

艳山姜挥发油通过Nrf2/Notch1信号通路抑制 高糖诱导的内皮间质转分化

赵爽, 何丽, 黄梅, 张嫩玲, 姜丰, 沈祥春, 李玲*, 张彦燕*
(贵州医科大学基础医学院, 药学院, 贵阳 550025)

[摘要] 目的:分析艳山姜挥发油(EOFAZ)抑制高糖(HG)诱导的内皮间质转分化(EndMT)的作用及其机制。方法:体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs),分析EOFAZ对HG诱导EndMT及氧化应激损伤的药效学作用,设定空白组,EOFAZ低、高剂量组($1, 4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),高糖组($35 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),EOFAZ预孵育2 h后加入HG共同孵育72 h复制EndMT细胞模型。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测波形蛋白(vimentin)和血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)的蛋白表达水平,血管生成实验检测细胞迁移能力以分析EOFAZ对EndMT的影响;采用2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针检测活性氧(ROS)水平的变化以及试剂盒法检测细胞内丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)的含量,以分析EOFAZ对氧化应激的影响;采用Western blot检测核转录因子E2相关因子2(Nrf2)与Notch1的蛋白表达水平。通过腺病毒(AD)转染实现Nrf2的过表达,进一步分析EOFAZ抑制EndMT的作用机制,设定空白组,AD-Nrf2+EOFAZ组($4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),AD-Nrf2组,高糖组($35 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),EOFAZ组($4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。Nrf2基因重组腺病毒过表达质粒感染细胞6 h,更换为正常培养基24 h,EOFAZ预孵育2 h后加入HG共同孵育72 h诱导EndMT。通过Western blot检测Nrf2, CD31, vimentin, Notch1和Snail的蛋白表达。结果:与高糖组比较,EOFAZ干预给药后明显上调HG诱导的CD31蛋白表达水平和下调vimentin蛋白表达水平($P<0.05, P<0.01$),降低细胞迁移能力($P<0.01$),同时降低ROS和MDA的水平($P<0.05, P<0.01$),提高CAT和SOD的水平($P<0.01$)。此外,EOFAZ干预给药能够显著上调抗氧化信号Nrf2的蛋白表达水平($P<0.01$),下调Notch1的蛋白表达水平($P<0.01$)。通过稳定的腺病毒转染HUVECs可实现Nrf2的高表达,Western blot结果显示,与高糖组比较,各给药处理组显著提高Nrf2和CD31的蛋白表达水平($P<0.01$),显著下调vimentin, Notch1和Snail蛋白表达水平($P<0.01$);与AD-Nrf2组相比,AD-Nrf2+EOFAZ组能够进一步上调Nrf2和CD31的蛋白表达水平($P<0.05, P<0.01$),降低vimentin, Notch1和Snail蛋白表达水平($P<0.01$)。结论:EOFAZ可改善HG诱导的血管内皮细胞氧化应激损伤,从而抑制EndMT,其作用与Nrf2/Notch1信号通路相关。

[关键词] 艳山姜; 挥发油; 氧化应激; 内皮间质转分化(EndMT); 核转录因子E2相关因子2(Nrf2); Notch信号; 蛋白免疫印迹法

[中图分类号] R22;R285;R96;Q2 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)23-0099-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201746

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200530.1244.001.html>

[网络出版日期] 2020-6-1 11:28

Inhibitory Effect of Essential Oil from Fructus *Alpinia zerumbet* on Endothelial-to-mesenchymal Transition Induced by High Glucose via Nrf2/Notch1 Signaling Pathway

ZHAO Shuang, HE Li, HUANG Mei, ZHANG Nen-ling, JIANG Feng,
SHEN Xiang-chun, LI Ling*, ZHANG Yan-yan*

(School of Basic Medical Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University,
Guiyang 550025, China)

[收稿日期] 20200309(031)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560811,U1812403-4-4);贵州省科技支撑计划项目(黔科合[2020]1Z069)

[第一作者] 赵爽,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:1660613296@qq.com

[通信作者] *李玲,硕士,教授,从事中药药理学研究,E-mail:354529962@qq.com;

