

NR4A1 通过 I κ B α /NF- κ B 通路调控过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的机制

姜子晗¹, 芦兴晨¹, 孙露², 赵蕙琛³, 左丹⁴,

马小莉³, 刘元涛⁵, 张玉超⁴

(1.青岛大学附属青岛临床医学院 青岛市市立医院,山东 青岛 266011;

2.山东大学齐鲁医院(青岛) 临床营养科,山东 青岛 266011;

3.青岛市市立医院内分泌科,山东 青岛 266011;4.青岛市市立医院医学杂志编辑部,山东 青岛 266011;

5.山东大学齐鲁医院(青岛) 内分泌科,山东 青岛 266011)

摘要:目的 探讨过氧化氢(H₂O₂) 诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)氧化应激中孤核受体 NR4A1 表达变化,以及其对细胞凋亡的影响及机制。方法 使用不同浓度及时间梯度 H₂O₂ 处理 HUVECs,采用 CCK-8 法检测细胞活性, TUNEL 法检测细胞凋亡, Western blotting 法检测 Bcl-2、Bax 与 NR4A1 蛋白表达;采用 siRNA 转染建立敲低 NR4A1 与对照的 HUVECs,分为 si-NC 组及 si-NR4A1 组, H₂O₂ 处理后检测各组细胞抑凋亡蛋白 Bcl-2、凋亡蛋白 Bax 表达, TUNEL 法检测细胞凋亡;采用慢病毒感染建立稳定过表达 NR4A1 与对照的 HUVECs,并进行 H₂O₂ 处理,分为空载对照组(NC 组)、过表达组(OV 组)、NC+H₂O₂ 组及 OV+H₂O₂ 组。TUNEL 法检测各组细胞凋亡、Western blotting 法检测各组中 NR4A1、Bcl-2、Bax、总 I κ B α 的蛋白表达、P65 蛋白在细胞核/质定位。结果 200 μ mol/L H₂O₂ 处理细胞 6 h, HUVECs 活力显著下降, 凋亡水平显著上升, Bax/Bcl-2 比值升高($P < 0.001$); NR4A1 蛋白表达量增加;与 si-NC 组相比, si-NR4A1 组在 H₂O₂ 处理后细胞凋亡率、Bax/Bcl-2 比值下降($P < 0.001$); OV+H₂O₂ 组细胞凋亡率、Bax/Bcl-2 比值较 NC+H₂O₂ 组显著降低($P < 0.001$);相较于 NC+H₂O₂ 组, P65 蛋白在 OV+H₂O₂ 组中细胞核内表达显著降低($P < 0.05$), 细胞质内表达显著上调($P < 0.001$);与 NC+H₂O₂ 组相比, OV+H₂O₂ 组总 I κ B α 表达上调($P < 0.001$)。结论 H₂O₂ 诱导 HUVECs 发生细胞凋亡; HUVECs 内 NR4A1 蛋白过表达可抑制细胞凋亡, 其作用机制可能与调控 I κ B α 的表达与抑制 NF- κ B 的核转位有关。

关键词:孤核受体 NR4A1; 人脐静脉内皮细胞; I κ B α 蛋白; NF- κ B 核转位; 细胞凋亡

中图分类号: R587 文献标志码: A

Mechanism of NR4A1 regulating hydrogen peroxide-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via the I κ B α /NF- κ B pathway

JIANG Zihan¹, LU Xingchen¹, SUN Lu², ZHAO Huichen³, ZUO Dan⁴,

MA Xiaoli³, LIU Yuantao⁵, ZHANG Yuchao⁴

(1. Qingdao Clinical Medical School of Qingdao University, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong, China;

2. Department of Clinical Nutrition, Qilu Hospital of Shandong University (Qingdao), Qingdao 266011, Shandong, China;

3. Department of Endocrinology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong, China;

4. Editorial Office of Medical Journal, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong, China;

5. Department of Endocrinology, Qilu Hospital of Shandong University (Qingdao), Qingdao 266011, Shandong, China)

收稿日期: 2023-12-25

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目(ZR2022MH086); 山东省医药卫生科技发展计划(202103060651); 2021年度青岛市医药卫生科技研发计划(2021-WJZD005)

通信作者: 张玉超. E-mail: yc.zhang@hotmail.com

Abstract: Objective To investigate the expression of orphan nuclear receptor 4A1 (NR4A1) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) oxidative stress, and its effects and mechanism in cell apoptosis. **Methods** After HUVECs were treated with different concentrations and exposure times of H_2O_2 , cell activity, apoptosis and protein expressions of Bcl-2, Bax and NR4A1 were detected with CCK-8, TUNEL and Western blotting, respectively. siRNA was transfected into HUVECs to obtain the knocked down NR4A1 cells (si-NR4A1) and control (si-NC). After H_2O_2 treatment, the levels of cell apoptosis, and the Bax/Bcl-2 ratio were detected. Lentivirus transfection was used to establish stably overexpressed NR4A1 HUVECs, which were treated with H_2O_2 and divided into empty vector control group (NC), NR4A1 overexpressed group (OV), NC+ H_2O_2 group, and OV+ H_2O_2 group. The cell apoptosis was determined with TUNEL, and the protein expressions of NR4A1, Bcl-2, Bax, total I κ B α , and the nuclear/cytoplasmic localization of P65 protein in each group were determined with Western blotting. **Results** After the cells were treated with 200 μ mol/L H_2O_2 for 6 hours, the vitality of HUVECs significantly decreased, the rate of apoptosis significantly increased, the Bax/Bcl-2 ratio increased ($P<0.001$), and the protein expression of NR4A1 increased. Compared with the si-NC group, the si-NR4A1 group had decreased Bax/Bcl-2 ratio and cell apoptosis after H_2O_2 treatment ($P<0.001$). Compared with the NC+ H_2O_2 group, the OV+ H_2O_2 group had significantly decreased cell apoptosis rate and Bax/Bcl-2 ratio ($P<0.05$). Compared with the NC+ H_2O_2 group, the OV+ H_2O_2 group had significantly decreased P65 protein expression in the nucleus ($P<0.05$), but significantly increased expression in the cytoplasm ($P<0.001$). Compared with the NC+ H_2O_2 group, the OV+ H_2O_2 group had significantly upregulated total I κ B α expression ($P<0.001$). **Conclusion** H_2O_2 induces apoptosis in HUVECs; NR4A1 inhibits cell apoptosis by regulating the expression of I κ B α and inhibiting the nuclear translocation of NF- κ B in HUVECs.

