

大蒜素对人脐静脉细胞抗氧化损伤保护作用*

陈思思, 张 林, 柴 惠[△]

(浙江中医药大学生命科学院, 浙江杭州 310053)

摘要: 目的 研究大蒜素(Allicin)对过氧化氢(H₂O₂)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)凋亡的保护作用及其作用机理。方法 建立 H₂O₂ 诱导 HUVEC 细胞的氧化应激凋亡模型;采用 MTT、RT-PCR、Western-blot 等方法检测来探究大蒜素对其保护作用与可能作用机制。结果 大蒜素能够减少 H₂O₂ 诱导 HUVEC 的凋亡;使基因 eNOS 的表达显著增加;使凋亡相关 PARP 蛋白切割减弱、前体 Caspase-3 蛋白表达增加,Bax 蛋白表达减弱。结论 大蒜素对 H₂O₂ 诱导 HUVEC 凋亡具有较好的保护作用,对氧化应激状态下的 HUVEC 细胞起保护作用。

关键词: 大蒜素;人脐静脉内皮细胞;抗凋亡;H₂O₂

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)05-0001-05

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是严重危害人类健康的常见病和多发病^[1-2]。血管内皮结构和功能损伤是动脉粥样硬化的始动环节^[3-5]。最近研究证明,血管内皮细胞的过度凋亡一方面增强组织因子的活性,加强血小板聚集能力,促进血液凝固,另一方面促进动脉粥样硬化斑块的糜烂,继发性血栓形成^[6]。大量体外实验证明^[7-9],ox-LDL 可通过多条途径诱导血管内皮细胞过度凋亡。寻找减少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。本研究旨在使用 H₂O₂ 代替 ox-LDL 建立氧化应激凋亡模型,观察大蒜素对内皮细胞凋亡的干预作用,研究其是否可抑制内皮细胞的凋亡,为继续探究其作用机制通路打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要器材与试剂

流式细胞仪(美国 Beckmancoulter),PCR 仪

(22331 Hamburg 型,Eppendorf),电泳仪(DYCZ-24 型,北京市六一仪器厂),凝胶成像系统(Gel Doc 2000 型,Bio-Bad),台式高速低温离心机(Centrifuge 5415R,Eppendorf),核酸蛋白测定仪(NANODROP 1000,Thermo),酶标仪(Elx800 型,Bio-Rad)。大蒜素(陕西慈缘生物技术有限公司),DMEM 高糖培养基、胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、MTT 染料(上海拜力生物科技有限公司),Annexin V/PI 染色试剂盒(Roche),H₂O₂ 试剂(Sigma-H1009),丙二醛(MDA)试剂盒、NO 试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。Western-blot 相关试剂(上海生工生物工程产品),一抗二抗(Santa Cruz Biotechnology 公司),ECL (Pierce 公司),Maker (Fermentas 公司)。Trizol:Bio Basic Inc. 公司产品,批号 BS409。

引物由上海生工生物工程公司合成(见表 1)。

表 1 引物序列

基因	上游引物序列	下游引物序列	产物长度/bp
GAPDH	5'-GTCATCCATGACAACCTTTGG-3'	5'-GAGCTTGACAAAGTGCTCGT-3'	444
eNOS	5'-CCAGCTAGCCAAAGTCACCAT-3'	5'-GTCTCGGAGCCATACAGGATT-3'	354
iNOS	5'-AGCGGTAACAAAGGAGATAG-3'	5'-CCCGAAACCACTCGTATT-3'	521

* 基金项目:浙江省自然科学基金(Q13H310011);浙江省医药卫生科学研究基金(2009B114);浙江省教育厅科研项目(Y20096333)

收稿日期:2014-07-22

作者简介:陈思思(1989-),女,江苏南通人,在读硕士研究生,研究方向:天然药物抗心血管研究。

[△]通信作者:柴惠,E-mail:chaihui1212@gmail.com

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

冻存内皮细胞复苏后进行培养,培养条件为 37℃、5% CO₂ 和 95% 空气饱和湿度,培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM,当细胞汇集接近满瓶时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,收集细胞,反复吹打后将细胞以 2×10^5 个/孔的密度均匀接种于 6 孔培养板,实验使用细胞均不超过 6 代。

