

异鼠李素对氧化型低密度脂蛋白所致内皮细胞凋亡的影响

鲍美华, 肖艳, 冷一平, 肖海英, 徐芳

(长沙医学院, 湖南省长沙市 410219)

[关键词] 异鼠李素; 内皮细胞; 氧化型低密度脂蛋白; 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1; Caspase-3

[摘要] 目的 观察异鼠李素对氧化型低密度脂蛋白所致内皮细胞凋亡的保护作用, 并对其作用机制进行探讨。方法 采用 MTT 法测定细胞活力, 试剂盒测定乳酸脱氢酶含量, Griess 法测定一氧化氮含量, JC-1 吖啶橙和溴化乙啶荧光染色法对其线粒体膜电位及细胞存活情况进行分析, 流式细胞术评价细胞凋亡率, 半定量 RT-PCR 法检测凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 和 Caspase-3 mRNA 的表达。结果 异鼠李素 (10^{-7} $\mu\text{mol/L}$, 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 和 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$) 预培养能显著抑制氧化型低密度脂蛋白所致内皮细胞活力降低、线粒体乳酸脱氢酶释放增加及一氧化氮释放降低 ($P < 0.05$), 明显抑制氧化型低密度脂蛋白所致线粒体膜电位降低和细胞凋亡, 并呈剂量依赖性; 异鼠李素 (10^{-7} $\mu\text{mol/L}$, 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 和 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$) 能显著抑制氧化型低密度脂蛋白所致凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 和 Caspase-3 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$), 并呈一定的量效关系。结论 异鼠李素对氧化型低密度脂蛋白所致内皮细胞凋亡呈现显著的保护作用, 其机制可能与抑制氧化型低密度脂蛋白损伤引起的凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 和 Caspase-3 mRNA 表达上调以及一氧化氮释放降低有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Isorhamnetin on Oxidized Low Density Lipoprotein Induced Endothelial Cell Apoptosis

BAO MeiHua, XIAO Yan, LENG YiPing, XIAO HaiYing and XU Fang

(Changsha Medical University, Changsha, Hunan 410219, China)

[KEY WORDS] Isorhamnetin; Endothelial Cells; Oxidized Low Density Lipoprotein; Lectin-Like Low Density Lipoprotein Receptor-1; Caspase-3

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effects of isorhamnetin against oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) induced apoptosis of endothelial cells and to figure out some of the underlying mechanisms of these effects

Methods Changes in cell viability were measured by the MTT method, the lactate dehydrogenase (LDH) release was evaluated by assay kits, and nitric oxide (NO) release was detected by the Griess assay. JC-1 staining was used to evaluate the mitochondrial membrane potential alteration, AO/EB staining was used to observe the morphological changes of apoptotic cells, and flow cytometry was employed to detect the apoptotic rate of the cells. RT-PCR was used to detect the lectin-like low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) and Caspase-3 mRNA expression. **Results** With the pretreatment by isorhamnetin (10^{-7} $\mu\text{mol/L}$, 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ and 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$), the decrease in endothelial cell viability and NO release as well as the increase in LDH induced by ox-LDL were significantly suppressed ($P < 0.05$). The ox-LDL induced mitochondrial membrane potential alteration and apoptosis were also considerably inhibited. All these suppressive effects exhibited concentration-dependant behaviors. Pretreatment by isorhamnetin (10^{-7} $\mu\text{mol/L}$, 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ and 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$) significantly ($P < 0.01$) inhibited the ox-LDL induced LOX-1 and Caspase-3 mRNA upregulation in a concentration-dependant manner. **Conclusions** The results show the protective effects of isorhamnetin on endothelial cells from ox-LDL induced apoptosis. These effects may be related to the inhibition of ox-LDL induced LOX-1 and Caspase-3 mRNA upregulation and the decrease of NO release.

氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 引起内皮功能损伤和凋亡在动脉粥样硬化 (As) 病理过程中起关键的作用^[1]。凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1

(LOX-1) 是新发现的大量存在于血管内皮细胞表面的 ox-LDL 特异性受体^[2], 是血管内皮细胞摄取和代谢 ox-LDL 的主要受体。LOX-1 可介导 ox-LDL 引起的内皮细胞凋亡、分泌活性改变等, 最终引起 As 的发生^[3,4]。黄酮类化合物已被应用于抗炎症、心血管疾病和抗肿瘤, 长期摄取黄酮类化合物可显著降低 As 及高血压等心血管疾病的风险^[5,6]。本研究利用 ox-LDL 损伤内皮细胞模型, 观察异鼠李素抗内皮细胞凋亡的作用, 并探讨其抗凋亡的作用机制。