*张彦燕,硕士,副教授,从事心血管药物药理学研究,E-mail:9127397@qq.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect and the possible mechanism of essential oil from fructus *Alpinia zerumbet* (EOFAZ) on endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) induced by high glucose (HG). **Method:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was cultured *in vitro* to analyze the pharmacodynamic effects of EOFAZ on EndMT and oxidative stress damage induced by HG. The experiment was set the blank group, HG group (35 mmol·L⁻¹), EOFAZ low dose group (1 μg·L⁻¹) and EOFAZ high dose group (4 μg·L⁻¹). After EOFAZ intervention for 2 h, HG was added to incubate for 72 h in order to establish EndMT cell model. Western blot was used to detect the protein expression of vimentin and platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31). Angiogenesis experiment was used to detect the ability of cell migration ability in order to analyze the effect of EOFAZ on EndMT. The changes of reactive oxygen species (ROS) levels were detected by 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence probe and the contents of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in cells were detected by the kit method to analyze the effect of EOFAZ on oxidative stress. Western blot was used to detect the protein expression levels of nuclear transcription factor E2 related factor 2 (Nrf2) and Notch1. The overexpression of Nrf2 was achieved by adenovirus (AD) transfection and the mechanism of EOFAZ inhibiting EndMT was further analyzed. The experiment was set the blank group, HG group (35 mmol·L⁻¹), AD-Nrf2 group, EOFAZ group (4 μg·L⁻¹), AD-Nrf2+EOFAZ group (4 μg·L⁻¹). The cells were infected with recombinant adenovirus overexpression plasmid of Nrf2 gene for 6 h, then replaced with normal medium for 24 h. After EOFAZ intervention for 2 h, HG was added to co-incubate for 72 h to induce EndMT. Western blot was used to detect the protein expressions of Nrf2, CD31, vimentin, Notch1 and Snail. **Result:** Compared with the HG group, after treatment with EOFAZ, the protein expression of CD31 was significantly up-regulated ($P<0.05$), the protein expression of vimentin was significantly down-regulated ($P<0.01$), the ability of cell migration was decreased ($P<0.01$), and the contents of ROS and MDA were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), the levels of CAT and SOD were increased ($P<0.01$). In addition, EOFAZ could significantly up-regulate the protein expression of antioxidant signal Nrf2 ($P<0.01$) and down-regulate the protein expression of Notch1 ($P<0.01$). High expression of Nrf2 was achieved by stable AD transfection into HUVECs. The results of Western blot showed that, compared with the HG group, the protein expression levels of Nrf2 and CD31 in each treatment group were significantly increased ($P<0.01$), while the protein expression levels of vimentin, Notch1 and Snail were down-regulated ($P<0.01$). At the same time, compared with the AD-Nrf2 group, the AD-Nrf2+EOFAZ group could further up-regulate the protein expressions of Nrf2 and CD31 ($P<0.05$, $P<0.01$), while decrease the protein expression levels of vimentin, Notch1 and Snail ($P<0.01$). **Conclusion:** EOFAZ ameliorates oxidative stress injury of vascular endothelial cells induced by HG and inhibits EndMT, which is related to Nrf2/Notch1 signaling pathway.

[Key words] *Alpinia zerumbet* fructus; essential oil; oxidative stress; endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT); nuclear transcription factor E₂ related factor 2 (Nrf2); Notch signal; Western blot

内皮间质转分化(EndMT)是内皮细胞丢失黏附连接及极性,向间充质细胞发生转化的过程^[1]。EndMT可致内皮细胞丢失特异性标志物,获得间充质或肌成纤维细胞表型,同时进一步获得迁移及分泌胶原的能力^[2-3],从而持续恶化血管功能。研究表明炎症、氧化应激、脂质损伤等均可诱导EndMT的发生^[4-6]。高血糖引起的内皮细胞氧化应激损伤可诱导EndMT的发生,此过程是引起糖尿病患者内皮功能损伤的主要原因^[7]。因此,改善氧化应激损伤,

抑制EndMT对保护糖尿病患者血管内皮细胞生物学功能具有重要意义。

据报道,核转录因子E2相关因子2(Nrf2)是维持氧化还原稳态和细胞抗氧化防御的关键调节因子^[8],Nrf2的激活可减少活性氧(ROS)的产生从而抑制EndMT^[9]。Notch信号传导途径广泛参与及精细调控细胞的生物学过程,通过释放Notch胞内结构域(NICD)进入细胞核中激活Notch信号下游基因的转录,进而调控EndMT相关基因Snail和Slug

的表达^[10],说明 Notch 信号传导途径参与 EndMT。另有研究显示,Nrf2-Notch1 信号轴在非小细胞肺癌中能够影响肿瘤细胞的凋亡^[11],提示 Nrf2/Notch1 信号参与调节细胞生物学过程。故本研究提出 Nrf2/Notch1 信号可能是参与 EndMT 的重要分子信号。

