

天麻素对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞氧化应激的影响

乔爱敏¹, 栗俞程², 刘珍伶³, 韩磊¹, 刘青^{1*}

1. 福建华侨大学化工学院 制药工程系, 福建 厦门 361021

2. 河南中医学院药学院, 河南 郑州 450008

3. 兰州大学 功能有机分子化学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 考察天麻素对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)氧化应激的影响。**方法** 建立高糖诱导的 HUVEC 氧化损伤模型, 用不同质量浓度的天麻素干预。MTT 法检测 HUVEC 存活率; 相关试剂盒测定一氧化氮(NO)的量、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)以及总抗氧化能力(T-AOC)的活性、丙二醛(MDA)的量, DCFH-DA 染色法检测胞内活性氧(ROS)水平, 实时荧光定量 PCR 法测定细胞中 NF- κ B 基因的表达。**结果** 与对照组相比, 模型组 HUVEC 氧化应激作用明显增强, 而天麻素能提高 HUVEC 中 NO 的量及 SOD 和 CAT 活性, 提高细胞的总抗氧化能力, 降低 MDA 的量与 ROS 水平, 显著降低细胞中 NF- κ B 基因的表达。**结论** 天麻素通过提高抗氧化酶活性、降低脂质过氧化产物和 ROS 水平, 抑制高糖诱导的 HUVEC 氧化应激作用, 其作用机制可能与 NF- κ B 通路密切相关。

关键词: 天麻素; 高糖; 氧化应激; 人脐静脉内皮细胞; NF- κ B

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)15-2118-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.15.017

Effect of gastrodin against oxidative stress induced by high glucose in human umbilical vein endothelial cells

QIAO Ai-min¹, LI Yu-cheng², LIU Zhen-ling³, HAN Lei¹, LIU Qing¹

1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

2. Henan University of Traditional Medicine, Zhengzhou 450008, China

3. State Key Laboratory Of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of gastrodin against oxidative stress induced by high glucose in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** Primary HUVEC were isolated and cultured, then the oxidative injury model of HUVEC was established by high glucose, and the cells were treated with different concentration of gastrodin. The cell viability of HUVEC, nitric oxide (NO) content, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, total anti-oxidative capacity (T-AOC), malondialdehyde (MDA) content, and intracellular reactive oxygen species (ROS) level were determined. Furthermore, the expression of NF- κ B mRNA in HUVEC was also detected by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** Compared with the control group, the oxidative stress was strengthened obviously in cells treated with high glucose. However, gastrodin could increase the activity of SOD and CAT and enhance T-AOC in HUVEC. Meanwhile, the amounts of MDA and ROS were decreased, and the level of NF- κ B mRNA was also reduced markedly. **Conclusion** These results indicate that gastrodin could inhibit the oxidative stress in HUVEC by enhancing the activity of anti-oxidative enzyme, and decreasing the amounts of lipid peroxidation products and ROS. The mechanism may be involved in NF- κ B pathway.

Key words: gastrodin; high glucose; oxidative stress; human umbilical vein endothelial cells; NF- κ B

糖尿病是由于胰岛素分泌绝对或相对不足而引起的高血糖为主要标志。糖尿病在我国发病率逐年上升, 其病因和发病机制尚未完全阐明, 治疗上仍以控制

收稿日期: 2012-12-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20972061); 华侨大学侨办基金(10QZR15); 福建省自然科学基金(2013J01337)

作者简介: 乔爱敏(1988—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为药理学。

*通信作者 刘青 E-mail: liuq@hqu.edu.cn

血糖水平稳定和调节脂质代谢平衡为主。

近年来,使用中药或中西药联用治疗糖尿病日益受到人们的重视。天麻素最初是从兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Blume. 中分离得到的有效成分,也存在于其他植物如兰科植物金线兰 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 中,临床上主要用于治疗神经系统疾病^[1-2]。近年研究表明天麻素还具有其他多种生物活性,如抑制高糖诱导的小神经胶质细胞中炎症因子的表达,该作用可能与天麻素的抗氧化活性有关;控制高脂喂饲肥胖大鼠的体质量,调节大鼠的脂肪酸代谢及降低血糖浓度,并提高胰岛素的敏感性,降低胰岛素抵抗^[3-4]。然而天麻素是否具有抗糖尿病作用还鲜见报道。

