

· 论 著 ·

人参皂苷 Rg1 抗同型半胱氨酸诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的作用及相关机制研究

贺国洋, 李永真, 李新强, 朱慧芳, 韩芳毅, 千新来[△]

(新乡医学院病理学教研室, 河南新乡 453003)

摘要:目的 探讨人参皂苷 Rg1 抗同型半胱氨酸(Hcy)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)凋亡的作用及相关机制。方法 体外培养 HUVECs 细胞,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,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blotting 分析各组内皮型一氧化氮合酶(eNOS)mRNA 和蛋白质的表达。结果 琼脂糖凝胶电泳显示:与对照组和 Rg1 组比较,Hcy 组可见特征性 DNA 的“梯状”条带。TUNEL 染色显示:与对照组和 Rg1 组比较 Hcy 组细胞凋亡率增加差异有统计学意义($P < 0.01$);RT-PCR 显示:与对照组和 Rg1 组相比,Hcy 组 eNOS mRNA 水平表达降低差异有统计学意义($P < 0.01$);与 Hcy 组相比,Hcy+Rg1 组 eNOS mRNA 水平表达增加差异有统计学意义($P < 0.01$),但仍低于对照组和 Rg1 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。Western blotting 显示:与对照组和 Rg1 组相比,Hcy 组 eNOS 蛋白水平表达降低差异有统计学意义($P < 0.01$);与 Hcy 组相比,Hcy+Rg1 组 eNOS 蛋白水平表达增加差异有统计学意义($P < 0.01$),但仍低于对照组和 Rg1 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 人参皂苷 Rg1 能够抑制 Hcy 诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡,此作用可能与上调血管内皮细胞 eNOS 水平有关。

关键词:人参皂苷;细胞凋亡;同型半胱氨酸;内皮型一氧化氮合酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.14.010

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)14-1376-03

Inhibiting effects of ginsenoside Rg1 on human umbilical vein endothelial cells apoptosis induced by Hcy and its molecular mechanism

He Guoyang, Li Yongzhen, Li Xinqiang, Zhu Hui Fang, Han Fangyi, Qian Xinlai[△]

(Department of Pathology, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibiting effect of ginsenoside Rg1 on apoptosis of human umbilical vein endothelial cells(HUVECs)induced by homocysteine(Hcy)and its possible mechanism. **Methods** HUVECs were incubated in vitro. The agarose gel electrophoresis and the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL)were applied for the detection of apoptosis of HUVECs treated with Hcy and Rg1. RT-PCR and Western blotting were performed to determine the expression of endothelial nitric oxide synthase(eNOS). **Results** The results from the agarose gel electrophoresis displayed that DNA ladder was seen in HUVECs treated with Hcy group. The results from the TUNEL staining displayed that compared to the control group and Rg1 group, the number of apoptotic cells in Hcy group increased significantly($P < 0.01$); compared to the Hcy group, the number of apoptotic cells in the Hcy+Rg1 group decreased markedly($P < 0.01$), and the apoptotic percentage decreased from 33.733% to 9.200%, but the percentage was still higher than the control group and Rg1 group($P < 0.01$). The results from the RT-PCR and Western blotting showed that compared to the control group and Rg1 group, the expression of eNOS decreased apparently in the Hcy group($P < 0.01$); compared to the Hcy group, the expression of eNOS increased visibly in the Hcy+Rg1 group ($P < 0.01$), but the expression of eNOS was still lower than the control group and Rg1 group($P < 0.01$). **Conclusion** Hcy can induce the apoptosis of HUVECs. Ginsenoside Rg1 can protect HUVECs from the injury induced by Hcy. Upregulation of eNOS expression may be one of the possible mechanisms.

