

• 论著 •

山萘酚对过氧化氢损伤血管内皮细胞的保护作用

何煜舟, 黄小民, 汪云开, 蒋旭宏, 吴丽娟, 陈 英

(浙江省中医院急诊科, 浙江 杭州 310006)

【摘要】 目的 探讨山萘酚对氧化损伤血管内皮细胞的保护作用。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC), 将细胞分为空白对照组、氧化损伤组、溶剂(二甲亚砜(DMSO))对照组、槲皮素干预对照组, 以及山萘酚低、中、高浓度干预组(0.5、10.0、50.0 μmol/L)7组。将750 μmol/L 过氧化氢(H₂O₂)作用于加入槲皮素及不同浓度山萘酚预培养24 h的内皮细胞中继续培养18 h, 检测丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)、一氧化氮(NO)含量以及细胞活性和细胞凋亡率。结果 槲皮素和不同浓度的山萘酚均可抑制H₂O₂诱导的血管内皮细胞MDA、LDH含量的升高, 增加培养液中NO₂⁻/NO₃⁻含量, 可呈剂量依赖性抑制H₂O₂所致细胞活性降低, 并显著减少细胞凋亡率, 上述各指标与氧化损伤组比较差异均有统计学意义(均P<0.01); 山萘酚的上述作用呈剂量依赖性。结论 山萘酚可保护和修复H₂O₂诱导的血管内皮细胞损伤, 其作用可能与抗氧化、减少NO降解有关。

【关键词】 过氧化氢; 山萘酚; 内皮细胞; 凋亡; 动脉粥样硬化

中图分类号: R965; Q343.6 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.01.003

Protective effects of kaempferol on injuries of vascular endothelial cells induced by hydrogen peroxide HE Yu-zhou, HUANG Xiao-min, WANG Yun-kai, JIANG Xu-hong, WU Li-juan, CHEN Ying. Department of Emergency, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

【Abstract】 Objective To study the effect of kaempferol on injuries of vascular endothelial cells induced by hydrogen peroxide (H₂O₂). **Methods** Human umbilical venous endothelial cells were cultured in vitro and divided into seven groups: blank control, H₂O₂, solvent (DMSO) control, quercetin control, kaempferol low, medium, high doses (0.5, 10.0, 50.0 μmol/L) groups, respectively. After the endothelial cells were incubated for 24 hours, 750 μmol/L H₂O₂ was added in the absence or presence of kaempferol and various concentrations of quercetin in the latter five groups, and afterward the culture continued for 18 hours. Then the contents of malondialdehyde (MDA), lactic acid dehydrogenase (LDL) and nitric oxide (NO) were measured; meanwhile the cell apoptotic rate was detected by flow cytometric method and the activity was observed. **Results** The incubation of endothelial cells with H₂O₂ for 18 hours elicited the increase of the rate of apoptotic cells, the releases of MDA and LDH accompanied by the increase in the content of NO₂⁻/NO₃⁻ in the medium. The pretreatment of kaempferol with 0.5, 10.0, 50.0 μmol/L and quercetin both could inhibit the H₂O₂-induced the reduction of cell activities and significantly decreased the rate of apoptosis in a concentration-dependent manner (all P<0.01). **Conclusion** Kaempferol possesses a protective effect against injuries of endothelial cells induced by H₂O₂, that is probably via anti-oxidation, decrease of degradation of NO and inhibition of apoptosis of the cells.

【Key words】 Hydrogen peroxide; Kaempferol; Endothelial cell; Apoptosis; Atherosclerosis

越来越多的证据表明, 缺血/再灌注损伤、心肌梗死等心血管疾病的发生发展与细胞凋亡关系密切^[1]。活性氧(ROS)如过氧化氢(H₂O₂)等在心血管疾病发生发展中具有重要作用。研究发现, 血管内皮细胞凋亡与多种心血管疾病密切相关, 而ROS被认为与内皮细胞凋亡有关^[2-3]。保护内皮细胞, 防止其凋亡, 对防治心血管疾病具有积极的临床意义, 而开发抗氧化药物可以有效防治氧化应激造成的内皮细胞凋亡已成为共识。山萘酚属于黄酮醇类化合物, 大量存在于水果、蔬菜、豆类、茶叶中, 其对心血管系统具有广泛的生物活性, 如抗氧化、抗动脉粥样硬化等

