



大豆异黄酮对过氧化氢致 L02 细胞凋亡的抑制作用

郑 峰^{1,2}, 金梅花¹, 金 明¹, 刘思彤¹, 张 天¹, 尹学哲¹, 全吉淑¹

(1. 延边大学 医学院, 吉林 延吉 133002; 2. 临沂市人民医院, 山东 临沂 276100)

摘 要:为研究大豆异黄酮对过氧化氢所致 L02 细胞凋亡的抑制作用及其可能机制,以过氧化氢诱导 L02 细胞制备 L02 肝细胞凋亡模型。用 Hoechst 33342 荧光染色技术观察 L02 细胞核形态变化,用原位末端标记(TUNEL)技术观察 L02 细胞凋亡情况,采用免疫印迹法检测 L02 细胞中 Caspase-3 活性片段(Cleaved caspase-3)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶活性片段(Cleaved PARP)表达,以及 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和核转录因子- κ B(NF- κ B)活化情况。结果显示:过氧化氢处理 L02 细胞能使细胞核 Hoechst 染色和 TUNEL 染色增强,提示 L02 细胞凋亡增多。同时,过氧化氢上调 L02 细胞 Cleaved caspase-3、Cleaved PARP 表达($P < 0.05$)、Bax/Bcl-2 比值($P < 0.05$)和 NF- κ B p65 核转位水平($P < 0.05$)。与损伤组比较,大豆异黄酮组 L02 细胞凋亡显著减少,Cleaved caspase-3 和 Cleaved PARP 表达量、Bax/Bcl-2 比值和 NF- κ B p65 核转位水平均降低($P < 0.05$)。结果表明大豆异黄酮能抑制过氧化氢所致 L02 细胞凋亡,其作用可能与 NF- κ B 通路有关。

关键词:大豆; 异黄酮; L02; 过氧化氢; 凋亡

Inhibitory Effect of Soy Isoflavones on Apoptosis of L02 Cells Induced by Hydrogen Peroxide

ZHENG Feng^{1,2}, JIN Mei-hua¹, JIN Ming¹, LIU Si-tong¹, ZHANG Tian¹, YIN Xue-zhe¹, QUAN Ji-shu¹

(1. Medical College of Yanbian University, Yanji 133002, China; 2. Linyi People's Hospital, Linyi 276100, China)

Abstract: In order to study the inhibitory effect of soybean isoflavone on apoptosis of L02 cells induced by hydrogen peroxide and its possible mechanism, we investigated the inhibitory effect of soy isoflavones on apoptosis of L02 cells induced by hydrogen peroxide. L02 apoptotic model was established by treating L02 cells with hydrogen peroxide. The morphological change of nucleus was detected by Hoechst 33342 fluorescent staining, cell apoptosis was detected by the TdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) method, the protein expression of the cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (caspase-3), B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated x protein(Bax), cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), as well as the activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) were determined with the western blotting method. The results showed that hydrogen peroxide elevated both Hoechst fluorescent staining and TUNEL staining of L02 cells, indicative of the increased number of apoptotic cells induced by hydrogen peroxide. In addition, hydrogen peroxide up-regulated the expressions of cleaved caspase-3 and cleaved PARP ($P < 0.05$), increased the ratio of Bax/Bcl-2 ($P < 0.05$), and reduced the nuclear translocation of NF- κ B p65 in L02 cells ($P < 0.05$). However, soy isoflavones suppressed cell apoptosis, down-regulated the expressions of cleaved caspase-3 and cleaved PARP ($P < 0.05$), reduced the Bax/Bcl-2 ratio ($P < 0.05$), and decreased the nuclear translocation of NF- κ B p65 ($P < 0.05$) of L02 cells induced by hydrogen peroxide. It is suggested that soy isoflavones could suppress the apoptosis of L02 cells induced by hydrogen peroxide, probably through the regulation of NF- κ B pathway.

