

[文章编号] 1007-3949(2011)19-07-0557-04

• 实验研究 •

二苯乙烯苷对血管内皮细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 表达的影响

龙石银, 黄良珠, 乔新惠, 高细强, 丁 岚, 张彩平, 陈武哲, 田 英

(南华大学生物化学与分子生物学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 细胞凋亡; 二苯乙烯苷; Bcl-2; Bax

[摘 要] 目的 观察二苯乙烯苷干预过氧化氢致人脐静脉内皮细胞凋亡及对凋亡调控蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达的影响。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞, 实验分为对照组、300 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组及二苯乙烯苷预处理组, 采用 MTT 法、形态学观察、流式细胞仪检测内皮细胞凋亡情况, Western blot 检测二苯乙烯苷对 Bcl-2 和 Bax 表达的影响。结果 内皮细胞经过过氧化氢处理后, 其增殖明显受到抑制, 凋亡率显著升高, Bcl-2 蛋白表达减少, Bax 蛋白表达显著增加, Bcl-2/Bax 比值降低, 差异均有显著性 ($P < 0.01$); 经二苯乙烯苷预处理后, 细胞增殖率显著提高, 凋亡率显著降低; Bcl-2 蛋白表达增加, Bax 蛋白表达减少, Bcl-2/Bax 比值明显提高, 差异均有显著性 ($P < 0.01$)。结论 二苯乙烯苷可通过调节 Bcl-2/Bax 表达而抑制过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡, 减少内皮细胞损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-Glucoside on the Expression of Bcl-2 and Bax in the Apoptosis of HUVEC induced by H_2O_2

LONG Shi-Yin, HUANG Liang-Zhu, QIAO Xin-Hui, GAO Xi-Qiang, DING Lan, ZHANG Cai-Ping, CHEN Wu-Zhe, and TIAN Ying

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Apoptosis; Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-Glucoside; Bcl-2; Bax

[ABSTRACT] Aim To investigate the effects of tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (TSG) on the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and its molecular mechanisms induced by hydrogen peroxide (H_2O_2).

Methods The model of apoptosis HUVEC was induced by 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , MTT assay was used to detect the cell proliferation, flowing cytometry was used to measure the effect of apoptosis. The expression of Bcl-2 and Bax was detected by Western blot.

Results H_2O_2 could inhibit the viability of cells, decrease the expression of Bcl-2 and the ratio of Bcl-2/Bax, and increase the apoptosis ratio and the expression of Bax. On the contrary, treatment of TSG could improve the rate of cell proliferation, inhibit cell apoptosis, up-regulate the expression of Bcl-2 and increase the ratio of Bcl-2/Bax, down-regulate the expression of Bax significantly ($P < 0.01$).

Conclusions TSG could inhibit H_2O_2 -induced apoptosis of HUVEC, and the mechanisms might be associated with regulating the expression of Bcl-2, Bax and the ratio of Bcl-2/Bax.

血管内皮细胞损伤、凋亡参与了动脉粥样硬化 (As) 的发生、发展, 被认为是触发 As 的始动因素之一。二苯乙烯苷 (TSG) 是从中药何首乌中提取的一种含多酚结构的水溶性活性成分, 研究发现 TSG 具有抗氧化、改善脂质代谢、抗 As 以及抗神经细胞凋亡等功能^[1-6], 但分子机制尚未明确。本研究采用过氧化氢 (H_2O_2) 诱导人脐静脉内皮细胞凋亡, 观察 TSG 对内皮细胞凋亡及凋亡调控蛋白 Bcl-2、Bax 表

达的影响, 初步探讨 TSG 保护内皮、防治 As 的分子机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

人脐静脉内皮细胞株 (HUVEC) 购自中国科学

[收稿日期] 2011-05-17

[基金项目] 国家自然科学基金 (30800474) 资助; 湖南省科技厅项目 (2010SK3037, 湘科条字 [2009] 130-19) 资助; 湖南省教育厅项目 (09C832) 资助; 湖南省研究生创新项目 (CX2010B385) 资助

[作者简介] 龙石银, 副教授, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化, E-mail 为 longshiyin@126.com。通讯作者田英, 教授, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化, E-mail 为 uscty@163.com。

院细胞生物学研究所上海细胞库, TSG 为中国药品生物制品检定所产品(编号 110844)。RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 胰蛋白酶、MTT 及 DMSO 购自 Amresco 公司, Hoechst33258 购自碧云天, 兔抗人 Bcl-2 单克隆抗体、抗 Bax 和抗 GAPDH 多克隆抗体购自 CST 公司, 其余均为国产试剂(分析纯级)。

