

文章编号: 1001-6325(2021)10-1451-06

丁苯酞减轻 H₂O₂ 诱导的人脐静脉和脐动脉内皮细胞氧化损伤

杨晓丽^{1*}, 王 征², 张艳茹³, 冀静静³, 王孟帅⁴

(1. 河北工程大学附属医院 神经内科, 河北 邯郸 056002; 2. 邯郸市第一医院 重症医学科, 河北 邯郸 056002;
3. 邯郸市第二医院 内分泌科, 河北 邯郸 056001; 4. 邯郸市第二医院 神经内科, 河北 邯郸 056001)

摘要:目的 探讨丁苯酞(NBP)对过氧化氢(H₂O₂)诱导的血管内皮细胞(人脐静脉和脐动脉)氧化损伤的保护作用及发生机制。**方法** 体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs)和人脐动脉内皮细胞(HUAECs)。用四甲基偶氮唑盐(MTT)法筛选合适的H₂O₂剂量建立两种细胞的氧化应激损伤模型。在加入H₂O₂前2h,分别用两种剂量的丁苯酞(5和10 μmol/L)预孵育细胞,用MTT法检测细胞活力,罗丹明123检测线粒体膜电位,Annexin V/PI双染法检测凋亡细胞,Fura-4/AM检测细胞内游离钙。**结果** H₂O₂刺激可导致HUVECs和HUAECs细胞活力下降,线粒体膜电位下降,细胞内游离钙增多,细胞凋亡率上升($P<0.05$)。丁苯酞可改善H₂O₂诱导的上述变化。**结论** 丁苯酞可通过减轻H₂O₂造成的氧化损伤来保护血管内皮细胞。

关键词: 氧化应激;丁苯酞;人脐静脉内皮细胞;人脐动脉内皮细胞

中图分类号:R363 文献标志码:A

Dl-3-n-butylphthalide attenuates H₂O₂-induced oxidative damage of human umbilical vein and umbilical artery endothelial cells

YANG Xiao-li^{1*}, WANG Zheng², ZHANG Yan-ru³, JI Jing-jing³, WANG Meng-shuai⁴

(1. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Hebei Engineering University, Handan 056002; 2. Department of Critical Care Medicine, the First Hospital of Handan, Handan 056002; 3. Department of Endocrinology, the Second Hospital of Handan, Handan 056001;
4. Department of Neurology, the Second Hospital of Handan, Handan 056001, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of dl-3-n-butylphthalide (NBP) on hydrogen peroxide (H₂O₂) - induced oxidative damage of vascular endothelial cells (VECs). **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and human umbilical artery endothelial cells (HUAECs) were cultured and MTT assay was used to find the appropriate dosage of H₂O₂ for establishment of oxidative stress injury model. Then the cells were pre-incubated with two different dosages of NBP (5 and 10 μmol/L) 2 h before exposure to H₂O₂. The cell viability was detected by MTT assay, mitochondrial membrane potential was measured by rhodamine 123, cell apoptosis was detected by Annexin-V/PI double staining, and intracellular free Ca²⁺ was measured by Fura-4/AM. **Results** H₂O₂-induced oxidative injury reduced the cell viability of HUVECs and HUAECs, increased the intracellular free Ca²⁺ concentration thus leading to mitochondrial membrane potential decline and cell apoptosis ($P<0.05$). However, NBP treatment improved the above changes induced by H₂O₂. **Conclusions** NBP protects

收稿日期:2020-11-17 修回日期:2021-04-15

基金项目:河北省卫健委青年科技课题(20200585)

* 通信作者 (corresponding author): hbyxl@126.com

vascular endothelial cells by alleviating the oxidative damage induced by H_2O_2 .

