

文章编号:1001-6880(2017)8-1265-05

葡萄籽原花青素通过 Nrf2/ARE 信号通路 抗高糖诱导的 HUVEC-12 细胞氧化损伤

张婷^{1*}, 刘瑞¹, 宋小峰¹, 张慧²¹新乡医学院三全学院; ²新乡医学院药学院, 新乡 453000

摘要:研究葡萄籽原花青素提取物(GSPE)对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞HUVEC-12氧化应激损伤的保护作用及其相关机制。建立高糖诱导的HUVEC-12细胞模型,测定细胞活力,检测细胞内活性氧(ROS)水平、乳酸脱氢酶(LDH)与超氧化物歧化酶(SOD)活性及Nrf2/ARE信号通路中相关基因mRNA水平和蛋白含量。结果显示GSPE作用后显著提高HUVEC-12细胞活力,抑制高糖诱导的细胞内ROS水平升高,增强SOD活性($P < 0.05$),并呈现剂量依赖效应。GSPE作用能同时提高抗氧化转录因子Nrf2和下游区GSH-Px、HO-1、 γ -GCS、NQO1基因的表达量以及HO-1、NQO1蛋白的含量($P < 0.05$)。结果表明GSPE能通过激活Nrf2/ARE通路对抗高糖诱导的HUVEC-12细胞氧化应激损伤。

关键词:葡萄籽原花青素;高糖;Nrf2/ARE信号通路;HUVEC-12细胞

中图分类号:R965.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.8.001

Protective Effects of Grape-Seed Proanthocyanidin Extract against High Glucose-induced Injury in HUVEC-12 Cells via Nrf2/ARE Pathway

ZHANG Ting^{1*}, LIU Rui¹, SONG Xiao-feng¹, ZHANG Hui²¹Sanquan Medical College, Xinxiang Medical University;²College of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China

Abstract: The objective of this study is to explore the protective effect and mechanisms of grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) against oxidative stress of HUVEC-12 cells induced by high glucose. HUVEC-12 cell model induced by high glucose was established. The proliferation of HUVEC-12 cells were evaluated. The levels of reactive oxygen species (ROS), lactate dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD) were assayed. Both mRNA expression levels and protein expression levels of Nrf2/ARE signaling pathway related genes were detected. The results showed that GSPE intervention can improve the antioxidant capacity of HUVEC-12 cells significantly, decrease the ROS levels in cells induced by high glucose, improve the SOD activity and the cell vitality in a dose-dependent effect ($P < 0.05$). The analysis showed that GSPE can also increase the mRNA expression levels of Nrf2, GSH-Px, HO-1, γ -GCS, NQO1 and protein contents of HO-1, NQO1. The results indicated that GSPE may protect against the oxidative damage of HUVEC-12 cells induced by high glucose via the activation of Nrf2/ARE signal pathway.

Key words: grape seed proanthocyanidin extract; high glucose; Nrf2/ARE pathway; HUVEC-12 cell

随着饮食和生活习惯的改变,糖尿病已逐渐成为一个全球性的公共卫生问题。到2030年,全球的患病人数将从3.8亿增加到5.96亿^[1]。糖尿病会增加多种大血管病的发病率,比如冠脉疾病,外周动脉疾病,约65%的糖尿病人死于糖尿病大血管合并症^[2]。动脉粥样硬化是糖尿病大血管合并症的主

要机制,内皮活化与功能障碍在动脉粥样硬化的产生和发展中起重要作用^[3,4]。细胞核相关因子(Nuclear erythroid related factor2, Nrf2)可通过抗氧化反应原件(antioxidant response element, ARE)增强抗氧化基因的表达来调控细胞的抗氧化应激和氧化还原反应^[5],研究显示Nrf2/ARE信号通路可被多种植物素激活^[6]。

