

龙胆苦苷对脂多糖诱导血管内皮细胞损伤的作用及机制

胡志良¹, 池 豪², 丁水印¹

1. 驻马店市中心医院 心血管内科, 河南 驻马店 463000

2. 郑州市中心医院 心血管内科, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 研究龙胆苦苷对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导血管内皮细胞损伤的作用及机制。方法 以 LPS 刺激大鼠主动脉血管内皮细胞 RAEC, 并给予低、中、高剂量 (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 龙胆苦苷进行干预, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况; 采用流式细胞术检测细胞凋亡情况; 采用试剂盒检测细胞丙二醛水平和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; 采用 qRT-PCR 法检测细胞中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)、白细胞介素-6 (interleukin-6, *IL-6*)、*IL-1 β* mRNA 表达情况; 采用 Western blotting 方法检测细胞中磷酸化 p65 (p-p65) 和剪切型半胱氨酸蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3) 蛋白表达情况。RAEC 细胞给予核因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 信号激活剂处理, 考察 NF- κB 信号激活剂对龙胆苦苷改善 RAEC 细胞损伤的影响。结果 与对照组比较, 模型组细胞活性显著降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$), 丙二醛水平显著升高 ($P < 0.05$), SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$), *TNF- α* 、*IL-6* 和 *IL-1 β* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), cleaved Caspase-3 和 p-p65 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 龙胆苦苷组细胞活性显著升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$), 丙二醛水平显著降低 ($P < 0.05$), SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$), *TNF- α* 、*IL-6* 和 *IL-1 β* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), cleaved Caspase-3 和 p-p65 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。NF- κB 信号激活剂显著抑制龙胆苦苷改善 RAEC 细胞损伤的作用 ($P < 0.05$)。结论 龙胆苦苷能够抑制 LPS 诱导的 RAEC 细胞凋亡、氧化损伤和炎症因子表达, 其作用机制可能与抑制 NF- κB 信号通路有关。

关键词: 龙胆苦苷; 血管内皮细胞; 凋亡; 炎症反应; 氧化损伤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)10-3002-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.017

Effect and mechanism of gentiopicroside on vascular endothelial cell injury induced by lipopolysaccharide

HU Zhi-liang¹, CHI Hao², DING Shui-yin¹

1. Cardiovascular Department of Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

2. Department of Cardiology, Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To study effect and mechanism of gentiopicroside on lipopolysaccharide (LPS)-induced vascular endothelial cell injury. **Methods** RAEC cells were stimulated by LPS and given low-, medium- and high-dose (5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$) gentiopicroside for intervention. CCK-8 was used to detect cell proliferation; Flow cytometry was used to detect cell apoptosis; Reagent test kits were used to detect malondialdehyde level and superoxide dismutase (SOD) activity in cells; qRT-PCR was used to detect tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), interleukin-6 (*IL-6*), and *IL-1 β* mRNA levels in cells; Western blotting was used to detect p-p65 and cleaved Caspase-3 expressions in cells. RAEC cells were treated with nuclear factor- κB (NF- κB) signal activator to investigate the effect of NF- κB signal activator on gentiopicroside in improving RAEC cells damage. **Results** Compared with control group, cell activity in model group was significantly reduced ($P < 0.05$), apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.05$), malondialdehyde level was significantly increased ($P < 0.05$), SOD activity was significantly reduced ($P < 0.05$), *TNF- α* , *IL-6* and *IL-1 β* mRNA levels were significantly increased ($P < 0.05$), cleaved Caspase-3 and p-p65 expressions were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, cell activity in gentiopicroside group was significantly increased ($P < 0.05$), apoptosis rate was significantly reduced ($P < 0.05$), malondialdehyde level was significantly reduced ($P < 0.05$), SOD activity was significantly

收稿日期: 2020-12-02

基金项目: 河南省科学技术计划项目 (2018225019)

作者简介: 胡志良 (1980—), 男, 硕士, 主治医师, 从事心血管内科研究。Tel: 15938085336 E-mail: huzl2020@163.com

increased ($P < 0.05$), *TNF- α* , *IL-6* and *IL-1 β* mRNA levels were significantly reduced ($P < 0.05$), cleaved Caspase-3 and p-p65 expressions were significantly reduced ($P < 0.05$). NF- κ B signal activator significantly inhibited the effect of gentiopicroside in improving RAEC cells damage ($P < 0.05$). **Conclusion** Gentiopicrocin can inhibit LPS-induced apoptosis, oxidative damage and inflammatory factor expression in RAEC cells, which mechanism may be related to the inhibition of NF- κ B signaling pathway.

