

白藜芦醇延缓心肌微血管内皮细胞衰老的作用机制

王强¹, 修成奎², 雷燕^{2*}, 杨静²

(1. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

[摘要] 目的:探讨白藜芦醇延缓人心脏微血管内皮细胞衰老的作用,从细胞骨架角度分析其作用机制。方法:通过热休克蛋白27(HSP27)shRNA细胞系的建立,将组别为8代复制性衰老模型组(衰老组),白藜芦醇组($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),空载质粒(Mock)组,HSP27shRNA组,HSP27shRNA+白藜芦醇组($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。运用 β -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老,细胞计数(cell counting kit-8,CCK-8)检测细胞增殖能力,激光免疫共聚焦显微镜观察纤维状肌动蛋白(F-actin)和球型蛋白单体(G-actin)的形态学改变,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测F-actin蛋白的表达情况。结果:与衰老组比较,白藜芦醇组 β -半乳糖苷酶染色比例下降($P < 0.01$),细胞增殖能力增加($P < 0.01$),F-actin线条较为完整的分布于细胞边缘,G-actin圆润饱满的分布于细胞中央,蛋白表达减少($P < 0.01$);热休克蛋白27(heat shock protein 27,HSP27)沉默后,与Mock组比较,HSP27shRNA组及HSP27shRNA+白藜芦醇组 β -半乳糖苷酶染色比例增加($P < 0.01$),细胞增殖能力下降($P < 0.01$),F-actin外周致密带边缘变得毛糙不规整,崩解消散,细胞的形状不能清晰的呈现;G-actin表现为边缘变模糊呈絮状向外延伸,而细胞中央区域染色离散,形态不规则,F/G-actin的平均光密度值下降($P < 0.01$),蛋白表达减少($P < 0.01$)。结论:白藜芦醇能够延缓内皮衰老,促进增殖,其中HSP27下调F-actin的表达可能是白藜芦醇延缓内皮衰老的重要机制所在。

[关键词] 白藜芦醇; 内皮衰老; heat shock protein 27 (HSP27) shRNA 细胞系; 纤维状肌动蛋白

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0145-08

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.20181930

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180717.0945.003.html>

[网络出版时间] 2018-07-17 13:59

Mechanism of Resveratrol in Delaying Senescence of Cardiac Microvascular Endothelial Cells

WANG Qiang¹, XIU Cheng-kui², LEI Yan^{2*}, YANG Jing²

(1. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China;

2. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of resveratrol in delaying senescence of human cardiac microvascular endothelial cells (HCMEC), and to analyze its mechanism of action from the perspective of cytoskeleton. **Method:** Heat shock protein 27 (HSP27) shRNA cell lines were established, and the cells were divided into 5 groups, the eighth generation replicative senescence model group (senescence group), resveratrol group ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), mock group, HSP27shRNA group, HSP27shRNA + resveratrol group ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Cells senescence was detected by using β -galactosidase staining; cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect cell proliferation; laser confocal microscopy was used to observe the morphological changes of fibrous actin (F-actin) and globular actin (G-actin). Western blot was used to detect the protein expression of F-actin. **Result:** As compared with the senescence group, resveratrol could decrease the proportion of β -galactosidase stained ($P < 0.01$), promote cell proliferation ($P < 0.01$), maintain F-actin distribution in the cell periphery and G-actin distribution in the cell center, and reduce the protein expression ($P < 0.01$). After silencing of heat shock protein

[收稿日期] 20180408(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273976,81703865);中国中医科学院自主选题项目(ZZ2013002)

[第一作者] 王强,博士,从事中西医结合心血管基础和临床研究,E-mail:wqwin21@163.com

[通信作者] *雷燕,博士,研究员,从事中西医结合心血管基础和临床研究,E-mail:13651217893@163.com

27 (HSP27), as compared with mock group, HSP27shRNA group and HSP27shRNA + resveratrol group could increase the proportion of β -galactosidase stained ($P < 0.01$), decrease cell proliferation ($P < 0.01$); F-actin around the cell periphery became irregular, sputtered and dissipated gradually, with unclear cell shape; G-actin showed blurred edges and stretched outside in cotton-like method, with staining dispersion in cell central region and irregular shape. The mean optical density value of F/G-actin was decreased ($P < 0.01$), and the protein expression was also decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Resveratrol could delay endothelial senescence, promote cell proliferation, and the mechanism may be associated with down-regulation of the F-actin expression by HSP27.