在研究抗糖尿病药用植物金线莲的活性成分时,发现从该植物中分得的天麻素能拮抗高糖对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖活力的抑制作用,提高内皮细胞内一氧化氮(NO)的量,但机制不明。高血糖诱导的氧化应激是糖尿病的重要特征,也是糖尿病造成损伤的主要原因之一^[5]。因此本实验进一步考察天麻素对高糖诱导的 HUVEC 内氧化应激的影响,为进一步探讨其抗糖尿病的潜力提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

天麻素由兰州大学功能有机分子化学国家重点实验室从兰科植物金线兰 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 中分离、鉴定,质量分数>90%;D-葡萄糖注射液,中国大冢制药有限公司,批号8I96D;维生素E胶丸,厦门星鲨制药有限公司,批号10894024;新生牛血清、M199培养基、RNA提取试剂、PCR试剂盒,Gibco公司;2',7'-二乙氧二氯荧光素(DCFH-DA)染料,Sigma公司;NO、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总抗氧化活力(T-AOC)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒,南京建成生物工程公司;DNA Marker, Solarbio公司;总RNA抽提试剂(Trizol)、人NF-κB p50与β-actin引物,由大连宝生物公司设计并合成;四甲基偶氮唑盐(MTT),武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 细胞

原代培养的 HUVEC,福建省厦门市第二人民医院健康产妇自愿提供。

1.3 仪器

生物安全柜、酶标仪、CO₂培养箱,美国热电公司;DMIL 相差倒置显微镜,莱卡公司;低温冻

离心机,美国 Sigma 公司;凝胶成像系统,上海天能科技有限公司;ABI Prism7700 型荧光定量基因扩增仪,美国应用生物系统公司;琼脂糖凝胶电泳仪,北京六一仪器厂。

2 方法

2.1 原代 HUVEC 的分离、培养及鉴定

在无菌条件下,取健康产妇分娩的脐带,固定,用预热磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗静脉血管,1%胰蛋白酶消化 HUVEC,用镊子轻轻挤压血管,使 HUVEC 脱落、分离。收集带有 HUVEC 的细胞消化分离液和 PBS,离心,弃去上清液,细胞沉淀用 M199 培养基重悬,植入 1%明胶预包被(过夜)的塑料培养皿,静置培养 24 h 后更换 M199 完全培养基,此后 3 d 更换 1 次培养基,直到细胞铺满,再进行传代培养。倒置显微镜下观察细胞形态,用兔抗人 VIII 因子相关抗原免疫组织化学检测试剂盒对 HUVEC 进行鉴定。

2.2 对正常 HUVEC 的毒性检测

取生长状态良好的 2~4 代 HUVEC,用 0.25% 胰蛋白酶消化,收集细胞,用 M199 培养基调整细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$,接种到 96 孔板,每孔 100 μL,静置培养 24 h。弃掉旧培养基,各孔加入新鲜 M199 培养基 90 μL,对照组每孔加入 PBS 10 μL,各给药组分别按终质量浓度为 10、20、50、100 μg/mL 每孔加入天麻素 10 μL,每个质量浓度 6 个复孔,静置培养 24 h,在终止培养前 4 h 每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μL,置 CO₂ 培养箱中培养 4 h,除去上清液,加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,酶标仪检测 570 nm 波长处各孔吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 对高糖下 HUVEC 细胞增殖的影响