Keywords: Soybean; Isoflavones; L02; Hydrogen peroxide; Apoptosis

过氧化氢是常用的细胞氧化应激诱导剂,可通过氧化和抗氧化系统的失衡引发细胞应激损伤,其表现为细胞内自由基过量积累而导致的细胞损伤以及继发的细胞凋亡^[1-2]。细胞凋亡是细胞的一种程序性死亡,由一系列基因控制的细胞自主有

序的死亡^[2]。在各种肝疾病中肝细胞损伤可导致肝细胞凋亡,而抑制细胞凋亡可达到保护肝细胞损伤的目的,因此凋亡抑制剂的运用将为临床上防治各种肝损伤提供新的途径^[3]。近年来,肝细胞损伤及凋亡与不同信号转导通路的关系一直是肝疾的

收稿日期:2020-01-30

基金项目:国家自然科学基金(81760659,81360651)。

第一作者简介:郑峰(1986),男,博士,主要从事分子药理学研究。E-mail: zhengfeng008@126.com。

通讯作者:全吉淑(1968-),女,博士,教授,主要从事中药药理学研究。E-mail: quanjs@ybu.edu.cn。

研究热点,细胞凋亡涉及一系列基因的激活、表达和调控,重要的有 Caspase 家族、Bcl-2 家族等^[4-5]。而与过氧化氢诱导的肝细胞凋亡密切相关的信号转导通路主要有 JNK 和 NF- κ B 通路^[2]。Caspase 家族是整个细胞凋亡过程的中心环节,Caspase-3 作为凋亡最终执行者将完成凋亡通路的最后环节^[2,4-5]。而 PARP 是 Caspase-3 的特异底物,可被其活性片段 Cleaved caspase-3 剪切后形成 Cleaved PARP,促进细胞走向凋亡^[6]。Bcl-2 家族也在细胞凋亡过程中起着至关重要的作用,可通过改变 Bcl-2 家族成员中促凋亡和抗凋亡成员之间平衡而决定肝细胞的存亡,其中,Bax 是 Bcl-2 家族的重要促凋亡成员,与抗凋亡成员 Bcl-2 一起构成凋亡途径的核心调节因子^[7-9]。

大豆异黄酮是大豆种子中重要活性物质,流行病学研究以及动物研究均表明,饮食中的大豆异黄酮摄入可降低癌症、心血管疾病的风险,而抗氧化活性是其重要的作用基础^[10-11]。前期研究表明,大豆异黄酮可保护过氧化氢诱导的肝细胞的氧化应激损伤,增高肝细胞抗氧化能力^[12]。然而,大豆异黄酮对过氧化氢诱导的肝细胞凋亡的影响以及其抑制肝细胞凋亡作用的潜在信号转导途径尚未阐明。因此,本研究拟通过建立过氧化氢诱导的 L02 细胞凋亡模型,以细胞凋亡、凋亡相关重要蛋白 Caspase、Bcl-2 家族蛋白的表达、以及相关信号转导通路中关键蛋白的活化为指标,探讨大豆异黄酮对 L02 细胞凋亡的抑制作用以及其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆异黄酮糖苷(纯度 $\geq 80\%$,华北制药股份有限公司);N-乙酰半胱氨酸(NAC,北京索莱宝科技有限公司);L02 细胞株(南京凯基生物科技有限公司);胎牛血清和 DMEM 培养基(以色列 BI 公司);Hoechst 33342、原位末端标记(TUNEL)细胞凋亡测试盒、细胞核蛋白提取盒(碧云天生物技术有限公司);小鼠多聚 ADP 核糖聚合酶(PARP)抗体、小鼠细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)抗体以及兔含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase-3)抗体、兔 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)抗体、兔 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体、兔核转录因子- κ B(NF- κ B)p65 抗体、兔 c-Jun N 末端激酶(JNK)抗体和兔 p-JNK 抗体(美国 CST 公司)、兔 β -actin 抗体(美国 Sigma-aldrich 公司)。

