

# 通心络抑制缺氧诱导的血管内皮细胞凋亡及机制研究

曾和松, 刘正湘, 马业新

(华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北, 武汉, 430030)

**摘要:**目的: 研究通心络对缺氧诱导的血管内皮细胞凋亡及 Caspase-3 活性的影响。方法: 培养的牛主动脉内皮细胞分为三组: 正常对照组, 缺氧组和缺氧加通心络组, 24h 后检测凋亡细胞数并计算凋亡百分比, 以及 Caspase-3 蛋白的表达与活性。结果: 三组细胞凋亡百分比分别为  $7 \pm 0.12\%$ ,  $28.85 \pm 2.46\%$  和  $11.48 \pm 1.4\%$  ( $P < 0.05$ ); 通心络对缺氧后血管内皮细胞的 Caspase-3 蛋白表达无影响, 但可抑制其活性增高 ( $41.2 \pm 5.5 \text{ U/ml}$  vs  $67.8 \pm 7.2 \text{ U/ml}$ ,  $P < 0.05$ )。结论: 通心络减少缺氧所致血管内皮细胞凋亡与抑制 Caspase-3 的活性有关。

**关键词:** 通心络; 内皮细胞; 凋亡; Caspase-3

中图分类号: R285.5

文献标识码: B

文章编号: 1005-9903(2004)03-0027-04

## The Efficacy and the Mechanism of Tong Xin Luo on the Inhibition of Endothelial Cell Apoptosis Induced by Hypoxia

ZENG He-song, LIU Zheng-xiang, MA Ye-xin

(Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430030, China)

**Abstract:** Objective: Determine the efficacy of Tong Xin Luo(TXL) on the apoptosis and the activity of Caspase-3 in the endothelial cell under hypoxia. Method: the Bovine aortic endothelial cells(BAEC) were divided into three groups and incubated with normal medium, hypoxia medium, hypoxia medium+ TXL(50ug/ml) for 24h respectively. Apoptosis were measured with TUNEL. Western blot and the kit of Caspase-3 activity determination were used to measure the expression and the activity of Caspase-3 in BAEC. Result: TXL can decrease the percent of apoptotic cells in BAEC induced by hypoxia with mark significance ( $11.84 \pm 1.4\%$  vs  $28.85 \pm 2.46\%$ ,  $P < 0.05$ ). Although TXL had no effect on the expression of Caspase-3 after hypoxia stimulation, TXL could abolished the increase of the activity of Caspase-3 in BAEC induced by hypoxia( $41.2 \pm 5.5$  VS  $67.8 \pm 7.2 \text{ U/ml}$ ,  $P < 0.05$ ). Conclusion: The inhibition of the activity of Caspase-3 might be the main mechanism of TXL decrease endothelial cell apoptosis induced by hypoxia.

**Key words:** Tong Xin Luo; Endothelial Cell; Apoptosis; Caspase-3

血管内皮细胞过度凋亡是血管病变发生发展的原因之一, 各种物理、化学刺激及生物因子均可引起血管内皮细胞凋亡, 继而引起一系列血管病变<sup>[1,2]</sup>, 抑制内皮细胞凋亡, 保护内皮功能可以预防血管病变的形成并具有治疗作用。凋亡是一种细胞程序性死亡, 很多因素参与这一过程, 其中, Caspase-3 被发现是哺乳动物细胞凋亡的关键蛋白酶之一<sup>[3,4]</sup>。Caspase-3 抑制剂可明显减少细胞凋亡, Caspase-3 激活后细胞凋亡则明显增加, 很多因素可促进 caspase-3 的活化, 缺氧损伤可引起 Caspase-3 的活化进而引起细胞凋亡增加<sup>[6]</sup>。缺血缺氧损伤是心

血管疾病最常见的损伤刺激, 已有很多报道有关 Caspase-3 和缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡的研究<sup>[6]</sup>, 但有关 Caspase-3 与缺血缺氧刺激血管内皮细胞凋亡的报道较少。

通心络由人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍、冰片组成, 依据中药络病理论诸药合用具有益气活血、通络止痛, 使气旺血行、脉络畅通的功效。研究发现通心络能明显抑制实验性缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡, 可以明显恢复高血压病患者受损的血管内皮细胞功能<sup>[7]</sup>, 是有临床应用价值的新型纯中药制剂, 本文研究通心络对缺氧刺激所致内皮细胞凋亡的保护作用及对 Caspase-3 活性的影响, 为通心络胶囊的临床应用提供更多的实验依据与理论基