Key words: Orphan nuclear receptor NR4A1; Human umbilical vein endothelial cells; I κ B α protein; NF- κ B nuclear translocation; Apoptosis

截至 2021 年,我国糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者人数高达 1.4 亿,占全球报告总数的 26.2%^[1]。DM 大血管并发症包括冠心病、心肌病、心律失常、猝死等心脑血管疾病和外周动脉疾病,其中心血管疾病是 DM 患者死亡的主要原因^[2]。血管内皮功能障碍被认为是 DM 大血管并发症发展的重要因素^[3]。脉管系统的内皮细胞层提供了半透性屏障,能够调节液体、分子和细胞的交换,当受到脂质代谢、炎症、氧化应激或病理生理学干扰时,内皮细胞功能可发生障碍^[4]。

核受体亚家族 4 A 组成员 1 (nuclear receptor subfamily 4 group A member 1, NR4A1) 是一种具有组成活性和不依赖于配体的受体,参与细胞增殖、凋亡、炎症反应等多种病理生理过程^[5]。NR4A1 可增加内皮细胞一氧化氮合酶表达,下调 Claudin-5 和 VE-Cadherin 等细胞连接蛋白调节血管通透性,并减少细胞间黏附分子-1 和血管细胞黏附因子-1 的表达从而抑制细胞炎症反应,调节血管内皮细胞功能^[6]。NF- κ B 通路也参与血管内皮细胞凋亡^[7]。研究表明,NR4A1 通过多种方式调控 I κ B α /NF- κ B 通路。NR4A1 缺陷小鼠肝脏中 NF- κ B 蛋白表达增加,诱导 Cyclin B1/D1/E1、Cdk4/2 表达,导致肝切

除后的肝细胞再生被抑制^[8]。NR4A1 抑制 I κ B- α /IKK- β /NF- κ B 通路活化,阻抑破骨细胞分化^[9]。NR4A1 也可直接与 p65 结合,或负反馈调节 I κ B α 表达,抑制巨噬细胞炎症反应^[10],保护血管内皮细胞。

NR4A1 对氧化应激诱导血管内皮细胞凋亡的影响和机制尚未完全阐明。为此,本研究通过过氧化氢(H_2O_2)处理 HUVECs 建立氧化应激细胞模型,探究 NR4A1 的表达情况以及 NR4A1 是否通过调控 NF- κ B 通路干预氧化应激所致的 HUVECs 凋亡。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

实验细胞人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)为山东大学细胞生物研究所提供。

1.1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清购自上海益启生物科技有限公司,青霉素-链霉素溶液(100 \times)、胰酶细胞消化液、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5 \times)、Western 一抗稀释液、Western 二抗稀释液、免疫染色强力通透液、免疫染

色固定液、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒、一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)购自上海碧云天生物技术有限公司, H₂O₂、嘌呤霉素、Tris[三(羟甲基)氨基甲烷]、Tris-HCL、甘氨酸、SDS、Tween-20 购自北京索莱宝科技有限公司, siRNA 购自广州锐博生物技术有限公司, 免封闭 SDS-PAGE 变性丙烯酰胺彩色凝胶快速制备试剂盒购自上海玉博生物科技有限公司, 磷酸缓冲盐溶液(1×PBS)购自美国海克隆实验室公司, DMEM/Ham's F-12(1:1) medium 培养基(1×)、NR4A1 慢病毒、兔抗 NR4A1(1:500)购自生工生物工程(上海)股份有限公司, Anti-I κ B alpha 抗体(1:20 000)、Anti-I κ B alpha (phospho S36) 抗体购自艾博抗(上海)贸易有限公司, 二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司, 鼠抗 GAPDH(1:10 000)、鼠抗 β -ACTIN(1:10 000)、鼠抗 NF- κ BP65(1:1 000)、山羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体(辣根过氧化物酶标记)(1:1 000)、山羊抗兔 IgG 多克隆抗体(辣根过氧化物酶标记)(1:1 000)购自武汉三鹰生物技术有限公司, 预染蛋白质 PageRuler 购自美国赛默飞世尔科技公司。细胞培养箱购于日本松下电器产业株式会社, 超声波细胞破碎仪购于上海沪析实业有限公司, 酶标分析仪(RT6 000)购于深圳雷杜生命科学股份有限公司。实时荧光定量 PCR 仪购于苏州天隆生物科技有限公司。全自动化学发光图像分析系统购于上海天能科技有限公司。电泳仪、电泳槽、转膜槽均购于伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HUVECs 在含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素双抗溶液(100×)的 DMEM/Ham's F-12(1:1)(DF-12) medium 培养基中, 于 37.0 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 筛选敲低 NR4A1 的 HUVECs

将细胞接种至小皿中使细胞生长至次日密度达 40%~50%, 使用 NR4A1-siRNA、NC-siRNA 转染 HUVECs 6 h, 6 h 后更换为完全培养基培养。提取转染后 HUVECs 总 RNA, qPCR 检测验证转染效果。将转染 NR4A1 siRNA 的 HUVECs 标记为 si-NR4A1 细胞, 将转染 NC siRNA 的 HUVECs 标记为 si-NC 细胞。

1.2.3 筛选过表达 NR4A1 的 HUVECs 株

使用携带嘌呤霉素抗体基因的 NR4A1 过表达

慢病毒及空载病毒分别感染 HUVECs 48 h, 使用荧光显微镜观察, 待显微镜下荧光率达 70% 以上时, 更换含有 6 μ g/mL 嘌呤霉素的细胞培养基进行培养。提取感染慢病毒的细胞总蛋白质进行 Western blotting 法检测, 以获得病毒感染效果。将感染过表达 NR4A1 的 HUVECs 标记为 OV 细胞, 将感染对照病毒的 HUVECs 标记为 NC 细胞。