Key words: gentiopicroside; vascular endothelial cells; apoptosis; inflammatory response; oxidative damage

血管内皮细胞具有分泌细胞因子、维持血管结构等多种功能,在肿瘤、严重感染、心血管系统疾病发生过程中均发现有血管内皮细胞损伤^[1]。病理条件下,细胞分泌大量的炎性因子,合成活性氧自由基,细胞过度凋亡^[2]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)促进血管内皮细胞凋亡、氧化应激和炎性因子分泌^[3]。龙胆苦苷提取自龙胆科植物,具有抗氧化、抗炎、杀菌等作用,临床上主要用于抗炎、健胃、保肝以及抗病原微生物的治疗^[4]。研究发现,龙胆苦苷能够改善氧化应激下血管内皮细胞氧化损伤,龙胆苦苷可能具有血管内皮损伤保护作用^[5]。龙胆苦苷能够通过抑制核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路,从而抑制氧化应激和炎性反应^[6]。人体内脑、肝、心、肺等多种组织均表达 NF- κ B, NF- κ B 负责调控氧化应激、细胞凋亡和炎性反应^[7]。LPS 可激活血管内皮细胞 NF- κ B 信号通路,抑制 NF- κ B 信号通路能够保护血管内皮细胞损伤^[8]。本研究考察龙胆苦苷对 LPS 诱导的血管内皮细胞损伤的作用及机制,为其治疗感染等因素诱导的血管内皮损伤提供依据。

1 材料

1.1 细胞

大鼠主动脉血管内皮细胞 RAEC 购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

龙胆苦苷(批号 L-005,质量分数>98%)购自成都瑞芬思生物科技有限公司;丙二醛检测试剂盒(批号 BC0025)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(批号 BC0175)、膜联蛋白 V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate isomer, FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)细胞凋亡检测试剂盒(批号 CA1020)购自北京索莱宝科技有限公司;兔抗磷酸化 p65(p-p65)抗体、兔抗剪切型半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)抗体、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、HRP 标记的山羊抗兔抗体购自英

国 Abcam 公司;RPMI 1640 培养基(批号 R8758)、胎牛血清(批号 F2442)购自美国 Sigma 公司;PMA(批号 GT6290)购自北京华越洋生物科技有限公司;引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。

1.3 仪器

Multiscan MK3 酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);FC500 流式细胞仪(美国 Beckman 公司);5424 离心机、5810R 离心机(德国 Eppendorf 公司);LightCycler480 荧光定量 PCR 仪(美国 Roche 公司);PowerPac 蛋白电泳仪、Gel Doc XR+凝胶显示系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

RAEC 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2 龙胆苦苷对 RAEC 细胞活力的影响

取处于对数生长期的 RAEC 细胞,以 3×10^3 /孔接种至 96 孔板中,培养 12 h。设置对照组和龙胆苦苷(5、10、20、40、80 μ mol/L)组,各给药组加入相应药物,对照组加入不含药物的培养基,培养 24 h。每孔加入 10 μ L CCK-8 工作液,孵育 2 h,采用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度(A)值。

2.3 龙胆苦苷对 RAEC 细胞增殖的影响

取处于对数生长期的 RAEC 细胞,以 3×10^3 /孔接种至 96 孔板中,培养 12 h。设置对照组、模型组和龙胆苦苷(5、10、20 μ mol/L)组,模型组和各给药组加入 LPS(100 μ g/mL),各给药组再加入相应药物,对照组加入不含药物的培养基,培养 24 h。按“2.2”项下方法检测各组细胞活力。

