

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.22.003

# 黄芪甲苷对过氧化氢损伤模型人脐静脉内皮细胞的改善作用\*

张 荔<sup>1</sup>, 孙付军<sup>2△</sup>, 李贵海<sup>2</sup>

(1. 湖北省襄阳市中医医院, 湖北 襄阳 441000; 2. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014)

**摘要:**目的 探讨黄芪甲苷对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)损伤模型人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的改善作用。方法 将对数生长期的 HUVEC 分为正常对照组(A组, 常规培养基), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组(B组, 300 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 阳性对照组(C组, 300 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 50 μg/mL 维生素 E), 以及黄芪甲苷高、中、低剂量组(D<sub>1</sub>组、D<sub>2</sub>组、D<sub>3</sub>组, 300 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 50.0, 25.0, 12.5 μg/mL 黄芪甲苷)。采用四氮唑盐(MTT)法测定细胞活力, 测定乳酸脱氢酶(LDH)及超氧化物歧化酶(SOD)活性, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)法测定单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)mRNA及细胞间黏附分子1(ICAM-1)mRNA表达情况。结果 与A组比较, B组细胞活力及SOD活性显著减弱, LDH活性及MCP-1 mRNA, ICAM-1 mRNA表达显著增强(P<0.01); 与B组比较, C组及D<sub>1</sub>组、D<sub>2</sub>组、D<sub>3</sub>组细胞活力及SOD活性显著增强, LDH活性及MCP-1 mRNA和ICAM-1 mRNA表达显著减弱(P<0.01)。结论 黄芪甲苷对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤HUVEC有一定改善作用, 其机制可能与减弱MCP-1 mRNA和ICAM-1 mRNA表达有关。

**关键词:**黄芪甲苷; 人脐静脉内皮细胞; 过氧化氢; 单核细胞趋化蛋白1; 细胞间黏附分子1

中图分类号: R932; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)22-0007-03

## Improvement Effect of Astragaloside IV on the Human Umbilical Vein Cell Injured by Hydrogen Peroxide

ZHANG Li<sup>1</sup>, SUN Fujun<sup>2</sup>, LI Guihai<sup>2</sup>

(1. Xiangyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiangyang, Hubei, China 441000; 2. Shandong Institute of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong, China 250014)

**Abstract: Objective** To investigate the improvement effect of astragaloside IV on the human umbilical vein endothelial cell(HUVEC) injured by hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). **Methods** The HUVEC in logarithmic growth phase were divided into the normal control group (group A, conventional medium), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group(group B, 300 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), positive control group(group C, 300 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 50 μg/mL vitamin E) and astragaloside IV high, medium and low dosage groups(group D<sub>1</sub>, group D<sub>2</sub>, group D<sub>3</sub>, 300 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 50.0, 25.0, 12.5 μg/mL astragaloside). The cell viability was measured by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay, the LDH and SOD activities were measured by biochemical detection, the monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) mRNA and intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) mRNA were measured by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** Compared with those in group A, the cell viability and SOD activity were significantly decreased, while the LDH activity, MCP-1 mRNA and ICAM-1 mRNA expression were significantly increased in group B(P<0.01). Compared with those in group B, the cell viability and SOD activity were significantly increased, while the LDH activity, MCP-1 mRNA and ICAM-1 mRNA expression were significantly decreased in group C, group D<sub>1</sub>, group D<sub>2</sub> and group D<sub>3</sub>(P<0.01). **Conclusion** Astragaloside IV can improve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HUVEC damage, and its mechanism may be related to the decrease of MCP-1 and ICAM-1 expression.

**Key words:** astragaloside IV; human umbilical vein endothelial cell; hydrogen peroxide; monocyte chemoattractant protein-1; intercellular adhesion molecule-1

大量研究表明, 动脉粥样硬化、血栓、高血压及心力衰竭等心血管疾病均伴有血管内皮细胞损伤<sup>[1-2]</sup>。氧化应激是体内氧化与抗氧化作用失衡, 一般是活性分子(如氧自由基)失调造成的, 同时也是很多心脑血管疾病中内皮细胞损伤的重要原因<sup>[3-6]</sup>。黄芪甲苷是黄芪的有效成分之一, 有抗凋亡、抗氧化、减轻脂质体过氧化、改善能量代谢等作用<sup>[7-9]</sup>。本研究中以黄芪甲苷作用于过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)损伤的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)模型, 观察各细胞因子水平, 探讨黄芪甲苷在相应细胞粘附过程中的作用机制。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、试剂与仪器

细胞: 人脐静脉内皮细胞株(HUVECs, 上海博古生物有限公司, 批号为BG018)。

试剂: 黄芪甲苷粉剂(南京春秋生物有限公司, 批号为111920); 胎牛血清(批号为42F9470K), 维生素E(批号为00360), 四氮唑盐(MTT, 批号为0793), 均购自美国Sigma公司; RPMI-1640培养基(美国Gibco公司, 批号为1908121); 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号为20180809), 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号为

