

· 基础研究 ·

苦豆碱对缺氧/复氧诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

马会军

西安市第一医院心血管内科,陕西 西安 710002

[摘要] 目的:探讨苦豆碱对缺氧/复氧诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响。方法:培养人脐静脉内皮细胞,随机分为对照组、缺氧/复氧组、苦豆碱(20、50和100 mg/L)预处理组和苦豆碱预处理+LY294002组,并进行相应处理。MTT法检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞凋亡,比色法检测 Caspase-3 活性,Western blot法检测 Bax、Bcl-2、Akt 和 p-Akt 蛋白表达。结果:苦豆碱可提高缺氧/复氧抑制的人脐静脉内皮细胞增殖($P < 0.05$),显著减少缺氧/复氧诱导的细胞凋亡($P < 0.05$),逆转缺氧/复氧引起的 Caspase-3 活性和 Bax 表达的增加、Bcl-2 表达的降低,提高 Bcl-2/Bax 值($P < 0.05$)。此外,苦豆碱预处理可明显上调缺氧/复氧降低的 p-Akt 蛋白表达($P < 0.05$),而 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 明显逆转苦豆碱抗缺氧/复氧诱导的凋亡作用($P < 0.05$)。结论:苦豆碱通过激活 PI3K/Akt 通路抑制缺氧/复氧诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡。

[关键词] 苦豆碱;人脐静脉内皮细胞;缺氧/复氧;凋亡;PI3K/Akt

[中图分类号] R364

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)10-1472-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20201013

Effects of aloperin on the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by hypoxia/reoxygenation

MA Huijun

Department of Vasculocardiology, Xi'an NO.1 Hospital, Xi'an 710002, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of aloperin on the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by hypoxia/reoxygenation. **Methods:** HUVECs were cultured and randomly divided into the control group, the hypoxia/reoxygenation group, the aloperin (20, 50 and 100 mg/L) pretreatment group and the aloperin+LY294002 group, and treated accordingly. Cell proliferation and apoptosis were detected by MTT assay and flow cytometry, respectively. Caspase-3 activity was detected by colorimetry, and protein expression of Bax, Bcl-2, Akt and p-Akt were detected by Western blot. **Results:** Aloperin reversed the decrease of proliferation and increase of apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation in human umbilical vein endothelial cells ($P < 0.05$). Aloperin alleviated the increase of Caspase-3 activity and Bax expression, and the downregulation of Bcl-2 induced by hypoxia/reoxygenation, and increased Bcl-2/Bax value ($P < 0.05$). In addition, aloperin significantly upregulated p-Akt protein expression ($P < 0.05$), while the anti-apoptosis effect of aloperin against hypoxia/reoxygenation was significantly reversed by PI3K/Akt inhibitor LY294002 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Aloperin could inhibit hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of HUVEC cells by activating the PI3K/Akt pathway.

[Key words] aloperin; human umbilical vein endothelial cells; hypoxia/reoxygenation; apoptosis; PI3K/Akt

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(10): 1472-1477]

目前心血管疾病已成为威胁人类生命的第一杀手,缺血是心血管疾病中影响多种组织器官功能的病理过程,通过再灌注尽快恢复缺血组织的血供是最理想的治疗方法,然而由此会导致更严重的缺血再灌注损伤^[1]。内皮细胞功能失调是缺血再灌注

损伤的重要病理生理基础^[2],而内皮细胞凋亡可能是缺血再灌注损伤的始发环节^[3]。因此,抑制内皮细胞凋亡有助于防治缺血再灌注损伤,从而达到治疗心血管疾病的目的。

