

人参皂苷 Rb1 减轻人脐静脉内皮细胞氧化损伤

宋志明¹, 余舒杰², 焦洁¹, 李平平¹, 李红梅¹, 钱孝贤^{2*}

(1. 河南大学第一附属医院 心内科, 河南 开封 475001; 2. 中山大学附属第三医院 心内科, 广东 广州 510630)

摘要:目的 探讨人参皂苷 Rb1(gRb1)对过氧化氢(H₂O₂)致人脐静脉内皮细胞(HUVECs)氧化损伤的影响。方法 将 HUVECs 分为对照组、H₂O₂(20、40、80 和 160 μmol/L)组、gRb1(10、20 和 40 μmol/L)干预组。MTT 法测定细胞存活率;annexin V-FITC/PI 双染法检测凋亡;黄嘌呤氧化酶法测定 SOD1 活性;硫代巴比妥比色法计算 MDA 含量;Western blot 测定细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)蛋白表达。结果 与对照组相比, H₂O₂ 呈浓度依赖性抑制细胞存活率($P<0.05$),增加细胞凋亡($P<0.05$),抑制 SOD1 活性($P<0.05$),增加 MDA 含量($P<0.05$),促进 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达($P<0.05$)。gRb1 干预能够显著缓解上述指标的变化。结论 gRb1 通过抑制细胞凋亡、改善氧化应激水平和抑制 ICAM-1 及 VCAM-1 蛋白表达减轻 HUVECs 氧化损伤。

关键词: 人参皂苷 Rb1;氧化损伤;细胞间黏附分子-1;血管细胞黏附分子-1

中图分类号:R339.3⁺8 文献标志码:A

Ginsenoside Rb1 alleviates oxidative damage of HUVECs

SONG Zhi-ming¹, YU Shu-jie², JIAO Jie¹, LI Ping-ping¹, LI Hong-mei¹, QIAN Xiao-xian^{2*}

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Henan University, Kaifeng 475001;

2. Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: Objective To explore the effect of ginsenoside Rb1 (gRb1) on oxidative damage of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) resulted from hydrogen peroxide (H₂O₂). **Methods** HUVECs were divided into control group, H₂O₂ group and gRb1 group. MTT assay was used to determine cell survival; annexin V-FITC/PI double staining was used to detect cell apoptosis; SOD1 activity was measured with xanthine oxidase method; MDA concentration was detected by thibaituric acid assay; protein expression of ICAM-1 and VCAM-1 was analysed by Western blot. **Results** Compared with control group, the apoptosis rate, MDA production and the protein level of ICAM-1 and VCAM-1 significantly increased, but the cell viability and SOD1 activity decreased. Compared with H₂O₂ group, gRb1 reversed the parameters mentioned above. **Conclusions** gRb1 can alleviate oxidative damage of HUVECs by reducing cell apoptosis, oxidative stress and protein expression of ICAM-1 and VCAM-1.

Key words: ginsenoside Rb1; oxidative injury; ICAM-1; VCAM-1

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心血管疾病发生和发展的病理基础。血管内皮细胞功能损伤

是 AS 形成的重要机制之一,早于动脉粥样硬化形态学改变,在心血管病的预测和防治方面具有极其重要

收稿日期:2020-03-16 修回日期:2020-05-25

基金项目:河南省医学科技攻关计划(SB201901065, 2018020307);河南省高等学校重点科研项目(19A320019);河南省科技发展计划(182102310559, 202102310373);开封市科技计划(1903008, 2003025)

* 通信作者(corresponding author): qianxx@mail.sysu.edu.cn

的意义^[1-2]。氧化应激会导致血管内皮细胞的功能紊乱,从而导致心血管疾病的发生^[3]。细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)参与 AS 的形成^[4],但其作用机制尚不清楚。人参皂苷 Rb1(ginsenoside Rb1, gRb1)已经被证实具有内皮细胞功能保护作用^[5-6]。

本研究拟建立人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)氧化损伤模型,探讨 gRb1 的药理效果,为其进一步的临床应用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

gRb1(HPLC 98.1%,成都普菲德生物技术有限公司);H₂O₂、MTT、DMSO(Sigma-Aldrich 公司);异丙醇、无水乙醇(广州化学试剂厂);I型胶原酶、无血清培养基、M199 培养基和胎牛血清(Gibco 公司);内皮细胞生长因子(BD 公司);细胞裂解液、蛋白定量试剂盒和凋亡试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);抗 ICAM-1 抗体(Cell Signaling Technology 公司);抗 VCAM-1 抗体(Santa Cruz 公司);抗 GAPDH 内参抗体(Proteintech Group 公司);小鼠及兔 II 抗(武汉博士德生物工程有限公司);分型 SOD 活性及 MDA 检测试剂盒(南京建成生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的分离培养:原代 HUVECs 分离培养见既往报道^[7]。若无特殊交代,研究所用细胞均为 1~3 代。本研究经河南大学第一附属医院伦理委员会批准,符合 Helsinki 原则。

