

黄芪甲苷对缺氧/复氧损伤血管内皮细胞 核转录因子- κ B 表达的影响

杨富国, 刘革新, 王 力

(青岛大学医学院护理学院, 山东 青岛 266021)

【摘要】 目的: 观察黄芪甲苷对血管内皮细胞缺氧/复氧损伤中核转录因子- κ B(NF- κ B)表达的干预作用。方法: 人脐静脉内皮细胞原代培养, 传至 3 代后随机分为 3 组。对照组: 常规培养; 缺氧/复氧组: 先缺氧处理 1 h, 再复氧 1 h; 药物干预组: 培养液中加入终浓度分别为 20、40 和 80 mg/L 的黄芪甲苷预处理, 12 h 后进行缺氧/复氧处理。分别用酶联免疫吸附技术、硫代巴比妥法检测细胞上清液中细胞间黏附分子-1(ICAM-1)浓度、丙二醛(MDA)含量; 用免疫化学法测定血管内皮细胞 NF- κ B 的表达。结果: 与对照组比较, 缺氧/复氧组细胞培养液中 MDA 含量、ICAM-1 浓度均显著增加 [MDA (6.98 ± 1.15) μ mol/L 比 (2.38 ± 0.49) μ mol/L, ICAM-1 (3169.01 ± 132.75) ng/L 比 (995.14 ± 74.93) ng/L, P 均 < 0.01], 内皮细胞 NF- κ B 阳性细胞率明显增强 [(58.02 ± 12.01)% 比 (6.28 ± 1.43)%, $P < 0.01$]。与缺氧/复氧组比较, 药物干预组细胞培养液中 MDA 含量均明显减少 (P 均 < 0.01)、ICAM-1 浓度均明显降低 (P 均 < 0.01), 内皮细胞 NF- κ B 阳性细胞率均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 黄芪甲苷能显著抑制缺氧/复氧引起的血管内皮细胞 NF- κ B 表达, 且呈剂量依赖性, 对缺氧/复氧损伤的血管内皮细胞具有保护作用。

【关键词】 黄芪甲苷; 内皮细胞; 缺氧/复氧; 细胞间黏附分子-1; 核转录因子- κ B

中图分类号: R285.5; Q813.11 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)06-0367-03

Effect of astragaloside (黄芪甲苷) on the expression of nuclear factor - κ B injured by hypoxia/reoxygenation in vascular endothelial cells YANG Fu-guo, LIU Ge-xin, WANG Li. Nursing School, Medical College, Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong, China

【Abstract】 Objective: To investigate the intervention effect of astragaloside on the expression of nuclear factor - κ B (NF- κ B) injured by hypoxia/reoxygenation (H/R) in vascular endothelial cells. **Methods:** The human umbilical vein endothelial cells (hUVECs) were cultured and passaged. After the third generation, hUVECs were randomly divided into three groups: control group, H/R group and astragaloside group. The cells in the control group were cultured under normal conditions; the cells of H/R group were cultured under hypoxia, in a closed container with oxygen concentrations below 1% for 1 hour, and then under normal conditions for 1 hour in a CO₂ foster box; the hUVECs in astragaloside group were pretreated by different dose of astragaloside (the final concentrations of 20, 40, 80 mg/L) at the time of pre-hypoxia, after 12 hours of the pretreatment, they suffered from H/R. The concentration of intercellular adhesion molecule - 1 (ICAM-1) and content of malondialdehyde (MDA) in supernatant were detected respectively by ABC-enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and thio-barbituric acid method. The expression of NF- κ B of the vascular endothelial cells was analyzed by immunohistochemistry. **Results:** Compared with the control group, the content of MDA and concentration of ICAM-1 in the supernatant fluid were remarkably increased in the H/R group [MDA content (6.98 ± 1.15) μ mol/L vs. (2.38 ± 0.49) μ mol/L, ICAM-1 concentration (3169.01 ± 132.75) ng/L vs. (995.14 ± 74.93) ng/L, both $P < 0.01$], and the percentage of NF- κ B positive endothelial cells was remarkably increased in H/R group [(58.02 ± 12.01)% vs. (6.28 ± 1.43)%, $P < 0.01$]. Compared with H/R group, the content of MDA in the supernatant were remarkably reduced (all $P < 0.01$), the concentration of ICAM-1 were significantly decreased (all $P < 0.01$), the percentage of NF- κ B positive endothelial cells were markedly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in astragaloside group with different dose of astragaloside. **Conclusion:** Astragaloside can significantly inhibit the expression of NF- κ B induced by H/R in vascular endothelial cells. These effects may be attenuated by administration of different dose of astragaloside, and the effect is dose-dependent. Astragaloside can protect vascular endothelial cells from the injury caused by H/R.

