文章编号:1000-5404(2010)23-2507-04

论著

染料木黄酮对叔丁基过氧化氢诱导的内皮细胞凋亡的抑制作用

王 凡*,张 婷*,糜漫天 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市医学营养研究中心,重庆市营养与食品安全重点实验室)

【摘要】 目的 研究染料木黄酮(genistein,Gen)对叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide,t-BHP)诱导的人血管内皮细胞株 *EA. hy*926 凋亡的保护效应并探索其相关分子机制。方法 以 t-BHP 建立氧化应激损伤体外模型,设立空白对照组、Gen 和 t-BHP 处理组,CCK-8 法、流式细胞仪检测 Gen 对内皮细胞活力、凋亡的影响;Western blot 法检测 Gen 对内皮细胞 Caspase-3 表达和 PPARγ 蛋白表达的影响;免疫细胞化学法检测 Gen 对细胞 PPARγ 表达定位。结果 t-BHP 能明显抑制 *EA. hy*926 生长,至最大浓度 240 μmol/L 时,抑制率达到(93.66±4.66)%,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),半数抑制浓度(IC_{50})约为 100 μmol/L;Gen(5~5 000 nmol/L)能显著抑制 t-BHP 诱导的内皮细胞凋亡,并呈明显的剂量-效应关系,500 nmol/L 预处理组总凋亡率为(12.20±1.28)%,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$);Gen 能够显著激活 PPARγ 蛋白的表达,并诱导其核易位。结论 Gen 对 t-BHP 诱导的内皮细胞凋亡有保护效应,其保护效应可能与 PPARγ 的活化有关。

【关键词】 染料木黄酮;内皮细胞;叔丁基过氧化氢;PPARγ
【中图法分类号】 R151.3;R322.12;R329.28 【文献标志码】 A

Inhibitory effect of genistein on tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis of human vascular endothelial cells

Wang Fan, Zhang Ting, Mi Mantian (Department of Nutrition and Food Hygiene, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing Medical Nutrition Research Center, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the protective effect of genistein (Gen) on tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced apoptosis of human vascular endothelial cells (*EA. hy*926 cells) and its mechanism. **Methods** An *in vitro* model of t-BHP-induced oxidative stress injury was established. The cells were divided into control group, Gen treatment group and t-BHP treatment group. Effect of Gen on viability and apoptosis of *EA. hy*926 cells was detected by CCK-8 assay and flow cytometry, respectively. Effect of Gen on expression of Caspase-3 and peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPARγ) in *EA. hy*926 cells was detected by Western blotting. **Results** t-BHP significantly inhibited the apoptosis of *EA. hy*926 cells at the concentration of 240 μmol/L with an inhibitory rate of (93.66±4.66)% ($P<0.05$). The IC_{50} was about 100 μmol/L. Gen at the concentration of 5 to 5 000 nmol/L significantly suppressed the t-BHP-induced apoptosis of *EA. hy*926 cells in a dose-dependent manner. The total apoptosis rate of *EA. hy*926 cells was (12.20±1.28)% when the concentration of t-BHP was 500 nmol/L ($P<0.05$). Gen effectively activated the expression of PPARγ and induced translocation of its protein. **Conclusion** Gen has the protective effect on t-BHP-induced apoptosis of *EA. hy*926 cells possibly by activating PPARγ.

【**Key words**】 genistein; endothelial cells; tert-butyl hydroperoxide; peroxisome proliferators-activated receptor gamma

Wang Fan and Zhang Ting are coauthors who contribute equally to this work. Corresponding author: Mi Mantian, Tel: 86-23-68752292, E-mail: mimt@sina.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是一类严重威胁人类健康和生命的心血管疾病,近年来我国的患病率呈逐年上升趋势。AS 是一个多因素、多阶段的病理过程。氧化应激是 AS 斑块形成学说中的重要组成部分,活性氧族(reactive oxygen species, ROS)大量生成导致的内皮细胞损伤是 AS 发生的始动环节。染料木黄酮(genistein, Gen)是主要存在于大豆中的异黄酮(soy