取生长状态良好的 2~4 代 HUVEC,设对照组,模型组,天麻素 10、20、50 μg/mL 组,维生素 E 阳性对照组,每组 6 个复孔。模型组每孔加入 PBS 10 μL,阳性对照组每孔加入维生素 E 溶液 10 μL(至终浓度为 800 μmol/L),天麻素各组每孔给予相应质量浓度的天麻素 10 μL。给药 1 h 后,除对照组每孔加入 PBS 20 μL 外,其余各组每孔均加入葡萄糖溶液 10 μL,至葡萄糖终浓度 40 mmol/L,培养 72 h,MTT 法检测各孔 A 值。

2.4 对高糖下 NO 的影响

分组、给药与高糖诱导氧化应激同“2.3”项。给予高浓度葡萄糖后细胞培养 72 h,收集细胞培养

液, 4℃保存, 消化细胞并收集于 1.5 mL 离心管中, 每管加入 4℃预冷的细胞裂解液 400 μL 于冰上裂解 10 min, 4℃、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按照试剂盒说明书进行 NO 的测定。

2.5 对高糖下 HUVEC 抗氧化能力的影响

2.5.1 SOD、CAT 活性及 T-AOC 检测 实验分组与给药同“2.3”项。给予高浓度葡萄糖后细胞培养 72 h, 消化收集的细胞, 裂解, 取上清液按照相关试剂盒说明书测定 SOD、CAT 活力及 T-AOC。

2.5.2 MDA 量的测定 实验分组与给药同“2.3”项, 采用硫代巴比妥酸 (TBA) 显色法并按照试剂盒说明书测定 MDA 的量。

2.5.3 活性氧 (ROS) 水平的检测 取生长状态良好的 2~4 代 HUVEC, 调整细胞密度至 1×10^5 /mL, 分成对照组、模型组、天麻素低和高质量浓度组。对照组每孔加入 PBS 20 μL, 模型组每孔加入 PBS 10 μL, 天麻素组分别给予天麻素 20、50 μg/mL, 给予体积 10 μL。给药后 1 h, 除对照组外, 其余 3 组均加入高糖溶液 10 μL, 至葡萄糖终浓度为 40 mmol/L, 再培养 72 h, 每组 4 个复孔。试验结束前 2 h, 每孔加入 DCFH-DA 染液 10 μL 至 DCFH-DA 终浓度为 10 μmol/L, 作用 30 min, 弃掉旧培养基, PBS 清洗 1 次, 用荧光显微镜观察 (×20)、拍照。

2.6 实时荧光定量 PCR 检测 HUVEC 中 NF-κB 基因的表达

2.6.1 引物 NF-κB p50 引物序列: 正向引物 GCC-TCCACAAGGCAGCAAATA, 反向引物 CACCAC-GGTCAGAGACTCGGTAA, 扩增片段长度 112 bp。β-actin 引物序列: 正向引物 TGGCAGCCAGCAC-AATGAA, 反向引物 CTAAGTCATAGTCCGCCTA-GAAGCA, 扩增片段长度 186 bp。

2.6.2 细胞 RNA 提取 将培养好的 HUVEC 加入 Trizol 1 mL, 反复吹打使细胞脱落, 根据 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 紫外分光光度计检测 260、280 nm 波长处 A 值, 选择 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 的样品用于后续实验。

2.6.3 琼脂糖凝胶电泳 将提取的 RNA 反转录成 cDNA 并进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 以 DNA Marker 为标尺, UVP 凝胶成像系统下观察, 目标 DNA 条带清晰, 无杂带且不拖尾。

2.6.4 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 以 cDNA 产物为模板, SYBR Green I 荧光染料法进行 RT-PCR

反应的实验。NF-κB PCR 的循环参数: 95℃、1 min 变性, 95℃、15 s, 50℃、15 s, 72℃、30 s 扩增, 40 个循环反应。扩增后进行溶解曲线分析, 以 0.17℃/s 变化速度从 55℃升至 95℃, 每隔 2 s 记录 1 次荧光值, 获得溶解曲线。所有样品检测均设置阴性对照 (无模板) 以排除假阳性结果。数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法 (相对基因表达量 = $2^{-(\Delta C_t \text{ 样本} - \Delta C_t \text{ 对照})}$) [6]。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计学软件进行统计学分析, 组间差异采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 HUVEC 形态学观察及鉴定