【Key words】 astragaloside; endothelial cells; hypoxia/reoxygenation; intercellular adhesion molecule - 1; nuclear factor - κ B

恢复缺血组织的血流灌注是心肌缺血治疗中不可跨越的阶段。然而,当缺血超过一定时间后,心肌血流再灌注反而会进一步加重心肌损害,引发更为严重的病理生理紊乱,即缺血/再灌注(I/R)损伤。内皮是 I/R 损伤的关键部位,细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达上调是内皮细胞活化的重要标志,它介导的白细胞紧密黏附是活化内皮细胞与白细胞相互作用这一病理生理过程的早期分子事件。核转录因子- κ B(NF- κ B)作为其调控因子可能作用在致损伤众多因素中的较上游环节,在 I/R 损伤中起了重要的作用^[1]。黄芪的有效成分比较复杂,主要有皂苷类、黄酮类、多糖等。现代医学研究发现,黄芪不同提取物具有抗氧化、抗炎、扩血管、改善心脏缺血性疾病的作用^[2-5]。黄芪甲苷是从黄芪总苷中分离得到的一类单体化合物,其对内皮细胞缺氧/复氧损伤的影响未见报道。本研究中采用人脐静脉内皮细胞(HUVEC)缺氧/复氧模型模拟器官组织 I/R 所诱导的血管改变,观察黄芪甲苷对血管内皮细胞(VEC)缺氧/复氧损伤中 NF- κ B 表达的干预作用,为 I/R 损伤的治疗提供用药依据。

1 材料与方 法

1.1 HUVEC 原代培养方法^[6]: 在无菌条件下取正常分娩的胎儿脐带 25~30 cm,用 Hank 液冲洗干净,灌入 1 g/L 的 I 型胶原酶,在 37 °C 温箱中培养 18~20 min,收集消化液,以 1 000 r/min(离心半径 20 cm)离心 10 min,弃上清,加入含体积分数 20% 小牛血清和生长因子的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)的培养液(美国 GIBCO 公司)制成细胞悬液,置 37 °C 含体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱中进行培养,24 h 换液,待细胞长成融合状态后作细胞鉴定。VEC 在相差显微镜下呈单层铺路石样排列特征,用免疫法测定第 VIII 因子相关抗原呈阳性反应。确定为内皮细胞后再传代培养,取第三代生长良好的 VEC 进入实验。

1.2 缺氧/复氧模型的制备: 将培养有内皮细胞的 24 孔培养板放入一可密闭容器中,向该容器内持续通入缺氧混合气体(含 5%CO₂、95%N₂)5 L/min,置换容器中的 O₂。待该容器内 O₂ 体积分数低于 1% 后,停止通入缺氧混合气体。密闭该容器,置于 37 °C 细胞培养箱中培养 1 h,再打开容器,将 24 孔培养板置于 37 °C、5% 的 CO₂ 培养箱进行复氧处理。

1.3 实验分组: ①对照组:置于 37 °C 5%CO₂ 培养

箱中进行常规培养;②缺氧/复氧组:制备缺氧/复氧模型;③药物干预组:又分 3 个浓度组,在培养液中加入终浓度分别为 20、40 和 80 mg/L 的黄芪甲苷(批号:0781-200311)预处理 12 h,然后同缺氧/复氧组处理。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 细胞培养上清液中丙二醛(MDA)含量和 ICAM-1 浓度检测: 收集各组细胞培养上清液,按每份 1 ml 分装,置-70 °C 冻存备用。采用酶联免疫吸附技术双抗体夹心法(ABC-ELISA)测定细胞培养上清液中 ICAM-1 的浓度。具体检测步骤按试剂盒(西安华美试剂公司)说明书操作,用酶标仪测定各孔波长 450 nm 处吸光度(A)值,按不同浓度标准品的 A 值做标准曲线,计算出样品中的 ICAM-1 浓度。用硫代巴比妥法检测 MDA 含量,具体步骤按试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书操作。

