

榆干离褶伞发酵液对血管内皮细胞的保护作用

彭 瀛, 周广亮, 沈明花*

(延边大学 医学院, 吉林 延吉 133000)

摘要: 为了探讨榆干离褶伞 (*Lyophyllum ulmarium*, 简称为 LU) 发酵液对人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的保护作用, 分别用 20、40、80 mg/L LU 干预 HUVEC 后用过氧化氢诱导凋亡, 采用 MTT 法观察 LU 发酵液对细胞存活率的影响; 通过比色法测定细胞上清液乳酸脱氢酶 (LDH) 活性; 用流式细胞仪检测细胞凋亡率; Western blot 法检测 bcl-2、bax、Caspase-3、Caspase-9 蛋白质的表达。结果显示: LU 发酵液显著提高内皮细胞的存活率, 降低细胞上清液 LDH 活性, 抑制 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡, 降低 bax、Caspase-3、Caspase-9 的表达, 提高 bcl-2 的表达。这说明 LU 发酵液对血管内皮细胞有保护作用, 其机制可能与抑制凋亡有关。

关键词: 榆干离褶伞; 发酵液; 血管内皮细胞; 凋亡; 保护作用

中图分类号: R 730.52 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)02—0177—04

Protective Effects of Fermentation Broth of *Lyophyllum ulmarium* on Vascular Endothelial Cells

PENG Ying, ZHOU Guangliang, SHEN Minghua*

(Medical College, Yanbian University, Yanji 133000, China)

Abstract: The protective effects of fermentation broth of *Lyophyllum ulmarium* (LU) on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were observed. The H₂O₂ was used to induce the injury of HUVEC after the treatment with 20, 40 and 80 mg/L LU. Survival rate of HUVECs was determined by the MTT assay, the lactate dehydrogenase (LDH) activity in culture serum was investigated using the colorimetric method, the apoptotic rate of HUVECs was detected by flow cytometry, and the protein expression of bcl-2, bax, Caspase-3 and Caspase-9 was detected by western blot method. The results showed that LU could increase the survival rate of endothelial cells induced by H₂O₂ and increase LDH activity, could reduce the cell apoptotic rate induced by H₂O₂, down-regulated the expression of bax, Caspase-3, Caspase-9 proteins, and up-regulated the expression of bcl-2 protein. It was indicated that the fermentation broth of *Lyophyllum ulmarium* has protective effects on vascular endothelial cell, probably via the inhibition of apoptosis.

Keywords: *Lyophyllum ulmarium*, fermentation broth, vascular endothelial cell, apoptosis, Protective effects

收稿日期: 2013-08-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760150, 81360088); 吉林省中医药管理局中医药科技项目(2012-151)。

* 通信作者: 沈明花(1970—), 女, 朝鲜族, 吉林延吉人, 理学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食用菌生物活性方面的研究。

E-mail: sdjjch@ybu.edu.cn

血管内皮细胞不仅作为血液与血管平滑肌之间的机械屏障,而且又是机体最大的内分泌器官^[1],在调节血管紧张度、抗血小板聚集以及抗凝促纤溶等过程中起着重要的作用,其抗栓作用越来越受到重视。血栓是血液中纤维蛋白多聚体与细胞组成的复合物,其形成与诸多因素有关,其中,血管内皮细胞的损伤与血栓形成密切相关。血管内皮细胞的过度凋亡是血栓形成的重要原因。

榆干离褶伞(*Lyophyllum ulmarium*),又名大榆蘑。属担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、口蘑科、离褶伞属。据文献报道,其发酵液具有抗氧化^[2]、溶栓^[3]作用。作者主要探讨榆干离褶伞发酵液对血管内皮细胞的保护作用,为榆干离褶伞的溶栓机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品的制备 榆干离褶伞菌种:由韩国益山大学特种作物加工实验室提供。在 25 ℃、150 r/min 液体深层二级培养 15 d。将发酵液用纱布过滤,收集滤液以 3 000 r/min 离心 15 min,将上清液进行冷冻干燥,得样品。

1.1.2 细胞株 人脐静脉内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC):购自北京宏宝达生物科技有限公司

1.1.3 试剂 MTT 和 DMSO:Sigma 公司;Annexin-V-Fluos 试剂盒:美国 Roche 公司;DMEM 培养基:Gibco 公司;胎牛血清和胰酶:华美生物工程公司;兔抗 bcl-2、bax、Caspase-3 和 Caspase-9 抗体:美国 Santa Cruz 公司;LDH 试剂盒:南京建成生物技术有限公司。

