

槲皮素抑制 ADMA 引起的脐静脉内皮细胞内质网应激和细胞凋亡

郭维康 刘英杰 刘文虎

摘要 目的 探讨槲皮素改善 ADMA 引起脐静脉内皮细胞凋亡的可能机制。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞,应用流式细胞仪技术检测细胞凋亡情况,应用 Western blot 法检测内质网应激蛋白 PERK 磷酸化水平及 IRE1 的蛋白表达量,用 RT-PCR 检测 ATF4 及 CHOP mRNA 表达量。结果 ADMA 诱导脐静脉内皮细胞凋亡,槲皮素可以抑制 ADMA 引起的 PERK 磷酸化及 IRE1 蛋白表达,并可以减少 ATF4 及 CHOP mRNA 量,继而改善 ADMA 引起的细胞凋亡。结论 槲皮素抑制 ADMA 引起的脐静脉内皮细胞内质网应激继而抑制细胞凋亡。

关键词 ADMA 内质网应激 细胞凋亡 槲皮素

中图分类号 R543

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.010

Quercetin Inhibited ADMA - induced Endoplasmic Reticulum Stress Responses and HUVECs Apoptosis. Guo Weikang, Liu Yingjie, Liu Wenhui. Department of Nephrology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract Objective To study the effect of quercetin on ADMA induced endoplasmic reticulum stress responses (ER stress). **Methods** Human umbilical veins endothelial cells (HUVECs) were cultured, and left untreated or challenged for 24h with 100 μ mol/L ADMA in the absence and presence of 20 μ mol/L quercetin, the PERK and IRE1 was determined by Western blot. ATF4 and CHOP mRNA was detected by RT-PCR. Cells apoptosis was detected by flow cytometry. **Results** ADMA induced HUVECs apoptosis. Quercetin inhibited ADMA - induced PERK and IRE1 protein expression and ATF4 and CHOP mRNA expression. At last, Quercetin inhibited ADMA - induced cells apoptosis. **Conclusion** ADMA induced ER stress and HUVECs apoptosis while quercetin inhibited ADMA - induced ER stress and apoptosis.

Key words ADMA; ER stress; Apoptosis; Quercetin

非对称性二甲基精氨酸 [asymmetric N(G), N(G) - dimethyl - l - arginine, ADMA] 是一种小分子尿毒症毒素,研究表明,ADMA 是慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD)、心血管疾病 (cardiac vascular disease, CVD) 全因死亡的独立危险因素^[1]。ADMA 主要通过损伤血管内皮细胞而发挥其生物学活性,故发现其引起内皮损伤的机制对于抑制 ADMA 对血管损害、延缓 CKD、CVD 进展意义重大。

内皮细胞凋亡参与动脉粥样硬化进程并与血管内膜钙化密切相关。本课题组前期研究结果表明 ADMA 通过诱发内质网应激反应而引起脐静脉内皮细胞凋亡^[2]。而有效药物如果能够改善 ADMA 引起的内质网应激和内皮细胞凋亡,那么该药物可能在临

床上起到降低 CKD 患者的心血管事件发生率的作用。

中药成分槲皮素 (3,5,7,3',4' - 五羟基黄酮) 是多种中药如黄芪、红花、银杏叶、三七等中药的黄酮成分,也是肾科常用中药黄葵胶囊的主要化学成分之一,在临床应用中起到了很好地肾脏保护作用^[3]。基础研究表明,槲皮素对于心血管系统也起到了保护作用^[4]。同时,国外报道槲皮素可以通过抗内质网应激、抗凋亡的机制发挥机体保护作用^[5,6]。故本课题组设想槲皮素是否通过拮抗内质网应激而改善尿毒症毒素 ADMA 引起的内皮细胞凋亡。本研究旨在探讨槲皮素是否通过对抗 ADMA 引起的内质网应激,而改善内皮细胞凋亡,发挥心血管保护作用。

材料与方法

1. 主要材料及试剂: 原代人脐静脉内皮细胞 (HUVECs)、内皮细胞培养基 (购于美国 ScienCell 公司); ADMA (购于美国 Sigma 公司); 抗 p - PERK 抗体、抗 IRE1 抗体以及抗 Actin 抗体 (购于美国 Abcam

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81570660); 北京市优秀人才培养基金资助项目 (2016000021469G223)

