

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.021.html>

蜕皮甾酮对同型半胱氨酸诱导人血管内皮细胞凋亡的影响

苏 华¹, 谢睿彬¹, 张小新¹, 罗高湖¹, 涂 铃²

摘要 目的 探讨蜕皮甾酮对同型半胱氨酸(Hcy)诱导人脐静脉内皮细胞株 CRL-1730 凋亡的影响。方法 体外常规培养人血管内皮细胞 CRL-1730, 细胞计数试剂盒法检测蜕皮甾酮对 CRL-1730 细胞增殖活力的影响; Hcy 处理人血管内皮细胞 CRL-1730 建立损伤模型, 分组为空白对照组、蜕皮甾酮高剂量组(Hcy + 1.5 μmol/L 蜕皮甾酮)、蜕皮甾酮中剂量组(Hcy + 1.0 μmol/L 蜕皮甾酮)、蜕皮甾酮低剂量组(Hcy + 0.5 μmol/L 蜕皮甾酮)、Hcy 组; 流式细胞术检测 CRL-1730 细胞凋亡率, 并利用荧光染色进行细胞凋亡形态学观察; RT-PCR 法检测 CRL-1730 细胞内 Bax、Bcl-2 及 Caspase-3 基因的表达; 采用 Western blot 法检测 CRL-1730 细胞内 Bax、Bcl-2、cleaved-Caspase-3 蛋白表达。结果 所选浓度蜕皮甾酮对 CRL-1730 细胞增殖活性无明显影响; 流式细胞术结果显示经 Hcy 处理后的 CRL-1730 细胞凋亡率明显增高, 但经过不同浓度的蜕皮甾酮处理后, Hcy 诱导的 CRL-1730 细胞凋亡率明显下降; 与空白对照组比较, Hcy 组 CRL-1730 细胞 Bax 和 cleaved-Caspase-3 的表达明显增高, Bcl-2 的表达明显降低, 差异有统计学意义。与 Hcy 组比较, 经过低、中、高剂量蜕皮甾酮处理后, Hcy 诱导的 CRL-1730 细胞

Bcl-2 表达上调, Bax 和 cleaved-Caspase-3 表达下调; 与空白对照组比较, Hcy 组 CRL-1730 细胞 Bax mRNA 和 Caspase-3 mRNA 的表达明显增高, Bcl-2 mRNA 的表达明显降低, 差异有统计学意义。与 Hcy 比较, 经过低、中、高剂量蜕皮甾酮处理后, CRL-1730 细胞 Bcl-2 mRNA 表达上调, Bax mRNA 和 Caspase-3 mRNA 表达下调。结论 蜕皮甾酮对 Hcy 诱导人脐静脉内皮细胞 CRL-1730 凋亡具有保护作用, 这为其治疗心血管疾病提供了依据。

关键词 蜕皮甾酮; 同型半胱氨酸; 人脐静脉内皮细胞; 凋亡

中图分类号 R 543.5
文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0099-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.021

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一类严重危害人类健康的心血管疾病, 其发生发展与多种因素有关。同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)属含硫氨基酸, Hcy 可损伤血管内皮促进动脉粥样斑块形成^[1]。研究^[2]证明, 血浆 Hcy 水平升高是冠心病、脑血管疾病以及外周阻塞性血管疾病等心脑血管疾病的一个重要独立危险因素。体外细胞培养显示 Hcy 能诱导内皮细胞凋亡^[3]。蜕皮甾酮是中药牛膝中甾酮类的主要成分^[4], 目前已证实其具有多种生物活性, 如清除自由基、抗氧化、缓解炎症反应等^[5-6]。研究^[7]表明蜕皮甾酮可以抑制 Hcy 诱导的炎症损伤, 抑制内皮细胞与白细胞、血小板等黏

2016-06-27 接收

基金项目: 湖北省卫生计生委员会西医一般项目(编号: WJ2015MB-006)

