

# 参芎葡萄糖注射液对 $H_2O_2$ 诱导的 HUVEC 细胞氧化损伤的保护作用

杨洋<sup>1</sup>, 刘兰<sup>1</sup>, 王文华<sup>1</sup>, 王永林<sup>1</sup>, 李勇军<sup>1</sup>, 何彬<sup>2</sup>, 孙佳<sup>1</sup>, 郑林<sup>1</sup>, 刘亭<sup>1\*</sup>

(1. 贵州医科大学药学院贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004;

2. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

**[摘要]** **目的:**探讨参芎葡萄糖注射液(Shenxiong glucose injection, SGI)对  $H_2O_2$  诱导的人脐静脉上皮细胞(HUVEC)细胞氧化模型损伤的保护作用及其机制。**方法:**体外培养 HUVEC 人脐静脉内皮细胞,用  $H_2O_2$  ( $130\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理 0.5 h,建立 HUVEC 细胞  $H_2O_2$  氧化损伤模型。SGI 组 HUVEC 细胞用(6%,8%,10%)SGI 预处理 6 h 后,再用  $H_2O_2$  处理 0.5 h。用 MTS 法检测细胞存活率;用 ELISA 法检测乳酸脱氢酶(LDH)漏出量、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力;用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白质免疫印迹(Western blot)技术检测凋亡相关基因及蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的 mRNA 和蛋白表达情况。**结果:**在  $130\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $H_2O_2$  作用细胞 0.5 h 的情况下,细胞存活率降低至 50% 左右,降低的程度合适,且实验结果重复性好,因此后续实验用该条件建立氧化损伤模型。与  $H_2O_2$  组比较,SGI 预处理 6 h 能显著升高细胞存活率( $P < 0.05, P < 0.01$ ),减少 LDH 的外漏和 MDA 的生成( $P < 0.05, P < 0.01$ ),显著增加 SOD, GSH-Px 和 CAT 的活性( $P < 0.05, P < 0.01$ )。RT-PCR 和 Western blot 结果表明,SGI 能显著上调 Bcl-2 的表达( $P < 0.05, P < 0.01$ ),下调 Caspase-3, Bax 的表达( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:**参芎葡萄糖注射液能保护 HUVEC 细胞对抗  $H_2O_2$  诱导的氧化损伤,具有一定的剂量依赖关系,其作用机制可能与抑制细胞凋亡有关。

**[关键词]** 参芎葡萄糖注射液; HUVEC 细胞; 氧化损伤; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)01-0163-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.2017010163

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161027.1509.042.html>

**[网络出版时间]** 2016-10-27 15:09

## Protective Effect of Shenxiong Glucose Injection on $H_2O_2$ -induced Oxidative Damage of HUVEC Cells

YANG Yang<sup>1</sup>, LIU Lan<sup>1</sup>, WANG Wen-hua<sup>1</sup>, WANG Yong-lin<sup>1</sup>, LI Yong-jun<sup>1</sup>,  
HE Bin<sup>2</sup>, SUN Jia<sup>1</sup>, ZHENG Lin<sup>1</sup>, LIU Ting<sup>1\*</sup>

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 2. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect and mechanism of Shenxiong Glucose injection (SGI) on  $H_2O_2$ -induced oxidative damage of HUVEC cells. **Method:** The *in vitro* models of oxidative stress damage based on HUVEC cells were established by treatment with  $H_2O_2$  ( $130\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 0.5 h. SGI

**[收稿日期]** 20151212(006)

**[基金项目]** 贵阳市科技局重大专项([2011401]社 6-2 号);贵州省科技厅重大专项(黔科合重大专项字[2011]6019 号);贵州中药民族药工程技术研究人才基地项目(黔人领发[2013]15 号(8));民族药与中药开发应用产学研基地建设(黔科合 KY 字[2013]122)

