

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.24.004

枸杞黄酮对 H_2O_2 损伤的血管内皮细胞 NO 及 NOS 作用的研究*

廖国玲, 马 磊, 曾 泰

(宁夏医科大学检验学院, 银川 750004)

[摘要] 目的 研究枸杞黄酮对过氧化氢(H_2O_2)损伤的血管内皮细胞一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶(NOS)作用。方法 以人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为研究对象,建立 H_2O_2 诱导 HUVEC 的氧化损伤模型。实验分为正常对照组、 H_2O_2 组、维生素 C(VitC)组、枸杞黄酮低、中、高浓度组(枸杞黄酮 100 mg/L、200 mg/L 和 400 mg/L 预处理)。用 MTT 法观察枸杞黄酮对 H_2O_2 损伤的血管内皮细胞活性的影响,观察枸杞黄酮类化合物对氧化应激损伤细胞过氧化物丙二醛(MDA)、人总一氧化氮合成酶(TNOS)、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)、及 NO 的作用。结果 (1)MTT 结果表明 H_2O_2 损伤后内皮细胞生长抑制率(IR)为 38.8%;枸杞黄酮低、中、高浓度组 IR 分别为 34.0%、30.7%、25.5%,与 H_2O_2 组比较差异有统计学意义($P<0.01$);(2)与正常对照组相比较, H_2O_2 组细胞 NO 活性降低,而 TNOS、iNOS、MDA 生成增加。与 H_2O_2 组相比较,枸杞黄酮低、中、高浓度组中 NO、TNOS、iNOS、MDA 的变化则相反,与枸杞黄酮呈剂量依赖性($P<0.01$)。结论 枸杞黄酮对 H_2O_2 所致人血管内皮细胞损伤有保护作用,且保护效果与枸杞黄酮呈一定相关性。

[关键词] 黄酮类;内皮,血管;过氧化氢;枸杞黄酮**[中图分类号]** R966**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)24-3323-02The effects Medlar flavone on NO and NOS in H_2O_2 damaged vascular endothelial cells*

Liao Guoling, Ma Lei, Zeng Tai

(School of Laboratory Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

[Abstract] **Objective** To study of effects Medlar flavone on NO and NOS in H_2O_2 damaged vascular endothelial cells. **Methods** Human Umbilical Vein Endothelial Cells(HUVEC) have been set as research object. HUVEC cells was damaged by H_2O_2 induced oxidative stress. Experiments were divided into normal control group, H_2O_2 injury group, VitC control group, and low, medium, high flavonoids protective groups(100, 200, 400 mg/L). MTT method was used to observe cells activity. The effects Medlar flavone on MDA, TNOS, iNOS and NO in H_2O_2 damaged vascular endothelial cells was observed. **Results** (1) MTT result demonstrated the IR of HUVEC cells was 38.8% in H_2O_2 injury group. Which in low, medium, high flavonoids protective groups were 34.0%, 30.7%, 25.5%. All were lower than H_2O_2 injury group($P<0.01$). (2) Compared with normal control group, NOS activity was decreased in H_2O_2 injury cell, while TNOS, iNOS, NO was more. Compared H_2O_2 group, the change of NO, TNOS, iNOS, MDA was opposite in flavone intervention group, and which were dose dependent ($P<0.01$). **Conclusion** Medlar flavone has a protective effect on H_2O_2 induced HUVEC cells injury, and there may be some kind of relevance between them.

[Key words] flavones; endothelium, vascular; hydrogen peroxide; Medlar flavone

血管内皮细胞是血液与组织进行物质交换的屏障,它通过合成与释放大量的血管活性物质来调节血管的基础张力,维持血管功能的正常。血管内皮细胞的损伤和功能失调是动脉粥样硬化(AS)发生的始动环节^[1],对其损伤保护的研究是目前研究的热点。自由基、活性氧、脂质过氧化物、过氧化氢(H_2O_2)等均可引起内皮细胞的损伤。抗氧化剂作为可终止自由基产生的一类化学物质,被认为在预防心脑血管疾病及癌症的发生中扮演着极其重要的作用^[2]。对中草药中天然活性成分的研究表明,一些黄酮类化合物具有抗氧化和抗癌作用。张自萍等^[3]研究表明:宁夏产的枸杞黄酮化合物中芦丁和绿原酸含量均高于河北、内蒙古枸杞,且有明显的抗脂质过氧化作用^[4]。本研究选择具有调节免疫能力、降血糖、降血脂、抗肿瘤、抑菌、抗氧化等作用的枸杞黄酮化合物作为课题研究的对象^[5-6],深入研究其对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)氧化应激损伤的保护机制。本实验通过对枸杞黄酮对 H_2O_2 损伤的血管内皮细胞一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶(NOS)作用的研究,为开发利用枸杞及其有效成分提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验药材与试剂 枸杞由宁夏农科院提供,陈淑华研究员鉴定,其总黄酮由本研究室分离和纯化^[7],含量经测定为 100 mg/mL;新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;四唑盐(MTT)试剂为 Sigma 公司产品;NO 试剂盒及 NOS 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;其余均为国产试剂(分析纯级)。

