

二苯乙烯苷对氧化诱导内皮细胞凋亡及 Caspase-3 和 PARP 表达的影响 *

龙石银 ** 张彩平 ** 乔新惠 黄良珠 田 英 *** 高细强 佟 丽

(南华大学生物化学与分子生物学教研室, 衡阳 421001)

摘要 为研究二苯乙烯苷对过氧化氢(H_2O_2)诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的影响并初步探讨二苯乙烯苷抗凋亡的可能机制, 采用不同浓度 H_2O_2 和二苯乙烯苷处理内皮细胞 24 h, 以 MTT 法检测细胞生长活力、Hoechst33258 染色观察细胞形态、流式细胞仪检测凋亡率等方法筛选造模内皮细胞凋亡的 H_2O_2 浓度和二苯乙烯苷最佳的抗内皮细胞凋亡作用浓度. RT-PCR、Western-blot 分别检测 Caspase-3、PARP mRNA 及蛋白质的表达. 结果发现, 与空白对照组相比, 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用后, 内皮细胞增殖明显受到抑制, Hoechst33258 染色可见大量凋亡细胞, 细胞凋亡率显著增加, 流式细胞仪检测出明显的凋亡峰, Caspase-3 和多聚腺苷酸二磷酸核糖基聚合酶(PARP)的表达量显著增加. 经二苯乙烯苷处理后, 随着二苯乙烯苷浓度增加, 细胞的增殖率随之增加, 凋亡细胞数减少, 凋亡率逐渐降低, 与 H_2O_2 组比较, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的二苯乙烯苷能够显著提高细胞增殖率, 降低细胞凋亡率, 并显著减少 Caspase-3 和 PARP 表达. 以上结果表明, 二苯乙烯苷能够抑制由 H_2O_2 诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡, 增加细胞生长活性, 降低细胞凋亡率, 其作用机制可能与下调 Caspase-3 和多聚腺苷酸二磷酸核糖基聚合酶(PARP)的表达有关.

关键词 二苯乙烯苷, 细胞凋亡, Caspase-3, 多聚腺苷酸二磷酸核糖基聚合酶(PARP)

学科分类号 R363, R285.5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00169

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发病机制复杂, 目前较多学者认为是一种慢性血管炎性病变, 其中血管内皮细胞损伤和凋亡是 As 发生的始动因素. 因此, 保护内皮细胞功能、抑制内皮细胞凋亡是药物防治心血管疾病研究热点之一. 研究表明, 中药何首乌的水溶性活性成分二苯乙烯苷(2, 3, 5, 4' -tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside, TSG)具有抗炎、抗氧化、抗 As 作用^[1-3], TSG 还能减少缺血、缺氧损伤等诱导的神经元细胞凋亡^[4-6]等作用, 但机制尚未完全明确; 课题组前期研究表明 TSG 对过氧化氢(H_2O_2)诱导损伤的内皮细胞具有保护作用, 但 TSG 是否通过调节凋亡相关基因的表达来抑制细胞凋亡尚未见文献报道. 因此, 本实验采用 H_2O_2 诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)凋亡, 观察 TSG 对 H_2O_2 诱导内皮细胞凋亡的影响, 并检测与凋亡相关的 Caspase-3 及多聚腺苷酸二磷酸核糖基聚合酶

(peroxynitrite-poly (ADP-ribose) polymerase, PARP) 的表达. 初步探讨其可能的分子机制, 为明确 TSG 的作用提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人脐静脉内皮细胞购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所上海细胞库; TSG 为中国药品生物制品检定所产品(编号: 110844); RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 胰蛋白酶、MTT、DMSO

* 国家自然科学基金资助项目(30800474), 湖南省教育厅项目(08B065, 09C832, 11A104), 湖南省科技厅项目(2010SK3037, 湘科条字[2009]130-19).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0734-8282847, E-mail: uscty@163.com

收稿日期: 2011-04-18, 接受日期: 2011-07-13

购自 Amresco 公司; Hoechst33258 购自碧云天公司; 逆转录试剂盒购自 MBI 公司; 兔抗人 Caspase-3 单克隆抗体、兔抗人 PARP 多克隆抗体、 β -actin 单克隆抗体购自 CST 公司; 其余均为国产试剂(分析纯级)。

1.2 人脐静脉内皮细胞培养及实验分组

人脐静脉内皮细胞接种于无菌培养瓶中, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37℃、5% CO₂、95% 饱和湿度条件下培养。取对数生长期的内皮细胞, 分别采用倒置显微镜观察、MTT 法、Hoechst33258 染色法和流式细胞仪等筛选不同浓度 H₂O₂ (100、200、300、400、500 μ mol/L) 和不同浓度 TSG (0.1、1、10、100 μ mol/L) 对内皮细胞形态、生长活性及凋亡率的影响, 确定 H₂O₂ 造模内皮细胞凋亡的浓度和 TSG 最佳的作用浓度。研究基因表达的实验分组为: (1) 空白对照组: 只加培养液和细胞; (2) H₂O₂ 组: 加 300 μ mol/L H₂O₂ 处理 24 h; (3) TSG + H₂O₂ 组: 以 10 μ mol/L 的 TSG 预处理 24 h, 加 300 μ mol/L H₂O₂ 孵育 24 h。

