

# 槲皮素调控 PTEN-Akt 通路抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的血管内皮细胞凋亡

李跃艳, 全智华

(南华大学附属第一医院心血管内科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 槲皮素; 氧化应激; 内皮细胞; 细胞凋亡

[摘要] 目的 探讨槲皮素对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)氧化应激损伤的保护作用及机制。方法 通过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用于人脐静脉内皮细胞建立氧化应激模型,采用 MTT 法测定 HUVEC 细胞存活率,试剂盒法测定乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)活性,流式细胞术检测细胞周期,Western Blot 法测定 PTEN、Akt、磷酸化 Akt 及 Bcl-2 蛋白的表达水平。结果 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可使 HUVEC 的存活率下降,而 10、20 μmol/L 槲皮素处理后细胞存活率显著提高( $P < 0.05$ );SOD 活性显著增加,而 MDA 与 LDH 水平显著降低( $P < 0.05$ ),与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组相比其细胞凋亡率明显降低,槲皮素能有效增加 PTEN 并减少 p-Akt、Bcl-2 的表达。结论 中、高剂量槲皮素能有效保护 HUVEC 细胞使其免受 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的损害,该作用可能与其作用 PTEN-Akt 通路从而抑制内皮细胞凋亡有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Quercetin Inhibiting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Induced-Apoptosis of Vascular Endothelial Cells by Regulating PTEN-Akt Pathway

LI Yue-Yan, and QUAN Zhi-Hua

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Quercetin; Oxidative Stress; Endothelial Cells; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate protective effect of Quercetin (Que) on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) from oxidative stress injury in rats and its mechanism. **Methods** Oxidative stress model of HUVEC was established by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Then, MTT assay was used to investigate the cell proliferation ability. The content of lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) were determined by kits. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. The protein expression of PTEN, Akt, phospho-Akt and Bcl-2 were detected by Western Blot. **Results** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can decrease HUVEC survival, while 10, 20 μmol/L Que significantly increase cell viability ( $P < 0.05$ ); Que treatment can significantly increase SOD activity, while significantly decrease MDA and LDH levels ( $P < 0.05$ ), and reduce their rate of apoptosis compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment group. Finally, Que can effectively increase PTEN and reduce p-Akt, Bcl-2 expression. **Conclusion** High-dose Que can effectively protect HUVEC cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damage; this effect may be related to the role of PTEN-Akt pathway by inhibiting endothelial cell apoptosis.

血管内皮细胞与循环血液直接接触,易受血液中活性物质的影响,因而血管内皮细胞损伤是多种血管性疾病的关键环节。如何避免血液中所包含的氧自由基、氧化型胆固醇等活性物质对内皮细胞的损害就具有极其重要的意义<sup>[1]</sup>。近年来通过流行病学调查研究发现,经常食用富含黄酮类化合物的食物,如大豆、茶叶、红酒等的人群其罹患心血管疾病的几率低于其他人群,进一步的研究证实,多种黄酮类化合物在其中发挥了重要的作用,如金雀

异黄素、白杨素、槲皮素等<sup>[2]</sup>。槲皮素(quercetin, Que)是一种存在于水果、蔬菜和谷物等植物中的植物源性黄酮类化合物。已有研究表明,槲皮素具有多种生物学功能,如:抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗菌等<sup>[3,4]</sup>。然而,其抗氧化作用分子机制仍有待阐明。为了阐明槲皮素在血管内皮细胞氧化应激保护作用中的机制,本研究通过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用于血管内皮细胞,建立血管内皮细胞损伤模型,并检测槲皮素处理后对血管内皮细胞的细胞增殖、凋亡、氧化应激相

[收稿日期] 2013-08-25

[作者简介] 李跃艳,硕士研究生,副主任医师,主要研究方向为动脉粥样硬化的防治,E-mail 为 confyang@sina.com。通讯作者全智华,博士,教授,硕士研究生导师,主要研究方向为冠心病心肌缺血的防治。

