

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2018)26-07-0698-07

## 洋葱精油对 ox-LDL 诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用

欧学兰, 杨春艳, 魏锦秋, 余刘勤, 周春阳

(川北医学院药物研究所 药学院, 四川省南充市 637007)

[关键词] 洋葱精油; 有机硫化物; 动脉粥样硬化; JAK/STAT 通路; NF- $\kappa$ B 通路

[摘要] **目的** 探讨洋葱精油是否对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤具有保护作用。**方法** 对购买的鲜洋葱进行显微鉴别, 索氏提取法提取鲜洋葱中的精油, GC-MS 法分析精油中的脂溶性成分。MTT 法检测不同浓度及不同时间点洋葱精油对 HUVEC 细胞增殖活力的影响。80 mg/L ox-LDL 诱导 HUVEC 24 h 建立 HUVEC 损伤模型。采用油红 O 染色法及检测细胞内总胆固醇(TC)和游离胆固醇(FC)含量, 确定是否已形成 HUVEC 损伤。ELISA 试剂盒、ROS 试剂盒、SOD 试剂盒对洋葱精油体外抗动脉粥样硬化作用进行初步研究。**结果** 对购买的鲜洋葱进行显微鉴别证实用于实验的材料为洋葱。从 26615.5 g 鲜洋葱中得到精油 9.9008 g, 挥发油平均得率为 0.372%。GC-MS 分析结果显示洋葱精油中有机硫化物的总相对含量为 47.64%, 其中含量最高的是 2-Thiazolidinethione(12.52%), 其次为 1,3,5-Trithiane(4.42%)和 Diallyldisulphide(3.82%)。200 mg/L 的洋葱精油处理 6 h 时细胞增殖活力最好; 80 mg/L 的 ox-LDL 诱导 HUVEC 24 h 细胞内出现大量红染颗粒且 FC/TC  $\geq$  50%, 表明 HUVEC 细胞内脂质聚集和胆固醇、甘油三酯代谢紊乱, 已造成 HUVEC 损伤。洋葱精油显著减少 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤模型炎症因子白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 的分泌( $P < 0.01$ )和活性氧的产生( $P < 0.01$ ); 促进抗炎因子 IL-10 的产生( $P < 0.01$ )及增加细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性( $P < 0.05$ )。**结论** 本研究制备得到的洋葱精油对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤模型具有保护作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

### Protective effect of onion essential oil on the injury of human umbilical vein endothelial cells induced by ox-LDL

OU Xuelan, YANG Chunyan, WEI Jinqiu, YU Liuqin, ZHOU Chunyang

(Institute of Materia Medica, School of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637007, China)

[KEY WORDS] onion essential oil; organic sulfides; atherosclerosis; JAK/STAT pathway; nuclear factor kappa B pathway

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether the onion essential oil from *Allium cepa* has a protective effect on the oxidative damage cell model of atherosclerosis (As) and whether the protective mechanism is related to the regulation of janus kinase/signal transduction and transcriptional activator (JAK/STAT) pathway and NF- $\kappa$ B pathway. **Methods**

Volatile oil extracting equipment was used to extract the essential oil from fresh *Allium cepa*. GC-MS was used to analyze the liposoluble components of the essential oil from *Allium cepa*. MTT method was used to detect the effect of the essential oil at different concentration and time on the cell proliferation of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). The HUVEC damage model has been established by using 80 mg/L oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to HUVEC for 24 h. The cell was stained by oil red O. The total cholesterol (TC) was detected by commercial kits. Free cholesterol (FC)/TC was more than or equal to 50%, which indicated whether HUVEC damage has been formed. ELISA kit, reactive oxygen species (ROS) kit and superoxide dismutase (SOD) kit were used to study the onion essential oil of anti-atherosclerosis effect and mechanism in vitro. **Results** 9.9008 g essential oil was extracted from 26615.5 g fresh *Allium cepa*, and the average yield of essential oil was 0.372%. GC-MS analysis showed that the total relative content of organic sulfide in the essential oil was 47.64%, among which the content of 2-thiazolidinethione among the organic sulfide com-

[收稿日期] 2017-11-24

[修回日期] 2018-03-16

[基金项目] 川北医学院药理学重点学科建设项目(2015); 四川省教育厅课题(13ZA0231)

[作者简介] 欧学兰, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 2234672348@qq.com。通信作者周春阳, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药理, E-mail 为 chunyangzhou@hotmail.com。

pounds was the highest (12.52%), followed by 1,3,5-trithiane (4.42%) and diallyldisulphide (3.82%). The cell proliferation was the best after 200 mg/L onion essential oil had acted on HUEVC for 6 h. HUEVC was induced by 80 mg/L ox-LDL for 24 h, the cells had a large number of red dye particles and FC/TC was not less than 50% of HUVEC cells which showed lipid accumulation and cholesterol and triglyceride metabolism has caused HUVEC damage. The onion essential oil significantly reduced HUVEC damage model secretion of inflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ( $P < 0.01$ ) and the produce of ROS, promoted the produce of anti-inflammatory factor IL-10 ( $P < 0.01$ ) and increased activity of intracellular SOD ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The onion essential oil produced in this study has protective effect on the HUVEC damage model induced by ox-LDL.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)性病变是目前世界上心脑血管疾病(cardiocerebrovascular disease, CCVD)发生率与死亡率高的首位原因<sup>[1]</sup>。洋葱(*Allium cepa*)属百合科、葱属草本植物,又名玉葱、葱头、球葱等,在民间用于防治动脉硬化症<sup>[2]</sup>。虽然国外对洋葱的研究要比国内深入,但是由于洋葱的特有气味(有机硫化物),在临床实验时往往被西方国家禁止使用<sup>[3]</sup>。现代医学研究表明<sup>[4]</sup>,洋葱的许多生理功效归因于洋葱中的有机硫化物,且认为洋葱防治动脉硬化症的有效成分是其中的精油(富含有机硫化物)。但洋葱精油抗 As 作用尤其是其作用机制还不充分明晰。因此,本实验通过利用氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)建立 HUVEC 损伤模型,探讨洋葱精油对 As 进程中 HUEVC 损伤的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与试剂

