

丹参多酚酸盐对过氧化氢诱导人内皮细胞 EA.hy926 氧化应激损伤的保护作用及机制*

吕林林, 安姿漪, 梁家健, 刘革修[△]

(暨南大学基础医学院血液研究所, 广东 广州 510632)

[摘要] **目的:** 探讨丹参多酚酸盐(salvianolate)对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞 EA.hy926 氧化损伤的保护作用及机制。**方法:** 体外培养 EA.hy926 细胞, 随机分为: 正常对照组、损伤组和抗损伤(丹参多酚酸盐 + 过氧化氢)组。采用 CCK-8 法检测细胞活性, Transwell 实验检测内皮细胞迁移能力; 一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒和 ELISA 法分别检测细胞培养液中 NO 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的水平; 流式细胞术检测细胞内超氧化物阴离子水平、线粒体跨膜电位和细胞凋亡情况; 采用 Western blot 法检测 caspase-3、cleaved-caspase3、Bcl-2、Bax、NF- κ B 和 p53 蛋白表达水平。**结果:** 与损伤组比较, 不同剂量的丹参多酚酸盐预处理可提高 EA.hy926 细胞的活性、降低内皮细胞的凋亡, 并促进细胞的迁移($P < 0.05$); 细胞上清液中 VEGF 和 NO 含量及细胞内线粒体膜电位水平显著升高($P < 0.05$); 细胞内 ROS 水平显著下降; NF- κ B、p53、Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白水平显著降低($P < 0.05$); Bcl-2 蛋白水平显著升高($P < 0.05$)。**结论:** 丹参多酚酸盐能减轻过氧化氢对 EA.hy926 细胞氧化应激的损伤作用, 其机制可能与 NF- κ B 通路的阻滞相关。

[关键词] 丹参多酚酸盐; 血管内皮细胞; 细胞凋亡; 氧化损伤; NF- κ B 信号通路

[中图分类号] R363.2; R329.2*5 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.05.015

Salvianolate attenuates oxidative stress injury of human endothelial EA.hy926 cells induced by hydrogen peroxide

LÜ Lin-lin, AN Zi-yi, LIANG Jia-jian, LIU Ge-xiu

(¹Institute of Hematology, Basic Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China. E-mail: tliugx@jnu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of salvianolate on oxidative damage induced by hydrogen peroxide in human endothelial EA.hy926 cells. **METHODS:** EA.hy926 cells were cultured *in vitro* and divided into the following groups: control group, damage group, and anti-damage groups (salvianolate + damage groups). The cell viability was measured by CCK-8 assay. The migration ability of the EA.hy926 cells was detected by Transwell assay. The content of nitric oxide (NO) in the culture supernatant of the EA.hy926 cells was examined. The levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by ELISA. The apoptosis, mitochondrial membrane potential and intracellular superoxide anion content of the EA.hy926 cells were analyzed by flow cytometry. The protein levels of caspase-3, cleaved caspase-3, Bcl-2, Bax, NF- κ B and p53 were determined by Western blot. **RESULTS:** Compared with damage group, the viability of EA.hy926 cells pretreated with salvianolate at different concentrations was significantly increased ($P < 0.05$). The apoptotic rate was significantly decreased ($P < 0.05$). Savianolate enhanced the migration ability of the cells. The levels of VEGF, NO and mitochondrial transmembrane potential were increased ($P < 0.05$), and the intracellular ROS level was significantly decreased ($P < 0.05$). The protein levels of NF- κ B, p53, Bax and cleaved caspase-3 were significantly decreased, and the protein level of Bcl-2 was markedly increased ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Savianolate reduces the damage of EA.hy926 cells by hydrogen peroxide exposure, and its mechanism may be related to the blocking of NF- κ B signaling pathway.

[KEY WORDS] Salvianolate; Vascular endothelial cells; Apoptosis; Oxidative damage; NF- κ B signaling pathway

[收稿日期] 2018-12-13 [修回日期] 2019-03-21

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81270568)

[△]通讯作者 Tel: 020-85220262; E-mail: tliugx@jnu.edu.cn

丹参多酚酸盐(salvianolate)是由丹参中提取的多酚酸盐类化合物制备而成的,其化学成分是丹参乙酸盐。近年来,大量研究报道不同的丹参制剂在体内外治疗心血管疾病的药理作用特点及临床应用情况,其中注射用丹参多酚酸盐用于冠心病稳定型心绞痛取得较好临床效果。研究显示,丹参多酚酸盐具有多途径保护血管内皮细胞的作用,如改善血管内皮舒缩功能、抑制血管内皮细胞黏附、抗炎、抗氧化应激、防止血小板聚集和黏附、减少氧化低密度脂蛋白及降低辐射损伤等^[1]。而血管内皮细胞损伤是心脑血管疾病发生的重要环节。血管内皮细胞易受到多种危险因素的影响,如高血压、高血糖、动脉粥样硬化、辐射和化疗等,并产生氧化应激和炎症反应。大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生以及一氧化氮(nitric oxide, NO)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)浓度的下降,都会影响血管内皮细胞的结构与功能、导致相关疾病发生发展^[2]。保护受损的血管内皮细胞对心脑血管疾病的发生发展具有阻遏作用。然而丹参多酚酸盐对氧化应激损伤的血管内皮细胞的保护作用机制尚不明确。本实验主要探讨丹参多酚酸盐对过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)诱导 EA. hy926 细胞氧化应激损伤的影响及机制,为丹参的临床应用和研发提供参考资料。