[收稿日期] 2010-03-05 [修回日期] 2010-06-03

[基金项目] 湖南省高等学校科学研究项目 (09C157)

[作者简介] 鲍美华, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为中药抗动脉粥样硬化的作用及作用机制, E-mail 为 mhbao78@163.com。肖艳, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为中药资源与质量研究。冷一平, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为糖尿病的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株 HUVEC 购自 ATCC; ox-LDL 购自北京协和生化所; 异鼠李素购自中国药品生物制品检定所; 吖啶橙 (AO)、溴化乙啶 (EB) 购自 Fluka 公司; JC-1 购自 Sigma 公司; 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒购自南京建成生物技术工程研究所; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所; Mastercycler Gradient 梯度 PCR 扩增仪 (Eppendorf 公司); 1-15K 型台式高速冷冻离心机 (Bio-Rad 公司); MF51 荧光显微镜 (Olympus 公司); EPICS ALTRA 流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特公司)。

1.2 细胞培养及实验分组

HUVEC 在含 10% 胎牛血清、青霉素 (100 KU/L)、链霉素 (100 mg/L)、 NaHCO_3 (3.7 g/L) 的 DMEM 培养基中, 于 37℃、5% CO_2 条件下常规培养, 待细胞生长至 80% 左右汇合, 用胰酶-EDTA 消化、传代。异鼠李素以 DMSO 配置成 0.02 mmol/L、0.2 mmol/L、2 mmol/L 的储备液, 使用前以细胞培养液稀释至所需浓度。实验共分 5 组: 正常对照组加入与药物处理组等体积的 DMSO, 无 ox-LDL 和异鼠李素孵育 HUVEC; ox-LDL 组以与药物处理组等体积的 DMSO 预培养后, 加入终浓度为 100 mg/L ox-LDL 孵育 24 h; 异鼠李素高、中、低剂量组, 以终浓度分别为 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 、 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 、 10^{-7} $\mu\text{mol/L}$ 预孵育 20 min 后加入终浓度为 100 mg/L ox-LDL 孵育 24 h。

1.3 内皮细胞活力、乳酸脱氢酶和一氧化氮含量的测定

内皮细胞以 1×10^4 接种于 96 孔板, 按 1.2 分组培养后, 吸取细胞上清液, 按试剂盒操作测 LDH 含量, 以 Griess 法测 NO 含量。细胞活力采用 MTT 法, 培养结束后加入终浓度为 0.5 g/L MTT 溶液 37℃ 孵育 4 h, 吸去培养液, 加入 200 μL DMSO 溶解蓝色结晶, 570 nm 测吸光度, 以正常对照组为 100% 计算各组相对细胞活力。

1.4 JC-1 荧光染色测定细胞线粒体膜电位

内皮细胞以 1×10^4 接种于 96 孔板, 培养 24 h 约 80% 汇合后, 加待测物预培养 20 min, 再加入 ox-LDL 孵育 4 h, 吸去培养液。JC-1 染液 (2.5 g/L) 以细胞培养液 1:250 稀释后加入 96 孔板, 在 37℃ 继续孵育 20 min, 吸去染液, 荧光显微镜下观察拍照。

1.5 吖啶橙和溴化乙啶荧光染色测定死亡细胞

内皮细胞以 1×10^4 接种于 96 孔板, 按 1.2 分组培养后, 每孔加入 AO/EB 双染液 (AO 和 EB 100 mg/L 溶液) 4 μL 混合均匀, 稍放置后, 吸去培养液, 观察拍照。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

内皮细胞以 1×10^6 接种于 6 孔板, 按 1.2 分组培养后, 收集细胞, 以 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒进行细胞染色, 随即进行流式细胞仪检测。Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 将实验样本中正常、坏死、凋亡细胞区分开。正常活细胞不被 Annexin V-FITC 和 PI 染色; 凋亡早期细胞仅被 Annexin V-FITC 染色, PI 染色呈阴性; 坏死细胞和晚期凋亡细胞同时被 Annexin V-FITC 和 PI 染色。

