

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.19.002

二苯乙烯苷通过上调 XIAP 抑制人脐静脉内皮细胞凋亡*

龙石银 刘 英 杨 滢 乔新惠 李 娜 仇梦霞 张彩平 田 英[△]

(南华大学生物化学与分子生物学教研室 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的: 二苯乙烯苷 (2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside, TSG) 具有抗炎、抗氧化、抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 等作用。课题组前期研究表明 TSG 对过氧化氢 (H_2O_2) 诱导损伤的内皮细胞具有保护作用, 并抑制内皮细胞的凋亡, 但机制尚未完全明确。本研究目的在于探讨 TSG 是否通过影响 X 连锁凋亡抑制蛋白 (X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)、Caspase-9 的表达来抑制细胞凋亡。**方法:** 体外培养人脐静脉内皮细胞, 实验分为正常对照组、模型组 ($300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$)、TSG 预处理组 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG + $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$)、Embelin 与 TSG 联合处理组 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Embelin + $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG + $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$)、TSG 单独处理组 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG)、Embelin 组 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Embelin)。采用 MTT 法检测细胞增殖率, Hoechst 33258 染色观察凋亡细胞核形态, RT-PCR 和 Western blot 检测 XIAP、Caspase-9 的表达。**结果:** 与空白对照组相比, H_2O_2 组内皮细胞增殖率降低, 核损伤明显, XIAP 表达显著性下降, Caspase-9 表达显著增加 ($P < 0.01$); 与 H_2O_2 组比较, 经 TSG 预处理后, 细胞增殖率增加, 核损伤减轻, XIAP 的表达上升, Caspase-9 表达减少, 差异均有显著性 ($P < 0.01$)。与 TSG 预处理组比较, 用 XIAP 阻断剂 Embelin 与 TSG 联合处理后, 内皮细胞活力下降, XIAP 表达显著降低, Caspase-9 表达增加 ($P < 0.01$)。**结论:** TSG 具有抑制 H_2O_2 诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡作用, 其机制与增加 XIAP 的表达, 抑制 Caspase-9 的表达有关。

关键词: 二苯乙烯苷; H_2O_2 ; 人脐静脉内皮细胞; X 连锁凋亡抑制蛋白; Caspase-9

中图分类号: R-33, R284.1, R34 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2014)19-3606-05

TSG Up-regulate XIAP and Inhibit Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

LONG Shi-yin, LIU Ying, YANG Ying, QIAO Xin-hui, LI Na, QIU Meng-xia, ZHANG Cai-ping, TIAN Ying[△]

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

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (TSG) against hydrogen peroxide (H_2O_2) induced human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) apoptosis and the expressions of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), Caspase-9. **Methods:** HUVECs were divided into six groups: control group, H_2O_2 group ($300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), TSG group ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG + $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$), TSG and Embelin combination group ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Embelin + $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG + $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$), TSG alone treatment group ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and Embelin group ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). The viability of HUVECs was determined with MTT assay. Hoechst 33258 staining was used to observe the morphology of apoptosis. The mRNA expression of XIAP, Caspase-9 was measured using RT-PCR. The protein expression of XIAP, Caspase-9 was detected by Western blotting. **Results:** Treatment HUVECs with H_2O_2 significantly increased the apoptosis, reduced the cell viability, decreased the expressions of XIAP and elevated Caspase-9 expression ($P < 0.01$). The expression of XIAP was inhibited by treated with Embelin alone. Compared with H_2O_2 group, the apoptosis rate reduced, the cell viability enhanced, the expressions of XIAP increased and Caspase-9 reduced markedly after TSG pretreated ($P < 0.01$). Combination of Embelin and TSG decreased the cell apoptosis than pretreatment of TSG, and the expression of XIAP reduced, Caspase-9 increased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** TSG could inhibit H_2O_2 -induced apoptosis in HUVECs, and the mechanism was associated with the expressions of XIAP and Caspase-9.