酶标仪(Spectramax 190, Molecular Devices),高速低温离心机(Thermo Mcrol17R, 美国),CO<sub>2</sub>细胞培养箱(3111, Thermo Forma),荧光倒置显微镜(CD-KX4, Olympus),GC-MS(7890B 5977, Agilent)。色谱级甲酸、乙腈、DMSO 购自 Sigma 公司。醋酸锌、N,N-二甲基对苯二胺溶液、硫酸铁铵、Na<sub>2</sub>S 购自科龙公司。RPMI1640 培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液、青霉素-链霉素双抗购自 Hyclone 公司。ox-LDL 购自广州奕源生物科技有限公司。AG490、活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒及白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-10 的 ELISA 试剂盒购自欣博盛公司。HUEVC 购自中乔新舟(批号为 ZQ 0113)。洋葱产自甘肃省平凉市。

### 1.2 洋葱提取物有机硫化物含量测定

采用亚甲基蓝分光光度法测定不同洋葱提取物有机硫化物含量。配制浓度梯度为 100、50、25 和 12.5  $\mu\text{mol/L}$  的 Na<sub>2</sub>S 溶液做标准曲线,同时配制 100 mg/L 的洋葱提取物溶液,各取 0.5 mL,每管加入 2.5 mL 去离子水后依次加入 0.5 mL 1% (质量分数)醋酸锌、0.5 mL 0.2% (质量分数) N,N-二甲基对苯二胺溶液,再加入 0.05 mL 10% (质量分数)硫酸铁铵溶液,室温静置 20 min。调零管用去离子水代替 Na<sub>2</sub>S 溶液,于 670 nm 读取光密度(OD)值<sup>[5]</sup>。

### 1.3 洋葱精油提取及 GC-MS 分析

取 26.615 kg 鲜洋葱切碎,按鲜洋葱:水=1:1.5 投料,匀浆,沸水浴(100  $^{\circ}\text{C}$ )灭酶 20 min。加入大蒜自制的蒜氨酸酶 25 mL(5 g 大蒜/100 g 鲜洋葱),25  $^{\circ}\text{C}$  酶解洋葱 50 min。将处理好的样品采用索氏提取器提取 5 h,得漂浮少许油状物的水溶液。二氯甲烷分别萃取 3 次,合并二氯甲烷萃取液加入无水硫酸钠干燥,保留二氯甲烷溶液提取层,于 40  $^{\circ}\text{C}$  水浴旋蒸,回收二氯甲烷即得洋葱挥发油<sup>[6]</sup>。平行多次提取实验,将所得挥发油混合在一起,取出适量,用二氯甲烷稀释,用于 GC-MS 分析。

### 1.4 HUEVC 细胞增殖活力测定

采用 MTT 法检测不同浓度及不同时间点洋葱精油对 HUEVC 细胞增殖活力的影响。复苏 HUEVC,以含 89% RPMI1640 培养基+10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素的培养基培养细胞,在细胞融合度达 95%时予以传代。收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,于 96 孔板每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液,铺板使待测细胞调密度至  $10^3 \sim 10^4$ /孔(边缘孔用无菌 PBS 填充)。5%CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}\text{C}$  孵育至细胞单层铺满孔底。分别加入洋葱精油溶液 0、6.25、12.5、25、50、100、200 mg/L,设置调零孔(含 0.1% DMSO 的 RPMI1640 培养基),每组 5 个复孔,每孔 180  $\mu\text{L}$  洋葱精油溶液或培养基,5%CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}\text{C}$  孵育。于 1、3、6、12、24、48 h 时每孔加入 20  $\mu\text{L}$  的 MTT 溶液(5 g/L,即 0.5%MTT),继续培养 4 h 后终止培养。去除孔

内培养液,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD<sub>570nm</sub>处测量各孔的吸光度值。实验重复三次,取平均值。细胞增殖活力=(洋葱精油处理组 OD 值-调零孔 OD 值)/(对照组 OD 值-调零孔 OD 值)

### 1.5 HUVEC 损伤模型的建立

培养 HUEVC,待细胞生长处于对数期时,加入 80 mg/L ox-LDL 诱导 HUEVC 24 h 建立 HUVEC 损伤模型<sup>[7]</sup>。采用油红 O 染色法及测定细胞内游离胆固醇(FC)和总胆固醇(TC)比值判断 HUVEC 细胞内脂质聚集,并测定胆固醇、甘油三酯代谢情况以判断 As 是否形成<sup>[8]</sup>。

