三七皂苷 Fc 对高糖损伤血管内皮细胞保护作用

刘晶晶　马　旭　冯丽帅　王建波

摘　要　目的　探讨三七皂苷 Fc 对体外高糖诱导大鼠血管内皮细胞损伤的保护作用。**方法**　体外培养大鼠血管内皮细胞(RAOEC),加入 30mmol/L D－葡萄糖造成细胞损伤。加入不同浓度三七皂苷 Fc 进行干预,采用 CCK－8 法测定细胞活性,筛选出最适用药浓度。将细胞均匀接种于 6 孔板内,分为 4 组,即正常对照组、高糖组、正常对照 + Fc 组、高糖 + Fc 组,用 Hochest33342荧光染色法对各实验组进行细胞凋亡的检测；采用细胞划痕实验检测各组细胞的伤口修复情况；采用 Western blot 法观察各组过氧化物酶体增殖物激活受体－γ(PPAR－γ)的蛋白表达。**结果**　高糖 + Fc 组内皮细胞凋亡率明显低于高糖组,而修复率却明显高于高糖组,差异均有统计学意义（$P<0.05$）；高糖 + Fc 组 PPAR－γ 蛋白表达量明显高于高糖组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　三七皂苷 Fc 可抑制高糖引起的血管内皮细胞凋亡,并促进高糖状态下血管内皮细胞的增殖修复 。其作用机制可能与三七皂苷 Fc 促进高糖状态下血管内皮细胞的 PPAR－γ 蛋白表达有关。

关键词　三七皂苷 Fc　过氧化物酶体增殖物激活受体－γ　高糖　血管内皮细胞

中图分类号　R5　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2018.08.026

Protective Effect of Notoginsenoside Fc on Vascular Endothelial Cell Against Injury Induced by High Glucose. *Liu Jingjing, Ma Xu, Feng Lishuai, et al. Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200023, China*

Abstract　Objective　To investigate the protective effect of Notoginsenoside Fc on injure of rat vascular endothelial cells induced by high glucose in vitro. **Methods**　Rat vascular endothelial cells (RAOEC) were cultured in vitro, and 30mM glucose was used to induce cell injury. Notoginsenoside Fc was added to the cells for intervention. Cell viability was determined by CCK－8 assay, and the most suitable concentration was selected. The cells were cultured in 6 well plates, divided into 4 groups: normal control group, high glucose group, normal control + Fc group, and high glucose + Fc group. Hochest33342 fluorescence stain were used to detect the cell apoptosis among every group; and cell scratch test were used to observe wound repairing. The PPAR－γ expression were measured by Western blot. **Results**　Compared with high glucose group, the apoptosis rate of endothelial cells in high glucose + Fc group was significantly lower, and the repair rate is significantly higher, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The expression of PPAR－γ in high glucose + Fc group was significantly higher than that of high glucose group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion**　Notoginsenoside Fc can inhibit the apoptosis and promote the proliferation of vascular endothelial cells under high glucose condition. The mechanism may be related to the promotion of PPAR－γ expression due to the treat with Notoginsenoside Fc.

Key words　Notoginsenoside Fc; Peroxides body proliferate activated receptor－gamma (PPAR－γ); High glucose; Vascular endothelial cell

随着人们生活水平提高、生活方式改变及人口老龄化,糖尿病 (diabetes mellitus, DM)的发生率逐年上升,已成为威胁人类健康的重大疾病[1]。血管病变是临床上最常见的糖尿病并发症,近年研究表明 2 型糖尿病患者合并的冠状动脉、大脑动脉及下肢动脉的血管病变,具有发生率高、起病早、进展快、预后差等特点,是 DM 患者致残、致死的主要原因[2]。因此,糖尿病血管病变的治方法亟待探索。中药具有多层次、多位点、整体调节的优势,可作用于血管病变发生、发展过程中的多个环节。近年来,越来越多的学者发现三七的主要活性成分三七皂苷可以通过扩张血管、降低心肌耗氧量、清除自由基、抗炎、抗氧化等进程有效发挥心血管保护作用[3]。然而,三七总皂苷含有多种单体成分,各单体成分对血管的作用需要研究。本实验采用体外培养大鼠血管内皮细胞研究三七总皂苷新单体成分三七皂苷 Fc 对高糖条件下血管内皮细胞的作用,初步探讨三七皂苷 Fc 的作用机制,为糖尿病血管病变的治疗提供新的思路和方法。