Key words: TSG; Hydrogen peroxide; Human umbilical vein endothelial cell; X-linked inhibitor of apoptosis protein; Caspase-9

Chinese Library Classification(CLC): R-33, R284.1, R34 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)19-3606-05

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30800474); 湖南省教育厅项目(11A104); 湖南省科技厅项目 (2013SK3120); 衡阳市科技局项目(2013KJ05); 南华大学研究生科研创新项目 (2013XCX20); 南华大学十二五科技创新团队基金; 南华大学留学归国人员启动基金资助

作者简介: 龙石银 (1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化, 电话: 0734-8281372, E-mail: longshiyin@126.com

[△] 通讯作者: 田英 (1963-), E-mail: uscty@163.com

(收稿日期: 2014-01-29 接受日期: 2014-02-24)

前言

血管内皮细胞过度凋亡时,内皮功能障碍,从而加快动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)进程^[1-3]。因此,保护内皮细胞结构及功能的完整性是防止 As 的有效手段。二苯乙烯苷(2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside, TSG)具有较强的抗氧化、抗炎等作用,对血脂代谢紊乱和动脉粥样硬化有显著疗效^[4-7]。本课题组前期实验结果显示,TSG 对过氧化氢诱导损伤的人脐静脉内皮细胞具有保护作用,并能抑制内皮细胞凋亡^[8-10],但其作用机制尚未明确。Sun 等研究表明,TSG 抗 MPP+ 诱导的神经细胞凋亡,与其下调 Caspase-3 表达相关^[11]。Caspase 家族的激活是细胞凋亡过程中的中心环节,X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)是凋亡抑制蛋白(Inhibitor of Apoptosis Family of Proteins, IAPs)家族中最强的凋亡抑制剂,可抑制 Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9 的表达^[12-14],Caspase-9 能激活下游 Caspase-3 而传递凋亡信号^[15]。本实验为进一步探讨 TSG 抗内皮细胞凋亡的作用靶点及机制,以 H₂O₂ 诱导内皮细胞凋亡,通过 TSG 预处理后,观察其对 XIAP 及 Caspase-9 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人脐静脉内皮细胞株 HUVEC-304 (编号:C-003-5C)采购自中国科学院细胞生物学研究所上海细胞库。

1.2 主要试剂

TSG (中国药品生物制品检定所产品, 编号 110844)。DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司,胎牛血清、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自中国杭州四季青公司,胰蛋白酶、DMSO、MTT 购自美国 Amresco 公司,Hoechst33258 和 ECL 发光剂均购自中国碧云天生物技术有限公司,逆转录试剂盒购自中国 MBI 公司,兔抗人 XIAP 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,兔抗人 β -actin 多克隆抗体、兔抗人 Caspase-9 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology, Inc 公司,HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自中国博士德生物工程有限公司,Embelin 购自美国 Sigma 公司,其余均为国产分析纯级试剂。

1.3 细胞培养及实验分组

复苏后的人脐静脉内皮细胞用 10%胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO₂、95%饱和湿度条件下培养。按 $5 \times 10^7 \cdot L^{-1}$ 的密度传代,培养至细胞融合率 70%时,按以下分组处理细胞:①空白对照组(10%胎牛血清的培养基培养);② H₂O₂ 组(300 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ H₂O₂ 处理 24 h,诱导细胞凋亡模型);③ TSG 预处理组(10 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ TSG 预处理 24 h 后,再用 300 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ H₂O₂ 孵育细胞 24 h);④ Embelin 与 TSG 共孵育组(30 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ Embelin 预处理 6 h 后,加 10 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ TSG 培养细胞 24 h,最后 300 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ H₂O₂ 孵育细胞 24 h);⑤ TSG 单独处理组(10 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ TSG 处理细胞 24 h);⑥ Embelin 组(30 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ Embelin 孵育细胞 6 h)。

1.4 MTT 法检测细胞活力

取对数生长期的 HUVECs 均匀接种到 96 孔板中,200 μL

细胞悬液/孔。细胞融合度达到 70%时,无血清培养基同步 12 h,按分组要求予以处理。每孔加 150 μL 新鲜培养基,避光条件下再加 20 μL MTT (5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),混匀后置于 37℃ 培养箱中培养 4 h 后,弃上清,加 150 μL DMSO,震荡 10 min 后,酶标仪测 A490。按公式:细胞存活率 = 实验组 A490/对照组 A490 $\times$ 100%计算各组细胞存活率。

1.5 Hoechst 33258 法检测内皮细胞的凋亡

取对数生长期的内皮细胞,按 5×10^7 个/L 的密度接种至 6 孔板。待细胞融合度达到约 70%时,用无血清培养基同步 12 h,按各组要求处理各组细胞。去培养液,用 4℃ 预冷的 4%多聚甲醛固定 20 min,去除固定液,5 min/次 PBS 震荡漂洗 3 次。再用 Hoechst 33258 染色 15 min,避光条件下 5 min/次 PBS 震荡漂洗 3 次。最后在荧光显微镜下观察细胞核形态并拍照。