* 同等贡献者
【通信作者】 糜漫天,电话:(023)68752292,E-mail:mimt@sina.com

isoflavone,SI),也是SI在人体内的主要存在形式。体内实验表明SI具有抗动脉粥样硬化效应,但其分子机制尚不清楚。过氧化酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptor gamma, PPARγ)是核受体超家族中的一员。近期研究发现PPARγ活化后可改善内皮功能[1-3]。本研究以人血管内皮细胞株*EA. hy*926为研究对象,建立t-BHP诱导的氧化应激损伤体外模型,观察Gen对内皮细胞氧化应激损伤和凋亡的影响,并初步探讨PPARγ在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 DMEM/H液体培养基购自美国Gibco公司,优级无支原体胎牛血清购自杭州四季青生物制品有限公司,Gen、t-BHP、DMSO购自美国Sigma公司,Gen用DMSO配制成100 mmol/L的储备液。CCK-8(cell counting kit-8)细胞计数试剂盒购自日本Dojindo公司,Annexin Ⅴ-FITC凋亡检测试剂盒购自贝博生物有限公司。ECL化学发光试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。Actived-Caspase-3 P17兔抗人抗体购自美国Bioworld公司,兔抗人β-tubulin多克隆抗体为美国Santa Cruz公司产品,PPARγ多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔IgG、DAB显色剂试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.2 主要仪器 超净工作台(苏州净化设备有限公司),CO_2孵箱(美国Thermo公司),倒置显微镜和照相系统(日本Olympus公司),InfiniteM200酶标仪(瑞士TECAN集团公司)。

1.1.3 细胞株 人脐静脉内皮细胞株*EA. hy* 926购自美国ATCC(CRL-2922™)。用含10%胎牛血清的DEME/H培养基在37 ℃、5% CO_2、100%饱和湿度条件下培养。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8法检测细胞活力 取对数生长期的*EA. hy*926细胞,以2.5×10^4/ml细胞数接种于96孔板,每孔200 μl,贴壁后,按梯度加入不同浓度t-BHP(30~240 μmol/L),空白对照组只加入培养基,每组6个平行孔,处理24 h后,小心吸去孔内液体,加入按1∶9(CCK-8∶培养基)配制的CCK-8应用液100 μl,置于CO_2培养箱中孵育2 h后,用酶标仪(450 nm)测定各孔光密度值[*D*(450)值],并计算增殖抑制率。

增殖抑制率=[对照组*D*(450)-处理组*D*(450)]/对照组*D*(450)×100%

同样方法,接种细胞贴壁后,按梯度加入不同浓度的Gen(5~5 000 nmol/L),对照组只加培养基,预处理10 h后,加入t-BHP(100 μmol/L)处理24 h,每组6个平行,并设溶剂对照调零组(即不接种细胞,仅有完全培养基),检测各孔光密度值。检测完毕,吸除培养液,PBS洗1遍后,相差倒置显微镜下观察细胞形态。

保护率=[处理组*D*(450)-对照组*D*(450)]/对照组*D*(450)×100%

1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期的*EA. hy* 926细胞,选取浓度0、50、100、500 nmol/L Gen预处理细胞10 h后,再分别加入100 μmol/L t-BHP 24 h,并设正常对照组,每组3个平行,胰酶消化离心,收集各组细胞,调整细胞数为1×10^6/ml,2 000 r/min离心5 min,弃上清,加入冰冷PBS洗涤2次,2 000 r/min离心5 min,弃上清,将细胞重悬于200 μl的Banding buffer中,先加入10 μl Annexin Ⅴ-FITC,轻轻摇匀室温避光反应15 min后,再加入10 μl PI,4 ℃避光反应5 min后,用流式细胞仪检测细胞凋亡。流式细胞术可将Annexin V-FITC/PI双染的细胞区分并定量分析为4个细胞亚群,包括坏死细胞(左上象限∶Annexin -/PI +)、正常活细胞(左下象限∶Annexin -/PI -)、早期凋亡细胞(右下象限∶Annexin +/PI -)和晚期凋亡细胞(右上象限∶Annnexin +/PI +)。总细胞凋亡率=早期细胞凋亡率+晚期细胞凋亡率。

