

宁夏枸杞总黄酮对 H₂O₂ 损伤人脐静脉内皮细胞的保护作用

廖国玲, 杨风琴, 王伟

(宁夏医科大学 检验学院, 银川 750004)

[摘要] 目的:研究宁夏枸杞总黄酮对过氧化氢(H₂O₂)损伤的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)的保护作用及可能的机制。方法:采用H₂O₂诱导HUVEC氧化应激损伤模型。实验分为正常组、1 mmol·L⁻¹H₂O₂损伤模型组、枸杞总黄酮保护(100,200,400 mg·L⁻¹)预孵育24 h组,以及阳性对照(维生素C 20 mg·L⁻¹)组,预孵育24 h。采用噻唑蓝(MTT)法检测枸杞总黄酮对1 mmol·L⁻¹H₂O₂损伤4 h细胞活性,测定细胞上清液中丙二醛(MDA),乳酸脱氢酶(LDH),超氧化物歧化酶(SOD),一氧化氮(NO)。结果:与正常组比较,H₂O₂损伤模型组MDA含量、LDH活性均增高,NO生成量、SOD活性明显下降,其差异均具有显著性(P<0.01)。枸杞黄酮保护组MDA含量、LDH活性均下降,NO生成量、SOD活性较H₂O₂损伤模型组明显增高(P<0.01),MDA含量、LDH活性的下降程度,NO生成量、SOD活性的增高程度,与枸杞总黄酮呈剂量依赖性。结论:宁夏枸杞总黄酮对H₂O₂所致人血管内皮损伤有保护作用,其机制可能与宁夏枸杞总黄酮抑制损伤细胞的脂质过氧化,以及有效提高机体抗氧化酶的活性、清除自由基,促进一氧化氮(NO)的合成有关。

[关键词] 宁夏枸杞总黄酮;人脐静脉内皮细胞;过氧化氢损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0139-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240139

[收稿日期] 20140522(004)

[基金项目] 宁夏自然科学基金项目(NZ111116)

[第一作者] 廖国玲, 硕士, 副教授, 从事西部天然产物和心血管病研究, Tel: 13995081670, 0951-4083334(0), E-mail: guolingliao@163.com

- [7] Kito Y. The functional role of intramuscular interstitial cells of Cajal in the stomach [J]. J Smooth Muscle Res, 2011,47(2):47.
- [8] 旺建伟,金颖慧,齐德英,等. 痛泻要方对脑肠肽含量的作用与脑-肠轴调控相关性的实验研究[J]. 中医药信息,2011,28(3):15.
- [9] 汤凯捷,张江春,时昭红,等. 心理护理对功能性消化不良患者胃肠动力的影响[J]. 中华现代护理杂志, 2008,33(14):3441.
- [10] 马桂凤. 功能性消化不良、胃动力与精神心理因素[J]. 天津医药,2006,34(8):575.
- [11] 王垂杰,姜巍. 功能性消化不良肝郁模型大鼠胃动素与Cajal间质细胞的关系研究[J]. 中华中医药学刊, 2009,27(12):2500.
- [12] 王垂杰,姜巍. 功能性消化不良肝郁模型大鼠胃排空障碍与胃平滑肌超微结构的关系[J]. 中国中西医结合消化杂志,2009,17(2):86.
- [13] 胡淑娟,王小娟,郭璇,等. 舒胃汤对功能性消化不良大鼠Cajal间质细胞和P物质表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2010,17(9):30.
- [14] 郭璇,弭艳红,王小娟,等. 舒胃汤对功能性消化不良大鼠血清干细胞因子、一氧化氮的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2011,31(9):27.
- [15] 弭艳红,郭璇,王小娟,等. 舒胃汤对功能性消化不良大鼠胃排空、血清干细胞因子、一氧化氮的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):159.
- [16] 徐寅,郭璇,弭艳红等. 舒胃汤对FD大鼠P物质与胃窦Cajal间质细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(6):163.
- [17] 徐寅,王小娟,张丽明,等. 舒胃汤对功能性消化不良大鼠胃动素及电镜观察胃窦Cajal间质细胞的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志,2012,20(3):65.