1.6 RT-PCR 检测 mRNA 表达

各组经不同处理因素处理后,0.25% 胰酶消化收集细胞,Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA,鉴 RNA 的完整性及纯度。各组分别取 5 μg 总 RNA,按照 MBI 公司逆转录试剂盒的操作要求合成 cDNA 第一链,cDNA 产物保存于 -20℃ 备用。XIAP 的上游引物为:5' -gtcggtgctttagttgtca-3',下游引物为:5' -agggttcctcgggtatatgg-3',退火温度 60.1℃,PCR 产物长度 294 bp;Caspase-9 的上游引物为:5' -tttttcagaggggatcgttg-3',下游引物为:5' -tcaagctgtcggcactactg-3',退火温度 59.0℃,PCR 产物长度 269 bp; β -actin 的上游引物为:5' -aaatctggcaccacacctt-3',下游引物为:5' -agcactgtgttggcgtacag-3',退火温度 60.6℃,PCR 产物长度 646 bp。PCR 反应参数为:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环后,72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统拍照并对 DNA 目的条带进行扫描,以 β -actin 为内参,分析 XIAP、Caspase-9 基因相对表达水平。

1.7 Western-Blot 检测蛋白表达

胰蛋白酶消化收集各组细胞,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 60 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离,转移到 PVDF 膜上,用含 5% 牛奶的封闭液封闭 1-2 h,加入 1:1000 稀释的一抗 XIAP 或 β -actin,4℃ 孵育过夜,TBST 缓冲液 (0.05% Tween-20 的 TBS 缓冲液)洗膜 3 次,每次 10 min,以 1:5000 稀释 HRP 标记的二抗,室温孵育 1-2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,化学发光试剂显色,胶片显影,扫描胶片后用凝胶图像分析系统测光密度值。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件分析,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示,组间差异采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学差异, $P < 0.01$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 TSG 抑制 H₂O₂ 对 HUVECs 氧化损伤作用

MTT 结果显示,与对照组比较,H₂O₂ 组 HUVECs 细胞活力较显著下降 ($P < 0.01$);10 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ TSG 预处理后细胞增殖率较 H₂O₂ 组增高;Embelin 与 TSG 共孵育组与 TSG 预处理组相比,细胞活力下降 ($P < 0.05$);30 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ Embelin 单独作用对细胞活力无影响。表明 TSG 能明显改善 H₂O₂ 诱导产生的细胞活

力损伤,Embelin 预处理 6 h 后减弱 TSG 的细胞保护作用。

表 1 内皮细胞的增殖($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 1 The proliferation of HUVECs ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Group	A_{490}
Control	1.025 $\pm$ 0.041
300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H ₂ O ₂	0.864 $\pm$ 0.036 ^{***}
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG + 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H ₂ O ₂	1.015 $\pm$ 0.025 ^{&&}
30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Embelin + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG + 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H ₂ O ₂	0.875 $\pm$ 0.037 [#]
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG	1.046 $\pm$ 0.058 ^{&&}
30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Embelin	1.017 $\pm$ 0.101 ^{&&}

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与正常对照组比较; && $P < 0.01$, 与 H₂O₂ 组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与 TSG+H₂O₂ 组相比

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. control; && $P < 0.01$, vs. H₂O₂; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs. TSG+H₂O₂

2.2 Hoechst 33258 染色观察不同处理因素对 HUVECs 细胞凋亡的影响

Hoechst 33258 染色后荧光显微镜下观察, 结果如图 1 所示: 正常活细胞荧光呈均匀弥散状; H₂O₂ 组可见细胞核荧光呈现浓染且致密颗粒状; 经 TSG 预处理后致密浓染颗粒荧光减少; Embelin 与 TSG 预处理组致密浓染颗粒荧光明显增多; TSG、Embelin 单独作用组染色结果与正常对照组无明显差异, 为均匀蓝色荧光, 未见明显细胞凋亡。