2.4 龙胆苦苷对 RAEC 细胞凋亡的影响

取处于对数生长期的 RAEC 细胞,以 1×10^3 /孔接种至 6 孔板中,培养 12 h。设置对照组、模型组和龙胆苦苷(5、10、20 μ mol/L)组,模型组和各给药组加入 LPS(100 μ g/mL),各给药组再加入相应药物,对照组加入不含药物的培养基,培养 24 h。收集细胞,以 PBS 溶液重悬,制成 5×10^5 /mL 细胞悬液,加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 染色液,

1 h 内采用流式细胞仪测定各组细胞凋亡情况。

2.5 龙胆苦苷对 RAEC 细胞丙二醛水平和 SOD 活性的影响

按“2.4”项下方法处理细胞,按照试剂盒说明书检测各组细胞丙二醛水平和 SOD 活性。

2.6 龙胆苦苷对 RAEC 细胞肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , $TNF-\alpha$)、白细胞介素-6 (interleukin-6, $IL-6$) 和 $IL-1\beta$ mRNA 表达的影响

按“2.4”项下方法处理细胞,按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列: $TNF-\alpha$ 上游引物 5'-TGACAAGCC-TGTAGCCCATGTT-3',下游引物 5'-AGGGCAATG-ATCCCAAAGTAGA-3'; $IL-6$ 上游引物 5'-CCAGTA-CCCCCAGGAGAAGAT-3',下游引物 5'-TTGCCTT-TTTCTGCAGGAAC-3'; $IL-1\beta$ 上游引物 5'-AGTT-GCCTTCTTGGGACTGA-3',下游引物 5'-TCCAC-GATTTCCCAGAGAAC-3'; $GAPDH$ 上游引物 5'-CCAGCAAAGAGACCAAGAGGAA-3',下游引物 5'-ATGGTACATAGACAAGGTGCGG-3'。

2.7 龙胆苦苷对 RAEC 细胞 p-p65 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

按“2.4”项下方法处理细胞,收集细胞,加入 RIPA 裂解液,4 °C、12 000×g 离心 10 min,收集上清液,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,于 5%牛血清白蛋白中封闭 1 h,分别加入 p-p65 和 cleaved Caspase-3 抗体 (1:600),4 °C 孵育过夜;加入 HRP 标记的山羊抗兔抗体 (1:4000),室温孵育 2 h,加入 ECL 发光液显影。

2.8 NF- κ B 信号激活剂 (PMA) 对龙胆苦苷促进 RAEC 细胞增殖的影响

取处于对数生长期的 RAEC 细胞,以 3×10^3 /孔接种至 96 孔板中,培养 12 h。设置对照组、模型组、龙胆苦苷 (10 μ mol/L) 组和龙胆苦苷 (10 μ mol/L) 联合 PMA (1 μ mol/L) 组,模型组和各给药组加入 LPS (100 μ g/mL),各给药组再加入相应药物,对照组加入不含药物的培养基,培养 24 h。按“2.2”项下方法检测各组细胞活力。

2.9 PMA 对龙胆苦苷抑制 RAEC 细胞凋亡的影响

取处于对数生长期的 RAEC 细胞,以 1×10^3 /孔接种至 6 孔板中,培养 12 h。设置对照组、模型组、龙胆苦苷 (10 μ mol/L) 组和龙胆苦苷 (10 μ mol/L)

联合 PMA (1 μ mol/L) 组,模型组和各给药组加入 LPS (100 μ g/mL),各给药组再加入相应药物,对照组加入不含药物的培养基,培养 24 h。按“2.4”项下方法检测各组细胞凋亡情况。

2.10 PMA 对龙胆苦苷抑制 RAEC 细胞丙二醛水平、升高 SOD 活性的影响

按“2.8”项下方法处理细胞,按“2.5”项下方法检测各组细胞丙二醛水平和 SOD 活性。

2.11 PMA 对龙胆苦苷抑制 RAEC 细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 和 $IL-1\beta$ mRNA 表达水平的影响

按“2.8”项下方法处理细胞,按“2.6”项下方法检测各组细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 和 $IL-1\beta$ mRNA 表达情况。

2.12 PMA 对龙胆苦苷抑制 RAEC 细胞 p-p65 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平的影响

按“2.8”项下方法处理细胞,按“2.7”项下方法检测各组细胞 p-p65 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达情况。

