

· 论 著 ·

人参皂苷 Rg1 对血管紧张素 II 诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

贺国洋¹, 李巍², 焦红丽³, 千新来^{1△}

(新乡医学院:1. 病理学教研室;2. 第二附属医院中心实验室;3. 组织胚胎学教研室, 河南 453003)

摘要:目的 探讨人参皂苷 Rg1 对血管紧张素 II (Ang II) 诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)凋亡的逆转作用。方法 体外培养 HUVECs, 采用台盼蓝染色方法筛选人参皂苷 Rg1 最适浓度, 采用琼脂糖凝胶电泳和末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)染色检测细胞凋亡情况。结果 台盼蓝染色显示人参皂苷 Rg1 的最适浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。琼脂糖凝胶电泳显示, 对照组和 Rg1 组未见凋亡条带, Ang II 组可见清楚的细胞凋亡的“梯状”条带, 而 Ang II + Rg1 组可见不明显的细胞凋亡的“梯状”DNA 断裂条带。TUNEL 染色显示, 与对照组和 Rg1 组相比, Ang II 组细胞凋亡数量增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与 Ang II 组相比, Ang II + Rg1 组细胞凋亡数量减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 凋亡百分比由 38.667% 下降到 10.667%, 但仍高于对照组和 Rg1 组($P < 0.01$)。结论 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 人参皂苷 Rg1 可一定程度逆转 Ang II 诱导的 HUVECs 凋亡。

关键词:人参皂苷 Rg1; 血管紧张素 II; 人脐静脉内皮细胞; 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.19.014

中图分类号:R365.54

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)19-2581-02

Reversal effects of ginsenoside Rg1 on apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by Ang II

HE Guo-yang¹, LI Wei², JIAO Hong-li³, et al.

(1. Department of Pathology; 2. Central Laboratory of the Second Affiliated Hospital;

3. Department of Histology and Embryology, Xinxiang Medical University, Henan 453003, China)

Abstract: Objective To explore reversal effects of ginsenoside Rg1 on apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by angiotensin II (Ang II). **Methods** The HUVECs were cultured in vitro. The optimal concentration of ginsenoside Rg1 was screened by staining of trypan blue. The apoptosis of cells were detected by agarose gel electrophoresis and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining. **Results** The result from staining of trypan blue showed that the optimal concentration of ginsenoside Rg1 was 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results from agarose gel electrophoresis indicated that there were no apoptotic ladder in the control group and Rg1 group, but apoptotic ladder was observed clearly in the group of Ang II, and obsolete apoptotic ladder were observed in the group of Ang II + Rg1. The results from the TUNEL staining displayed that compared with the control group and Rg1 group, the quantity of apoptotic cells in Ang II group increased significantly ($P < 0.01$); Compared with the group of Ang II, the quantity of apoptotic cells in the group of Ang II + Rg1 decreased markedly ($P < 0.01$), and the apoptotic percentage decreased from 38.667% to 10.667%, but the percentage also higher than the control group and Rg1 group. **Conclusion** The partial reverse effects of ginsenoside Rg1 on the apoptosis of HUVECs induced by Ang II are identified.

Key words: ginsenoside Rg1; angiotensin II; human umbilical vein endothelial cells; apoptosis

近年来对人参皂苷(ginsenosides, GS)进行了深入研究, 多集中在减少缺血再灌注心肌细胞的凋亡、促进骨髓干细胞分化和增强机体免疫功能等方面^[1-2]。已有研究表明, GS 能对抗氧自由基对心脏的损伤, 保持心肌细胞膜的完整性, 改善急性心肌梗死时心肌舒张功能, 还能对抗心肌缺血所致心肌不可逆坏死^[3-4]。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是肾素-血管紧张素系统的主要效应因子, 通过调节血管张力和细胞生长增殖, 引起高血压、动脉粥样硬化和充血性心力衰竭等。研究表明, 在生理情况下, 低浓度的 Ang II 能维持血管的构造和张力; 在病理情况下 Ang II 的浓度异常升高, 可导致内皮细胞损伤^[5-6]。但是, 未见人参皂苷 Rg1 对 Ang II 诱导血管内皮细胞凋亡的影响及其机制的相关报道。

