

原花青素 B2 保护血管内皮细胞延缓凋亡及机制研究

李 强¹, 杨成明^{2△}

(1. 重庆市南川区人民医院心内科 408400; 2. 第三军医大学野战外科研究所大坪医院心内科 400042)

[摘要] **目的** 以 H₂O₂ 诱导人内皮细胞凋亡为模型, 观察原花青素 B2(GSPB2) 延缓人内皮细胞凋亡的保护作用及其机制。**方法** 用 0.5 mmol H₂O₂ 预处理细胞, 分别加入不同浓度的 GSPB2(5.0、10.0、20.0 μmol/L) 保护细胞, TUNEL 法检测细胞凋亡; Western blotting 检测凋亡相关分子 Caspase-3、Bax、Bcl-2 以及影响凋亡的相关分子 PI3K、p-Akt、Akt 的蛋白表达; Transwell 小室检测各组细胞迁移情况。**结果** 0.5 mmol H₂O₂ 致人内皮细胞凋亡明显增加 ($P < 0.01$), GSPB2 能明显减轻 H₂O₂ 所致的人内皮细胞凋亡 ($P < 0.05$), 10 μmol/mL 的 GSPB2 就能接近恢复到 H₂O₂ 未处理的对照组水平。进一步研究发现: Caspase-3、bax 蛋白表达上调, Bcl-2 表达下调; PI3K、p-Akt、Akt 表达上调。**结论** 不同浓度的 GSPB2 对 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞具有保护作用, 而且表现为浓度依赖性和时间依赖性, 其机制与相关分子 PI3K、p-Akt、Akt 有关。

[关键词] 原花青素 B2; 凋亡; 血管内皮细胞**[中图分类号]** R54**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)13-1753-03

Study on effect and mechanism of GSPB2 for protecting vascular endothelial cell and delaying apoptosis

Li Qiang¹, Yang Chengming^{2△}

(1. Department of Cardiology, Nanchuan District People's Hospital, Chongqing 408400; 2. Department of Cardiology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** To observe the protective effect of GSPB2 for delaying the human endothelial cells apoptosis with H₂O₂ induced human endothelial cells apoptosis as the model and to investigate its mechanism. **Methods** The human endothelial cells were pre-treated by 0.5 mmol H₂O₂, then different concentrations of GSPB2(5.0, 10.0, 20.0 μmol/L) was added for protecting cells. The cellular apoptosis was detected by TUNEL method; the apoptosis related molecules, such as Caspase-3, Bax, Bcl-2, and influencing apoptosis related molecules such as PI3K, p-Akt and Akt protein expression were detected by Western blot; Transwell chamber was used to detect cell migration situation. **Results** 0.5 mmol H₂O₂ induced obvious increase of human endothelial cells ($P < 0.01$). GSPB2 could significantly alleviate the H₂O₂ induced apoptosis of human endothelial cells ($P < 0.05$). 10 μmol/mL GSPB2 could be close to return to H₂O₂ untreated control group level. Further found that Caspase-3, Bax protein expression were up-regulated, Bcl-2 expression was down-regulated and the expression of PI3K, p-Akt and Akt wa sup-regulated. **Conclusion** The different concentrations of GSPB2 has a protective effect on vascular endothelial cells induced by H₂O₂, moreover which manifested by the concentration and time dependence. Its mechanism is related with the related molecules PI3K, p-Akt and Akt

[Key words] GSPB2; apoptosis; vascular endothelial cell

心血管疾病的发病率和病死率在所有疾病中是最高的, 血管内皮细胞分布广, 极易受到多种因素的影响, 其中, 氧化与抗氧化对奔、凋亡与抗凋亡的矛盾, 都发生在血管内皮细胞, 进而与心血管疾病相关联。原花青素 (grape seed proanthocyanidins, GSPs) 广泛存在于水果、蔬菜、花、坚果、种子和树皮中, 是一类多羟基黄酮-3-酚的低聚物, 也有以高聚物形式存在的酚类化合物, 原花青素与缩合单宁是同系物, 是多羟基黄酮-3-酚的寡聚或高聚物, 大多以 C4→C8 键相互连接, 也存在 C4→C6 键连接^[1]。具有抗氧化、清除自由基、心血管保护、抗炎、抗血小板聚集、抗肿瘤、调节血脂、抗高血压、抑制细胞增殖、调节免疫、保护肝脏、抑制细胞凋亡以及抗疲劳、改善睡眠等广泛的生物活性, 且具有高效、低毒、生物利用度高等特点^[2-5]。研究发现: Bax/Bcl-2 蛋白和半胱天冬酶-3 活化与 GSP 处理诱导的凋亡现象间有所关联^[6]。因此, 探讨原花青素对血管内皮细胞的保护机制具有重要的临床意义。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂 原花青素 B2(GSPB2)(货号 B10957), 标准品大于或等于 98%, 购自上海士锋生物科技有限公司; H₂O₂