1.2.3 免疫细胞化学法检测PPARγ在细胞内的定位表达 细胞以每孔1×10^5细胞接种于预先置有洁净玻片(8 mm×8 mm)的24孔板中,选取浓度500 nmol/L Gen处理10 h,并设空白对照组,制备细胞爬片。4%多聚甲醛室温固定30 min,PBS浸洗3次,每次5 min,用含1% BSA的0.5% Triton X-100 37 ℃处理细胞20 min,PBS浸洗后以5% BSA于37 ℃孵育10 min,加入1∶200稀释的兔抗人单克隆抗体4 ℃孵育过夜。PBS浸洗后加入1∶500稀释的羊抗兔辣根酶标记二抗,室温孵育2 h后,DAB显色,常规脱水,中性树胶封片。

1.2.4 胞核蛋白与细胞质蛋白抽提 按照碧云天生物技术研究所胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒说明书操作步骤,温融解3种试剂,使用冰PBS清洗内皮细胞2次,用细胞刮子刮下细胞,每20 μl细胞沉淀加入200 μl添加了PMSF的细胞质蛋白抽提试剂A,最高速剧烈震荡5 s,冰浴15 min,再加入细胞质蛋白抽提试剂B 10 μl,最高速剧烈震荡5 s,冰浴1 min,低温高速(4 ℃,12 000 r/min)离心5 min,上清液即为抽提得到的细胞质蛋白;剩余沉淀中加入50 μl添加了PMSF的胞核蛋白抽提试剂,最高速剧烈震荡15 s,冰浴30 min,再低温高速离心10 min,则上清液即为抽提得到的胞核蛋白;再用Bradford法进行蛋白定量,后稀释分装,于-70 ℃保存备用。

1.2.5 Western blot检测细胞PPARγ蛋白的表达 收集空白对照组、Gen和t-BHP处理组细胞,各组分别取40 μg蛋白,加入5×SDS上样缓冲液,95 ℃煮沸5 min使蛋白变性,进行SDS-PAGE电泳,然后电转移至0.22 μmol/L的PVDF膜上。5%的BSA封闭2 h,用1∶500稀释的兔抗人单克隆一抗4 ℃孵育过夜,用TBST振摇洗膜10 min×3次,以1∶6 000稀释的羊抗兔辣根酶标记二抗,室温孵育2 h后,再次洗膜。ECL底物化学发光显色后曝光显影,避光晾干后扫描存盘,以Quantity One软件进行条带分析。

1.2.6 PPARγ相关抗原免疫荧光化学染色法鉴定血管内皮细胞凋亡 制备*EA. hy*926细胞爬片,4%多聚甲醛室温固定30 min,PBS浸洗3次,每次3 min,用含1% BSA的1% Triton X-100室温给细胞打孔15 min,PBS浸洗3次,每次3 min,山羊血清室温封闭15 min,1∶200稀释的PPARγ抗体37 ℃ 1 h,4 ℃孵育过夜;次日室温PBS浸洗3次,每次3 min,1∶50稀释的FITC标记山羊抗小鼠IgG室温孵育2 h;再次PBS浸洗3次,每次3 min,DAPI染核5 min,PBS浸洗3次,以90%甘油封片,拿至激光共聚焦显微镜下观察,拍照保存。

1.3 统计学分析

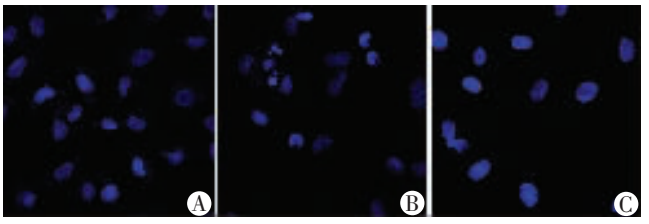
数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行单因素方差

分析。

2　结果

2.1　t-BHP 对内皮细胞形态的影响

激光共聚焦显微镜下观察，正常 *EA. hy*926 内皮细胞培养 2～3 d 后，内皮细胞的细胞核完整，但染色强度不高（图 1A）；经 t-BHP 处理后的内皮细胞可以看到细胞核区域出现明显的凋亡小体（图 1B）；经 Gen 预处理后的细胞，细胞核区域未见凋亡小体，且染色强度增加（图 1C）。



A：对照组；B：100 μmol/L t-BHP 处理 24 h 组；C：500 nmol/L Gen 处理 10 h＋100 μmol/L t-BHP 处理 24 h 组

