

## 降压宝蓝片含药血清对过氧化氢损伤的人脐静脉内皮细胞的保护作用

梁瑞峰, 李开言, 王晓丽, 王军\*  
(河南省中医药研究院, 郑州 450004)

**[摘要]** 目的:探讨降压宝蓝片含药血清对过氧化氢( $H_2O_2$ )诱导人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)损伤的保护作用。方法:体外培养 HUVECs,分为空白组、模型组、降压宝蓝片含药血清低、中、高浓度组(含量血清体积分数为 5%,10%,15%),显微镜下观察细胞形态,用噻唑蓝(MTT)法检测 HUVECs 活力,微板法检测上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的活性及一氧化氮(NO)的含量,ELISA 法检测内皮素-1(ET-1),组织型纤溶酶原激活物(tPA),组织型纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-1)的含量。结果:与空白组比较,模型组细胞活力显著降低,上清液中 LDH 活性明显增高,ET-1 和 PAI-1 含量显著增加,NO 和 tPA 含量显著下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,降压宝蓝片中、高浓度组细胞活力显著升高,LDH 活性显著减低,ET-1 和 PAI-1 含量显著减少,NO 和 tPA 显著升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论:降压宝蓝片含药血清对  $H_2O_2$  诱导的 HUVECs 损伤具有显著地保护作用。

**[关键词]** 降压宝蓝片; 含药血清; 人脐静脉内皮细胞; 过氧化氢

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0112-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030112

### Protective Effect of Medicated Serum Prepared with Jiangya Baolan Tablets on Human Umbilical Vein Endothelial Cells Injured by Hydrogen Peroxide

LIANG Rui-feng, LI Kai-yan, WANG Xiao-li, WANG Jun\*

(Henan Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of medicated serum prepared with Jiangya Baolan tablets on the human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) injured by hydrogen peroxide. **Method:** HUVECs were cultured *in vitro* and used for experiment. They were divided into five groups as follows: blank group, model group, Jiangya Baolan tablets low dosage group, mid-dosage group and high-dosage group (volume fraction of 5%, 10%, 15% respectively). The morphological change of the cells was observed under microscope. MTT was used to determine the HUVECs viability. The levels of lactate dehydrogenase (LDH), and nitric oxide (NO) in supernatant were measured by the microplate method; the levels of endothelin-1 (ET-1), tissue plasminogen activator (tPA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with the blank group, the model group significantly decreased HUVECs viability, significantly increased the levels of LDH in supernatant, significantly increased ET-1 and PAI-1, and significantly decreased the levels of NO and tPA ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, Jiangya Baolan tablets mid-dosage and high-dosage groups significantly increased HUVECs viability, significantly decreased the levels of LDH, ET-1, PAI-1, and significantly increased the levels of NO and tPA ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Medicated serum prepared with Jiangya Baolan tablets has significant protective effect on HUVECs injured by  $H_2O_2$ .

**[收稿日期]** 20150302(008)

**[基金项目]** 国家中医药管理局重点学科建设项目(国中医药发[2009]30号);国家中医药管理局中医内科学重点学科基础研究课题(1304483)

**[第一作者]** 梁瑞峰, 硕士, 助理研究员, 从事中药药理及中药药性研究, Tel:13523599546, E-mail:hnsxm009@163.com

**[通讯作者]** \*王军, 博士, 研究员, 从事中药心血管药理学研究, Tel:0371-66336964, E-mail:wj13513891329@163.com

[Key words] Jiangya Baolan tablets; medicated serum; human umbilical vein endothelial cells; hydrogen peroxide

