

7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮通过下调 Caspase-3 的表达拮抗 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞凋亡

王莉¹, 李素云¹, 彭田红¹, 何慧¹, 吕运成¹, 符晓华², 曹建国²

(1. 南华大学医学院解剖学教研室, 湖南省衡阳市 421001; 2. 湖南师范大学医学院, 湖南省长沙市 410013)

[关键词] 7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮; Caspase-3; 过氧化氢; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 研究 7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮对 H_2O_2 诱导血管内皮细胞凋亡的影响, 并初步探讨其作用机制。**方法** 用 1 mmol/L H_2O_2 诱导人脐静脉内皮细胞建立氧化应激损伤模型。实验分为空白对照组、 H_2O_2 损伤组、溶媒对照组、先导化合物组(100 μ mol/L 染料木黄酮)、不同浓度(0.1、0.3、1、3、10 μ mol/L) 7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮组。DCFH-DA 激活荧光流式细胞术测定活性氧的生成, 吖啶橙染色荧光显微镜观察细胞凋亡形态, PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blot 测定 Caspase-3 的表达。**结果** 1 mmol/L H_2O_2 孵育血管内皮细胞 24 h, 活性氧的生成显著增加, 吖啶橙染色荧光显微镜下细胞呈现明显的凋亡形态学改变, 细胞凋亡率升高, Caspase-3 的表达上调。用 7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮预处理血管内皮细胞后可见活性氧的生成减少, 细胞凋亡率降低, Caspase-3 的表达下调。**结论** 7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮对 H_2O_2 诱导血管内皮细胞凋亡有明显的抑制作用, 其作用机制可能是通过降低活性氧的生成, 下调 Caspase-3 的表达, 从而拮抗 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞凋亡。

[中图分类号] R966

[文献标识码] A

The anti-apoptotic effects of 7-difluoromethyl-5,4'-dimethoxygenistein on vascular endothelial cells induced by H_2O_2 through down-regulating the expression of Caspase-3

WANG Li¹, LI Su-Yun¹, PENG Tian-Hong¹, HE Hui¹, LV Yun-Cheng¹, FU Xiao-Hua², CAO Jian-Guo²

(1. Department of Anatomy, College of Medicine, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. College of Medicine, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410013, China)

[KEY WORDS] 7-difluoromethyl-5,4'-dimethoxygenistein; Caspase-3; H_2O_2 ; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of 7-difluoromethyl-5,4'-dimethoxygenistein (dFMGEN) on the apoptosis to H_2O_2 -induced vascular endothelial cells and its molecular mechanism. **Methods** The oxidative stress injury model was established by human umbilical vein endothelial cells induced by 1 mmol/L H_2O_2 . The experiment was divided into blank control group, H_2O_2 group, vehicle group, 100 μ mol/L genistein group and different concentrations (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ mol/L) dFMGEN groups. The reactive oxygen species (ROS) generation was examined by DCFH-DA activated fluorescence flow cytometry (FCM). Apoptotic morphology was observed by acridine orange staining under fluorescence microscopy. The apoptotic rate was detected by PI staining FCM. The expression of Caspase-3 was determined by Western blot. **Results** When vascular endothelial cells were treated with 1 mmol/L H_2O_2 for 24 h, the generation of ROS was highly added, obvious morphological changes of apoptosis was found by acridine orange staining under fluorescence microscopy, the apoptotic rate was increased and the expression of Caspase-3 was up-regulated. After pretreating with dFMGEN, results showed that dFMGEN could reduce the release of ROS, decrease the apoptotic rate and down-regulate the expression of Caspase-3. **Conclusion** dFMGEN can effectually inhibit the apoptosis of vascular endothelial cells induced by H_2O_2 , which is probably due to the decrease of ROS generation and downregulation of Caspase-3, thereby inhibiting apoptosis of vascular endothelial cells induced by H_2O_2 .