艳山姜最早被收录于 2003 年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》,具有温中燥湿、行气止痛、截疟等功效^[12]。艳山姜挥发油(EOFAZ)为艳山姜果实的挥发油部位,具有抗炎镇痛、抗氧化等作用。前期研究证实,EOFAZ 可通过调控核转录因子- κ B 信号抑制脂多糖诱导的人主动脉内皮细胞炎性损伤^[13],同时抑制转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)诱导的 EndMT^[14],提示其具有良好的血管药理学活性。基于此,本研究采用高糖(HG)诱导 EndMT 模型,基于氧化应激损伤分析 EOFAZ 抑制 EndMT 的作用,并探讨其 Nrf2/Notch1 分子信号机制。

1 材料

DMi1 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司),CFX 型凝胶成像系统仪和 170-3930 型垂直电泳系统(美国 Bio-Rad 公司),Varioskan LUX 型多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

艳山姜药材采自贵州省贞丰县,经贵州医科大学龙庆德教授鉴定为姜科植物艳山姜 *Alpinia zerumbet* 的干燥成熟果实;内皮细胞培养基(ECM),胎牛血清(FBS),内皮细胞生长因子(ECGS),双抗(青霉素-链霉素,P/S)(美国 ScienCell 公司,批号分别为 26219,26331,25682,26512);胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号 2046777);Nrf2 基因重组腺病毒过表达质粒(AD-r-Nfe2l2-3xflag-EGFP,上海汉恒生物科技有限公司,批号 HH20190610YY-AP02);2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶快速配制试剂盒,上样缓冲液(loading buffer)(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 S0033,P0012A,P0015);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号 LC2002);基质胶(metrigel, BD Biosciences 公司,批号 354230);丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 A003-1,S0101,A001-3-2);D-无水葡萄糖(纯度>99.8%),二甲基亚砜,RIPA 裂解液,苯甲基磺酰氟(PMSF),彩虹 245 广谱蛋白 Marker,牛血清白蛋白(BSA)封闭液,TBST 洗涤液(北京索莱宝科技有限

公司,批号分别为 G8150,D8370,20180823,20180525,PR1920,A8020,T1081);BCA 蛋白定量试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号 P0010);电化学发光(ECL)检测试剂盒(美国密理博公司,批号 1829501);血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)抗体,波形蛋白(vimentin)抗体,Notch1 抗体,Snail 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 #3528,#19245,#4380,#5276);核转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)抗体(Proteintech 公司,批号 16396-1-AP); β -肌动蛋白(β -actin,美国艾菲公司,批号 T0022)。原代人脐静脉内皮细胞(HUVECs,美国 ScienCell 公司,批号 19195)。

2 方法

2.1 EOFAZ 的提取与制备 精密称取艳山姜干燥成熟果实适量,加 10 倍量水浸泡 0.5 h,采用水蒸气蒸馏法提取 5 h,经无水硫酸钠脱水制备 EOFAZ,计算挥发油得率 0.98%^[15],采用 GC-MS 进行挥发油质量分析^[16-17]。精密吸取 EOFAZ 30 μ L(29 mg),加二甲基亚砜 2.9 mL 使溶解,配成 10 $g \cdot L^{-1}$ 的母液,经 0.22 μ m 微孔滤膜除菌后置于 4 $^{\circ}C$ 避光保存,临用时用培养基稀释至工作浓度。

2.2 细胞培养 HUVECs 采用含 5% FBS,1% P/S 和 1% ECGS 的 ECM 培养基置于温度 37 $^{\circ}C$,相对湿度 95%,含 5% CO_2 的培养箱中常规培养,适时换液。取 4~5 代对数生长期的细胞进行相关实验。

2.3 细胞转染 细胞生长密度达 60% 时进行腺病毒转染实现 Nrf2 的过表达,腺病毒感染指数(病毒数-细胞数)30:1,即每孔内(体系 2 mL)加入 AD-r-Nfe2l2-3xflag-EGFP 4 μ L,6 h 后更换为正常培养基常规培养 24 h,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Nrf2 的转染效率,转染成功的细胞用于实验。

2.4 细胞分组与处理 分析 EOFAZ 抑制 HG 诱导 EndMT 及氧化应激损伤的药理学作用,实验共分为 4 组,即空白组(5% ECM),高糖组(35 $mmol \cdot L^{-1}$),EOFAZ 低剂量组(1 $\mu g \cdot L^{-1}$)以及 EOFAZ 高剂量组(4 $\mu g \cdot L^{-1}$)。HUVECs 生长融合达 70% 左右时,采用 EOFAZ 预孵育 2 h,再加入 HG 共同孵育 72 h 诱导 EndMT 细胞模型,进行细胞表型标志物水平、迁移能力、氧化应激相关指标以及关键信号 Nrf2 和 Notch1 的检测。基于抗氧化经典信号 Nrf2,通过腺病毒转染实现 Nrf2 的过表达,进一步分析 EOFAZ 抑制 EndMT 的作用机制。实验分为 5 组,即空白组(5% ECM),高糖组(35 $mmol \cdot L^{-1}$),腺病毒(AD)-Nrf2+EOFAZ 组(4 $\mu g \cdot L^{-1}$),AD-Nrf2 组,EOFAZ 组

