

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2020.03.004

不同浓度黄芪总黄酮对高糖诱导人脐静脉系内皮细胞损伤的保护作用*

唐 静 许娟娟 袁秀芝[△]

华中科技大学同济医学院附属梨园医院药剂科, 武汉 430077

摘要 目的 探讨不同浓度黄芪总黄酮对高糖诱导人脐静脉系内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)损伤的保护作用。**方法** 将 HUVECs 随机分为正常对照组(5.5 mmol/L 葡萄糖)、高糖模型组(30 mmol/L 葡萄糖)、高渗对照组(5.5 mmol/L 葡萄糖+24.5 mmol/L 甘露醇)及黄芪总黄酮高剂量组(2 mg/mL 黄芪总黄酮+30 mmol/L 葡萄糖)、黄芪总黄酮中剂量组(1 mg/mL 黄芪总黄酮+30 mmol/L 葡萄糖)、黄芪总黄酮低剂量组(0.5 mg/mL+30 mmol/L 葡萄糖)。37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 检测各组 HUVECs 的一氧化氮(nitric oxide, NO)及总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)水平、病理学改变、内皮素-1(endothelin-1, ET-1)mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 培养 24 h 后, 与正常对照组比较, 高糖模型组 NO、T-SOD 水平明显降低, 细胞数量明显减少, ET-1 mRNA 及蛋白表达显著升高($P<0.05$)。与高糖模型组比较, 黄芪总黄酮高、中、低剂量组 NO、T-SOD 水平明显升高, 细胞数量明显增加, ET-1 mRNA 及蛋白表达显著降低($P<0.05$); 且黄芪总黄酮高剂量变化最为显著($P<0.05$)。**结论** 不同浓度黄芪总黄酮对高糖损伤的 HUVECs 细胞均有保护作用, 可促进 NO、T-SOD 分泌, 提升细胞数量, 抑制 ET-1 mRNA 及蛋白表达, 且高浓度黄芪总黄酮的保护效果最为突出。

关键词 黄芪总黄酮; 人脐静脉系内皮细胞; 保护作用; 高糖损伤

中图分类号 R285.5 **文献标识码** A

Study on the Protective Effects of Different Concentration of Astragali Radix Total Flavonoids on the Injury of Human Umbilical Vein Epithelial Cells Induced by High Glucose

TANG Jing, XU Juanjuan, YUAN Xiuzhi

Department of Pharmacy, Liyuan Hospital Affiliated to Tongji Medical College,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, China

Abstract Objective To study the protective effects of different concentrations of Astragali Radix total flavonoids on the injury of human umbilical vein endothelial cells(HUVECs)induced by high glucose. **Methods** The HUVECs cells were divided into six groups, including normal control group(5.5 mmol/L glucose), high glucose model group(30 mmol/L glucose), hypertonic control group(5.5 mmol/L glucose+24.5 mmol/L mannitol), high-dose group of Astragali Radix total flavonoids(2 mg/mL Astragali Radix total flavonoids +30 mmol/L glucose), middle-dose group of Astragali Radix total flavonoids(1 mg/mL Astragali Radix total flavonoids +30 mmol/L glucose) and low-dose group of Astragali Radix total flavonoids(0.5 mg/mL Astragali Radix total flavonoids +30 mmol/L glucose). Cultured in 37℃, 5% CO₂ incubator for 24 h, the level of nitric oxide(NO) and total superoxide dismutase(T-SOD), pathological changes, the levels of endothelin-1(ET-1)mRNA and protein expression were de-

* 湖北省自然科学基金(No. 2016CKB702)

[△]通信作者, Corresponding author, E-mail: 1005327881@qq.com

tected in each group. **Results** After cultured for 24 h, compared with the normal control group, the levels of NO, T-SOD, numbers of cells were significantly decreased, the levels of ET-1 mRNA and protein expression were significantly increased in high glucose model group ($P < 0.05$). Compared with the high glucose model group, the levels of NO, T-SOD, numbers of cells were significantly increased, the levels of ET-1 mRNA and protein expression were significantly decreased in Astragali Radix total flavonoids groups ($P < 0.05$), and the high-dose group of Astragali Radix total flavonoids had made the most significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Different concentration of Astragali Radix total flavonoids have protective effects on HUVECs cells damaged by high glucose, which could promote NO, T-SOD secretion, increase cell number, inhibit ET-1 mRNA and protein expression, and the protective effect of high concentration of Astragali Radix total flavonoids was the most prominent.