1.2 试验设计

首先通过预试验确定 ISOF 浓度,然后采用 Hoechst 染色和 TUNEL 染色技术研究 ISOF 对 L02 细胞凋亡的影响。设置空白组、损伤组、ISOF 组及 NAC 组,检测细胞凋亡相关蛋白(Caspase、Bcl-2 家族蛋白),以及上游重要信号通路蛋白(JNK、NF- κ B)的表达情况,进一步探究 ISOF 抑制 L02 细胞凋亡的可能作用机制。

1.3 方法

1.3.1 大豆异黄酮试样的制备 大豆异黄酮糖苷主要含 46% 大豆苷、21% 黄豆苷、13% 染料木苷,以及少量的异黄酮苷元^[12]。将大豆异黄酮糖苷用盐酸水解生成大豆异黄酮苷元产物,经乙酸乙酯萃取、减压蒸馏得大豆异黄酮苷元(soy isoflavone aglycones,ISOF),其主要成分为 57% 大豆苷元、26% 黄豆苷元和 16% 染料木素^[12-13],将其配成无菌溶液备用。

1.3.2 L02 细胞的 Hoechst 染色 将 L02 细胞用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、1% 双抗),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中进行培养和传代^[8]。将对数生长期 L02 细胞接种于 6 孔板中,培养 24 h 使 L02 细胞贴壁。随机分为空白组、损伤组、ISOF 组及 NAC 组。损伤组 L02 细胞继续在无血清 DMEM 培养液中培养 12 h,加过氧化氢使其终浓度为 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,继续培养 8 h 以建立细胞凋亡模型;ISOF 组 L02 细胞用含 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ISOF 的无血清 DMEM 培养液处理 12 h 后,再用 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过氧化氢损伤 8 h;NAC 组 L02 细胞用含 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAC 的无血清 DMEM 培养液处理 12 h 后,再用 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过氧化氢损伤 8 h;空白组 L02 细胞则在无血清 DMEM 培养液中培养 12 h,换无血清培养液后再培养 8 h。将 L02 细胞轻轻清洗后,加固定液固定 20 min,再换入 Hoechst 33342 染色液进行避光染色,封片,置于荧光显微镜下观察 Hoechst 染色结果^[4]。

1.3.3 L02 细胞的 TUNEL 染色 将对数生长期 L02 细胞接种于 6 孔板中。将 L02 细胞清洗后,用免疫染色固定液固定后,加 TUNEL 检测液孵育 1 h,用抗荧光淬灭封片液封片后,置于荧光显微镜下观察 TUNEL 染色结果^[4]。

1.3.4 L02 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 将 L02 细胞接种于 100 mm 培养皿中。收集并裂解细胞,提取总蛋白和核蛋白。进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,并电转移至 PVDF 膜上,用脱脂蛋白封闭后,依次用一抗、二抗孵育,ECL 显影,采集图像并进行

灰度比值分析^[4,14]。

1.4 数据分析

测量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,利用 SAS 9.0 统计软件,采用单因素方差分析和 *t* 检验进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 ISOF 对过氧化氢诱导的 L02 细胞 Hoechst 染色的影响

Hoechst 染料是能够穿过细胞膜的蓝色荧光染

料,可与细胞 DNA 结合,但对细胞毒性小,因此常用于活细胞的标记,可根据细胞核形态特征及荧光强度综合评价细胞凋亡的发生情况^[2,4]。结果显示:正常组 L02 细胞核蓝色荧光弱而均匀,而损伤组 L02 细胞核蓝色荧光明亮而小,可见部分细胞核固缩、甚至呈颗粒状的强蓝色荧光染色,显示显著细胞凋亡特征。与损伤组比较,ISOF 组和 NAC 组细胞核强蓝色荧光染色减少,大部分细胞呈现弥散且均匀的弱蓝色荧光(图 1)。