(4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。依据 2.3 项下方法进行细胞转染,给予 EOFAZ 预孵育 2 h 后加入 HG 共孵育 72 h 诱导 EndMT,进行细胞表型标志物(CD31 和 vimentin)及 Nrf2,Notch1 和 Snail 蛋白水平的检测。

2.5 血管生成实验检测细胞迁移能力 将 metrigel 与无血清 ECM 以 1:1 比例进行稀释,均匀铺在 24 孔板内,置于细胞培养箱中凝固 30 min。按 2.4 项下方法分组给药处理 72 h 后的细胞用胰蛋白酶消化,以 2×10^5 个/mL 的密度接种于 metrigel 胶上,2~4 h 后进行观察,拍照,选取 5 个视野进行计数。

2.6 荧光探针法检测细胞 ROS 水平 HUVECs 融合度达到 70% 左右按 2.4 项下方法分组给药处理,72 h 后弃去旧培养液,用无血清 ECM 洗涤 3 次,将 DCFH-DA 荧光探针按 1:1 000 的比例用无血清 ECM 稀释,使探针终浓度为 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。置细胞培养箱中避光孵育 40 min,采用酶标仪在 488,525 nm 处测定吸光度 A ,倒置荧光显微镜下观察拍照。

2.7 氧化应激相关指标的检测 分别收集各实验组细胞或培养上清液,按照试剂盒说明书的操作检测各组细胞内 MDA 和 SOD 的水平,以及各组细胞培养上清液中 CAT 的含量。

2.8 Western blot 检测相关蛋白的表达 取各实验组细胞,加入 RIPA 裂解液(含 $100\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF)提取内皮细胞总蛋白,按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定各组蛋白浓度,加入适量 loading buffer 后煮沸 5 min 使其变性。取每组处理好的蛋白样品等体积加入凝胶泳道中进行 SDS-PAGE 分析,根据蛋白 Marker 显示蛋白充分分离后,将凝胶转移至甲醇激活的 PVDF 膜上,使用标准湿式转膜装置转膜 90 min,加入 5% BSA 室温封闭 2 h。加入稀释度为 1:1 000 的一抗于 $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜, $1\times\text{TBST}$ 清洗 3 次后加入对应的二抗(1:1 万),置于摇床上缓慢摇动 90 min,回收抗体后用 $1\times\text{TBST}$ 清洗 3 次,每次 10 min。ECL 底物发光,胶片于凝胶成像仪内扫描。数据采用 Image Lab 5.1 软件分析。

2.9 统计学分析 所有实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,进行正态性检验及单因素方差分析,组间比较采用最小显著性差异法(LSD), $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 EOFAZ 对 HG 诱导 EndMT 的作用 Western blot 结果表明,与空白组比较,高糖组内皮细胞标志物 CD31 的蛋白水平显著下调($P<0.01$),间充质标志物 vimentin 的蛋白水平显著上调($P<0.01$);与

高糖组比较,EOFAZ 预孵育后可明显上调 CD31 的蛋白水平($P<0.05$),下调 vimentin 的蛋白水平($P<0.01$)。血管生成实验结果发现高糖作用后小管生成数量明显增加($P<0.01$),而 EOFAZ 预孵育后小管生成数量明显减少($P<0.01$),表明 EOFAZ 可以降低 HUVECs 迁移能力,抑制 HG 诱导的 EndMT。结果见表 1 和图 1,2。

表 1 EOFAZ 对 HG 诱导的 CD31, vimentin 蛋白表达及 HUVECs 迁移能力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Effect of EOFAZ on expressions of CD31, vimentin and migration ability of HUVECs induced by HG ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	CD31 $/\beta\text{-actin}$	vimentin $/\beta\text{-actin}$	小管生成 数量/个
空白	-	1.41 ± 0.04	0.57 ± 0.05	5.00 ± 1.58
高糖	-	$0.81\pm 0.09^{1)}$	$1.02\pm 0.05^{1)}$	$41.20\pm 7.19^{1)}$
EOFAZ	1	$1.41\pm 0.25^{2)}$	$0.70\pm 0.09^{3)}$	$20.60\pm 3.91^{3)}$
	4	$1.90\pm 0.58^{2)}$	$0.26\pm 0.05^{3)}$	$11.20\pm 1.92^{3)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与高糖组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表 2 同)。