Key words Astragali Radix total flavonoids; human umbilical vein endothelial cells; protective effect; high glucose injury

我国是糖尿病大国,预计到 2030 年中国的糖尿病患者人数将达到 1.40 亿^[1]。糖尿病的发生与氧化应激密切相关,机体一旦出现氧化应激反应,微循环会受到破坏,继而累及血管内皮细胞。黄芪是常用中药,研究^[2]表明其能改善氧化应激,从而改善糖尿病带来的不利影响。本实验通过在高糖环境中培养人脐静脉系内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),比较了不同浓度黄芪总黄酮提取物对高糖损伤 HUVECs 细胞的保护作用,并检测了影响血管内环境的 NO、T-SOD、ET-1 的含量,为黄芪总黄酮的降糖研究提供了进一步的证据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

HUVECs 购自武汉普诺赛生物科技有限公司。

1.2 药物与试剂

黄芪总黄酮提取物(自提),葡萄糖(南京建成生物工程研究所),甘露醇(中国医药集团上海化学试剂公司),总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所),一氧化氮(nitric oxide, NO)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),Trizol 试剂(Aidlab 公司),DL2000 DNA Marker(TAKARA 公司)。DMEM 培养基(低糖型)[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

1.3 主要仪器

R-205 型旋转蒸发仪(瑞士 BuChi 公司),EDC-810 型 PCR 仪(东胜创新生物科技有限公司),Multi-skan MK3 全自动酶标仪(Thermo scientific),C2500-R-230V 微型高速离心机。

1.4 细胞处理

采用随机数字表法将 HUVECs 细胞分为:①正常对照组,加入 5.5 mmol/L 葡萄糖;②高糖模型组,

加入 30 mmol/L 葡萄糖;③高渗对照组,先加入 24.5 mmol/L 甘露醇,2 h 后加入 5.5 mmol/L 葡萄糖;④黄芪总黄酮高剂量组,先加入 2 mg/mL 黄芪总黄酮,2 h 后加入 30 mmol/L 葡萄糖;⑤黄芪总黄酮中剂量组,先加入 1 mg/mL 黄芪总黄酮,2 h 后加入 30 mmol/L 葡萄糖;⑥黄芪总黄酮低剂量组,先加入 0.5 mg/mL 黄芪总黄酮,2 h 后加入 30 mmol/L 葡萄糖。以上 5 组细胞处理完毕后置于 CO₂ 培养箱中 37℃, 5% CO₂ 培养,24 h 后进行指标检测。

1.5 检测指标

1.5.1 NO、T-SOD 水平 各组细胞均在高糖处理前分别加入药物,培养 24 h 后取细胞上清液,按照试剂盒使用说明书进行操作,检测各组细胞 NO、T-SOD 水平。

1.5.2 病理变化 将各组细胞采用 4% 多聚甲醛固定爬片,常规 HE 染色,在 200 倍显微镜下进行观察。

1.5.3 RT-PCR 检测 ET-1 mRNA 水平 通过 Trizol 法提取 RNA 后,逆转录成 cDNA,设计相应的引物。采用实时荧光定量 PCR 检测,测定 HUVECs 细胞内 ET-1 mRNA 的表达。以 GAPDH 作为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法比较分析各组 ET-1 mRNA 表达^[3]。引物序列见表 1。

1.5.4 Western blot 法检测 ET-1 蛋白表达 倒掉培养液,并将瓶倒扣在吸水纸上使吸水纸吸干培养液,加入 4℃ 预冷的 PBS 液洗涤细胞后加入裂解液,充分裂解后,12 000 rpm 离心 5 min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度,-20℃ 冻存储备用。30% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品,用 1×TBS 漂洗一次,加入含 5% 脱脂奶粉的 TBST(封闭液)浸泡 PVDF 膜,室温摇床封闭 2 h,分别加入一抗,4℃ 过夜,洗膜后分别加入 HRP 标记二抗,37℃ 摇床孵育 2 h,用 TBST 充分洗涤 PVDF 膜;加入增强化学发光试剂(ECL)后置于曝光机上曝光,用 BandScan 软件分析胶片灰度值,以

GAPDH 作为内参计算相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列
GAPDH	上游:5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3'
	下游:5'-TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3'
ET-1	上游:5'-GTCCCTGATGGATAAAGAGTGTGT-3'
	下游:5'-CATTGGCATCTATTTTCACGGTCTG-3'

