

## 二苯乙烯苷通过 MAPK、HIF-1 $\alpha$ 和 p53 通路减轻缺氧/复氧损伤诱导的支气管上皮细胞凋亡

连浦娇<sup>1</sup>, 范燕楠<sup>1</sup>, 杨慧<sup>1</sup>, 傅丽霞<sup>1</sup>, 李云霄<sup>2</sup>, 侯琦<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050;  
2. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050)

**摘要:** 本文研究二苯乙烯苷 (2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- $\beta$ -D-glycoside, TSG) 对缺氧/复氧损伤诱导的支气管上皮细胞 (BEAS-2B) 氧化应激损伤的保护作用及机制。正常培养的 BEAS-2B 细胞, 以缺氧/复氧处理, 采用 DCFH-DA 探针检测细胞内 ROS 生成, 试剂盒检测 MDA 生成和 SOD 活性, DAPI 染色观察细胞核形态学改变, MCF-7/GFP-Bax 细胞观察 Bax 至线粒体的转位, JC-1 探针检测线粒体膜电位, 免疫荧光检测细胞色素 C 自线粒体的释放, Western blotting 检测胞浆和线粒体 Bax、细胞色素 C 表达, 及 caspase-9、caspase-3、磷酸化 MAPK、HIF-1 $\alpha$  和磷酸化 p53 (p-p53) 表达。结果显示, TSG 可显著提高细胞存活率、降低 ROS 和 MDA 生成, 抑制 Bax 蛋白向线粒体的转位, 改善核固缩、碎裂等改变, 抑制线粒体膜电位下降、细胞色素 C 释放和 caspase-9、caspase-3 的激活。同时 TSG 能抑制 SAPK JNK1/2 和 p38 MAPK 的激活但不影响 ERK1/2 信号通路, 抑制 HIF-1 $\alpha$  表达和核蛋白 p53 的磷酸化。以上结果表明, TSG 能显著抑制缺氧/复氧诱导的 BEAS-2B 细胞线粒体途径凋亡反应, 且 MAPK、HIF-1 $\alpha$  和 p53 通路可能是其发挥支气管上皮细胞保护作用的潜在机制。

**关键词:** 二苯乙烯苷; 缺氧/复氧; BEAS-2B 细胞; 凋亡; 丝裂原活化蛋白激酶; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; p53

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 07-1122-11

## 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-*O*- $\beta$ -D-glycoside attenuates the apoptotic responses of hypoxia/reoxygenation injury in bronchial epithelial cells through MAPK, HIF-1 $\alpha$ and p53 pathway

LIAN Pu-qiao<sup>1</sup>, FAN Yan-nan<sup>1</sup>, YANG Hui<sup>1</sup>, FU Li-xia<sup>1</sup>, LI Yun-xiao<sup>2</sup>, HOU Qi<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Natural Products and Functions, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

**Abstract:** This study was designed to investigate the effect of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- $\beta$ -D-glycoside (TSG) on hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced oxidative stress injury and its potential mechanism in human bronchial epithelial cell (BEAS-2B) cells. BEAS-2B cells were exposed to H/R treatment. Level of intracellular ROS was detected using DCFH-DA probe and fluorescence microplate reader. Production of MDA and activity of SOD were evaluated with MDA and SOD kits. Nucleus was shaped by DAPI staining. Translocation of Bax to mitochondria was observed in MCF-7/GFP-Bax cells. Change in mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 staining. Release of cytochrome C from mitochondria was detected by immunofluorescence. Expressions of mitochondrial/cytoplasmic Bax and cytochrome C, caspase-9, caspase-3, phosphorylated MAPK,

收稿日期: 2017-05-05; 修回日期: 2017-05-31.

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165191, E-mail: houq@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0443

HIF-1 $\alpha$  and phosphorylated p53 (p-p53) were determined by Western blotting. TSG significantly improved cell viability and reduced H/R-induced ROS production in BEAS-2B cells, while significantly decreased MDA production. It inhibited Bax translocation and nucleus fracture, reversed the decrease in mitochondrial membrane potential and inhibited the release of cytochrome C and following activation of caspase-9/caspase-3. Simultaneously, TSG down-regulated the signals of SAPK JNK1/2 and p38 MAPK without an impact in ERK1/2. It attenuated expression of HIF-1 $\alpha$  and phosphorylation of p53. This study suggests that TSG could protect BEAS-2B against H/R-induced apoptosis, perhaps through the MAPK, HIF-1 $\alpha$  and p53 pathways.

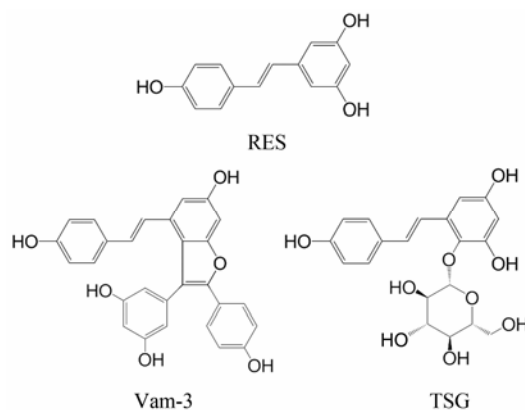
**Key words:** 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- $\beta$ -D-glycoside; hypoxia/reoxygenation; BEAS-2B cell; apoptosis; mitogen-activated protein kinase; hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; p53

大量研究证实, 缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 通常造成活性氧簇 (oxygen species, ROS) 生成增加<sup>[1]</sup>, 进而启动不可控的氧化应激损伤和随后的细胞凋亡<sup>[2]</sup>。这些改变伴随着细胞器的失活和多种疾病的发生<sup>[3-5]</sup>。随着空气污染物排放和吸烟者的大量增多, 许多肺部炎症 (如慢性阻塞性肺病、哮喘和肺癌等) 的发生率在发展中国家呈上升趋势<sup>[6]</sup>。因为这类疾病以反复发作和病程长为特点, 而且肺部的病理改变往往也是不可逆的, 从而缺乏有效的治疗手段。长期的缺氧/复氧和氧化应激损伤在这类疾病发病中扮演着重要的角色, 而这些疾病的发作同时又加重了组织的缺氧状态, 形成恶性循环<sup>[5]</sup>。

二苯乙烯苷 (2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- $\beta$ -D-glycoside, TSG) 是传统中药何首乌的主要活性成分, 与白藜芦醇 (resveratrol, RES) 相似, 属于多羟基芪类化合物 (图 1)。因其 2-位通过  $\beta$ -糖苷键与葡萄糖相结合, 故具有良好的水溶性<sup>[7]</sup>。何首乌因补益精血、乌须发、强筋骨和补肝肾的功效, 自古便广泛应用于各种药方<sup>[8]</sup>。现代研究也证实, TSG 具有抗衰老<sup>[9, 10]</sup>、抗炎<sup>[11-13]</sup>、抗动脉粥样硬化<sup>[14, 15]</sup>、保肝<sup>[16]</sup>、抗氧化和自由基清除<sup>[17]</sup>等作用。这些研究指出, TSG 在分子水平上可能主要通过调控 PI3K/AKT、ROS-iNOS、NF- $\kappa$ B 和 JNK/MAPK 等通路, 及在整体动物上通过 APP 和 SIRT 等通路发挥作用。尤其近年来越来越多的文献<sup>[17]</sup>提出, TSG 在抗氧化应激损伤方面或许具有独到作用。然而, 更具体和深入的机制仍有待阐明。对 TSG 保护作用机制的研究将有利于药物研发和临床应用。