作者单位: 100050 首都医科大学附属北京友谊医院肾内科

通讯作者: 刘文虎, 电子信箱: liuwh2002@yahoo.cn

公司), Annexin V - FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (购于美国 R&D 公司)。

2. 细胞培养方法:用加入 20% 牛血清的内皮培养基培养人脐静脉内皮细胞,对细胞隔日换液,选用第 4~5 代细胞用于后续实验。

3. Western blot 法检测 BCL-2、p-PERK、IRE1 蛋白含量:将各实验组的细胞经过含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液进行细胞裂解,提取蛋白,应用 BCA 法测定总蛋白含量。每个上样槽加入大约 20 μ g 的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。待溴酚蓝指示带跑至胶底部时终止电泳。并通过电转印法将蛋白转移至 PVDF 膜。转膜结束后,将膜放入 TBST 缓冲液中清洗 3 次。用 5% TBST 脱脂奶粉配备一抗孵育并 4 $^{\circ}$ 过夜。用 TBST 缓冲液洗膜 3 次。加入二抗于室温下孵育 1h。用 TBST 缓冲液洗膜 3 次。加入显影液,避光压片。

4. RT-PCR 检测 ATF4、CHOP mRNA 表达水平:
(1) 反应体系 (20 μ l): Syber green 缓冲液 (2 $\times$) 10 μ l,上游引物 0.3 μ l。下游引物 0.3 μ l,模板 cDNA 1 μ l,ddH₂O 8.4 μ l。(2) 上机:在 96 孔板加样后,3000r/min 离心 10min 后上机,运行程序。(3) 反应条件:50 $^{\circ}$ C $\times$ 2min,95 $^{\circ}$ C $\times$ 10min,然后进行 40 个循环 95 $^{\circ}$ C $\times$ 15s 及 60 $^{\circ}$ C $\times$ 1min;终末延伸。(4) 采集数据:反应结束后使用软件采集与分析结果。

5. 流式细胞仪检测细胞凋亡情况:用去 EDTA 的

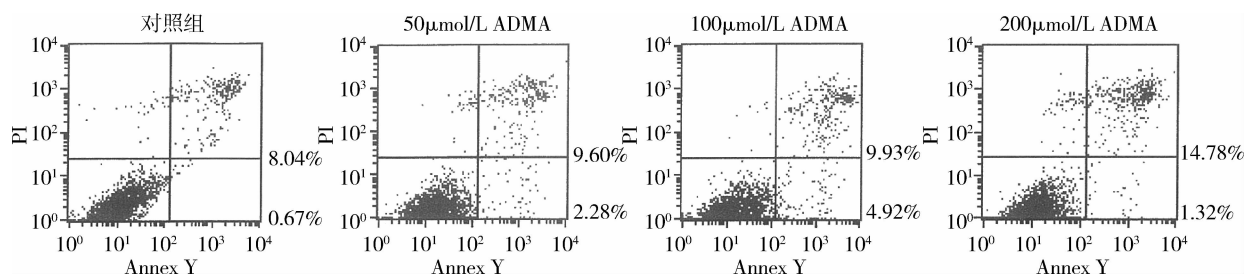


图 1 ADMA 引起 HUVECs 凋亡

2. 槲皮素抑制 ADMA 引起的脐静脉内皮细胞凋亡,并上调 Bcl-2 表达:实验分为阴性对照组,ADMA 组 (应用 100 μ mol/L ADMA 刺激 HUVECs 24h),槲皮素组 (用 20 μ mol/L 槲皮素预处理细胞 30min 后继续用普通培养基培养 24h),槲皮素 + ADMA 组 (20 μ mol/L 槲皮素预处理细胞 30min 后继续用 ADMA 刺激细胞 24h)。再次应用 Annexin V - FITC/PI 双标记细胞来检测细胞凋亡情况。结果表明,槲皮素可以明显改善 ADMA 引起的脐静脉内皮细胞凋亡

胰酶对细胞进行消化,细胞悬浮后用含牛血清的培养基终止消化,PBS 洗涤后收集细胞。用 100 μ l 1 $\times$ Binding Buffer 重悬细胞,调整细胞密度为 1 $\times$ 10⁶ 细胞/毫升左右。在悬液中加入 Annexin V - FITC 试剂 5 μ l,混匀后放置于避光盒,并在 4 $^{\circ}$ C 冰箱内孵育 15min。反应结束后,直接在细胞悬液内加入 PI 试剂 1 μ l,混匀后放置于避光盒,并在 4 $^{\circ}$ C 冰箱内孵育 5min。加入 400 μ l 1 $\times$ Binding Buffer 并轻轻混匀,冰上保存。最后使用流式细胞仪检测并收集结果。Annexin V - FITC 标记细胞阳性表明细胞发生凋亡或死亡,PI 记细胞阳性表明细胞发生死亡,所以存活的细胞被标记为 Annexin V 阴性/PI 阴性,凋亡细胞被标记为 Annexin V 阳性/PI 阴性,死亡细胞被标记为 Annexin V 阳性/PI 阳性。

