

[文章编号] 1007-3949(2009)17-03-0193-04

• 实验研究 •

# 原花青素对血管内皮细胞过氧化氢损伤的保护作用

王桂霞, 刘 义, 杨春玲

(辽宁医学院药理学教研室, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] 原花青素; 人脐静脉内皮细胞; 过氧化氢损伤; 氧化应激; 细胞凋亡

[摘要] 目的 观察原花青素对血管内皮细胞过氧化氢损伤的保护作用及可能机制。方法 用体外培养的人脐静脉内皮细胞传代后进行实验, 实验分为 3 组: 对照组常规培养; 过氧化氢损伤组; 药物干预组加入原花青素低、中、高浓度组 (25 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L 预处理)。用 MTT 法观察原花青素对过氧化氢损伤的内皮细胞活性的影响, 各组均测定细胞中超氧化物歧化酶、丙二醛和乳酸脱氢酶的活性, 用 Hoechst 33258 荧光染色法观察过氧化氢损伤对血管内皮细胞的凋亡情况, 蛋白免疫印迹法分析各组凋亡基因 bcl-2 蛋白的表达。结果 (1) 原花青素使过氧化氢损伤的内皮细胞的脂质过氧化物丙二醛生成减少, 乳酸脱氢酶漏出液减少, 超氧化物歧化酶活力增加; (2) 过氧化氢损伤可以诱导内皮细胞凋亡, 原花青素可显著减少过氧化氢诱导的内皮细胞的凋亡, 且上调抗凋亡基因 bcl-2 的蛋白表达。结论 原花青素处理对过氧化氢所致的内皮细胞的损伤有保护作用, 机制可能通过抗脂质过氧化, 对氧自由基的清除, 以及抗细胞凋亡有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

## Protective Effect of Proanthocyanidins on the Injury of Vascular Endothelial Cell Induced by Hydrogen Peroxide

WANG GuiXia, LIU Yi, and YANG Chun-Ling

(Department of Pharmacology, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

[KEY WORDS] Proanthocyanidins, Endothelial Cell, Hydrogen Peroxide, Oxidative Stress, Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effect of proanthocyanidins (PC) on the injury of vascular endothelial cell (VEC) induced by hydrogen peroxide and its corresponding mechanisms. **Methods** The endothelial cell strain from human umbilical vein was cultured and a model of VEC injured by hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) was established.

This study was conducted as follows: normal control group,  $H_2O_2$ -injury group (250  $\mu$ mol/L), PC protective groups (25, 50, 100 mg/L). Cell viability was tested by using MTT. The levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and lactate dehydrogenase (LDH) activity were measured with corresponding kit.  $H_2O_2$ -induced apoptosis was detected using staining with Hoechst 33258. Protein levels were examined by Western-blot. **Results** PC could inhibit the hydrogen peroxide induced VEC reduction, suppress LDH activity, reduce the MDA production, and enhance SOD activity under hydrogen peroxide. Typical apoptotic cells were detected using staining with Hoechst 3325. The bcl-2 protein expression increased. **Conclusions** These results demonstrated that PC can protect the VECs from  $H_2O_2$ -induced injury, and the possible mechanism may refer to its effect of anti-apoptosis, anti-lipid peroxidation and SOD activity enhancing.

内皮细胞是覆衬于全身血管和淋巴管内面的单层扁平细胞, 具有多种生理功能, 它作为组织与血液间的第一道屏障, 是最先感受缺氧的细胞之一。在缺血性心脏病的发生发展过程中, 内皮细胞受损功能障碍是其中的关键因素。自由基、活性氧、脂质过氧化物和  $H_2O_2$  等均可引起内皮细胞的损伤<sup>[1]</sup>。原花青素 (proanthocyanidins, PC) 是一种很强的抗

氧化剂, 最初将其作为一种有效的保护肝的药物随着临床的应用深入, PC 在心血管方面表现出显著的保护作用, 同时还是一种有效的保肝药物<sup>[2]</sup>。但原花青素对过氧化氢损伤内皮细胞是否有保护作用, 国内外的相关报道不多。本研究采用体外培养细胞方法测定细胞增殖活性和细胞损伤标志物, 对原花青素抗细胞损伤作用及其可能机制进行探讨。

