

二苯乙烯苷抑制过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡*

佟 丽 张彩平 龙石银 乔新惠 黄良珠 高细强 田 英[△]

(南华大学生化与分子生物学教研室 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的:研究二苯乙烯苷(TSG)对过氧化氢(H₂O₂)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)凋亡的保护作用。方法:运用四甲基偶氮唑盐还原法(MTT法)和流式细胞术筛选建立细胞凋亡模型的H₂O₂合适浓度以及检测不同浓度TSG对H₂O₂诱导HUVECs的增殖率和凋亡率;Hoechst33258染色观察细胞凋亡形态。结果:MTT及流式法筛选300μmol/L为H₂O₂作用于细胞的最适凋亡浓度。MTT和流式结果显示,与H₂O₂(300μmol/L)损伤组比较,10μmol/L与100μmol/L TSG预处理组细胞的增殖率增加(P<0.05),凋亡率显著降低(P<0.01);Hoechst33258染色观察TSG能降低H₂O₂诱导的细胞凋亡,使细胞凋亡数减少。结论:TSG能抑制H₂O₂诱导的HUVECs凋亡,从而起到保护血管内皮细胞的作用。

关键词 二苯乙烯苷;人脐静脉内皮细胞;细胞凋亡;H₂O₂

中图分类号:R541.4 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)09-1675-05

Effects of TSG on Apoptosis of HUVECs Induced by H₂O₂*

TONG Li, ZHANG Cai-ping, LONG Shi-ying, QIAOXin-hui, HUANG Liang-zhu, GAO Xi-qiang, TIAN Ying[△]

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

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effect of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside (TSG) on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) apoptosis induced by H₂O₂. **Methods:** HUVECs were treated with H₂O₂ (100,200,300,400,500μmol/L) for 24 hours, the optimal concentration of H₂O₂ was selected by MTT and Flow Cytometry. HUVECs were treated with TSG (0.1, 1, 10, 100μmol/L) for 24 hours then exposed to H₂O₂ (100,200,300,400,500μmol/L) for 24 hours, cell viability rates and apoptosis rates of different concentration of TSG pretreatment group were detected by MTT and Flow Cytometry. Morphology of apoptosis and the protective effect of TSG on HUVECs induced by H₂O₂ were detected by Hoechst33258 staining. **Results:** The optimal concentration for H₂O₂ to establish apoptosis model were 300μmol/L. Cell viability rate of TSG pretreatment group (10μmol/L and 100μmol/L) increased (P<0.05) while the apoptosis rate decreased obviously (P<0.01) compared with H₂O₂ group(300μmol/L). TSG reduced the number of HUVECs apoptosis. **Conclusions:** TSG may have a protective effect on HUVECs apoptosis induced by H₂O₂.

Key words: TSG; HUVECs; Apoptosis; H₂O₂

Chinese Library Classification(CLC): R541.4 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)09-1675-05

前言

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性血管炎性病变。血管内皮细胞凋亡在动脉粥样硬化形成过程中起重要作用^[1]。体外氧化应激致内皮细胞凋亡,导致内皮完整性的破坏进而损伤血管和促进动脉粥样斑块形成^[2-3]。因此保护血管内皮药物的研发对于防治As具有重要意义。二苯乙烯苷(2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, TSG)是中药何首乌中提取的具有多酚结构的水溶性活性成分,具有抗氧化、抗炎、降脂、抑制动脉粥样硬化等多种作用^[4-7]。目前对TSG保护血管内皮细胞功能抗As药理作用机制仍在研究中。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人脐静脉内皮细胞株 HUVECs(编号: C-003-5C)购自中国科学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: 110844-200908)。RPMI-1640培养基购自美国 GBICO 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,胰蛋白酶、MTT、DMSO 均购自 Amresco 公司, Hoechst33258 荧光染色液购自碧云天生物技术研究。

1.2 细胞培养及分组

人脐静脉内皮细胞株 HUVECs 接种于无菌培养瓶中,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。显微镜下观察细胞呈单层鹅卵石样排列。待细胞融合度达到 80%左右时,用 0.25%胰蛋白酶消化并传代。每次实验分组前,需用无血清 RPMI-1640 培养基同步化细胞 12h。筛选建立细胞凋亡模型的 H₂O₂ 合适浓度实验分组为空白对照组、不同浓度 H₂O₂ (100、200、300、400 及 500μmol/L)

