

## 维生素 E 在体内外具有抗氧化作用

仓宝成\*, 宫瑾瑾, 王 莉, 何 佩, 赖泽仁

(中国人民解放军第一五三中心医院, 河南 郑州 450042)

**摘要:**目的 探讨维生素 E 在体内外的应激损伤。方法 体外实验:人肝 RBL 细胞系根据  $H_2O_2$  损伤及损伤前后给予维生素 E 分为 4 组,对照组(C)、 $H_2O_2$  损伤组(Ec)、 $H_2O_2$  损伤前(Eb)及后(Ea)给维生素 E 组;体内实验:将 20 只清洁级雄性 Wistar 大鼠分为对照组和大及小剂量维生素 E 组,每天进行一次 35 和 15 mg/kg 溶液 2 mL 灌胃,连续 3 d。体外实验应用 MTT 和 TUNEL 法检测细胞存活率和凋亡率,免疫印迹和免疫组化方法检测细胞中 NF- $\kappa$ B、Hsp-70、Bcl-2、Bax 及 caspase-3 的表达水平;体内实验应用生化法检测 3 和 6 d 后血浆内 T-AOC、SOD、GSH 和 MDA 的水平。结果  $H_2O_2$  损伤组(Ec)细胞凋亡率增加( $P < 0.01$ ),细胞内 Bax、Hsp-70、NF- $\kappa$ B 及 caspase-3 显著升高( $P < 0.01$ ),而 Bcl-2 显著下降( $P < 0.01$ ),维生素 E 干预后能显著缓解上述变化( $P < 0.01$ ), $H_2O_2$  损伤前干预效果优于后干预。灌胃后 3 d 血浆中 T-AOC、SOD、GSH 的水平增高,MDA 降低( $P < 0.01$ ),6 d 后其相关指标变化更加显著( $P < 0.05$ )。结论 维生素 E 可通过调节人肝 RBL 细胞相关蛋白表达水平和 Wistar 大鼠血浆中抗氧化酶体系而发挥抗氧化作用。

**关键词:** 维生素 E; $H_2O_2$ ;抗氧化酶体系;抗凋亡信号传导

中图分类号:R285.5 文献标志码:A

## Vitamin E has antioxidant effect both *in vivo* and *in vitro*

CANG Bao-cheng\*, GONG Cui-cui, WANG Li, HE Pei, LAI Ze-ren

(Laboratory Center of Chinese PLA 153 Hospital, Zhengzhou 450042, China)

**Abstract: Objective** To explore the antioxidant effect of vitamin E on both in the rat *in vivo* and in hepatic RBL cells *in vitro*. **Methods** The cultured human hepatic RBL cells were exposed to  $H_2O_2$  as an oxidant and treated with 0.4 mM dose of Vitamin E before or after exposure of  $H_2O_2$ . The cell survival and apoptosis were detected by MTT and TU-NEL assays. The expression level of NF- $\kappa$ B, Bcl-2, Bax, Hsp-70 and caspase-3 was determined by immunohistochemistry and Western blot. 20 clean level male Wistar rats were divided into control group and the big and small doses of vitamins E 35 and 15 mg/kg 2 mL lavage solution, 1 time a day, a total of three times, the biochemical method was performed to detect within the plasma after 3 and 6 d T-AOC, SOD, GSH and MDA levels. **Results**  $H_2O_2$  damage group (Ec) apoptosis rate increased ( $P < 0.01$ ), intracellular Bax, HSP-70, the NF-kappa B and caspase 3 significantly higher ( $P < 0.01$ ), while the Bcl-2 decreased significantly ( $P < 0.01$ ), vitamin E after the intervention can significantly alleviate the above changes ( $P < 0.01$ ),  $H_2O_2$  damage before intervention was milder than that after intervention. Lavage after 3 d plasma T-the AOC, SOD, higher level of GSH, MDA lowered ( $P < 0.01$ ), and 6 d after the relevant index change was more significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The results

showed that the vitamin E displays anti-oxidant capacity through upregulating the antioxidant enzyme system and regulating the expression of relevant proteins.