1.3 MTT 法检测细胞生长活力

取对数生长期的细胞, 以 5×10^4 个 /ml 密度接种在 96 孔板中, 按分组要求给予不同的因素处理, 每组设 6 个平行复孔。培养 24 h 后, 每孔加 MTT 20 μ l (5 g/L), 培养 4 h 后弃上清, 每孔加 DMSO 150 μ l, 待紫色结晶完全溶解后, 用酶标仪在波长 490 nm 处测定吸光度值。细胞增殖率(%) = 试验组吸光度值 / 对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。

1.4 Hoechst33258 染色观察内皮细胞核形态变化

取对数生长期细胞, 按细胞密度 5×10^4 个 /ml, 500 μ l / 孔接种于 24 孔板。分组给予不同因素处理, 每组设 3 个平行孔, 处理 24 h 后, 每孔加 0.5 ml 4% 多聚甲醛后置于 4℃ 冰箱固定 6 h, 倒出固定液后, PBS 清洗 3 遍, 加入终浓度为 10 mg/L 的 Hoechst33258 染液, 37℃ 避光染色 30 min, 荧光显微镜下观察拍照。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期细胞, 按 5×10^4 个 /ml 的细胞接种密度, 接种到培养瓶中, 每瓶 5 ml。待细胞生长至 80% 融合状态, 分组给予不同因素处理细胞, 每组设 3 个平行瓶, 收集细胞, 离心, 用 4℃ 的 PBS 洗 1 遍再离心, 加入 1 ml 预冷的 75% 乙醇, 4℃ 冰箱固定过夜, 流式细胞仪检测。

1.6 RT-PCR 检测 Caspase-3 和 PARP mRNA 的表达

收集各组细胞, 提取细胞总 RNA; 按照 MBI 公司逆转录试剂盒合成 cDNA 第一链, PCR 扩增各基因。Caspase-3 上游引物为 5' atggaagcgaatcaatggac 3', 下游引物为 5' tggtcagaagcacacaaac 3', 扩增片段为 298 bp; PARP 上游引物为 5' atgaagtgaaggccatgattg 3', 下游引物为 5' tcctttaacgatgtccaccag 3', 扩增片段 479 bp; GAPDH 上游引物为 5' tgtcgctgttgaaagtcagag 3', 下游引物为 5' tcaccatcttcaggagcgag 3', 扩增片段为 648 bp。反应参数为: 95℃ 预变性 4 min, 95℃ 变性 30 s, Caspase-3 61℃ 退火 30 s, GAPDH 和 PARP 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统拍照, 并对各目的 DNA 条带进行扫描, 以 GAPDH 为内参, 分析各基因 mRNA 的相对表达量。

1.7 Western blot 检测 Caspase-3 和 PARP 蛋白的表达

收集各组细胞, 用细胞裂解液裂解细胞后提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白质含量。每组取 60 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 分离, 采用电转移将凝胶上蛋白质转印至 PVDF 膜上, 用含 5% 牛奶的封闭液封闭 2 h, 用 1 : 1 000 稀释的 Caspase-3、PARP、 β -actin 一抗 4℃ 孵育过夜, 再用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育后, DAB 显色, 胶片显影, 扫描胶片后用凝胶图像分析各蛋白质条带的灰度值。

1.8 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计方法采用单因素方差分析及 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 H₂O₂ 对内皮细胞增殖的影响

H₂O₂ 处理内皮细胞 24 h 后, 倒置显微镜下观察发现, 随着 H₂O₂ 浓度的增加, 细胞逐渐变圆、贴壁能力降低、细胞数及细胞密度均明显下降、细胞间空隙增加, 并且在 400 μ mol/L 和 500 μ mol/L H₂O₂ 组能观察到细胞碎片(图 1)。MTT 结果显示, 随着 H₂O₂ 浓度增加, 细胞增殖率逐渐降低, 与空白对照组相比, 200~500 μ mol/L H₂O₂ 处理后的细胞增殖率显著性降低($P < 0.01$, 表 1, 图 2)。

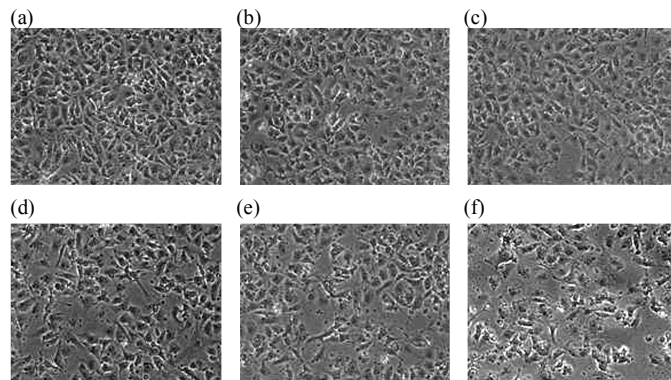


Fig. 1 Morphological change of HUVECs treated with different concentration of H_2O_2 after 24 h ($\times 100$)

(a) Control. (b) 100 $\mu\text{mol/L}$. (c) 200 $\mu\text{mol/L}$. (d) 300 $\mu\text{mol/L}$. (e) 400 $\mu\text{mol/L}$. (f) 500 $\mu\text{mol/L}$.