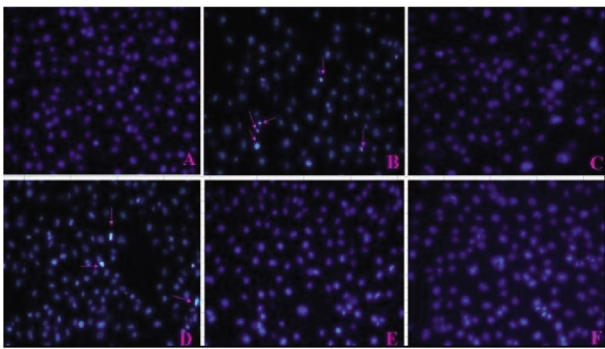


图 1 各组内皮细胞形态 (Hoechst 染色, $\times 200$)

A. 正常对照组; B. 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 组; C. 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG + 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 组; D. 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Embelin + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG + 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 组; E. 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG 组; F. 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Embelin 组

Fig. 1 Morphological observation of HUVECs (Hoechst 33258 dye, $\times 200$)

A. Control; B. 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ group; C. 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG + 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ group; D. 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Embelin + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG + 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ group; E. 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG group; F. 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Embelin group

2.3 XIAP 阻断剂 Embelin 对 HUVECs 细胞 XIAP 表达的影响

Embelin 阻断 XIAP 后, XIAP mRNA 及蛋白表达结果如图 2、图 3 所示: 与正常对照组比较, H₂O₂ 组 XIAP mRNA 及蛋白表达水平明显下调 ($P < 0.01$); 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG 预处理后, 内皮

细胞 XIAP 表达较 H₂O₂ 组明显上调 ($P < 0.01$); 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Embelin 阻断 XIAP 后, XIAP 的 mRNA 及蛋白表达水平较 TSG 预处理组明显降低 ($P < 0.01$); 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG 单独处理组细胞 XIAP 表达水平与正常对照组无明显差异; 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Embelin 单独处理组细胞 XIAP 表达水平较正常对照组低, 说明此浓度 Embelin 可成功阻断 XIAP。表明: TSG 促进 XIAP 的表达, 可被 Embelin 阻断。

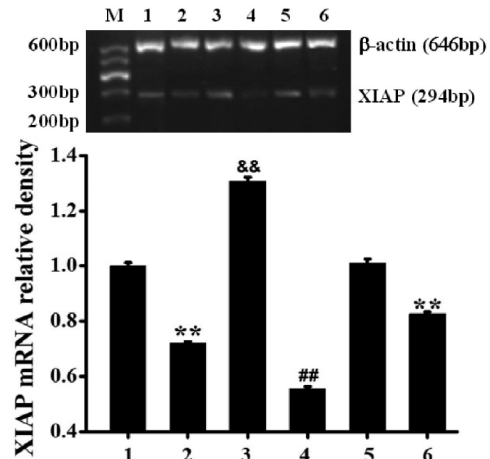


图 2 Embelin 对内皮细胞中 XIAP mRNA 表达的影响

1. 正常对照组; 2. H₂O₂ 组; 3. TSG + H₂O₂ 组; 4. Embelin + TSG + H₂O₂ 组; 5. TSG 组; 6. Embelin 组。 ** $P < 0.01$, 与空白对照组比较; && $P < 0.01$, 与 H₂O₂ 组比较; ## $P < 0.01$, 与 TSG+H₂O₂ 组比较

Fig. 2 Effect of Embelin on the expression of XIAP in mRNA

1. Control; 2. H₂O₂; 3. TSG + H₂O₂; 4. Embelin + TSG + H₂O₂; 5. TSG; 6. Embelin. ** $P < 0.01$, vs. control; && $P < 0.01$, vs. H₂O₂; ## $P < 0.01$, vs. TSG+H₂O₂

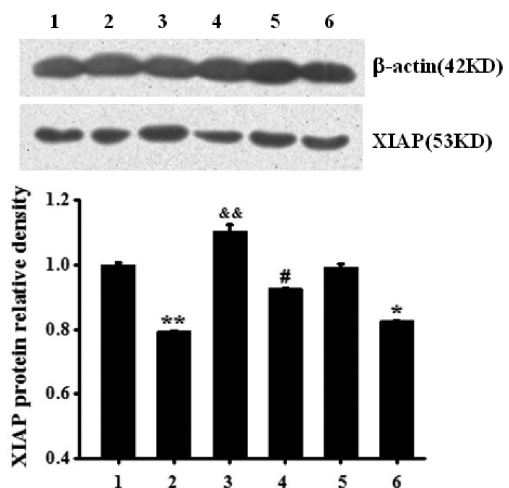


图 3 Embelin 对内皮细胞中 XIAP 蛋白表达的影响

1. 正常对照组; 2. H₂O₂ 组; 3. TSG + H₂O₂ 组; 4. Embelin + TSG + H₂O₂ 组; 5. TSG 组; 6. Embelin 组。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与空白对照组比较; && $P < 0.01$, 与 H₂O₂ 组比较; # $P < 0.05$, 与 TSG+H₂O₂ 组比较

