

黄芩苷对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用

康超, 张秋香, 赵美丽

(金乡县人民医院心内一科, 山东省金乡县 272200)

[关键词] 动脉粥样硬化; 氧化型低密度脂蛋白; 黄芩苷; 人脐静脉内皮细胞

[摘要] 目的 观察黄芩苷对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的血管内皮细胞的保护作用。方法 将体外培养的人脐静脉内皮细胞(EAhy926)分成对照组、ox-LDL 组、黄芩苷组和不同浓度的黄芩苷(25、50 和 100 mg/L)+ox-LDL 组,培养 24 h。采用 CCK-8 检测细胞活力,ELISA 检测细胞培养上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平,Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达。结果 与 ox-LDL 组相比,50、100 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组细胞存活率明显升高($P<0.05$),细胞培养上清中 TNF- α 和 IL-6 水平均明显下降($P<0.05$),Bax/Bcl-2 比值降低($P<0.05$)。结论 黄芩苷对预防内皮细胞损伤的保护功能可能是通过抑制炎症因子,减少细胞凋亡,增强细胞活性实现的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective effect of Baicalin on ox-LDL induced injury of human umbilical vein endothelial cells

KANG Chao, ZHANG Qiu-Xiang, ZHAO Mei-Li

(First Department of Cardiac Internal Medicine, Jinxiang People's Hospital, Jinxiang, Shangdong 272200, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Oxidized low density lipoprotein; Baicalin; Human umbilical vein endothelial cells

[ABSTRACT] **Aim** To observe the protective effect of Baicalin on vascular endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** In vitro cultured human umbilical vein endothelial cells (EAhy926) were divided into control group, ox-LDL group, Baicalin group and different concentrations of Baicalin (25, 50 and 100 mg/L)+ox-LDL groups, cultured 24 h. Cell viability was detected by CCK-8, ELISA was used to detect the level of IL-6 and TNF- α in cell culture supernatant, Western blot was used to detect the expression of apoptosis related protein Bax and Bcl-2. **Results** Compared to the ox-LDL group, the cell survival rates of 50, 100 mg/L Baicalin+ox-LDL groups were significantly increased ($P<0.05$), the protein levels of both TNF- α and IL-6 in cell culture supernatant were decreased significantly ($P<0.05$), and the ratio of Bax/Bcl-2 decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Baicalin protects against endothelial cell injury, which may be achieved by inhibiting inflammatory factors, reducing apoptosis and enhancing cell activity.

心血管疾病是我国居民最主要的死亡原因,每年约有 350 万人死于各类心血管病^[1]。动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症性的病理改变,是心血管疾病最主要的病因,As 的发生和发展是复杂的,其病理生理过程主要包括内皮细胞功能失调,炎症细胞浸润,血脂紊乱及血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)分化,其中氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是公认的 As 的独立危险因子,参与 As 发生发

展的各个环节^[2-3]。黄芩苷是一种黄酮类单体化合物,它从传统中药黄芩的干燥根中提取,是黄芩及其制剂的主要质量控制成分,近年来大量研究发现,黄芩苷具有抗炎、抑制 VSMC 增殖、抗氧化、调节免疫等作用,从理论上讲其可作为预防 As 的有效天然药物^[4]。但黄芩苷对 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤的效应尚未见报道。本研究以 ox-LDL 为诱导因子,作用于人脐静脉内皮细胞 EAhy926,检测细胞活力、炎症相关因子 TNF- α 和 IL-6 表达水平、细胞

[收稿日期] 2016-07-20

[修回日期] 2016-12-14

[作者简介] 康超,住院医师,研究方向为冠心病的发病机制及其介入治疗,E-mail 为 sdjxkc@163.com。通讯作者赵美丽,硕士,主治医师,研究方向为冠心病、心衰的发病机制以及心律失常的诊断和治疗,E-mail 为 zml8171@sina.com。

凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达情况,探讨黄芩苷对保护血管内皮细胞的可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