作者单位: ¹贺州市人民医院心血管内科, 贺州 542899

²华中科技大学附属同济医院综合科, 武汉 430000

作者简介: 苏 华, 男, 主治医师, 责任作者, E-mail: suhuahz@yeah.net

(Control), the negative control group (Negative) and the test group (HK2-siRNA). The HK2 siRNA was transfected into MDA-MB231 cells and the Western blot and qRT-PCR tests were used to detect expressions of HK2 protein and mRNA before and after silencing. Then proliferation of cells in three groups that were exposed to different doses of X-ray (0 2 4 6 8 Gy) was analyzed by CCK-8 experiment and the apoptosis rate of cells irradiated by 4 Gy X rays was determined by flow cytometry. **Results** After silencing HK2 gene, the expressions of protein and mRNA of HK2 in the test group cells were inhibited effectively. After three groups of cells being exposed to different doses of X-ray, the survival rate of cells displayed a decreased trend in a dose-dependent manner. And compared with the negative control group, the cell survival rate in the test group was significantly decreased and the cell apoptosis rate in the test group was higher than that in the negative control group and blank group ($P < 0.01$). **Conclusion** Silencing HK2 gene through siRNA can significantly sensitize MDA-MB231 breast carcinoma cells to X radiation.

Key words HK2; siRNA; breast cancer; radiation

附 具有防止早期 AS 等多种药理作用及生物活性。且能通过上调 Bcl-2 的表达,下调 Bax 的表达,抑制白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 诱导的软骨细胞凋亡^[8]。但对 Hcy 诱导人血管内皮细胞 CRL-1730 凋亡有无保护作用,目前还未见报道。该研究观察蜕皮甾酮对 Hcy 诱导人血管内皮细胞凋亡的影响,并对线粒体凋亡途径中 Bax/Bcl-2-Caspase3 表达调控进行了研究,现报道如下。

1 材料

1.1 材料 蜕皮甾酮(批号:111638-201403)购自中国药品生物制品检定所;人血管内皮细胞 CRL-1730 购自中国典型培养物保藏中心(武汉大学医学院)。

1.2 试剂 100 U/L 青霉素和 100 μ g/L 链霉素(批号:20140111)、CCK-8 试剂盒(批号:FP653)购自武汉博士德生物公司;DMEM 培养基(批号:12491)、小牛血清(批号:8131650)、胰蛋白酶(批号:25200)购自美国 Gibco 公司;Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(批号:KGA108)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;TRIzol 总 RNA 提取试剂(批号:15596-026)购自美国 Invitrogen 公司;Quant-Script RT Kit(批号:KR103)、SYBR green 荧光实时定量 PCR 试剂盒(批号:FP302)购自北京天根生化公司;Bax 抗体(批号:2772)、Bcl-2 抗体(批号:15071)、cleaved-Caspase-3 抗体(批号:9661)购自美国 Cell Signal Technology 公司;辣根酶标记抗鼠 IgG 抗体(批号:SC-358920)、辣根酶标记抗兔 IgG 抗体(批号:SC-2030)购自美国 Santa Cruz 公司;辣根酶标记的 β -actin 抗体(批号:4976)购自上海兴悠生物科技有限公司;ECL 试剂盒(批号:2232)购自瑞典 Amersham Biosciences 公司。

1.3 仪器 Multiskan MS-353 型分光光度仪(芬兰雷勃公司);3111 型细胞培养箱(美国热电公司);9700 型 PCR 仪(美国 ABI 公司);BD FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 BD FACScan 公司)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 将 CRL-1730 细胞培养于含 10% 小牛血清、100 U/L 青霉素和 100 μ g/L 链霉素的 DMEM 培养液中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱内培养,当细胞生长至近融合时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1:2 传代培养。取对数生长期细胞用于

实验。

1.4.2 分组及处理方法 将细胞传代于细胞培养皿中,每组均设 6 孔。正常对照组处理方法:加入完全培养液,于培养箱中继续培养 36 h。蜕皮甾酮高剂量组(3.0 mmol/L Hcy + 1.5 μ mol/L 蜕皮甾酮),蜕皮甾酮中剂量组(3.0 mmol/L Hcy + 1.0 μ mol/L 蜕皮甾酮),蜕皮甾酮低剂量组(3.0 mmol/L Hcy + 0.5 μ mol/L 蜕皮甾酮)处理方法:待细胞生长至 80% 融合时,分别将不同浓度的蜕皮甾酮加入培养皿与 CRL-1730 细胞于培养箱中共同孵育 6 h,再各加 Hcy 3.0 mmol/L 培养 36 h 后收集细胞进行指标检测。Hcy 组(3.0 mmol/L Hcy)处理方法:加 Hcy 3.0 mmol/L 培养 36 h 后收集细胞进行指标检测。

