

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.11.009

番茄红素对血管内皮细胞氧化应激损伤的作用及机制研究*

陈文豪¹ 陈浩¹ 赵达君¹ 乔慧莲² 易定华^{1△}

(1 第四军医大学附属西京医院 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学 陕西 西安 710032)

摘要 目的:观察番茄红素(lycopene, LYC)对于血管内皮细胞功能的作用,探讨其作用机制。**方法:**人脐静脉内皮细胞(HUVECs)处理实验分组:对照组, H₂O₂组, H₂O₂+LYC组(1、2、4、8 μmol/L)。MTT法检测 HUVECs 存活率;免疫印迹法(Western blot)检测 p38MAPK 蛋白磷酸化水平、抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞/白血病-2(bcl-2)及线粒体凋亡通路相关蛋白 bax 的表达;细胞黏附能力测定和伤口愈合实验检测 HUVECs 粘附率和迁移率;TUNEL 法检测 HUVECs 凋亡率;ELISA 法测定 HUVECs 内活性氧(ROS), 超氧化物歧化酶(SOD), 乳酸盐脱氢酶(LDH)释放量和 caspase-3 的活性。**结果:**H₂O₂ 损伤后 HUVECs 存活率显著降低(P<0.01), 凋亡率显著增加(P<0.01), 黏附和迁移能力显著降低(P<0.01), bax 和 p-p38MAPK 的表达上调, bcl-2 的表达下调, 并且 ROS、LDH 的释放和 caspase-3 的活性增加(P<0.01), SOD 的释放减少。而 LYC 的预处理可以明显逆转 H₂O₂ 以上作用。**结论:**H₂O₂ 氧化应激损伤中, LYC 保护内皮细胞可能与其抗过氧化损伤细胞凋亡, 抑制异常的 p38MAPK 信号通路有关。

关键词:番茄红素;人脐静脉内皮细胞;氧化应激;凋亡;p38MAPK 信号通路

中图分类号:R285.5, Q75, R54 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)11-2037-06

The Protective Effects and Mechanism of Lycopene Against H₂O₂ induced Injury in Vascular Endothelial Cells*CHEN Wen-hao¹, CHEN Hao¹, ZHAO Da-jun¹, QIAO Hui-lian², YI Ding-hua^{1△}

(1 Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of lycopene (LYC) in human umbilical endothelial cells (HUVECs) and investigate the mechanism of LYC. **Methods:** The groups of cells were divided as below: control group, H₂O₂ treatment group, H₂O₂ treatment +LYC (1, 2, 4, 8 μmol/L) treatment group. The survival rate of HUVECs was detected by MTT method; The indicator were detected by Western blot, which included the phosphorylation level of p38MAPK and the expression of mitochondrial apoptosis pathway proteins (bax), B-lymphocyte / leukemia -2 (bcl-2) protein; The adhesive rate and migration of HUVECs was detected by the cellular adhesion ability assay and the wound healing assay; The apoptosis rate of HUVECs was detected by TUNEL; The indicator were detected by ELISA, which included the production of Reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), lactate dehydrogenase (LDH) and caspase-3 activity. **Results:** After being treated with H₂O₂, the HUVECs survival rate was distinctly decreased (P<0.01), the HUVECs apoptosis rate was distinctly increased (P<0.01), the HUVECs adhesion and migration ability was distinctly reduced (P<0.01), The phosphorylation level of p38MAPK and the expression of bax protein was distinctly down-regulated (P<0.01), and the expression of bcl-2 protein was distinctly up-regulated (P<0.01), the production of ROS, LDH and caspase-3 activity was distinctly increased (P<0.01), the production of SOD was distinctly decreased (P<0.01). Moreover, after the treatment with LYC, these effects has been reversed. **Conclusions:** LYC can anti-oxidation stress injury induced by H₂O₂ of HUVECs via its capacity of anti-apoptosis and inhibition of abnormal p38MAPK signal pathway.

Key words: Lycopene; Human umbilical vein endothelial cells; Oxidative stress; Apoptosis; P38MAPK signal pathway

Chinese Library Classification: R285.5, Q75, R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)11-2037-06

前言

番茄红素(lycopene, LYC)是源自于瓜果蔬菜的天然色素,并具有抗氧化功能。据报道近年 LYC 应用在治疗和预防心衰

方面卓见成效,且参与调节脂质代谢^[12]。流行病学研究证实,LYC 在减少缺血性心脏病和中风发病率中有明显的功效,可能与其减少动脉内膜厚度和减轻心肌梗死的过程密切相关^[9]。p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)在炎症反应中起重要作用

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81070183;81100137)

作者简介:陈文豪(1987-),男,硕士研究生,主要研究方向:心血管保护 E-mail: chenwenhao1987@126.com

△通讯作者:易定华(1954-),男,教授,主要研究方向:心血管保护, E-mail: dinghuayi210@126.com

(收稿日期:2013-11-30 接受日期:2013-12-25)