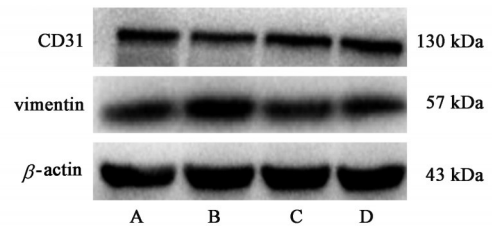


图 1 EOFAZ 对 HG 诱导的 HUVECs 中 CD31 和 vimentin 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of EOFAZ on protein expressions of CD31 and vimentin in HUVECs induced by HG

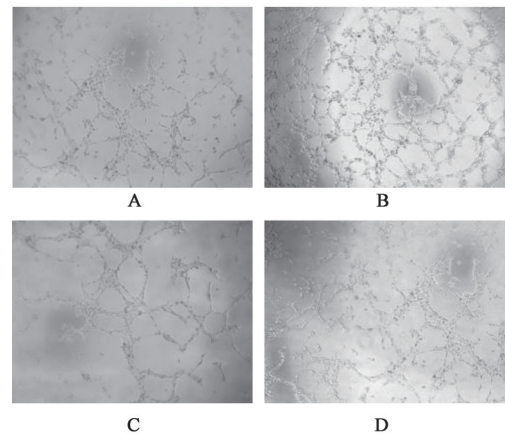


图 2 EOFAZ 对 HUVECs 迁移能力的影响(倒置显微镜, $\times 50$)

Fig. 2 Effect of EOFAZ on migration ability of HUVECs induced by HG (inverted microscope, $\times 50$)

3.2 EOfAZ对HG诱导氧化应激的作用 与空白组比较,高糖组ROS和MDA水平显著升高($P < 0.01$),CAT和SOD水平显著降低($P < 0.01$);与高糖组比较,EOfAZ预处理可不同程度抑制HG诱导的ROS($P < 0.05$)和MDA水平($P < 0.05, P < 0.01$),同时显著提高CAT和SOD的水平($P < 0.01$),表明EOfAZ可改善HG诱导的血管内皮细胞氧化应激损伤。见图3和表2。

3.3 EOfAZ对HG诱导Nrf2与Notch1表达的作用 Western blot结果显示,与空白组比较,HG作用后可显著下调抗氧化信号Nrf2的蛋白水平($P < 0.01$),显著上调Notch1的蛋白水平($P < 0.01$);与高糖组比较,EOfAZ预孵育后可显著上调Nrf2的蛋白水平($P < 0.01$),下调Notch1的蛋白水平($P < 0.01$)。见

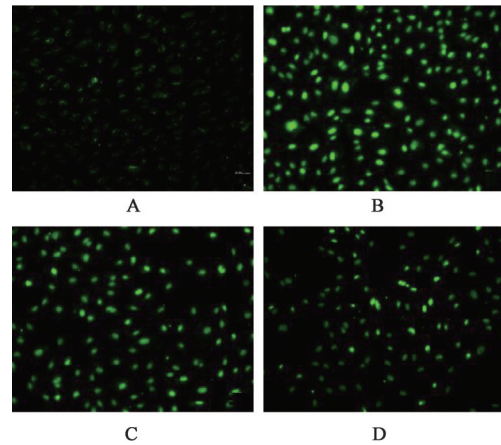


图3 EOfAZ对HG诱导的ROS水平的影响(DCFH-DA, $\times 100$)
Fig. 3 Effect of EOfAZ on level of ROS induced by HG (DCFH-DA, $\times 100$)

表2 EOfAZ对HG诱导的ROS,MDA,CAT和SOD水平以及HUVECs中Nrf2和Notch1蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	ROS	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	CAT/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	Nrf2/ $\beta\text{-actin}$	Notch1/ $\beta\text{-actin}$
空白	-	0.91 \pm 0.11	0.50 \pm 0.02	10.85 \pm 0.64	14.25 \pm 0.40	1.31 \pm 0.06	0.47 \pm 0.05
高糖	-	3.21 \pm 0.54 ¹⁾	0.77 \pm 0.04 ¹⁾	3.06 \pm 0.55 ¹⁾	7.34 \pm 1.02 ¹⁾	0.54 \pm 0.09 ¹⁾	0.69 \pm 0.04 ¹⁾
EOfAZ	1	1.99 \pm 0.11 ²⁾	0.65 \pm 0.05 ²⁾	6.10 \pm 0.96 ³⁾	10.57 \pm 0.56 ³⁾	1.61 \pm 0.01 ³⁾	0.46 \pm 0.07 ³⁾
	4	1.74 \pm 0.17 ²⁾	0.55 \pm 0.07 ³⁾	9.72 \pm 0.49 ³⁾	13.95 \pm 1.48 ³⁾	1.84 \pm 0.03 ³⁾	0.39 \pm 0.04 ³⁾