1.2.4 细胞分组及处理

①将 HUVECs 接种于 96 孔板, 按照 0、100、200、400 μ mol/L 浓度加入对应体积 H₂O₂ 处理 6、12、24 h。收取处理后的细胞提取细胞总蛋白质, Western blotting 法检测 NR4A1 的表达情况; ②实验细胞分为敲低对照组(si-NC)、NR4A1 敲低组(si-NR4A1), 200 μ mol/L H₂O₂ 处理 6 h 后收集细胞, 提取 mRNA 与蛋白, 行后续 PCR 与 Western blotting 检测; ③实验分为对照病毒组(NC 组)、过表达组(OV 组)和 200 μ mol/L H₂O₂ 处理 6 h 的对照病毒组(NC+H₂O₂ 组)及过表达组(OV+H₂O₂ 组)细胞。收集上述各组细胞进行后续 TUNEL 实验及 Western blotting 蛋白检测。

1.2.5 TUNEL 法观察细胞凋亡

将处理好的细胞去除培养液, 使用 PBS 洗涤 1 次, 用免疫染色固定细胞 30 min, 使用 PBS 洗涤 1~2 次, 加入免疫染色强力通透液室温孵育 5 min, 使用 PBS 洗涤 2 次, 每个 12 孔板中分别加入 50 μ L 检测液, 遮光放置于培养箱中孵育 60 min, PBS 洗涤 3 次, 每孔中加入 50 μ L 即用型 DAPI, 室温孵育 5 min, PBS 洗涤 3 次, 抗荧光淬灭液封片。使用荧光显微镜观察并拍照, 凋亡细胞标记为红色, 对凋亡细胞计数, 并计算凋亡率=视野下红色细胞个数/总细胞个数 \times 100%。

1.2.6 qPCR 法检测 mRNA 表达

充分裂解细胞后加入 RNase-free dd H₂O 溶解 RNA 沉淀, 分光光度计测量其浓度及纯度。将提取后的 RNA 配制成 20 μ L 体系后逆转录获得 cDNA、计算并配制 20 μ L PCR 反应体系: 2 \times UltraSYBR mixture (10 μ L), cDNA 模板(1~2 μ L), 引物 F、R(各 0.4 mL), 双蒸水(6.8 μ L)。扩增反应条件如下: 95 °C 30 s 变性, 95 °C 10 s 退火, 60 °C 30 s 延伸, 40 个循环, 获取各基因 CT 值。以 GAPDH 内参基因为标准, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 相对定量法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。引物序列为: NR4A1-F: CCCTGAAGTTGTTCCCCTCAC; NR4A1-R: GCC-

CTCAAGGTGTGGAGAAG; GAPDH-F: TGTGGGC-ATCAATGGATTTGG; GAPDH-R: ACACCATGTA-TCCGGGTCAAT。

1.2.7 Western blotting 法检测蛋白表达

用细胞刮板收集细胞悬液,使用移液器移至 1.5 mL 离心管中,使用适量的 RIPA 细胞裂解液,冰上裂解 30 min,在 4 ℃ 下,以 12 000 r/min 离心 15 min,将上清液转移至另一 1.5 mL 离心管中,以 BCA 法测定蛋白浓度,加入上样缓冲液,煮沸 10 min 后聚丙烯酰胺凝胶电泳和转膜,室温下 5% 脱脂奶粉封闭。将封闭结束的 PVDF 膜用 TBST 溶液洗涤 3 次,4 ℃ 一抗孵育过夜,次日二抗摇床孵育 1 h。最后使用 ECL 发光液在化学发光成像系统进行曝光成像。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析,先进行正态性检验,符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t

检验比较两独立组间均值,多个样本的比较采用单因素方差分析,Tukey 检验进行两两多重比较;对于不满足方差齐性的数据,采用非参数 Kruskal-Wallis 检验进行分析,Dunn's 检验进行两两多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 梯度浓度 H_2O_2 处理 HUVEC 细胞不同时间点细胞活性和凋亡的比较

使用不同浓度的 H_2O_2 处理 HUVECs 不同时间(6、12、24 h)。随着 H_2O_2 处理时间延长及处理浓度增加,CCK-8 结果显示 HUVECs 活性逐渐降低($P < 0.001$),TUNEL 结果显示细胞凋亡率均显著升高。在 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理细胞 6 h 时细胞凋亡率增加明显($P < 0.001$),选取该浓度作用 HUVECs 6 h 为细胞凋亡模型造模条件。见图 1。

