

菟丝子总黄酮对过氧化氢损伤的血管内皮细胞的保护作用

刘海云, 崔艳茹, 伍庆华, 王晓敏*
(江西中医药大学, 南昌 330029)

[摘要] **目的:**探讨菟丝子总黄酮对 H_2O_2 损伤的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的保护作用。**方法:**于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 空气饱和湿度的培养箱内体外培养内皮细胞, 将细胞分为 4 组, 即正常对照组; 加入 DMEM 培养液 (pH 7.2~7.4)、菟丝子对照组 (菟丝子 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、模型组 (过氧化氢终浓度为 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、菟丝子 + 过氧化氢组 (菟丝子 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 过氧化氢 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 研究菟丝子总黄酮对受损血管内皮细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量、乳酸脱氢酶(LDH)释放情况、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及对细胞形态学的影响。**结果:**菟丝子总黄酮($0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)能明显减轻 H_2O_2 对 HUVECs 所致的氧化损伤, 可明显改善氧化损伤的 HUVECs 形态学变化, H_2O_2 模型组($200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)与空白组比较, LDH 释放和 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), SOD 释放水平和 GSH-Px 活力显著下降 ($P < 0.01$), 菟丝子($0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) + H_2O_2 ($200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)组与 H_2O_2 模型组($200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)比较, LDH 释放和 MDA 含量显著下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), SOD 释放水平和 GSH-Px 活力显著升高 ($P < 0.01$)。**结论:**菟丝子总黄酮对 H_2O_2 诱导的 HUVECs 的损伤具有保护作用。

[关键词] 菟丝子总黄酮; 过氧化氢; 人脐静脉内皮细胞; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 谷胱甘肽过氧化物酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0215-04

[doi] 10.11653/syfy2013180215

Protective Effects of Flavonoids Extracted from Cuscutae Semen on Human Umbilical Vein Endothelial Cells Injured by H_2O_2

LIU Hai-yun, CUI Yan-ru, WU Qing-hua, WANG Xiao-min*
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effects of flavonoids extracted from Cuscutae Semen (FCS) on human umbilical vein endothelial cells injured by H_2O_2 . **Method:** Vein endothelial cells were cultured *in vitro* and divided into four groups which was normal control, FCS control, model, FCS + H_2O_2 respectively. We tested the influence of FCS on the endothelial cells oxidative damage induced by H_2O_2 the indexes of superoxide dismutase (SOD), malonyldiadehyde (MDA), lactate dehydrogenase (LDH), glutathione peroxidase (GSH-Px) and apoptosis were measured. **Result:** FCS could remarkable lessen oxidative damage of endothelial cell induced by H_2O_2 , compared with normal control groups, the levels of LDH and MDA in model group remarkably increased and the activity of SOD and GSH-Px obviously decreased; while the groups pretreated by FCS, compared with model group, the levels of LDH and MDA obviously decreased and the activity of SOD and GSH-Px increased. **Conclusion:** FCS has protective effects on human umbilical vein endothelial cells injured by H_2O_2 .

[Key words] flavonoids extracted from the Cuscutae Semen; H_2O_2 ; HUVECs; SOD; MDA; GSH-Px

血管内皮细胞不仅是血液和组织液之间进行物质交换的屏障,也是人体最大的旁分泌器官,释放和

[收稿日期] 20130414(005)

[基金项目] 江西省教育厅青年科学基金项目(GJJ12541);江西省卫生厅中医药科研基金项目(2011A137);江西省自然科学基金项目(2008GZY0018);江西中医学院校级课题项目(2012ZR046)

[第一作者] 刘海云, 硕士, 讲师, 从事中医药生殖内分泌与心血管的研究, Tel:0791-87118930, E-mail: liuhaiyun98175@163.com

[通讯作者] * 王晓敏, 博士, 副教授, 从事中医药与心血管的研究工作, Tel:0791-87118927, E-mail: wangxm2001@163.com