1.4.2 免疫组化检测 NF- κ B 的表达: 根据武汉博士德生物工程有限公司提供的链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶法(SABC)免疫组化染色试剂盒说明书要求进行。标本用体积分数为 5% 的多聚甲醛固定 20 min,采用 NF- κ B p65 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司)在 4 °C 过夜,再用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体保温,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)染色。在显微镜下检测,阴性细胞为核空白或呈均匀淡褐色,如细胞核内出现棕褐色颗粒,则为阳性细胞,高倍镜下观察 10 个高倍视野,计算阳性细胞占所有细胞的百分率。

1.5 统计学处理: 所有实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS11.5 软件进行处理,多组间比较用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 黄芪甲苷对缺氧/复氧损伤 VEC 培养液中 MDA 含量和 ICAM-1 浓度的影响(表 1): 与对照组比较,缺氧/复氧组细胞培养液中 MDA 含量和 ICAM-1 浓度均明显升高(P 均 <0.01)。与缺氧/复氧组比较,药物干预组随着黄芪甲苷预处理浓度的增加,细胞培养液中 MDA 含量和 ICAM-1 浓度明显降低(P 均 <0.01),说明该效应与黄芪甲苷预处理浓度呈剂量依赖效应。

2.2 黄芪甲苷对缺氧/复氧损伤 VEC NF- κ B 表达的影响(表 1): 正常细胞胞浆有阳性染色,多数细胞胞核无明显的染色,少数细胞核有一定程度的染色。缺氧/复氧后,多数细胞核呈明显的阳性染色,与对照组比较,缺氧/复氧组 NF- κ B 阳性细胞率显著

作者简介:杨富国(1970-),男(汉族),山东省人,硕士研究生,讲师,从事冠心病的基础和临床研究,发表论文 10 篇。

升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与缺氧/复氧组比较,药物干预组随着黄芪甲苷预处理浓度的增加,NF- κ B 阳性细胞率呈明显下降趋势($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明该效应与黄芪甲苷预处理浓度呈剂量依赖性。

表 1 黄芪甲苷对缺氧/复氧损伤 VEC 培养上清液中 MDA 含量、ICAM-1 浓度及 NF- κ B 表达阳性细胞率的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of astragaloside on MDA content, ICAM-1 concentration in supernatant and expression of NF- κ B in vascular endothelial cells injured by H/R($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(孔)	MDA(μ mol/L)	ICAM-1(ng/L)	NF- κ B 阳性细胞率(%)
对照组	6	2.38 \pm 0.49	995.14 \pm 74.93	6.28 \pm 1.43
缺氧/复氧组	6	6.98 \pm 1.15*	3 169.01 \pm 132.75*	58.02 \pm 12.01*
药物干预组 20 mg/L	6	4.38 \pm 0.83 [#]	2 454.19 \pm 109.54 [#]	47.58 \pm 7.45 Δ
40 mg/L	6	3.25 \pm 0.66 [#]	1 539.67 \pm 93.70 [#]	23.25 \pm 6.41 [#]
80 mg/L	6	2.22 \pm 0.58 [#]	1 011.61 \pm 95.05 [#]	7.98 \pm 1.12 [#]

注:与对照组比较:* $P < 0.01$;与缺氧/复氧组比较: $\Delta P < 0.05$,
$P < 0.01$

3 讨论

研究表明,血管内皮是心肌 I/R 损伤的关键部位。I/R 时产生大量的氧自由基,VEC 被激活,激活的内皮细胞能表达多种黏附分子(如 ICAM-1)、肿瘤坏死因子(TNFs)和白细胞介素(ILs)等,进而造成心肌炎症反应、损伤、凋亡和坏死。NF- κ B 转录调节的连结位点位于许多促炎细胞因子与免疫调节因子的启动区,NF- κ B 的激活在 I/R 所致的炎症损伤中发挥了重要作用^[7]。

