

中图分类号: R965; R285

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2024)04-0039-04

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.04.010



3种中药成分对氧化型低密度脂蛋白诱导人主动脉内皮细胞损伤的影响*

楼彩霞^{1,2}, 王弋^{1,2}, 代路路^{1,2}, 龙淑娴^{1,2}, 黄小琼^{1,2}

(1. 广东省医学实验动物中心, 广东 佛山 528248; 2. 广东省人民医院·广东省医学科学院, 广东 广州 510080)

摘要:目的 探讨3种中药成分(姜黄素、连翘苷、白藜芦醇)对氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)诱导的人主动脉内皮细胞(HAEC)损伤的影响。方法 实验设空白对照组(等体积基础培养液),溶剂对照组[等体积含二甲亚砜(DMSO)的基础培养液],Ox-LDL组(20 μg/mL Ox-LDL),姜黄素①②③④组(20 μg/mL Ox-LDL + 2.5 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L 姜黄素),连翘苷①②③④组(20 μg/mL Ox-LDL + 10 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L、80 μmol/L 连翘苷),白藜芦醇①②③组(20 μg/mL Ox-LDL + 20 μmol/L、40 μmol/L、80 μmol/L 白藜芦醇),采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞活性,并计算细胞增殖率;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)法检测细胞微管相关蛋白1轻链3(LC3)和环氧合酶2(COX-2)mRNA的表达水平。结果 与Ox-LDL组比较,姜黄素、白藜芦醇各剂量组,连翘苷④组细胞增殖率均显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);姜黄素③组、连翘苷②③④组、白藜芦醇各剂量组细胞LC3 mRNA表达水平均显著升高,COX-2 mRNA表达水平均显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论 姜黄素、连翘苷和白藜芦醇可抑制Ox-LDL诱导下HAEC的增殖,可激发受损细胞自噬,抑制炎症因子COX-2表达。

关键词:姜黄素;连翘苷;白藜芦醇;氧化型低密度脂蛋白;人主动脉内皮细胞;细胞自噬;炎症反应

Effects of Three Traditional Chinese Medicine Ingredients on the Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Human Aortic Endothelial Cells Injury

LOU Caixia^{1,2}, WANG Yi^{1,2}, DAI Lulu^{1,2}, LONG Shuxian^{1,2}, HUANG Xiaoqiong^{1,2}

(1. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan, Guangdong, China 528248; 2. Guangdong Provincial People's Hospital · Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou, Guangdong, China 510080)

Abstract: Objective To investigate the effects of three traditional Chinese medicine (TCM) ingredients (curcumin, phillyrin and resveratrol) on the oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL)-induced human aortic endothelial cells (HAECs) injury. **Methods** HAECs were divided into the blank control group (equal volume of basic culture medium), the solvent control group [equal volume of basic culture medium containing dimethyl sulfoxide (DMSO)], the Ox-LDL group (20 μg/mL Ox-LDL), the curcumin groups ①②③④ (20 μg/mL Ox-LDL + 2.5 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L, 20 μmol/L curcumin), the phillyrin groups ①②③④ (20 μg/mL Ox-LDL + 10 μmol/L, 20 μmol/L, 40 μmol/L, 80 μmol/L phillyrin), the resveratrol groups ①②③ (20 μg/mL Ox-LDL + 20 μmol/L, 40 μmol/L, 80 μmol/L resveratrol). Cell activity was detected by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method, the cell proliferation rate was calculated, the expression levels of microtubule-associated protein 1 light-chain 3 (LC3) and cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA were detected by the real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). **Results** Compared with that in the Ox-LDL group, the cell proliferation rate in the phillyrin group ④, all the curcumin groups and resveratrol groups significantly decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Compared with those in the Ox-LDL group, the expression levels of LC3 mRNA in the curcumin group ③, phillyrin groups ②③④ and all the resveratrol groups significantly increased, and the expression level of COX-2 mRNA significantly decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** Curcumin, phillyrin and resveratrol can inhibit the proliferation of HAECs induced by Ox-LDL, stimulate the autophagy of injured cells, and inhibit the expression of inflammatory factor COX-2.