Fig. 3 Effect of Embelin on the expression of XIAP in protein

1. Control; 2. H₂O₂; 3. TSG + H₂O₂; 4. Embelin + TSG + H₂O₂; 5. TSG; 6. Embelin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. control; && $P < 0.01$, vs. H₂O₂; # $P < 0.05$, vs. TSG+H₂O₂

2.4 XIAP 阻断剂 Embelin 对 HUVECs 细胞 Caspase-9 表达的影响

与正常对照组相比, H_2O_2 组 Caspase-9 mRNA 及蛋白表达水平明显上调; 与 H_2O_2 组相比, TSG 预处理组 Caspase-9 mRNA 及蛋白表达水平显著下调; 与 TSG 预处理组相比, 加 Embelin 阻断剂作用后, Caspase-9 mRNA 及蛋白表达水平显著升高; TSG 单独作用能降低 Caspase-9 的表达; Embelin 单独作用组 Caspase-9 的表达与正常组无差异。表明 TSG 可抑制 H_2O_2 诱导的 Caspase-9 的表达, Embelin 阻断 XIAP 后, Caspase-9 的表达较 TSG 预处理组显著增加, 见图 4、图 5。

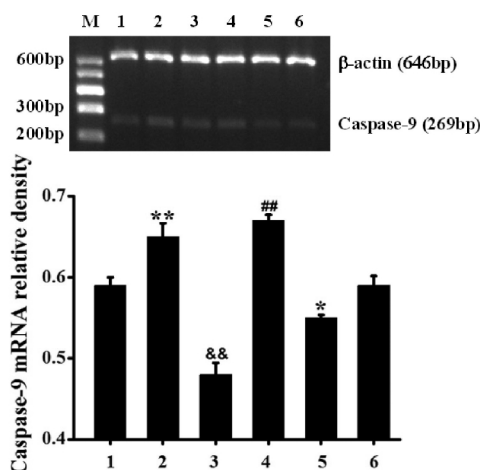


图 4 Embelin 对内皮细胞中 Caspase-9 mRNA 表达的影响

1. 正常对照组; 2. H_2O_2 组; 3. TSG + H_2O_2 组; 4. Embelin + TSG + H_2O_2 组; 5. TSG 组; 6. Embelin 组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与正常对照组比较; && $P < 0.01$, 与 H_2O_2 组比较; ## $P < 0.01$, 与 TSG + H_2O_2 组比较

Fig. 4 Effect of Embelin on the expression of Caspase-9 in mRNA 1.

Control; 2. H_2O_2 ; 3. TSG + H_2O_2 ; 4. Embelin + TSG + H_2O_2 ;

5. TSG; 6. Embelin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. control; && $P < 0.01$, vs. H_2O_2 ; ## $P < 0.01$, vs. TSG + H_2O_2

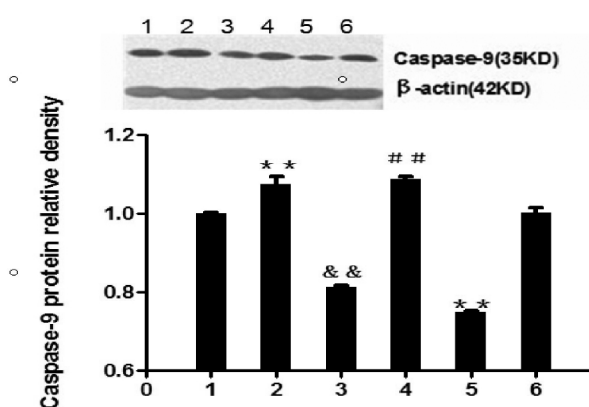


图 5 Embelin 对内皮细胞中 Caspase-9 蛋白表达的影响

1. 空白对照组; 2. H_2O_2 组; 3. TSG + H_2O_2 组; 4. Embelin + TSG + H_2O_2 组; 5. TSG 组; 6. Embelin 组。** $P < 0.01$, 与空白对照组比较; && $P < 0.01$, 与 H_2O_2 组比较; ## $P < 0.01$, 与 TSG + H_2O_2 组比较