血管内皮细胞具有多种生物学功能,它所产生的和分泌的多种生物活性物质具有维持血管张力、调节血压、抗血栓形成等作用。内皮细胞损伤是导致高血压和动脉粥样硬化等心血管疾病的关键因素<sup>[1]</sup>。氧化应激被认为在内皮细胞损伤中起关键作用,因而抗氧化应激对于心血管疾病的治疗具有重要意义<sup>[2]</sup>。降压宝蓝片是河南省中医药研究院附属医院的院内制剂,由大黄、龙胆草、萝芙木、黄芩、黄柏等组成,主要用于肝火亢盛型高血压的治疗,临床疗效确切<sup>[3]</sup>。为阐明降压宝蓝片的作用机制,本研究采用降压宝蓝片含药血清干预过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导损伤的人脐静脉内皮细胞,以探讨该药保护血管内皮损伤的作用及机制,为临床应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物及细胞株** SPF 级 SD 大鼠,雄性,40 只,体重 180 ~ 200 g,购于河南省实验动物中心,合格证号 SCXK(豫)2010-0002。人脐静脉内皮细胞(HUVECs),购于南京凯基生物科技发展有限公司。

**1.2 药物及试剂** 降压宝蓝片(河南省中医药研究院附属医院制剂室提供,批号 20130404),胎牛血清、胰蛋白酶和 1640 培养基均购自美国 Hyclone 公司,噻唑蓝(MTT,美国 Amresco 公司),H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(国药集团化学试剂有限公司,批号 20130309),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号 20140809)和一氧化氮(NO)试剂盒(批号 20140804)均购于南京建成生物公司;内皮素-1(ET-1)试剂盒(批号 V18133092),组织型纤溶酶原激活物(tPA)试剂盒(批号 C16133091),tPA 抑制剂(PAI-1)试剂盒(批号 X19133093)购于武汉华美生物工程有限公司。

**1.3 仪器** ELX800 型多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),Midi40 型细胞培养箱(美国 Forma Scientific 公司),2K15 型冷冻离心机(德国 Sigma 公司),XDS-1B 型倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 含药血清制备** 40 只 SD 大鼠随机分为空白组和降压宝蓝片组,每组 20 只。按体表面积法换算动物的等效剂量,降压宝蓝片组给予降压宝蓝片 0.9 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(等效剂量的 5 倍),空白组给予相同体积的蒸馏水,ig 给药,每天 1 次,连续 7 d,末次给药后 2 h,麻醉,腹主动脉取血,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心

10 min 分离血清,56 ℃ 水浴灭活 30 min,0.22 μm 过滤除菌,-20 ℃ 保存备用。

**2.2 细胞培养及分组** 用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养人脐静脉内皮细胞,待细胞至 80% 融合时,加入 0.25% 胰酶消化,显微镜下见细胞圆缩、间隙增大时,立即加入含 10% 胎牛血清的 1640 培养液终止消化,吹打,制成细胞悬液,接种于 48 或 96 孔板。实验设空白组(体积分数为 15% 的空白血清),模型组(15% 空白血清 + 200 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),降压宝蓝片低浓度组(5% 降压宝蓝片血清 + 10% 空白血清 + 200 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),中浓度组(10% 降压宝蓝片含药血清 + 5% 空白血清 + 200 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)及高浓度组(15% 降压宝蓝片含药血清 + 200 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),每组均设 6 个复孔<sup>[4]</sup>。

**2.3 细胞形态学观察** 将 HUVECs 细胞以 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL 接种于 96 孔板培养 24 h 后,分组干预处理,药物孵育 24 h 后,倒置显微镜下观察 HUVEC 形态改变。

**2.4 MTT 法测定细胞活力** 将 HUVECs 细胞以 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL 接种于 96 孔板,另设 6 孔为阴性组(无细胞),培养 24 h 后,分组处理孵育 20 h 后,每孔加入 5 g·L<sup>-1</sup> MTT 20 μL,继续孵育 4 h,小心吸弃培养液,然后每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μL,避光震荡 10 min,用酶标仪于 570 nm 处测定各孔的吸光度 A 并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{(A_{\text{实验组}} - A_{\text{阴性组}})}{(A_{\text{空白组}} - A_{\text{阴性组}})} \times 100\%$$