1 材料与与方法

1.1 材料、试剂与主要仪器 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)由中国典型培养物保藏中心提供, 100 bp DNA Markers、RPMI-1640 培养基试剂为美

国 Invitrogen 公司产品, Ang II 为德国 Calbiochem 公司产品, 人参皂苷 Rg1 购于中国药品生物制品检定所, 台盼蓝为德国 Merk 公司产品, 凋亡试剂盒购自德国 ROCHE 公司。

1.2 方法 细胞培养条件 HUVECs 培养条件为: 含 10% 胎牛血清和青/链霉素(青霉素 100 u/mL, 链霉素 100 mg/L)的 RPMI-1640 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养。

1.3 人参皂苷 Rg1 最适浓度的筛选 取对数生长期 HUVECs 细胞接种于 24 孔板, 接种细胞数为每孔 2×10^4 个, 各浓度均 3 个复孔, 实验重复 3 次。常规培养细胞 24 h 后, 弃掉旧培养基, 加入新 RPMI-1640 完全培养基, 各组分别加入人参皂苷 Rg1, 终浓度分别为 0、10、20、40、80、100、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 作用 24 h, 观察各组细胞的生长状况。用常规胰蛋白酶消化法收集细胞, 台盼蓝染色后在细胞计数板上进行活细胞计数。活细胞百分数等于未着色细胞数/细胞总数(着色细胞数加未着色细胞数)。以细胞生长不受影响而 Rg1 浓度达最高时的浓度作为实验浓度。

△ 通讯作者, E-mail: qxlfsws@163.com。

1.4 细胞凋亡检测 (1)琼脂糖凝胶电泳:用常规胰蛋白酶消化法收集对数生长期对照组、10 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 组(Ang II 组)、10 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 和 40 $\mu\text{g/mL}$ Rg1 组(Ang II + Rg1 组)和 40 $\mu\text{g/mL}$ Rg1 组(Rg1 组)处理 24 h 的 HUVECs 细胞,按分子克隆方法提取基因组 DNA。定量后 DNA 样品与上样缓冲液 5 : 1(v/v)混匀,加样 10 μL 在含有溴化乙锭的 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳中电泳 4 h,电压 50 V,电泳缓冲液为 $1\times\text{TAE}$,电泳结束后在凝胶成像系统的紫外灯下观察并拍照分析细胞凋亡情况;(2)TUNEL 染色观察凋亡细胞:常规胰酶消化 HUVECs,取用新鲜配制 40 g/L 的多聚甲醛处理过的载玻片,室温固定 HUVECs 60 min。然后滴加 3%过氧化氢-甲醇室温作用 10 min,PBS 冲洗 3 次上摇床 5 min,PBS 冲洗滴加标记反应混合物 50 $\mu\text{L}/\text{片}$,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱避光反应 60 min,阴性对照只加 50 μL 分出的管 2 溶液。PBS 冲洗后放在湿盒中滴加管 3 液体 50 $\mu\text{L}/\text{片}$,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、避光反应 30 min,DAB 显色、复染、分化、脱水、中性树胶封片、光镜观察并照相。

1.5 统计学方法 应用 SPSS11.5 统计软件进行统计学数据分析,多样本均数的比较采用单因素方差分析,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 人参皂苷 Rg1 最适浓度的确定 40 $\mu\text{g/mL}$ 组与 0、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 组相比,细胞百分数差异无统计学意义($P > 0.05$);但与 80、120、160 $\mu\text{g/mL}$ 组相比,细胞百分数差异有统计学意义($P < 0.05$)。镜下观察 Rg1 浓度达 40 $\mu\text{g/mL}$ 时,HUVECs 生长状况与对照组相似,细胞贴壁良好,增殖快,仅见少数固缩漂浮的细胞。故以 40 $\mu\text{g/mL}$ 为 Rg1 的最适浓度,见表 1。

