

黄芩苷对氧化低密度脂蛋白诱导的血管内皮细胞凋亡的防护作用

高爱社 沈晓君

(河南中医学院病理与病理生理学教研室, 河南省郑州市金水大道 1 号, 450008)

摘要 目的: 研究黄芩苷抑制氧化低密度脂蛋白(oxLDL)诱导的血管内皮细胞凋亡及其介导机制。方法: 应用大鼠模型, 以低密度脂蛋白(LDL)体内诱导血管内皮细胞凋亡, 并以黄芩苷进行干预, 观察其对 LDL 诱导血管内皮细胞凋亡的影响。原位末端标记技术(TUNEL)法检测凋亡细胞, 比色法测半胱天冬蛋白酶 3(Caspase-3)的活性。结果: LDL 组与氯化钠对照组比较, 血管内皮细胞凋亡数显著增加, caspase-3 酶活性显著增高, 黄芩苷干预组与 LDL 组比较, 凋亡细胞数显著减少, caspase-3 酶活性下降。结论: LDL 可能通过激活 caspase-3 使大鼠血管内皮细胞凋亡; 黄芩苷可通过抑制 caspase-3 酶活性抑制 LDL 诱导的细胞凋亡。

关键词 黄芩苷; 氧化低密度脂蛋白

Protective Effect of Baicalin on Apoptosis of Vascular Endothelial Cells Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

Gao Aishe, Shen Xiaojun

(Faculty of Pathology and Physiology, He'nan College of Chinese Medicine, Add.: No. 1 Jinshui Boulevard, Zhengzhou, He'nan Province, post code: 450008)

Abstract Objective: To research the inhibitive effect and mechanism of baicalin on apoptosis of vascular endothelial cells in rats induced by oxidized low density lipoprotein(ox-LDL). **Methods:** The rats were firstly intravenously injected with LDL, then intervened by baicalin to be observed for any changes, and compared with rats treated with NaCl2 only, and rats treated with LDL but without baicalin intervention. Apoptosis were detected by TUNEL method, activity of caspase-3 enzyme was assayed by colorimetric assay. **Results:** Compared with NaCl2 only rats, the LDL group showed larger number of apoptosis cells, and caspase-3 with higher activity ($P < 0.01$) which were inhibited significantly by baicalin as shown in the intervention group ($P < 0.01$). **Conclusion:** LDL stimulates activity of caspase-3 to cause apoptosis of vascular endothelial cells; baicalin can inhibit such apoptosis by restricting activity of caspase-3.

Key Words baicalin; oxidized low density lipoprotein

研究表明, 低密度脂蛋白(Low Density Lipoprotein, LDL)增高是动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)的重要危险因素, 而 LDL 经过氧化修饰, 形成氧化修饰低密度脂蛋白(ox-LDL), 则具有更强的致 AS 作用。大量体外实验证明, oxLDL 可通过多条途径诱导血管内皮细胞过度凋亡^[1-2]。寻找防止脂蛋白氧化修饰的药物, 特别是天然抗氧化剂, 对 AS 的防治具有重要意义。黄芩苷是普遍存在于自然界中的黄酮类化合物, 具有抗脂质氧化, 降低血脂, 降低血压, 抗炎等作用^[3-4], 目前已被广泛运用于心脑血管病的治疗。我们应用 LDL 诱导大鼠血管内皮细胞凋亡的体内模型, 观察黄芩苷对其干预作用, 研究黄芩苷是否可抑制 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞凋亡并探讨其可能机制。

1 实验材料

1.1 试剂与药品 黄芩苷由北京协和药厂生产, TUNEL 检测试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司, 组织半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)活性比色法定量检测试剂盒为美国 Santa Cruz 产品, 台盼蓝及多

聚甲醛购自北京化学试剂公司。

1.2 LDL 的制备 取正常人空腹 12h 血浆, 4℃, 1200r/min 离心 30min, 去除乳糜微粒; 溴化钠铺梯度, 两步超速离心法分离低密度脂蛋白(LDL), 0.45μm 滤纸过滤除菌, 4℃保存, Lowry 法测蛋白浓度。

2 实验方法

2.1 实验分组和动物模型制备 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 36 只, 200g 左右, 随机分为 3 组。对照组: 0.85% 氯化钠溶液 1mL/d 灌胃 4 周, 第 3 周后尾静脉注射 0.85% 氯化钠溶液 2mL(kg·d)1 周; LDL 组: 0.85% 氯化钠溶液 1mL/d 灌胃 4 周, 第 3 周后尾静脉注射 LDL8mg(kg·d)1 周; 黄芩苷组: 20mg/(kg·d)灌胃 4 周, 第 3 周后尾静脉注射 LDL8mg/(kg·d)1 周。

2.2 血管内皮细胞铺片的制备 大鼠模型制备后, 每组随机取 6 只麻醉后打开胸腔, 插管至左心室腔, 灌注 PBS, 右心房排出液清亮后, 换 4% 多聚甲醛 PBS 液(pH7.2)灌注 5min; 分离全段主动脉, 4% 多聚甲醛固定 4h, 将主动脉纵行剖开, 内皮面朝下压贴于火棉胶

玻片上,揭下血管壁内皮细胞则粘贴于火棉胶上;浸入蒸馏水中,将脱落火棉胶转贴于明胶玻片上,烤片后风干保存,每只大鼠4张铺片,用于凋亡检测。

2.3 凋亡细胞检测 采用末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)标记凋亡细胞核中的DNA 3'-OH末端,DAB显色,甲基绿复染,每一样本4张铺片,每张铺片观察5个视野,计数每一视野($\times 200$)阳性凋亡细胞数,取均值代表每一样本数。