础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 通心络原粉(石家庄以岭药业股份有限公司提供,用生理盐水溶解并稀释成溶液,用 0.22 $\mu$ m 过滤器灭菌), ApoAlert DNA Fragmentation Assay Kit(Clontech, 编号: K2024-1), 鼠抗人 Caspase-3 单克隆抗体(R&D Systems, Inc. Ca: M1AB707), 辣根过氧化物酶羊抗鼠二抗(Amersham), Caspase-3 活性检测试剂盒(R&D Systems, Inc. Ca: BF1100), 0.5% trypsin/5.3mmol/L EDTA((Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 0.25% 胰蛋白酶(Gibco), 10% 胎牛血清的低糖 DMEM(Gibco), 5% CO<sub>2</sub> 孵箱(Heraeus)。

**1.2 牛主动脉内皮细胞的分离和培养** 取新生小牛主动脉(武汉华鑫肉联厂提供), 结扎肋间动脉分支后将主动脉的内膜面翻出。用 0.25% 胰蛋白酶消化主动脉内皮, 消化下的内皮细胞以含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基、置 5% CO<sub>2</sub> 孵箱内、37℃ 培养。待细胞生长至融合状态后用 0.05% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA) 消化传代, 取 P2-P3 作实验用。

**1.3 最适浓度的选择** 将培养的 BAEC 随机分成十组, 每组重复 8 次, 待细胞生长达 80% 汇合以后, 各组分别加入通心络(用生理盐水稀释, 0.22 $\mu$ m 滤网过滤) 0 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml、20 $\mu$ g/ml、30 $\mu$ g/ml、40 $\mu$ g/ml、50 $\mu$ g/ml、60 $\mu$ g/ml、80 $\mu$ g/ml、160 $\mu$ g/ml、320 $\mu$ g/ml 作用 24h, 观察各组细胞的生长状况。收集全部的贴壁和漂浮细胞制备单个细胞悬液, 并用培养基作适当的稀释将各组细胞密度调整为 10<sup>6</sup> 个/ml。取微量用台盼蓝染色后的细胞悬液加于血细胞计数板一侧的计数池内, 在显微镜下用 10 $\times$  物镜观察计数板四角大方格中的细胞数。活细胞因其细胞膜的完整性而对台盼蓝拒染, 死细胞被台盼蓝染成蓝色。活细胞百分数= 未着色细胞数/细胞总数(着色细胞数+ 未着色细胞数)。以细胞生长不受影响时通心络的浓度范围作为对体外培养牛主动脉内皮细胞作用的适宜浓度范围。

**1.4 缺氧损伤凋亡模型与实验分组** 取生长达 80% 的培养细胞分为三组, ①正常对照组, ②缺氧损伤组, ③缺氧损伤+ 通心络干预组(缺氧前 2h 加入筛选好的最适浓度的通心络), 缺氧损伤凋亡模型制作方法为: 在正常培养基培养的细胞中通入含 5% CO<sub>2</sub>+ 95% N<sub>2</sub>, 5L/min $\times$ 10min, 并测得培养基内氧分压为 23~25mmHg, 迅速关闭瓶盖并密封 24h, 收集细胞前通入空气 1h。

**1.5 凋亡细胞检测** 用 ApoAlert DNA Fragmentation Assay Kit 染色, 先按说明书步骤对细胞染色, 然后分别在 520nm 和 > 620nm 条件下用荧光显微镜观察。每组 10 个样本, 每个样本随机观察 8 个视野, 每组共计观察 80 个视野。> 620nm 波长计数发红色荧光的细胞数为细胞的总数, 520nm 波长计数发绿色荧光的细胞数为凋亡细胞数, 测定各组的凋亡百分比(发绿色荧光细胞数/发红色荧光细胞数)。

**1.6 细胞 DNA 抽提及琼脂糖电泳** 分别收集各组悬浮和贴壁细胞至 1.5ml EP 管中, 每管用细胞裂解液 500 $\mu$ l 重悬细胞后加蛋白酶 K 至终浓度为 100 $\mu$ g/ml, 50℃ 水浴 3h。经酚/氯仿抽提一次, 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA。在 12% 的琼脂糖凝胶上电泳约 1h, 比较各组 DNA 电泳带型特点。

**1.7 Caspase-3 蛋白表达检测** 用 Western Blot 法检测通心络对缺氧诱导的内皮细胞内 Caspase-3 蛋白表达的影响。具体步骤简述如下: 收集各组细胞提取蛋白质后, 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用电转移法将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 室温下用含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 封闭 2h, 加入鼠抗人 Caspase-3 单克隆抗体 4℃ 过夜, 与 1:10000 稀释的连接有辣根过氧化物酶羊抗鼠二抗室温下结合 3h。最后按说明书要求加入 ECL 试剂进行自显影。