表 1 HUVECs 经不同浓度 Rg1 作用后活细胞情况

组别	Rg1 浓度($\mu\text{g/mL}$)	活细胞百分数($\bar{x} \pm s, \%$)
1	0	98.000 \pm 1.732
2	10	97.000 \pm 2.646
3	20	96.667 \pm 1.528
4	40	95.000 \pm 2.646 [#] *
5	80	77.000 \pm 2.000
6	120	64.000 \pm 4.583
7	160	55.000 \pm 1.000

与 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 组比较,[#]: $P > 0.05$;与 80、100、160 $\mu\text{g/mL}$ 组比较,*: $P < 0.05$ 。

表 2 TUNEL 染色检测细胞凋亡情况

组别	细胞总数(个)	凋亡细胞数($\bar{x} \pm s, \text{个}$)	凋亡百分比(%)
对照组	1 000	26.667 \pm 5.773	2.667
Rg1 组	1 000	33.333 \pm 5.774	3.333
Ang II 组	1 000	386.670 \pm 40.415 [*]	38.667
Ang II + Rg1 组	1 000	106.670 \pm 15.275 Δ	10.667

与对照组、Rg1 组和 Ang II + Rg1 组比较,*: $P < 0.01$;与对照组和 Rg1 组比较, Δ : $P < 0.01$ 。

2.2 细胞凋亡检测 与对照组和 Rg1 组相比,Ang II 组可见清楚的细胞凋亡特征性的“梯状”条带,而 Ang II + Rg1 组未见明显的细胞凋亡特征性的“梯状”条带。TUNEL 染色检测结果显示,与对照组和 Rg1 组相比,Ang II 组细胞凋亡数量增加,

差异有统计学意义($P < 0.01$);与 Ang II 组相比,Ang II + Rg1 组细胞凋亡数量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),凋亡百分比由 38.667%下降到 10.667%。但仍高于对照组和 Rg1 组($P < 0.01$),见表 2。

3 讨 论

已有研究表明,GS 能对抗氧自由基对心脏的损伤,保持心肌细胞膜的完整性,改善急性心肌缺血时心肌舒张功能,还能对抗心肌缺血所致心肌不可逆坏死^[7-8]。在本研究中,为达到人参皂苷 Rg1 最大作用效果,同时又保持细胞的正常生理活性,通过台盼蓝染色筛选实验发现 40 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rg1 组与低浓度组相比,细胞百分数差异无统计学意义($P > 0.05$);但与 80、120、160 $\mu\text{g/mL}$ 组相比,细胞百分数差异有统计学意义($P < 0.05$)。镜下观察结果亦提示浓度过高将影响 HUVECs 的正常生长,故将 40 $\mu\text{g/mL}$ 作为人参皂苷 Rg1 作用的最适浓度。

研究表明,血管内皮细胞的损伤及功能紊乱与心血管疾病的发生密切相关,是心血管疾病特别是动脉粥样硬化的关键环节。Ang II 是肾素-血管紧张素系统中主要的功能性成分,它不仅存于血液循环中也存在于局部组织和细胞中,是体内维持正常血压的重要活性物质。Ang II 本身是一种强烈的缩血管因子,同时也可刺激 VEC 产生和释放内皮素,从而对血管收缩产生正反馈调节作用^[9-10]。研究表明,在生理状态下,低浓度的 Ang II 对血管构造和张力的维持起重要作用;而 10 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 能够诱导血管内皮细胞的凋亡^[11]。因此,本实验采取 10 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 作为实验浓度。

