

丹参红花提取物保护内皮细胞免受氧化损伤的体外实验***

满永, 丁莉, 国汉邦, 王蕾, 王抒, 黎健

卫生部北京医院老年医学研究所, 北京市 100730
满永, 男, 北京市人, 汉族, 1990年北京卫生职业学校毕业, 主管技师, 主要从事动脉粥样硬化的发病机制的研究。
通讯作者: 黎健, 研究员, 博士生导师, 卫生部北京医院老年医学研究所, 北京市 100730
国家自然科学基金资助项目(300440065, 30572082)**; 北京市自然科学基金资助项目(7052059)*
中图分类号: R329.2 文献标识码: A 文章编号: 1671-5926(2006)39-0119-04
收稿日期: 2006-06-22 修回日期: 2006-07-26 (06-50-6-5052/N-Q)

In vitro experiment of danshen root and carthamus tinctorius extract in the protection of endothelial cells from oxidative damage

Man Yong, Ding Li, Guo Han-bang, Wang Lei, Wang Shu, Li Jian
Institute of Geriatric Medicine, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China
Man Yong, Technician-in-charge, Institute of Geriatric Medicine, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China
Correspondence to: Li Jian, Investigator, Tutor of doctor, Institute of Geriatric Medicine, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 300440065*, 30572082*; the Natural Science Foundation of Beijing City, No. 7052059*
Received: 2006-06-22 Accepted: 2006-07-26

Abstract

AIM: To investigate the production of reactive oxygen species (ROS), expression of NADPH oxidase 4 (NOX4) mRNA and apoptotic rate in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) treated with low density lipoprotein or serum-free, and interventional effect of danshen root and carthamus tinctorius extract.

METHODS: The experiment was performed at the Key Laboratory of Geriatric Medicine of Ministry of Health from November 2005 to May 2006. Fresh human umbilical cord was obtained to culture HUVECs. The cells were assigned into normal control group, serum-free group: cultured for 24 hours in serum-free medium; low density lipoprotein group: cultured with 800 mg/L low density lipoprotein medium for 16 hours; danshen root and carthamus tinctorius extract pretreatment group: After pretreatment with danshen root and carthamus tinctorius extract (brand name: Danhong injection, concentrated solution provided by Shanxi Buchang Group, number Z 20026866/Z 20026867) for 24 hours, 800 mg/L low density lipoprotein was added to culture for 16 hours or culture in serum-free medium for 24 hours. The effect of danshen root and carthamus tinctorius extract on HUVECs was observed with MTT method. NOX4 mRNA level was analyzed with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Apoptotic rate was measured with flow cytometry and ROS production was detected with DCFH-DA method.

RESULTS: NOX4 mRNA expression, ROS production and apoptotic rate in the low density lipoprotein group was 1.3 times, 1.2 times and 4 times of those in the normal control group. NOX4 mRNA expression, ROS production and apoptotic rate in the serum-free group was 1.4 times, 1.6 times and 3 times of those in the normal control group, respectively. NOX4 mRNA expression, ROS production and apoptotic rate in the danshen root and carthamus tinctorius extract pretreatment group was 0.4 times, 0.5 times and 0.2 times of those in the low density lipoprotein group, respectively. NOX4 mRNA expression, ROS production and apoptotic rate in the danshen root and carthamus tinctorius extract pretreatment group was 0.2 times, 0.5 times and 0.6 times of those in the serum-free group, respectively.

CONCLUSION: Danshen root and carthamus tinctorius extract can effectively prevent the NOX4 mRNA expression under high-lipid and ischemic status so as to inhibit ROS production and apoptotic rate in HUVECs, and

has effectively protective effect on endothelial cells.