倒置显微镜观察可见, 贴壁生长至融合的原代 HUVEC 为单层, 互不重叠, 呈典型的鹅卵石样排列; 细胞呈扁平长梭形, 多角形, 边界清楚, 细胞核圆形或卵圆形位于细胞中央, 核中显示有 1~2 个核仁。免疫组织化学法检测凝血因子 VIII 因子, 结果为阳性, HUVEC 的胞浆显示棕黄色, 整个细胞的轮廓清晰。结果见图 1。

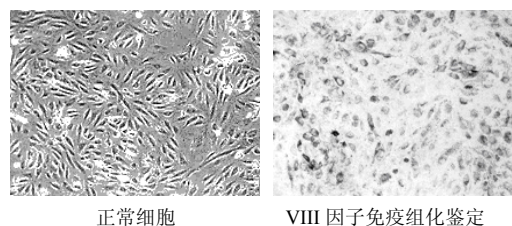


图 1 HUVEC 形态观察与鉴定

Fig. 1 Morphology and identification of primary HUVEC

3.2 对正常 HUVEC 的毒性

正常 HUVEC 与天麻素 10、20、50、100 μg/mL 共同孵育 24 h 后对细胞生长无影响。提示天麻素 10~100 μg/mL 对正常 HUVEC 生长无毒性。结果见图 2。

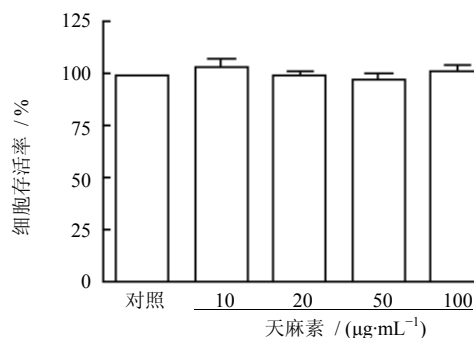


图 2 天麻素对正常 HUVEC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Effect of gastrodin on viability of normal HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.3 对氧化应激中 HUVEC 增殖活力的影响

与对照组相比,模型组细胞活力显著降低 ($P < 0.01$),表明高糖模型制备成功。与模型组相比,维生素组、天麻素 10、20、50 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞活力均显著提高 ($P < 0.05$ 、 0.01),表明天麻素对高糖诱导 HUVEC 的损伤有保护作用。结果见图 3。

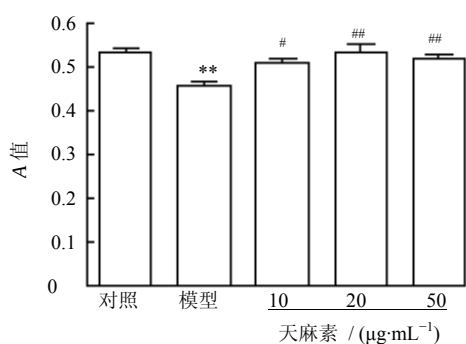
3.4 对氧化应激中 NO 量的影响

与对照组相比,模型组 HUVEC 内 NO 的量明显下降 ($P < 0.01$)。与模型组相比,维生素 E 组、天麻

素各给药组 HUVEC 内 NO 的量显著增加 (图 4) ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.5 对氧化应激中 HUVEC 抗氧化能力的影响