6. 统计学方法:采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据统计分析处理,所有统计资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间资料采用方差分析进行数据分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ADMA 诱导脐静脉内皮细胞凋亡:在应用 50、100、200 μ mol/L 的 ADMA 刺激脐静脉内皮细胞 24h 后,以 100 μ mol/L ADMA 组的细胞凋亡百分比最高,而死亡细胞则在 200 μ mol/L ADMA 组最高 (图 1)。故笔者在后续实验中使用 100 μ mol/L ADMA 刺激 HUVECs 24h 作为实验条件。

(图 2)。Bcl-2 是一个抑制凋亡因子,当细胞凋亡发生时,Bcl-2 表达下降。接下来课题组进一步检测了凋亡抑制因子 Bcl-2 的表达情况。实验结果表明,ADMA 可以降低 Bcl-2 蛋白表达,而槲皮素 + ADMA 组 Bcl-2 的表达较 ADMA 组有明显的上调 (图 3)。

3. 槲皮素抑制 ADMA 引起的脐静脉内皮细胞内质网应激反应:本研究进一步检测了内质网应激信号通路因子的表达,结果表明,与 ADMA 组相比较,用

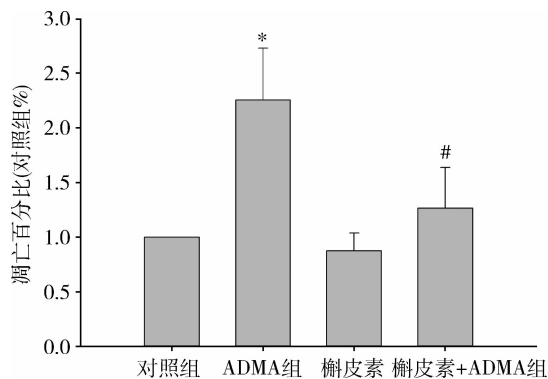


图2 槲皮素抑制 ADMA 引起细胞凋亡

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 ADMA 组比较, # $P < 0.05$

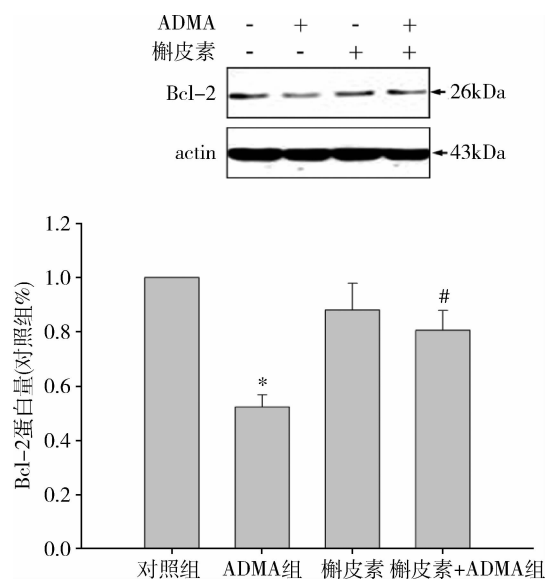


图3 槲皮素改善 ADMA 引起的 Bcl-2 减低

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 ADMA 组比较, # $P < 0.05$

槲皮素预处理后再加入 ADMA 的细胞表现出较低的 PERK 磷酸化水平和 IRE1 的蛋白表达水平 (图 4)。同时笔者用 RT-PCR 检测 PERK 的下游通路 ATF4 及 CHOP mRNA 表达,结果表明,槲皮素可以明显抑制 ADMA 引起的 ATF4 及 CHOP mRNA 表达 (图 5)。

讨 论

槲皮素是一种常见的黄酮类化合物,广泛存在于植物中,并是多种中药的主要成分。研究表明,槲皮素通过调节酶的活性、抗氧化应激作用、抑制炎症因子而发挥细胞保护作用^[7-11]。在临床上,槲皮素被制成中药用于治疗哮喘、高血压、心血管疾病、肿瘤、糖尿病和慢性肾脏病等,具有广泛的治疗价值^[12-15]。同时,槲皮素还可以发挥抗肿瘤作用^[16]。