[责任编辑 聂淑琴]

Protective Effect of Total Flavonoids from *Lycium barbarum* on Injured Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Hydrogen Peroxide

LIAO Guo-ling, YANG Feng-qin, WANG Wei

(School of Laboratory Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protection action and possible mechanism of total flavonoids from *Lycium barbarum* (FLB) on the injured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by hydrogen peroxide (H_2O_2). **Method:** The HUVEC oxidative stress damage model was established by using H_2O_2 . This study was divided into as follows: normal group, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 injury group, FLB protective groups ($100, 200, 400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) incubation for 24 hours and positive control (vitamin C $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) group incubation for 24 h. MTT method was used to detect cell activity that was protected by FLB from damage caused by $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 . The levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD), the activity of lactate dehydrogenase (LDH), the generation of nitric oxide (NO) in the supernatant were measured. **Result:** The levels of MDA and the activity of LDH were increased, the generation of NO and the activity of SOD decreased obviously in H_2O_2 damage model group, the differences are significant ($P < 0.01$). In FLB protection group, the activity of LDH and the levels of MDA were decreased, the generation of NO and the activity of SOD were increased obviously, the differences were significant ($P < 0.01$). There was a dose dependent manner between the decreased degree of MDA, the activity of LDH, the degree of NO generation, the activity of SOD and FLB. **Conclusion:** FLB has the ability to protect vascular endothelial from damage caused by H_2O_2 , its mechanism of the protecting of total FLB may be related to inhibiting lipid peroxidation damage cells, effectively improving the cell's antioxidant enzyme activity, eliminating free radicals, and promoting the production of NO.

[Key words] total flavonoids of *Lycium barbarum*; umbilical vein endothelial cells; oxidative damage

血管疾病是一类危害人类健康和生命的非传染性慢性疾病^[1]。血管内皮细胞的损伤与功能紊乱是诱发多种心血管疾病发病的共同环节,抑制因血管内皮细胞损伤导致的血管内皮细胞凋亡是药物防治心血管疾病的靶点之一^[2]。林丽等^[3]发现黑果枸杞花色苷对氧化低密度脂蛋白所损伤的人脐静脉内皮细胞具有保护作用^[4]。黄酮类化合物是枸杞属植物中分布最广的一类化合物,具有调节心血管功能的药理作用^[5-6]。目前,有关枸杞黄酮类化合物对血管内皮细胞损伤保护作用的研究尚未见报道。本研究以体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为实验对象,过氧化氢诱导建立血管内皮细胞氧化应激损伤模型,通过对枸杞总黄酮的抗细胞损伤作用及其可能机制进行探讨,为宁夏枸杞总黄酮作为具有开发前景的心血管疾病防治的中药材提供理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 宁夏枸杞 *Lycium barbarum* 由宁

夏农科院枸杞研究所提供,陈淑华研究员鉴定。宁夏枸杞总黄酮由本研究室分离、纯化和检测。噻唑蓝(MTT,批号 20131105)、丙二醛(MDA,批号 20131209)、乳酸脱氢酶(LDH,批号 20131216)、超氧化物歧化酶(SOD,批号 20131211)、一氧化氮(NO,批号 20131213)试剂盒,购自南京建成生物工程研究所,其余均为国产试剂(分析纯)。

1.2 细胞来源 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)由宁夏医科大学附属医院提供。Trypsin,胎牛血清,DMEM培养基(Gibco公司)。

1.3 仪器 CO_2 培养箱(美国Sheldon公司),倒置显微镜(Olympus),酶标仪(Me2tertech公司)。

2 方法

2.1 枸杞总黄酮提取、分离和检测 采用80%乙醇,60℃超声提取,减压浓缩,经HPD-600型大孔树脂,乙醇洗脱,减压浓缩后,超纯水定容为枸杞总黄酮溶液^[6-7]。以芦丁为标准液绘制标准曲线,铝盐法测定总黄酮的浓度。