与对照组相比,模型组 HUVEC 中抗氧化酶 SOD、CAT 活性明显下降 ($P < 0.01$),T-AOC 显著下降 ($P < 0.01$)。与模型组相比,维生素 E 组、天麻素各给药组 HUVEC 内 SOD、CAT 活性及 T-AOC 有升高趋势,天麻素 50 $\mu\text{g/mL}$ 能显著增强 SOD、CAT 的活性 ($P < 0.05$),显著降低 MDA 的量 ($P < 0.05$);在 20、50 $\mu\text{g/mL}$ 时显著增强 T-AOC 的活性 ($P < 0.01$)。结果见图 5。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下图同
** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group,
same as below

图3 天麻素对氧化应激中 HUVEC 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of gastrodin on proliferation of HUVECs in oxidative stress ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

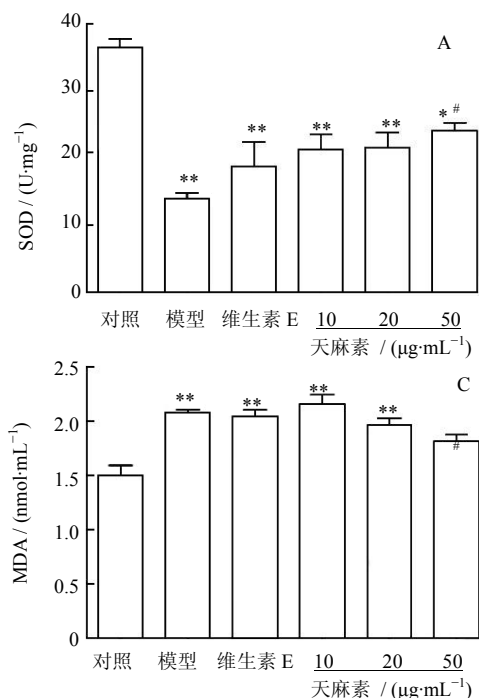


图5 天麻素对高糖下 HUVEC 的 SOD (A) 和 CAT (B) 活性、MDA 量 (C)、T-AOC (D) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effects of gastrodin on activities of SOD (A), CAT (B), extracellular content of MDA (C), and T-AOC (D) in HUVEC in oxidative stress ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

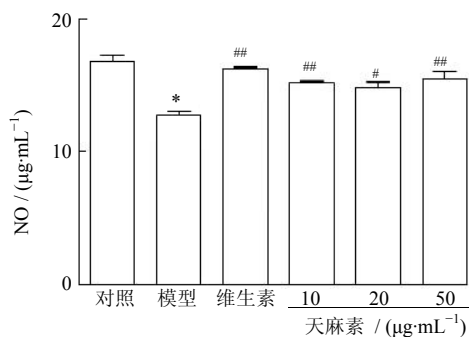
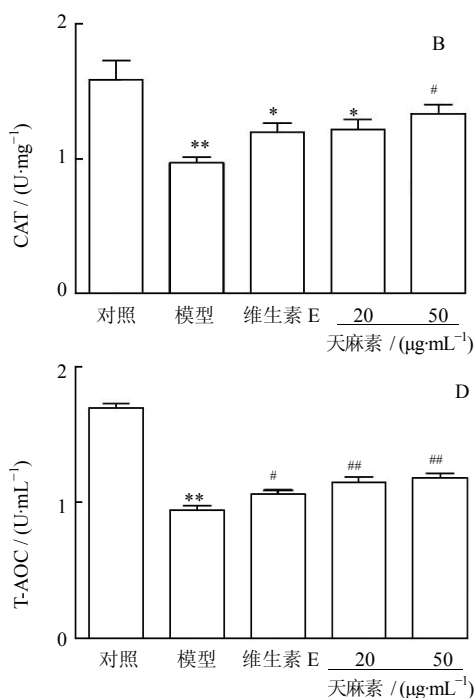


图4 天麻素对氧化应激中 HUVEC 内 NO 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of gastrodin on NO content in HUVEC in oxidative stress ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



3.6 对 HUVEC ROS 水平的影响

对照组 HUVEC 荧光背景很弱,表明在正常条件下细胞内 ROS 的量很少。模型组 HUVEC 显示了很强的荧光强度,表明高糖能诱导该细胞 ROS 生成,氧化应激增强。与模型组相比,天麻素 20、50 $\mu\text{g/mL}$ 组 HUVEC 的荧光强度明显减弱,提示天麻