1.2.2 细胞的分组与处理:H₂O₂ 氧化损伤诱导实验:细胞分为对照组和不同浓度的 H₂O₂(20、40、80 和 160 μmol/L)组。gRb1 氧化损伤保护实验:细胞分为对照组, H₂O₂(80 μmol/L)组和不同浓度的 gRb1(10、20 和 40 μmol/L)组。细胞处理:取对数增殖的细胞按实验目的进行接种,培养 24 h 后加药刺激。按照不同实验目的,加药顺序为:gRb1 作用 0.5 h 后加入 H₂O₂ 培养 24 h,收集细胞上清液、细胞和蛋白进行实验。

1.2.3 MTT 法检测细胞存活率:细胞处理结束后,加入 20 μL MTT(5 mg/mL)培养 4 h;去除培养基

后,每孔加入 150 μL 的 DMSO,用锡箔纸遮盖后置于摇床上 15 min 充分摇匀。最后在 490 nm 处,用酶标仪读取各孔的吸光度值(A₄₉₀),计算存活率。

存活率=实验组 A₄₉₀值/对照组 A₄₉₀值。

1.2.4 流式细胞检测细胞凋亡:操作过程见参考文献^[5]。

1.2.5 SOD1 活性及 MDA 含量的测定:用黄嘌呤氧化酶法测定细胞培养上清液中 SOD1 活性;用硫代巴比妥比色法(TBA 法)测定 MDA 含量。操作过程严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.6 Western blot 检测 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白:吸去培养基收集细胞,用 1×磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2~3 遍,加 50~60 μL 细胞裂解液,低温孵育 10 min,刮下细胞,将细胞裂解物吸至 1.5 mL 离心管中,4 ℃下以 13 200 r/min 离心 15 min;吸取上清,分装保存以备后用。BCA 蛋白定量后,取等量总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后转移到 NC 膜上。5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入相应抗体,4 ℃摇床过夜孵育;弃去 I 抗,1×TBST 洗 5 min×3 次,加入小鼠或兔 II 抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次后 ECL 显影,最后用 Quantity One 软件扫描并分析。

1.3 统计学分析

通过 SPSS19.0 统计软件进行分析,定量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均数比较采用方差分析(one-way ANOVA)。

2 结果

2.1 氧化损伤模型 H₂O₂ 浓度的选择

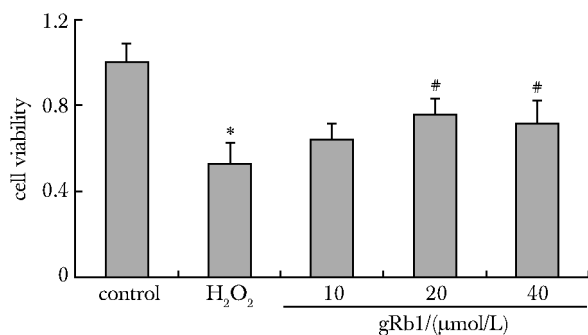
与对照组相比,40、80 和 160 μmol/L H₂O₂ 显著抑制细胞存活率为 64.2%±15.3%、53.3%±15.1%、25%±10.9%。将存活率转换为抑制率,测算得出 IC₅₀ 为 78.62 μmol/L。因此,80 μmol/L H₂O₂ 为建立损伤模型的最佳浓度。

2.2 gRb1 对细胞存活率的影响

与对照组相比,H₂O₂ 组细胞存活率明显受到抑制(P<0.05)。与 H₂O₂ 组对比,20 和 40 μmol/L gRb1 均能显著提高内皮细胞的存活率,且以 20 μmol/L gRb1 最为明显(P<0.05)(图 1)。后续研究以 20 μmol/L gRb1 探讨其对细胞的保护作用。

2.3 gRb1 对细胞凋亡的影响

与对照组相比,H₂O₂ 组细胞凋亡率明显升高



* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with H₂O₂ group

图1 不同浓度 gRb1 处理对细胞活力的影响

Fig 1 Effects of gRb1 with different dosages on cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