材料与方法

1. 细胞培养：大鼠血管内皮细胞(RAOEC)购自

基金项目:上海市浦东新区科技发展基金资助项目(PKJ2016－Y52)

作者单位:200023　上海交通大学附属第六人民医院

通讯作者:王建波,电子信箱:wangjianbomd@163.com

美国模式培养物集存库(ATCC)。培养条件为高糖 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)加入 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司),于 37℃、5% CO_2 孵箱中培养,每周换液 2~3 次,使细胞密度保持(2~8)×10^6 个/升,实验均采用复苏后传至第 3 代以上的细胞。

2. 实验材料:CCK-8(日本同仁公司);Hoechst 33342(上海碧云天生物科技有限公司);一抗 PPAR-γ(英国 Abcam 公司);一抗 GAPDH(美国 Cell Signaling 公司);山羊抗兔 IgG(美国 Cell Signaling 公司);细胞裂解液(RIPA)(上海碧云天生物技术有限公司);苯甲基磺酰氟(PMSF,美国 Sigma 公司);BCA 蛋白测定试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司);三七皂苷 Fc(上海经科化学科技有限公司,HPLC 检验纯度≥98%)。

3. 实验分组:实验分为 4 组,即正常对照组(NG 组)(葡萄糖 5.6mmol/L)、高糖组(HG 组)(葡萄糖 30mmol/L)、正常对照+三七皂苷 Fc 组(N+Fc 组)、高糖+三七皂苷 Fc 组(H+Fc 组)。

4. CCK-8 检测细胞活力:待细胞融合生长至 70%~80%,取对数生长期的第 3~5 代细胞接种于 96 孔培养板中(密度 1×10^4 个/孔),为了确定三七皂苷 Fc 可以改善高糖对内皮细胞生长抑制作用,以不同浓度三七皂苷 Fc(0、1、10、20、50、100μmol/L)+高糖(葡萄糖浓度为 30mmol/L)对内皮细胞进行干预处理,每组设置 5 个复孔。作用 24h 后,每孔加入 CCK-8 溶液 10μl 终止培养,37℃孵育 2h 后,检测 490nm 处吸光度值(A_{490})。以对照组作为空白参照(细胞活力 100%),计算其他各组细胞活力=[处理组 A_{490}/空白参照组 A_{490}]×100%。

5. Hoechst 33342 染色:Hoechst 将正常细胞核染成均匀蓝色,而凋亡细胞早期细胞膜通透性改变,进入凋亡细胞中的 Hoechst 33342 比正常细胞多,因此凋亡细胞的细胞核呈致密浓染,或呈碎片状致密浓染。本研究将荧光显微镜下细胞核呈致密浓染细胞所占比值记为内皮细胞的凋亡率进行观察。将 6 孔板细胞用浓度为 30mmol/L 的葡萄糖及 20μmol/L 的三七皂苷 Fc 按相应分组处理 24h 后,吸弃上清,每孔加入配置好的 Hoechst 333421ml 染色液,置于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 20~30min,弃掉染色液,用 PBS 洗涤 2~3 次,荧光倒置显微镜下观察并拍照,观察细胞凋亡情况。