1.4.3 细胞存活率检测 将对数生长期的 CRL-1730 细胞消化后,按 2.5×10^4 /孔的细胞密度接种于 96 孔板中,培养细胞 24 h,实验分为正常对照组、蜕皮甾酮 1.5 μ mol/L 组、蜕皮甾酮 1.0 μ mol/L 组、蜕皮甾酮 0.5 μ mol/L 组,培养 24 h 后,加入 CCK-8 10 μ l,待培养液显色后用酶标仪检测各孔 450 nm 波长的吸光度(absorbance, A)值,以细胞的存活率表示细胞的增殖程度。细胞的存活率(%) = [(A1 - A3) / (A2 - A3)] \times 100%。A1:含有细胞培养基、CCK-8、毒性物质;A2:含有细胞培养基、CCK-8,没有毒性物质;A3:不含有细胞和毒性物质的培养基、CCK-8。

1.4.4 细胞凋亡检测 实验分组及处理方法见 1.4.2。各组 CRL-1730 细胞处理后,用胰酶消化并收集细胞,制备细胞悬液,1 000 r/min 离心弃上清液,PBS 洗涤,收集细胞,在冰浴中避光进行如下操作:用试剂盒中结合缓冲液悬浮细胞,调节细胞浓度为 5×10^4 /L,取上述细胞,按试剂盒说明,加入 Annexin-FITC 和 PI 混匀后孵育 15 min,于 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.4.5 细胞凋亡形态的观察 收集细胞,制备活细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^9 个/L,以每瓶 5 ml 的体积接种于培养瓶中,分组及处理方法同 1.4.4,处理 24 h 后,收集细胞并洗涤,用 4% 多聚甲醛溶液固定后,用 PBS 洗涤细胞后,Hoechst33258 染色,10 min 后于荧光显微镜下观察细胞形态,并照相留存结果。

1.4.6 各组 CRL-1730 细胞 Bax、Bcl-2 及 Caspase-3 mRNA 表达检测 取对数生长期 CRL-1730 细胞按

不同实验分组处理后(同 1.4.4)收集细胞,设计上、下游引物: Bax F: 5'-CAAGCTGAGCCAGTGTCT-CAAGC-3', R: 5'-ATGGTCACGGTCCAACCACC-3', 碱基长度 269 bp; Bcl-2 F: 5'-CTGTGGTCCACCT-GACCCTCC-3', R: 5'-GGCATCCCAGCCTCCGTTAT-3', 碱基长度 220 bp; GAPDH F: 5'-GTCAACGGAT TTGGTCGTATTG-3', R: 5'-TGGAGGGATCTCGCTC CTGGAAGAT-3', GAPDH 扩增长度为 214 bp。提取 CRL-1730 细胞总 RNA; cDNA 合成; 取 cDNA 1 μ l, 2.5 \times RealMasterMix/20 \times SYBR Solution 11.25 μ l, 上下游引物各 1 μ l, 加无 Rnase 水, 总反应体积 25 μ l; PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 变性 2 min, 循环 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 50 s。结果采用 Δ Ct 值法, Δ Ct = 样品的 Ct 均值 - 内参的 Ct 均值, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 即某样品初始 cDNA 的相对量。

1.4.7 Western blot 法检测 取对数生长期 CRL-1730 细胞按不同实验分组处理后(同 1.4.4)收集细胞, 提取总蛋白, 用 BCA 法蛋白定量, 上样, SDS-PAGE 凝胶电泳后, 转膜, PBS 洗膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h; PBS 洗膜后加入一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBS 洗膜; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 0.5 h; 洗膜; 用增强化学发光试剂盒检测。结果扫描后, 用 Quantity One 图像分析软件进行光密度分析, 以 β -actin 为内参校正。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两个独立样本均数比较采用 t 检验, 多组均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同浓度蜕皮甾酮对 CRL-1730 细胞活力的影响 在所选浓度范围内, 蜕皮甾酮对 CRL-1730 细胞增殖活力无明显影响。与空白对照组比较, 蜕皮甾酮 0.5 μ mol/L 组、蜕皮甾酮 1.0 μ mol/L 组、蜕皮甾酮 1.5 μ mol/L 组 CRL-1730 细胞增殖活力无明显差异, 且三组组间比较差异无统计学意义 ($F = 2.791, P > 0.05$)。见图 1。