材 料 和 方 法

1 药 物

丹参多酚酸盐注射剂(上海绿谷制药有限公司;规格:每瓶 100 mg;批号:Z20050248),4 °C 冰箱保存。

2 主要试剂

人脐静脉血管内皮细胞 EA. hy926 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。30% 过氧化氢购自广州化学试剂厂;高糖 DMEM 培养液购自 HyClone;CCK-8 试剂购自日本同仁公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco;0.25% 胰酶购自 Sigma-Aldrich;ROS 试剂盒和线粒体膜电位试剂盒购自 BD;VEGF ELISA 试剂盒和 NO 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;细胞凋亡检测试剂盒和 DAPI 购自南京凯基科技发展有限公司;ECL 化学发光试剂盒购自 Thermo;兔抗人 caspase-3 单抗、兔抗人 cleaved caspase-3 单抗、兔抗人 Bax 单抗、鼠抗人 Bcl-2 单抗、鼠抗人 NF- κ B 单抗、鼠抗人 p53 单抗和鼠抗人 GAPDH 单抗均购自 CST。

3 主要方法

3.1 EA. hy926 细胞培养及其 H₂O₂ 损伤模型的建

立 复苏 EA. hy926 细胞,加入含 10% FBS 和 1% 双抗的高糖 DMEM 培养液,置于 37 °C、5 % CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。待细胞生长至 90% 融合时,用 PBS 洗 2 遍,加入 0.25% 胰酶消化 3 min 左右,再加入新鲜的培养液中和胰酶。将细胞悬液移入离心管,200 × g 离心 5 min 收集细胞,用新鲜培养液重悬细胞,并调整细胞浓度为 5 × 10⁷/L,每孔 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔板中,并置于培养箱中孵育 24 h。戴青里等^[3]研究表明,当 H₂O₂ 浓度大于 100 μmol/L 时,细胞大量死亡。故细胞培养 24 h,添加终浓度分别为 0、15、25、50 和 100 μmol/L 的 H₂O₂ 培养 24 h 以摸索构建血管内皮细胞氧化损伤的条件。每组设 4 个复孔,重复 3 次;根据细胞活性选择合适的过氧化氢浓度。

3.2 实验分组和 CCK-8 法检测细胞存活率 实验分为对照(control)组、损伤(25 μmol/L H₂O₂, damage)组和抗损伤(丹参多酚酸盐 + 25 μmol/L H₂O₂, anti-damage)组,其中抗损伤组分 3 个亚组,即丹参多酚酸盐的质量浓度分别为 50、100、200 mg/L^[4]。调整 EA. hy926 细胞密度为 5 × 10⁷/L,每孔 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔板内,并置于 5% CO₂、37 °C 的细胞培养箱中培养 24 h。然后加入丹参多酚酸盐溶液,使其终浓度分别为 50、100 和 200 mg/L;预处理 1 h 后加入 H₂O₂,继续置于培养箱中培养 24 h。然后更换不含血清的新鲜的培养液,并每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL,置于培养箱中避光孵育 2~4 h,当颜色逐渐变深时,用酶标仪检测 450 nm(参比波长为 630 nm)处的吸光度(A),计算细胞存活率。细胞存活率(%) = (实验孔 A 值 - 空白孔 A 值)/(对照孔 A 值 - 空白孔 A 值) × 100%。

3.3 Transwell 小室检测细胞迁移能力和 DAPI 染色观察细胞凋亡形态 取对数生长期的细胞,按每孔 5 × 10⁵ 细胞接种于上室,使其终体积含 200 μL 无血清培养液,下室加入 500 μL 含 10% FBS 的培养液。同时加入丹参多酚酸盐(终浓度为 100 mg/L)和过氧化氢(终浓度为 25 μmol/L)加入 Transwell 小室的下室,置于培养箱中培养 48 h 后,将小室取出,用棉签将未迁移的细胞小心擦去,甲醇固定 10 min,经 DAPI 染色后,荧光显微镜下随机计数 3 个高倍镜视野中细胞,随后用图像处理软件 ImageJ 统计细胞迁移的数量,重复 3 次。

3.4 一氧化氮试剂盒检测细胞上清中 NO 含量 取对数生长期的内皮细胞制成细胞悬液,按每孔 2 × 10⁵ 个接种至 6 孔板中,培养 24 h 后,抗损伤组加入丹参多酚酸盐(终浓度为 100 mg/L),对照组加入等

体积溶剂,预处理 1 h 后,损伤组加入过氧化氢(终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$),培养 24 h 后收集细胞上清液,使用一氧化氮试剂盒检测各组细胞培养液上清中 NO 含量。

