

黄芪甲苷对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用

许崇花, 王洪新*, 唐富天, 鲁美丽, 韩榕徽, 梅蒙, 胡进
(辽宁医学院 心脑血管药物重点实验室, 辽宁 锦州 121001)

[摘要] 目的:研究黄芪甲苷(astragaloside IV, As IV)对过氧化氢(H_2O_2)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)保护作用并探讨其可能的作用机制。方法:在37℃, 5% CO_2 , 95%空气饱和湿度的培养箱内体外培养HUVECs,将细胞分为正常组,模型组(过氧化氢 $180 \mu mol \cdot L^{-1}$),黄芪甲苷不同剂量(25, 50, 100 $\mu mol \cdot L^{-1}$) + 过氧化氢($180 \mu mol \cdot L^{-1}$)组。MTT法测定各组细胞活力,二氢乙锭原位定性细胞内超氧阴离子含量,Western blot测定细胞内核因子(NF)- κB p65, NF- κB 抑制蛋白 α 亚基(I κB - α),内皮型一氧化氮合酶(eNOS)蛋白表达,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测HUVECs外液肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)的含量。结果:与正常组比较,模型(H_2O_2)组细胞活力明显降低,细胞中超氧阴离子明显升高, NF- κB p65蛋白表达升高, I κB - α 蛋白表达降低, eNOS蛋白表达升高,细胞上清液中TNF- α 和IL-6的含量升高($P < 0.01$)。与模型(H_2O_2)组相比,黄芪甲苷不同剂量组表现为细胞活力明显升高,细胞中超氧阴离子含量减少, eNOS, p65蛋白表达有不同程度的降低, I κB - α 的蛋白含量增加,细胞上清液中TNF- α 和IL-6的含量降低,且呈浓度依赖性($P < 0.05$)。结论:黄芪甲苷能改善 H_2O_2 诱导的HUVECs的损伤,其机制可能是通过降低超氧阴离子量,抑制eNOS的解耦联,减少其产生超氧阴离子,从而减轻氧化应激,降低NF- κB 和相关炎症因子表达。

[关键词] 黄芪甲苷; 过氧化氢; 人脐静脉内皮细胞; 超氧阴离子; 内皮型一氧化氮合酶; 核因子- κB

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0101-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015160101

Protective Effect of Astragaloside IV on Dysfunction of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Hydrogen Peroxide XU Chong-hua, WANG Hong-xin*, TANG Fu-tian, LU Mei-li, HAN Rong-hui, MEI Meng, HU Jin (Key Laboratory of Cardiovascular and Cerebrovascular Drug Research of Liaoning Province, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effects of astragaloside IV (As IV) on the dysfunction of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by hydrogen peroxide and the underlying mechanism. **Method:** Human umbilical vein endothelial cells were cultured *in vitro* and divided into five groups including normal, model (H_2O_2 $180 \mu mol \cdot L^{-1}$), As IV ($25 \mu mol \cdot L^{-1}$) + H_2O_2 ($180 \mu mol \cdot L^{-1}$), As IV ($50 \mu mol \cdot L^{-1}$) + H_2O_2 ($180 \mu mol \cdot L^{-1}$), As IV ($100 \mu mol \cdot L^{-1}$) + H_2O_2 $180 \mu mol \cdot L^{-1}$. The cell viability was evaluated by MTT assay, endothelial superoxide anion generation was determined by staining of cells with fluorescent-labeled dihydroethidium. Western blot were used to quantify intracellular protein expression of nuclear factor- κB (NF- κB) p65, I κB - α and endothelial nitric oxide synthase (eNOS), the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in the extracellular fluid by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with the normal group, the cell viability of model group were decreased remarkably, the intracellular superoxide anion generation were increased significantly, the protein expression of p65 was increased while the I κB - α was decreased and the eNOS was increased, the production of TNF- α and IL-6 in the extracellular fluid were increased obviously ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the cell viability was increased, the intracellular superoxide anion generation was decreased, the protein expression of p65 was decreased, while the I κB α was increased and the eNOS was decreased, the production of TNF- α and IL-6 was