### 1.6 实验分组

①正常对照组:加入含 0.1% DMSO 的无血清 RPMI1640 培养基;②HUVEC 模型组:80 mg/L ox-LDL 诱导 HUEVC 24 h 后加入含 0.1% DMSO 的无血清 RPMI1640 培养基;③洋葱精油组:80 mg/L ox-LDL 诱导 HUEVC 24 h 后加入 200 mg/L 的洋葱精油溶液;④PDTC 组:加入 100  $\mu\text{mol/L}$  的 PDTC 溶液作用于 HUEVC 1 h,弃上清,加入 80 mg/L ox-LDL 诱导 HUEVC 24 h 后加入含 0.1% DMSO 的无血清 RPMI1640 培养基;⑤ PDTC+洋葱精油组:加入 100  $\mu\text{mol/L}$  的 PDTC 溶液作用于 HUEVC 1 h,弃上清,加入 80 mg/L ox-LDL 诱导 HUEVC 24 h 后加入 200 mg/L 的洋葱精油溶液;⑥AG490 组:20  $\mu\text{mol/L}$  的 AG490 溶液作用于 HUEVC 1 h,弃上清,加入 80 mg/L ox-LDL 诱导 HUEVC 24 h 后加入含 0.1% DMSO 的无血清 RPMI1640 培养基;⑦AG490+洋葱精油组:20  $\mu\text{mol/L}$  的 AG490 溶液作用于 HUEVC 1 h,弃上清,加入 80 mg/L ox-LDL 诱导 HUEVC 24 h 后加入 200 mg/L 洋葱精油溶液。

### 1.7 IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 等炎症相关因子检测

实验方法同 1.6。200 mg/L 洋葱精油溶液作用 HUEVC 损伤模型 6 h,吸取各组含药上清液,按 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  含量。

### 1.8 双荧光素酶荧光染色法检测细胞内活性氧水平

实验方法同 1.6。200 mg/L 洋葱精油溶液作用 HUEVC 6 h,弃各组培养液。PBS 沿 24 孔板孔壁缓缓加入轻轻冲洗细胞 2~3 次,风干,每孔加入 10  $\mu\text{mol/L}$  的 DCFH-DA 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵育 45 min,弃上清,PBS 冲洗 3 次于 525、488 nm 荧光定量检测。检测完毕立即在荧光显微镜下观察并拍照<sup>[9]</sup>。

### 1.9 SOD 试剂盒检测洋葱精油对 As 细胞氧化损伤模型 SOD 活性的影响

实验方法同 1.6。弃各组培养液,胰酶消化细

胞,1500 r/min 离心 5 min 得各组细胞沉淀。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)说明书测定各组细胞蛋白浓度以及 SOD 试剂盒说明书测定 SOD 活性<sup>[10]</sup>。按公式计算 SOD 抑制率,即 SOD 抑制率(%)=[(A 对照-A 空白)-(A 测定-A 测定空白)] $\div$ (A 对照-A 空白);按公式计算 SOD 的活力,即 SOD 活力(U/mg)=SOD 抑制率 $\div$ 50% $\times$ 反应体系稀释倍数 $\div$ 待测样本蛋白浓度(g/L)。

### 1.10 统计学处理方法

数据采用 GraphPad Prism 5 软件进行分析,计量资料采用  $\bar{x}\pm s$  描述,组间比较采用方差分析及  $t$  检验; $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 亚甲基蓝分光光度法测定不同洋葱提取物有机硫化物含量

$\text{Na}_2\text{S}$  标准曲线方程为  $Y=0.0028X-0.012$ ,  $R^2=0.9985$ (图 1)。在洋葱超声提取物、洋葱回流提取物、洋葱精油这三种洋葱提取物中洋葱精油中的有机硫化物含量最高(图 2)。

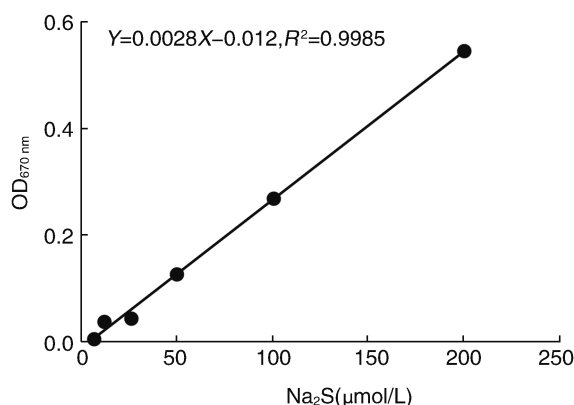


图 1.  $\text{Na}_2\text{S}$  标准曲线

Figure 1.  $\text{Na}_2\text{S}$  standard curve

### 2.2 洋葱精油提取及 GC-MS 分析

从 26.615 kg 鲜洋葱中提取得到 9.9008 g 洋葱精油。洋葱精油为黄色透明液体,具有浓烈的洋葱气味,称量后计算挥发油平均得率为 0.372%。GC-MS 分析结果发现,洋葱精油中有机硫化物的总相对含量为 47.64%,其中含量最高的是 2-Thiazolidinethione (12.52%),其次为 1,3,5-Trithiane (4.42%) 和 Diallyldisulphide (3.82%) (表 1 和图 3)。

### 2.3 不同浓度及不同时间点 HUEVC 增殖活力

在 1~6 h,洋葱精油对 HUEVC 细胞的增殖活力

随时间呈浓度依赖性的增加,有促进生长作用。12~24 h,洋葱精油对 HUEVC 细胞的增殖活力先随时间呈浓度依赖性的增加,但洋葱精油达到 100 mg/L 时细胞增殖活力反而下降。48 h 后洋葱精油对 HUEVC 的细胞增殖活力随时间呈浓度依赖性下降趋势。洋葱精油对 HUEVC 的细胞增殖活力于 200 mg/L、6 h 时最高(图 4)。