图 1　免疫荧光法观察各组 *EA. hy*926 细胞形态　（×40）

2.2　t-BHP 对内皮细胞活力的影响

t-BHP 在较低剂量（30 μmol/L）时对内皮细胞的抑制率为（15.42±11.02）%，随着剂量的升高，其对内皮细胞活力呈现出明显的抑制作用，并且呈现出显著的剂量-效应关系，60 μmol/L 为（34.89±8.88）%，120 μmol/L 时为（65.28±13.22）%，至最大浓度 240 μmol/L 时，细胞大部分死亡，抑制率达到（93.66±4.66）%，与对照组（0%）相比，差异有统计学意义（$P<0.05$）。t-BHP 的半数抑制浓度（IC_{50}）值约为 100 μmol/L。

2.3　Gen 对 t-BHP 诱导的内皮细胞活力下降的影响

Gen 预处理内皮细胞后，细胞能有效对抗 t-BHP 诱导的氧化应激损伤，死亡数量下降，在 5～500 nmol/L 浓度范围内，随着浓度的增加，Gen 对细胞的保护率显著增加，5 nmol/L 时为（7.85±2.09）%，50 nmol/L 时为（25.50±2.23）%，至 500 nmol/L 达到最大保护率（33.11±4.60）%，与对照组（0%）相比，差异有统计学意义（$P<0.05$），其中 50 nmol/L 和 500 nmol/L 处理组具有显著的抗氧化效应。

2.4　Gen 对抑制 t-BHP 诱导的内皮细胞凋亡的影响

100 μmol/L t-BHP 处理内皮细胞 24 h 后，经流式细胞仪检测发现凋亡细胞明显增加，早、中、晚期凋亡率均有所升高（$P<0.05$，$P<0.01$）；Gen 预处理细胞能有效降低 t-BHP 诱导的细胞凋亡，随着 Gen 剂量增加，各期细胞凋亡率均有所降低，有少量坏死细胞和碎片（表 1）。

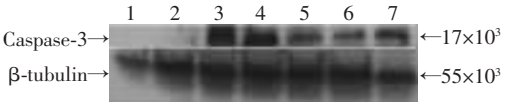
表 1　Gen 对 t-BHP 诱导内皮细胞凋亡的影响（%，$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	早期凋亡	中、晚期凋亡	总凋亡	坏死、碎片
空白对照组	1.71±0.43	6.13±0.49	7.84±0.97	0.16±0.38
0 nmol/L Gen＋t-BHP 组	2.85±0.50[a]	11.12±0.51[b]	13.97±0.55[b]	0.17±0.58
100 nmol/L Gen＋t-BHP 组	3.09±0.43[a]	9.61±0.36[a]	12.70±0.41[b]	0.18±0.44
500 nmol/L Gen＋t-BHP 组	1.78±0.46	7.42±1.16	9.20±1.28	0.08±3.27

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与空白对照组比较

2.5　Gen 对抑制 t-BHP 诱导内皮细胞 Caspase-3 活化表达的影响

从图 2 可以看出，对照组细胞几乎无活化的 Caspase-3 表达，t-BHP 处理细胞 3 h 后 Caspase-3 无明显激活，但处理 6 h 后，Caspase-3 显著活化，蛋白表达量明显增加，9 h 时 Caspase-3 表达量达最大；细胞分别经 50、100、500 nmol/L Gen 预处理后能够有效抑制 t-BHP 诱导的 Caspase-3 活化，随着剂量增大，此抑制程度增加。

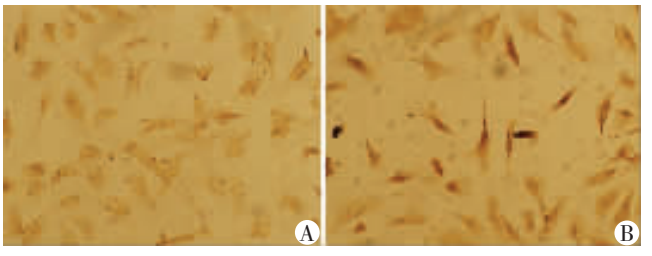


1：对照组；2：t-BHP 处理 3 h；3：t-BHP 处理 6 h；4：t-BHP 处理 9 h；5：500 nmol/L Gen 处理 10 h＋t-BHP 处理 9 h；6：100 nmol/L Gen 处理 10 h＋t-BHP 处理 9 h；7：50 nmol/L Gen 处理 10 h＋t-BHP 处理 9 h