Man Y, Ding L, Guo HB, Wang L, Wang S, Li J. In vitro experiment of danshen root and carthamus tinctorius extract in the protection of endothelial cells from oxidative damage. *Zhongguo Linchuang Kangfu* 2006; 10(39):119-22 (China)
满永, 丁莉, 国汉邦, 王蕾, 王抒, 黎健. 丹参红花提取物保护内皮细胞免受氧化损伤的体外实验[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(39):119-22 [www.zglckf.com]

摘要

目的: 观察低密度脂蛋白和无血清培养刺激下人脐静脉内皮细胞内活性氧、NOX4 mRNA水平和细胞凋亡的变化, 以及丹参红花提取物的干预作用。

方法: 实验于2005-11/2006-05在卫生部老年医学重点实验室完成。取新鲜脐带分离培养人脐静脉内皮细胞, 分为: 正常对照组。无血清培养组: 用无血清培养基培养24 h。低密度脂蛋白处理组: 以含有800 mg/L低密度脂蛋白的培养基培养16 h。丹参红花提取物预处理组: 用丹参红花提取物(商品名丹红注射液, 由陕西步长集团提供浓缩液, 国药准字Z 20026866/Z 20026867)预处理24 h后加入800 mg/L低密度脂蛋白继续培养16 h或在无血清培养基中培养24 h。以MTT法观察丹参红花提取物对人脐静脉内皮细胞生长的影响; 应用反转录-聚合酶链反应检测NOX4 mRNA水平; 用流式细胞仪分析细胞凋亡率; 并以DCFH-DA法检测细胞内活性氧生成量。

结果: 低密度脂蛋白处理组NOX4 mRNA表达、细胞内活性氧生成量和细胞凋亡为正常对照组的1.3倍、1.2倍和4倍。无血清培养组NOX4 mRNA表达、细胞内活性氧生成量和细胞凋亡分别为正常对照组的1.4倍、1.6倍和3倍。丹参红花提取物预处理组NOX4 mRNA表达、细胞内活性氧生成量和细胞凋亡分别为低密度脂蛋白处理组的0.4倍、0.5倍和0.2倍。丹参红花提取物组NOX4 mRNA表达、细胞内活性氧生成量和细胞凋亡分别为无血清培养组的0.2倍、0.5倍和0.6倍。结论: 丹参红花提取物能够有效抑制高脂及缺血状态下NOX4 mRNA表达水平, 从而抑制人脐静脉内皮细胞内活性氧的产生及细胞凋亡, 对内皮细胞起到很好的保护作用。

主题词: 脐静脉/细胞学; 内皮细胞; NADPH氧化酶; 活性氧; 细胞凋亡; 丹参; 红花

0 引言

业已证明, 血液中大量低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)在内皮下的沉积可导致内皮细胞损伤。LDL进入血管内皮细胞后可刺激细胞产生活性氧, 引起氧化修饰LDL的形成, 诱导内皮细胞凋亡^[1]。在正常生理情况下, 由于血液中存在抗氧化酶系统如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶, 内皮细胞产生的活性氧维持在较低水平, 一旦大量LDL进入内皮细胞, 则导致高水平活性氧的产生和氧化修饰LDL的形成, 并刺激内皮细胞产生细胞间黏附分子1和血管细胞黏附分子1等黏附因子, 造成炎症细胞浸润, 加重血管内皮的炎症损伤。Lee等^[2]发现无血清培养可增加活性氧生成, 导致细胞凋亡。这些研究提示活性氧在动脉粥样硬化的发生过程中起重要作用。因此, 探寻具有抗氧化作用的药物用于防治心脑血管病具有重要的临床意义和广阔的应用前景。本实验建立血管内皮细胞损伤模型, 观察丹参红花提

取物保护内皮细胞的作用,侧重其抗氧化作用。

1 材料和方法

设计:体外实验,分组对照。

单位:卫生部北京医院老年医学研究所。

材料:实验于2005-11/2006-04在卫生部老年医学重点实验室完成。脐带来自卫生部北京医院产科,产妇或家属签署知情同意书。丹参红花提取物(商品名丹红滴注液),由陕西步长集团提供浓缩液,国药准字Z20026866/Z20026867,是植物丹参、红花提取物,其主要成分是丹参素;LDL由卫生部北京医院老年研究所生化室超速离心提取。

