

## 金粉蕨素抑制氧化应激诱导的血管内皮细胞凋亡

唐勤慧, 朱炳阳, 廖端芳, 严鹏科, 雷小勇

(南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

**[关键词]** 药理学; 金粉蕨素抑制内皮细胞凋亡; 流式细胞术; 金粉蕨素; 氧化应激; 内皮细胞; 天冬氨酸凋亡蛋白酶 3

**[摘要]** 研究金粉蕨素对氧化应激诱导的血管内皮细胞凋亡的影响及可能机制。用过氧化氢损伤人脐静脉内皮细胞株 ECV304, 制备内皮细胞凋亡模型。应用四甲基偶氮唑盐还原法观察细胞活性; 流式细胞术和 Tunel 法检测细胞凋亡率; 用 Western blot 检测细胞天冬氨酸凋亡蛋白酶 3 活性。结果发现, 金粉蕨素(0.3、1 和 3  $\mu\text{mol/L}$ )呈浓度依赖性增加内皮细胞活性, 显著降低细胞凋亡率(15.5%  $\pm$  1.2%、12.6%  $\pm$  0.9%、8.2%  $\pm$  0.8% 比 22.7%  $\pm$  3.9%,  $P < 0.05$ ); 同时金粉蕨素(3  $\mu\text{mol/L}$ )抑制过氧化氢诱导天冬氨酸凋亡蛋白酶 3 的活化, 与阳性对照药金雀异黄酮作用强度相似。结果提示, 金粉蕨素拮抗氧化应激诱导的血管内皮细胞凋亡可能与抑制天冬氨酸凋亡蛋白酶 3 活化有关。

**[中图分类号]** R96

**[文献标识码]** A

### Protective Effect of Onychin on Apoptosis of Vascular Endothelial Cells Induced by Oxidative Stress

TUO Qin-Hui, ZHU Bing-Yang, LIAO Duan-Fang, YAN Peng-Ke, and LEI Xiao-Yong

(The Institute of Pharmacy Pharmacology, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

**[KEY WORDS]** Onychin; Oxidative Stress; Endothelial cell; Caspase-3; Apoptosis; Hydrogen Peroxide

**[ABSTRACT]** **Aim** To study the protective effect of onychin against vascular endothelial cell apoptosis induced by oxidative stress. **Methods** Cultured human umbilical vein endothelial cells (ECV304) were incubated for 30 min with either vehicle (DMSO), genistein or onychin before being challenged with  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cell viability were measured by the MTT assay, and cell apoptosis was determined by flow cytometric analysis and terminal deoxynucleotidyl transfersas-mediated dUTP nick end-labeling (Tunel) respectively. Meanwhile, Western blot was used to measure the activation of caspase-3. **Results**  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment for 24 h evoked endothelium apoptosis, and onychin (0.3, 1 and 3  $\mu\text{mol/L}$ ) decreased the rate of apoptotic endothelial cells (15.5%  $\pm$  1.2%, 12.6%  $\pm$  0.9% and 8.2%  $\pm$  0.8% vs 22.7%  $\pm$  3.9%) in a concentration-dependent manner. Meanwhile, Onychin decreased the expression of active caspase-3 induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  as genistein. **Conclusion** onychin prevents  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced endothelium apoptosis which correlated with inhibition of caspase-3 activation.

血管内皮细胞功能受损是动脉粥样硬化触发的早期事件, 而受损的内皮细胞发生细胞凋亡是细胞功能受损的重要原因之一<sup>[1]</sup>。在动脉粥样硬化斑块部位也存在凋亡的内皮细胞, 凋亡内皮细胞脱落后促进血栓形成, 最终引起管腔再狭窄<sup>[2,3]</sup>。因此, 拮抗各种病理因素刺激引起的内皮细胞凋亡是防治动脉粥样硬化和再狭窄的又一热门靶点。

金粉蕨素 (Onychin, Ony) 是一种新型二氢黄酮甙类单体化合物<sup>[4]</sup>, 与植物雌激素中羟基异黄酮的化学结构类似。在离体血管环实验中观察到, 金粉