**[第一作者]** 杨洋, 硕士, 从事中药药理学研究, Tel: 15761600422, E-mail: 102168747@qq.com

**[通讯作者]** \* 刘亭, 博士, 副教授, 从事中药新药研究, Tel: 14785563829, E-mail: 1586740@qq.com

pretreated group: HUVEC cells were pretreated with SGI (6%, 8%, 10%) for 6 h, and then treated with  $H_2O_2$  for 0.5 h. The cell viability was detected by MTS assay; ELISA method was used to determine lactate dehydrogenase (LDH) release, malondialdehyde (MDA) content as well as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) activities; gene and protein expression levels of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in HUVEC cells were detected by Real-time PCR and Western blot. **Result:** After HUVEC cells were treated with  $H_2O_2$  ( $130 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) for 0.5 h, the survival rate of the cells decreased to about 50% with a proper range and good repeatability, so that oxidative damage models were established under this condition. As compared with the  $H_2O_2$  group, the cells survival was significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) after treatment with SGI for 6 h. SGI not only decreased the release of LDH, MDA ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), but also significantly increased the activities of SOD, GSH-Px, and CAT ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). In addition, Real-time PCR and Western blot showed SGI can significantly up-regulate the expression level of Bcl-2 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) and down-regulate the expression level of Caspase-3, Bax ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Conclusions: SGI could protect the HUVEC cells against  $H_2O_2$ -induced oxidative damage in a certain range. The mechanism of action seemed to be relevant with inhibiting apoptosis.

[**Key words**] Shenxiong glucose injection; HUVEC cell; oxidative damage; apoptosis

随着生活水平的提高及生活方式的改变,心血管系统疾病发病率逐年上升,如何有效地防治心脑血管疾病是当今医学领域的研究热点<sup>[1-3]</sup>。参芎葡萄糖注射液为一种中药单体复方制剂,其主要成分为自中药丹参提取的丹参素和人工合成的盐酸川芎嗪配伍组成的中药注射剂<sup>[4]</sup>,这两种成分均具有抗氧化损伤、清除自由基等作用<sup>[5-6]</sup>;ZHAO 等<sup>[5]</sup>研究显示,丹参素具有抗氧化作用,能清除自由基,其清除能力大于维生素 C;川芎嗪则具有抗血栓、抑制钙超载、减少氧自由基生成的作用<sup>[6]</sup>;临床上主要用于冠心病、心绞痛及其他缺血性心血管疾病的治<sup>[7-9]</sup>;由此依据,以参芎葡萄糖注射液为抗氧化损伤治疗药物,在分子生物水平研究其保护作用及机制。但迄今为止,关于参芎葡萄糖注射液对  $H_2O_2$  诱导人脐静脉上皮细胞(HUVEC)细胞损伤作用相关报道较少,本实验拟建立 HUVEC 细胞  $H_2O_2$  氧化损伤模型,以不同浓度(低、中、高)参芎葡萄糖注射液预处理,然后考察细胞存活率及氧化损伤相关指标,研究该药是否对 HUVEC 细胞有保护作用且呈浓度依赖性;并检测凋亡相关基因及蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的表达情况。因此,探究参芎葡萄糖注射液抗氧化损伤作用及其机制,以便参芎葡萄糖注射液在心血管疾病防治中的作用提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 细胞** HUVEC 人脐静脉上皮细胞株(中科院上海细胞库)。