Key words: ginsenoside; apoptosis; homocystein; endothelial nitric oxide synthase

血管内皮结构和功能损伤是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的始动环节^[1-3]。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是 AS 等心血管疾病的独立危险因素,其致病机制之一就是降低内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的合成和活性,使内皮细胞 NO 生成减少,导致血管内皮功能损害^[4-5]。血管内皮细胞死亡分为凋亡和坏死两种形式,人参皂苷究竟是通过抑制何种死亡形式防止氧自由基对血管内皮细胞的损伤目前尚未探明。本研究以 Hcy 诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)凋亡为模型,探讨人参皂苷 Rg1 是否有抑制 Hcy 诱导

血管内皮细胞凋亡的作用及其相关分子机制,为保护血管内皮功能和防治 AS 开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与主要仪器 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)由中国典型培养物保藏中心提供;胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物工程材料研究所;100 bp DNA Marker 为美国 Fermentas 公司产品;人参皂苷 Rg1 购自北京中国药品生物制品鉴定所,编号 0703-9711;RPMI1640 琼脂糖、RNA 酶 A、蛋白酶 K、胰蛋白酶等为美国 Invitrogen 公司产品,酶标仪为美国 Thermo 公司产品,凋亡试剂盒购自德国 ROCHE 公司。 β -ac-

[△] 通讯作者, Tel:13839073820; E-mail: qxlfswws@163.com.

tin 鼠抗人单抗(IgG)、eNOS 兔抗人多克隆抗体(IgG)、辣根酶标记的兔抗鼠(IgG)和辣根酶标记的羊抗兔(IgG)二抗均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养条件 HUVECs 培养条件为:含体积分数为 10%FBS 和青/链霉素(青霉素 100 U/mL,链霉素 100 mg/L)的 RPMI1640 培养基,在 37 °C,体积分数为 5%CO₂ 孵箱中培养。

1.2.2 细胞凋亡检测 (1)琼脂糖凝胶电泳:常规胰蛋白酶消化法收集对数生长期对照组、200 μmol/L Hcy(Hcy 组)、200 μmol/L Hcy 和 40 μg/mL Rg1 组(Hcy+Rg1 组)及 40 μg/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^[6]。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×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)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,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次上摇床 5 min,PBS 冲洗滴加标记反应混合物每片 50 μL,于 37 °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 液体每片 50 μL,于 37 °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。

1.2.3 eNOS mRNA 检测 由 TRIzol 试剂提取对数生长期的对照组、Hcy 组、Hcy+Rg1 组和 Rg1 组处理 24 h 的 HUVECs 细胞总 RNA 并定量,按 RT-PCR 试剂盒方法合成 cDNA 第 1 条链,以 cDNA 为模版,采用 RT-PCR 方法检测 eNOS mRNA 表达。引物和目的片段见表 1。反应条件:94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 45 s,60 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 2 min,扩增 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。产物以 18 g/L 琼脂糖凝胶电泳后观察并照相。以 GAPDH 为内参照。

表 1 引物序列和目的片段

基因	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
eNOS(F)	CAC CTA CAT CTG CAA CCA CAT C	762
eNOS(R)	TGA TGG AAA ACA GGA GTG AGG C	
GAPDH(F)	AAT CCC ATC ACC ATC TTC CA	580
GAPDH(R)	CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG	

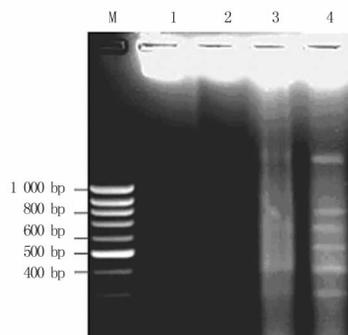
1.2.4 eNOS 蛋白检测 常规胰蛋白酶消化法收集对数生长期对照组、Hcy 组、Hcy+Rg1 组及 Rg1 组处理 24 h 的 HUVECs 细胞,细胞总蛋白提取、定量及变性见文献^[7]。提取的总蛋白经十二烷基硫酸钠(SDS)变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后进行 Western blotting 操作,检测 eNOS 蛋白表达。蛋白上样量均为 50 μg,β-actin 鼠抗人单抗(IgG)、eNOS 兔抗人多克隆抗体(IgG)、辣根酶标记的兔抗鼠(IgG)和辣根酶标记的羊抗兔(IgG)二抗稀释倍数分别为 1 : 2 500、1 : 200、1 : 7 500 和 1 : 5 000。

1.3 统计学处理 应用 SPSS11.5 统计软件进行数据分析,多样本均数的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 和 SNK 检验。检验水准为 α=0.05。