1.1.2 实验仪器 仪器 CO_2 培养箱为美国 Sheldon 公司产品,倒置显微镜 Olympus 产品,酶标仪为美国 Me2tertech 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 提取物制备 采用 80%乙醇,60℃超声提取,减压浓缩,经 HPD-600 型大孔树脂,乙醇洗脱,减压浓缩后,超纯水定容为枸杞黄酮溶液^[7-8]。以芦丁为标准液绘制标准曲线,铝盐法测定总黄酮的浓度为 100 mg/mL。

1.2.2 细胞培养 复苏冻存的 HUVEC 细胞,加入含 10%胎

牛血清的低糖 DMEM 培养基,于 37 °C 饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中静置培养,将生长良好的 HUVEC 细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化 1~2 min 后,用培养基终止消化,轻轻吹打细胞壁制成细胞悬液,进行传代培养用于实验。

1.2.3 实验分组 正常对照组:只加相应体积培养液;H₂O₂ 损伤模型组(H₂O₂ 组):在培养液中加入 1 000 μmol/L H₂O₂ 诱导损伤 4 h;枸杞黄酮干预组:依次分为枸杞黄酮低浓度组、枸杞黄酮中浓度组、枸杞黄酮高浓度组,先分别在培养液中加入终浓度为 100、200、400 mg/L 的枸杞黄酮溶液孵育 24 h,再加入 1 000 μmol/L H₂O₂ 诱导损伤 4 h;维生素 C(VitC)阳性对照组(VitC 组):在培养液中先加入终浓度为 20 mg/L 的 VitC 孵育 24 h,再加入 1 000 μmol/L H₂O₂ 诱导损伤 4 h。

1.2.4 MTT 法检测 HUVEC 活力 实验结果以 MTT 的光密度(OD)值计算内皮细胞生长抑制率(IR)。IR=(对照组 OD-实验组 OD)/对照组 OD×100%。

1.2.5 细胞培养液中过氧化物丙二醛(MDA)、人总一氧化氮合成酶(TNOS)、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)和 NO 的测定

按实验分组所述方法处理后,收集细胞培养上清液,分别按 MDA、NOS 和 NO 测定试剂盒中说明书上所述的方法分别检测 MDA、TNOS、iNOS 和 NO 的活性,试验重复 3 次,每次 4 个复孔,取均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析,采用 *q* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 枸杞黄酮对 H₂O₂ 诱导脐静脉内皮细胞活力的影响

H₂O₂ 处理 HUVEC 后其细胞 IR 为 38.8%,与正常对照组比较差异有统计学意义(*P*<0.01);与 H₂O₂ 组比较,枸杞黄酮低、中、高浓度组 IR 显著降低(*P*<0.01),与枸杞黄酮呈剂量依赖性,见表 1。

表 1 枸杞黄酮对 H₂O₂ 诱导脐静脉内皮细胞活力的影响(*n*=4)

组别	剂量	OD 值	IR(%)
正常对照组	—	0.463±0.003 ^b	0
H ₂ O ₂ 组	1 000 μmol/L	0.283±0.002 ^a	38.8
VitC 组	20 mg/L	0.356±0.002 ^b	23.1
枸杞黄酮低浓度组	100 mg/L	0.306±0.002 ^b	34.0
枸杞黄酮中浓度组	200 mg/L	0.321±0.002 ^b	30.7
枸杞黄酮高浓度组	400 mg/L	0.345±0.002 ^b	25.5

^a:*P*<0.01,与正常对照组比较;^b:*P*<0.01,与 H₂O₂ 组比较;—:无数据。

表 2 枸杞黄酮对 H₂O₂ 诱导脐静脉内皮细胞 MDA、NOS、iNOS 活性及 NO 含量的影响($\bar{x} \pm s$,*n*=4)