1.2 仪器

倒置显微镜:日本日立公司;酶标仪:日本岛津公司;流式细胞仪:Beckman 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 将 HUVEC 在 37 ℃、5% CO₂ 条件下常规培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中。待细胞长满至 80%时更换为无血清培养基,做以下实验并进行相应指标的测定。

1.3.2 MTT 法检测 LU 发酵液的细胞毒性作用 取对数生长期的细胞,将细胞密度调整为 5×10⁴/L,接种于 96 孔培养板,每孔 200 μL。待细胞贴壁后,分 4 组,分别为空白对照组、低、中、高剂量 LU 发酵液

用药组,每组设 6 个复孔。用药组分别加入终质量浓度为 20、40、80 mg/L 的 LU 发酵液,而空白对照组加相应体积的培养基。各组分别培养 24、48 h 后每孔加入预先配制的 MTT 液 20 μL,37 ℃继续孵育 4 h。吸去每孔培养液,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 5 min 后,在波长 490 nm 处测定各孔光吸收值(A),按下列公式计算细胞存活率:

$$\text{存活率} = A_{\text{用药组}} / A_{\text{空白对照组}}$$

1.3.3 LU 发酵液对 H₂O₂ 所致损伤细胞存活率的影响 取前述传代细胞接种到 96 孔板中,分为正常对照组、模型组和发酵液低(20 mg/L)、中(40 mg/L)、高(80 mg/L)剂量用药组,每组设 6 个复孔。首先用药组以低、中、高剂量发酵液预处理细胞 24 h,正常对照组和模型组以无血清培养基代替。24 h 后,除正常对照组外其余各组均加入终浓度为 200 μmol/L 的 H₂O₂,继续培养 4 h 后按方法 1.3.2 进行 MTT 检测。

1.3.4 细胞上清液 LDH 的测定 收集各组上清液以测 LDH 活性。

1.3.5 流式细胞术测定细胞凋亡率 将细胞接种于 6 孔板,分组及处理同 1.3.3。培养 24 h 后,用胰酶消化并收集细胞,用 PBS 冲洗两次,调整细胞数 1×10⁶ 个。按美国 Roche 公司提供的试剂盒说明书操作,进行流式细胞仪凋亡检测。

1.3.6 Western Blot 法检测 Bax、Bcl-2、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白质的表达 分组及处理方法同 1.3.3。分别收集各组细胞,提取总蛋白,参照文献[4]方法进行电泳、转膜、显影及定影。

1.4 统计学分析

用 SPSS 统计软件处理,进行单因素方差分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 LU 发酵液对正常血管内皮细胞的影响

与正常组相比,中、高剂量组处理 HUVEC 24、48 h 后细胞活力高于正常组,这就说明用药剂量范围内 LU 发酵液对正常内皮细胞无毒性作用,反而促进细胞的增殖,见表 1。

2.2 LU 发酵液对损伤细胞存活率及 LDH 的影响

如表 2 所示,模型组细胞存活率显著低于正常组,LDH 活性显著高于正常组,说明 H₂O₂ 作用以后损伤或死亡的内皮细胞数增多。用 LU 发酵液预处

理以后,中、高剂量组细胞活力显著高于模型组,且高剂量组的 LDH 活性显著低于模型组,这就提示 LU 发酵液具有保护 HUVEC 的作用。

表 1 LU 发酵液对正常 HUVEC 存活率的影响

Table 1 Effect of LU fermentation broth on survival rates of HUVECs

组别	24 h		48 h	
	A_{490}	存活率/%	A_{490}	存活率/%
正常组	0.38±0.08	100.00	0.62±0.08	100.00
低剂量组	0.45±0.06	122.38	0.57±0.05	90.53
中剂量组	0.54±0.05**	150.37	0.78±0.07**	126.71
高剂量组	0.73±0.05**	203.83	0.98±0.14**	160.53

注:与正常组比较,**表示 $P<0.01$ 。

表 2 LU 发酵液对损伤细胞存活率及 LDH 的影响

Table 2 Effect of LU fermentation broth on survival rates and LDH of cells with injury

组别	MTT		LDH/(U/L)
	A_{490}	存活率/%	
正常组	0.70±0.11	100	286.76±113.59
模型组	0.37±0.07**	45.05	790.44±217.91**
低剂量组	0.35±0.09**	45.53	776.47±316.33**
中剂量组	0.53±0.07##	78.17	595.58±295.31*
高剂量组	0.61±0.08##	86.19	319.85±118.47##

注:与正常组比较,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$;与模型组比较,##表示 $P<0.01$ 。