[收稿日期] 20150113(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81374008)

[第一作者] 许崇花, 硕士, 从事心血管药理研究, Tel:18841608863, E-mail:youya5168@163.com

[通讯作者] *王洪新, 教授, 博士, 从事心血管药理学及天然药物研究, Tel:18641637333, E-mail:jyhxwang@163.com

decreased in 3 dose groups of As IV, and the differences showed a dose-dependent ($P < 0.05$). **Conclusion:** As IV has protective effects on the dysfunction of human umbilical vein endothelial cells induced by H_2O_2 . The mechanism may be related to reducing superoxide anion production, inhibiting eNOS uncoupling which could produce superoxide anion, thus attenuating oxidative stress and reducing the expression of NF- κ B and related inflammatory cytokine. Consequently As IV could protect human umbilical vein endothelial cells from damage induced by H_2O_2 .

[**Key words**] astragaloside IV; hydrogen peroxide; human umbilical vein endothelial cells; superoxide anion; endothelial nitric oxide synthase; nuclear factor- κ B

血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VEC)是一层连续覆盖整个血管腔表面的单层细胞,其功能障碍是多种心血管疾病的发病基础^[1]。过氧化氢(H_2O_2)刺激内皮细胞,一方面会导致细胞膜上的内皮型一氧化氮合酶(eNOS)蛋白表达升高,另一方面会激活细胞膜上的 NADPH 氧化酶,导致胞浆中超氧阴离子产生增多^[2],超氧阴离子与胞浆中的 eNOS 产生的一氧化氮(NO)反应生成过氧亚硝酸(ONOO⁻),其会导致 eNOS 解耦联而进一步产生超氧阴离子,超氧阴离子会使得核转录因子- κ B(NF- κ B)与其抑制蛋白(I κ B- α)解聚,进而激活 NF- κ B 转移到细胞核内,增加相关炎症因子的表达^[3],使内皮细胞功能受损。研究表明,中药黄芪具有抗氧化、清除自由基、抗炎等作用^[4],黄芪甲苷作为其有效成分对内皮细胞有显著保护作用,从而防止和减轻相关疾病发生发展过程中的内皮功能障碍。本课题旨在观察在 H_2O_2 诱导人脐静脉内皮损伤模型中,黄芪甲苷对内皮细胞的保护作用及相关作用机制。

1 材料

1.1 细胞株 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)(美国 Sciencell 公司)。

1.2 药物与试剂 黄芪甲苷(As IV,批号 140810,南京景竹生物科技有限公司,纯度 > 98%),过氧化氢(H_2O_2 ,批号 20121120,国药集团化学试剂有限公司),甲基四唑蓝(MTT,批号 104K3719,美国 Sigma 公司),低糖 DMEM 培养基(批号 1297499, Gibco 公司),胎牛血清(批号 NVD0250, Hyclone 公司),二氢乙锭(hydroethidine,批号 073023,美国 AAT Bioquest 公司),I κ B α 一抗(批号 AC111401,北京博奥森生物技术有限公司),p65 一抗(批号 AD090103,北京博奥森生物技术有限公司),eNOS 一抗(批号 D-C1-07C1613,武汉博士德生物科技有限公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 TC2323 型二氧化碳孵箱(美国 Sheldon

Manufacturing 公司),XD-101 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),79-1 型磁力加热搅拌器(江苏金坛中大仪器厂),Leica DM 1000 型荧光显微镜(德国 Leica 公司),BS-124S 型电子天平(德国赛多利斯天平有限公司),DNM-9602G 型酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人脐静脉内皮细胞株按常规培养,用添加了内皮生长因子($4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),10% 胎牛血清,青霉素($100 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)和链霉素($100 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)的 DMEM 培养基,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$,5% CO_2 细胞培养箱中培养。0.25% 胰酶消化 2~3 min,用培养基终止消化,轻轻吹打瓶壁制成细胞悬液,分成 2 瓶,每瓶 5 mL,2~3 d 传代 1 次。