2.2 蜕皮甾酮对 Hcy 诱导 CRL-1730 细胞凋亡的影响 在所选浓度范围内, 蜕皮甾酮能抑制 Hcy 诱导的 CRL-1730 细胞凋亡。与空白对照组凋亡率 (5.157 \pm 1.222) % 比较, Hcy 组 (23.970 \pm 2.169) % CRL-1730 细胞凋亡率明显上升 ($P < 0.01$), 提示 Hcy 能诱导 CRL-1730 细胞凋亡。与 Hcy 组比较, 蜕

皮甾酮 0.5 μ mol/L 组 (18.130 \pm 2.084) %、蜕皮甾酮 1 μ mol/L 组 (12.488 \pm 1.324) %、蜕皮甾酮 1.5 μ mol/L 组 (8.307 \pm 1.888) % CRL-1730 细胞凋亡率逐渐下降 ($P < 0.01$), 且三组组间比较差异有统计学意义 ($F = 143.438, P < 0.01$)。见图 2。

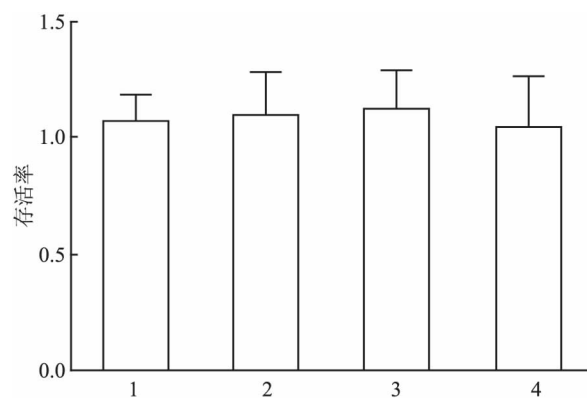


图1 CCK-8 法检测各组 CRL-1730 细胞存活率 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

1: 正常对照组; 2: 蜕皮甾酮 0.5 μ mol/L 组; 3: 蜕皮甾酮 1.0 μ mol/L 组; 4: 蜕皮甾酮 1.5 μ mol/L 组

2.3 Hoechst 染色及细胞核形态学观察 用 Hoechst 染液对细胞进行染色后在荧光显微镜下观察, 可见存活细胞的胞核呈长椭圆形, 被染成亮度较低的均匀蓝色; 凋亡细胞的胞核染色质凝聚、边缘化或片段化, 缩小呈圆形, 显示为亮度较高的明亮蓝色的特征性凋亡小体。随着蜕皮甾酮浓度的升高, 凋亡细胞数量逐渐减少。见图 3。

2.4 蜕皮甾酮对 Hcy 诱导 CRL-1730 细胞凋亡相关基因表达的影响 蜕皮甾酮能浓度依赖性上调 Bcl-2 mRNA 的表达, 下调 Bax mRNA 及 Caspase-3 mRNA 的表达。经 Hcy 处理后, 与正常对照组比较, Hcy 组 CRL-1730 细胞 Bax mRNA 和 Caspase-3 mRNA 表达明显增高 ($P < 0.01$); 与 Hcy 组比较, 蜕皮甾酮 0.5 μ mol/L 组、蜕皮甾酮 1.0 μ mol/L 组、蜕皮甾酮 1.5 μ mol/L 组 CRL-1730 细胞 Bax mRNA 和 Caspase-3 mRNA 表达逐渐降低 ($P < 0.01, P < 0.01$), 三组组间比较差异有统计学意义 ($F = 249.097, P < 0.01; F = 20.543, P < 0.01$)。与空白对照组比较, Hcy 组 CRL-1730 细胞 Bcl-2 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$); 与 Hcy 组比较, 蜕皮甾酮 0.5 μ mol/L 组、蜕皮甾酮 1.0 μ mol/L 组、蜕皮甾酮 1.5 μ mol/L 组 CRL-1730 细胞 Bcl-2 mRNA 表达逐渐增高 ($P < 0.01$), 三组组间比较差异有统计学意义 ($F = 33.845, P < 0.01$)。见表 1。