**Key words:** vitamin E; hydrogen peroxide; anti-oxidant enzyme system; anti-apoptotic signal transduction

氧化应激包含反应氧族 ROS 和反应氮族 RNS, 两者皆可呈现双重作用, 过度氧化应激致使线粒体电子传递链 ROS/RNS 的过量积累损伤细胞的类脂和 DNA 等<sup>[1]</sup>。本课题组曾研究并证明金银花对大鼠体内外具有抗氧化作用<sup>[2]</sup>。维生素 E 在体内可保护细胞不受氧化剂的损害<sup>[3]</sup>, 在体外实验中, 能够抑制炎症反应、细胞黏附和平滑肌细胞增殖等<sup>[4]</sup>。

维生素 E 是通过细胞信号传导和基因调节发挥其生物学作用<sup>[5-7]</sup>。而近期研究又发现维生素 E 结合蛋白具有受体功能的作用。尽管有如此多的发现, 但对于维生素 E 的作用机制探讨较少<sup>[8]</sup>。对维生素 E 的分子事件进行深入研究, 有助于临床干预。本研究目的将从体内外两个方面探讨维生素 E 抗氧化应激损伤的作用效果和作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞: 人肝 RBL 细胞系(广州医科大学细胞库)。大鼠: 清洁级雄性 Wistar 大鼠, 体质量 210 ~ 250 g[北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京)2010-2011]。

1.1.2 试剂: 维生素 E 注射液(上海第九制药厂); 胎牛血清; DMEM (Sigma 公司); TUNEL 试剂盒 (Promega 公司); 单克隆抗体 (Invitrogen 公司); T-AOC、SOD、GSH、MDA 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

### 1.2 方法

1.2.1 实验细胞分组及处理: 人肝 RBL 细胞根据 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤及损伤前后给予维生素 E 分为 4 组, 对照组(C)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组(Ec)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤前(Eb)及后(Ea)给维生素 E 组, 如表 1。

1.2.2 MTT 检测: 制备 5 × 10<sup>4</sup>/mL 细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔细胞悬液加 200 μL。24 h 后分组, (每组做 5 个平行孔) 加入不同浓度的维生素 E 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液培养 24 h。每孔加 20 μL MTT, 培养 4 h。弃去上清液, 加 DMSO 200 μL/孔, 震荡器上充分震

荡溶解。在酶标仪上 490 nm 波长处读取 A 值, 取平均值。细胞存活率 = 处理组 A/对照组 A × 100%, 抑制率 = (1 - 处理组 A/对照组 A) × 100%。

表 1 人肝 RBL 细胞在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤前后给予维生素 E 的处理

Table 1 Human liver RBL cells were treatment with vitamin E in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> before and after damage

group	0.25 g/L vitamin E of culture	0.5 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> culture	0.25 g/L vitamin E of culture	10% fetal bovine serum DMEM culture
C	-	-	-	24 hours
Ec	-	0.5 hours	-	24 hours
Ea	24 hours	0.5 hours	-	-
Eb	-	0.5 hours	24 hours	-

1.2.3 TUNEL 实验: 取 4% 多聚甲醛固定后的 4 组细胞滴片, 冷风吹 4 h, 0.3% Triton X-100/PBS 透化后, 37 °C 蛋白酶 K 消化 8 min, TdT(末端脱氧核苷酸转移酶)缓冲液, 1 μL TdT 酶及 1 μL Bio-dUTP/玻片, 置于湿盒 37 °C 1.5 h。BCIP/NBT 底物显色, 甲基绿复染。阴性对照实验不加 TdT 酶。每组细胞滴片选取 10 个视野, 计数 500 个细胞, 计算阳性细胞所占百分比即各组细胞凋亡率。

1.2.4 免疫组化: 4% 多聚甲醛固定后的细胞标本, 加入 0.3% Triton X-100/PBS 透化后, 加 10% 正常的羊血清封闭, 除多余血清, 加 1:100 稀释的各种一抗置 4 °C 湿盒内孵育过夜。PBS 洗后, 加 1:200 稀释的二抗(鼠 IgG-HRP), 置 37 °C 湿盒内孵育 1.3 h, 以 DAB 显色。阴性对照实验用 PBS 代替一抗, 应用图象分析仪扫描各标本免疫印迹信号的吸光度值 A, 即各相关蛋白表达量。