[**Key words**] resveratrol; endothelial senescence; heat shock protein 27 (HSP27) shRNA cell lines; F-actin

白藜芦醇作为广泛存在于葡萄、草莓、花生、其他传统药物中的成分,是通过许多不同通路调节起到作用的多酚类。Nonomura 等^[1]于 1940 年从白藜芦的根和 1963 年于中药虎杖中分离出来。其中以虎杖中含量最多,它可以诱导抗氧化酶的产生(例如过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、血红素氧合酶-1),抑制炎症标记物的表达^[2-3],保持端粒的长度和激活端粒酶的活性^[4],增加自噬相关的基因的表达^[5],抑制糖基化终末产物的产生和危害^[6],保持线粒体的功能^[7],模拟限制热量的作用等,这些都与延缓衰老密切相关。

微血管是官腔直径在 100 μm 以下的毛细血管网^[8]。微血管内皮细胞与大血管的内皮细胞比较,为多功能的分泌细胞,在调节机体内环境稳定、维持正常的生理和免疫功能、物质交换、凝血反应、炎症反应等有重要的意义^[9]。心血管系统衰老的关键因素是内皮功能的紊乱,这与衰老相关的微血管功能的损伤有关。损伤的微血管功能进一步导致心血管和代谢系统疾病的病理改变。因此微循环在心血管和代谢系统疾病中非常重要,这与内皮细胞在微循环中占有比例较大密切相关。细胞骨架是指细胞质中的蛋白质纤维网架体系,狭义是指细胞中与保持细胞形态结构和运动有关的纤维网络,主要包括微管、微丝、中间纤维,它对于内皮细胞的形状、运动、染色体的分离和细胞分裂、物质的运输等起到重要作用。肌动蛋白(actin)作为微丝的主要组成,包括聚合态的纤维状肌动蛋白(F-actin)和可溶性的球型蛋白单体(G-actin)两种形式,在细胞中发挥支撑、信息传导和非肌性运动的作用^[10-11]。细胞骨架参与内皮细胞通透性改变、内皮舒缩功能、内皮凋亡、内皮细胞信号转导等^[12]。鉴于白藜芦醇延缓衰老的作用、细胞骨架对微血管内皮细胞的意义,该研究主要从骨架蛋白角度探讨白藜芦醇延缓微血管内皮细胞衰老的作用及机制,为后期的研究提供一定

的实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人心肌微血管内皮细胞(human cardiac microvascular endothelial cell, HCMEC, 批号 9596)。

1.2 药物及试剂 白藜芦醇(中国食品药品检定研究院,批号 111535-200502),用冻存液溶解,配成 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的贮存液分装后保存于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱,使用时用内皮细胞完全培养基(ECM)稀释成相应的浓度。胎牛血清,内皮细胞生长因子,ECM 基础培养基,双抗 P/S Solution,牛血浆纤连蛋白,胰酶中和液,胰酶/EDTA 消化酶,冻存液(美国 Sciencell 公司,批号分别为 13301, 12995, 13916, 13311, 12579, 12953, 13010, 13779); Earle's 平衡盐溶液(EBSS, 美国 Gibco 公司,批号 1605212); 兔 Beclin 1 多克隆抗体,兔 LC3B 多克隆抗体 β -肌动蛋白(β -actin)(英国 Abcam 公司,货号分别为 ab55878, ab128025, ab127923); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H + L)(上海碧云天生物技术有限公司,货号 A0208); 戊二醛溶液(美国 Sigma-Aldrich 公司,货号 G5882); 高效 RIPA 组织/细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司,货号 S3568); 无内毒素质粒提取试剂盒(美国 Biomiga 公司,批号 PD1220-02); 快速连接试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号 6022); Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司,批号 1274436)。

1.3 仪器 SVE-4A1 型超净工作台(新加坡 ESCO 公司); MCO-20AIC 型 CO_2 细胞培养箱(日本 Sanyo 公司); 4000B 型倒置显微镜及成像系统(德国 Leica 公司); Delta320 型精密 pH 计(英国 Mettler-Toledo 公司); sepattechbiofuge 28RS 型低温高速离心机(德国 Heraeus 公司); BS97My Cyler 型荧光定量 PCR 仪, 1658001 型稳压稳流电泳仪, 1703940 型半干转电转印仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 热休克蛋白 27 (HSP27) shRNA 细胞系的建立

2.1 重组慢病毒载体的构建

2.1.1 shRNA 片段的设计、合成筛选 从 www.ncbi.nlm.nih.gov 查询 HSP27 在 GENE BANK 中的序列号为 NM_001540。利用软件设计 HSP27shRNA 特异性干扰序列,使用 BLAST(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)排除与其他编码序列具有同源性,最

终选定 4 种 shRNA (shRNA-1, shRNA-2, shRNA-3, shRNA-4, 见表 1)。由英国 Invitrogen 公司设计合成对应的 oligo 寡核苷酸。收到合成的 oligo 寡核苷酸,进行 60 °C 退火 50 s 反应,使合成的单链寡核苷酸变为双链。同样进行 HSP2, HSP3, HSP4 的退火反应。进行以上的操作之后得到的反应产物储存于 -20 °C。