1.2 人脐静脉内皮细胞培养及实验分组

用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37℃、5% CO₂、95% 饱和湿度条件下培养 HUVEC, 以 300 μmol/L H₂O₂ 建立内皮细胞凋亡模型, 实验分为: ①空白对照组; ②H₂O₂ 组; ③TSG + H₂O₂ 组, 以 0.1、1、10 及 100 μmol/L TSG 预处理细胞 24 h 后, 加 H₂O₂ 300 μmol/L 孵育 24 h; 选取最佳 TSG 作用浓度做基因表达实验。

1.3 MTT 法检测细胞活力

取对数生长期细胞, 每组设 6 个平行复孔, 加入处理因素作用 24 h 后, 每孔加 MTT 20 μL (5 g/L), 培养 4 h 后弃上清, 加 DMSO 150 μL/孔, 待紫色结晶完全溶解后, 用酶标仪在波长 490 nm 处测定吸光度值(OD), 计算细胞增殖率。细胞增殖率 = 试验组 OD 值/对照组 OD 值 × 100%。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率

取对数生长期细胞, 每组设 3 个平行组, 分组给予不同因素处理 24 h 后, 收集细胞, 离心, 用 4℃ PBS 洗 1 遍再离心, 加入 1 mL 预冷的 75% 冰乙醇, 吹匀放置 4℃ 冰箱固定过夜, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.5 Western blot 检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达

分别收集各组细胞, 用细胞裂解液裂解细胞后提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白质含量。每组取 60 μg 蛋白量上样进行 SDS-PAGE 电泳, 采用电转膜仪

将凝胶上蛋白转印至 0.22 μm 的 PVDF 膜, 用 1:1000 稀释的兔抗人 Bcl-2、Bax、GAPDH 一抗孵育 4 h 或 4℃ 孵育过夜, 再用 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 2 h 后, DAB 显色, 胶片显影, 扫描图像后用凝胶图像系统分析蛋白条带的灰度值。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析及 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TSG 对内皮细胞增殖的影响

倒置显微镜下, H₂O₂ 组细胞数目较空白对照组显著减少, 细胞皱缩; 用 TSG 预处理后, 随着 TSG 的浓度增加, 细胞数目逐渐增多, 细胞形态逐渐趋于规则饱满(图 1)。MTT 结果显示, 随着 TSG 浓度的增加, 细胞增殖率逐渐增加, 与 H₂O₂ 组比较, 10 μmol/L 和 100 μmol/L TSG 组细胞增殖率显著增加 (*P* < 0.05; 表 1)。

表 1. TSG 对内皮细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

分 组	OD 值
空白对照组	1.437 ± 0.095
300 μmol/L H ₂ O ₂ 组	1.147 ± 0.076 ^a
0.1 μmol/L TSG + H ₂ O ₂ 组	1.142 ± 0.054 ^a
1 μmol/L TSG + H ₂ O ₂ 组	1.153 ± 0.046 ^a
10 μmol/L TSG + H ₂ O ₂ 组	1.248 ± 0.125 ^{ab}
100 μmol/L TSG + H ₂ O ₂ 组	1.282 ± 0.105 ^{ab}

a 为 *P* < 0.01, 与空白对照组比较; b 为 *P* < 0.05, 与 H₂O₂ 组比较。

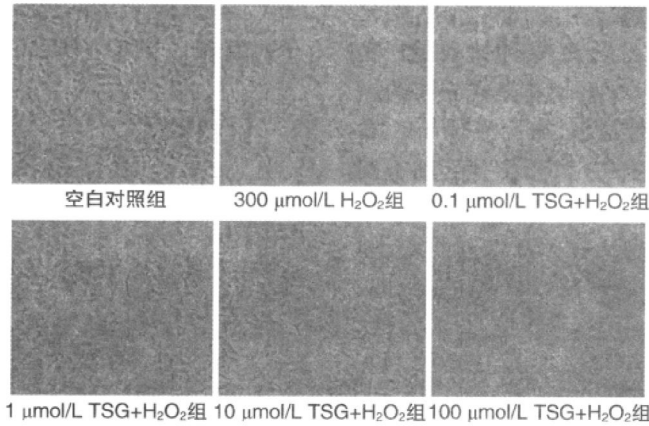


图 1. TSG 对内皮细胞形态的影响 (×200)

