

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.13.004

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1097.R.20230222.1440.008.html>(2023-02-23)

4-苯基丁酸对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用^{*}

刘赞朝¹,孙静华¹,李 洋¹,赵维丽¹,李 蓉²,刘立朋^{1△}
(河北省石家庄市第二医院:1.河北省糖尿病基础医学研究重点实验室;2.感控科 050000)

[摘要] **目的** 探究 4-苯基丁酸(4-PBA)通过调节过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α)对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤的影响。**方法** 使用 30 mmol/L 高糖刺激 HUVECs, CCK-8 法检测 HUVECs 活性,免疫荧光法检测 HUVECs 氧化应激水平,原位末端标记法(TUNEL 法)检测 HUVECs 凋亡水平,免疫荧光法、逆转录聚合酶链反应(PCR)法检测 HUVECs PGC-1 α 蛋白及基因表达水平;逆转录 PCR 检测超氧化物歧化酶 1(Sod1)和 Sod2。**结果** 30 mmol/L 高糖刺激 HUVECs 2 d 后其活性明显降低,氧化应激水平明显升高,凋亡水平明显上调,差异均有统计学意义($P<0.05$);4-PBA (1.0 mmol/L)干预后可促进 PGC-1 α 高表达,Sod1、Sod2 表达明显上调,凋亡水平明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 4-PBA 可能通过调节 PGC-1 α 发挥抗氧化效应,抑制高糖诱导的细胞损伤。

[关键词] 4-苯基丁酸;高糖;人脐静脉内皮细胞;氧化应激;凋亡;过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α

[中图法分类号] R587.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)13-1938-05

Protective effect of 4-phenyl butyric acid on endothelial cells injury induced by high glucose^{*}

LIU Zanchao¹,SUN Jinghua¹,LI Yang¹,ZHAO Weili¹,LI Rong²,LIU Lipeng^{1△}

(1. Hebei Provincial Key Laboratory of Basic Medicine for Diabetes;2. Department of Infection Control, Shijiazhuang Municipal Second Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of 4-phenyl butyric acid (4-PBA) on the injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by high glucose through regulating peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α). **Methods** HUVECs were stimulated with 30 mmol/L glucose, and then the CCK-8 assay was used to determine the HUVECs viability. The immunofluorescence method was applied to detect the oxidative stress level of HUVECs. TUNEL was used to detect HUVECs apoptotic level. Immunofluorescence and RT-PCR were performed to detect the protein and gene expression levels of PGC-1 α , and RT-PCR was used to detect the Sod1 and Sod2 levels in HUVECs. **Results** The HUVECs activity was significantly decreased after 30 mmol/L high glucose stimulation for 2 d, the oxidative stress level was significantly increased, the apoptosis level was significantly up-regulated, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The 4-PBA (1.0 mmol) intervention promoted the high expression of PGC-1 α , the Sod1 and Sod2 expression levels were significantly up-regulated, the apoptosis level was significantly decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** 4-PBA could play the anti-oxidation effect and inhibit the high glucose induced cellular injury by regulating PGC-1 α .

[Key words] 4-phenyl butyric acid; high glucose; human umbilical vein endothelial cells; oxidative stress; apoptosis; peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α

糖尿病患者持续性高血糖会引起机体严重并发症,是导致糖尿病患者死亡的重要原因^[1]。随着糖尿病进展,高糖毒性会导致机体众多器官受损,尤其是心血管系统^[2]。高糖诱导机体内活性氧(ROS)生成过多,过量的 ROS 引起机体内抗氧化调节失衡,导致机体发生氧化应激^[3]。有学者指出,4-苯基丁酸(4-

^{*} 基金项目:河北省医学科学研究计划基金项目(20220197);河北省重点研究计划生物医药专项(19277739D)。 作者简介:刘赞朝(1981—),副主任医师,博士,主要从事糖尿病血管并发症研究。 △ 通信作者, E-mail: liulipeng1011@163.com。