6. 细胞划痕实验:细胞划痕法是简便测定细胞迁移运动与修复能力的方法。40 万~50 万生长良好的内皮细胞接种于 6 孔板内并增殖生长至 70%~80% 的融合状态,用浓度为 30mmol/L 的葡萄糖及 20μmol/L 三七皂苷 Fc 处理相应孔板中的细胞后,吸弃之前的培养液,用枪头垂直于 6 孔板底部每孔划 3 条痕,不同孔之间使用同一只枪头。用 PBS 洗细胞 2~3 次,洗净划下的细胞,每组中均加入 2ml 完全培养基。先拍照留取 0h 时细胞划痕,放入 37℃、5% CO_2 培养箱,培养 24h 后,取出再次拍照,使用 Image J 软件,计算每孔细胞间距离的均值,细胞增殖修复能力=(0h 细胞间距-24h 细胞间距)/0h 细胞间距。

7. 免疫印迹法检测细胞 PPAR-γ 蛋白表达水平:对上述各组细胞在冰上进行蛋白裂解提取,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后,加入上样缓冲液,100℃煮蛋白 10min 使其变性,以每孔 30μg 蛋白量加样,用体积分数为 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离,转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5% 脱脂牛奶封闭 2h,TBST 洗膜 5min×4 次,根据所需目的蛋白分子质量的不同和 marker 所指示的分子质量进行裁膜,放入孵育盒中一抗抗体 4℃ 孵育过夜:β-actin、PPAR-γ;次日 TBST 洗膜 5min×4 次;羊抗兔二抗室温孵育 1h,TBST 洗膜 5min×4 次。加入 ECL 发光剂,化学发光成像系统曝光成像,应用 Image J 软件测定条带灰度值,各实验组之间进行半定量分析,比较各蛋白的相对表达量。

8. 统计学方法:使用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析,所有数据均采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间显著性检验采用 t 检验进行比较,每次实验至少重复 3 次,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 三七皂苷 Fc 改善高糖对内皮细胞生长抑制作用:用不同浓度(0、1、10、20、50、100μmol/L)的三七皂苷 Fc+高糖(葡萄糖浓度为 30mmol/L)对内皮细胞干预处理 24h 后,细胞活力如图 1 所示,三七皂苷 Fc 可改善高糖对内皮细胞生长抑制作用,并在其作用浓度为 20μmol/L 时细胞活力最高,故后续实验均采用 20μmol/L 三七皂苷 Fc 作用 24h 进行观察。

2. Hoechst 33342 染色显示内皮细胞凋亡情况:按上述方法处理各组细胞 24h 后,高糖组血管内皮细胞的凋亡率明显高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),30mmol/L 的葡萄糖对内皮细胞凋亡诱导作用明显。与高糖组比较,高糖+Fc 组血管内皮细胞凋亡率显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$),三七皂苷 Fc 能抑制高糖状态下血管内皮细胞

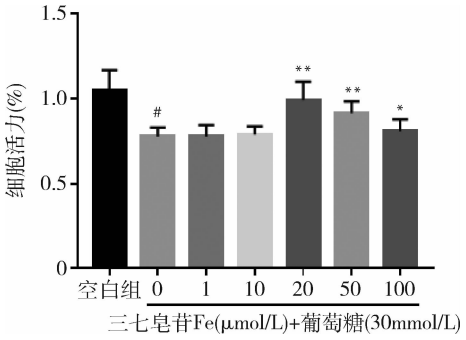

图 1　不同浓度三七皂苷 Fc 对内皮细胞活力的影响

与空白组比较，$^{\#}P<0.01$；与 0μmol/L 三七皂苷 Fc + 高糖组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