细胞凋亡发生时,被激活的内源性核酸内切酶,在核小体连接区切开 DNA 时,即可形成 180~200 bp 整倍数的片段。这些片段在琼脂糖凝胶电泳中可呈特征性的“梯状”条带,作为判断凋亡发生的客观指标之一^[12-13]。本研究结果表明,对照组和 Rg1 组未见凋亡条带,Ang II 组可见清楚的细胞凋亡特征性的“梯状”条带。TUNEL 染色结果显示,Ang II 能够诱导 HUVECs 凋亡。本研究通过琼脂糖凝胶电泳发现 Ang II + Rg1 组可见不明显的细胞凋亡特征性的“梯状”条带,TUNEL 染色结果显示,与 Ang II 组相比,Ang II + Rg1 组细胞凋亡数量显著减少,凋亡百分比由 38.667%下降到 10.667%,但仍高于对照组和 Rg1 组,提示人参皂苷 Rg1 可一定程度逆转 Ang II 诱导的 HUVECs 凋亡。有关人参皂苷 Rg1 对 Ang II 诱导血管内皮细胞凋亡的逆转作用的分子机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李丽帆,顾国龙,吴芳,等.同型半胱氨酸致兔动脉粥样硬化的实验研究[J].广西医学,2007,29(5):625.
- [2] 李志刚,蓝荣芳,关丽,等.人参皂苷 Rg1 抗 OxLDL 诱导内皮细胞凋亡及分子机制[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2002,11(3):248.
- [3] Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, et al. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis[J]. Mol Cell Cardiol, 2001, 33(9):1673.
- [4] Dou DQ, Zhang YW, Zhang L, et al. The inhibitory effect of ginsenosides on protein tyrosine kinase activated by hypoxia/reoxygenation in cultured human umbilical vein endothelial cells[J]. Planta Med, 2002, 67:19.
- [5] 郑加军,杨铭艳,张纲,等. VIP 促进人(下转第 2585 页)

2.4 透射电子显微镜观察 10 μ M Sunitinib 作用于 LoVo 细胞 24 h 后,细胞发生凋亡,体积缩小,胞膜完整但发生皱缩,细胞核固缩,核内染色质向核膜边缘凝聚、固缩、边聚(图 2)。

3 讨 论

受体酪氨酸激酶(RTK)属于 III 和 V 类裂解激酶域家族成员,它们的功能异常与多种实体瘤和造血系统恶性肿瘤的发生和发展相关。RTKs 由细胞外的配体结合域和细胞内的催化结构域构成。RTK 受体与配体结合后,受体寡聚化,并且自磷酸化而激活下游信号通路。该信号传导的级联反应最终促使细胞存活和增殖,如肿瘤细胞通过分泌 VEGF 和 PDGF 直接作用于内皮细胞促进血管新生,使肿瘤生长、增殖和转移。Sunitinib 能抑制体内多种受体 RTK 的磷酸化作用,特别是对与肿瘤相关的受体 RTK、PDGFR、RET、KIT 等,以及 PDGFR β 和 VEGFR2-依赖的肿瘤血管生长因子显示很强的抑制作用,对肿瘤生长和转移显示抑制作用^[3-4]。2006 年 1 月 FDA 批准舒尼替尼用于治疗转移性肾细胞癌和不能耐受或伊马替尼(甲磺酸伊马替尼,imatinib mesylate, Gleevec)治疗失败的胃肠道间质瘤(GIST)患者。实验显示,在放、化疗同时加用舒尼替尼有助于增强放、化疗的抗肿瘤效应^[5]。