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30800474),湖南省教育厅项目(08B065, 09C832),湖南省科技厅项目(2010SK3037),湘科条字[2009]130-19)资助

作者简介:佟丽(1976-)女,硕士,研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化,电话:15173440246, E-mail: mailtongli@126.com

△通讯作者:田英, E-mail: uscty@163.com

(收稿日期: 2011-03-05 接受日期: 2011-03-28)

组 ;TSG 保护浓度的实验分组为空白对照组、不同浓度 TSG (0.1、1、10、100μ mol/L)组、选定浓度 H₂O₂ 组(300μ mol/L)。

1.3 MTT 检测细胞增殖活力

取对数生长期的细胞接种在 96 孔板中，待细胞生长至融合度 80%，倾去培养基，PBS 清洗 2 遍，用无血清培养基同步 12h，再换新鲜培养基，按分组要求给予不同的处理因素。培养箱中培养细胞 24 小时后，每孔加 MTT 20μ L(5mg/mL)，培养 4h 后弃上清，加 DMSO150μ L/ 孔，待紫色结晶完全溶解后，用酶联免疫仪在波长 490nm 处测定吸光度值。通过 OD 值计算细胞增殖率。细胞增殖率 (%)= 试验组 OD/ 对照组 OD× 100%。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期细胞接种于培养瓶内，每瓶 5ml。待细胞生长至融合度 80%，倾去培养基，PBS 清洗 2 遍，无血清培养基同步 12h，换新鲜培养基，按分组要求给予不同的处理因素处理 HUVECs24 小时后，用 0.25%的胰蛋白酶消化贴壁细胞，800r/min 离心 5min，去上清，PBS 漂洗 2 遍，离心去 PBS，加入冰预冷的 75%的乙醇固定，4℃ 过夜，PI 单染检测细胞凋亡。

1.5 Hoechst33258 染色观察细胞凋亡形态

取对数生长期细胞接种于 24 孔板内，500μ L/ 孔。在

37℃、5% CO₂ 条件下生长至 80%满，倾去培养基，PBS 清洗 2 遍，无血清培养基同步 12h，换新鲜培养基，按分组要求给予不同的处理因素处理 HUVECs24 小时，每孔用 500μ L 4%多聚甲醛 4℃冰箱固定 6h，倒出固定液后，PBS 清洗 1 遍，每孔加入 Hoechst33258 (10μ g/ml)500μ L，37℃避光摇床上振荡 30 分钟，显微镜观察、摄片。

1.6 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，统计方法采用单因素方差分析(one way ANOVA)及 t 检验。

2 结果

2.1 体外诱导 HUVECs 凋亡H₂O₂ 浓度的筛选

2.1.1 显微镜观察不同浓度的H₂O₂ 诱导 HUVECs 形态变化及 MTT 测定H₂O₂ 对 HUVECs 增殖的影响

显微镜下观察，随着 H₂O₂ 浓度的增大，细胞开始皱缩变圆裂解，细胞数逐渐减少。MTT 结果显示，随 H₂O₂ 处理浓度增加，其增殖抑制作用更加明显，并呈明显的量效关系；不同浓度 H₂O₂ 处理组与空白对照组比较，差异均有显著性(P<0.01)(图 1 表 1)。