[收稿日期] 2008-10-27 [修回日期] 2009-01-25

[作者简介] 王桂霞, 硕士, 研究方向为心血管药理学, 联系电话为 0416-4874030, E-mail 为 wangguixia80@163.com。通讯作者刘义, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 liuyi6564@163.com。杨春玲, 硕士, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 yangyangziz0363@sina.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

原花青素 (上海卓康生物公司) 产品批号为 A1084, UV  $\geq 95\%$ ; 人脐静脉内皮细胞 (北京大学医

学部解剖实验室); Trypsin (Gibco公司)、DMEM 培养基 (Gibco公司); 胎牛血清 (杭州四季青公司); MTT (Sigma公司); 丙二醛 (malondialdehyde MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase SOD)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase LDH) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 二甲基亚砷 (DMSO)、碘化丙啉 (美国 Sigma公司); 培养板 (Becton); Xd-101 型倒置显微镜 (南京江南光电集团); 酶标仪 (Anthos Labtec Instruments公司)。

## 1.2 内皮细胞的培养

人脐静脉内皮细胞系其中含体积分数为 10% 的胎牛血清, 青霉素 (100 KU/L) 和链霉素 (100 KU/L), 37℃下置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。达 90% 以上单层融合状态时用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代培养, 用于以下实验。

## 1.3 实验分组

待细胞长至 60% ~ 70% 融合状态时换无血清 DMEM 培养液继续培养 24 h 使同步化后, 随机分为 5 组: 正常对照组; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组; 原花青素保护低、中、高剂量组 (25、50 和 100 mg/L)。

## 1.4 MTT 比色法检测原花青素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤血管内皮的活性影响

调整细胞密度为  $1 \times 10^7$  个/L 接种 96 孔板, 在上述条件下培养 24 h, 然后用含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 24 h 加入原花青素, 继续培养 24 h 将 250  $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加入模型组和原花青素组, 刺激细胞 4 h 每孔加入 20  $\mu$ L MTT (5 g/L), 37℃孵育 4 h 倾去上清液, 每孔加二甲基亚砷 150  $\mu$ L, 振荡数分钟, 使紫色结晶甲臞充分溶解, 在 960 全自动酶标仪上于 570 nm 处测定吸光值 (OD 值)。

## 1.5 原花青素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤血管内皮细胞丙二醛和乳酸脱氢酶水平的影响

测定释放到培养基中 MDA 和 LDH 的量来判断细胞损伤状况。收集培养的内皮细胞并调节细胞密度为  $1 \times 10^6$  /L, 接种于 24 孔板 (每孔 1 mL), 待细胞达 70% ~ 80% 后, 分组同上。各实验组作用后收集培养上清液, 按试剂盒说明书操作, 比色法测定培养上清液和细胞裂解液中 MDA 和 LDH 的水平。

## 1.6 超氧化物歧化酶活性的测定

采用黄嘌呤氧化酶法: 黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基, 后者氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂作用下呈红色, 分光光度计测其吸光度, 计算被测样品中的 SOD 活性。

## 1.7 细胞凋亡的荧光 Hoechst 33258 染色

依据文献 [3] 的方法, 各因素处理后, 移去培养

基, 用冷的 PBS 洗 2 次, 4% 的多聚甲醛固定 20 min, 弃固定液, 双蒸水洗 2 次, 自然晾干后, 5 mg/L Hoechst 33258 避光染色 10 min, 用双蒸水洗 2 次, 室温晾干后于荧光显微镜 (Dlympus) 观察。每张片随机选取 4 个高倍视野, 计算凋亡细胞占每个视野总细胞数的百分比, 求出 4 个视野平均百分比, 作为该样本的凋亡百分比, 每组取 2 张盖玻片。