Table 1 Effects of H_2O_2 on HUVECs proliferation

Group	A	Proliferation rate/%
Control	1.666 ± 0.131	100.0 ± 8.7
100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2	1.513 ± 0.157	89.2 ± 9.6
200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2	$1.349 \pm 0.144^{**}$	$77.6 \pm 7.1^{**}$
300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2	$1.158 \pm 0.105^{**}$	$64.1 \pm 5.5^{**}$
400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2	$0.857 \pm 0.060^{**}$	$42.9 \pm 5.6^{**}$
500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2	$0.683 \pm 0.071^{**}$	$30.6 \pm 5.4^{**}$

Compared with control, $^{**}P < 0.01$, $n = 6$.

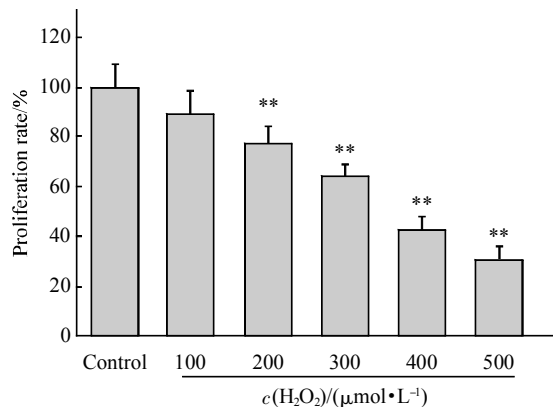


Fig. 2 Effects of H_2O_2 on HUVECs' proliferation

Compared with control, $^{**}P < 0.01$, $n = 6$.

2.2 H_2O_2 对内皮细胞凋亡率的影响

流式细胞仪检测结果显示, 空白对照组凋亡率为 $(1.9 \pm 0.01)\%$, 经不同浓度 H_2O_2 (100、200、300、400、500 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 HUVECs 24 h 后, 各组细胞的凋亡率随着 H_2O_2 浓度的升高而增加, 凋亡率分别为 $(6.3 \pm 0.03)\%$ 、 $(14.9 \pm 0.2)\%$ 、 $(25.3 \pm 0.3)\%$ 、 $(28.8 \pm 0.6)\%$ 和 $(33.0 \pm 1.1)\%$ (图 3)。从细胞周期图分析, 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组 G2/M 期阻滞明显高于对照组和其他浓度的 H_2O_2 组。结合形态学观察和 MTT 法实验结果, 选择 300 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢作为造模内皮细胞凋亡的浓度。

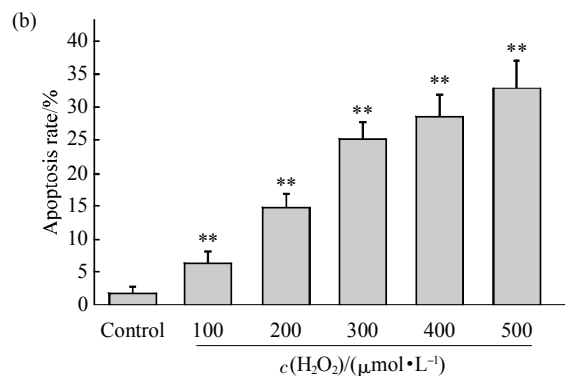
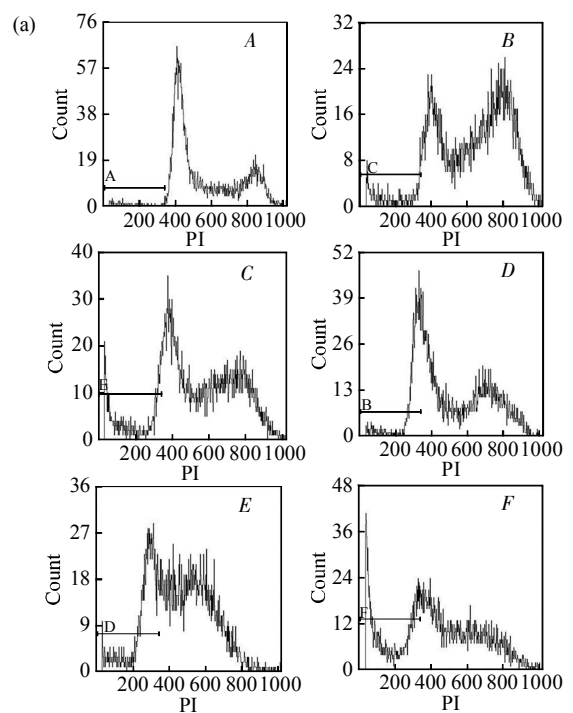


Fig. 3 The effect of H_2O_2 on HUVECs apoptosis

(a) Figure of apoptosis results. A: Control; B: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; C: 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; D: 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; E: 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; F: 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . (b) Apoptosis rate of HUVECs induced by H_2O_2 . Compared with control, $^{**}P < 0.01$, $n = 3$.