**1.2 试剂** 参芎葡萄糖注射液(贵州景峰注射剂有限公司,批号 H52020703), $H_2O_2$ (国药集团化学试剂有限公司),1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号分别为 8114031,1227694, J130049);青霉素-链霉素,RIPA 细胞裂解液,磷酸盐缓冲液,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 15140-123,20151019, 20150728);丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),过氧化氢酶(CAT),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20150813,20150813, 20150621,20150621,20150813);MTS(普洛麦格生物技术有限公司),Trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 79402),Estep 总 RNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司,批号 20140801),TransScript™ One-Step 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR) SuperMix(大连宝生物有限公司,批号 RR047A),Bax, Bcl-2, Caspase-3 以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的引物由上海生工公司合成,DEPC 水(上海生工生物工程有限公司),SYBR® Premix Ex Taq™ II(大连宝生物有限公司,批号 RR820A),蛋白质免疫印迹(Western blot)试剂盒高灵敏度化学发光检测试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 AC21141),PVDF 膜(美国 Millipore 公司,批号 K4SA1716L),兔抗 Bcl-2 多抗、兔抗 Bax 多抗、兔抗 Caspase-3 多抗、鼠抗  $\beta$ -actin 单抗、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 和抗鼠 IgG 抗体(巴傲得生物科技有限公司,批号分别为 AA65121, CA36131, CH27141, AB66132,

AB01151, G3114)。

**1.3 仪器** TS100 型倒置显微镜(Nikon 公司),BD FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 BD 公司), Allegra 64R 型冷冻高速离心机(美国 Beckman 公司), Model 680 型酶标仪, PowerPac Basic 型电泳仪, 垂直电泳槽及 ChemiDoc XRS + 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 HUVEC 细胞的培养** 取冻存于液氮中的 HUVEC 细胞,置 37 °C 水浴中迅速解冻。将细胞转移至离心管,加入 4 mL 含 10% FBS 的 1640 完全培养基,充分混合,1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 3 min。沉淀用 5 mL 完全培养基重悬于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的条件下静置培养,6 h 细胞贴壁生长后换液。细胞达到 80% 融合时,用胰蛋白酶消化传代。

**2.2 建立 HUVEC 细胞氧化损伤模型** 取对数生长期的细胞,用完全培养基调整细胞密度至 8 × 10<sup>4</sup> 个/mL,以每孔 100 μL 接种于 96 孔培养板中,于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。24 h 后,设空白组:加入空白 1640 培养基;不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组:分别加入终浓度为 100, 130, 150, 200, 300, 400 μmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 HUVEC 细胞 0.5 h 后,每孔加入 5 μL MTS 溶液孵育 3 h,然后用酶标仪检测 490 nm 波长处吸光度 A,并依据下式计算细胞存活率。每组设置 5 个复孔。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{样品组 A 的平均值}}{\text{对照组 A 的平均值}} \times 100\%$$

**2.3 SGI 预处理对细胞存活率的影响** HUVEC 细胞按 2.2 项方法铺板,培养 24 h 后,设不同体积浓度的 SGI 组,其给药含量为 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 空白组和模型组。各组培养 6 h 后,吸出 SGI 药液,并用 100 μL 1640 培养基洗涤细胞 2 次。给药组和模型组中每孔加入 100 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。孵育 0.5 h 后,各组细胞均加 5 μL MTS 继续孵育 3 h。孵育完毕后于 490 nm 处检测 A。每组设置 5 个复孔,实验重复 3 次。

**2.4 细胞形态观察** 取对数生长期的细胞,调整细胞密度至 8 × 10<sup>4</sup> 个/mL,以每孔 2 mL 接种于 6 孔培养板中,于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。24 h 后,设置低、中、高给药组(6%, 8%, 10%), 空白组和模型组,以 2.3 项方法给药处理细胞;然后在倒置显微镜下观察细胞形态,并照相记录。

**2.5 LDH 活性,MDA 含量及 SOD, GSH-Px, CAT 活力的测定** HUVEC 细胞按 2.2 项方法 96 孔细胞铺

板,SGI 处理后,取培养基上清,按照 LDH 试剂盒说明书检测各组心肌细胞上清液中 LDH 的活性;取对数生长期的 HUVEC 细胞,接种于 6 孔培养板中,培养 24 h 后加 SGI 处理。然后用 600 μL 含 0.5% 细胞裂解液的 PBS 缓冲液裂解细胞。分别取 200, 200, 50, 100 μL 裂解物,用于 MDA, SOD, GSH-Px, CAT 和蛋白质的检测。MDA 含量及 SOD, GSH-Px, CAT 活力和蛋白质含量分别用 MDA, SOD, GSH-Px, CAT 和 BCA 试剂盒检测,按照说明书进行操作。