图 2　Western blot 检测 Gen 对 t-BHP 诱导内皮细胞 Caspase-3 表达的影响

2.6　Gen 对内皮细胞 PPARγ 表达定位的影响

对照组中 PPARγ 在内皮细胞中表达水平较低，且主要表达于细胞质，高倍镜细胞观察细胞核呈明显“空泡”状（图 3A）；经 500 nmol/L Gen 处理后，可见视野下多数细胞 PPARγ 表达向细胞核内转移，PPARγ 主要表达于细胞核中（图 3B）。

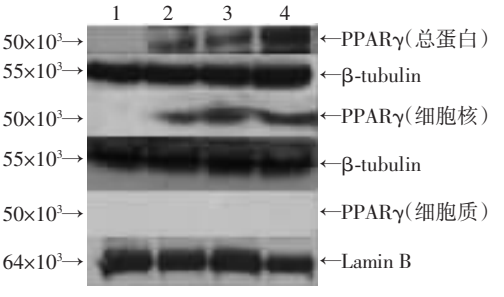


A：对照组；B：500 nmol/L Gen 处理组

图 3　免疫组化法观察 Gen 对内皮细胞 PPARγ 表达定位的影响　（S-P ×400）

2.7　Gen 对内皮细胞 PPARγ 蛋白表达的影响

对照组中几乎没有 PPARγ 表达，经 Gen 处理 1、2、4 h 后，PPARγ 蛋白表达水平有所升高，且随着处理时间延长表达量逐渐增加，至 4 h 时达到最高；而内皮细胞细胞质中几乎检测不到 PPARγ 的表达，Gen 处理组与对照组相比，细胞质中 PPARγ 无明显表达水平差异，而细胞核中 PPARγ 表达量明显增加，且随 Gen 处理时间的延长而升高。见图 4。



1：对照组；2～4：分别为 500 nmol/L Gen 处理 1、2、4 h

图 4　Western blot 检测 Gen 对内皮细胞 PPARγ 表达的影响

3 讨论

活性氧族(ROS)如超氧阴离子(O_2^-·)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基(·OH)在机体内的大量生成,可直接或间接地对细胞产生各种毒性作用,甚至引起细胞凋亡或坏死。目前大量的实验利用t-BHP作为自由基引发剂研究各种氧化应激生物学效应或建立体外氧化应激损伤模型。Pocrnich等[4]用t-BHP诱导人视网膜色素上皮细胞的死亡呈明显的剂效和量效关系。本实验发现t-BHP对*EA. hy*926内皮细胞具有明显的毒性,并且在40~160 μmol/L范围内其剂量与细胞死亡数量呈显著的量效关系,与Beretta等[5]用50~100 μmol/L H_2O_2处理相同细胞株时观察的效果一致。因此本实验以t-BHP建立内皮细胞氧化应激损伤体外模型,该模型简易、稳定且有效。染料木黄酮,又称三羟异黄酮或金雀异黄酮,为大豆异黄酮的主要活性成分,是一种天然的植物雌激素,且由于其分子结构含有3个羟基而具有一定的抗氧化能力[6]。国内外有关大豆异黄酮体外抗氧化效应的研究并不多见。Hernandez-Montes等[7]以*EA. hy*926细胞为研究对象,发现用25 μmol/L和50 μmol/L Gen预处理细胞24 h后,能够保护细胞抵抗H_2O_2诱导的氧化应激损伤,但大豆黄素(Daidzein,Dai)没有此效应。在我们实验中也发现Gen的抗氧化能力大于Dai,Gen在5~500 nmol/L范围内有显著的抗氧化效应,能够明显减轻t-BHP诱导细胞死亡,与Xu等[8]的研究结果一致。