\*基金项目: 山东省科技发展计划项目[2011GSF11848]。

第一作者: 张荔, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为中药药理学, (电子信箱)707950356@qq.com。

△通信作者: 孙付军, 男, 大学本科, 副研究员, 研究方向为中药药理与毒理学, (电子信箱)sunfujun01@126.com。

20180809), 蛋白定量(BCA)试剂盒(批号为 PC200898), 均购自南京建成生物工程研究所; 胰蛋白酶(美国 HyClone 公司, 批号为 Q6949); 三氯甲烷(美国 Amresco 公司, 批号为 67-66-3); 逆转录试剂盒和实时荧光定量聚合酶链式反应试剂盒(美国 Invitrogen 公司, 批号为 00000541604); 细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司, 批号为 P0013)。

仪器: SW-CJ-2FD 型超净工作台(新加坡 Esco 公司); IL-161CI 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(日本 Sanyo 公司); A1301049 型低温高速离心机(美国 Beckman 公司); IX73 型<sup>[1]</sup>倒置显微镜(日本 Olympus 公司); PTC-200 型实时荧光定量聚合酶链式反应仪(美国 Bio-Rad 公司); xMark 型酶标仪(美国 BioTek 公司); EX1103 型电子天平(上海上天精密仪器有限公司); HZ211KB 型汽浴恒温振荡器(江苏金坛市医疗器械厂)。

## 1.2 方法

细胞培养: 用 10% 胎牛血清、RPMI-1640 培养基于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 HUVECs, 待细胞长至 70%~80% 融合状态时, 用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化, 37℃ 条件下孵育 2~3 min, 显微镜下观察细胞收缩变圆时弃去胰酶终止消化, 巴氏滴管吸取培养液, 吹打瓶壁制成细胞悬液, 将细胞悬液接种于新的细胞瓶中传代, 继续培养, 根据细胞数量每 2~3 d 传代 1 次。

分组、建模及给药: 将对数生长期的 HUVEC(密度为 5×10<sup>4</sup> 个/mL), 以每孔 200 μL 接种于 96 孔板, 培养 24 h 待细胞贴壁生长后, 弃去培养基, 每 5 孔为 1 组, 分为正常对照组(A 组, 常规培养基), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组(B 组, 300 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 阳性对照组(C 组, 300 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 50 μg/mL 维生素 E), 以及黄芪甲苷高、中、低剂量组(D<sub>1</sub> 组、D<sub>2</sub> 组、D<sub>3</sub> 组, 300 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 50.0, 25.0, 12.5 μg/mL 黄芪甲苷)。

细胞活力测定: 以 MTT 法测定。加药培养 24 h 后, 弃去培养基, 每孔加入 5 μg/mL MTT 溶液 10 μL, 37℃ 孵育 4 h, 弃去上清液, 加入 100 μL 二甲基亚砷, 振荡 10 min, 在 490 nm 波长处, 以酶标仪测定每孔的吸光度值(A), 以空白对照(培养基)作为 100% 存活对照, 计算细胞活力。细胞活力(%) = (A<sub>用 药 组</sub> - A<sub>正 常 对 照 组</sub>) / (A<sub>正 常 对 照 组</sub> - A<sub>空 白 对 照 组</sub>) × 100%。

LDH 及 SOD 活性测定: 加药培养细胞 24 h 后, 弃去培养液, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次, 加 100 μL 细胞裂解液, 裂解完全后按试剂盒说明书方法测定 LDH 及 SOD 活性。

单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)及细胞间黏附分子 1(ICAM-1)mRNA 表达测定: 加药培养细胞 24 h 后, 弃去培养液, PBS 洗 2 次, 收集细胞, Trizol 法提取 RNA,

鉴定完 RNA 纯度和完整性后, 反转录制备 cDNA; PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 20 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 20 s, 循环 40 次<sup>[10]</sup>。实时荧光定量 PCR 反应结束后, 定量分析 PCR 获得的熔解曲线和扩增曲线结果的可靠性, 并设定循环阈值(C<sub>t</sub>), 以 MCP-1/β-actin 及 ICAM-1/β-actin 比值分别代表各自相对表达水平, 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法计算 MCP-1 mRNA、ICAM-1 mRNA 的相对表达量。各组设 3 个复孔, 重复操作 3 次。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

名称	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'	长度(bp)
ICAM-1	CTCCAATGTGCCAGGCTTG	CAGTGGGAAAGTGCCATCCT	71
MCP-1	CATTGTGCCAAGGAGATCTG	CTTCGGAGTTTGGGTTTGCTT	91
β-actin	CTCTCCAGCCTTCCTTCCT	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	116