的凋亡。而正常对照 + Fc 组血管内皮细胞的凋亡率与正常对照组之间差异无统计学意义（图 2）。

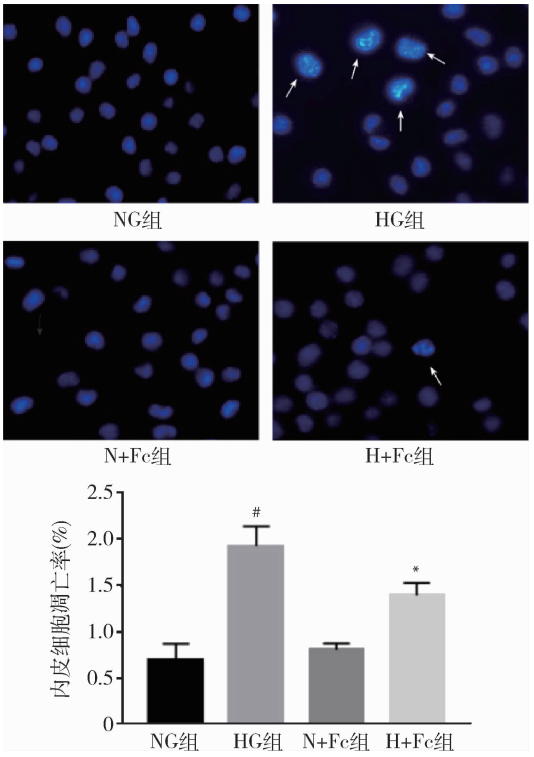

图 2　Hochest33342 染色（荧光倒置显微镜，×400）及各组内皮细胞凋亡率比较

与 NG 组比较，$^{\#}P<0.01$；与 HG 组比较，$^{*}P<0.05$

3. 内皮细胞增殖修复能力：按上述方法处理各组细胞 24h 后，高糖组血管内皮细胞的增殖修复率明显低于对照组，差异有统计学意义（$P<0.01$），表明 30mmol/L 的葡萄糖对内皮细胞增殖修复抑制作用明显。与高糖组比较，高糖 + Fc 组血管内皮细胞增殖修复率显著增加，差异有统计学意义（$P<0.05$），表明三七皂苷 Fc 能促进高糖状态下血管内皮细胞的增殖修复。而正常对照 + Fc 组血管内皮细胞的增殖修复率与正常对照组之间比较，差异无统计学意义（图 3）。

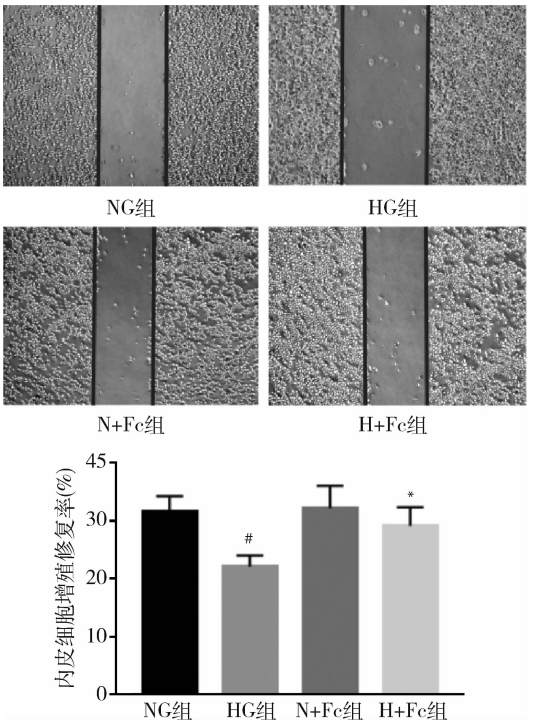

图 3　24 h 时内皮细胞迁移（倒置显微镜，×50）及各组内皮细胞增殖修复率比较

与 NG 组比较，$^{\#}P<0.01$；与 HG 组比较，$^{*}P<0.05$

4. Western blot 法检测不同实验组细胞 PPAR－γ 表达量的变化：高糖组内皮细胞过氧化物酶体增殖物激活受体－γ（PPAR－γ）的蛋白表达量明显低于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$），在高糖条件下，PPAR－γ 蛋白水平的表达明显受到抑制。高糖 + Fc 组 PPAR－γ 蛋白表达量明显高于高糖组，差异有统计学意义（$P<0.05$），三七皂苷 Fc 促进高糖状态下血管内皮细胞的 PPAR－γ 蛋白表达（图 4）。

