

白花九里明醇提取物对 H_2O_2 诱导 ECV304 细胞损伤的保护作用

张文涛¹, 覃洪含²

(1. 广西中医药大学药理学教研室, 广西 南宁 530001;

2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000)

摘要:目的 研究白花九里明醇提取物对过氧化氢(H_2O_2)诱导人脐静脉内皮细胞(ECV304 细胞)氧化损伤的保护作用。方法 体外培养 ECV304 细胞,以 H_2O_2 诱导 ECV304 细胞氧化损伤为模型,将白花九里明醇提取物(终浓度为 100、200、400 $\mu\text{g/ml}$)作用于细胞 24 h 后,MTT 法检测细胞存活率,收集细胞上清液,分别测定 SOD 和 NO 含量。比较各组的存活率、SOD 及 NO 的表达水平。结果 白花九里明醇提取物能显著提高氧化损伤细胞的存活率,与 H_2O_2 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。白花九里明醇提取物能提高 SOD、NO 的表达水平,其中白花九里明醇提取物高剂量组与 H_2O_2 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论 白花九里明醇提取物对 H_2O_2 诱导的 ECV304 细胞氧化损伤具有保护作用,其作用机制可能与提高 SOD、NO 水平有关。

关键词: 白花九里明; H_2O_2 ; ECV304; 氧化损伤

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2015)02-0188-02

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2015.02.007

白花九里明系菊科植物东风草[*Blumea megacephala*(Randeria) Chang et Tseng]的全草,又名大头艾纳香、华艾纳香、管芽等。功能祛风除湿,活血调经。民间常用于风湿骨痛、跌打肿痛、产后血崩、月经不调^[1]。现代药理学研究表明白花九里明具有一定的止血作用,能缩短出血时间和凝血时间^[2-3],还能降低离体蛙心的心肌收缩力,且效应与剂量呈正相关^[4]。目前,尚未见白花九里明对心血管及抗氧化作用方面的研究。本实验以 H_2O_2 诱导人脐静脉内皮细胞(ECV304 细胞)氧化损伤为模型,观察白花九里明醇提取物对 ECV304 细胞氧化损伤的保护作用,为深入研究白花九里明治疗心脑血管疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 白花九里明,采自广西南宁市郊,药材晾干后剪碎,先用 10 倍量 95%乙醇浸泡 0.5 h,连续回流提取 2 次,每次 1 h,合并滤液,浓缩干燥后所得浸膏冷藏保存。

1.1.2 试剂 RPMI1640 培养基(gibco 公司);胎牛血清(HyClone);胰蛋白酶(Solarbio);双抗(gibco 公司);SOD 试剂盒、NO 试剂盒(南京建成生物工程研究所);四氮唑蓝 MTT(SIGMA); H_2O_2 (南国药业)。

1.1.3 仪器 倒置显微镜(LEICA DMIRB);二氧化碳培养箱(美国 Thermo);超净工作台(荷兰 ClearAir 公司);离心机(德国 Biofuge Stoctos 公司);连续波长酶标仪(上海科华实验系统有限公司,ST360)。

1.2 方法

1.2.1 药物配制 称取白花九里明醇提取物浸膏 0.1225 g,溶解于 1 ml DMSO 溶液中,得 0.1225 g/ml 母液,实验中以母液稀释成所需的浓度,控制 DMSO 的终浓度在 0.05%以内。

1.2.2 细胞培养 ECV304 细胞株由广西中医药大学药理学教研室提供,细胞复苏后培养于含 10%胎牛血

清和双抗 1%的 RPMI1640 培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中传代培养。

1.2.3 分组及处理 取对数生长期细胞,将细胞以 1×10^5 个/毫升的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μl ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度条件下培养。待细胞长满单层后,实验分为正常对照组、 H_2O_2 组(终浓度为 0.5 mmol/L)、白花九里明醇提取物高、中、低剂量组(终浓度 400、200、100 $\mu\text{g/ml}$),每组 3 个复孔。除正常对照组加培养基外, H_2O_2 组和药物组均先加终浓度为 0.5 mmol/L 的 H_2O_2 ,在培养箱中预先孵育 1 h,去掉上清,并用 PBS 清洗 2 遍后, H_2O_2 组加培养基,药物组加相应浓度的药物,继续在培养箱中培养 24 h,用 MTT 法测定细胞存活率。

1.2.4 白花九里明醇提取物对氧化损伤内皮细胞分泌 SOD、NO 含量的检测 细胞处理方法见“1.2.3”,待药物处理 24 h 后,收集上清液,按试剂盒说明分别测定 SOD、NO 的含量。

1.3 统计学方法 实验数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白花九里明醇提取物对 H_2O_2 作用下 ECV304 细胞生长情况的影响 如表 1 所示,白花九里明醇提取物各浓度组 OD 值较 H_2O_2 组高,与 H_2O_2 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),可明显提高 ECV304 细胞的存活率。