素能抑制高糖诱导的 ROS 生成,见图 6。

3.7 对高糖下 HUVEC 中 NF- κ B 基因表达的影响

RT-PCR 结果显示,与对照组相比,模型组 HUVEC 内 NF- κ B 基因表达明显上调 ($P < 0.01$)。与模型组相比,维生素 E 和天麻素 20、50 $\mu\text{g/mL}$ 组均能使 NF- κ B 基因的表达下调 ($P < 0.01$)。结果见图 7。

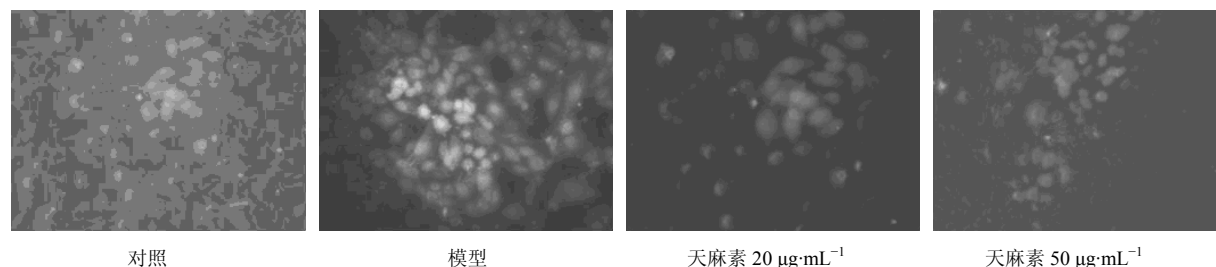


图 6 天麻素对氧化应激中 HUVEC 内 ROS 的影响

Fig. 6 Effect of gastrodin on content of ROS in HUVEC in oxidative stress

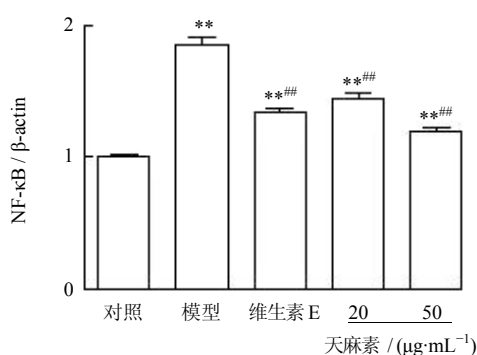


图 7 天麻素对氧化应激中 HUVEC 中 NF- κ B 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of gastrodin on relative expression of NF- κ B in HUVEC in oxidative stress ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

氧化应激是体内 ROS 等产生过多或清除减少形成的氧化系统和抗氧化系统间的平衡紊乱。尽管糖尿病的发病机制尚未完全阐明,但高血糖诱发的氧化应激造成的细胞功能失调及损伤,被认为是糖尿病发生、发展的主要因素。本实验结果表明,持续以高糖刺激 72 h 后, HUVEC 内 ROS 生成明显增多,重要的抗氧化酶 SOD、CAT 活性下降,使细胞内自由基的清除能力减弱,导致自由基的生成与代谢失衡,因而表现为 HUVEC 内 T-AOC 降低,脂质过氧化产物增多,提示高糖刺激下 HUVEC 内氧化应激显著增强。

ROS 能激活氧化还原敏感的转录因子,包括

NF- κ B 和激活因子蛋白-1 (AP-1)。NF- κ B 是目前研究得最多的核因子,其对氧化应激产生的 ROS 非常敏感,ROS 可直接激活 NF- κ B,也可以通过其他途径间接使 NF- κ B 活化。激活的 NF- κ B 启动和调节黏附因子、内皮素、血管内皮生长因子 (VEGF)、炎症因子等下游基因的转录,最终导致血管细胞增殖改变及血管功能损伤^[7]。本实验结果显示,经天麻素干预后,高糖损伤的 HUVEC 中抗氧化系统清除自由基能力的增强,ROS 生成减少,氧化应激减弱, NF- κ B 基因的表达水平也显著降低, HUVEC 损伤得到改善增殖活力明显增强。