1.6 统计学方法

采用 Stata 14.0 软件进行统计分析,实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验分析组间差异;以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪总黄酮对高糖损伤 HUVECs NO、T-SOD 水平的影响

培养 24 h 后,与正常对照组比较,高糖模型组 NO、T-SOD 水平明显降低($P < 0.05$)。与高糖模型组比较,黄芪总黄酮高、中、低剂量组 NO、T-SOD 水平明显升高($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组细胞 NO、T-SOD 水平比较($n = 72, \bar{x} \pm s$)

组别	NO($\mu\text{mol/L}$)	T-SOD(U/mL)
正常对照组	77.06±0.29 Δ	95.54±1.33 Δ
高糖模型组	28.93±1.17*	36.33±0.37*
高渗对照组	71.49±0.59 Δ	91.33±0.66 Δ
黄芪总黄酮高剂量组	46.28±4.67* Δ	79.85±0.33* Δ
黄芪总黄酮中剂量组	40.08±0.59* Δ	62.52±0.99* Δ
黄芪总黄酮低剂量组	35.54±1.17*	82.68±6.98* Δ

与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与高糖模型组比较, $\Delta P < 0.05$

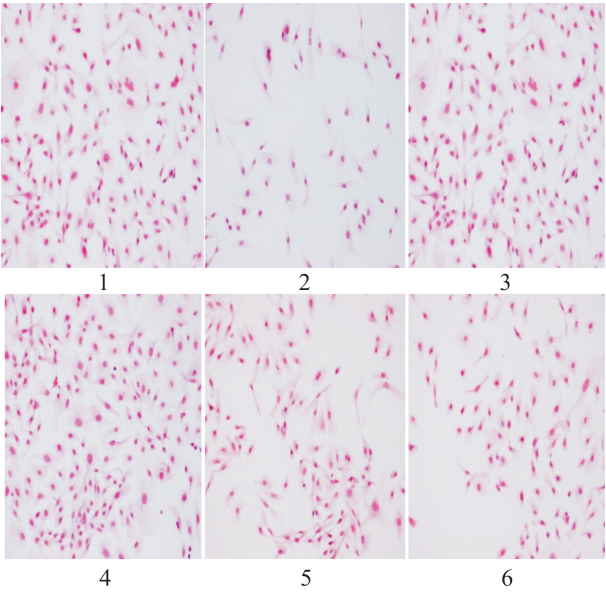
2.2 黄芪总黄酮对高糖损伤 HUVECs 形态的影响

HE 染色显示,正常对照组、高渗对照组 HUVECs 大小均匀;高糖模型组视野内细胞数量减少,大小分布不均;黄芪总黄酮高、中、低浓度干预后,细胞数量出现了明显的增加,形态较高糖模型组略为规整;且随着黄芪总黄酮浓度的变化,细胞数量也呈现出不同的变化,黄芪总黄酮高剂量组的细胞数量增加最为显著。见图 1。

2.3 黄芪总黄酮对高糖损伤 HUVECs ET-1 mRNA 水平的影响

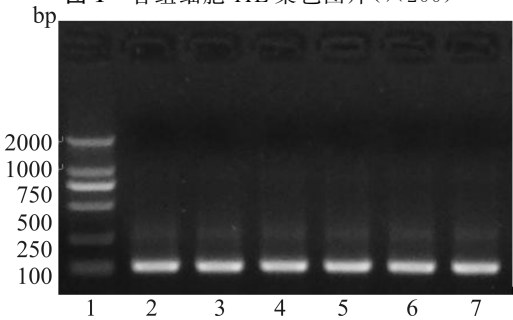
不同组别扩增出来的内参 GAPDH 表达一致,说明整个实验体系正常,见图 2。与正常对照组比较,高糖模型组的 ET-1 mRNA 表达明显升高($P < 0.05$)。

与高糖模型组比较,黄芪总黄酮高、中、低剂量组 ET-1 mRNA 表达显著下降($P < 0.05$),且黄芪总黄酮高剂量降低最为显著($P < 0.05$)。见图 3 及图 4。