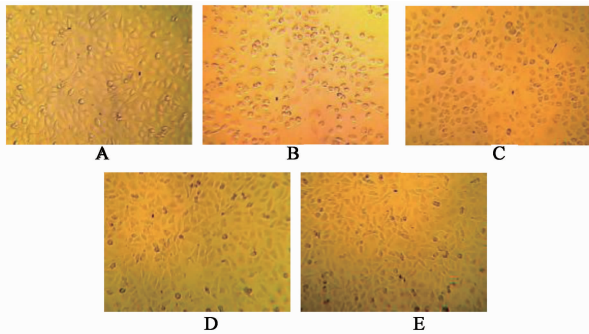
**2.5 培养液中 LDH, NO, ET-1 测定** 细胞以 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL 接种于 48 孔板培养 24 h 后,分组药物孵育 24 h 后,收集上清液,采用微板法检测各组细胞上清液中 LDH 的活性和 NO 的含量,ELISA 法检测各组上清液中 ET-1 的含量。

**2.6 细胞分泌 tPA, PAI-1 含量测定** 细胞以 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL 接种于 48 孔板培养 24 h 后,分组药物处理 24 h 后,收集上清液,采用 ELISA 法检测各组细胞上清液 tPA, PAI-1 的含量。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件对结果进行统计分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对各组细胞形态学的影响** 从细胞形态学观察,空白组人脐静脉内皮细胞生长状态良好,排列紧密,细胞呈梭形或多角形,大小均匀,边界清楚,呈单层铺路石样排列,胞核圆形或椭圆形,位于细胞中央,多核仁,胞浆丰富,内含小颗粒。模型组细胞皱缩变圆,间隙增大,大小分布不均,细胞排列紊乱,形成大片脱失区,失去典型的单层铺路石样形状。与模型组比较,5% 降压宝蓝片含药血清组细胞形态无明显改善,但细胞间隙较小,边界较清,少数细胞呈梭形。10% 和 15% 降压宝蓝片含药血清组细胞形态明显好转,可见大部分细胞呈梭形或多角形,细胞间隙小,细胞间连接较为紧密,呈单层排列。见图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 5% 降压宝蓝片含药血清组; D. 10% 降压宝蓝片含药血清组; E. 15% 降压宝蓝片含药血清组

图 1 降压宝蓝片含药血清对各组细胞形态学的影响 (×100)  
Fig. 1 Effects of medicated serum of Jiangya Baolan tablets on morphology in HUVECs (×100)

表 2 降压宝蓝片含药血清对上清液中 LDH, NO, ET-1 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effects of medicated serum of Jiangya Baolan tablets on LDH, NO and ET-1 content in HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	含药血清/%	LDH/ $U \cdot L^{-1}$	NO/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	ET-1/ $ng \cdot L^{-1}$
空白	-	603.29 ± 69.02	52.69 ± 4.28	46.22 ± 7.70
模型	-	946.71 ± 120.65 <sup>2)</sup>	30.76 ± 2.83 <sup>2)</sup>	72.81 ± 13.84 <sup>2)</sup>
降压宝蓝片含药血清	5	867.11 ± 85.38	33.54 ± 3.03	69.52 ± 11.10
	10	686.84 ± 103.33 <sup>4)</sup>	34.12 ± 2.99	59.80 ± 8.42 <sup>3)</sup>
	15	609.87 ± 103.86 <sup>4)</sup>	35.25 ± 2.79 <sup>3)</sup>	50.51 ± 9.44 <sup>4)</sup>

胞分泌 tPA 含量显著降低, PAI-1 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 降压宝蓝片含药血清高浓度 (体积分数 15%) 可显著提高细胞 tPA 的分泌, 减少 PAI-1 的分泌 ( $P < 0.01$ ), 降压宝蓝片含药血清中浓度 (体积分数 10%) 可显著增加细胞 tPA 的分泌 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