2.13 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用独立样本 t 检验和单因素方差比较。

3 结果

3.1 龙胆苦苷对 RAEC 细胞活力的影响

如表 1 所示,与对照组比较,龙胆苦苷 (5、10、20 μ mol/L) 组细胞活力无明显变化,龙胆苦苷 (40、80 μ mol/L) 组细胞活力显著降低 ($P < 0.05$)。因此,选择 5、10、20 μ mol/L 龙胆苦苷进行后续研究。

3.2 龙胆苦苷对 RAEC 细胞增殖和凋亡的影响

如图 1 和表 2 所示,与对照组比较,模型组细胞活力显著降低 ($P < 0.05$),细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,龙胆苦苷组细胞活力显著升高 ($P < 0.05$),细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$),

表 1 龙胆苦苷对 RAEC 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Effect of gentiopicoside on viability of RAEC cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ (μ mol·L ⁻¹)	A ₄₉₀
对照	—	0.65 ± 0.05
龙胆苦苷	5	0.63 ± 0.07
	10	0.60 ± 0.08
	20	0.61 ± 0.05
	40	0.50 ± 0.04*
	80	0.32 ± 0.03*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

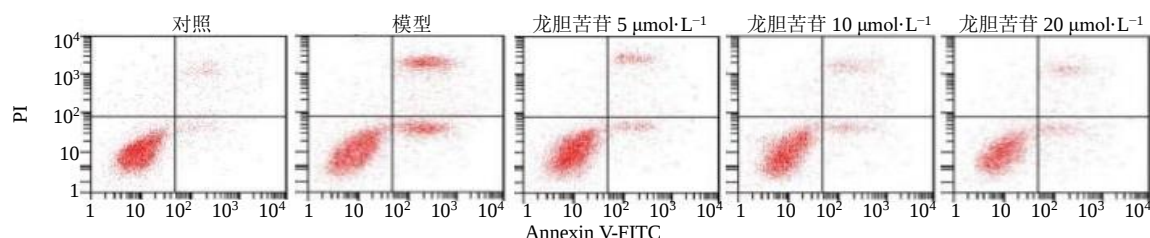


图 1 龙胆苦苷对 RAEC 细胞凋亡的影响

Table 1 Effect of gentiopicroside on apoptosis of RAEC cells

表 2 龙胆苦苷对 RAEC 细胞增殖和凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of gentiopicroside on proliferation and apoptosis of RAEC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A_{490}	凋亡率/%
对照	—	0.67 ± 0.07	6.35 ± 0.42
模型	—	$0.36 \pm 0.03^*$	$27.61 \pm 2.26^*$
龙胆苦苷	5	$0.44 \pm 0.04^{\#}$	$22.41 \pm 1.24^{\#}$
	10	$0.56 \pm 0.06^{\#}$	$14.30 \pm 1.17^{\#}$
	20	$0.65 \pm 0.05^{\#}$	$8.62 \pm 0.53^{\#}$

与对照组比较: $^*P < 0.05$; 与模型组比较: $^{\#}P < 0.05$, 下表同

$^*P < 0.05$ vs control group; $^{\#}P < 0.05$ vs model group, same as below tables

呈剂量相关性, 表明龙胆苦苷可促进 LPS 诱导的 RAEC 细胞增殖并抑制其凋亡。

3.3 龙胆苦苷对 RAEC 细胞丙二醛水平和 SOD 活性的影响

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组细胞丙二醛水平显著升高 ($P < 0.05$), SOD 活性显著降低 ($P <$

表 3 龙胆苦苷对 RAEC 细胞丙二醛水平和 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of gentiopicroside on malondialdehyde level and SOD activity in RAEC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	丙二醛/ ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	SOD/ ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)
对照	—	1.03 ± 0.10	17.45 ± 1.32
模型	—	$3.78 \pm 0.25^*$	$8.36 \pm 0.74^*$
龙胆苦苷	5	$3.05 \pm 0.15^{\#}$	$10.25 \pm 1.04^{\#}$
	10	$2.14 \pm 0.22^{\#}$	$13.46 \pm 1.17^{\#}$
	20	$1.23 \pm 0.10^{\#}$	$15.04 \pm 1.08^{\#}$