Key words: oxidative stress; dl-3-n-butylphthalide; human umbilical vein endothelial cells; human umbilical artery endothelial cells

内皮功能障碍在动脉粥样硬化的病理生理过程中起着关键作用^[1-2],其发生机制包括氧化应激^[3]。动脉粥样硬化与卒中、心肌梗死及肾脏病变等多种疾病密切相关。因此研究如何保护内皮功能至关重要。在研究内皮功能时一般选用人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),人脐动脉内皮细胞(human umbilical artery endothelial cells, HUAECs)主要用于动脉粥样硬化的体外研究,但因 HUAECs 的培养难度较大,以往研究选用的较少。因内皮功能与动脉粥样硬化密切相关,因此同时选用两种内皮细胞研究内皮功能可使得到的结果更加可靠。

丁苯酞主要用于治疗急性缺血性卒中^[4],也可抑制神经元凋亡^[5]。但丁苯酞是否具有内皮保护作用目前研究较少。本实验主要研究氧化应激对血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)造成的影响以及丁苯酞是否具有内皮保护作用及其作用机制,为保护内皮功能寻找新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞:人脐静脉内皮细胞(HUVECs)(上海吉凯基因细胞库),人脐动脉内皮细胞(HUAECs)(北纳创联生物科技有限公司)。

1.1.2 主要试剂:DMEM 培养基和 10% 胎牛血清(Gibco 公司); H_2O_2 (河北健宁药业有限公司);丁苯酞(石药集团恩必普药业);MTT(Biosharp 公司);罗丹明 123 和 Annexin V/PI 凋亡细胞检测试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司);Fura-4/AM(Sigma-Aldrich 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养及分组处理:将 HUVECs 和 HUAECs 培养于含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素-链霉素溶液的高糖 DMEM 培养基中,在 37 °C, 5% CO_2 培养箱中进行培养。

首先建立 H_2O_2 损伤模型和检测 NBP 对细胞的影响。将细胞分为对照组,不同剂量 H_2O_2 干预组及 NBP 组(剂量:5 和 10 $\mu\text{mol/L}$)。根据预实验结

果 H_2O_2 剂量在 50~200 $\mu\text{mol/L}$ 时对 HUVECs 没有明显损伤作用,但对 HUAECs 已显现出损伤作用,因此选用 300、500、700 和 900 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 剂量与 HUVECs 共培养 24 h,选用 100、200、300 和 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 剂量与 HUAECs 共培养 24 h,来选取 IC_{50} 值。

建立 H_2O_2 损伤模型后,接下来的实验将细胞分为对照组,不同剂量 H_2O_2 干预组(HUVECs 组 H_2O_2 剂量:700 $\mu\text{mol/L}$; HUAECs 组 H_2O_2 剂量:300 $\mu\text{mol/L}$)及 NBP 处理组(剂量:5 和 10 $\mu\text{mol/L}$,在 H_2O_2 前 2 h 加入)。

1.2.2 MTT 法检测细胞活力:两种细胞以 5×10^4 个/mL 的浓度接种于 96 孔板上,每孔 100 μL 置于培养箱中孵育 24 h。24 h 后进行 MTT 检测,每孔加入 20 μL MTT 溶液,继续放入培养箱中孵育 4 h,小心吸掉旧培养基后每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO),摇床上摇 10 min,溶解生成的蓝紫色结晶,用酶标仪检测 490 nm 波长的吸光度值。

1.2.3 罗丹明 123 检测线粒体膜电位:将细胞培养在 6 孔板中,按照试剂操作说明配制细胞后加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 罗丹明 123,在 37 °C 的环境中,30 min 后应用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,然后立即进行流式分析,结果用 Expo 32 ADC 软件进行处理。

1.2.4 Annexin V/PI 检测凋亡细胞:将细胞培养在 6 孔板中,按照试剂操作说明配制细胞后加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,保持在黑暗环境中 15 min,滤过后,用流式细胞仪分析细胞凋亡率,结果用 Expo 32 ADC 软件进行处理。

1.2.5 Fura-4/AM 检测细胞内游离钙:将细胞培养在 6 孔板中,按照试剂操作说明配制细胞后加入 5 mmol/L Fluo-4/AM,40 min 后用流式细胞仪测量细胞内游离钙的变化,结果用 Expo 32 ADC 软件进行处理。