1.7 RT-PCR 检测 LOX-1 和 Caspase-3 mRNA 表达

以 Trizol 一步法提取总 RNA, 通过核酸蛋白测定仪分别测量 260 nm 处吸光度和 A_{260}/A_{280} 比值确定总 mRNA 的浓度和纯度。按 25℃ 10 min、42℃ 1 h、72℃ 15 min 逆转录得到 cDNA。采用手工热启动 PCR, 即在首轮 94℃ 变性 3 min 后手工加入 0.5 μL Taq DNA 聚合酶, 然后进行 PCR 循环 (94℃ 45 s 退火 45 s 72℃ 45 s), 末次循环后 72℃ 延长为 10 min, 4℃ 冷却保存。 β -actin 引物序列上游 5'-TGA CCG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA -3', 下游 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG -3', 扩增片段长度 610 bp。LOX-1 引物序列: 上游 5'-TTG CTG CAC ACA ATC TAG CA -3', 下游 5'-CGA GCA TCA AGA TGG AGA CA -3', 扩增片段长度 394 bp。Caspase-3 引物序列上游 5'-AGT CAG TGG ACT CTG GGA TC -3', 下游 5'-GTA CAG TTC TTT CGT GAG CA -3', 扩增片段长度 749 bp。PCR 反应至少重复 3 次。PCR 反应产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色, Gel Doc 2000 型凝胶成像系统观察结果, 产物带的密度用凝胶扫描系统分析记录结果。

1.8 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 异鼠李素对内皮细胞活力、乳酸脱氢酶和一氧化氮的影响

ox-LDL 培养 24 h 后显著降低内皮细胞活力, 明显促进线粒体 LDH 释放, 并能显著降低培养液中

NO 含量, 异鼠李素 (10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 、 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 和 10^{-7} $\mu\text{mol/L}$) 预培养能显著抑制 ox-LDL 对内皮细胞的损伤, 提高细胞存活率, 抑制 LDH 释放, 升高 NO 含量, 并呈一定的浓度依赖关系 (表 1)。

表 1 异鼠李素对 ox-LDL 所致内皮细胞活力、LDH 和 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

分 组	细胞活力	LDH (U/L)	NO ($\mu\text{mol/L}$)
正常对照组	100.0%	268.1 \pm 47.7	9.4 \pm 0.6
ox-LDL 组	52.4% \pm 9.8%	676.2 \pm 56.0 ^a	6.3 \pm 0.7 ^a
异鼠李素高剂量组	89.6% \pm 10.3% ^b	264.5 \pm 28.0 ^b	8.6 \pm 0.2 ^b
异鼠李素中剂量组	72.5% \pm 11.0% ^b	452.7 \pm 48.8 ^b	7.9 \pm 0.4 ^b
异鼠李素低剂量组	60.7% \pm 7.8%	580.9 \pm 21.2 ^b	6.9 \pm 0.9

a 为 $P < 0.01$ 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 ox-LDL 组比较。

2.2 异鼠李素对细胞线粒体膜电位及细胞凋亡的影响

ox-LDL 培养 4 h 后, JC-1 染色后荧光显微镜下观察, 红色颗粒状染色明显减少。 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 、 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 和 10^{-7} $\mu\text{mol/L}$ 异鼠李素预培养 20 min 后, 红色颗粒状染色明显增加。ox-LDL 培养 24 h 后, AO/EB 双染后荧光显微镜下观察, 发现有 4 种细胞: 绿色均匀荧光, 为正常细胞; 明亮浓缩的黄绿色荧光为早期凋亡细胞; 黄色偏红荧光为晚期凋亡细胞, 细胞核呈现 AO 和 EB 双染效果; 红色荧光为死亡细胞。而 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 、 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 和 10^{-7} $\mu\text{mol/L}$ 异鼠李素预培养 20 min 后, 凋亡细胞和死亡细胞明显减少 (图 1)。

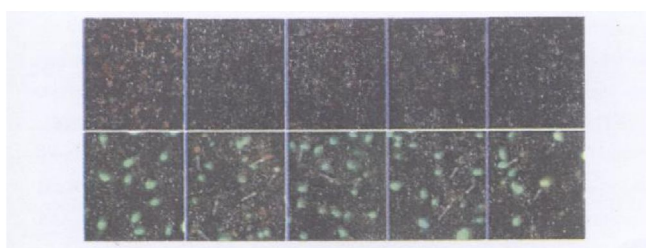


图 1 异鼠李素对 ox-LDL 所致线粒体膜电位降低和细胞凋亡的影响 上图为 JC-1 染色, 下图为 AO/EB 染色; 从左至右分别为正常对照组、ox-LDL 组及 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 、 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 和 10^{-7} $\mu\text{mol/L}$ 异鼠李素组。标尺为 50 μm 。

