

蓝莓花青素对由 H_2O_2 诱导人脐静脉内皮细胞氧化应激损伤的保护作用

赵 凯 郑源强 贾宇臣

摘 要 **目的** 通过建立人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)氧化应激损伤细胞模型,探讨蓝莓花青素是否能够对 H_2O_2 引起的细胞损伤具有保护作用。**方法** 采用过氧化氢(H_2O_2)创建 ECV304 氧化应激损伤细胞模型,实验分为正常对照组、 H_2O_2 组、蓝莓花青素低、中、高剂药物组,药物组中加入蓝莓花青素培养 2h 后,再加入 H_2O_2 继续培养 6h,采用 MTT 法检测细胞活力,流式细胞术检测细胞周期变化情况及细胞凋亡率。**结果** 细胞活力与 H_2O_2 浓度及其作用的时间呈相关性下降趋势,在一定浓度范围内蓝莓花青素对细胞具有保护作用。**结论** 蓝莓花青素对由 H_2O_2 引起的氧化应激损伤具有一定保护作用。

关键词 蓝莓花青素 氧化应激损伤 人脐静脉内皮细胞株

中图分类号 R543

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.10.029

Protective Effect of Blueberry Anthocyanins on Oxidative Stress Injury by H_2O_2 of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Zhao Kai, Zheng Yuanqiang, Jia Yuchen. Hohhot First Hospital, Inner Mongolia 010030, China

Abstract **Objective** To study the protective effect of blueberry anthocyanins on H_2O_2 induced human umbilical vein endothelial cells, HUVECs. **Methods** The cultured cells were divided into 3 groups: normal control group, H_2O_2 model group, blueberry anthocyanins group. MTT method was used to observe cell viability. Annexin V - FITC/PI straining was used to observe cell apoptosis. Flow cytometry was used to detect cell cycle. **Results** H_2O_2 could induce HUVECs oxidative stress injury. Cell survival rate was positive correlated with drug concentration and action time. In the certain concentration range blueberry anthocyanin had a protective effect. **Conclusion** Blueberry anthocyanin can protect H_2O_2 induced oxidative stress injury in HUVECs.

Key words Blueberry anthocyanins; Oxidative stress injury; Human umbilical vein endothelial cells

内皮细胞(endothelial cell, EC)在调节血管功能、生理和病理生理过程中起着至关重要的作用,氧化应激损伤(oxidative stress injury, OSI)是脑卒中、动脉粥样硬化、高血压和糖尿病等心血管疾病的重要组成部分,预防和治疗内皮 OSI 具有重要的临床意义。

花青素(Anthocyanins)又名花色苷,是一种水溶性天然色素,属于黄酮类化合物。它是一种来源丰富、无毒性的天然食用色素,具有多种生物活性及药理作用,如抗氧化、防止 DNA 损伤、抗氧及抗肿瘤等。在常见的水果和蔬菜中,蓝莓中的花青素含量最高的^[1-5]。

氧化应激是指机体在遭受有害刺激时,导致高活

性分子产生过多,氧化程度超出抗氧化防御系统的清除能力,从而引起组织损伤的一种状态。研究发现,活性氧簇(ROS)在糖尿病及其并发症的发生、发展中发挥了重要的作用,ROS 参与了糖尿病的 β 细胞死亡及功能损伤的过程^[6]。内源性抗氧化防御系统的脆弱及 DNA 修复能力的低下使得胰岛对氧化应激损伤更加敏感。抗氧化药物能够有效抑制氧自由基引起的胰岛损害,因此,抗氧化治疗在强化胰岛防御状态的作用成为当今研究的热点。本研究人脐静脉内皮细胞氧化应激损伤细胞模型,探讨蓝莓花青素是否能够对 H_2O_2 引起的氧化应激细胞损伤具有保护作用。

材料与方法

1. 细胞株:人脐静脉内皮细胞株,为内蒙古医科大学分子生物学研究中心保存。

2. 实验试剂:30% 过氧化氢溶液、四甲基偶氮唑盐、碘化丙啶和二甲基亚砷(美国 Sigma 公司),胎牛

基金项目:内蒙古自治区科技厅科技计划项目(20120402);内蒙古自治区研究生科研创新基金资助项目(B20161012615)

作者单位:010030 呼和浩特市第一医院(赵凯);010059 呼和浩特市,内蒙古医科大学分子生物学研究中心(郑源强、贾宇臣)

通讯作者:贾宇臣,电子邮箱:springxy2003@aliyun.com

血清、DPBS(美国赛默飞世尔生物化学制品有限公司),DMEM/F12 高糖培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),氨苄青霉素、链霉素(华北制药厂),Annexin V-PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司)。