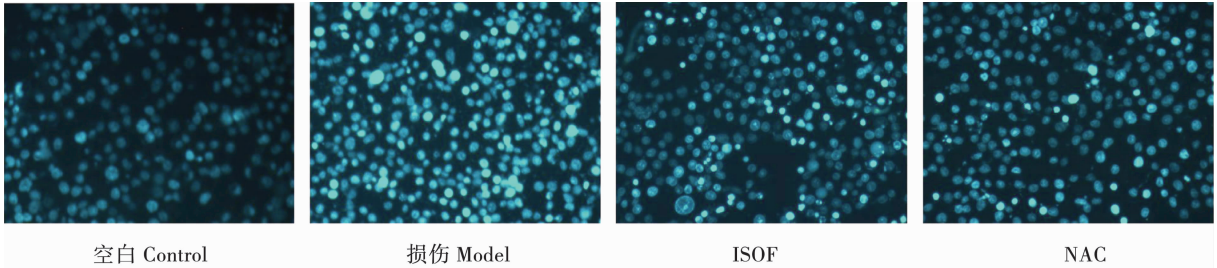


图 1 ISOF 对过氧化氢诱导的 L02 细胞 Hoechst 染色的影响(×100)

Fig. 1 Effect of ISOF on Hoechst staining of L02 cells induced by hydrogen peroxide(×100)

2.2 ISOF 对过氧化氢诱导的 L02 细胞 TUNEL 染色的影响

TUNEL 染色法是检测细胞凋亡常用的检测方法之一,TUNEL 染色液与凋亡细胞断裂 DNA 末端上加荧光素标记过的 dUTP 发出绿色荧光,因此常

用于细胞凋亡的评价^[9]。ISOF 对过氧化氢诱导的 L02 细胞 TUNEL 染色的影响如图 2 所示。与空白组比较,损伤组中强绿色荧光染色的凋亡细胞显著增多($P < 0.05$);与损伤组比较,ISOF 组和 NAC 组强荧光染色的凋亡细胞显著减少($P < 0.05$)。

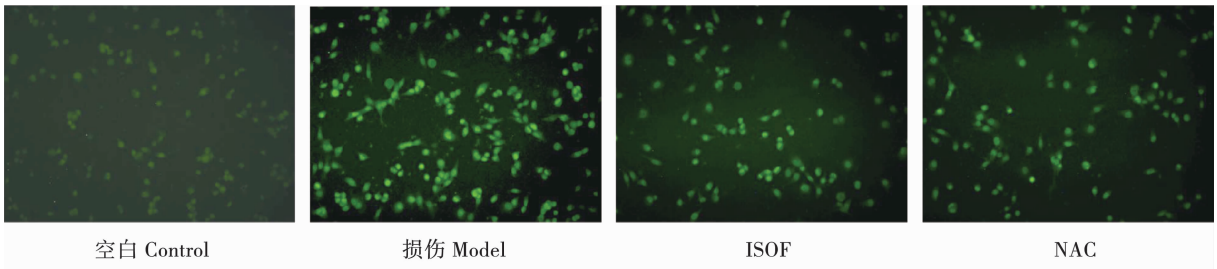


图 2 ISOF 对过氧化氢诱导的 L02 细胞 TUNEL 染色的影响(×100)

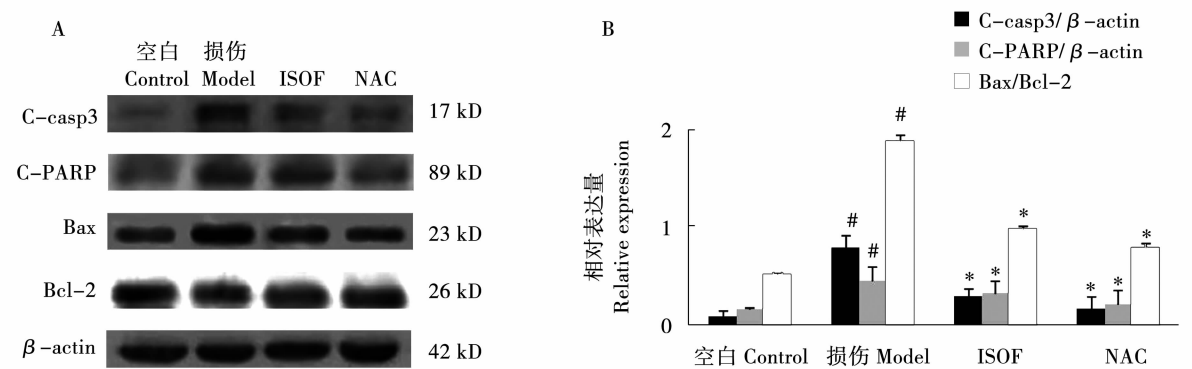
Fig. 2 Effect of ISOF on TUNEL staining of L02 cells induced by hydrogen peroxide(×100)