**1.8 Caspase-3 活性检测** 用 0.5% trypsin/5.3mmol/L EDTA 收集细胞, 250g $\times$ 10min 离心去上清液后, 加 50 $\mu$ l 裂解液(RIPA buffer) 溶解细胞, 检测细胞溶解物中蛋白质浓度达 2~4mg/ml。按 Caspase-3 活性测定试剂盒说明书方法在 96 孔板上检测 caspase-3 活性。

**1.9 统计学处理** 应用  $\chi^2$  检验比较组间活细胞百分数的差异, 应用 *F* 检验比较组间 Caspase-3 活性和凋亡百分比的不同。以 *P* < 0.05 作为有显著性差异的检验标准。

## 2 结果

**2.1 最适宜用于细胞培养的通心络浓度范围** 通心络浓度为 40~60 $\mu$ g/ml 时, 细胞的生长状况良好, 增殖快。其中浓度为 50 $\mu$ g/ml 时, 活细胞百分数最高(97%)。通心络浓度小于 40 $\mu$ g/ml, 大于 60 $\mu$ g/ml 时, 活细胞百分数明显降低(*P* < 0.05), 细胞的增殖速度减慢, 可见大量固缩、漂浮的细胞。故本实验采用 50 $\mu$ g/ml 作为通心络的实验浓度。

**2.2 通心络对缺氧所致内皮细胞凋亡的影响** 三组细胞的 DNA 电泳发现(图 1), 缺氧组具有凋亡特征的梯状条带(B), 而通心络组电泳结果与对照组相

仿,均为基因组 DNA 带(A,C)。TUNEL 染色结果显示:正常对照组细胞均匀红色,偶见细胞核被 FITC 着色呈绿色;缺氧组细胞核可见许多浓染致密的颗粒状绿色荧光;通心络组细胞核的绿色荧光染色较缺氧组明显减少。通心络干预后使缺氧诱导的血管内皮细胞凋亡比例由  $28.85 \pm 2.46\%$  下降到  $11.48 \pm 1.4\%$ ,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),结果见表 1。

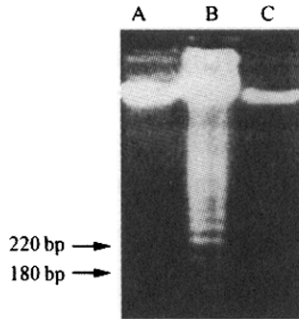


图 1 通心络对缺氧造成的血管内皮细胞凋亡的抑制作用(DNA 电泳),

A.正常对照组,B.缺氧组,C.缺氧+通心络处理组

表 1 通心络对缺氧造成的细胞凋亡的抑制作用 (TUNEL 染色)(N=8)

组别	细胞总数	凋亡细胞数	凋亡比例(%)
对照组	1452	102	$7 \pm 0.12$
缺氧组	1210	359	$28.85 \pm 2.46^a$
缺氧+通心络	1120	134	$11.48 \pm 1.4^{b,c}$

注:a:  $P < 0.01$  缺氧组 vs. 对照组;b:  $P < 0.05$  通心络组 vs. 缺氧组;c:  $P > 0.05$  通心络组 vs. 对照组

2.3 通心络对缺氧诱导血管内皮细胞 Caspase-3 活性的影响 缺氧刺激明显增高培养血管内皮细胞 Caspase-3 的活性,而通心络可显著抑制缺氧所诱导的 Caspase-3 活性增高(图 2)。

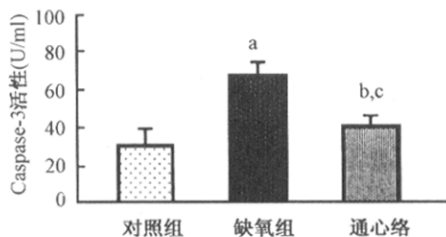


图 2 通心络对血管内皮细胞缺氧后 Caspase-3 活性的影响

a:  $P < 0.01$  缺氧组 vs. 对照组;b:  $P < 0.05$  缺氧+通心络组 vs. 缺氧组;c:  $P > 0.05$  缺氧+通心络组 vs. 对照组

2.4 通心络对缺氧诱导血管内皮细胞 Caspase-3 蛋白表达的影响 如图 3 所示:缺氧刺激可增加血管内皮细胞内 Caspase-3 的表达,通心络对这种变化影响不明显,在 Western Blot 检查上表现为无论通心络处理与否缺氧刺激后内皮细胞内 Caspase-3 蛋白带密度改变不明显。