原花青素广泛存在于葡萄、可可和苹果中,其中以葡萄籽和葡萄皮中的含量最高^[7]。已有研究证明,葡萄籽原花青素提取物(Grape seed proanthocy-

收稿日期:2017-05-03 接受日期:2017-06-20

基金项目:河南省科技攻关项目(172102310311);新乡医学院三全学院创新团队(STD201603)

*通信作者 E-mail:teger377@163.com

nidin extract, GSPE) 具有清除自由基、降低餐后血糖^[8-10]、改善血脂异常、调节脂质代谢和改善血脂异常, 抑制高级聚糖化终产物 AGE^[11] 等多种生物活性。江蓓等^[12] 的研究表明 GSPE 能通过 Nrf2/ARE 通路发挥保护肾脏的保护作用, 而 GSPE 是否能通过 Nrf2/ARE 通路保护血管内皮细胞的氧化损伤从而延缓糖尿病大血管合并症的进展却鲜有报道。本研究拟通过建立高糖诱导的 HUVEC-12 细胞模型, 探讨 GSPE 是否对高糖所致的 HUVEC-12 细胞损伤有保护作用并探讨其与 Nrf2/ARE 信号通路的关系, 以期对糖尿病大血管合并症提供一种可能的疗法。

1 材料与方法

1.1 细胞、材料及试剂

HUVEC-12 细胞(中科院上海细胞生物研究所); GSPE(纯度 >95%, 天津尖峰天然产物有限公司); MTT(德国 Sigma 公司); ROS 检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司); SOD 检测试剂盒(南京建成生物技术研究所); HO-1 和 NQO1 酶联免疫吸附试剂盒(上海酶联生物科技有限公司); Trizol(总 RNA 抽提试剂)、逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒、SYBR Premix Ex TaqTM 等(Takara 公司); 引物(上海生工生物工程公司); ABI 7500 Real-Time PCR system(美国应用生物系统[ABI]公司); 酶标仪(Thermo Multiskun Mk3, 美国赛默飞世尔科技公司); 电子分析天平(德国 Sartorius 公司); U-2001 型紫外分光光度仪(日本 HITACHI 公司)。

1.2 细胞分组、活力测定及 LDH 检测

将 HUVEC-12 细胞分为对照组(无血清培养基培养 36 h)、高糖组(含 100 mmol/L 葡萄糖的无血清培养基培养 36 h)、药物组(含 100 mmol/L 葡萄糖的无血清培养基分别与 10、20、40 μmol/L GSPE 共同孵育 36 h)。细胞接种于 96 孔培养板, 每孔 0.1 mL, 24 h 后细胞贴壁, 更换培养液, 按上述分组, 分别进行相应处理。每孔加 5 g/mL 的 MTT 20 μL, 4 h 后弃去培养液, 加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min 使其充分溶解后用酶标仪测量 490 nm 波长的吸光度值。

LDH 检测采用乳酸脱氢酶检测试剂盒。各组细胞经相应处理后, 取 120 μL 细胞培养上清液加入到一新的 96 孔板相应孔中, 每孔均加入 60 μL LDH 检测工作液, 25 °C 避光孵育 30 min 后在 490 nm 处

测定吸光度。

1.3 细胞内 ROS 水平检测

用活性氧检测试剂盒检测细胞内 ROS 水平, 按照试剂盒说明书操作。HUVEC-12 细胞(5×10^6)与 10 μmol/L 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)探针于 37 °C 孵育 35 min, 用 PBS 洗 3 遍洗去未结合的探针。细胞内的酯酶可将进入细胞内的 DCFH-DA 水解为二氯氯化荧光素(DCFH), 而细胞内的活性氧又将其氧化为有荧光的 2',7'-二氯荧光素(DCF)。使用荧光分光光度计检测 DCF 荧光可反映细胞内活性氧的水平。

1.4 细胞内 SOD 活性测定

6 孔板培养 HUVEC-12 细胞, 各组细胞经相应处理后分别收集, 超声破碎细胞后离心, 取上清 200 μL, 按照 SOD 检测试剂盒说明书在 550 nm 波长下测定 OD 值。