1.3 统计学分析

所有数据均使用 SPSS18.0 统计软件进行统计学分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行多样本均数比较,然后采用 LSD 检验进行多重比较。

2 结果

2.1 丁苯酞对两种血管内皮细胞均无毒性作用

两种剂量的丁苯酞(5 和 10 μmol/L)对两种细胞存活率与对照组相比无差异(图 1)。

2.2 H₂O₂ 刺激可导致两种血管内皮细胞的细胞活力下降

随着 H₂O₂ 剂量逐渐升高, HUVECs(图 2A)和 HUAECs(图 2B)的细胞活力逐渐下降。与对照组相比, H₂O₂ 剂量分别为 700 和 300 μmol/L 时细胞活力下降约 50% ($P < 0.05$), 因此选取 700 和 300 μmol/L 的 H₂O₂ 剂量来建立 HUVECs 和 HUAECs 的氧化损伤模型。

2.3 丁苯酞可改善 H₂O₂ 导致的血管内皮细胞活力下降

两种剂量的丁苯酞(5 和 10 μmol/L)提前干预

HUVECs(图 3A)和 HUAECs(图 3B)2 h 后,再分别与 700 和 300 μmol/L 的 H₂O₂ 共培养 24 h。与 H₂O₂ 组相比,提前加入任何一种剂量的丁苯酞细胞活力都明显升高($P < 0.05$),并且丁苯酞剂量为 10 μmol/L 时效果更明显。

2.4 丁苯酞可减轻 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞线粒体膜电位下降

由于高剂量的丁苯酞作用较明显,因此在接下来的实验当中,选用丁苯酞的剂量为 10 μmol/L。与对照组相比, H₂O₂ 刺激可导致两种血管内皮细胞的线粒体膜电位下降($P < 0.05$),然而提前加入丁苯酞可使细胞线粒体膜电位下降的程度明显减轻($P < 0.05$)(图 4)。

2.5 丁苯酞可抑制 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞凋亡

与对照组相比, H₂O₂ 刺激两种血管内皮细胞均

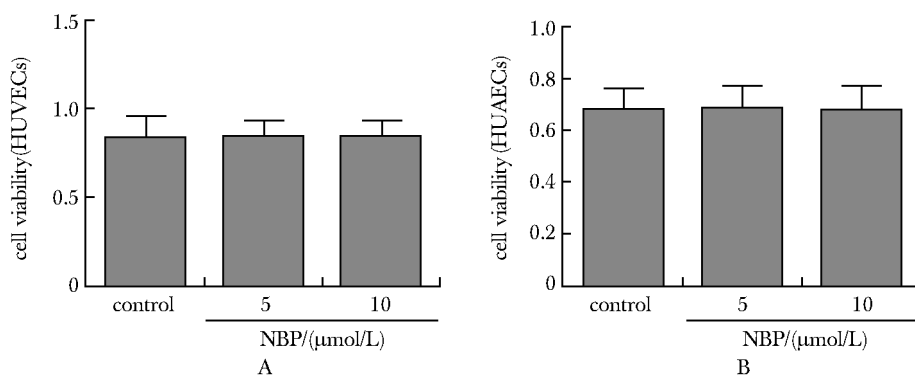
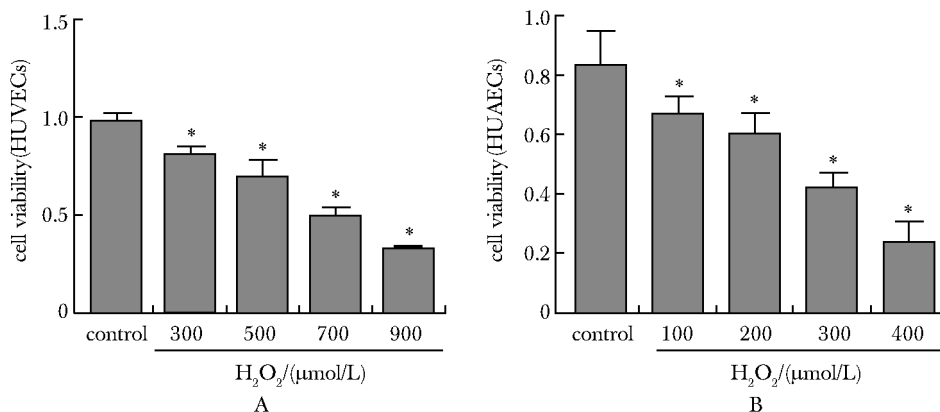