组别	NO (μmol/L)	TNOS (U/mL)	iNOS (U/mL)	MDA (nmol/mL)
正常对照组	55.69±8.12 ^b	1.10±0.10 ^b	0.81±0.06 ^b	0.418±0.042 ^b
H ₂ O ₂ 组	19.05±6.27 ^a	1.78±0.07 ^a	1.33±0.06 ^a	2.216±0.062 ^a
VitC 组	39.11±3.09 ^b	1.32±0.06 ^b	0.99±0.06 ^b	1.304±0.105 ^b
枸杞黄酮低浓度组	28.15±5.71 ^c	1.59±0.04 ^b	1.16±0.08 ^b	1.796±0.155 ^b
枸杞黄酮中浓度组	33.25±3.94 ^b	1.49±0.07 ^b	1.07±0.05 ^b	1.674±0.054 ^b
枸杞黄酮高浓度组	37.27±3.72 ^b	1.40±0.07 ^b	1.01±0.06 ^b	1.427±0.106 ^b

^a:*P*<0.01,与正常对照组比较;^b:*P*<0.01,^c:*P*<0.05,与 H₂O₂ 组比较。

2.2 枸杞黄酮对 H₂O₂ 诱导脐静脉内皮细胞活力培养上清液中 MDA、TNOS、iNOS 活性和 NO 含量的影响

比较,H₂O₂ 组细胞培养液中细胞内 MDA 含量增高,差异有统计学意义(*P*<0.01)。而枸杞黄酮各浓度组细胞 MDA 生成减少,其变化程度与枸杞黄酮浓度呈正比,与 H₂O₂ 组比较,差异有统计学意义(*P*<0.01)。H₂O₂ 组细胞培养液中细胞内 NO 含量降低,TNOS(结构型和诱导型)活性升高,尤以 iNOS 活性升高为主,与正常对照组比较差异有统计学意义(*P*<0.01)。而枸杞黄酮各浓度组细胞内 TNOS、iNOS 活性降低,NO 生成增多,与 H₂O₂ 组比较差异有统计学意义(*P*<0.01),见表 2。

3 讨 论

造成血管内皮细胞损伤的因素有很多,其中氧化应激是造成血管内皮损伤较为重要的因素之一,H₂O₂ 是体内常见的一种活性氧,可促进自由基生成,直接作用于细胞膜脂质,造成脂质过氧化反应,致使细胞膜的损伤^[9]。MTT 参与活细胞的能量代谢,直接反映活细胞的数量和活性^[10]。机体内存在抗氧化系统包括酶系统和非酶系统,NO 为内皮源性舒血管因子,由 NOS 催化 L-精氨酸和分子氧而合成。内皮细胞有两种 NOS,即 iNOS(诱导型)、cNOS(内皮型),外源刺激可影响 NOS 活性或表达,进而影响 NO 产生与释放。iNOS 在无病理性刺激时表达通常较低或无表达,其表达调节主要在转录水平,许多物质可上调或下调表达。cNOS 在细胞中结构性表达,一些病理性刺激对其表达也有调节作用^[11]。乌兰格日乐等^[12]研究发现枸杞黄酮的抗氧化作用与其结构有关,羟基化是其抗氧化活性不可缺少的。研究证明黄酮类化合物可显著降低高脂大鼠血浆氧化低密度脂蛋白(oxLDL)和 MDA 水平,提高超氧化物歧化酶(SOD)活力,进而达到保护内皮细胞的功效^[13]。贾刚等^[14]研究发现不同种类的枸杞黄酮对于细胞的氧化应激具有完全不同的作用,而且黄酮对细胞氧化应激的作用与其浓度呈现出很好的相关性。