表2和图4。

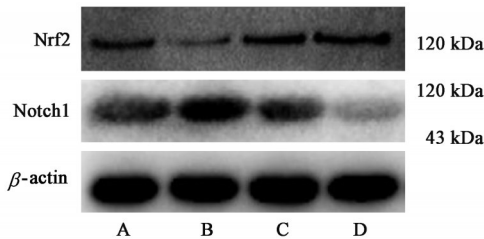
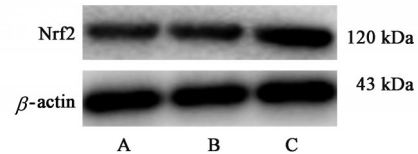


图4 EOfAZ对HG诱导的HUVECs中Nrf2和Notch1蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of EOfAZ on protein expressions of Nrf2 and Notch1 in HUVECs induced by HG

3.4 EOfAZ和过表达Nrf2对HG诱导相关蛋白表达的作用 为了通过稳定的腺病毒转染实现内皮细胞Nrf2的高表达,设定了3个组别,分别为空白组,AD-阴性对照(NC)组以及AD-Nrf2组,采用Western blot测得空白组和AD-NC组的条带灰度值均为0.16 \pm 0.02,AD-Nrf2组的条带灰度值0.31 \pm 0.01,见图5,结果表明通过稳定的腺病毒转染已成功实现了HUVECs中Nrf2的过表达。

另外,Western blot结果显示,与空白组进行比较,高糖组Nrf2和CD31的蛋白水平显著下调($P < 0.01$),vimentin,Notch1和Snail蛋白水平显著上调



A.空白组;B.AD-NC组;C.AD-Nrf2组

图5 腺病毒转染对HUVECs中Nrf2表达的影响

Fig. 5 Effect of adenovirus transfection on expression of Nrf2 in HUVECs

($P < 0.01$)。与高糖组比较,AD-Nrf2组及EOfAZ组均显著提高Nrf2和CD31的蛋白表达水平($P < 0.01$),下调vimentin,Notch1和Snail蛋白表达水平($P < 0.01$)。同时,与AD-Nrf2组相比,AD-Nrf2+EOfAZ组能够进一步上调Nrf2和CD31的蛋白表达水平($P < 0.05, P < 0.01$),降低vimentin,Notch1和Snail蛋白表达水平($P < 0.01$)。表明EOfAZ可通过上调Nrf2的表达,降低Notch1及其下游靶分子Snail的表达抑制EndMT,且Nrf2信号可能为Notch1的上游调节信号。见表3和图6。

4 讨论

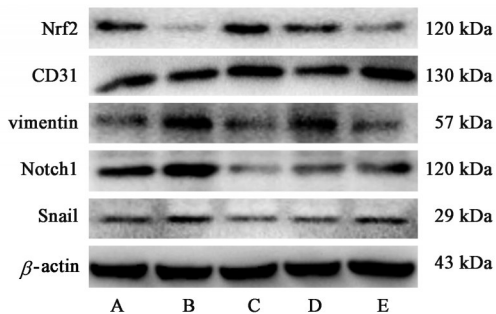
研究表明EndMT参与动脉粥样硬化、糖尿病等疾病进程^[18-19]。处于EndMT进程中的内皮细胞从

表 3 EOFAZ 和过表达 Nrf2 对 HG 诱导的 Nrf2, CD31, vimentin 等蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of EOFAZ and Nrf2 overexpression on protein expressions of Nrf2, CD31, vimentin and others induced by HG ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Nrf2/ β -actin	CD31/ β -actin	vimentin/ β -actin	Notch1/ β -actin	Snail/ β -actin
空白	-	0.80±0.03	0.90±0.04	1.03±0.07	1.15±0.02	0.98±0.01
高糖	-	0.14±0.03 ¹⁾	0.22±0.02 ¹⁾	1.88±0.08 ¹⁾	2.82±0.43 ¹⁾	1.62±0.24 ¹⁾
AD-Nrf2+EOFAZ	4	1.35±0.27 ³⁾	1.34±0.11 ⁴⁾	1.19±0.03 ⁴⁾	0.32±0.05 ⁴⁾	0.39±0.04 ⁴⁾
AD-Nrf2	-	0.77±0.08 ²⁾	0.46±0.08 ²⁾	1.48±0.08 ²⁾	0.49±0.03 ²⁾	0.55±0.03 ²⁾
EOFAZ	4	0.31±0.04 ²⁾	1.11±0.15 ²⁾	1.31±0.05 ²⁾	0.58±0.03 ²⁾	0.69±0.06 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与高糖组比较²⁾ $P < 0.01$;与 AD-Nrf2 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。