PBA)通过减缓氧化应激可以明显改善因缺血再灌注引起的细胞损伤^[4]。然而 4-PBA 对高糖导致的细胞氧化应激的影响及调节机制的相关研究较少见。因此,本研究通过建立人脐静脉内皮细胞(HUVECs)高糖模型观察 4-PBA 对氧化应激导致的细胞损伤的影响,并探讨其机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α)抗体购自美国 Abcam 公司,原位末端标记(TUNEL)细胞凋亡试剂盒购自北京碧云天公司,细胞增殖/毒性 CCK-8 检测试剂盒购自日本同仁化学研究所,低糖杜氏改良 Eagle 培养基(DMEM 培养基)购自美国 Thermo Fisher 公司,胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司,4-PBA 购自美国 Sigma 公司,RNA 提取试剂盒购自北京天根生化公司,实时定量-聚合酶链反应(PCR)试剂、逆转录 PCR 试剂均购自南京诺唯赞公司,二氧化碳培养箱、Multiskan GO 型酶标仪均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,LightCycler 480II 实时荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司,E-CLIPSE Ts2R 荧光倒置显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 HUVECs(购自北京北纳创联生物技术研究院)使用含有 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的低糖 DMEM 培养基于 37 °C、5% 二氧化碳培养箱中进行培养。待细胞融合度达 70%~80%时使用 0.25%消化胰酶进行消化传代。

1.2.2 实验分组

对照组(Ctrl 组)使用的低糖 DMEM 完全培养基含 5.5 mmol/L 葡萄糖、10% FBS 和 100 U/mL 青链霉素双抗;4-PBA 对照组(Ctrl+4PBA 组)使用的低糖 DMEM 完全培养基含 0.5 mmol/L 4-PBA、5.5 mmol/L 葡萄糖、10% FBS 和 100 U/mL 青链霉素双抗;高糖组(HG 组)使用的低糖 DMEM 完全培养基含 30 mmol/L 葡萄糖、10% FBS 和 100 U/mL 青链霉素双抗;4-PBA 高糖组(HG+4PBA 组)使用的低糖 DMEM 完全培养基含 0.5 mmol/L 4-PBA、30 mmol/L 葡萄糖、10%FBS 和 100 U/mL 青链霉素双抗。

1.2.3 CCK-8 检测细胞活性

将 HUVECs 以每孔 5×10^4 个细胞铺于 96 孔板,高糖培养 2 d 后加入 0.5 mmol/L 4-PBA 进行培养。培养 24 h 后弃上清液,每孔加入 100 μ L CCK-8 稀释液于二氧化碳培养箱孵育 40 min 后使用多功能酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度值。

1.2.4 TUNEL 检测细胞凋亡

将细胞爬片用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次后加入固定液室温固定 10 min。用 PBS 清洗 3 次加入

0.2% Triton 进行打孔,室温放置 5 min。用 PBS 清洗 3 次加入 TUNEL 染色液,37 °C 放置 1 h 后用 PBS 清洗 3 次,封片后使用荧光显微镜进行拍照分析。

1.2.5 ROS 水平检测

按 1.2.2 项进行分组,对不同组进行干预后使用无血清培养基将 2'-7'-二氯荧光素乙酸盐稀释为 10 μ mol/L,放于二氧化碳培养箱中孵育 30 min。用 PBS 清洗 3 次后于荧光显微镜下进行拍照。

1.2.6 免疫荧光检测 PGC-1 α 表达

将细胞于爬片上培养后按 1.2.2 项进行分组并给予 4-PBA 干预。干预结束后用 PBS 清洗 3 次后加入含 0.2% Triton-100 的 PBS 室温静置 5 min。使用羊血清进行封闭后按说明书加入抗体于 4 °C 过夜孵育。第 2 天用 PBS 清洗后加入二抗室温孵育 1 h,用 PBS 清洗后使用荧光封片剂进行封片。于荧光显微镜下进行拍照分析。