2.2 HUVEC 细胞培养 HUVEC 细胞采用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基(100 kU·L⁻¹青霉素, 100 kU·L⁻¹链霉素), 37℃, 饱和湿度, 5% CO₂ 培养箱中静置培养, 达 90% 以上单层融合状态时用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代培养用于试验。

2.3 分组 正常组: 只加培养液; H₂O₂ 损伤模型组: 在培养液中加入 1 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 诱导损伤 4 h; 枸杞黄酮保护组: 预先在培养液中分别加入终质量浓度为 100, 200, 400 mg·L⁻¹ 的枸杞黄酮孵育 24 h, 再加入 1 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 诱导损伤 4 h; 阳性对照组: 在培养液中先加入终质量浓度为 20 mg·L⁻¹ 的 VitC 孵育 24 h, 再加入 1 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 诱导损伤 4 h。

2.4 对 H₂O₂ 损伤人脐静脉内皮细胞活力的影响 调整细胞密度为 1 × 10⁶ 个/L 接种 96 孔板, 按 2.3 项下所述培养, 每孔加入 20 μL MTT (5 g·L⁻¹), 37℃ 孵育 4 h, 倾去上清液, 每孔加二甲亚砜 150 μL, 振荡数分钟, 使甲臜充分溶解, 570 nm 处测定吸光度(A)。以 MTT 的 A 计算细胞生长抑制率(IR)。

$$IR = (\text{对照组 } A - \text{实验组 } A) / \text{对照组 } A \times 100\%$$

2.5 对 H₂O₂ 损伤人脐静脉内皮细胞的丙二醛(MDA) 含量和乳酸脱氢酶(LDH) 活性的影响 按 2.3 项下所述培养, 取细胞培养上清液, 严格按试剂盒说明书所述方法, 分别测定释放的 MDA 的含量和 LDH 活性, 试验重复 3 次, 每次 4 个复孔, 取均值, 判断细胞损伤状况。

2.6 对 H₂O₂ 损伤人脐静脉内皮细胞 NO, SOD 的影响 按 2.3 项下所述培养, 取细胞培养上清液, 严格按试剂盒说明书方法, 分别检测 NO 含量和 SOD 活性, 试验重复 3 次, 每次 4 个复孔, 取均值。观察枸杞总黄酮对氧化应激损伤细胞活性影响的机制。

2.7 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 19.0 统计软件两组间比较用 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析, 然后用 *q* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 枸杞总黄酮的提取、分离和检测 采用反相高效液相色谱法分离并检测枸杞总黄酮提取液, 证实含有芦丁和绿原酸^[8]。以芦丁为标准液, 绘制标准曲线, 铝盐法测定总黄酮质量浓度为 100 g·L⁻¹。

3.2 对 H₂O₂ 损伤人脐静脉内皮细胞活力, MDA 含量和 LDH 活性的影响 H₂O₂ 处理 HUVEC 后其细胞活力较正常组 HUVEC 细胞活力下降(*P* < 0.01), 与 H₂O₂ 组比较, 枸杞黄酮各浓度组可抑制 H₂O₂ 损伤引起的细胞活力降低, 并随浓度增加, 抑制作用增强, 具有显著性差异(*P* < 0.01)。与正常组比较, H₂O₂ 损伤组细胞培养液中细胞内 MDA 含量、LDH 活性增高, 其差异具有显著性。与 H₂O₂ 损伤组比较, 枸杞总黄酮具有抑制 H₂O₂ 所致细胞脂质过氧化损伤的能力, 表现为脂质过氧化物 MDA 生成减少, LDH 活性下降, 并与枸杞总黄酮呈剂量依赖性, 具有显著性差异(*P* < 0.01), 见表 1。

