto.2015.11.010.

[3] Yu H, Yang M, Wang Y, *et al.* p75NTR is mainly responsible for A β toxicity but not for its internalization: a primary study[J]. *Neurol Sci*, 2012, 33(5):1043-1050.

[4] 张晓璇, 邱海鹏, 赵淑敏. 丁苯酞对脑缺血再灌注大鼠 HSP70 及 TLR4 的影响研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2014, 30(10):1401-1403.

[5] Ma JF, Wang HM, Li QY, *et al.* Starvation triggers Abeta42 generation from human umbilical vascular endothelial cells[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(14):3101-3106.

[6] Zhang W, Wang LZ, Yu JT, *et al.* Increased expressions of TLR2 and TLR4 on peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease[J]. *J Neurol Sci*, 2012, 315(1/2):67-71.

[7] Gambuzza ME, Sofo V, Salmeri FM, Soraci L, *et al.* Toll-like receptors in Alzheimer's disease: a therapeutic perspective[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2014, 13(9):1542-1558.

[8] Shi S, Liang D, Chen Y, *et al.* Gx-50 reduces β -amyloid-induced TNF- α , IL-1 β , NO, and PGE2 expression and inhibits NF- κ B signaling in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(3):665-676.

[9] Wu D, Zhang X, Zhao M, *et al.* The role of the TLR4/NF- κ B signaling pathway in A β accumulation in primary hippocampal neurons[J]. *Acta physiologica Sinica*, 2015, 67(3):319-328.

[10] Chen L, Bai Y, Zhao M, *et al.* TLR4 inhibitor attenuates amyloid- β -induced angiogenic and inflammatory factors in ARPE-19 cells: Implications for age-related macular degeneration[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(4):3249-3256.

[11] 齐凡星, 胡莹, 卢军栋, 等. 丁苯酞治疗阿尔茨海默病的临床观察[J]. *中国药房*, 2016, 27(17):2412-2414.

(收稿日期:2016-09-16 修回日期:2016-10-27)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