1.2.7 实时定量 PCR 分析 PGC-1 α 、超氧化物歧化酶(Sod1)和 Sod2 表达

将细胞铺至 6 孔板,按 1.2.2 项分组进行分组处理后使用试剂盒提取细胞总 RNA 进行逆转录,使用逆转录 PCR 试剂进行实时定量 PCR 反应。引物序列:PGC-1 α 上游引物 5'-TGG TGC CAC CAC CAT CAA AGA-3',下游引物 5'-TCA CCA AAC AGC CGC AGA CTG-3';Sod1 上游引物 5'-GTG CAG GGC ATC ATC AAT T-3',下游引物 5'-AGC CTG CTG TAT TAT CTC CAA A-3';Sod2 上游引物 5'-TGG ACA AAC CTC AGC CCT AA-3',下游引物 5'-AAC CAA GCC AAC CCC AAC-3';GAPDH 上游引物 5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3',下游引物 5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3'。

1.3 统计学处理

采用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析、独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖导致 HUVECs 损伤

与 Ctrl 组比较,HG 组 HUVECs 活性明显降低,氧化应激水平明显升高,凋亡水平明显上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.2 高糖抑制 HUVECs PGC-1 α 、Sod1、Sod2 表达

与 Ctrl 组比较,HG 组 HUVECs PGC-1 α 蛋白及基因表达均降低,Sod1、Sod2 基因表达均明显下调,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

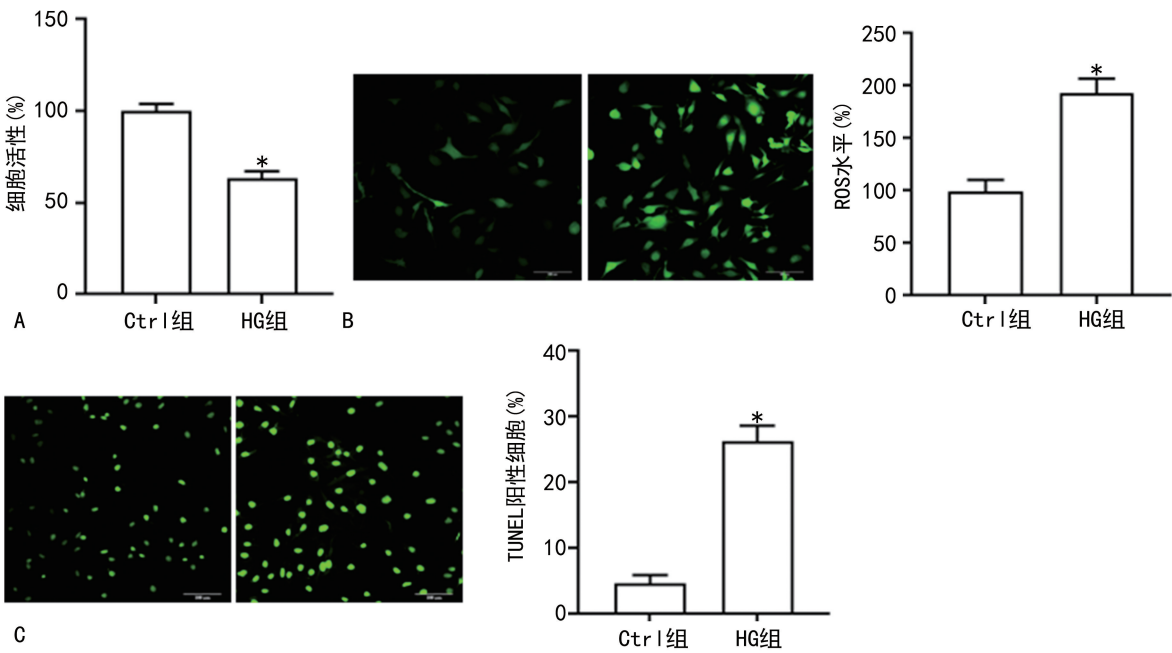
2.3 4-PBA 促进 HUVECs PGC-1 α 、Sod1、Sod2 表达

0.1、0.5、1.0、5.0 mmol/L 4-PBA 均可明显提高 HUVECs 活性,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 3A。与 HG 组比较,HG+4PBA 组 HUVECs