本研究采用 H₂O₂ 诱导 HUVEC 建立内皮细胞氧化损伤模型。研究结果表明 H₂O₂ 组内皮细胞的存活率明显下降,IR 为 38.8%。加入不同浓度梯度的枸杞黄酮各组其细胞生长抑制率呈下降趋势,即枸杞黄酮呈剂量依赖性(*P*<0.01)。内皮细胞在 H₂O₂ 刺激下,与正常对照组相比,MDA 含量明显增加;加入 100、200、400 mg/L 枸杞黄酮预先干预,与 H₂O₂ 组相比,MDA 含量明显降低(*P*<0.01)。而 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程度,因此,MDA 含量的降低说明枸杞黄酮可通过抑制过氧化而减轻 H₂O₂ 造成的细胞损伤;同样,H₂O₂ 组 NO 较正常对照组比较低,随着枸杞黄酮的量增加呈上升趋势,损伤后 iNOS 表达增强,枸杞黄酮各组 iNOS 表达与 NO 的生成呈负相关,差异有统计学意义(*P*<0.01)。推测 NO 升高与 cNOS 表达有关^[11],即枸杞黄酮可能促进了血管壁 cNOS 的表达,使 iNOS 的表达下降,有利于生理性的 NO 合成并发挥作用,使其减轻 H₂O₂ 对 HUVEC 的氧化作用,增加 NO 的生成,其保护机制可能为通过清除自由基,有效提高机体抗氧化酶的活性来修复受损的内皮细胞,调节细胞表达 NOS,催化促进 NO 的合成有关。与此同时,本研究也推测枸杞黄酮在调节 NO 对内皮细胞保护的同时,过高的 NO 水平也会协同 H₂O₂ 而引起血管内皮细胞的损伤,即枸杞黄酮通过调节 NO 保护内皮细胞具有双面性,而且已经有不少动物实验发现某些黄酮化合物具有毒性,且其毒性与促氧化作用密不可分^[15]。这种诱导细胞损伤可能与以下机制有关:(1)NO 作用于铁蛋白,影响细胞呼吸及能量代谢;参与过氧化脂质的形成^[16],加速过氧化亚硝基阴离子(ONOO⁻)等羟自由基(OH·)等氧化剂的生成;(2)NO 及其中间反应(下转第 3327 页)

ERK/MAPK(extracellular signal-regulated kinase, mitogen-activated protein kinase)是一条高度保守的,由 3 组苏氨酸-精氨酸蛋白激酶模块构成的信号通路,它通过 Raf 蛋白(A-raf,B-Raf 和 Raf1)、MEK1/2 蛋白、ERK1/2 蛋白先后磷酸化级联,将分子信号从细胞膜向细胞核传递并放大,参与调节包括细胞增殖、迁移、凋亡等在内的多种重要细胞进程^[9-10]。有研究发现蛋白酶体抑制剂抗凋亡的机制是通过 p38MAPK 途径激活 Nrf2 的细胞核移位,进而导致 GCLC 的诱导作用和谷胱甘肽生成的连锁反应^[11]。研究发现,过表达 cAMP 可通过激活 Ras 抑制 Raf-1 的活化,从而负性调节^[12]。通过 RT-PCR、Western Blotting,检测到 dbcAMP 显著抑制了 Raf1 mRNA 及蛋白水平的表达,提示 dbcAMP 抑制 FTC-133 细胞增殖能力的途径之一是抑制 ERK/MAPK 通路。也有研究认为甲状腺癌细胞的增殖抑制与有丝分裂促成因子(MPF)活性降低直接相关^[13]。

综上所述,本文发现 dbcAMP 能够通过 Raf1 抑制 ERK/MAPK 通路,干扰甲状腺癌细胞株 FTC-133 的增殖能力、促进其凋亡,为今后深入研究 dbcAMP 的抑癌机制和开发肿瘤治疗药物提供理论基础。

参考文献

- [1] 关海霞,滕卫平.分化型甲状腺癌的研究新进展[J].中华内科杂志,2012,51(1):61-63.
- [2] 吴艺捷.甲状腺癌已成为严重的公共健康问题[J].中华内分泌代谢杂志,2015,31(1):1-3.
- [3] 陈竟文,宋陆军.甲状腺癌的流行病学新特点[J].中国临床医学,2009,16(5):812-813.
- [4] Li F,Xu W,Zhao S. Regulatory roles of metabolites in cell signaling networks[J]. J Genet Genomics,2013,40(7):367-374.
- [5] Malaguarnera R,Chen KY, Kim TY, et al. Switch in signaling control of mTORC1 activity after oncoprotein ex-

pression in thyroid cancer cell lines[J]. J Clin Endocrinol Metab,2014,99(10):E1976-1987.