本实验室曾报道了另一种白藜芦醇和 TSG 的同系物——Vam-3 (图 1) 通过降低 nSMase2 水平和神经酰胺表达, 抑制香烟烟雾诱导的支气管上皮细胞 (BEAS-2B) 线粒体途径凋亡的作用<sup>[18]</sup>; 通过降低 SIRT1 与 p53 表达, 抑制硝普钠诱导的大鼠关节软骨细胞线粒体途径凋亡<sup>[19]</sup>。本研究将通过 TSG 的保护

作用, 从另一个方面探讨线粒体途径在 H/R 损伤中的角色, 及 MAPK、HIF-1 $\alpha$  和 p53 信号通路在 TSG 抗氧化应激损伤中的作用。



**Figure 1** Chemical structures of RES, Vam-3 and TSG

## 材料与方法

**材料** TSG (棕红色无定形粉末, 纯度 $\geq$ 98%) 由中国医学科学院药物研究所姚春所实验室合成。支气管上皮细胞 (BEAS-2B 系) 购于 ATCC 公司。乳腺癌细胞 (MCF-7 系及其 GFP-Bax 稳定转染的 MCF-7/GFP-Bax 系) 储存于本实验室。四甲基噻唑蓝 (thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT) 购于 Sigma-Aldrich 公司; 单克隆 Bax、Bcl-2、细胞色素 C、p38 MAPK、SAPK/JNK1/2、ERK1/2、p-p38 MAPK、p-SAPK/JNK1/2、p-ERK1/2、HIF-1 $\alpha$ 、p53 和 p-p53 (Ser 15) 一抗购于 Abcam 公司; 单克隆  $\beta$ -actin、COX IV、GAPDH、caspase-3 和 caspase-9 一抗购于 Cell Signaling Technology 公司; 线粒体分离试剂盒购于 Thermo Fisher Scientific 公司。丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒购于南京建成生物科技研究所; DCFH-DA 探针、JC-1 探针购于上海碧云天生物技术有限公司; Hoechst 33258 染料购于东仁化学科技 (上海) 有限公司; zVAD-fmk

购于上海蓝木化工有限公司; FITC、HPR 偶联二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司; ELISA 试剂盒购于 BioLegend 公司; 其他试剂、溶剂购于本地公司。

**细胞培养** BEAS-2B、MCF-7 和 MCF-7/GFP-Bax 细胞培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 中 [含 4500 mg·L<sup>-1</sup> D-葡萄糖的 DMEM 培养基, 10% 胎牛血清 (FBS)]。生长至约 80% 融合时 1:2 传代 (BEAS-2B 约每 1.5 天, MCF-7 与 MCF-7/GFP-Bax 约每 1 天), 同时更换新鲜培养基。取对数生长期的 BEAS-2B 细胞进行实验, 96 孔板和 24 孔板接种细胞数分别为 1×10<sup>4</sup> 和 5×10<sup>4</sup> 个/孔, 培养过夜。缺氧实验前 1 h, 待测化合物组每孔加入不同浓度的 TSG。模型组和空白对照组加入等量溶剂 DMSO。

**体外缺氧/复氧 (H/R) 损伤模型的建立** 本实验参照目前采用最广泛的混合气体培养法建立体外 H/R 损伤模型<sup>[20]</sup>, 即按 95:5 (v/v) 混合惰性气体 N<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub>, 然后通入一个装有实验细胞的密闭盒子, 使其内原有气体排空形成无氧环境, 同时更换培养基至低糖、低血清即为缺氧; 培养一定时间后再取出细胞, 更换为正常培养基进行正常培养即为复氧。缺氧时长为 4 h (含 1000 mg·L<sup>-1</sup> D-葡萄糖的 DMEM 培养基, 2.5% FBS), 复氧时长为 6 h (含 4500 mg·L<sup>-1</sup> D-葡萄糖的 DMEM 培养基, 10% FBS)。另设一组于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 环境下正常伴随培养作为空白对照。

**MTT 检测** 设置 TSG 终浓度为 3.13~100 μmol·L<sup>-1</sup>, 倍半稀释, 一共 7 个浓度。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 1 h, 之后进行 H/R 造模操作。注意在 H/R 处理全过程中, 所更换的培养基内也始终含有既定浓度的 TSG 或溶剂。完成预定的 H/R 处理后, 各孔加入 0.5% MTT 溶液 40 μL, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 4 h。吸除上清, 加入 DMSO 200 μL, 避光放置 5 min, 室温振荡混匀, 测定 OD<sub>570</sub>。细胞存活率 (%) = (OD<sub>处理组</sub> - OD<sub>本底</sub>) / (OD<sub>空白对照组</sub> - OD<sub>本底</sub>) × 100。

**荧光探针 DCFH-DA 检测 ROS** 取 BEAS-2B 细胞接种于黑壁 96 孔板中, 培养过夜。TSG 终浓度为 12.5~100 μmol·L<sup>-1</sup>, 倍半稀释, 一共 4 个浓度。同法 H/R 处理后, 参照试剂盒说明书, 加入 DCFH-DA 荧光探针。37 °C 培养箱中避光孵育 30 min, 用无血清培养基轻柔洗涤细胞 3 次, 荧光酶标仪检测 (激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm)。

**试剂盒检测总 SOD 活性和 MDA 生成** 细胞加药和 H/R 处理后, 参照试剂盒说明书操作, 收集细胞用于检测总 SOD 活性, 以及收集细胞上清检测 MDA 含量。

**荧光显微镜观察 MCF-7/GFP-Bax 细胞核形态的改变及 Bax 至线粒体的转位** 细胞加药和 H/R 处理后, PBS 漂洗细胞 2 次, 每次 3~5 min。缓慢加入预冷 4% 多聚甲醛, 室温固定 15 min。PBS 轻柔漂洗细胞 2 次。加入终质量浓度为 10 μg·mL<sup>-1</sup> Hoechst 33258 染色液, 37 °C 避光孵育 30 min。避光下, 吸除 Hoechst 33258 染色液, PBS 漂洗细胞 2 次, 每次 3~5 min, 加入新鲜无血清 DMEM 培养基, 荧光显微镜下立即观察。各实验组分别随机取 3 个视野, 于蓝色滤光片 (激发波长 358 nm, 发射波长 461 nm) 观察细胞核形态, 计算有不正常细胞核的细胞所占细胞总数百分比; 于蓝色滤光片 (激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm) 动态观察并记录每个视野细胞总数和有绿色环状荧光点 (GFP-Bax 转位并聚集于线粒体) 细胞数, 计算有环状荧光点细胞数占细胞总数百分比。

**荧光探针 JC-1 检测线粒体膜电位 (Δφ<sub>M</sub>)** 细胞接种于黑壁 96 孔板中, TSG 终浓度为 12.5~100 μmol·L<sup>-1</sup>, 倍半稀释, 一共 4 个浓度。阴性对照组、空白对照组于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 环境下正常伴随培养, 待测化合物组、模型组同法 H/R 处理。阴性对照组加入终浓度 10 μmol·L<sup>-1</sup> 解耦联剂羰基氰化间氯苯胺 (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone, CCCP) 处理细胞 20 min 后, 同其余各组一道弃去培养基, 按照说明书避光加入含 JC-1 探针 (终质量浓度 10 μg·mL<sup>-1</sup>) 的新鲜培养基, 于 37 °C 培养箱中避光孵育 30 min 后吸除上清液。PBS 洗涤 2 次, 加入新鲜培养基, 荧光酶标仪检测, 同时使用倒置荧光显微镜观察 (激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm 观察绿色单体形式; 激发波长 540 nm, 发射波长 590 nm 观察红色聚合物形式)。