苦豆碱是一种从中药苦豆子 *Sophora alopecuroides*

des L.中提取出的生物碱,有显著的抗肿瘤、抗感染和抗炎等作用^[4-5]。近年来,研究发现苦豆碱对于器官缺血再灌注损伤有一定保护作用,能够保护肾脏^[6]和心肌缺血再灌注损伤^[7],苦豆碱对海马神经元氧糖剥夺再灌注损伤也显示出了一定的保护作用,但苦豆碱对缺氧/复氧诱导内皮细胞凋亡的影响还未见报道。本实验通过建立人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)缺氧/复氧模型,模拟在体血管内皮细胞缺血再灌注损伤,探讨苦豆碱对缺血再灌注引起的血管内皮细胞损伤的影响及可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株 HUVEC(上海细胞生物学研究所);苦豆碱(宁夏紫荆花药业股份有限公司),纯度99%;DMEM培养基(Hyclone公司,美国);胎牛血清(Gibco公司,美国);MTT试剂盒、Annexin-V-FITC/PI试剂盒和Caspase-3活性检测试剂盒(南京凯基生物公司);Real-time PCR试剂盒(TaKaRa公司,日本);TRIzol试剂盒和逆转录试剂盒(Invitrogen公司,美国);兔抗人Bax多克隆抗体、兔抗人Bcl-2多克隆抗体、兔抗人p-Akt多克隆抗体、兔抗人Akt多克隆抗体、内参兔抗人 β -actin抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(Abcam公司,美国);PI3K/Akt信号通路抑制剂(LY294002, Sigma公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HUVEC细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基在37℃、5%CO₂条件下培养,取对数生长期HUVEC细胞接种培养。

1.2.2 缺氧/复氧模型的构建

待细胞生长至80%融合,取生长良好的细胞进行实验。缺氧前将缺氧/复氧组细胞培养液改为不含糖和血清的培养液,然后将细胞于94% N₂和5% CO₂混合气体密闭缺氧培养2 h,而后于含95%空气和5% CO₂混合气体的培养箱中继续培养4 h^[8]。

1.2.3 实验分组

将HUVEC细胞接种于6孔板,分组如下:对照组,正常培养;缺氧/复氧组,按照1.2.2缺氧/复氧模型构建进行处理;苦豆碱预处理组,细胞在处理前分别用终浓度为20、50、100 mg/L苦豆碱处理24 h,其余处理同缺氧/复氧组;苦豆碱预处理+LY294002组,用100 mg/L苦豆碱处理24 h,缺氧前0.5 h避光加入

20 μ mol/L LY294002,再进行缺氧/复氧处理,每组3个复孔,每次实验至少重复3次。

1.2.4 MTT检测

将细胞接种于96孔板培养24 h,各组细胞分别进行相应处理,每孔加入20 μ L 5 g/L的MTT溶液,孵育4 h后,加入DMSO溶液振荡溶解结晶。用酶标仪在490 nm处检测吸光度。

1.2.5 Caspase-3活性检测

收集细胞,用胰酶消化,PBS清洗,细胞中加入裂解液,混匀,冰浴裂解20 min,30 000 r/min 4℃离心5 min,取各组上清。按照Caspase-3活性检测试剂盒说明书测定并计算Caspase-3活性。

1.2.6 流式细胞仪检测

收集各组细胞,PBS洗涤3次,重悬后调整至密度为 1×10^6 个/mL,取100 μ L细胞悬液至5 mL流式管,加入5 μ L Annexin V-FITC,室温避光孵育15 min,再加入10 μ L PI室温避光反应5 min,1 h内上流式细胞仪进行检测。

1.2.7 Western blot实验

收集细胞用RIPA裂解,测定蛋白浓度。各取蛋白质样品30 μ g进行10%SDS-PAGE电泳分离蛋白,转膜,5%脱脂奶粉封闭1 h,加入一抗Bax(1:2 000)、Bcl-2(1:1 000)、Akt(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)和 β -actin(1:1 000)4℃振荡过夜,TBST洗涤后,加入山羊抗兔二抗(1:4 000),室温振荡2 h,TBST清洗。以 β -actin为内参,ECL发光显影,Image J分析条带灰度值。目的基因条带灰度值与内参灰度值的比值反映目的基因蛋白的表达。

1.3 统计学方法

实验结果用SPSS 22.0软件进行统计分析,定量数据表示为均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),用单因素方差分析对数据进行组间比较,用LSD法进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苦豆碱促进缺氧/复氧HUVEC细胞增殖

在预实验时,根据文献选用浓度为0、50、100、1 000 mg/L的苦豆碱处理HUVEC细胞^[9],发现1 000 mg/L苦豆碱会导致细胞大量死亡(大于70%)。因此本实验使用0、20、50、100 mg/L的苦豆碱处理细胞。该处理浓度与人体及动物实验的使用浓度存在差异,仅适用于体外细胞实验。MTT检测结果显示,和对照组相比,缺氧/复氧组HUVEC细胞增殖显著降低($P < 0.05$);而与缺氧/复氧组相比,