0.05); 与模型组比较, 龙胆苦苷组细胞丙二醛水平显著降低 ($P < 0.05$), SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$), 呈剂量相关性, 表明龙胆苦苷可抑制 LPS 诱导的 RAEC 细胞氧化应激。

3.4 龙胆苦苷对 RAEC 细胞 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 和 $\text{IL-1}\beta$ mRNA 表达的影响

如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 和 $\text{IL-1}\beta$ mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$);

表 4 龙胆苦苷对 RAEC 细胞 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 和 $\text{IL-1}\beta$ mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of gentiopicroside on mRNA expressions of $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 and $\text{IL-1}\beta$ in RAEC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	mRNA 相对表达量		
		$\text{TNF-}\alpha$	IL-6	$\text{IL-1}\beta$
对照	—	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.11
模型	—	$5.17 \pm 0.42^*$	$9.65 \pm 0.93^*$	$4.16 \pm 0.32^*$
龙胆苦苷	5	$4.12 \pm 0.36^{\#}$	$7.51 \pm 0.62^{\#}$	$2.95 \pm 0.23^{\#}$
	10	$3.01 \pm 0.21^{\#}$	$5.04 \pm 0.52^{\#}$	$2.20 \pm 0.14^{\#}$
	20	$1.78 \pm 0.12^{\#}$	$3.71 \pm 0.28^{\#}$	$1.64 \pm 0.17^{\#}$

与模型组比较, 龙胆苦苷组细胞 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 和 $\text{IL-1}\beta$ mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 呈剂量相关性, 表明龙胆苦苷可抑制 LPS 诱导的 RAEC 细胞炎症因子的表达。

3.5 龙胆苦苷对 RAEC 细胞 p-p65 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

如图 2 和表 5 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 p-p65 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 龙胆苦苷组细胞 p-p65 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ($P <$

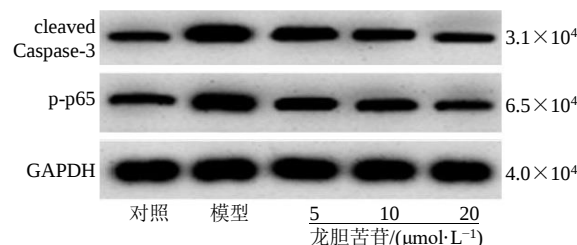


图 2 龙胆苦苷对 RAEC 细胞 p-p65 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of gentiopicroside on expressions of p-p65 and cleaved Caspase-3 in RAEC cells

表 5 龙胆苦苷对 RAEC 细胞 p-p65 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of gentiopicroside on expressions of p-p65 and cleaved Caspase-3 in RAEC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	蛋白相对表达量	
		cleaved Caspase-3	p-p65
对照	—	0.26 ± 0.03	0.30 ± 0.04
模型	—	0.87 ± 0.08*	0.99 ± 0.09*
龙胆苦苷	5	0.63 ± 0.05 [#]	0.68 ± 0.07 [#]
	10	0.49 ± 0.03 [#]	0.59 ± 0.05 [#]
	20	0.24 ± 0.03 [#]	0.33 ± 0.04 [#]

0.05), 呈剂量相关性, 表明龙胆苦苷可抑制 LPS 诱导的 RAEC 细胞 NF- κ B 信号通路的激活, 并抑制细胞凋亡。

3.6 PMA 对龙胆苦苷促进 RAEC 细胞增殖以及抑制 RAEC 细胞凋亡的影响

如图 3 和表 6 所示, 与龙胆苦苷组比较, 龙胆苦苷联合 PMA 组细胞活力显著降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。

3.7 PMA 对龙胆苦苷抑制 RAEC 细胞丙二醛水平、升高 SOD 活性的影响

如表 7 所示, 与龙胆苦苷组比较, 龙胆苦苷联合 PMA 组细胞丙二醛水平显著升高 ($P < 0.05$), SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$)。

