

## 异鼠李素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤内皮细胞的保护作用

张放,程嘉艺\*,苑博

(辽宁中医药大学,沈阳 110032)

**[摘要]** 目的:观察异鼠李素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 CRL-1730 细胞的活性、凋亡率以及细胞周期的影响。方法:用 55, 27.5, 13.75 mg·L<sup>-1</sup> 3 种质量浓度的异鼠李素与培养的 CRL-1730 细胞置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中共同孵育 24 h, 再用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤 4 h 后, 四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测异鼠李素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的细胞活性的影响, 流式细胞仪测定异鼠李素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的细胞周期及细胞凋亡的影响。结果:异鼠李素能够剂量依赖性增强 CRL-1730 细胞活性, 与模型组吸光度(A) 0.459 比较, 高剂量组 A 0.503, 升高了 0.044, 有显著性差异(P < 0.01), 中剂量组 A 0.48, 升高了 0.027, 差异有统计学意义(P < 0.05), 低剂量组无明显影响。异鼠李素能够剂量依赖性减少受损细胞的凋亡, 降低早期凋亡率, 与模型组凋亡率 77.78% 相比, 高剂量组 69.28% 和中剂量组 72.50% 差异均有统计学意义(P < 0.05)。异鼠李素能抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的 CRL-1730 细胞减少, 表现在使 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例减少, 模型组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例为 82.23%, 异鼠李素高, 中, 低剂量组该值分别为 69.43%, 67.05%, 69.56%, 均有显著性差异; S 期和 C<sub>2</sub>/M 期细胞比率增加, 模型组 S 期和 C<sub>2</sub>/M 期细胞比率为 11.77% 和 1.91%, 异鼠李素高剂量组为 23.39% 和 7.18%, 中剂量组为 29.73% 和 3.23%, 低剂量组为 27.42% 和 3.01%。差异均有统计学意义(P < 0.05 或 P < 0.01)。结论:异鼠李素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 CRL-1730 细胞具有保护作用。

**[关键词]** 异鼠李素;过氧化氢;CRL-1730;细胞周期;凋亡率

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0169-04

## Protective Effect of Isorhamnetin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Injury of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ZHANG Fang, CHENG Jia-yi\*, YUAN Bo

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the influence of isorhamnetin on cell cycle and cell apoptosis in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Method:** Cultured CRL-1730 cell was commonly incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours with isorhamnetin of different concentrations, then CRL-1730 was injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 4 hours. Cell viability was measured by MTT assay. The rate of apoptosis and cell circles were detected by flow cytometry (FCM). **Result:** Isorhamnetin could increase the cell viability in a concentration-dependent manner. Compared with the model group, the high dosage group showed A of 0.503 (increased 0.044), with significant difference (P < 0.01). Low dosage group was no significant difference, while the middle dosage group showed A of 0.48 (increased 0.027), with significance (P < 0.05). Isorhamnetin could decrease the cell apoptosis in a concentration-dependent manner, especially decrease the early apoptosis. Compared with the model group apoptosis rate of 77.78%, the apoptosis in high dosage group was 69.28% and the middle dosage group was

**[收稿日期]** 20110117(010)

**[基金项目]** 辽宁省教育厅 2009 年度高等学校科研项目计划(2009A495)

**[第一作者]** 张放, 硕士研究生, 药理学, Tel: 13998123864, E-mail: pjff555@126.com

**[通讯作者]** \*程嘉艺, 博士学位, 教授, Tel: 024-31207194, E-mail: cjj61@163.com

72.50%。Both had statistical significance ( $P < 0.05$ )。Isorhamnetin could inhibit the decrease in CRL-1730 caused by  $H_2O_2$ , showing by the cell cycle ratio of  $G_0/G_1$ 。In the model group the ratio was 82.23%, in the high, middle and low dosage groups of isorhamnetin they were 69.43%, 67.05% and 69.56% accordingly。All of them had significance。Isorhamnetin increased the percentage of cells in S phase and  $C_2/M$  phase, the percentage of cells of S phase and  $C_2/M$  phase of the model group was 11.77% and 1.91% respectively, while the high dosage was 23.39% and 7.18%, the middle dosage was 29.73% and 3.23%, and the low dosage was 27.42% and 3.01%。

**Conclusion:** Isorhamnetin has protective effect on HUVECs injury induced by  $H_2O_2$ 。The mechanism may be related to its antioxidant activity。

[**Key words**] isorhamnetin;  $H_2O_2$ ; CRL-1730; cell circle; rate of apoptosis