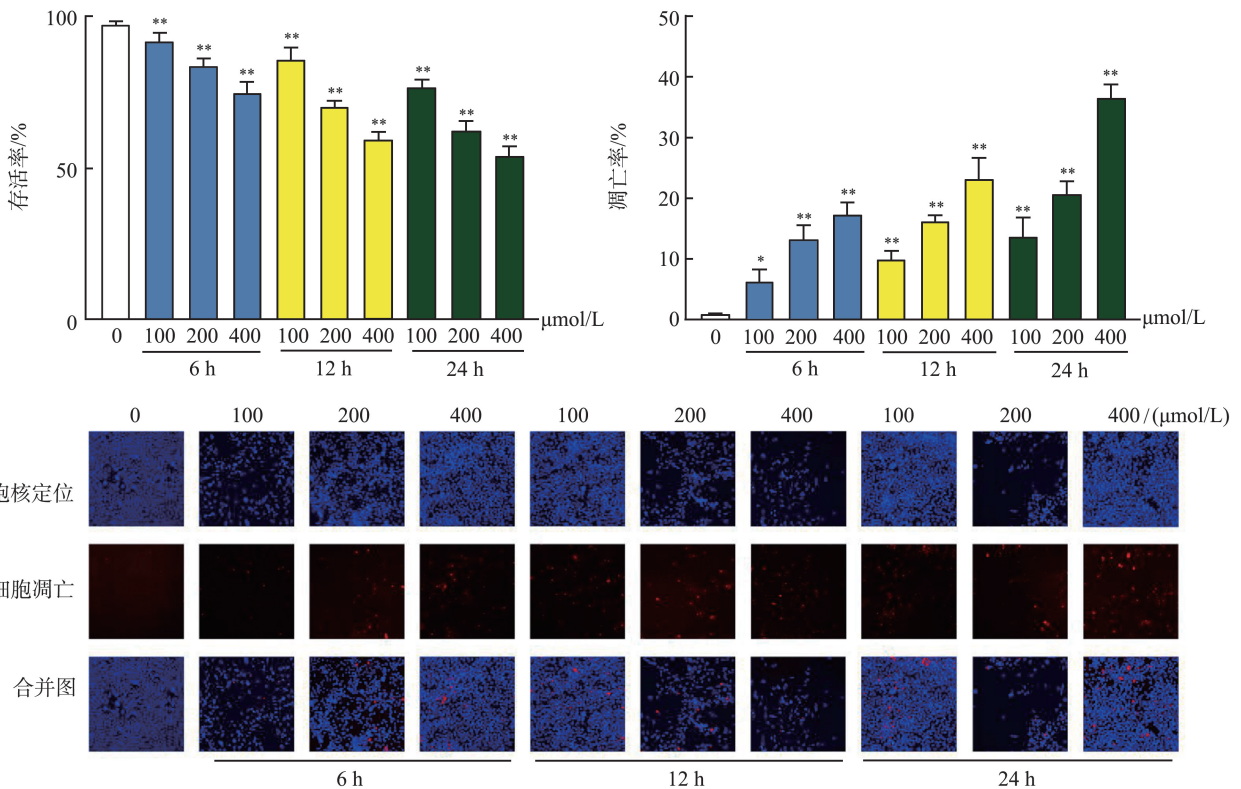


图 1 梯度浓度 H_2O_2 处理不同时间后 HUVECs 生存情况(* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ vs 第 0 h 对照组)

Figure 1 Survival of HUVECs after treatment with different concentrations of H_2O_2 for different time periods (* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ vs control group)

2.2 H_2O_2 处理 HUVECs 前后 NR4A1 蛋白相对表达量比较

与第 0 h 对照组相比,Western blotting 结果显示 H_2O_2 处理细胞 6、12 h, NR4A1 的蛋白表达水平

随 H_2O_2 浓度增加, H_2O_2 处理细胞 24 h, NR4A1 蛋白表达水平下降。在 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用细胞 6 h 时, NR4A1 表达水平显著升高($P < 0.001$)。见图 2。

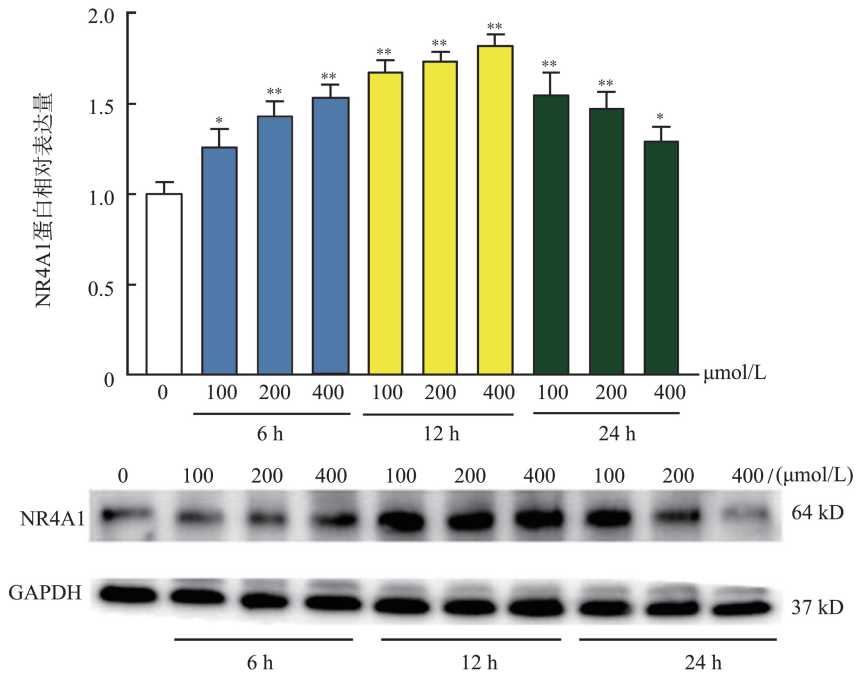


图2 加入不同浓度 H_2O_2 处理不同时间后 NR4A1 的表达水平 (* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ vs 第 0 h 对照组)

Figure 2 Protein expression of NR4A1 in HUVECs treated with different concentrations of H_2O_2 for different time periods (* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ vs 0 h control group)

2.3 下调 NR4A1 表达后 H_2O_2 诱导的各组 HUVECs 凋亡水平的比较

qPCR 结果显示,与 si-NC 组细胞相比,si-NR4A1 组细胞 NR4A1 mRNA 水平显著下调 ($P < 0.001$),见

图 3。使用 200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 H_2O_2 处理两组细胞 6 h, Western blotting 结果显示,敲低 NR4A1 后 HUVECs Bax/Bcl-2 比值较 si-NC 组显著上升 ($P < 0.001$),见图 4。

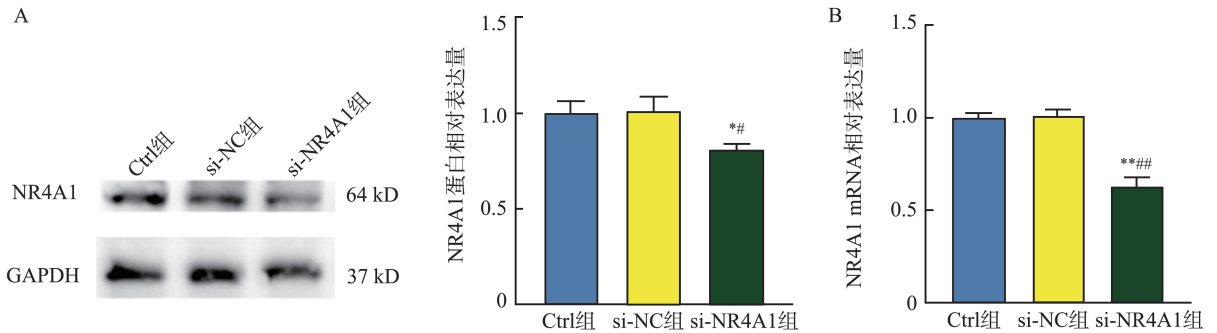


图3 转染 siRNA-NR4A1 后 HUVECs NR4A1 mRNA 及蛋白相对表达量比较

A: 转染 siRNA-NR4A1 下调 HUVECs NR4A1 蛋白表达水平; B: 转染 siRNA-NR4A1 下调 HUVECs NR4A1 mRNA 水平 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs Ctrl 组; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs si-NC 组)。

Figure 3 Comparison of relative expressions of NR4A1 mRNA and protein in HUVECs after transfection with siRNA-NR4A1

A: Downregulation of NR4A1 protein expression in HUVECs after transfection with siRNA-NR4A1; B: Downregulation of NR4A1 mRNA in HUVECs after transfection with siRNA-NR4A1 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs Ctrl group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs si-NC group).