PGC-1 α 、Sod1、Sod2 表达均明显上调,差异均有统计
学意义($P<0.05$),见图 3B~D。

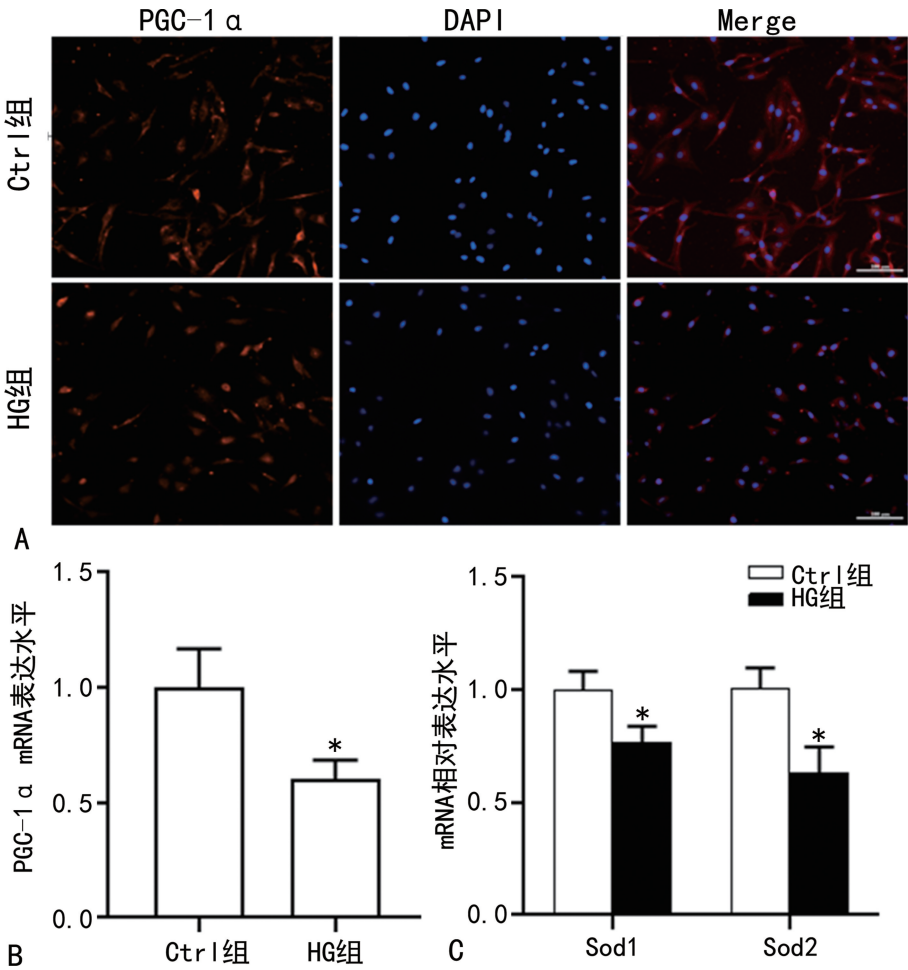
与 HG 组比较,HG+4PBA 组 HUVECs 活性明
显升高,凋亡水平明显降低,差异均有统计学意义
($P<0.05$),见图 4。