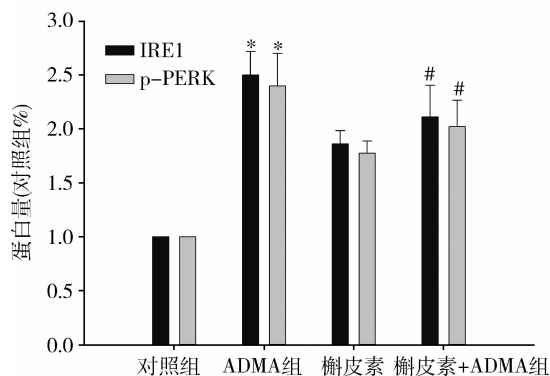
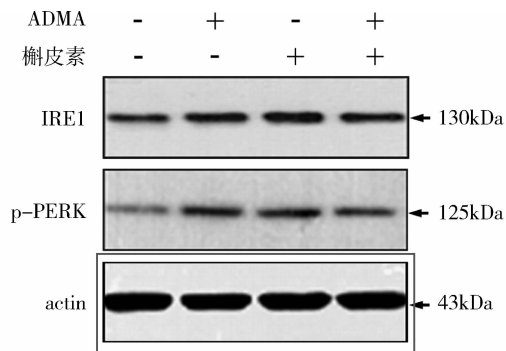


图4 槲皮素抑制 ADMA 引起 p-PERK 及 IRE1 蛋白表达

与对照组相同指标比较, * $P < 0.05$; 与 ADMA 组相同指标比较, # $P < 0.05$

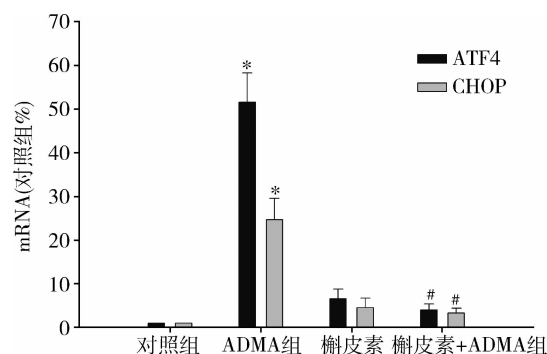


图5 槲皮素抑制 ADMA 引起的 ATF4 及 CHOP mRNA 表达

与对照组相同指标比较, * $P < 0.05$; 与 ADMA 组相同指标比较, # $P < 0.05$

目前国内外研究关于槲皮素对凋亡影响的研究结果并不一致。在肿瘤的发生过程中,槲皮素表现出诱导肿瘤细胞凋亡的活性,从而发挥抗癌作用^[17]。然而,国外研究者发现槲皮素对于细胞凋亡的作用具有选择性,它可以诱导前列腺癌细胞凋亡,而对正常的前列腺上皮细胞则不会引起增加凋亡的效果^[18]。这些提示槲皮素的诱导凋亡作用可能是癌细胞特异

性的,对于正常细胞,在病理条件下槲皮素可以通过抑制细胞凋亡而对机体起到保护性作用^[19]。而且槲皮素在心血管中发挥了重要的保护性作用,所以笔者设想槲皮素对于 ADMA 引起的 HUVECs 凋亡是否发挥作用。通过本研究的实验结果,提示槲皮素可能保护 ADMA 引起的内皮细胞凋亡,该结果提示与前人研究结果一致,对于外来有害刺激,槲皮素发挥了细胞保护性作用。

本研究表明,ADMA 可以通过内质网应激引起内皮细胞凋亡,而国外也有研究报道,在病理条件下,槲皮素可以通过抑制内质网应激从而减少细胞损伤^[5, 20, 21]。本研究推测槲皮素可能通过抑制内质网应激通路而改善 ADMA 引起的内皮细胞凋亡。故后续实验结果表明,槲皮素抑制了 PERK - CHOP 和 IRE1 介导的细胞凋亡通路。故这些结果表明抑制内质网应激信号通路是槲皮素保护 ADMA 引起内皮细胞凋亡的机制之一。本研究为槲皮素应用于临床,尤其是改善慢性肾脏病患者心血管事件发生提供了理论依据。