3.5 ELISA 法检测细胞上清中 VEGF 含量 取对数生长期的内皮细胞制成细胞悬液,按每孔 2×10^5 个接种至 6 孔板中,培养 24 h 后,抗损伤组加入丹参多酚酸盐,对照组加入等体积溶剂,预处理 1 h 后,损伤组加入过氧化氢,培养 24 h 后收集细胞上清液,按照 VEGF 试剂盒操作方法检测各组细胞培养液上清中 VEGF 含量。

3.6 流式细胞术检测细胞内超氧化物阴离子含量

取对数生长期的内皮细胞制成细胞悬液,按每孔 2×10^5 个接种至 6 孔板中,培养 24 h 后,抗损伤组加入丹参多酚酸盐,对照组加入等体积溶剂,预处理 1 h 后,损伤组加入过氧化氢,置于培养箱中培养 48 h 后,胰酶消化,离心收集细胞,用 PBS 洗 3 遍;加入二氢乙啶(dihydroethidium, DHE; 10 $\mu\text{mol/L}$)至细胞悬液,置于培养箱中避光孵育 20 min,离心,弃上清后用 PBS 重悬细胞,流式细胞术检测样本的荧光强度,用平均荧光强度(mean fluorescence intensity)表示细胞内 ROS 水平。

3.7 流式细胞术检测线粒体膜电位 取对数生长期的内皮细胞制成细胞悬液,按每孔 2×10^5 个接种至 6 孔板中,培养 24 h 后,抗损伤组加入丹参多酚酸盐,对照组加入等体积溶剂,预处理 1 h 后,损伤组加入过氧化氢,置于培养箱中培养 48 h 后,胰酶消化,离心收集细胞,用 PBS 洗 3 遍;将 500 μL 的罗丹明 123(rhodamine 123, Rho123; 5 $\mu\text{mol/L}$)加入至细胞悬液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光孵育 20 min,离心后用 PBS 重悬细胞,流式细胞术检测样本的荧光强度,用平均荧光强度(mean fluorescence intensity)表示线粒体膜电位水平。

3.8 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的内皮细胞制成细胞悬液,按每孔 2×10^5 个接种至 6 孔板中,培养 24 h 后,加入丹参多酚酸盐使其终浓度为 100 mg/L,预处理 1 h 后,加入过氧化氢,置于细胞培养箱中培养 24 h 后,用胰酶消化,离心,收集细胞并进行 Annexin V-FITC 和 PI 染色,染色方法参照试剂盒,最后于流式细胞仪上检测分析。

3.9 Western blot 实验 取对数生长期的内皮细胞制成细胞悬液,按每孔 2×10^5 个接种至 6 孔板中,培养 24 h 后,加入丹参多酚酸盐使其终浓度为 100 mg/L,预处理 1 h,加入过氧化氢,在细胞培养箱中培

养 24 h 后,胰酶消化,离心,收集细胞。采用 RIPA 法提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒定量,100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后上样,SDS-PAGE 分离目标蛋白,上样量为 40 μg 。转至 PVDF 膜上,TBST 漂洗后,5% 脱脂奶粉封闭液封闭 60 min,孵 I 抗过夜,TBST 漂洗 3 次(每次 10 min),加入 II 抗摇床孵育 1 h,TBST 漂洗 3 次(每次 10 min),用 ECL 试剂盒显色,最后显影拍照观察,并用 Image J 软件对图片进行分析。

4 统计学方法

本研究中数据以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。此外,应用 GraphPad Prism 7.00 进行数据的统计学分析和统计绘图;多组间的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较时采用 LSD 法;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 EA. hy926 细胞的过氧化氢氧化损伤模型的建立

CCK-8 结果显示,随着过氧化氢浓度的升高,细胞活性呈下降趋势。与对照组(H_2O_2 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$)比较,当过氧化氢浓度小于 15 $\mu\text{mol/L}$ 时,EA. hy926 细胞活性抑制(抑制率为 24.41%)不显著;当过氧化氢浓度达到 25 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活性受到显著性抑制(抑制率为 44.38%);当浓度升至 50 $\mu\text{mol/L}$ ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞绝大部分都已死亡,见图 1A。故在接下来的实验中,选择 25 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢构建氧化损伤模型。

2 丹参多酚酸盐对过氧化氢损伤的 EA. hy926 细胞活性的影响

CCK-8 检测细胞活性结果提示,与对照组细胞活性相比,损伤组细胞活性显著下降($P < 0.05$);与损伤组比较,随着丹参多酚酸盐浓度的升高,抗损伤组细胞活性显著提高($P < 0.05$),其中 100 mg/L 和 200 mg/L 丹参多酚酸盐抗损伤组细胞活性分别为 $(92.75 \pm 6.13)\%$ 和 $(100.00 \pm 2.94)\%$,且差异有统计学意义($P < 0.05$),而 50 mg/L 浓度丹参多酚酸盐抗损伤组细胞活性为 $(72.75 \pm 2.50)\%$,差异无统计学意义;另外 100 mg/L 和 200 mg/L 丹参多酚酸盐抗损伤组之间无显著差异,故选择 100 mg/L 浓度的丹参多酚酸盐用于后续实验,见图 1B。

