

· 实验研究 ·

儿茶素拮抗过氧化氢诱导的大鼠内皮祖细胞凋亡

曹艳,许自川,何小解,党西强,易著文,曾雪琪

(中南大学湘雅二医院小儿肾脏病研究室,湖南省小儿肾脏病临床中心,湖南 长沙 410011)

〔摘要〕 **目的** 观察过氧化氢(H_2O_2)对大鼠骨髓来源内皮祖细胞(EPCs)增殖及凋亡的影响及儿茶素对 H_2O_2 诱导细胞凋亡的拮抗作用。**方法** 免疫荧光法检测 EPCs 表面标志 CD34, CD133 和血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)的表达;将第2代 EPCs 分为空白对照组、 H_2O_2 组和儿茶素- H_2O_2 组,干预后常规提取 DNA 琼脂糖电泳观察细胞凋亡梯带的形成;MTT 法检测细胞增殖率的变化。**结果** ①骨髓单个核细胞培养 10 d 后均表达 CD34, VEGFR-2 和 CD133 抗原;②干预 1 d 后,3 组细胞均未出现明显的 DNA 凋亡梯带;2 d 后, H_2O_2 组出现明显细胞凋亡 DNA 梯带;3 d 后, H_2O_2 组和儿茶素- H_2O_2 组均出现明显的细胞凋亡 DNA 梯带, H_2O_2 组凋亡 DNA 梯带数量、灰度强于儿茶素- H_2O_2 干预组;③与对照组相比, H_2O_2 组、 H_2O_2 -儿茶素组 EPCs 增殖活性明显下降($P < 0.01$);在 H_2O_2 组和 H_2O_2 -儿茶素组组内 EPCs 增殖活性第 1 天和第 3 天细胞增殖活性明显高于第 2 天细胞增殖活性(均 $P < 0.05$); H_2O_2 组-儿茶素组细胞增殖活性在 3 个不同时间点显著高于同一时间点 H_2O_2 组细胞增殖活性。**结论** H_2O_2 可以降低 EPCs 增殖活性,诱导其凋亡;儿茶素可以增强 EPCs 对 H_2O_2 的抵抗力,减少细胞凋亡。

[中国当代儿科杂志,2009,11(1):61-64]

〔关键词〕 儿茶素;过氧化氢;内皮祖细胞;凋亡;大鼠

〔中图分类号〕 R-33 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2009)01-0061-04

Protective effects of catechin on apoptosis of endothelial progenitor cells induced by H_2O_2 in rats

CAO Yan, XU Zi-Chuan, HE Xiao-Jie, DANG Xi-Qiang, YI Zhu-Wen, ZENG Xue-Qi. Laboratory of Pediatric Nephropathy, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China (He X-J, Email: hexj7150@163.com)

Abstract: Objective To study the effect of H_2O_2 on the proliferation and apoptosis of endothelial progenitor cells (EPCs) and the antagonistic effects of catechin on the cell apoptosis induced by H_2O_2 in rats. **Methods** Immunofluorescence assay was applied to detect CD34, CD133 and VEGFR-2 expression. EPCs of generation 2 were divided into control cells, H_2O_2 -treated cells and catechin- H_2O_2 -treated cells (H_2O_2 : 100 mg/L; catechin: 10 mg/L). Genomic DNA was extracted by the conventional method after intervention for the analysis of apoptosis ladder pattern. The MTT assay was applied to detect proliferation rate of EPCs. **Results** The cultured cells at day 10 expressed CD34, CD133 and VEGFR-2. DNA apoptosis ladder pattern appeared in H_2O_2 -treated cells 2 days after intervention. After 3 days of intervention DNA apoptosis ladder pattern appeared in both H_2O_2 -treated cells and H_2O_2 -catechin-treated cells, with more ladders and grayer scale in H_2O_2 -treated cells. Compared with the controls, H_2O_2 -treated cells and H_2O_2 -catechin-treated cells showed significantly decreased proliferation rate ($P < 0.01$), with the lowest proliferation rate at the 2nd day ($P < 0.05$). The H_2O_2 -catechin-treated cells showed increased proliferation rate than H_2O_2 -treated cells at the 1st, 2nd and 3rd days. **Conclusions** H_2O_2 may impair EPCs proliferation and induce EPCs apoptosis. Catechin may increase the capacity of EPCs for the resistance to apoptosis induced by H_2O_2 . [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (1):61-64]