设计、实施、评估者:实验由第六作者设计,其余作者实施完成,所有作者均受过专业培训。

方法:

人脐静脉内皮细胞分离培养:取长度约20cm的新鲜脐带,用生理盐水冲洗脐静脉后,以1g/L的型胶原酶灌注脐静脉20min,收集灌注液,800r/min离心6min,收集内皮细胞到25cm²培养瓶中,加入M199混合培养基(5mL)在37℃含体积分数为0.05的CO₂培养箱中培养,12h后更换新鲜培养基,以后每隔2天换液1次,待第二、三代细胞长至亚融合状态时用于实验。

实验分组:正常对照组。无血清培养组:用无血清培养基培养人脐静脉内皮细胞24h。LDL处理组:以含有800mg/L LDL的培养基培养人脐静脉内皮细胞16h。丹参红花提取物预处理组:用丹参红花提取物注射液/滴注液预处理24h后加入800mg/L LDL继续培养16h或在无血清培养基中培养24h。

MTT法测定内皮细胞的生长。在96孔细胞培养板中每孔种入人脐静脉内皮细胞(6~7)×10³个,总体积为200μL。培养24h后加入不同浓度(50,150,250,350,450mg/L)丹参红花提取物溶液继续培养48h,然后每孔加入0.5%的MTT 20μL,4h后弃去上清,加入150μL DMSO摇床震荡10min,用酶标仪测定波长570nm处吸光度。

流式细胞术分析细胞凋亡率:用2.5g/L胰蛋白酶消化后收集细胞,磷酸盐缓冲液洗涤细胞一次,用体积分数为0.7的乙醇5mL固定细胞;800r/min离心5min,磷酸盐缓冲液洗涤细胞二次;加入含RNase A(终浓度50mg/L)的磷酸盐缓冲液500μL,37℃水浴孵育30min;再加入碘化丙啶(PI),使其终浓度为50mg/L,4℃避光30min;300目尼龙网过滤,用流式细胞仪检测,计数10000个细胞,测定凋亡的细胞数。DCFH-DA法检测细胞内活性氧水平:应用活性氧检测试剂盒(上海碧云天试剂公司产品),按照说明书的流程操作:用无血清的培养基冲洗细胞两次,加5mL

无血清培养基和7μL DCFH-DA到25cm²的培养瓶中,在37℃含体积分数为0.05的CO₂的培养箱中孵育45min;磷酸盐缓冲液洗3次,用胰酶消化,加血清终止反应,用无血清培养基洗二次,用3mL无血清培养基重悬细胞;其中阳性对照组加阳性药物(试剂盒提供)5μL,常温下孵育1h;磷酸盐缓冲液冲洗两次,流式细胞仪计数8000个细胞,以检测细胞内平均荧光强度反应活性氧水平。

反转录-聚合酶链反应检测内皮细胞内NADPH氧化酶4(NADPH oxidase 4, NOX4)表达。按美国GIBCO公司的Trizol试剂盒说明提取各种细胞总RNA,以Promega公司试剂盒进行反转录。聚合酶链反应引物序列:-actin 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3',和5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3',扩增片段长度为539bp;NOX4 5'-CAG GAG GGC TGC TGA AGT ATC AA-3'和5'-TGA CTG GCT TAT TGC TCC GGA TA-3',扩增片段长度为303bp。聚合酶链反应条件:94℃预变性5min,94℃变性1min,68℃退火1min,72℃延伸1.5min,30个循环,72℃继续延伸7min。聚合酶链反应在15g/L的琼脂糖凝胶中电泳,加样量为8μL。电泳条带用凝胶成像系统Pharmacia Biotech分析。