分泌多种生物活性物质^[1],与血管生理学的许多方面(如血管舒张、血管再生、炎症和屏障功能等)密切相关,内皮细胞损伤是导致动脉粥样硬化和高血压的关键因素^[2]。氧化应激被认为是导致内皮细胞损伤的主要病理因素^[3-4],因而寻找具有抗氧化应激作用的药物对于治疗心血管疾病具有重要的临床意义。菟丝子是旋花科植物菟丝子或大菟丝子的成熟种子,为温补肾阳的中药,黄酮是其重要成分,药理研究表明菟丝子总黄酮对正常雌性、雄性大鼠生殖内分泌都有作用^[5],并发现菟丝子总黄酮具有维持早孕的作用^[6]和调整脂质代谢紊乱、促进老年血管平滑肌细胞凋亡^[7]等方面有重要作用,但菟丝子总黄酮在人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中的研究尚未见报道。过氧化氢(H₂O₂)是主要的活性氧,它可诱导内皮细胞凋亡,甚至死亡。本实验用体外细胞培养方法,采用 H₂O₂ 诱导 HUVECs 损伤模型,研究菟丝子总黄酮对氧化损伤内皮细胞的乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)与谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活力及对细胞形态学的影响,并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 仪器 TECAN 酶标仪 sunrise(奥地利 TECAN 公司)、倒置显微镜(日本 Olympus 公司)、微量进样器(德国 Eppendorf 公司)、Adventurer™ 电子天平(奥豪斯国际贸易有限公司)、恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司),723 型分光光度计(上海第三分析仪器厂),Sn-695B 型免疫计数器(上海核所日环光电仪器有限公司)JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试剂 HUVECs(武汉细胞保藏中心),过氧化氢终浓度 200 mmol·L⁻¹(本实验室提供),二甲基亚砜(DMSO),四甲基偶氮唑盐(MTT),碘化丙啶(PI)均购自 Aldrich-Sigma 公司,SOD 测定试剂盒(批号 20090121)、MDA 测定试剂盒(批号 20090217)、GSH-Px 测定试剂盒(批号 20090214),LDH 测定试剂盒(批号 20090213)均购于南京建成生物公司,DMEM/F12 培养基(GIBCO 公司),小牛血清(杭州四季青试剂公司)。

2 方法

2.1 菟丝子总黄酮的制备 菟丝子经本院中药鉴定教研室鉴定为 *Cuscuta chinensis* Lam. 的成熟种子,经溶剂提取,聚酰胺柱分离得黄酮提取物。

2.2 HUVECs 的培养 取生长状态良好的细胞,吹下的细胞悬液低速离心浓缩,用少量培养液悬浮细

胞,加入 2 倍体积胎牛血清和 1/10 体积的 DMSO 混匀,-20 ℃ 冻存 2 h 转入 -70 ℃ 过夜,然后保存于液氮罐中。HUVECs 冻存复苏后,用含 15% 新生小牛血清、青霉素(100 U·L⁻¹)和链霉素(100 U·L⁻¹)的 1640 培养液,于 37 ℃,5% CO₂,95% 空气饱和湿度的培养箱内培养,每隔 3 天传代 1 次。

2.3 菟丝子黄酮对 HUVECs 增殖活性的直接影响 分组:空白对照组,于含 5% 小牛血清的 1640 培养液中继续培养 24 h;菟丝子黄酮不同剂量组:终质量浓度分别为 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg·L⁻¹。每组 6 个样本,培养 24 h 后进行 MTT 检测。

2.4 分组 实验共分 4 组:正常对照组:加入 DMEM 培养液(pH 7.2~7.4);菟丝子对照组(菟丝子 0.5 mg·L⁻¹);模型组(过氧化氢为 200 mmol·L⁻¹);菟丝子+过氧化氢组(菟丝子 0.5 mg·L⁻¹,过氧化氢 200 mmol·L⁻¹)。

2.5 血管内皮细胞内 LDH 的测定 取传代培养的血管内皮细胞,用 0.125% 的胰蛋白酶消化液消化细胞,制成细胞计数达 1 × 10⁵/mL 的细胞悬液,按每孔 600 μL 接种于 24 孔板,每组 5 个平行孔,待细胞基本融合后(12 h),换成无血清的 DMEM 培养液(pH 7.2~7.4),同时给药组按上述要求加入相应浓度的菟丝子总黄酮进行预处理,培养 24 h 后,选择上述加入菟丝子总黄酮一组加入含 H₂O₂(终浓度为 200 mmol·L⁻¹)的培养基,继续培养 12 h 后终止培养。然后取上清液,按乳酸脱氢酶试剂盒要求的方法进行操作,于 440 nm 处测定其吸光度(A),并计算各组细胞的 LDH。

$$\text{LDH} = (\text{测定管 } A - \text{测定空白管 } A) / (\text{标准管 } A - \text{对照空白管 } A) \times \text{对照管浓度} \times 1\,000 \text{ mL} \times \text{样本测试前稀释倍数}$$

