

黄连素对脂多糖诱导人脐静脉血管内皮细胞损伤的保护作用研究

王丽君 包贝贝 郭君平 华燕吟

【摘要】目的 探讨黄连素(BBR)对脂多糖(LPS)诱导的人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)损伤的保护作用及其机制。**方法** 体外培养 HUVECs,分为正常对照组(Control 组)、LPS 组、LPS+ 细胞自噬诱导剂雷帕霉素(RAPA)组、LPS+ 细胞自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)组和 LPS+BBR 组,置于含相关药物的培养基中继续培养。采用 EdU 染色法检测细胞活性变化,荧光显微镜观察自噬流变化,Western blot 法检测自噬相关蛋白 p62、LC3-II/LC3-I 表达水平变化。**结果** 与 Control 组比较,LPS 组 EdU 染色阳性细胞率明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与 LPS 组比较,LPS+RAPA 组 EdU 染色阳性细胞率明显下降,而 LPS+3-MA 组 EdU 染色阳性细胞率明显上升,LPS+BBR 组 EdU 染色阳性细胞率明显上升,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。与 Control 组比较,LPS 组自噬小体和自噬溶酶体数量均增加,p62 和 LC3-II/LC3-I 表达水平均上升(均 $P<0.05$);与 LPS 组比较,BBR 组自噬小体和自噬溶酶体数量均减少,p62 和 LC3-II/LC3-I 表达水平均下降(均 $P<0.05$)。**结论** LPS 诱导 HUVECs 产生自噬,BBR 通过抑制由 LPS 诱导产生的自噬来减轻 LPS 诱导的 HUVECs 损伤。

【关键词】 黄连素 脂多糖 人脐静脉血管内皮细胞 自噬

Protective effect of berberine on lipopolysaccharide-induced injury of human umbilical vein endothelial cells WANG Lijun, BAO beibei, GUO Junping, et al. Department of Endocrinology, Zhejiang Provincial People's Hospital, People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China

【Abstract】Objective To investigate the protective effect and mechanism of berberine(BBR) on lipopolysaccharide(LPS)-induced injury of human umbilical vein endothelial cells in vitro. **Methods** HUVECs were cultured in vitro. LPS, rapamycin (RAPA), 3-methyladenine (3-MA) and BBR were used to intervene on LPS, LPS+RAPA, LPS+3-MA and LPS+BBR group but not in Control group. The ability of cell proliferation was detected by EdU incorporation assay, the changes of autophagy in cells which were infected with adenovirus expressing tandem mRFP-GFP-LC3 and then observed by Fluorescence microscopy, the protein levels of p62 and LC3 were detected by Western blot. **Results** Compare with Control group, LPS treatment significantly decreased HUVECs viability ($P<0.05$); compare with LPS group, adding RAPA could aggravate this damage ($P<0.05$), adding 3-MA could alleviate this damage ($P<0.05$), and BBR could also protect LPS-induced damage to HUVECs ($P<0.05$). Compare with Control group, after LPS treated with HUVECs, the numbers of autophagosomes and autolysosomes were increased, and the expression of p62 and LC3-II/LC3-I were increased ($P<0.05$). However, compare with LPS group, pretreatment with BBR could decrease the numbers of autophagosomes and autophagic lysosomes, also the expression of p62 and LC3-II/LC3-I ($P<0.05$). **Conclusion** Autophagy was induced by LPS in HUVECs, and BBR may protect HUVECs from LPS-induced damage by reducing autophagy.

【Key words】 Berberine Lipopolysaccharide Human umbilical vein endothelial cells Autophagy

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.22.2019-1401

基金项目:浙江省科技公益技术应用研究计划(2017C37175);浙江省医药卫生科技项目(2018KY226);浙江省中医药科技计划(2017ZB066)

作者单位:310014 杭州,浙江省人民医院(杭州医学院附属人民医院)内分泌科(王丽君、华燕吟);浙江大学城市学院医学院(包贝贝、郭君平)