血管内皮细胞的损伤和功能失调是动脉粥样硬化(AS)发生的始动环节。自由基、活性氧、脂质过氧化物等均可引起内皮细胞的损伤。异鼠李素(isorhamnetin, Iso)是广泛存在于植物界的黄酮类化合物,在沙棘中含量较高,通常作为对照品用以测定沙棘总黄酮(total flavones of *Hippophae rhamnoides* L., TFH)的含量<sup>[1]</sup>,其具有较好的抗肿瘤作用<sup>[2-5]</sup>,同时具有抗氧化、降血脂、扩张冠脉、降低血压等多种生物学效应<sup>[6]</sup>,在心血管系统疾病防治中具有广阔的应用前景。本实验研究在体外细胞培养条件下,用  $H_2O_2$  诱导人脐静脉内皮细胞 CRL-1730 氧化损伤,通过对血管内皮细胞增殖活性、细胞凋亡和细胞周期指标的测定,研究异鼠李素对 CRL-1730 氧化损伤的保护作用。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** 人脐静脉内皮细胞株 HUVEC (CRL-1730), (ATCC); 异鼠李素购自南京青泽医药科技开发公司,对照品纯度 > 98%,批号 20080721; 丹参注射液购自四川升和制药有限公司,批号 20091110,含生药量为  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 优质胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 为天津灏洋生物制品科技有限责任公司产品; 胰蛋白酶 (trypsinase) 为美国 Invitrogen 公司产品; PBS 为北京中杉金桥生物技术有限公司产品,批号 ZLI-9062; DMEM 培养基 (Gibco 公司) 批号 705801; 青-链霉素 (Gibco 公司); 甲基噻唑蓝 (MTT) (Sigma 公司); 二甲基亚砷 (DMSO) (Sigma 公司); 碘化丙啶 (PI), 批号 DH260-3; RNA 酶, trion X-100, AnnexinV-FITC (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); 过氧化氢 3% ( $H_2O_2$ ) (中外合资上海远大过氧化物有限公司) 批号 20091120; 其他试剂为国产分析纯。

**1.2 仪器** VS-840-Ku 洁净工作台为苏州安泰空

气技术有限公司产品, HERAcell 150  $CO_2$  培养箱为德国 Heraeus 公司产品, CKX 41 倒置显微镜为日本 Olympus 公司产品, ST-2 冷冻离心机为美国 Sorvall 公司产品, OLS200 恒温水浴箱为英国 Grant 公司产品, SUNRISE RC 酶标仪为瑞士 TECAN 公司产品, HVE-50 电热高压蒸气消毒器, 日本 Hirayama 公司; FACSCalibur 流式细胞仪, 美国 BD 公司。

## 2 方法

**2.1 人脐静脉内皮细胞株的培养与传代** 人脐静脉内皮细胞 CRL-1730 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液将细胞密度调至  $5 \times 10^4$  个/mL, 置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $CO_2$  饱和湿度培养箱中静置培养, 24 h 换液 1 次, 待细胞生长融合成单层细胞, 细胞如铺路石样铺满瓶底时, 用 3 mL PBS 清洗 3 遍, 加入 1 mL 胰蛋白酶溶液消化 4 min 后, 显微镜下观察, 细胞回缩变圆, 部分连片脱落, 迅速加入 3 mL DMEM 培养液终止消化, 用吸管吹打瓶底, 使细胞全部脱落, 将细胞悬液吸入离心管中,  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 5 min, 倒出上清液, 加入 DMEM 培养液, 用吸管吹打制成单细胞悬液, 按 1:2 或 1:3 比例将细胞悬液接种于培养瓶中, 置于培养箱中培养。

**2.2 分组** 将细胞随机分成 6 组, 第 1 组作为空白对照组, 不加药物, 只加含 10% FBS 的 DMEM 培养; 第 2 组作为氧化模型组, 先加 DMEM 培养 24 h, 再加入用 DMEM 调节至  $250 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $H_2O_2$  溶液培养 4 h; 第 3 组作为阳性对照组, 加入用 DMEM 调节至  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的丹参注射液培养 24 h, 再加入用 DMEM 调节至  $250 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $H_2O_2$  溶液培养 4 h; 第 4~6 组, 分别为异鼠李素高、中、低剂量组, 分别加入用 DMEM 调节至 55, 27.5, 13.75  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的异鼠李素溶液, 培养 24 h 后, 再加入用 DMEM 调节浓度至  $250 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $H_2O_2$  溶液培养 4 h。

**2.3 MTT 法检测细胞活性** 取对数生长期细胞培养,瓶底细胞达 80% 融合时用 0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,将单细胞悬液以  $5 \times 10^4$  个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 200  $\mu$ L。分为 6 组,每组 6 孔,按照 2.2 分组处理后,吸出溶液,加入含 10% MTT 的 DMEM 培养液 200  $\mu$ L,避光培养 4 h,吸出溶液,每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L,振荡 10 min,选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)。