**免疫荧光检测细胞色素 C 释放** 取对数生长期的 BEAS-2B 细胞, 以细胞数 5×10<sup>5</sup> 个/孔接种于多聚赖氨酸预包被的激光共聚焦专用玻底培养皿中, 培养过夜。同法 H/R 处理细胞后, PBS 轻柔漂洗 2 次。后续操作均避光下进行。加入含有 MitoTracker Red CM-XRos (终浓度为 100 nmol·L<sup>-1</sup>) 染料的新鲜无血清 DMEM 培养基, 37 °C 孵育 30 min。吸出上清, PBS 漂洗 2 次。用预冷 4% 多聚甲醛室温固定细胞 20 min。PBS 轻柔漂洗 2 次, 0.5% Triton X-100 的 PBS 溶液室温通透细胞 15 min, PBS 漂洗 2 次。山羊血清室温封闭 2 h。再用 PBS 漂洗 2 次, 加入抗细胞色素 C 单克隆一抗 (1:200 稀释), 置于免疫荧光湿盒内 4 °C 孵育过夜。PBS 漂洗 3 次, 加入 FITC 偶联的二抗, 室温孵育 1 h。PBS 漂洗 3 次, 加入含有 DAPI (终质量浓度为 10 μg·mL<sup>-1</sup>) 染料的新鲜无血清 DMEM 培养

基, 37 °C 孵育 15 min。吸出上清, PBS 轻柔漂洗 2 次。激光共聚焦显微镜立即观察, 记录结果。

**细胞总蛋白及线粒体、胞浆蛋白的提取** 取已进行相应处理的细胞, 弃去培养基, 预冷的 PBS 漂洗 2 遍。胰酶消化细胞, 离心弃去上清, 收集细胞沉淀。在细胞沉淀中加入含蛋白酶抑制剂和蛋白磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液, 冰上作用 40 min, 每 10 min 剧烈震荡一次。4 °C、12000  $\times g$  离心 20 min, 上清即为总蛋白成分。添加蛋白酶抑制剂和蛋白磷酸酶抑制剂至试剂 A 和试剂 C, 按照线粒体分离试剂盒说明书操作, 之后差速离心提取细胞线粒体、胞浆蛋白成分。

**Western blotting** 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 然后转移到 PVDF 膜上。转移上蛋白的 PVDF 膜用 TBST 配制的 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h TBST 洗 3 遍。4 °C 下与 TBST 稀释的一抗孵育过夜。用 TBST 洗 3 遍, 然后在 TBST 稀释的辣根过氧化酶偶联的二抗中孵育 2 h, 用 TBST 洗 3 遍, 在 LAS-4000 化学发光系统 (Fujifilm, 日本) 检测, ImageJ 1.8.0 分析条带灰度。

**统计学方法** 每个实验平行 3 次, 每次设 3 个复孔。实验结果均以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 SPSS 17.0 软件进行数据统计。组间差异采用 one-way ANOVA 进行统计学处理,  $P < 0.05$  时认为有显著性差异。

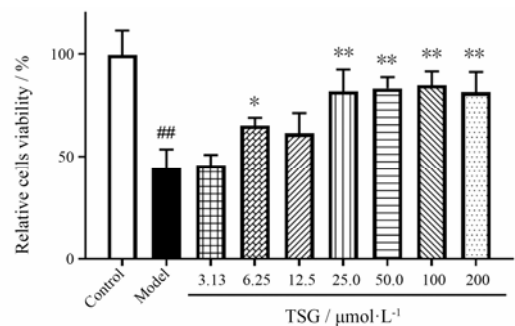
## 结果

### 1 TSG 增加 H/R 处理后的 BEAS-2B 细胞的存活率

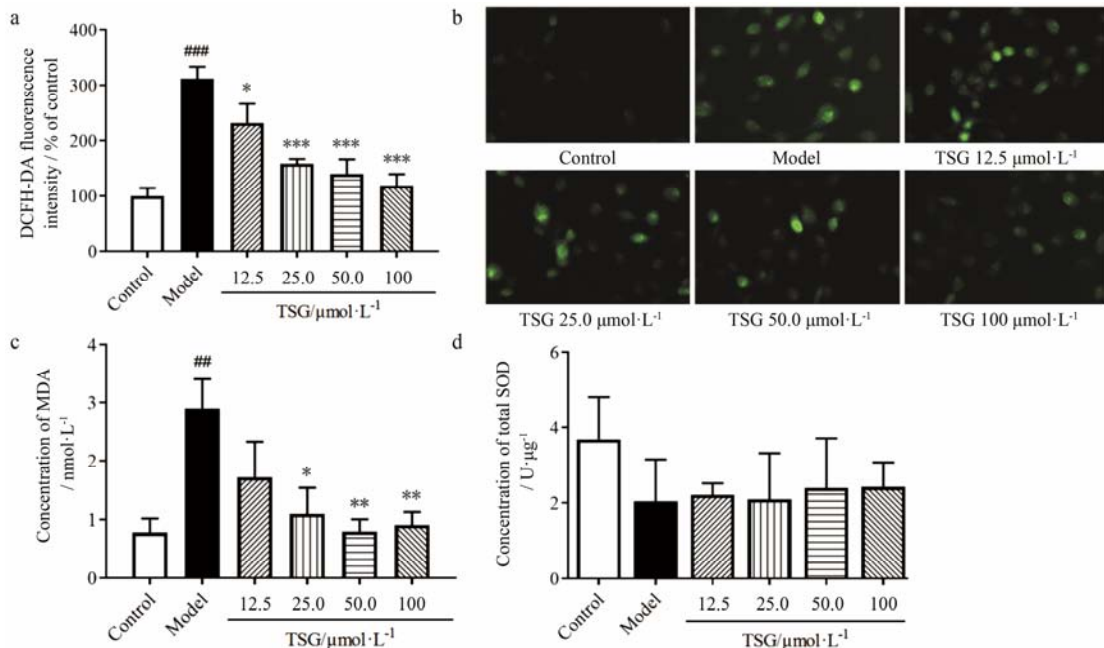
经过 H/R 处理后, BEAS-2B 细胞相对存活率显著下降 ( $P < 0.01$ )。而最低在 6.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时便可观察到 TSG 的预处理显著提高 BEAS-2B 细胞相对存活率 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。

### 2 TSG 通过降低 ROS 和 MDA 的产生抑制 BEAS-2B 的氧化应激反应

H/R 处理显著增加 BEAS-2B 细胞 ROS 的产生。在给予 TSG 预处理后, BEAS-2B 细胞的 ROS 产生被显著抑制 (图 3a, b)。MDA 是细胞脂质过氧化的生物



**Figure 2** TSG significantly improved cells viability. The relative cells viability was determined by MTT assay. Mean intensity of control group was normalized as 100%. Results are presented as  $\bar{x} \pm s$  from at least 3 independent experiments.  $###P < 0.01$  vs control;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  vs model



**Figure 3** TSG inhibited the production of ROS and MDA in BEAS-2B cells. (a) The DCFH-DA fluorescence was read in a microplate reader. Mean intensity of control group was normalized as 100%. (b) Representative images of the cells stained with DCFH-DA probe were examined by using fluorescence microscope to detect the intensity of ROS fluorescence. (c) The concentration of MDA was assayed with a reagent kit. (d) Total SOD was extracted and the content was assayed with a reagent kit. Results are presented as  $\bar{x} \pm s$  from at least 3 independent experiments.  $###P < 0.01$ ,  $####P < 0.001$  vs control;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  vs model