2.3 异鼠李素对氧化型低密度脂蛋白所致细胞凋亡率的影响

ox-LDL 培养 24 h 后能显著升高内皮细胞凋亡率, 与正常对照组比较, 凋亡率由 9.43% 升高为 52.50%; 10^{-7} $\mu\text{mol/L}$ 、 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 和 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 异鼠李素预培养能显著抑制 ox-LDL 对内皮细胞的

损伤, 细胞凋亡率分别降低为 36.01%、28.89% 和 19.17% (图 2)。

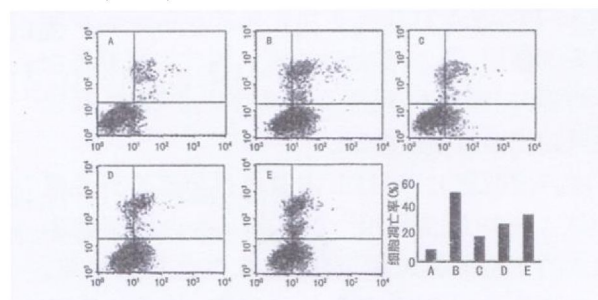


图 2 异鼠李素对 ox-LDL 所致细胞凋亡的影响 A 为正常对照组, B 为 ox-LDL 组, C-E 分别为 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 、 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 和 10^{-7} $\mu\text{mol/L}$ 异鼠李素组。

2.4 异鼠李素对氧化型低密度脂蛋白所致 LOX-1 和 Caspase-3 mRNA 表达的影响

ox-LDL 培养 24 h 能显著升高内皮细胞 LOX-1 和 Caspase-3 mRNA 的表达, 分别为正常对照组的 2.45 倍和 3.83 倍。 10^{-7} $\mu\text{mol/L}$ 、 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 和 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 异鼠李素预培养能显著抑制 ox-LDL 所致 LOX-1 和 Caspase-3 mRNA 的表达升高, LOX-1 mRNA 分别为正常对照组 2.12 倍、1.47 倍和 1.30 倍, Caspase-3 mRNA 分别为正常对照组 2.70 倍、1.71 倍和 1.15 倍, 并呈一定的量效关系 (图 3)。

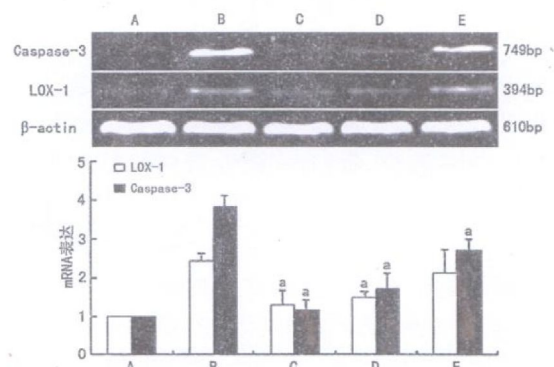


图 3 异鼠李素对 ox-LDL 所致内皮细胞 LOX-1 和 Caspase-3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$) a 为 $P < 0.01$ 与 ox-LDL 组比较。A 为正常对照组, B 为 ox-LDL 组, C-E 分别为 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 、 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 和 10^{-7} $\mu\text{mol/L}$ 异鼠李素组。

3 讨论

在 As 的形成过程中, 内皮细胞起着非常重要的作用。目前被普遍接受的“损伤学说”认为, 内皮细胞损伤是 As 形成早期的始动环节^[7]。正常情况下, 血管内皮细胞通过产生生物活性物质, 对维持正常血管壁的通透性和功能状态、凝血纤溶活性及炎症反应起着重要作用。然而, 内皮细胞的正常代谢

一旦发生异常改变,则能迅速促发血管损伤,引发动脉粥样硬化的发生发展。研究表明,在As的形成过程中,ox-LDL所致内皮细胞功能异常及损伤起着非常重要的作用,是As的始动因素。因此本研究采用离体培养的HUVEC,观察ox-LDL对其影响,从而建立血管内皮细胞损伤模型。

在内皮细胞上,ox-LDL主要通过与其特异性受体LOX-1发挥损伤作用^[8]。LOX-1是内皮细胞丰富表达的Ⅲ型单链跨膜蛋白,属C型选择素家族。LOX-1可介导ox-LDL的摄取和降解,并受ox-LDL的上调。