3 丹参多酚酸盐对过氧化氢诱导的 EA. hy926 细胞凋亡的影响

经 100 mg/L 丹参多酚酸盐预处理 1 h 后,加入过氧化氢处理 24 h 后,流式细胞术检测细胞凋亡情况如下:与对照组细胞的凋亡率比较,损伤组细胞的

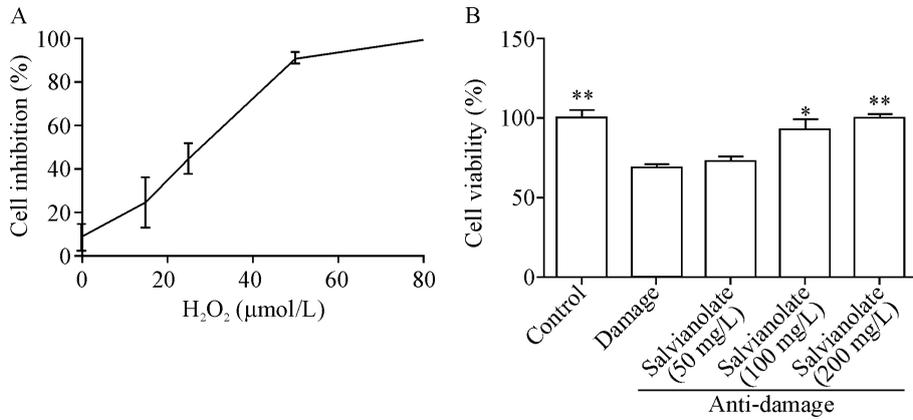


Figure 1. Effects of different concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂) and salvianolate on EA. hy926 cell activity. A: the inhibitory effect of different concentrations of hydrogen peroxide on the viability of EA. hy926 cells; B: effect of salvianolate on the viability of EA. hy926 cells induced by hydrogen peroxide. Mean ± SD. n = 3. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs damage group.

图 1 不同浓度的过氧化氢和丹参多酚酸盐对 EA. hy926 细胞活性的影响

凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)；与损伤组细胞的凋亡率比较, 抗损伤组细胞的凋亡率显著下降 ($P < 0.05$)；对照组细胞的凋亡率与抗损伤组细胞的凋亡率比较差异无统计学意义, 见图 2。此外, 药物处理后收集

细胞, 经 DAPI 染色, 细胞形态发生明显改变; 对照组与抗损伤组的细胞大部分呈光滑、圆形的核形态, 染色均匀, 蓝色荧光较弱; 损伤组的细胞大部分细胞核呈现固缩状, 边缘不清楚, 蓝色荧光加强, 见图 3A。

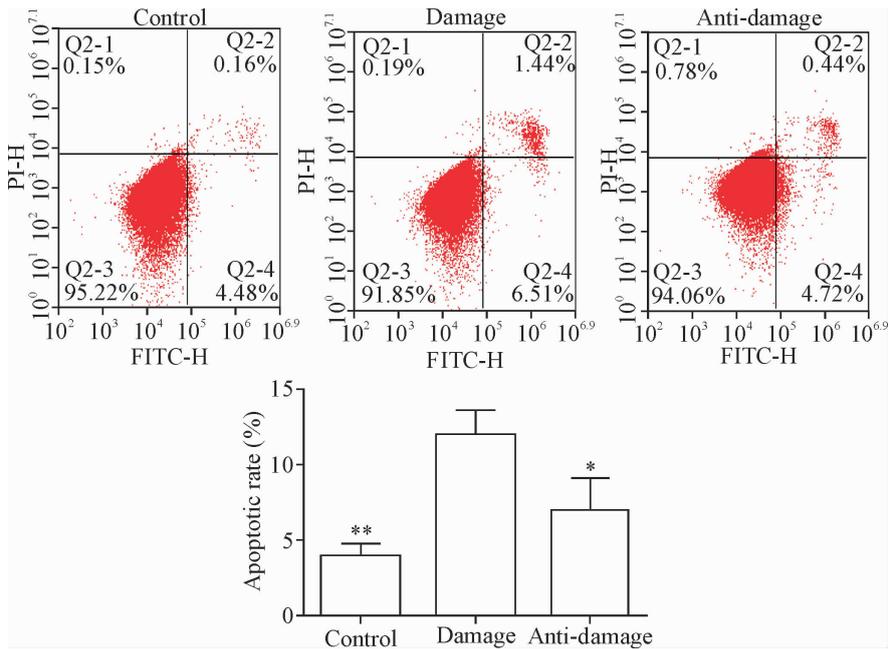


Figure 2. The effect of salvianolate on the apoptosis of EA. hy926 cells induced by hydrogen peroxide. Mean ± SD. n = 3. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs damage group.