[收稿日期] 2017-07-05

[修回日期] 2017-11-09

[基金项目] 湖南省教育厅科研资助项目(10C1178)

[作者简介] 王莉, 硕士, 副教授, 主要从事药物筛选及作用机制的研究, E-mail 为 wangli179@sina.com。

细胞凋亡是细胞死亡形式之一,是受多种基因调控的主动过程。在血管内皮受损和早期动脉粥样硬化斑块,可见血管内皮细胞凋亡,内皮细胞凋亡可能是动脉粥样硬化过程中的早期重要事件^[1]。大量研究表明,氧化应激产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)能够导致细胞凋亡^[2-3]。染料木黄酮是大豆异黄酮的主要成分,具有抗动脉粥样硬化的作用^[4]。但是,由于溶解性差、肠道吸收少以及体内代谢迅速导致其活性较低而限制了它的临床应用^[5]。我们以染料木黄酮为先导化合物,合成了一种活性新化学实体即7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮(7-difluoromethyl-5,4'-dimethoxygenistein, dFMGEN)^[6]。前期研究证明,dFMGEN对氧化诱导的血管内皮细胞与单核细胞黏附具有明显的抑制作用^[7]。为进一步研究dFMGEN的抗氧化应激损伤保护作用,本研究通过观察dFMGEN对H₂O₂诱导的血管内皮细胞ROS的生成及细胞凋亡的影响,初步探讨其作用机制是否涉及Caspase-3的表达调节。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

dFMGEN由本实验室制备^[6]。染料木黄酮、VitE购自美国Sigma公司;DMEM培养基购自美国Gibco公司;H₂O₂购自广东光华化学厂有限公司;ROS检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;吖啶橙购自美国Amresco公司;兔抗人Caspase-3多抗、辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG抗体购自武汉博士德公司;实验中所用其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 细胞培养

人脐静脉内皮细胞(HUVEC-12,编号CRL-2480)来自北京大学医学院肿瘤研究所(来源于ATCC细胞库),用含10%新生牛血清的DMEM培养基培养;取对数生长期细胞用于实验。

1.3 实验分组

实验分为6组:①空白对照组:加入DMEM培养基;②H₂O₂损伤组:加入1 mmol/L H₂O₂;③溶媒对照组:在加入1 mmol/L H₂O₂前30 min加入终浓度为0.01%的DMSO;④先导化合物组:在加入1 mmol/L H₂O₂前30 min加入100 μmol/L染料木黄酮;⑤dFMGEN组:在加入1 mmol/L H₂O₂前30 min分别加入0.1、0.3、1、3、10 μmol/L dFMGEN;

⑥阳性药物组:在加入1 mmol/L H₂O₂前30 min加入50 μmol/L VitE。

1.4 ROS的测定

细胞培养至汇合率达80%左右时,弃原培养基,换含1%新生牛血清的DMEM培养基,同时按上述实验分组处理细胞,继续孵育24 h。收集细胞,0.25%胰蛋白酶消化后,用无血清的DMEM培养基吹打,制成单细胞悬液,1000 r/min离心5 min。弃上清液,用1 mL无血清的DMEM培养基重悬细胞,并转入1 mL EP管中,再用1000 r/min离心5 min。弃上清液,用稀释好的荧光探针DCFH-DA重悬细胞,每支EP管加入1 mL,调节细胞浓度为 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^{10}$ /L,置细胞培养箱中孵育20 min后用无血清的DMEM培养基洗涤3次,然后上流式细胞仪检测。

1.5 吖啶橙染色荧光显微镜观察细胞凋亡形态

取对数生长期的HUVEC-12细胞,以 1×10^8 /L接种于24孔培养板,每孔加1 mL单细胞悬液,置细胞培养箱中培养4 h,待细胞贴壁后按上述实验分组处理细胞,每组设3个复孔。孵育24 h后终止,0.25%胰蛋白酶消化后,用无血清的DMEM培养基配成单细胞悬液,取25 μL单细胞悬液与2 μL吖啶橙储存液(0.1 g/L吖啶橙/PBS)混匀,在室温下孵育5 min。取10 μL滴于载玻片上铺匀,在荧光显微镜下观察细胞形态的改变。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