2.4 4-PBA 改善高糖导致的细胞凋亡



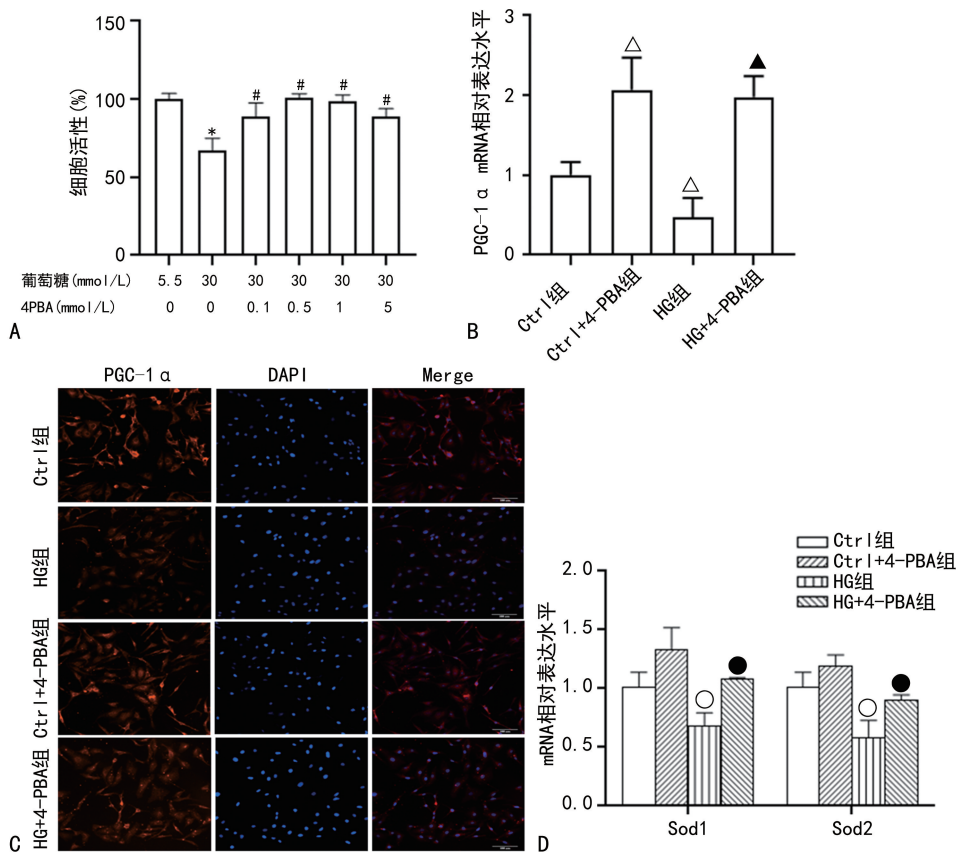
A:高糖抑制细胞活性;B:高糖导致 ROS 水平上调;C:高糖导致细胞凋亡;* : $P<0.05$,与 Ctrl 组比较。

图 1 高糖导致细胞损伤(标尺:100 μm)



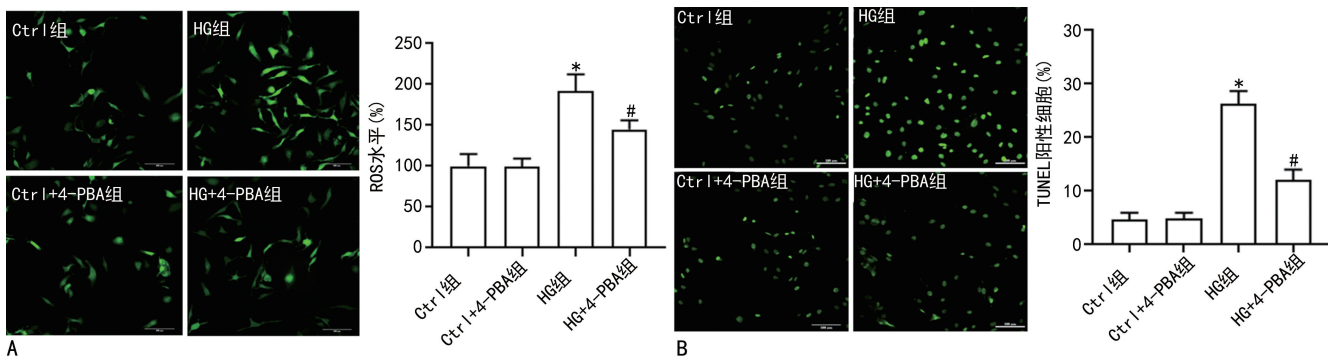
A:高糖抑制 PGC-1 α 蛋白表达;B:高糖抑制 PGC-1 α 基因表达;C:高糖导致 Sod1、Sod2 基因表达降低;* : $P<0.05$,与 Ctrl 组比较。

图 2 高糖抑制 PGC-1 α 、Sod1、Sod2 表达(标尺:100 μm)