图 2 丹参多酚酸盐诱导过氧化氢对 EA. hy926 细胞凋亡的影响

4 丹参多酚酸盐对过氧化氢诱导的 EA. hy926 细胞迁移的影响

采用 Transwell 迁移实验检测 EA. hy926 细胞迁移的能力, 以迁移至小室下室面的细胞数量来表示迁移能力, 数量越多表明迁移能力越强, 数量越少表明迁移能力越弱; 处理后的细胞经 DAPI 染色后, 可

根据平均荧光强度间接反映细胞数量的多少。Transwell 迁移实验结果显示, 与对照组细胞比较, 损伤组细胞的平均荧光强度显著下降 ($P < 0.05$)；抗损伤组细胞的平均荧光强度无显著变化; 损伤组细胞的平均荧光强度较抗损伤组细胞的平均荧光强度显著降低 ($P < 0.05$), 见图 3B。

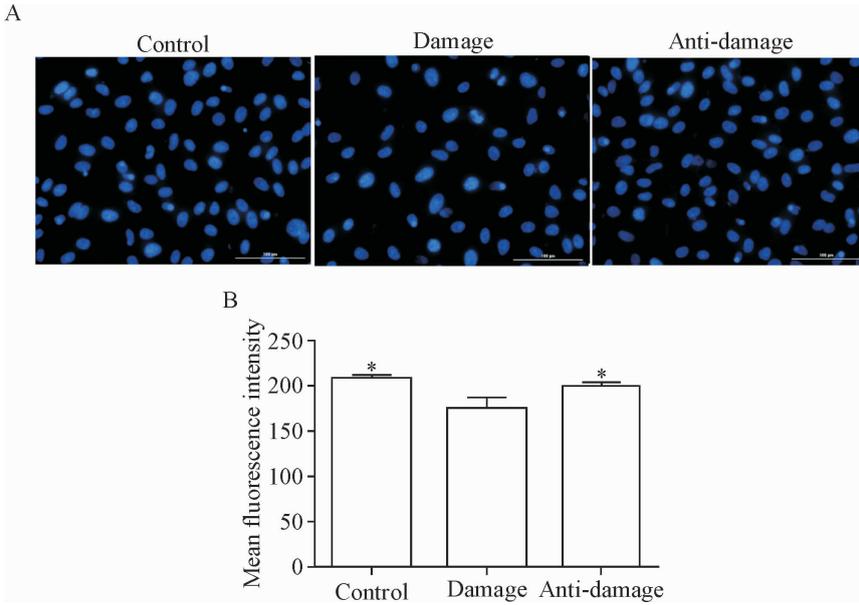


Figure 3. The effects of salvianolate on the nuclear morphological change (A) and the migration ability (B) of EA. hy926 cells induced by hydrogen peroxide (DAPI staining, scale bar = 100 μm). Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs damage group.

图3 丹参多酚酸盐诱导过氧化氢对 EA. hy926 细胞核形态和迁移的影响

5 丹参多酚酸盐对过氧化氢损伤的 EA. hy926 细胞线粒体膜跨电位的影响

流式细胞术检测结果显示,与对照组比较,过氧化氢损伤组细胞的平均荧光强度显著升高($P < 0.01$),

表明过氧化氢可导致线粒体膜电位下降;与损伤组比较,丹参多酚酸盐抗损伤组细胞的平均荧光强度显著下降($P < 0.01$),见图4。

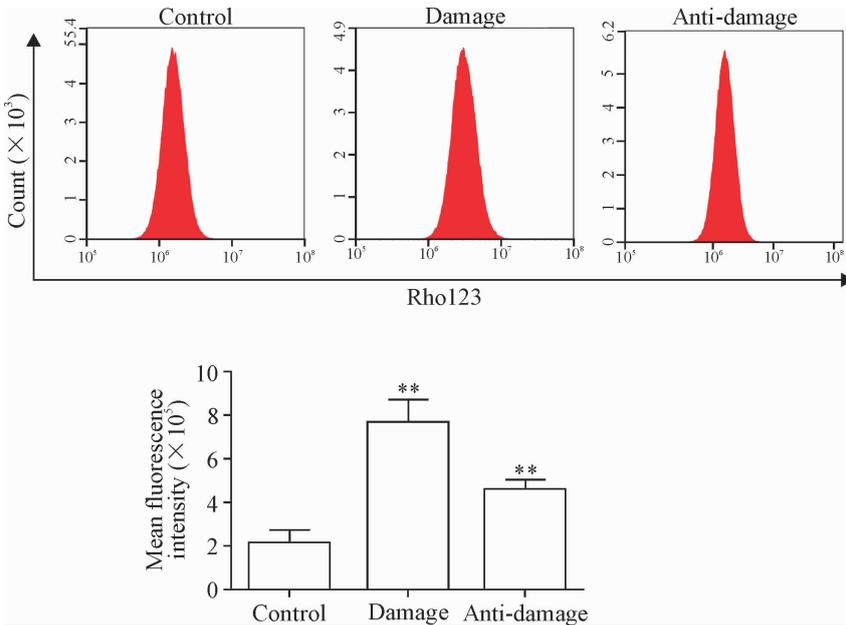


Figure 4. Effect of salvianolate on the mitochondrial membrane potential of EA. hy926 cells. Mean \pm SD. $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs control group.