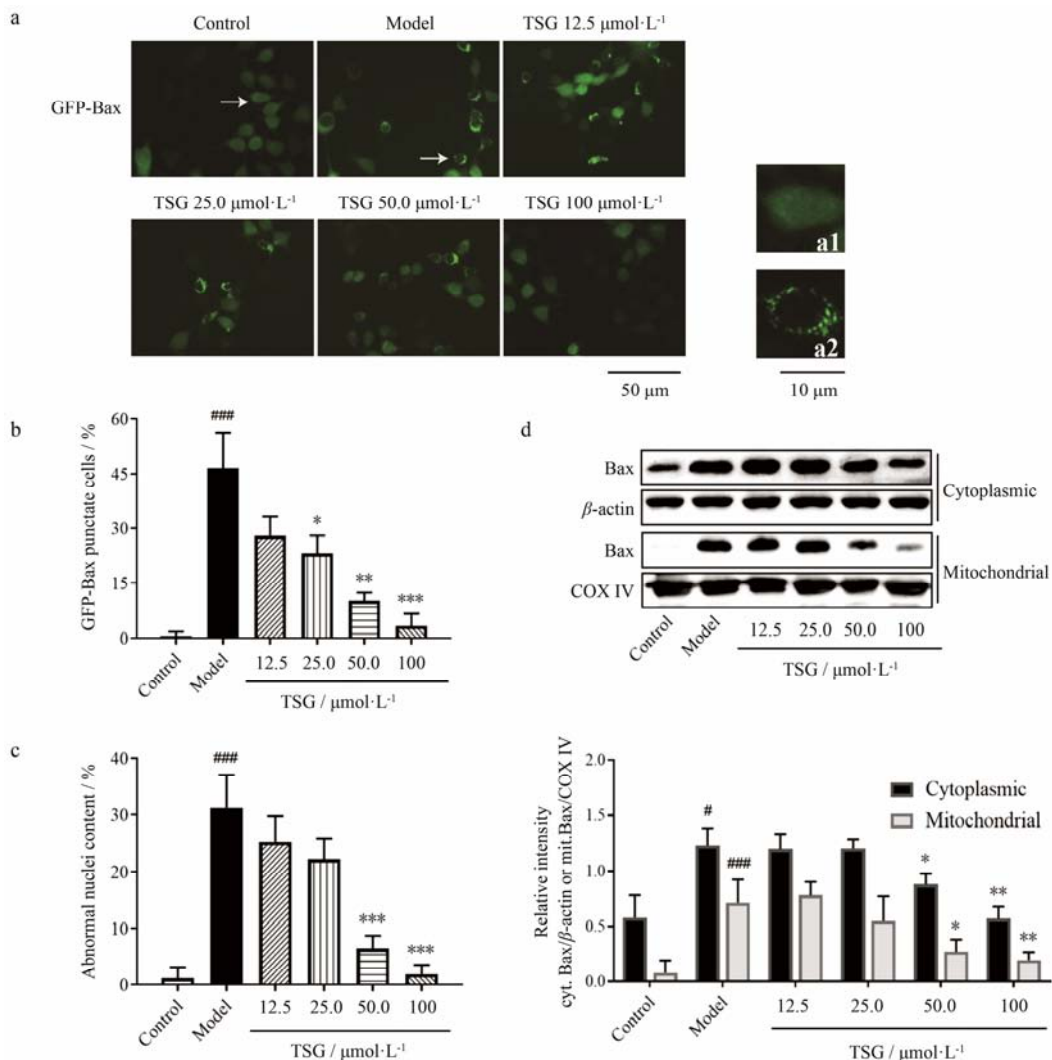
标志物。ROS 积累造成氧化失衡的一个重要体现就是细胞 MDA 生成的升高。在本实验中, H/R 处理显著增加 BEAS-2B 细胞 MDA 浓度, 而 TSG 的预处理能显著抑制 MDA 浓度的升高 (图 3c)。至于 SOD, 其在抗氧化损伤中扮演着重要的角色, 然而在本实验中并未观察到空白对照组、H/R 处理组和 TSG 处理组之间的显著性差异 (图 3d)。

### 3 TSG 通过线粒体途径抑制 H/R 损伤诱导的 BEAS-2B 细胞凋亡

在正常培养的 GFP-Bax-stable MCF-7 细胞中, 与 Bax 蛋白偶联的绿色荧光弥散地分布在整个细胞

中 (图 4a1), 表明 Bax 均匀分布于胞浆。Hoechst 33258 染料标记的细胞核呈正常、均一的形态。H/R 处理 10 h 之后, 绿色荧光蛋白聚集成斑点, 形成环绕于细胞核的小环 (图 4a2), 表明 Bax 蛋白在胞浆转位、积累于同一位置。H/R 处理的细胞核在倒置荧光显微镜下可见染色质固缩、核边缘皱缩及碎片化等形态改变。在 TSG 预处理之后, 具有 GFP-Bax 荧光斑点和异常细胞核的细胞比例显著下降 (图 4b, c), 表明 TSG 抑制了 H/R 处理的 GFP-Bax-stable MCF-7 细胞 Bax 从胞浆的转位以及细胞核损伤。

为了验证 Bax 是否转位至了线粒体, 用同法处

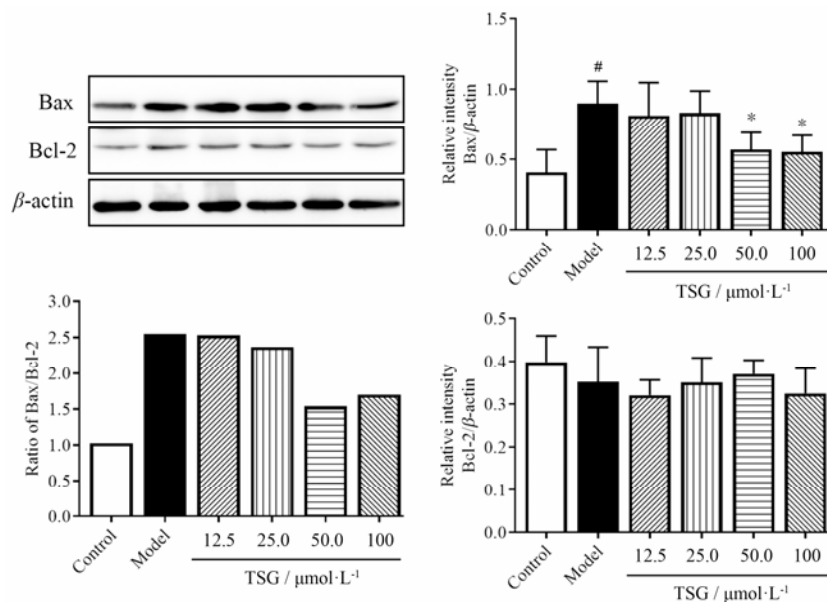


**Figure 4** TSG inhibited the translocation of Bax and nuclear deformation. GFP-Bax-stable MCF-7 cells were pretreated with TSG for 2 h before challenged with 10-h H/R process. (a) The cells stained with Hoechst 33258 nuclear stain were examined by using fluorescence microscope to detect the translocation of Bax (green channel). Cells with typical characteristics were marked with arrows and enlarged in images a1, a2. (b) GFP-Bax punctate cells and total green fluorescent cells were counted, then the content of punctate cells was calculated. (c) The abnormal nuclei and total fluorescent nuclei (with condensate chromatin, crenation and fractionation) were counted, then the content of abnormal nuclei was calculated. (d) Expressions of Bax separately in mitochondria and cytoplasm were determined by Western blotting. Representative blot (up) and quantified protein levels (down) are shown. Results are presented as  $\bar{x} \pm s$  from at least 3 independent experiments. # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$  vs control; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model