2.3 TSG 预处理对 H₂O₂ 诱导损伤 HUVECs 增殖的影响

经 TSG 预处理 24 h 后, 加入 300 μmol/L H₂O₂ 作用 24 h, MTT 结果显示, 随着 TSG 浓度的增

加, 内皮细胞的增殖率逐渐增加, 与 H₂O₂ 组相比, 10 μmol/L 及 100 μmol/L TSG 组细胞增殖率明显增加, 其差异有显著性($P < 0.01$), 表明 TSG 具有抗 H₂O₂ 氧化损伤作用(表 2, 图 4).

Table 2 The effect of TSG on HUVECs proliferation

Group	A	Proliferation rate/%
Control	1.437 ± 0.095	100.0 ± 9.5
300 μmol/L H ₂ O ₂	1.147 ± 0.076**	77.5 ± 8.8**
0.1 μmol/L TSG + 300 μmol/L H ₂ O ₂	1.142 ± 0.054**	75.9 ± 8.7**
1 μmol/L TSG + 300 μmol/L H ₂ O ₂	1.153 ± 0.046**	77.0 ± 8.5**
10 μmol/L TSG + 300 μmol/L H ₂ O ₂	1.248 ± 0.125**#	85.3 ± 7.5**#
100 μmol/L TSG + 300 μmol/L H ₂ O ₂	1.282 ± 0.105**#	88.0 ± 7.8**#

Compared with control, ** $P < 0.01$, compared with H₂O₂ group, # $P < 0.05$. $n = 6$.

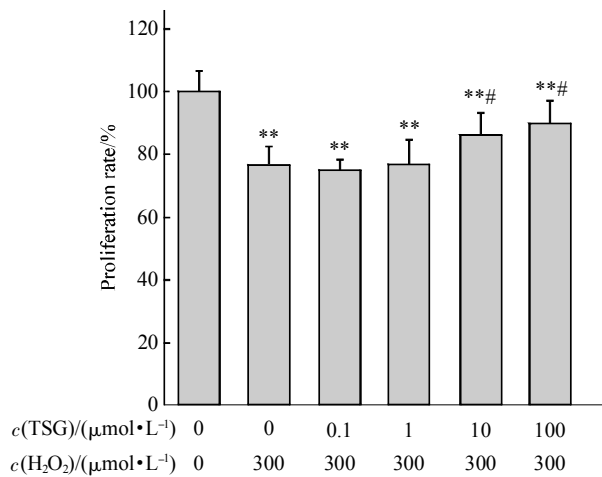


Fig. 4 The effect of TSG on HUVECs proliferation

Compared with control, ** $P < 0.01$, compared with H₂O₂ group, # $P < 0.05$, $n = 6$.

2.4 Hoechst33258 染色结果

HUVECs 经不同浓度 TSG 预处理后, 荧光显微镜下观察发现, 空白对照组细胞核呈正常的低密度均匀的蓝染、细胞核膜完整、细胞数较多、分布较均匀. H₂O₂ 组中细胞数较对照组减少, 细胞出现核固缩、呈致密浓染、发出高亮度荧光, 随着 TSG 浓度增加, 细胞数逐渐增多, 呈固缩状态的细胞核数明显减少. 在 10 μmol/L TSG 组中, 大部分细胞染色质呈均匀的低密度蓝光, 提示 TSG 能够抑制 H₂O₂ 诱导的内皮细胞凋亡(图 5).

2.5 TSG 对 H₂O₂ 诱导内皮细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示, H₂O₂ 组呈现明显的凋亡峰, 经 TSG 预处理 24 h 后, 细胞凋亡率随 TSG 浓度的增加而逐渐减少, 其中 1、10、