EAhy926 细胞株购自 ATCC; ox-LDL 购自北京索莱宝科技有限公司;黄芩苷购自 Sigma 公司,临用时将药物溶解于含 0.01% DMSO 培养液,现用现配。CCK-8 试剂盒购自日本同仁公司; TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒购自 R&D Systems; Bax、Bcl-2 抗体购自 Santa Cruz 公司;酶标二抗购自中杉金桥生物技术有限公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。二氧化碳培养箱 (Thermo)、酶标仪 (Bio-Rad)、电泳系统 (上海天能) 由山东省金乡县人民医院中心实验室提供,流式细胞仪 (Beckman Coulter) 由济宁医学院附属医院中心实验室提供。

1.2 细胞培养

EAhy926 细胞株解冻复苏后转移至细胞培养皿中,用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基在 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱内培养。经 2~3 天细胞生长成单层汇合状态后,用 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代。实验所用细胞均为对数生长期状态良好的细胞。

1.3 细胞活力测定

收集对数生长期的 EAhy926 细胞,以 2.5×10^8 Cells/L 的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,培养 24 h,待细胞长成良好的单层后,随机分为 6 组,每组设 5 个复孔:①对照组:换正常培养液;②ox-LDL 组:换含有 50 mg/L ox-LDL 的培养液;③黄芩苷组:换含有 100 mg/L 黄芩苷的培养液;④不同浓度黄芩苷+ox-LDL 组:分别换含有 25、50 和 100 mg/L 黄芩苷的培养液,孵育 6 h 后分别加入 ox-LDL 使其终浓度达到 50 mg/L。将其置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱内培养 24 h,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μ L,37℃ 孵育 1 h 后于酶标仪 450 nm 处检测各孔光密度值 (A),细胞存活率=(实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。

1.4 TNF- α 和 IL-6 水平测定

收集对数生长期的 EAhy926 细胞,以 2.5×10^8 Cells/L 的密度接种于 6 孔板中,具体处理分组同上,每组设 3 个复孔。收集各组细胞培养液上清后,采用 ELISA 测定 TNF- α 和 IL-6 水平。按 ELISA 试剂盒说明书操作:将不同浓度的标准品以及待测品

以每孔 100 μ L 加入 96 孔酶标板,加盖,37℃ 反应 120 min;洗板液洗板 4 次,加入生物素标记物,37℃ 孵育 60 min,洗板 4 次;加 TMB 显色液避光室温孵育 20 min,加入终止液终止反应。在 450 nm 波长下读取每孔吸光度值,绘制标准曲线。用各样本孔测得的吸光度均值从标准曲线上得到相应的浓度值,再乘以各自稀释倍数,得实际值。

1.5 Western blot 检测 Bax 和 Bcl-2 的表达

用 RIPA 裂解液冰上裂解细胞 30 min 后,12000 r/min、4℃ 离心 10 min 后取上清。加适量上样缓冲液,沸水中煮 5 min 制备蛋白样品。经 12% SDS-PAGE 100 V 恒压电泳,250 mA 恒流湿转膜 90 min,将蛋白转移至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后分别加 Bax (1:500)、Bcl-2 (1:500) 或 β -actin (1:5 000) 抗体,4℃ 孵育过夜;TBST 洗 3 次,加上辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:2000),室温下孵育 1 h, TBST 洗 4 次后进行 ECL 显色发光。X 光胶片用 Image J 软件进行分析,以灰度值的比值作相对量分析。

1.6 流式细胞分析法检测 Bax 和 Bcl-2 的表达

按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,0.25% 胰酶 (不含 EDTA) 消化待检测细胞,用 RPMI1640+10% FBS 终止消化,重悬制成单细胞悬液。PBS 洗涤细胞 2 次,1000 r/min 离心 5 min, PBS (含 1% FBS) 重悬细胞,收集细胞。加入 500 μ L Binding Buffer 重悬细胞。加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μ L Propidium Iodide,混匀。室温避光静置反应 5~15 min。用 400 目的尼龙网过滤后,1 h 内进行流式细胞仪的观察和检测。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芩苷对 ox-LDL 诱导的 EAhy926 细胞活力的影响

ox-LDL 组、黄芩苷组、25、50 及 100 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组细胞存活率分别为 69.4% \pm 4.2%、96.8% \pm 2.9%、74.5% \pm 4.3%、89.8% \pm 5.3%、91.7% \pm 5.1%。与 ox-LDL 组相比,50 和 100 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组细胞存活率明显升高 ($P < 0.05$;图 1)。