A:4-PBA 改善细胞活性;*: $P<0.05$,与 Ctrl 组 0 mmol/L 4-PBA 比较;#: $P<0.05$,与 HG 组 0 mmol/L 4-PBA 比较;B:4-PBA 促进 PGC-1 α 基因表达; $\triangle$: $P<0.05$,与 Ctrl 组比较; $\blacktriangle$: $P<0.05$,与 HG 组比较;C、D:分别为 4-PBA 促进 PGC-1 α 蛋白表达,Sod1、Sod2 基因表达; $\circ$: $P<0.05$,与 Ctrl 组比较; $\bullet$: $P<0.05$,与 HG 组比较。

图 3 4-PBA 促进 HUVECs PGC-1 α 、Sod1、Sod2 表达(标尺:100 μm)



A:4-PBA 抑制高糖导致的 ROS 生成;B:4-PBA 抑制高糖导致的细胞凋亡;*: $P<0.05$,与 Ctrl 组比较;#: $P<0.05$,与 HG 组比较。

图 4 4-PBA 改善高糖导致的细胞凋亡(标尺:100 μm)

3 讨 论

ROS 是氧化应激的代表性产物,其表达量可以反映细胞氧化应激水平。持续性高糖可引起细胞内抗氧化和氧化系统功能障碍,导致 ROS 持续积累,引起氧化应激损伤。CHEN 等^[5]指出,高糖会导致细胞 ROS 水平上调,破坏细胞氧平衡,从而导致细胞损伤,影响糖尿病伤口愈合。本研究结果显示,高糖可以明显抑制 HUVECs 活性,引起细胞损伤,并可引起 ROS 上升导致 HUVECs 凋亡,与相关研究结果相符,证实高糖诱导的氧化应激是导致细胞凋亡和损伤的关键因素。因此,抑制细胞氧化应激对高糖诱导的细胞损伤至关重要。而 4-PBA 是否可以抑制高糖诱

导的氧化应激,从而发挥改善细胞损伤的相关研究较少见。本研究结果显示,4-PBA 可以抑制高糖诱导的 ROS 生成减轻细胞氧化应激,从而发挥改善细胞损伤的作用。目前,关于 4-PBA 调节 ROS 的相关研究较少见,其具体的调节机制尚不明确。本研究结果显示,4-PBA 干预后 PGC-1 α 表达明显上调。PGC-1 α 是重要的能量代谢调节因子,与氧化应激和炎症反应密切相关^[6-7]。有研究表明,PGC-1 α 可以通过调节其下游抗氧化酶从而发挥抑制细胞凋亡、改善细胞损伤等功能。如 QI 等^[8]指出,抑制骨骼肌 PGC-1 α 表达导致 Sod1 表达下调,该结果在转基因小鼠中同样得到验证。BYUN 等^[9]研究表明,PGC-1 α 可以增加 Sod2

活性从而发挥抗氧化作用,改善细胞损伤。同时,有学者指出,PGC-1 α 可以通过下游抗氧化通路从而发挥抑制细胞凋亡的作用^[10]。然而 PGC-1 α 在糖尿病领域通过抗氧化作用改善细胞损伤的相关研究较少见。本研究结果显示,4-PBA 干预后 PGC-1 α 、Sod1、Sod2 表达均升高,从而抑制氧化应激引起的 HU-VECs 凋亡和损伤。揭示了 4-PBA 调节氧化应激可能的新机制,为该药的应用提供了参考依据。

4-PBA 是一种相对分子质量较小的氨清除剂,用于治疗尿素循环紊乱。近年来,有学者指出,4-PBA 在糖尿病及其并发症防治方面发挥着重要作用。然而对 4-PBA 的研究主要集中在内质网应激方面,如有学者指出,4-PBA 可以抑制内质网应激的产生,从而减缓糖尿病小鼠血管钙化^[11];HAN 等^[12]也指出,4-PBA 可以减轻糖尿病小鼠内质网应激的积累,从而减轻糖尿病肾小管损伤,改善肾功能。关于 4-PBA 对 ROS 的影响及调控机制的相关文献报道较少见。WU 等^[4]指出,4-PBA 可以通过调节 CHOP 蛋白从而发挥抗氧化应激作用。GE 等^[13]研究表明,4-PBA 通过上调核转录因子红系 2 相关因子 2(Nrf2)抑制细胞氧化应激,然而其具体机制仍不清楚。目前,4-PBA 在高糖细胞模型中促进 PGC-1 α 上调从而发挥调节氧化应激的相关研究尚未见相关文献报道。本研究探讨了 4-PBA 调节氧化应激的机制,对推动 4-PBA 在糖尿病临床领域的应用具有一定参考意义。但本研究仍存在不足,如未深入研究 4-PBA 调节 PGC-1 α 的具体机制,后续将深入挖掘其具体的调节机制。