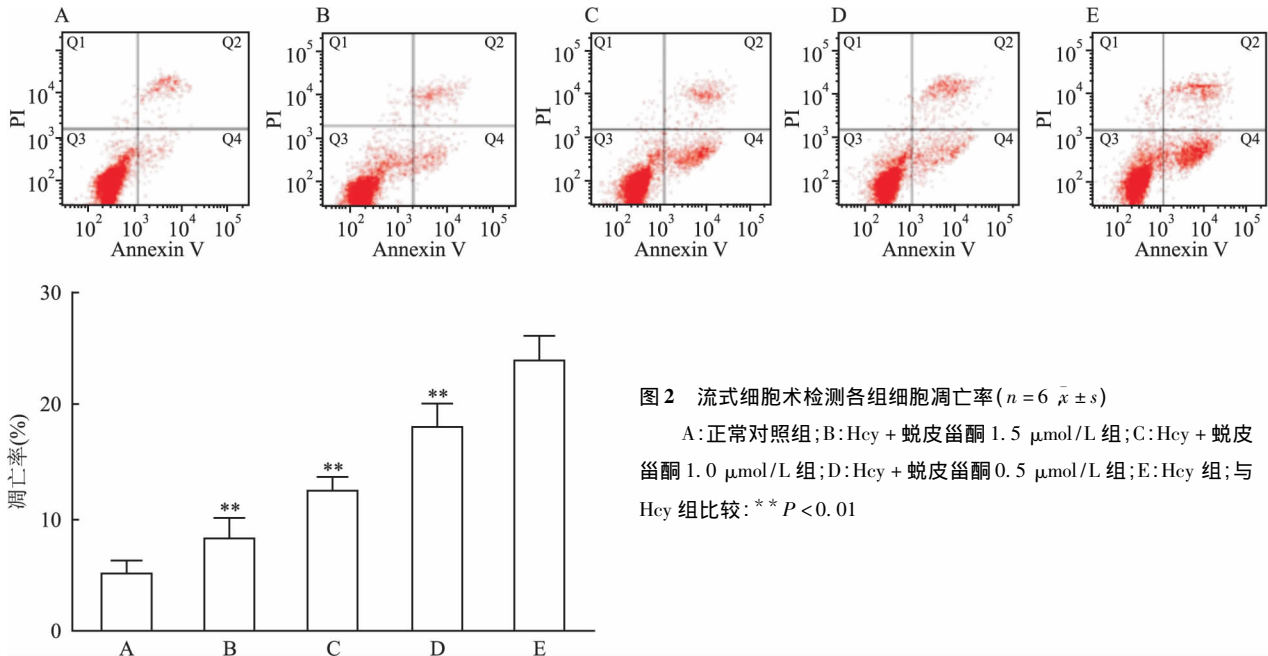


图2 流式细胞术检测各组细胞凋亡率($n=6 \bar{x} \pm s$)
A:正常对照组;B:Hcy + 蜕皮甾酮 1.5 μmol/L 组;C:Hcy + 蜕皮甾酮 1.0 μmol/L 组;D:Hcy + 蜕皮甾酮 0.5 μmol/L 组;E:Hcy 组;与 Hcy 组比较: ** $P < 0.01$

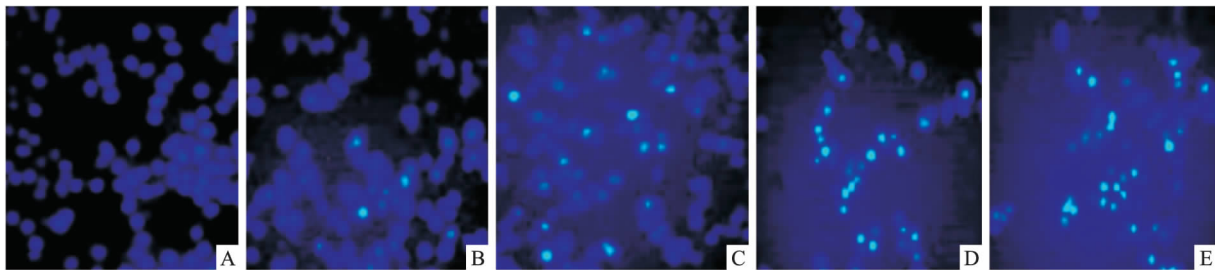


图3 Hoechst 凋亡染色观察 CRL-1730 细胞 ×400

A:正常对照组;B:Hcy + 蜕皮甾酮 1.5 μmol/L 组;C:Hcy + 蜕皮甾酮 1.0 μmol/L 组;D:Hcy + 蜕皮甾酮 0.5 μmol/L 组;E:Hcy 组

