

- [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(4): 324-326.
- [6] 周大伟, 张 晨, 师小娟, 等. 单侧输尿管梗阻再通模型的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(17): 3145-3147.
- [7] 何立群, 蔡 淦. 健脾清化方治疗脾虚湿热型慢性肾衰的临床观察[J]. 中西医结合学报, 2005, 3(4): 270-273.
- [8] 陈 刚, 何立群. 健脾清化方治疗慢性肾衰竭 53 例临床观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2006, 7(10): 591-593.
- [9] 何立群, 侯卫国, 沈沛成, 等. 健脾清化方治疗脾虚湿热型慢性肾衰的临床疗效及细胞分子机制研究[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(4): 6-8.
- [10] 吴 锋, 孙 悦, 张 彤, 等. 健脾清化方对 CKD2~3 期患者慢性微炎症状态的随机对照多中心研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13(6): 504-506.
- [11] 麻志恒, 彭 文, 倪兆慧, 等. 健脾清化方治疗慢性肾脏病(3 期)脾虚湿热型患者的临床疗效观察[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(10): 4333-4337.
- [12] 余柯娜, 倪兆慧, 汪年松, 等. 健脾清化方治疗脾虚湿热型慢性肾脏病 3 期的多中心随机对照临床观察[J]. 中国医学科学院学报, 2016, 38(6): 686-695.
- [13] Yuan X P, Liu L S, Fu Q, *et al.* Effects of ligustrazine on ureteral obstruction-induced renal tubulointerstitial fibrosis[J]. *Phytother Res*, 2012, 26(5): 697-703.
- [14] 徐艳秋, 杨超茅, 顾向晨, 等. 慢性肾衰竭早期从脾论治的临床疗效分析[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(6): 502-505.
- [15] 李瑞玲, 杜霄壤, 丁世永, 等. 抑囊方治疗脾肾亏虚兼血瘀型多囊肾临床观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(8): 682-685.
- [16] 于昊新, 何立群, 费秀丽, 等. 益肾解毒汤对单侧输尿管梗阻大鼠模型肾组织氧化应激反应的干预作用[J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17(1): 22-24.
- [17] 吴 锋, 张新志, 王骆冰, 等. 益肾止衰颗粒治疗慢性肾脏病 3~5 期的随机对照研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2015, 16(4): 311-313.
- [18] 杨志超, 杨建军, 马 军, 等. 改良地黄散抑制 TGF- β 1-CTGF 信号通路改善肾间质纤维化的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(1): 47-52.

葛根素 6"-O-木糖苷对 ox-LDL 诱导 HUVECs 细胞损伤的影响

袁向科¹, 江 瑞²

(1. 河南省中医院周围血管科, 河南 郑州 450002; 2. 河南中医药大学第三附属医院老年病科, 河南 郑州 450003)

摘要: **目的** 探讨葛根素 6"-O-木糖苷对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导人静脉内皮细胞(HUVECs)损伤的影响。**方法** 将 HUVECs 随机分为对照组、ox-LDL 组及葛根素 6"-O-木糖苷 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 组, MTT 法检测细胞活性, ELISA 法检测白介素(IL)-1 β 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平, 试剂盒检测 caspase-3 活性, Western blot 检测细胞间黏附分子(ICAM1)、血管细胞黏附分子(VCAM1)、cleaved caspase-3、p-p65、p-I κ B- α 表达。**结果** 与对照组比较, ox-LDL 处理使 HUVECs 细胞活性降低($P<0.05$), caspase-3 活性及 IL-1 β 、TNF- α 水平升高($P<0.05$), cleaved caspase-3、ICAM1、VCAM1、p-p65、p-I κ B- α 蛋白表达升高($P<0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 葛根素 6"-O-木糖苷能改善以上指标($P<0.05$), 并呈剂量依赖性。**结论** 葛根素 6"-O-木糖苷能抵抗 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤, 包括提高细胞活性、抑制细胞凋亡和炎症, 其机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路有关。

关键词: 葛根素 6"-O-木糖苷; 人静脉内皮细胞(HUVECs); 氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL); 细胞凋亡; 炎症

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)04-1310-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.04.052

收稿日期: 2020-06-30

作者简介: 袁向科(1984—), 男, 硕士, 主治医师, 从事中西医结合治疗周围血管疾病研究。Tel: (0371) 60977731, E-mail: xiangkey888@163.com

