

[文章编号] 1007-3949(2010)18-05-0351-04

• 实验研究 •

## 乔松素对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

李 伟, 李东娟, 杨 艳

(山东省泰山医学院, 山东省泰安市 271000)

[关键词] 乔松素; 人脐静脉内皮细胞; 凋亡; 脂多糖

**[摘要]** 目的 探讨蜂胶乔松素对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响。方法 用消化灌注法收集人脐静脉内皮细胞进行体外原代培养,于培养液中给予 10 mg/L 脂多糖处理以建立细胞凋亡模型,乔松素处理组于模型条件培养液中分别加入不同浓度的乔松素 (50、100和 200 mg/L)干预,共同孵育 24 h。光镜下观察细胞形态,MTT法测定细胞存活率以观察细胞增殖变化,缺口末端标记技术 TUNEL法检测细胞凋亡率,免疫细胞化学法检测信号转导系统核因子 KB 亚基 p65核易位变化。结果 模型组内皮细胞凋亡率明显高于阴性对照组,不同浓度乔松素组细胞凋亡率均低于模型组,同时细胞存活率增高 ( $P < 0.01$ )。加入不同浓度乔松素能显著降低脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞核因子 KB p65核易位活性 ( $P < 0.01$ )。结论 乔松素可通过抑制脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡而保护内皮细胞功能,其机制可能与抑制核因子 KB p65活化有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

### Effect of Pinocembrin on Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Lipopolysaccharide

LI Wei, LI Dong-Juan, and YANG Yan

(Taishan Medical College, Taian, Shandong 271000, China)

[KEY WORDS] Pinocembrin, Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Apoptosis, Lipopolysaccharide

**[ABSTRACT]** **Aim** To investigate the effect of pinocembrin on apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** HUVEC were collected by digestion-perfusion culture

An apoptotic model of HUVEC was established by 10 mg/L LPS. The apoptosis of HUVEC induced by LPS was mixed with culture medium of 50 mg/L, 100 mg/L and 200 mg/L pinocembrin after treatment of 24 hours. HUVEC apoptotic rate was detected by TUNEL assay. Cell morphology was observed by light microscope. Cell survival rate was measured by MTT assay. Expression of nuclear factor- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65) was detected by immunocytochemistry staining.

**Results** HUVEC apoptotic rate of model group increased obviously than control group and different dosage pinocembrin group decreased significantly than model group ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, cell survival rate was increased after pinocembrin treatment. Expression of NF- $\kappa$ B p65 in LPS induced HUVEC was reduced significantly after pinocembrin treatment compared with those induced apoptosis group by LPS ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Pinocembrin may inhibit the apoptosis of HUVEC. The protection mechanism of pinocembrin on HUVEC may be related to reducing the activity of NF- $\kappa$ B.

Thereby it plays a role in protecting the vascular endothelial cells.

血管内皮细胞的损伤及功能改变是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发生的初始环节<sup>[1]</sup>。黄酮类化合物是蜂胶中一类非常重要的生理活性物质,具有多种医疗保健作用,其消炎、抗肿瘤、提高机体免疫力和抗病毒等疗效已得到证实<sup>[2-3]</sup>。近几年一些流行病学调查证实,摄入富含类黄酮物质食物的量,与 As 的发生率和死亡率呈负相关<sup>[4-5]</sup>,其中蜂胶黄

酮具有广泛的抗 As 功能<sup>[6]</sup>。乔松素是蜂胶黄酮类化合物中含量较高的一种,约为 1.7% ~ 2.8%。本实验采用人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 体外培养,将乔松素作用于脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 HUVEC,观察其对脂多糖诱导 HUVEC 凋亡的影响,探讨乔松素对血管内皮细胞可能的保护作用。

[收稿日期] 2010-04-20 [修回日期] 2010-05-16

[基金项目] 山东省自然科学基金 (Y2008C86)

[作者简介] 李伟,教授,硕士研究生导师,主要研究方向为动脉粥样硬化发病机制。通讯作者李东娟,硕士,讲师,主要研究方向为动脉粥样硬化发病机制,Email为 lidongjuan\_001@163.com。杨艳,硕士研究生,主要研究方向为动脉粥样硬化发病机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物与试剂