讨　　论

糖尿病血管病变发病机制复杂，诸多因素参与其中，而高糖引起的血管内皮细胞损伤是导致血管并发症发生的主要启动因子[4]。高糖不仅可以引起血管内皮细胞凋亡，同时还可使内皮细胞的 NF－κB 信号通路激活，引起 TNF－α、ICAM－1、MCP－1 等炎性因子表达增多，引发炎性反应从而进一步加重高糖诱导的细胞损伤[5]。因此从理论上说，是防治糖尿病血管并发症发生最有效策略就是控制血糖水平，但临床研究发现糖尿病患者血糖控制有效率低的问

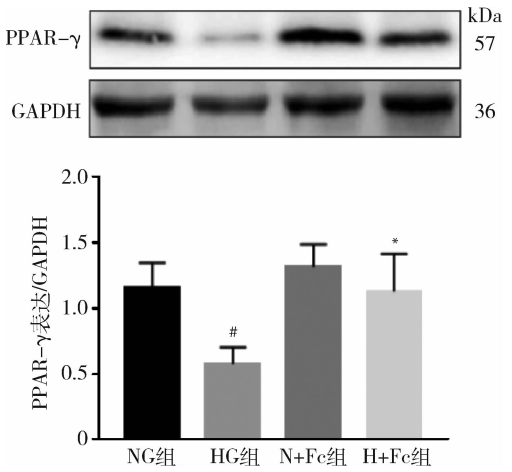

图 4　各组内皮细胞 PPAR－γ 相对蛋白表达量比较

与对照组比较，$^{\#}P<0.05$；与高糖组比较，$^{*}P<0.05$

题普遍存在[6]。故在强调血糖控制研究的同时，积极探索高糖引发血管内皮细胞损伤的防治措施对于控制糖尿病血管并发症具有十分重要的现实意义。以往研究表明高糖呈剂量依赖性方式显著抑制血管内皮细胞活力，其半数抑制浓度（IC_{50}）约为 30mmol/L，故本研究以三七皂苷 Fc 单用，采用 30mmol/L 葡萄糖进行体外诱导，观察中药单体成分对高糖诱导的内皮细胞保护作用。

三七皂苷 Fc 是三七总皂苷的一种新型单体成分，是一种原人参二醇型皂素，具有很好的抗血小板聚集能力[7]。而三七皂苷 Fc 对血管内皮细胞的作用尚不明确。近年来国内外许多学者的大量研究表明，三七总皂苷及其单体成分可以从多种途经发挥血管保护作用。例如，人参皂苷 Rb1 可以通过激活 PI_3K/Akt 信号通路来降低高半胱氨酸诱导的内皮功能损伤[8]。人参皂苷 Rg3 可以通过抑制单核细胞－内皮细胞的黏附，起到保护内皮细胞、抗动脉粥样硬化的作用[9]。三七皂苷 R1 可以减轻氧化低密度脂蛋白诱导的人血管内皮细胞炎性反应[10]。由此可见，研究三七皂苷 Fc 的血管内皮细胞保护作用，具有十分重要的临床意义。本研究发现，三七皂苷 Fc 能显著改善高糖状态下大鼠主动脉内皮细胞损伤，三七皂苷 Fc 可能成为防治糖尿病血管病变的极具开发潜力的新型药物。

为了进一步探究三七皂苷 Fc 血管内皮细胞保护作用的机制，本实验通过蛋白免疫印迹法对内皮细胞 PPAR－γ 的表达进行检测。过氧化物酶体增殖物激活受体－γ（PPAR－γ）是核受体超家族中的一种由配体激活的核转录因子，被配体激活后，可与目的基因启动子内反应元件相结合，从而调控基因的转录，具有多种生物学效应[11]。多项研究已表明，PPAR－y 的活化能够抑制与内皮细胞功能障碍相关的细胞活化、内分泌障碍与炎性反应，具有抗动脉粥样硬化的作用[12～14]。本实验研究发现，与 对照组比较，高糖组血管内皮细胞 PPAR－y 表达明显上升，而高糖＋三七皂苷 Fc 组 PPAR－y 蛋白表达水平较高糖组显著下降。因而，推断三七皂苷 Fc 可能通过抑制 PPAR－y 蛋白表达，从而发挥内皮细胞保护作用。