培养HUVEC-12细胞至汇合率达80%左右时,弃原培养基,换含1%新生牛血清的DMEM培养基,同时按上述实验分组处理细胞,继续孵育24 h。收集细胞,0.25%胰蛋白酶消化后,用含10%新生牛血清的DMEM培养基吹打,制成单细胞悬液,4℃、1000 r/min离心5 min。弃上清液,冷PBS重悬再离心,4℃、1000 r/min离心5 min,如此重复两次。用50 μL PBS将细胞制成单细胞悬液,移入1 mL冷70%乙醇中固定,PI染色上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.7 Western blot 测定Caspase-3的表达

培养HUVEC-12细胞至汇合率达80%左右时,弃原培养基,换含1%新生牛血清的DMEM培养基,同时按空白对照组、H₂O₂损伤组、10 μmol/L dFMGEN组处理细胞,30 min后再加入1 mmol/L H₂O₂,收集H₂O₂处理4 h、8 h、24 h的细胞,用细胞裂解液裂解,4℃、12000 r/min离心10 min,用BCA试剂进行蛋白定量。取提取的蛋白样品(40 μg总蛋白/泳道)加入等体积上样缓冲液,100℃煮5 min,

10%SDS-PAGE 电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜上。用含 5%脱脂牛奶的 TBST 室温下封闭 2 h,1 : 200 加入 Caspase-3 一抗于 4℃ 过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入相应的二抗室温孵育 1 h 后,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。然后在含化学发光剂 A、B 的溶液中激发荧光,于暗室中压片、显影、定影。结果用图像分析仪分析,以面积和光密度的乘积为积分光密度表示。

1.8 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,多组间比较采用 One-way ANOVA 分析,两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 dFMGEN 对 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞 ROS 生成的影响

空白对照组细胞内 ROS 含量低,平均荧光强度只有 5.15 ± 0.17 ,而 1 mmol/L H_2O_2 损伤 24 h 后,细胞内 ROS 显著增加,平均荧光强度达 13.00 ± 0.49 。dFMGEN 能有效降低 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞内 ROS 含量增加,且呈浓度依赖性。染料木黄酮、VitE 也能抑制 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞 ROS 释放,100 $\mu\text{mol/L}$ 染料木黄酮的效价强度近似于 3 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN,50 $\mu\text{mol/L}$ VitE 的效价强度近似于 10 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN,说明 dFMGEN 的作用强于先导化合物染料木黄酮和阳性对照药 VitE(图 1)。

2.2 dFMGEN 对 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞凋亡的影响

吖啶橙染色荧光显微镜下,空白对照组细胞形态正常,细胞核发出黄绿色均匀荧光; H_2O_2 损伤组细胞呈现明显的凋亡形态学改变,细胞内可见致密浓染的黄绿色荧光,甚至可见黄绿色碎片;10 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 预处理后,凋亡细胞明显减少,其效果好于先导化合物染料木黄酮(图 2)。

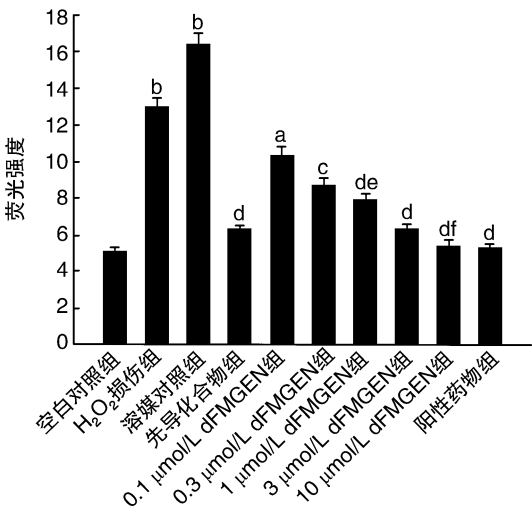


图 1. dFMGEN 对 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞 ROS 生成的影响($n=3$) a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 H_2O_2 损伤组比较; e 为 $P < 0.05$, 与 0.1 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 组比较; f 为 $P < 0.05$, 与 1 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 组比较。
Figure 1. Effect of dFMGEN on ROS generation in vascular endothelial cells induced by H_2O_2 ($n=3$)