关分子及相关信号通路的变化,以期对槲皮素保护内皮细胞的作用与机制进行初步探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料与试剂

细胞培养用小牛血清、DMEM 培养基购自 Gibco 公司;MTT 购自 Sigma 公司;二甲基亚砜(DMSO) 购自 Amresco 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂、ECL 发光试剂购自 Pierce 公司;PTEN、p-Akt、Akt、Bcl-2、 $\beta$ -actin 及二抗均购自 Santa cruz 公司。槲皮素购自美国 Sigma 公司,纯度大于 98%,以 0.2 mmol/L 溶于 DMSO 中(DMSO 终浓度 < 0.1%)。乳酸脱氢酶(LDH) 细胞毒性检测试剂盒购自碧云天公司,丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

### 1.2 细胞与细胞培养

人脐静脉内皮细胞(HUVEC) 株购自中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC),用含 10% 小牛血清(FCS) 的 DMEM 培养基培养,常规培养于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中,取对数生长期细胞用于实验。

### 1.3 实验分组

实验分为 5 组:(1)空白对照组;(2)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组(0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>);(3)低剂量槲皮素组(5  $\mu$ mol/L 槲皮素 + 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>);(4)中剂量槲皮素组(10  $\mu$ mol/L 槲皮素 + 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>);(5)高剂量槲皮素组(20  $\mu$ mol/L 槲皮素 + 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。

### 1.4 MTT 法检测细胞活性

取 HUVEC 细胞悬液,以  $2 \times 10^4$ /孔的密度接种于 96 孔板,每孔 200  $\mu$ L,待细胞贴壁后加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激细胞 4 h 后换液,再加入 20  $\mu$ L 不同浓度槲皮素继续培养,溶媒对照组加入相同体积含终浓度为 0.1% DMSO 的完全培养基,每组设 6 个复孔,分别处理 24、48、72 h。在培养结束前 4 h 每孔加入 5 g/L 的 MTT 20  $\mu$ L,移除培养液后每孔加入 DMSO 100  $\mu$ L,待显色后在酶标仪(EX-800 型)上检测 570 nm 波长吸光值(A 值),计算细胞存活率,以上实验重复 3 次以上。

### 1.5 LDH、SOD 及 MDA 活性测定

按 LDH 细胞毒性检测试剂盒及 MDA、SOD 检测试剂盒说明书所述方法,分别测定细胞培养液或细胞中 LDH、SOD 和 MDA 的浓度。

### 1.6 流式细胞术测细胞凋亡率

收集经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后的 HUVEC, PBS 吹打细胞

成单细胞悬液,离心,冰冷 PBS 洗 2 遍,4℃ 的 70% 乙醇固定 24 h,经 FITC-PI 染色后,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

### 1.7 Western Blot 检测相关蛋白表达

收集经不同处理细胞后,冷 PBS 洗 3 次,用细胞裂解液(0.1 mmol/L NaCl, 0.01 mmol/L Tris-Cl, 1  $\mu$ mol/L EDTA, 1  $\mu$ mol/L Aprotinin 和 100  $\mu$ mol/L PMSF) 冰上裂解 20 min 后,4℃、13000  $\times$  g 离心 10 min,取上清,按 BCA 蛋白定量试剂盒所述方法对蛋白进行定量。取蛋白样品(25  $\mu$ g 总蛋白/泳道) 加入适量上样缓冲液,100℃ 煮沸 5 min,10% SDS-PAGE 胶电泳后转移至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 于 4℃ 封闭过夜后,分别加入相应一抗抗体于 37℃ 孵育 2 h 或 4℃ 过夜;TBST 洗涤 30 min,期间每 10 min 换液 1 次,再加入相应的二抗 37℃ 孵育 1 h 后,TBST 洗涤 15 min/次,共洗 3 次后加入发光试剂于暗室中压片,显影、定影。

### 1.8 统计学处理

各组实验均重复 3 次以上,实验数据采用 SPSS 13.0 统计分析软件处理,以 One-way ANOVA 及 Student t test 方法进行检验,所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 槲皮素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用后 HUVEC 细胞活性的影响