用,可以介导神经系统和心血管系统的损伤和坏死^[4]。最新研究表明,LYC 在心肌梗死和心室重构中可以通过调节 p38 发挥保护作用^[5]。冠心病(Oronary rtery isease,CAD)死亡率很高,血管内皮细胞氧化应激凋亡是其发病的根本原因^[6]。血管内皮细胞位于血液和组织之间,在机体凝血、脂类代谢和免疫反应过程中有重要调节作用^[10]。目前,其在血管内皮细胞氧化应激方面的具体机制并未进行深入研究,本研究利用 H₂O₂ 诱导内皮细胞过氧化损伤,观察 LYC 在其损伤中对于内皮细胞功能的作用,并初步探索其具体作用机制,为冠心病临床治疗的研究提供进一步的科学基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

人脐静脉内皮细胞(HUVECs)细胞株来自本实验室传代培养,胎牛血清由杭州四季青公司购得,DMEM 高糖细胞培养基由美国 Hyclone 公司购得,原位末端转移酶标记(TUNEL)检测试剂盒由德国 Roche 公司购得,LYC、四甲基偶氮唑蓝试剂(MTT)、胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)、蛋白酶抑制剂、caspase-3 活性检测试剂盒均由美国 Sigma 试剂公司购得,鼠源抗小鼠凋亡蛋白 Caspase-3、 β -Actin、凋亡促进蛋白 Bax、phospho-p38MAPK (p-p38MAPK)、p38MAPK 和 B 淋巴细胞/白血病-2(bcl-2)抗体均由美国 Cell Signaling 公司购得,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗由北京中杉金桥生物技术有限公司购得,BCA-蛋白质定量检测试剂盒由美国 Pierce 公司购得,活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸盐脱氢酶(LDH)检测试剂盒由南京建成生物工程研究所购得,组织蛋白裂解液由上海碧云天生物技术研究所得,预染标准蛋白质 Marker 由美国 Thermo 公司购得,细胞培养箱来自美国 Thermo 公司,酶标仪来自美国 Biotech 公司,超净工作台来自苏州净化设备仪器厂,激光共聚焦显微镜和倒置相差显微镜来自日本 Olympus 公司,ZW-A 微量振荡器来自常州国华电子有限公司,低速离心机来自湖南 Saitexiangyi 公司,电泳及湿转转移槽和 Western 发光照相系统均来自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞株的培养 在培养箱(37℃,5% CO₂)中培养 HUVECs 2-3 d,置于倒置相差显微镜下观察,培养至细胞生长贴壁融合,加入胰蛋白酶(0.25%)轻轻吹打将已贴壁的细胞消化下来。待细胞在镜下的形态开始呈现变圆并且脱离时弃去蛋白酶消化液,加入胎牛血清浓度为 10%的 DMEM 终止胰蛋白酶的作用。以滴管轻轻吹打培养瓶壁上的细胞,待其脱落分离下来,轻柔吹打均匀。置于离心管中在离心机(1000 r·min⁻¹)离心 5 min,弃去上清液,加入胎牛血清浓度为 10%的 DMEM 充分吹打均匀,细胞计数板进行计数,按 1×10^7 L⁻¹ 密度比例接种于培养瓶中,在恒温 37℃,CO₂ 浓度为 5%的培养箱中培养 24 h 后换液,用显微镜观察形态,等待其生长贴壁融合以后,再次进行换液,用不含血清 DMEM 培养液孵育 24 h,即可用于实验。

1.2.2 不同浓度番茄红素对 HUVECs 存活率的影响 实验分 3 组:① 对照组(control 组):HUVECs 培养在不含血清的 DMEM 培养液中;② H₂O₂ 处理组:HUVECs 培养在 300 μ mol·L⁻¹ 的 H₂O₂(以 DMEM 稀释)中 4 h;③ LYC 处理组(LYC 1、2、

4、8 μ mol·L⁻¹ 组):HUVECs 分别培养在加入 1、2、4、8 μ mol·L⁻¹ LYC 的 DMEM 培养液中培养 12 h 后再加 300 μ mol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 孵育 4 h;以上各组细胞种于 96 孔板中(6 孔/组),每组细胞培养处理以后,弃培养液,避光加入 DMEM 培养液 100 μ L、培养液稀释至 0.5%的 MTT 10 μ L,在恒温 37℃,CO₂ 浓度为 5%培养箱内孵育 4 h 后,弃去培养液,加入 100 μ L 的 DMSO,轻微震荡 10 min,用酶标仪于 490 nm 波长处测定吸光值(OD 值)。

1.2.3 细胞粘附能力测定法检测 HUVECs 的黏附能力 将处理过的 HUVECs 用含 5%胎牛血清的培养基进行消化、离心分离和再悬浮,在 6 孔板(纤维连接蛋白包被)中每组一个孔,以细胞计数每孔 1×10^4 的密度种植,接种后在 37℃,5%CO₂ 培养箱内培养 30 min,用 PBS 轻柔洗 3 遍。贴壁细胞用 MTT 法染色检测并且以倒置相差显微镜拍照,双盲条件下两位观察者对视野进行细胞计数,重复做 3 次。对照组设置值为 100%。