蕨素对溶血性磷脂酰胆碱损伤的内皮依赖性舒张功能有保护作用<sup>[5]</sup>, 并且能够拮抗体外培养的内皮细胞氧化应激损伤<sup>[6]</sup>, 提示金粉蕨素有内皮细胞保护作用。而金粉蕨素的细胞保护效应是否与拮抗内皮细胞凋亡有关, 尚未见文献报道。本研究将进一步验证金粉蕨素对内皮细胞凋亡的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 药品与试剂

人脐静脉内皮细胞株 ECV304 购自武汉大学细胞馆藏中心; 过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、金雀异黄酮、二甲基亚砜 (DMSO) 和四甲基偶氮唑盐 (MTT) 均购自 Sigma 公司; DMEM 培养基为 GIBCO 产品; 新生牛血清 (杭州四季清产品); 鼠抗人天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (又称为天冬氨酸凋亡蛋白酶 3, caspase-3)

[收稿日期] 2003-09-10 [修回日期] 2004-02-01

[基金项目] 卫生部基金 (981345)、湖南省中医药科研基金 (2000006) 和湖南省教委基金 (98B100) 资助

[作者简介] 唐勤慧, 中南大学博士研究生, E-mail 为 qhtuo@scnu.com; 廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 本文通讯作者, E-mail 为 dliao@hotmail.com; 朱炳阳, 高级实验师。

(Santa Cruz Biotechnology); BCA 蛋白含量测定试剂、Western blot 荧光检测试剂盒(Hyclone-Pierce 公司); Tunel 试剂盒(博士德公司); 金粉蕨素为本实验室提取并鉴定(纯度 > 98%), 溶于二甲基亚砜(DMSO), 终浓度 < 0.01%。

### 1.2 细胞培养及处理

用含有 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基, 同时加入 100 u/L 链霉素和 100 u/L 青霉素, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养细胞。实验分组: 空白对照组弃原培养基并重新加入含 1% 新生牛血清的 DMEM 培养基继续培养, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞凋亡组在含 1% 新生牛血清的 DMEM 培养液中加入 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 24 h, 金粉蕨素组在加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 前 30 min 分别加入不同浓度金粉蕨素(0.1、0.3、1、3 和 10 μmol/L), 溶媒对照组在含 1% 新生牛血清的 DMEM 培养液中加入 0.01% DMSO, 阳性药物对照组在加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 前 30 min 加入 100 μmol/L 金雀异黄酮。

### 1.3 四甲基偶氮唑盐还原实验

细胞以 2 × 10<sup>5</sup> 个/孔铺种于 96 孔板, 待汇合后按以上分组处理, 24 h 后弃原培养基, 各孔加入含 MTT(终浓度 0.5 mg/L) 和 1% 新生牛血清的 DMEM 培养基, 培养 4 h 后, 弃培养基, 加入 100 μL DMSO 原液, 37℃ 培养 10 min, 待结晶完全溶解后, 用酶联免疫仪于 570 nm 波长处测定吸光度(A); 并根据吸光度计算细胞存活率, 细胞存活率 = 给药组吸光度 ÷ 空白组吸光度 × 100%。

### 1.4 流式细胞术测定细胞凋亡

按分组处理细胞后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 收集悬浮和贴壁细胞, 1 000 g 离心 5 min。弃上清, PBS 垂直再离心, 1 000 g/min 离心 5 min, 弃上清, 用 50 μL PBS 将细胞吹打成单细胞悬液, 加入 75% 乙醇 4℃ 固定 24 h。用 PBS 洗细胞 2 次, 加碘化吡啶(PI) 荧光染料于 4℃ 冰箱中放置 45 min, 300 目尼龙网滤过, 流式细胞仪检测分析细胞凋亡率, 寻找金粉蕨素最佳保护浓度组。

### 1.5 Tunel 法检测细胞凋亡

收集细胞, PBS 洗 2 次, 离心收集细胞团, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 用纱布包裹, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片。脱蜡后按 Tunel 试剂盒说明书操作: 样品加蛋白酶 K 处理 5 min, PBS 洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定 5 min。取 TdT 及 Biotin-HdUTP 各 1 μL, 加 8 μL 标记缓冲液混匀后, 加入样品, 37℃ 反应 60 min。2 × SSC 浸泡 15 min, PBS 洗后加 Avidin-HRP, 在 37℃ 湿盒中反应 60 min。PBS 漂洗, DAB 显色, 苏木素复染, 常规封片镜检。细胞核中有棕黄色颗粒者为阳