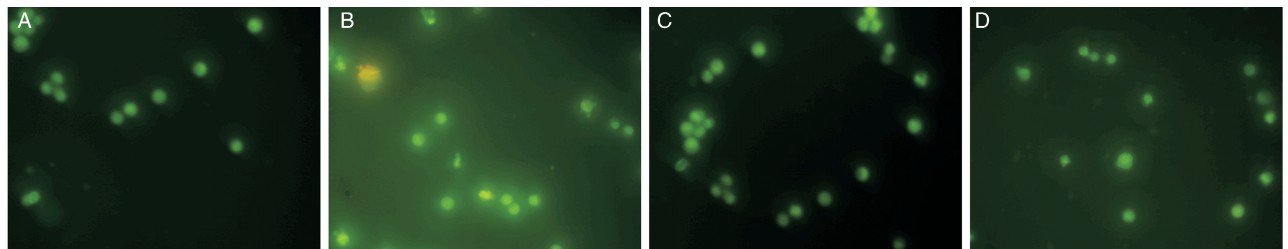


图 2. 吖啶橙染色荧光显微镜观察 dFMGEN 对 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞凋亡的影响(10×20) A 为空白对照组, B 为 H_2O_2 损伤组, C 为 10 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 组, D 为先导化合物组。
Figure 2. Effect of dFMGEN on the apoptotic morphology in vascular endothelial cells induced by H_2O_2 was observed by acridine orange staining under fluorescence microscopy(10×20)

2.3 dFMGEN 对 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞凋亡率的影响

PI 染色流式细胞术检测结果显示,1 mmol/L H_2O_2 与血管内皮细胞孵育 24 h 后能明显诱导细胞凋亡($14.73\% \pm 0.58\%$ 比 $2.48\% \pm 0.32\%$, $P < 0.01$)。0.1、0.3、1、3 及 10 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 预处理细胞后,

细胞凋亡率依次降低为 $7.33\% \pm 0.47\%$ 、 $5.70\% \pm 0.35\%$ 、 $4.11\% \pm 0.37\%$ 、 $3.43\% \pm 0.23\%$ 、 $2.65\% \pm 0.19\%$ 。染料木黄酮、VitE 也能抑制 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞凋亡,但 dFMGEN 的效价强度高于先导化合物染料木黄酮和阳性对照药 VitE(图 3)。