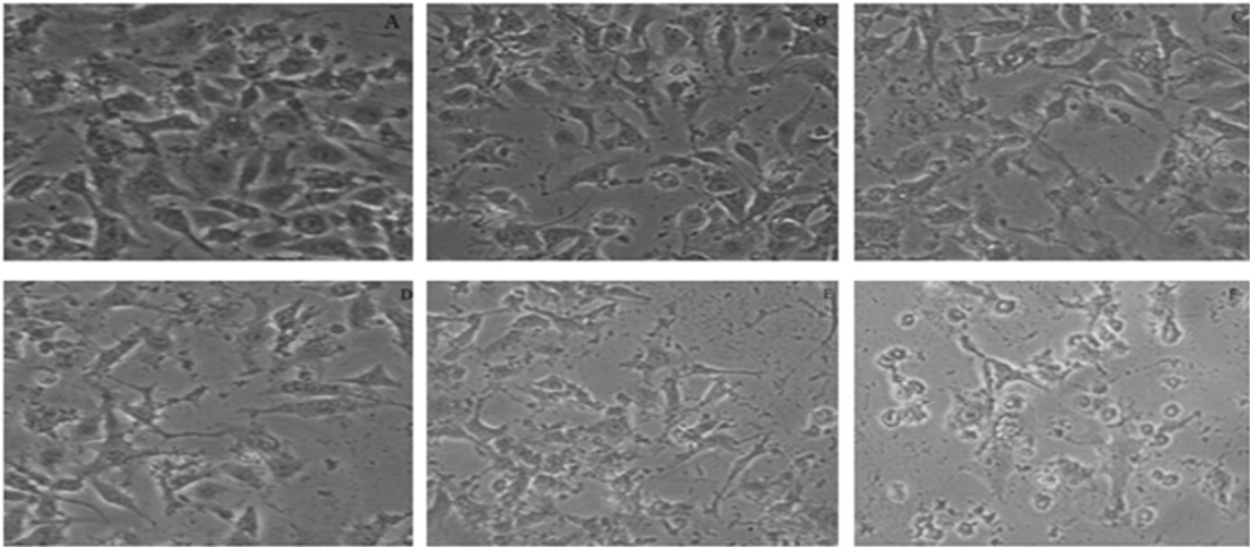


图 1 不同浓度 H₂O₂ 对 HUVECs 增殖的比较(× 100)
A 空白对照组 B :100μ mol/L H₂O₂ 组 ;C 200μ mol/L H₂O₂ 组 ;
D 300μ mol/L H₂O₂ 组 ;E 400μ mol/L H₂O₂ 组 F 500μ mol/L H₂O₂ 组
Fig. 1 Effects of H₂O₂ on HUVECs proliferation(× 100)
A control ;B :100μ mol/L H₂O₂ ;C 200μ mol/L H₂O₂ ;
D 300μ mol/L H₂O₂ ;E 400μ mol/L H₂O₂ ;F 500μ mol/L H₂O₂

表 1 H₂O₂ 对 HUVECs 增殖的影响($\bar{x} \pm s$,n=6)
Table 1 Effects of H₂O₂ on HUVECs proliferation

Group	Absorbance values	Viability rates(%)
Control	1.666± 0.131	100
H ₂ O ₂ 100μmol/L	1.513± 0.157**	89.2
H ₂ O ₂ 200μmol/L	1.349± 0.144**	77.6
H ₂ O ₂ 300μmol/L	1.158± 0.105**	64.1
H ₂ O ₂ 400μmol/L	0.857± 0.060**	42.9
H ₂ O ₂ 500μmol/L	0.683± 0.071**	30.6

2.1.2 流式检测不同浓度的H₂O₂ 诱导 HUVECs 凋亡率

各损伤组的凋亡率随着 H₂O₂ 浓度(100、200、300、400、500μ mol/L)的升高而增加 ,细胞凋亡率分别为 6.3%、14.9%、25.3%、28.8%、33.0%。300μ mol/L、400μ mol/L H₂O₂ 组损伤细

胞明显,且 300μ mol/L H₂O₂ 组 G2/M 期阻滞明显高于对照组和其他各组 ,500μ mol/L H₂O₂ 组凋亡率为 33% ,但 G2/M 期值低于正常值。结合 MTT 实验结果 ,选择 300μ mol/L H₂O₂ 浓度为建立细胞凋亡的最适浓度(图 2)。