Key words: Catechin; H_2O_2 ; Endothelial progenitor cell; Apoptosis; Rats

肾小管周围微血管丢失是慢性肾脏疾病的重要表现之一,也是肾脏病慢性进展的一个重要环节^[1]。血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)和其前体细胞,内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是维持血管功能的最重要的因素。VECs 维持血管内皮的完整性,EPCs 参与损伤血管内皮的修复。VECs 和 EPCs 功能障碍将直接导致血管的损伤^[2]。慢性肾脏病时各种尿毒代谢产物、氧自由基、血液动力学改变可以损伤 VECs 功能,导致肾小管周围微血管丢失、密度下降^[3],而应

[收稿日期]2008-06-03;[修回日期]2008-07-01
[基金项目]国家自然科学基金(30500546)。
[作者简介]曹艳,女,大学,主治医师。主攻方向:小儿肾脏病防治机制的研究。
[通讯作者]何小解,男,博士,主管技师,中南大学湘雅二医院儿科,邮编:410011。

用药物如 ACEI 制剂、抗氧化剂维生素 E 和儿茶素有助于增加肾小管周围微血管密度,减缓肾脏病的慢性进展^[4]。由此我们推测氧自由基可能可以损伤血管内皮细胞直接造成微血管密度的下降,也可能损伤内皮祖细胞,降低其在外周组织的血管新生功能,减少对损伤血管内皮的修复而导致外周组织微血管密度的下降。儿茶素可以拮抗氧自由基的损伤作用,但可否藉此保护血管内皮细胞及内皮祖细胞,修复损伤细胞?目前尚鲜见报道。为此,本研究用 H₂O₂ 和儿茶素对体外培养的血管内皮祖细胞进行干预,探讨 H₂O₂ 和儿茶素对内皮祖细胞体外增殖和凋亡的影响,为临床应用儿茶素辅助治疗血管相关性疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 大鼠 EPCs 体外培养

健康 Sprague-Dawley 雌性大鼠,体重 300 ~ 350 g(由本院动物实验室提供),10% 水合氯醛麻醉后,断尾放血,75% 乙醇浸泡 30 min 后取出胫骨和股骨,M199 基本培养基(Invitrogen 公司)冲洗骨髓腔,Histopaque-1083(天津灏阳公司)梯度离心,M199 基本培养基洗涤细胞 2 次后,含 10 ng/mL 的 VEGF,4 ng/mL 的 bFGF(Peprotech 公司)和 10% 胎牛血清(杭州四季清公司)的 M199 完全培养基重悬细胞,使其密度在 10⁶/mL,接种于预铺内纤连蛋白(Biosource 公司)培养瓶中,37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,4 d 后第一次换液,以后每 3 d 换液 1 次。第 8 天时细胞第一次常规传代。

1.2 EPCs 抗原免疫荧光检测

细胞接种于预置盖玻片的培养皿中,载玻片用人纤联蛋白处理。细胞爬满 80% 后取出,然后用 PBS 冲洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 15 mins,再用 PBS 冲洗 2 次,滴加兔抗鼠 CD133 抗体、兔抗鼠 vWF 抗体和兔抗鼠 VEGFR-2 抗体,4℃ 湿盒中过夜,PBS 冲洗 2 次,滴加羊抗兔 CY-3 标记的 IgG,37℃ 湿盒中孵育 1 h,荧光显微镜下观察,细胞多聚甲醛固定后,分别滴加兔抗鼠 FITC-CD34 抗体和 FITC-CD31 抗体,37℃ 湿盒中孵育 1 h,荧光显微镜下观察。

1.3 H₂O₂ 诱导 EPCs 凋亡的时间-剂量效应

取生长良好的第 2 代 EPCs,按 H₂O₂ 终浓度分为 0(NS 对照组)、50 μmol/L 组、100 μmol/L 组、150 μmol/L 组、200 μmol/L 组、250 μmol/L 组,每个处理组分 1,2,3 d 3 个小组,筛选 H₂O₂ 对诱导 EPCs 凋亡的最适剂量与最佳时点。

1.4 MTT 法检测 H₂O₂、儿茶素对 EPCs 增殖的影响

取生长良好的第 2 代 EPCs,接种于 96 孔培养板中,稳定后加入 M199 基本培养基同步 12 h,按 1.3 筛选的 H₂O₂ 的最佳浓度,将细胞分为空白对照组、H₂O₂ 组、H₂O₂-儿茶素(儿茶素终浓度 10 mg/L)组,分别干预 1,2,3 d 后,加入 MTT(Amresco 公司)培养 4 h 后,倾出培养体系中的液体,加入 DMSO(Amresco 公司),酶标仪检测光密度值,分析结果。

