

[文章编号] 1007-3949(2004)12-01-0011-04

•实验研究•

舒心胶囊对缺氧诱导人脐静脉内皮细胞凋亡 及相关基因表达的影响

刘 强, 黄兆铨, 叶 武, 陈申杰

(浙江省中医院心内科, 浙江省杭州市 310006)

[关键词] 中药学; 舒心胶囊对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响; 细胞培养; 内皮细胞; 流式细胞仪; 基因表达; 舒心胶囊

[摘要] 观察舒心胶囊对缺氧诱导人脐静脉内皮细胞凋亡及相关基因表达的影响。体外培养人脐静脉内皮细胞, 建立缺氧模型, 以透射电子显微镜技术、流式细胞术(膜联蛋白 v/碘化丙啶)双染色鉴定细胞凋亡; 流式细胞术检测 Fas、bcl-2 及 p53 蛋白表达。缺氧培养 12 h 后, 电镜显示细胞呈典型凋亡形态, 双染色流式细胞仪检测凋亡细胞比例(13.03% ± 0.96%)显著高于正常组(4.47% ± 0.64%) ($P < 0.01$), 而加入 5 g/L 舒心胶囊原液缺氧培养 12 h 后, 凋亡细胞显著减少(5.03% ± 0.54%) ($P < 0.01$)。Fas 蛋白表达在缺氧损伤过程中未见改变, 舒心胶囊可使 bcl-2 蛋白表达升高, p53 蛋白表达降低。舒心胶囊能够抑制缺氧诱导人脐静脉内皮细胞凋亡, 可能与其升高 bcl-2 表达、降低 p53 表达有关。

[中图分类号] R28

[文献标识码] A

Effect of Shuxin Capsule on Apoptosis Induced by Hypoxia and Apoptosis-related Genes Expression in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells

LIU Qiang, HUANG ZhaoQuan, YE Wu, and CHEN ShenJie

(Department of Cardiology, Zhejiang Traditional Chinese Medicine Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310006, China)

[KEY WORDS] Endothelial Cell; Flow Cytometry; Genes Expression; Shuxin Capsule; Cell Culture; Hypoxia

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of Shuxin capsule on apoptosis induced by hypoxia and apoptosis-related genes expression in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** HUVECs were cultured and hypoxic models were established. The presence of apoptosis was detected by electron microscope and flow cytometry assessment of Annexin v/PI stain. The protein levels of Fas, bcl-2 and p53 were examined by flow cytometry. **Results** After cultured 12 h in hypoxic condition, apoptosis of HUVECs was identified with electron microscope and showed by flow cytometry. Apoptosis rate in hypoxia group (13.03% ± 0.96%) was significantly higher than that in control group (4.47% ± 0.64%) ($P < 0.01$), and after treated with 5 g/L Shuxin capsule liquid for 12 h in hypoxic condition, apoptosis rate decreased clearly (5.03% ± 0.54%) ($P < 0.01$). Furthermore, it was revealed by flow cytometry that the apoptosis process was associated with upregulation of p53 expression and downregulation of bcl-2 expression, but not with the marked change of Fas expression. Shuxin capsule could make expression of p53 down-regulated and expression of bcl-2 up-regulated. **Conclusion** Shuxin capsule can inhibit the apoptosis of HUVECs induced by hypoxia, which is associated with its effects on expression of bcl-2 and p53.

血管内皮细胞功能异常是冠状动脉粥样硬化的重要环节, 有研究提示内皮细胞功能异常可能参与急性冠状动脉综合征的发病过程^[1]。因此国内外学者都在积极探索和研究保护内皮细胞免受损伤的药物。舒心胶囊是我院治疗冠心病的多年验方, 临床疗效确切, 其功用重在益气养阴、活血通痹, 由黄

芪、麦冬、丹参、郁金等药物组成。本研究通过观察舒心胶囊对缺氧诱导内皮细胞凋亡及相关基因表达的影响, 尝试探讨其改善内皮细胞功能的部分机制。

1 材料与方法

1.1 人脐静脉内皮细胞的培养及实验分组

人脐静脉内皮细胞株 ECV304(中国预防医学科学院提供), 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(GIBCO 公司)培养, 第 3~5 代用于实验, 接种于 24 孔培养板(1×10^5 /孔), 换用无血清 DMEM 液培养 12 h 使细胞同步化。然后进行分组处理: ①正常组: 继续用无血清 DMEM 液培养 12 h; ②舒心胶囊组: 用含