Key words: curcumin; phillyrin; resveratrol; oxidized low-density lipoprotein; human aortic endothelial cells; cellular autophagy; inflammatory reaction

中医理论认为,动脉粥样硬化(AS)属本虚标实之血瘀、痰浊范畴,治疗应以补益肝肾、健脾益气、滋阴养血、活血化瘀、祛痰降浊为主。中药姜黄能行气破瘀、通经止痛,连翘能清热解毒、散结消痈,虎杖能活血散瘀、

祛风除湿,均能用于AS的治疗。过氧化物酶体增生物激活受体 γ (PPAR γ)可通过抑制血管平滑肌细胞中Toll样受体4(TLR4)介导的炎症反应,改善血管内膜增生^[1],PPAR γ 激动剂对AS具有保护作用^[2]。中药有效成

*基金项目:广东省中医药局面上科研项目[20191046]。

第一作者:楼彩霞,女,博士,副主任药师,研究方向为中药药效,(电子信箱)alou_1218@163.com。

分姜黄素^[3]、连翘苷^[4]和白藜芦醇^[5]均具有PPAR γ 激动作用。且姜黄素具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抑制淋巴管内皮细胞增殖、延缓细胞衰老等多种生物学功能^[6-9]；连翘苷广泛用于治疗发热、病毒性感冒、淋病、溃疡等疾病^[4]；白藜芦醇具有抗炎、抗氧化、抗糖尿病和心肌保护等作用^[5]。氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)已被证明参与了AS的形成过程,其诱导的血管内皮损伤是AS早期发病机制之一。AS始于内皮的炎性变化,内皮功能障碍是心血管疾病的前兆,保护内皮细胞是AS的治疗策略。自噬在多种类型细胞的稳态维持中起重要作用。基于此,本研究中探讨了姜黄素、连翘苷、白藜芦醇对Ox-LDL干预下人主动脉内皮细胞(HAEC)的增殖、相关自噬、炎性因子表达的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器: Step One 实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)仪(美国ABI公司); JS-680A型自动凝胶图像分析仪(上海培清科技有限公司); SKG-01型电热恒温干燥箱(湖北省黄石市医疗器械厂); GL-3250A型磁力搅拌器、LX-100手掌型离心机(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); YXQ-LS-30S II型立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); Ultra Pure UF型纯水系统(上海和泰仪器有限公司); Flexa-200型酶联免疫检测仪(杭州奥盛仪器有限公司)。

试剂: 姜黄素(货号CAS 458-37-7,批号为MB2147,含量 $\geq 97\%$),连翘苷(货号CAS 487-41-2,批号为A0426AS,含量 $> 98\%$),白藜芦醇(货号CAS 501-36-0,批号为M03018,含量 $\geq 97\%$),均购自大连美仑生物科技有限公司; PriMed-iCell-002原代内皮细胞基础培养基(赛百慷<上海>生物科技有限公司,批号为2022032901); Ox-LDL检测试剂盒(广州奕源生物科技有限公司,批号为20220323); 二甲基亚砜(DMSO,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号为67-68-5); Maxima TMSYBRGreen / ROXq PCR Master Mix (2X)(批号为#A25742),反转录试剂盒(批号为K1622),均购自美国Thermo Fisher Scientific公司; 总RNA提取试剂盒(美国Promega公司,批号为LS1040); Marker 1(广州东盛生物科技有限公司,批号为M1081); 其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

细胞: (永生化)iCell-0015a HAEC(免疫荧光鉴定,赛百慷<上海>生物科技有限公司)。

1.2 方法

细胞培养与分组: 收集对数生长期的HAEC,以 3×10^3 个/孔均匀接种至96孔板中。每孔体积100 μ L。置37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养18 h。实验设空白对照组

(等体积基础培养液),溶剂对照组(等体积分含DMSO的基础培养液,DMSO体积分数 $< 0.1\%$),Ox-LDL组(20 μ g/mL Ox-LDL),姜黄素①②③④组(20 μ g/mL Ox-LDL + 2.5 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L、20 μ mol/L姜黄素),连翘苷①②③④组(20 μ g/mL Ox-LDL + 10 μ mol/L、20 μ mol/L、40 μ mol/L、80 μ mol/L连翘苷),白藜芦醇①②③组(20 μ g/mL Ox-LDL + 20 μ mol/L、40 μ mol/L、80 μ mol/L白藜芦醇)。除空白对照组外,其余各组细胞以含DMSO(体积分数 $< 0.1\%$)的基础培养液及相应药液分别培养48 h。

细胞增殖情况: 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法。各组细胞培养48 h后,吸去上清液。每孔加入培养液180 μ L,再加入5 mg/mL MTT溶液20 μ L,培养4 h,弃去孔内培养液。每孔加入150 μ L DMSO,低速振荡10 min。采用酶联免疫检测仪测定490 nm波长处的吸光度值(A)。细胞增殖率(%) = $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白对照组}}) / (A_{\text{溶剂对照组}} - A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 。