图4 丹参多酚酸盐对 EA. hy926 细胞线粒体跨膜电位水平的影响

6 丹参多酚酸盐对过氧化氢诱导 EA. hy926 细胞内 ROS 水平的影响

流式细胞术检测结果显示,与对照组比较,过氧化氢损伤组细胞的平均荧光强度显著升高($P < 0.01$),

表明过氧化氢可诱导胞内 ROS 升高;与过氧化氢损伤组比较,丹参多酚酸盐抗损伤组细胞的平均荧光强度显著下降($P < 0.01$);表明丹参多酚酸盐减少过氧化氢诱导胞内 ROS 的生成,见图5。

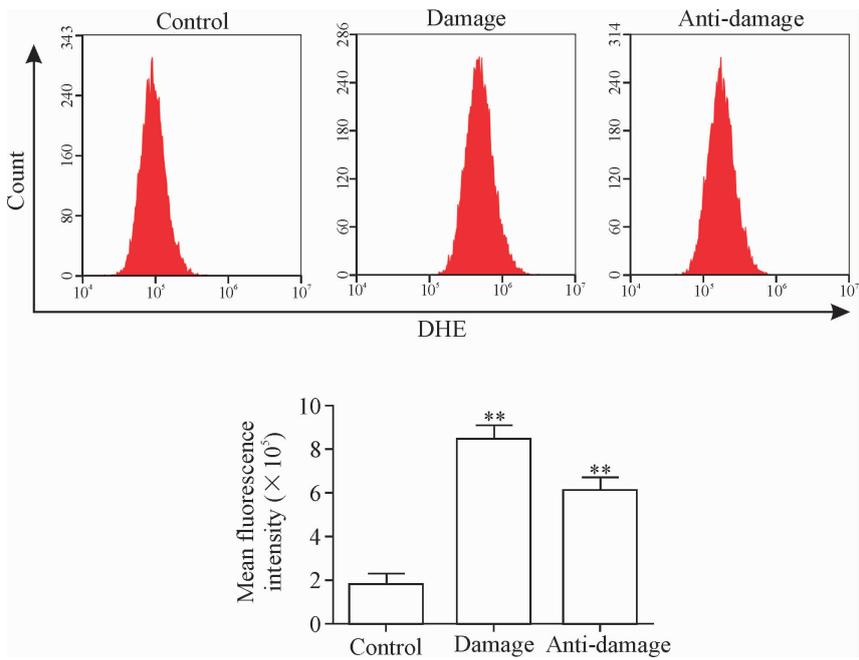


Figure 5. Effect of salvianolate on ROS formation induced by hydrogen peroxide. Mean \pm SD. $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs control group.

图 5 丹参多酚酸盐对过氧化氢诱导的 EA. hy926 细胞生成 ROS 的影响

7 丹参多酚酸盐对过氧化氢诱导 EA. hy926 细胞 NO 和 VEGF 分泌水平的影响

与对照组比较,过氧化氢损伤组细胞的 NO 和 VEGF 分泌水平显著降低 ($P < 0.01$);与过氧化氢损伤组比较,丹参多酚酸盐抗损伤组细胞的 NO 和 VEGF 分泌水平显著升高 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 丹参多酚酸盐对过氧化氢诱导的 EA. hy926 细胞培养上清中 NO 和 VEGF 相对含量的影响

Table 1. The effects of salvianolate on the contents of NO and VEGF in hydrogen peroxide-induced EA. hy926 cells (Mean \pm SD. $n = 3$)

Group	NO ($\mu\text{mol/L}$)	VEGF (ng/L)
Control	98.42 \pm 6.47 **	882.77 \pm 66.83 *
Damage	47.02 \pm 8.42	342.14 \pm 82.82
Anti-damage	72.12 \pm 11.06 *	650.48 \pm 46.02 *

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs damage group.

8 丹参多酚酸盐对 EA. hy926 细胞 Bcl-2、Bax、caspase-3、NF- κ B 和 p53 蛋白表达量的影响

Western blot 实验结果显示,与对照组相比,过氧化氢损伤组的 cleaved caspase-3/caspase-3 比值显著增大 ($P < 0.01$), NF- κ B 和 p53 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), Bcl-2/Bax 比值显著减小 ($P < 0.01$);与过氧化氢损伤组比较,抗损伤组的 cleaved caspase-3/caspase-3 比值显著减小, NF- κ B 和 p53 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$), Bcl-2/Bax 比值显著增大 ($P < 0.05$),见图 6。

讨 论

血管内皮系统是心血管系统的重要部分,参与各组织器官营养物质供应与废物清理。在一定程度上,内皮细胞损伤与功能失常可导致各种各样的疾病。内皮细胞氧化应激可见于多种疾病的病理生理过程,主要表现为组织体液循环障碍等,其本质是细胞内 ROS 异常升高^[5]导致线粒体跨膜电位下降,影响细胞的代谢和生理功能,并最终引起内皮细胞功能失调或丧失,激活凋亡信号通路,导致细胞损伤和凋亡^[6-7]。本研究结果显示,丹参多酚酸盐具有对抗过氧化氢诱导内皮细胞 EA. hy926 细胞氧化应激损伤的作用,可显著改善 H_2O_2 损伤的内皮细胞活力,改善细胞迁移能力,显著增加细胞 VEGF^[8-10] 和 NO 水平,显著减少细胞凋亡。