1.5 H₂O₂、儿茶素对 EPCs 凋亡的影响

取生长良好的第 2 代 EPCs,接种于 25 cm² 培养瓶中,稳定后加入 M199 基本培养基同步 12 h,按 1.3 筛选的 H₂O₂ 的最佳浓度,将细胞分为空白对照组、H₂O₂ 组、H₂O₂-儿茶素(儿茶素终浓度 10 mg/L)组,分别干预 1,2,3 d 后,观察各组细胞数量、细胞集落大小并常规提取细胞 DNA,琼脂糖凝胶电泳,Gel Doc2000 型凝胶成像系统分析结果。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件包进行统计学处理,所有资料均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,时间-剂量效应采用析因方差分析进行统计处理,多组资料间和同组多个时点资料间比较时,方差齐者,采用 One-Way ANOVA 分析,组间两两比较采用 LSD 法,方差不齐者,采用 Tamhane 分析。对有相关趋势的变量采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差别有显著性意义。

2 结果

2.1 EPCs 表面抗原的表达

第 1 次传代后,收集爬片细胞,进行细胞免疫荧光染色,可见 B 组、C 组和 D 组细胞均表达内皮祖细胞表面标志(图 1A ~ C)。

2.2 H₂O₂ 诱导 EPCs 凋亡的时间-剂量效应

H₂O₂ 干预培养 3 d 后,50 μmol/L H₂O₂ 组内皮祖细胞出现脱壁现象(图 2A);100 μmol/L 组出现明显的细胞脱壁现象;并且细胞出现碎裂(图 2B);150 μmol/L 组细胞几乎完全脱壁;200 μmol/L 和 250 μmol/L 组细胞完全脱壁(图 2C,2D)。

2.3 H₂O₂、儿茶素对 EPCs 增殖活性的影响

与对照组相比,干预后,H₂O₂ 组、H₂O₂-儿茶素组 EPCs 增殖活性明显下降($P < 0.01$);在 H₂O₂ 组和 H₂O₂-儿茶素组,细胞增殖活性在干预第 1 天细胞活性下降,第 3 天开始上升;H₂O₂ 组、H₂O₂-儿茶素组组内 EPCs 增殖活性在 3 个时间点之间存在明

显差异,第1天和第3天细胞增殖活性明显高于第2天细胞增殖活性(均 $P<0.05$); H_2O_2 组-儿茶素组细胞增殖活性在3个不同时间点显著高于同一时间点 H_2O_2 组细胞增殖活性(均 $P<0.05$,图3)。

2.4 H_2O_2 、儿茶素对 EPCs 凋亡的影响

干预1 d后两组细胞都未形成明显的DNA凋亡梯带,干预2 d后, H_2O_2 组细胞DNA凋亡梯带形成较儿茶素- H_2O_2 组明显增多,干预3 d后两组均可见明显的DNA凋亡梯带, H_2O_2 组梯带形成明显(图4)。

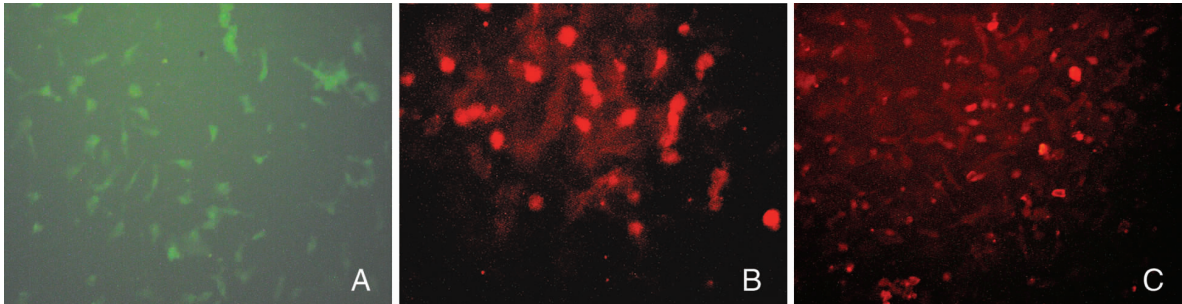


图1 培养10 d后细胞表达内皮祖细胞表面抗原(×200) A:培养10 d后细胞表达CD34; B:培养10 d后细胞表达CD133; C:培养10 d后细胞表达VEGFR-2。