1.2.4 伤口愈合试验测定 HUVECs 的迁移能力 将 HUVECs 种于 6 孔板中,每组细胞处理之后,取 200 μ L 移液器的枪头,用剪刀除去顶尖的毛刺,力道均匀地沿孔底平行划三道划痕,然后换用含 5%的胎牛血清的培养基孵育 8 h,用倒置相差显微镜拍照,测量两侧划痕的两端之间的平均距离。对照组设置值为 100%。

1.2.5 TUNEL 法检测 HUVECs 的凋亡率 将 HUVECs 种于 24 孔板中,各组细胞待处理之后分别制作细胞爬片,然后加入 4%的多聚甲醛,固定时间 15 min。使用之前,首先,PBS 清洗 3 次:5 min 一次后用 0.1%的 Triton X-100 打孔 5 min。再用 PBS 清洗 3 次,5 min 一次。按照 TUNEL 试剂盒说明书的方法,严格避光按照 1:9 的比例用 1 号液和 2 号液配置 TUNEL 液,从配置开始整个过程严格避光。按照每片 50 μ L 的剂量添加 TUNEL 液,37℃ 避光孵育 120 min,然后用 PBS 清洗 3 次,5 min 一次。用 DAPI 染核 5 min,PBS 清洗 3 次,5 min 一次。最后用 50%的甘油封片,置于激光共聚焦显微镜下拍照,其中凋亡染色为绿色,细胞核染色为蓝色,并随意挑选 8 个视野进行计数。以绿染的凋亡 HUVECs/蓝染的 HUVECs $\times 100\%$ 。

1.2.6 ELASA 法测定 ROS、LDH、SOD 释放量和 Caspase-3 活性 HUVECs 种于 96 孔板中,每组 8 个孔,各组细胞处理之后吸取细胞上清液,严格按照 ROS、LDH、SOD、Caspase-3 检测试剂盒说明书操作。ROS 测定:取各组上清加入 96 孔板,每组 8 孔,每孔 100 μ L。将 DCFH-DA 用 DMSO 稀释到 20 μ mol·L⁻¹,加入到各孔中,再加入 PBS 在 37℃ 共孵育 2 h。在酶标仪中以散发波长 530 nm 和激发波长 485 nm 检测每孔 DCFH 的荧光值,无细胞的孔设为背景,对照组设置值为 100%。LDH 测定:取各组上清加入 EP 管中,每管 100 μ L。标准管加入 0.1 mL 标准品、0.05 mL 蒸馏水、0.25 mL 基质缓冲液,标准空白管加入 0.15 mL 蒸馏水、0.25 mL 基质缓冲液,测定管加入 0.1 mL 样本、0.25 mL 基质缓冲液、0.05 mL 辅酶溶液,测定空白管加入 0.05 mL 蒸馏水、0.1 mL 样本、0.25 mL 基质缓冲液。混匀以后,37℃ 水浴 15 min。各管分别加入 0.25 mL 的二硝基苯腈混匀以后,37℃ 水浴 15 min。各管分别加入 0.4%氢氧化钠 2.5 mL,混匀以后室温放置 3 min,分别用酶标仪在 440 nm 检测 LDH 吸光度,计量单位设置为单位每升(U/L)。按照上述步骤做 3 次。SOD 测定:向

各孔细胞加入 50 μL 裂解液制备细胞裂解液,加入 EP 管中,每管 50 μL 。向各管加入试剂一 1 mL、试剂二到四各 0.1 mL,对照管加入 1 mL 蒸馏水。混匀以后,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 min。加入显色剂 2 mL,室温静置 10 min,在 550 nm 处检测 SOD 的吸光度,计量单位设置为单位每毫克 (U/mg)。按照上述步骤做 3 次。Caspase-3 活性测定:取各组上清加入 96 孔板,每组 8 孔,每孔 5 μL 。各加入 1 $\times$ 缓冲液 85 μL ,加入 10 μL caspase-3 底物。对照组加入 90 μL 1 $\times$ 缓冲液和 10 μL caspase-3 底物。轻微震荡均匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 90 min。在 405 nm 处检测 Caspase-3 的吸光度,对照组设置为 100%。