表1 各组 CRL-1730 细胞凋亡相关基因表达的比较($n=6 \bar{x} \pm s$)

| 组别 | Bax mRNA | Bcl-2 mRNA | Caspase-3 mRNA |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 正常对照 | 1.055 ± 0.162 | 1.043 ± 0.116 | 1.060 ± 0.142 |
| Hcy + 蜕皮甾酮 1.5 μmol/L | 1.342 ± 0.220 ^{##} | 0.787 ± 0.108 ^{##} | 2.347 ± 0.499 ^{##} |
| Hcy + 蜕皮甾酮 1.0 μmol/L | 2.725 ± 0.334 ^{##} | 0.433 ± 0.066 ^{##} | 3.557 ± 0.678 ^{##} |
| Hcy + 蜕皮甾酮 0.5 μmol/L | 4.103 ± 0.287 ^{##} | 0.283 ± 0.085 ^{##} | 4.612 ± 0.646 ^{##} |
| Hcy | 5.248 ± 0.442 ^{**} | 0.148 ± 0.063 ^{**} | 6.093 ± 0.618 ^{**} |

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 Hcy 组比较: ^{##} $P < 0.01$

2.5 蜕皮甾酮对 Hcy 诱导 CRL-1730 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 蜕皮甾酮能浓度依赖性下调 Hcy 诱导后 CRL-1730 细胞促凋亡蛋白 Bax 和 cleaved-Caspase-3 的表达,并上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达。与空白对照组比较,Hcy 组 CRL-1730 细胞 Bax 和 cleaved-Caspase-3 表达明显增高($P < 0.01$, $P < 0.01$);与 Hcy 组比较,蜕皮甾酮 0.5 μmol/L 组、蜕皮甾酮 1 μmol/L 组、蜕皮甾酮 1.5 μmol/L 组 CRL-1730 细胞 Bax 和 cleaved-Caspase-3 蛋白表达

逐渐降低($P < 0.01$, $P < 0.01$),且三组组间比较差异有统计学意义($F = 86.895$, $P < 0.01$; $F = 33.080$, $P < 0.01$)。与空白对照组比较,Hcy 组 CRL-1730 细胞 Bcl-2 蛋白表达明显降低($P < 0.01$);与 Hcy 组比较,蜕皮甾酮 0.5 μmol/L 组、蜕皮甾酮 1.0 μmol/L 组、蜕皮甾酮 1.5 μmol/L 组 CRL-1730 细胞 Bcl-2 蛋白表达逐渐增高($P < 0.01$),三组组间比较差异有统计学意义($F = 22.591$, $P < 0.01$)。见图 4、表 2。

3 讨论

Hcy 作为 AS 独立危险因素之一,近年来越来越受到重视,其可以通过损伤内皮细胞引起细胞凋亡、促进炎症介质释放等多方面引起 AS 的发生和发展^[9]。Hcy 主要是通过激活细胞凋亡的细胞膜途径和线粒体途径进而促进了内皮细胞的凋亡。Hcy 可抑制内皮细胞 Bcl-2 的表达,促进内皮细胞 Bax 和

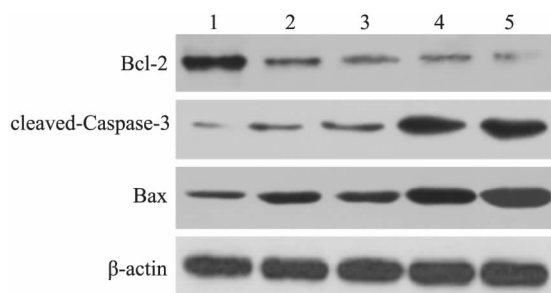


图4 各组 CRL-1730 细胞 Bax、Bcl-2 和 cleaved-Caspase-3 蛋白表达

1:正常对照组;2:Hcy + 蜕皮甾酮 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 组;3:Hcy + 蜕皮甾酮 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组;4:Hcy + 蜕皮甾酮 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组;5:Hcy 组

表2 各组 CRL-1730 细胞 Bax、Bcl-2 和 cleaved-Caspase-3 蛋白表达 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | Bcl-2 | cleaved-Caspase-3 | Bax |
|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 正常对照 | 0.997 \pm 0.086 | 1.009 \pm 0.113 | 1.007 \pm 0.118 |
| Hcy + 蜕皮甾酮 1.5 $\mu\text{mol/L}$ | 0.483 \pm 0.086 ^{##} | 1.295 \pm 0.152 ^{##} | 1.763 \pm 0.111 ^{##} |
| Hcy + 蜕皮甾酮 1.0 $\mu\text{mol/L}$ | 0.364 \pm 0.046 ^{##} | 2.226 \pm 0.148 ^{##} | 2.135 \pm 0.190 ^{##} |
| Hcy + 蜕皮甾酮 0.5 $\mu\text{mol/L}$ | 0.213 \pm 0.042 ^{##} | 3.200 \pm 0.173 ^{##} | 3.110 \pm 0.227 ^{##} |
| Hcy | 0.124 \pm 0.037 ^{**} | 3.699 \pm 0.174 ^{**} | 3.765 \pm 0.144 ^{**} |