1.5 实时荧光定量 PCR 测定细胞内 Nrf2、GSH-Px、HO-1、γ-GCS、NQO1 基因的表达

Trizol 法提取细胞内总 RNA, 使用 TaKaRa 反转录试剂盒将总 RNA 逆转录。以逆转录后的 cDNA 为模板, 管家基因 GAPDH 为内参, 在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪上使用 SYBR PCR 试剂盒对各基因进行荧光定量 PCR 扩增。反应体系: 2 μL cDNA 产物, 正反向引物各 0.4 μL, 10 μL Taq Master Mix, 6.8 μL RNase-free 水, 0.4 μL ROX Reference Dye (50×), 总体积 20 μL。引物序列见表 1。反应条件: 95 °C 预变性 1 min; 95 °C 10 s, 60 °C 31 s, 重复 35 个循环。每个样品重复 3 次。各基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.6 酶联免疫吸附法测定细胞内 HO-1 和 NQO1 含量

6 孔板培养 HUVEC-12 细胞, 经相应处理后分别收集各组细胞上清液, 1000 g 离心 10 min 后去除沉淀, 严格按照酶联免疫吸附试剂盒说明书要求加样操作。

1.7 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。统计分析采用 SPSS 19.0 软件, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 MTT 检测 GSPE 对 HUVEC-12 细胞的保护作用

MTT 结果显示高糖组 HUVEC-12 细胞的增殖

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Table 1 Primers for real-time PCR analyses

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	产物长度 Product size (bp)
Nrf2	F:TCCTATGCGTGAATCCCAAT R:GGGGCTTGAATGTTGTCTT	103 bp
GSH-Px	F:GAAGTGCAGTGAAATGG R:TGTGATGGTAGCAGAACGC	224 bp
HO-1	F:GGGCTGTGAACCTGTCCAAT R:GGTGGAGGAAACTGTGTGTCAGG	162 bp
γ-GCS	F:TGGATGATGCCAACGAGTC R:CCTAGTGAGCAGTACCAACGAATA	185 bp
NQO1	F:TTCTGTGGCTTCAGGTCTT R:TCCAGACGTTCTTCCATCC	104 bp
GAPDH	F:TGACGCTGGGGCTGGCATTTG R:GCTCTTGCTGGGGCTGGTGG	154 bp

表 2 高糖及 GSPE 干预对 HUVEC-12 细胞活性的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)
Table 2 Effect of GSPE on cells viability in HUVEC-12 cells exposed to high glucose ($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组 Group	给药剂量 Dose ($\mu\text{mol/L}$)	正常组百分率 % of CON
正常组 Control group	-	100
高糖组 High glucose group	-	51.26 ± 7.33 ^{##}
GSPE 低剂量组 GSPE-L	10	62.78 ± 6.25 [*]
GSPE 中剂量组 GSPE-M	20	70.26 ± 7.21 [*]
GSPE 高剂量组 GSPE-H	40	82.32 ± 5.53 ^{* * *}

注:与高糖组比较, $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$;与正常组比较, $^{##} P < 0.01$ 。

Note: compared with HG group, $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$; compared with control group, $^{##} P < 0.01$.

较正常组明显降低($P < 0.01$)。而 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ GSPE 与高糖共同作用下的 HUVEC-12 细胞增殖活性显著高于高糖组($P < 0.05, P < 0.01$)。结果见表 2。

2.2 GSPE 对培养液中 LDH 水平的影响

高糖组 LDH 水平较正常组显著升高($P < 0.01$);与高糖组比较, GSPE 中、高剂量组 LDH 水平的含有量明显降低($P < 0.05-0.01$),但低剂量组作用不明显($P > 0.05$)。结果见表 3。