## 1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析。计量资料以  $\bar{X} \pm s$  表示, 行单因素方差检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 对模型细胞活力的影响

与 A 组比较, B 组细胞活力显著减弱 (P < 0.01); 与 B 组比较, C 组及 D<sub>1</sub> 组, D<sub>2</sub> 组, D<sub>3</sub> 组细胞活力显著增强 (P < 0.01)。详见表 2。

表 2 黄芪甲苷对模型细胞活力的影响(n=5)

组别	质量浓度(μg/mL)	A( $\bar{X} \pm s$ )	细胞活力(%)
A 组		0.993 ± 0.010 5	100.0
B 组		0.559 ± 0.008 7	56.3 <sup>#</sup>
C 组	50.0	0.714 ± 0.010 2	71.9 <sup>*</sup>
D <sub>1</sub> 组	50.0	0.735 ± 0.009 5	74.0 <sup>*</sup>
D <sub>2</sub> 组	25.0	0.718 ± 0.018 4	72.3 <sup>*</sup>
D <sub>3</sub> 组	12.5	0.637 ± 0.018 8	64.1 <sup>*</sup>

注: 与 A 组比较, <sup>#</sup>P < 0.01; 与 B 组比较, <sup>\*</sup>P < 0.01。表 3、图 1、图 2 同。

### 2.2 对模型细胞 LDH 及 SOD 活性的影响

与 A 组比较, B 组细胞 LDH 活性显著增强, SOD 活性显著减弱 (P < 0.01); 与 B 组比较, C 组及 D<sub>1</sub> 组, D<sub>2</sub> 组, D<sub>3</sub> 组细胞 LDH 活性显著减弱, SOD 活性显著增强 (P < 0.01)。详见表 3。

表 3 黄芪甲苷对模型细胞 LDH 和 SOD 活性的影响(U/mg, n=5)

组别	质量浓度(μg/mL)	LDH( $\bar{X} \pm s$ )	SOD( $\bar{X} \pm s$ )
A 组		155.18 ± 0.095	26.55 ± 0.102
B 组		274.02 ± 0.146 <sup>#</sup>	12.92 ± 0.083 <sup>#</sup>
C 组	50.0	176.70 ± 0.141 <sup>*</sup>	22.00 ± 0.076 <sup>*</sup>
D <sub>1</sub> 组	50.0	175.33 ± 0.098 <sup>*</sup>	21.72 ± 0.064 <sup>*</sup>
D <sub>2</sub> 组	25.0	197.06 ± 0.143 <sup>*</sup>	17.99 ± 0.094 <sup>*</sup>
D <sub>3</sub> 组	12.5	216.53 ± 0.122 <sup>*</sup>	16.46 ± 0.087 <sup>*</sup>

### 2.3 对模型细胞 MCP-1 mRNA 及 ICAM mRNA 的影响

与 A 组比较, B 组细胞 MCP-1 mRNA 及 ICAM-1 mRNA 表达显著增强 ( $P < 0.01$ ); 与 B 组比较, C 组及 D<sub>1</sub> 组、D<sub>2</sub> 组、D<sub>3</sub> 组细胞 MCP-1 mRNA 及 ICAM-1 mRNA 表达显著减弱 ( $P < 0.01$ )。详见图 1 及图 2。

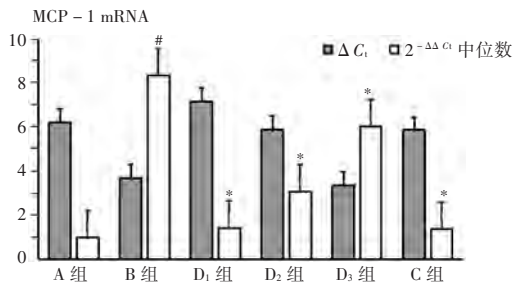


图 1 黄芪甲苷对模型细胞 MCP-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{X} \pm s, n=5$ )

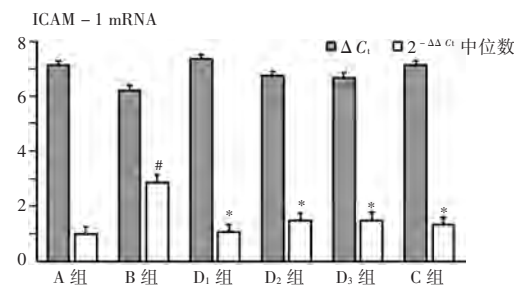


图 2 黄芪甲苷对模型细胞 ICAM-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{X} \pm s, n=5$ )