DMSO 购自 Sigma 公司, 小鼠抗人 caspase-3、抗人 BCL-2、抗人 bax、抗人 akt、抗人 p-akt、抗人 PI3K 单抗均购自 Cell Signaling Technology 公司。Tulne 试剂盒购自罗氏公司, 一次性细胞培养瓶 (25 cm²、75 cm²) 细胞培养板等购自 Coster 公司。CO₂ 细胞培养箱购自 Shellab 公司; 倒置显微镜购自日本奥林巴斯公司; 电子天平 (Thermo Scientific)、酶标仪、电泳仪购自 Bio-Rad 公司; 纯水制备系统购自 Millipore 公司; pH 计购自上海大普仪器有限公司; 光学显微镜及其成像系统购自 Bio-Rad 公司; 摇床、组化笔、小型染色缸、湿盒 (塑料饭盒与纱布)、塑料盖玻片或封口膜、吸管、各种规格的移液器及枪头等。

1.2 主要溶液配制方法 (1)GSPB2 溶液: 用 DMSO 直接溶解粉状的 GSPB2 至终浓度为 40 mg/L, -20 °C 保存备用。(2)10%FBS 的 DMEM/H 细胞完全培养基: 于 500 mL 装的 DMEM/H 培养液中加入青霉素与链霉素使其终浓度都为 100 U/mL, 于 4 °C 保存。使用前与胎牛血清以 9:1 的比例混合, 4 °C 保存待用。(3)PBS 溶液: 将 PBS 缓冲体系 (粉末) 充分溶于超纯水, 配制成 1×PBS 缓冲液, 分装后高温高压灭菌。(4)0.25%胰酶: 称取 0.25 g 胰蛋白酶和 0.02 g 乙二胺四乙酸

(EDTA), 溶解于 100 mL PBS 缓冲液中, 充分搅拌均匀, 4 ℃ 放置过夜后于超净工作台用一次性过滤器过滤除菌, 4 ℃ 保存。

1.3 细胞培养及分组 人脐静脉血管内皮细胞株 CRL-2932 细胞购自 ATCC 公司。用含有 10% 胎牛血清的 DMEM/H 的完全培养基, 在 37 ℃、5% CO₂ 且湿度饱和的恒温细胞培养箱中培养。显微镜下观察细胞贴壁生长至 80%~95% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代。

1.3.1 分组 (1) 空白对照组, 换无血清 DMEM/H 继续培养; (2) H₂O₂ 组, 换无血清 DMEM/H 培养基 2 h 后, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 H₂O₂ 培养 24 h。 (3) GSPB2+H₂O₂ 组, 换无血清培养基, 不同浓度的 GSPB2 (5.0、10.0、20.0 μmol/L) 预处理 2 h 后加 H₂O₂ 孵育 24 h。但是免疫印迹选用的时间为 24 h, GSPB2 的浓度为 10.0 μmol/L。

1.3.2 CCK-8 法检测细胞的存活率 取对数生长期的细胞, 接种于 96 孔板 (每孔接 2 000 个细胞), 在 37 ℃、5% CO₂ 培养条件培养过夜, 按分组要求给予不同因素的处理, 每组设 8 个平行孔, 培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL 的 CCK-8, 继续培养 2 h, 用分光光度计在 540 nm 出读取光度值 (OD), 取其 8 孔的平均值按公司计算细胞的存活率, 细胞的存活率 (%) = 处理组 OD/对照组 × 100%。