2.2 细胞培养上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平

与 ox-LDL 组相比,50 和 100 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组 TNF- α 和 IL-6 水平均明显下降 ($P < 0.01$;表 1)。

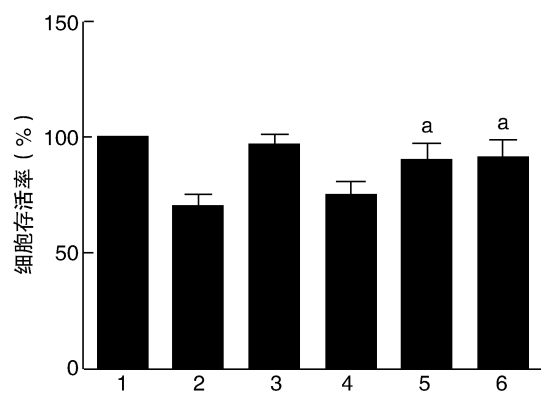


图 1. 不同浓度黄芩苷对 ox-LDL 诱导的内皮细胞存活率的影响($n=5$) 1 为对照组,2 为 ox-LDL 组,3 为黄芩苷组,4 为 25 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组,5 为 50 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组,6 为 100 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组。a 为 $P<0.05$,与 ox-LDL 组比较。

Figure 1. Effects of different concentrations of Baicalin on survival rate in endothelial cells induced by ox-LDL($n=5$)

表 1. 各组细胞培养上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平 ($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g/L}$, $n=4$)

Table 1. The protein levels of TNF- α and IL-6 in cell culture supernatant from different groups($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g/L}$, $n=4$)

分组	TNF- α	IL-6
对照组	150.08 \pm 1.81	71.42 \pm 1.52
ox-LDL 组	487.25 \pm 4.45	401.56 \pm 10.07
黄芩苷组	162.09 \pm 1.67	91.25 \pm 1.28
25 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组	428.92 \pm 3.12	371.54 \pm 4.16
50 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组	263.15 \pm 5.01 ^a	217.93 \pm 3.39 ^a
100 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组	259.87 \pm 2.48 ^a	218.67 \pm 2.11 ^a

a 为 $P<0.01$,与 ox-LDL 组比较。

2.3 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达

不同浓度的黄芩苷干预 6 h 后再加入 ox-LDL 刺激内皮细胞,Bax 的蛋白表达量下降,Bcl-2 的蛋白表达量有所升高。与 ox-LDL 组比较,50 和 100 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组 Bax/Bcl-2 比值均明显降低($P<0.05$;图 2)。流式细胞分析法检测 Bax 和 Bcl-2 的表达与 Western blot 检测结果相一致(图 3)。

3 讨论

目前认为 ox-LDL 的升高是 As 的重要危险因素^[3]。ox-LDL 作为氧自由基的携带者,不仅能够直接影响内皮细胞通透性、分泌调节及炎症反应等功能,也可能通过某些信号通路诱导内皮细胞凋亡,导致内皮屏障功能明显降低^[5-6],与 As 等心血管疾病的发生发展密切相关。如何保护血管内皮功能不受损伤成为近年来心脑血管疾病防治的热点。