1.2.7 Western Blot 法检测 Bax、Bcl-2 和 p-p38MAPK 的表达分为 3 组:① 对照组:HUVECs 培养在不含胎牛血清的 DMEM 培养液中;② H_2O_2 处理组(H_2O_2 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$): HUVECs 培养在 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 (以 DAEM 稀释)中孵育 4 h;③ LYC 处理组 (LYC + H_2O_2): HUVECs 培养在加入 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LYC 的 DMEM 培养液中培养 12 h 后再加 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 孵育 4 h。各组细胞处理之后,提取细胞蛋白,用裂解液裂解,在离心机中(12000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)离心 5 min,弃上清留取底部细胞裂解物,用 BCA 法蛋白定量。20 μg 蛋白原液加入 1 $\times$ SDS 缓冲液置于沸水煮 7 min,用 SDS-PAGE 电泳将各种蛋白分离并电转移到硝酸纤维素膜上。用脱脂奶粉和 TBST 配置 50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的牛奶封闭液,将转有蛋白的膜置于其中在室温环境下封闭 90 min,然后分别孵育 1:1000 的小鼠抗 Bax、Bcl-2、p38MAPK、p-p38MAPK 以及 β -actin 抗体,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境过夜。将其取出以 TBST 清洗 3 遍,10 min 每遍。然后分别孵育 1:5000 的 HRP 山羊抗小鼠的 IgG 二抗,置于室温环境下 2 h,用 TBST 清洗 3 次,10 min 每遍。最后用 ECL 进行显色,用 Bio-Rad 系统照相并分析蛋白的相对表达量。对照组设置值为 100%。

1.3 统计学分析

用 SPSS16.0 软件进行理数的统计分析,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间差异的比较统一采用 t 检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度番茄红素处理以后 HUVECs 的存活率

各组细胞处理之后,MTT 法测定不同组的吸光度值,数据进行统计学统计,结果如图 1 所示。由图可见, H_2O_2 处理之后细胞的生存率显著降低 (** $P<0.001$),而 LYC 可以有效的改善 H_2O_2 过氧化损伤细胞的生存率 (* $P<0.05$)。并且随浓度梯度的上升效果越来越明显,LYC 处理组与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 (H_2O_2 组)相比,细胞存活率均有所上升 (* $P<0.05$),与其他处理组相比,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞损伤减小 (* $P<0.05$)。当 LYC 浓度为 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞存活率最高,因此本研究选择的保护浓度为 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 细胞黏附能力测定法检测 HUVECs 的黏附能力

各组细胞经处理以后,培养粘附 0.5 h 后细胞进行计数并统计分析及所得显微镜下照片,结果如图 2 所示。与对照组相比, H_2O_2 处理以后,细胞的形态收缩,黏附减少 (** $P<0.01$)。与 H_2O_2 组相比,LYC 处理组细胞黏附增加,黏附能力上升 (** $P<0.01$)。结果表明番茄红素可以有效增加内皮细胞的粘附

能力。

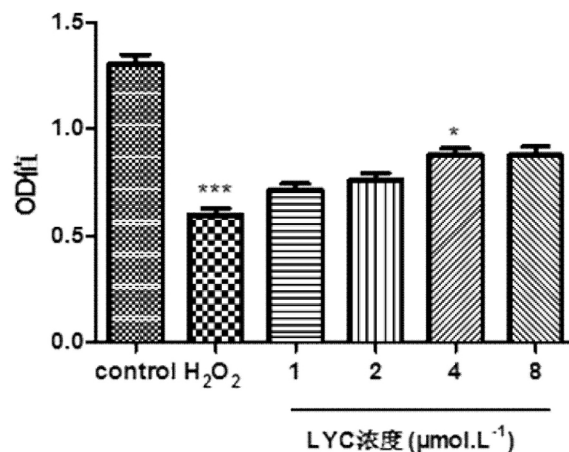


图 1 不同浓度番茄红素对 HUVECs 存活率的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of LYC to HUVECs survival

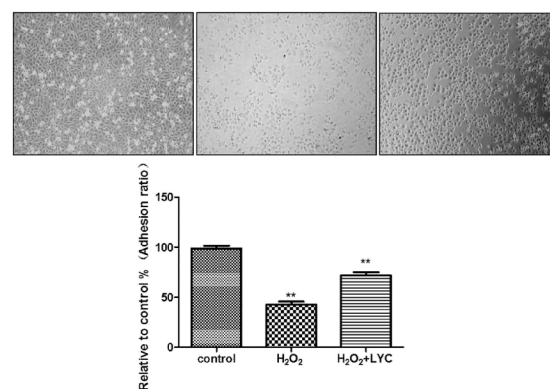


图 2 黏附实验测定 HUVECs 的黏附能力 ($\times 100$)

Fig. 2 The cellular adhesion Ability of cellular adhesion ability assay ($\times 100$)

2.3 伤口愈合实验测定 HUVECs 的迁移能力

各组细胞经处理以后,划痕试验培育 8 h,在倒置显微镜下拍照并进行手工测量,其数据及照片如图 3 所示。与对照组相比, H_2O_2 处理以后,细胞划痕两端的平均距离增大 (** $P<0.01$)。与 H_2O_2 组相比,LYC 处理组细胞两端的平均距离有所减少,即细胞的迁移能力有所上升 (** $P<0.01$)。结果表明 LYC 可以明显增加细胞迁移能力。