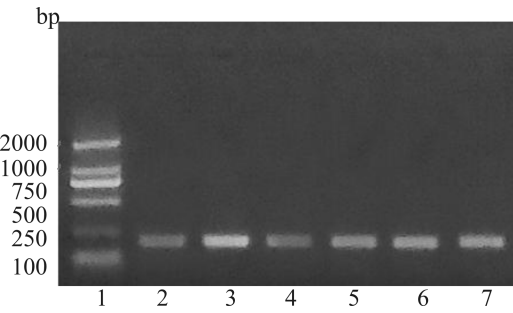
1 为正常对照组;2 为高糖模型组;3 为高渗对照组;4 为黄芪总黄酮高剂量组;5 为黄芪总黄酮中剂量组;6 为黄芪总黄酮低剂量组

图 1 各组细胞 HE 染色图片($\times 200$)



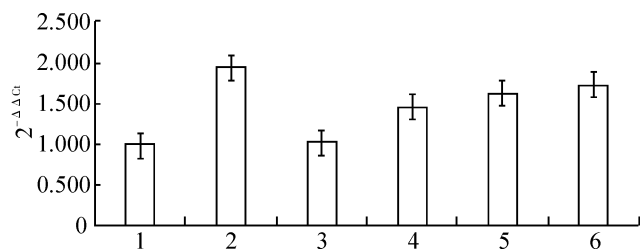
1 为 DL2000;2 为正常对照组;3 为高糖模型组;4 为高渗对照组;5 为黄芪总黄酮高剂量组;6 为黄芪总黄酮中剂量组;7 为黄芪总黄酮低剂量组

图 2 RT-PCR GAPDH 表达图



1 为 DL2000;2 为正常对照组;3 为高糖模型组;4 为高渗对照组;5 为黄芪总黄酮高剂量组;6 为黄芪总黄酮中剂量组;7 为黄芪总黄酮低剂量组

图 3 RT-PCR ET-1 mRNA 表达图

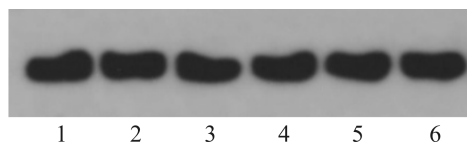


1 为正常对照组;2 为高糖模型组;3 为高渗对照组;4 为黄芪总黄酮高剂量组;5 为黄芪总黄酮中剂量组;6 为黄芪总黄酮低剂量组

图 4 各组细胞 ET-1 mRNA 水平比较

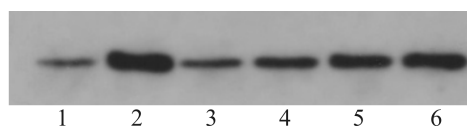
2.4 黄芪总黄酮对高糖损伤 HUVECs ET-1 蛋白表达的影响

不同组别内参 GAPDH 表达一致,说明整个实验体系正常,见图 5。与正常对照组比较,高糖模型组的 ET-1 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。与高糖模型组比较,黄芪总黄酮高、中、低剂量组 ET-1 蛋白表达显著下降($P<0.05$),且黄芪总黄酮高剂量降低最为显著($P<0.05$)。见图 6 及图 7。



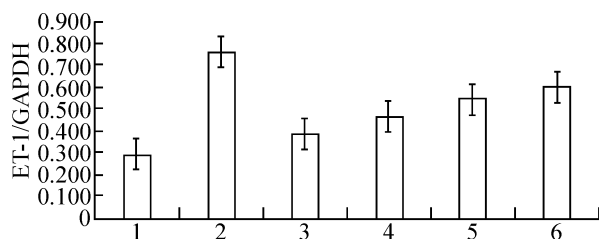
1 为正常对照组;2 为高糖模型组;3 为高渗对照组;4 为黄芪总黄酮高剂量组;5 为黄芪总黄酮中剂量组;6 为黄芪总黄酮低剂量组

图 5 Western blot GAPDH 表达图



1 为正常对照组;2 为高糖模型组;3 为高渗对照组;4 为黄芪总黄酮高剂量组;5 为黄芪总黄酮中剂量组;6 为黄芪总黄酮低剂量组

图 6 Western blot ET-1 蛋白表达图



1 为正常对照组;2 为高糖模型组;3 为高渗对照组;4 为黄芪总黄酮高剂量组;5 为黄芪总黄酮中剂量组;6 为黄芪总黄酮低剂量组

图 7 各组细胞 ET-1 蛋白水平比较

3 讨论

HUVECs 在循环血液和血管壁之间起到天然屏障作用,对神经、体液,特别是血流动力学变化作出反应。高糖毒性会诱导血管内皮细胞活性氧生成增多,产生氧化应激反应;应激产生的多种炎性因子,会引起血管内皮细胞损伤,造成血管内皮细胞功能障碍。黄芪作为经典的中药,其主要成分黄芪皂苷^[4-5]、黄芪多糖^[6-7]和黄芪总黄酮均有降糖疗效,目前对黄芪皂苷和黄芪多糖的高糖损伤保护作用的探讨较多,本研究主要从从细胞学的角度,研究了黄芪总黄酮可抑制氧化应激、改善内皮细胞功能,从而保护了 HUVECs 免受高糖损伤。