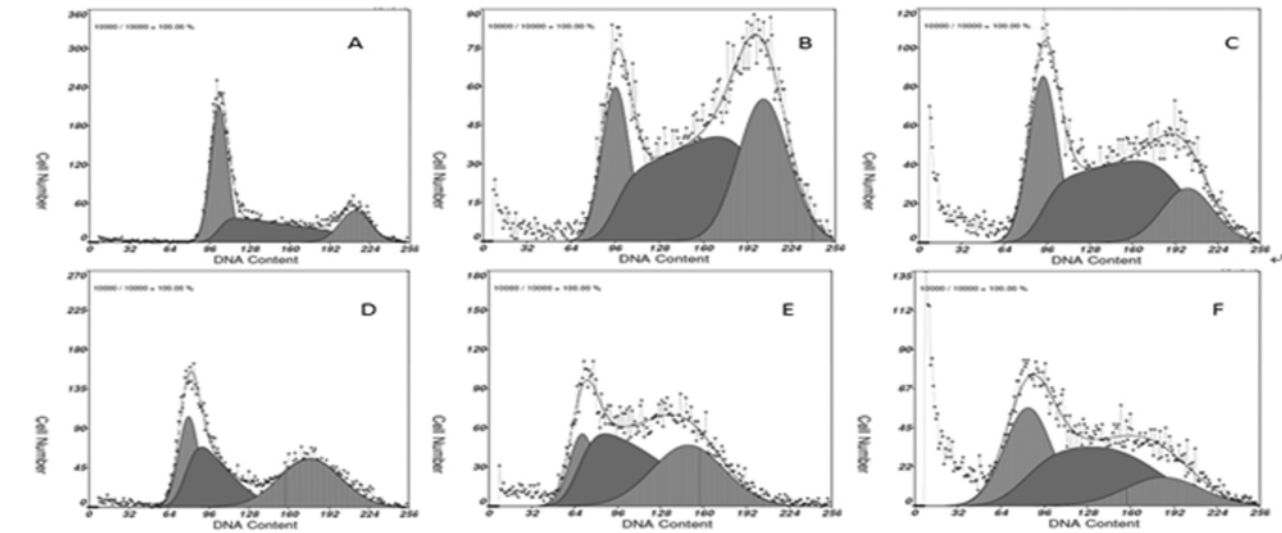


图 2 不同浓度H₂O₂ 诱导 HUVECs 的凋亡率

A 空白对照组 B :100μ mol/L H₂O₂ 组 C 200μ mol/L H₂O₂ 组 ;
D 300μ mol/L H₂O₂ 组 E :400μ mol/L H₂O₂ 组 F: 500μ mol/L H₂O₂ 组 ;
Fig.2 Apoptosis rates of HUVECs induced by different concentration of H₂O₂ group

A control ;B :100μ mol/L H₂O₂ ;C 200μ mol/L H₂O₂ ;
D 300μ mol/L H₂O₂ ; E :400μ mol/L H₂O₂ ; F :500μ mol/L H₂O₂

2.2 二苯乙烯苷对H₂O₂ 诱导 HUVECs 凋亡的保护作用

2.2.1 MTT 检测不同浓度 TSG 单独作用细胞 24h 后的增殖率
选择不同浓度 TSG 单独对细胞作用结果显示 ,不同浓度

的 TSG(0.1、1、10、100μ mol/L)处理细胞 24h 后 ,各组增殖率与空白对照组比 ,差异无统计学意义(P > 0.05)(表 2)。

表 2 TSG 对 HUVECs 增殖的影响($\bar{x} \pm s$, n=6)
Table 2 Effects of TSG on HUVECs proliferation

Group	Absorbance values	Viability rates(%)
Control	0.933± 0.059	100
TSG 0.1μ mol/L	0.941± 0.082	101.0
TSG 1μ mol/L	0.951± 0.056	102.3
TSG 10μ mol/L	0.939± 0.071	100.8
TSG 100μ mol/L	0.921± 0.071	98.6

2.2.2 MTT 检测不同浓度 TSG 对H₂O₂ 诱导 HUVECs 凋亡后增殖的影响

MTT 结果显示 ,与空白组比较 ,各组细胞增殖率均明显下降 ,差异有显著性(P < 0.01) ;与 H₂O₂ 组比 ,10μ mol/L TSG 组与 100μ mol/L TSG 组促增殖作用明显 ,差异具有统计学意义(P < 0.05)(图 3)。