1.2.5 Western blot: 应用有机溶剂萃取方法提取蛋白。制备 SDS-PAGE, 电泳条件 85 V、1.5 h。电转仪 4 °C 下转到硝酸纤维素膜上, 将硝酸纤维素膜与 1:100 稀释的各种一抗反应 2 h, 再与 1:200 稀释的二抗室温下反应 1 h。加入底物显色, 以 β-actin 为内参照, 阳性条带出现棕色后终止反应, 应用薄层层析扫描仪进行扫描。

1.2.6 动物实验:SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体质量 210~250 g,分为对照组及大和小剂量实验组,分别给予蒸馏水及 35 和 15 mg/kg 维生素 E 溶液 2 mL 灌胃 3 次,间隔 12 h。在灌胃前和后 3 及 6 d 取血,分离血浆,检测大鼠血浆中 T-AOC、SOD、MDA 和 GSH 的含量,严格按各试剂盒说明进行。

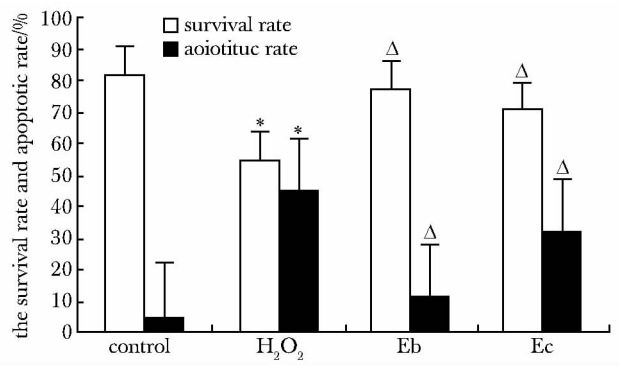
1.3 统计学分析

用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,各组数据均用均值和标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,进行单因素方差分析,对细胞的存活率和凋亡率应用 $\chi^2$ 检验。

2 结果

2.1 细胞实验结果

2.1.1 细胞存活率和凋亡率:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组较对照组存活率下降而凋亡率升高( $P < 0.01$ ),维生素 E 干预组显著减轻上述变化( $P < 0.01$ )(图 1)。



\* $P < 0.01$  compared with control;  $\Delta P < 0.01$  compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

图 1 各组人 RBL 肝细胞存活率和凋亡率  
Fig 1 The survival rate and apoptotic rate in RBL cells of each group(%,  $n = 500$ )

2.1.2 维生素 E 保护对人 RBL 肝细胞相关蛋白表达水平的影响:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组(Ec) Bax、Hsp-70、NF- $\kappa$ B 及 caspase-3 显著升高( $P < 0.01$ ),而 Bcl-2 显著下降( $P < 0.01$ ),维生素 E 干预后能显著缓解上述变化( $P < 0.01$ ),H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤前干预效果优于后干预(表 2)。

2.1.3 Western blot 检测维生素 E 对人 RBL 肝细胞相关蛋白表达水平的影响:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组较对照组, Hsp-70、NF- $\kappa$ B 和 Bax 的表达水平明显增高( $P < 0.01$ )。Eb 组/Ea 组上述指标明显降低( $P < 0.01$ )(图 2)。

表 2 各组细胞相关蛋白表达水平扫描值  
Table 2 The scanned GSM of expressions of following proteins in RBL cells of each group ( $\bar{x} \pm s$ )

group	NF- $\kappa$ B	Hsp-70	Bcl-2	Bax	caspase-3
C	174 $\pm$ 13	247 $\pm$ 20	45 $\pm$ 3	50 $\pm$ 8	21 $\pm$ 1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	291 $\pm$ 25 *	350 $\pm$ 27 *	19 $\pm$ 1 *	113 $\pm$ 11 *	57 $\pm$ 4 *
Eb	192 $\pm$ 13	271 $\pm$ 23 #	42 $\pm$ 2 #	27 $\pm$ 3 #	22 $\pm$ 2 #
Ea	243 $\pm$ 20	337 $\pm$ 26	35 $\pm$ 3	42 $\pm$ 7	29 $\pm$ 7