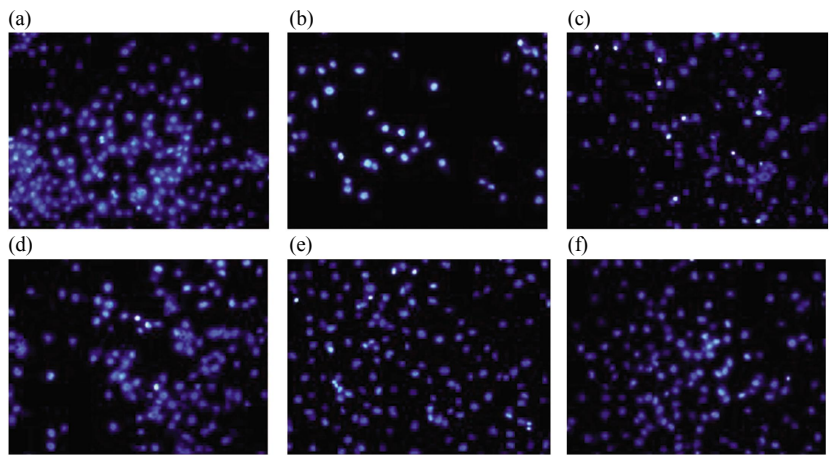


Fig. 5 Morphology of HUVECs treated with different concentration of TSG (×200)

(a) Control. (b) 300 μmol/L H₂O₂. (c), (d), (e), (f) Corresponding to the different concentration of TSG 0.1, 1, 10 and 100 plus 300 μmol/L H₂O₂ respectively. All figures represent three independent experiments.

100 $\mu\text{mol/L}$ TSG 组的凋亡率较 H_2O_2 组差异有显著性($P < 0.01$), 表明 TSG 可减少 H_2O_2 诱导的内皮细

胞凋亡(图 6). 结合 MTT 和 Hoechst33258 染色结果, 选择 10 $\mu\text{mol/L}$ TSG 做下一步实验.

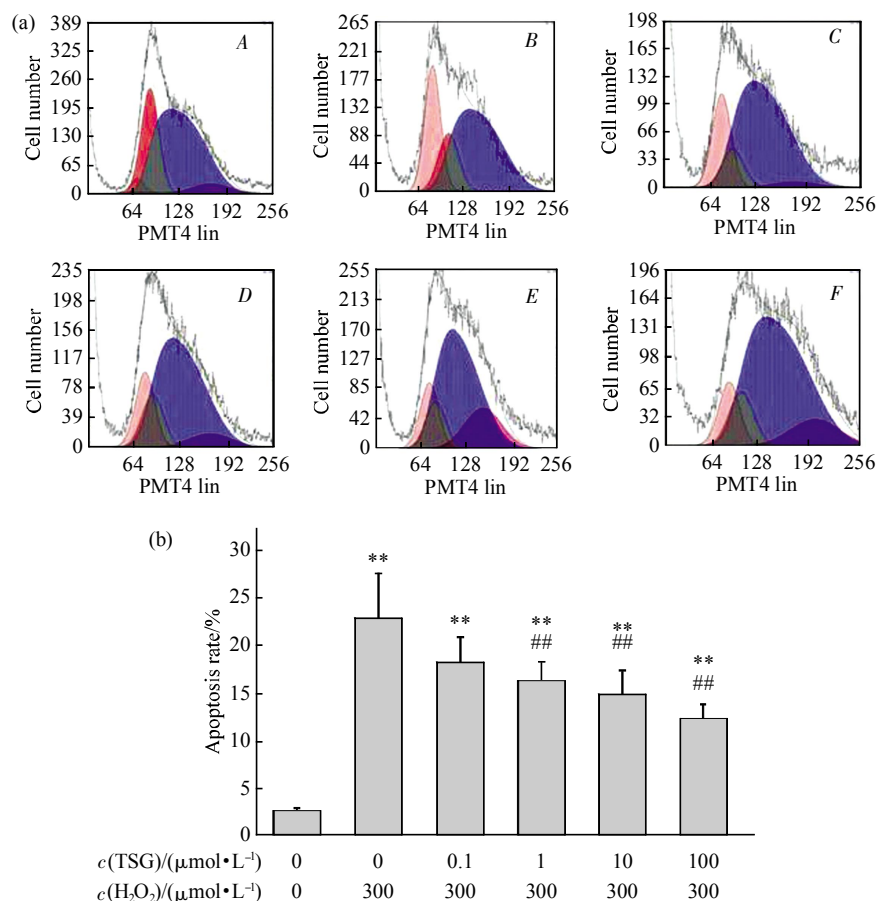


Fig. 6 Effects of TSG on H_2O_2 induced apoptosis of HUVECs

(a) Figure of apoptosis results. A: Control. B: 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . C, D, E, F: Corresponding to the different concentration of TSG 0.1, 1, 10 and 100 plus 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 respectively. (b) Apoptosis rate of HUVECs. Compared with control, ** $P < 0.01$; Compared with H_2O_2 group, ## $P < 0.01$. $n = 3$.

2.6 TSG 对 H_2O_2 诱导凋亡的人脐静脉内皮细胞 Caspase-3 表达的影响

RT-PCR 和 Western-blot 检测结果显示: H_2O_2 作用后, 受试细胞 Caspase-3 mRNA 表达增加, 与空白对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$),

经 TSG 预处理后, Caspase-3 mRNA 的表达较 H_2O_2 组降低, $P < 0.05$; Caspase-3 蛋白表达与 mRNA 表达趋势相一致, 差异均有显著性. 上述结果表明, TSG 能降低 H_2O_2 诱导凋亡内皮细胞中 Caspase-3 mRNA 及蛋白质的表达(图 7, 表 3).