细胞相关蛋白mRNA表达水平: 收集对数生长期的HAEC,以 5×10^4 个/孔均匀接种至12孔板中,每孔1.5 mL。置37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养18 h,按分组加入不同浓度的相应药物,每组设6个复孔。给药48 h后,提取细胞总RNA,进行qPCR,测定微管相关蛋白1轻链3(LC3)和环氧合酶2(COX-2)的mRNA表达水平。每组做3个复孔,取平均值。引物序列见表1。

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	序列(5'-3')	扩增长度(bp)
GAPDH	F: ACTCCTCCACCTTTGACGCT	187
	R: GGTCTCTCTCTTCCTCTGTGC	
LC3	F: TGAAGTGAAGTGCCTCTACC	125
	R: CCAGAGGGACAACCCTAACAC	
COX2	F: GCCAAGCACTTTTGGTGGAG	91
	R: GGGACAGCCCTTCACGTTAT	

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖情况

与Ox-LDL组比较,姜黄素、白藜芦醇各剂量组及连翘苷④组细胞增殖率显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。详见图1。

2.2 LC3和COX-2 mRNA表达水平

与Ox-LDL组比较,姜黄素③组,连翘苷②③④组,白藜芦醇各剂量组细胞LC3 mRNA表达水平均显著升高,COX-2 mRNA表达水平均显著降低($P < 0.01$ 或

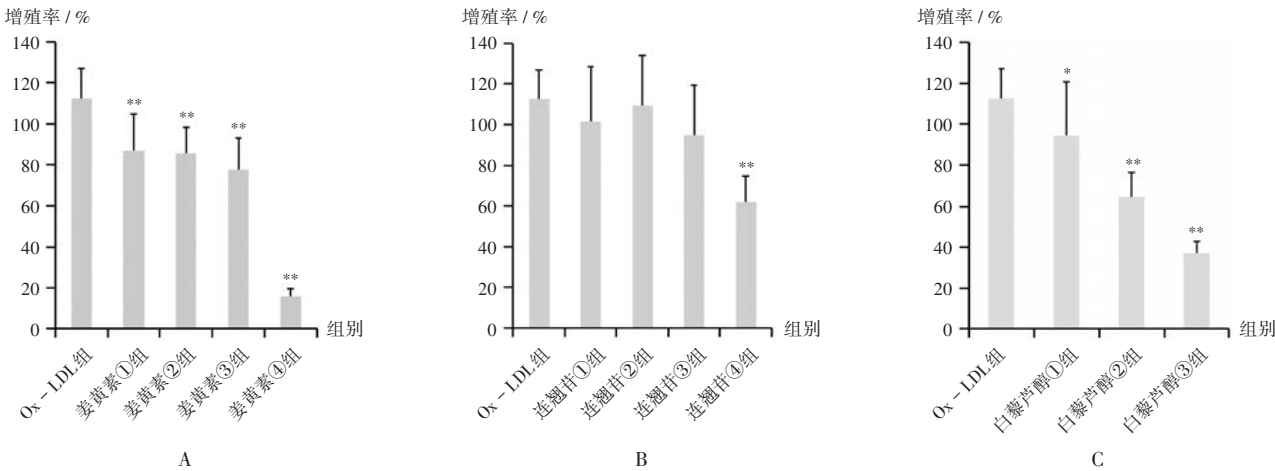
$P < 0.05$)。因姜黄素①④组及连翘苷①组细胞复孔间细胞数量差异大或未收集到足够检测所需细胞,故未能检测出LC3和COX-2 mRNA。详见图2。

3 讨论

Ox-LDL是AS的危险因素,能损伤内皮细胞、诱导人血管内皮细胞自噬功能障碍,促进AS的发生和发展^[10]。内皮细胞在维持血管稳态中起重要作用。内皮功能障碍是心脑血管疾病及其他血管系统疾病发生发展的重要原因。自噬是溶酶体的降解过程,通过移除废弃的多余蛋白质和细胞器,在细胞的生命过程中起重要作用,是细胞的自我保护行为。激活有益的自噬是心血管疾病治疗的关键。有益的自噬可通过诱导受损细胞器的降解为细胞提供能量和营养,保护心肌细胞和血

管内皮细胞,并稳定AS斑块^[11]。氧化应激会引起过量自噬而导致疾病状态。LC3是重要的自噬标记物,并用于跟踪自噬体的形成。血管慢性炎症是AS过程中的主要病理改变。COX-2是与AS疾病相关的血管炎症重要的分子指标。