乔松素系本院实验室分离纯化 (经高效液相色谱仪检测质量分数 > 98%), I 型胶原酶、胰酶和

DMEM + F12培养基购自美国 GIBCO 公司; 脂多糖 (来源于 *Escherichia coli* serotype O55 B5) 和 MTT 购自美国 Sigma 公司; PAA Gold A11-649 胎牛血清购自澳大利亚 PAA 实验室; DHank's 液由实验室配制。缺口末端标记试剂盒 (TUNEL)、核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 一抗、SABC 免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.2 人脐静脉内皮细胞的培养和鉴定

取出生 1 h 内新生儿脐带用 0.1% 胶原酶灌注消化脐静脉内皮, 以 20% 胎牛血清的 DMEM + F12 培养, 汇合生长至 80% ~ 90% 即行传代。倒置显微镜下, 细胞呈典型的铺路石状镶嵌排列。第 11 因子相关抗原间接免疫荧光法鉴定呈阳性。第 2~3 代细胞用于实验。

### 1.3 形态学观察和分组

按  $1 \times 10^8$  /L 将细胞接种于 96 及 24 孔培养板。培养 24 h 后, 换无血清培养液培养 24 h。实验分阴性对照组 (加等量 DHank's 液)、模型组 (10 mg/L 脂多糖) 和不同浓度乔松素组 (于模型条件培养液中分别加入 50、100 和 200 mg/L 的乔松素干预), 各组设 8 个复孔, 培养 24 h 后, 光镜下观察细胞形态。

### 1.4 MTT 法测定细胞存活率

上述各组细胞观察大致形态后, 每孔加 20  $\mu$ L MTT, 继续孵育 4 h, 倾去上清液, 每孔加二甲亚砜 150  $\mu$ L, 振荡 10 min 使蓝紫色结晶充分溶解, 酶联免疫检测仪 (英国 Labsystems 公司) 测  $A_{570}$  值, 细胞存活率 = 实验组  $A_{570}$  / 对照组  $A_{570}$ , 取平均值。

### 1.5 TUNEL 检测细胞凋亡

按 TUNEL 试剂盒说明操作, 计算阳性细胞凋亡率 (%)。

### 1.6 免疫细胞化学法检测核因子 $\kappa$ B p65

细胞爬片, 按照 SABC 试剂盒说明操作, 每组各取 6 张染色片, 切片于 400 倍镜下随机选择 5 个视野, 计算 NF- $\kappa$ B p65 阳性细胞所占比率。以细胞核内或核周边出现棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞。用 Image-Pro Plus Version 4.0 for windows<sup>TM</sup> 图像处理

系统测量 NF- $\kappa$ B p65 核易位阳性细胞百分比 (%)。

### 1.7 统计学处理

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SAS8.0 统计软件进行单因素方差分析和因素相关分析。

## 2 结果

### 2.1 人脐静脉内皮细胞的鉴定

倒置显微镜下, 培养的细胞呈典型的铺路石状镶嵌排列; 内皮细胞第 11 因子相关抗原间接免疫荧光法检测发现, 阳性细胞达 95% 以上, 胞浆内可见大量棕色或棕黑色颗粒 (图 1)。

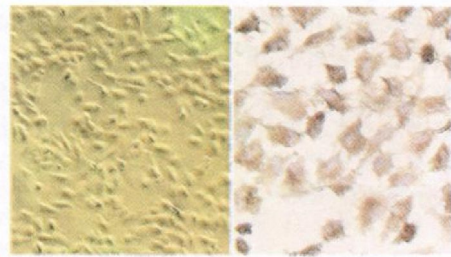


图 1 人脐静脉内皮细胞的鉴定 左为培养的 HUVEC 倒置显微镜下观 ( $\times 50$ ), 右为第 11 因子相关抗原染色照片 ( $\times 100$ )。