## 1.8 bcl-2 蛋白检测 (Western blot)

经处理后分别收集细胞, 冷 PBS 洗 2 次, 加入预冷细胞裂解液裂解细胞, 超声破碎, 提取物冰上孵育 30 min, 12 kr/min, 4℃离心 20 min, 上清液中的蛋白浓度经考马斯亮蓝法定量。每组取 20  $\mu$ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离, 转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉的 TBST 4℃封闭过夜, 加入一抗 (兔抗人 bcl-2 单抗, 1: 400) 室温振荡 3 h, TBST 洗膜 10 min  $\times$  3 次, 辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 室温孵育 1 h, 常规洗膜, 化学发光试剂显色。

## 1.9 统计学处理

统计方法采用单因素方差分析, 再行两两比较 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

# 2 结果

## 2.1 原花青素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤内皮细胞活性的影响

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可引起人脐静脉内皮活性降低, 与对照组比较差异有显著性 ( $P < 0.01$ ), 而原花青素各浓度组可抑制过氧化氢损伤引起的活性降低 ( $P < 0.01$ ), 并随浓度增加, 抑制作用增强 (表 1)。

表 1 原花青素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤内皮细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	OD 值
对照组	0.84 $\pm$ 0.036
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤组	0.33 $\pm$ 0.021 <sup>a</sup>
原花青素 25 mg/L 组	0.43 $\pm$ 0.056 <sup>ab</sup>
原花青素 50 mg/L 组	0.59 $\pm$ 0.011 <sup>ab</sup>
原花青素 100 mg/L 组	0.72 $\pm$ 0.010 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$  与对照组比较, b 为  $P < 0.01$  与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较。

## 2.2 原花青素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤血管内皮细胞丙二醛和乳酸脱氢酶及超氧化物歧化酶水平的影响

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤可引起细胞内 MDA 和 LDH 释放增加, 而 SOD 活性明显降低; 原花青素预作用于损伤的细胞后, 与模型组比较, MDA 和 LDH 释放随浓度增加减少, SOD 活性有所升高 ( $P < 0.05$  表 2)。

## 2.3 原花青素对人脐静脉内皮细胞凋亡率的影响

Hoechst 33258 是与 DNA 特异结合的荧光染

料。经荧光显微镜观察,  $H_2O_2$  损伤组可见细胞核固缩, 凝聚及凋亡小体形成等典型的细胞凋亡形态而正常细胞染色质均匀疏松 (图 1 所示), 原花青素 50 mg/L 组使呈高强度的细胞明显减少, 多数细胞呈均匀弥漫的荧光。正常对照组内皮细胞凋亡百分比为  $13.9\% \pm 8.1\%$ ,  $H_2O_2$  损伤组内皮细胞凋亡百分比为  $54.8\% \pm 11.5\%$ , 与正常组比较有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 取原花青素中间浓度保护组内皮细胞凋亡率为  $25.7\% \pm 8.9\%$ , 与损伤组比较有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

表 2 原花青素对  $H_2O_2$  损伤人脐静脉内皮细胞释放丙二醛、乳酸脱氢酶和超氧化物歧化酶的影响 ( $\bar{x} \pm s$   $n = 6$ )

分 组	MDA (mmol/L)	LDH (U/L)	SOD (U/L)
对照组	1.08 $\pm$ 0.25	544.73 $\pm$ 83.19	26.85 $\pm$ 3.89
$H_2O_2$ 损伤组	3.25 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	1022.64 $\pm$ 175.23 <sup>a</sup>	6.16 $\pm$ 2.84 <sup>a</sup>
原花青素 25 mg/L 组	2.52 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>	781.08 $\pm$ 48.98 <sup>ac</sup>	18.73 $\pm$ 3.04 <sup>ab</sup>
原花青素 50 mg/L 组	1.91 $\pm$ 0.28 <sup>ac</sup>	656.71 $\pm$ 37.66 <sup>ac</sup>	23.55 $\pm$ 5.92 <sup>b</sup>
原花青素 100 mg/L 组	1.28 $\pm$ 0.26 <sup>c</sup>	514.92 $\pm$ 62.20 <sup>c</sup>	24.28 $\pm$ 4.06 <sup>c</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较, b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与  $H_2O_2$  损伤组比较。