图 1 两种剂量的丁苯酞对 HUVECs(A) 和 HUAECs(B) 均无明显影响

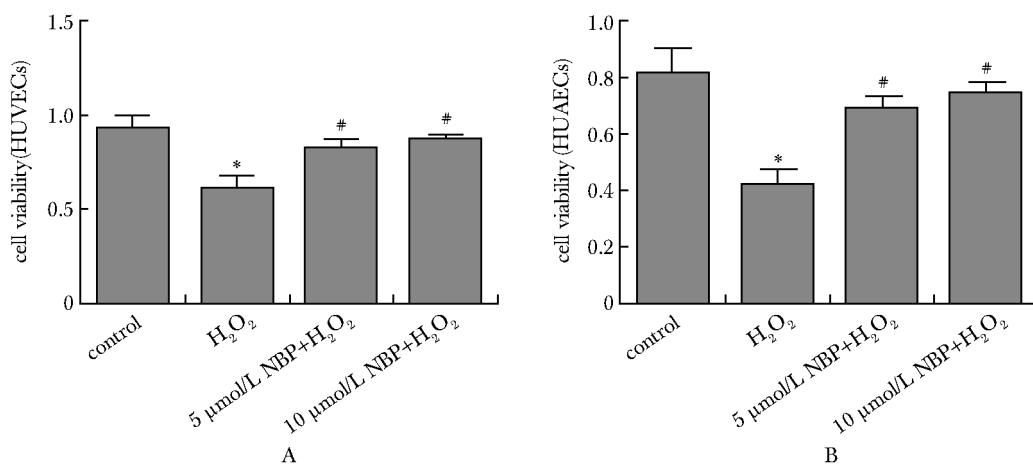
Fig 1 NBP had no effect on the cell viability of HUVECs (A) and HUAECs (B) ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)



* $P < 0.05$ compared with control group

图 2 不同剂量的 H₂O₂ 均可造成血管内皮细胞的细胞活力下降

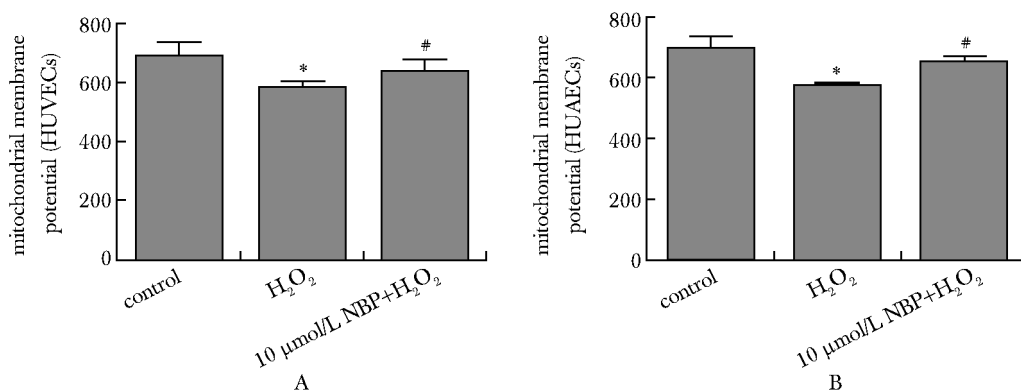
Fig 2 Cell viability of HUVECs (A) and HUAECs (B) were assessed after various dosages of H₂O₂ treatment, the injury of the cells induced by H₂O₂ was in a dosage-dependent manner ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)