表 1 shRNA 序列

Table 1 Sequence of shRNA

引物名称	oligo 寡核苷酸序列
HSP-1	上游 CCGG CAGTCCAACGAGATCACCATC CTCGAG GATGGTGATCTCGTTGGACTG TTTTTC 下游 AATTCAAAAA CAGTCCAACGAGATCACCATC CTCGAG GATGGTGATCTCGTTGGACTG
HSP-2	上游 CCGG GATCACCATCCCAGTCACCTT CTCGAG AAGGTGACTGGGATGGTGATC TTTTTC 下游 AATTCAAAAA GATCACCATCCCAGTCACCTT CTCGAG AAGGTGACTGGGATGGTGATC
HSP-3	上游 CCGG CCCGGACGAGCTGACGGTCAA CTCGAG TTGACCGTCAGCTCGTCCGGG TTTTTC 下游 AATTCAAAAA CCCGGACGAGCTGACGGTCAA CTCGAG TTGACCGTCAGCTCGTCCGGG
HSP-4	上游 CCGG CCGATGAGACTGCCGCCAAGT CTCGAG ACTTGGCGGCAGTCTCATCGG TTTTTC 下游 AATTCAAAAA CCGATGAGACTGCCGCCAAGT CTCGAG ACTTGGCGGCAGTCTCATCGG

2.1.2 重组质粒的合成

2.1.2.1 慢病毒载体质粒的酶切 酶切载体 (Lenti-KDP), 37 °C 酶切反应 120 min 后终止反应并对酶切产物进行纯化。

2.1.2.2 双链 OligoDNA 与质粒的连接 按照 Takara 快速连接试剂盒进行连接,共有 4 种退火产物 HSP1, HSP2, HSP3, HSP4, 和一个阴性组 (退火产物用水代替), 5 管连接反应。

2.1.2.3 转化和涂板 冰上加感受态 50 μL, 冰上孵育 20 ~ 30 min; 42 °C 水浴 90 s 热激; 冰上放置 2 ~ 5 min, 涂氨苄青霉素平板 (氨苄青霉素 50 mg · L⁻¹)。

2.1.2.4 阳性克隆鉴定 挑取转化子重悬于 LB 溶液 10 μL, 混匀取 1 μL 作为模板, 进行菌落 PCR 鉴定, 并挑选阳性的菌落, 摇菌, 提取质粒。得到的质粒送 Invitrogen 公司进行测序。

2.1.2.5 重组质粒的扩增 提取质粒, 使用 Biomiga 无内毒素质粒提取试剂盒进行提取和纯化。

2.1.2.6 慢病毒包装 准备包装病毒, 接种 293T 细胞 7 × 10⁵ 个/60 mm 平皿, 24 h 后待细胞密度达 70% ~ 80% 时转染。共转染质粒 Lenti-KDPshMock 或 HSPshRNA-1, 2, 3, 4 质粒 1 μg, 加上 pMD2.0G (addgene) 和 psPAX2 (addgene) 质粒各 1 μg, 相应体积的 Opti-MEM 混合, 调整总体积到 250 μL, 室温下孵育 5 min; lipofectamine2000 转染试剂 7.5 μL 与

Opti-MEM 250 μL 混合, 室温下孵育 5 min; 将后者加入到前者的离心管中, 混合均匀, 室温下孵育 20 min, 将质粒与转染试剂混合物加入到 293T 细胞的培养液中孵育 5 h, 然后更换完全培养基, 继续培养 72 h。收集细胞上清液, 4 °C, 4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 弃沉淀, 以 0.22 μm 滤器过滤上清液获得病毒液、分装, -80 °C 保存。

2.2 慢病毒感染细胞和 HSP27 沉默效果的鉴定

2.2.1 慢病毒感染人心肌微血管内皮细胞 复苏复制性衰老人心肌微血管内皮细胞 (8 代细胞) 一支^[13]。待复苏细胞长满后, 种植细胞, 准备感染病毒。细胞密度为 2 × 10⁵ 个/孔 (6 孔板), 5 个孔。第 2 天感染 (移去培养基, 换用含病毒培养基 (1.5 mL 培养基含 10 mg · L⁻¹ polybrene + 病毒液 200 μL, 混匀, 加至细胞), 感染过夜。24 h 后移去含病毒培养基, 换用新鲜培养基。72 h 后 6 孔板内细胞已经长满, 胰酶/EDTA 消化, 收获细胞, 准备蛋白免疫印迹法 (Western blot) 鉴定沉默效果。

2.2.2 Western blot 鉴定沉默的效果 蛋白提试剂提取蛋白, 同时确定蛋白含量, 调整浓度, 通过煮沸, 变性 5 min, 10% SDS-PAGE 电泳后转膜, 5% BSA-TBST 封闭 1 h, 5% BSA-TBST 稀释一抗 (HSP27 1:1 000, β-actin 1:500), 4 °C 孵育至第 2 天, 山羊抗鼠 IgG (H + L) 二抗 1:1 万室温孵育 40 min, β-actin