苦豆碱预处理显著促进缺氧/复氧 HUVEC 细胞增殖 ($P < 0.05$, 图1)。

2.2 苦豆碱抑制缺氧/复氧诱导的 HUVEC 细胞凋亡

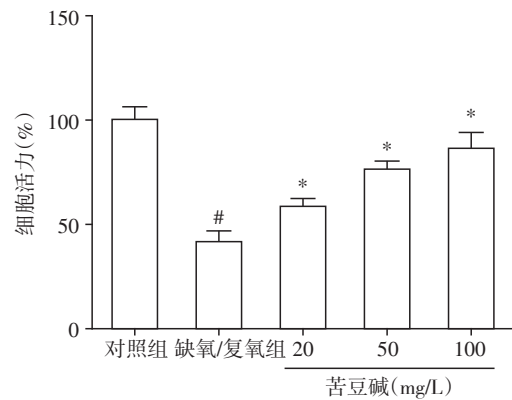
如图2所示,与正常组相比缺氧/复氧组的凋亡率显著增加 ($P < 0.05$);不同浓度苦豆碱作用后凋亡率明显低于缺氧/复氧组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明苦豆碱能抑制缺氧/复氧引起的 HUVEC 细胞凋亡。

2.3 苦豆碱抑制缺氧/复氧 HUVEC 细胞 Caspase-3 活性

缺氧/复氧组 HUVEC 细胞 Caspase-3 活性明显高于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图3);与缺氧/复氧组相比,苦豆碱预处理显著抑制缺氧/复氧诱导的 Caspase-3 活性 ($P < 0.05$)。

2.4 苦豆碱对缺氧/复氧 HUVEC 细胞 Bax 和 Bcl-2 表达的影响

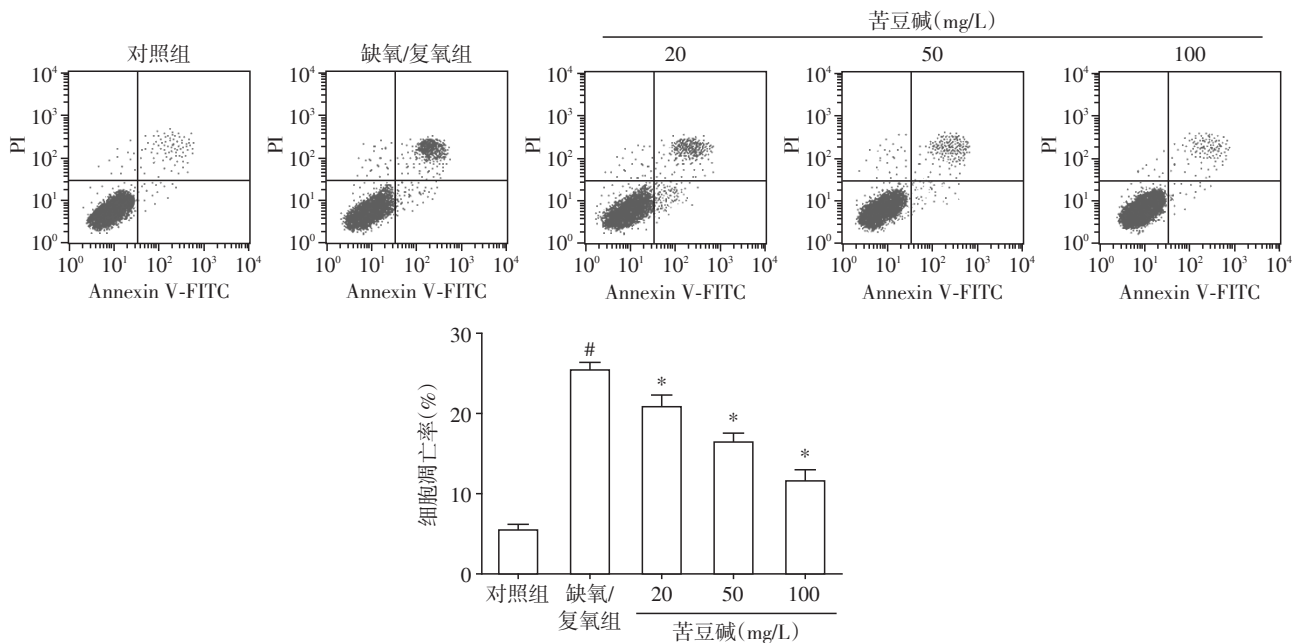
如图4所示,缺氧/复氧组 Bax 蛋白的相对表达



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与缺氧/复氧组比较, # $P < 0.05$ ($n=6$)。