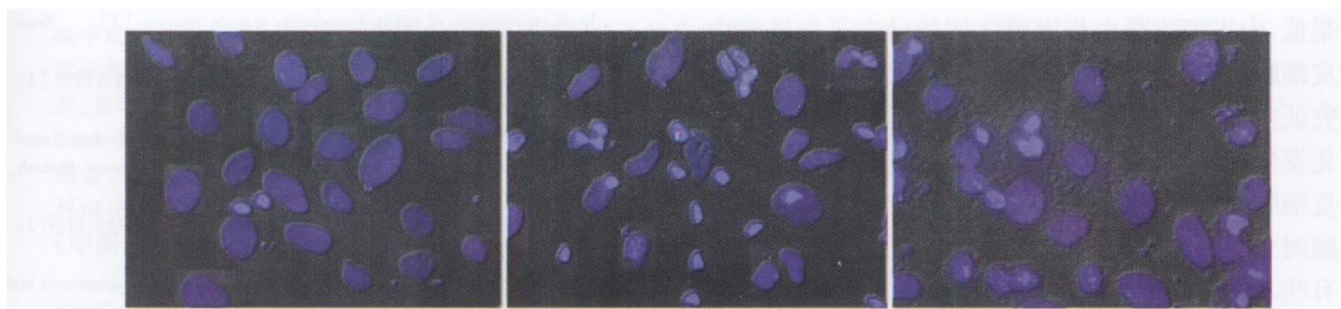


图 1 细胞核形态的 33258 染色 ( $\times 400$ ) 左为对照组, 中为  $H_2O_2$  损伤组, 右为 50 mg/L 原花青素组。

## 2.4 原花青素对 bcl-2 蛋白表达的影响

与损伤组比较原花青素组 bcl-2 蛋白表达明显上调, 且随浓度增加 bcl-2 蛋白表达上调。

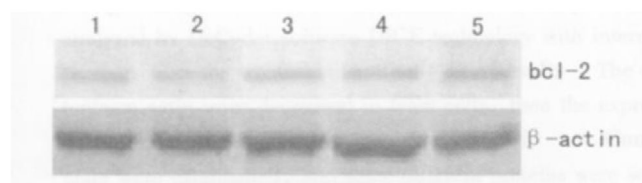


图 2 原花青素对 bcl-2 蛋白表达的影响 ( $n = 4$ ) 1 为正常对照组, 2 为过氧化氢损伤组, 3 为原花青素 25 mg/L 剂量组, 4 为原花青素 50 mg/L 剂量组, 5 为原花青素 100 mg/L 剂量组。

## 3 讨论

血管内皮细胞结构和功能损伤与动脉粥样硬化的发生和发展有着密切关系, 它是动脉粥样硬化的始动因素<sup>[4]</sup>。活性氧自由基是内皮细胞损伤的主要原因之一。 $H_2O_2$  是机体产生的活性氧, 在过氧化条件下能分解成一系列复杂产物, 如氧自由基。氧自由基可通过对生物膜中多不饱和脂肪酸的过氧化引起细胞损伤, 引发机体细胞内脂质发生过氧化, 膜结构破坏, 膜通透性增加, 导致组织损伤, 最终形成动脉粥样硬化斑块。

血管内皮细胞活性的高低可以反映细胞的代谢与增殖。近年研究已证明 MTT 法可用于研究血管内皮细胞的活性, MTT 能被活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶还原为难溶性的蓝紫色结晶物甲臞并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能, 因此可以间接反映活细胞的数量<sup>[5]</sup>。在一定细胞数范围内, MTT 结晶物形成的量与细胞数成正比。本研究发现,  $H_2O_2$  使内皮细胞的甲臞形成量减少, 而预先加入原花青素可促进甲臞的形成, 说明原花青素具有抗  $H_2O_2$  诱导的内皮细胞的损伤的作用。