该结果与已报道的其相关药理作用具有一致性,如丹参多酚酸盐体内外应用方面显示可对抗高糖^[11]、辐射、高血压、心肌梗死、动脉粥样硬化、缺血再灌注和高同型半胱氨酸^[12]等引起的氧化应激反应;此外,丹参多酚酸盐通过抑制氧化应激相关途径降低培养的乳鼠心肌细胞凋亡^[4, 13-14]。本研究结果表明,丹参多酚酸盐可显著降低 ROS 水平、稳定 H_2O_2 诱导的线粒体膜电位水平,抑制氧化应激相关途径,如显著降低 NF- κ B、p53、Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白水平,显著升高 Bcl-2 蛋白水平,该部分结果与已报道的 H_2O_2 导致的氧化应激信号途径

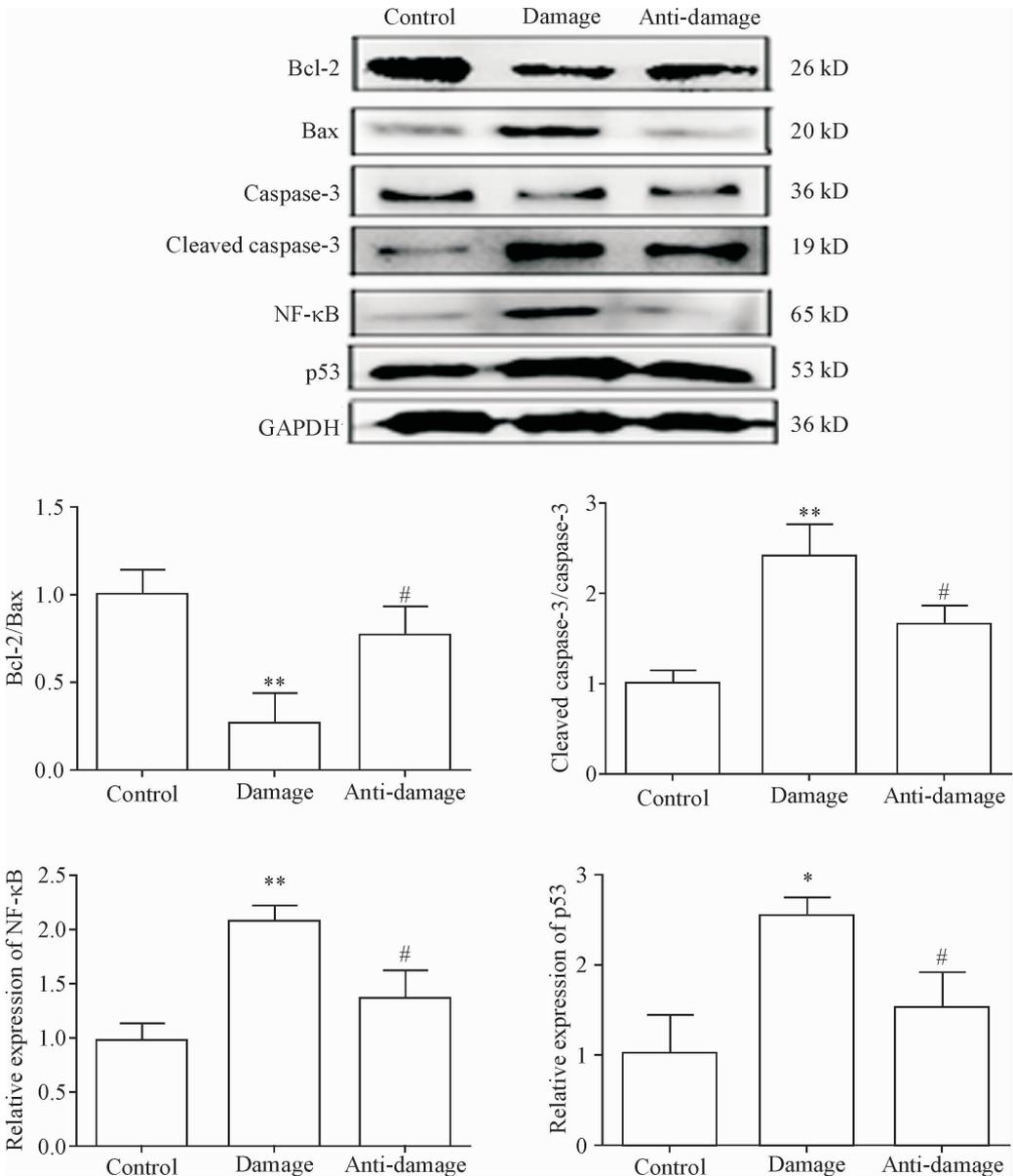


Figure 6. The effects of salivanolate on the protein levels in the EA. hy926 cells. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs damage group.