2.2 分组及药物处理 传代细胞 48 h 后换液,用含有 1% 胎牛血清的培养基继续培养。实验所需试剂 H_2O_2 配成相应浓度后($180 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)用 $0.22 \mu\text{m}$ 针式滤器过滤;As IV 溶于 DMSO,且 DMSO 在培养基中的体积分数 < 0.1%。As IV 预先孵育 30 min 后加入 H_2O_2 ,24 h 后收集细胞及其上清液用以相关指标测定。实验分组为正常组、模型组(H_2O_2 $180 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[5]组),As IV($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + H_2O_2 ($180 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组,As IV($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + H_2O_2 ($180 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组及 As IV($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + H_2O_2 ($180 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组。

2.3 MTT 法检测 HUVECs 细胞活力 选取对数生长期 HUVECs 细胞,接种于 96 孔板内,每孔细胞密度约 $10^4 \sim 10^5$ 个,每组设 6 个复孔,培养 24 h 后进行指标检测。实验分组及药物处理同 2.2,于酶标仪上 570 nm 处测定每孔吸光度 A。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{处理组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.4 细胞内超氧阴离子测定^[6] 用氧化荧光染料二氢乙锭测定完整人脐静脉内皮细胞超氧阴离子。二氢乙锭能自由渗透细胞,在超氧化物阴离子存在的情况下,被氧化成溴化乙锭插入到 DNA 中^[7]。选

取对数期生长期 HUVECs 细胞,接种于 6 孔板内,每孔约 1×10^5 个细胞,培养 24 h 进行实验,实验分组及药物处理同 2.2,药物处理 24 h 后,倒掉培养基,用 PBS 洗 3 遍,加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的二氢乙锭, 37°C 孵育 30 min,荧光显微镜观察。

2.5 测定 eNOS, I κ B α , NF- κ B p65 蛋白的表达
收集各组细胞,加入 200 μL 蛋白裂解液(含 1% PMSF),冰上反复吹打, 4°C , $12\ 000 \times g$ 离心 15 min,取上清,蛋白浓度测定后,为确保上样量相同,计算每组应吸取的样品上清液量,加 TBS 补足到 160 μL ,再加 40 μL 5 倍上样缓冲液煮沸 5 min,取 20 μL 电泳,待条带接近玻璃板底时终止电泳。采用半干法转膜,封闭,洗膜,按对应相对分子质量切割后分别置于 1:300 稀释的 eNOS, I κ B α , 1:1 000 稀释的 NF- κ B p65 一抗稀释液中, 4°C 过夜,洗膜后加入 1:5 000 稀释的二抗,摇床上杂交 1 h。显影,检测。

2.6 HUVECs 上清液中 TNF- α 和 IL-6 的含量 收集各组细胞上清液,采用酶联免疫吸附(ELISA)法

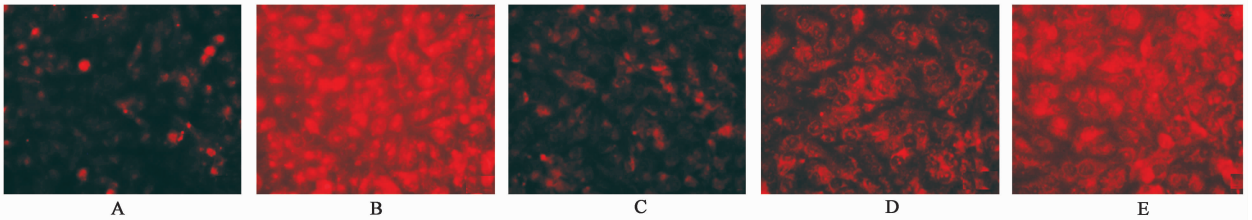
检测细胞上清液 TNF- α 和 IL-6 的含量,将试剂盒置于室温平衡 30 min,按照 ELISA 试剂盒说明进行操作,完毕后全自动酶标仪在 450 nm 读取 A,绘制标准曲线,根据各标本 A 算出相应的浓度。

2.7 数据处理 数据以 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间显著性检验采用单因素方差分析和 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 H₂O₂ 处理 HUVECs 活力的影响 与正常组比较,模型组的细胞活力明显降低($P < 0.01$);与模型组相比,As IV ($25 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组呈现一定的浓度依赖性增强细胞活力。见表 1。