### 2.2 乔松素对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞形态学的影响

倒置显微镜下动态观察可见阴性对照组细胞紧密贴壁, 呈铺路石状生长; 模型组可见多数细胞呈圆形, 胞膜空泡, 核浓缩; 乔松素组见上述细胞较模型组明显减少 (图 2)。

### 2.3 乔松素对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞存活率的影响

与阴性对照组比较, 脂多糖可明显降低细胞存活率 ( $P < 0.01$ ), 不同浓度的乔松素 (50 mg/L、100 mg/L 和 200 mg/L) 均可明显抑制脂多糖的作用, 升高细胞存活率 ( $P < 0.05$  表 1)。

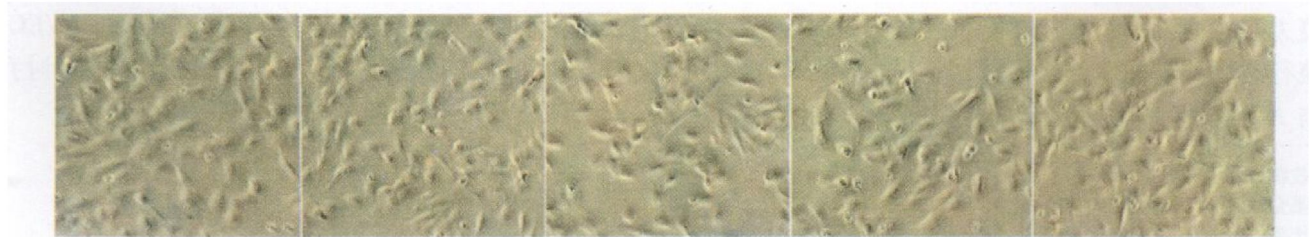
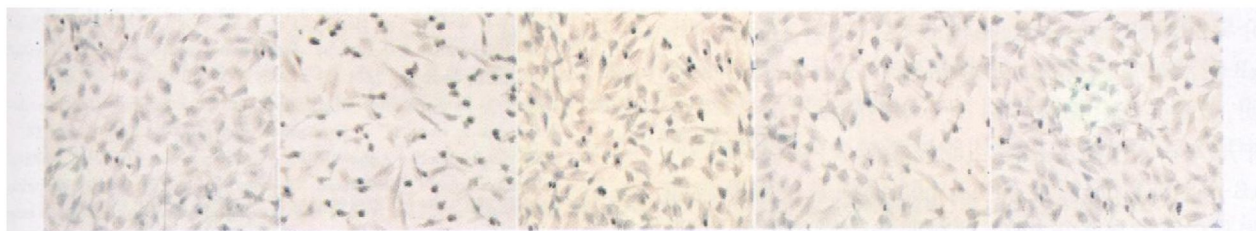


图 2 乔松素对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞形态学的影响 ( $\times 100$ ) 从左到右依次为阴性对照组、模型组及 50、100 和 200 mg/L 乔松素组。

表 1 乔松素对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

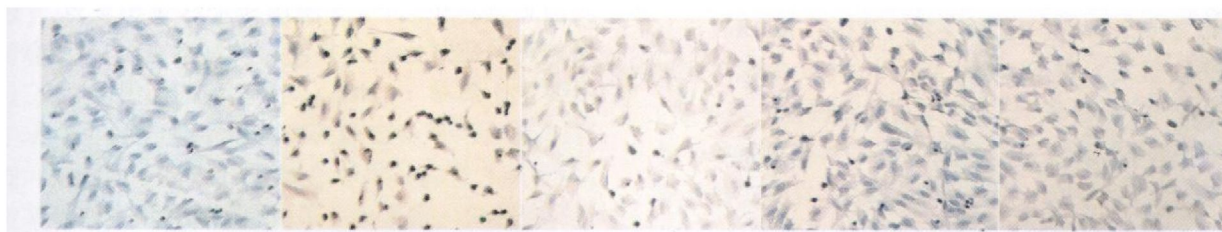
分 组	细胞存活率
阴性对照组	0.632 ± 0.021
模型组	0.335 ± 0.019 <sup>a</sup>
50 mg/L 乔松素组	0.459 ± 0.025 <sup>b</sup>
100 mg/L 乔松素组	0.473 ± 0.027 <sup>b</sup>
200 mg/L 乔松素组	0.523 ± 0.013 <sup>bc</sup>

a为  $P < 0.01$ , 与阴性对照组比较; b为  $P < 0.05$ , 与模型组比较; c为  $P < 0.01$ , 与 50 mg/L 乔松素组比较。