通信作者:华燕吟,E-mail:yanyinhua@gmail.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是众多心脑血管疾病的共同病理生理基础^[1],而血管内皮细胞损伤是 AS 发生的重要原因^[2]。研究表明,细胞自噬在维持心血管系统稳态和血管内皮功能方面至关重要^[3]。正常的细胞自噬可以通过减轻炎症水平、影响内皮一氧化氮合酶等途径来保护血管内皮细胞,维持心血管系统的稳态^[4];但细胞自噬受损或过度时可导致细胞功能障碍,促进 AS 的发生和进展^[5]。目前细胞自噬作为 AS 潜在治疗靶点受到越来越多的关注。在之前的研究中,本团队发现黄连素(berberine, BBR)能通过 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)起保护作用^[6]。由于 JNK 信号通路与细胞自噬关系十分密切^[7],而异常的细胞自噬可能是 AS 的启动因素,因此本研究通过 LPS 诱导 HUVECs 建立血管内皮炎症损伤模型,观察 BBR 在 LPS 诱导的 HUVECs 损伤后细胞自噬中的作用,以期为 BBR 在抗 AS 治疗的临床应用中提供更多的理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料 HUVECs 购自上海奥赛尔生物技术有限公司;BBR、LPS、雷帕霉素(rapamycin, RAPA)和 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)均购自美国 Sigma 公司;DMEM/F12、10%FBS 均购自美国 Gibco 公司;自噬双标腺病毒(mRFP-GFP-LC3)购自上海汉恒生物科技有限公司;5-溴-2-脱氧尿嘧啶(EdU)试剂盒、RIPA 裂解液、考马斯蓝染色蛋白浓度测定试剂盒均购自江苏碧云天生物技术有限公司;兔抗人 p62 抗体、兔抗人 LC3 抗体及辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔二抗均购自英国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 HUVECs 的培养、分组和处理 细胞培养:HUVECs 复苏后用含有 5U/ml 肝素、2mmol/L L-谷氨酰胺、100U/ml 青霉素、10μg/ml 链霉素、50μg/ml 内皮细胞生长添加物和 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基培养,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中贴壁培养,待细胞生长至 80%融合度时,用 0.25%胰酶(含 0.02%乙二胺四乙酸)消化传代,倒置光学显微镜观察细胞的生长,待细胞状态稳定后用于实验。实验分组和处理:(1)正常对照组(Control 组):不予特殊处理;(2)LPS 组:只给予 LPS 20μg/ml;(3)LPS+RAPA 组:以细胞自噬诱导剂 RAPA 100nmol/L 预处理 30min 后再给予 LPS 20μg/ml 刺激;(4)LPS+3-MA

组:以细胞自噬抑制剂 3-MA 5mmol/L 预处理 30min 后再给予 LPS 20μg/ml 刺激;(5)LPS+BBR 组:BBR 10μM 预保护培养 24h 后再给予 LPS 20μg/ml 刺激。Control 组、LPS 组、LPS+RAPA 组和 LPS+3-MA 组 4 组细胞相互比较,观察调控细胞自噬水平对细胞损伤的影响;Control 组、LPS 组和 LPS+BBR 组 3 组细胞相互比较,观察 BBR 的保护作用及其对细胞自噬的影响。

1.2.2 细胞活性检测 采用 EdU 染色法。取对数生长期的 HUVECs,制备单细胞悬液,调整细胞浓度至 1×10^5 /ml,接种于 96 孔板并继续培养 24h,按分组培养处理后,加入终浓度为 50μmol/L 的 EdU 孵育 2h,加入 4%多聚甲醛固定液室温孵育 30min,0.5%TritonX-100 室温孵育 20min,每孔加入 1xApollo 反应液 100μl 避光孵育 30min,最后再加入 5mg/L Hoechst33342 染色液避光孵育 30min,染色完成后立即在荧光显微镜下观察并拍照。EdU 染色细胞发绿色荧光,Hoechst33342 染色细胞发蓝色荧光,EdU 阳性细胞率=暗视野中发绿色荧光细胞数/发蓝色荧光细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.3 观察细胞自噬流变化 采用荧光显微镜观察法。取对数生长期的 HUVECs,制备单细胞悬液,调整细胞浓度至 1×10^5 /ml,接种于 24 孔板,培养至细胞融合度 50%~70%,用 mRFP-GFP-LC3 感染 24h,再按分组培养处理后,在激光共聚焦荧光显微镜下随机选取多个细胞拍照,包括红色荧光图、绿色荧光图,红光激发的斑点为自噬溶酶体,红光和绿光共同激发的黄色斑点为自噬体。