2 结果

2.1 细胞凋亡的检测 与对照组和 Rg1 组相比,Hcy 组可见

明显 DNA 梯状条带,而 Hcy+Rg1 组未见特征性 DNA 的梯状条带(图 1);TUNEL 染色结果显示,Hcy 组细胞凋亡率明显高于对照组和 Rg1 组(P<0.05)。见表 2。



M:100 bp DNA Markers;1:对照组细胞;2:Rg1 组细胞;3:Hcy+Rg1 组细胞;4:Hcy 组细胞。

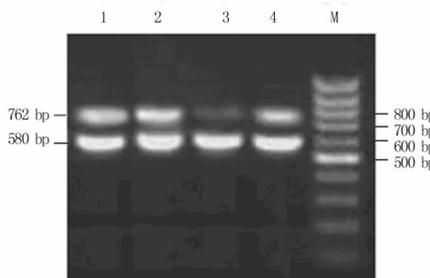
图 1 琼脂糖凝胶电泳分析细胞 DNA 断裂情况

表 2 TUNEL 染色检测细胞凋亡情况

组别	细胞总数	凋亡细胞数(±s)	凋亡百分比(%)
对照组	1 000	23.670±6.123	2.367
Rg1 组	1 000	28.333±8.387	2.833
Hcy 组	1 000	337.333±15.476*	33.733
Hcy+Rg1 组	1 000	92.000±10.435**	9.200
F		151.369	
P		0.000	

*:P<0.01,与对照组、Rg1 组和 Hcy+Rg1 组比较; **:P<0.01,与对照组和 Rg1 组比较。

2.2 eNOS mRNA 检测结果 RT-PCR 结果见图 2、表 3。



1:对照组细胞;2:Rg1 组细胞;3:Hcy 组细胞;4:Hcy+Rg1 组细胞;M:100 bp DNA Markers。

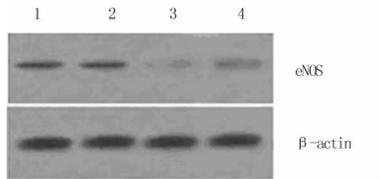
图 2 RT-PCR 方法检测 eNOS mRNA 水平表达变化琼脂糖凝胶电泳结果

表 3 eNOS mRNA 水平表达变化 RT-PCR 检测结果

组别	eNOS/GAPDH 灰度比值(±s)
对照组	0.798 7±0.013 0
Rg1 组	0.806 7±0.035 0
Hcy 组	0.104 3±0.007 8*
Hcy+Rg1 组	0.590 3±0.022 0**
F	671.972
P	0.000

*:P<0.01,与对照组、Rg1 组和 Hcy+Rg1 组比较; **:P<0.01,与对照组和 Rg1 组比较。

2.3 eNOS 蛋白表达情况 Western blotting 结果见图 3、表 4。



1: 对照组细胞; 2: Rg1 组细胞; 3: Hcy 组细胞; 4: Hcy + Rg1 组细胞。

图 3 Western blotting 方法检测 eNOS 蛋白水平表达变化结果

表 4 eNOS 蛋白水平表达变化 Western blotting 检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	eNOS/GAPDH 灰度比值
对照组	0.409 3 ± 0.011 5
Rg1 组	0.406 7 ± 0.005 7
Hcy 组	0.091 7 ± 0.005 5 *
Hcy + Rg1 组	0.304 3 ± 0.007 6 **
F	1 053.428
P	0.000

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

3 讨论

血管内皮细胞位于血管腔的内表面,不仅是血流与血管壁之间的屏障结构,而且是维持血管正常功能的关键因素,包括调节动脉血管收缩、凝血系统平衡血小板聚集、单核细胞黏附和促进新生血管生长等。血管内皮功能障碍是多种心血管疾病共同的病理生理改变,尤其在 AS、心肌缺血及缺血再灌注损伤过程中发挥重要作用^[8-9]。近年来的研究发现血浆 Hcy 水平升高是 AS、心肌缺血等心血管疾病一个独立危险因素。血管内皮细胞的过度凋亡在 AS、急性冠状动脉综合征等心血管疾病发生发展中起重要作用,因此抑制 Hcy 诱导的血管内皮细胞过度凋亡是心血管疾病防治的重要环节^[10-13]。实验中以 Hcy 作用于 HUVECs 细胞 24 h 时,与对照组相比,细胞凋亡比例显著升高(对照组为 2.367%, Hcy 组为 33.733%),RT-PCR 和 Western blotting 结果显示, Hcy 能够抑制 eNOS mRNA 和蛋白的表达,进而抑制 eNOS 活性,从而减少内皮细胞 NO 的生成。同时血管内皮细胞 eNOS 表达水平也明显降低。