图 3 TUNEL测定内皮细胞凋亡变化 ( $\times 100$ ) 从左到右依次为阴性对照组、模型组及 50、100和 200 mg/L 乔松素组。

## 2.5 核因子 $\kappa$ B p65免疫细胞化学法分析

阴性对照组可见少量细胞胞浆淡染,核膜及核内极少阳性染色;模型组可见多量细胞核膜与近核膜的胞浆区域深染,可见棕黄色颗粒沉积。加入乔松素干预后,可见多数细胞胞浆淡染,核内阳性染色明显减少, HUVEC NF- $\kappa$ B p65核易位显著减少,并呈现一定的浓度依赖趋势,乔松素高浓度抑制 NF- $\kappa$ B p65核易位作用最明显(表 2和图 4)。

图 4 核因子  $\kappa$ B p65免疫细胞化学染色结果 ( $\times 100$ ) 从左到右依次为阴性对照组、模型组及 50、100和 200 mg/L 乔松素组。

## 2.6 核因子 $\kappa$ B与细胞凋亡率之间的相关性分析

相关分析发现 NF- $\kappa$ B p65与细胞凋亡率正相关 ( $r=0.99$ ,  $P=0.0001$ ), 因变量 NF- $\kappa$ B p65增加, 自变量细胞凋亡率随之增加。

## 3 讨论

以 As为基础的心脑血管疾病是目前发病率和病死率最高的疾病。在 As形成过程中, 内皮细胞病

## 2.4 乔松素对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

与阴性对照组比较, 脂多糖能明显诱导内皮细胞凋亡的发生 ( $P < 0.01$ )。50~200 mg/L 乔松素能明显减少细胞凋亡的发生, 与模型组相比差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); 100和 200 mg/L 乔松素对细胞凋亡的抑制作用比 50 mg/L 乔松素更明显 ( $P < 0.01$ ; 表 2和图 3)。

表 2 乔松素对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡和核因子  $\kappa$ B p65表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	细胞凋亡率 ( $n=8$ )	NF- $\kappa$ B p65 ( $n=30$ )
阴性对照组	2.49% ± 0.97%	2.72% ± 0.63%
模型组	11.06% ± 2.56% <sup>a</sup>	10.89% ± 2.57% <sup>a</sup>
50 mg/L 乔松素组	3.36% ± 1.65% <sup>b</sup>	3.92% ± 1.41% <sup>b</sup>
100 mg/L 乔松素组	2.44% ± 1.01% <sup>bc</sup>	2.60% ± 0.88% <sup>bc</sup>
200 mg/L 乔松素组	2.02% ± 0.66% <sup>bc</sup>	2.70% ± 0.45% <sup>bc</sup>

a为  $P < 0.01$ , 与阴性对照组比较; b为  $P < 0.01$ , 与模型组比较; c为  $P < 0.01$ , 与 50 mg/L 乔松素组比较。

变起着重要作用。脂多糖可通过直接或间接的方式激活并损伤内皮细胞, 引起相关细胞因子的合成和释放, 引起血管内皮细胞形态与功能的改变, 导致 As的发生<sup>[7,8]</sup>。

近几年研究发现, 在 As斑块形成过程中, 存在血管内皮细胞凋亡现象, 并反过来参与和加速 As进程。本实验通过 MTT法证实三种不同浓度的乔松素均可拮抗脂多糖诱导的细胞存活率下降, 并能部分拮抗脂