### 3 讨论

本研究中通过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVEC 建立氧化损伤模型, 探讨黄芪甲苷对 HUVEC 损伤的改善作用。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能造成内皮细胞损伤及功能紊乱。黄芪甲苷可促进 HUVEC 血管内皮生长因子 (VEGF) 上调, 通过刺激 VEGF 的表达而促进血管新生<sup>[11]</sup>。

MCP-1 作为趋化因子家族蛋白, 可趋化单核细胞向血管内皮的炎症部位聚集, 加剧活化巨噬细胞粘附血管内皮, 促进巨噬细胞进入血管壁形成泡沫细胞, 加重血管炎症, 从而导致动脉粥样硬化的形成<sup>[12-13]</sup>。ICAM-1 在动脉硬化早期细胞的迁移和增殖、泡沫细胞的形成中具有重要作用, 也是动脉粥样硬化病程中内皮细胞表达过程的重要黏附分子<sup>[14]</sup>。细胞受损时, 细胞胞浆会释放 LDH, 因此将 LDH 的释放率作为细胞受损程度的敏感指标之一<sup>[15]</sup>。SOD 是一种胞内氧化酶, 可以清除氧自由基。本研究结果显示, 黄芪甲苷能增强损伤模型细胞 SOD 活性, 降低 LDH 活性, 显示黄芪甲苷能增强细胞的抗氧化能力, 抵抗氧化应激损伤, 保护内皮细胞。黄芪甲苷能降低损伤模型 MCP-1 mRNA 和 ICAM-1 mRNA 表达, 通过抑制单核细胞与内皮细胞的粘附和迁移, 保护动脉粥样硬化中受损的内皮细胞。

综上所述, 黄芪甲苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型 HUVEC 有一定改善作用, 其机制可能与减弱 MCP-1 mRNA 和 ICAM-1 mRNA 表达有关。

### 参考文献:

- [1] 汪美红. 心血管急症的社区院前急救探讨[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2015, 7(5): 719-722.
- [2] 张清. 人脐静脉内皮细胞体外培养及其相关研究[J]. 医学综述, 2010, 16(3): 333-336.
- [3] ZHU Y, ZHANG YJ, HUANG X, et al. Z-Ligustilide protects vascular endothelial cells from oxidative stress and rescues high fat diet-induced atherosclerosis via activating multiple NRF2 downstream genes[J]. Atherosclerosis, 2019, 2(10): 1833-1835.
- [4] 李香华, 王洪新. 黄芪甲苷在心血管疾病中的作用[J]. 心血管病学进展, 2011, 32(1): 132-136.
- [5] YUAN T, CONG Y, MENG J, et al. Arachidonic acid causes hidden blood loss-like red blood cell damage through oxidative stress reactions[J]. Journal of Surgical Research, 2017, 211(2): 14-16.
- [6] 权赫秀, 金鹏, 李露, 等. 麝香及其代用品人工麝香对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人脐静脉内皮细胞损伤保护作用比较研究[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(17): 1783-1787.
- [7] PANIERI E, MILLIA C, SANTORO MM. Real-time quantification of subcellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glutathione redox potential in living cardiovascular tissues[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2017, 109: 189-200.
- [8] LU Y, LI S, WU H, et al. Beneficial effects of astragaloside IV against angiotensin II-induced mitochondrial dysfunction in rat vascular smooth muscle cells[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2015, 36(5): 1223-1232.
- [9] 路遥, 徐晋妤, 卞智萍. 黄芪甲苷逆转血管紧张素 II 引起的主动脉平滑肌细胞线粒体功能障碍[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2015, 35(7): 975-980.
- [10] VARGAS FDS, SOARES DG, RIBEIRO APD, et al. Protective effect of alpha-tocopherol isomer from vitamin E against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced toxicity on dental pulp cells[J]. Bio Med Research International, 2014, 2014(8): 895049.
- [11] 李玉梅, 杨辛欣, 韩旭, 等. 川芎嗪与黄芪甲苷配伍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机制[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(1): 18-23.
- [12] RAHMANIAN A, MOHEBALI N, HAGHNEGHAHDAR A, et al. Serum levels of monocyte chemoattractant protein-1 correlate with poor clinical grades in cerebral aneurysms[J]. Iran J Immunol, 2015, 12(4): 302-310.
- [13] 袁佳利, 刘静, 夏艳辉, 等. 单核细胞趋化蛋白-1 与自身免疫性疾病研究进展[J]. 实用医院临床杂志, 2017, 14(2): 126-129.
- [14] 夏英凯, 杜怡峰, 韩国哲, 等. 急性脑梗死患者血清 MCP-1 水平的变化[J]. 山东医药, 2016, 56(1): 79-80.
- [15] 蒋艳, 雷小勇. 细胞因子在动脉粥样硬化发生发展中的作用[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(21): 4198-4200.

(收稿日期: 2019-05-12)