2.6 血管内皮细胞内 SOD 活性的测定 分组及处理方法同上,继续培养 12 h 后终止培养。弃掉上清液,用胰酶消化细胞,用 PBS 充分冲洗细胞后,用 0.1% 的 PBS(pH 7.2~7.4)制成细胞悬液,进行计数,将其配制成细胞数为 2 × 10⁶/mL 的细胞悬液,取细胞悬液,用 JY92-II 超声波细胞粉碎机将细胞震碎,采用黄嘌呤氧化酶法,按试剂盒所述方法测定细胞内的 SOD 活性。于 550 nm 处测定其 A,并按下述公式计算其活力。

$$\text{SOD 活力} = (\text{对照管 } A - \text{测定管 } A) / \text{对照管 } A \times \text{反应液总体积} / \text{取样量}$$

2.7 血管内皮细胞内 MDA 含量的测定 细胞接种于 24 孔板,分组及处理方法同 2.4。取 600 μL 各

组细胞上清液,按试剂盒所述方法测定,并按下述公式计算MDA的含量:

$$\text{MDA 含量} = (\text{测定管 } A - \text{测定空白管 } A) / (\text{标准管 } A - \text{标准空白管 } A) \times \text{对照品浓度} \times \text{样本测试前稀释倍数}$$

2.8 血管内皮细胞内 GSH-Px 含量的测定 细胞接种于 24 孔板,分组及处理方法同 2.4。取 600 μL 各组细胞上清液,按试剂盒所述方法测定。

2.9 血管内皮细胞形态学变化 显微镜下观察细胞生长状态及细胞形状。

2.10 统计处理 各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 15.0 软件包处理,多个均数间比较采用方差分析,然后进行两两比较的 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 HUVECs 增殖活性的影响 菟丝子总黄酮 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 A 大于空白对照组 ($P < 0.05$),而 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 A 小于空白对照组 ($P < 0.01$)。菟丝子总黄酮促进内皮细胞的增殖活性在 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组效果最明显。但随着浓度继续增高此作用下降,当质量浓度达 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时反而抑制细胞的增殖活性。见表 1。

表 1 菟丝子总黄酮对 HUVECs 增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活性/A
空白对照	-	0.43 \pm 0.03
菟丝子总黄酮	0.1	0.49 \pm 0.04
	0.5	0.52 \pm 0.05 ¹⁾
	1.0	0.44 \pm 0.04
	5.0	0.19 \pm 0.08 ²⁾
	10.0	0.09 \pm 0.07 ²⁾

注:与空白对照组相比¹⁾ $P < 0.05$;与菟丝子总黄酮 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 H_2O_2 损伤的 HUVECs 释放 LDH 和 SOD 活性的影响 与正常对照组相比, H_2O_2 模型组血管内皮细胞内 SOD 活力明显降低 ($P < 0.01$),LDH 释放明显升高 ($P < 0.01$),说明 H_2O_2 能够抑制血管内皮细胞内 SOD 活力,促进 LDH 释放;与模型组比较,菟丝子总黄酮 + H_2O_2 组的血管内皮细胞内 SOD 活力明显升高 ($P < 0.01$),LDH 释放明显降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 对 H_2O_2 损伤的 HUVECs 的 MDA 含量和 GSH-Px 活性的影响 与正常对照组相比,模型组细胞内 MDA 的含量明显升高 ($P < 0.05$),GSH-Px 活力明显降低 ($P < 0.01$);而在加入菟丝子总黄酮后,