主要观察指标:细胞生长情况,活性氧产生,细胞凋亡率,NOX4 mRNA水平。

统计学分析:所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,由第二作者用SPSS 10.0软件进行统计学t检验,以P<0.05判定差异的显著性。

2 结果

2.1 丹参红花提取物对内皮细胞生长的影响 图1结果显示,丹参红花提取物可以促进内皮细胞生长。用高至450mg/L的丹参红花提取物处理内皮细胞,也未见细胞毒性作用。

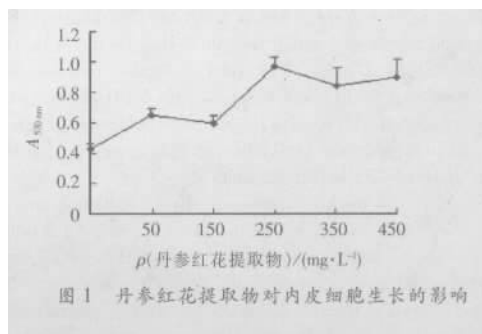
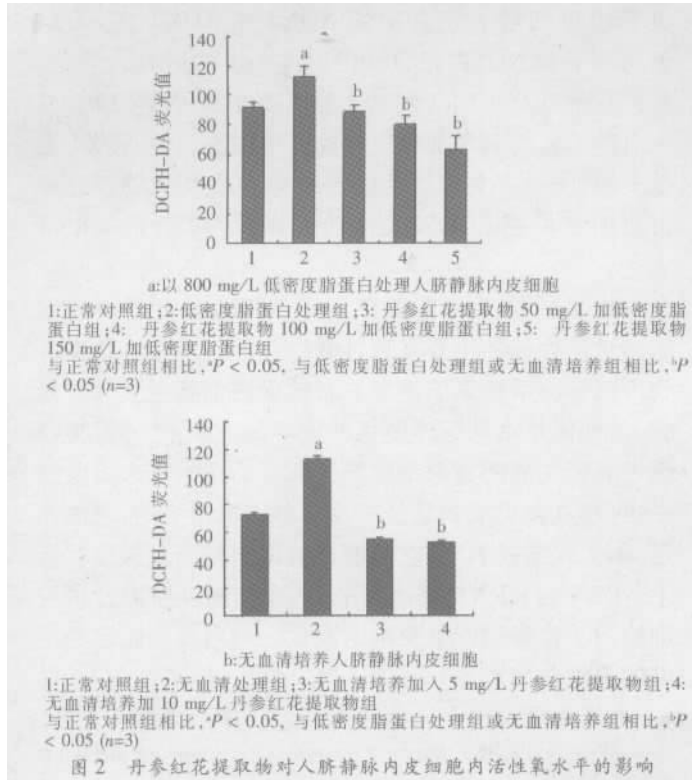


图1 丹参红花提取物对内皮细胞生长的影响

2.2 丹参红花提取物预处理对内皮细胞中活性氧生成的影响 结果显示,用800mg/L LDL处理16h,人脐静脉内皮细胞内活性氧生成量约为正常对照组的1.2倍(P<0.05, n=3),而用不同浓度丹参红花提取物预处理24h再加LDL处理16h细胞内活性氧水平显著降低(约为0.5倍, P<0.05, n=3)见图2a;类似地,用

低浓度丹参红花提取物预处理人脐静脉内皮细胞,可以抑制由无血清培养条件下引起的活性氧生成增加(分别为1.6倍及0.5倍, $P < 0.05$, $n=3$),见图2b。这些结果表明,丹参红花提取物可以拮抗LDL与缺血促进人脐静脉内皮细胞中活性氧生成的作用。