与空白对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组 HUVEC 细胞活力显著下降,提示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HUVEC 具有损伤作用;而给予不同浓度槲皮素处理后,细胞活力随槲皮素浓度的增加明显增强( $P < 0.05$ ;表 1),表明槲皮素能部分拮抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对内皮细胞的损伤作用。

表 1. 不同浓度槲皮素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVEC 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1. Effect of different concentrations of quercetin on the viability of HUVEC injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

分 组	细胞活性
空白对照组	1.47 $\pm$ 0.14
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 处理组	0.53 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
低剂量槲皮素组	0.58 $\pm$ 0.11
中剂量槲皮素组	0.82 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
高剂量槲皮素组	1.05 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与空白对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组比较。

## 2.2 槲皮素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 氧化应激的影响

与空白对照组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组 SOD 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而 MDA 及 LDH 含量显著增加 ( $P < 0.05$ ), 提示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导后内皮细胞处于较强的氧化应激状态。在给予中、高剂量槲皮素处理后, 细胞 SOD 活性显著增加, 而 MDA 与 LDH 水平显著降低, 且该变化随槲皮素浓度的增加而逐渐降低 ( $P < 0.05$ )。这表明槲皮素能显著改善 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成的氧化应激反应 (表 2)。

## 2.3 槲皮素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 细胞凋亡的影响

与空白对照组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组细胞凋亡率显著增加 ( $P < 0.05$ ), 提示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能诱导 HUVEC 凋亡。给予 10、20  $\mu\text{mol/L}$  的槲皮素处理后, HUVEC 凋亡率分别由 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组的 37.3%  $\pm$  3.5% 减少

至 26.5%  $\pm$  2.7% 和 13.7%  $\pm$  2.4% ( $P < 0.05$ , 图 1), 表明槲皮素对 HUVEC 发挥保护作用可能与减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致的细胞凋亡有关。

表 2. 槲皮素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 分泌 MDA、SOD 和 LDH 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2. Effect of quercetin on the levels of MDA, SOD and LDH in HUVEC induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

分 组	MDA (mmol/L)	SOD (U/L)	LDH (U/L)
空白对照组	0.49 $\pm$ 0.05	0.67 $\pm$ 0.08	22.4 $\pm$ 3.4
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 处理组	1.43 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	79.6 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>
低剂量槲皮素组	1.17 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	65.1 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>
中剂量槲皮素组	1.03 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	0.39 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	47.3 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>
高剂量槲皮素组	0.57 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.52 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	26.4 $\pm$ 3.8 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与空白对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组比较。

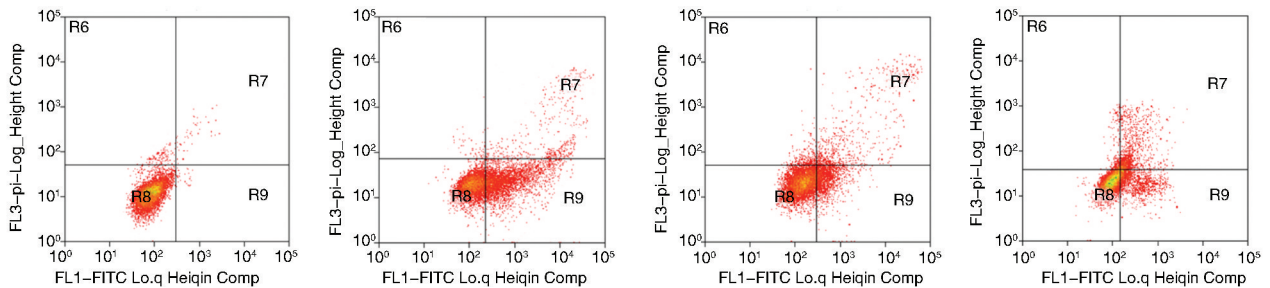


图 1. 槲皮素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 凋亡的影响 从左到右依次为空白对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组、中剂量槲皮素组和高剂量槲皮素组。