A. HUVECs; B. HUAECs; * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with H₂O₂ group

图3 丁苯酞可改善 H₂O₂ 导致的血管内皮细胞活力下降,高剂量的丁苯酞效果更明显

Fig 3 NBP improved the decrease of cell viability in VECs induced by H₂O₂, and high dosage of NBP had better effect ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)



A. HUVECs; B. HUAECs; * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with H₂O₂ group

图4 丁苯酞可减轻 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞线粒体膜电位下降

Fig 4 NBP reduced the decrease of mitochondrial membrane potential mediated by H₂O₂ in VECs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

可引起明显的细胞凋亡 ($P < 0.05$), 而提前加入丁苯酞可明显抑制 H₂O₂ 引起的细胞凋亡 ($P < 0.05$) (图5)。

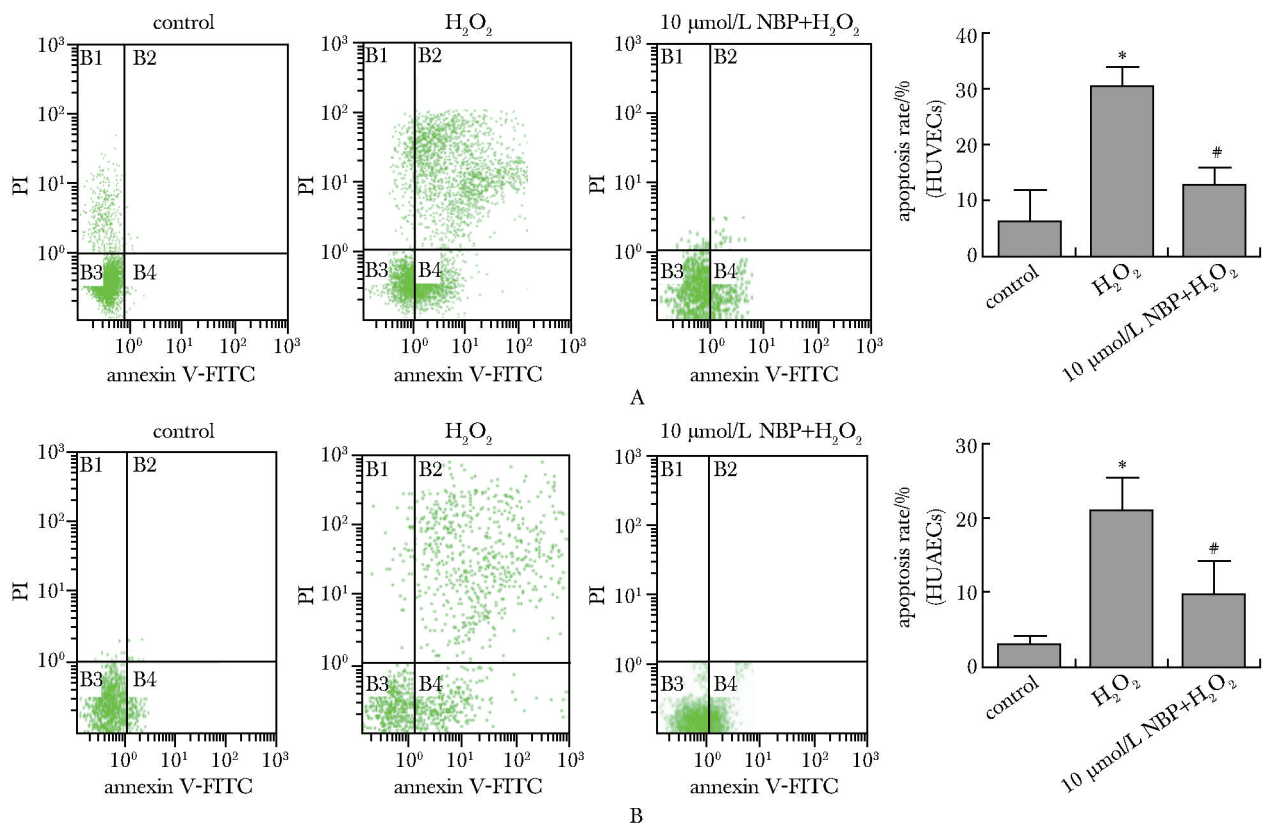
2.6 丁苯酞可减少 H₂O₂ 介导的两种血管内皮细胞内钙超载

与对照组相比, H₂O₂ 刺激可引起两种血管内皮细胞内游离钙增多 ($P < 0.05$), 而提前加入丁苯酞可明显减少两种细胞内游离钙的生成, 防止钙超载 ($P < 0.05$) (图6)。