图1 苦豆碱对缺氧/复氧 HUVEC 细胞增殖的影响
Figure 1 Effects of aloperin on the cell proliferation in HUVEC cells after hypoxia/reoxygenation

量较对照组显著升高, Bcl-2 蛋白的相对表达量较对照组显著降低, Bcl-2/Bax 降低 ($P < 0.05$)。苦豆碱预处理组与缺氧/复氧组相比, Bax 表达显著下降, Bcl-2



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与缺氧/复氧组比较, # $P < 0.05$ ($n=3$)。

图2 苦豆碱对缺氧复氧 HUVEC 细胞凋亡率的影响

Figure 2 Effects of aloperin on apoptosis in HUVEC cells after hypoxia/reoxygenation

表达量显著升高, Bcl-2/Bax 升高 ($P < 0.05$)。

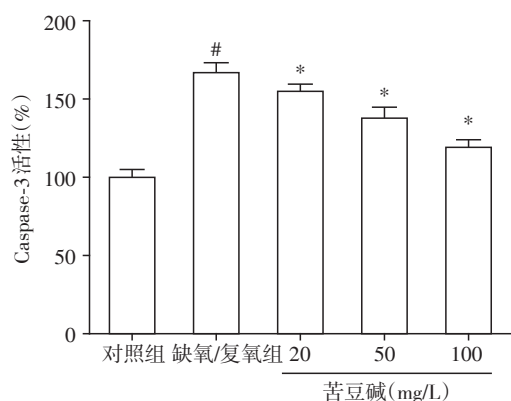
2.5 苦豆碱对缺氧/复氧 HUVEC 细胞 p-Akt 蛋白表达的影响

缺氧/复氧 HUVEC 细胞的 p-Akt 水平明显低于对照组 ($P < 0.05$), 当用苦豆碱作用后, 细胞中 p-Akt 水平显著升高 ($P < 0.05$, 图5), 提示苦豆碱能够促进缺氧/复氧作用下 HUVEC 细胞中 PI3K/Akt 通路的

活化。

2.6 苦豆碱通过激活 PI3K/Akt 通路减轻缺氧/复氧引起的 HUVEC 细胞凋亡

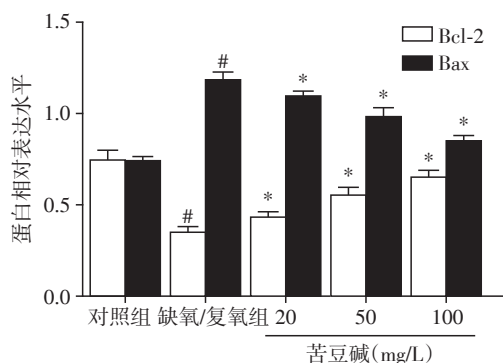
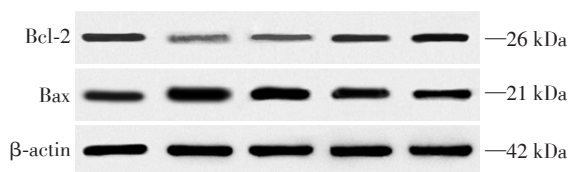
为进一步检测苦豆碱对细胞凋亡的保护作用机制, 本实验室使用 20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 与苦豆碱共同处理细胞。产品说明书以及文献中 LY294002 常用浓度为 1~50 $\mu\text{mol/L}$ [10-11]。而我们预实验显示,



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与缺氧/复氧组比较, [#] $P < 0.05$ ($n=6$)。

图3 苦豆碱对缺氧复氧损伤HUVEC细胞Caspase-3活性的影响

Figure 3 Effects of aloperin on caspase-3 activity in HUVEC cells after hypoxia/reoxygenation