2.2 SOD、NO 含量的检测 结果见表 2,白花九里明醇提取物高、中、低剂量组均能提高氧化损伤 ECV304 细胞 SOD 和 NO 的含量,其中高剂量能提高 SOD 含量明显,与 H_2O_2 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。白花九里明醇提取物高、中剂量组提高 NO 含量明显,与 H_2O_2 比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。低剂量组与高剂量组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 白花九里明醇提取物对 H₂O₂ 作用下 ECV304 细胞生长情况的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	终浓度	OD值	存活率(%)
正常对照组	—	0.73±0.05	100.00
H ₂ O ₂ 组	0.5 mmol/L	0.24±0.02 ^a	33.11
白花九里明醇提取物			
低剂量	100 μg/ml	0.29±0.04 ^b	40.54
中剂量	200 μg/ml	0.33±0.02 ^c	45.46
高剂量	400 μg/ml	0.37±0.08 ^b	50.65

注:与正常对照组比较,a: $P < 0.05$;与 H₂O₂组比较,b: $P < 0.05$,c: $P < 0.01$

表2 白花九里明醇提取对氧化损伤 ECV304 细胞 SOD、NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	终浓度	SOD (U/ml)	NO (μmol/L)
正常对照组	—	20.84±0.57	15.19±0.47
H ₂ O ₂ 组	0.5mmol/L	13.93±0.66 ^a	10.95±0.42 ^a
白花九里明醇提取物			
低剂量组	100 μg/ml	14.08±1.91	11.50±0.85 ^d
中剂量组	200 μg/ml	14.87±1.70	12.20±0.18 ^b
高剂量组	400 μg/ml	16.82±0.63 ^c	13.58±0.75 ^b

注:与正常对照组比较,a: $P < 0.01$;与 H₂O₂组比较,b: $P < 0.05$,c: $P < 0.01$;与高剂量比较,d: $P < 0.05$

3 讨论

内皮细胞损伤与多种血管性疾病有着密切的联系,而氧化应激是导致内皮细胞损伤的主要病理因素^[5]。当内皮细胞损伤后不仅可以促进血管局部血栓的形成,还可释放血管紧张素转换酶、内皮素、5-羟色胺、生长因子、细胞因子、黏附分子等血管活性分子,促进血管的收缩,进而启动和引起一系列损伤后反应,导致心血管疾病的发生。

H₂O₂ 是活性氧,可促进自由基生成。生物体内 H₂O₂ 如不及时消除可透过细胞膜,在膜外与 Fe²⁺ 或 Cu²⁺ 生成经自由基·OH,从而引发脂类过氧化而导致细胞损伤。

SOD 是细胞抗氧化系统中重要的抗氧化酶之一,它是体内重要的氧自由基消除剂。NO 具有松弛血管平滑肌、抗血小板聚集、保护心肌以及减轻氧自由基造

成的血管内皮功能障碍的作用。在病理条件下,如高血压、高血脂、糖尿病、心力衰竭等,都有内皮细胞受损,表现是 NO 减少。Canipan 等^[6]研究表明,内膜损伤的动物,其损伤表面积减少与血管 NO 的生成呈正相关,说明 NO 活性的恢复能导致内膜损伤的消退。

改善内皮细胞的功能,保护内皮细胞免受损伤,是预防和治疗血管性疾病的一个重要手段。近年来已证实多种中药能从多个方面保护血管内皮细胞免受损伤和促进内皮细胞增殖,从而为中药治疗血管内皮细胞功能受损相关性疾病提供了药理学依据。

本实验发现白花九里明醇提取物各剂量组均可提高 H₂O₂ 诱导氧化损伤的 ECV304 细胞存活率,提示了白花九里明醇提取物对 H₂O₂ 诱导的 ECV304 细胞损伤有保护作用。实验中发现白花九里明醇提取物高剂量组能显著提高 SOD、NO 的含量,与 H₂O₂ 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示了白花九里明醇提取物对 H₂O₂ 诱导的 ECV304 细胞损伤的保护作用机制可能是与提高 SOD 和 NO 的水平含量有关。

参考文献:

- [1] 广西卫生厅. 广西本草选编:上册[M]. 南宁:广西人民出版社,1974:925.
- [2] 王杉,青桂玲,韦颖,等. 白花九里明提取液对小鼠出血时间、凝血时间和血小板数量的影响[J]. 广东医学,2012,9(33):1228-1230.
- [3] 黄艳,宁小清,原鲜玲,等. 壮药白花九里明水煎液止血作用机制探讨[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2013,7(15):1552-1556.
- [4] 王杉,青桂玲,潘海涛,等. 白花九里明提取液对蟾蜍离体灌流蛙心收缩力和心率的影响[J]. 中外医学研究,2012,4(10):3-4.
- [5] Griending KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of Ros[J]. Circulation,2003,108(16):1912-1916.
- [6] Candipan RC, Wang BY, Buitrigo R, et al. Regression or progression dependency on vascular nitric oxide[J]. Atheroscler Thromb Vasc Biol,1999,16(1):44-50.

收稿日期:2015-03-09;修回日期:2015-04-09