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 Hcy 组比较: ^{##} $P < 0.01$

Fas 的表达,进而激活 Caspase-3、Caspase-6 和 p38 的表达,产生促凋亡作用^[10]。本实验结果证实 Hcy 诱导 CRL-1730 凋亡时,CRL-1730 Bax 和 Caspase-3 mRNA 及蛋白表达较正常对照组显著升高;而 Bcl-2 mRNA 及蛋白的表达呈下降的趋势。

蜕皮甾酮又名蜕皮激素,早期发现是昆虫、甲壳动物及其它节肢动物体内分泌的一种激素,具有淘汰角质层,代之以新生皮层的作用。研究^[11]表明,许多药用植物如牛膝、贯众、僵蚕、桑叶等都含有蜕皮甾酮。由于蜕皮甾酮对细胞的增殖及蛋白合成有一定的促进作用,故这类药物的化学与药理作用已引起人们重视。近年来有实验表明蜕皮甾酮对血管内皮的损伤有一定的治疗作用。通过对蜕皮甾酮各组对 CRL-1730 细胞活力的检测,结果显示一定浓度范围内,蜕皮甾酮对 CRL-1730 细胞增殖活力无明显影响。通过细胞凋亡检测,在 CRL-1730 给予 Hcy 处理后,细胞凋亡率明显上升,说明 Hcy 处理可以诱导 CRL-1730 凋亡的发生。在给予蜕皮甾酮处理后,Hcy 处理的 CRL-1730 细胞凋亡得到了抑制,且呈浓度依赖性,进而证实蜕皮甾酮可以在一定程度上抑制 Hcy 诱导的内皮细胞凋亡。

Bax/Bcl-2 的比例失衡可以引起细胞线粒体膜

电位改变以及线粒体细胞色素释放,激活 Caspase 家族蛋白,最终导致凋亡的发生^[12-13]。为了进一步研究蜕皮甾酮抗凋亡的具体机制,本实验对线粒体凋亡途径中的相关蛋白进行了研究。研究^[14]表明:在正常条件下,Bcl-2 和 Bax 在 CRL-1730 细胞中均表达,且 Bcl-2 表达显著高于 Bax。通过 Bcl-2 高水平表达、Bax 低水平表达,从而调节 Bcl-2/Bax 的比值位于较高水平,预防各种不良因素导致的细胞凋亡,维持系统的稳定。本研究也显示:Hcy 在诱导 CRL-1730 细胞凋亡过程中,激活了凋亡诱导蛋白 Bax 表达,下调了凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达,使 Bcl-2/Bax 的比率下降,进而激活 Caspase-3,从而诱发细胞发生凋亡;在给予蜕皮甾酮处理后,在 mRNA 水平引起 Bcl-2、Bax 等表达的变化,进一步上调了 CRL-1730 细胞 Bcl-2 蛋白的表达,下调了 Bax 蛋白的表达,从而使 Bcl-2/Bax 的比率提高,并抑制 cleaved-Caspase-3 的表达,最终对 Hcy 诱导的 CRL-1730 细胞的凋亡起到明显抑制作用。

综上所述,本研究证实了蜕皮甾酮对 Hcy 诱导的人血管内皮细胞 CRL-1730 的凋亡具有一定的抑制作用,而且从细胞凋亡角度初步探讨了可能存在的机制,为蜕皮甾酮防治以 AS 为基础的心脑血管疾病提供了一定的依据。