### 4 讨论

血管内皮不仅仅是血液与组织间进行物质交换的屏障, 也是机体最大的旁分泌器官, 分泌和释放多

**3.2 对各组细胞活力的影响** 与空白组比较,  $H_2O_2$  损伤后 HUVECs 存活率显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 降压宝蓝片含药血清中、高浓度组 (体积分数 10%, 15%) 细胞活力显著升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 降压宝蓝片含药血清对各组细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effects of medicated serum of Jiangya Baolan tablets on cell activity in HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	含药血清/%	A	细胞存活率/%
空白	-	0.58 ± 0.09	100.00 ± 9.21
模型	-	0.22 ± 0.04 <sup>2)</sup>	37.98 ± 4.83 <sup>2)</sup>
降压宝蓝片含药血清	5	0.24 ± 0.05	41.97 ± 5.49
	10	0.31 ± 0.05 <sup>3)</sup>	52.59 ± 5.76 <sup>3)</sup>
	15	0.39 ± 0.06 <sup>4)</sup>	67.18 ± 6.46 <sup>4)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~3 同)。

**3.3 对各组细胞上清液中 LDH, NO, ET-1 的影响** 与空白组比较, 模型组细胞培养上清液 LDH 活性, ET-1 含量显著升高, NO 含量显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 降压宝蓝片含药血清中、高浓度组 (体积分数 10%, 15%) 上清液中 LDH 活性, ET-1 含量降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 降压宝蓝片含药血清高浓度组 (体积分数 15%) 上清液 NO 含量显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

**3.4 对人脐静脉内皮细胞分泌 tPA, PAI-1 的影响** 与空白组比较,  $H_2O_2$  损伤后人脐静脉内皮细

种生物活性物质, 起着调节血管张力、防止血栓形成等众多保护作用。血管内皮细胞易受氧化应激、血糖等多种因素的影响而损伤, 细胞因子间的平衡遭到破坏, 导致血管内皮功能障碍, 内皮功能障碍在高血压等心血管疾病的发生和发展中起重要作用<sup>[5-6]</sup>。

活性氧自由基是内皮细胞氧化应激损伤的主要原因,  $H_2O_2$  作为活性氧之一, 可分解成氧自由基, 在细胞外诱导细胞凋亡, 同时促进细胞内羟自由基的产生, 诱导细胞膜脂质过氧化反应, 引起细胞受损而死

表 3 降压宝蓝片含药血清对各组细胞分泌 tPA, PAI-1 的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effects of medicated serum of Jiangya Baolan tablets on tPA and PAI-1 content in HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	含药血清 /%	tPA / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	PAI-1 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	58.39 ± 8.22	43.03 ± 8.73
模型	-	43.58 ± 5.74 <sup>2)</sup>	77.57 ± 7.78 <sup>2)</sup>
降压宝蓝片含药血清	5	46.90 ± 5.70	75.21 ± 15.58
	10	49.52 ± 8.61 <sup>3)</sup>	64.44 ± 14.75
	15	55.46 ± 6.26 <sup>4)</sup>	46.70 ± 11.80 <sup>4)</sup>

亡,因此,本实验以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为刺激因素造成细胞损伤模型<sup>[7]</sup>。MTT 实验是一种检测细胞存活和生长的方法,可以反映活细胞的数量。本实验结果表明,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可诱导人脐静脉内皮细胞凋亡,而降压宝蓝片含药血清具有抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的内皮细胞损伤的作用。

LDH 是胞内酶,漏出量的多少可反映细胞膜的完整性和细胞的损伤死亡程度。ET-1 是内皮细胞释放的强效血管收缩剂,当内皮损伤时,ET-1 合成与释放增加,被认为是血管内皮功能受损的标志物之一。内皮细胞产生的 NO 是重要的血管舒张因子,具有强大的舒张血管、抗血小板聚集黏附、抗炎及抗脂质氧化等作用。ET-1 和 NO 是人体维持正常内皮功能的一对拮抗因子,生理情况下二者相互平衡,这种平衡一旦被打破,即出现内皮功能障碍,进而导致血管病变<sup>[8,9]</sup>,纠正两者的失衡有利于改善血管内皮功能<sup>[10]</sup>。本研究显示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可导致人脐静脉内皮细胞 LDH,ET-1 含量增加,NO 含量降低,表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起内皮细胞氧化损伤,降压宝蓝片含药血清中、高浓度可抑制模型细胞 LDH 的漏出,减少 ET-1 的分泌,提高 NO 的含量,恢复 ET-1 与 NO 之间的平衡。