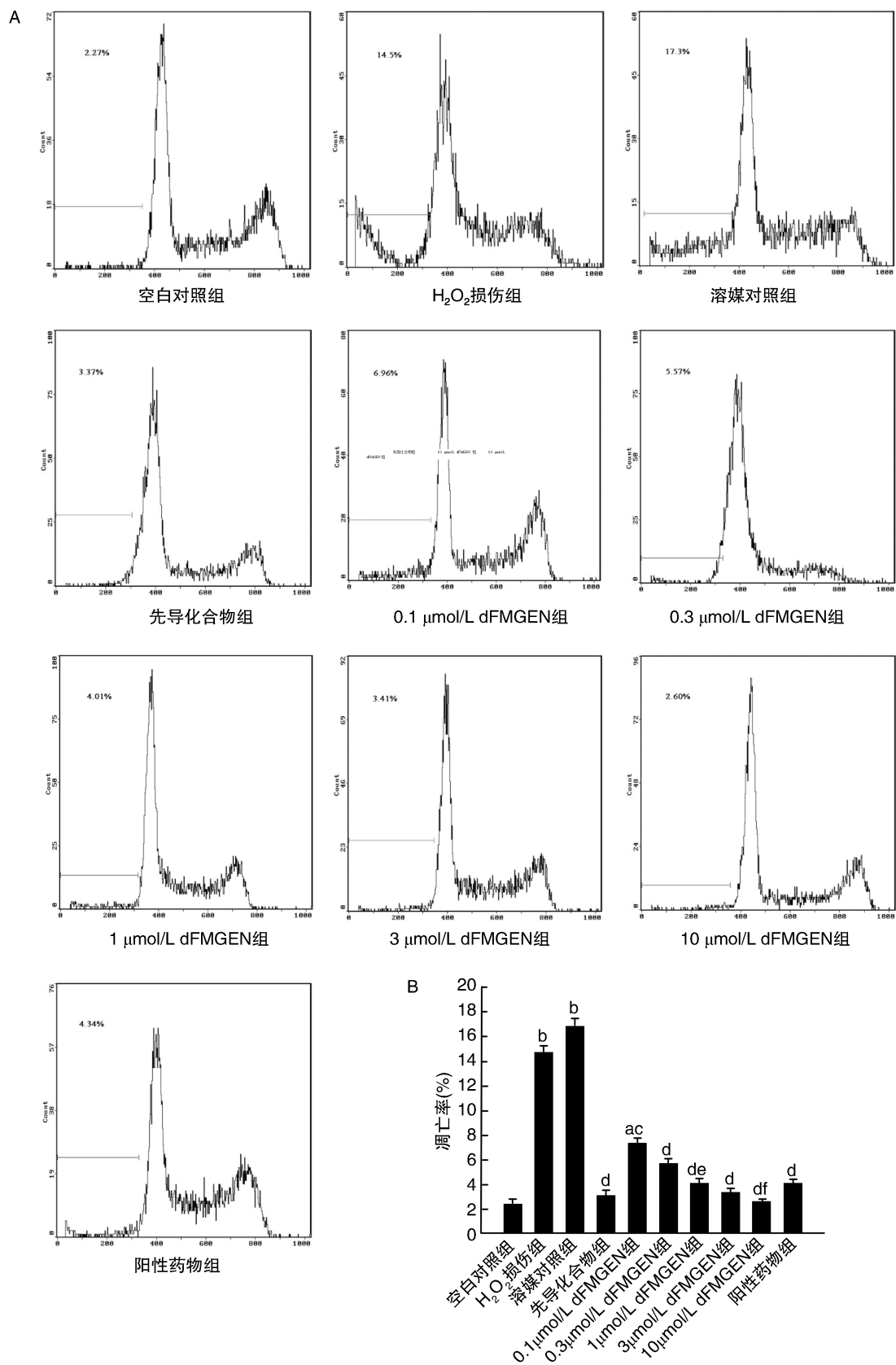


图 3. dFMGEN 对 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞凋亡率的影响 (n=3) A 为各组 PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡率的代表性流式图,B 为细胞凋亡率的统计图。a 为 P<0.05,b 为 P<0.01,与空白对照组比较;c 为 P<0.05,d 为 P<0.01,与 H₂O₂ 损伤组比较;e 为 P<0.05,与 0.1 μmol/L dFMGEN 组比较;f 为 P<0.05,与 1 μmol/L dFMGEN 组比较。

Figure 3. Effect of dFMGEN on the apoptotic rate in vascular endothelial cells induced by H₂O₂(n=3)

2.4 dFMGEN 对 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞 Caspase-3 表达的影响

正常状态下 Caspase-3 以无活性的酶原形式 pro-Caspase-3 (分子量为 32 kDa) 存在,细胞发生凋亡时,Caspase-3 被激活而出现断裂带(分子量为 17 kDa)。空白对照组 Caspase-3 非活性前体条带较强,而活性亚单位条带较弱;H₂O₂ 损伤组 Caspase-3 活性亚单位条带明显增强,说明 Caspase-3 活性增高。10 μmol/L dFMGEN 预处理细胞 4 h、8 h 和 24 h 后,Caspase-3 的表达下调,其作用呈时间依赖性(图 4)。