Figure 1. Effects of TSG on HUVEC morphology

2.2 TSG 对内皮细胞凋亡率的影响

流式细胞仪检测显示,不同浓度的 TSG 预处理组内皮细胞凋亡率随着 TSG 浓度的增加而逐渐降低,与 H_2O_2 组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),表明 TSG 能显著抑制 H_2O_2 的作用,降低细胞凋亡率,具有抗凋亡作用(表 2)。综合形态学观察、细胞增殖情况及流式细胞仪检测结果,选择 $10 \mu\text{mol/L}$ TSG 作为最佳药物作用浓度进行后续实验。

表 2. TSG 对细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2. Effects of TSG on the apoptosis rates of HUVEC induced by H_2O_2

分 组	细胞凋亡率
空白对照组	$2.51\% \pm 0.20\%$
$300 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组	$22.76\% \pm 4.76\%^a$
$0.1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组	$18.33\% \pm 2.60\%^a$
$1 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组	$16.16\% \pm 1.96\%^{ab}$
$10 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组	$15.00\% \pm 2.35\%^{ab}$
$100 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组	$12.43\% \pm 1.37\%^{ab}$

a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与 H_2O_2 组比较。

2.3 TSG 对内皮细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

与空白对照组比较, H_2O_2 组 Bcl-2 的表达下降,Bax 的表达明显增加,Bcl-2/Bax 比值显著降低 ($P < 0.01$);经 TSG 预处理后,与 H_2O_2 组比较,Bcl-2 的表达增加,Bax 的表达显著减少,Bcl-2/Bax 比值明显升高 ($P < 0.01$;图 2 和表 3)。

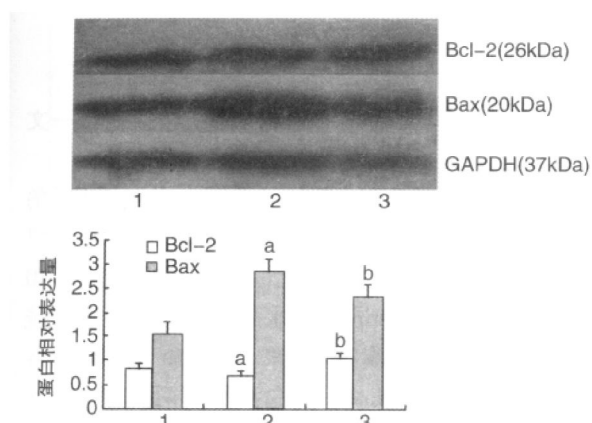


图 2. TSG 对内皮细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 1 为空白对照组,2 为 H_2O_2 组,3 为 $10 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组。a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与 H_2O_2 组比较。

Figure 2. Effects of TSG on the expression of Bcl-2 and Bax in HUVEC

表 3. 内皮细胞 Bcl-2/Bax 比值比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3. The relative ratio of Bcl-2/Bax in HUVEC

分 组	Bcl-2/Bax 比值
空白对照组	0.552 ± 0.005
$300 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组	0.233 ± 0.001^a
$10 \mu\text{mol/L}$ TSG + H_2O_2 组	0.465 ± 0.002^b

a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与 H_2O_2 组比较。

3 讨 论

TSG 对血管内皮细胞具有保护作用,但分子机制尚未明确^[3,4]。而血管内皮细胞的损伤、凋亡与 As 的启动有着密切联系^[7,8],因而推测 TSG 可能通过抑制血管内皮细胞凋亡而发挥保护内皮作用。本研究结果表明,TSG 可显著增加由 H_2O_2 诱导损伤的血管内皮细胞的增殖率、降低凋亡率,提示 TSG 具有抗氧化诱导血管内皮细胞凋亡的作用。

细胞凋亡是受多种基因调控的复杂系统,Bcl-2 家族在凋亡过程中起着重要作用,家族中的成员通常以二聚体的形式发挥作用。其中 Bcl-2 和 Bax 是两种重要的凋亡相关基因,Bcl-2 是抗凋亡基因,Bax 属于促凋亡基因^[9-13],细胞是否发生凋亡及凋亡的严重程度取决于 Bcl-2/Bax 比值。当比值高时趋向抗凋亡作用,当比值低时促进细胞凋亡,提高 Bcl-2、降低 Bax 的表达能增加细胞抗凋亡作用^[9,14]。本研究中, H_2O_2 组内皮细胞 Bcl-2 的表达减少,Bax 的表达明显增加,Bcl-2/Bax 比值显著下降;经 TSG 预处理后,Bcl-2 的表达明显增加,Bax 的表达减少,并显著升高 Bcl-2/Bax 比值。这与赵玲等^[5]在研究 TSG 对局灶性脑缺血大鼠脑组织细胞凋亡时的结果一致。提示何首乌中的有效成分 TSG 能够通过调节 Bcl-2 和 Bax 的表达,提高 Bcl-2/Bax 比值从而拮抗 H_2O_2 的氧化作用,抑制血管内皮细胞凋亡,减少内皮细胞损伤。

