

槲皮素对 H₂ O₂ 致内皮细胞损伤的保护作用

孙静¹, 程嘉艺^{1*}, 滕丹¹, 张莹², 陈文娜¹

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110032; 2. 中国医科大学, 沈阳 110001)

〔摘要〕 目的:探讨槲皮素对血管内皮细胞损伤的保护作用及机制。方法:采用体外培养的人脐静脉内皮细胞株 ECV304,观察内皮细胞加入槲皮素 8,4,2 mg·L⁻¹培养 24 h 后,再加入 H₂O₂ 培养 18 h 后,造成血管内皮细胞损伤模型。用流式细胞仪测定内皮细胞死亡率,用 ELISA 法检测内皮细胞培养液血栓调节蛋白(TM)的含量;荧光分光光度法测定内皮细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)的活性。结果:与 H₂O₂ 损伤后的模型组相比,槲皮素可以减低细胞死亡率,[模型组细胞死亡率为(28.36±0.10)%,槲皮素高、中、低剂量分别为(8.34±0.01)%, (16.58±0.04)%, (10.12±0.02)%],可使培养液中 TM 蛋白含量减少,[模型组为(58.5±18.8) μg·L⁻¹,槲皮素高、中、低剂量为(32.7±9.7), (27.8±1.9), (32.1±8.6) μg·L⁻¹]和 LDH 活性减少[模型组为(1 931.9±159.5) U·L⁻¹,槲皮素高、中、低剂量为(1.092±126.2), (1 159.6±274.2), (1 223.5±120.5) U·L⁻¹]。结论:槲皮素能明显保护过氧化氢对内皮细胞的损伤,其保护作用与抗脂质过氧化、保护细胞的完整性有关。

〔关键词〕 槲皮素;内皮细胞;流式细胞术;血栓调节蛋白;乳酸脱氢酶
〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)05-0174-03

Protective Effect of Quercetin on Endothelial Cell Injured by H₂O₂

SUN Jing¹, CHENG Jia-yi¹, TENG Dan¹, ZHANG Ying², CHEN Wen-na¹

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032 China;
2. China Medical University, Shenyang 110001, China)

〔Abstract〕 Objective: To evaluate the effects of quercetin on the injured vascular endothelial cells and

〔收稿日期〕 2010-03-08
〔通讯作者〕 *程嘉艺,副教授,从事心血管药理学研究,Tel:024-31207194,E-mail:cjy61@163.com

模型对照组,而血小板计数多于模型对照组。

凉血止血药的介入可以提高血小板数量,而 TXA₂ 是目前已发现的最强的缩血管物质与血小板聚集剂之一^[4]。PGI₂ 则是较强的血小板功能的抑制剂,具有抑制血小板的黏附、聚集和释放反应,抑制血小板的促凝活性等作用^[5]。由于 TXA₂ 和 PGI₂ 的半衰期很短,一般将 TXA₂ 和 PGI₂ 稳定的代谢产物 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 作为判断其浓度的指标。本研究证实,柏叶汤组可明显提高大鼠血清 TXB₂ 的水平和下调大鼠血清 6-keto-PGF_{1α} 的水平,而柏叶汤中去掉凉血止血药侧柏叶后,与模型组比较则无统计学差异。因此,笔者认为凉血止血药的介入可能是通过对 TXB₂、6-keto-PGF_{1α} 水平的影响增强血小板的聚集功能,从而加速血小板内部促凝物的释放,加速凝血。

〔参考文献〕

[1] 罗苏群.柏叶汤及其拆方对小鼠虚寒性出血影响的实验研究[J].陕西中医,2006,27(4):1590.

[2] 李瑞琴,崔姗姗,陈虹.柏叶汤与泻心汤对脾胃虚寒胃出血模型的止血及胃黏膜损伤的保护作用研究[J].浙江中医杂志,1999,24(3):122.

[3] 陈小野.实用中医证候动物模型学[M].北京:北京医科大学中国协和医院大学联合出版社,1993:168.

[4] 庞爱明,阮长耿.绿茶的主要成分没食子儿茶素、没食子酸酯(EGCG)对血小板功能影响的研究[J].中国血液流变学杂志,2004,14(1):37.

[5] 刘耀武,马腾飞,蒋新颖,等.盐酸戊乙奎醚对高黏血症大鼠微循环和血液流变性的影响[J].中国微循环,2006,10(6):415.

〔责任编辑 何伟〕

its mechanism. **Method:** Endothelial cell culture was *in vitro*. The endothelial cell injury model was established by cultured with H₂O₂ for 18 h, Quercetin at dose of 8, 4, 2 mg · L⁻¹ was cultured with the cells before the model establishment. Flow cytometry was used for determining endothelial cell death rate. Endothelial cell was detected by ELISA for medium thrombomodulin (TM) content; spectrophotometric determination was used for the culture medium lactate dehydrogenase (LDH) activity. **Result:** Compared to the model group, quercetin can lower endothelial cell death rate, reduce the content of TM and activity of LDH in the culture medium. **Conclusion:** Quercetin can obviously protect endothelial cells, and its protective effect is related to against lipid peroxidation, protection of the cell membrane.