3.2 对 H₂O₂ 处理人脐静脉内皮细胞内超氧阴离子的影响 如图 1 所示,与正常组相比,模型组中细胞内的超氧阴离子的量明显增多;与模型组比较,As IV ($25, 50, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各剂量组细胞内的超氧阴离子均有所减少,且呈现一定的浓度依赖性。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 黄芪甲苷 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 黄芪甲苷 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; E. 黄芪甲苷 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 黄芪甲苷对 H₂O₂ 处理人脐静脉内皮细胞内超氧阴离子的影响(二氢乙锭荧光标记, $\times 40$)

Fig. 1 Effects of As IV on intracellular superoxide anion production in HUVECs induced by H₂O₂ (dihydroethidine labeled, $\times 40$)

3.3 对 H₂O₂ 处理 HUVECs 中 eNOS, p65 和 I κ B α 蛋白表达的影响 与正常组相比,模型组 eNOS, p65 表达明显增加, I κ B α 表达减少($P < 0.01$);与模型组相比,As IV ($100, 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) eNOS, p65 表达

减少, I κ B- α 蛋白表达增加($P < 0.05$),且 As IV ($25 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 呈现一定的浓度依赖性保护作用($P < 0.05$)。见表 1。

3.4 对 H₂O₂ 处理 HUVECs 上清液 IL-6 和 TNF- α

表 1 黄芪甲苷对 H₂O₂ 处理人脐静脉内皮细胞中 eNOS, p65 和 I κ B α 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of As IV on HUVECs viability and eNOS, p65 and I κ B α protein expression in HUVECs induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活力 /%	蛋白表达		
			eNOS/ β -actin	p65/ β -actin	I κ B α / β -actin
正常	-	100	0.58 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.79 ± 0.03
模型	-	$46.15 \pm 2.81^{1)}$	$0.88 \pm 0.03^{1)}$	$0.90 \pm 0.04^{1)}$	$0.44 \pm 0.02^{1)}$
黄芪甲苷	100	$76.92 \pm 3.30^{2,4)}$	$0.64 \pm 0.04^{2,4)}$	$0.60 \pm 0.03^{2,4)}$	$0.72 \pm 0.04^{2,4)}$
	50	$69.23 \pm 4.01^{2,3)}$	$0.73 \pm 0.03^{2,3)}$	$0.78 \pm 0.04^{2,3)}$	$0.69 \pm 0.04^{2,3)}$
	25	51.28 ± 3.12	0.81 ± 0.04	0.85 ± 0.04	0.50 ± 0.03

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与黄芪甲苷 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比³⁾ $P < 0.05$;与黄芪甲苷 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相比⁴⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

含量的影响 与正常组相比,模型细胞上清液中 IL-6 和 TNF- α 的含量均增加($P < 0.01$)。与模型组相

比,在 As IV ($100, 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 IL-6, TNF- α 表达均减少($P < 0.05$),且黄芪甲苷 ($25 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot$

L⁻¹) 呈现一定的浓度依赖性保护作用 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 黄芪甲苷对 H₂O₂ 处理 HUVECs 上清液 IL-6 和 TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of As IV on expression of IL-6 and TNF- α in supernate of HUVECs induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-6 / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	211.2 \pm 1.8	10.1 \pm 1.1
模型	-	417.7 \pm 4.3 ¹⁾	30.6 \pm 2.4 ¹⁾
黄芪甲苷	100	230.2 \pm 2.4 ^{2,4)}	14.1 \pm 1.4 ^{2,4)}
	50	301.2 \pm 3.2 ^{2,3)}	21.4 \pm 1.7 ^{2,3)}
	25	391.7 \pm 3.8	27.9 \pm 2.1