多糖诱导内皮细胞凋亡,说明乔松素可抑制脂多糖对HUVEC的损伤,减少内皮细胞的凋亡,发挥其保护血管内皮细胞的功能。

脂多糖在血管内皮细胞的跨膜信号转导是引起细胞效应的关键,NF- $\kappa$ B信号转导通路是脂多糖所介导的信号转导通路中最重要的下游通路<sup>[9]</sup>。NF- $\kappa$ B是参与免疫和炎症反应的许多基因的多效性调节基因,NF- $\kappa$ B激活后可增强各种前炎症因子的转录和蛋白质表达,由此引发细胞黏附性增强、炎症细胞趋化、细胞分化和细胞外基质降解,参与并促进As的进展<sup>[10-11]</sup>。Brand等<sup>[12]</sup>提出As可能是NF- $\kappa$ B介导的慢性炎症过程,在此过程中血管内皮的NF- $\kappa$ B激活被认为是As的起始事件。近年来研究表明,黄酮类化合物可抑制NF- $\kappa$ B的激活<sup>[13]</sup>。本实验中加入不同浓度乔松素均能显著减少内皮细胞NF- $\kappa$ B p65核易位,而且NF- $\kappa$ B p65的核易位程度与细胞凋亡率呈显著正相关,存在明显的依存关系,说明NF- $\kappa$ B对脂多糖引起的血管内皮细胞凋亡率升高可能起一定的调控作用,抑制NF- $\kappa$ B活化这个中间环节可能为治疗As提供一种新的思路。

目前国内外对蜂胶黄酮的研究多集中于总黄酮的探讨,而对于黄酮单体的研究甚少。进一步加强蜂胶黄酮化学成分分离鉴定和对有效成分进行深入的药理研究,寻找具有活性的化学单体,对阐明蜂胶防治As的相关物质基础和进一步开发利用蜂胶资源具有重要意义。

#### [参考文献]

- [1] Chudek J, Wiecek A. Adipose tissue inflammation and endothelial dysfunction [J]. *Pharmacol Rep*, 2006 **58** (Suppl): 81-88
- [2] 黄文诚. 蜂胶的生物活性和药理作用的研究进展 [J]. *蜜蜂杂志*, 2006 (9): 6-7
- [3] Sun JL, Hu YL, Wang DY, et al. Immunologic enhancement of compound Chinese herbal medicinal ingredients and their efficacy comparison with compound Chinese herbal medicines [J]. *Vaccine*, 2006 **24** (13): 2343-348
- [4] Aheme SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism [J]. *Nutrition*, 2002 **18**: 75-81
- [5] Geleijnse JM, Launer LJ, Pols HA, et al. Tea flavonoids may protect against atherosclerosis: the Rotterdam Study [J]. *Arch Intern Med*, 1999 **159**: 2170-174
- [6] 王家富, 姚树桐, 秦树存. 蜂胶抗动脉粥样硬化研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009 **17** (7): 620-621
- [7] Zhang WJ, Wei H, Tory Hagen, et al.  $\alpha$ -Lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway [J]. *PNAS*, 2007 **3** (10): 4077-082
- [8] Lawson C, Holder A, Rose M. Effect of ICAM-1 polymorphism on endothelial cells in vitro [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2004 **13** (3): 112-118
- [9] Shishodia S, Kour D, Aggarwal BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates TNF-induced NF- $\kappa$ B activation through inhibition of activation of I $\kappa$ B kinase and Akt in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of COX-2 synthesis [J]. *J Immunol*, 2004 **173** (3): 2011-022
- [10] Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  contributes to ischemia- and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts [J]. *Circ Res*, 1999 **84** (4): 392-400
- [11] Hunt BJ. The endothelium in atherogenesis [J]. *Lupus*, 2000 **9** (3): 189-193
- [12] Brand K, Page S, Rogler G, et al. Activated transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B is present in the atherosclerotic lesion [J]. *Clin Invest*, 1996 **97** (7): 1715-722
- [13] Tsai SH, Liang YC, Lin-Shiau SY, et al. Suppression of TNF- $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activity by myricetin and other flavonoids through down-regulating the activity of IKK in ECV304 cells [J]. *J Cell Biochem*, 1999 **74**: 606-615

(此文编辑 许雪梅)