1.2.2 实验分组

实验分组为对照组(不经任何药物处理)、模型组(0.5 mmol/L H₂O₂)、药物组(0.5 mmol/L H₂O₂+1,10,20,40 mg/L 大蒜素)。

1.2.3 MTT

对数生长期的 HUVEC 细胞接种于 96 孔板,每孔容积 200 μ L,待细胞融合至 70%~80% 时,换为无血清 DMEM 培养液培养 12 h,使细胞生长同步于 G0/G1 期,作用相同时间 6,12,24 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L,4 h 后吸弃上清液,每孔加入 DMSO 200 μ L 溶解结晶物,振荡 10 min 后在酶标仪 490 nm 处测定各孔的吸光值(OD 值)。

1.2.4 抗氧化活性检测

根据丙二醛(MDA)试剂盒、NO 试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒说明书分别检测 HUVEC 细胞培养液中 MDA、SOD、NO 的含量。

1.2.5 Annexin V/PI 双染色

待 6 孔板中的细胞融合 70%~80% 时,换无血清 DMEM 培养基培养 12h,然后在实验组培养孔内加入 H₂O₂ 溶液,终浓度分别为 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L 与 1.0 mmol/L,空白对照组在培养孔内加入等量的生理盐水,培养 12h 后进行相应指标检测。

培养 12 h 后终止反应,细胞消化后 1 000 rpm/min 离心 5 min,倾去上清液漂洗 2 次后重悬,加入 500 μ L 的 1 $\times$ binding buffer,5 μ L AnnexinV 和 10 μ L PI,避光室温孵育 20 min 后,再加入 200 μ L 的 PBS,上流式细胞仪检测,测定细胞数为 10 000 个。可以检测早期凋亡细胞(Annexin V+/PI-)与继发性死亡细胞(Annexin V+/PI+),计算出凋亡细胞,以百分率表示。

1.2.6 RT-PCR

对数生长期的 HUVEC 细胞接种于 6 孔板,待细胞融合至 70%~80% 时,换为无血清 DMEM 培养

液培养 12 h,使细胞生长同步于 G0/G1 期,培养 24h 后收集细胞。Trizol 法提取各组总 RNA,核酸蛋白测定仪测浓度。根据逆转录试剂盒制备 cDNA,再通过 eNOS,iNOS 特异性引物进行 PCR 反应。反应条件:95℃预培养 5 min,(95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s)反应 35 个循环,最后 72℃反应 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,凝胶成像系统拍照。

1.2.7 Western-blot

对数生长期的 HUVEC 细胞接种于 6 孔板,待细胞融合至 70%~80% 时,换为无血清 DMEM 培养液培养 12 h,使细胞生长同步于 G0/G1 期,培养 24 h 后收集各组细胞。在收集的细胞中加入预冷的裂解液,冰浴上反复吹打,放置 30 min,4℃ 13 000 rpm/min 离心 30 min。用 BCA 法检测蛋白浓度后,将分装的蛋白(40 μ g)补加三蒸水和上样缓冲液(5 $\times$)至同体积,95℃水浴 5 min,稍冷却,上样,70 V 电泳 30 min 后,调至 110 V 电泳 1.5 h;然后用电转膜仪将 SDS-Page 上的蛋白转印到硝酸纤维素膜上,330 mA,90 min;用含 5% 脱脂牛奶的 TBS 溶液于室温封闭硝酸纤维素膜 1 h;加入待检蛋白(PARP、pro-Caspase-3、Bax)及 β -Actin 的一抗(1:500),4℃过夜;TBS 漂洗 3 次(15 min,5 min,5 min);分别加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗(1:5000),室温孵育 1h;TBS 漂洗 3 次(15 min,5 min,5 min);采用 ECL 法检测印迹膜,在暗室内压片曝光,拍照记录。