表 3 高糖及 GSPE 干预对 HUVEC-12 细胞的 LDH、ROS 水平及 SOD 活性的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)
Table 3 Effect of GSPE on LDH release, ROS activity and SOD activity in HUVEC-12 cells exposed to high glucose ($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组 Group	给药剂量 Dose ($\mu\text{mol/L}$)	LDH(% 正常组) LDH (% of CON)	ROS(% 正常组) ROS (% of CON)	SOD 活性 SOD activity (U/mg)
正常组 Control group	-	100	100	1.79 ± 0.16
高糖组 High glucose group	-	254.46 ± 25.54 ^{##}	235.36 ± 20.14 ^{##}	0.87 ± 0.13 ^{##}
GSPE 低剂量组 GSPE-L	10	205.15 ± 14.23	186.27 ± 19.32 [*]	1.18 ± 0.34 [*]
GSPE 中剂量组 GSPE-M	20	184.17 ± 20.15 [*]	170.39 ± 18.85 [*]	1.50 ± 0.16 [*]
GSPE 高剂量组 GSPE-H	40	128.86 ± 18.46 ^{* *}	125.64 ± 17.84 ^{* *}	1.72 ± 0.21 ^{* *}

注:与高糖组比较, $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$;与正常组比较, $^{##} P < 0.01$ 。

Note: compared with HG group, $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$; compared with control group, $^{##} P < 0.01$.

2.3 GSPE 对细胞内 ROS 水平和 SOD 活性的影响

与正常组比较,高糖组 ROS 水平显著提高,SOD 活力明显下降($P < 0.01$)。而 GSPE 低、中、高

剂量组能明显减少高糖诱导的 ROS 水平并增强 SOD 的活力($P < 0.05-0.01$),其中 GSPE 高剂量组作用最强。结果见表 3。

2.4 GSPE 对细胞内 Nrf2/ARE 信号通路相关基因表达的影响

与正常组相比,高糖组的 Nrf2、GSH-Px、HO-1、 γ -GCS 和 NQO1 基因的表达量有所增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$);而 GSPE 低、中、高剂量组作用后均能增强 Nrf2、GSH-Px、HO-1、 γ -GCS 和 NQO1 基因的表达量($P < 0.05-0.01$),且呈剂量依赖效应,其中 Nrf2 和 NQO1 的表达量增加的更为显著。结果见图 1。

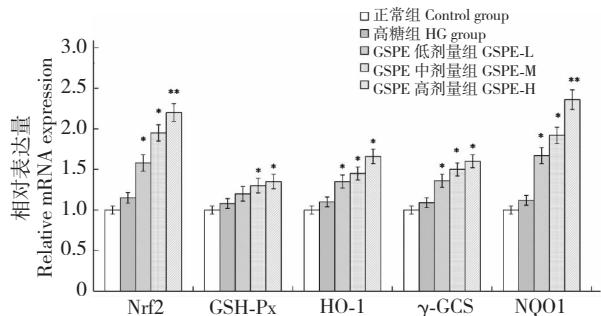


图 1 高糖及 GSPE 干预对 HUVEC-12 细胞内 Nrf2、GSH-Px、HO-1、 γ -GCS 和 NQO1 基因 mRNA 表达的影响($n = 3$)

Fig. 1 The mRNA expression of Nrf2, GSH-Px, HO-1, γ -GCS and NQO1 in HUVEC-12 cells exposed to high glucose analyzed by RT-PCR

注:与高糖组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: compared with HG group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

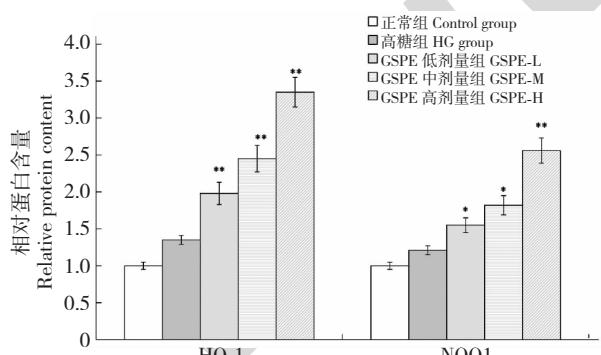


图 2 高糖及 GSPE 干预对 HO-1 和 NQO1 蛋白表达的影响($n = 3$)