**2.6 HUVEC 细胞 mRNA 水平的测定** 取 2.0 μg RNA 按照 Mix 说明书进行逆转录反应。通过特异性引物对 HUVEC 细胞中的 Bcl-2, Bax, Caspase-3 和内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)进行扩增,基因引物序列: GAPDH 上游 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3', 下游 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAAGCTT-3'; Bcl-2 上游 5'-GTACCTGAACCGGCATCTG-3', 下游 5'-GGGGCCATATAGTTCCACAA-3'; Bax 上游 5'-CGAGCTGATCAGAACCATCA-3', 下游 5'-GGGGTCCCGAAGTAGGAA-3'; Caspase-3 上游 5'-CATGGCCCTGAAATACGAAGTC-3'; 下游 5'-GCAGGCCTGAATGATGAAGAGTTT-3'。20 μL 荧光定量 PCR 反应体系包括:2.0 μL 逆转录反应产物,上下游引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各 0.8 μL, Premix 10 μL。在 CFX96 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪上进行反应,PCR 扩增程序为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 共 40 个循环,循环结束后绘制溶解曲线。每次扩增均设置 GAPDH 内参照,用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 方法分析数据。

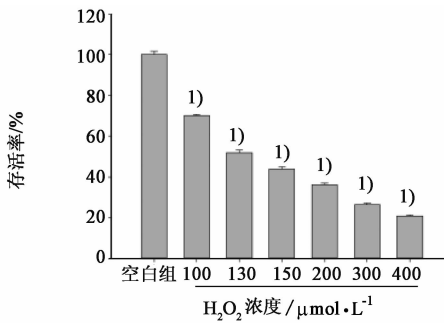
**2.7 HUVEC 细胞 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白的测定** 取对数生长期的 HUVEC 细胞,接种于 100 mm 培养皿中,培养 24 h,加 SGI 预处理;然后用预冷的 PBS 洗涤 3 次, RIPA 裂解液冰上裂解细胞 30 min, 每 10 min 用枪头吹打皿使细胞裂解完全,最后于 13 000 × g 离心 5 min 取上清液,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取等量总蛋白上样, SDS-PAGE 分离后,将蛋白转印至 PVDF 膜。用 5% 的 BSA 封闭 2 h,加入相应一抗,室温孵育 3 h。TBST 洗膜 3 次后,用相应二抗室温孵育 2 h。用 TBST 洗涤 3 次后, ECL 显色。ChemiDoc XRS + 系统成像, Quantity One 软件灰度分析。

**2.8 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件处理,实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间采用单因素方差分析比较,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HUVEC 细胞存活率的影响

高浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可引起 HUVEC 细胞氧化应激损伤并降低 HUVEC 细胞的存活率。实验结果显示 100 ~ 400 μmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 HUVEC 细胞 0.5 h 后,可浓度依赖性地降低细胞存活率。130 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能使 HUVEC 细胞的存活率降低 45% ~ 50% ( $P < 0.01$ ),细胞存活率降低程度适中,实验结果重复性好,因此选择 130 μmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 来建立氧化应激损伤模型。见图 1。



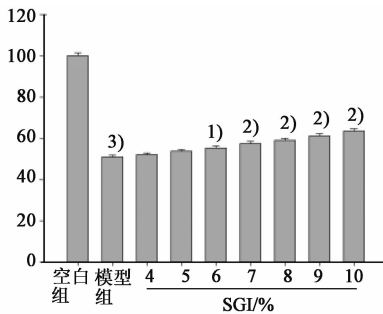
与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$

图 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HUVEC 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 1 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on survival of HUVEC cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