表 2 菟丝子总黄酮对 H_2O_2 损伤的 HUVECs 释放的 LDH 含量和 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	药物浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	LDH/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
正常对照	-	3.20 \pm 1.05	0.45 \pm 0.03
菟丝子总黄酮	0.5	3.92 \pm 0.53 ²⁾	0.44 \pm 0.24 ²⁾
模型组 ³⁾	-	7.36 \pm 1.16 ¹⁾	0.39 \pm 0.02 ¹⁾
模型组 + 菟丝子 ³⁾	0.5	4.51 \pm 0.63 ²⁾	0.43 \pm 0.12 ²⁾

注:与对照组相比¹⁾ $P < 0.01$;与 H_2O_2 模型组相比²⁾ $P < 0.01$,³⁾ 过氧化氢 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

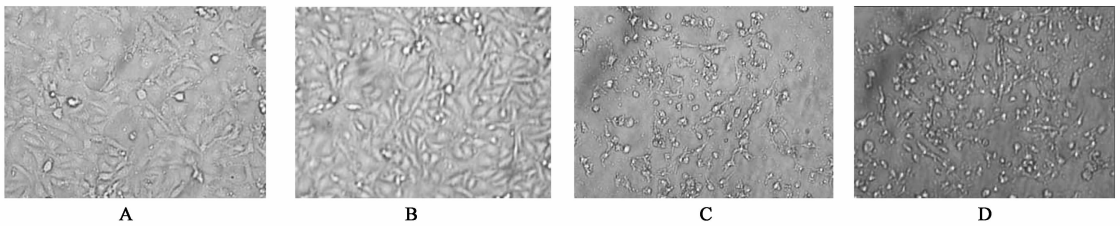
内皮细胞内 MDA 含量较模型组明显降低 ($P < 0.05$),GSH-Px 活力明显升高 ($P < 0.01$)。实验结果提示:血管内皮细胞经 H_2O_2 氧化损伤后,MDA 的生成量显著性的增加,GSH-Px 活力明显降低;而加入菟丝子总黄酮后,能明显抑制血管内皮细胞由于过氧化损伤导致的脂质过氧化产物 MDA 的生成,显著提高细胞内 GSH-Px 的活力,明显减轻过氧化氢对血管内皮细胞的过氧化性损伤。见表 3。

表 3 菟丝子总黄酮对 H_2O_2 损伤的 HUVECs 的 MDA 含量和 GSH-Px 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$	GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
正常对照	-	1.02 \pm 0.15	157.1 \pm 5.2
菟丝子总黄酮	0.5	0.98 \pm 0.50 ^{1,3)}	154.2 \pm 4.2
模型组 ⁵⁾	-	1.44 \pm 0.16 ¹⁾	42.3 \pm 5.6 ²⁾
模型组 + 菟丝子 ⁵⁾	0.5	1.19 \pm 0.04 ^{1,3)}	123.7 \pm 3.6 ⁴⁾

注:与正常对照组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$,⁵⁾ H_2O_2 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.4 对 H_2O_2 损伤的 HUVECs 的形态学变化 光学显微镜下正常对照组:人脐静脉内皮细胞为建系的细胞株,细胞增殖旺盛。细胞贴壁生长,细胞为多角形,呈“铺路石”样镶嵌排列,无重叠生长现象。菟丝子 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 该组细胞与正常对照组相比,细胞形态无明显区别,但细胞密度稍有增加,有轻微重叠生长现象。 H_2O_2 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞在含 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 的无血清培养基中培养 24 h 后,细胞变圆形或卵圆形,体积变小,与周围细胞分离,甚至出现大片脱落,细胞密度减少。 H_2O_2 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ + 菟丝子 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组与模型组细胞相比,呈多角形的细胞比例增加,变圆形和卵圆形的细胞比例减少,细胞脱落程度有所减轻,细胞密度增加。见图 1。



A. 正常对照组; B. 菟丝子 0.5 mg·L⁻¹组; C. H₂O₂ 200 mmol·L⁻¹组; D. H₂O₂ 200 mmol·L⁻¹ + 菟丝子 0.5 mg·L⁻¹组

图 1 菟丝子总黄酮对 H₂O₂ 损伤的 HUVECs 的形态学变化 (×100)