人参皂苷是一类正在开发的防治心血管疾病的新药,目前已经明确其有 30 多种单体,其药理效应各自不尽相同,人参皂苷 Rg1 为原人参三醇类的主要组成成分之一^[14-15],在实验中发现人参皂苷 Rg1 能抑制 Hcy 诱导的 HUVECs 细胞凋亡,使凋亡比例由 33.733% 下降到 9.200%。Rg1 抑制 Hcy 诱导 HUVECs 细胞凋亡的同时还能上调被 Hcy 抑制的内皮细胞 eNOS 水平。因此推测 Rg1 抑制 Hcy 诱导内皮细胞凋亡的作用机制可能是通过上调 eNOS 水平、提高血管内皮细胞 NO 的含量、减轻细胞的脂质过氧化损伤来实现的。

综上所述,人参皂苷 Rg1 可抑制 Hcy 诱导的血管内皮细胞凋亡,此作用可能与上调血管内皮细胞的 eNOS 水平有关^[16]。

参考文献:

- [1] 王海东,余双奇,高芬,等.脂联素的抗动脉粥样硬化作用[J].重庆医学,2009,38(19):2509.
- [2] Herman AG, Moncada S. Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of atherosclerosis[J]. Eur Heart J, 2005, 26(19): 1945-955.
- [3] 段珩. 动脉粥样硬化的发病机制[J]. 中国保健: 医学研究版, 2008, 16(21): 971-972.
- [4] Durand P, Prost M, Loreau N, et al. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease[J]. Lab Invest, 2001, 81(5): 645.
- [5] Stühlinger MC, Oka RK, Graf EE, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e) inemia: role of asymmetric dimethylarginine [J] Circulation, 2003, 108(8): 933-938.
- [6] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 译. 3 版. 北京: 科技出版社, 1992: 305.
- [7] 崔静, 千新来, 李永真, 等. 钙磷酸蛋白 C 对乳腺癌细胞 MDA-MB-435S 凋亡的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2009, 44(4): 731-735.
- [8] Meng X, Li ZM, Zhou YJ, et al. Effect of the antioxidant alphalipoic acid on apoptosis in human umbilical vein endothelial cells induced by high glucose[J]. Clin Exp Med, 2008, 8(1): 43-49.
- [9] 黄朝晖, 赵洪雯, 刘宏, 等. 核因子- κ B 对 ApoE^{-/-}小鼠肾动脉粥样硬化斑块破裂肾损害的实验研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(8): 793-795.
- [10] Takahashi M, Takahashi S, Shimpo M, et al. Beta-very low density lipoprotein enhances inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells[J]. Atherosclerosis, 2002, 162(2): 307-315.
- [11] 何志勇, 张雄, 王小同. 叶酸拮抗同型半胱氨酸诱导的内皮细胞凋亡的作用机制[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(4): 699-701.
- [12] Virani SS, Polsani VR, Nambi V. Novel markers of inflammation in atherosclerosis[J]. Curr Atheroscler Rep, 2008, 1(2): 164-171.
- [13] 谭红梅, 赵驰, 吴伟康, 等. 同型半胱氨酸对血管内皮细胞增殖、贴壁和迁移的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(2): 390-392.
- [14] Chen XC, Chen LM, Zhu YG, et al. Involvement of CDK4, pRB, and E2F1 in ginsenoside Rg1 protecting rat cortical neurons from beta-amyloid induced apoptosis[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(12): 1259-1264.
- [15] 李冬梅, 许逸, 傅万玉, 等. 人参皂苷 Rg1 对脑缺血大鼠软脑膜微循环的影响[J]. 微循环学杂志, 1999, 9(1): 8-11.
- [16] 邓俊, 向贵平, 黄骥. HO-1/CO 与 NOS/NO 系统在动脉粥样硬化中的作用及其相关性研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(23): 2146-2150.