#### 3.2 SGI 预处理对氧化损伤细胞存活率的影响

与模型组比较,4% ~ 10% SGI 预处理后,细胞存活率显著上升 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。由于在 6% ~ 10% 的浓度下,细胞存活率有显著性回升,对细胞存活率呈浓度依赖性,说明具有一定的保护作用,故 SGI 给药组低、中、高剂量分别为 6%, 8%, 10%。见图 2。



与空白组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05, ^2) P < 0.01$

图 2 SGI 预培养对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVEC 细胞氧化损伤的保护作用影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 2 Protective effect of SGI on HUVEC cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

#### 3.3 SGI 预处理对 MDA 含量及上清液中 LDH 活性的影响

与空白组比较,130 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 HUVEC 细胞 0.5 h 后,胞内脂质过氧化产物 MDA 含量及细胞上清液中 LDH 活性显著增加 ( $P <$

0.01); 与模型组比较,而 SGI 低、中、高浓度能明显降低胞内 MDA 的含量及上清液中 LDH 活性 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 SGI 预处理对氧化损伤 HUVEC 细胞中 MDA 含量及上清液中 LDH 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Effect of SGI pretreatment on contents of MDA and LDH activity in HUVEC cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	体积浓度 / %	MDA / μmol·g <sup>-1</sup>	LDH / U·L <sup>-1</sup>
空白	-	2.86 ± 0.28 <sup>2)</sup>	22.58 ± 2.74 <sup>2)</sup>
模型	-	5.67 ± 0.29	78.16 ± 5.052
SGI	6	4.82 ± 0.18 <sup>1)</sup>	47.58 ± 2.74 <sup>1)</sup>
	8	4.03 ± 0.32 <sup>2)</sup>	38.54 ± 2.30 <sup>2)</sup>
	10	3.44 ± 0.23 <sup>2)</sup>	31.95 ± 1.78 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05, ^2) P < 0.01$  (表 2, 3 同)。

#### 3.4 SGI 预处理对 HUVEC 细胞内 SOD, GSH-Px, CAT 活力的影响

与空白组比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 0.5 h 后, SOD, GSH-Px, CAT 的活性显著性降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, SGI 低、中、高浓度能不同程度的升高胞浆内 SOD, GSH-Px, CAT 的活力 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 SGI 预处理对氧化损伤 HUVEC 细胞中 SOD, GSH-Px, CAT 活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of SGI pretreatment on activities of SOD, SGH-Px, CAT in HUVEC cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	体积浓度 / %	SOD / U·mL <sup>-1</sup>	GSH-Px / U·mg <sup>-1</sup>	CAT / U·mL <sup>-1</sup>
空白	-	22.13 ± 0.74 <sup>2)</sup>	84.68 ± 4.33 <sup>2)</sup>	37.69 ± 1.51 <sup>2)</sup>
模型	-	6.43 ± 0.85	43.92 ± 3.782	21.23 ± 2.022
SGI	6	9.05 ± 0.64 <sup>2)</sup>	50.75 ± 2.54 <sup>2)</sup>	24.25 ± 1.82 <sup>2)</sup>
	8	12.54 ± 0.58 <sup>2)</sup>	61.51 ± 3.22 <sup>2)</sup>	27.50 ± 1.89 <sup>2)</sup>
	10	15.82 ± 0.58 <sup>2)</sup>	70.47 ± 3.67 <sup>2)</sup>	30.81 ± 1.40 <sup>2)</sup>

#### 3.5 SGI 预处理对 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达的影响

与空白组比较, HUVEC 细胞经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 0.5 h 后, 模型组细胞 Bax, Caspase-3 mRNA 水平的表达明显升高, Bcl-2 mRNA 水平的表达明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 经 SGI 低、中、高浓度组预处理后, Bax, Caspase-3 mRNA 水平的表达都有不同程度的降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 而 Bcl-2 mRNA 水平的表达明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与 SGI 对 HUVEC 细胞的保护作用趋势一致。见表 3。