2.3 丹参红花提取物对内皮细胞凋亡的影响 LDL处理组人脐静脉内皮细胞细胞凋亡率显著高于正常对照组[(29.1 ± 8.9)%, (7.4 ± 0.43)%, $P < 0.05$],而用100 mg/L丹参红花提取物预处理再加LDL处理组的细胞凋亡率为(5.8 ± 1.2)%,接近正常对照组,显著低于LDL处理组($P < 0.05$, $n=3$)。在无血清培养条件下也得到类似结果,应用无血清培养基培养组细胞凋亡率为(23.6 ± 0.3)%,显著高于正常对照组($P < 0.05$, $n=3$),而5 mg/L丹参红花提取物预处理可以降低细胞凋亡率[(13.5 ± 0.6)%]。见图3。这些结果表明,丹参红花提取物预处理在降低内皮细胞内活性氧生成的同时,细胞凋亡发生率亦下降。

2.4 丹参红花提取物抑对人脐静脉内皮细胞 NOX4 mRNA 水平的影响 如图4所示,LDL处理组的NOX4 mRNA水平显著高于正常对照组(约为1.3倍, $P < 0.05$, $n=3$),而用较高浓度丹参红花提取物(150 mg/L)预处理再加入LDL组则显著低于LDL处理组(约为0.4倍, $P < 0.05$, $n=3$);在无血清培养条件下,内皮细胞的NOX4表达水平也显著高于正常对照组(约1.4倍, $P < 0.05$, $n=3$),而较低浓度丹参红花提取物(5, 10 mg/L)预处理可显著下调NOX4的mRNA表达(约为0.2倍, $P < 0.05$, $n=3$)。这些结果表明,LDL和无血