AS发生时,体内氧化应激水平持续增高,使内皮细胞通透性增加,造成内皮细胞功能性障碍甚至凋亡[9,10]。Caspase-3的激活是凋亡发生的最早期事件,他对染色质固缩、DNA片段化及细胞气泡起重要的执行作用。Xu等[4]同样观察到Gen对H_2O_2诱导的细胞凋亡有非常显著的抑制作用。本实验结果发现t-BHP主要诱导内皮细胞的凋亡而非坏死,在9 h时对Caspase-3的激活效应达到最大,远远早于观察到的细胞明显的凋亡形态学变化,而Gen(5~500 nmol/L)能够显著抑制Caspase-3的激活,且对细胞的凋亡有明显的抑制效应。以上结果提示了Gen对血管内皮细胞的保护效应,及Gen作为一种潜在的天然抗氧化膳食补充剂,对于防治AS发生、发展的重要意义。有学者评价大豆异黄酮为"poor antioxidant",但我们观察到了Gen具有非常明显的抗氧化效应,但不同于VitaminC或VitaminE是对自由基直接有效的清除作用,Gen对细胞信号转导具有较强的启动能力,它能诱导系列信号分子的表达,使细胞能持续抵抗氧化应激伤害。PPARγ是核受体超家族中的一类由配体激活的核转录因子,具有多种生物学效应。近年来有研究表明PPARγ的活化与血管内皮细胞粘附分子-1(VCAM-1)相关,与它的表达成剂量依赖性,PPARγ的活化能抑制Na^+-K^+交换器的活性,部分阻断血管内皮细胞表达VCAM-1,减少白细胞和单核细胞在AS病变部位的聚集,从而抑制动脉粥样硬化[11]。本研究发现500 nmol/L Gen能有效激活PPARγ,免疫细胞化学实验显示了PPARγ非常显著的核聚集效应,而PPARγ在蛋白水平明显的表达增加。SI作为酪氨酸酶(PTK)抑制剂被研究20多年,但其发挥PTK抑制效应的作用剂量远远高于我们实验所用剂量,而人群从膳食补充中摄入豆制品或Gen后,血清中Gen浓度通常为(18±20) nmol/L[12],因此Gen对AS发生、发展的抑制效应很可能通过PPARγ激活途径来实现。

综上所述,本研究发现Gen对t-BHP诱导的内皮细胞凋亡有显著的抑制效应,与Gen能有效激活内皮细胞PPARγ的表达有关。但Gen是否在mRNA水平对PPARγ有调节作用,通过PPARγ调控下游何种保护基因介导内皮细胞抗氧化应激效应有待进一步研究。

参考文献:

[1] 黄佳祎,毕杨,左国伟,等. 腺病毒载体介导的HBx表达对HepG2细胞中PPARγ定位的影响[J]. 第三军医大学学报,2008,30(18):1693-1696.

[2] 胡波,张晓刚. PPAR与动脉粥样硬化[J]. 现代医药卫生,2005,21(22):3077-3079.

[3] 高凌云,李福平,何作云. PPARγ与动脉粥样硬化[J]. 中国微循环,2005,9(5):369-372.

[4] Pocrnich C E, Liu H, Feng M, *et al*. p38 mitogen-activated protein kinase protects human retinal pigment epithelial cells exposed to oxidative stress[J]. Can J Ophthalmol, 2009, 44(4):431-436.

[5] Beretta G, Orioli M, Facino R M. Antioxidant and radical scavenging activity of honey in endothelial cell cultures(*EA. hy*926)[J]. Planta Med, 2007, 73(11):1182-1189.

[6] 李明,周永,糜漫天. 染料木黄酮的研究进展[J]. 西南国防医药,2008,18(4):617-620.

[7] Hernandez-Montes E, Pollard S E, Vauzour D, *et al*. Activation of glutathione peroxidase via Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 346(3):851-859.

[8] Xu S Z, Zhong W, Ghavideldarestani M, *et al*. Multiple mechanisms of soy isoflavones against oxidative stress-induced endothelium injury[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(2):167-175.

[9] 杨永宗. 动脉粥样硬化的发病学说[M]// 杨永宗. 动脉粥样硬化性心血管病的基础与临床. 北京:科学出版社,2004:48-64.

[10] 王红,黄岚. 内皮祖细胞与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2008,16(9):751-753.

[11] 路一平,邱健. 过氧化物酶体增殖物激活受体γ与动脉粥样硬化[J]. 医学研究生学报,2006,19(6):565-568.

[12] Bhakta D, Higgins C D, Sevak L, *et al*. Phyto-oestrogen intake and plasma concentrations in South Asian and native British women resident in England[J]. Br J Nutr, 2006, 95(6):1150-1158.

(收稿 2010-06-29 修回 2010-07-23)

(编辑 龙 亮)