参考文献

- [1] Steed M M, Tyagi S C. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15 (7):1927-43.
- [2] 程文文,傅佳,赵焕,等.马来酸依那普利叶酸片用于脑卒中二级预防的临床研究[J].安徽医科大学学报,2012,47(6):670-3.
- [3] Lentz S R. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis [J]. J Thromb Haemost 2005, 3(8):1646-54.
- [4] 张翠英,梁生旺,张广强.不同产地牛膝中蜕皮甾酮的含量测定[J].中国药理学杂志,2001,36(10):699-700.
- [5] 马坤. β -蜕皮甾酮对实验性牙周炎大鼠症状及氧化应激的改善作用[J].中国老年学杂志,2015,35(15):4194-6.
- [6] 邹德平,许志忠,曹灵,等.蜕皮甾酮对 2 型糖尿病大鼠肾组织氧化应激的影响[J].山东医药,2012,52(17):25-7.
- [7] 晋军,黄岚,祝善俊,等.蜕皮甾酮对内皮细胞凋亡保护作用的研究[J].中国药理学通报,2001,17(5):546-8.
- [8] Zhang X, Xu X, Xu T, et al. β -Ecdysterone suppresses interleukin-1 β -induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes via inhibition of NF- κ B signaling pathway [J]. Drug Dev Res, 2014, 75(3):195-201.

- [9] 刘晓军,蔡东联,曲丹,等. 高同型半胱氨酸血症对大鼠血管内皮功能和抗氧化系统的损伤作用[J]. 肠外与肠内营养, 2009, 16(1): 7-11.
- [10] 何志勇,张雄,王小同,等. 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]. 中国病理生理学杂志, 2007, 23(4): 699-701.
- [11] 孟大利,李锐. 中药牛膝化学成分和药理活性的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2001, 11(2): 120-4.
- [12] Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas A C, et al. Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis[J]. *In Vivo*, 2007, 21(1): 123-32.
- [13] Yang B, Johnson T S, Thomas G L, et al. A shift in the Bax/Bcl-2 balance may activate caspase-3 and modulate apoptosis in experimental glomerulonephritis[J]. *Kidney Int*, 2002, 62(4): 1301-13.
- [14] Cory S, Adams J M. Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch[J]. *Cancer Cell*, 2005, 8(1): 5-6.

Protective effect of ecdysterone against homocysteine-induced apoptosis of HUVEC

Su Hua, Xie Ruibin, Zhang Xiaoxin, et al

(Dept of Cardiovascular Disease, The People's Hospital of Hezhou, Hezhou 542899)

Abstract Objective To investigate the effect of ecdysterone (EDS) against homocysteine (Hcy)-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (CRL-1730). **Methods** CRL-1730 cells were cultured *in vitro* routinely with different concentrations of EDS. The viability of CRL-1730 cells was detected by cell counting Kit-8 assay. Hcy treatment induced apoptosis in CRL-1730 cells, CRL-1730 cells were divided into 5 groups: control group, high dose of EDS (Hcy + 1.5 $\mu\text{mol/L}$ EDS), middle dose of EDS group (Hcy + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ EDS), low dose of EDS group (Hcy + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ EDS), and Hcy group. The apoptosis of CRL-1730 cells was determined by flow cytometry assay and was observed by fluorescent staining. Real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction was used to detect Bax, Bcl-2 and Caspase-3 mRNA expressions in CRL-1730 cells. Western blot was used to detect Bax, Bcl-2, cleaved-Caspase-3 protein expressions in CRL-1730 cells. **Results** EDS in selective concentration had no effect on the viability of CRL-1730 cells. The apoptosis rates of CRL-1730 cells were significantly increased with the treatment of Hcy, but Hcy-induced apoptosis in CRL-1730 cells was inhibited by EDS treatment in a dose-dependent manner. The protein expressions of Bax and cleaved-Caspase-3 in CRL-1730 cells in the Hcy group showed significant elevation in comparison with the control group. The expression of Bcl-2 protein declined in the Hcy group compared with the control group, but high, middle and low doses of EDS treatments down-regulated the protein expressions of Bax, cleaved Caspase-3 and up-regulated the expression of Bcl-2 in Hcy-treated CRL-1730 cells. The mRNA expressions of Bax and Caspase-3 of CRL-1730 cells in the Hcy group were elevated significantly in comparison with the control group. The expression of Bcl-2 mRNA was reduced in the Hcy group compared with the control group, but high, middle and low doses of EDS treatments down-regulated the mRNA expressions of Bax, Caspase-3 and up-regulated the mRNA expression of Bcl-2 in Hcy-treated CRL-1730 cells. **Conclusion** EDS has a protective effect on Hcy-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells. This study provides evidence for the efficacy of EDS in the treatment of cardiovascular disease.

Key words ecdysterone; homocysteine; human umbilical vein endothelial cells; apoptosis