Fig. 5 Effect of Embelin on the expression of Caspase-9 in protein

1. Control; 2. H_2O_2 ; 3. TSG + H_2O_2 ; 4. Embelin + TSG + H_2O_2 ; 5. TSG; 6. Embelin. ** $P < 0.01$, vs. control; && $P < 0.01$, vs. H_2O_2 ; ## $P < 0.01$, vs. TSG + H_2O_2

3 讨论

血管内皮是血管的内在生物活性保护层^[6], 在外界氧化应激或炎症因子的刺激下, 血管内皮细胞发生凋亡, 内膜功能遭破坏, 血管内皮细胞数量减少, 从而为巨噬细胞、免疫细胞、平滑肌细胞的迁入创造了条件, 同时脂质侵入血管, 血管受损加剧, 受累部位继而形成斑块^[2]。因此, 维持血管内皮细胞结构及功能的稳定性, 对于防治动脉粥样硬化有至关重要的意义。

本课题组前期实验已证实 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSG 预处理能够显著抑制 H_2O_2 诱导的 HUVECs 细胞损伤, 下调凋亡相关因子 NF- κ B、Bax、Caspase-3 和 PARP 的表达, 促进凋亡抑制因子 Bcl-2 等的表达^[8-10,17], 但其关键靶点及通路仍未明确。XIAP 是 IAPs 家族中作用最强的内源性凋亡抑制蛋白, 也是唯一的直接抑制 Caspase 活性的蛋白^[18]。XIAP 可通过 BIR3 结合区, 直接抑制 Caspase 家族中凋亡启动因子 Caspase-9 裂解, 减少下游 Caspase-7 和 Caspase-3 的激活, 降低 Caspase 的活性, 抑制细胞凋亡^[12,19]。Embelin 是 XIAP 的特异性抑制剂, 可直接阻断 XIAP 与 Caspase 的结合发挥 XIAP 抑制作用。Embelin 抑制 XIAP 后, 影响 XIAP 与 proCaspase-9 的结合^[20], 并导致 Caspase 活性增强, 细胞活力下降, 细胞凋亡加剧^[21]。另外, Caspase-3 还可水解 NF- κ B 的抑制蛋白 I κ B^[21]。为探讨 TSG 是否通过作用 XIAP 而抑制内皮细胞凋亡, 本实验以 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 诱导细胞损伤后, 细胞内 XIAP 表达显著下降, Caspase-9 表达增加; 经 TSG 预处理后, 细胞活力增强, XIAP mRNA 及蛋白表达量增加, Caspase-9 表达减少; 用 XIAP 特异性阻断剂 Embelin 预处理细胞后, 与 TSG 预处理组相比, 细胞增殖率下降, 细胞凋亡率上升, XIAP 表达减少, Caspase-9 表达增加, 即 Embelin 预处理阻断 XIAP 的表达后, 再加入 TSG 也无法恢复 XIAP 的表达水平, 说明 Embelin 可拮抗 TSG 对 XIAP 生成的促进作用, 使 TSG 不能减弱 H_2O_2 对内皮细胞的损伤, 而使细胞凋亡增加。与对照组比较, 单独用 Embelin 作用细胞, 也可降低内皮细胞内 XIAP 的表达, 但对细胞的增殖率和凋亡均无影响。综合以上结果得出 TSG 可通过上调 XIAP 的表达而抑制 H_2O_2 诱导的人脐静脉内皮细胞损伤, 然而内皮细胞的凋亡是多通路相互联系的复杂调控系统, XIAP 是否能作为 TSG 抗氧化、抗内皮细胞凋亡的关键靶点还有待进一步证实。

参考文献 (References)

- [1] Fearon IM, Faux SP. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 47 (3): 372-381
- [2] Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, et al. Atherosclerosis and oxidative stress[J]. Histol Histopathol, 2008, 23(3): 381-390
- [3] Popolo A, Autore G, Pinto A, et al. Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure [J]. Free Radic Res, 2013, 47(5): 346-356
- [4] Liu QL, Xiao JH, Ma R, et al. Effect of 2,3,5,4' -tetrahydro xystilbene-2-O-beta-D-glucoside on lipoprotein, oxidation and proliferation of coronary arterial smooth cells [J]. J Asian Nat Prod Res, 2007, 9(6-8): 689-697
- [5] Zhang W, Xu XL, Wang YQ, et al. Effects of 2,3,4' ,5-Tetrahydro xystilbene-2-O- β -D-Glucoside on Vascular Endothelial