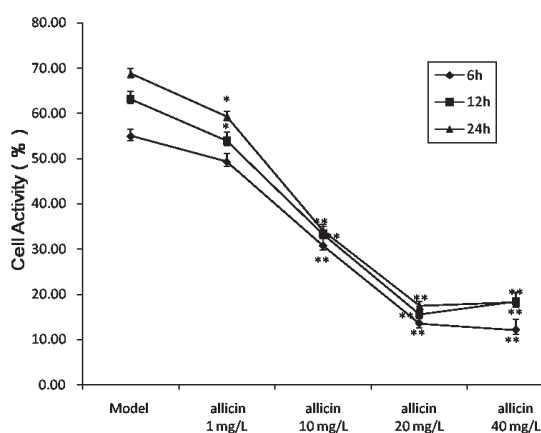
1.2.8 统计分析

数据结果以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 student-*t* 检验处理数据。

2 结果

2.1 MTT

大蒜素浓度(10,20,40 μ g $\cdot$ mL⁻¹)作用 6h,能极显著($P < 0.01$)减少 HUVEC 凋亡;大蒜素浓度(1 μ g $\cdot$ mL⁻¹)作用 12h,能显著($P < 0.05$)减少,浓度(10,20,40 mg/L)能极显著($P < 0.01$)减少 HUVEC 凋亡;大蒜素浓度(1 mg/L)作用 24h,能显著($P < 0.05$)减少,浓度(10,20,40 mg/L)能极显著($P < 0.01$)降低 HUVEC 的细胞活力。相同大蒜素浓度(1,10,20,40 mg/L),随着时间(6,12,24 h)的变化,逆转细胞活力降低作用并不显著,不成时间依赖性(如图 1 所示)。



注:与 H_2O_2 模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图1 大蒜素对 H_2O_2 处理的 HUVEC 细胞活力的影响

2.2 大蒜素对 H_2O_2 诱导 HUVEC 凋亡培养液中 MDA、SOD、NO 水平的影响

H_2O_2 损伤 HUVEC 细胞后, 脂质过氧化产物 MAD 含量增加, 从而导致 H_2O_2 模型组 MAD 含量较正常 HUVEC 组极显著增加($P<0.01$)。大蒜素浓度 (1 mg/L) 能在 24 h 时, 显著($P<0.05$)减少 MAD 的含量水平。大蒜素浓度 (10, 20, 40 mg/L) 在 6, 12, 24 h 时均能极显著($P<0.01$)减少 MAD 的含量水平(如图 2A 所示)。

H_2O_2 损伤 HUVEC 细胞后, 超氧化物歧化酶 SOD 含量减少, 从而导致 H_2O_2 模型组 SOD 含量较正常 HUVEC 组极显著减少($P<0.01$)。大蒜素浓度 (10, 20, 40 mg/L) 在 6, 12, 24h 时均能极显著 ($P<0.01$)增加 SOD 的含量水平(如图 2B 所示)。

H_2O_2 损伤 HUVEC 细胞后, H_2O_2 模型组 NO 释放量较正常 HUVEC 组极显著减少($P<0.01$)。大蒜素浓度 (1 mg/L) 能在 12, 24h 时, 显著($P<0.05$)增加 NO 释放水平。大蒜素浓度 (10, 20, 40 mg/L) 在 6, 12, 24h 时均能极显著($P<0.01$)增加 NO 释放水平(如图 2C 所示)。

2.3 Annexin V/PI 双染色

不同浓度 H_2O_2 (0.1 mmol/L、0.5 mmol/L 与 1.0 mmol/L)作用于 HUVEC 细胞 12h, 各组凋亡率和继发性死亡率均显著 ($P<0.05$) 高于正常 HUVEC 组(如表 2 所示), 且凋亡率和继发性死亡率均随 H_2O_2 浓度增高而增高。