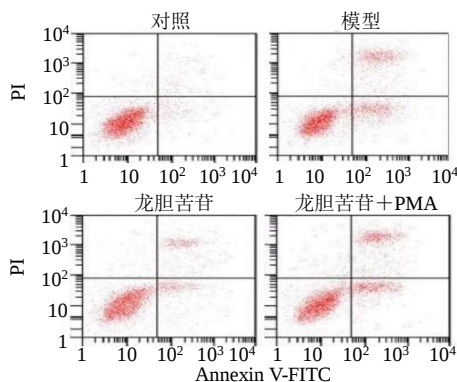


图 3 PMA 对龙胆苦苷抑制血管内皮细胞凋亡的影响
Fig. 3 Effect of PMA on inhibiting RAEC cells apoptosis by gentiopicroside

表 8 PMA 对龙胆苦苷抑制 RAEC 细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 和 $IL-1\beta$ mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of PMA on inhibiting mRNA expressions of $TNF-\alpha$, $IL-6$ and $IL-1\beta$ in RAEC cells by gentiopicroside ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	mRNA 相对表达量		
		$TNF-\alpha$	$IL-6$	$IL-1\beta$
对照	—	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.09
模型	—	4.78 ± 0.41*	9.32 ± 0.74*	4.11 ± 0.36*
龙胆苦苷	10	2.95 ± 0.25	4.84 ± 0.41	2.26 ± 0.21
龙胆苦苷 + PMA	10 + 1	3.20 ± 0.21 [△]	6.98 ± 0.15 [△]	3.25 ± 0.10 [△]

表 6 PMA 对龙胆苦苷促进血管内皮细胞增殖以及抑制细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of PMA on promoting RAEC cells proliferation and inhibiting cells apoptosis by gentiopicroside ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A_{490}	凋亡率/%
对照	—	0.65 ± 0.06	6.32 ± 0.51
模型	—	0.35 ± 0.04*	27.45 ± 2.36*
龙胆苦苷	10	0.57 ± 0.06	13.45 ± 1.23
龙胆苦苷 + PMA	10 + 1	0.40 ± 0.05 [△]	23.69 ± 2.15 [△]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与龙胆苦苷组比较: [△] $P < 0.05$, 下表同
* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs gentiopicroside group, same as below tables

表 7 PMA 对龙胆苦苷抑制 RAEC 细胞丙二醛水平、升高 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of PMA on inhibiting malondialdehyde level and increasing SOD activity of RAEC cells by gentiopicroside ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	丙二醛/ ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	SOD/ ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)
对照	—	1.05 ± 0.11	17.86 ± 1.95
模型	—	3.75 ± 0.31*	8.44 ± 0.82*
龙胆苦苷	10	2.11 ± 0.19	12.95 ± 1.27
龙胆苦苷 + PMA	10 + 1	3.04 ± 0.17 [△]	9.68 ± 0.96 [△]

3.8 PMA 对龙胆苦苷抑制 RAEC 细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 和 $IL-1\beta$ mRNA 表达水平的影响

如表 8 所示, 与龙胆苦苷组比较, 龙胆苦苷联合 PMA 组细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 和 $IL-1\beta$ mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

3.9 PMA 对龙胆苦苷抑制 RAEC 细胞 p-p65 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平的影响

如图 4 和表 9 所示, 与龙胆苦苷组比较, 龙胆苦苷联合 PMA 组细胞 p-p65 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。以上结果表明, PMA 能够抑制龙胆苦苷改善 RAEC 细胞损伤的作用。

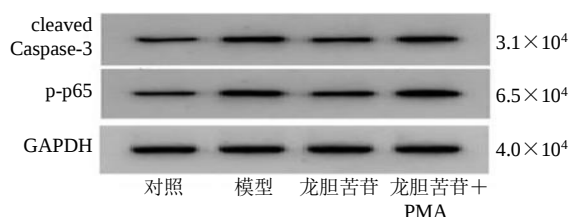


图 4 PMA 对龙胆苦苣抑制 RAEC 细胞 p-p65 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of PMA on inhibiting expressions of p-p65 and cleaved Caspase-3 in RAEC cells by gentiopicoside