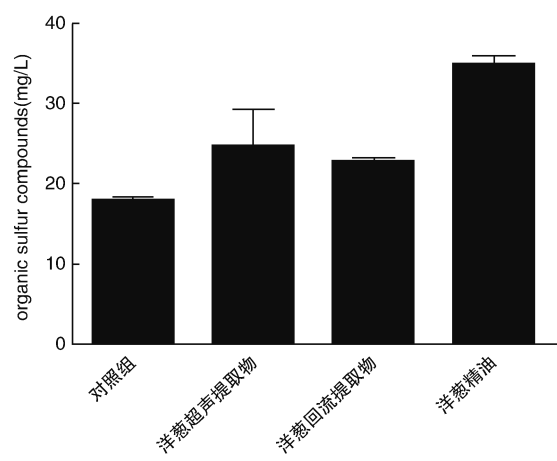


图 2. 洋葱精油中的有机硫化物含量  
Figure 2. The content of organic sulfur compounds from onion essential oil

2.4 HUVEC 损伤模型的建立

油红 O 染色结果发现,用 80 mg/L 的 ox-LDL 诱导 HUEVC 24 h,染料已经进入细胞溶于脂质中形成大量红染颗粒,说明 HUVEC 已形成损伤(图 5);细胞中游离胆固醇含量为 486  $\mu$ mol/L,总胆固醇含量为 706  $\mu$ mol/L,FC/TC (68.83%)  $\geq$  50%,表明细胞

内胆固醇和甘油三酯代谢紊乱,已形成 HUVEC 损伤。

2.5 洋葱精油对 HUVEC 损伤模型分泌 IL-6、IL-10 和 TNF- $\alpha$  的影响

与正常对照组相比,HUVEC 模型组分泌的致炎因子 IL-6、TNF- $\alpha$  及抗炎因子 IL-10 均显著增加( $P < 0.01$ )。与 HUVEC 模型组相比,洋葱精油组分泌致炎因子 IL-6、TNF- $\alpha$  显著减少( $P < 0.01$ );抗炎因子 IL-10 显著增加( $P < 0.01$ )。与洋葱精油组相比,PDTC+洋葱精油组和 AG490+洋葱精油组炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  的分泌增加( $P < 0.01$ );抗炎因子 IL-10 分泌减少( $P < 0.01$ ;表 2)。表明洋葱精油降低 HUVEC 损伤模型致炎因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的分泌及增加抗炎因子 IL-10 分泌与调控 NF- $\kappa$ B 信号通路和 JAK/STAT 信号通路均有关。

2.6 洋葱精油对细胞内活性氧的影响

与正常对照组相比,HUVEC 模型组 ROS 含量显著增加( $P < 0.01$ )。与 HUVEC 模型组相比,洋葱精油组 ROS 含量显著减少( $P < 0.01$ ;图 6)。

2.7 洋葱精油对 HUVEC 损伤模型 SOD 活性的影响

与正常对照组相比,HUVEC 模型组 SOD 活性显著降低( $P < 0.01$ )。与 HUVEC 模型组相比,洋葱精油组细胞内 SOD 活性显著增加( $P < 0.01$ )。与洋葱精油组相比,PDTC+洋葱精油组 SOD 活性减小( $P < 0.05$ ;图 7)。洋葱精油降低 HUVEC 损伤模型细胞内 SOD 活性主要与调控 NF- $\kappa$ B 信号通路有关,与 JAK/STAT 信号通路无关。

表 1.GC-MS 分析洋葱挥发油中的有机硫化物

Table1. Organic sulfur compounds from the volatile oil of *Allium cepa* analyzed by Gas chromatography-mass spectroscopy

Peak	RT	Area%	Compound	Peak	RT	Area%	Compound
1	8.999	0.24	3,4-Dimethylthiophene	15	24.777	2.03	2-Ethylidene[1,3] dithiane
2	9.436	2.06	Disulfide, methyl 2-propenyl	16	26.994	0.47	Methyl 2-(methylthio) butyrate
2	12.052	3.22	Dimethyl trisulfide	17	29.735	2.30	Thiazole
4	15.903	0.44	Aminothiazole	18	33.142	1.37	7-Amino-6-methyl-7H-S-triazolo[5,1-c]-S-triazole-3-thio
5	16.709	0.01	Thiirane	19	35.252	1.26	Thiopropionamide
6	17.093	3.82	Diallyldisulphide	20	35.989	0.45	Methanethioamide
7	17.763	2.36	4-Thiazolidinone, 3-amino-2-thiox	21	39.362	0.02	1,2-Dithiolan
8	18.812	0.21	Propionic acid, 3-(allylthio)	22	39.989	0.08	Iberin nitrile
9	18.842	0.66	3H-1,2-Dithiole-3-thione, 5-methyl	23	45.954	0.18	tetrahydro-Thiazole
10	20.139	12.52	2-Thiazolidinethione	24	48.779	0.07	2-Amino-3-(propylthio) propionic acid
11	20.728	2.55	Phenol, 3-methyl-4-(methylthio)	25	50.064	0.13	S-Methyl isopropylphosphonamidothioate
12	21.321	4.42	1,3,5-Trithiane	26	55.071	0.87	1,2-Dithiolane
13	23.063	0.45	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene	27	55.820	0.40	Cyclic octaatomic sulfur
14	23.850	1.77	1,3-Dithiolane-2-thione				