综上所述，三七皂苷 Fc 可以显著减少高糖诱导的血管内皮细胞凋亡，促进高糖状态下血管内皮细胞的增殖修复，具有血管内皮细胞损伤的保护作用，作用机制可能与其促进高糖状态下内皮细胞的PPAR－γ 蛋白表达及相关通路有关。具体分子生物学机制有待进一步深入研究，后续实验将从国家倡导的基础实验与临床相结合的理念出发，继续探讨三七皂苷 Fc 内皮细胞保护作用的关键信号通路及作用靶点，为其最终成为防治糖尿病血管病变的新型药物奠定基础。

参考文献

1　Bastawrous A, Mathenge W, Wing K, *et al*. The incidence of diabetes mellitus and diabetic retinopathy in a population－based cohort study of people age 50 years and over in Nakuru, Kenya [J]. Bmc Endocrine Disor, 2017, 17(1): 19－25

2　Kang YM, Cho Y K, Lee SE, *et al*. Cardiovascular diseases and life expectancy in adults with type 2 diabetes: a Korean national sample cohort study [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2017, 102(9): 34－43

3　Yu Y, Sun G, Luo Y, *et al*. Cardioprotective effects of Notoginsenoside R1 against ischemia/reperfusion injuries by regulating oxidative stress－ and endoplasmic reticulum stress－ related signaling pathways [J]. Sci Rep, 2016, 6(5):21－30

4　Ning RB, Zhu J, Chai DJ, *et al*. RXR agonists inhibit high glucose－induced upregulation of inflammation by suppressing activation of the NADPH oxidase－nuclear factor－ÎoB pathway in human endothelial cells [J]. Genet Mol Res, 2013, 12(4): 692－707

5　Sena CM, Pereira AM, SEIç AR. Endothelial dysfunction — a major mediator of diabetic vascular disease [J]. Biochim Biophy Acta, 2013, 1832(12): 2216－2231

6　Jiao XM, Zhang XG, Xu XU, *et al*. Blood glucose fluctuation aggravates lower extremity vascular disease in type 2 diabetes[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(14):2025－2030

7　He C, Li J, Xu N, *et al*. Pharmacokinetics, bioavailability, and metabolism of Notoginsenoside Fc in rats by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 109:150－157

（下转第 120 页）

mechanical ventilation[J]. Eur J Clin Nutr, 2010, 64(11): 1358 – 1364

6 Lattuada M, Bergquist M, Maripuu E, *et al*. Mechanical ventilation worsens abdominal edema and inflammation in porcine endotoxemia [J]. Crit Care, 2013, 17(3): R126

7 De Magalhaes RF, Samary CS, Santos RS, *et al*. Variable ventilation improves pulmonary function and reduces lung damage without increasing bacterial translocation in a rat model of experimental pneumonia[J]. Respir Res, 2016, 17(1): 158

8 Ergin Ozcan P, Akinci OI, Edipoglu I, *et al*. Effects of different recruitment maneuvers on bacterial translocation and ventilator – induced lung injury[J]. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, 2016, 22(2): 127 – 133

9 Druyan ME, Compher C, Boullata JI, *et al*. Clinical guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients: applying the GRADE system to development of A. S. P. E. N. clinical guidelines[J]. JPEN, 2012, 36(1): 77 – 80

10 Elke G, van Zanten AR, Lemieux M, *et al*. Enteral versus parenteral nutrition in critically ill patients: an updated systematic review and meta – analysis of randomized controlled trials[J]. Crit Care, 2016, 20(1): 117

11 Perinel J, Mariette C, Dousset B, *et al*. Early enteral versus total parenteral nutrition in patients undergoing pancreaticoduodenectomy: a randomized multicenter controlled trial (Nutri – DPC)[J]. Ann Surg, 2016, 264(5): 731 – 737