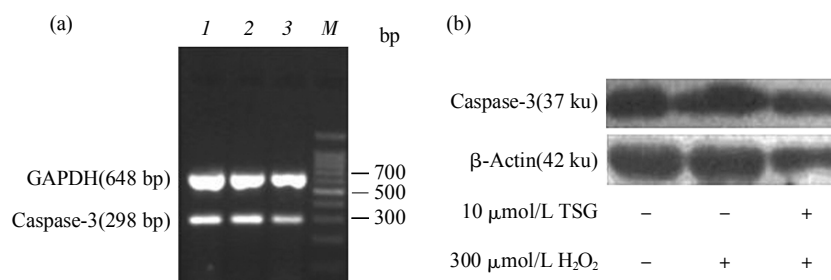


Fig. 7 The effects of TSG on Caspase-3 expression of HUVECs apoptosis induced by H_2O_2

(a) Caspase-3 mRNA expression was detected by RT-PCR. (b) Caspase-3 protein expression was detected by Western blot. All figures represent three independent experiments. M: DNA marker, 1: Control; 2: H_2O_2 group; 3: TSG+ H_2O_2 group.

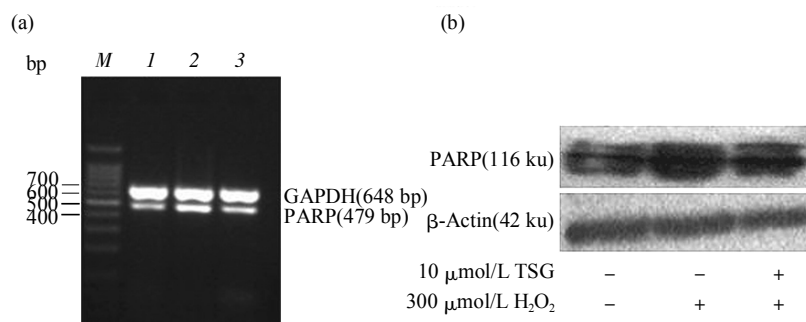
Table 3 The relative densities of Caspase-3 were analyzed by densitometric analysis

Group	mRNA relative density ratio	Protein relative density ratio
Control	0.426 ± 0.007	0.895 ± 0.062
H ₂ O ₂	0.512 ± 0.008*	1.264 ± 0.131**
TSG + H ₂ O ₂	0.430 ± 0.050 [#]	1.092 ± 0.087 ^{##}

Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with H₂O₂ group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$. $n = 3$.

2.7 TSG 对 H₂O₂ 诱导凋亡的人脐静脉内皮细胞 PARP 表达的影响

RT-PCR 和 Western-blot 结果显示, H₂O₂ 作用后, 内皮细胞中 PARP mRNA 及蛋白质表达水平均较空白对照组增加, 差异有显著性($P < 0.01$), 经 TSG 预处理后, PARP mRNA 及蛋白质表达均较 H₂O₂ 组降低, 差异均有统计学意义(图 8, 表 4)。

**Fig. 8** Effects of TSG on PARP expression of HUVECs apoptosis induced by H₂O₂

(a) PARP mRNA expression was detected by RT-PCR. (b) PARP protein expression was detected by Western blot. All figures represent three independent experiments. *M*: DNA marker; *1*: Control; *2*: H₂O₂ group; *3*: TSG+H₂O₂ group.

Table 4 The relative densities of PARP were analyzed by densitometric analysis

Group	mRNA relative density ratio	Protein relative density ratio
Control	0.337 ± 0.033	1.086 ± 0.014
H ₂ O ₂	0.439 ± 0.014**	2.299 ± 0.027**
TSG + H ₂ O ₂	0.375 ± 0.007 [#]	1.843 ± 0.030 ^{##}

Compared with control, ** $P < 0.01$; Compared with H₂O₂ group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$. $n = 3$.

3 讨 论

目前已形成几种学说来阐述 As 发病机理, 氧化学说是其中之一, 体内过多的氧自由基能损伤组织细胞, 内皮细胞作为血管的第一保护层, 一旦内皮细胞受到损伤, 丧失保护血管的功能, 单核细胞侵入血管壁, 分泌的炎性分子促进平滑肌细胞迁移到内层大量增殖, 与内皮细胞、单核细胞等形成动脉粥样硬化斑块。因此, 对血管内皮细胞的保护是预防和治疗动脉粥样硬化的关键之一。

本实验用不同浓度的 H₂O₂ 处理 HUVECs, 24 h 后发现, 低浓度(100 μmol/L)的 H₂O₂ 对内皮细胞形态无明显影响, 随着 H₂O₂ 浓度增加, 细胞间间隙增加、细胞皱缩变圆、贴壁能力降低、细胞增殖率