1.3.3 TUNEL 检测细胞的凋亡 取对数生长的细胞, 消化成为细胞悬液, 1 × 10⁵ 个细胞/每孔接种于 24 孔板中, 24 孔板内放入细胞爬片, 在 37 ℃、5% CO₂ 培养条件培养过夜, 按分组要求给予不同因素的处理, 培养 24 h 后。PBS 洗 3 次-4% 多聚甲醛固定-PBS 洗 3 次-0.3% triton-100 透化细胞-PBS 洗 3 次-滴加 TUNEL 反应物, 37 ℃ 孵育 60 min-冲洗样品 5~20 min-用抗荧光淬灭封片剂封片, 荧光显微镜拍照分析结果。

1.4 免疫印迹检测 Caspase-3、Bax、Bcl-2、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达 提取各组 CRL-2932 细胞的总蛋白, 用 BCA 法测定各组细胞蛋白的含量, 每孔上样 25 μg 的总蛋白, 用 5% 积层胶和 10% 的分离胶电泳后, 半干转法将蛋白转移到 PVDF 膜上, 室温用 TBST 配制的 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。分别加入人抗的

总 Caspase-3 (1 : 500 稀释), 活化的 Caspase-3 (1 : 500 稀释), 人抗的 Bax (1 : 1 000 稀释), 人抗的 PI3K (1 : 1 000 稀释), 人抗的 p-Akt (1 : 1 000 稀释) 人抗的 Akt (1 : 1 000 稀释), 4 ℃ 过夜孵育, 复温半小时, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 标记的兔抗人的二抗 (1 : 2 000 稀释), 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 化学发光显影目的条带和内参, 用 Quantity Qne 软件分析光密度值, 代表蛋白表达的相对含量。

1.5 统计学处理 采用 Graphpad Prism 5 统计软件对实验结果进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 经方差齐性检验后, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两组间比较采用独立样本/检验; 不满足方差齐性检验的, 经对数转换后再采用方差分析, 结果以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞存活率 用 H₂O₂ 孵育内皮细胞 24 h 后, 明显下降 ($P < 0.05$), 细胞的存活率仅为对照组的 59.1% ± 1.2%。用不同浓度的 GSPB2 和 H₂O₂ 共同孵育内皮细胞后, 细胞的存活率依次为: 64.5% ± 1.8%, 80.5% ± 2.2%, 85.4% ± 1.9%。随着 GSPB2 浓度增高, 内皮细胞的存活率增加, 成浓度依赖性, 但 10.0 μmol/L 和 20.0 μmol/L 之间对细胞的活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

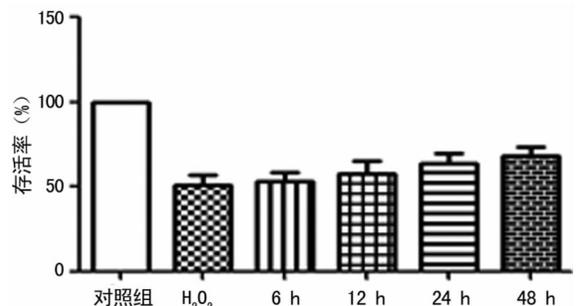
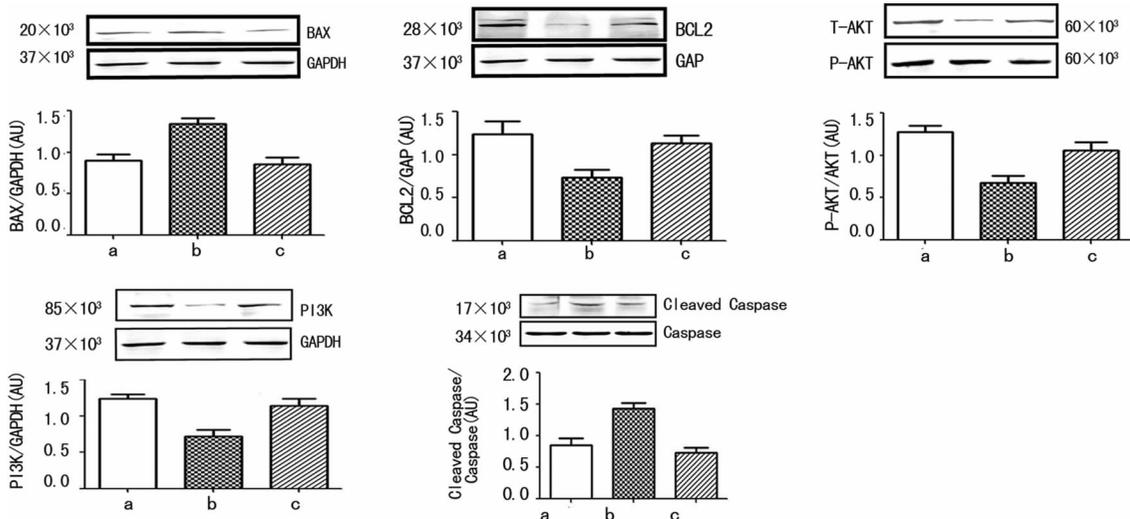