2.4 RT-PCR

H_2O_2 损伤 HUVEC 细胞后, 基因 eNOS 的表达量较正常 HUVEC 组显著($P<0.05$)减少。大蒜素浓

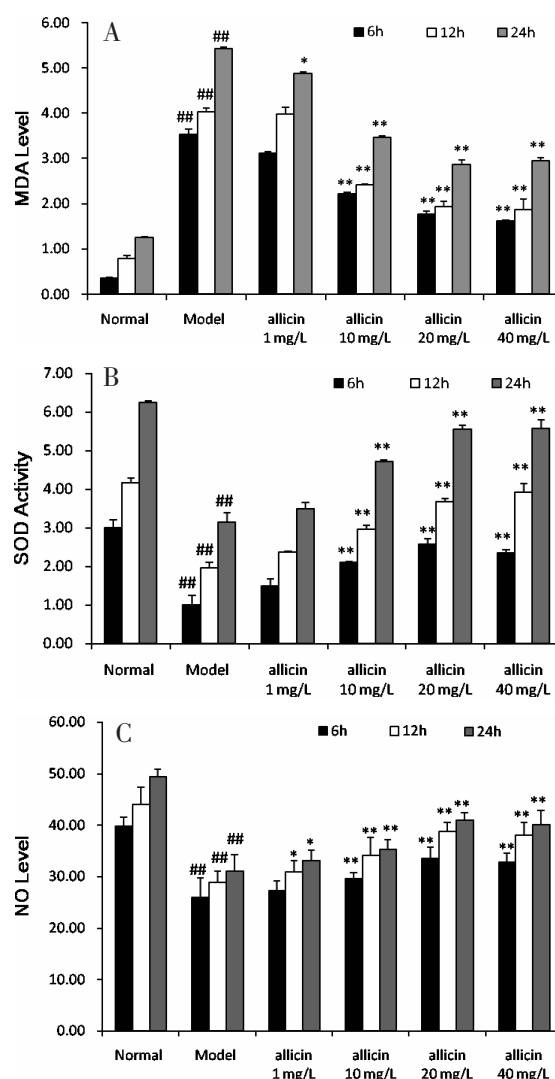


图2 大蒜素对 H_2O_2 诱导 HUVEC 凋亡的抗氧化作用

表2 各组 HUVEC 细胞凋亡率与继发性死亡率($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞凋亡率/%	继发性死亡率/%
正常 HUVEC 组	1.9±0.1	1.1±0.1
0.1mmolL ⁻¹ H_2O_2	16.2±3.2*	6.2±0.2*
0.5mmolL ⁻¹ H_2O_2	33.7±1.1*	6.7±1.2*
1.0mmolL ⁻¹ H_2O_2	47.2±2.1*	23.2±1.4**

注:与正常 HUVEC 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

度 (10, 20, 40 mg/L) 能显著 ($P<0.05$) 增加 eNOS 的表达量, 而基因 iNOS 的表达量基本维持不变(如图 3 所示)。

2.5 Western-blot

大蒜素浓度 (10, 20, 40 mg/L) 作用于 H_2O_2 诱导 HUVEC, 凋亡相关蛋白 PARP 切割减弱、前体 Caspase-3 表达增加, Bax 表达减弱(如图 4 所示)。

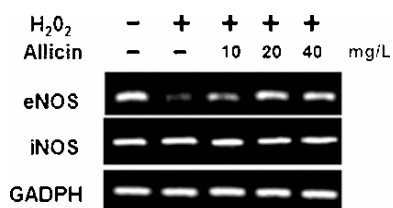


图 3 大蒜素对 eNOS、iNOS 基因 mRNA 表达的影响

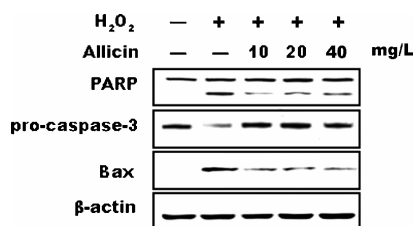


图 4 大蒜素对 PARP、pro-Caspase-3 和 Bax 表达的影响

3 讨论

细胞凋亡又被称为细胞程序化死亡^[10],是不同于细胞坏死的一种细胞死亡形式,是一种有核细胞主动的、由基因编制程序控制的细胞死亡形式。在多细胞生物体中,细胞的增殖和死亡之间的平衡是维持机体平衡的重要方式^[11]。细胞凋亡的正常发生在组织重建、老化和应答、不可恢复的损害中具有重要意义,凋亡的失控可能成为多种疾病的病因。