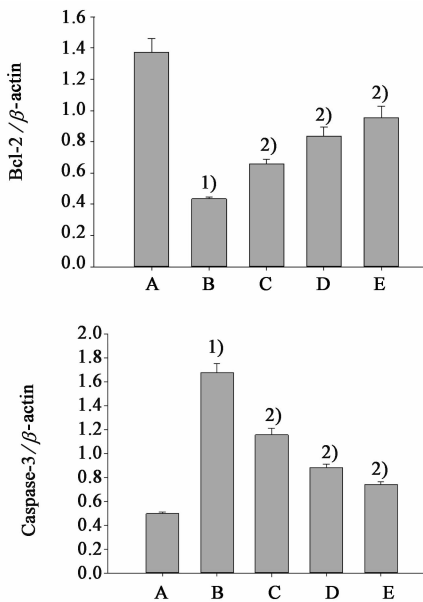
#### 3.6 SGI 预处理对 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

与空白组比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组 Bcl-2 蛋白的表达显著降低, Bax, Caspase-3 蛋白的表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, SGI 预处理后, HUVEC 细胞中 Bcl-2 蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而 SGI 组的 Caspase-3, Bax 蛋白表达量

表 3 SGI 对 HUVEC 细胞 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of SGI on Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 mRNA expression of HUVEC cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	体积浓度 /%	Bax mRNA	Bcl-2 mRNA	Caspase-3 mRNA
空白	-	1.000 ± 0.058 <sup>2)</sup>	1.000 ± 0.062 <sup>2)</sup>	1.000 ± 0.131 <sup>2)</sup>
模型	-	3.117 ± 0.126	0.470 ± 0.092	3.583 ± 0.171
SGI	6	2.583 ± 0.122 <sup>1)</sup>	0.567 ± 0.038 <sup>1)</sup>	2.927 ± 0.049 <sup>1)</sup>
	8	2.118 ± 0.158 <sup>2)</sup>	0.670 ± 0.025 <sup>2)</sup>	2.330 ± 0.123 <sup>2)</sup>
	10	1.841 ± 0.203 <sup>2)</sup>	0.771 ± 0.026 <sup>2)</sup>	1.932 ± 0.087 <sup>2)</sup>



A. 空白组; B. 模型组; C. SGI 6% 组; D. SGI 8% 组; E. SGI 10% 组。与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$

图 3 SGI 对 HUVEC 细胞 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of SGI on Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 protein expression of HUVEC cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

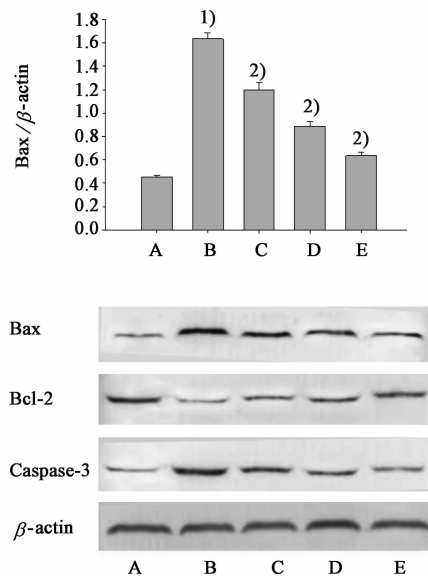
合成,其数量和效果非常有限,且存在一定的毒性、致畸性和潜在致癌性。因此,筛选有效、无毒的自由基清除剂来逐渐取代这些化学合成的抗氧化剂具有重大的现实意义<sup>[12]</sup>。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可直接作用于细胞膜脂质,造成脂质过氧化反应造成细胞膜的损伤,细胞活力值 (MTS 法) 明显降低 (49.36%), 细胞上清液中 MDA 含量和 LDH 活性明显增加; 其中 MDA 含量的高低可以反映脂质过氧化反映的严重程度, 细胞活力值的大小, LDH 活性的高低是反映细胞受损伤程度的非常灵敏的指标; SOD 是体内重要的氧自由基消除剂, 消除 O<sup>2·-</sup> 对体内脂质、蛋白质、糖等代谢的影响及其对细胞的损伤, 使机体免受损害<sup>[14]</sup>。通常情况下, 内源性抗氧化物酶 (SOD, CAT, GSH-Px) 是防止氧化应激产生损伤的第一道防线, 其抗氧化物酶通过清除过量的 ROS 使机体处于平衡状态<sup>[15]</sup>。本实验对