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是心脑血管疾病的共同病理基础,可由高血压、高血糖、高血脂等多种因素引发,严重危害人类健康^[1-2]。氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 是早期动脉粥样硬化发生和发展的重要因素,其诱导的血管内皮损伤能促进泡沫细胞的形成,释放大炎症反应因子,进而加重该病病程^[3]。因此,减少 ox-LDL 诱导的内皮损伤是预防和治疗动脉粥样硬化的有效途径。

目前,黄酮类化合物因其抗炎、抗氧化等功能^[4-5]在防治动脉粥样硬化方面受到广泛的关注^[6-7]。葛根素 6"-O-木糖苷是葛根中的主要异黄酮^[8],具有显著的抗肿瘤^[9-10]、抗骨质疏松^[11]活性,但该成分对血管内皮损伤的作用尚未见报道。因此,本研究采用 ox-LDL 诱导人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 损伤,探讨葛根素 6"-O-木糖苷对 HUVECs 活性、凋亡、炎症损伤及 NF- κ B 信号通路的影响。

1 材料

HUVECs 购自美国典型培养物保藏中心。DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司; ox-LDL、维生素 E 购自美国 Sigma 公司。葛根素 6"-O-木糖苷 (纯度大于 98%) 购自上海同田生物科技有限公司。MTT 试剂盒、IL-1 β 、TNF- α ELISA 试剂盒购自江苏凯基生物有限公司; caspase-3 活性检测试剂盒、RIPA 细胞裂解液、PMSF、BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; cleaved caspase-3、ICAM1、VCAM1、p-p65、p-I κ B- α 、GAPDH 等一抗购自英国 Abcam 公司和武汉博士德生物工程有限公司; 二抗购自北京中衫金桥生物有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养、分组及给药 将 HUVECs 置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。当细胞生长至 80%~90% 时,用 0.25% 胰酶进行消化传代培养。将 HUVECs 随机分为 6 组,分别为对照组,正常培养 48 h; ox-LDL 组,正常培养基培养 24 h 后,100 μ g/mL ox-LDL 处理 24 h; 葛根素 6"-O-木糖苷 10、20、40 μ mol/L 组,10、20、40 μ mol/L 葛根素 6"-O-木糖苷处理 24 h 后,100 μ g/mL ox-LDL 处理 24 h; 维生素 E 组,200 μ g/L 维生素 E 处理 24 h 后,100 μ g/mL ox-LDL 处理 24 h。

2.2 MTT 检测细胞活性 将细胞接种到 96 孔板上,按“2.1”项下方法处理,每孔加入 10 μ L MTT (0.5 mg/mL),在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 4 h,弃去培养基,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜溶液,振荡 15 min,在 490 nm 波长处检测光密度 (OD) 值,计算细胞活性。

2.3 试剂盒检测细胞 caspase-3 活性 将细胞接种到 6 孔板上,按“2.1”项下方法处理,胰酶消化贴壁细胞,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min 收集细胞,按 caspase-3 活性检测试剂盒说明书进行操作,在 405 nm 波长处检测 OD 值,计算 caspase-3 相对活性。

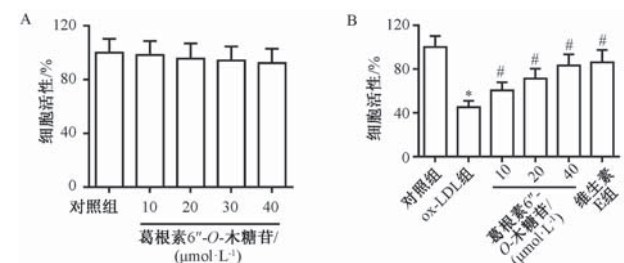
2.4 ELISA 法检测细胞上清液 IL-1 β 、TNF- α 水平 按“2.1”项下方法处理细胞,离心收集细胞上清液,按 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-1 β 、TNF- α 水平。

2.5 Western blot 检测细胞相关蛋白表达 将细胞接种到 24 孔板上,按“2.1”项下方法处理,每孔加入 RIPA 裂解液与 PMSF 的混合液 (100:1) 裂解细胞 15 min,离心收集上清,即为总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,取适量样本进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,采用半干转方法将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗,在 4 $^{\circ}$ C 下过夜孵育,再加入二抗,室温孵育 1 h,采用红外激光成像系统扫描。以 GAPDH 为内参,分析蛋白相对表达。