tPA 和 PAI-1 是人体内纤溶系统的重要组成部分,主要由血管内皮细胞产生,PAI-1 是 tPA 的主要生理性抑制剂,PAI-1 与 t-PA 按 1:1 结合,快速将其灭活<sup>[11]</sup>。PAI-1 与 tPA 是纤溶功能的主要调节者,PAI-1 与 tPA 之间的平衡决定着机体纤溶状态。tPA 含量降低,PAI-1 含量升高会引起纤溶活性降低,机体凝血与溶血间平衡失调,使沉积于血管内皮的纤维蛋白不易溶解,促进血栓形成。大量研究表明,心脑血管疾病的重要特点之一就是 tPA 和 PAI-1 的含量变化<sup>[12]</sup>。本实验表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可导致内皮细胞 tPA 分泌量减少,PAI-1 分泌量增加,降压宝蓝片含药血清中、高浓度可提高模型细胞 tPA 的分泌,降低 PAI-1 的分泌,改善 tPA 和 PAI-1 间的平衡。

综上所述,降压宝蓝片含药血清对活性氧所致血管内皮细胞损伤具有保护作用,此作用与其降低细胞的脂质过氧化程度、恢复 ET-1 与 NO 间的平衡、改善纤溶状态有关。鉴于降压宝蓝片在血管内皮上所具有的保护作用,提示其可能在防治高血压等心血管疾病所伴随的血管内皮功能失调具有良好的应用前景。

[参考文献]

[1] Ribeiro F, Alves A J, Teixeira M, et al. Endothelial function and atherosclerosis: circulatory markers with clinical usefulness [J]. Rev Port Cardiol, 2009, 28 (10):1121-1151.

[2] 陈霁晖,杨宝学,周虹. 心血管疾病中氧化应激与一氧化氮合酶脱耦联[J]. 中国心血管杂志,2012,17 (2):149-151.

[3] 罗继红,苗治国. 降压宝蓝片治疗高血压 120 例[J]. 中医研究,2010,23(4):38-39.

[4] 刘竹青,尹登科,韩岚,等. 桃红四物汤含药血清对过氧化氢损伤的人脐静脉内皮细胞的保护作用[J]. 中国中药杂志,2013,38(3):402-406.

[5] 李丹,李玉洁,杨庆,等. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18 (8):272-276.

[6] 米宁,高允生. 血管内皮细胞的功能与损伤机制的研究进展[J]. 泰山医学院学报,2011,32(10):790-792.

[7] Wang Y K, Hong Y J, Wei M, et al. Curculigoside attenuates human umbilical vein endothelial cell injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132 (1):233-239.

[8] 张蕾,阮君山,严令耕,等. 内皮素和一氧化氮致血管损伤性疾病的分子机制及药物研发策略[J]. 中国药理学通报,2012,28(2):162-165.

[9] Bellien J, Iacob M, Remy-Jouet I, et al. Epoxyeicosatrienoic acids contribute with altered nitric oxide and endothelin-1 pathways to conduit artery endothelial dysfunction in essential hypertension [J]. Circulation, 2012, 125 (10):1266-1275.

[10] 黄斌,王辉,杨涛,等. 补阳还五汤加减对糖尿病并不稳定型心绞痛患者血小板活化和内皮功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):317-321.

[11] Hu X Y, Ma Y H, Wang C, et al. Effects of simvastatin on cigarette smoke extract induced tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 expression in human umbilical vein endothelial cells [J]. Chin Med J, 2009, 122 (19):2380-2385.

[12] 刘靖,孙宁玲. 氯沙坦和阿替洛尔对高血压患者纤溶系统及血浆血管性血友病因子的作用比较[J]. 中华高血压杂志,2007,15(6):501-504.

[责任编辑 周冰冰]