2.3 LU 发酵液对细胞凋亡的影响

图 1 中 A~E 均为由四个象限组成的细胞直方图,每个图中左下象限代表正常细胞群(A_n-PI-),右下象限代表早期凋亡细胞群(A_n+PI-),右上象限代表晚期凋亡细胞和坏死细胞(A_n+PI+),左上象限代表为非特异死亡细胞(A_n-PI+)。与正常组相比,模型组凋亡率(47.24%)显著增多,说明 H_2O_2 诱导的 HUVEC 凋亡模型制备成功。各剂量用药组凋亡数明显减少($p<0.05$),但无量效关系。

2.4 Bax、Bcl-2、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白质的表达结果

如图 2 所示,与正常组比较,模型组 Bax、Caspase-9 和 Caspase-3 基因表达显著增加,而 Bcl-2 基因表达变化不明显。与模型组比较,各剂量用药组 Bax、Caspase-9 和 Caspase-3 基因表达减少,而 Bcl-2 基因表达增多。

3 结语

MTT 法常用于生物活性因子的活性检测。本实验中所用的剂量范围内榆干离褶伞发酵液对 HUVEC 无细胞毒性,促进 HUVEC 的增殖。过氧化氢诱导 HUVEC 损伤后细胞存活率显著下降,而用榆干离褶伞发酵液预处理时,其存活率明显增高,

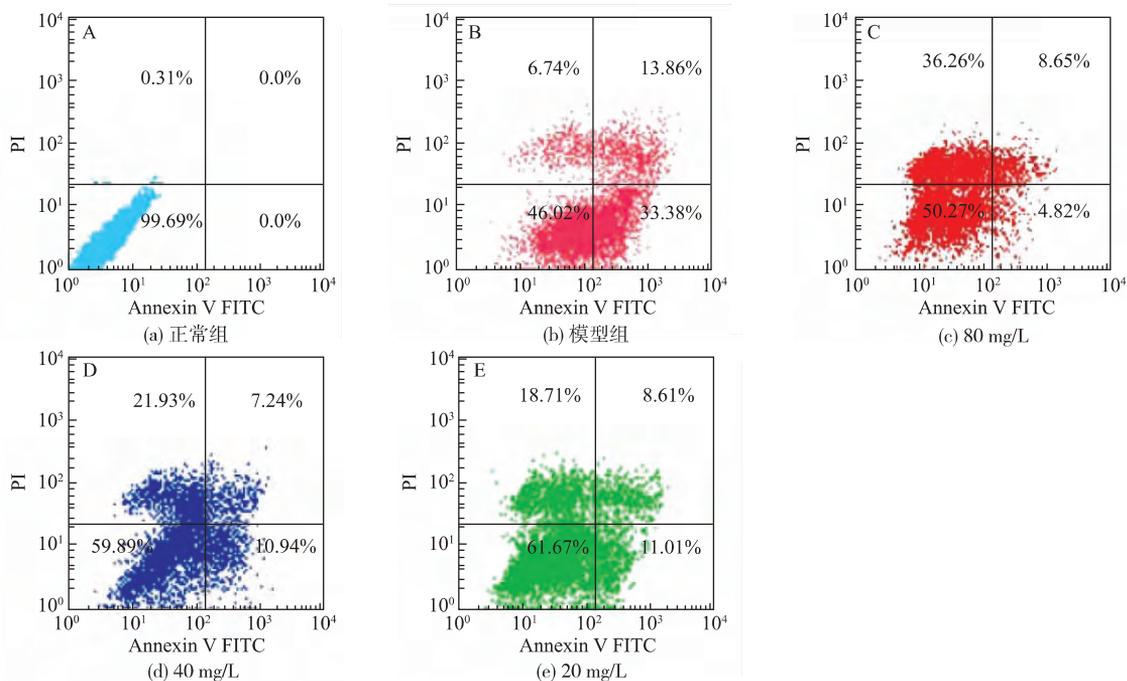
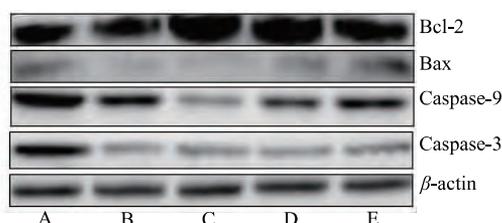


图 1 LU 发酵液对 HUVEC 细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effect of LU fermentation broth on apoptosis of HUVEC

这就提示榆干离褶伞发酵液对 HUVEC 的氧化损伤有保护作用。我们曾报道过榆干离褶伞发酵液的抗氧化作用^[2],由此可认为榆干离褶伞发酵液对 HUVEC 的保护作用与其抗氧化作用密切相关。当过氧化氢作用于 HUVEC 后,导致细胞的氧化损伤,由此细胞的完整性遭到破坏,引起细胞膜的通透性增加,导致细胞上清液 LDH 活性增加。以榆干离褶伞发酵液处理细胞后,因它对细胞有保护作用,所以用药组细胞上清液的 LDH 活性明显降低。