[收稿日期] 2003-01-16 [修回日期] 2003-12-12

[基金项目] 浙江省卫生厅项目(98B017)资助

[作者简介] 刘强, 博士, 讲师, 主治医师, 研究方向为冠心病与病毒性心脏病的发病机制和治疗; E-mail 为 liuqiang925@msn.com。黄兆铨, 教授, 主任医师, 研究方向为冠心病与病毒性心脏病的发病机制和治疗, 以及心血管疾病的介入治疗。叶武, 副教授, 副主任医师, 研究方向为冠心病、高血压及心律失常的发病机制和治疗。

5 g/L 舒心胶囊原液(由浙江中医学院制剂研究中心提供,用水煎醇提法制备,每毫升含生药 1 g)的无血清 DMEM 液继续培养 12 h; 缺氧组:于缺氧装置中用无血清 DMEM 液继续培养 12 h; 缺氧+ 舒心胶囊组:于缺氧装置中用含 5 g/L 舒心胶囊原液的无血清 DMEM 液继续培养 12 h(缺氧装置参照文献[2],持续通入 95% N₂、5% CO₂ 的混合气体,多次抽气进行分析,氧分压< 1.0 kPa),培养温度为 37℃。

1.2 透射电镜观察

弃去上清液,用无钙镁 Hank 液洗涤,加 0.08% 胰蛋白酶(华美公司)消化,离心,收集细胞。用 2.5% 戊二醛及 1% 四氧化锇固定,乙醇脱水,包埋,超薄切片,染色,透射电镜下观察。

1.3 膜联蛋白 V/碘化丙啶标记染色检测早期凋亡细胞

实验条件下置 5% CO₂ 培养箱 37℃ 孵育,收获细胞,调整细胞数为 1×10^6 /L。用冷 PBS 洗 1 遍后置 0℃ 水浴中,加 490 μL 结合缓冲液,轻轻混匀细胞后加 5 μL FITC-Annexin V 和 5 μL PI(Annexin V 和 PI 试剂均系 Immunotech 公司产品)(Annexin V:膜联蛋白 V;PI:碘化丙啶)。10 min 后上流式细胞仪(EPICS-XL 型,Beckman Coulter 公司产品)检测。细胞经膜联蛋白 V/碘化丙啶双染色后上机检测,可被

区分为不同的细胞:右上象限为碘化丙啶和膜联蛋白 v 均阳性的凋亡晚期及死细胞;左上象限为碘化丙啶阳性、膜联蛋白 v 阴性的机械损伤细胞;左下象限为碘化丙啶和膜联蛋白 v 均阴性的活细胞;右下象限为碘化丙啶阴性、膜联蛋白 v 阳性的凋亡细胞。

1.4 p53、bcl-2 和 Fas 蛋白的检测

p53、bcl-2 和 Fas 单抗均购自 Immunotech 公司,克隆号分别为 PAB240、83-8B 和 PAB240;具体检测参照试剂盒说明书,采用流式细胞仪检测。

1.5 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理采用方差分析, $P < 0.05$ 表示统计学差异有显著性。

2 结果

2.1 透射电镜观察

正常组及舒心胶囊组细胞形态正常,细胞核形态规则,核仁清晰。缺氧组细胞则呈现凋亡典型形态,细胞体积缩小,胞膜完整,细胞核形态不规则,核仁消失,核染色质浓聚,胞浆浓缩,部分细胞质中有大小不一、数量不等的空泡形成,并可见凋亡小体。缺氧+ 舒心胶囊组细胞形态接近正常细胞(图 1, Figure 1)。