本实验应用 Sunitinib 作用于人结肠癌细胞,观察其对 LoVo 细胞的生长抑制作用。实验结果显示在 1.25~20 μ M 的浓度范围内对 LoVo 细胞有不同程度的抑制作用,体外实验药物作用浓度范围对临床用药选择最佳给药浓度具有借鉴意义。细胞生长曲线除了显示 Sunitinib 有较明显的生长抑制作用外,还较直接地反映了其对肿瘤细胞生长抑制的动态变化情况。细胞凋亡是一个细胞主动参与的复杂的病理生理过程,近年来的研究表明,许多抗肿瘤药物可以诱导肿瘤细胞凋亡,可能是抗肿瘤药物抑制肿瘤细胞生长的机制之一。化疗药物主要是通过诱导肿瘤细胞凋亡来达到治疗目的,肿瘤细胞对化疗药物的敏感性决定了化疗的效果。本研究中 Sunitinib 作用于 LoVo 细胞后,电镜观察结果显示细胞体积缩小,胞膜完整但发生皱缩,细胞核固缩,核内染色质向核膜边缘凝聚、固缩、边

聚等凋亡的特异性变化。流式细胞仪还观察到 Sunitinib 对肿瘤细胞 DNA 合成期及 G₂/M 期的阻滞。

细胞凋亡是基因导向的细胞自我消灭的过程,通过细胞内的核酸内切酶,使核小体间的 DNA 裂解成碎片,继而核裂解,导致细胞死亡。它是通过外源性或内源性的凋亡信号,激活细胞内编码的自杀程序而促发的^[6-7]。本实验观察到 Sunitinib 对结肠癌细胞的抑制作用可能是通过诱导细胞凋亡实现的。

参考文献:

- [1] Mendell BD, Laird AD, Xin XH, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(1):327.
- [2] Abrams TJ, Lee LB, Murray LJ, et al. SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor β in pre-clinical models of human small cell lung cancer[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2003, 2(2):471.
- [3] Chow LQ, Eckhardt SG. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(7):884.
- [4] Le Tourneau C, Faivre S, Raymond E. New developments in multitargeted therapy for patients with solid tumours[J]. *Cancer Treat Rev*, 2008, 34(1):37.
- [5] 董肖椿,周福生,闻韧. 抗肿瘤药物苹果酸舒尼替尼的合成[J]. *中国药物化学杂志*, 2008, 18(1):28.
- [6] 周桔,罗荣保,汤长发,等. bcl-2 蛋白家族和 p53 基因在细胞凋亡中的调控效应[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(10):1950.
- [7] 耿礼文,赵韶春,梁桃. 舒林酸抑制结肠癌细胞株增殖诱导凋亡[J]. *重庆医学*, 2008, 37(15):1704.

(收稿日期:2010-03-09 修回日期:2010-04-30)

(上接第 2582 页)

- 脐静脉血管内皮细胞增殖及合成 VEGF 的初步研究[J]. *重庆医学*, 2007, 36(7):618.
- [6] 杨丽霞,沈珠甫,郭瑞,等. Ang II 诱导人脐静脉内皮细胞凋亡[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(5):414.
 - [7] 宋永兴,金才益,曾忠友,等. 人参皂甙对大鼠急性脊髓损伤的保护作用及其机制[J]. *海南医学*, 2009, 20(5):6.
 - [8] Haverkate F. Levels of haemostatic factors, arteriosclerosis and cardiovascular disease[J]. *Vascul Pharmacol*, 2002, 39:109.
 - [9] Rui WG, Li XY, Mao QL, et al. Angiotensin II induced NF- κ B activation in HUVEC via the p38 MAPK pathway

[J]. *Peptides*, 2006, 27:3267.

- [10] Landon EJ, Inagami T. Beyond the G protein; the saga of the type 2 angiotensin II receptor[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25:15.
- [11] 贺国洋,李巍,冶亚平,等. Ang II 对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响[J]. *新乡医学院学报*, 2009, 26(3):257.
- [12] 金惠铭. 病理生理学[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社, 2000:179.
- [13] 王海燕,王启会,王高芳,等. 植物诱导 HeLa 细胞凋亡的机制[J]. *安徽医药*, 2007, 11(7):580.

(收稿日期:2010-02-12 修回日期:2010-03-04)