大蒜具有抗菌、杀虫、解毒、消炎、健胃等功效。大蒜植物杀菌素,对流感病毒、葡萄球菌、链球菌、脑炎双球菌、伤寒、副伤寒、痢疾等杆菌,以及霍乱、白喉等致病菌,均有杀灭作用,此外大蒜中还含有激发人体巨噬细胞吞噬力的有效成分。大蒜素以稳定、无臭的形式存在于大蒜中,是一种醚型的结构(S-烯丙基-L 半胱氨酸亚砷),约占大蒜总重的 0.25%^[12]。目前对大蒜素功效的研究大多停留在定性阶段,尚未对其在降脂和抗动脉粥样硬化作用上进行定量分析。

MTT 实验结果显示大蒜素能有效的降低 H₂O₂ 处理的 HUVEC 的细胞活力(呈一定剂量依赖性),从而保护 HUVEC 细胞在氧化应激状态下存活。

氧自由基能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA),引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物,如丙二醛 MDA。因此测试 MAD 的量可以反映脂质氧化的程度,间接地反映出细胞的损伤的程度^[13]。超氧化物歧化酶 Orgotein(Superoxide Dismutase, SOD),可清除过多的有害的氧自由基,降低脂质过氧化物的含量^[14]。MDA 测定与 SOD 测定相互配合, SOD 活力的高低

间接反映了清除氧自由基的能力, MAD 的高低又间接反映了细胞受自由基攻击的严重程度。

实验结果显示大蒜素能有效降低 H₂O₂ 作用引起 MDA 含量增加,也能有效增加 SOD 的活力。提示大蒜素可能通过提高 SOD 等抗氧化酶活性,清除氧自由基、防止脂质过氧化、稳定细胞膜等,达到保护 HUVEC 细胞的作用。

流式细胞术结果发现 H₂O₂ 浓度(0.1~0.5 mmol/L)范围内, HUVEC 细胞凋亡率增高,但继发性死亡率增加不明显; H₂O₂ 浓度增加到 1.0 mmol/L 时,细胞凋亡率增加,继发性死亡率也明显增加。

一氧化氮(NO)是作为一种内源性的血管舒张因子,由血管内皮细胞释放,具有调节血管张力的作用而被发现的,这种泛肽信号分子调节多种细胞的凋亡^[15]。细胞是否进行凋亡取决于促凋亡因子和抗凋亡因子之间的平衡与否,大量研究显示 NO 具有促进细胞凋亡和抗细胞凋亡的双重特性,其促进凋亡和抗凋亡的作用很大程度上依赖于量的多少和所作用的细胞型号。

eNOS 为内皮细胞性一氧化氮合酶,广泛分布于心脏、肾脏和血管内皮细胞,主要负责 NO 的合成,调节各种生理功能^[16]。体内 NO 通过 NOS 催化 L-精氨酸生成, NOS 分 3 种类型: I 型存在于神经细胞中,称为神经型 NOS(neuronal NOS, nNOS); II 型存在于巨噬细胞和中性粒细胞中,称为诱导型 NOS(inducible NOS, iNOS),它只在特定细胞中稳定表达,在受到刺激时,表达量才发生变化; III 型存在于内皮细胞中,称为内皮型 NOS(endothelial NOS, eNOS)^[17]。内皮细胞的 NOS 主要为 eNOS,同时含一定量的 iNOS。

RT-PCR 通过琼脂糖凝胶电泳判断产物量,达到半定量的目的。由于 EB 等染色剂与较长片段 DNA 结合后才能显现可测量的荧光,因而往往产物大小偏长。实验结果显示 H₂O₂ 能使 HUVEC 细胞内 eNOS 的表达量低于正常 HUVEC 组,抑制 eNOS 的活性,使 NO 的释放减少。正常 HUVEC 细胞有 iNOS 的表达,但是 H₂O₂ 的刺激没有引起 iNOS 的表达增高,提示 H₂O₂ 对于 HUVEC 的 iNOS 表达无明显诱导作用。大蒜素可以提高 H₂O₂ 诱导 HUVEC 凋亡的 eNOS 表达的增加,从而使 NO 释放量增加,诱导保护性应激蛋白,来减少凋亡。