参考文献

- 1 Ravani P, Tripepi G, Malberti F, *et al.* Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005,16(8):2449 - 2455
- 2 郭维康,刁宗礼,刘文虎. ADMA 通过引起脐静脉内皮细胞内质网应激而诱导细胞凋亡 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2016,3:201 - 203
- 3 D'Andrea G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? [J]. *Fitoterapia*, 2015,106:256 - 271
- 4 Anand DAV, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of biological importance of quercetin: a bioactive flavonoid [J]. *Pharmacogn Rev*, 2016,10(20):84 - 89
- 5 Arumugam S, Thandavarayan RA, Arozal W, *et al.* Quercetin offers cardioprotection against progression of experimental autoimmune myocarditis by suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress via endothelin - 1/MAPK signalling [J]. *Free Radic Res*, 2012,46(2):154 - 163
- 6 Natsume Y, Ito S, Satsu H, *et al.* Protective effect of quercetin on ER stress caused by calcium dynamics dysregulation in intestinal epithelial cells [J]. *Toxicology*, 2009,258(2 - 3):164 - 175
- 7 Kanimozhi S, Subramanian P, Shanmugapriya S, *et al.* Role of bioflavonoid quercetin on expression of urea cycle enzymes, astrocytic and inflammatory markers in hyperammonemic rats [J]. *Indian J Clin Biochem*, 2017,32(1):68 - 73
- 8 Palle S, Neerati P. Enhancement of oral bioavailability of rivastigmine

- with quercetin nanoparticles by inhibiting CYP3A4 and esterases [J]. *Pharmacol Rep*, 2016,69(2):365 - 370
- 9 de Souza SR, de Miranda Neto MH, Martins Perles JV, *et al.* Antioxidant effects of the quercetin in the jejunal myenteric innervation of diabetic rats [J]. *Front Med*, 2017,4:8
- 10 Zou W, Zhou H, Hu J, *et al.* Rhizoma Smilacis Glabrae inhibits pathogen - induced upper genital tract inflammation in rats through suppression of NF - kappaB pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017,202:103
- 11 Xue F, Nie X, Shi J, *et al.* Quercetin inhibits LPS - induced inflammation and ox - LDL - induced lipid deposition [J]. *Front Pharmacol*, 2017,8:40
- 12 Caglayan SS, Karaman M, Cilaker Micili S, *et al.* Effects of quercetin treatment on epithelium - derived cytokines and epithelial cell apoptosis in allergic airway inflammation mice model [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2016,15(6):487 - 497
- 13 Chen S, Jiang H, Wu X, *et al.* Therapeutic effects of quercetin on inflammation, obesity, and type 2 diabetes [J]. *Mediat Inflamm*, 2016,2016:9340637
- 14 George VC, Dellaire G, Rupasinghe HP. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability [J]. *J Nutr Biochem*, 2016,45:1 - 14
- 15 Gormaz JG, Quintremil S, Rodrigo R. Cardiovascular disease: a target for the Pharmacological Effects of Quercetin [J]. *Curr Top Med Chem*, 2015,15(17):1735 - 1742
- 16 Khan F, Niaz K, Maqbool F, *et al.* Molecular targets underlying the anticancer effects of quercetin: an update [J]. *Nutrients*, 2016,8(9):1 - 19
- 17 Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, *et al.* The role of activated MEK - ERK pathway in quercetin - induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2004,25(5):647 - 659
- 18 Aalinkeel R, Bindukumar B, Reynolds JL, *et al.* The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down - regulating the expression of heat shock protein 90 [J]. *Prostate*, 2008,68(16):1773 - 1789
- 19 Yao S, Sang H, Song G, *et al.* Quercetin protects macrophages from oxidized low - density lipoprotein - induced apoptosis by inhibiting the endoplasmic reticulum stress - C/EBP homologous protein pathway [J]. *Exp Biol Med*, 2012,237(7):822 - 831
- 20 Cai X, Bao L, Ding Y, *et al.* Quercetin alleviates cell apoptosis and inflammation via the ER stress pathway in vascular endothelial cells cultured in high concentrations of glucosamine [J]. *Mol Med Rep*, 2017,15(2):825 - 832
- 21 Park E, Chun HS. Protective effects of quercetin on dieldrin - induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in dopaminergic neuronal cells [J]. *Neuroreport*, 2016,27(15):1140 - 1146

(收稿日期:2017 - 03 - 02)

(修回日期:2017 - 03 - 21)