表 1 枸杞总黄酮对 1 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 损伤的 HUVEC 活力, MDA 含量, LDH 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 40$)

组别	终质量浓度 /mg·L ⁻¹	HUVEC 活力 /A	IR /%	MDA /μmol·L ⁻¹	LDH /U·mL ⁻¹
正常	-	0.463 ± 0.003	0.0	0.418 ± 0.042	44.2 ± 5.5
H ₂ O ₂ 模型	-	0.283 ± 0.002 ¹⁾	38.8	2.216 ± 0.062 ¹⁾	174.8 ± 8.8 ¹⁾
VitC	20	0.356 ± 0.002 ²⁾	23.1	1.304 ± 0.105 ²⁾	81.6 ± 6.4 ²⁾
H ₂ O ₂ + 枸杞黄酮	100	0.306 ± 0.002 ²⁾	34.0	1.796 ± 0.155 ²⁾	86.2 ± 7.8 ²⁾
	200	0.321 ± 0.002 ²⁾	30.7	1.674 ± 0.054 ²⁾	80.4 ± 7.3 ²⁾
	400	0.345 ± 0.002 ²⁾	25.5	1.427 ± 0.106 ²⁾	50.0 ± 6.8 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ *P* < 0.01; 与 H₂O₂ 模型组比较²⁾ *P* < 0.01 (表 2 同)。

3.3 对 H₂O₂ 损伤 HUVEC 的 NO 生成量和 SOD 活性的影响 与正常组比较, H₂O₂ 损伤组 NO 生成量、SOD 活性明显下降。与 H₂O₂ 损伤组比较, 不同浓度的枸杞黄酮保护组 NO 生成量、SOD 活性均明显增加。且 NO 生成量、SOD 活性的增加与枸杞总黄酮呈剂量依赖性。具有显著性差异(*P* < 0.01),

见表 2。

4 讨论

血管内皮细胞的损伤与功能紊乱是诱发多种心血管疾病的共同环节^[1-2, 8]。因此, 除调动机体源性防御机制外, 寻找保护血管内皮细胞活性的药物, 是防治心脑血管疾病的靶点之一^[8]。

表 2 枸杞总黄酮对 1 mmol·L⁻¹H₂O₂

损伤脐静脉内皮细胞 SOD 活性及 NO 生成量的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	终质量浓度 /mg·L ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹	NO /μmol·L ⁻¹
正常	-	18.837 ± 0.456	55.69 ± 8.12
H ₂ O ₂ 模型	-	13.323 ± 0.320 ¹⁾	19.05 ± 6.27 ¹⁾
VitC	20	17.076 ± 0.063 ²⁾	39.11 ± 3.09 ²⁾
H ₂ O ₂ + 枸杞黄酮	100	15.084 ± 0.569 ²⁾	28.15 ± 5.71 ²⁾
	200	16.080 ± 0.328 ²⁾	33.25 ± 3.94 ²⁾
	400	16.616 ± 0.313 ²⁾	37.27 ± 3.72 ²⁾

黄酮类化合物是植物代谢过程中产生的一类重要的天然有机化合物。目前,应用于心血管系统治疗的药材(如银杏叶、丹参等)大都含有黄酮类化合物^[9-10]。研究表明宁夏枸杞黄酮类化合物有明显的抗氧化活性^[11-12]。深入研究枸杞黄酮类化合物对血管内皮细胞损伤的保护作用和机制,将为研究新型治疗心脑血管疾病中药材提供理论依据。