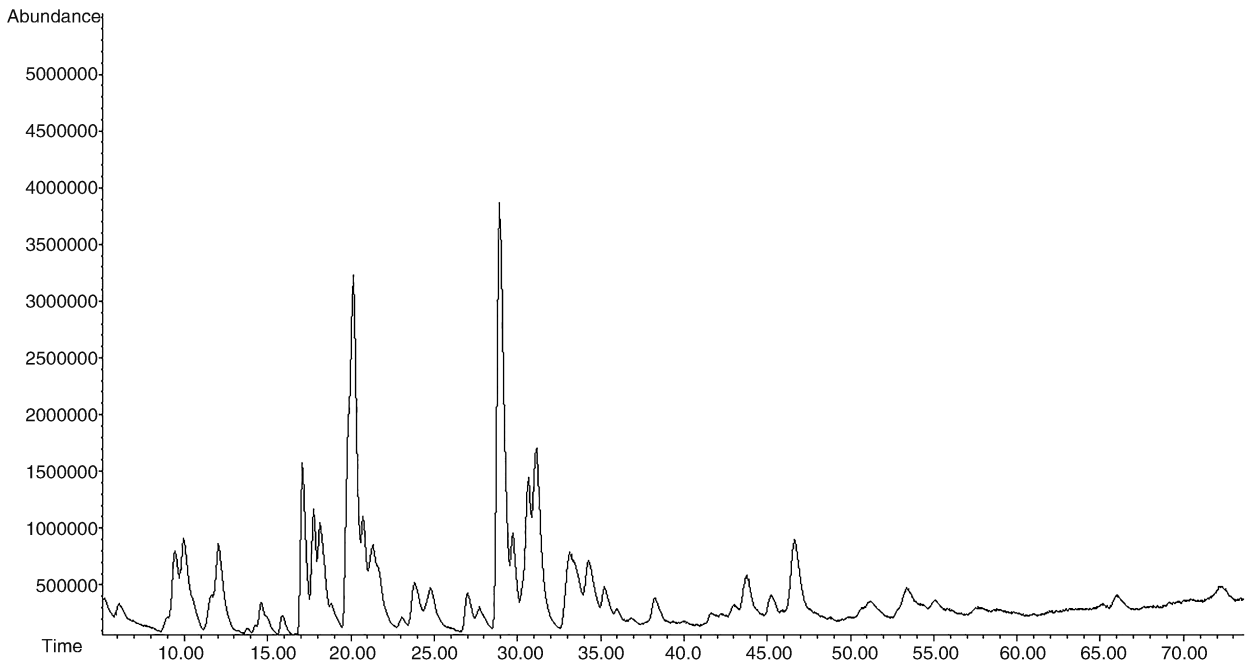


图 3.洋葱精油中的有机硫化物总离子流图  
Figure 3. GC-MS of the organic sulfur compounds from onion essential oil

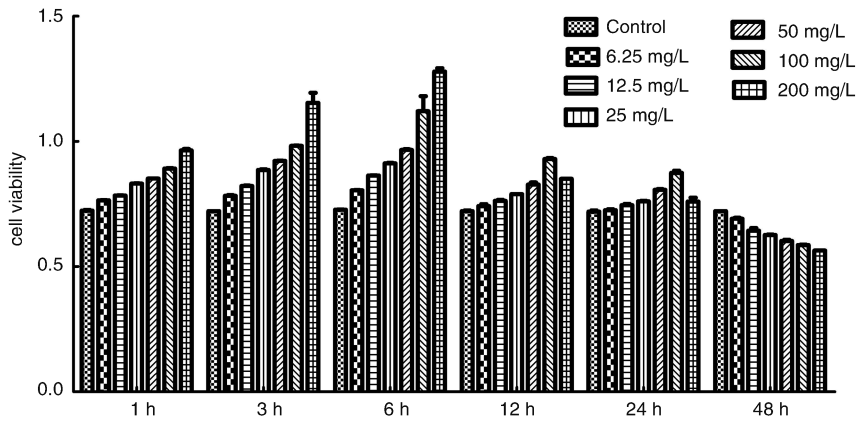


图 4. 洋葱精油对 HUVEC 增殖活力的影响  
Figure 4. The effect of onion essential oil on the cell proliferation of HUVEC

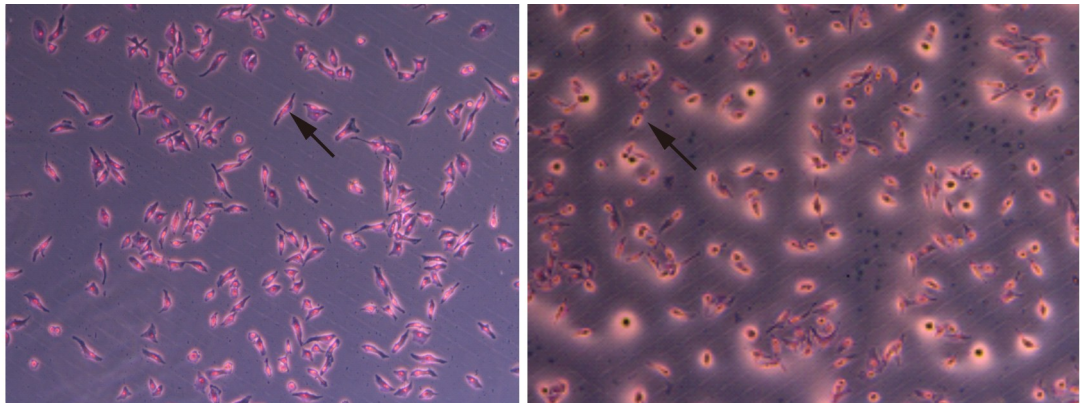


图 5. 油红 O 染色结果(10×10) 左为正常的 HUVEC,右为 ox-LDL 诱导的 HUVEC。  
Figure 5. Oil red O staining results(10×10)

表 2. 洋葱精油对 HUVEC 损伤模型分泌 IL-6、IL-10 和 TNF- $\alpha$  的影响( $\bar{x}\pm s$ , ng/L,  $n=5$ )

Table 2. Effects of onion essential oils on IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in HUVEC model ( $\bar{x}\pm s$ , ng/L,  $n=5$ )