3 讨论

内皮细胞是血管腔表面的单层细胞, 起着物理

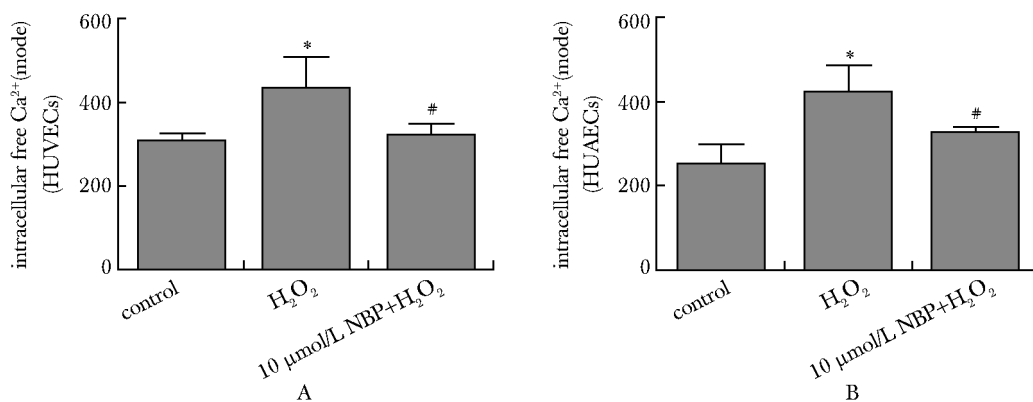
屏障的作用, 可合成和释放多种血管活性物质, 在血管自稳态调节中起着重要作用。内皮功能障碍被认为是动脉粥样硬化的早期标志, 因此保护内皮功能是预防动脉粥样硬化的关键步骤。活性氧 (ROS) 包括过氧化氢 (H₂O₂) 和羟自由基 (OH⁻) 等, 在许多生理和病理生理事件中起着重要作用。过量的 ROS 是导致内皮功能障碍的主要原因^[6-7]。过量的 ROS 可诱导线粒体双层膜通透孔开放, 释放 Ca²⁺ 和细胞色素 C, 进而引起促凋亡蛋白释放, 最后使线粒体外膜破裂, 导致细胞凋亡^[8]。本研究发现 H₂O₂ 对两种血管内皮细胞 (HUVECs 和 HUAECs) 均可导致明显损伤, 细胞活力明显下降, 细胞凋亡增加。



A. HUVECs; B. HUAECs; **P*<0.05 compared with control group; #*P*<0.05 compared with H₂O₂ group

图 5 丁苯酞可抑制 H₂O₂ 导致的血管内皮细胞凋亡

Fig 5 NBP inhibited the apoptosis of VECs induced by H₂O₂ ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)



A. HUVECs; B. HUAECs; **P*<0.05 compared with control group; #*P*<0.05 compared with H₂O₂ group

图 6 丁苯酞可减少 H₂O₂ 导致的血管内皮细胞内钙超载

Fig 6 NBP reduced H₂O₂-induced calcium overload in VECs ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