为内参,Odyssey 荧光扫描。

3 细胞实验方法

3.1 造模、分组及给药 细胞培养和传代依据内皮细胞培养方法进行,等细胞长满瓶底 90% 时,用 0.25% 胰酶/EDTA 液消化,中和液中和后,吹打后移至 50 mL 离心管 $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集细胞,弃上清液,加入 2~3 mL 的培养基,采用 1:2 或 1:3 传代。

实验分为 6 组,分别为 8 代人心肌微血管内皮细胞组(衰老组),白藜芦醇组($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),空载质粒(Mock)组,HSP27shRNA 组,HSP27shRNA + 白藜芦醇组,均用 ECM 完全培养基稀释,干预 48 h。其中各组细胞在干预之前均为 8 代人心肌微血管内皮细胞;白藜芦醇的剂量根据前期实验的结果确定^[13-14]。

3.2 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色鉴定衰老 待 24 孔板内细胞铺满瓶底 70%~80% 时,弃培养液;每孔加入清理液 500 μL ,弃清理液,再加入固定液 500 μL ,室温固定 5 min;弃固定液,每孔加入酸性液 500 μL ,清洗细胞,弃酸性液,重复以上操作;每孔加入染色液 400 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育出现蓝色;在 10 倍物镜下数 100~200 个细胞,随机找 3 个视野,计算染色为蓝色细胞的比例。

3.3 CCK-8 检测细胞增殖 每个孔中接种细胞 6×10^3 个,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 24 h,待细胞生长至 70% 时,每孔中加 CCK-8 液 10 μL ,于培养箱中放置 2 h,用酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度 A 。

3.4 激光共聚焦显微镜观察细胞骨架改变 荧光染色观察 F-actin 和 G-actin 的改变较为直观^[15]。用纤连蛋白包被 96 孔板,每孔接种 $6\times 10^3\sim 8\times 10^3$ 个,当细胞占瓶底 70%~80% 时,用 PBS 清洗内皮细胞,重复 1 遍,用 4% 的多聚甲醛常温孵育 15 min,用 PBS 清洗 3 遍,每次 5 min;用 0.1% TritonX-100 常温下穿透细胞 5 min,用 PBS 清洗(同上);用 Alexafluor488 DNase I 和罗丹明鬼笔环肽染色 30 min,再用 PBS 清洗 3 遍,用激光共聚焦显微镜观察 F-actin 和 G-actin 的形态。

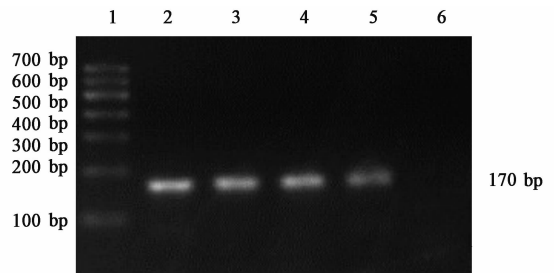
3.5 Western blot 测定细胞 F-actin, HSP27 蛋白表达情况 蛋白提试剂提取蛋白,同时确定蛋白含量,调整浓度,通过煮沸,变性 5 min,10% SDS-PAGE 电泳后转膜,5% BSA-TBST 封闭 1 h,5% BSA-TBST 稀释一抗(HSP27 1:1 000, F-actin 1:500, β -actin 1:500),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育至第 2 天,山羊抗鼠 IgG(H+L)二抗 1:1 万室温孵育 40 min, β -actin 为内参,Odyssey

荧光扫描,使用 Gel Image System4.0 计算灰度值,与内参做比值后进行分析。

3.6 统计学方法 采用 SPSS 18.0 进行统计处理,观察指标用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组内比较用 LSD 检验,组间比较用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

4 结果

4.1 重组质粒菌落 PCR 和基因测序鉴定 慢病毒质粒与 HSP27-shRNA 片段连接形成的 HSP27-shRNA 重组质粒,经过 PCR 鉴定结果提示重组质粒大小与估计相符。见图 1。基因测序结果表明 HSP27-shRNA 寡核苷酸链序列插入的位置和顺序正确。

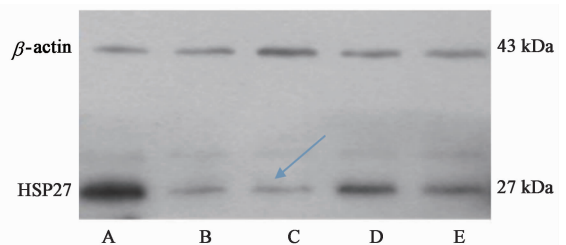


1. Marker; 2. HSP1; 3. HSP2; 4. HSP3; 5. HSP4; 6. Mock

图 1 HSP27shRNA 重组质粒 PCR 鉴定

Fig.1 PCR identification of HSP27 shRNA recombinant plasmid

4.2 HSP27 基因敲低效果测定 通过 Western blot 检测 Mock, HSP1, HSP2, HSP3, HSP4 组慢病毒液感染后 HSP27 蛋白的表达,发现 HSP2 组 HSP27 蛋白表达量明显降低(箭头所示,见图 2),因此选用 HSP2 作为特定敲低序列,后续实验以 HSP2 慢病毒液感染细胞,大量制备 HSP27 基因敲低的细胞。