作用^[4]。本实验中用体外细胞培养方法, 采用H₂O₂诱导血管内皮细胞损伤模型, 探讨山萘酚对内皮细胞损伤的过氧化脂质生成、一氧化氮(NO)、蛋白酶表达变化和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料:人脐静脉内皮细胞(HUVEC)由浙江大学细胞中心提供(用液氮冻存), 山萘酚购自上海康九化工有限公司〔纯度>95%, 采用二甲亚砜(DMSO, 上海生物工程有限公司)溶解后避光保存〕, Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)、胰蛋白酶为美国GIBCO公司产品, 槲皮素(quercetin)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、黄嘌呤(xanthine)、黄嘌呤氧化酶均购自美国Sigma公司, 小牛血清为杭州四季青生物工程有限公司产品, 二甲基吡啶N-氧化物

基金项目: 浙江省教育厅科研项目(20060749)

作者简介: 何煜舟(1972-), 男(汉族), 浙江省人, 医学硕士, 副主任医师, Email: hyzy1995@126.com.

(DMPO)使用前经活性炭纯化处理。

1.2 实验方法

1.2.1 HUVEC 培养:用含体积分数为 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37 °C、5%CO₂ 条件下培养,待细胞生长至约 85%融合时用于实验。

1.2.2 H₂O₂ 和山萘酚的处理:细胞传代铺于 24 孔板中(3×10⁴ 个/孔),待生长至单层融合时,氧化损伤组加入终浓度为 750 μmol/L 的 H₂O₂ 刺激 18 h,给药组在 H₂O₂ 刺激前将细胞分别与 0.5、10.0、50.0 μmol/L 的山萘酚预培养 24 h。另设槲皮素(30 μmol/L)阳性药物对照组、溶剂 DMSO 对照组和空白对照组。各组实验至少重复 3 次。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 丙二醛(MDA)和乳酸脱氢酶(LDH)水平测定:收集各组细胞上清液 1 ml,按试剂盒说明书方法测定 MDA,用全自动生化分析仪测定 LDH。

1.3.2 NO 测定:取各组培养液 100 μl,加入等量 Griess 试剂(0.1% N-萘基-乙二胺与 1%对氨基苯磺酰胺混合),室温避光 15 min,于酶标仪 550 nm 处测定吸光度(A)值,用 NO₂⁻/NO₃⁻ 含量表示 NO 生成量。

1.3.3 细胞活性测定:用 MTT 法,按文献要求^[5]测定。取 24 孔板各组细胞,每组加入 50 μl MTT (5 mg/ml),于 5%CO₂、37 °C 孵箱中孵育 4 h 后,吸去培养液,每孔再加入二甲基亚砷 500 μl 振荡,在全自动酶标仪上于 570 nm 处测定每孔细胞 A 值。按照公式计算细胞生长抑制率[IR=(空白对照组 A 值-用药组 A 值)/空白对照组 A 值×100%]。

1.3.4 体外自由基捕捉实验:产生超氧阴离子自由基模型为黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶体系;产生羟自由基的模型为 Fenton 反应。对照组用磷酸盐缓冲液(PBS),实验组为不同浓度的山萘酚。在顺磁共振波谱仪(EPR)的谐振腔内进行测试。波谱信号分别为代表羟自由基和超氧阴离子自由基被捕捉后的加合物 DMPO-OH 和 DMPO-OOH,其峰值与体系中产生的氧自由基浓度成正比,计算山萘酚消除自由基

的百分率[SR=(对照组电子自旋共振信号平均峰值-实验组平均峰值)/对照组平均峰值×100%]。

1.3.5 细胞凋亡率检测:将各组细胞制成单细胞悬液,收集 1×10⁶ 个细胞,经冷 PBS 洗 2 次,加入乙醇固定,4 °C 放置 24 h,加等量 PBS 洗 2 次,加 RNA 酶(10 mg/ml)100 μl,37 °C 下静置 15~20 min;再加入含有曲通 X-100(Triton X-100)的碘化丙锭(50 mg/ml)500 μl,4 °C 下放置 30 min,用流式细胞仪检测,Cellquest 3.1f 获取直方图,经 Modfit 3.0 DNA 分析软件分析。