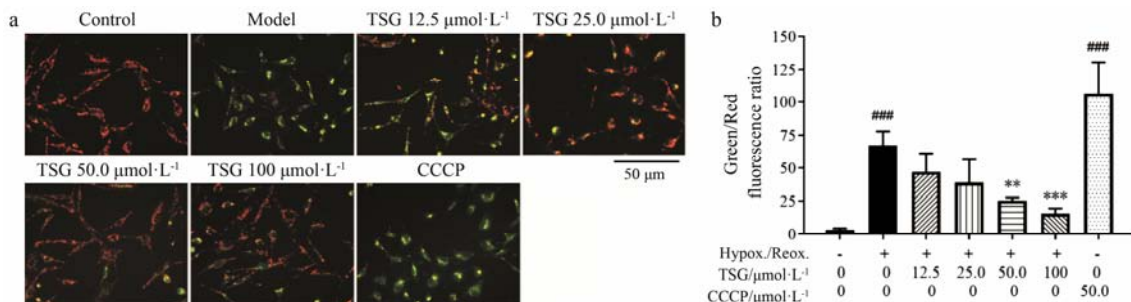
理 BEAS-2B 细胞, 收集细胞并且分离胞浆和线粒体组分。在模型组, BEAS-2B 细胞胞浆 Bax 和线粒体 Bax 蛋白表达相较空白组均显著升高, 且线粒体 Bax 表达升高的比例更为显著 ( $P < 0.001$ ), 表明大量的 Bax 生成且从胞浆转位至了线粒体。在 TSG 预处理组, 胞浆 Bax 和线粒体 Bax 蛋白表达相较模型组均显著下降 (图 4d)。

此外, 分析 Bax/Bcl-2 比率来观察 Bax 和 Bcl-2 的表达情况。H/R 处理 10 h 后, 总 Bax 蛋白表达相较空白组显著升高 (图 5)。在 TSG 预处理之后, 总 Bax 蛋白表达显著下降。然而, 在空白组与 H/R 处理组、H/R 处理组与 TSG 预处理组间没有观察到 Bcl-2 蛋白表达的显著性差异。

同时检测了线粒体去极化水平, 观察 TSG 对 H/R 损伤诱导的 BEAS-2B 细胞凋亡的保护作用。正常 BEAS-2B 细胞在加载 JC-1 染料后会激发出橙红色荧光 (图 6a)。在 H/R 处理 10 h 后, 聚集的 JC-1 从线粒体内释放至胞浆以绿色荧光的单体形式存在, 从而可指示线粒体膜电位的下降。与空白组相比, 解耦联试剂 CCCP 可彻底抑制线粒体氧化磷酸化, 从而能大幅降低线粒体膜电位, 产生明显的绿色荧光并且显著增加绿/红荧光比值 (图 6b), 因此其在本实验中作为阴性对照。TSG 可使 H/R 处理后的 BEAS-2B 细胞绿色荧光翻转至红色, 且显著降低绿/红荧光比值, 说明 TSG 可减轻 H/R 诱导的线粒体去极化。



**Figure 5** TSG inhibited the expression of total Bax in BEAS-2B cells and decreased the Bax/Bcl-2 ratio. Relative expressions of Bax and Bcl-2 were determined by Western blotting. Representative blot (upper left), quantified protein levels (right) and calculated Bax/Bcl-2 ratio (lower left) are shown. Protein levels results are presented as  $\bar{x} \pm s$  from at least 3 independent experiments. The ratio was calculated as (mean Bax)/(mean Bcl-2). #  $P < 0.05$  vs control; \*  $P < 0.05$  vs model

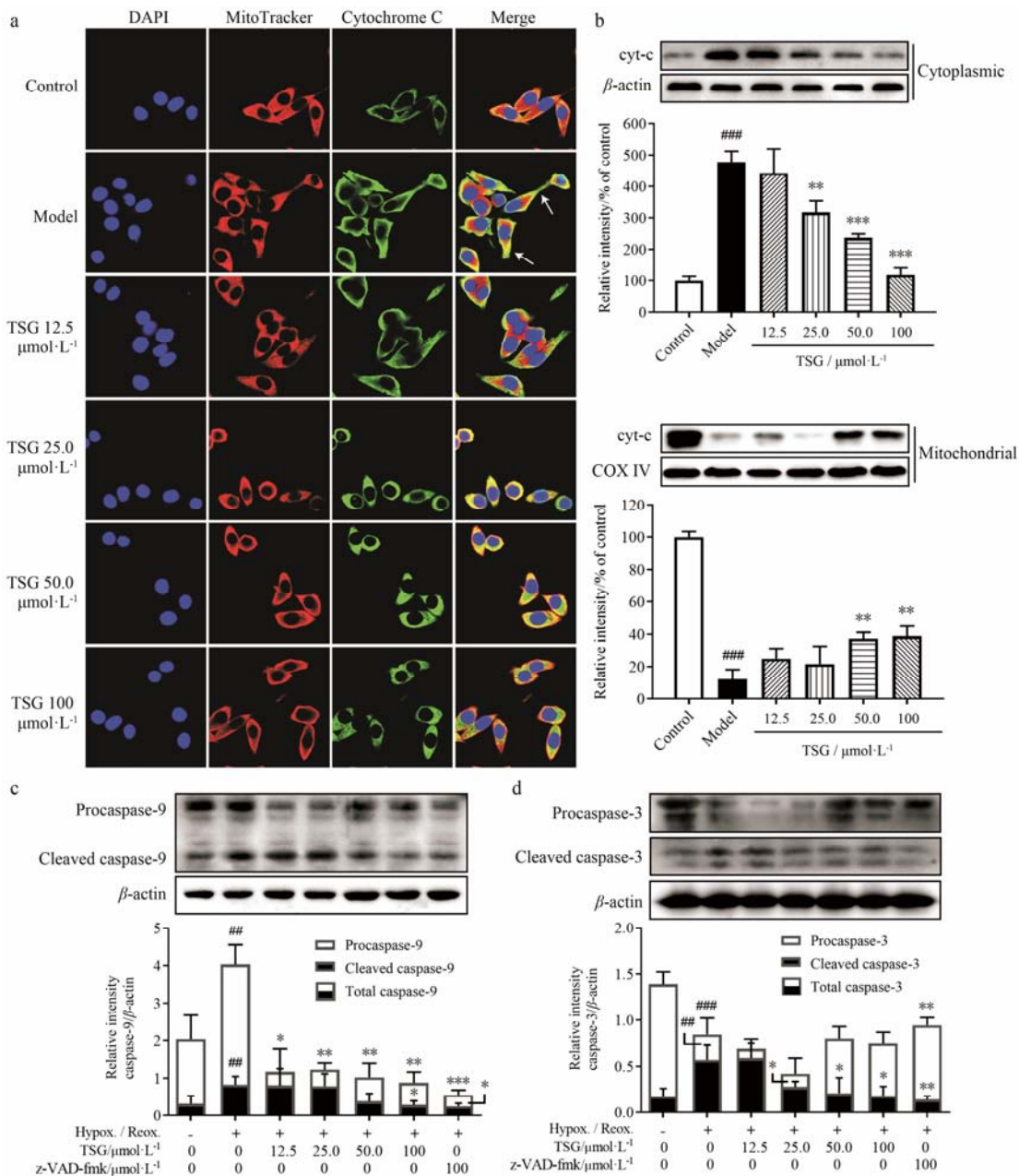


**Figure 6** TSG inhibited the decline of BEAS-2B cells membrane potential ( $\Delta\phi\text{M}$ ). (a) The cells were imaged through fluorescent microscopy. Representative merged images of green (monomeric JC-1) and red (aggregated JC-1) channels were shown. (b) The fluorescent intensity of BEAS-2B cells were quantitatively assayed through microplate reader and the green/red fluorescence ratio was calculated. Results are presented as  $\bar{x} \pm s$  from at least 3 independent experiments. ###  $P < 0.001$  vs control; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs model