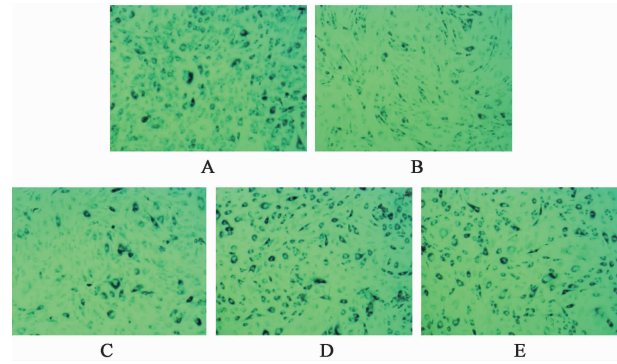


A. Mock; B. HSP1; C. HSP2; D. HSP3; 4. HSP4

图 2 不同基因序列慢病毒液感染细胞后 HSP27 蛋白的表达

Fig.2 Expression of HSP27 protein after different gene sequence lentivirus infects cells

4.3 白藜芦醇对 SA- β -gal 细胞染色的影响 与衰老组比较,白藜芦醇组 SA- β -gal 衰老染色显著减少($P<0.01$);与 Mock 组比较,基因敲低组细胞 SA- β -gal 衰老染色显著增多($P<0.01$)。见图 3,表 2。



A. 衰老组; B. 白藜芦醇组; C. Mock 组; D. Hsp27shRNA 组; E. Hsp27shRNA + 白藜芦醇组(图 4,5 同)

图 3 白藜芦醇对 HCMEC 衰老染色的影响(SA-β-gal, ×100)

Fig. 3 Effects of resveratrol on proportion of aging staining in HCMEC (SA-β-gal, ×100)

表 2 白藜芦醇对 HCMEC 衰老染色的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of resveratrol on proportion of aging staining in HCMEC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	SA-β-gal 染色 蓝色细胞比/%
衰老	-	75.13 ± 3.06
白藜芦醇	10	51.90 ± 4.56 ²⁾
Mock	-	76.61 ± 2.42
Hsp27shRNA	-	86.14 ± 2.12 ⁴⁾
Hsp27shRNA + 白藜芦醇	10	84.11 ± 5.14 ⁴⁾

注:与衰老组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与 Mock 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3~5 同)。

4.4 白藜芦醇对细胞增殖的影响 与衰老组比较,白藜芦醇组细胞增殖能力显著增多($P < 0.01$);与 Mock 组比较,基因敲低组细胞增殖能力显著下降($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 白藜芦醇对 HCMEC 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of resveratrol on ability of cell proliferation in HCMEC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A
衰老	-	1.223 ± 0.161
白藜芦醇	10	1.589 ± 0.149 ²⁾
Mock	-	0.939 ± 0.053
Hsp27shRNA	-	0.700 ± 0.028 ⁴⁾
Hsp27shRNA + 白藜芦醇	10	0.643 ± 0.109 ⁴⁾

4.5 白藜芦醇对细胞骨架形态学的影响 与衰老组比较,白藜芦醇组 F-actin 的边缘较清晰光滑,且 F-actin 很少形成应力纤维和断裂;G-actin 边缘清

晰,主要集中在细胞中间,边界清晰圆润,染色清晰;F-actin,G-actin 的平均荧光强度增加,差异无统计学意义。与 Mock 组细胞比较,基因敲低组细胞 F-actin 外周致密带边缘变得毛糙不规整,崩解消散,细胞的形状不能清晰的表现出来;G-actin 表现为边缘变模糊呈絮状向外延伸,而细胞中央区域染色离散,形态不规则;F-actin,G-actin 的荧光强度显著下降($P < 0.01$)。见图 4,表 4。

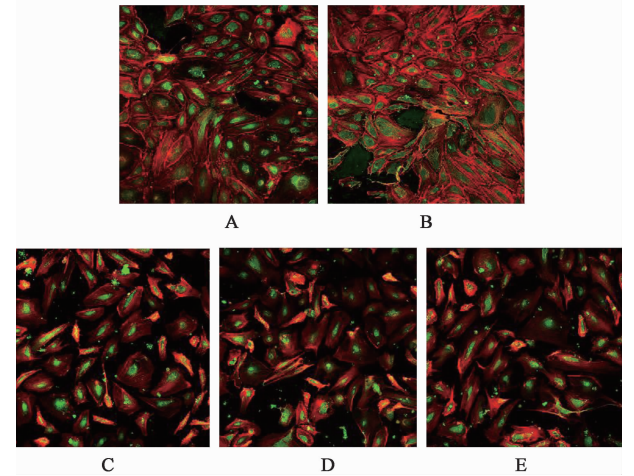


图 4 白藜芦醇对 HCMEC F-actin 形态学影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 4 Effect of resveratrol on morphology of F-actin in HCMEC (immunofluorescence, ×200)