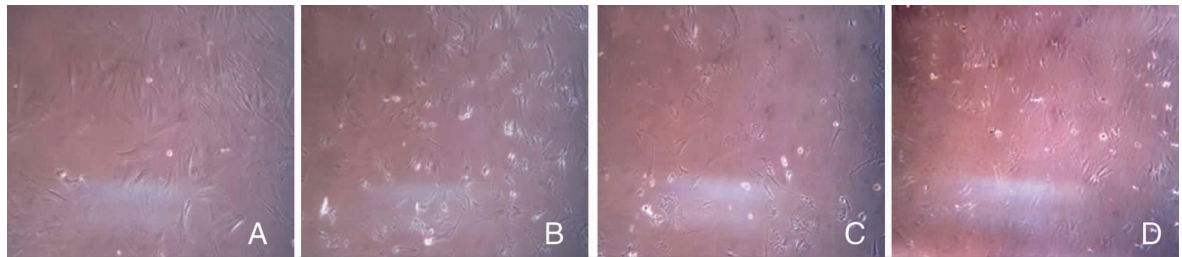


图2 各干预组内皮祖细胞光镜下形态学变化(×100) A:50 μmol/L H_2O_2 组内皮祖细胞3 d后出现脱壁现象; B:100 μmol/L组EPCs出现明显的细胞脱壁现象,并且细胞出现核碎裂; C:150 μmol/L组EPCs几乎完全脱壁; D:200 μmol/L和250 μmol/L组细胞完全脱壁。

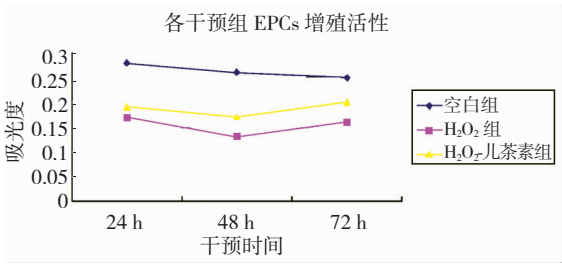


图3 MTT 法测 H_2O_2 、儿茶素对 EPCs 增殖活性的影响($\bar{x} \pm \bar{s}, n=88$)

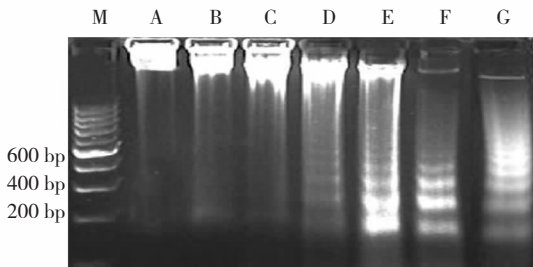


图4 各干预组 EPCsDNA 凋亡梯带电泳图。A:正常对照组; B: H_2O_2 -儿茶素组1 d; C: H_2O_2 组1 d; D: H_2O_2 -儿茶素组2 d; E: H_2O_2 2 d; F: H_2O_2 -儿茶素组3 d; G: H_2O_2 3 d。

3 讨论

肾小球疾病是儿童的常见病与多发病,是儿童时期慢性肾衰最常见的原因。肾小管周围微血管丢失是肾小球疾病慢性进展的表现之一,也是加速肾小球疾病慢性进展的因素之一。微血管的丢失与内皮细胞的破坏、血管内皮修复功能损失有关。肾小管周围微血管内皮细胞损伤与慢性肾脏病时氧自由基损伤、血液动力学改变、尿毒毒素和血管紧张素Ⅱ水平增高等诸多因素密切相关^[6,7]。Choi等^[8]研究发现,慢性肾功能衰竭进行血液透析的病人体内内皮祖细胞数量和活性均较正常成人下降。目前针对肾小球疾病RAS系统治疗主要包括ACEI制剂、氧自由基清除剂维生素E等,目的在于减缓肾脏病变的慢性进展,延长患者生命,改善患者生活质量。研究发现,内皮祖细胞是血管内皮细胞的前体细胞,体内和体外培养时,EPCs可以增殖分化为成熟的内皮细胞^[9],形成管腔样结构,认为其参与胚胎时期血