\* $P < 0.01$  compared with control; # $P < 0.01$  compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

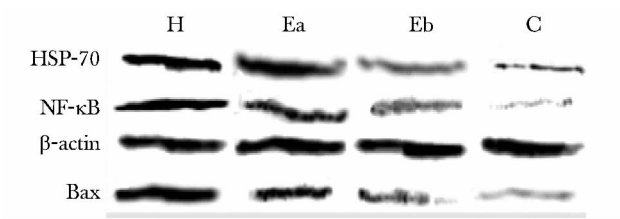


图 2 Western blot 检测各实验组相关蛋白表达水平  
Fig 2 The expression of protine in RBL cells of each group by Western blot

2.2 Wistar 大鼠维生素灌胃前及后血浆中抗氧化酶体系水平的变化

灌胃后 3 d 血浆中 T-AOC、SOD、GSH 的水平增高,MDA 降低( $P < 0.01$ ),6 d 后其相关指标变化更加显著( $P < 0.05$ ),结果见表 3。

表 3 维生素 E 灌胃不同时间后大鼠血浆中抗氧化酶体系水平的变动  
Table 3 The alteration of anti-oxidative enzyme system in the rat plasma after irri-gating with vitamin E in different times

group	T-AOC	SOD	GSH	MDA
control A3d	20 $\pm$ 4	196 $\pm$ 19	185 $\pm$ 16	83 $\pm$ 9
control a3d	18 $\pm$ 2	187 $\pm$ 11	188 $\pm$ 18	90 $\pm$ 8
control A6d	19 $\pm$ 3	189 $\pm$ 18	183 $\pm$ 17	85 $\pm$ 8
control a6d	17 $\pm$ 2	180 $\pm$ 12	195 $\pm$ 19	83 $\pm$ 7
test A3d	41 $\pm$ 5 *	251 $\pm$ 23 *	377 $\pm$ 43 *	66 $\pm$ 10 *
test a3d	43 $\pm$ 7 *	218 $\pm$ 12 *	245 $\pm$ 18 *	68 $\pm$ 8 *
test A6d	45 $\pm$ 4 **	386 $\pm$ 33 **	425 $\pm$ 53 **	61 $\pm$ 15 **
test a6d	51 $\pm$ 8 **	245 $\pm$ 19 **	298 $\pm$ 22 **	57 $\pm$ 5 **
test B	21 $\pm$ 3	199 $\pm$ 21	185 $\pm$ 16	88 $\pm$ 11

control A3d and control A6d respectively in the control group after the big dose lavage 3 d and 6 d test results, the control a3d and control a6d respectively control small dose lavage after 3 d and 6 d test results; as same the experimental group; the test B shows the results before filling the stomach; \* $P < 0.01$  compared with control; \*\* $P < 0.01$  compared with 3 days.

### 3 讨论

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为氧化损伤剂<sup>[10]</sup>可诱导细胞产生大量的 ROS,而 ROS 不仅能生成第二信使,其本身也可作为第二信使发挥作用<sup>[11]</sup>。细胞内的氧化还原状态,能直接或间接的影响 NF- $\kappa$ B 的转录和基因的表达<sup>[12]</sup>。维生素 E 可以通过 ROS-NF- $\kappa$ B 途径抑制血管平滑肌细胞氧化应激反应,降低 ROS 和 NF- $\kappa$ B 的表达水平<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组相比,维生素 E 可明显减低 NF- $\kappa$ B 的表达水平。