2.4 过表达 NR4A1 后 H_2O_2 诱导的各组 HUVECs 凋亡水平的比较

与空载病毒感染对照细胞 (NC) 比较, NR4A1 慢病毒感染组细胞中 NR4A1 蛋白高表达 ($P < 0.001$), 表明过表达 NR4A1 HUVECs 筛选成功, 标记为 OV 细胞, 见图 5A; 使用 H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 分别处理 NC 组及 OV 组细胞 6 h, 与 NC 组比较,

NC+ H_2O_2 细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.001$); 与 NC+ H_2O_2 组比较, OV+ H_2O_2 组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.001$), 见图 5B。与 NC 组比较, H_2O_2 处理后, NC+ H_2O_2 细胞中 Bax/Bcl-2 比值增高 ($P < 0.001$); 与 NC+ H_2O_2 组比较, OV+ H_2O_2 组细胞 Bax/Bcl-2 比值降低 ($P < 0.001$), 见图 5C。

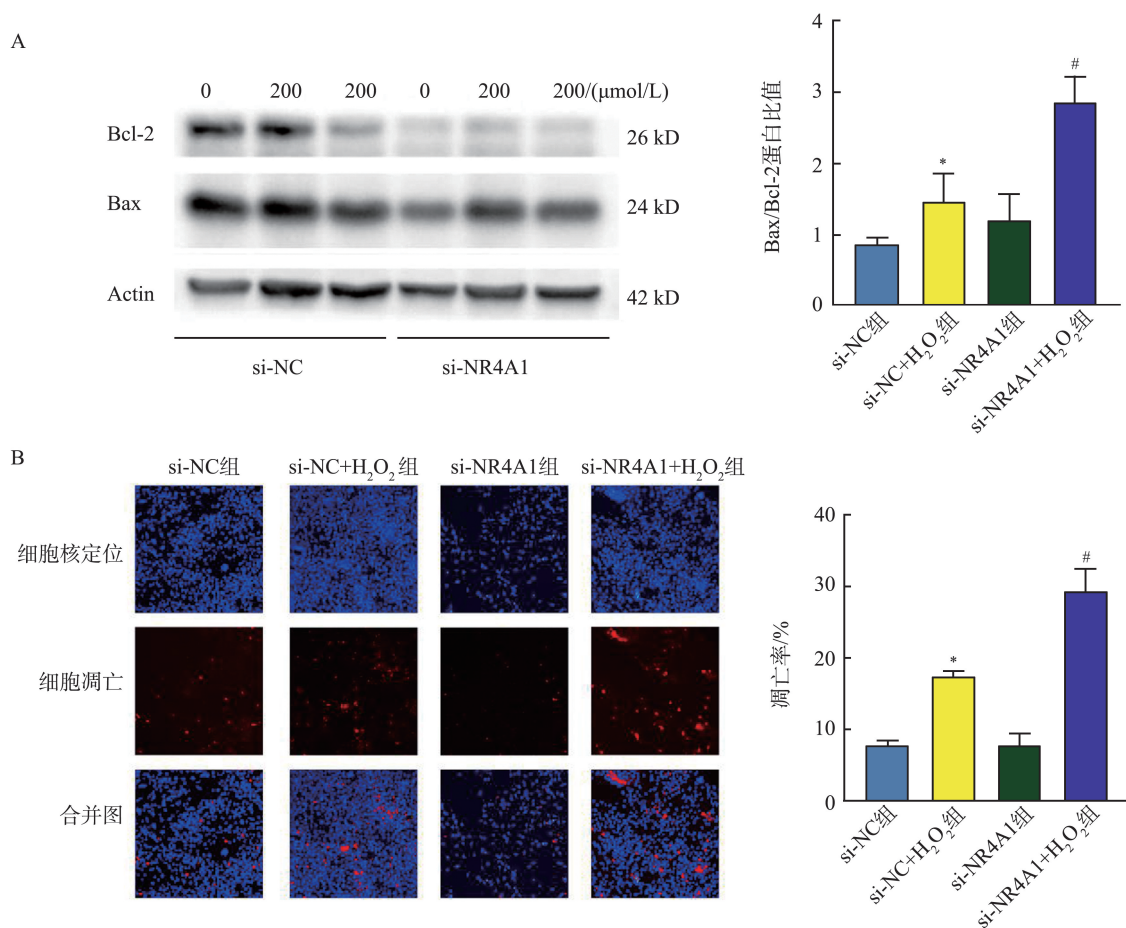
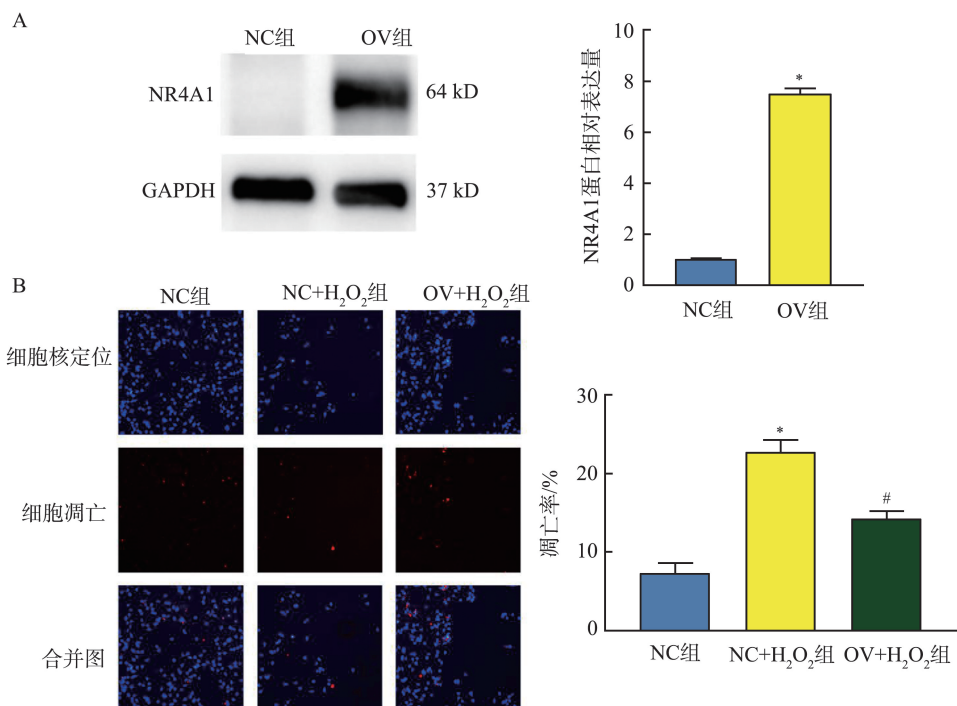