A. 空白组; B. 高糖组; C. AD-Nrf2+EOFAZ 组; D. AD-Nrf2 组; E. EOFAZ 组

图 6 EOFAZ 和过表达 Nrf2 对 HG 诱导的相关蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of EOFAZ and Nrf2 overexpression on expressions of related proteins induced by HG

血管内膜脱落,同时通过入侵皮下组织而进行细胞迁移,由此细胞失去内皮细胞标志物 CD31 和血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)^[20],同时表达间充质细胞标志物如 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和 vimentin,从而获得间充质表型,诱发血管内皮功能紊乱,加剧糖尿病血管功能损伤。本文发现 EOFAZ 干预给药后可显著增加 HG 诱导的内皮细胞标志物 CD31 水平,降低 vimentin 的表达,同时降低内皮细胞迁移能力,结果证实 EOFAZ 可抑制 HG 诱导的 EndMT。Nrf2 是维持氧化还原稳态和细胞抗氧化防御的关键调节因子^[8],能够通过抗氧化反应元件调节多种抗氧化剂及 II 期解毒酶的表达^[21],且 Nrf2 的激活可以抑制 EndMT 过程^[9]。研究表明 Notch 信号通路活化可上调 α -SMA 的表达,同时 Jagged1/Notch 信号通路的激活可以在体外诱导 EndMT 的发生^[22],提示 Notch 信号参与了 EndMT 进程。本研究发现 EOFAZ 预处理后可上调 Nrf2 的蛋白水平,下调 Notch1 的蛋白水平,表明 EOFAZ 抑制 HG 诱导的 EndMT 作用涉及对 Nrf2 与 Notch1 信号的调节。

据研究报道,高水平的 ROS 可诱导血管内皮细胞发生 EndMT,有效降低 ROS 水平可抑制氧化应激介导的 EndMT^[23]。MDA 作为脂质过氧化的最终

产物,可以反应人体氧自由基的代谢和自由基攻击细胞的损伤程度^[24]。SOD 和 CAT 是机体内重要的抗氧化剂和自由基清除剂,其活性的高低可反应体内抗氧化能力的强弱^[25]。本研究结果显示,EOFAZ 干预作用后降低 ROS 和 MDA 的水平,升高 SOD 和 CAT 的水平,证实 EOFAZ 可通过改善氧化应激来抑制 HG 诱导的 EndMT。

有研究证实,线粒体钙单向转运调节因子主要通过 ROS/Nrf2/Notch1 信号来调控肝细胞癌的侵袭和迁移^[26]。另有研究报道,ROS-Nrf2-抗氧化反应元件(ARE)轴可以调控循环肿瘤细胞中 Notch1 的表达,提示抗氧化分子 Nrf2 与 Notch1 之间存在一定的关联^[27]。已有研究表明,Nrf2 可作为上游信号调控 Notch1 的表达,间接影响上皮间质转化途径,促进乳腺癌细胞的迁移^[28]。同时,Notch 信号的激活导致胞内域裂解和释放,继而进入细胞核中调节下游靶分子,包括 EndMT 开关效应蛋白 Snail^[10],从而促进 TGF- β 诱导的间质转分化进程^[29]。本研究结果表明,在 HG 诱导的 EndMT 中,Nrf2 的高表达可逆转 EndMT 进程,同时 Nrf2 可作为上游信号调控 HG 诱导的 Notch1 及其下游靶分子 Snail 的表达,这与其他研究报道一致。同时本研究证实了 EOFAZ 可通过上调 Nrf2 的表达来抑制 HG 诱导的氧化应激损伤,并进一步调控 Notch1 及其下游靶分子 Snail 的表达,从而抑制 HG 诱导的 EndMT。即 EOFAZ 可通过 Nrf2/Notch1 信号通路抑制 HG 诱导的 EndMT,但其精密的作用机制还有待进一步深入分析。

[参考文献]

[1] PINTO M T, COVAS D T, KASHIMA S, et al. Endothelial mesenchymal transition: comparative analysis of different induction methods[J]. Biol Proced Online, 2016, 18: 10.
[2] PIERA-VELAZQUEZ S, LI Z D, JIMENEZ S A. Role of endothelial-mesenchymal transition(EndoMT) in the