12 Zhao XF, Wu N, Zhao GQ, *et al*. Enteral nutrition versus parenteral nutrition after major abdominal surgery in patients with gastrointestinal cancer: a systematic review and meta – analysis[J]. J Investig Med, 2016, 64(5): 1061 – 1074

13 Tatucu – Babet OA, Ridley EJ. Prevalence of underprescription or overprescription of energy needs in critically Ⅲ mechanically ventilated adults as determined by indirect calorimetry: a systematic literature review[J]. JPEN, 2016, 40(2): 212 – 225

14 Velazco CS, Zurakowski D, Fullerton BS, *et al*. Nutrient delivery in mechanically ventilated surgical patients in the pediatric critical care unit[J]. J Pediatr Surg, 2017, 52(1): 145 – 148

15 Schietroma M, Pessia B, Carlei F, *et al*. Intestinal permeability and systemic endotoxemia in patients with acute pancreatitis[J]. Ann Ital Chir, 2016, 87: 138 – 144

16 Elke G, van Zanten AR, Lemieux M, *et al*. Enteral versus parenteral nutrition in critically ill patients: an updated systematic review and meta – analysis of randomized controlled trials[J]. Crit Care, 2016, 20(1): 117

17 Olah A, Romics L, Jr. Enteral nutrition in acute pancreatitis: a review of the current evidence[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(43): 16123 – 16131

18 Reignier J, Darmon M, Sonneville R, *et al*. Impact of early nutrition and feeding route on outcomes of mechanically ventilated patients with shock: a post hoc marginal structural model study[J]. Intensive Care Med, 2015, 41(5): 875 – 886

19 项美姣. 营养支持管理对机械通气患者预后的影响[D]. 温州: 温州医学院, 2012

20 李凤. 系统营养评估对神经重症患者营养支持及预后的影响研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2015

(收稿日期:2017 – 12 – 18)
(修回日期:2018 – 01 – 15)

(上接第 115 页)

8 Lan TH, Xu ZW, Wang Z, *et al*. Ginsenoside Rb1 prevents homocysteine – induced endothelial dysfunction via PI_3K/Akt activation and PKC inhibition [J]. Biochemi Pharmaco, 2011, 82(2): 148 – 155

9 Cho YS, Kim CH, Kim HN, *et al*. Ginsenoside Rg3 inhibits lipopolysaccharide – induced adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cell and C57BL/6 mice [J]. Die Pharma, 2014, 69(11): 818 – 822

10 Su P, Du S, Li H, *et al*. Notoginsenoside R1 inhibits oxidized low – density lipoprotein induced inflammatory cytokines production in human endothelial EA. hy926 cells [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 770: 9 – 15

11 Beekmann K, Rubió L, de Haan LH, *et al*. The effect of quercetin and kaempferol aglycones and glucuronides on peroxisome proliferator – activated receptor – gamma (PPAR – γ)[J]. Food Function, 2015, 6(4):1098 – 1104

12 Yun HK, Cho BJ, Min JK, *et al*. Rosiglitazone increases endothelial cell migration and vascular permeability through Akt phosphorylation [J]. Bmc Pharmacol Toxicol, 2017, 18(1): 62 – 68

13 Szostak J, Miguet – Alfonsi C, Berthelot A, *et al*. Training - induced anti - atherosclerotic effects are associated with increased vascular PPARgamma expression in apolipoprotein E – deficient mice [J]. Acta Physiolo, 2016, 216(2):221 – 230

14 Sun H, Zhu X, Lin W, *et al*. Interactions of TLR4 and PPARγ, dependent on AMPK signalling pathway contribute to anti – inflammatory effects of vaccariae hypaphorine in endothelial cells [J]. Cellular Physiology & Biochemistry International Journal of Experimental Cellular Physiology Biochemistry & Pharmacology, 2017, 42(3): 12 – 27

(收稿日期:2017 – 10 – 24)
(修回日期:2017 – 11 – 20)