Figure 1. Effect of quercetin on the cell apoptosis in HUVEC injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## 2.4 槲皮素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

各处理组的总 Akt 表达无显著差异, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后 p-Akt、Bcl-2 明显升高, PTEN 明显降低, 而用 10 或 20  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素处理能有效减少 p-Akt、Bcl-2 的表达并增加 PTEN 的表达 (图 2)。表明槲皮素减少 HUVEC 细胞凋亡与 PTEN-Akt 通路有关。

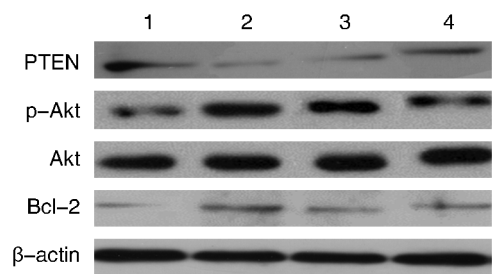


图 2. 槲皮素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 1 为空白对照组, 2 为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组, 3 为中剂量槲皮素组, 4 为高剂量槲皮素组。

Figure 2. Effect of quercetin on the cell apoptosis regulatory proteins expression in HUVEC induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## 3 讨论

自由基是生物体内的正常代谢产物, 随着对自由基研究的逐步深入, 科学家们越来越清楚地认识到, 当体内自由基过量和/或失衡时, 可能导致心脑血管疾病、炎症、衰老等。清除多余自由基有益于某些疾病的预防和治疗, 因而自由基清除剂的研究对人体健康的意义便显得更为重大。槲皮素作为黄酮类化合物的一种, 近年来对其功能研究日益增多, 如有研究发现, 槲皮素可呈剂量与时间效应关

系减少 GSH 耗竭<sup>[5]</sup>, 提高抗氧化酶活性, 抑制脂质过氧化来保护大鼠原代肝细胞抗酒精性氧化损伤。赵丽婷等<sup>[6]</sup>发现, 通过饲料补充槲皮素不仅可显著提高大鼠外周血抗氧化能力, 而且能够保护维生素 E 和维生素 C 的活性。这些研究结果均提示我们,

槲皮素对自由基、超氧阴离子等均有良好的清除作用,但其对内皮细胞抗氧化作用并未被完全阐明。

在本研究中我们采用  $H_2O_2$  处理内皮细胞建立氧化应激模型,用以研究槲皮素的抗氧化作用机制。 $H_2O_2$  能产生大量氧自由基引起氧化应激反应,是一种常用的细胞氧化应激诱导剂,广泛用于建立细胞氧化应激反应模型<sup>[7]</sup>。由于细胞凋亡或坏死而造成的细胞膜结构的破坏会导致细胞浆内的酶释放到培养液里,其中包括酶活性较为稳定的 LDH。通过检测从质膜破裂的细胞中释放到培养液中的 LDH 的活性,就可以实现对细胞毒性的定量分析。而 MDA 是毒性作用最大的自由基,因此测定上述分子的含量可间接的反映细胞损伤的程度。SOD 主要存在于胞液和线粒体基质中,是防御生物体氧化损伤的一种十分重要的酶<sup>[8]</sup>。它的作用底物是超氧阴离子自由基  $O_2^{\cdot -}$ , 可将其催化歧化为氧气和过氧化氢。我们的研究发现,槲皮素处理后可使内皮细胞 MDA、LDH 减少, SOD 增加,槲皮素能有效减轻  $H_2O_2$  对内皮细胞的毒性。而进一步的流式细胞术检测结果提示我们,槲皮素的上述保护作用至少部分是通过减少内皮细胞凋亡而实现的。