1.4 统计学处理:采用 SPSS 11.5 统计软件,实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析和 *q* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MDA 含量(表 1):H₂O₂ 与内皮细胞共同孵育后,可显著加剧细胞膜脂质过氧化反应(*P*<0.01);给予槲皮素或不同浓度的山萘酚,对 H₂O₂ 所致的 MDA 增加有很好的抑制作用(均 *P*<0.01),并呈剂量依赖性。

2.2 NO 含量(表 1):H₂O₂ 与内皮细胞共同孵育后,可引起细胞培养液内 NO 含量的显著降低(*P*<0.01);加入槲皮素或不同浓度的山萘酚后,对 H₂O₂ 损伤的内皮细胞所致 NO 水平降低有很好的抑制作用(均 *P*<0.01),并呈剂量依赖性。

2.3 LDH 释放情况(表 1):H₂O₂ 与内皮细胞共同孵育后,可显著增加 LDH 从内皮细胞的漏出(*P*<0.01);而加入槲皮素或不同浓度的山萘酚后,LDH 的活性降低(均 *P*<0.01),表明其从细胞膜中漏出减少,提示该药可减轻 H₂O₂ 对细胞膜的损伤而导致 LDH 大量外泄。

2.4 细胞活性(表 1):细胞中加入 H₂O₂ 刺激后,细胞活性明显下降,表现为 A 值明显降低,IR 明显升高(*P*<0.01)。给予槲皮素或不同浓度的山萘酚后,可呈剂量依赖性抑制 H₂O₂ 所致的细胞活性降低(均 *P*<0.01)。

表 1 各组 HUVEC 中 MDA、NO、LDH、细胞活性和细胞凋亡率的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	MDA(nmol/L)	NO(μmol/L)	LDH(U/L)	IR(%)	凋亡率(%)
空白对照组	3	3.57±0.24	14.73±0.65	45.0±6.5	0.0±0.0	4.2±0.6
氧化损伤组	3	5.16±0.14 ^a	6.12±0.41 ^a	158.0±7.4 ^a	59.7±7.9 ^a	46.6±5.3 ^a
DMSO 对照组	3	3.69±0.31	14.10±0.41	47.0±7.1	0.5±0.1	4.1±0.5
槲皮素对照组	3	3.92±0.11 ^{ab}	10.65±0.35 ^{ab}	61.0±7.1 ^{ab}	26.3±4.2 ^{ab}	23.5±4.1 ^{ab}
山萘酚低剂量组	3	4.58±0.24 ^{ab}	6.95±0.61 ^{ab}	116.0±10.1 ^{ab}	52.1±5.6 ^a	40.7±3.7 ^a
山萘酚中剂量组	3	4.09±0.33 ^{ab}	9.09±0.51 ^{ab}	85.0±6.4 ^{ab}	34.3±3.7 ^{ab}	31.7±4.1 ^{ab}
山萘酚高剂量组	3	3.87±0.19 ^b	12.15±0.31 ^{ab}	59.0±7.3 ^b	20.3±3.2 ^{ab}	22.4±3.2 ^{ab}

注:与空白对照组比较,^a*P*<0.01;与氧化损伤组比较,^b*P*<0.01

2.5 细胞凋亡率(表 1):用流式细胞仪分析结果显示, H₂O₂ 可使得内皮细胞凋亡率明显升高(P<0.01);预先加入槲皮素或不同浓度的山萘酚孵育 24 h,可使内皮细胞凋亡率明显下降(均 P<0.01),并呈剂量依赖性。

3 讨论

山萘酚有 3 位羟基,本实验结果表明山萘酚有良好的抗氧化活性,与 Kim 和 Lee^[6]研究的黄酮类化合物在体外与维生素 C 的抗氧化活性结果相符,表明 3 位羟基有很好的抗氧化活性。