清培养通过上调人脐静脉内皮细胞中NOX4的表达水平,增加活性氧的生成,引起细胞凋亡。而丹参红花提取物可以拮抗LDL和无血清培养所导致的氧化损伤作用。

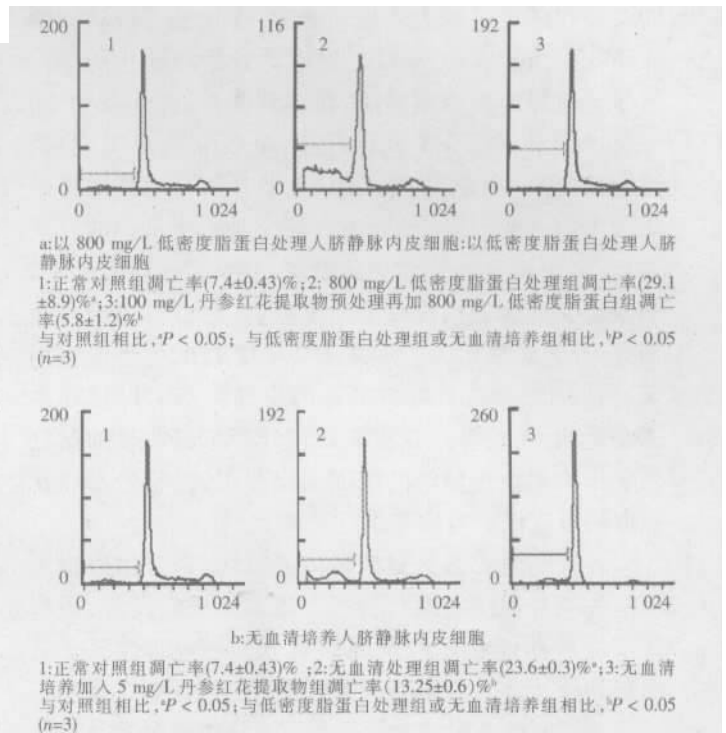


图3 丹参红花提取物对人脐静脉内皮细胞细胞凋亡率的影响

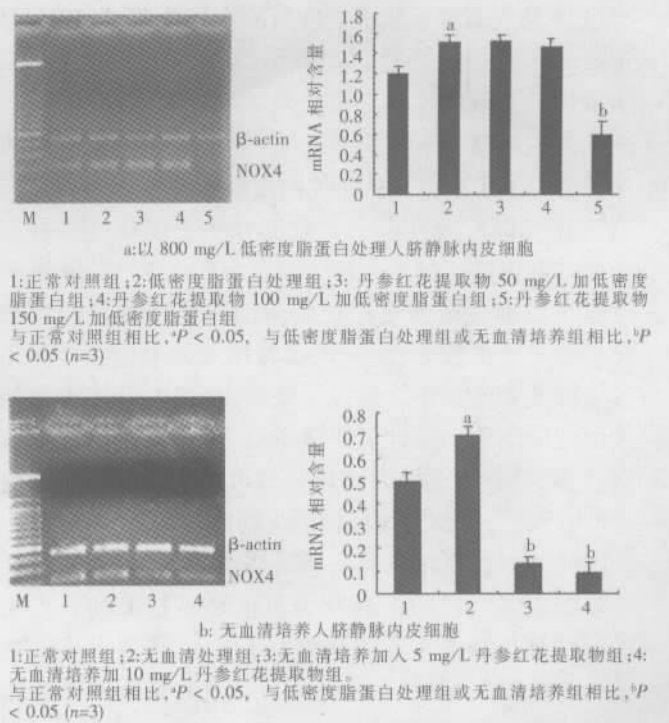


图4 丹参红花提取物对NOX4 mRNA表达的影响

3 讨论

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病,其病理变化包括血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、单核-巨噬细

胞、血小板功能的改变等。血管内皮细胞损伤是促进动脉粥样硬化发生发展的重要因素,保护内皮细胞免受损伤是防治动脉粥样硬化的关键^[3]。

在动脉粥样硬化众多的病因学说中,血浆脂质浸润与炎症学说是两大主流。血浆 LDL 水平与动脉粥样硬化呈负相关,而 LDL 促进动脉粥样硬化的第一步便是破坏内皮细胞功能,促进其凋亡;此外,LDL 还可以诱导核因子 B 表达升高,单核细胞浸润,启动炎症反应^[4]。因此,血浆 LDL 水平升高是动脉粥样硬化发生的重要因素。动脉粥样硬化是一个动态的发展过程,斑块阻塞血管腔导致血管狭窄、供血供氧不足,而缺血又能刺激内皮细胞功能损害、凋亡^[5],形成恶性循环,导致斑块增大。本文用高浓度 LDL 处理或只用无血清培养基培养人脐静脉内皮细胞都可以诱导内皮细胞凋亡,丹参红花提取物预处理可以明显抑制这两种因素单独作用时的内皮细胞凋亡,提示丹参红花提取物可以保护内皮细胞。

各种刺激状态又是如何施展破坏、诱导内皮细胞功能失调并促使它凋亡的呢?诸多的研究发现,一种调节血管功能状态的重要信号分子——活性氧在其中起到非常重要的作用。当机体内的活性氧产生大于清除速率时便会引起氧化应激。人体内多种酶及通路都可产生活性氧,如黄嘌呤氧化酶、NADPH 氧化酶(NOX)、线粒体电子传递链及一氧化氮合酶等,但只有 NOX 才是人血管系统中活性氧的主要来源^[3,6]。LDL 促进血管细胞功能变化,包括内皮细胞凋亡、平滑肌细胞增殖以及巨噬细胞吞噬脂质、泡沫细胞形成等,都与细胞内的活性氧升高有关^[4]。它可以通过胞浆的磷脂酶 A2 激活 NOX,从而使内皮细胞中活性氧表达升高^[7],还可以使内皮型一氧化氮合酶不耦联等多种途径使细胞内产生过多的活性氧^[8]。无血清培养基培养时也可以通过磷酸化途径刺激细胞内活性氧的积聚而最终导致细胞死亡^[2]。本实验用流式细胞术检测了各组活性氧的水平,研究结果显示,LDL 及无血清处理细胞时细胞内活性氧明显增加,细胞处于高氧化应激状态,丹参红花提取物预处理可以明显降低细胞内活性氧水平,从而有效保护内皮细胞免受氧化损伤。