细胞凋亡是控制细胞过度增殖的一种正常细胞功能,通常情况下血管内皮细胞凋亡是血管病变的始发件,这是因为它不仅可以造成血管内皮结构的损害,还严重地影响内皮细胞的正常功能,削弱了血管内皮在调控血管张力、血管通透性、血流等方面的作用,从而诱发血管病变的发生。研究表明,血管内皮细胞凋亡是受多个基因、多条通路调控的过程,如 Caspase-3、NF- $\kappa$ B、Bax、JNK 等均能介导其凋亡<sup>[9-11]</sup>。霍艳英等<sup>[12]</sup> 通过研究发现, $H_2O_2$  能够以 PTEN 依赖的方式介导永生化的小鼠胚胎成纤维细胞凋亡,在 PTEN<sup>-/-</sup> 细胞中, $H_2O_2$  对细胞凋亡作用明显减弱,提示 PTEN 信号通路在  $H_2O_2$  诱导的细胞凋亡过程中具有重要的作用。因此我们推测,槲皮素可能也能通过影响 PTEN 的表达,进而调控其下游凋亡相关基因的表达,从而达到抑制 HUVEC 凋亡的作用。我们的实验结果也证实, $H_2O_2$  处理后其 PTEN 表达明显降低,p-Akt、Bcl-2 明显升高,而用 10 或 20  $\mu$ mol/L 槲皮素处理能增加 PTEN 的表达并有效降低 p-Akt、Bcl-2 的表达水平。这表明槲皮素能抑制  $H_2O_2$  处理后 HUVEC 细胞内 PTEN 的表达,进而激活 PI3K/Akt 信号通路,Akt 主要作用于抗凋亡通路,持续激活 Akt 能够阻止由 PTEN

介导的凋亡。同时,Akt 还能通过抑制其下游靶蛋白如 Bcl-2 等促凋亡分子的表达,从而抑制  $H_2O_2$  诱导内皮细胞发生凋亡,最终发挥内皮细胞保护作用。

总之,通过本研究我们证实,槲皮素能有效对抗氧化应激所致的内皮细胞凋亡,该功能有利于维持血管内皮细胞的生理功能完整性,可以有有效的减轻内皮细胞受到氧化应激刺激后的各种不良反应,本研究为进一步阐明槲皮素抗氧化应激作用的分子机制提供了理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease[J]. Pflugers Arch, 2010, 459(6): 923-939.
- [2] Gülin. Antioxidant activity of food constituents: an overview [J]. Arch Toxicol, 2012, 86(3): 345-391.
- [3] ibellini L, Pinti M, Nasi M, et al. Quercetin and cancer chemoprevention [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2011, 2011: 1-15.
- [4] 李世正, 张俊华, 董哲. 槲皮素体外抑制乳腺癌细胞侵袭转移及相关机制[J]. 中国现代医学杂志, 2013, (001): 14-17.
- [5] 刘爽, 姚平, 李珂, 等. 槲皮素对大鼠原代肝细胞酒精性氧化损伤的防护作用[J]. 营养学报, 2007, 29(3): 288-291.
- [6] 赵丽婷, 郭长江, 蔡东联, 等. 补充槲皮素对大鼠外周血抗氧化体系的影响[J]. 武警医学院学报, 2009, 18(4): 269-279.
- [7] Heng Y, Liu Y, Ge J, et al. Resveratrol protects human lens epithelial cells against  $H_2O_2$ -induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression[J]. Molecular Vision, 2010, 16: 1467.
- [8] 周晓, 商战平. 槲皮素对内皮素 1 诱导的人脐动脉平滑肌细胞 L 型钙通道表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(3): 261.
- [9] Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease [J]. Apoptosis, 2009, 14(4): 536-548.
- [10] 郝小燕. 脂联素对心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响及内质网应激指标 GRP78、Caspase-12 的表达变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(3): 236-236.
- [11] 胥光热, 彭永权, 林静, 等. 槲皮素对人内皮祖细胞增殖和凋亡的影响及机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(010): 22-28.
- [12] 霍艳英, 付春玲, 苟巧, 等. 过氧化氢以 PTEN 依赖方式介导细胞凋亡[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 4: 304-308.

(此文编辑 许雪梅)