下降、凋亡细胞逐渐增多、凋亡率增加; 用不同浓度 TSG 预处理细胞 24 h 后, 0.1 和 1 μmol/L TSG 组与 H₂O₂ 组的细胞形态及增殖率无显著差异, 当 TSG 浓度增加到 10~100 μmol/L 时, 细胞增殖率明显增加、细胞数量增加、凋亡率显著降低。表明 H₂O₂ 能诱导内皮细胞凋亡, TSG 作用后能降低氧化损伤内皮细胞的凋亡率, 提示 TSG 具有抗氧化诱导的内皮细胞凋亡的作用。

H₂O₂ 是小分子活性氧, 可直接穿过细胞膜进入细胞核损伤 DNA^[7]。PARP 可作为细胞内有效监测 DNA 损伤的分子感受器, 参与修复损伤或诱导细胞凋亡, 而且此作用与细胞受到损伤的程度有关。当 DNA 受损时, 为修复受损细胞的 DNA, PARP 被激活, 表达增多^[8], 抑制 PARP 的活性可降低细胞凋亡^[9-10]。本研究发现, H₂O₂ 处理组 PARP 的 mRNA 和蛋白质水平均增加, 经 TSG 预处理作用后, PARP 的 mRNA 和蛋白质表达量降低。说明内皮细胞在受到氧化刺激时损伤了细胞 DNA, 胞内 DNA 的损伤激发应激蛋白 PARP 的活性, 使其表达增加, 当细胞损伤严重, PARP 无力修复 DNA 损伤时, 便通过凋亡清除损伤细胞。TSG 预处理后, 发挥其抗氧化的保护作用, 使 DNA 损伤程度降低, 诱导细胞进入生长休止状态, 修复损伤

以利于细胞功能的恢复。

Caspase-3 是凋亡级联信号通路中的效应分子, 是凋亡的执行蛋白, 研究发现, 凋亡信号, 如 TNF、辐射、炎症、 H_2O_2 等, 通过激活依赖 Caspase 凋亡途径导致细胞凋亡^[11-13], 其特异性底物 PARP 裂解失活, 引起细胞凋亡, 抑制 Caspase 的激活能抑制细胞凋亡^[14-16]. 本研究用 $300 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 HUVEC 后, Caspase-3 mRNA 和蛋白质表达量均增高, 经 TSG 预处理 24 h 后, Caspase-3 mRNA 和蛋白质表达量均减少. 提示 TSG 抗凋亡机制可能通过降低 Caspase-3 表达, 抑制启动细胞凋亡信号传导系统, 减少凋亡信号传递至细胞凋亡的执行者 Caspase-3, 抑制激活的 Caspase-3 对其特异性底物进行裂解, 最终减少细胞凋亡.

PARP 在修复 DNA 过程中, 为防止能量的过度消耗, 同时会激活凋亡通路中的关键效应分子 Caspase-3, 切割 PARP, 抑制 PARP 对无用 DNA 的修复功能. 而 Caspase-3 作为凋亡级联信号通路中的共同效应蛋白, 在凋亡执行中起着关键性的作用, Caspase-3 激活后可作用于激活相应的凋亡底物 PARP, 使 DNA 损伤聚 ADP 核糖化早期爆发及随后在凋亡执行阶段 PARP 的灭活. 提示 Caspase-3 和 PARP 在细胞应激及凋亡机制中作用复杂, 内皮细胞的凋亡是多通路相互联系的复杂调控系统, TSG 发挥抗氧化, 抗内皮细胞凋亡的具体分子机制及确切靶点还有待进一步研究.