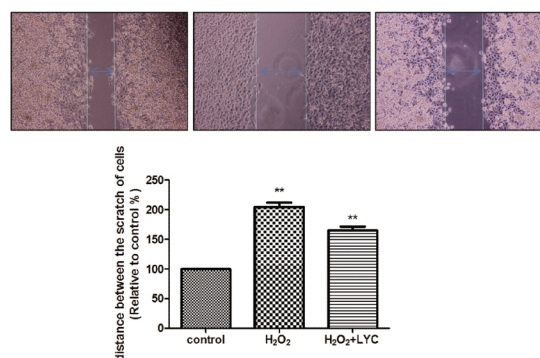


图 3 划痕试验测定 HUVECs 的迁移能力 ($\times 100$)

Fig. 3 The wound healing assay of cellular migration ($\times 100$)

2.4 LYC 对 HUVECs 凋亡率的影响

TUNEL 染色结果及其数据统计如图 4 所示, 与对照组相

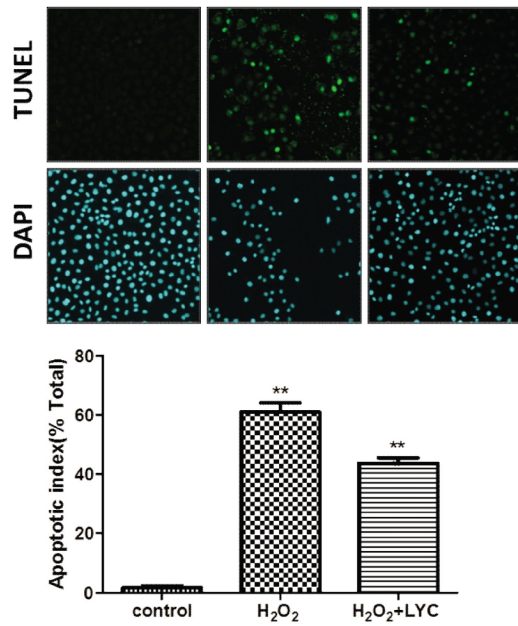


图 4 LYC 对 HUVECs 凋亡率的影响 (× 300)

Fig. 4 The cellular apoptosis assay of the function with LYC (× 300)

比, H₂O₂ 处理以后, 细胞凋亡增加 (**P < 0.01)。与 H₂O₂ 组相比, LYC 处理组细胞的凋亡明显减少 (**P < 0.01), LYC 可以有效拮抗 H₂O₂ 对细胞的过氧化损伤作用。结果表明 LYC 可以明显降低细胞的凋亡。

2.5 细胞 ROS、LDH、Caspase-3、SOD 测定

各组细胞经处理以后, 取上清液按照试剂盒说明测量各组 ROS、LDH 释放量、caspase-3 活性和 SOD 释放量, 其数据及统计分析如图 5 所示。与对照组相比, H₂O₂ 处理以后, 细胞内 ROS、LDH 释放量和 caspase-3 活性增加 (**P < 0.01), SOD 释放量减少 (**P < 0.01)。与 H₂O₂ 组相比, 细胞内 ROS、LDH 释放量和 Caspase-3 活性降低 (**P < 0.01), SOD 释放量增加 (**P < 0.01)。结果表明 LYC 可以明显减少细胞 ROS、LDH 的释放和 caspase-3 活性, 增加 SOD 的释放。

2.6 Bax、Bcl-2 和 p-p38MAPK 表达水平的检测

各组 Bax、Bcl-2 和 p-p38MAPK 表达水平如图 7, 各组细胞处理之后, 由图可见, H₂O₂ 处理之后细胞的 Bax 和 p-p38MAPK 的表达量上调, 而 Bcl-2 的表达下调; LYC 处理之后, 相对于 H₂O₂ 过氧化损伤组, Bax 和 p-p38MAPK 的表达量明显有所下调, Bcl-2 的表达明显有所上调。试验结果证明, LYC 处理之后, Bax 和 p-p38MAPK 的表达量降低, p38MAPK 磷酸化水平降低, Bcl-2 的表达增加。