此外,在氧化应激及超氧阴离子增多的情况下,血管细胞可以将 LDL 转化为氧化修饰 LDL 使其发生广泛的氧化修饰^[1];而氧化修饰 LDL 又将进一步促进活性氧的产生,促发恶性循环。在这种持久的刺激作

用下,容易导致内皮细胞屏障破坏、血小板黏附、平滑肌细胞增殖、单核细胞浸润并吞噬脂质形成泡沫细胞,最终发展为动脉粥样硬化。

近几年在各种组织中发现了 NOX 的 5 种同工酶,分别称为 NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 和 NOX5^[9]。血管内皮细胞表达其中的 NOX4 和 NOX2 且 NOX4 表达水平比 NOX2 高 20 倍^[5]。进一步的研究表明,血管内皮细胞产生的活性氧主要来源于 NOX4^[3],LDL 及无血清培养的刺激都可以导致内皮细胞内的 NOX4 表达上调^[10-12]。本文的结果显示,丹参红花提取物预处理可以明显抑制 LDL 及无血清培养时 NOX4 的 mRNA 表达。

本文的结果一方面证实了 NOX4 是血管内皮细胞产生活性氧的主要来源,同时也表明,丹参红花提取物可以抑制活性氧的产生,有效保护细胞免受氧化损伤。活性氧是动脉粥样硬化的重要促进因素,寻找抑制活性氧产生的药物对动脉粥样硬化的防治具有重要意义。丹参红花提取物是从中药材种提取出来的,来源充足。本实验结果表明,它能够有效抑制高脂及缺血状态下 NOX4 的 mRNA 表达水平,从而抑制人脐静脉内皮细胞内活性氧的产生及细胞凋亡,对内皮细胞起到很好的保护作用。

4 参考文献

- 1 屈顺林,唐蔚青,黎健. NADPH 氧化酶与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005,13(2):228-32
- 2 Lee SB, Cho ES, Yang HS, et al. Serum withdraw kills U937 cells by inducing a positive mutual interaction between reactive oxygen species and phosphoinositide 3-kinase. Cell signal 2005;17(2):197-204
- 3 Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, et al. NOX4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. Circulation 2004;109(2):227-33
- 4 Norata GD, Pirillo A, Pellegatta F, et al. Native LDL and oxidized LDL modulate cyclooxygenase-2 expression in HUVECs through a p38-MAPK, NF-kappaB, CRE dependent pathway and affect PGE2 synthesis. Int J Mol Med 2004;14(3):353-9
- 5 Kwon YG, Min JK, Kim KM, et al. Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. J Biol Chem 2001;276(14):10627-33
- 6 Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, et al. Superoxide production and expression of NOX family proteins in human atherosclerosis. Circulation 2002;105(12):1429-35
- 7 O'Donnell RW, Johnson DK, Ziegler LM, et al. Endothelial NADPH oxidase: mechanism of activation by low-density lipoprotein. Endothelium 2003;10(6):291-7
- 8 Stepp DW, Ou J, Ackerman AW, et al. Native LDL and minimally oxidized LDL differentially regulate superoxide anion in vascular endothelium in situ. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002;283(2):H750-9
- 9 Cheng G, Cao Z, Xu X, et al. Homologues of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. Gene 2001;269(1-2):131-40
- 10 Mever JW, Schmitt ME. A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. FEBS LETT 2000;472(1):1-4
- 11 Thum T, Borkak J. Mechanistic role of cytochrome P450 monooxygenases in oxidized low-density lipoprotein-induced vascular injury: therapy through LOX-1 receptor antagonism? Cir Res 2004;94(1):e1-13
- 12 Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, et al. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NADPH oxidase. Circulation 2004;109(2):227-33