综上所述,4-PBA 可以抑制高糖诱导的细胞凋亡,改善细胞损伤,其调节机制可能是通过 PGC-1 α 抑制细胞氧化应激从而发挥调控作用。

参考文献

- [1] CHARITON A,GARZARELLA J,JANDELEIT-DAHM K A M,et al. Oxidative stress and inflammation in renal and cardiovascular complications of diabetes[J]. *Biology (Basel)*,2020,10(1):18.
- [2] JOHNSON J,JAGGERS R M,GOPALK RISHNA S,et al. Oxidative stress in neutrophils: implications for diabetic cardiovascular complications[J]. *Antioxid Redox Signal*,2022,36(10/11/12):652-666.
- [3] CHECA J,ARAN J M. Reactive oxygen species: drivers of physiological and pathological processes[J]. *J Inflamm Res*,2020,13:1057-1073.
- [4] WU Z,NIU J,XUE H,et al. Sodium 4-phenylbutyrate protects hypoxic-ischemic brain injury via attenuating endoplasmic reticulum stress in neonatal rats[J]. *Front Behav Neurosci*,2021,15:632143.
- [5] CHEN H,TU M,SHI J,et al. Effect of photobiomodulation on CCC-ESF reactive oxygen species steady-state in high glucose mediums[J]. *Lasers Med Sci*,2021,36(3):555-562.
- [6] JEGANATHAN J,SARAF R,MAHMOOD F,et al. Mitochondrial dysfunction in atrial tissue of patients developing postoperative atrial fibrillation[J]. *Ann Thorac Surg*,2017,104(5):1547-1555.
- [7] CHANDRASEKARAN K,ANJANEYULU M,CHOI J,et al. Role of mitochondria in diabetic peripheral neuropathy: influencing the NAD dependent SIRT1-PGC-1 α -TFAM pathway[J]. *Int Rev Neurobiol*,2019,145:177-209.
- [8] QI Y,YIN X,WANG S,et al. PGC-1 α silencing compounds the perturbation of mitochondrial function caused by mutant SOD1 in skeletal muscle of ALS mouse model[J]. *Front Aging Neurosci*,2015,7:204.
- [9] BYUN K A,OH S,YANG J Y,et al. Ecklonia cava extracts decrease hypertension-related vascular calcification by modulating PGC-1 α and SOD2[J]. *Biomed Pharmacother*,2022,153:113283.
- [10] YIN Q H,ZHOU Y,LI Z H Y. miR-373 Suppresses cell proliferation and apoptosis via regulation of SIRT1/PGC-1 α /NRF2 axis in pancreatic cancer[J]. *Cell J*,2021,23(2):199-210.
- [11] NI L,YUAN C,WU X. Endoplasmic reticulum stress in diabetic nephrology: regulation, pathological role, and therapeutic potential[J]. *Oxid Med Cell Longev*,2021,2021:7277966.
- [12] HAN J,PANG X,SHI X,et al. Ginkgo biloba extract egb761 ameliorates the extracellular matrix accumulation and mesenchymal transformation of renal tubules in diabetic kidney disease by inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. *Biomed Res Int*,2021,2021:6657206.
- [13] GE C X,XU M X,QIN Y T,et al. Endoplasmic reticulum stress-induced iRhom2 up-regulation promotes macrophage-regulated cardiac inflammation and lipid deposition in high fat diet (HFD)-challenged mice: intervention of fisetin and metformin[J]. *Free Radic Biol Med*,2019,141:67-83.