表 4 白藜芦醇对 HCMEC 细胞骨架荧光强度的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of resveratrol on fluorescence intensity in HCMEC of cytoskeleton ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	荧光强度
衰老	-	0.893 ± 0.010
白藜芦醇	10	1.346 ± 0.120
Mock	-	0.099 ± 0.035
Hsp27shRNA	-	0.591 ± 0.023 ⁴⁾
Hsp27shRNA + 白藜芦醇	10	0.552 ± 0.044 ⁴⁾

4.6 白藜芦醇对细胞骨架蛋白表达的影响 与衰老组比较,白藜芦醇组细胞 F-actin 蛋白表达显著减少($P < 0.01$);与 Mock 组比较,基因敲低组细胞 F-actin 蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。见图 5,表 5。

5 讨论

该研究主要分析了白藜芦醇延缓微血管内皮细胞衰老的作用,包括减少衰老染色,促进细胞增殖,保持微结构细胞骨架的形态正常。此外,该研究还从细胞骨架层面探讨了白藜芦醇延缓微血管内皮

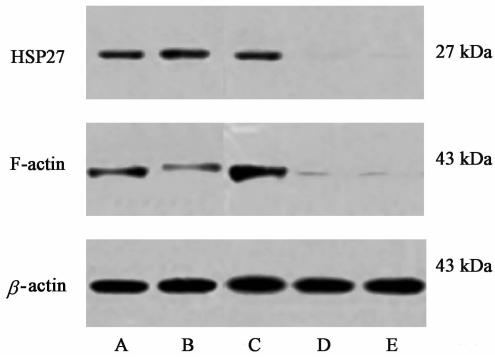


图 5 各组 HCMEC F-actin, HSP27 蛋白的表达

Fig. 5 Protein expression of F-actin, HSP27 in each group of HCMEC

表 5 白藜芦醇对 HCMEC F-actin 和 HSP27 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of resveratrol on protein expression of F-actin, HSP27 in HCMEC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	F-actin/ β -actin	HSP27/ β -actin
衰老	-	0.240 \pm 0.005	0.172 \pm 0.002
白藜芦醇	10	0.177 \pm 0.004 ²⁾	0.235 \pm 0.005
Mock	-	0.316 \pm 0.003	0.276 \pm 0.002
Hsp27shRNA	-	0.049 \pm 0.003 ⁴⁾	0.031 \pm 0.002 ⁴⁾
Hsp27shRNA + 白藜芦醇	10	0.040 \pm 0.002 ⁴⁾	0.030 \pm 0.003 ⁴⁾

细胞衰老的机制。通过基因沉默技术建立 HSP27shRNA 细胞系,通过比较白藜芦醇干预 HSP27shRNA 细胞系,发现 HSP27shRNA + 白藜芦醇组衰老染色增多、细胞增殖能力下降、细胞骨架蛋白 F-actin 外周致密带边缘变得毛糙不规整和崩解消散,F-actin 蛋白表达显著降低,且与 HSP27shRNA 细胞系无统计学差异,表明了白藜芦醇延缓微血管内皮细胞衰老的作用与 HSP27 下调骨架蛋白 F-actin 的表达有关。

白藜芦醇减少高糖诱导的内皮细胞的凋亡^[16],抑制钙离子内流,延缓动脉粥样硬化^[17]。作为抗氧化剂可以提高体外一氧化氮(nitric oxide, NO)的利用度,减少炎症反应,调节体内葡萄糖代谢平衡^[18];通过降低血浆甘油三酯和低密度脂蛋白水平,并通过增加高密度脂蛋白水平发挥抗动脉粥样硬化作用^[19]。白藜芦醇增加 NO 的产生、上调内皮型一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的表达,增加 NO 的活性,改善内皮的氧化还原平衡、抑制促炎症和代谢损伤引起的内皮细胞的激活^[20-21]。白藜芦醇通过 eNOS 依赖型途径,诱导内皮细胞和血管老化小鼠内皮的线粒体生成^[22]。因

此白藜芦醇对内皮细胞的保护机制主要包括促进 NO 的产生改善内皮功能、促进线粒体合成和改善线粒体功能、抗氧化作用、减少活性氧的产生、调节糖脂代谢、抗动脉粥样硬化作用。但是从细胞骨架角度探讨白藜芦醇延缓内皮细胞衰老的研究较少。该研究表明了白藜芦醇延缓血管内皮细胞衰老作用与细胞骨架形态的保持密切相关。Bruder 等^[23]通过白藜芦醇作用于牛肺动脉内皮细胞,发现白藜芦醇对血管内皮的保护作用与肌动蛋白微管和微丝的重新排列有关。该研究与国外研究一致。