图 1 10.0 μmol/L GSPB2 对 H₂O₂ 诱导内皮细胞的凋亡保护作用



a: 对照组; b: H₂O₂ (0.5 mmol/L); c: H₂O₂ (0.5 mmol/L) + GSPB2 (10 μmol/L)。

图 2 10 μmol/L GSPB2 对内皮细胞的保护作用

2.2 GSPB2 对 H₂O₂ 诱导内皮细胞凋亡的影响 采用 TUNEL 染色检测内皮细胞的凋亡, 观察 GSPB2 (浓度 10.0

μmol/L) 保护 H₂O₂ 诱导的内皮细胞发生凋亡情况。结果发现: 正常情况下细胞凋亡率为 1.0%, 存活率为 99.0%, 在浓度

为 1.0 mmol/L 的 H_2O_2 孵育 24 h 后,细胞的凋亡率明显增加,为 41.0%,存活率为 59.0%。用浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 GSPB 预处理 2 h 后,再加 H_2O_2 孵育,在第 6 小时尚未见明显变化,但在第 12、24、48 小时的凋亡率分别为:36.0%、27.0%、25.0%。第 48 小时与 24 小时的凋亡率差异无统计学意义 ($P>0.05$),见图 1。

2.3 Caspase-3、Bax、Bcl-2、PI3K、p-Akt、Akt 的蛋白表达
Western blotting 结果显示: H_2O_2 处理内皮细胞 24 h 后,与对照组比较,总 Caspase-3 的表达不变,活化的 Caspase-3 表达上调,用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 GSPB2 预处理后,再加入 H_2O_2 ,活化的 Caspase-3 表达下调(图 2E)。同时 Caspase-3 的下游蛋白 bax 上调,Bcl-2 上调(图 2,A、B)。影响细胞凋亡的信号分子 PI3K(图 2D)明显增加;同时,p-Akt、Akt 明显增加(图 2C)。

3 讨 论

原花青素是一种天然多酚类化合物,是由不同数量的儿茶素、表儿茶素缩合而成的聚合物,因其具有极强的抗氧化活性和清除自由基能力,而被广泛应用于保健食品、护肤品及医药卫生等领域。以往的研究发现 GSPE 主要有以下作用,(1)调节血脂:GSPE 能够降低血清 TC、TG、LDL 水平,同时升高 HDL 水平,而且还能够增加血清卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LACT)活性,调节胆固醇外流,减少胆固醇聚集,减轻泡沫细胞的聚集;(2)抗炎作用:GSPE 主要通过下调细胞黏附分子的表达,减少单核细胞向内膜下的迁入以及抑制类花生酸合成酶的基因转录和酶活性,抑制炎性介质的产生,以及对 NF- κ B 途径的调控等发挥其强大的抗炎作用,对类风湿性关节炎等多种急慢性炎症疾病都有很好的抗炎作用^[7-9];(3)GSPE 可以抑制多种肿瘤细胞的生长并促进其凋亡,对抗血管内皮细胞损伤,抑制 VSMC 的增殖和迁移,发挥心血管保护效应,能够抑制心脏损伤时心肌细胞的凋亡等等。凋亡是由抗凋亡和促凋亡效应分子,如 Bcl-2 和 Bax,所组成的复杂调控网络来调控的,Bax/Bcl-2 比率升高会导致半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶的裂解且会诱导凋亡过程^[10-12]。体内体外实验都证实与食物中不添加 GSPs 的无胸腺裸鼠体内生长的肿瘤内相关蛋白表达水平相比,GSPs 可在鼠乳腺癌细胞(4T1)和人类鳞状细胞癌 A431 细胞中下调 Bcl-2 表达的同时上调 Bax 的表达,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 的表达水平增加。血管内皮功能紊乱则是 AS 的起始环节,与 CHD 的发生有密切的关系^[14],因此,保护内皮功能也已成为心血管疾病防治的重要目标之一。