1.2.4 自噬相关蛋白 p62、LC3-II/LC3-I 表达水平检测 采用 Western blot 法。收集不同处理组的细胞,以 RIPA 裂解液充分裂解后再提取细胞总蛋白,冰浴 30min 裂解混匀,4℃ 13 000g 离心 10min,BCA 法蛋白定量,SDS-PAGE 分离蛋白质,之后转膜到 PVDF 膜上,室温下 5%脱脂奶粉封闭 1h 后,加入 p62、LC3 及 GAPDH 一抗(1:1000 稀释)4℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,加入 HRP 标记的鼠抗兔抗体孵育 1h,TBST 洗膜 3 次,ECL 化学发光法检测蛋白的表达情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组细胞 EdU 染色阳性细胞率比较 4 组细胞用含相关药物的培养基刺激 24h 后,EdU 染色阳性细胞率比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较,发现与 Control 组比较,LPS 组 EdU 染色阳性细胞率明显

下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与 LPS 组比较, LPS+RAPA 组 EdU 染色阳性细胞率明显下降,而 LPS+3-MA 组 EdU 染色阳性细胞率明显上升,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见图 1(插页)、表 1。

表 1 4 组细胞 EdU 染色阳性细胞率比较(%)

组别	n	EdU 阳性细胞率(%)
Control 组	6	55.50 ± 2.09
LPS 组	6	36.83 ± 1.97*
LPS+RAPA 组	6	31.33 ± 1.61 [△]
LPS+3-MA 组	6	43.17 ± 1.95 [△]

注:与 Control 组比较,* $P<0.05$;与 LPS 组比较,[△] $P<0.05$

2.2 3 组细胞 EdU 染色阳性细胞率比较 3 组细胞用含相关药物的培养基刺激 24h 后,EdU 染色阳性细胞率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比较,与 Control 组比较,LPS 组 EdU 染色阳性细胞率明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$);而与 LPS 组相比, LPS+BBR 组 EdU 染色阳性细胞率明显上升,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2(插页)、表 2。

表 2 3 组 EdU 染色阳性细胞率比较(%)

组别	n	EdU 阳性细胞率(%)
Control 组	6	59.67 ± 2.94
LPS 组	6	34.67 ± 2.14*
LPS+BBR 组	6	42.50 ± 2.39 [△]

注:与 Control 组比较,* $P<0.05$;与 LPS 组比较,[△] $P<0.05$

2.3 3 组细胞自噬流变化结果 3 组细胞用含相关药物的培养基刺激 24h 后, HUVECs 细胞内自噬体(黄色斑点)和自噬溶酶体(单独红色点)均增加,而应用 BBR 后,自噬体(黄色斑点)和自噬溶酶体(单独红色点)均减少,见图 3(插页)。

2.4 3 组细胞 p62、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 蛋白表达水平比较 与 Control 组比较,LPS 组 p62 蛋白表达水平下调, LC-Ⅱ/LC-Ⅰ 蛋白表达水平上调,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);而与 LPS 组比较, BBR 组 p62 蛋白表达上升, LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 蛋白表达下调,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),结果见图 4、表 3。

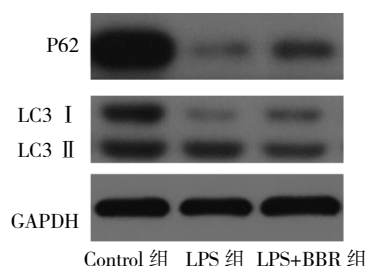


图 4 3 组细胞 p62、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 蛋白表达电泳图

表 3 3 组细胞 p62、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 蛋白表达水平比较

组别	n	p62	LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ
Control 组	3	1.12 ± 0.06	0.76 ± 0.04
LPS 组	3	0.73 ± 0.05*	1.00 ± 0.05*
LPS+BBR 组	3	0.92 ± 0.08 [△]	0.79 ± 0.08 [△]