4 讨论

内皮细胞损伤是一个复杂的病理过程^[10],而血管内皮细胞功能的损伤是多种心脑血管疾病发生的始动环节^[8]。H₂O₂ 是一种常用的细胞氧化应激诱导剂,广泛用于诱导细胞氧化损伤及细胞凋亡模型^[9]。eNOS 是与 NO 生成有关的关键酶,NO 不仅与血管舒张有关,还能抑制低密度脂蛋白的氧化、血小板聚集、白细胞黏附等^[10],从而对内皮细胞功能起到保护作用。eNOS 在病理状态下会发生解耦联,会转化为生成超氧阴离子,从而加重氧化应激反应,进一步导致 NF- κ B 激活,导致炎症因子 IL-6, TNF- α 表达升高,最终导致内皮细胞功能损伤。研究表明,黄芪甲苷具有抗氧化,抗炎症等作用,但在 H₂O₂ 诱导的内皮细胞损伤模型下的作用尚未见报道,其机制也尚不明确。本实验通过 H₂O₂ 诱导内皮细胞损伤,探讨黄芪甲苷对其的保护作用,并从超氧阴离子(O²⁻)/eNOS 解耦联通路及 NF- κ B 与相关炎症因子方面研究其可能的作用机制。

本实验结果表明,H₂O₂ 能够导致人脐静脉内皮细胞活力明显下降,原因可能是因为产生氧化应激反应,增加了细胞内的超氧阴离子含量,使 NF- κ B p65 的蛋白表达升高,I κ B- α 蛋白表达降低,从而激活下游的炎症因子 IL-6, TNF- α 表达升高,另外 H₂O₂ 首先增加了 eNOS 蛋白表达,但超氧阴离子与其产生的 NO 反应生成过氧亚硝酸(ONOO⁻),其会导致 eNOS 发生解耦联,加重了氧化应激反应。而黄芪甲苷可以通过清除细胞内的超氧阴离子,降低氧化应激反应,降低 NF- κ B p65 表达,升高 I κ B- α 表达,从而减轻炎症反应,另外能够抑制过氧化氢导致的 eNOS 蛋白表达升高,减轻其解耦联导致的氧化应激反应,对内皮细胞起到保护作用。

综上所述,H₂O₂ 可导致 HOVECs 受损,细胞活力降低,而 As IV 对内皮细胞具有直接保护作用,增强细胞活力,减少氧化应激和炎症反应,降低 eNOS 表达从而降低 eNOS 解耦联产生的超氧阴离子,从而改善内皮细胞的功能,且呈浓度依赖性。本实验为黄芪甲苷临床治疗心血管疾病提供了新的理论依据。

[参考文献]

[1] Toya S P, Malik A B. Role of endothelial injury in disease mechanisms and contribution of progenitor cells in mediating endothelial repair [J]. Immunobiology, 2012, 217(5):569-580.

[2] Hu Z, Chen J, Wei Q, et al. Bidirectional actions of hydrogen peroxide on endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and function: co-commitment and interplay of Akt and AMPK [J]. J Biol Chem, 2008, 283(37):25256-25263.

[3] Davel A P, Kawamoto E M, Scavone C, et al. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week; a role for endothelial modulation [J]. Br J Pharmacol, 2006, 148(5):629-639.

[4] 吴发宝,陈希元. 黄芪药理作用研究综述[J]. 中药材, 2004, 27(3):232-234.

[5] Ugusman A, Zakaria Z, Chua K H, et al. Role of rutin on nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells [J]. Scientific World Journal, doi:10.1155/2014/169370.

[6] Che-Hsin Lee, Shin-Da Lee, Hsiu-Chung Ou, et al. Eicosapentaenoic acid protects against palmitic acid-induced endothelial dysfunction via activation of the AMPK/eNOS pathway [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(6):10334-10349.

[7] Miller F J Jr, Gutterman D D, Rios C D, et al. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis [J]. Circ Res, 1998, 82(12):1298-1305.

[8] Delmastro M M, Piganelli J D. Oxidative stress and redox modulation potential in type 1 diabetes [J]. Clin Dev Immunol, doi:10.1155/2011/593863.

[9] 白莉,方伟蓉,孔毅,等. 蛇毒三肽 pENW 对 H₂O₂ 诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(2):43-46.

[10] Naseem K M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases [J]. Mol Aspects Med, 2005, 26(1/2):33-65.

[责任编辑 聂淑琴]