分组	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-10
正常对照组	9.88 $\pm$ 0.408	10.05 $\pm$ 0.1845	9.28 $\pm$ 0.4867
HUVEC 模型组	73.31 $\pm$ 2.036 <sup>a</sup>	41.38 $\pm$ 2.571 <sup>a</sup>	17.74 $\pm$ 1.244 <sup>a</sup>
洋葱精油组	25.28 $\pm$ 1.362 <sup>b</sup>	19.72 $\pm$ 1.247 <sup>b</sup>	34.26 $\pm$ 1.214 <sup>b</sup>
PDTC 组	27.52 $\pm$ 1.563	27.65 $\pm$ 1.237	23.73 $\pm$ 1.283
PDTC+洋葱精油组	35.08 $\pm$ 1.957 <sup>c</sup>	26.69 $\pm$ 1.787 <sup>c</sup>	25.26 $\pm$ 0.9025 <sup>c</sup>
AG490 组	26.84 $\pm$ 1.350	30.27 $\pm$ 1.069	27.11 $\pm$ 1.351
AG490+洋葱精油组	36.42 $\pm$ 2.432 <sup>c</sup>	31.64 $\pm$ 2.633 <sup>c</sup>	21.84 $\pm$ 1.498 <sup>c</sup>

a 为  $P<0.01$ ,与正常对照组比较;b 为  $P<0.01$ ,与 HUVEC 模型组比较;c 为  $P<0.01$ ,与洋葱精油组比较。

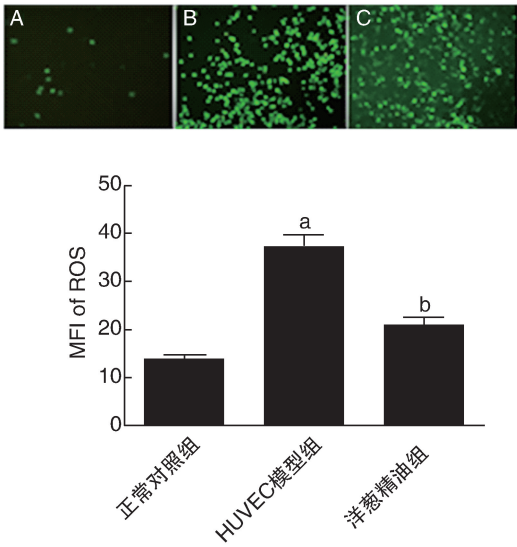


图 6. 洋葱精油对 HUVEC 损伤模型活性氧的影响(10 $\times$ 10) A 为正常对照组, B 为 HUVEC 模型组, C 为洋葱精油组。a 为  $P<0.01$ ,与正常对照组比较;b 为  $P<0.01$ ,与 HUVEC 模型组比较。

Figure 6. The effects of onion essential oils on ROS in HUVEC damage model(10 $\times$ 10)

### 3 讨论

本研究初步探讨了洋葱精油对 ox-LDL 诱导 HUVEC 损伤的保护作用。采用不同的提取方法获得不同的洋葱提取物,其中所含的有机硫化物含量不同。在几种不同的洋葱提取物中洋葱精油中所含的有机硫化物含量最高,这与文献报道的洋葱精油富含有机硫化物一致<sup>[11]</sup>。洋葱精油在浓度较低和作用于 HUVEC 损伤模型时间较短时,进入 HUVEC 细胞内的洋葱精油随浓度增加而增加,促进

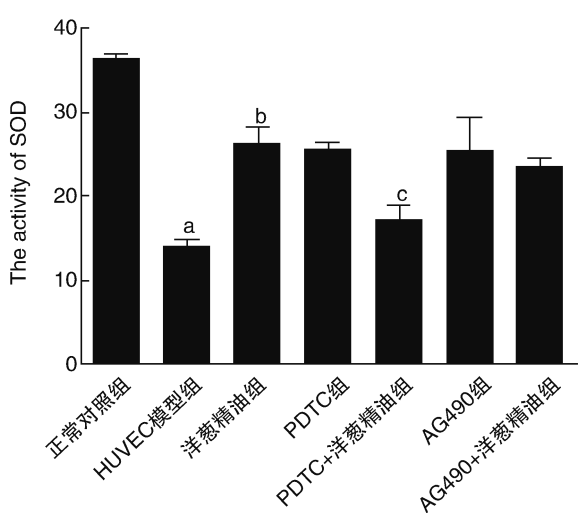


图 7. 洋葱精油对 HUVEC 损伤模型 SOD 活性的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ) a 为  $P<0.01$ ,与正常对照组比较;b 为  $P<0.01$ ,与 HUVEC 模型组比较;c 为  $P<0.05$ ,与洋葱精油组比较。

Figure 7. Effects of essential oil on SOD in HUVEC damage model ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

HUVEC 的增长。但当洋葱精油的浓度较高及作用与 HUVEC 时间较长时具有一定细胞毒性,对细胞增殖活力促进作用减弱,反而抑制 HUVEC 的增长。随着作用时间不断增加,洋葱精油的部分挥发以及培养基中的营养不断消耗均可能会导致细胞增殖活力进一步下降。

甘油三酯代谢紊乱是动脉粥样硬化形成的标志之一<sup>[12]</sup>,内皮细胞、平滑肌细胞、单核细胞、巨噬细胞等多种细胞内含有过高甘油三酯易导致细胞外脂质沉着、细胞内脂质聚集、白细胞募集、粥样斑块形成;胆固醇代谢紊乱也是动脉粥样硬化的基础<sup>[13]</sup>。ox-LDL 能显著改变内皮细胞、单核细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞等细胞生物学性状,使其具备 As 表型共同参与 As 形成和发展<sup>[14]</sup>。80 mg/L ox-LDL 诱导 HUVEC 24 h 后建立 HUVEC 损伤模型,通过油红 O 染色方法观察发现,24 h 后染料已经进入细胞内,细胞内出现大量红染颗粒,说明细胞内已产生大量脂质,且 FC/TC  $\geq 50\%$  表明 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞内胆固醇和甘油三酯代谢紊乱,已形成 HUVEC 损伤。