[**Key words**] quercetin; endothelial cell; flow cytometry; thrombomodulin; lactate dehydrogenase

槲皮素(quercetin, Que) 是黄酮类化合物, 广泛存在于多种药物中。近年来许多实验表明, 槲皮素有保护心血管、抗肿瘤、抗氧化等作用, 因其毒副作用小, 越来越显示出其重要的价值。

1 材料

1.1 细胞系 人脐静脉内皮细胞株 ECV304, 购于中国医科大学肿瘤研究所, 复苏后用含 20% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基于 37 ℃, 5% CO₂, 饱和湿度培养箱中静置培养, 24 h 换液 1 次。

1.2 药物、试剂与仪器 槲皮素对照品, 纯度 98%, 购自南京青泽医药科技开发公司; 乳酸脱氢酶 (LDH) 测试盒购自南京建成生物工程研究所; 血栓调节蛋白 (TM) 酶联免疫检测试剂盒为美国 (ADL) 公司产品; FACSCalibur 流式细胞仪为美国 BD 公司。

2 方法

2.1 对过氧化氢 (H₂O₂) 损伤后内皮细胞死亡率的影响 取对数生长期的内皮细胞随机分为 6 组: 空白对照组; 模型对照组; 阳性对照组 (芍药苷, 终质量浓度为 50 mg · L⁻¹); 槲皮素, 高、中、低剂量组 (终质量浓度为 8.0, 4.0, 2.0 mg · L⁻¹)。将各组细胞培养 24 h 后制成单细胞悬液, 收集细胞于离心管中, 除空白组外, 其余各组分别加入 200 μmol · L⁻¹ 的 H₂O₂, 留 1 管做阴性对照 (调零)。加入终质量浓度为 10 mg · L⁻¹ PI 避光染色 5 min, 利用流式细胞仪检测各组细胞的死亡率。

2.2 对 H₂O₂ 损伤后内皮细胞培养液 TM 含量的影响 取对数生长期细胞接种于 96 孔板中, 置培养箱中培养至细胞达 80% 融合时, 将细胞随机分成 6 组: 空白对照组、阳性对照组 (加入芍药苷, 其终质量浓度为 50 mg · L⁻¹)、槲皮素高、中、低剂量组 (终质量浓度为 8.0, 4.0, 2.0 mg · L⁻¹), 模型对照组。将各组细胞培养 24 h 后, 除空白对照组外, 各组均换入含有 200 μmol · L⁻¹ H₂O₂ 的培养液 200 μL, 空

白组换入不含 H₂O₂ 的培养液 200 μL, 再将各组细胞培养 18 h 后取出, 取上清, 作为待测样品。按试剂盒说明的方法测定。

2.3 对 H₂O₂ 损伤后内皮细胞培养液 LDH 活性的影响 待测样品处理方法同 2.2。用荧光光度法, 按照试剂盒说明书测定细胞培养液中 LDH 的活性。

3 结果

3.1 对 H₂O₂ 损伤后内皮细胞死亡率的影响 加 H₂O₂ 刺激后内皮细胞死亡率显著增加 ($P < 0.01$)。不同质量浓度槲皮素均显著降低 H₂O₂ 损伤后内皮细胞死亡率 ($P < 0.01$)。高浓度槲皮素作用强于中、低浓度组, 已达空白对照组水平。见表 1。

表 1 槲皮素对 H₂O₂ 损伤后内皮细胞死亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/mg · L ⁻¹	死亡率/%
空白对照	—	9.89 ± 0.02 ¹⁾
模型	—	28.36 ± 0.10
芍药苷	50	10.82 ± 0.01 ¹⁾
槲皮素	8.0	8.34 ± 0.01 ¹⁾
	4.0	16.58 ± 0.04 ¹⁾
	2.0	10.12 ± 0.02 ¹⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 H₂O₂ 损伤后内皮细胞培养液 TM 的含量的影响 经 H₂O₂ 处理后, 培养的内皮细胞培养液中 TM 含量明显上升 ($P < 0.05$), 槲皮素高、中、低浓度均能抑制 H₂O₂ 增加 TM 的作用, 槲皮素中浓度抑制作用最明显。见表 2。

3.3 对 H₂O₂ 损伤后内皮细胞培养液 LDH 活性的影响 模型组细胞培养液中 LDH 活性明显高于正常组 ($P < 0.01$); 槲皮素对 H₂O₂ 所致内皮细胞 LDH 泄漏有明显的对抗作用, 低、中、高浓度组呈良好的量效相关性, 随着槲皮素浓度的增加, LDH 的渗出逐渐减少, 表现出明显的内皮细胞保护作用。见表 2。