维生素 E 可下调 Hsp-70 的表达水平,起到氧化应激的保护作用<sup>[14]</sup>。维生素 E 还可通过下调 Bcl-2 和 caspase-3,上调 Bax 的表达水平,抑制小鼠细胞的凋亡。NF- $\kappa$ B 通过激活热休克因子-1 诱导 HSPs 的表达,而高表达的 Hsp-70 又与 NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B 结合形成复合物,抑制 NF- $\kappa$ B 的核转位,降低 NF- $\kappa$ B 的活性。本课题研究结果表明,维生素 E 具有明显的抗凋亡能力,且前保护组的抗凋亡能力优于后保护组。维生素 E 在抗氧化应激中,下调 NF- $\kappa$ B、Hsp-70、Bcl-2 和 caspase-3 的表达,上调 Bax 的表达,提示维生素 E 可能通过阻抑 NF- $\kappa$ B 信号传导途径,抑

制 Hsp-70 的合成,提高 Bcl-2/Bax 比率,阻抑 caspase 级联反应,抑制细胞凋亡,而呈现抗氧化的保护作用。

机体抗氧化防御体系主要包括 SOD 和 GSH 等,而 MDA 水平的高低可反映体内氧自由基的平衡状态。本研究动物实验结果显示,与灌前实验组相比,维生素 E 灌胃后 3、6 d 血浆中 SOD 和总抗氧化能力均显著增加,MDA 含量却明显降低,并存在用量和时间的依赖性,提示维生素 E 是通过上调体内抗氧化酶体系来提高抗氧化能力。

ROS 含量的增加可导致细胞的损伤,其作用可被体内的抗氧化防御酶体系所抑制<sup>[15]</sup>。化学损伤剂诱导肝细胞凋亡的机制与细胞因子含量的增加或氧化应激反应程度的增加有相关性<sup>[22]</sup>。大量的 ROS 可导致 LPO 的生成,而 LPO 是造成肝细胞损伤和肝纤维化的主要因素。维生素 E 可抑制 ROS 的产生,对氧化应激造成的肝细胞损伤具有一定的保护作用。本研究通过观察不同检测指标在体内外实验中的变化,从而探讨维生素 E 抗氧化作用机制和维生素 E 的抗氧化效果。

### 参考文献:

- [1] Vakko M, Leibfreitz D, Moncol J, *et al.* Free radicles and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. *Int J Biochem Cell Biology*, 2007, 39: 49-84.
- [2] 宫瑾瑾, 郑乃刚, 吴景兰, 等. 金银花对大鼠体内和体外 RBL 细胞的抗氧化保护作用及其机制 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2009, 35: 1074-1078.
- [3] Sebastian S, Muller WE, Eckert GP. Tocotrienols: constitutional effects in aging and disease [J]. *J Nutr*, 2005, 135: 151-154.
- [4] Rimbach G, Minihane AM, Majewicz J, *et al.* Regulation of cell signalling by vitamin E [J]. *Proc Nutr Soc*, 2002, 61: 415-425.
- [5] Azzi A, Gysin R, Kempná P, *et al.* Regulation of gene expression by alpha-tocopherol [J]. *Biol Chem*, 2004, 385: 585-591.
- [6] Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. The 80th anniversary of vitamin E: beyond its antioxidant properties [J]. *Biol Chem*, 2002, Mar-Apr; 383: 457-465.
- [7] Zingg JM, Azzi A. Non-antioxidant activities of vitamin E [J]. *Curr Med Chem*, 2004, 11: 1113-1133.
- [8] Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E: protective role of a Janus molecule [J]. *FASEB J*, 2001, 15: 2314-2325.
- [9] 宫瑾瑾, 郑玉霞, 郑乃刚, 等. 金银花在体内抗氧化作用的实验研究 [J]. *实用医药杂志*, 2006, 23: 584-585.
- [10] Niwa k, Inanami O, Yamamori T, *et al.* Redox regulation of PI3K/Akt and P53 in bovine aortic endothelial cells exposed to hydrogen peroxide [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2003, 5: 713-722.
- [11] Kondo T, Hirose M, Kageyama K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis [J]. *Atheroscler Thromb*, 2009, 16: 532-538.
- [12] Kabe Y, Ando K, Hirao S, *et al.* Redox regulation of Nf-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus [J]. *Antioxid Redox Signal*,

2005,7: 395-403.

- [13] Ye SF, Wu YH, Hou ZQ, *et al.* ROS and NF-kappaB are involved in upregulation of IL-8 in A549 cells exposed to multi-walled carbon nanotubes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379: 643-648.