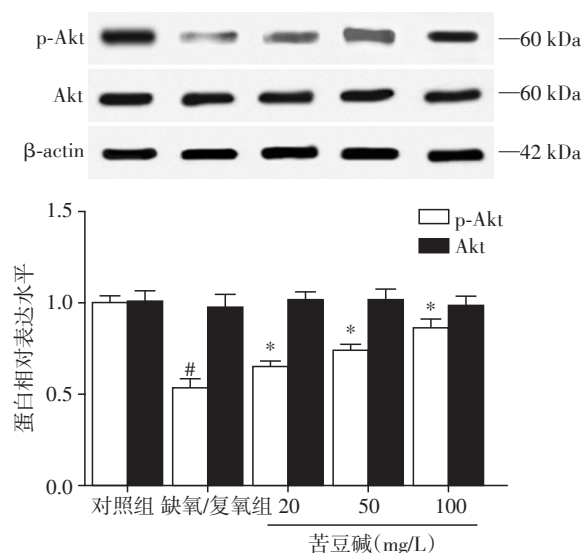


与对照组比较, * $P < 0.05$; 与缺氧/复氧组比较, [#] $P < 0.05$ ($n=3$)。

图4 苦豆碱对缺氧/复氧损伤HUVEC细胞Bax和Bcl-2蛋白表达的影响

Figure 4 Effects of aloperin on the expression of Bax and Bcl-2 in HUVEC cells after hypoxia/reoxygenation

20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002的作用已较为明显,因此本实



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与缺氧/复氧组比较, [#] $P < 0.05$ ($n=3$)。

图5 苦豆碱对缺氧/复氧HUVEC细胞p-Akt蛋白表达的影响

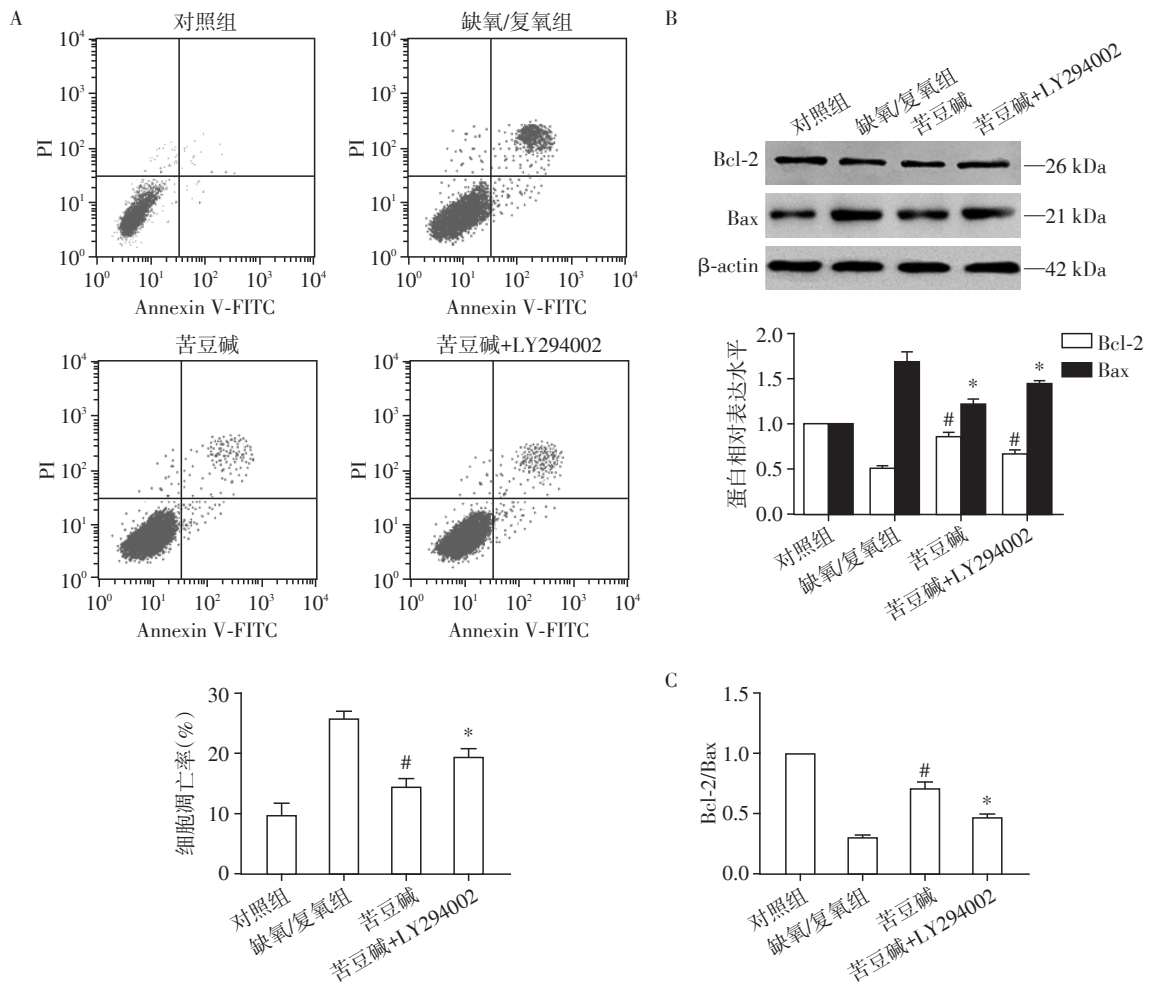
Figure 5 Effects of aloperin on the expression of p-Akt of HUVEC cells after hypoxia/reoxygenation