3. 仪器设备:二氧化碳培养箱(IGO-150,美国 Thermo 公司),超净工作台(JJ-1300,北京半导体设备一厂),高压灭菌锅(HVE-50,日本 Hirayama 公司),干燥箱(CS101-2AB,重庆银向实验仪器有限公司),恒温水浴箱(CS501A,重庆银向实验仪器有限公司),纯水仪(QTMOOOLX,丹麦 Hiteh 公司),低温离心机(美国 Sigma 公司),普通光学显微镜(日本 Olympus 公司),倒置相差及图像分析系统(Nikon XDS-1B,日本 Olympus 公司)。

4. 氧化应激损伤细胞模型的建立:为了观察不同浓度的 H_2O_2 处理神经母细胞瘤细胞存活率的影响,分别在 100、200、300、400、500、600、800 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理 4h 后,每孔加 10 μl MTT,继续培养 2h 后每孔再加入 150 μl 的 DMSO,脱色摇床 15min,酶标仪读取 A_{570} 吸光度值,重复 2 次,抑制率(%) = $[1 - (\text{实验组平均值} / \text{对照组平均值})] \times 100\%$,抑制率达 70% 为模型成功。

5. 蓝莓花青素对 HUVECs 增殖的影响:取对数生长期的 HUVECs 经胰酶消化,以 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 的密度接种于 96 孔板,培养 24h 后,弃原培养液。设置正常对照组、 H_2O_2 损伤模型组和药物处理组 3 组,每个处理设置 6 个复孔。药物处理组分别加入含终浓度为 100、150、200 $\mu\text{g/ml}$ 的蓝莓花青素 200 μl 培养基,培养 2h 后加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 ,培养 4h 后每孔加入 20 μl 5mg/ml MTT 溶液,2h 弃掉培养液,每孔加入 DMSO 150 μl 。使用酶标仪读取 A_{570} 吸光度值,重复 2 次,计算细胞抑制率。

6. 流式细胞术检测细胞周期:取生长良好的细胞,按 $(1 \sim 5) \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 6 孔板,培养 24h 后进行处理。收集、固定细胞后将其重悬于 0.5ml PBS 中,加入 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 RNase 2.5 μl ,37℃ 消化 30 ~ 40min,震荡混匀,冰浴终止消化,过 400 目细胞筛于流式上样管中,加入 50 μl PI,混匀,室温避光 5min 后上机检测。

7. Annexin V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡率:按 5×10^5 个毫升接种于 6 孔板上,药物处理后,使用冰 PBS 洗 2 次,再用 $1 \times \text{Binding buffer}$ 缓冲液制成 1×10^6 个细胞/毫升悬液,加入 100 μl 细胞悬液,加入 Annexin V-FITC/PI,混匀,室温避光 15min,各管加

入 $1 \times \text{Binding buffer}$ 缓冲液 400 μl ,1h 内上机检测。

8. 统计学方法:利用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析,数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. HUVECs 氧化应激损伤模型的建立:如图 1 所示,细胞抑制率随 H_2O_2 浓度的增加而增大,呈剂量依赖性,其中终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 抑制率达到 65.44%,适合用来建立氧化应激损伤细胞模型。

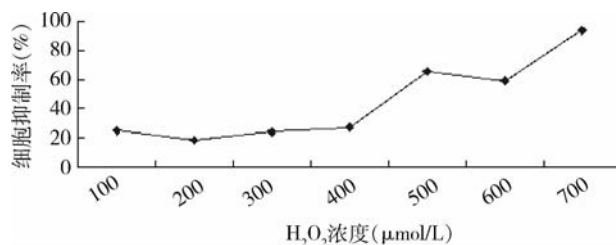


图 1 不同浓度 H_2O_2 对 HUVECs 细胞活力的影响

2. 蓝莓花青素对 H_2O_2 处理的 HUVECs 存活率的影响:HUVECs 用不同浓度的花青素处理后 MTT 结果如图 2 所示显示,与 H_2O_2 组相比,低、中、高 3 个剂量药物组细胞存活率分别为 78.19%、69.12% 和 40.27% ($P < 0.05$),高剂量组细胞存活率呈降低趋势。由此可见,在一定浓度范围内的蓝莓花青素对氧化应激损伤细胞具备保护功能。

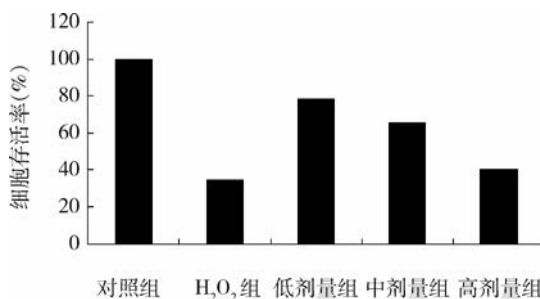


图 2 蓝莓花青素对 HUVECs 存活率的影响

3. 细蓝莓花青素对 H_2O_2 诱导的细胞周期的改变:流式细胞术检测细胞周期结果显示(图 3),对照组处于 S 期(40.18%)细胞百分比高于 H_2O_2 组(33.57%)高于(33.57%),低剂量药物组(31.12%)低于对照组,从细胞周期结果中未发现明显的变化趋势。