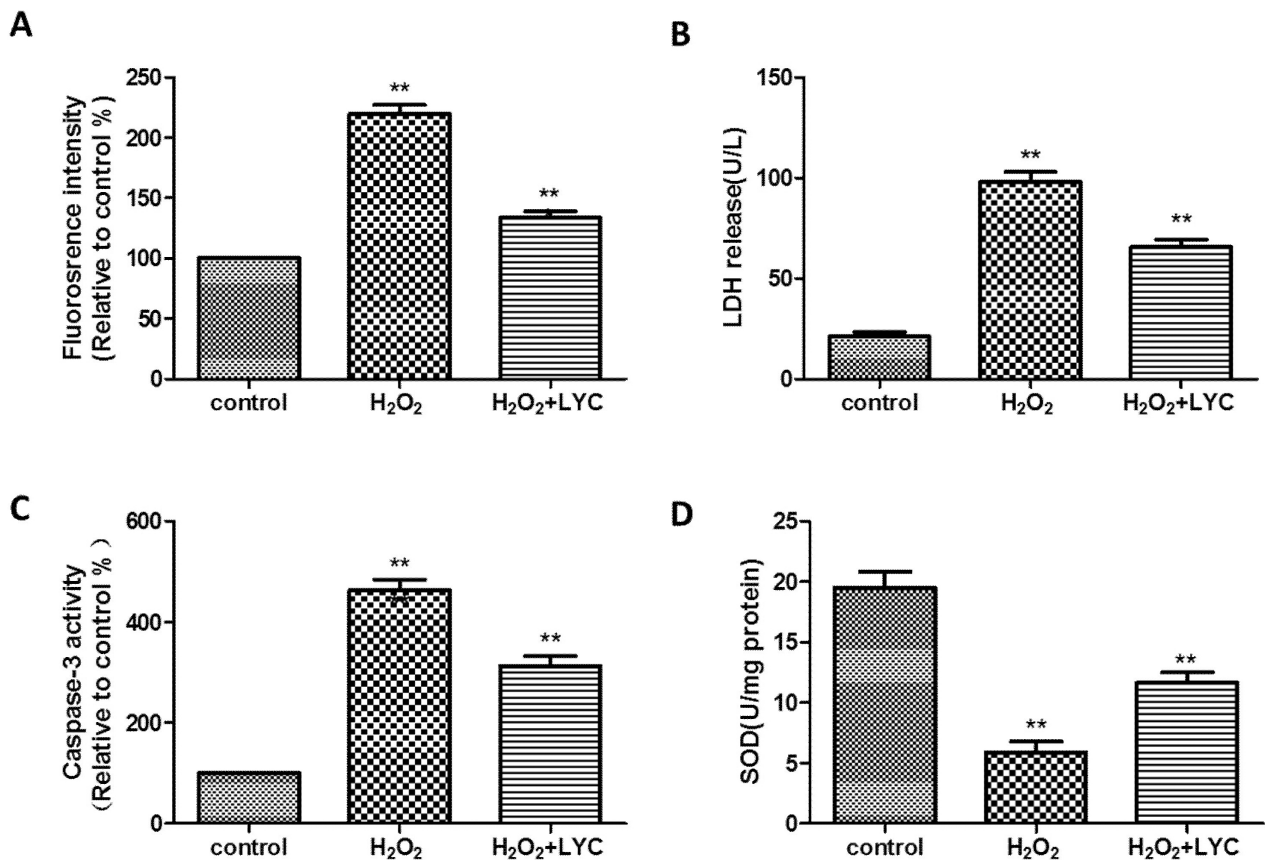


图 5 LYC 对 HUVECs ROS, LDH, SOD 释放和 caspase-3 活性的影响

Fig. 5 The influence of the function with LYC to the ROS, LDH, SOD release and caspase-3 activity in HUVECs