($P < 0.05$)。与 H₂O₂ 组相比, gRb1 组细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$) (图 2)。

2.4 gRb1 对细胞 SOD1 活性和 MDA 含量的影响

与对照组相比, H₂O₂ 组 SOD1 活性明显降低, MDA 含量明显增加($P < 0.05$)。与 H₂O₂ 组相比, gRb1 组 SOD1 活性明显升高, MDA 含量明显下降($P < 0.05$) (图 3)。

2.5 gRb1 对细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达的影响

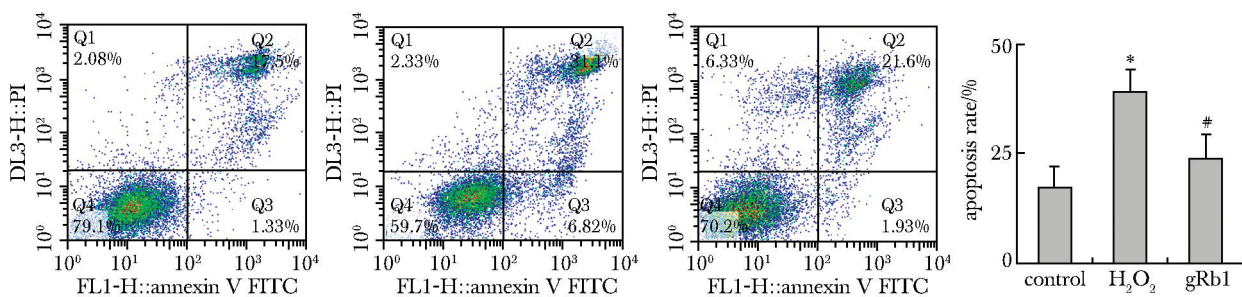
与对照组相比, H₂O₂ 组细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达均明显升高($P < 0.05$)。与 H₂O₂ 组相比, gRb1 组 ICAM-1 及 VCAM-1 蛋白表达显著减少($P < 0.05$) (图 4)。

3 讨论

动脉粥样斑块组织中存在大量凋亡的内皮细胞, 这是细胞黏附分子产生以及单核、泡沫细胞黏附的主要机制。因此, 内皮细胞功能损伤和凋亡已被公认为与心血管疾病的发生存在密切联系^[8]。

内皮细胞损伤模型是阐明内皮损伤机制的重要工具, 而 H₂O₂ 诱导的内皮细胞损伤模型为目前广泛应用的研究内皮损伤的模型^[9]。本研究通过细胞形态学和细胞存活率的检测, 最终确定 80 μmol/L H₂O₂ 为损伤模型的最佳浓度。

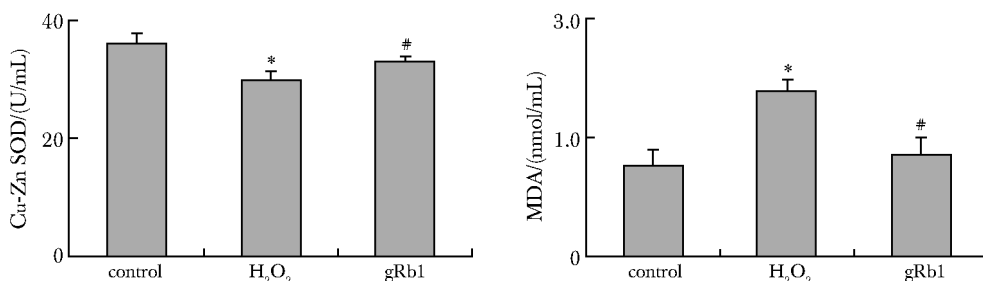
人参自古以来就被认为是一种增强机体抵抗力的中药。现代医学和药理研究表明, 人参皂苷为人参的主要有效成分, gRb1 是含量最多的一种^[10]。



* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with H₂O₂ group

图2 gRb1 处理对 H₂O₂ 损伤的 HUVECs 细胞凋亡的影响

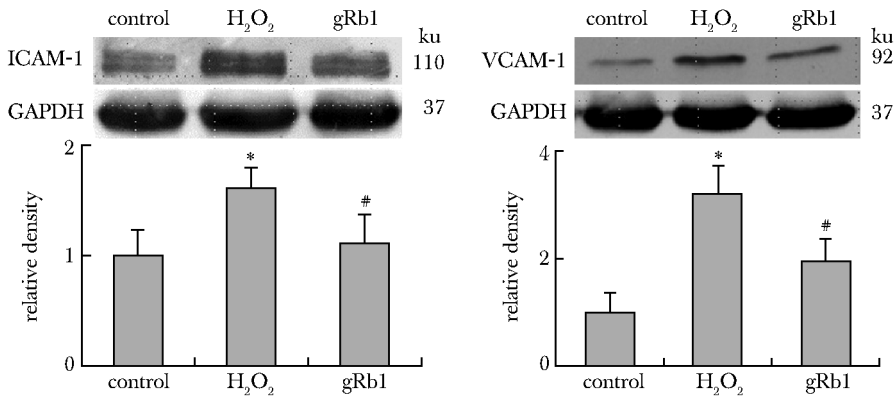
Fig 2 Effect of gRb1 on apoptosis of HUVECs injured by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with H₂O₂ group

图3 gRb1 处理对细胞 SOD1 和 MDA 的影响

Fig 3 Effect of gRb1 on the SOD1 activity and MDA production ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with H₂O₂ group

图4 gRb1对细胞内ICAM-1和VCAM-1蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of gRb1 on protein expression of ICAM-1 and VCAM-1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

既往研究发现, gRb1能够改善自然衰老小鼠体内的氧化应激水平^[11]。本研究显示, 氧化损伤的内皮细胞中SOD活性减低, MDA含量增加。而gRb1能够增加SOD活性, 同时减少MDA生成。

内皮细胞的异常凋亡是内皮损伤的生理反映, 而ICAM-1和VCAM-1是内皮细胞损伤的主要标志^[12]。本研究显示, 在氧化损伤中, 内皮细胞的凋

亡异常增加, ICAM-1和VCAM-1的蛋白表达也大幅增加。gRb1能够减少内皮细胞的凋亡, 抑制细胞表面黏附分子的合成。

本研究结果显示, gRb1能够通过减少内皮细胞凋亡、氧化应激水平和黏附分子的合成发挥其改善H₂O₂诱导的内皮细胞损伤。后续的研究将进一步利用特异性抑制剂或基因沉默技术进一步阐释相关机制。

参考文献:

- [1] Gimbrone MA, García-Cardeña G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118: 620-636.
- [2] Fan LM, Cahill-Smith S, Geng L, *et al.* Aging-associated metabolic disorder induces Nox2 activation and oxidative damage of endothelial function [J]. *Free Radical Biol Med*, 2017, 108: 940-951.
- [3] Dehghan Shahreza F. From oxidative stress to endothelial cell dysfunction [J]. *J Prev Epidemiol*, 2016, 1: e04.
- [4] Vogel ME, Idelman G, Konaniah ES, *et al.* Bilirubin prevents atherosclerotic lesion formation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by inhibiting endothelial VCAM-1 and ICAM-1 signaling [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6: e004820. doi: 10.1161/JAHA.116.004820.
- [5] Song Z, Liu Y, Hao B, *et al.* Ginsenoside Rb1 prevents H₂O₂-induced HUVEC senescence by stimulating sirtuin-1 pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e112699. doi: 10.1371/journal.pone.0112699.
- [6] 周彬, 余舒杰, 刘定辉, 等. 人参皂苷 Rb₁ 通过 Caveolin-1/eNOS/NO 通路抗人脐静脉内皮细胞衰老 [J]. *中药材*, 2019, 42: 189-195.
- [7] 宋志明, 余舒杰, 杨建涛, 等. 硫化氢通过调节 Sirt1/eNOS 信号通路延缓人脐静脉内皮细胞衰老 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34: 258-263.
- [8] Forstermann U, Xia N, Li H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2017, 120: 713-735.
- [9] 宋志明, 余舒杰, 焦洁, 等. 硫化氢通过抑制蛋白激酶 B 过度磷酸化延缓内皮细胞衰老 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36: 652-656.
- [10] Qiao L, Zhang X, Liu M, *et al.* Ginsenoside Rb1 enhances atherosclerotic plaque stability by improving autophagy and lipid metabolism in macrophage foam cells [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 727. doi: 10.3389/fphar.2017.00727.
- [11] 宋志明, 余舒杰, 巩贵宏, 等. 人参皂苷 Rb1 通过抑制炎症反应及氧化应激改善老年小鼠内皮功能 [J]. *中国实验诊断学*, 2018, 22: 1066-1070.
- [12] Bus P, Scharpfenecker M, Van Der Wilk P, *et al.* The VEGF-A inhibitor sFLT-1 improves renal function by reducing endothelial activation and inflammation in a mouse model of type 1 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2017, 60: 1813-1821.