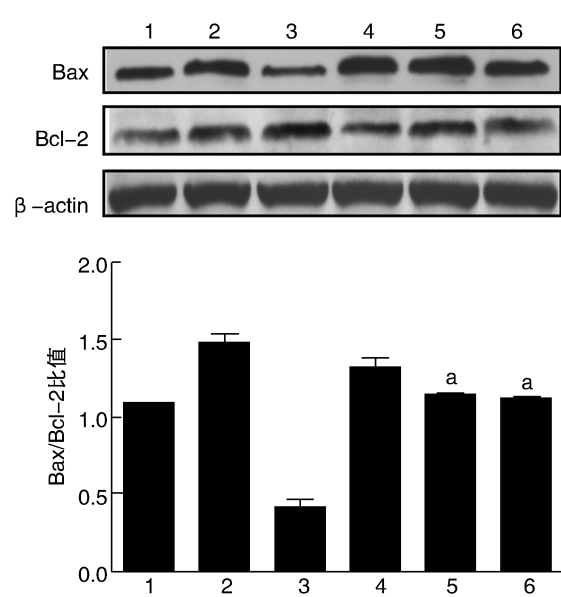


图 2. 不同浓度黄芩苷对 ox-LDL 诱导的内皮细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响($n=3$) 1 为对照组,2 为 ox-LDL 组,3 为黄芩苷组,4 为 25 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组,5 为 50 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组,6 为 100 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组。a 为 $P<0.05$,与 ox-LDL 组比较。

Figure 2. Effects of different concentrations of Baicalin on Bax and Bcl-2 protein expression in endothelial cells induced by ox-LDL($n=3$)

黄芩苷是中药黄芩的最主要质量控制成分,具有抗炎、抗氧化、减轻缺血再灌注损伤、免疫调节等广泛的药理作用^[7-8]。秦明春等^[9]研究表明黄芩苷对 TNF- α 诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡有抑制作用,TNF- α 明显抑制细胞增殖分裂过程,诱导细胞凋亡,黄芩苷对人脐静脉血管内皮细胞的生长增殖具有一定的促进作用。顾琼琼等^[10]研究表明黄芩苷对 As 有干预作用,其机制可能与降低 IL-6 表达进而下调 hs-CRP 及凝血酶激活的纤溶抑制物水平有关。细胞凋亡是一种程序化死亡的过程,只有在受到一定的体内或体外因素刺激下才会启动。通常情况下 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达相对稳定,当细胞内 Bcl-2 较多时,Bcl-2 和 Bax 的异源二聚体增多,凋亡趋势减弱;当细胞内 Bax 较多时,Bax 本身形成的同源二聚体占主导,则易于发生凋亡。Bax/Bcl-2 比值对决定细胞是否进入凋亡状态有重要意义^[11-12]。

本研究采用 ox-LDL 损伤的 EAhy926 细胞建立 As 体外实验模型,并用黄芩苷进行干预,结果发现,黄芩苷能够抑制 ox-LDL 引起的细胞存活率降低,降低相关炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达水平,并使 Bax/Bcl-2 比值降低从而抑制内皮细胞凋亡,证明黄芩苷对 ox-LDL 诱导的 EAhy926 损伤有一定的保护