A: 模型组 B: 正常组 C: 80 mg/L D: 40 mg/L E: 20 mg/L

图 2 LU 发酵液对 Bax、Bcl-2、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白质的表达的影响

Fig. 2 Effect of LU fermentation broth on the protein expression of bcl-2, bax, caspase-3 and caspase-9

为了进一步探讨榆干离褶伞发酵液对 HUVEC 的保护作用机制,用过氧化氢诱导细胞凋亡模型,观察了榆干离褶伞对凋亡的影响。实验结果显示,模型组凋亡率 47.24%,而用药组凋亡率明显下降,分别为 18.1%、19.62%、13.47%,这就说明榆干离褶伞具有抑制凋亡的作用。在细胞凋亡调控的众多基因中,Bcl-2 和 Bax 是关键基因,其中 Bcl-2 是凋亡

抑制的基因,而 Bax 是凋亡促进基因。而当 Bax 在细胞内超表达时,Bax/Bax 同源二聚体的数量明显增多,细胞对死亡信号的反应性增强,启动凋亡;而当 Bcl-2 高表达时,则 Bax/Bax 二聚体大量解离,生成更为稳定的 Bcl-2/Bax 异源二聚体,对抗其诱导凋亡的作用^[5]。本实验中,经过过氧化氢诱导细胞凋亡后,模型组的 Bax 表达比正常组明显增多;在用药组中其表达量随着剂量的增加逐渐减少,而 Bcl-2 的表达逐渐增多,这就提示榆干离褶伞发酵液可拮抗由过氧化氢引起的细胞凋亡。研究证实,H₂O₂ 主要通过激活经典的线粒体途径诱导细胞凋亡^[6]。在线粒体通路凋亡途径中,当细胞受到过氧化氢等氧化应激刺激时,线粒体膜通透性增加,释放出细胞色素 C,并与细胞凋亡激活因子 1 (Apoptotic protease activating factor 1, Apaf-1) 结合,并活化 Caspase-9 的前体,进而激活 Caspase-3,进而诱导细胞凋亡^[7]。有文献报道,Bax 是在线粒体外膜通过形成离子通道方式促进细胞色素 C 等蛋白质分子释放^[8]。本实验结果显示,与正常组比较,模型组 Caspase-9 和 Caspase-3 明显增加,表明过氧化氢通过影响 Bax 基因的表达,促进线粒体释放大量的包括细胞色素 C 在内的蛋白质,诱导 Caspase 的激活。用榆干离褶伞发酵液预处理后,Bax/Bcl-2 比值下降,Caspase-9 和 Caspase-3 基因表达减少,这就提示榆干离褶伞发酵液可能通过抑制或阻断线粒体凋亡通路,对血管内皮细胞起保护作用,而这种保护作用有可能作为它的溶栓作用机制之一。

参考文献:

- [1] Pries A R, Kuebler W M. Normal endothelium[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2006, 176(pt1): 1-40.
- [2] 孙权, 沈玉秀, 沈明花. 榆干离褶伞发酵液体外抗氧化性能研究[J]. *食品科技*, 2010, 35(1): 223-225.
SUN Quan, SHEN Yuxiu, SHEN Minghua. Study on the antioxidant activity of *Lyophyllum ulmarium medea* in vitro [J]. *Food Science and Technology*, 2010, 35(1): 223-225. (in Chinese)
- [3] 沈明花, 彭瀛, 宋晓琳. 榆干离褶伞发酵液的溶栓作用与降血脂作用研究[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(10): 28-30.
SHEN Minghua, PENG Ying, SONG Xiao-lin. Studies on fibrinolytic and hypolipidemic function of *Lyophyllum ulmarium* fermentation broth[J]. *Food and Fermentation Industries Editorial Staff*, 2011, 37(10): 28-30. (in Chinese)
- [4] He Y, Luo Y, Tang S, et al. Critical function of Bmx/Etk in ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(9): 2344-55.
- [5] Tsukahara S, Yamamoto S, Tin-Tin-Win-Shwe, et al. Inhalation of low-level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2006, 13(2): 63-68.
- [6] 郝旭亮. 罗布麻总黄酮抗血栓作用物质基础及抗人脐静脉血管内皮细胞凋亡作用机理研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2009.
- [7] Eskes R, Desagher S, Antonsson B, et al. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(3): 929-935.
- [8] Chipuk J E, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis[J]. *Science*, 2004, 303(5660): 1010-1014.