以往研究表明,异鼠李素可通过p38MAPK途径在转录水平影响内皮细胞功能相关蛋白,如内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的表达,最终抑制NO释放并引起细胞死亡^[9]。NO是血管内皮细胞释放的重要功能物质,它参与了血管舒张,血管平滑肌细胞增殖迁移,血小板的黏附和聚集。当NO的合成、释放、分解受到影响时,就会引起内皮功能障碍,甚至引起细胞凋亡,因此NO的合成是说明内皮功能状态的最重要的指标之一^[10]。本研究中,异鼠李素具有抑制细胞凋亡的作用,证明NO可能参与了异鼠李素的抗内皮细胞凋亡的作用。

在细胞凋亡发展过程中,线粒体的作用引起了学者们极大的关注。细胞内氧化磷酸化、能量代谢和抗氧化作用都有赖于线粒体的功能。线粒体早期的改变为线粒体膜通透性变化和线粒体膜电位降低,膜间孔开放,离子通过,基质渗透压升高,线粒体体积扩大,外膜破裂,Caspase活性蛋白包括细胞色素C释放至胞质,引起Caspase级联反应,产生细胞凋亡^[11,12]。因此线粒体膜电位的下降被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件。Caspase家族是一组蛋白酶,具有促进蛋白溶解系统活化作用,是细胞凋亡的执行人。Caspase家族的蛋白都是以非活性的酶原方式存在于胞质中,Caspase的活化途径有二条:一条是由死亡受体如Fas或TNFR介导的;另一条是线粒体途径,它们分别通过Caspase-8和Caspase-9启动Caspase级联放大反应,激活Caspase-3引起细胞凋亡,因此Caspase-3是凋亡的关键执行分子^[13]。本研究中,异鼠李素能显著抑制ox-LDL所致内皮细胞LOX-1 mRNA表达的上调、

NO释放的降低、线粒体膜电位的降低,并抑制Caspase-3 mRNA表达的上升,说明异鼠李素可能通过干扰LOX-1→NO→线粒体→Caspase-3途径发挥抗血管内皮细胞凋亡作用,最终发挥保护内皮细胞免受ox-LDL的损伤。

As是当今严重威胁人类健康的疾病,在降低胆固醇的同时注重保护内皮细胞免受损伤,是防治As发展、促进转归的重要举措。中国传统中药具有毒性小的特点越来越引起大家的关注,本研究利用ox-LDL损伤内皮细胞模型对黄酮类化合物异鼠李素进行药效评价,并且在基因层面上对其保护作用机制进行探讨,找到了药物作用的部分靶点,为进一步开发抗As药物提供了依据。

[参考文献]

- [1] Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis [J]. *J Clin Invest* 1991; **88** (6): 1785-792
- [2] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. An endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein [J]. *Nature* 1997; **386** (6620): 73-77
- [3] Novelli G, Mango R, Vecchione L, et al. New insights in atherosclerosis research: LOX-1, leading actor of cardiovascular diseases [J]. *Clin Ter* 2007; **158** (3): 239-248
- [4] 尹凯,涂玉林,桂庆军. 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体1与动脉粥样硬化易损斑块[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; **16** (7): 572-574
- [5] Benavente-Garcia O, Castukki J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular and anti-inflammatory activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2008; **56** (15): 6185-205
- [6] 刘莉,李鑫,刘丰,等. 大豆异黄酮对代谢综合征模型大鼠抗动脉粥样硬化作用的机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; **16** (12): 928-932
- [7] Ross T. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature* 1993; **362** (6423): 801-809
- [8] Mehta JL, Li DY. Identification, regulation and function of LOX-1, a novel receptor for ox-LDL [J]. *J Am Coll Cardiol* 2002; **39** (9): 1429-435
- [9] Meihua Bao, Yijia Lou. Isohamnetin prevent endothelial cell injuries from oxidized LDL via activation of p38MAPK [J]. *Eur J Pharmacol* 2006; **547** (1-3): 22-30
- [10] Steffen Y, Schewe T, Sies H. Epicatechin protects endothelial cells against oxidized LDL and maintains NO synthase [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **331** (4): 1277-283
- [11] Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, et al. Elucidating the mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998; **1366** (1-2): 79-94
- [12] 卫玮,韩兵社,关丽英,等. 活性氧激活线粒体凋亡通路是亚硝酸钠诱导NB4细胞凋亡的重要机制[J]. *中国医学科学院学报*, 2007; **29** (3): 324-328
- [13] Wilson MR. Apoptotic signal transduction: emerging pathways [J]. *Biochem Cell Biol* 1998; **76** (4): 573-582

(此文编辑 文玉珊)