2.6 统计学分析 通过 GraphPad Prism 5 软件进行处理,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 Bonferroni 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 葛根素 6"-O-木糖苷对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞活性的影响 如图 1A 所示,0、10、20、30、40 μ mol/L 葛根素 6"-O-木糖苷处理 HUVECs 后,细胞活性无明显变化 ($P > 0.05$),表明该成分无细胞毒性。如图 1B 所示,与对照组比较,ox-LDL 可导致 HUVECs 的细胞活性下降 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较,葛根素 6"-O-木糖苷呈剂量依赖性地抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞活性下降 ($P < 0.05$)。

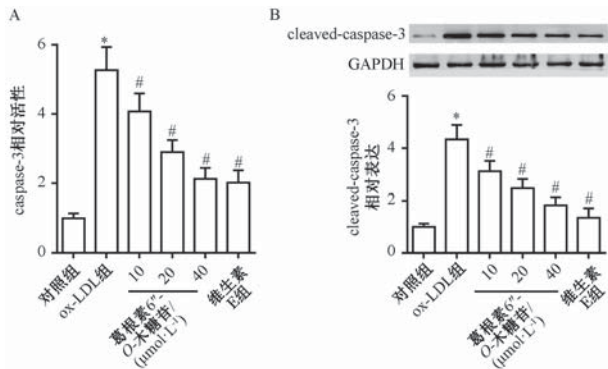


注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 ox-LDL 组比较,# $P < 0.05$ 。

图 1 各组 HUVECs 细胞活性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 葛根素 6"-O-木糖苷对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞 caspase-3 表达的影响 如图 2A 所示,与对照组比较,ox-LDL 组细胞 caspase-3 活性升高 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较,葛根素 6"-O-木糖苷组呈剂量依赖性地抑制 ox-LDL 诱导的 caspase-3 活性升高 ($P < 0.05$)。如图 2B 所示,与对照组比较,ox-LDL 组细胞 cleaved caspase-3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较,葛根素 6"-O-木糖苷呈剂量依赖性地抑制 ox-LDL 诱导的 cleaved caspase-3 表达升高 ($P < 0.05$)。

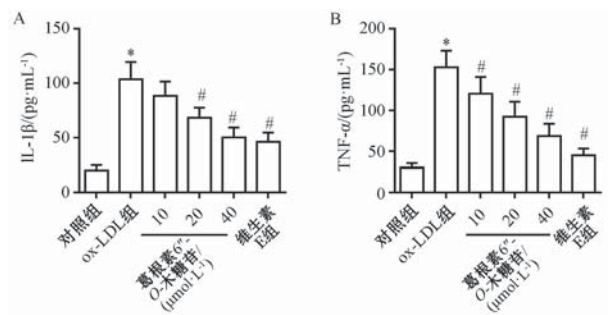
3.3 葛根素 6"-O-木糖苷对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞上清液中炎症因子的影响 如图 3 所示,与对照组比较,ox-LDL 组细胞上清液中 IL-1 β (图 3A)、TNF- α (图 3B) 水平升高 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较,葛根素 6"-O-木糖



注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与 ox-LDL 组比较，# $P<0.05$ 。

图2 各组 HUVECs 细胞 caspase-3 表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

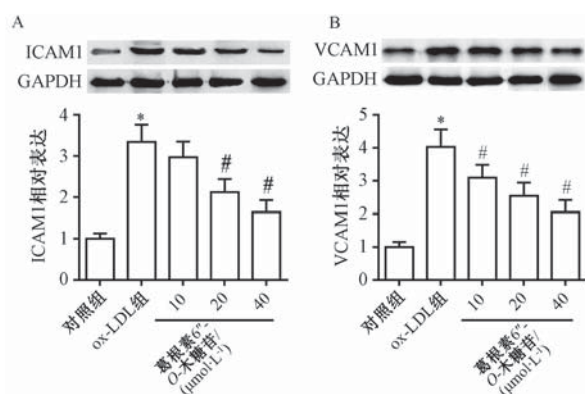
昔呈剂量依赖性地抑制 ox-LDL 诱导的 IL-1 β 、TNF- α 水平升高 ($P<0.05$)。