血管内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞在炎症的不同阶段都可以分泌白细胞介素<sup>[15]</sup>。IL-6 可使机体产生慢性炎症并在某种程度上放大急性炎症反应,引起一些趋化因子及 ROS 释放直接参与并进一步加重 As 进程<sup>[16-17]</sup>。TNF- $\alpha$  存在于动脉粥样斑

块中,可刺激炎症因子生成直接促进炎症的发展<sup>[18]</sup>。IL-10具有抗炎和调节免疫等作用,其提高机体的抗炎能力是治疗As疾病的新方向<sup>[19]</sup>。ox-LDL诱导HUVEC可使细胞内甘油三酯和胆固醇代谢紊乱引起脂质聚集损伤内皮细胞,炎症反应启动,细胞内致炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-6和抗炎因子IL-10分泌增多。释放的TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-10可激活NF- $\kappa$ B促进IL-6、IL-8等炎症因子产生和释放,使炎症反应进一步加重。洋葱精油可以减少HUVEC损伤模型分泌炎症因子IL-6和TNF- $\alpha$ ,促进抗炎因子IL-10的分泌,从而保护ox-LDL诱导的HUVEC损伤。As进程中的平滑肌细胞、巨噬细胞以及内皮细胞中均能检测到活化的NF- $\kappa$ B因子<sup>[20]</sup>。NF- $\kappa$ B作为炎症反应的主要转录因子,可被IL-6、TNF- $\alpha$ 和CRP等激活调控许多细胞因子、细胞黏附分子、化学趋化因子、急性反应蛋白、生长因子及多种免疫受体的表达,参与动脉粥样硬化的全过程<sup>[19-20]</sup>。此外,NF- $\kappa$ B作为一种氧化还原敏感转录因子可被细胞间的ROS激活。As病变过程中ROS的生成增加将激活NF- $\kappa$ B,从而进一步促发炎症反应加快As的进程<sup>[21-22]</sup>。SOD在血管壁中可以调节超氧阴离子水平,减轻氧自由基对内皮细胞的过氧化损伤,从而保护内皮细胞,防止AS的形成。洋葱精油可以通过降低细胞内ROS水平减少NF- $\kappa$ B转录因子激活,使HUVEC损伤模型致炎因子IL-6、TNF- $\alpha$ 的分泌减少及抗炎因子IL-10分泌增加以及诱导内皮细胞SOD的表达从而抑制炎症反应延缓As进程。

酪氨酸蛋白激酶/信号转导子和转录激活子(janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)信号通路是一条由细胞因子刺激的信号转导通路,参与多种炎症因子的信号转导和调控过程<sup>[23]</sup>。在早期As的发展进程中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10、IL-1与JAK/STAT信号通路的活化紧密相关<sup>[24]</sup>。JAK/STAT信号转导途径始于JAK2磷酸化后激活,抑制JAK2活性后能抑制STAT3磷酸化,从而抑制IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 等炎症相关因子产生<sup>[25]</sup>。JAK/STAT信号通路在As的形成发展和稳定中起着重要的作用,阻断该信号通路能有效的防止As相关疾病的发生和加重<sup>[26]</sup>。洋葱精油减少TNF- $\alpha$ 、IL-6分泌和促进IL-10产生可能与调控JAK/STAT信号通路有关。

基于现有基础,尚需更进一步的研究证实洋葱精油对ox-LDL诱导HUVEC损伤的保护作用与调

控NF- $\kappa$ B信号通路和JAK/STAT信号通路有关。同时对保护ox-LDL诱导HUVEC损伤的下游靶点和基因,以及目前NF- $\kappa$ B信号通路和JAK/STAT信号通路调控的IL-6、IL-10和TNF- $\alpha$ 作用的受体和其他相关信号通路及指标进行更深入的研究。洋葱精油是一个混合物,通过此研究我们并不清楚对ox-LDL诱导HUVEC损伤起保护作用的是有机硫化物还是哪种化合物或是哪几种化合物。由于洋葱精油对HUVEC损伤模型保护作用的影响因素很多,有待于进一步分离得到洋葱精油化合物做更深入的研究和探索论证。

#### [参考文献]

- [1] 李博,周春阳. 硫化氢在动脉粥样硬化病变中的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(9): 963-968.
- [2] 廖春龙, 征阮, 印遇龙, 等. 洋葱化学成分、生理保健功能和我国洋葱加工现状与发展趋势[J]. 食品工业科技, 2010, 31(08): 409-416.
- [3] Li W, Tang C, Jin H, et al. Effects of onion extract on endogenous vascular H<sub>2</sub>S and adrenomedullin in rat [J]. Atherosclerosis, 2011, 12(9): 1427-1439.
- [4] Li C J, Yuan L, Ji T F, et al. Furostanol saponins from the seeds of *Allium cepa* L [J]. Fitoterapia, 2014, 99: 56-63.
- [5] 谢静, 曾强, 郑扬, 等. 活细胞硫化氢检测新方法[J]. 北京大学学报(医学版), 2013, 45(3): 489-492.
- [6] 李翔, 刘达玉, 邹强, 等. 洋葱精油提取工艺研究及化学成分GC/MS分析[J]. 中国调味品, 2013, 38(12): 82-85.
- [7] 易龙. 黄酮类植物化学物抑制内皮细胞氧化应激损伤的结构-效应关系研究[D]. 第三军医大学, 2010.
- [8] 许可为, 吴虹. 红景天苷对内皮细胞动脉粥样硬化损伤的保护作用研究[J]. 实用中西医结合临床, 2015, 15(7): 92-93.
- [9] 张军, 谷翔, 黄问银, 等. GLP-1对AGEs诱导H9C2心肌细胞凋亡的保护作用研究[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(1): 120-126.
- [10] 张妮, 曹慧敏, 宋囡, 等. 丹参酮IIA通过调节自噬小体对ox-LDL诱导内皮细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(3): 244-249.
- [11] Yuan L, Ji T F, Li C J, et al. Two new steroidal saponins from the seeds of *Allium cepa* L [J]. Chin Chem Lett, 2008, 99(4): 56-63.
- [12] 侯鹏高. 动脉粥样硬化与脂代谢紊乱研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015(7): 1039-1040.