在免疫荧光实验中，混合了 MitoTracker 和 anti-Cyt-C 通道的荧光。激光共聚焦显微镜观察发现，生长良好的 BEAS-2B 细胞胞浆部分呈现橙红色荧光，指示细胞色素 C 和线粒体位于相同位置 (图 7a)。在 H/R 处理 10 h 后，胞浆部分呈现出明显的绿色荧光拖尾 (箭头所示)，表明细胞色素 C 从线粒体大量释放至胞浆。然而，TSG 的预处理可使绿色荧光拖尾

缩短，并且使胞浆荧光颜色从亮绿色翻转至黄色或橙色，表明其可减轻 H/R 诱导的细胞色素 C 的释放。Western blotting 结果也证实，TSG 可显著抑制 H/R 诱导的细胞色素 C 从线粒体向胞浆的释放 (图 7b)。

作为细胞色素 C 释放的结果，后续 caspase-9 和 caspase-3 的激活在细胞凋亡中扮演重要的角色。通过实验观察前体的 procaspase-9、procaspase-3 及它们



**Figure 7** TSG inhibited release of cytochrome C and subsequent activation of cleaved caspase-9 and caspase-3. (a) Representative confocal microscopic images showing nuclei (blue channel), mitochondria (red channel), cytochrome C (green channel) and overlaid images are shown. Released cytochrome C was marked with arrows. (b) Expressions of cytochrome C separately in mitochondria and cytoplasm were determined by Western blotting. Representative blot (up) and quantified protein levels (down) are shown. Mean intensity of control group was normalized as 100%. (c, d) Relative expressions of caspase-9 and caspase-3 were determined by Western blotting. Representative blot (up) and quantified protein levels (down) are shown. Results are presented as  $\bar{x} \pm s$  from at least 3 independent experiments. ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs control; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model

的激活型 caspase-9、caspase-3 的表达情况。与空白对照相比, H/R 处理 10 h 可使 procaspase-9 及激活型 caspase-9 的表达同时升高 (图 7c)。TSG 可同时抑制 caspase-9 的合成和激活, 并呈现较好的量效关系。作为起始 caspase, caspase-9 可剪切激活下游的效应 caspase (即 caspase-3 等)。与空白对照相比, H/R 处理 10 h 可使激活型 caspase-3 表达显著升高 (图 7d), 同时前体 procaspase-3 表达相应降低。而 TSG 可抑制 caspase-3 的剪切激活, 并呈现较好的量效关系。

#### 4 TSG 的抗凋亡效应受 MAPK、HIF-1 $\alpha$ 及 p53 的调控

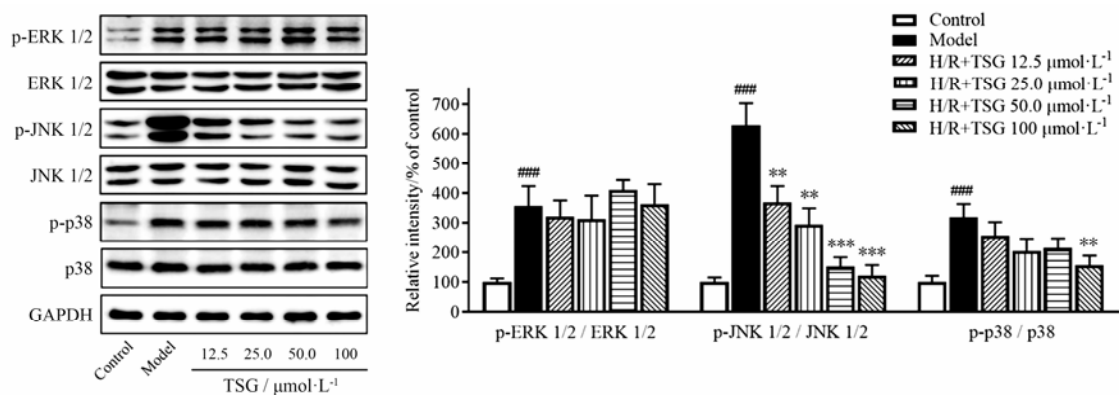
为了证实 TSG 是否可调节 BEAS-2B 细胞中 H/R 诱导损伤的 MAPK 信号通路, 通过 Western blotting 观察了 p-p38 MAPK、p-SAPK/JNK1/2 和 p-ERK1/2 在 BEAS-2B 细胞中的表达 (图 8)。在 H/R 处理后的 BEAS-2B 细胞中, 磷酸化 p38 和磷酸化 JNK1/2 表达明显增加。而 TSG 的预处理显著降低了 p38 和 JNK1/2 在 H/R 处理的 BEAS-2B 细胞中的磷酸化蛋白质/总蛋白比, 并存在一定的剂量依赖性。与对照组细胞相比, BEAS-2B 细胞经 H/R 处理后 ERK1/2 磷酸化水平显

著升高。但是, 在 H/R 模型组和 TSG 预处理组之间并没有观察到 (p-ERK1/2)/(ERK1/2) 比值的显著性差异。这些结果提示, TSG 可能通过抑制 MAPK 通路的激活, 减少 p-p38 MAPK、p-SAPK/JNK1/2 及下游促凋亡蛋白的表达从而减轻 H/R 造成的 BEAS-2B 细胞的损伤。

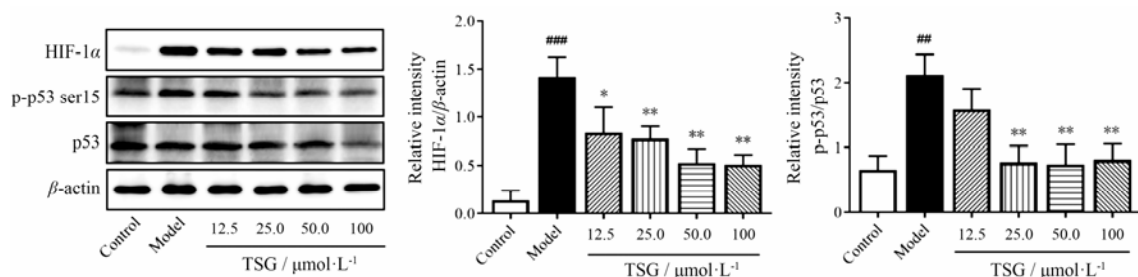
此外还检测了 HIF-1 $\alpha$  和 p53 蛋白水平, 以观察 TSG 对 H/R 诱导损伤的 BEAS-2B 细胞的保护作用是否与 HIF-1 $\alpha$  和 p53 这对调节细胞缺氧适应的重要蛋白有关。BEAS-2B 细胞经 H/R 处理 10 h 后, HIF-1 $\alpha$  表达明显增高; 而在 TSG 预处理后, HIF-1 $\alpha$  表达呈剂量依赖性下降 (图 9)。同时, H/R 处理也升高 BEAS-2B 细胞 p53 蛋白磷酸化水平, 通过 TSG 的预处理, p53 磷酸化水平下降 (图 9)。这些结果表明, TSG 可以通过降低 HIF-1 $\alpha$  的表达和 p53 的核级联反应, 抑制 H/R 诱导的细胞凋亡。