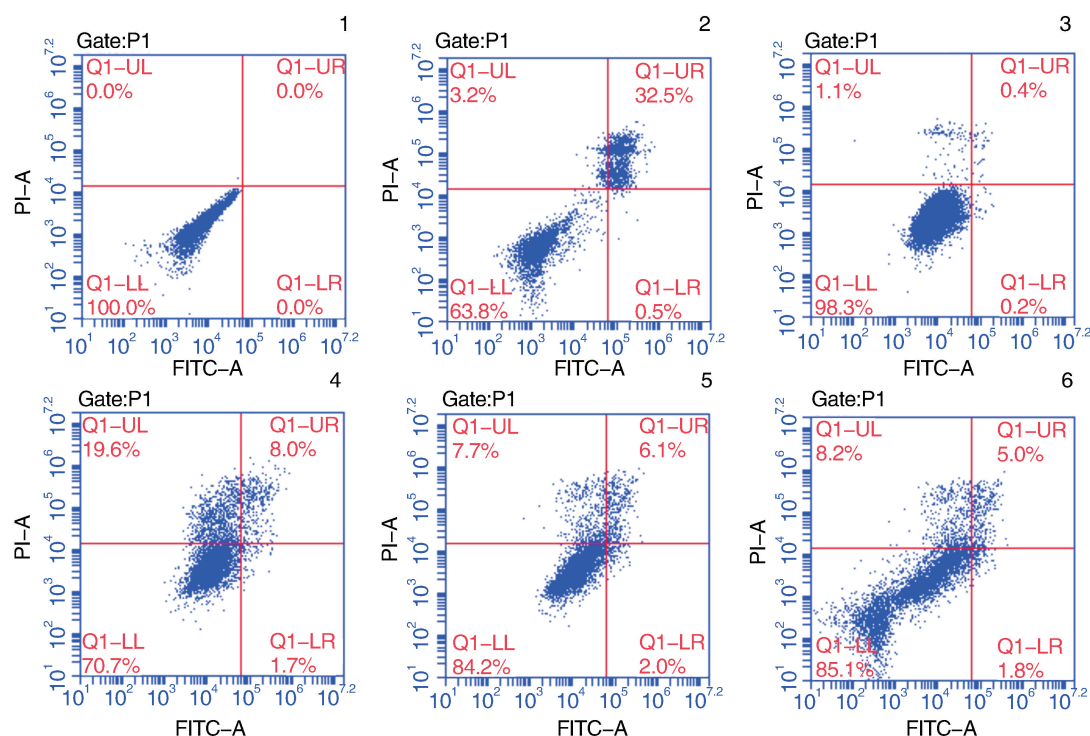


图 3. 不同浓度黄芩苷对 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡的影响 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为黄芩苷组, 4 为 25 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组, 5 为 50 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组, 6 为 100 mg/L 黄芩苷+ox-LDL 组。

Figure 3. The results of different concentrations of Baicalin on apoptosis in endothelial cells induced by ox-LDL

作用。

综上所述, 黄芩苷对 ox-LDL 诱导的 EAhy926 损伤有一定的保护功能, 可能是通过抑制炎症因子, 减少细胞凋亡, 增强细胞活性, 减轻内皮细胞损伤, 保持内皮细胞的完整性来实现的, 为将天然药物黄芩苷应用于 As 发生发展的防治提供一定的理论支持。

[参考文献]

- [1] 高润霖, 刘力生. 中国心血管病报告 2013 概要[J]. 中国循环杂志, 2014, 29(7): 487-491.
- [2] Guo J, Li HZ, Zhang WH, et al. Increased expression of calcium-sensing receptors induced by ox-LDL amplifies apoptosis of cardiomyocytes during simulated ischaemia reperfusion[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(3): 128-135.
- [3] Yang J, Yu J, Li D, et al. Store-operated calcium entry-activated autophagy protects EPC proliferation via the CAMKK2-MTOR pathway in ox-LDL exposure[J]. Autophagy, 2016, 28: 1-17.
- [4] 刘纯, 宋成文. 黄芩苷对血管内皮细胞作用机制的研究进展[J]. 华南国防医学杂志, 2015, 29(7): 569-571.
- [5] Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb

Vasc Biol, 2011, 31(5): 969-979.

- [6] Bae YS, Lee JH, Choi SH, et al. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: Toll-like receptor-4 and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2[J]. Circ Res, 2009, 104(2): 210-218.
- [7] 胡世林, 冯学锋. 黄芩研究的某些新进展[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(11): 728.
- [8] 辛文好, 宋俊科, 何国荣, 等. 黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(6): 647-653.
- [9] 秦明春, 王若光, 尤昭玲, 等. 黄芩苷对 TNF- α 诱导下人脐静脉血管内皮细胞影响的初步研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(8): 2016-2019.
- [10] 顾琼琼, 刘向群, 王敏, 等. 黄芩苷对动脉粥样硬化大鼠血浆 TAFI 及 hs-CRP、IL-6 水平的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(12): 862-864.
- [11] Guo J, Zhang K. Effects of ethyl pyruvate on myocardial apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax proteins after ischemia-reperfusion in rats[J]. Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2008, 28(3): 281-283.
- [12] 孙洁, 田林红, 王收宝. 黄芩苷对糖尿病大鼠肾脏细胞凋亡及其 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(5): 757-760.

(此文编辑 文玉珊)