2.4 Caspase-3 酶活性测定 采用比色法 caspase-3 colorimetric assay 测定 caspase-3 酶活性,每组大鼠随机取6只,快速分离主动脉,4℃ PBS液冲洗,内翻主动脉;PBS液中轻轻刮取内皮层,研磨后,4℃,300r/min离心10min,弃上清液;加细胞裂解缓冲液,置冰上30min;1000r/min离心1min,取上清液,96孔平底微孔板上进行反应,依次加入反应物100 μ l(设置阴性对照,微孔内加PBS100 μ l),2x反应缓冲液100 μ l,比色反应底物(DEVE-pNA)10 μ l,37℃孵育2h,Elx 800 Universal Microplate Reader(Bio-TEK INSTRUMENTS INC)测波长405nm的吸收度(A405nm),A405nm表示caspase-3酶活性。

3 实验结果

3.1 凋亡细胞计数 正常大鼠血管内皮细胞核呈均匀淡蓝色,凋亡细胞核呈深浅不一棕褐色,对照组、LDL组、黄芩苷组大鼠每一视野下凋亡细胞数分别为 12.01 ± 2.03 , 92.33 ± 14.68 , 26.48 ± 8.16 。LDL组与对照组比较凋亡细胞显著增多($P < 0.01$);黄芩苷组与LDL组比较,凋亡细胞显著减少($P < 0.01$)。

3.2 Caspas-3 酶活性变化 对照组、LDL组、黄芩苷组大鼠血管内皮细胞A405min分别为 0.028 ± 0.006 , 0.092 ± 0.008 , 0.036 ± 0.005 。LDL组A405nm较对照组显著增高($P < 0.01$),黄芩苷组较LDL组显著降低($P < 0.01$),表明LDL可通过激活caspase-3这一凋亡效应酶诱导大鼠血管内皮细胞凋亡,黄芩苷可抑制这一酶的活性而抑制凋亡。

4 讨论

细胞凋亡的现象广泛存在于心脑血管疾病的发生发展过程中,是细胞损伤的特征性病理生理变化,因此,干预细胞凋亡保护心脑血管已成为当今心脑血管药理的一个新的发展方向。内皮细胞是影响血管壁通透性的主要屏障,其在调节心血管功能、维持心血管稳态中发挥重要作用。研究表明氧化低密度脂蛋白诱导内皮细胞凋亡的毒性作用在动脉粥样硬化形成中占有

重要的地位。在心脑血管系统疾病中,心肌炎、心肌梗死、充血性心力衰竭、心脑血管再灌注损伤、帕金森综合征中普遍存在细胞凋亡异常现象,因此,研究中药对于细胞凋亡影响的研究有重要意义。黄芩苷有清除自由基抗氧化干预细胞凋亡等作用,在心血管疾病防治中具有潜在的开发价值。黄芩苷在心血管疾病的治疗与预防上有很多应用,许多实验证明,黄芩苷可以影响神经细胞、血管内皮细胞、心肌细胞及血管平滑肌细胞的凋亡。已有的研究提示黄芩苷的作用可能与Bcl家族P53、fas、fos等凋亡调控因子有关^[5-7],与caspase-3信号传递途径有关。Caspases蛋白酶级联切割反应在细胞凋亡过程中发挥重要的作用,而Caspase-3又处于级联反应的核心位置,是哺乳动物细胞凋亡的关键蛋白酶^[8]。本研究发现黄芩苷可以明显抑制氧化损伤条件下内皮细胞Caspase-3的表达,此作用可能是其抗凋亡分子机制中的一个重要环节。细胞凋亡的调控是十分复杂的,黄芩苷的影响位点及作用途径可能还涉及许多其他的基因和调控因子,这些问题的揭示将会对相关疾病的预防及治疗有积极意义。

研究结果显示LDL可能通过激活caspase-3这一凋亡效应酶诱导大鼠血管内皮细胞凋亡,为黄芩苷治疗新的适应症提供了理论线索,为心脑血管系统疾病特别是动脉粥样硬化的防治提供了科学的理论依据。

参考文献

- [1] Steinberg D, Parthasarathy S, Carew T E, et al. Beyoncholesterol: modification of lowdensity lipoprotein that increasits atherogenicity. Nengl JMed, 1989,320:915-925.
- [2] Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like protease. A mechanistic clue to the cresponse to injury' hypothesis. Circulation, 1997,95(7):1760-1763.
- [3] 兰真,曾凡骏,曾里,等.生物类黄酮对心血管系统的调节及作用机理.现代预防医学,2005,32(6):613.
- [4] 李荣,李俊.黄酮类化合物药理活性及其构效关系研究进展.安徽医药,2005,9(7):481.
- [5] 刘萍,王菊英,许复郁,等.黄芩苷对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠海马神经细胞凋亡的影响.中国药理学与毒理学杂志,2005,19(6):412-418.
- [6] 刘萍,李倩,刘兆平,等.黄芩苷对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞凋亡及相关基因表达的影响.中国新药与临床杂志,2007,26(2):109-112.
- [7] 汪丽娅,张占军,王忠,等.黄芩苷对脑缺血大鼠的治疗作用及对caspase-3的影响.天津中医药,2006,23(2):143-145.
- [8] Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammaliancaspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annu Rev Biochem, 1999,68:383-424.

(2008-05-29 收稿)