图 6 不同浓度的丹参多酚酸盐对 EA. hy926 细胞相关蛋白表达的影响

具有相关性和一致性,如在过氧化氢诱导的人皮肤成纤维细胞氧化应激发生中 NF- κ B 被激活并表达增加,同时激活经典的 p53 的表达^[6],抑制细胞增殖,促进细胞凋亡^[15-18]。由于 *bcl-2* 和 *bax* 是 p53 的下游靶基因,进而导致 Bcl-2/Bax 比率下降,导致线粒体跨膜电位下降,激活 caspase 家族,诱导细胞凋亡^[7]。这说明丹参多酚酸盐对抗 H₂O₂ 诱导的内皮细胞损伤与其抑制氧化应激相关途径有关。

丹参多酚酸盐具有中医学方面的活血、化瘀和通脉等多种作用。这些反映了丹参多酚酸盐药理作用的多样性与复杂性,其关于内皮功能方面的作用是本实验研究的观察点,即丹参多酚酸盐对内皮细

胞氧化应激损伤的抑制作用。本研究通过体外细胞培养实验观察到的作用只是丹参多酚酸盐对过氧化氢诱导的内皮细胞氧化应激损伤具有抑制作用,因素相对单一。而丹参多酚酸盐在体内效应则极其复杂,还有待进一步探究。

总之,本研究证实,丹参多酚酸盐对过氧化氢诱导的内皮细胞氧化应激损伤具有保护作用,其机制是通过降低 ROS 水平,抑制 NF- κ B 和 p53 蛋白表达水平,提高 Bcl-2/Bax 比值和稳定细胞线粒体膜电位,改善与恢复细胞功能活性。本研究可为临床上心脑血管疾病抗氧化损伤的治疗提供一定的参考资料。

[参 考 文 献]

- [1] 麦鸿成, 逯 丹, 张玉生. 丹参多酚酸盐对血管内皮损伤保护作用的研究进展[J]. 湘南学院学报: 医学版, 2015, 17(4):76-78.
- [2] 樊春华, 田 宽, 何 菲, 等. 氰酸盐诱导人脐静脉内皮细胞氧化应激损伤[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(12):1550-1555.
- [3] 戴青里, 孙贵虎, 闫 斌, 等. 过氧化氢诱导 HUVEs 氧化应激模型的构建[J]. 昆明医科大学学报, 2018, 39(4):34-39.
- [4] 李 兵. 丹参多酚酸盐对过氧化氢所致乳鼠心肌细胞氧化应激损伤影响及其机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(12):28-31.
- [5] 王玉荣, 杨 康, 崔伟业, 等. 过氧化氢损伤 A549 细胞的作用[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(5):1014-1020.
- [6] 王春宇, 姜 民, 侯冠宇, 等. 小柴胡汤对过氧化氢诱导的人皮肤成纤维细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(6):1074-1077.
- [7] 金海南, 刘莉园, 金芳多, 等. 祁州漏芦水提取物对叔丁基过氧化氢诱导血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(16):1366-1372.
- [8] Li L, Liu H, Xu C, et al. VEGF promotes endothelial progenitor cell differentiation and vascular repair through connexin 43[J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8:237.
- [9] Bus P, Gerrits T, Heemskerk AC, et al. Endoglin mediates vascular endothelial growth factor-A-induced endothelial cell activation by regulating akt signaling[J]. Am J Pathol, 2018, 188(12):2924-2935.
- [10] Zhu M, Liu X, Wang Y, et al. YAP via interacting with STAT3 regulates VEGF-induced angiogenesis in human retinal microvascular endothelial cells[J]. Exp Cell Res, 2018, 373(1-2):155-163.
- [11] 何胜虎, 燕建锋, 袁 彬, 等. 丹参多酚酸盐对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(12):948-952.
- [12] 王 琳, 李正飞, 舒小军, 等. 丹参多酚酸盐对高同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞组织因子表达的干预作用[J]. 甘肃医药, 2012, 31(9):643-646.
- [13] 李 兵. 丹参多酚酸盐对过氧化氢所致乳鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 天津中医药, 2016, 33(8):491-495.
- [14] 李 兵. 丹参多酚酸盐对过氧化氢所致乳鼠心肌细胞损伤保护作用的研究[J]. 中医药信息, 2016, 33(5):7-11.
- [15] Beyfuss K, Hood DA. A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle[J]. Redox Rep, 2018, 23(1):100-117.
- [16] Jiao L, Jiang M, Liu J, et al. Nuclear factor-kappa B activation inhibits proliferation and promotes apoptosis of vascular smooth muscle cells[J]. Vascular, 2018, 26(6):634-640.
- [17] Pei X, Xiao J, Wei G, et al. Oenothien B induced human non-small cell lung cancer A549 cell death by ROS-mediated PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway[J]. Chem Biol Interact, 2019, 298:112-120.
- [18] Xu J, Shen W, Pei B, et al. Xiao tan he wei decoction reverses MNNG-induced precancerous lesions of gastric carcinoma *in vivo* and *in vitro*: regulation of apoptosis through NF-kappaB pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 108:95-102.

(责任编辑: 卢 萍, 罗 森)