大量的研究报道了丁苯酞在改善急性缺血缺氧损伤方面的神经保护作用^[9-10],但丁苯酞是否具有内皮保护作用并不十分清楚。本研究证实了两种剂量的丁苯酞对 H₂O₂ 诱导的两种血管内皮损伤均具

有保护作用,高剂量的效果较明显,这与既往的研究结果相同^[11]。丁苯酞可减轻 H₂O₂ 对两种血管内皮细胞所造成的氧化损伤,抑制细胞凋亡,表明丁苯酞可通过抗氧化作用保护内皮细胞。

线粒体膜电位损伤是线粒体功能受损的标志,细胞内钙超载不仅可影响血管活性物质正常作用的发挥,还可以导致线粒体吸收钙增多,导致线粒体功能障碍^[12]。丁苯酞可抑制 H₂O₂ 介导的两种血管内皮细胞的线粒体膜电位下降及细胞内钙超载,表明丁苯酞可通过保护线粒体这一途径来保护内皮细胞。

综上所述,本研究证实了丁苯酞可减轻氧化应

激介导的人脐静脉内皮细胞和脐动脉内皮细胞氧化损伤。丁苯酞可通过提高细胞活力,抑制细胞凋亡,防止细胞内钙超载,改善线粒体功能等途径保护内皮细胞,从而预防动脉粥样硬化的发生。本研究选用两种血管内皮细胞,使得到的结果更加全面和可靠,为临床应用保护内皮功能药物和抗动脉粥样硬化治疗开辟了新的选择方法。

参考文献:

- [1] 王刚,周敬群. β -NGF 减轻 H₂O₂ 对 HUVECs 的损伤 [J]. 基础医学与临床, 2015, 35:228-230.
- [2] Gimbrone MA, García-Cardeña G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis [J]. Circ Res, 2016, 118:620-636.
- [3] Steven S, Munzel T, Daiber A. Exploiting the pleiotropic antioxidant effects of established drugs in cardiovascular disease [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16:18185-18223.
- [4] Ding Y, Gu Z, Zhai T, *et al.* Effect of butylphthalide on new cerebral microbleeds in patients with acute ischemic stroke [J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99: e21594. doi: 10.1097/MD.00000000000021594.
- [5] 刘雅林, 谢兰兰, 王丽云, 等. 丁苯酞减轻阿尔茨海默病大鼠海马神经元凋亡 [J]. 基础医学与临床, 2019, 39:1746-1751.
- [6] Santos-Parker JR, Strahler TR, Bassett CJ, *et al.* Curcumin supplementation improves vascular endothelial function in healthy middle-aged and older adults by increasing nitric oxide bioavailability and reducing oxidative stress [J]. Aging (Albany NY), 2017, 9:187-208.
- [7] Daiber A, Steven S, Weber A, *et al.* Targeting vascular (endothelial) dysfunction [J]. Br J Pharmacol, 2017, 174:1591-1619.
- [8] Marchi S, Patergnani S, Missiroli S, *et al.* Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death [J]. Cell Calcium, 2018, 69:62-72.
- [9] Cui LY, Zhu YC, Gao S, *et al.* Ninety-day administration of dl-3-n-butylphthalide for acute ischemic stroke: a randomized, double-blind trial [J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126:3405-3410.
- [10] Li Z, Lu J, Ma L, *et al.* DL-3-n-butylphthalide for alleviation of neurological deficit after combined extracranial-intracranial revascularization for moyamoya disease: a propensity score-matched analysis [J]. J Neurosurg, 2019, 132:421-433.
- [11] 殷建瑞, 张波, 谭丽华, 等. 丁苯酞对缺氧缺糖条件下血管内皮细胞 VEGF 和 HIF-1 α 表达的影响 [J]. 中国病理生理学杂志, 2011, 27:643-647.
- [12] Chen W, Yang J, Chen S, *et al.* Importance of mitochondrial calcium uniporter in high glucose-induced endothelial cell dysfunction [J]. Diab Vasc Dis Res, 2017, 14: 494-501.