显著降低 ( $P < 0.01$ )。见图 3。

#### 4 讨论

血管内皮细胞覆盖于血管内膜表面直接与循环血液接触, 很容易受到血液中活性物质, 特别是自由基以及脂质过氧化产物的影响; 内皮细胞功能损伤是多种血管性疾病发病的关键环节<sup>[10]</sup>。造成血管内皮细胞损伤的因素有很多, 其中氧化应激是造成血管内皮损伤的较为重要的因素之一<sup>[11]</sup>, 采取抗氧化应激来保护血管内皮细胞功能, 是防治血管性疾病的着力点之一; 现阶段的抗氧化药物大多为化学



HUVEC 细胞内 SOD, CAT, GSH-Px 的活力进行了检测, 实验结果表明, 130 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 0.5 h 后, HUVEC 细胞内 SOD, GSH-Px, CAT 的活性明显下降, 说明 HUVEC 细胞内清除 ROS 的能力受到显著抑制。低、中、高浓度的 SGI 预处理后, 损伤的 HUVEC 细胞内 SOD, CAT, GSH-Px 的活性明显升高并呈浓度依赖性, 表明 SGI 能够明显的对抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对细胞内 SOD, CAT, GSH-Px 活性的抑制, 提高细胞清除 ROS 的能力。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导内皮细胞凋亡可通过线粒体、细胞色素 C 途径。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可以渗入细胞膜内, 直接破坏线粒体, 促进细胞色素 C 的释放, 激活 Caspase 级联<sup>[16]</sup>。研究表明, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 通过 Fenton 等反应产生大量的羟自由基 (·OH), 使抗凋亡基因 Bcl-2 下调, 降低 HUVEC 抗氧化能力, 从而导致氧化损伤和细胞凋亡<sup>[17]</sup>。氧化应激等刺激因子能使线粒体膜完整性

受到破坏,导致凋亡诱导因子释放到细胞质,引起 Caspase-9 的活化,激活 Caspase-3 执行通路,引发细胞凋亡<sup>[18]</sup>。Bcl-2 家族中的 Bax 蛋白能转位到线粒体表面,增加线粒体通透性,导致促凋亡物质从线粒体释放到胞质中;而 Bcl-2 可与 Bax 形成异二聚体,阻止 Bax 转移到线粒体上,从而拮抗 Bax 的促凋亡作用<sup>[19]</sup>。实验结果发现,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组细胞的 Bcl-2 蛋白表达下调,Bax 和 Caspase-3 蛋白表达上调,这些指标说明线粒体凋亡途径被活化。而在低、中、高浓度的 SGI 作用下,上述指标得到了逆转,且蛋白的表达呈浓度依赖性。这表明 SGI 可通过抑制线粒体凋亡途径的激活,来拮抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HUVEC 细胞的损伤。

为了探究 SGI 对 HUVEC 细胞氧化损伤的保护作用机制,进一步用 Real-time PCR 检测了 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 mRNA 的表达情况。以 Eastep 总 RNA 提取试剂盒进行 RNA 纯化的提取方案;然而,Trizol 可有效抑制 RNA 酶活性,确保 RNA 样品的完整性,Eastep 总 RNA 提取试剂盒可在纯化柱上进行基因组 DNA 消化,消除了基因组 DNA 对实验结果的影响,并且也简化了实验步骤。用该方案提取到的 RNA,完整性和纯度均符合 Real-time PCR 的要求,且具有较高的重复性。结果表明,SGI 可明显下调 Caspase-3 和 Bax 的 mRNA 水平,上调 Bcl-2 的 mRNA 水平,且在低、中、高体积浓度的 SGI 预处理下呈浓度依赖性,这一结果与 SGI 拮抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HUVEC 细胞氧化损伤的蛋白表达情况相符,为研究 SGI 的保护作用机制提供了深层次的依据。