缺氧/复氧时氧自由基生成增加,氧自由基作用于细胞膜可引起脂质过氧化反应,产生大量 MDA,MDA 含量的变化在某种程度上可以反映机体内氧化反应的强弱。已有研究表明,黄芪甲苷具有清除氧自由基,抗脂质过氧化作用^[8]。本实验结果显示:经不同浓度黄芪甲苷预处理后,细胞培养液中 MDA 含量下降,且其作用具有剂量依赖性,可能是黄芪甲苷通过加强 HUVEC 清除氧自由基的能力,使脂质过氧化作用减轻,故培养液中 MDA 含量下降。

在静息细胞的胞浆中,NF- κ B p65 与其抑制蛋白(I κ B)结合,使 NF- κ B 的核定位信号不能暴露,从而处于非活性状态。缺氧/复氧时产生的氧自由基可使 I κ B 磷酸化水解,从而与 NF- κ B 发生解离,导致 NF- κ B 发生核移位,进入细胞核与靶基因启动区或增强子上的 NF- κ B 结合位点结合,促使细胞表面受体、黏附分子和细胞因子(如 ICAM-1 和

TNF- α 等)的表达^[9]。ICAM-1 在介导内皮细胞与白细胞相互作用过程中至关重要,ICAM-1 表达于受刺激活化的内皮细胞表面,通过与其相应配体结合介导白细胞与血管壁接触,并使白细胞在激活的内皮细胞表面紧密黏附,从而启动一系列反应,最终导致白细胞在炎症反应区域集中,并致血管狭窄、微血管通透性升高、组织水肿、无复流等现象。抑制 NF- κ B 活性可以减少黏附分子的表达。本结果显示,经不同浓度黄芪甲苷预处理后,VEC 中 NF- κ B 表达降低,细胞培养液中 ICAM-1 浓度减少,且其作用具有剂量依赖性。表明黄芪甲苷可能通过清除氧自由基,减少 I κ B 磷酸化水解,抑制 NF- κ B 发生核移位,从而减少 ICAM-1 的表达,使内皮细胞 NF- κ B 表达减少,培养液中 ICAM-1 浓度降低。然而,黄芪甲苷究竟是通过何种途径影响缺氧/复氧损伤 VEC 中 NF- κ B 的表达,尚待进一步探讨。

综上所述,缺氧/复氧可造成 VEC 脂质过氧化损伤,使 NF- κ B 及其调控的 ICAM-1 表达增加。黄芪甲苷可能通过下调 NF- κ B 活性、进而抑制 ICAM-1 表达,减轻心肌缺氧/复氧损伤中的炎症反应,对损伤的 VEC 具有保护作用。

参考文献:

- [1]Valen G, Yan Z Q, Hansson G K. Nuclear factor kappa-B and the heart[J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 38(2): 307-314.
- [2]杨贵志,李传凤,唐爱.黄芪注射液合静脉溶栓治疗急性心肌梗死后再灌注损伤的研究[J].中国中西医结合急救杂志,2004,11(3):162-164.
- [3]赵春玲,李莉华,邹丽莎,等.黄芪注射液对缺血/再灌注肾损伤时 IL-6 和 bFGF 的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2001,8(4):225-227.
- [4]张成明,于金玲,王海霞,等.黄芪注射液对感染性休克大鼠心肌损伤的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2007,14(1):47-50.
- [5]杨富国,董果雄,张社华.黄芪注射液对内皮细胞缺氧复氧损伤的保护作用[J].中国微循环,2004,8(3):136-139.
- [6]薛庆善.体外培养的原理与技术[M].北京:科学技术出版社,2001:342.
- [7]黄勤.心肌 NF- κ B 与疾病[J].国外医学·生理病理科学与临床分册,2000,20(3):204-206.
- [8]高卫真,康毅,姜建石,等.黄芪苷 IV 对心肌细胞氧化损伤的保护作用[J].中国心血管杂志,2005,10(3):166-169.
- [9]Li C, Kao R L, Ha T, et al. Early activation of IKK beta during in vivo myocardial ischemia[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(3):H1264-1271.
- [10]周四桂,雷小勇,廖端芳.缺氧预适应对缺氧复氧诱导内皮细胞-中性粒细胞黏附的影响[J].中国危重病急救医学,2003,15(3):159-162.

(收稿日期:2007-10-10)

(本文编辑:李银平)