2.3 ISOF 对过氧化氢诱导的 L02 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

氧化应激损伤可诱导肝细胞发生凋亡,而细胞凋亡是多基因严格控制的过程,如 Caspase 家族、Bcl-2 家族等^[4-5]。ISOF 对过氧化氢诱导 L02 细胞凋亡相关蛋白表达的影响如图 3 所示。与空白组比较,损伤组 L02 细胞 Bcl-2 表达下调($P < 0.05$),Bax 表达上调($P < 0.05$),Cleaved caspase-3(C-casp3)、Cleaved PARP(C-PARP)表达上调($P < 0.05$);与损伤组比较,ISOF 组和 NAC 组 L02 细胞 Bcl-2 表达上调($P < 0.05$),Bax 表达下调($P < 0.05$),Cleaved caspase-3(C-casp3)、Cleaved PARP(C-PARP)表达下调($P < 0.05$)(图 3B)。

2.4 ISOF 对过氧化氢诱导的 L02 细胞 JNK 和 NF-κB 激活的影响

氧化应激可通过多个信号转导途径活化 JNK 和 NF-κB 从而引发细胞凋亡和(或)坏死基因的激活或改变^[10]。研究结果显示:过氧化氢能够激活 L02 细胞,使其增强 JNK 磷酸化以及 NF-κB p65 核转位水平($P < 0.05$);与损伤组比较,ISOF 组 L02 细胞 NF-κB p65 核转位水平显著下降($P < 0.05$),JNK 磷酸化虽有下降趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与损伤组比较,NAC 组 L02 细胞 JNK 磷酸化以及 NF-κB p65 核转位显著降低($P < 0.05$)(图 4)。

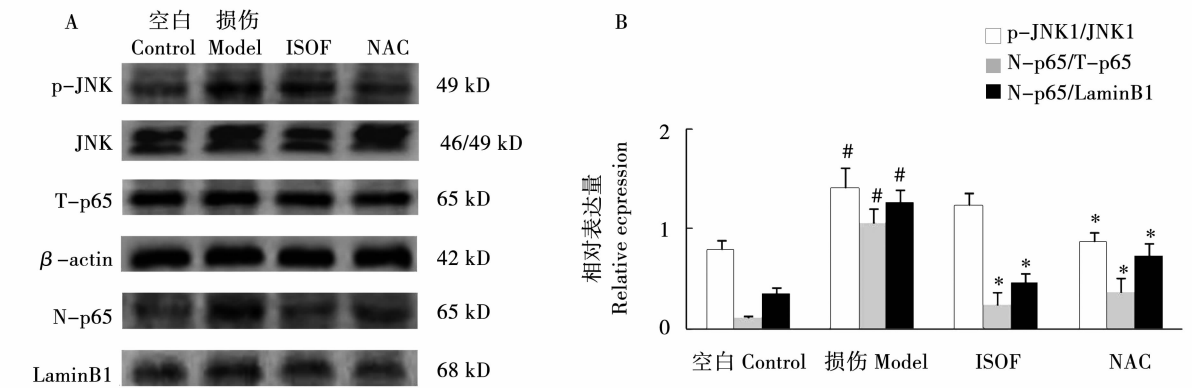


A:免疫印迹检测; B:灰度分析; #:与空白组相比存在显著差异($P < 0.05$); *:与损伤组相比存在显著性差异($P < 0.05$)。下同。

A:Immunoblotting assays; B:Gray analysis; #: There is significant difference compared with the blank group; *: There is significant difference compared with the injury group. The same below.