Caspases 是近年来发现的一组存在于胞质溶

胶中的结构上相关的半胱氨酸蛋白酶,它们的一个重要共同点是特异地断开天冬氨酸残基后的肽键。在现已确定的 11 种 caspase 中,caspase-3 被证明参与细胞凋亡的执行,并且被认为是凋亡过程中最主要的终末剪切酶。前体 caspase-3 被活化后,切割底物多聚(ADP-核糖)聚合酶 PARP,使其产生切割条带,不能发挥正常功能,结果使受 PARP 负调控影响的 Ca/Mg 依赖性核酸内切酶的活性增高,裂解核小体间的 DNA,引起细胞凋亡。Western-blot 结果表明大蒜素增加 H₂O₂ 诱导 HUVEC caspase-3 前体蛋白表达(也就是减少 caspase-3 活化),减少 PARP 蛋白的切割,减少 Bax 的蛋白。该结果亦证明了大蒜素能逆转 H₂O₂ 诱导 HUVEC 的凋亡,起保护作用。

参考文献:

- [1] Lusis AJ. Atherosclerosis [J]. Nature,2000,407(6801): 233-241.
- [2] Chan JY, Yuen AC, Chan RY, et al. A review of the cardiovascular benefits and antioxidant properties of allicin[J]. Phytotherapy research, 2013, 27(5): 637-646.
- [3] 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.
- [4] Herman AG, Moncada S. Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of atherosclerosis [J]. Eur Heart J, 2005, 26(19): 1945-1955.
- [5] 段珩. 动脉粥样硬化的发病机制 [J]. 中国保健, 2008, 16(21): 971-972.
- [6] Trostorf F, Landgraf C, Kahlau M. Increased endothelial cell apoptosis in symptomatic high-grade carotid artery stenosis: preliminary data [J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2007, 33: 65-68.
- [7] 胡子旺,全智华,陈颜芳,等. 氧化型低密度脂蛋白诱导血管内皮细胞凋亡及 Fas 抗原表达 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(5): 415-417.
- [8] 郭素箴,刘克强,齐新,等. 氧化型低密度脂蛋白对培养的内皮细胞的致凋亡作用及尼莫地平的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9(1): 351.
- [9] Osterud B, Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis [J]. Physiological Reviews, 2003, 83(4): 1069.
- [10] Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory [J]. Nature, Rev Mol Cell Biol, 2001(2): 545-550.
- [11] Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM. Apoptosis of endothelial cells: contribution to the pathophysiology of atherosclerosis [J]. Eur Cytokine Netw, 1998, 9(4): 697-698.
- [12] Chu YL, Ho CT, Chung JG, et al. Allicin induces p53-mediated autophagy in Hep G2 human liver cancer cells [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2012, 60(34): 8363-8371.
- [13] Liu YZ, TB, Zheng YL, Ma KJ, et al. Screening methods for waterlogging tolerance at maize (Zea mays L.) seedling stage [J]. Agricultural Sciences, 2010, 9(3): 362-369.
- [14] Du XM, Yin WX, Zhang H. The progress of super oxide dismutase [J]. Journal of China Biotechnology, 2002, 23(1): 77-79.
- [15] Liao JK, Shin WS, Lee WY. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase [J]. J Biol Chem, 1995, 270(1): 319-324.
- [16] Chen CA, Wang TY, Varadharaj S, et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function [J]. Nature, 2010, 468(7327): 1115-1118.
- [17] Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals [J]. The Biochemical journal, 1994, 298: 249-258.

(编辑:杨阳)

Effect and Mechanism of Allicin on Apoptosis of HUVECs Induced by H₂O₂

CHEN Si-si, ZHANG Lin, CHAI Hui

(Life Science College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effect and mechanism of Allicin on apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) induced by H₂O₂. **Methods** To establish a model of oxidative stress apoptosis of HUVEC induced by H₂O₂. MTT, RT-PCR and western-blot were used to detect the effects and mechanism of Allicin on the model. **Results** Allicin can decrease the apoptosis rate induced by H₂O₂ in HUVEC cells. The expression of eNOS gene was increased by allicin significantly, the cutting of PARP was impaired, the expression of pro-Caspase-3 was increased, and the expression of Bax was decreased. **Conclusion** Allicin has powerful protective effects on HUVEC cells from apoptosis.

KEY WORDS: Allicin; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; anti-apoptosis; H₂O₂