Fig. 2 The protein content of HO-1 and NQO1 in HUVEC-12 cells intervened by high glucose and GSPE analyzed by enzyme-linked immuno sorbent assay

注:与高糖组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: compared with HG group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 GSPE 对细胞内 HO-1 和 NQO1 蛋白含量的影响

与正常组相比,高糖组的 HO-1、NQO1 含量提

高,但差异无统计学意义($P > 0.05$);低、中、高剂量的 GSPE 作用后 HO-1、NQO1 含量显著高于高糖组并呈剂量依赖效应($P < 0.05-0.01$)。结果见图 2。

3 讨论与结论

糖尿病血管病变的主要诱发原因之一为血管内皮损伤,而高糖是导致血管内皮功能损伤的主要原因^[13],本研究通过高糖诱导 HUVEC-12 细胞构建糖尿病血管内皮细胞损伤模型,以探讨 GSPE 对高糖诱导的 HUVEC-12 细胞损伤的抑制作用。

本研究发现不同浓度的 GSPE 能明显减轻高糖所致 HUVEC-12 细胞活力的降低,且具有浓度依赖性。细胞内的乳酸脱氢酶(LDH)在细胞破裂时会释放到基质中,故其活性可代表细胞损伤程度。本实验中高糖诱导后 HUVEC-12 细胞培养液中的 LDH 水平明显增加,而经不同浓度 GSPE 处理后细胞培养液中 LDH 水平显著降低,且存在浓度依赖性。由此可见,GSPE 可减轻高糖所致 HUVEC-12 细胞损伤。

SOD 作为一种重要的抗氧化剂,能够通过清除 ROS 来保护细胞免受损伤。本研究发现,高糖组细胞内 ROS 含量明显增加,SOD 活性下降。而 GSPE 作用后,细胞内 ROS 含量明显降低,SOD 活性显著增高。说明 GSPE 能通过增强抗氧化酶的活性降低高糖所致 HUVEC-12 细胞的氧化损伤。

Nrf2/ARE 通路是重要的内源性抗氧化应激通路,其激活后能启动下游多种保护性基因的表达,如谷胱甘肽系统酶 GSH-Px、 γ -GCS,超氧化物歧化酶 SOD, 血红素氧合酶 HO-1 和 酚氧化还原酶 NQO1 等^[14],已有研究表明这些基因表达的蛋白能通过抗氧化应激来保护细胞^[15-18]。本实验结果显示,与高糖组相比,GSPE 干预后能够显著提高 Nrf2、GSH-Px、HO-1、 γ -GCS 和 NQO1 基因的表达量。NQO1 是 Nrf2 调节的下游重要的 II 相解毒酶,可通过催化酚、氮氧化合物等的双电子还原来减轻氧化损伤^[19]。表没食子儿茶素没食子酸酯能通过上调血管内皮细胞中 Nrf2 和 NQO1 的 mRNA 及蛋白的水平,减轻多氯联苯诱导的氧化应激损伤^[20]。HO-1 是一种抗氧化酶,为 Nrf2 下游抗氧化系统中的重要组成部分。Tripathi 等^[21]发现虾青素能增加 NQO1 和 HO-1 的表达量,明显降低肝脏中环磷酰胺诱导的氧化应激。本实验结果中,GSPE 干预组与高糖组相比 HO-1 和 NQO1 蛋白的含量显著提高。这表明 GSPE 能通过提高 Nrf2/ARE 信号通路中基因的

表达水平来调节 Nrf2 相关蛋白在细胞内的堆积。这跟 Kwak^[22]等的研究结果一致,其结果表明 Nrf2 能通过自身启动子近侧区的类 ARE 元件来调控自身的表达,使 Nrf2 持续在细胞内堆积并且增强其下游靶基因对毒素的感应。