Akt 可以磷酸化 Caspas-9 前体(ProCaspas-9)从而阻断源性蛋白酶的活性,已知 ProCaspas-9 是 Caspas 级联反应的起始蛋白酶,Caspas-9 的活化可以激活 Caspas-3、Caspas-6、Caspas-7 等蛋白酶,在凋亡级联反应中起中间的转接作用,在凋亡调控中发挥主要功能。本实验发现:不同浓度的 GSPB2 可以有效保护血管内皮细胞延缓凋亡,作用的影响,而且是通过调节 Akt 磷酸化的方式发挥作用的^[13]。

参考文献

[1] Prieur JR,Cheyrier L,Moutounet M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds[J]. *Phytochemis-*

try,1994,36(3):781-789.

- [2] Yamakoshi J,Kataoka S,Koga T, et al. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis the cholesterol in fed rabbits[J]. *Atherosclerosis*,1999,142(1):139-149.
- [3] Dongmo AB,Kamanyi A,Anchang MS, et al. Anti-inflammatory and amilgesic properties of the stem bark extract of *Erythrophleum suaveolens* (caesalpinaceae), guillemin samp perrottet[J]. *J Ethnopharmacol*,2001,77(2/3):137-141.
- [4] Zhang JQ,Gao BW,Wang J, et al. Critical role of foxO1 in granulosa cell apoptosis caused by oxidative stress and protective effects of grape seed procyanidin B2[J]. *Oxid Med Cell Long*,2016(4):1-16.
- [5] Cai X,Bao L,Ren J, et al. Grape seed procyanidin B2 protects podocytes from high glucose-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis via the AMPK-SIRT1-PGC-1 α axis in vitro[J]. *Food Funct*,2016,7(2):805-815.
- [7] Roy AM,Baliga MS,Elmets CA, et al. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis through p53, Bax, and caspase 3 pathways[J]. *Neoplasia*,2005,7(1):24-36.
- [8] Yin W,Li B,Li X, et al. Anti-inflammatory effects of grape seed procyanidin B2 on a diabetic pancreas[J]. *Food Funct*,2015,6(9):3065-3071.
- [9] Baselga-Escudero L,Blade C,Ribas-Latre AA, et al. Chronic supplementation of proanthocyanidins reduces postprandial lipemia and liver miR-33a and miR-122 levels in a dose-dependent manner in healthy rats[J]. *J Nutritional Biochemistry*,2014,25(2):151-156.
- [10] Devi A,Jolitha AB,Ishii N. Grape seed proanthocyanidin extract(GSPE) and antioxidant defense in the brain of adult rats [J]. *Med Sci Monit*,2006,12(4):124-129.
- [11] Clarke RB. p27 (KIP1) phosphorylation by PKB/Akt leads to poor breast cancer prognosis[J]. *Breast Cancer Res*,2003,5(3):162-163.
- [12] Engelbrecht AM,Mattheyse M,Ellis B, et al. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line [J]. *Cancer Lett*,2007,258(1):144-153.
- [13] Meeran SM,Katlyar SK. Grape seed proanthocyanidins promote apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells through alterations in Cdk1-Cdk-cyclin cascade, and caspase-3 activation via loss of mitochondrial membrane potential[J]. *Exp Dermatol*,2007,16(5):405-415.
- [14] 郭兵,秦观海,袁英. α 生育酚对链脲菌素诱导乳鼠胰岛细胞凋亡的影响[J] *重庆医学*,2010,39(16):2190-2194.

(收稿日期:2016-11-24 修回日期:2017-01-12)