表 9 PMA 对龙胆苦苣抑制 RAEC 细胞 p-p65 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effect of PMA on inhibiting expressions of p-p65 and cleaved Caspase-3 in RAEC cells by gentiopicoside ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	蛋白相对表达量	
		cleaved Caspase-3	p-p65
对照	—	0.24 ± 0.02	0.28 ± 0.03
模型	—	$0.86 \pm 0.09^*$	$0.92 \pm 0.10^*$
龙胆苦苣	10	0.50 ± 0.07	0.53 ± 0.07
龙胆苦苣 + PMA	10+1	$0.79 \pm 0.08^\Delta$	$1.23 \pm 0.12^\Delta$

4 讨论

龙胆苦苣为裂环烯醚萜化合物，能够抑制氧化应激和炎症反应^[4]。龙胆苦苣能够抑制氧化应激诱导的血管内皮细胞损伤和细胞凋亡^[5]。本研究结果显示，与模型组比较，龙胆苦苣组细胞活力升高，细胞凋亡率降低，提示龙胆苦苣可能具有改善 LPS 诱导的血管内皮细胞损伤的作用。

LPS 刺激血管内皮细胞损伤与氧化应激、炎症反应有关^[9]。LPS 诱导的血管内皮细胞中抗氧化酶的活性下降，抗氧化酶活性降低能够直接诱导氧自由基的大量聚集，过量的氧自由基能够刺激细胞，诱导脂质发生过氧化，导致氧化损伤；还能够激活细胞内的凋亡反应，促进细胞凋亡^[10-11]。丙二醛水平可直接反应细胞氧化损伤程度^[12]。SOD 是氧自由基清除剂，也是主要的抗氧化酶之一^[13]。Caspase 蛋白家族被激活后形成凋亡级联反应，诱导细胞凋亡；Caspase-3 是 Caspase 凋亡级联反应的下游执行因子，其被活化后是细胞凋亡的标志^[14-15]。LPS 诱导血管内皮细胞分泌炎症因子，促进炎症反应的产生并诱导细胞凋亡^[16]。血管内皮细胞分泌 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎症因子，诱导炎症损伤^[17-19]。氧自由基过度积累可诱导炎症反应，并且炎症因子也可

促进氧化应激^[20-21]。本研究结果显示，模型组细胞丙二醛水平升高，SOD 活性降低，cleaved Caspase-3 蛋白表达水平降低，TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β mRNA 表达水平升高；龙胆苦苣能够显著抑制 LPS 诱导的血管内皮细胞炎症因子表达和氧化损伤，抑制细胞凋亡。

龙胆苦苣能够通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活发挥抗损伤作用^[6]。本研究结果显示，龙胆苦苣组细胞 p-p65 蛋白表达水平降低。p65 是 NF- κ B 信号通路的关键亚单位，其表达量与 NF- κ B 信号通路的激活水平有关^[22]。NF- κ B 在炎症反应、细胞生长和氧化应激等过程中均有调控作用^[23]。血管内皮损伤中 NF- κ B 信号异常激活，抑制 NF- κ B 信号通路能够缓解 LPS 诱导的血管内皮细胞损伤^[7]。本研究结果显示，PMA 能够抑制龙胆苦苣改善 RAEC 细胞损伤的作用，表明龙胆苦苣能够通过 NF- κ B 信号通路发挥血管内皮细胞损伤保护作用。

综上，龙胆苦苣能够改善 LPS 诱导的血管内皮细胞损伤，其机制与抑制 NF- κ B 信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ma H L, Su L, He X Y, et al. Loss of HMBOX1 promotes LPS-induced apoptosis and inhibits LPS-induced autophagy of vascular endothelial cells in mouse [J]. *Apoptosis*, 2019, 24(11/12): 946-957.
- [2] Zhang G Q, Tao Y K, Bai Y P, et al. Inhibitory effects of simvastatin on oxidized low-density lipoprotein-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in vascular endothelial cells [J]. *Chin Med J*, 2018, 131(8): 950-955.
- [3] Hou X H, Yang S B, Yin J. Blocking the REDD1/TXNIP axis ameliorates LPS-induced vascular endothelial cell injury through repressing oxidative stress and apoptosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(1): 104-110.
- [4] 李生浩, 李俊义, 武昆利, 等. 龙胆苦苣的药理作用及分子机制研究进展 [J]. *昆明医科大学学报*, 2020, 41(1): 158-162.
- [5] 杨凯强, 刘宝辉, 王玉玖, 等. 龙胆苦苣预处理对过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞氧化应激损伤的影响及机制 [J]. *山东医药*, 2019, 59(17): 24-27.
- [6] 徐关丽, 陈露露, 蔡江辉, 等. 龙胆苦苣对脓毒症小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. *激光杂志*, 2013, 34(1): 96-97.
- [7] Cildir G, Low K C, Tergaonkar V. Noncanonical NF- κ B signaling in health and disease [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(5): 414-429.