综上所述,GSPE 可抑制高糖作用下 HUVEC-12 细胞 LDH 的释放并提高细胞活力,清除细胞内的 ROS,增加 SOD 的活性,提高 Nrf2、GSH-Px、HO-1、 γ -GCS 和 NQO1 基因的表达量和 HO-1、NQO1 蛋白的含量,进而减轻高糖所诱导的 HUVEC-12 细胞活力降低,起到保护的作用。本研究结果所显示的 GSPE 能够通过激活 Nrf2/ARE 信号通路对血管内皮损伤的保护作用有望为糖尿病大血管合并症的治疗提供可能有效的方法。

参考文献

- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 2001, 414: 782-787.
- Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract*, 2013, 103: 137-149.
- Strojek K. Features of macrovascular complications in type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol*, 2003, 40: s334-s337.
- Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci*, 2005, 109: 143-159.
- Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7: 385-394.
- Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. Regulation of Nrf2—an update. *Free Radic Biol Med*, 2014, 66: 36-44.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*, 2000, 130: 2073-2085.
- Pinent M, Blay M, Bladé MC, et al. Grape seed-derived proanthocyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology*, 2004, 145: 4985-4990.
- El-Awdan SA, Jaleel GAA, Saleh DO. Grape seed extract attenuates hyperglycaemia-induced in rats by streptozotocin. *Bull Fac Pharm Cairo Univ*, 2013, 7: 203-209.
- Adisakwattana S, Jiphimai P, Prutanopajai P, et al. Evaluation of α -glucosidase, α -amylase and protein glycation inhibitory activities of edible plants. *Int J Food Nutr*, 2010, 61: 295-305.
- Zhang F, Gao H, Wu J. Selective inhibition by grape seed proanthocyanidin extracts of cell adhesion molecule expression induced by advanced glycation end products in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 48: 47-53.
- Jiang B(江蓓), Li BY(李保应), Zhen JH(甄军晖), et al. Grape seed proanthocyanidin regulates expression of GSTM through Nrf2 in renal tissues of STZ-induced diabetic rats. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2011, 27: 1586-1591.
- Chai WD(柴伟栋), Chen JW(陈家伟), Shen J(沈捷), et al. The effects of glucose and insulin on the functions of vascular endothelial Cells. *J Chin Microcircul* (中国微循环), 2003, 7: 204-207.
- Liu W(刘薇), Wang HX(王红霞), Wang LK(王立魁), et al. COX-2 and Nrf2/ARE signaling pathways in anti-inflammation and antioxidation *in vivo* and *in vitro*. *Chin Bul Life Sci* (生命科学), 2011, 10: 1027-1033.
- Jiang YM, Wang Y, Tan HSY, et al. Schisandrol B protects against acetaminophen-induced acute hepatotoxicity in mice via activation of the Nrf2/ARE signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37: 382-389.
- Gum SI, Cho MK. Recent updates on acetaminophen hepatotoxicity: The role of Nrf2 in hepatoprotection. *Toxicol Res*, 2013, 29: 165-172.
- Otterbein LE, Choi AMK. Heme oxygenase: Colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279: 1029-1037.
- Moffit JS, Aleksunes LM, Kardas MJ, et al. Role of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 in clofibrate-mediated hepatoprotection from acetaminophen. *Toxicology*, 2007, 230: 197-206.
- Nioi P, Hayes JD. Contribution of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutat Res*, 2004, 555(1/2): 149-171.
- Han SG, Han SS, Toborek M, et al. EGCG protects endothelial cells against PCB 126-induced inflammation through inhibition of Ah R and induction of Nrf2-regulated genes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 261: 181-188.
- Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcino genesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mutat. Res*, 2010, 696: 69-80.
- Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, et al. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: Role of antioxidant response element-like sequences in the Nrf2 promoter. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 2883-2892.