- pathogenesis of fibrotic disorders [J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(3): 1074-1080.
- [3] ZHOU H, CHEN X, CHEN L Z, et al. Anti-fibrosis effect of scutellarin via inhibition of endothelial-mesenchymal transition on isoprenaline-induced myocardial fibrosis in rats [J]. *Molecules*, 2014, 19(10): 15611-15623.
- [4] RIEDER F, KESSLER S P, WEST G A, et al. Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(5): 2660-2673.
- [5] 刘欣辰, 孙宏晨. 内皮间充质转化在肿瘤中的研究进展 [J]. *口腔医学研究*, 2019, 35(11): 1023-1025.
- [6] 张湾, 刘高虹, 于为民, 等. 激活素A对成人脐静脉内皮细胞的转分化作用 [J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(21): 3276-3280.
- [7] 万欢. 丹参酮 II_A对高糖环境下大鼠心肌微血管内皮细胞间质转分化的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2013.
- [8] DE OLIVEIRA M R, BRASIL F B, ANDRADE C M B. Naringenin attenuates H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction by an Nrf2-dependent mechanism in SH-SY5Y cells [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(11): 3341-3350.
- [9] CHEN Y C, YUAN T Y, ZHANG H F, et al. Activation of Nrf2 attenuates pulmonary vascular remodeling via inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition: an insight from a plant polyphenol [J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(8): 1067-1081.
- [10] 齐莎莎. 褪黑素通过 Notch1/Numb/Snail 信号通路调控子宫内膜相关疾病上皮间质转化的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [11] 王敏, 刘其礼, 许帅, 等. 鸦胆子苦醇对非小细胞肺癌 Nrf2-Notch1 信号轴的影响机制研究 [J]. *中国医药导报*, 2018, 15(19): 16-19.
- [12] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 292.
- [13] 林丹, 石廷雨, 杨红, 等. 艳山姜挥发油调控 NF- κ B 信号抑制 LPS 诱导 HAECs 炎症损伤 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(19): 139-144.
- [14] 李晨, 赵爽, 徐旖旎, 等. 艳山姜挥发油对 TGF- β_1 诱导人脐静脉内皮细胞间质转分化的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(22): 160-164.
- [15] 张旭, 何明辉, 郑伟耀, 等. 艳山姜果实挥发油的提取工艺优化及其化学成分分析 [J]. *中国民族民间医药*, 2017, 26(8): 94-17.
- [16] 沈祥春, 胡涵帅, 肖海涛. GC-MS 法分析艳山姜根茎、茎、叶及果实等部位挥发油化学成分 [J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(8): 7-11.
- [17] 张彦燕, 文波, 陶玲, 等. 艳山姜挥发油对脂多糖诱导损伤的血管内皮细胞保护作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(4): 66-68.
- [18] 林昌建, 孔辉, 解卫平, 等. EndMT 在血管重塑中的作用及相关信号通路 [J]. *江苏医药*, 2016, 42(12): 1384-1386.
- [19] 杜建奎. Kallikrein-8 促进内皮细胞间质转化在糖尿病心脏和肾脏间质纤维化中的作用及其机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019.
- [20] FIDLER I J. Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2001, 10(2): 257-269.
- [21] AN L, ZHOU M, MARIKAR F M M T, et al. *Salvia miltiorrhiza* lipophilic fraction attenuates oxidative stress in diabetic nephropathy through activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 [J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(7): 1441-1457.
- [22] NOSEDA M, MCLEAN G, NIESSEN K, et al. Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation [J]. *Circ Res*, 2004, 94(7): 910-917.
- [23] LI J M, ZHANG Q W, REN C, et al. Low-intensity pulsed ultrasound prevents the oxidative stress induced endothelial-mesenchymal transition in human aortic endothelial cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(4): 1350-1365.
- [24] FÖRSTERMANN U, XIA N, LI H G. Roles of vascular oxidative stress and Nitric Oxide in the pathogenesis of Atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2017, 120(4): 713-735.
- [25] 马生龙, 李生花, 杨应忠, 等. 慢性低压低氧对大鼠心肌组织 COX-1 蛋白及 ROS, SOD 和 CAT 水平的影响 [J]. *高原医学杂志*, 2011, 21(4): 62-64.
- [26] JIN M P, WANG J J, JI X Y, et al. MCUR1 facilitates epithelial-mesenchymal transition and metastasis via the mitochondrial calcium dependent ROS/Nrf2/Notch pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 136.
- [27] SPROUSE M L, WELTE T, BORAL D, et al. PMN-MDSCs enhance CTC metastatic properties through reciprocal interactions via ROS/Notch/Nodal signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1916.
- [28] 杜光远. Nrf2 通过代谢重编程及 Notch 信号通路调控乳腺癌增殖和迁移 [D]. 北京: 北京工业大学, 2018.
- [29] MATSUNO Y, COELHO A L, JARAI G, et al. Notch signaling mediates TGF- β_1 -induced epithelial-mesenchymal transition through the induction of Snail [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(5): 776-789.

[责任编辑 刘德文]