综上所述,利用了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 细胞氧化损伤模型考察 SGI 的抗氧化损伤作用。结果表明,SGI 可抗氧化损伤的作用,其机制可能是通过提高 HUVEC 细胞内 SOD, CAT, GSH-Px 的活性,清除自由基防止细胞氧化损伤;调节 Bcl-2, Bax, Caspase-3 蛋白和基因的表达,维持细胞膜和线粒体的完整性,从而抑制细胞凋亡。因实验内容缺乏体内实验的论证,结果具有一定的局限性,但实验结果为参芎葡萄糖注射液的进一步开发提供了理论基础。

#### [参考文献]

[1] 谭初兵,杜冠华. 心血管疾病药物治疗的现状与进展[J]. 中国医药导刊,2006,8(5):318-319.  
[2] 姚卫. 高血压与心脑血管疾病研究综述[J]. 中外医疗,2010,29(14):184-186.  
[3] 史奎雄. 单不饱和脂肪酸与心脑血管疾病[J]. 营养健康新观察,2003,20:13-15.

[4] 国家药典委员会. 卫生部药品标准. 第十二册[M]. 北京:化学工业出版社,2002:118.  
[5] ZHAO G R, ZHANG H M, YE T X, et al. Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B [J]. Food Chem Toxicol,2008,46(1):73-81.  
[6] 江美芳. 川芎嗪注射液的临床应用进展[J]. 中国现代药物运用,2008,2(9):109-110.  
[7] 刘旭,郭胜. 参芎葡萄糖注射液治疗冠心病心肌缺血临床观察[J]. 中国中医急症,2008,17(7):903-904.  
[8] 黄舒鹏,黄文辉. 参芎葡萄糖注射液治疗无症状心肌缺血的临床研究[J]. 中国血液流变学杂志,2008,7(7):89-89.  
[9] 金明,周忠光. 参芎葡萄糖注射液治疗不稳定型心绞痛 38 例[J]. 中医医学报,2008,36(5):54-55.  
[10] Nakayama M, Nakamura J, Hamada Y, et al. Aldose reductase inhibition ameliorates pupillary light reflex and F-wave latency in patients with mild diabetic neuropathy [J]. Diabetes Care, 2001, 4(6):1093-1098.  
[11] Kalichman M W, Dines K C, Bobik M, et al. Nerve conduction velocity, laser doppler flow, and axonal caliber in galactose and streptozocin [J]. Brain Res, 1998, 810(1/2):130-137.  
[12] 曹致超,周晓霞,庞树华,等. 黄芩茎叶总黄酮对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用及其机制[J]. 实用临川医药杂志,2013,17(13):1-3.  
[13] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats [J]. Lab Invest,1996, 74: 86-107.  
[14] 边金铎,邓同乐. 丹参素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的内皮细胞氧化损伤的保护作用研究[J]. 上海中医药大学学报,2015,26(3):62-64.  
[15] HE H B, XU J, XU Y Q, et al. Cardioprotective effects of saponins from Panax japonicus on acute myocardial ischemia against oxidative stress-triggered damage and cardiac cell death in rats [J]. J Ethnopharmacol,2012, 140(1):73-82.  
[16] FAN L H, DANG X Q, SHI Z B, et al. Hydroxysafflor yellow A protects PC12 cells against the apoptosis induced by oxygen and glucose deprivation [J]. Cell Mol Neurobiol,2011, 31(8):1187-1194.  
[17] Harris M H, Thompson C B. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability [J]. Cell Death Differ, 2000, 7(12):1182-1191.

[责任编辑 周冰冰]