2.2.2 流式检测不同浓度 TSG 预处理后H₂O₂ 诱导 HUVECs 的凋亡率

与 H₂O₂ 组比较 ,不同浓度的 TSG 预处理组均降低 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡率 ,除 0.1μ mol/L TSG 与 300μ mol/L H₂O₂ 无统计学意义外(P > 0.05) ,其它三种浓度的 TSG 与 H₂O₂ 都具有

显著性差异(P < 0.01)(表 3)。

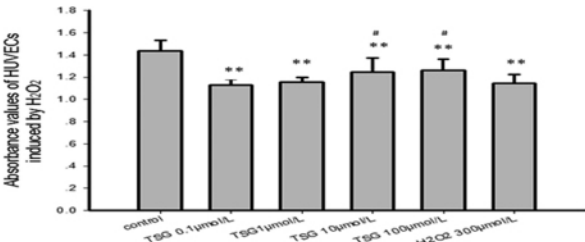


图 3 TSG 对H₂O₂ 损伤的 HUVECs 的保护作用($\bar{x} \pm s$, n=6)

Fig.3 Protective effects of TSG on HUVECs induced by H₂O₂

**P < 0.01 vs control group; #P < 0.05 vs H₂O₂ group.

表 3 不同浓度 TSG 预处理后H₂O₂ 诱导 HUVECs 的凋亡率($\bar{x} \pm s$ n=3)

Table 3 Apoptosis rates of HUVECs induced by H₂O₂ under different concentration of TSG pretreatment group

Group	Apoptosis rates(%)
control	2.51± 0.15
TSG 0.1μ mol/L+ H ₂ O ₂ 300μ mol/L	18.33± 2.60
TSG 1μ mol/L+ H ₂ O ₂ 300μ mol/L	16.16± 1.96 ^{##}
TSG 10μ mol/L+ H ₂ O ₂ 300μ mol/L	15.00± 2.35 ^{##}
TSG 100μ mol/L+ H ₂ O ₂ 300μ mol/L	12.43± 1.37 ^{##}
H ₂ O ₂ 300μ mol/L	22.76± 4.76

##P<0.01vs H₂O₂ group.