管发生和出生后的微血管新生、损伤血管内皮修复和功能维持,其功能障碍可导致或加速一些疾病的进展,如糖尿病足病、冠心病等。本研究发现,刚分离的大鼠骨髓单个核细胞经过 VEGF 诱导后,可以表达干细胞和内皮细胞表面标志,如 CD34, CD133 和 VEGFR-2 等。氧自由基参与多种细胞的损伤,参与临床多种疾病的发生、发展,也是体内血管内皮细胞损伤的最重要因素之一,自由基学逐渐成为当代医学的一个研究热点,成为一门新兴的学科。众所周知, H_2O_2 本身是一种自由基,作用于细胞,可使单线态氧活化而生成氧自由基损伤细胞^[10]。在本研究中发现, $100\ \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 可引起 EPCs 明显的损伤,表现为细胞贴壁不良甚至脱壁、细胞碎裂直至细胞死亡。氧自由基可以通过以下机制引起细胞损伤:①氧自由基直接损伤细胞 DNA, 激活 p53 基因, 诱导细胞凋亡或者死亡;②活化聚 ADP 核糖转移酶, 引起 NAD 快速耗竭, 细胞能量障碍, 从而诱导细胞凋亡;③氧自由基攻击细胞膜上的不饱和脂肪酸, 引起脂质过氧化直接造成细胞膜损伤, 胞浆物质大量外漏, 细胞外物质的异常侵入, 从而引起细胞凋亡;④氧自由基激活核转录因子 NF- κ B 和 AP-1, 加速细胞凋亡相关基因表达, 诱发细胞凋亡。儿茶素是从茶叶中提取的一种高效低毒的天然抗氧化剂, 具有消除自由基、抗氧化等生物学活性。本研究室前期研究发现^[11], 儿茶素能够明显清除肾病综合征大鼠血清氧自由基, 提高大鼠血清抗氧化酶水平。本研究中发现, 儿茶素能够明显减少 H_2O_2 诱导的 EPCs 的凋亡, 增加细胞的增殖活性。可能与下列机制有关:①分子中活泼的羟基氢可以提供质子结合体内过量的自由基, 直接破坏 H_2O_2 , 降低体内自由基水平, 减少自由基对细胞的损伤;②儿茶素提高内皮祖细胞内源性抗氧化酶, 如 tSOD 酶、GSH-PX 等活性, 增强细胞自身抗氧化防御系统对氧自由基的清除能力^[12,13];③儿茶素直接参与修复损伤的细胞 DNA^[14,15]。本研究发现: H_2O_2 干预组和 H_2O_2 -儿茶素组 3 d 后细胞增殖活性明显高于干预 2 d 后细胞的增殖活性, 可能与细胞自身对应激的产生反馈, 抗氧化活性上调有关。

综上所述, H_2O_2 可引起 EPCs 损伤, 诱导 EPCs 凋亡, 儿茶素可能是通过有效清除 H_2O_2 产生的羟自由基 ($OH^\cdot$), 上调内源性抗氧化酶系统, 拮抗 H_2O_2 对 EPCs 的损伤。

[参 考 文 献]

- [1] Kang DH, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschki D, et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(3):806-816.
- [2] Ohashi R, Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H, Ishizaki M, Sugisaki Y, et al. Capillary regression during the progression of experimental obstructive nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(7):1795-1805.
- [3] Rizzoni D, Panza JA. Impaired endothelial regulation of vascular tone in patients with systemic arterial hypertension[J]. J Hypertens, 2006, 24(5):867-863.
- [4] Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trialon Reversing Endothelial Dysfunction) study[J]. Circulation, 1996, 94(3):258-265.
- [5] Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davì G. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006, 16(3):222-233.
- [6] Fleck C, Schweitzer F, Karge E, Busch M, Stein G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases[J]. Clin Chim Acta, 2003, 336(1-2):1-12.
- [7] Jankowski J, van der Giet M, Jankowski V, Schmidt S, Hemeier M, Mahn B, et al. Increased plasma phenylacetic acid in patients with end-stage renal failure inhibits iNOS expression[J]. J Clin Invest, 2003, 112(2):256-264.
- [8] Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, Suh W, et al. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(7):1246-1252.
- [9] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302):964-967.
- [10] Jankun J, Selman SH, Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E. Why drinking green tea could prevent cancer[J]. Nature, 1997, 387(6633):561-562.
- [11] 何小解, 易著文, 党西强, 吴小川, 何庆南, 卢向阳, 等. 儿茶素对肾病综合征大鼠血清氧自由基及抗氧化酶的影响[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2002, 11(4):342-346.
- [12] Kim MJ, Choi JH, Yang JA, Kim SY, Kim JH, Lee JH, et al. Effects of green tea catechin on enzyme activities and gene expression of antioxidative system in rat liver exposed to microwaves[J]. Nut Res, 2002, 22(6):733-744.
- [13] 罗非君. 茶多酚抑制肿瘤细胞增殖的分子机制研究新进展[J]. 国外医学生理病理科学与临床分册, 2001, 21(4):251-253.
- [14] 张健, 秦静芬, 曹恩华, 张仲伦, 郑雁珍. DAN 损伤的化学发光法测定和茶多酚对它的保护作用[J]. 生物物理学报, 1996, 12(4):691-695.
- [15] 何小解, 卢向阳, 易著文, 党西强, 何庆南, 吴小川. 儿茶素对肾病综合征 TGF- β 1 表达的影响研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(5):373-376.

(本文编辑:吉耕中)