图3 ISOF对过氧化氢诱导的L02细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of ISOF on expression of apoptosis-related proteins of L02 cells induced by hydrogen peroxide



A:免疫印迹检测; B:灰度分析。

A:Immunoblotting assays; B:Gray analysis.

图4 ISOF对过氧化氢诱导L02细胞JNK和NF-κB激活的影响

Fig. 4 Effect of ISOF on activation of JNK and NF-κB of L02 cells induced by hydrogen peroxide

3 讨论

氧化应激损伤及其导致的细胞凋亡是目前研究的一个热点,它与肝细胞损伤以及急性性肝炎的发病有着密切的关系,因此,研究肝细胞凋亡作用及其机制可为探索治疗肝炎新的方法提供新的依据^[2-3]。本研究中,Hoechst染色和TUNEL荧光染色结果显示,过氧化氢处理L02肝细胞可诱导细胞发生凋亡,并有大量Caspase-3和PARP前体蛋白被剪切后形成相应的活性片段,如Cleaved caspase-3和Cleaved PARP,从而推动和促进凋亡进程,同时伴随着Bax/Bcl-2比值的升高。类似的凋亡模型在前人研究中也报道,如Qian等^[15]用过氧化氢诱导原代大鼠大脑皮质神经细胞凋亡,Wu等^[16]用过氧化氢诱导大鼠H9c2心肌细胞凋亡,二者均发现过氧化氢通过上调Bax/Bcl-2比值而活化Caspase-3,最

终引发细胞凋亡。本研究中,ISOF有效抑制了过氧化氢诱导的L02细胞凋亡,抑制了Caspase-3和PARP前体蛋白被剪切形成其活性片段,并降低Bax/Bcl-2比值。

研究表明,与细胞氧化应激损伤以及随之引发的凋亡密切相关的信号转导通路主要有JNK和NF-κB通路^[5,9,17]。活性氧自由基可通过JNK、NF-κB等信号通路的激活,形成调控肝细胞增殖和凋亡的一个复杂网络,因此,JNK、NF-κB通路与肝细胞损伤及凋亡的关系一直是肝疾的研究热点^[4,17]。本研究中,过氧化氢处理L02肝细胞可诱导JNK和NF-κB的激活,主要表现为JNK磷酸化和NF-κB p65核转位水平增高。而ISOF有效抑制NF-κB p65核转位,并呈现降低JNK活化趋势。说明,ISOF能够有效抑制过氧化氢诱导的L02细胞凋亡,其作用可能与NF-κB通路的调控有关。

4 结 论

本研究利用过氧化氢诱导的 L02 细胞凋亡模型,研究结果表明 ISOF 能够降低 Bax/Bcl-2 比值,阻碍 Caspase-3 活化,从而抑制过氧化氢诱导的 L02 细胞凋亡,其作用可能与 NF-κB 通路的调控有关。

参考文献

[1] 金明,王玉娇,金梅花,等. 两种细胞建立肝细胞氧化损伤模型比较[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(3): 324. (Jin M, Wang Y J, Jin M H, et al. Comparative study of liver cell models with oxidative damage using two cell lines [J]. Chinese Journal of Public Health, 2015, 31(3): 324.)

[2] 田笑. 草苈蓉多糖对叔丁基过氧化氢引起肝细胞凋亡的保护作用[D]. 延吉:延边大学, 2018: 1. (Tian X. Protective effect of polysaccharides from *Boschniakia rossica* on tBHP-induced apoptosis of liver cells [D]. Yanji: Yanbain University, 2018:1.)

[3] 陈绪军,肖琦. 肝细胞损伤、细胞凋亡及肝细胞保护[J]. 国外医学·外科学分册, 2000 (1): 21-24. (Chen X J, Xiao Q. Hepatocyte injury, apoptosis and hepatocyte protection [J]. Foreign Medical Sciences·Subbranch Surgery, 2000 (1):21-24.)