- [14] Yoon BK, Kang YH, Oh WJ, *et al.* Impact of lysophosphatidylcholine on the plasminogen activator system in cul-

tured vascular smooth muscle cells[J]. *Korean Med Sci*, 2012, 27: 803-810.

- [15] Ozacmak VH, Barut F, Ozacmak HS. Melatonin provides neuroprotection by reducing oxidative stress and HSP70 expression during chronic cerebral hypoperfusion in ovariectomized rats[J]. *Pineal Res*, 2009, 22: 576-579.

## 新闻点击

### 年轻时晒伤增加罹患黑色素瘤风险

据美国 WebMD 医学新闻网(2014-06-15)报道,最新研究结果指出,有 5 次以上晒伤起泡的 15~20 岁白人女性,患黑色素瘤的风险增加 80%;黑色素瘤是最致命的皮肤癌。

研究人员也发现这些女性患基底细胞癌与鳞状细胞癌这两种皮肤癌的几率高了 68%。

根据布朗大学与罗得岛医院的皮肤科主任 Abrar Qureshi 教授表示,他们的结果显示,年轻时与成人时期晒太阳可以预测非黑色素瘤皮肤癌;但黑色素瘤的风险主要是与年轻时晒太阳有关。

Qureshi 教授在美国癌症研究的新闻稿中表示,需要建议父母们多注意孩子在年轻时晒太阳的保护措施,以降低长大后罹患黑色素瘤的可能性。年长者晒太阳时也应该注意,因为累积下来的接触阳光量也会增加皮肤癌风险。

### Pap vs HPV 检查:做检查总比不做好

据美国 WebMD 医学新闻网(2014-06-26)报道,麻州波士顿大学医学院 Rebecca B. Perkins 医生和 Elizabeth A. Stier 医生在线发表于 6 月 10 日《内科学档案》的文章写道,单独使用 HPV 筛检检查子宫颈癌是否优于用抹片检查(Pap),或者单独使用 Pap 检查?答案是这 3 种方式都适用。

他们认为,虽然各项筛检的相对好处还需要进一步讨论,仍不能忽略子宫颈癌大多发生在那些未曾做过任何筛检的妇女。要强调的是,应致力于增加筛检率,以减少子宫颈癌,不论使用哪种检查方法。

他们的研究结论显示,单独使用 HPV 检查至少等同于单独使用 Pap 检查,对于 30 岁以上妇女每三年检查一次。较年轻妇女的初次 HPV 检查会有较高比率的假阳性。它被核准用于 25 岁以上妇女,以及短暂 HPV 感染但未引起子宫颈病变的 30 岁以下妇女。并指出,对于降低子宫颈癌比率,增加任何一种检测的覆盖率和增加 HPV 疫苗的覆盖率,比选择哪种检查方式更重要。

### 7 h 是睡眠最佳时长

据英国《BBC 新闻》(BBC NEWS)2014-07-29 报道,对于健康的成年人而言,究竟需要睡多少小时才够?专家们普遍建议 7~9 h。但数个睡眠研究发现,当涉及到一定的认知能力和健康指标时,7 h 睡眠比长期认为的 8 h 对人体更有益。

最新的研究表明,晚上睡眠即使少了 20 min,也能降低第二天的工作表现和记忆力。但太多的睡眠也牵连到一些健康问题,包括糖尿病、肥胖、心血管疾病和较高的病死率等。

“最低的病死率和发病率是 7 h 睡眠,”美国亚利桑那州凤凰城立大学的一个护理和健康学院杨斯特德(Shawn Youngstedt)教授说:“8 h 或更长时间一直被证明是危险的。”

加州大学圣地亚哥分校精神病学的荣誉教授克里普克(Daniel F. Kripke)在 6 年期间跟踪了一份参与大型癌症研究的 110 万人的资料。他在报告中说,睡眠 6.5 至 7.4 h 的人比那些有更短或更长的睡眠的人有更低的病死率。这项研究在 2002 年发表在《普通精神病学文献》(*the Archives of General Psychiatry*)。