HSP27 作为分子开关,涉及到细胞生物学中很多重要角色,包括平滑肌细胞的迁移、凋亡、抵抗氧化应激、内皮的屏障功能、调节炎症,这些都对动脉粥样硬化的进程有重要的影响。通过 HSP27 在心血管事件血清中的表达及动脉粥样硬化进程相关机制的分析,证实 HSP27 可能是预测动脉粥样硬化进程和冠心病事件的重要标记物。Dohke 等^[24]通过蛋白质组学方法来研究由于充血性心力衰竭导致的心动过速引起的蛋白的变化,发现磷酸化染色和蛋白印迹证实 HSP27 在 Ser-78 和 Ser-82 位点的表达增加,认为磷酸化的 HSP27 与预防心功能不全有关。此外急性缺血可以导致心肌 HSP27 表达的上调。因此,HSP27 的表达对心脏有保护作用。HSP27 的磷酸化可以导致细胞骨架的重排,进而引起细胞功能的改变,即磷酸化的 HSP27 上调 F-actin 的蛋白表达。Rho 的激活依靠相对分子质量为 38 的促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)的激活和 HSP27 的表达^[25]。热休克蛋白作为普遍存在和高度保守的分子伴侣,促进多种蛋白激酶的构象成熟,因此热休克蛋白功能的抑制会导致蛋白激酶的稳定形态崩溃^[26]。Alford 等^[27]通过基因沉默技术发现 HSP27 对促炎症因子基因的表达是必要的。过度表达的热休克蛋白减弱核转录因子- κB 的激活^[28]。因此 HSP27 可以调节与细胞骨架密切相关的上游蛋白三磷酸鸟苷结合蛋白,MAPks,蛋白激酶 C/G,炎症因子等^[29-32]。从文献角度说明了 HSP27 与细胞骨架的调节密切相关。因此该研究通过基因沉默,建立 HSP27 沉默的内皮细胞株,发现 HSP27 基因敲低组细胞 F-actin 外周致密带边缘变得毛糙不规整,崩解消散,细胞的形状不能清晰的表现出来;G-actin 表现为边缘变模糊呈絮状向外延伸,而细胞中央区域染色离散,形态不规则;F-actin, G-actin 的平均光密度值下降,与文献研究一致。通过对 HSP27 沉默组通过白藜芦醇干预,

发现 HSP27 基因沉默 + 白藜芦醇组分别与 Mock 组比较, HSP27 基因敲低后白藜芦醇组细胞 SA- β -gal 染色比例增加, 增殖能力下降; F-actin 外周致密带边缘变得毛糙不规整, 崩解消散, 细胞的形状不能清晰的呈现; G-actin 表现为边缘变模糊呈絮状向外延伸, 而细胞中央区域染色离散, 形态不规则, F-actin, G-actin 的平均光密度值下降; F-actin 蛋白表达明显增多, 表明白藜芦醇延缓微血管内皮衰老作用与 HSP27 下调 F-actin 密切相关。

[参考文献]

[1] Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A. Chemical constituents of polygonaceous plants. I. Studies on the components of Ko-jo-kon (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.) [J]. Yakugaku Zasshi, 1963, 83: 988-990.

[2] Rodríguez-Bies E, Tung B T, Navas P, et al. Resveratrol primes the effects of physical activity in old mice [J]. Br J Nutr, 2016, 116(6): 979-988.

[3] Seif El-Din S H, El-Lakkany N M, Salem M B, et al. Resveratrol mitigates hepatic injury in rats by regulating oxidative stress, nuclear factor-kappa B, and apoptosis [J]. J Adv Pharm Technol Res, 2016, 7(3): 99-104.

[4] Latorre E, Birar V C, Sheerin A N, et al. Small molecule modulation of splicing factor expression is associated with rescue from cellular senescence [J]. BMC Cell Biol, 2017, 18(1): 31-38.

[5] Tomas-Hernández S, Blanco J, Rojas C, et al. Resveratrol potentially counteracts quercetin starvation-induced autophagy and sensitizes HepG2 cancer cells to apoptosis [J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(5): 25-29.

[6] Fleming T H, Humpert P M, Nawroth P P, et al. Reactive metabolites and AGE/RAGE-mediated cellular dysfunction affect the aging process: a mini-review [J]. Gerontology, 2011, 57(5): 435-443.

[7] Ungvari Z, Sonntag W E, de Cabo R, et al. Mitochondrial protection by resveratrol [J]. Exerc Sport Sci Rev, 2011, 39(3): 128-132.

[8] 修丽梅, 王振平, 严雪梅, 等. 糖尿病足微血管病变及其药物治疗的研究进展 [J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(6): 532-533.