注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与 ox-LDL 组比较，# $P<0.05$ 。

图3 各组 HUVECs 细胞上清液中炎症因子水平 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.4 葛根素 6''-O-木糖苷对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞中黏附分子的影响 如图 4 所示，与对照组比较，ox-LDL 组细胞中 ICAM1 (图 4A)、VCAM1 (图 4B) 蛋白表达升高 ($P<0.05$)；与 ox-LDL 组比较，葛根素 6''-O-木糖苷呈剂量依赖性地抑制 ox-LDL 诱导的 ICAM1、VCAM1 表达升高 ($P<0.05$)。

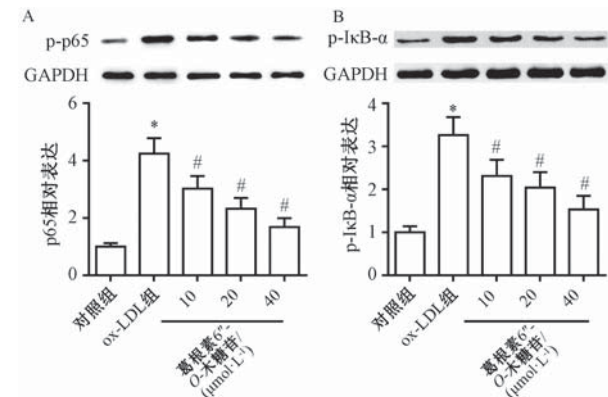


注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与 ox-LDL 组比较，# $P<0.05$ 。

图4 各组 HUVECs 细胞中黏附分子的表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.5 葛根素 6''-O-木糖苷对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞 NF- κ B 通路的影响 如图 5A 所示，与对照组比较，ox-LDL

组细胞 p-p65 蛋白表达升高 ($P<0.05$)；与 ox-LDL 组比较，葛根素 6''-O-木糖苷呈剂量依赖性地抑制 ox-LDL 诱导的 p-p65 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。如图 5B 所示，与对照组比较，ox-LDL 组细胞 p-I κ B- α 表达升高 ($P<0.05$)；与 ox-LDL 组比较，葛根素 6''-O-木糖苷呈剂量依赖性地抑制 ox-LDL 诱导的 p-I κ B- α 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。



注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与 ox-LDL 组比较，# $P<0.05$ 。

图5 各组 HUVECs 细胞 NF- κ B 通路蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

血管内皮损伤是导致动脉粥样硬化发展的始动环节^[12]，在该病灶部位中 ox-LDL 水平升高。HUVEC 具有与动脉血管内皮细胞相似的生物学特征，用 ox-LDL 体外诱导 HUVECs，可以模拟体内血管内皮损伤。本研究发现，葛根素 6''-O-木糖苷能够抵抗 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞损伤，提高细胞活性，抑制细胞凋亡和炎症反应。

在动脉粥样硬化斑块中存在广泛的内皮细胞凋亡，损伤的内皮细胞能够诱导 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等炎症因子和 VCAM1、ICAM1 等黏附分子的产生，加速白细胞向内皮细胞的黏附和级联炎症反应^[13]。通过 ox-LDL 诱导 HUVECs，使得 HUVEC 细胞活性下降，caspase-3 活性和表达提高，且 IL-1 β 、TNF- α 、VCAM1 和 ICAM1 表达升高。Bhaskar 等^[14]发现槲皮素降低 ox-LDL 诱导的 HUVECs 中 VCAM1、ICAM1、MCP-1 和 IL-6 等炎症介质表达。槲皮素和芦丁调节 JAK2 通路抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡^[15]。芳香新塔花总黄酮抑制炎症反应来保护内皮细胞^[16]。本研究中葛根素 6''-O-木糖苷能够呈剂量依赖性地抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞损伤，包括提高细胞活性，降低 caspase-3 表达，且下调 IL-1 β 、TNF- α 、VCAM1 和 ICAM1 表达。

NF- κ B 是一种重要的转录因子，广泛参与癌症、炎症和免疫疾病的发展^[17-18]，其信号通路的激活与动脉粥样硬化的发展进程密切相关^[19-21]。Bhaskar 等^[14]发现槲皮素通过调控 NF- κ B 信号通路减少动脉粥样硬化炎症和黏附分子的表达。Deng 等^[22]发现葛根素通过抑制 NF- κ B 信号通路可抵抗 LPS 诱导的血管内皮损伤。本研究发现 ox-LDL 处理导致 HUVECs 细胞中 p-p65 和 p-I κ B- α 表达升高，激活 NF-