**2.4 细胞凋亡率检测** 取对数生长期细胞培养,瓶底细胞达 80% 融合时用 0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,将单细胞悬液以  $3 \times 10^5$  mL 接种于 6 孔板中,每孔 2 mL,分为 6 组,按照 2.2 分组处理后,分别将细胞用胰蛋白酶消化至 EP 管中,1 000  $r \cdot \min^{-1}$  离心 5 min,用 PBS 冲洗 1 遍,加入 Annexin V-FITC,然后加入 1 mL PI(含 20  $g \cdot L^{-1}$  PI,0.25  $g \cdot L^{-1}$  RNA 酶和 0.1% trion X-100),放在冰上避光 5 min。流式细胞仪检测细胞凋亡情况。按照 Annexin V/PI-FITC 荧光染色结果的判定标准,对实验散点图相应数据进行统计学分析。

**2.5 细胞周期检测** 按照 2.4 分组处理后,分别将细胞用胰蛋白酶消化至 EP 管中,1 000  $r \cdot \min^{-1}$  离心 5 min,用 PBS 冲洗 1 遍,再加入 1 mL 乙醇,4 $^{\circ}$ C 固定,再离心,PBS 冲洗 2 遍。然后加入 1 mL PI(含 20  $g \cdot L^{-1}$  PI,0.25  $g \cdot L^{-1}$  RNA 酶和 0.1% trion X-100),放在冰上避光 30 min。流式细胞仪检测细胞周期。

**2.6 统计处理** 各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间数值比较用 SPSS 17.0 统计分析软件进行单因素方差分析,独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVEC 细胞活性的影响** 如表 1 所示,与正常组相比,模型组 A 明显降低( $P < 0.01$ );与模型组相比,异鼠李素高剂量组 A 明显升高( $P < 0.01$ ),异鼠李素中剂量组 A 也有升高( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义。

**3.2 鼠李素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVEC 细胞凋亡的影响** 如表 1 所示,与正常组相比,模型组细胞早期凋亡率明显增高,异鼠李素高、中剂量组此数据均有降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且降低程度与剂量成正比。

**3.3 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVEC 细胞周期的影响** 结果见表 2,与正常组相比,模型组 S 期和 C<sub>2</sub>/M 期的细胞比率减少,其中,C<sub>2</sub>/M 期有显著性差异( $P <$

表 1 不同质量浓度异鼠李素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 HUVEC 细胞活性和细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	细胞活性/A <sub>490 nm</sub>	早期凋亡率/%
正常	-	0.522 ± 0.017	34.92 ± 7.26
模型	-	0.459 ± 0.027 <sup>2)</sup>	77.78 ± 2.56 <sup>2)</sup>
丹参注射液	2 500	0.480 ± 0.012 <sup>1)</sup>	72.15 ± 2.39 <sup>1)</sup>
异鼠李素	55	0.503 ± 0.021 <sup>2)</sup>	69.28 ± 4.58 <sup>1)</sup>
	27.5	0.480 ± 0.012 <sup>1)</sup>	72.50 ± 2.06 <sup>1)</sup>
	13.75	0.457 ± 0.015	80.12 ± 4.66

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

表 2 不同浓度异鼠李素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVEC 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S 期	C <sub>2</sub> /M 期	%
正常	-	83.19 ± 0.99	15.76 ± 0.63	1.05 ± 0.24	
模型	-	82.23 ± 1.22	11.77 ± 0.74 <sup>2)</sup>	1.91 ± 0.25 <sup>1)</sup>	
丹参	2 500	75.65 ± 1.11 <sup>2)</sup>	20.50 ± 0.45 <sup>2)</sup>	3.85 ± 0.62 <sup>2)</sup>	
异鼠李素	55	69.43 ± 1.23 <sup>2)</sup>	23.39 ± 0.82 <sup>2)</sup>	7.18 ± 0.58 <sup>2)</sup>	
	27.5	67.05 ± 0.93 <sup>2)</sup>	29.73 ± 0.56 <sup>2)</sup>	3.23 ± 0.45 <sup>1)</sup>	
	13.75	69.56 ± 1.12 <sup>2)</sup>	27.42 ± 0.53 <sup>2)</sup>	3.01 ± 0.56 <sup>1)</sup>	

0.01)。与模型组相比,不同剂量组异鼠李素 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比率明显减少( $P < 0.01$ ),S 期细胞比率明显增加( $P < 0.01$ ),异鼠李素高、中、低剂量组 C<sub>2</sub>/M 期细胞比率明显增加( $P < 0.01, P < 0.05$ )。