本研究结果显示,姜黄素、白藜芦醇各剂量组及连翘苷④组细胞增殖率显著降低;姜黄素③组及连翘苷②③④组,白藜芦醇各剂量组细胞LC3 mRNA表达水平均显著升高,COX-2 mRNA表达水平均显著降低。该结果与下述文献部分结论趋势大致相同:姜黄素可抑制HeLa细胞诱导的血管内皮细胞增殖^[12],抑制缺氧诱导的恒河猴视网膜血管内皮细胞增殖^[13],抑制血管新生内膜过度增生^[14],降低内皮脂毒性并调节自噬^[15],



注:与Ox-LDL组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图1 细胞增殖活性

A. Curcumin B. Phillyrin C. Resveratrol

Note: Compared with that in the Ox-LDL group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 1 Cell proliferation

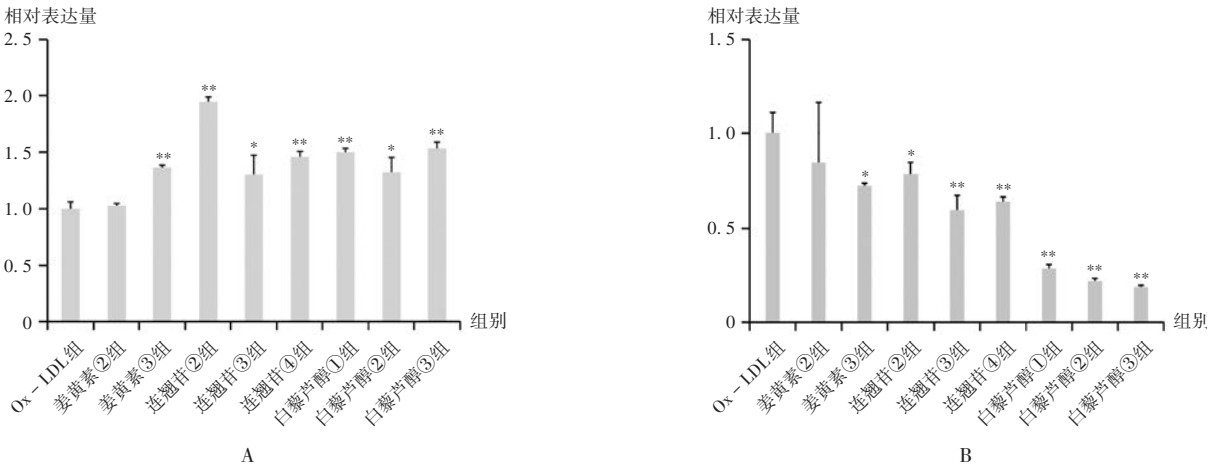


图2 LC3和COX-2 mRNA表达水平

A. LC3 B. COX-2

Fig. 2 Expression levels of LC3 and COX-2 mRNA

减弱肿瘤细胞活力和抑制其增殖^[16],减少凋亡内皮细胞和降低机体氧化应激水平^[17],抑制微血管内皮细胞血管生成^[18]等;连翘苷可减小ApoE^{-/-}小鼠主动脉内膜粥样斑块面积^[19],减少肿瘤体积和肿瘤组织密度^[20],改善肥胖症模型氧化应激和脂代谢紊乱^[21]等;白藜芦醇可抑制高糖条件下人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖^[22],减轻糖化低密度脂蛋白对HUVEC的炎性损伤^[23],缺血和再灌注期间保护心脏^[24]等。

需要说明的是,本研究中中药成分对细胞增殖活性的影响存在与已有的部分文献报道趋势不一致的情况。分析原因:1)中药成分在发挥疗效的同时,可能也伴随一定的毒性。两者与中药来源、批号、纯度和剂量等均相关。2)本研究中使用了助溶剂(如DMSO)溶解中药成分,为避免其对细胞生长的影响,将DMSO体积分数控制在0.1%以下。部分中药成分在溶解后的稀释过程中,可能会有沉淀析出,对实验结果可能存在一定影响。3)部分中药有颜色,本研究中虽已尽量排除药物颜色对实验的干扰,但可能还不能完全排除。另外,本研究中仅选取了几个有代表性的指标进行检测,后期需加大样本量,增加检测指标,进一步完善实验结论。