2.3 Hoechst33258 染色观察细胞凋亡形态

荧光显微镜下可见 ,正常细胞核出现弥漫均匀的低强度荧光 ; 凋亡细胞的细胞核呈浓染致密的固缩形态及颗粒状荧光 ,

随 TSG 预处理组浓度的增加 ,经 300μ mol/L H₂O₂ 诱导 HU- VECs 凋亡细胞明显减少(图 4)。

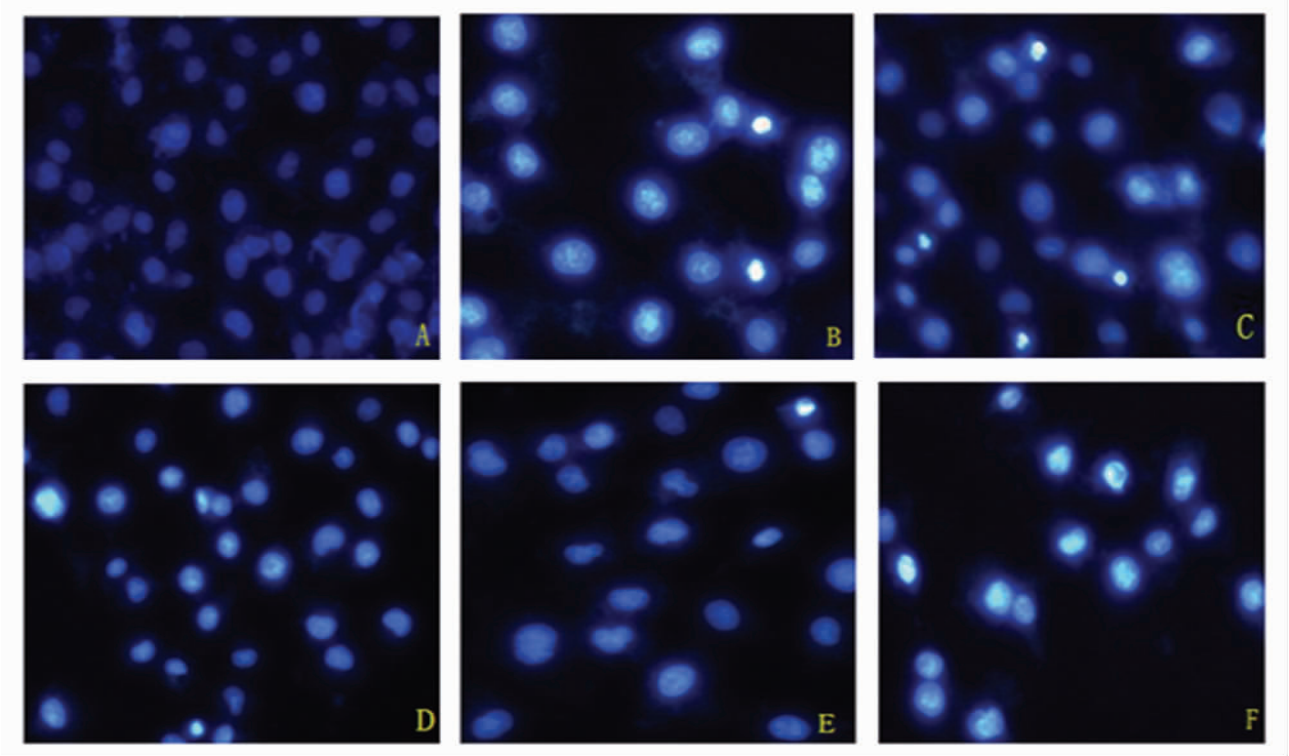


图 4 不同浓度 TSG 对H₂O₂ 诱导 HUVECs 形态的影响

A :空白对照组 B :0.1μ mol/LTSG+ H₂O₂ 组 C :1μ mol/LTSG+ H₂O₂ 组 ;

D :10μ mol/LTSG+ H₂O₂ 组 E :100μ mol/LTSG+ H₂O₂ 组 F :300μ mol/L H₂O₂ 组

Fig.4 Morphology of HUVECs apoptosis induced by H₂O₂ under different concentration of TSG pretreatment group

A :control; B :0.1μ mol/LTSG + H₂O₂; C :1μ mol/LTSG + H₂O₂;

D :10μ mol/LTSG + H₂O₂; E :100μ mol/LTSG + H₂O₂; F :300μ mol/L H₂O₂

3 讨论

生理状态下 ,血管内皮细胞保持正常的增殖和凋亡动态平衡对于维持内皮细胞数量的稳定和血管功能的正常至关重要。但在氧化应激等条件下 ,内皮细胞功能紊乱导致细胞过度凋亡则会促进动脉粥样硬化斑块的糜烂 继发血栓的形成^[8-10]。

从 H₂O₂ 介导内皮细胞凋亡的机制来看 ,H₂O₂ 主要损伤细

胞的膜性结构 ,暴露出来的膜结构成份磷脂酰丝氨酸(PS)^[2]不仅是吞噬细胞识别和吞噬凋亡细胞的靶点 ,同时还引发一系列促进动脉粥样硬化事件。因此 H₂O₂ 作为 ROS 族被认为是诱导细胞凋亡的重要因素 ,可作为细胞内信号转导分子参与细胞凋亡的发生^[11-12]。从体外氧化应激致内皮细胞凋亡的形式发现 ,高浓度 H₂O₂ 可引起细胞坏死 ,低浓度 H₂O₂ 则引起内皮细胞凋亡。因此 ,选择合适的 H₂O₂ 浓度诱导细胞凋亡 ,成功建立内皮

细胞凋亡模型对于体外模拟动脉粥样硬化发病起因尤为重要。本研究结果发现,随着 H_2O_2 浓度的增大 HUVECs 开始皱缩变圆裂解,细胞数逐渐减少;其中 $300\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用 HUVECs 24h 能显著抑制内皮细胞增殖,促进细胞凋亡,因此可选择此浓度作为 H_2O_2 诱导内皮细胞凋亡的最适浓度。