性细胞, 即凋亡细胞, 在高倍(×400)视野下每张切片计数 5 个视野, 每个视野中计数 100 个细胞中阳性细胞的百分率, 每组观察 3 张切片。

### 1.6 Western blot 测定蛋白的表达

收集不同条件处理的血管内皮细胞(金粉蕨素组采用最佳保护浓度孵育细胞), 用三去污剂裂解缓冲液裂解细胞, 4 000 g 离心 15 min, 收集上清, BCA 试剂测定蛋白含量, 1 × SDS(十二烷基硫酸钠)凝胶加样缓冲液调蛋白浓度使各组一致, 经 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后将蛋白电转移至 PVDF 膜上, TBST 缓冲液(20 mmol/L Tris base、pH7.6, 50 mmol/L NaCl, 0.1% Tween)配制的 5% 脱脂牛奶室温封闭 1.5 ~ 2 h, 一抗 4℃ 过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜, 发光剂孵育, 显影。用 Labworks 图像分析系统对 Western blot 结果进行灰度扫描, 以对照组无活性 caspase-3 和有活性 caspase-3 的面积灰度值分别为 1.0 和 0, 与实验组进行比较和半定量分析。

### 1.7 统计学处理

所有实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异性比较采用单因素方差分析, 由 SPSS11.0 统计软件完成。

## 2 结果

### 2.1 四甲基偶氮唑盐还原法检测内皮细胞活性

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 24 h 的内皮细胞活性明显下降; 不同浓度的金粉蕨素与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共同孵育内皮细胞, 呈浓度依赖性的增加内皮细胞活性, 3 和 10 μmol/L 金粉蕨素保护细胞作用显著, 其作用强度与对照药物金雀异黄酮相似, 而溶媒对照组 DMSO 没有任何保护效应(表 1, Table 1)。

表 1. 金粉蕨素对内皮细胞增殖活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n = 4)

Table 1. The effect of onychin on endothelial cells viability

分组	细胞存活率
空白对照组	100.0% ± 2.1%
过氧化氢处理组	23.3% ± 2.1% <sup>a</sup>
金粉蕨素 0.1 μmol/L	26.4% ± 5.2%
0.3 μmol/L	48.7% ± 7.2% <sup>b</sup>
1.0 μmol/L	61.5% ± 5.8% <sup>b</sup>
3.0 μmol/L	69.3% ± 3.4% <sup>b</sup>
10 μmol/L	68.1% ± 3.6% <sup>b</sup>
金雀异黄酮	70.2% ± 10.3% <sup>b</sup>
溶媒对照组	30.1% ± 7.1%

a: P < 0.05, 与空白对照组比较; b: P < 0.01, 与过氧化氢处理组比较。

2.2 流式细胞术检测内皮细胞凋亡

1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与内皮细胞孵育 24 h 后,明显诱导细胞凋亡( $P < 0.01$ ),0.3、1.0 和 3.0 μmol/L 金粉藤素呈浓度依赖性降低细胞凋亡率。3 μmol/L 金粉藤素保护强度与金雀异黄酮相似,而溶媒对照组没有任何保护效应(表 2, Table 2)。

2.3 TUNEL 法检测内皮细胞凋亡

正常细胞核呈蓝色,而 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 24 h 后部分细胞核呈棕褐色,镜下凋亡细胞计数增多( $P < 0.01$ ),金粉藤素呈浓度依赖性地抑制细胞凋亡(图 1 和表 2, Figure 1 and Table 2)。

表 2. 金粉藤素对过氧化氢诱导内皮细胞凋亡的影响

Table 2. Effect of onychin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced apoptosis of endothelial cells ( $\bar{x} \pm s, n = 2$ )

分 组	流式细胞术检测 细胞凋亡率	TUNEL 检测 细胞凋亡率
空白对照组	2.2% ± 0.4%	6.6% ± 1.5%
过氧化氢处理组	22.7% ± 3.9% <sup>a</sup>	25.5% ± 2.1% <sup>a</sup>
金粉藤素 0.3 μmol/L	17.5% ± 1.2% <sup>b</sup>	17.5% ± 1.2% <sup>b</sup>
1 μmol/L	12.6% ± 0.9% <sup>b</sup>	15.6% ± 1.5% <sup>b</sup>
3 μmol/L	8.2% ± 0.8% <sup>b</sup>	11.5% ± 1.5% <sup>b</sup>
金雀异黄酮	8.3% ± 0.4% <sup>b</sup>	10.5% ± 0.7% <sup>b</sup>
溶媒对照组	21.0% ± 0.7%	23.3% ± 4.2%

a:  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较; b:  $P < 0.01$ , 与过氧化氢处理组比较。