图4 敲低NR4A1增加H₂O₂处理后HUVECs凋亡

A: 敲低NR4A1上调HUVECs Bax/Bcl-2比例; B: TUNEL实验检测细胞凋亡水平(* $P < 0.001$ vs si-NC组; # $P < 0.001$ vs si-NC+H₂O₂组)。

Figure 4 Downregulating NR4A1 enhanced apoptosis of HUVECs after H₂O₂ treatment

A: Ratio of the Bax/Bcl-2 increased in si-NR4A1 cells; B: Apoptosis rate detected with TUNEL (* $P < 0.001$ vs si-NC group; # $P < 0.001$ vs si-NC+H₂O₂ group).



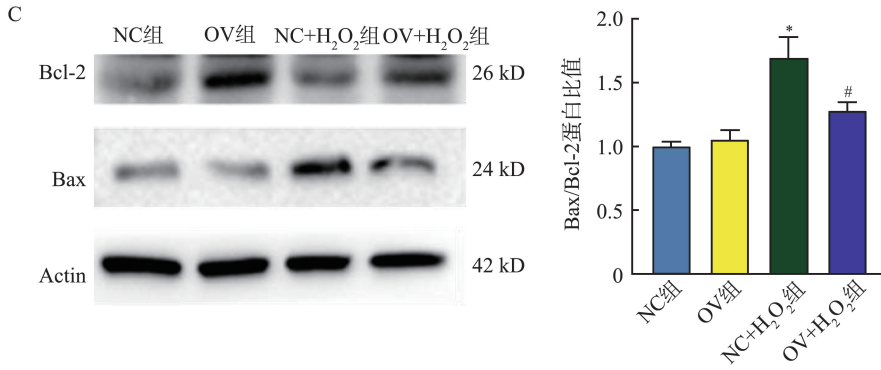


图5 过表达 NR4A1 减少 H₂O₂ 处理后 HUVECs 凋亡

A: 慢病毒感染上调 HUVECs NR4A1 蛋白表达水平; B: TUNEL 实验检测细胞凋亡水平; C: OV+H₂O₂ 组 Bax/Bcl-2 比值降低 (**P*<0.001 vs NC 组; #*P*<0.001 vs NC+H₂O₂ 组)。

Figure 5 Overexpression of NR4A1 decreased the apoptosis rate induced by H₂O₂ in HUVECs

A: The protein level of NR4A1 increased in HUVECs with lentivirus-NR4A1 infection; B: The apoptosis rate detected with TUNEL; C: The Bax/Bcl-2 ratio decreased in OV+H₂O₂ group (**P*<0.001 vs NC group; #*P*<0.001 vs NC+H₂O₂ group).

2.5 各组细胞 NF-κB 与 IκBα 蛋白相对表达量的比较

H₂O₂ 未处理的 NC 组与 OV 组比较, P65 蛋白表达差异无统计学意义 (*P*>0.05)。NC+H₂O₂ 组细胞核中 P65 蛋白表达水平较 NC 组上调 (*P*<0.05), 而细胞质中的 P65 表达水平下调 (*P*<0.05)。与

NC+H₂O₂ 组相比, OV+H₂O₂ 组细胞核中 P65 表达下调 (*P*<0.05), 在细胞质中表达上调 (*P*<0.05)。与 NC 组细胞比较, NC+H₂O₂ 组细胞总 IκBα 表达显著下调 (*P*<0.05); 与 NC+H₂O₂ 组细胞比较, OV+H₂O₂ 组细胞总 IκBα 表达显著上调 (*P*<0.05), 见图 6。