验使用浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 的LY294002与苦豆碱共同处理细胞。结果显示,与苦豆碱预处理组相比,LY294002处理能减弱苦豆碱对缺氧复氧诱导的HUVEC细胞凋亡的抑制作用($P < 0.05$,图6)。

3 讨论

细胞凋亡是细胞的主动性、生理性死亡,内皮细胞凋亡是缺氧/复氧损伤的一种重要形式^[10]。苦豆碱是一种具有抗炎、抗菌和抗肿瘤等功效的生物碱,对氧糖剥夺再灌注海马神经元损伤和心肌细胞缺血再灌注损伤有显著的保护作用^[7-9, 12-14]。然而,苦豆碱对内皮细胞缺氧/复氧预处理诱导的凋亡的影响却鲜见报道。因此本研究以HUVEC细胞为研究对象,探讨苦豆碱对于缺氧/复氧损伤中内皮细胞凋亡的作用。实验结果发现,苦豆碱预处理能够促进缺氧/复氧抑制的内皮细胞增殖,抑制缺氧/复氧诱导的内皮细胞凋亡。

细胞凋亡受一系列基因的调控,Bcl-2与Bax被认为是调控细胞凋亡最关键的基因。其中Bcl-2是抑凋亡基因,Bax是促凋亡基因,过表达的Bcl-2蛋白可与Bax形成异源二聚体,抑制Bax转位及二聚体化,关闭线粒体膜通透性转换孔,阻断细胞色素c释放而抑制下游Caspase-3的激活,从而抑制细胞凋亡^[14]。研究报道缺氧/复氧诱导内皮细胞凋亡取决于Bcl-2/Bax比值^[15]。本研究结果表明,缺氧/复氧



A: LY294002与苦豆碱共同处理对细胞凋亡的影响; B: Western blot检测LY294002与苦豆碱共同处理对细胞内Bcl-2及BAX蛋白表达的影响; C: Bcl-2/BAX表达水平的比值。与缺氧/复氧组比较, # $P < 0.05$; 与苦豆碱组比较, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图6 苦豆碱通过激活PI3K/Akt通路减轻缺氧/复氧引起的HUVEC细胞凋亡

Figure 6 Aloperin reduces hypoxia/reoxygenation induced HUVEC cell apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway

处理后 Bax 的表达显著上调, Bcl-2 的表达显著下调, 而 Bcl-2/Bax 值降低, Caspase-3 活性降低。苦豆碱预处理能够下调缺氧/复氧增加的 Bax 表达, 上调缺氧/复氧降低的 Bcl-2 表达, 提高 Bcl-2/Bax 值和 Caspase-3 活性。

PI3K/Akt 通路是参与细胞生存和代谢的关键信号通路, 在保护血管内皮功能完整性方面发挥重要的作用, 参与调节内皮细胞增殖、分化、凋亡等多种过程^[16-18]。研究报道 PI3K/Akt 信号通路与 HUVEC 的凋亡密切相关, 其激活能够阻断一系列凋亡信号通路, 促进细胞的存活^[19]。PI3K 依赖的 Akt 活化可使 Bad 在 Ser136/Ser112 位点磷酸化, 磷酸化的 Bad 从 Bcl-2 或 Bcl-xL 上解聚, 通过与 14-3-3 蛋白结合发挥抗凋亡作用, 同时, 解离的 Bcl-2 也可作为抗凋亡蛋白发挥作用^[20]。为了探讨苦豆碱抑制缺氧/复氧引起的内皮细胞凋亡的机制, 本研究探讨了 PI3K/