#### 讨论

H/R 及氧化应激损伤频繁发生于人体各组织, 尤其是在呼吸系统, 因为肺和支气管直接与外环境相



**Figure 8** TSG inhibited MAPK signaling pathways. Total levels and phosphorylated forms of ERK, JNK and p38 in BEAS-2B cells by H/R injury were detected by Western blotting analysis. Representative blot (left) and quantified protein levels (right) are shown. Results are presented as  $\bar{x} \pm s$  from at least 3 independent experiments. ### $P < 0.001$  vs control; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model



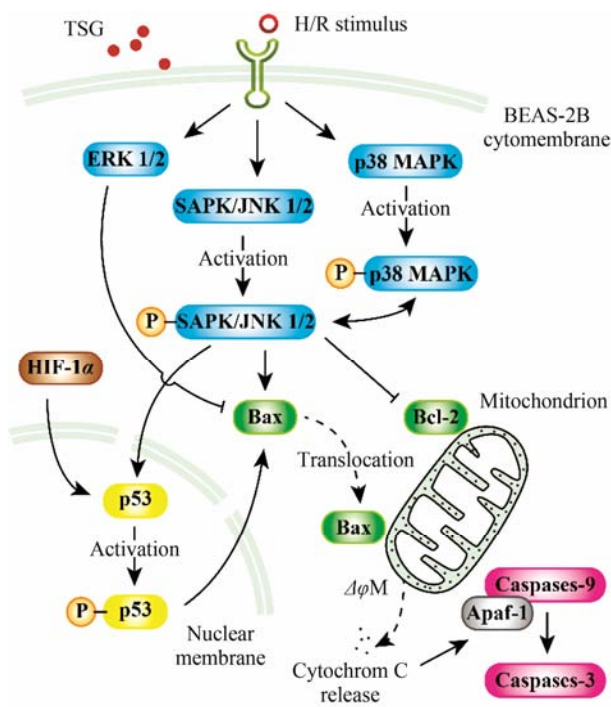
**Figure 9** TSG inhibited expression of HIF-1 $\alpha$  and activation of p53 protein. Total levels of HIF-1 $\alpha$ , p53 and phosphorylated (Ser 15) forms of p53 in BEAS-2B cells by H/R injury were detected by Western blotting analysis. Representative blot (left) and quantified protein levels (right) are shown. Results are presented as  $\bar{x} \pm s$  from at least 3 independent experiments. ### $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs model

通并且随时进行气体交换。BEAS-2B 细胞广泛应用于肺部相关的研究中。低糖和低血清培养基的氧剥夺模型可诱导细胞缺氧状态。复氧处理干扰细胞的缺氧适应, 从而对细胞造成额外的损伤。基于 MAPK 通路是转导胞外信号至胞内效应的重要的级联通路, 本研究主要通过 MAPK 信号通路探讨了何首乌的主要生物活性组分 TSG 在 H/R 诱导的 BEAS-2B 细胞损伤中的保护作用, 即胞外氧化应激刺激和胞内下游的细胞凋亡反应。H/R 处理后, 氧化应激状态被认为是启动细胞损伤的主要因素, 尤其是在肺上皮和支气管上皮细胞中, 因为此类细胞与外环境直接相通且无时不在与外界进行气体交换。

无论是缺氧或高氧状态都能诱导细胞损伤, 并且调节 BEAS-2B 细胞的凋亡<sup>[21, 22]</sup>。ROS 的产生是氧张力的直接指标。SOD 反映了缺氧组织损伤的水平, 其作为一个强大的抗氧化剂参与体内氧化还原反应, 将超氧化自由基催化反应为过氧化氢和氧气, 在肺部对氧化应激的响应中扮演了一个有益的角色<sup>[23]</sup>, 避免了组织的进一步氧化损伤<sup>[24]</sup>。MDA 是脂质过氧化的稳定终产物, 与 ROS 介导的氧化应激相关, 指示了组织损伤的严重程度<sup>[25]</sup>。在本研究中, 通过观察 H/R 处理的 BEAS-2B 细胞产生的 ROS、SOD 活性和 MDA 浓度来检测细胞氧化损伤程度。实验结果显示了 TSG 具有抗 H/R 诱导的 BEAS-2B 细胞氧化应激损伤的活性。H/R 处理后 BEAS-2B 细胞 ROS 和 MDA 的生成量显著升高, 而 TSG 能显著逆转这种 ROS 和 MDA 的生成, 同时本研究并没有观察到空白对照组、模型组和 TSG 预处理组之间 SOD 活性的显著差异。这些结果提示 TSG 能部分纠正 H/R 损伤下的 BEAS-2B 细胞氧张力失衡, 改善氧化应激状态, 且这种效应可能与 SOD 的参与并没有直接关系。

MAPK 信号通路调控细胞的存亡, 其被认为是氧化应激损伤的调控因子<sup>[26]</sup>。在 H/R 发生之时, 氧化应激激活 MAPK 介导细胞存活或凋亡的级联反应<sup>[27]</sup> (图 10)。p38 MAPK 和 SAPK/JNK1/2 由炎症细胞因子和环境应激因素激活, ERK1/2 则由生长因子及细胞因子激活<sup>[28]</sup>。

JNK1/2 在死亡受体介导的外源性凋亡通路和线粒体介导的内源性凋亡通路中均发挥关键作用。JNK1/2 参与促凋亡蛋白 Bax 的转位和下游的线粒体去极化、细胞色素 C 的释放及 caspase 的激活 (图 10)。本研究观察了 H/R 处理后, Bax 从 BEAS-2B 细胞胞浆至线粒体的转位。聚集的 Bax 在线粒体外膜上形成孔道, 诱使细胞色素 C 从线粒体内释放至胞浆。细胞色素 C



**Figure 10** TSG is involved in the regulation of MAPK, HIF-1 $\alpha$  and p53 signaling pathway in H/R-induced cell apoptosis. Solid arrow: Stimulatory modification or phosphorylating activation; Dashed arrow: Translocation; Bar-headed arrow: Inhibitory modification

在胞浆外与 Apaf-1 结合、寡聚, 募集始动 caspase (如 procaspase-9)。自活化的 procaspase-9 又激活下游效应 caspase (如 caspase-3 和 caspase-7)<sup>[29]</sup>, 最终引起 DNA 断裂和细胞凋亡。TSG 抑制 Bax 的转位、降低 Bax/Bcl-2 比值, 从而抑制 H/R 诱导损伤的 BEAS-2B 细胞下游一系列的功能改变和凋亡行为。值得注意的是, 本研究没有观察到空白对照组、模型组和 TSG 预处理组之间 Bcl-2 表达的显著差异。这个结果提示, Bcl-2 作为对 MAPK 通路激活有负反馈调节效应的抑凋亡蛋白, 可能在 BEAS-2B 细胞上, 对 TSG 的预处理并不敏感。

此外, JNK 还激活 p53 凋亡通路<sup>[30]</sup> (图 10)。JNK 激活的凋亡通路与 p53 介导的 Bax 表达上调有关。在大多数情况下, p38-MAPK 与 JNK1/2 同时被激活<sup>[31]</sup>。BEAS-2B 经 4 h 的缺氧及 6 h 的复氧处理后, p38、ERK1/2 及 JNK1/2 的磷酸化水平迅速升高。TSG 的预处理可抑制 JNK1/2 和 p38 MAPK 的激活但对 p-ERK1/2 的表达没有显著影响。这些结果提示, TSG 抑制 H/R 诱导的 BEAS-2B 细胞损伤的作用可能与 JNK1/2 及 p38 MAPK 信号通路有关。