注:与 Control 组比较,* $P<0.05$;与 LPS 组比较,[△] $P<0.05$

3 讨论

自噬是真核细胞中高度保守的代谢活动,广泛参与多种生理和病理过程^[8]。细胞自噬可以被缺血缺氧、饥饿和 DNA 受损等多种因素激活,通过形成双层膜囊泡来隔离受损的细胞器或蛋白质,并通过溶酶体结合来降解内容物,分解后为饥饿或代谢压力状态下的细胞提供能量,维持内环境的稳定和平衡^[9]。正磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号传导通路是自噬过程中最主要的信号传导通路之一。RAPA 是一种新型大环内酯类免疫抑制剂,也是哺乳动物 mTOR 信号通路特异性的负性调控因子,能通过与 mTORC1 复合物特异性的结合,促进细胞自噬的发生,因此 RAPA 通常作为细胞自噬诱导剂使用^[10]。3-MA 则是 PI3K 信号通路的特异性抑制剂,可特异性阻断细胞自噬过程中自噬泡与溶酶体的融合,通常作为细胞自噬抑制剂使用^[11]。在本研究中,加用 RAPA 后,与单纯 LPS 组相比,诱导自噬后使细胞活力进一步下降,而加用 3-MA 后,减轻自噬后细胞活力明显提升,说明细胞自噬在 LPS 诱导 HUVECs 损伤中发挥重要的作用。

为进一步观察 LPS 诱导 HUVECs 损伤后自噬的变化及 BBR 的干预作用,本研究采用 mRFP-GFP-LC3 双荧光自噬体系来观察自噬流的变化。mRFP-GFP-LC3 转染细胞后,LC3 蛋白被 RFP 的红色荧光和 GFP 的绿色荧光标记。当自噬小体与溶酶体融合形成自噬溶酶体后,由于溶酶体内部的酸性环境,导致 GFP 绿色荧光淬灭,因此单纯红色荧光点(GFP-RFP+)为自噬溶酶体,而红色荧光和绿色荧光融合后形成的黄色荧光点(GFP+RFP+)即为自噬小体,通过荧光显微镜观察红色荧光点和黄色荧光点数量的变化及相互对比检测即可清晰地看出自噬流的强弱及通畅与否^[12]。在本研究中, LPS 作用后 HUVECs 内黄色荧光点(主要是自噬小体)和红色荧光点(自噬溶酶体)都增加,而加用 BBR 预处理后,黄色荧光点和红色荧光点减少,提示 BBR 可能通过抑制自噬对 LPS 诱导 HUVECs 损伤起保护作用。BBR 是一味传统中药,主要用于胃肠道感染;近年来,多项基础研究表明 BBR 具有降血糖、调节血脂、抗氧化

应激、抗炎等多种药理作用^[13],本研究结果也进一步证实 BBR 在 AS 的治疗上具有潜在的应用价值。

LC3 和 p62 都是自噬标志性蛋白。自噬过程中,LC3 蛋白首先形成胞浆型 LC3(LC3-I),其后 LC3-I 会酶解掉一小段多肽并和膜磷脂相互作用产生 LC3-II,靶向结合在细胞内自噬体的膜上^[14],其含量与自噬泡数量呈正相关,因此是自噬过程可靠的标志物,通常用 LC3-II 总表达量和 LC3-II/LC3-I 比值的大小两个指标来估计自噬水平的高低^[15]。而 p62 蛋白作为自噬的选择性底物,在自噬中晚期可进入自噬溶酶体后被降解,其表达与自噬水平呈负相关^[16]。在本研究中,LPS 作用 HUVECs 后,p62 蛋白表达下降,LC3-II/LC3-I 比值增大,而加用 BBR 干预后,p62 蛋白表达增加,LC3-II/LC3-I 比值减少,进一步确定 BBR 通过抑制过度细胞自噬保护 LPS 诱导 HUVECs 损伤。但由于细胞自噬的调控过程非常复杂,牵涉到 PI3K/mTOR、JNK、AMPK 等多条信号通路,本实验仅是初步证实 BBR 可以通过抑制过度自噬对 LPS 诱导 HUVECs 起保护作用,后续可进一步应用 JNK 的特异性抑制剂如 SP600125 等进行干预研究,具体自噬的详细过程及可能的机制也有待进一步去研究。