[9] 杨向红. 微血管内皮细胞功能改变与糖尿病微血管病变研究热点 [J]. 中国动脉粥样硬化杂志, 2007, 15(7): 528-529.

[10] CHEN C L, WANG Y, Sesaki H, et al. Myosin I links PIP3 signaling to remodeling of the actin cytoskeleton in chemotaxis [J]. Sci Signal, 2012, doi: 10.1126/scisignal.2002446.

[11] YAN J, Mihaylov V, XU X, et al. A G β y effector, elmoE, transduces GPCR signaling to the actin network during hemotaxis [J]. Dev Cell, 2012, 22(1): 92-103.

[12] 王强, 雷燕, 李敏, 等. 细胞骨架与内皮衰老关系的研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(4): 506-508.

[13] 王强. 益气活血中药对衰老血管内皮细胞骨架蛋白的干预作用及机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2015: 118.

[14] 王强, 雷燕, 杨静, 等. 人参三七川芎提取物对复制性衰老内皮细胞的影响和钙黏蛋白的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10): 123-127.

[15] Kim M S, Kewalramani G, Puthanveetil P, et al. Acute diabetes moderates trafficking of cardiac lipoprotein lipase through p38 mitogen-activated protein kinase dependent actin cytoskeleton organization [J]. Diabetes, 2008, 57(1): 64-76.

[16] LU T, ZHOU D, GAO P, et al. Resveratrol attenuates high glucose-induced endothelial cell apoptosis via mediation of store-operated calcium entry [J]. Mol Cell Biochem, 2017, doi: 10.1007/s11010-017-3194-7.

[17] 伍志学, 张韧, 林锐珊, 等. 白藜芦醇调节 STIM1 抗动脉粥样硬化的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15): 148-153.

[18] Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and cardiovascular diseases [J]. Nutrients, 2016, 8(5): E250.

[19] Göçmen A Y, Burgucu D, Gümüşlü S. Effect of resveratrol on platelet activation in hypercholesterolemic rats: CD40-CD40L system as a potential target [J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2011, 36(31): 323-330.

[20] ZHANG H, ZHANG J, Ungvari Z, et al. Resveratrol improves endothelial function: role of TNF α and vascular oxidative stress [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(8): 1164-1171.

[21] Taubert D, Berkels R. Upregulation and activation of eNOS by resveratrol [J]. Circulation, 2003, 107(11): e78-e79.

[22] Csiszar A, Labinskyy N, Pinto J T, et al. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 297(1): H13-H20.

[23] Bruder J L, Hsieh T, Lerea K M, et al. Induced cytoskeletal changes in bovine pulmonary artery endothelial cells by resveratrol and the accompanying modified responses to arterial shear stress [J]. BMC Cell Biol, 2001, 2(1): 1-11.

[24] Dohke T, Wada A, Isono T, et al. Proteomic analysis

- reveals significant alternations of cardiac small heat shock protein expression in congestive heart failure[J]. *J Card Fail*, 2006, 12(1): 77-84.
- [25] Garcia M C, Ray D M, Lackford B, et al. Arachidonic acid stimulates cell adhesion through a novel p38 MAPK-RhoA signaling pathway that involves heat shock protein 27 [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(31): 20936-20945.
- [26] Sreedhar A S, Soti C, Csermely P. Inhibition of Hsp90: a new strategy for inhibiting protein kinases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1697(1/2): 233-242.
- [27] Alford K A, Glennie S, Turrell B R, et al. Heat shock protein 27 functions in inflammatory gene expression and transforming growth factor-beta-activated kinase-1 (TAK1)-mediated signaling [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(9): 6232-6241.
- [28] Sheppard P W, SUN X, Khammash M, et al. Overexpression of heat shock protein 72 attenuates NF- κ B activation using a combination of regulatory mechanisms in microglia [J]. *PLoS Comput Biol*, 2014, 10(2): e1003471.
- [29] Gray D S, LIU W F, CHEN C J, et al. Engineering amount of cell-cell contact demonstrates biphasic proliferative regulation through RhoA and the actin cytoskeleton [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(15): 2846-2854.
- [30] Desai T R, Leeper N J, Hynes K L, et al. Interleukin-6 causes endothelial barrier dysfunction via the protein kinase C pathway [J]. *J Surg Res*, 2002, 104(2): 118-123.
- [31] Boon R A, Leyen T A, Fontijn R D, et al. KLF2-induced actin shear fibers control both alignment to flow and JNK signaling in vascular endothelium [J]. *Blood*, 2010, 115(12): 2533-2542.
- [32] Ghosh S, Tewari R, Dixit D, et al. TNF α induced oxidative stress dependent Akt signaling affects actin cytoskeletal organization in glioma cells [J]. *Neurochem Int*, 2010, 56(1): 194-201.

[责任编辑 周冰冰]