[4] 何鑫. 草苈蓉多糖对叔丁基过氧化氢引起血管内皮细胞凋亡的保护作用[D]. 延吉: 延边大学, 2017: 2. (He X. Protective effect of polysaccharides from *Boschniakia rossica* on tBHP-induced apoptosis of vascular endothelial cells [D]. Ynaji: Yanbain University, 2017: 2.)

[5] 何鑫,刘春彦,尹基峰,等. 祁州漏芦通过下调 JNK 和 NF-κB 抑制 H₂O₂致肝细胞凋亡[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(6): 1189-1193. (He X, Liu C Y, Yin J F, et al. *Rhaponticum uniflorum* inhibits H₂O₂-induced apoptosis of liver cells via JNK and NF-κB pathways [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(6):1189-1193.)

[6] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 1999, 5: 269-290.

[7] 廖永晖,千年松,张毅,等. 创伤应激与肝细胞凋亡[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(15):1569-1576. (Liao Y H, Qian N S, Zhang Y, et al. Traumatic stress and hepatocyte apoptosis [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2010, 18(15): 1569-1576.)

[8] Peña-blanco A, García-súez A J. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis [J]. The FEBS Journal,

2018, 285(3): 416-431.

[9] 金海南,刘莉园,金芳多,等. 祁州漏芦水提取物对叔丁基过氧化氢诱导血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(16): 1366-1372. (Jin H N, Liu L Y, Jin F D, et al. Protective effect of *Radix Rhapontici* water extract on tert-butyl hydroperoxide-induced damage of vascular endothelial cells [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2018, 53(16):1366-1372.)

[10] 赵琳琳,解慧,张彪,等. 茶多酚对大豆胰蛋白酶抑制因子诱导氧化应激的抑制作用[J]. 大豆科学, 2018, 37(3):373-377. (Zhao L L, Xie H, Gu C M, et al. Effects of daidzein and its phenylsulfonate derivatives on proliferation and apoptosis of lung cancer cells [J]. Soybean Science, 2018, 37(3): 373-377.)

[11] 孙明明,王萍,李智媛,等. 大豆活性成分研究进展[J]. 大豆科学, 2018, 37(6): 975-983. (Sun M M, Wang P, Li Z Y, et al. Research progress of soybean active ingredients [J]. Soybean Science, 2018, 37(6): 975-983.)

[12] 尹学哲,金延华,何鑫,等. 大豆异黄酮对过氧化氢诱导的肝细胞损伤的保护作用[J]. 大豆科学, 2016, 35(4): 687-690. (Yin X Z, Jin Y H, He X, et al. Protective effect of soy isoflavones on oxidative damage of liver cells induced by hydrogen peroxide [J]. Soybean Science, 2016, 35(4): 687-690.)

[13] Jin M, Shen M H, Jin M H, et al. Hypoglycemic property of soy isoflavones from hypocotyl in Goto-Kakizaki diabetic rats [J]. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2018, 62(2):148-154.

[14] 刘莉园. 草苈蓉多糖对脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应的影响及其机制[D]. 延吉:延边大学, 2019: 6. (Liu L Y. Effect of *Boschniakia rossica* polysaccharides on LPS-induced inflammation of RAW264.7 macrophages [D]. Yanji: Yanbain University, 2019: 6.)

[15] Qian Y, Cao L, Guan T, et al. Protection by genistein on cortical neurons against oxidative stress injury via inhibition of NF-kappaB, JNK and ERK signaling pathway [J]. Pharmaceutical Biology, 2015, 53(8): 1124-1132.

[16] Wu H, Gao H, Gao S, et al. A Chinese 4-herb formula, Yiqi-Huoxue granule, alleviates H₂O₂-induced apoptosis by upregulating uncoupling protein 2 in H9c2 cells [J]. Phytomedicine, 2019, 53:171-181.

[17] Wu Z, Wang Y, Meng X, et al. Total C-21 steroidal glycosides, isolated from the root tuber of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight, attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative injury and inflammation in L02 cells [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 42(6):3157-3170.