κ B 信号通路;而葛根素 6"-O-木糖苷处理能够呈剂量依赖性地抑制 ox-LDL 诱导的 p-p65 和 p-I κ B- α 表达升高。

综上所述,本研究证实了葛根素 6"-O-木糖苷在 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞中发挥重要的作用,包括提高细胞活性,抑制细胞凋亡,降低炎症因子和黏附分子水平,与抑制 NF- κ B 信号通路有关。

参考文献:

- [1] Lusis A J. Atherosclerosis [J]. *Nature*, 2000, 407 (6801): 233-241.
- [2] 王 新,李春阳,苏立平,等.动脉粥样硬化发病机制及治疗的研究进展[J].实用心脑血管病杂志,2017,25(2):1-4.
- [3] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(9): 2045-2051.
- [4] Choi K C, Son Y O, Hwang J M, *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory and anti-septic potential of phenolic acids and flavonoid fractions isolated from *Lolium multiflorum* [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 611-619.
- [5] 宣 伟.黄酮类化合物的研究进展[J].中国林副特产,2017(1):66-69.
- [6] Lu X L, Zhao C H, Yao X L, *et al.* Quercetin attenuates high fructose feeding-induced atherosclerosis by suppressing inflammation and apoptosis *via* ROS-regulated PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 658-671.
- [7] Wu Y, Wang F, Fan L, *et al.* Baicalin alleviates atherosclerosis by relieving oxidative stress and inflammatory responses *via* inactivating the NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1673-1679.
- [8] Song W, Li Y, Qiao X, *et al.* Chemistry of the Chinese herbal medicine *Puerariae Radix* (Ge-Gen): A review [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(6): 347-360.
- [9] Chen T, Chen H, Wang Y, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antitumour activities of puerarin 6"-O-xyloside on human lung carcinoma A549 cell line *via* the induction of the mitochondria-mediated apoptosis pathway [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(9): 1793-1799.
- [10] Zhang X L, Wang B B, Mo J S. Puerarin 6"-O-xyloside possesses significant antitumor activities on colon cancer through inducing apoptosis [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 5557-5564.
- [11] Li H, Chen B, Pang G, *et al.* Anti-osteoporotic activity of puerarin 6"-O-xyloside on ovariectomized mice and its potential mechanism [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(1): 111-117.
- [12] Gimbrone M J, García C G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 620-636.
- [13] 康桂兰,景增秀.山奈酚通过调控 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路缓解 ox-LDL 介导的内皮细胞损伤 [J]. 中国免疫学杂志,2018,34(4):525-530.
- [14] Bhaskar S, Sudhakaran P R, Helen A. Quercetin attenuates atherosclerotic inflammation and adhesion molecule expression by modulating TLR-NF- κ B signaling pathway [J]. *Cell Immunol*, 2016, 310(12): 131-140.
- [15] Choi J S, Kang S W, Li J, *et al.* Blockade of oxidized LDL-triggered endothelial apoptosis by quercetin and rutin through differential signaling pathways involving JAK2 [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(5): 2079-2086.
- [16] 张选明.芳香新塔花总黄酮保护内皮细胞、抑制炎症反应的抗动脉粥样硬化作用及机制研究 [D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2018.
- [17] Zhang Q, Lenardo M J, Baltimore D. 30 Years of NF- κ B: A blossoming of relevance to human pathobiology [J]. *Cell*, 2017, 168(1-2): 37-57.
- [18] Taniguchi K, Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(5): 309-324.
- [19] Dabek J, Kulach A, Gqsior Z. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B): a new potential therapeutic target in atherosclerosis? [J]. *Pharmacol Rep*, 2010, 62(5): 778-783.
- [20] Winther M P, Kanters E, Kraal G, *et al.* Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(5): 904-914.
- [21] Pateras I, Giaginis C, Tsigris C, *et al.* NF- κ B signaling at the crossroads of inflammation and atherogenesis: searching for new therapeutic links [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(9): 1089-1101.
- [22] Deng H F, Wang S, Li L, *et al.* Puerarin prevents vascular endothelial injury through suppression of NF- κ B activation in LPS-challenged human umbilical vein endothelial cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104(8): 261-267.