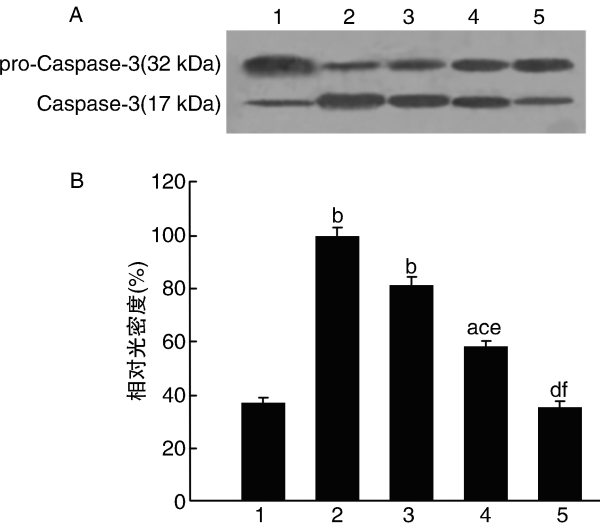


图 4. dFMGEN 对 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞 Caspase-3 表达的影响(n=3) A 为 Western blot 检测 Caspase-3 蛋白表达, B 为蛋白表达相对光密度的统计图。1 为空白对照组,2 为 H₂O₂ 损伤组,3~5 分别为 10 μmol/L dFMGEN 处理 4 h、8 h、24 h 组。a 为 P<0.05,b 为 P<0.01,与空白对照组比较;c 为 P<0.05,d 为 P<0.01,与 H₂O₂ 损伤组比较;e 为 P<0.05,与 10 μmol/L dFMGEN 处理 4 h 组比较;f 为 P<0.05,与 10 μmol/L dFMGEN 处理 8 h 组比较。

Figure 4. Effect of dFMGEN on the expression of Caspase-3 in vascular endothelial cells induced by H₂O₂(n=3)

3 讨论

血管内皮细胞具有多种生理功能,参与机体的物质转运、免疫、凝血和生物活性物质的释放等生命活动。血管内皮受损是许多心血管疾病的病理基础。在病理情况下,如动脉粥样硬化^[8]、高血压^[9]等均可导致内皮细胞结构和功能的改变,并且内皮细胞在相应病理过程的发生发展中也起着重要作用。目前被普遍接受的 Ross 修正的“损伤反应”学说认为,内皮细胞损伤和内皮细胞功能紊乱

是动脉粥样硬化形成早期的始动环节^[10]。血管内皮损伤和功能紊乱与机体和局部组织抗氧化能力降低,氧自由基产生增多而氧化灭活一氧化氮有关。

众多研究表明,氧自由基及其衍生物与细胞凋亡密切相关^[11-14]。例如,一定浓度的 H₂O₂ 能诱导某些类型的细胞(如血管内皮细胞、HepG2 细胞)凋亡,超氧阴离子可诱导支气管上皮细胞凋亡,过氧亚硝基自由基可诱导 PC12 细胞凋亡等。本研究发现,dFMGEN 可明显抑制 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞 ROS 生成,进而拮抗细胞凋亡,且作用呈浓度依赖性,说明 dFMGEN 通过其抗氧化作用保护血管内皮。先导化合物染料木黄酮和阳性药物 VitE 也均能抑制 H₂O₂ 诱导血管内皮细胞 ROS 的释放及细胞凋亡,但 dFMGEN 的效价强度高于染料木黄酮和 VitE。