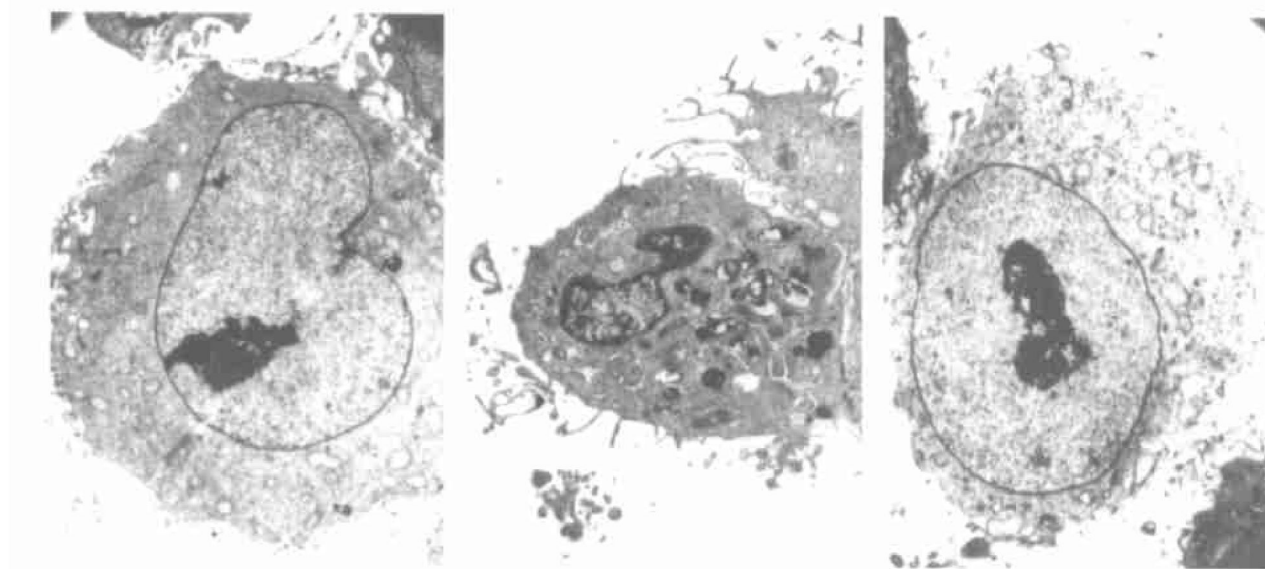


图 1. 人脐静脉内皮细胞超微结构 ($\times 4000$) A 为正常组及舒心胶囊组; B 为缺氧组; C 为缺氧+ 舒心胶囊组。

Figure 1. Apoptosis of HUVECs detected by electron microscope

2.2 膜联蛋白 V/碘化丙啶染色和 Fas、bcl-2 和 p53 蛋白检测

缺氧培养 12 h 后,缺氧组凋亡细胞比例显著高于正常组($P < 0.01$);而加入 5 g/L 舒心胶囊原液缺氧培养 12 h 后,凋亡细胞明显减少,与缺氧组相比

有显著性差异($P < 0.01$),与正常组相比无显著性差异($P > 0.05$);舒心胶囊组与正常组相比亦无显著性差异($P > 0.05$)(表 1 和图 2, Table 1 and Figure 2)。

与正常组相比,缺氧组 bcl-2 蛋白表达显著降低

($P < 0.01$), p53 蛋白表达则显著升高($P < 0.01$); 而与缺氧组相比, 缺氧+ 舒心胶囊组 bcl-2 蛋白表达明显升高, p53 蛋白表达明显降低, 均有显著性差异($P < 0.01$); 但与正常组相比, 缺氧+ 舒心胶囊组

bcl-2 蛋白表达无显著性差异($P > 0.05$), p53 蛋白表达仍存在显著性差异($P < 0.01$); 舒心胶囊组与正常组相比无显著性差异($P > 0.05$); Fas 表达各组间均无显著性差异($P > 0.05$)。

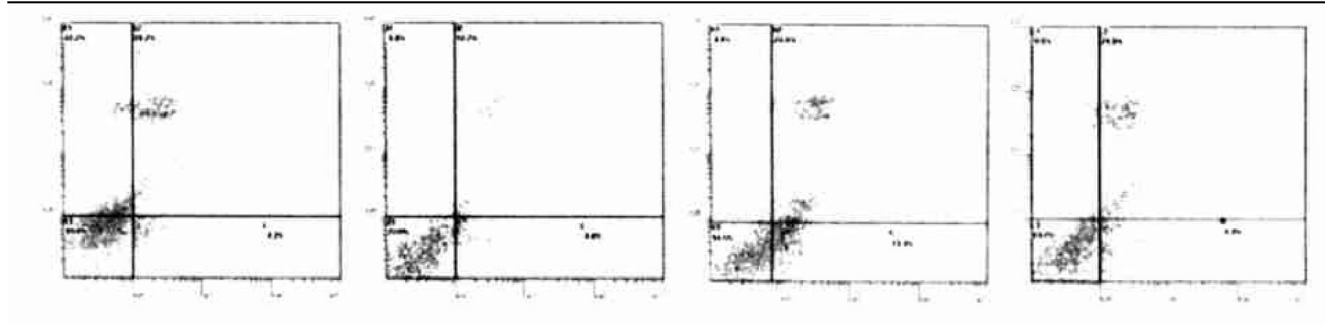


图 2. 流式细胞仪膜联蛋白 v/ 碘化丙啶双染色检测细胞凋亡 A: 正常组; B: 舒心胶囊组; C: 缺氧组; D: 缺氧+ 舒心胶囊组。

Figure 2. Apoptosis detected with assessment of Annexin v/ PI stain by flow cytometry