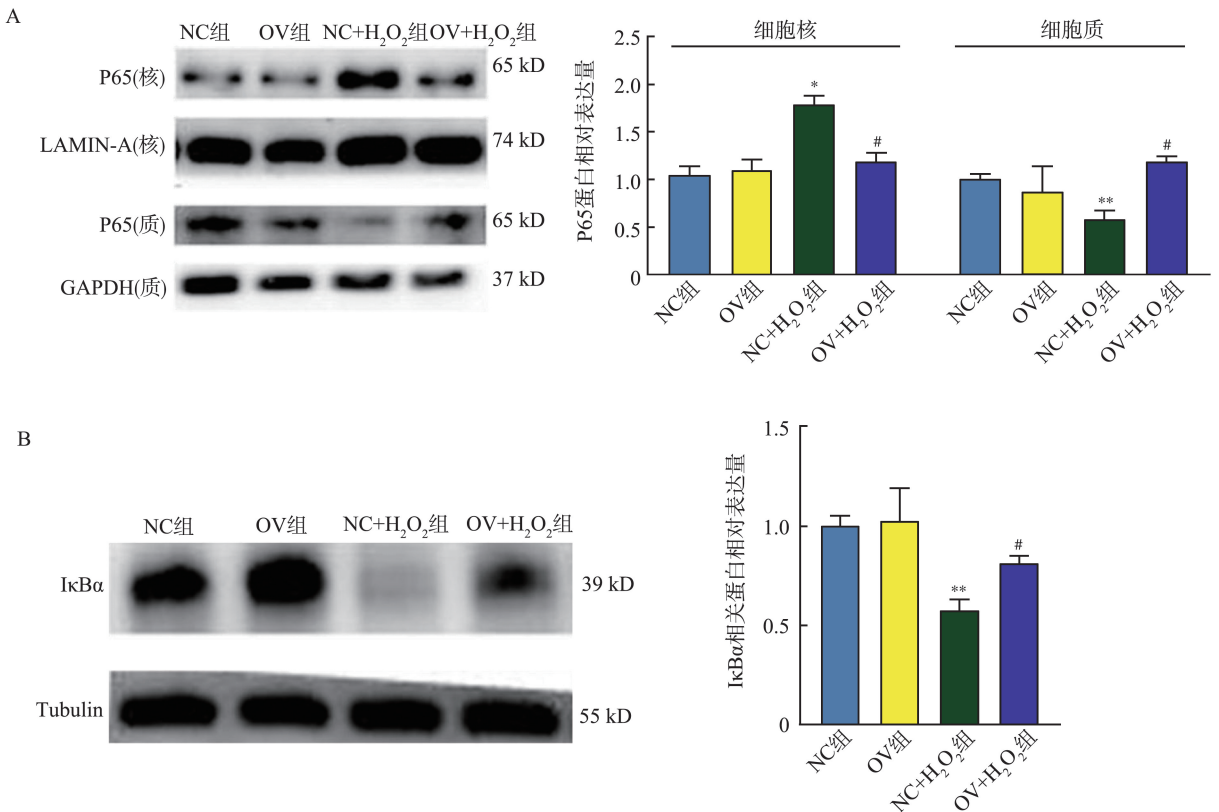


图6 NR4A1 调节 IκBα/NF-κB 通路

A: 过表达 NR4A1 抑制 NF-κB 核转位; B: 过表达 NR4A1 上调总 IκBα 表达; (**P*<0.05, ***P*<0.01 vs NC 组; #*P*<0.05 vs NC+H₂O₂ 组)。

Figure 6 NR4A1 regulated IκBα/NF-κB pathway

A: Overexpression of NR4A1 inhibited the nuclear translocation of NF-κB; B: Overexpression of NR4A1 increased the total protein level of IκBα (**P*<0.05, ***P*<0.01 vs NC group; #*P*<0.05 vs NC+H₂O₂ group).

3 讨论

血管内皮损伤是糖尿病血管病变发展的重要因素,高血糖、血脂代谢异常等因素引起的氧化应激在其中起重要作用^[11]。 H_2O_2 诱导 HUVECs 氧化应激,升高活性氧水平,上调氧化应激指标 GRP78 的蛋白表达,导致 HUVECs 存活率下降^[12]。本研究使用 H_2O_2 建立 HUVECs 氧化应激细胞模型,结果显示 H_2O_2 处理后细胞内 NR4A1 表达升高。进一步通过上/下调 NR4A1 受体表达,发现 NR4A1 通过调控总 I κ B α 的表达、NF- κ B 的核转位,抑制血管内皮细胞凋亡。

NR4A1 属于核受体 4A (NR4A) 亚家族,没有已知内源性配体,在各种组织中广泛表达,参与多种信号通路和病理生理过程,包括细胞自噬、增殖、凋亡、免疫调节、氧化应激调控等^[13-17]。当前研究表明,在不同细胞及组织中, NR4A1 对细胞生存的调控作用表现并不一致。Zheng 等^[18] 通过缺氧再灌注处理 BRL-3A 细胞模拟肝细胞缺血再灌注损伤模型,利用 LKB1 通路抑制剂 radicicol 调节 LKB4 测定 NR1A1 在肝细胞缺氧再灌注损伤中的作用,发现敲低 NR1A1 激活 LKB1/AMPK 通路,下调 Bcl-2 表达水平,上调 Bax、caspase3 及 RAPR 表达,抑制氧化应激、炎症和细胞凋亡。胰腺 β 细胞中 NR4A1 过表达可降低内质网应激诱导的 C/EBP 同源蛋白表达和 Caspase3 激活,同时 NR4A1 与 Survivin 启动子物理结合,上调抗凋亡蛋白 SURVIVIN 表达,抑制细胞凋亡^[19]。在 HUVECs 中, NR4A1 可通过减少 IRF-1 与 Caspase-1 启动子的结合,下调 Caspase-1 表达,从而抑制脂多糖诱导的炎症小体激活,保护血管内皮细胞^[20]。本实验结果表明, H_2O_2 处理后, HUVECs 活性降低、凋亡水平提高, NR4A1 蛋白表达增加,且敲低 NR4A1 后 Bax/Bcl-2 比值升高,提示 NR4A1 抑制 HUVECs 凋亡。为进一步探究 NR4A1 对 HUVECs 生存的影响,本实验使用慢病毒感染获得过表达 NR4A1 的 HUVECs (OV 组) 及空载对照细胞 (NC 组),应用 H_2O_2 分别处理。相较于 NC 组, TUNEL 试验结果表明 OV 组细胞凋亡减少, Western blotting 检测结果表明 OV 组 Bax/Bcl-2 比例下降,提示 NR4A1 抑制 H_2O_2 诱导 HUVECs 凋亡。

多项研究表明, NR4A 参与调控 NF- κ B 通路,其在调控细胞生存中发挥重要作用。NF- κ B 由属于 Rel 蛋白家族的不同亚基的同源或异源二聚体组成,包括 p65 (RelA)、RelB、c-Rel、p105/p50 (NF- κ B2) 和

p100/p52 (NF- κ B2) 等^[8-10,21-22]。在大多数静息细胞中, NF- κ B 蛋白通过与抑制蛋白 I κ B 结合在细胞质中保持无活性^[23]。Bian 等^[24] 研究发现,当 HUVECs 被 ox-LDL 诱导引发氧化应激,活性氧水平显著升高,引起脂质过氧化并导致丙二醛产生, p-I κ B α /I κ B α 比值显著升高, NF- κ B 核转位增加, NF- κ B 信号通路被激活,继而发生血管内皮凋亡。在小鼠星形胶质细胞中,使用 NR4A1 激动剂 C-DIM5 选择性诱导 NR4A1,抑制 NF- κ B 核转位,下调包括 Nos2、Ccl2、Il-6 和 TNF 在内的炎症因子表达^[21]。在造血干细胞中, NR4A1/3 通过直接转录激活 C/EBP α 驱动的抗增殖网络,同时抑制 NF- κ B 驱动的炎症信号传导,进而抑制细胞炎症反应^[22]。NF- κ B 表达受 I κ B α 调控, I κ B α 磷酸化可募集 E3 泛素连接酶 SCF/ β TRCP,从而通过 26S 蛋白酶体将 NF- κ B 二聚体标记为降解的目标, NF- κ B 被释放到细胞核中,发生 NF- κ B 介导的转录激活^[25]。本研究结果显示, H_2O_2 处理后,与对照组细胞比较, OV 组总 I κ B α 表达上调,细胞核中 P65 蛋白表达显著下调,而 P65 蛋白在细胞质中表达显著上调,提示 NR4A1 可通过抑制 NF- κ B 的核转位干预 I κ B α /NF- κ B P65 信号通路活化,从而抑制了 H_2O_2 诱导的 HUVECs 凋亡。