表 2 槲皮素对 H ₂ O ₂ 损伤后内皮细胞培养液 TM 的含量和 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	TM ⁽³⁾ /μg·L ⁻¹	LDH ⁽⁴⁾ /U·L ⁻¹
空白对照	—	34.7 ± 7.4 ⁽¹⁾	481.5 ± 164.5 ⁽²⁾
模型	—	58.4 ± 18.8	1 931.9 ± 159.5
芍药苷	50	32.4 ± 6.7 ⁽¹⁾	940.0 ± 156.2 ⁽²⁾
槲皮素	8.0	32.7 ± 9.7 ⁽¹⁾	1 092.0 ± 126.2 ⁽²⁾
	4.0	27.8 ± 1.9 ⁽²⁾	1 159.6 ± 274.2 ⁽²⁾
	2.0	32.1 ± 8.6 ⁽¹⁾	1 223.5 ± 120.5 ⁽²⁾

注:与模型组比较⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$, ⁽³⁾ TM ($n = 5$), ⁽⁴⁾ LDH ($n = 4$)。

4 讨论

血管内皮细胞 (endothelium cell, EC) 为衬贴于机体血管内腔面、位于循环血液与血管壁内皮组织之间的单层扁平细胞。正常状态下内皮细胞具有一系列抗血栓的特性,完整的内皮细胞构成薄膜屏障,将血液中的凝血因子、血小板等与内皮下组织隔离开。当内皮细胞损伤时,其凝血与纤溶平衡失调,细胞内许多活性物质如 LDH 等外溢。在许多病理过程,都会对内皮细胞造成不可逆损伤,因此内皮细胞完整性关系到很多疾病的发展。

本试验利用流式细胞仪测定细胞坏死率,采用 PI 染色法,PI 为核酸嵌入型染料,坏死细胞由于细胞膜失去了选择透过性,PI 可以进入细胞内,与胞内的核酸物质结合,从而可以被激发出荧光。测定荧光的强度即可反映细胞的死亡率。槲皮素能明显降低内皮细胞在含有 H₂O₂ 培养液中的死亡率。TM 是 EC 膜表面的一种糖蛋白,是凝血酶活化蛋白 C 所必需的辅助因子。许多实验表明 TM 既有抗凝活性,又具有抗纤溶的作用。当 EC 受到损伤后 TM 分泌到细胞外,因此 TM 也是 EC 损伤的分子标志,与许多 EC 损伤的疾病的发生发展有着密切联系。H₂O₂ 可促进自由基生成,从而引发脂类过氧化而导致 EC 损伤,TM 被释放到培养液中,因此 EC 培养液中 TM 蛋白含量明显上升。而槲皮素可以明显降低培养液中 TM 含量,说明槲皮素具有对抗 H₂O₂,保护 EC 膜完整的作用,中浓度槲皮素的保护作用较低、高浓度作用明显。LDH 可由 EC 合成,是一种细胞内的糖酵解酶,广泛存在于细胞浆内,主要催化乳酸和丙酮酸之间的相互转化。正常情况下,血清中酶活性是组织中酶活性的 0.1%,当有少量组织

损伤时,LDH 释放入血使血液中酶活性增高。在细胞生物学实验中,细胞培养上清中 LDH 的活性是判断细胞的损伤程度的重要指标之一。H₂O₂ 作用于 EC 24 h 后促进细胞膜脂质过氧化和胞膜损伤, H₂O₂ 组 LDH 活性明显升高,而槲皮素可使 H₂O₂ 损伤细胞的 LDH 活性明显降低,说明槲皮素对 EC 具有保护作用。

本实验在 H₂O₂ 诱导的 EC 损伤模型上,通过检测 EC 死亡率和培养液中 TM 含量和 LDH 活性可知槲皮素具有明显的 EC 保护作用。林蓉^[9] 实验表明槲皮素能降低内皮素的释放和丙二醛 (MDA) 的生成,推测槲皮素保护 H₂O₂ 诱导内皮细胞损伤的作用与清除氧自由基、抗脂质过氧化、保护细胞膜的完整性有关。

[参考文献]

[1] 朱益,梁中琴. 槲皮素对培养人脐静脉内皮细胞在缺氧条件下 ET-1 和 NO 水平的影响[J]. 苏州大学学报:医学版,2004,24(3):280.

[2] 甘伟杰,刘俊田. 槲皮素对高同型半胱氨酸血症家兔血管内皮细胞的保护作用[J]. 中国药理学通报,2004,20(6):647.

[3] Takahashi M. Roles of reactive oxygen species inmonocyte activation induced by photochemical reactions during photodynamic therapy[J]. Front Med Biol Eng, 2002,11:279.

[4] 王桂霞,刘义,杨春玲. 原花青素对血管内皮细胞过氧化氢损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志,2009,17(3):193.

[5] 叶剑锋. 芍药苷的抗血栓与内皮细胞保护作用及其机理研究[D]. 杭州:浙江大学,2003.

[6] 刘慧明,丁航. 槲皮素对过氧化氢诱导的人红细胞过氧化损伤的抑制作用[J]. 广东医学院学报,2003,21(4):317.

[7] Go Go S. Characterization of the unique mechanism mediating the shear dependent. binding of soluble vWF to platelet[J]. J Biol Chem,1995,270:233.

[8] 高凌云,何作云. 氧化修饰低密度脂蛋白对内皮细胞功能的影响[J]. 中国微循环,2006,10(6):399.

[9] 林蓉,刘俊田. 槲皮素对血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国循环杂志,2000,15(5):304.

[责任编辑 何伟]