(下转第730页)

- and disease[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368: 1845.
- [7] Sheng R, Qin ZH. The divergent roles of autophagy in ischemia and preconditioning [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36: 411-420.
- [8] Kirshenbaum LA. Regulation of autophagy in the heart in health and disease [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 60: 109.
- [9] Aviv Y, Shaw J, Gang HY, et al. Regulation of autophagy in the heart: "you only live twice" [J]. *Antioxidants Redox Signal*, 2011, 14: 2245-2250.
- [10] 郝阳, 郭晓辰, 张军平. 氧化应激和自噬在动脉粥样硬化中的作用研究新进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(4): 404-410.
- [11] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014[J]. *中华心血管病杂志*, 2014, 42(2): 98-122.
- [12] Brey EM, Lalani Z, Johnston C, et al. Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification [J]. *J Histochem Cytochem*, 2003, 51: 575-584.
- [13] 张彪, 韩伟, 庞海玉, 等. 完全随机缺失条件下连续型随机变量数据缺失插补方法的比较研究[J]. *中国卫生统计*, 2015, 32(4): 605-608, 612.
- [14] Zhang JL, Lu JK, Chen D, et al. Myocardial autophagy variation during acute myocardial infarction in rats: the effects of carvedilol [J]. *Chin Med J*, 2009, 122: 2372-2379.
- [15] Zhao M. The progress of autophagy involved in heart disease[J]. *Prog Physiol Sci*, 2011, 42: 81-85.
- [16] Yan L, Vatner DE, Kim SJ, et al. Autophagy in chronically ischemic myocardium[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 13807-13812.
- [17] Matsui Y, Takagi H, Qu X, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin-1 in mediating autophagy[J]. *Circ Res*, 2007, 100: 914-922.
- [18] Cao DJ, Wang ZV, Battiprolu PK, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors attenuate cardiac hypertrophy by suppressing autophagy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 4123-4128.
- [19] 韩全乐, 刘晓堃, 张琦, 等. 早发冠心病患者理想心血管健康行为和因素研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(12): 1268-1272.
- (此文编辑 文玉珊)

(上接第 704 页)

- [13] 刘明玥, 王帅, 吴崇明, 等. 动脉粥样硬化药理模型概述[J]. *国际药学研究杂志*, 2015, 42(1): 25-29.
- [14] 许可为, 吴虹. 红景天苷对内皮细胞动脉粥样硬化损伤的保护作用研究[J]. *实用中西医结合临床*, 2015, 15(7): 92-93.
- [15] 张安邦, 高杰, 李令根, 等. 相关炎症因子与动脉粥样硬化的关系[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2014, 42(5): 563-566.
- [16] 崔艳, 李艳. 白细胞介素 6 及其受体对动脉粥样硬化的作用[J]. *微循环学杂志*, 2016, 26(4): 66-70.
- [17] Akita K, Isoda K, Sato-Okabayashi Y, et al. An interleukin-6 receptor antibody suppresses atherosclerosis in atherogenic mice [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2017, 22(4): 84-89.
- [18] Pfeiler S, Gerdes N. Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins-focus on anti-inflammatory therapies [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2018, 29(1): 53-55.
- [19] Lópezfranco O, Hernándezvargas P, Ortizmuñoz G, et al. Parthenolide modulates the NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(8): 1864-1870.
- [20] Mitchell J P, Carmody R J. NF- $\kappa$ B and the transcriptional control of inflammation [J]. *Int Rev Cell Mol Bio*, 2018, 335, (12): 41-84.
- [21] Weij V V D, Toet K, Zadelaar S, et al. Anti-inflammatory salicylate beneficially modulates pre-existing atherosclerosis through quenching of NF- $\kappa$ B activity and lowering of cholesterol[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 213(1): 241-246.
- [22] Nowak W N, Deng J, Ruan X Z, et al. Reactive Oxygen Species Generation and Atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(5): 41-52.
- [23] 程初勇, 黄照河. JAK/STAT 信号通道与相关疾病的研究进展[J]. *湖北科技学报(医学版)*, 2016, 30(5): 448-451.
- [24] Laguna-Fernández A, Novella S, Bueno-Betí C, et al. Endothelial transcriptomic changes induced by oxidized low density lipoprotein disclose an up-regulation of Jak-Stat pathway [J]. *Vasc Pharmacol*, 2015, 73(5): 104
- [25] Wang R, Zhang Y, Xu L, et al. Protein inhibitor of activated STAT3 suppresses oxidized LDL-induced cell responses during atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36790.
- [26] Huang W B, Lü L, Zhang L. Effect of JAK/STAT pathway in atherosclerosis [J]. *J Shanghai Jiaotong University*, 2013, 33(4): 506-509.
- (此文编辑 许雪梅)