- [8] Yu S, Chen X, Xiu M, *et al.* The regulation of Jmjd3 upon the expression of NF- κ B downstream inflammatory genes in LPS activated vascular endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 485(1): 62-68.
- [9] Yu Z X, Rayile A, Li Y, *et al.* Ulinastatin alleviated Lps-induced injury of cardiac micro vascular endothelial Cell via NF- κ B pathway [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2017, 30(3): 983-988.
- [10] 许静红, 吕嘉贤, 童荔, 等. 髓源性抑制细胞对脂多糖诱导的血管内皮细胞凋亡的保护作用 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(7): 1064-1068.
- [11] 许美霞, 邹丽娟, 张晓霞, 等. Kv1.5 蛋白对内毒素致血管内皮细胞氧化应激损伤的影响 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2018, 47(3): 305-308.
- [12] 曹军, 刘志强, 杨东伟. 大黄素对缺氧复氧心肌细胞凋亡、氧化应激及 AMPK 信号通路蛋白表达的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2020, 55(1): 74-77.
- [13] Li L, Sun S L, Tan L L, *et al.* Polystyrene nanoparticles reduced ROS and inhibited ferroptosis by triggering lysosome stress and TFEB nucleus translocation in a size-dependent manner [J]. *Nano Lett*, 2019, 19(11): 7781-7792.
- [14] 王迪, 徐楠, 郭家妍, 等. 小檗碱上调程序性细胞死亡蛋白 4 抑制黑色素瘤 B16 细胞增殖及促细胞凋亡的研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2020, 24(11): 82-86.
- [15] 刘莎, 吴明, 邸琨, 等. 人脐带间充质干细胞条件培养液通过线粒体凋亡通路对抗 A β 诱导的原代皮质神经元凋亡 [J]. 河北医科大学学报, 2019, 40(4): 390-395.
- [16] Tang Y S, Zhao Y H, Zhong Y, *et al.* Neferine inhibits LPS-ATP-induced endothelial cell pyroptosis via regulation of ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway [J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(9): 727-738.
- [17] Mao Y, Luo W, Zhang L, *et al.* STING-IRF $_3$ triggers endothelial inflammation in response to free fatty acid-induced mitochondrial damage in diet-induced obesity [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(5): 920-929.
- [18] Mitra S, Exline M, Habyarimana F, *et al.* Microparticulate caspase 1 regulates gasdermin D and pulmonary vascular endothelial cell injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 59(1): 56-64.
- [19] Zhong L, Simard M J, Huot J. Endothelial microRNAs regulating the NF- κ B pathway and cell adhesion molecules during inflammation [J]. *FASEB J*, 2018, 32(8): 4070-4084.
- [20] Blaser H, Dostert C, Mak T W, *et al.* TNF and ROS crosstalk in inflammation [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(4): 249-261.
- [21] El-Kenawi A, Ruffell B. Inflammation, ROS, and mutagenesis [J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(6): 727-729.
- [22] 张健, 刘贤, 郭雅丽, 等. 甲磺酸加贝酯联合 CBP 治疗 SAP 的效果及对炎症“瀑布效应”相关因子的影响 [J]. 河北医科大学学报, 2020, 41(3): 272-275, 281.
- [23] 江丹, 熊金河, 尚华. 洛索洛芬钠对急性痛风性关节炎大鼠血清 IL-1 β 和滑膜组织中 NF- κ B 蛋白表达的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2019, 54(3): 446-449.

[责任编辑 李亚楠]