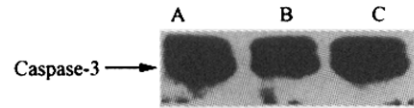


图 3 通心络对血管内皮细胞缺氧后 caspase-3 蛋白表达的影响

A:缺氧组,B:正常对照组,C:缺氧+通心络处理组

### 3 讨论

应用培养的血管内皮细胞作为缺氧损伤模型,能消除在体和离体血管中难以控制的神经、体液影响,可更好地控制培养液中细胞所处的理化环境;能观察药物直接对血管内皮细胞的保护效应并直接研究细胞生化、代谢和功能的变化及分子生物学改变,有它的独特优点,是一个好的实验方法。

细胞凋亡的研究是一个很活跃的领域,成为疾病研究的热点。Caspase-3 是细胞凋亡一系列酶促反应酶中的关键酶,平常以无活性的状态存在于细胞内,在凋亡信息的刺激下而激活,Caspase-3 的活性与细胞凋亡明显相关,在不同细胞中发现 Caspase-3 活性增加时细胞凋亡增加,是研究细胞凋亡的常用指标。本文发现缺氧刺激可明显增加动脉内皮细胞 Caspase-3 活性,同时细胞凋亡明显增加,与以前的实验结果相符<sup>[7]</sup>,提示 Caspase-3 活性增加是缺氧损伤引起内皮细胞凋亡的机制之一。

通心络是由多种纯天然中药精制而成,研究表明,通心络有益气活血,通络止痛之功能,可以增加冠脉血流量,改善冠脉血供,抑制缺血再灌注心肌细胞损伤、缩小梗塞面积,恢复高血压病人受损的内皮功能等作用,动物实验发现通心络可抑制心肌细胞凋亡,机制与增加心肌细胞 bcl-2 表达和抑制 bax 的表达有关<sup>[8]</sup>。bcl-2 及相关蛋白是哺乳类动物细胞凋亡的重要调节因子<sup>[9]</sup>,目前研究较多,实验发现激活的 Caspase-3 可以裂解 bcl-2 使 bcl-2 表达减少,bcl-2/bax 的比例降低,从而诱导细胞凋亡增多,提示 Caspase-3 是 bcl-2 蛋白表达的重要调节因素之一<sup>[10]</sup>。本实验发现通心络可明显抑制缺氧引起的血管内皮细胞 Caspase-3 活性增高并减少缺氧所诱导的动脉内皮细胞凋亡。结合 Caspase-3 活性增加在缺血/再灌注损伤心肌细胞凋亡中的促进作用,我们认为通心络抑制细胞凋亡的机制与其抑制各种损伤刺激诱导的 Caspase-3 活性增加有关。

### 参考文献:

[1] Mehta U, Kang BP, Bansal G, et al. Studies of apoptosis and

- bc1-2 in experimental atherosclerosis in rabbit and influence of selenium supplementation[ J ]. *Gen Physiol Biophys* 2002, 21( 1) : 15-29.
- [ 2 ] Kockx MM, Knaapen MW. The role of apoptosis in vascular disease[ J ]. *J Pathol* 2000, 190( 3) : 267-280.
- [ 3 ] Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis[ J ]. *Cell* 1991, 65( 7) : 1097-1098.
- [ 4 ] Chen YC, Shen SC, Lee WR, et al. Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL- 60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production[ J ]. *Biochem Pharmacol* 2002, 64 ( 12) 1713-1724.
- [ 5 ] Hung TH, Skepper JN, Charnock-Jones DS, et al. Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preclampsia [ J ]. *Circ Res* 2002, 90( 12) : 1274-1381.
- [ 6 ] Condorelli G, Roncarati R, Ross JJ, et al. Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increase infarct size and depresses cardiac function [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98( 17) : 9977-9982.
- [ 7 ] 曾和松,姚济华,马业新,等. 通心络对高血压患者血浆一氧化氮浓度的影响[ J ]. *中华中医杂志* 2002, 12: 54-55.
- [ 8 ] Yamamoto K, Morishita R, Hayashi S, et al. Contribution of bc1-2, but not bc1-xL and bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells[ J ]. *Hypertension*. 2001, 37: 1341-1346.
- [ 9 ] 赵明中,高承梅,张宇洋,等. 通心络胶囊对缺血再灌注心肌细胞凋亡及基因蛋白表达的影响[ J ]. *中华心血管病杂志* 2000, 28( 3) : 206.
- [ 10 ] Gruenenfelder J, Miniati DN, Murata S, et al. Upregulation of Bcl-2 through caspase-3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat cardiac allografts[ J ]. *Circulation* 2001, 104[ suppl] 1 : I -202-206.