综上所述,本研究初步证实 BBR 能通过抑制 HUVECs 的过度自噬对 LPS 诱导的 HUVECs 损伤起保护作用,为临床上将 BBR 作用于内皮细胞损伤相关性疾病和 AS 的防治提供理论依据和实验基础。

4 参考文献

- [1] Bergheanu SC, Bodde MC, Jukema JW. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis: Current view and future perspective on lipoprotein modification treatment[J]. *Neth Heart J*, 2017, 25(4): 231-242. DOI: 10.1007/s12471-017-0959-2.
- [2] 张运,张澄,张猛.动脉粥样硬化抗炎治疗的新时代[J]. *中华心血管病杂志*, 2018, 46(5): 332-337. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758. 2018. 05.002.
- [3] Hassanpour M, Rahbarghazi R, Nouri M, et al. Role of autophagy in atherosclerosis: foe for friend? [J]. *J Inflamm*, 2019, 16:8. DOI: 10.1186/s12950-019-0212-4.
- [4] 丁玲,于菲,荆运红,等.自噬与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2018, 41(5): 570-573. DOI: 10.3760/cma.j.issn. 1673-4394.2018.05.019.
- [5] Bravo-San PJM, Jose M, Galluzzi L. Autophagy and mitophagy in cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2017, 120(11): 1812-1824. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311082.
- [6] Guo JP, Wang LJ, Wang LY, et al. Berberine Protects Human Umbilical Vein Endothelial Cells against LPS-Induced Apoptosis by Blocking JNK-Mediated Signaling[J]. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2016: 1-11. DOI: 10.1155/2016/6983956.
- [7] Zhou YY, Li Y, Jiang WQ, et al. MAPK/JNK signaling: a potential autophagy regulation pathway[J]. *Biosci Rep*, 2015, 35(3): e00199. DOI: 10.1042/BSR20140141.
- [8] Mandy OJG, Lynn R, Dorien MS, et al. Defective autophagy in atherosclerosis: To die or to senesce? [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018: 1-12. DOI: 10.1155/2018/7687083.
- [9] Zhu YN, Fan WJ, Zhang C, et al. Role of autophagy in advanced atherosclerosis (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(5): 2903-2908. DOI: 10.3892/mmr.2017.6403.
- [10] Boutouja F, Stiehm CM, Platta HW. MTOR: Acellular regulator interface in health and disease [J]. *Cells*, 2019, 8(1): E18. DOI: 10.3390/cells8010018.
- [11] 朱人大,李晓强.3-甲基腺嘌呤对 EPCs 超微结构和 LC3-II 蛋白表达影响研究[J]. *浙江医学*, 2016, 38(8): 531-533.
- [12] Kou B, Liu W, Xu X, et al. Autophagy induction enhances tetrandrine-induced apoptosis via the AMPK/mTOR pathway in human bladder cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(5): 3137-3143. DOI: 10.3892/or.2017.5988.
- [13] Huang Z, Han Z, Ye B, et al. Berberine alleviate cardiac ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy in cardiomyocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 762: 1-10. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.05.028.
- [14] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, 12(1): 1-222. DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356.
- [15] 许尧,陈蕊,丁亮,等. CD137-CD137 配体信号通路通过 JNK 途径影响小鼠血管平滑肌细胞自噬 [J]. *中华心血管病杂志*, 2018, 46(5): 370-375. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2018.05.009.
- [16] Liu H, Dai C, Fan Y, et al. From autophagy to mitophagy :the roles of P62 in neurodegenerative disease [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2017, 49(5): 413-422. DOI: 10.1007/s10863-017-9727-7. (本文由浙江省医师协会推荐)

(收稿日期: 2019-05-25)

(本文编辑: 俞骏文)