NO 是血管内皮细胞生成的舒血管物质,在正常状态下,与缩血管因子内皮素一起调节血管的功能,使血管的舒缩保持动态平衡,因此 NO 也被认为是反应血管内皮细胞功能的标志。本实验结果表明,在高糖刺激下,血管内皮细胞中 NO 的量显著下降,提示血管内皮功能受损。有学者认为糖尿病状态下氧化应激增强,自由基增多使 NO 灭活增加,是 NO 减少的主要因素,NO 减少而内皮素及炎症相关因子合成增加,引起血管舒张障碍,削弱了内皮自稳态,是糖尿病血管并发症的基础^[8]。而天麻素能显著增加高糖刺激下 HUVEC 中 NO 的量,从而改善血管内皮功能。

天麻素不仅有显著的神经保护作用,也具有良好的抗炎、抗心肌肥大、抗高血脂、抗高血压等作用^[9-12],这些研究为天麻素在心脑血管的应用提供了依据。本实验结果表明,天麻素能有效抑制高糖

诱导的 HUVEC 中氧化应激, 抑制 NF- κ B 的激活并提高 NO 的量, 显示血管内皮保护作用。然而天麻素是否有抗糖尿病作用还进一步研究。

参考文献

- [1] Lv H, Li A, Liu F, *et al.* Effects of gastrodin on the dopamine system of Tourette's syndrome rat models [J]. *Biosci Trends*, 2009, 3(2): 58-62.
- [2] Choi D K, Koppula S, Suk K. Inhibitors of microglial neurotoxicity: focus on natural products [J]. *Molecules*, 2011, 16(2): 1021-1043.
- [3] 杜晓红, 毛瑞阳, 刘毅, 等. 天麻糖素对高糖诱导的神经小胶质细胞 TL-1 β , IL-6 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(12): 1535-1539.
- [4] 王君, 王颢, 郭真, 等. 构建高脂饮食肥胖大鼠模型体质量及代谢变化与天麻素的干预 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(20): 3992-3996.
- [5] Evans J L, Goldfine I D, Maddux B A, *et al.* Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes [J]. *Endocr Rev*, 2002, 23(5): 599-622.
- [6] Aggarwal B B, Takada Y, Shishodia S, *et al.* Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology and medicine [J]. *Indian J Exp Biol*, 2004, 42(4): 341-353.
- [7] 唐永凯, 贾永义. 荧光定量 PCR 数据处理方法的探讨 [J]. 生物技术, 2008, 18(3): 89-91.
- [8] Graier W F, Posch K, Wascher T C, *et al.* Role of superoxide anions changes of endothelial vasoactive response during acute hyperglycemia [J]. *Horm Metab Res*, 1997, 29(12): 622-626.
- [9] Dai J N, Zong Y, Zhong L M, *et al.* Gastrodin inhibits expression of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and proinflammatory cytokines in cultured LPS-stimulated microglia via MAPK pathways [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21891.
- [10] Shu C, Chen C, Zhang D P, *et al.* Gastrodin protects against cardiac hypertrophy and fibrosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 359(1/2): 9-16.
- [11] 于滨, 左增艳, 蒋建东. 天麻细粉和天麻素降血脂作用的实验研究 [J]. 中国医药生物技术, 2010, 5(6): 415-418.
- [12] Zhang Q, yang Y M, Yu G Y. Effects of gastrodin injection on blood pressure and vasoactive substances in treatment of old patients with refractory hypertension: a randomized controlled trial [J]. *J Chin Integ Med*, 2008, 6(7): 695-699.