基于目前的实验结果初步判断,姜黄素、连翘苷和白藜芦醇可抑制Ox-LDL干预下HAEC细胞的增殖,可激发受损细胞自噬,抑制炎症因子COX-2表达。

参考文献

- [1] ZHANG LL, GAO CY, FANG CQ, et al. PPAR attenuates intimal hyperplasia by inhibiting TLR4-mediated inflammation in vascular smooth muscle cells [J]. Cardiovasc Res, 2011, 92(3): 484-493.
- [2] 柴湘平. PPAR- α/γ 激动剂联合应用对代谢综合征动脉粥样硬化的保护机制研究[D]. 长沙:中南大学, 2011.
- [3] 刘尊敬, 鲍秀琦, 贾树红, 等. PPAR γ 激动剂筛选细胞模型的构建及验证姜黄素为PPAR γ 天然激动剂的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2011, 28(11): 872-874.
- [4] 陈星澎, 张帆, 裴冬梅. 连翘苷通过PPARs信号通路对肥胖大鼠脂质代谢与肠道菌群失调的改善作用研究[J]. 中药材, 2022, 45(4): 942-947.
- [5] 葛恒, 张俊峰, 王彬尧, 等. 白藜芦醇对PPAR- γ 激动作用的研究[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(12): 905-908.
- [6] 周淑琴, 张守法, 张伟, 等. 姜黄素对波动性高血糖处理下人脐静脉内皮细胞DNA氧化损伤的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(5): 1205-1207.
- [7] 姚运红, 余健华, 熊晖, 等. 姜黄素抑制鼻咽癌细胞增殖及血管内皮生长因子基因表达的研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2006, 37(4): 647-649.
- [8] 张大伟, 吕恒娟, 郑海星, 等. 姜黄素对淋巴管内皮细胞生成的影响[J]. 中医药学报, 2014, 42(4): 86-88.
- [9] 宰青青, 叶兰, 秦臻, 等. 姜黄素对衰老大鼠内皮祖细胞功能的影响[J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(18): 177-178.
- [10] ZHANG Y, CAO X, ZHU W, et al. Resveratrol Enhances Autophagic Flux and Promotes Ox-LDL Degradation in HUVECs via Upregulation of SIRT1 [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 7589813.
- [11] GU SM, LI X. Regulation of Autophagy in Cardiovascular Diseases by Natural Products [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1207: 731-736.
- [12] 郑伟, 高振华, 吴丽娜, 等. 姜黄素抑制HeLa细胞诱导的血管内皮细胞增殖作用及其机制研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(14): 1064-1067.
- [13] 张静, 姚国敏, 李小珩. 姜黄素对缺氧下视网膜血管内皮细胞增殖、迁移和成管的影响[J]. 临床眼科杂志, 2019, 27(5): 463-467.
- [14] 田凤选. 高良姜黄素促进大鼠颈动脉内膜剥脱术后内皮修复及抑制内膜增生的实验研究[D]. 苏州:苏州大学, 2015.
- [15] HAN J, PAN XY, XU Y, et al. Curcumin induces autophagy to protect vascular endothelial cell survival from oxidative stress damage [J]. Autophagy, 2012, 8(5): 812-825.
- [16] ASHRAFIZADEH M, NAJAFI M, MAKVANDI P, et al. Versatile role of curcumin and its derivatives in lung cancer therapy [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(12): 9241-9268.
- [17] CHEN D, TAO X, WANG Y, et al. Curcumin accelerates reendothelialization and ameliorates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery via the upregulation of endothelial cell autophagy [J]. Int J Mol Med, 2015, 36(6): 1563-1571.
- [18] BINION DG, OTTERSON MF, RAFIEE P. Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition [J]. Gut, 2008, 57(11): 1509-1517.
- [19] 徐逸雯. 连翘苷干预动脉粥样硬化形成的作用及机制探究[D]. 温州:温州医科大学, 2021.
- [20] 郑末, 姜忠敏. 连翘苷对Lewis肺癌VEGF和内皮抑素表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(1): 167-171.
- [21] 郑桃, 田雪飞, 胡青松, 等. 连翘苷对肥胖症大鼠脂代谢紊乱和氧化应激的影响及机制研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2023, 20(1): 78-83.
- [22] 高洁, 刘美志, 邱军辉, 等. 白藜芦醇对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞增殖、迁移及管腔形成的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(2): 176-183.
- [23] 刘美志, 高洁, 沙雯君, 等. 白藜芦醇抑制Gly-LDL诱导人脐静脉内皮细胞损伤的作用机制研究[J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(5): 413-420.
- [24] HUANG FC, KUO HC, HUANG YH, et al. Anti-inflammatory effect of resveratrol in human coronary arterial endothelial cells via induction of autophagy: implication for the treatment of Kawasaki disease [J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2017, 18(1): 3.

(收稿日期:2023-04-17;修回日期:2023-06-19)