以体外培养的 HUVEC 为实验对象,H₂O₂ 诱导建立血管内皮细胞氧化应激损伤模型,初步探讨了枸杞总黄酮对 H₂O₂ 损伤的血管内皮细胞的保护作用及其可能机制。研究发现,H₂O₂ 诱导 HUVEC 损伤,使细胞的存活率明显下降,枸杞总黄酮保护后,IR 下降,MDA 含量、LDH 活性均下降,具有显著性差异($P < 0.01$),均与枸杞黄酮呈剂量依赖性。MDA 的含量可以反映细胞脂质过氧化的程度^[11],LDH 的活力反映细胞损伤的程度。枸杞总黄酮保护组 MDA 含量、LDH 活性均下降,说明枸杞总黄酮抑制了 H₂O₂ 损伤的 HUVEC 脂质过氧化,减弱了乳酸脱氢酶的漏出,对 H₂O₂ 损伤的血管内皮细胞具有较好的保护作用,保护作用的强弱与枸杞总黄酮呈剂量依赖性。

NO 是血管内皮细胞合成并分泌的血管源性舒张因子,是心血管系统功能重要的调节因子,SOD 是机体内清除自由基的第一道防线^[13]。H₂O₂ 损伤组细胞培养液中 NO 生成量、SOD 活性明显下降,说明 H₂O₂ 可导致血管内皮细胞的抗氧化酶活力下降,清除氧自由基的能力降低,NO 生成量增加,进一步加重细胞损伤。而加入枸杞总黄酮后,NO 生成量、SOD 活性明显增高($P < 0.01$),且与枸杞总黄酮呈剂量依赖性,提示枸杞总黄酮是通过增强细胞

清除氧自由基的能力、调节 NO 生成量来保护细胞免受 H₂O₂ 的氧化损伤。随总黄酮浓度的增加而这种保护作用不断增强。

总之,枸杞总黄酮对 H₂O₂ 所致的内皮细胞的损伤有保护作用,且随着枸杞黄酮剂量的增加,保护作用效果更好。其保护作用机制可能与抑制脂质过氧化、减弱 LDH 的漏出,以及有效提高机体抗氧化酶的活性、清除自由基,促进 NO 的合成有关。研究枸杞总黄酮对血管内皮细胞损伤的保护作用,将为研究新型治疗心脑血管疾病中药材提供理论依据。

[参考文献]

[1] Keen H. The WHO multinational study of vascular disease in diabetes[J]. Diabetologia,2001,44(Z2):S1.

[2] 刘静,张向阳. 血管内皮细胞损伤与修复的机制研究[J]. 中国神经再生研究,2009,13(50):9997.

[3] 林丽,李进,李永洁,等. 黑果枸杞花色苷对氧化低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞的保护作用[J]. 中国药理学杂志,2013,48(8):606.

[4] 白寿宁. 宁夏枸杞研究[M]. 银川:宁夏人民出版社,1998.552.

[5] 郑国琦,胡正海. 宁夏枸杞生物学和化学成分的研究进展[J]. 中草药,2008,39(5):796.

[6] 廖国玲,王伟. 枸杞黄酮类化合物色谱分析条件的优化[J]. 宁夏医学杂志,2013,35(7):614.

[7] 廖国玲,王伟. 反相高效液相色谱法测定枸杞活性成分[J]. 医学信息,2013,26(1):68.

[8] 刘颖琳,刘耕圃. 血管内皮细胞炎症反应与动脉粥样硬化的关系对药物研究的启示[J]. 中国药理学通报,2001,17(4):361.

[9] 鲁晓翔. 黄酮类化合物抗氧化作用机制研究进展[J]. 食品研究与开发,2012,33(3):220.

[10] 吴旭彤,朱莹莹,李七一,等. 中药对血管内皮细胞损伤的保护作用的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2011,29(12):2648.

[11] 黄文波. 宁夏枸杞中黄酮类化合物的提取、纯化及其抗氧化活性研究[D]. 宁夏:宁夏大学,2005.

[12] 张自萍,廖国玲,李弘武. 宁夏枸杞黄酮类化合物 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2008,39(1):103.

[13] 潘会君,唐宁,华晓东,等. 中药调控一氧化氮合酶-一氧化氮系统的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):202.

[责任编辑 聂淑琴]