### 4 讨论

血管内皮细胞(VEC)是覆盖于血管内表面的单层细胞,具有多种重要的生物学功能。在多种病理因素作用下,血管内皮细胞易发生与血液各种成分相接结构损伤和功能障碍,因而成为多种疾病机制研究的重要对象<sup>[7]</sup>。

血管内皮细胞暴露在具有生理活性的环境因素下,受多种因素的调节包括细胞外调节和细胞内的调节,血管细胞在这些因素的作用下产生各种细胞因子,导致细胞凋亡<sup>[8]</sup>。促动脉粥样硬化因素氧化应激等能诱导内皮细胞凋亡。其中的主要原因之一是活性氧自由基,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是活性氧,可促进自由基生成。生物体内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 如不及时消除可透过细胞膜,在膜外与 Fe<sup>2+</sup> 或 Cu<sup>2+</sup> 生成羟自由基·OH,从而引发脂质过氧化而导致细胞损伤,最终形成动脉粥样硬化斑块<sup>[9]</sup>。因此抑制血管内皮细胞氧化损伤对动脉粥样硬化和冠心病等疾病的防治具有重要意义。

本实验采用  $H_2O_2$  处理 CRL-1730 细胞,模拟氧化应激条件下血管内皮细胞的损伤<sup>[10]</sup>。MTT 测定细胞活性结果表明, $H_2O_2$  与 CRL-1730 细胞共同孵育 4 h 可诱导细胞进入氧化应激状态,细胞活性明显降低。预先加入 55,27.5,13.75  $mg \cdot L^{-1}$  的异鼠李素孵育 24 h,可以提高氧化应激状态的 CRL-1730 细胞活性,其作用呈剂量依赖关系。

实验发现氧化应激损伤 4 h 后细胞发生早期凋亡率与正常组比较明显升高,S 期和  $C_2/M$  期的细胞比率减少。这说明  $H_2O_2$  能引起 CRL-1730 细胞氧化损伤,同时也抑制了细胞的增殖代偿能力。异鼠李素可减少氧化损伤细胞的早期凋亡率,不同剂量组异鼠李素  $G_0/G_1$  期细胞比率明显减少,S 期和  $C_2/M$  期细胞比率均明显增加。由此可见,异鼠李素可以减轻  $H_2O_2$  引起的 CRL-1730 细胞氧化损伤,对氧化损伤血管内皮细胞具有保护作用。

综上所述,本研究通过使用  $H_2O_2$  制作血管内皮细胞氧化应激损伤模型,观察异鼠李素对氧化应激损伤的保护作用,发现异鼠李素能较强的抗细胞凋亡及促进受损血管内皮细胞增殖。这个结果为我们进一步研究异鼠李素潜在的防治心脑血管动脉硬化相关疾病展示了乐观的前景。

#### [参考文献]

[1] 朱玲,王正荣,周黎明,等. 异鼠李素对肺癌的作用及其抗肿瘤机制的初步探讨[J]. 航天医学与医学工

程,2005,18(5):381.

- [2] 朱玲,周黎明,杨春蕾. 异鼠李素诱导 A549 细胞凋亡的研究[J]. 中国抗生素杂志,2004,29(11):687.
- [3] 李华,李家富. 异鼠李素对 Ang  $t/\alpha$  诱导新生大鼠心脏成纤维细胞增殖和胶原合成的影响[J]. 中国心血管病研究杂志,2006,4(3):200.
- [4] 杨春蕾,彭涛,屈艺. 异鼠李素对 Eca-109 细胞 DNA 的合成和 Cmyc 基因表达近日节律的影响[J]. 生物医学工程学杂志,2005,22(6):1227.
- [5] 杨春蕾,屈艺,王正荣. 异鼠李素对 HeLa 细胞端粒酶活性的抑制作用[J]. 四川大学学报:医学版,2004,35(2):198.
- [6] 赵增光,刘应才. 异鼠李素的心血管保护作用[J]. 医学综述,2008,14(15):2321.
- [7] 中华人民共和国国家标准. 医疗器械生物学评价第 11 部分[S]. 2003:12.
- [8] Karafliou M, Lambrinouaki I, Christodoulakos G. Apoptosis in atherosclerosis: a mini-review [J]. Mini Rev Med Chem,2008,8(9):912.
- [9] 王维蓉,林蓉,彭宁,等. 丹参酮 II<sub>A</sub> 对过氧化氢损伤人血管内皮细胞的保护作用[J]. 中药材,2006,29(1):49.
- [10] Zhang J, Wei X B, Ding H. Protective effects of carvedilol on oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide in vascular endothelial cells [J]. Chin Pharmacol Bull, 2006,22(5):620.

[责任编辑 聂淑琴]