表 1. 舒心胶囊对缺氧诱导人脐静脉内皮细胞凋亡及 bcl-2、p53 及 Fas 蛋白表达的影响

Table 1. Effect of Shuxin capsule on apoptosis induced by hypoxia and apoptosis related genes expression in HUVECs ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

分 组	膜联蛋白 v/ 碘化丙啶染色	Bcl-2	P53	Fas
正常组	4.47 ± 0.64 ^a	11.61 ± 1.92 ^a	24.8 ± 3.10 ^a	40.18 ± 1.82
舒心胶囊组	4.51 ± 0.70 ^a	12.33 ± 2.3 ^a	25.33 ± 3.85 ^a	41.64 ± 2.87
缺氧组	13.03 ± 0.96	4.38 ± 0.84	60.74 ± 8.23	40.68 ± 4.79
缺氧+ 舒心胶囊组	5.03 ± 0.54 ^a	10.6 ± 1.42 ^a	33.6 ± 4.78 ^{ab}	42.33 ± 3.77

a: $P < 0.01$, 与缺氧组比较; b: $P < 0.01$, 与正常组比较。

3 讨论

血管内皮细胞功能异常贯穿了动脉粥样硬化发生、发展的各个阶段, 同时也是动脉粥样斑块破裂、血栓形成的促发因素之一。当内皮细胞受损时, 内皮细胞的调节功能出现异常, 从而影响血管紧张度、血管炎性改变、粥样斑块稳定性及血栓形成^[3]。内皮细胞过度凋亡是引起内皮功能障碍的一个重要因素, 而缺氧能够加速内皮细胞凋亡, 从而加重内皮功能的失调^[4], 因此对缺氧内皮细胞的保护将阻止内皮功能的进一步恶化。

近年来多项研究表明, 复方及单味中药从抗氧化、抗血栓及调节血管活性物质和细胞因子的分泌等方面改善血管内皮细胞功能, 从而发挥抗动脉粥样硬化作用^[5,6]。本文通过透射电镜和流式细胞仪膜联蛋白 v/ 碘化丙啶双染色检测, 观察人脐静脉内皮细胞处于缺氧缺血状态的病理生理变化及舒心胶囊的干预作用, 尝试探讨舒心胶囊的内皮细胞保护机制。结果发现: 与缺氧组相比, 舒心胶囊能够显著降低缺氧致内皮细胞凋亡的比例($P < 0.01$), 与正常组相比无显著性差异($P > 0.05$)。提示对于缺氧

诱导内皮细胞凋亡, 舒心胶囊具有明显的保护作用。

凋亡是一种基因控制的细胞自主性的死亡形式, 多种基因及其表达产物与细胞凋亡过程有着密切关系。Fas、bcl-2 及 p53 是近年来研究较多的几种凋亡调控基因, Fas、p53 能够促进细胞凋亡, 而 bcl-2 则能抑制细胞凋亡。Rosse 等^[7]认为其机制可能是 bcl-2 与凋亡促进基因 Bax 拮抗, 抑制细胞色素 C 自线粒体释放入胞质, 阻止其对 caspase 蛋白酶的激活; Scaffidi 等^[8]进一步研究提示, bcl-2 可能只抑制依赖于线粒体的凋亡途径; Tanaka 等^[9]证实, bcl-2 过度表达能够维持正常线粒体内膜跨膜电位, 从而抑制细胞凋亡。另外, 有研究提示 p53 在调节 bcl-2 依赖的细胞凋亡途径中发挥重要作用, Miyashita 等^[10]发现, p53 能激活 Bax 基因的表达, 从而促进细胞凋亡。本文结果提示, bcl-2 与 p53 在因缺氧而致人脐静脉内皮细胞凋亡过程中发挥重要调节作用, 而 Fas 蛋白表达在此过程中未见明显变化; 舒心胶囊通过促进 bcl-2 表达和降低 p53 表达, 从而抑制内皮细胞因缺氧损伤而过度凋亡, 这对在缺氧环境中更好地保持内皮完整性, 发挥内皮细胞维持血管稳

态和防止血栓形成作用方面有重要意义。舒心胶囊抑制内皮细胞过度凋亡可能是其改善血管内皮功能的机制之一。

[参考文献]