Caspase 全称为含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶,它是一组存在于细胞质中具有类似结构的蛋白酶。Caspase 与真核细胞凋亡密切相关,并参与细胞的生长、分化与凋亡调节。Caspase 酶原的活性很低,需要切除氨基端的一段序列才能被激活,活化的 Caspase 能够特异地水解一套蛋白底物,从而导致细胞凋亡。Caspase 成员较多,其中 Caspase-3 在细胞凋亡的执行期发挥关键作用,并与凋亡的形态学特征密切相关^[15]。Mallat 等^[16]从患者的动脉粥样硬化斑块中检测出 Caspase-3 的免疫活性较正常血管壁明显增强,且 Caspase-3 的表达定位于 TUNEL 阳性部位(即凋亡的平滑肌细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞)。本研究结果显示 H₂O₂ 可诱导血管内皮细胞 Caspase-3 活化。dFMGEN 可下调 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞 Caspase-3 的表达,提示 dFMGEN 可能通过降低 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞 ROS 产生阻断死亡受体和线粒体凋亡信号转导途径,下调 Caspase-3 活性,从而拮抗 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞凋亡。

综上所述,dFMGEN 对 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞凋亡有明显的抑制作用,其作用机制可能与调控 Caspase-3 的表达有关。这一研究结果进一步证实 dFMGEN 作为一种活性新化学实体,具有血管内皮氧化应激损伤保护作用,为研制心血管疾病防治新型药物提供了实验依据。

[参考文献]

[1] Lovren F, Verma S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction[J]. Clin Chem, 2013, 59(8): 1 166-174.

- [2] Tang L, Cheng JN, Long Y, et al. PCB 118-induced endothelial cell apoptosis is partially mediated by excessive ROS production[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2017, 27(5): 394-399.
- [3] Li L, Tan H, Yang H, et al. Reactive oxygen species mediate heat stress-induced apoptosis via ERK dephosphorylation and Bcl-2 ubiquitination in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(8): 12 902-916.
- [4] 杨秀, 张黎明. 染料木黄酮抗动脉粥样硬化的研究进展[J]. *医学综述*, 2013, 19(13): 2 328-330.
- [5] Chang YC, Naci MG, Nitiss JL. Metabolites of daizein and genistein and their biological activities [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58(12): 1 901-905.
- [6] Fu XH, Wang L, Zhao H, et al. Synthesis of genistein derivatives and determination of their protective effects against vascular endothelial cell damages caused by hydrogen peroxide[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(2): 513-517.
- [7] 王莉, 李严兵, 彭田红, 等. 7-二氟亚甲基-5,4'-二甲氧基染料木黄酮通过下调核因子 κ B 和磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 的表达抑制血管内皮细胞与单核细胞的黏附[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(1): 11-14.
- [8] 张妮, 曹慧敏, 宋囡, 等. 丹参酮 II A 通过调节自噬小体对 ox-LDL 诱导内皮细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(3): 244-249.
- [9] 李晓燕, 公雪, 张红明, 等. 奥美沙坦对高血压合并冠心病和糖尿病患者血管内皮功能的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(2): 181-185.
- [10] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 801-809.
- [11] Ma Y, Li W, Yin Y, et al. AST IV inhibits H_2O_2 -induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis by suppressing NOX4 expression through the TGF- β 1/Smad2 pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(6): 1 667-674.
- [12] Luo Y, Wen X, Wang L, et al. Identification of microRNAs involved in growth arrest and apoptosis in hydrogen peroxide-treated human hepatocellular carcinoma cell line HepG2[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 7530853.
- [13] Antognelli C, Gambelunghe A, Talesa VN, et al. Reactive oxygen species induce apoptosis in bronchial epithelial BEAS-2B cells by inhibiting the antiglycation glyoxalase I defence: involvement of superoxide anion, hydrogen peroxide and NF- κ B[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(1): 102-116.
- [14] Wen J, Li H, Zhang Y, et al. Modification of HSP proteins and Ca^{2+} are responsible for the NO-derived peroxynitrite mediated neurological damage in PC12 cell[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 4 492-502.
- [15] Choudhary GS, Al-Harbi S, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1219: 1-9.
- [16] Mallat Z, Ohan J, Lesèche G, et al. Colocalization of CPP-32 with apoptotic cells in human atherosclerotic plaques[J]. *Circulation*, 1997, 96(2): 424-428.
- (此文编辑 文玉珊)