HE 染色可以直观清晰地反映细胞结构,染色后的细胞浆呈粉红色,通过不同剂量黄芪总黄酮干预后,在光学显微镜下,能直接观察各组细胞的数量变化。血管内皮细胞覆盖于血管内膜表面直接与循环血液接触,很容易受到血液中活性物质的影响,NO 和 ET-1 分别为重要的血管舒张因子及收缩因子,在维持内环境的稳定性方面起着重要作用^[8-9]。T-SOD 是一种重要的内源性活性物质,可消除生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质^[10]。本研究结果发现,与正常对照组比较,高糖模型组细胞 NO、T-SOD 水平明显降低,细胞数量减少,ET-1 mRNA 及蛋白表达显著升高,说明高糖对 HUVECs 会造成明显损伤;与高糖模型组比较,黄芪总黄酮高、中、低剂量组 NO、T-SOD 水平明显升高,细胞数量增加,ET-1 mRNA 及蛋白表达显著降低,说明黄芪总黄酮能对高糖损伤 HUVECs 产生一定的保护作用,其作用机制很可能是通过抑制 HUVECs 中 ET-1 的分泌而实现的;且高、中、低剂量黄芪总黄酮对 HUVECs 的保护作用,存在一定的剂量相关性,剂量越大则对 HUVECs 的保护作用越显著。改善高糖引起的血管内皮功能紊乱的机制较为复杂,本实验通过 ET-1 途径来研究高糖损伤 HUVECs 略显单薄,下一步可对其保护机制进行进一步的探讨。

综上所述,不同浓度黄芪总黄酮对高糖损伤的 HUVECs 细胞均有保护作用,可促进 NO、T-SOD 分泌,提升细胞数量,抑制 ET-1 mRNA 及蛋白表达,且高浓度黄芪总黄酮的保护效果最为显著。

参 考 文 献

[1] 国际糖尿病联盟. 2019 全球糖尿病地图(第 9 版)[EB/OL].[2020-02-16]. <https://diabetesatlas.org/en.html>.

- [2] 范颖,李新. 黄芪部分有效部位对糖尿病模型大鼠氧化应激的影响及其交互关系[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(11):3432-3436.
- [3] 唐静,曾雅莉,何婷. 何首乌提取物对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠的影响[J]. 实用药物与临床, 2016, 19(11): 1336-1339.
- [4] 肖峰,胡雅国,吴石楠,等. 黄芪皂苷提取物对糖尿病大鼠肾脏的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(10):2014-2018.
- [5] 刘倩. 基于 AdipoR1/AMPK 通路探讨黄芪葛根配伍对糖尿病大鼠糖脂代谢的影响[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2017.
- [6] 运立媛,张民,朱振元. 不同产地黄芪多糖降血糖活性的比较研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(19):20-25.
- [7] 贺映侠,朱虹. 黄芪多糖对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌氧化应激水平及 SIRT3 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(12):3023-3025.
- [8] 宋茜茜. 槲皮素对高糖诱导人脐静脉内皮细胞舒缩功能损伤的保护作用[D]. 石家庄:河北医科大学, 2014.
- [9] 孟承颖,胡德林,余又新,等. HIF-1 α 介导大鼠血管内皮细胞 ET-1 及其受体表达的机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(3):413-417.
- [10] 于娟,丁汉荣. 黄芪注射液对糖尿病患者血清氧自由基、TGF- β 1 及血管内皮功能的干预作用[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(9):119-121.

(收稿日期:2020-02-25)

《中西医结合研究》实行网站投稿

《中西医结合研究》杂志自 2020 年 1 月 1 日起实行网上投稿系统投稿,登录网站 ritcwm.com,按要求注册成为本刊作者即可投稿,欢迎广大作者踊跃投稿!咨询电话:027-69378380,E-mail: ritcwm@163.com。

(本刊编辑部)