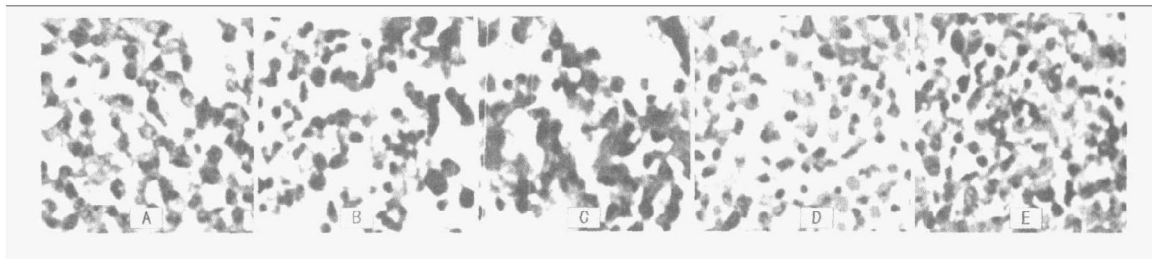


图 1. TUNEL 法检测细胞凋亡 (×400) A 为空白对照组; B 为过氧化氢处理组; C 为溶媒对照组; D 为金粉藤素组; E 为金雀异黄酮组。  
Figure 1. Representative morphological changes of apoptotic EC determined by TUNEL staining

2.4 金粉藤素对天冬氨酸凋亡蛋白酶 3 活性影响

经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理细胞后,酶原形式的 caspase-3(32 kD)表达信号非常弱,17 kD 的断裂带非常清晰。金粉藤素(3 μmol/L)抑制 caspase-3 活化,断裂带信号较弱,而没有活性的 caspase-3 酶原表达增多,与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较有显著性差异(图 2 和表 3, Figure 2 and Table 3)。

表 3. 金粉藤素对天冬氨酸凋亡蛋白酶 3 活性的影响

Table 3. Effect of onychin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced expression of caspase-3

分 组	Caspase-3 酶原 相对吸光度	Caspase-3 相对吸光度
空白对照组	1	0
过氧化氢处理组	0.01 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.21 <sup>a</sup>
3 μmol/L 金粉藤素	0.68 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.32 ± 0.11 <sup>b</sup>
金雀异黄酮	0.88 ± 0.23 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.07 <sup>b</sup>
溶媒对照组	0.11 ± 0.01	0.78 ± 0.13

a:  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较; b:  $P < 0.01$ , 与过氧化氢处理组比较。

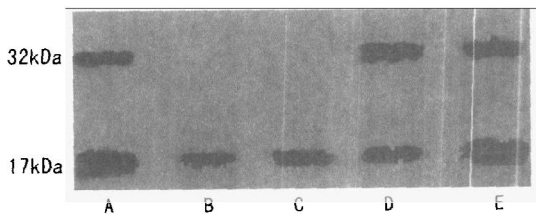


图 2. Western blot 检测天冬氨酸凋亡蛋白酶 3 活性 A 为空白对照组; B 过氧化氢处理组; C 为溶媒对照组; D 为金粉藤素组; E 为金雀异黄酮组。

Figure 2. Effect of onychin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced expression of caspase-3 by Western blot

3 讨论

异黄酮类植物雌激素如金雀异黄酮、daidzein 等可显著降低脂质过氧化物的形成,保护血管内皮细胞,使其不被氧化破坏,有抗动脉粥样硬化损伤的作用<sup>[7,8]</sup>,药效与雌二醇相当,且没有明显的毒副作用。本研究以异黄酮类植物雌激素的代表药金雀异黄酮为阳性对照,在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的内皮细胞凋亡模型上,