4 讨论

LDH 是细胞损伤的重要标志之一。LDH 是一种细胞内的糖酵解酶,广泛存在于细胞浆内,当细胞破坏或细胞膜通透性增加时,因此细胞内 LDH 漏出增加,LDH 水平明显增高,可反映细胞或细胞膜损伤的程度^[8]。若进一步加重,可导致细胞代谢功能减退直至死亡。本实验结果显示,过氧化氢可以使血管内皮细胞释放 LDH 增加,说明血管内皮细胞受到氧自由基的攻击后,细胞膜受到损伤,细胞内 LDH 释放增加,细胞活性显著下降。当加入过氧化氢再加入菟丝子总黄酮时,内皮细胞内 LDH 释放减少,表明菟丝子总黄酮可以减轻过氧化氢对血管内皮细胞的氧化损伤,保护膜完整性。

活性氧(ROS)如 H₂O₂ 等在心血管疾病发生发展中具有重要作用^[9]。H₂O₂ 作为活性氧家族中的一员,可直接作用于膜脂质,形成脂质过氧化物,导致细胞膜的损伤,而且还可通过脂质过氧化物分解代谢产物 MDA,促使蛋白质交联聚合反应引起细胞损伤^[10]。笔者的实验也表明可促进脂质过氧化反应,增加 MDA 生成,而菟丝子总黄酮可降低 H₂O₂ 损伤的内皮细胞产生 MDA,提示菟丝子总黄酮具有抗细胞过氧化反应性损伤的能力。内皮细胞 MDA 量的变化可反映内皮细胞产生 ROS 的情况^[11]。同时细胞内存在一个包括 SOD, CAT, GSH-Px 等酶在内的内源性抗氧化体系,他们通过代谢转化来清除 ROS, H₂O₂ 导致细胞抗氧化酶的活力下降,清除氧自由基的能力下降等均会使细胞损伤进一步加重。笔者研究表明菟丝子总黄酮提高过氧化损伤的内皮细胞中 SOD, GSH-Px 的活力,从而保护细胞免受自由基损伤。

总之,本实验采用 H₂O₂ 作为外源性自由基生成系统,通过 LDH 活性检测证实菟丝子总黄酮可提高氧化损伤的血管内皮细胞活性;通过细胞上清液 MDA 含量, SOD, GSH-Px 活性的测定及细胞形态学的变化,证实菟丝子总黄酮有清除自由基和活性氧的抗氧化特性。菟丝子总黄酮对血管内皮细胞的保

护作用可能与抗氧化、增强抗氧化酶 SOD 活力、清除自由基有关。

[参考文献]

[1] 席蓓莉,谷巍,赵凤鸣,等. 泽泻对 H₂O₂ 诱导血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(3): 232.

[2] Wang Y K. Curculigiside attenuates human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132(6): 233.

[3] Griendling K K, Fitz Gerald G A. 2003a. Oxidative stress and car-diovascular injury. Part II [J]. Animal and Human Studies Circ, 2003, 108(5): 2034.

[4] Griendling K K, FitzGerald G A. Oxidative stress and car-diovascular injury. Part I. Basic mechanisms and *in vivo* monito-ring of ROS [J]. Circulation, 2003, 108(6): 1912.

[5] 秦达念,余白蓉,余运初. 菟丝子总黄酮对实验动物及人绒毛组织生殖功能的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(6): 349.

[6] 马红霞,尤昭玲,王若光,等. 菟丝子总黄酮对大鼠流产模型血清 P、PR、Th1/Th2 细胞因子表达的影响[J]. 中药材, 2008, 31(8): 1201.

[7] 王晓敏,王建红,伍庆华. 菟丝子总黄酮对去势雌性大鼠血清中的雌激素水平和血管平滑肌细胞凋亡的影响[J]. 天津医药, 2005, 33(10): 650.

[8] 张启春,卞慧敏,喻丽珍,等. 六味地黄方含药血清对氧化低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(7): 31.

[9] 黄摇艳,赵凤鸣,吴勉华,等. 凉血通淤方对过氧化氢致血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3064.

[10] 王世君,刘保国,李志英,等. 复方杏仁面膜对黄褐斑患者血清 SOD、MDA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(9): 71.

[11] 何玲,孙桂波,孙潇,等. 木槿草苷对阿霉素诱导鼠心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(9): 1229.

[责任编辑 聂淑琴]