4. 蓝莓花青素对 H_2O_2 诱导的 HUVECs 凋亡的影响:采用 Annexin V-FITC/PI 双标法检测细胞凋亡,其结果如图 4 所示, H_2O_2 处理组的凋亡率为

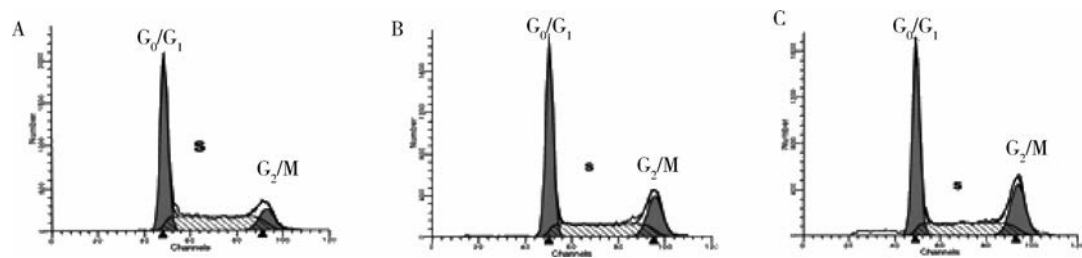


图 3 流式细胞仪检测细胞周期结果
A. 对照组;B. H₂O₂ 组;C. 药物组

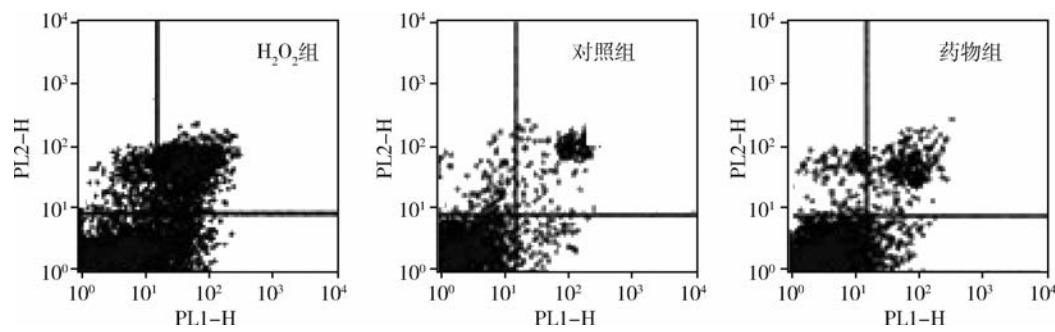


图 4 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡结果

30.46%, 药物组为 15.27%, 细胞凋亡率下降两组之间比较的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

讨 论

血管内皮是由一薄层上皮单核细胞组成,位于血管壁组织和血液之间,其复杂的系统具有多功能和分布广泛的特点。血管内皮在调节血液循环、抵抗炎症侵袭以及维持血管内外稳态方面起到至关重要的作用,内皮细胞氧化应激损伤是高血压、糖尿病、动脉粥样硬化的早期病理改变。因此,预防和拮抗内皮细胞氧化应激损伤成为国内外学者研究的热点和难点^[7]。

本研究选取正常细胞 HUVECs 为实验材料,通过 H₂O₂ 诱导建立氧化应激损伤细胞模型,通过 MTT、细胞周期及凋亡检测旨在初步探讨蓝莓花青素是否具有拮抗由 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞氧化应激损伤的功能。实验结果表明,蓝莓花青素可以发挥抗氧化应激损伤作用,进而发挥保护内皮细胞的作用。还需进一步研究发挥抗氧化应激损伤的分子机制。

参考文献

1 Zhao ZL, Yang RY, Gu TM, *et al.* Migratory and chemoattractant

responses of mesenchymal stem cells to oxidative stress injury of endothelial cell in vitro[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2009, 89(22): 1577-1581

2 Seeram NP. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56:727-629

3 Astadii R, Astuti M, Santoso U, *et al.* In vitro antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL)[J]. *Food Chemistry*, 2009, 112:659-663

4 Gordillo G, Fang H, Khanna H, *et al.* Oral Administration of blueberry inhibits angiogenic tumor growth and enhances survival of mice with endothelial cell neoplasm[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009, 11(1):47-58

5 Huang WY, Zhang HC, Liu WX, Li CY. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2012, 13(2):94-102

6 Corbett JA, Wang JL, Hughes JH, *et al.* Nitric oxide and cyclic GMP formation induced by interleukin 1 beta in islets of Langerhans. Evidence for an effector role of nitric oxide in islet dysfunction[J]. *Biochem J*, 1992, 287:229-235

7 Yang Y, Duan W, Liang Z, *et al.* Curcumin attenuates endothelial cell oxidative stress injury through Notch signaling inhibition[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(3):615-629

(收稿日期:2016-12-21)
(修回日期:2016-12-21)