Akt 通路在该过程中的作用。苦豆碱预处理可明显提高缺氧/复氧 HUVEC 细胞中 PI3K/Akt 信号通路的活化, 提示苦豆碱对缺氧/复氧诱导的 HUVEC 凋亡的抑制作用可能与 PI3K/Akt 信号通路有关。为了进一步验证这个猜测, 用 PI3K/Akt 特异性抑制剂 LY294002 处理细胞, 发现苦豆碱对缺氧/复氧诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的抑制作用明显减弱。该结果表明 PI3K/Akt 通路的活化参与了苦豆碱对内皮细胞缺氧/复氧凋亡的抑制作用。

综上所述, 本研究结果表明, 苦豆碱预处理可以通过激活 PI3K/Akt 通路抑制缺氧/复氧诱导的 HUVEC 凋亡。

[参考文献]

[1] KALOGERIS T, BAINES C P, KRENZ M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2012, 298: 229-317

- [2] SEAL J B, GEWERTZ B L. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury [J]. *Ann Vasc Surg*, 2005, 19(4): 572-584
- [3] SCARABELLI T, STEPHANOU A, RAYMENT N, et al. Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2001, 104(3): 253-256
- [4] 金少举, 金道欣, 王文宝, 等. 苦豆碱药理学研究进展 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(3): 214-217
- [5] CHEN S, JIN Z, DAI L, et al. Aloperine induces apoptosis and inhibits invasion in MG-63 and U2OS human osteosarcoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 45-52
- [6] HU S, ZHANG Y, ZHANG M, et al. Aloperine protects mice against ischemia-reperfusion (IR)-induced renal injury by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling and AP-1 activity [J]. *Mol Med*, 2016, 21(1): 912-923
- [7] 张会超, 徐里, 芮浩森, 等. 苦豆碱对缺血再灌注引起的H9c2心肌细胞损伤和炎症应答的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(2): 281-286
- [8] FENG Y, HU L, XU Q, et al. Cytoprotective role of alpha-1 antitrypsin in vascular endothelial cell under hypoxia/reoxygenation condition [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2015, 66(1): 96-107
- [9] 郝银菊, 周茹, 姚婉霞, 等. 苦豆碱对氧糖剥夺再灌注损伤后海马神经元的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(1): 44-46
- [10] STAGG H W, BOWEN K A, SAWANT D A, et al. Tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand promotes microvascular endothelial cell hyperpermeability through phosphatidylinositol 3-kinase pathway [J]. *Am J Surg*, 2013, 205(4): 419-425
- [11] KUNNIMALAIYAAN M, NDIAYE M, CHEN H. Apoptosis - mediated medullary thyroid cancer growth suppression by the PI3K inhibitor LY294002 [J]. *Surgery (St Louis)*, 2006, 140(6): 1009-1015
- [12] 李江津, 刘正湘. 人参皂苷Rb1对缺氧复氧诱导内皮细胞凋亡的影响 [J]. *临床心血管病杂志*, 2005, 21(12): 728-730
- [13] MA N T, ZHOU R, CHANG R Y, et al. Protective effects of aloperine on neonatal rat primary cultured hippocampal neurons injured by oxygen-glucose deprivation and reperfusion [J]. *J Nat Med*, 2015, 69(4): 575-583
- [14] GUO J, ZHANG K, JI Y, et al. Effects of ethyl pyruvate on myocardial apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax proteins after ischemia - reperfusion in rats [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2008, 28(3): 281-283
- [15] 李江津, 刘正湘. 缺氧复氧诱导脐静脉内皮细胞凋亡的机制 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2004, 13(4): 511-516
- [16] GARCIA-CARDENA G, ANDERSON K R, MAURI L, et al. Distinct mechanical stimuli differentially regulate the PI3K/Akt survival pathway in endothelial cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 902: 294-297
- [17] 高静, 朱红霞, 王敏哲, 等. SDF-1通过PI3K/Akt和MAPK/Erk信号通路对人微血管内皮细胞功能产生影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(9): 1205-1210
- [18] 盛祖龙, 鞠成伟, 鄢高亮, 等. Fn14-PI3K-Akt介导TWEAK促人脐血内皮祖细胞血管生成研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(5): 571-576
- [19] LI P, GUO X, LEI P, et al. PI3K/Akt/uncoupling protein 2 signaling pathway may be involved in cell senescence and apoptosis induced by angiotensin II in human vascular endothelial cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(10): 6931-6937
- [20] HENSHALL D C, ARAKI T, SCHINDLER C K, et al. Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(19): 8458-8465

[收稿日期] 2019-06-23