脂质过氧化作用对内皮细胞有明显的损伤作用, 可表现为内皮细胞结构和功能的改变及其合成和分泌功能的平衡失调等。因此, 具有抗脂质过氧化能力的药物, 也可达到防治动脉粥样硬化的目的<sup>[6]</sup>。LDH 是细胞损伤后的代谢产物, 它的活力反映细胞损伤的程度。MDA 是自由基与生物膜多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化的产物, 它的含量反映氧自由基的水平及脂质过氧化的程度。此外, MDA 可与核酸及蛋白质发生交联, 使之受损。因此, MDA 不仅是细胞损伤的代谢产物, 而且是导致细胞损伤的机制之一。本研究发现,  $H_2O_2$  可导致人脐静脉内皮细胞产生的 LDH 和 MDA 增多, 这表明  $H_2O_2$  能引起人脐静脉内皮细胞的氧化损伤, 同时也

抑制了细胞的增殖代偿能力。原花青素的预作用可抑制  $H_2O_2$  的损伤作用,使 LDH 活力和 MDA 含量降低。机体正常下存在完整的抗氧化体系,如 SOD 过氧化物酶在细胞浆和线粒体内发挥重要的防御作用。 $H_2O_2$  导致的抗氧化酶活力下降,清除氧自由基的能力降低等会进一步加重细胞损伤。本研究表明原花青素可提高损伤内皮细胞中 SOD 的活力。由此可见,原花青素可以减轻  $H_2O_2$  引起的内皮细胞的损伤,对血管内皮细胞损伤时的保护具有重要意义。

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<sup>[7]</sup>。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<sup>[8]</sup>。在众多的调控细胞凋亡的因子中,有些基因是促进细胞发生凋亡,而有些基因是促进细胞生存,抑制凋亡。细胞凋亡因子 bcl-2 是最具有代表的一个基因蛋白, bcl-2 过度表达可以特异地抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>。本实验通过 Hoechst 33258 荧光染色明显观察到,  $H_2O_2$  可导致内皮细胞大量凋亡,而预先加入原花青素培养,可明显抑制内皮细胞的凋亡。其机制可能是上调抗凋亡

基因 bcl-2 蛋白表达抑制内皮细胞的凋亡。本实验结果表明原花青素可以减轻对内皮细胞的氧化损伤,抑制内皮细胞凋亡。其保护作用可能机制是通过其抗氧化抗凋亡作用来实现的,其确切机制有待进一步实验证明。

#### [参考文献]

- [1] 王维蓉,林蓉,彭宇,等. 丹参酮 ②A 对过氧化氢损伤人血管内皮细胞的保护作用 [J]. 中草药, 2006, 29 (1): 49-51.
- [2] 王计良,毛朝旭,薛伟珍,等. 原花青素抑制同行半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞的毒性作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (11): 967-970.
- [3] Yan GM, Lin SZ, Iw in RP, et al. Activation of G proteins bidirectionally affects apoptosis of cultured cerebellar granule neurons [J]. Neurochem, 1995, 65 (6): 2 425-431.
- [4] 徐雅琴,张钧华,唐朝枢. 氧化低密度脂蛋白和血管内皮损伤 [J]. 心血管病学进展, 2000, 21 (1): 26-29.
- [5] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. Immunol Methods, 1983, 65 (1-2): 55-63.
- [6] 高琳琳,王浩. 中药保护血管内皮细胞结构和功能的研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (10): 907-910.
- [7] Dimmeler S, Zeher AM. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression [J]. Circ Res, 2000, 87 (6): 434-439.
- [8] Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanism and implication for cardiovascular disease [J]. Circ Res, 1998, 82 (11): 1 111-120.
- [9] Xu H, Jin XQ, Jing L, et al. Effect of sodium fluoride on the expression of bcl-2 family and osteopontin in rat renal tubular cells [J]. Biol Trace Elem Res, 2006, 109 (1): 55-60.

(此文编辑 李小玲)