综上所述, NR4A1 参与调控氧化应激诱导的血管内皮细胞凋亡机制,过表达 NR4A1 可上调总 I κ B α 的表达,从而抑制 H_2O_2 诱导的 NF- κ B 的移位激活抑制 HUVECs 凋亡。

参考文献:

- [1] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119. doi: 10.1016/j.diabres.2021.109119.
- [2] Viigimaa M, Sachinidis A, Toumpourleka M, et al. Macrovascular complications of type 2 diabetes mellitus [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2020, 18(2): 110-116.
- [3] Vorotnikov AV, Khapchayev AY, Nickashin AV, et al. In vitro modeling of diabetes impact on vascular endothelium: are essentials engaged to tune metabolism? [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(12): 3181. doi: 10.3390/biomedicines10123181.
- [4] Baaten CCFMJ, Vondenhoff S, Noels H. Endothelial cell dysfunction and increased cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease [J]. *Circ Res*, 2023, 132(8): 970-992.

- [5] Wang H, Zhang M, Fang F, et al. The nuclear receptor subfamily 4 group A1 in human disease[J]. *Biochem Cell Biol*, 2023, 101(2): 148-159.
- [6] Hamers AA, Hanna RN, Nowyhed H, et al. NR4A nuclear receptors in immunity and atherosclerosis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2013, 24(5): 381-385.
- [7] Cui M, Liu J, Geng L, et al. Let-7a Targeting TNFAIP3 promotes vascular endothelial cell apoptosis of pediatric patients with henoch-schönlein purpura via NF-κB signaling pathway[J]. *J Healthc Eng*, 2022, 2022: 3889318. doi: 10.1155/2022/3889318.
- [8] Hu Y, Zhan Q, Liu HX, et al. Accelerated partial hepatectomy-induced liver cell proliferation is associated with liver injury in Nur77 knockout mice[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(12): 3272-3283.
- [9] Tian H, Chen F, Wang Y, et al. Nur77 prevents osteoporosis by inhibiting the NF-κB signalling pathway and osteoclast differentiation[J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(8): 2163-2176.
- [10] Li L, Liu Y, Chen HZ, et al. Impeding the interaction between nur77 and p38 reduces LPS-induced inflammation[J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(5): 339-346.
- [11] Jing Cao, Zhang G, Liu Z, et al. Peroxidase promotes diabetic vascular endothelial dysfunction induced by advanced glycation end products via NOX2/HOCl/Akt/eNOS pathway[J]. *Redox Biol*, 2021, 45: 102031. doi: 10.1016/j.redox.2021.102031.
- [12] 扈艳雯, 赵蕙琛, 马小莉, 等. GLP-1 通过细胞色素 P450 表氧化酶途径抑制氧化应激[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2023, 61(8): 10-16.
HU Yanwen, ZHAO Huichen, MA Xiaoli, et al. GLP-1 inhibits oxidative stress damage through cytochrome P450 surface oxidase pathway[J]. *Journal of Shandong University(Health Science)*, 2023, 61(8): 10-16.
- [13] Herring JA, Elison WS, Tessem JS. Function of Nr4a orphan nuclear receptors in proliferation, apoptosis and fuel utilization across tissues[J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1373.
- [14] Chen L, Fan F, Wu L, et al. The nuclear receptor 4A family members: mediators in human disease and auto-phagy[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2020, 25(1): 48.
- [15] Crean D, Murphy EP. Targeting NR4A nuclear receptors to control stromal cell inflammation, metabolism, angiogenesis, and tumorigenesis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 589770. doi: 10.3389/fcell.2021.589770.
- [16] Deng S, Chen B, Huo J, et al. Therapeutic potential of NR4A1 in cancer: focus on metabolism[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 972984. doi: 10.3389/fonc.2022.972984.
- [17] Bending D, Zikherman J. Nr4a nuclear receptors: markers and modulators of antigen receptor signaling[J]. *Curr Opin Immunol*, 2023, 81: 102285. doi: 10.1016/j.coi.2023.102285.
- [18] Zheng Y, Tao Y, Zhan X, et al. Nuclear receptor 4A1 (NR4A1) silencing protects hepatocyte against hypoxia-reperfusion injury in vitro by activating liver kinase B1 (LKB1)/AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 8349-8359.
- [19] Yu C, Cui S, Zong C, et al. The orphan nuclear receptor NR4A1 protects pancreatic β-Cells from endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(34): 20687-20699.
- [20] Ding R, Sun X, Yi B, et al. Nur77 Attenuates inflammasome activation by inhibiting caspase-1 expression in pulmonary vascular endothelial cells[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2021, 65(3): 288-299.
- [21] Popichak KA, Hammond SL, Moreno JA, et al. Compensatory expression of nur77 and nurr1 regulates nf-κb-dependent inflammatory signaling in astrocytes[J]. *Mol Pharmacol*, 2018, 94(4): 1174-1186.
- [22] Freire PR, Conneely OM. NR4A1 and NR4A3 restrict HSC proliferation via reciprocal regulation of C/EBPα and inflammatory signaling[J]. *Blood*, 2018, 131(10): 1081-1093.
- [23] Barnabei L, Laplantine E, Mbongo W, et al. NF-κB: at the borders of autoimmunity and inflammation[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 716469. doi: 10.3389/fimmu.2021.716469.
- [24] Bian W, Jing X, Yang Z, et al. Downregulation of LncRNA NORAD promotes Ox-LDL-induced vascular endothelial cell injury and atherosclerosis[J]. *Aging*, 2020, 12(7): 6385-6400.
- [25] Liang WJ, Yang HW, Liu HN, et al. HMGB1 upregulates NF-κB by inhibiting IκB-α and associates with diabetic retinopathy[J]. *Life Sci*, 2020, 241: 117146. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117146.

(编辑:张彩凤)