本实验中发现, H₂O₂ 使内皮细胞的活性明显降低,而预先加入不同浓度的山萘酚培养可显著改善 H₂O₂ 对细胞活性的影响,说明山萘酚具有抗 H₂O₂ 诱导的内皮细胞损伤作用,其机制可能是由于保护了内皮细胞的线粒体,抑制脂质过氧化所致。本实验结果还显示, H₂O₂ 使内皮细胞 LDH 释放增加,而预先加入山萘酚可减少 H₂O₂ 诱导的内皮细胞 LDH 释放,说明山萘酚可能具有促进内皮细胞修复和保护内皮细胞膜完整性的作用。内皮细胞生成的 NO 具有抑制血细胞对内皮细胞的黏附和损伤,调节血管张力等作用^[7-8]。在病理条件下,如高血压、高血脂、糖尿病、动脉粥样硬化等心脑血管疾病都有内皮细胞受损,表现为 NO 的储备或基础 NO 量的减少。Candipan 等^[9]研究表明,内膜损伤的动物,其损伤面积减少与血管 NO 的生成呈正相关,说明 NO 活性的恢复能导致内膜损伤的消退。本实验研究发现体外 H₂O₂ 使 NO 含量明显下降,而山萘酚随浓度增加可以促进 H₂O₂ 诱导的 NO 水平升高,提示山萘酚可能促进损伤的内皮细胞功能恢复,我们推测山萘酚对内皮细胞 NO 的影响可能通过抗氧化、抑制 NO 降解来实现。

在正常情况下,内皮细胞的增殖率和凋亡率都很低,内皮细胞凋亡与增殖之间的动态平衡维持内皮细胞数量的稳定和血管功能的正常。多项研究证实内皮细胞损伤、功能异常是冠状动脉粥样硬化发生的早期事件,而内皮细胞的过度凋亡却是内皮细胞功能失调的始动环节。本实验中采用流式分析法检测细胞凋亡,能够很敏感地反映细胞膜上外翻的磷脂,成为目前检测凋亡常用的方法。本实验研究中也发现,750 μmol/L 的 H₂O₂ 可导致内皮细胞大量

凋亡;而预先加入阳性对照药槲皮素培养,可明显抑制内皮细胞的凋亡;而不同浓度的山萘酚在 H₂O₂ 损伤内皮细胞前预培养 24 h,可呈浓度依赖性地抑制内皮细胞的凋亡数量,减轻内皮损伤。NO 已被证明能显著抑制内皮细胞凋亡^[10];本实验中还发现 NO 水平与内皮细胞凋亡存在一定的正相关性,但山萘酚的抗凋亡作用与其对 NO 水平的影响的确切关系及其可能存在的机制尚不明确,有待于进一步研究。内皮细胞凋亡不仅与动脉粥样硬化的发生相关^[11],而且还可促进动脉粥样硬化血管中血栓形成,从而导致心脑血管疾病急性事件发生的危险性大大增加。

综上所述,山萘酚可明显保护 H₂O₂ 诱导的内皮细胞氧化损伤,从而保持内皮的相对稳定性,发挥内皮细胞维持血管稳态和防止血栓形成的作用,降低心脑血管疾病急性事件发生的危险性。此作用可能是通过抗氧化、减轻细胞的脂质过氧化损伤、提高 NO 水平来实现的。

参考文献

- [1] Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*, 1996, 79(5):949-956.
- [2] Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors*, 1998, 8(1-2):1-5.
- [3] Ying W. Deleterious network hypothesis of apoptosis. *Med Hypotheses*, 1998, 50(5):393-398.
- [4] Ruiz E, Padilla E, Redondos, et al. Kaempferol inhibits apoptosis in vascular smooth muscle induced by a component of oxidized LDL. *Eur J Pharmacol*, 2006, 529(1-3):79-83.
- [5] 陈频,徐向进.复方丹参滴丸对高糖/高胰岛素诱导兔胸主动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(5):313-316.
- [6] Kim DO, Lee CY. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical, and its structural relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2004, 44(4):253-273.
- [7] Woodman OL. Modulation of vasoconstriction by endothelium derived nitric oxide; the influence of vascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1995, 22(9):585-593.
- [8] 杨洁红,张宇燕,王华锋.养阴益气活血方对培养人脐静脉内皮细胞抗凝和纤溶功能的作用. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(1):3-5.
- [9] Candipan RC, Wang BY, Buitrago R, et al. Regression or progression dependency on vascular nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 16(1):44-50.
- [10] Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis; basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*, 1998, 82(11):1111-1129.
- [11] Kim YM, Kim TH, Seol DW, et al. Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl-2 cleavage and cytochrome C release. *J Biol Chem*, 1998, 273(47):31437-31441.

(收稿日期:2009-08-08) (本文编辑:李银平)

《中国危重病急救医学》杂志入编《中文核心期刊要目总览》

排在《中文核心期刊要目总览》2008 年版(第 5 版)之临床医学/特种医学类第 1 位