研究报道,TSG 改善血管内皮功能,抑制血栓形成,稳定动脉粥样硬化斑块等非调脂作用可能在动脉粥样硬化的防治中占有更重要的地位^[13-15]。本实验 MTT 结果显示,不同浓度 TSG (0.1 、 1 、 10 、 $100\mu\text{mol/L}$) 单独作用细胞 24h 后对细胞均无细胞毒性作用。与 H_2O_2 模型组相比, $10\mu\text{mol/L}$ 和 $100\mu\text{mol/L}$ TSG 预处理组促增殖作用明显;流式和 Hoechst 染色结果显示,随着 TSG 浓度的增大,凋亡的内皮细胞数目逐渐减少,凋亡率降低。以上结果表明 TSG 能通过抑制 H_2O_2 诱导 HUVECs 凋亡而发挥对血管内皮细胞的保护作用。但 TSG 对于内皮细胞的保护作用机制尚待进一步探讨。

由上可知,TSG 可通过抑制 H_2O_2 诱导 HUVECs 凋亡而保护血管内皮细胞功能,具有防止 As 的作用。

参考文献(References)

- [1] 陈亚平. 血管内皮细胞凋亡与动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国医学工程, 2010, 18(4): 179-180
Chen Ya-ping. Vascular endothelial cells apoptosis and atherosclerosis research progress [J]. China Medical engineering, 2010, 18(4): 179-180
- [2] 李立平, 韦瑛, 蔡捷等. 过氧化氢诱导血管内皮细胞凋亡与 Caspase-3 表达的实验研究[J]. 陕西医学杂志, 2009, 38(8): 960-961
Li Li-ping, Wei Ying, Cai Jie et al. Hydrogen peroxide induced apoptosis in human vascular endothelial cells in vitro and expression of Caspase-3[J]. Journal of Shanxi Medicine, 2009, 38(8): 960-961
- [3] Bonomini F, Tengattini S, Fabian A, et al. Atherosclerosis and oxidative stress[J]. Histol Histopathol, 2008,23(3):381-390
- [4] Ryu G, Ju JH, Park YJ, et al. The radical scavenging effects of stilbene glucosides from Polygonum multiflorum [J]. Arch Pharm Res, 2002,25(5): 636-639
- [5] Wang X, Zhao L, Han T, et al. Protective effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside, an active component of Polygonum multiflorum Thumb, on experimental colitis in mice [J]. Eur J Pharmacol, 2008,578(2-3): 339-348
- [6] Liu QL, Xiao JH, Ma R, et al. Effect of 2,3,5,4'- tetrahydroxystilbene-2-O- β -D- glucoside on lipoprotein oxidation and proliferation of coronary arterial smooth cells [J]. J Asian Nat Prod Res, 2007,9(6-8): 689-697
- [7] Lv LS. Recent Advances on Stilbene Glucoside from Polygonum multiflorum Thumb[J]. Food Science, 2006,27(10): 608-612
- [8] Trostorf F, Landgraf C, Kablau M, et al. Increased endothelial cell apoptosis in symptomatic high-grade carotid artery stenosis: preliminary data[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2007, 33: 65-68
- [9] Sima AV, Stancu CS, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis[J]. Cell Tissue Res,2009,335(1):191-203
- [10] 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
- [11] Wang YK, Hong YJ, Wei M, et al. Curculigoside attenuates human umbilical vein endothelial cell injury induced by H_2O_2 [J]. J Ethnopharmacol, 2010,132(1):233-239
- [12] Siu PM, Wang Y, Always SE. Apoptotic signaling induced by H_2O_2 -mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes[J]. Life Sci, 2009,84(13-14):468-481
- [13] Long Shi-yin, Tian Ru-fang, Cui Hui-hui, et al. Effect of TSG on H_2O_2 induced NF- κ B expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. Journal of University of South China, 2010,38(3):303-306
- [14] Zhang W, Wang YQ, Li F, et al. Effect of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside on expression of ICAM-1, VCAM-1 and VEGF in atherosclerotic rats [J]. Clin Pharm acol Bull, 2007,23(12): 1630-1635
- [15] Lv LS, Gu XH, Tang J, et al. Antioxidant activity of stilbene glycosides from poygonum multiflorim[J]. Food Chemistry, 2007,104(4)