另一方面, HIF 也是与氧化应激敏感性相关的重要转录因子。缺氧之后的复氧过程可导致 p53 蛋白的

积累和 Bax 的寡聚化<sup>[32]</sup>, 使细胞经历速发的 p53 依赖性细胞凋亡<sup>[33]</sup>。有研究证实, p53 蛋白与 HIF-1 $\alpha$  之间在物质与功能上有着密切的相互作用<sup>[34, 35]</sup> (图 10)。在本研究中, H/R 诱导损伤的 BEAS-2B 细胞中磷酸化 p53 和 HIF-1 $\alpha$  表达均显著升高; 而在 TSG 预处理组中, 两者表达均显著下降, 且呈良好的量效关系。这提示 TSG 可通过调控 p53 和 HIF-1 $\alpha$  发挥增强 BEAS-2B 细胞存活和降低 H/R 损伤的作用。

总之, 此研究表明了 TSG 能降低 BEAS-2B 细胞的 H/R 损伤。这种保护效应能够抑制细胞死亡、提高气管内皮功能、恢复氧化应激平衡及增强细胞抗凋亡能力。TSG 通过抑制 MAPK 的激活, 从而降低 Bax/Bcl-2 比值、细胞色素 C 的释放, 抑制 caspase-9、caspase-3、磷酸化 p53 和 HIF-1 $\alpha$  的表达发挥保护作用。TSG 抗 H/R 损伤的保护作用可能对将来预防和治疗慢性阻塞性肺病、肺水肿、肺气肿和其他肺部缺血再灌注损伤药物研发带来积极意义。

## References

- [1] Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282: C227–C241.
- [2] Ferrari RS, Andrade CF. Oxidative stress and lung ischemia-reperfusion injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 590987.
- [3] Jiang T, Sun Q, Chen S, et al. Oxidative stress: a major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 147: 1–19.
- [4] Maekawa H, Inagi R. Stress signal network between hypoxia and ER stress in chronic kidney disease [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 74.
- [5] McGuinness AJ, Sapey E. Oxidative stress in COPD: sources, markers, and potential mechanisms [J]. *J Clin Med*, 2017, 6: E21.
- [6] To T, Zhu J, Larsen K, et al. Progression from asthma to chronic obstructive pulmonary disease (COPD): is air pollution a risk factor? [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 194: 429–438.
- [7] Lü LS. Recent advances on stilbene glucoside from *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2006, 27: 608–612.
- [8] Nonaka G, Miwa N, Nishioka I, et al. Stilbene glycoside gallates and proanthocyanidins from *Polygonum multiflorum* [J]. *Phytochemistry*, 1982, 21: 429–432.
- [9] Wang T, Yang YJ, Wu PF, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside, a plant-derived cognitive enhancer, promotes hippocampal synaptic plasticity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650: 206–214.
- [10] Hou Y, Yang Q, Zhou L, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside improves learning and (or) memory ability of aged rats and may be connected to the APP pathway [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2011, 89: 801–809.
- [11] Zeng C, Xiao JH, Chang MJ, et al. Beneficial effects of THSG on acetic acid-induced experimental colitis: involvement of upregulation of PPAR- $\gamma$  and inhibition of the NF- $\kappa$ B inflammatory pathway [J]. *Molecules*, 2011, 16: 8552–8568.
- [12] Chao H, Wang Y, Jia W, et al. TSG (2,3,4',5-tetrahydroxystilbene 2-O- $\beta$ -D-glucoside) suppresses induction of pro-inflammatory factors by attenuating the binding activity of nuclear factor- $\kappa$ B in microglia [J]. *J Neuroinflammation*, 2013, 10: 129.
- [13] Zhang Y, Shen J, Xu J, et al. Inhibitory effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside on experimental inflammation and cyclooxygenase 2 activity [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9: 355–363.
- [14] Yao W, Fan W, Huang C, et al. Proteomic analysis for anti-atherosclerotic effect of tetrahydroxystilbene glucoside in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2013, 67: 140–145.
- [15] Zhang W, Xu X, Wang Y, et al. Effects of 2,3,4',5-tetrahydroxystilbene 2-O- $\beta$ -D-glucoside on vascular endothelial dysfunction in atherogenic-diet rats [J]. *Planta Med*, 2009, 75: 1209–1214.
- [16] Li H, Wang X, Liu Y, et al. Hepatoprotection and hepatotoxicity of Heshouwu, a Chinese medicinal herb: context of the paradoxical effect [J]. *Food Chem Toxicol*, 2016. DOI: 10.1016/j.fct.2016.07.035.
- [17] Zhou X, Yang Q, Xie Y, et al. Protective effect of tetrahydroxystilbene glucoside against D-galactose induced aging process in mice [J]. *Phytochem Lett*, 2013, 6: 372–378.
- [18] Xuan L, Shi J, Yao C, et al. Vam3, a resveratrol dimer, inhibits cigarette smoke-induced cell apoptosis in lungs by improving mitochondrial function [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35: 779–791.
- [19] Jiang RT, Yao CS, Bai JY, et al. Effects of Vam3 on sodium nitroprusside-induced apoptosis and SIRT1 and p53 expression in rat articular chondrocytes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 608–614.
- [20] Liu MJ, Fei SJ, Qiao WL, et al. The protective effect of 17 $\beta$ -estradiol postconditioning against hypoxia/reoxygenation injury in human gastric epithelial cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 645: 151–157.

- [21] Pietarinenruntti P, Raivio KO, Saksela M, et al. Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 19: 286–292.
- [22] Park E, Yi J, Chung K, et al. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells [J]. *Toxicol Lett*, 2008, 180: 222–229.
- [23] Shen CY, Lee J, Su CL, et al. Hypoxia and reoxygenation of the lung tissues induced mRNA expressions of superoxide dismutase and catalase and interventions from different antioxidants [J]. *Transplant Proc*, 2008, 40: 2182–2184.
- [24] Ciancarelli I, Di Massimo C, De Amicis D, et al. Uric acid and Cu/Zn superoxide dismutase: potential strategies and biomarkers in functional recovery of post-acute ischemic stroke patients after intensive neurorehabilitation [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2015, 12: 120–127.
- [25] Yuhai GU, Zhen Z. Significance of the changes occurring in the levels of interleukins, SOD and MDA in rat pulmonary tissue following exposure to different altitudes and exposure times [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10: 915–920.
- [26] Kovalska M, Kovalska L, Pavlikova M, et al. Intracellular signaling MAPK pathway after cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37: 1568–1577.
- [27] Nozaki K, Nishimura M, Hashimoto N. Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia [J]. *Mol Neurobiol*, 2001, 23: 1–19.
- [28] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases [J]. *Science*, 2002, 298: 1911–1912.
- [29] Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip [J]. *Cell*, 2009, 138: 838–854.
- [30] Oleinik NV, Krupenko NI, Krupenko SA. Cooperation between JNK1 and JNK2 in activation of p53 apoptotic pathway [J]. *Oncogene*, 2007, 26: 7222–7230.
- [31] Werlen G, Hausmann B, Naeher D, et al. Signaling life and death in the thymus: timing is everything [J]. *Science*, 2003, 299: 1859–1863.
- [32] Zhang X, Li J, Sejas DP, et al. Hypoxia-reoxygenation induces premature senescence in FA bone marrow hematopoietic cells [J]. *Blood*, 2005, 106: 75–85.
- [33] Pires IM, Bencokova Z, Milani M, et al. Effects of acute *versus* chronic hypoxia on DNA damage responses and genomic instability [J]. *Cancer Res*, 2010, 70: 925–935.
- [34] Poon E, Harris AL, Ashcroft M. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer [J]. *Exp Rev Mol Med*, 2009, 11: e26.
- [35] Fels DR, Koumenis C. HIF-1 $\alpha$  and p53: the ODD couple? [J]. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30: 426–429.