采用 MTT 法、流式细胞术、Tunel 法检测了金粉蕨素对内皮细胞凋亡的影响。结果发现,金粉蕨素呈浓度依赖性地增加内皮细胞活性,降低内皮细胞凋亡率。Tunel 法显示  $H_2O_2$  处理的细胞呈棕褐色深染,而金粉蕨素组阳性细胞显著减少,镜下凋亡细胞计数与流式细胞计数相似,且金粉蕨素作用强度与金雀异黄酮相仿,说明金粉蕨素可以拮抗  $H_2O_2$  诱导的内皮细胞凋亡。

$H_2O_2$  作为氧化应激源处理细胞诱导内皮细胞凋亡,启动的信号通路非常复杂。因为  $H_2O_2$  既是体内氧化代谢的中间产物,也可以代谢产生活性氧和羟自由基,这些物质都可以通过不同的信号通路启动细胞凋亡途径<sup>[9]</sup>,所以  $H_2O_2$  诱导细胞凋亡既可通过激活相应的蛋白激酶<sup>[10]</sup>,也可通过线粒体、细胞色素 C 途径。 $H_2O_2$  可以渗入细胞膜内,直接破坏线粒体,促进细胞色素 C 的释放,激活 caspase 级联<sup>[11,12]</sup>。caspase 是天门冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶超家族,平时以活性很低的酶原形式合成,通过蛋白水解酶水解去除氨基端的一段序列而被激活<sup>[13]</sup>。caspase-3 是其中的一个重要成员,活化后使特异性底物如 DFF<sup>[14]</sup> 裂解,切断目标细胞与周围细胞的联系,细胞骨架改变,DNA 复制和修复能力降低,最终使细胞解体形成凋亡小体。本实验中采用 Western blot 观察到无活性的 caspase-3 酶原 (procaspase-3) 在未经处理的内皮细胞中表达最强, $H_2O_2$  处理组因 caspase-3 活化而 caspase-3 酶原表达很少,有活性的 caspase-3 断裂带清晰可见。金粉蕨素孵育组 caspase-3 酶原表达比较多,断裂带很弱,提示金粉蕨素通过抑制  $H_2O_2$  对 caspase-3 的活化而保护内皮细胞。

本研究结果表明,金粉蕨素保护氧化应激诱导

的血管内皮细胞凋亡与抑制 caspase-3 活性有关。

#### 【参考文献】

- [1] Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis. *Eur Cytokine Netw*, 1998, 9: 697-698
- [2] Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Leseche G, Tedgui A. Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 2000, 101: 2 450-453
- [3] Chey JC, Granville DJ, Hunt DW, McManus BM. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33 (9): 1 673-690
- [4] 许云龙, 郑兴, 何以能. 栗柄金粉蕨素黄酮成分. *云南植物研究*, 1999, 3: 497-504
- [5] 庾勤慧, 廖端芳, 黄红林. 金粉蕨素对溶血性磷脂酰胆碱损伤血管内皮依赖性舒张功能的保护作用及机制. *中国动脉硬化杂志*, 2001, 9 (1): 27-30
- [6] 庾勤慧, 廖端芳, 朱炳阳. 金粉蕨素拮抗血管内皮细胞氧化应激损伤及机制. *中国临床药理学和治疗学杂志*, 2003, 8 (4): 381-384
- [7] Kapiotis S, Hermann M, Held I. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17 (11): 2 868-874
- [8] Sonjen D, Knoll E, Kohen F, Stern N. Effects of phytoestrogens on DNA synthesis and creatine kinase activity in vascular cells. *Am J Hypertens*, 2001, 14 (12): 1 256-262
- [9] Zhuang S, Denuis JT, Kochevar IE. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 2000, 275 (34): 25 939-948
- [10] Asada S, Fukuda K, Nishisaka F, Matsukawa M, Hamanisi C. Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes; involvement of calcium ion and extracellular signal-regulated protein kinase. *Inflamm Res*, 2001, 50 (1): 19-23
- [11] Kajiwara K, Ikeda K, Kuroi R, Hashimoto R, Tokumaru S, Kojo S. Hydrogen peroxide and hydroxyl radical involvement in the activation of caspase-3 in chemically induced apoptosis of HL-60 cells. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58 (3): 485-491
- [12] Takeyama N, Miki S, Hirakawa A. Role of the mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 2002, 274 (1): 16-24
- [13] Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 2000, 256: 27-33
- [14] Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 1997, 89 (2): 175-184

(此文编辑 文玉珊)