血管内皮凋亡是多基因参与、多通路相互调节的复杂系统,Bcl-2 自身也具有抗氧化应激的作用,能抑制超氧阴离子产生过多和程序性死亡诱导因子的释放,干扰 Bax 的促凋亡功能,并阻断依赖 Caspase 途径的凋亡通路^[10,11]。因此,对于 TSG 抗内皮细胞氧化损伤、抗凋亡的作用机制还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Wang X, Zhao L, Han T, et al. Protective effects of 2,3,

- 5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside, an active component of polygonum multiflorum thunb, on experimental colitis in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 578 (2-3): 339-348.
- [2] 张伟, 王春华, 李 锋. 二苯乙烯苷对大鼠动脉硬化模型的 MMP-2、9 表达的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2008, 24 (2): 134-138.
- [3] 崔慧辉, 田 英, 龙石银. 二苯乙烯苷抗动脉粥样硬化的作用和机制 [J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9 (20): 3 968-982.
- [4] 龙石银, 崔慧辉, 张彩平, 等. 二苯乙烯苷对 H_2O_2 诱导的人脐静脉内皮细胞核因子 κB 和肿瘤坏死因子 α 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18 (7): 510-513.
- [5] 赵 玲, 李春阳, 张 丽, 等. 二苯乙烯苷对局灶性脑缺血大鼠脑组织细胞凋亡的影响 [J]. *中草药*, 2008, 39 (3): 394-397.
- [6] 孙 欣, 顾 宜, 李晓锋, 等. 二苯乙烯苷对抗 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞凋亡的作用 [J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30 (24): 2 910-913.
- [7] Sima AV, Stancu CS, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis [J]. *Cell Tissue Res*, 2009, 335 (1): 191-203.
- [8] Noonan DM, Vannini N, Pfeffer U, et al. Endothelial cell aging and apoptosis in prevention and disease: E selectin expression and modulation as a model [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14 (3): 221-225.
- [9] Krishna S, Low IC, Pervaiz S. Regulation of mitochondrial metabolism: yet another facet in the biology of the oncoprotein Bcl-2 [J]. *Biochem J*, 2011, 435 (3): 545-551.
- [10] Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria-specificity in membrane targeting for death [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813 (4): 532-539.
- [11] Johansson AC, Appelqvist H, Nilsson C, et al. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane Permeabilization [J]. *Apoptosis*, 2010, 15 (5): 527-540.
- [12] Ott M, Norberg E, Zhivotovsky B, et al. Mitochondrial targeting of tBid/Bax: a role for the TOM complex [J]? *Cell Death Differ*, 2009, 16 (8): 1 075-082.
- [13] Galganska H, Karachitos A, Wojtkowska M, et al. Communication between mitochondria and nucleus: putative role for VDAC in reduction/oxidation mechanism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1797 (6-7): 1 276-280.
- [14] Walensky LD. Bcl-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13 (8): 1 339-350.
- (此文编辑 文玉珊)

• 读者 • 作者 • 编者 •

更正启示

发表在本刊 2011 年第 19 卷第 2 期 85-88 页的《硫化氢对 THP-1 源性巨噬细胞脂质摄取的影响》一文中,图 2 标注 GAPDH (510bp) 更正为 GAPDH。

发表在本刊 2011 年第 19 卷第 2 期 135-138 页的《冠心病患者血浆 periostin 蛋白与血管内皮生长因子的相关性》一文中,第 136 页右栏倒数第 7 行“血浆 periostin 水平除 OMI 组与 SA 组之间以及 UA 组与 OMI 组之间比较无统计学差异之外”,应改为“血浆 periostin 蛋白水平除 OMI 组与 SAP 组之间以及 UAP 组与 OMI 组之间比较无统计学差异之外”,第 138 页左栏第 1 行“除 OMI 组血浆 periostin 蛋白水平高于 SAP 组但无统计学差异之外,其余各组 periostin 蛋白水平两两比较均有统计学差异”,应改为“血浆 periostin 蛋白水平除 OMI 组高于 SAP 组、UAP 组高于 OMI 组但无统计学差异之外,其余各组 periostin 蛋白水平两两比较均有统计学差异”。

特此更正说明。

《中国动脉硬化杂志》编辑部