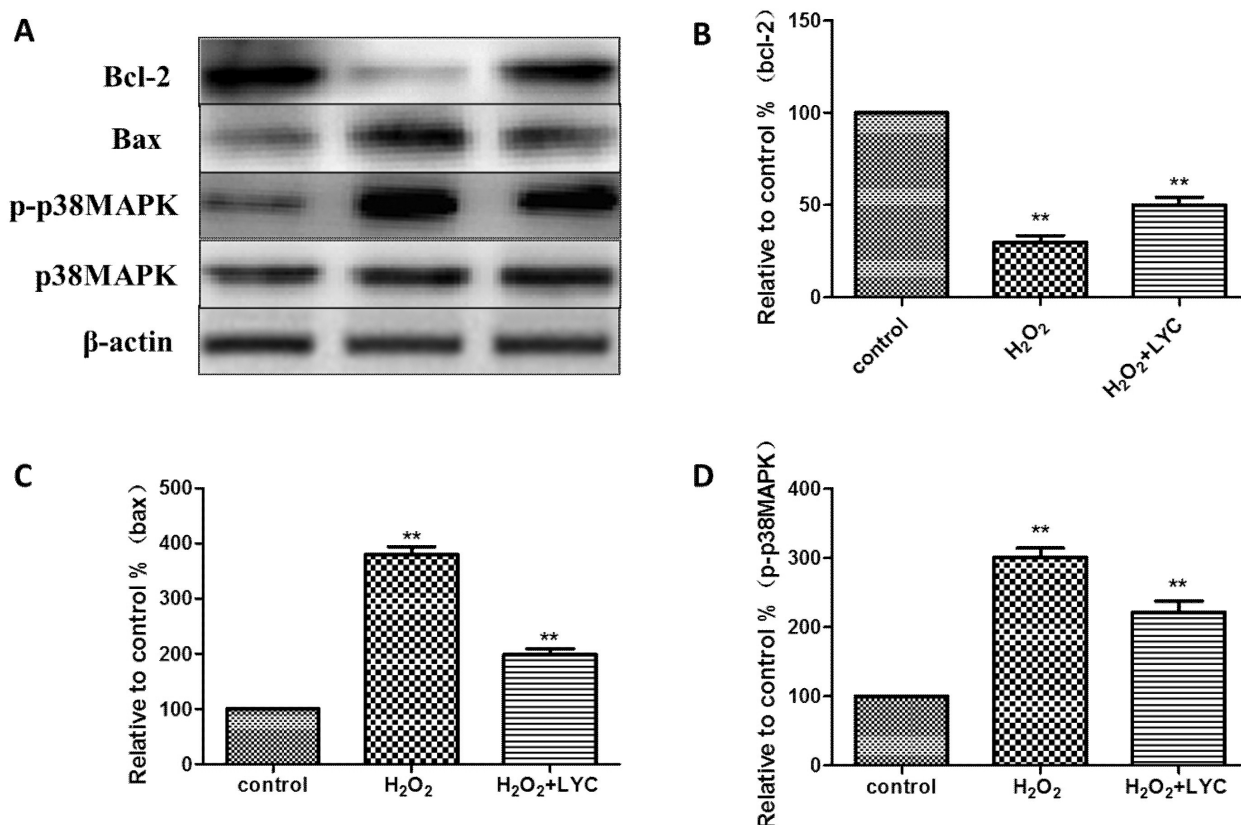


图6 LYC 对各组 bax、bcl2、p-p38MAPK 表达的影响

Fig. 6 The influence of LYC on the expression of bax, bcl2, p-p38MAPK in each group

3 讨论

血管内皮细胞位于血液和组织之间,促使免疫细胞进入血管和周围的组织粘附分子和趋化因子的表达,在血管内分泌调节中起到调控作用^[10]。在内皮细胞氧化应激损伤过程中,线粒体凋亡通路相关蛋白 bax 的表达将会上升, bax 可以干扰正常状态中 Bcl-2 的作用^[12]。而 bax 是一种线粒体蛋白,位于细胞的胞质当中,通常以单体形式存在,当细胞过氧化损伤时 bax 可以与线粒体膜相互结合形成复合体,促使凋亡因子从线粒体中释放出来,从而启动凋亡,加重组织损伤^[13]。Bcl-2 属于一种抗凋亡蛋白,可以抑制凋亡因子的释放,从而减少超氧阴离子。同时 bcl-2 还可以与 bax 聚合,抑制 Bcl-2 从而抑制细胞凋亡。P38MAPK 是细胞内有丝分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 之一,对于氧化应激十分敏感,在氧化应激中参与心肌纤维化的形成^[14]。P38MAPK 信号通路在炎症反应中起重要作用,外部刺激因素可以增加 p38MAPK 的磷酸化,导致下游的激酶和因子激活,增加 IL-2 等炎症介质的表达,启动最终的细胞凋亡程序、炎症反应及纤维化^[15]。研究证实,P38MAPK 在介导神经系统和心血管系统细胞损伤和凋亡中起到重要作用^[9]。Ali 等发现 SB203580 可以特异性抑制 p38MAPK 在 H₂O₂ 氧化应激损伤 HUVECs 过程的作用^[11]。机体在过氧化损伤过程中通过各种机制发挥保护作用,其中包括激活 AMPK 通路和 Akt 通路,抑制异常的 p38MAPK 通路^[16,17]。其主要作用机制是下调 bax 的表达,抑制异常的 p38MAPK 及下游通路,最终清除氧自由基,减少氧化应激损伤。

番茄红素(LYC)是源自于瓜果蔬菜的天然色素,并具有抗氧化功能。在氧化应激时,LYC 可以上调 bcl-2 的表达,减少细胞损伤^[18]。目前研究发现,LYC 在预防心衰和心肌梗死过程中发挥着重要的保护作用^[7]。另外,LYC 还可以调节脂质代谢,其在降血脂和防止冠动脉硬化方面的作用也已经得到临床证实^[19,20]。最新研究表明 LYC 可以在心肌梗死和心室重构发挥保护作用,与其调节 p38 和 MMP-9 的表达有关^[9]。但是,目前 LYC 在血管内皮细胞氧化应激中的具体机制方面并没有深入研究。

本实验主要证实 LYC 在血管内皮细胞 H₂O₂ 诱导的氧化应激损伤中的保护作用,并对其保护机制进行初步探讨。实验中用不同的浓度 (1、2、4、8 μmol·L⁻¹) LYC 处理内皮细胞 24 h 后,相对于氧化应激损伤组,内皮细胞在 H₂O₂ 过氧化损伤后存活明显升高。Bax 的表达量和 p38MAPK 磷酸化水平下调, bcl-2 的表达量上调;伤口愈合实验结果显示内皮细胞的迁移能力明显升高;TUNEL 结果显示内皮细胞的凋亡率明显下降;ELASA 测定显示 ROS, SOD, LDH, Caspase-3 相对于氧化应激损伤组也显著减弱。证明 LYC 可以保护血管内皮细胞抵抗氧化应激损伤。在本实验中,LYC 在氧化应激损伤中的处理,抑制了 bax 蛋白和 caspase-3 蛋白的表达和 p38MAPK 磷酸化,并且上调 bcl-2 的表达,减轻了内皮细胞的氧化应激损伤和凋亡。