- Dysfunction in Atherogenic-Diet Rats [J]. *Planta Med*, 2009, 75(11): 1209-1214
- [6] Sun FL, Zhang L, Zhang RY, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP⁺-induced cytotoxicity[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 660(2-3): 283-290
- [7] 李军, 王国荣, 张秀芹, 等. 二苯乙烯苷对同型半胱氨酸诱导血管内皮细胞凋亡及 bcl-2、bax、caspase-3 表达的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(4): 743-747
- Li Jun, Wang Guo-Rong, Zhang Xiu-qin, et al. Effects of tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside on apoptosis and expression of bcl-2 /bax /caspase-3 in HUVECs treated with homocysteine [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2013, 29(4): 743-747
- [8] 龙石银, 张彩平, 高细强, 等. NF- κ B/I κ B 在二苯乙烯苷抑制过氧化氢诱导内皮细胞凋亡中的表达变化[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(10): 1353-1357
- Long Shi-yin, Zhang Cai-ping, Gao Xi-qiang, et al. Effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D- glucoside on the expression of NF- κ B/I κ B and apoptosis of HUVECs induced by H₂O₂ [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2011, 27(10): 1353-1357
- [9] 龙石银, 张彩平, 乔新惠, 等. 二苯乙烯苷对氧化诱导内皮细胞凋亡及 Caspase-3 和 PARP 表达的影响 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2011, 38(11): 1052-1059
- Long Shi-yin, Zhang Cai-ping, Qiao Xin-hui, et al. Effects of TSG on Apoptosis of HUVECs and The Expression of Caspase- 3 and PARP Induced by H₂O₂[J]. *Prog Biochem and Biophys*, 2011, 38(11): 1052-1059
- [10] 龙石银, 黄良珠, 乔新惠, 等. 二苯乙烯苷对 H₂O₂ 诱导内皮细胞凋亡的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(3): 181-186
- Long Shi-yin, Huang Liang-zhu, Qiao Xin-hui, et al. Effect of 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-Glucoside on Hydrogen Peroxide Induced Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cell[J]. *Chin J Arterioscl*, 2011, 19(3): 181-186
- [11] Sun FL, Zhang L, Zhang RY, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP⁺-induced cytotoxicity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 660(2-3): 283-290
- [12] Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, et al. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP [J]. *Cell*, 2001, 104(5): 769-780
- [13] Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, et al. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis [J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 112-116
- [14] Silke J, Hawkins CJ, Ekert PG, et al. The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase-3 and caspase-9 interacting sites[J]. *J Cell Biol*, 2002, 157(1): 115-124
- [15] Mahdavi M, Davoodi J, Zali MR, et al. Concomitant activation of caspase-9 and down-regulation of IAP proteins as a mechanism of apoptotic death in HepG2, T47D and HCT-116 cells upon exposure to a derivative from 4-aryl-4H-chromenes family [J]. *Biomed Pharmacother*, 2011, 65(3): 175-182
- [16] Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, et al. Oxidative stress in cardiovascular disease [J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2009, 46(6): 421-440
- [17] 龙石银, 黄良珠, 乔新惠, 等. 二苯乙烯苷对血管内皮细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(7): 557-560
- Long Shi-yin, Huang Liang-zhu, Qiao Xin-hui, et al. Effects of Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-Glucoside on the Expression of Bcl-2 and Bax in the Apoptosis of HUVEC induced by H₂O₂ [J]. *Chin J Arterioscl*, 2011, 19(7): 557-560
- [18] Zheng ZL, Tan LZ, Yu YP, et al. Interaction of CSR1 with XIAP Reverses Inhibition of Caspases and Accelerates Cell Death [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(2): 463-471
- [19] Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family [J]. *EMBO*, 2006, 7(10): 988-994
- [20] Nikolovska-Coleska Z, Xu L, Hu Z, et al. Discovery of embelin as a cell-permeable, small-molecular weight inhibitor of XIAP through structure-based computational screening of a traditional herbal medicine three-dimensional structure database [J]. *J Med Chem*, 2004, 47(10): 2430-2340
- [21] Aird KM, Ghanayem RB, Peplinski S, et al. X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibits apoptosis in inflammatory breast cancer cells with acquired resistance to an ErbB1/2 tyrosine kinase inhibitor [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(5): 1432-1442