参 考 文 献

- [1] Wang X, Zhao L, Han T, *et al.* Protective effects of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D- glucoside, an active component of Polygonum multiflorum Thunb on experimental colitis in mice. *Eur J Pharmacol*, 2008, **578**(2-3): 339-348
- [2] 田汝芳, 龙石银, 田 英, 等. 二苯乙烯苷抗动脉粥样硬化的药理作用. *现代生物医学进展*, 2010, **10**(2): 1193-1197
Tian R F, Long S Y, Tian Y, *et al.* *Prog Modern Biomedicine*, 2010, **10**(2): 1193-1197
- [3] 张 伟, 王春华, 李 锋. 二苯乙烯苷对大鼠动脉硬化模型的 MMP-2、9 表达的影响. *中国临床药理学杂志*, 2008, **24**(2): 134-138
Zhang W, Wang C H, Li F. *Chin J Clin Pharmacol*, 2008, **24**(2): 134-138
- [4] 孙 欣, 顾 宜, 李晓峰, 等. 二苯乙烯苷对抗 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞凋亡的作用. *第四军医大学学报*, 2009, **30** (24): 2910-2913
Sun X, Gu Y, Li X F, *et al.* *J Fourth Mil Med Univ*, 2009, **30**(24): 2910-2913
- [5] 赵 玲, 李春阳, 张 丽, 等. 二苯乙烯苷对局灶性脑缺血大鼠脑组织细胞凋亡的影响. *中草药*, 2008, **39**(3): 394-397
Zhao L, Li C Y, Zhang L, *et al.* *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2008, **39**(3): 394-397
- [6] 李雅莉, 赵 玲, 张 兰, 等. 二苯乙烯苷对缺氧缺氧致海马神经元凋亡的影响. *中国新药杂志*, 2007, **16**(20): 1670-1673
Li Y L, Zhao L, Zhang L, *et al.* *Chin J New Drugs*, 2007, **16**(20): 1670-1673
- [7] Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res*, 2005, **68**(1): 26-36
- [8] Eustermann S, Videler H, Yang J C, *et al.* The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger. *J Mol Biol*, 2011, **407**(1): 149-170
- [9] Blenn C, Althaus F R, Malanga M. Poly(ADP-ribose)glycohydrolase silencing protects against H_2O_2 -induced cell death. *Biochem J*, 2006, **396**(3): 419-429
- [10] Huang Q, Shen H M. To die or to live: the dual role of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in autophagy and necrosis under oxidative stress and DNA damage. *Autophagy*, 2009, **5**(2): 273-276
- [11] J Park S, Kim J A, Choi S, *et al.* Superoxide is a potential culprit of caspase-3 dependent endothelial cell death induced by lysophosphatidylcholine. *Physiol Pharmacol*, 2010, **61**(4): 375-38
- [12] Choi Y J, Kang J S, Park J H, *et al.* Polyphenolic flavonoids differ in their antiapoptotic efficacy in hydrogen peroxide-treated human vascular endothelial cells. *J Nutr*, 2003, **133**(4): 985-991
- [13] 关丽英, 许彩民, 潘华珍. 内质网应激介导的细胞凋亡. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(11): 1136-1141
Guan L Y, Xu C M, Pan H Z. *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(11): 1136-1141
- [14] Meguro T, Chen B, Parent A D, *et al.* Caspase inhibitors attenuate oxyhemoglobin-induced apoptosis in endothelial. *Stroke*, 2001, **32**(2): 561-566
- [15] Wang Y K, Hong Y J, Wei M, *et al.* Curculigoside attenuates human umbilical vein endothelial cell injury induced by H_2O_2 . *J Ethnopharmacol*, 2010, **132**(1): 233-239
- [16] Song J, Liu K, Yi J, *et al.* Luteolin inhibits lysophosphatidylcholine-induced apoptosis in endothelial cells by a calcium/mitochondrion/Caspases-dependent pathway. *Planta Med*, 2010, **76**(5): 433-438

Effects of TSG on Apoptosis of HUVECs and The Expression of Caspase-3 and PARP Induced by H₂O₂*

LONG Shi-Yin**, ZHANG Cai-Ping**, QIAO Xin-Hui, HUANG Liang-Zhu,
TIAN Ying***, GAO Xi-Qiang, TONG Li

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract To explore the effects of tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside(TSG) on the apoptosis of HUVEC cells and its mechanisms induced by H₂O₂. The models of apoptosis induced by H₂O₂ in HUVEC and the concentrations of TSG on apoptosis model were established *via* MTT, Hoechst33258 staining, and Flow Cytometry. The expression of Caspase-3 and PARP was detected by RT-PCR and Western blot. Compared with control group, the viability of cells is decreased and the apoptosis ratios is increased with increased concentration of H₂O₂ ($P < 0.01$) respectively. And the group of 300 μ mol/L H₂O₂ inhibited the cell proliferation, increased the number of apoptotic cells significantly. The viability of cells is increased and the apoptosis of HUVECs is decreased after pretreated with different concentration of TSG. According to the MTT and Flow Cytometry, the optimal concentration for H₂O₂ to establish apoptosis model and for TSG to protect HUVECs induced by H₂O₂ were 300 μ mol/L and 10 μ mol/L respectively. Compared with the control group, the group of 300 μ mol/L H₂O₂ inhibited the cell proliferation, increased the number of apoptotic cells and the expression of Caspase-3 significantly. Compared with H₂O₂ group, 10 μ mol/L of TSG improved the rate of cell proliferation, inhibited cell apoptosis, and decreased the expressions of the Caspase-3 and PARP significantly ($P < 0.01$). These results indicate that TSG can inhibit H₂O₂-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells, and its mechanism may relate to the down-regulation of Caspase-3 and PARP expression.

Key words tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (TSG), apoptosis, Caspase-3, PARP

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00169

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30800474), The Education Department Foundation of Hunan Province (08B065, 09C832, 11A104), The Science and Technology Department of Hunan Province (2010SK3037, [2009]130-19).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-734-8282847, E-mail: uscty@163.com

Received: April 18, 2011 Accepted: July 13, 2011