- [6] 王莹莹,朱琦. cAMP 信号通路与多发性骨髓瘤[J]. 国际肿瘤学杂志,2014,41(5):368-370.
- [7] 杭海芳,王莹莹,朱琦. 环腺苷酸拟似物 8-CPT-cAMP 诱导骨髓瘤细胞凋亡的实验研究[J]. 中国癌症杂志,2014,24(10):755-760.
- [8] Chrenek P,Makarevich AV,Balazi A, et al. The effect of the cAMP analogue,dbcAMP, on proliferation and apoptosis of rabbit oviductal cells[J]. Folia Biol (Krakow),2013,61(3/4):247-252.
- [9] Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells[J]. Int J Biochem Cell Biol,2008,40(12):2707-2719.
- [10] Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time[J]. Trends Biochem Sci,2006,31(5):268-275.
- [11] 张海燕,都镇先,孟欣,等. 蛋白酶体抑制剂诱导甲状腺癌细胞凋亡机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志,2012,19(8):583-587.
- [12] Dumaz N,Marais R. Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. Based on the anniversary prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels[J]. FEBS J,2005,272(14):3491-3504.
- [13] 高月,肖建英,赵颂,等. 双丁酰环腺苷酸对甲状腺鳞癌 SW579 细胞株增殖的影响[J]. 天津医药,2012,40(6):537-539.

(收稿日期:2015-02-18 修回日期:2015-08-15)

(上接第 3324 页)

产物还可激活核修复多聚酶,抑制 DNA 合成,间接激活蛋白酶激活受体,引起无效修复,最终导致生物能量耗竭,致使细胞死亡^[17]。综上所述,枸杞黄酮对 H₂O₂ 损伤的血管内皮细胞 NO 及 NOS 作用的研究的作用还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Pan KY,Shen MP, Ye ZH, et al. Inhibitive effects of antioxidative vitamins on mannitol-induced apoptosis of vascular endothelial cells[J]. J Zhejiang Univ Sci B,2006,7(10):825-829.
- [2] 周颖,陈虹. 血管内皮细胞功能紊乱与心血管疾病关系的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2006,6(8):63-65.
- [3] 张自萍,廖国玲,史晓文. HPLC 法测定不同产地宁夏枸杞中芦丁和绿原酸含量[J]. 时珍国医国药,2007,18(7):1586-1587.
- [4] 鲁晓翔. 黄酮类化合物抗氧化作用机制研究进展[J]. 食品研究与开发,2012,33(3):220-224.
- [5] 郑国琦,胡正海. 宁夏枸杞的生物学和化学成分的研究进展[J]. 中草药,2008,39(5):796.
- [6] 曹志超,顾翔,苏佩清. 黄酮类化合物抗氧化及其作用机制的研究进展[J]. 实用临床医药杂志,2009,13(13):110-112.
- [7] 廖国玲,王伟. 枸杞黄酮类化合物色谱分析条件的优化[J]. 宁夏医学杂志,2013,35(7):614-615.

[8] 廖国玲,王伟. 反相高效液相色谱法测定枸杞活性成分[J]. 医学信息,2013,26(2):68.

- [9] Nakayama M, Nakamura J, Hamada Y, et al. Aldose reductase inhibition ameliorates pupillary light reflex and f-wave latency in patients with mild diabetic neuropathy[J]. Diabetes Care,2001,24(6):1093-1098.
- [10] 李上标,裴淑艳,蒋超,等. MTT 比色法研究应用进展[J]. 西北民族大学学报:自然科学版,2013,34(3):68-73,91.
- [11] 杨学礼. 一氧化氮的生物效应及其作用机制的研究[J]. 生理科学进展,2008,39(1):91-95.
- [12] 乌兰格日乐,白海泉,翁慧. 黄酮的抗氧化活性研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报,2008,23(3):277-280.
- [13] 李洋,马文平,倪志婧. 宁夏枸杞体外抗氧化机理研究[J]. 食品科学,2014,35(1):79-84.
- [14] 贾刚,谢丽阳,张迪,等. 黄酮对 AAPH 诱导的 HepG2 细胞氧化应激的作用[J]. 食品科技,2011,36(9):23-26.
- [15] 龚金炎,洪辉,吴晓琴,等. 黄酮类化合物的促氧化作用及其细胞毒性研究进展[J]. 中草药,2008,39(12):1905-1909.
- [16] Myatt YM, Cui X. oxidative stress in the placenta[J]. Histochem Cell Biol,2004,122(4):369-382.
- [17] 但素萍. 诱导型一氧化氮合酶在心肌梗死进程中的研究进展[D]. 重庆:重庆医科大学,2014.

(收稿日期:2015-02-15 修回日期:2015-08-10)