综上所述,番茄红素(LYC)在内皮细胞氧化应激损伤中可以上调抗凋亡蛋白 bcl-2,降低线粒体凋亡通路相关蛋白 bax,减少细胞凋亡发挥保护作用,这一作用可能与其抗凋亡和抑制异常的 p38MAPK 通路有关。

参 考 文 献(References)

- [1] Biddle M, Moser D, Song E K, et al. Higher dietary lycopene intake is associated with longer cardiac event-free survival in patients with heart failure[J]. *Eur J Cardiovasc Nurs*, 2013, 12(4):377-384
- [2] Bose K S, Agrawal B K. Effect of lycopene from tomatoes (cooked) on plasma antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in grade-I hypertension[J]. *Ann Nutr Metab*, 2007, 51(5):477-481
- [3] Rissanen T H, Voutilainen S, Nyyssönen K, et al. Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study [J]. *The American journal of clinical nutrition*, 2003, 77(1):133-138
- [4] Wu F, Wang Z, Gu J H, et al. p38 (MAPK)/p53-Mediated Bax induction contributes to neurons degeneration in rotenone-induced cellular and rat models of Parkinson's disease [J]. *Neurochem Int*, 2013, 63(3):133-140
- [5] Wang X, Lv H, Gu Y, et al. Protective effect of lycopene on cardiac function and myocardial fibrosis after acute myocardial infarction in rats via the modulation of p38 and MMP-9 [J]. *Journal of molecular histology*, 2013, 10(10):1-8
- [6] Simon A S, Chithra V, Vijayan A, et al. Altered DNA repair, oxidative stress and antioxidant status in coronary artery disease [J]. *Journal of biosciences*, 2013, 38(2):1-5
- [7] Costacou T, Evans R W, Schafer G L, et al. Oxidative stress and response in relation to coronary artery disease in type 1 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(11):3503-3509
- [8] Cai H, Harrison D G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress [J]. *Circ Res*, 2000, 87 (10): 840-844
- [9] Buttari B, Profumo E, Businaro R, et al. Oxidized haemoglobin-driven endothelial dysfunction and immune cell activation: novel therapeutic targets for atherosclerosis [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20 (37): 4806-4814
- [10] Levenberg S, Golub J S, Amit M, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99 (7):4391-4396
- [11] Ali N, Yoshizumi M, Tsuchiya K, et al. Ebselen inhibits p38 mitogen-activated protein kinase-mediated endothelial cell death by hydrogen peroxide[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 485(1-3):127-135
- [12] Kavitha M, Nataraj J, Essa M M, et al. Mangiferin attenuates MPTP induced dopaminergic neurodegeneration and improves motor impairment, redox balance and Bcl-2/Bax expression in experimental Parkinson's disease mice [J]. *Chemico-biological interactions*, 2013, 206(2):239-247
- [13] Bogdanov M B, Ferrante R J, Mueller G, et al. Oxidative stress is attenuated in mice overexpressing BCL-2[J]. *Neurosci Lett*, 1999, 262 (1):33-36
- [14] Fujii T, Onohara N, Maruyama Y, et al. Galpha12/13-mediated production of reactive oxygen species is critical for angiotensin receptor-induced NFAT activation in cardiac fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(24):23041-23047
- [15] Du QC, Zhang D Z, Chen X J, et al. The effect of p38MAPK on cyclic stretch in human facial hypertrophic scar fibroblast differentiation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75635
- [16] Ni L, Li T, Liu B, et al. The Protective Effect of Bcl-xl Overexpression against Oxidative Stress-Induced Vascular Endothelial Cell Injury and the Role of the Akt/eNOS Pathway[J]. *International journal of molecular sciences*, 2013, 14 (11): 22149-22162
- [17] Huot J, Houle F, Marceau F, et al. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells[J]. *Circ Res*, 1997, 80(3):383-392
- [18] Krishnamoorthy G, Selvakumar K, Venkataraman P, et al. Lycopene supplementation prevents reactive oxygen species mediated apoptosis in Sertoli cells of adult albino rats exposed to polychlorinated biphenyls[J]. *Interdiscip Toxicol*, 2013, 6(2):83-92
- [19] Denniss S G, Haffner T D, Kroetsch J T, et al. Effect of short-term lycopene supplementation and postprandial dyslipidemia on plasma antioxidants and biomarkers of endothelial health in young, healthy individuals[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2008, 4(1):213-222
- [20] Riccioni G, Mancini B, Di Ilio E, et al. Protective effect of lycopene in cardiovascular disease [J]. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2008, 12(3):183-190