- [1] Huggins GS, Pasternak PC, Alpert NM, Fischman AJ, Gewirtz H. Effects of short-term treatment of hyperlipidemia on coronary vasodilator function and myocardial perfusion in regions having substantial impairment of baseline dilator reserve. *Circulation*, 1998, **98**: 1 291-296
- [2] 谢 崧, 钱桂生, 杨晓静. 一种用于研究的经济实用缺氧小容器. 第三军医大学学报, 1998, **20**: 92
- [3] De Meyer GR, Herman AG. Vascular endothelial dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis*, 1997, **39**: 325-334
- [4] Kitazono M, Takebayashi Y, Ishitsuka K, Takao S, Tani A, Furukawa T, et al. Prevention of hypoxia-induced apoptosis by the angiogenic factor thymidine phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **253**: 797-804
- [5] 李亚俊, 宋剑南, 周瑕菁, 牛晓红, 王宇辉, 金 红, 等. 脂泰胶囊对实验性动脉粥样硬化家兔内皮素及一氧化氮合酶基因表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7**: 4-8
- [6] 陈志勇, 翁 进, 李福刚, 汪 钟. 7643 对人血小板功能及血管内皮细胞抗凝作用的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1994, **2**: 137-139
- [7] Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 1998, **391**: 496-499
- [8] Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*, 1998, **17**: 1 675-687
- [9] Tanaka S, Saito K, Reed JC. Structure function analysis of the bcl-2 oncoprotein: Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the bcl-2 data protein restores function as a regulation of cell survival. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 10 920-926
- [10] Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 1994, **9**: 1 799-805

(此文编辑 曾学清, 胡必利)

•读者•作者•编者•

我刊对学术研究论文英文摘要的写作要求

国家标准 GB7713-87 规定:“为了国际交流,科学技术报告、学位论文和学术论文应附有外文(多用英文)摘要。”遵照这一规定,我刊从创刊号起,就十分注重英文摘要。1997 年第 5 卷第 1 期起将概括式英文摘要改为四项结构式英文摘要后,给作者带来了写作上的方便,作者们认真撰写出了一些质量较高的英文摘要。然而,我刊的英文摘要距参与国际交流的目的还有一定差距,主要体现在以下几个方面:第一、英文摘要的要素虽全,但繁简失当;部分摘要方法写得详细,而结果简单;第二、有的英文摘要整篇只有五六个句子,二三十个单词,信息量有限;第三、部分英文摘要出现文法错误;如此等等。

英文摘要存在上述问题,说明质量有待提高。而提高质量需要编辑和作者共同努力,其中作者是关键。最近,中国科协学会学术部下发了关于进一步提高期刊学术论文英文摘要写作质量的通知。遵照通知精神,结合我刊实际,现就英文摘要的写作提出以下几点要求,请广大作者参照执行。

一、英文摘要应用符合英文语法的文字语言、以提供文献内容梗概为目的、不加评论和补充解释、简明扼要地论述文献重要内容的短文,写作时必须符合“拥有与论文等量的主要信息”的原则。我刊的英文摘要(ABSTRACT)应按照目的(Aim)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusions)四项要素来写,重点是结果(Results)和结论(Conclusions)。在有些情况下,英文摘要可包括研究工作的主要对象和范围,以及具有情报价值的其它信息。

二、英文摘要的句型力求简单,少用从句。写作时建议多用第三人称和被动语态,少用我(I)或我们(We)。描述结果时少用或不用显示(to display),多用被发现(be discovered)。一篇标准的英文摘要一般应有 10 个以上意义完整、语句通顺的句子。即目的(Aim)有 1~2 个句子,方法(Methods)有 2 个以上句子,结果(Results)有 6 个以上句子,结论(Conclusions)有 2 个以上句子。

三、英文摘要不应有引言中出现的内容,也不要对论文内容作诠释和评论,目的(Aim)不得简单重复题名中已有的信息;结果(Results)的叙述应详细,除了不能使用插图和表格外,论文结果中的所有信息都应得到表述,尤其是结果数据。应注意不用非公知公用的符号和术语,不用引文。对于缩写词、略语和代号,除了相邻专业的读者也能清楚理解(如 ATP、RNA、DNA 等)外,在首次出现时必须写出全文。还应采用国际标准计量单位,正确使用语言文字和标点符号。

四、英文摘要要是写给非汉语人群看的,因此,写作时既要注意英文语法,又要符合英文的语言习惯;还要注意多义词在科技英语与文学中的用法差别。

以上是我刊对研究论文的英文摘要的写作要求,供广大作者在撰写研究论文英文摘要时参考。由于我刊对汉英两种文字的摘要采取了不同的格式,因此,我刊不要求汉英文摘要一致。