

# 齐墩果酸对氧化损伤模型人脐静脉内皮细胞的保护作用<sup>△</sup>

王巧云<sup>1\*</sup>, 李丙华<sup>2</sup>, 朱莉<sup>3</sup>, 李萍<sup>3</sup>, 韩志武<sup>3#</sup> (1. 青岛大学药学院, 山东青岛 266071; 2. 青岛市第八人民医院药剂科, 山东青岛 266100; 3. 青岛大学附属医院药学部, 山东青岛 266003)

中图分类号 R285; R331 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4033-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.01

**摘要** 目的: 研究齐墩果酸对氧化损伤模型人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的保护作用。方法: 分别以含10%胎牛血清DMEM高糖培养液[含氧化低密度脂蛋白(ox-LDL, 质量浓度分别为0、25、50、100、200、400 μg/ml)]培养HUVECs, CCK-8法检测细胞活性以筛选复制模型最适质量浓度。以0、10、20、40、60、80、100 μmol/L齐墩果酸培养HUVECs, CCK-8法检测细胞活性以考察齐墩果酸试验最适浓度。以5、10、20、40 μmol/L齐墩果酸作用于氧化损伤模型HUVECs(100 μg/ml ox-LDL诱导), CCK-8法检测细胞活性, 测定一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)水平。结果: 复制模型ox-LDL最适质量浓度为100 μg/ml; 齐墩果酸试验最适浓度范围为0~40 μmol/L; 5、10、20、40 μmol/L齐墩果酸可增加氧化损伤模型HUVECs存活率, 增强CAT、GSH-PX、NOS活性, 增加NO含量。结论: 齐墩果酸能够保护ox-LDL氧化损伤的HUVECs, 其保护机制与增强CAT、GSH-PX、NOS抗氧化酶活性有关。

**关键词** 齐墩果酸; 人脐静脉内皮细胞; 动脉粥样硬化; 氧化损伤

## Protective Effects of Oleanolic Acid on Oxidative Damaged Human Umbilical Vein Endothelial Cells

WANG Qiao-yun<sup>1</sup>, LI Bing-hua<sup>2</sup>, ZHU Li<sup>3</sup>, LI Ping<sup>3</sup>, HAN Zhi-wu<sup>3</sup> (1. College of Pharmacy, Qingdao University, Shandong Qingdao 266071, China; 2. Dept. of Pharmacy, Qingdao Eighth People's Hospital, Shandong Qingdao 266100, China; 3. Dept. of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong Qingdao 266003, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the protective effects of oleanolic acid(OA) on oxidative damaged human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). METHODS: HUVECs were cultured with DMEM high glucose medium of 10% serum [containing ox-LDL 0, 25, 50, 100, 200 and 400 μg/ml]; the activity of cells was detected by CCK-8 assay to screen optimal concentration of medium. HUVECs were cultured with OA (0, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 μmol/L), and the activity of cells was detected by CCK-8 assay to screen optimal concentration of OA. The oxidative damaged HUVECs (induced by 100 μg/ml ox-LDL) were treated with OA (5, 10, 20, 40 μmol/L), and the activity of cells was detected by CCK-8 assay; the levels of NO, NOS, CAT and GSH-PX were detected. RESULTS: For inducing model, the optimal concentration of ox-LDL was 100 μg/ml, and that of OA was 0-40 μmol/L; 5, 10, 20, 40 μmol/L OA enhanced the survival rate of HUVECs, enhanced the activities of CAT, GSH-PX and NOS and increased NO levels. CONCLUSIONS: OA can protect the ox-LDL oxidative damage HUVECs, and the protective mechanism may be associated with the improvement of CAT, GSH-PX, NOS activity.

**KEYWORDS** Oleanolic acid; Human umbilical vein endothelial cells; Atherosclerosis; Oxidative damage

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)发生于全身动脉系统, 近年来其发病率日益上升<sup>[1]</sup>。Ross提出AS是一种炎症性疾病, 探讨药物对内皮细胞炎症反应的影响, 成为国内外AS研究的热点<sup>[2]</sup>。

齐墩果酸(Oleanic acid)是一种从天然产物中提取的五环三萜类化合物<sup>[3]</sup>。近十年来, 齐墩果酸对心血管疾病的保护作用引起了国内外学者的关注。Somova LI<sup>[4]</sup>等发现齐墩果酸具有抗AS的作用。Sultana N<sup>[5]</sup>报道了齐墩果酸的心血管保护作用,

与其自身所具有不饱和基团清除活性氧、提高抗氧化酶的活性有关。但是, 齐墩果酸抗AS的具体机制仍有待探索。

血管内皮细胞的氧化损伤, 尤其是低密度脂蛋白氧化修饰生成的氧化性低密度脂蛋白(Oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是诱发血管内皮细胞炎症反应的主要因素<sup>[6]</sup>, 是AS预防和治疗的关键靶点。本研究通过复制ox-LDL诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)氧化损伤模型, 探讨齐墩果酸对HUVECs的保护作用, 并进一步对其机制进行研究。

## 1 材料

### 1.1 仪器

680型酶标仪(美国Bio-Rad公司); 723型分光光度计(上海第三分析仪器厂); IX50型倒置显微镜(日本Olympus公司); TDL-50B型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

<sup>△</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81274126)

\* 硕士研究生。研究方向: 心血管药理学。E-mail: 18724771268@126.com

# 通信作者: 副主任药师。研究方向: 中药心血管药理。电话: 0532-82911848。E-mail: zhiwu1218@126.com

## 1.2 药品与试剂

齐墩果酸(美国Sigma公司,批号:05504,纯度:99%);人胆囊收缩素(CCK-8,日本同仁化学研究所,批号:C0038);ox-LDL(广州奕源生物科技有限公司,批号:YB-002-1);维生素E(美国Sigma公司,批号:S20796-254);过氧化氢酶(CAT)测试盒(批号:20140227)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒(批号:20140220)、一氧化氮(NO)测试盒(批号:20140227)、总一氧化氮合酶(NOS)测试盒(批号:20140220)均购于南京建成生物工程研究院。

## 1.3 细胞

HUVECs(中国科学院上海细胞库)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将生长状态良好的传代HUVECs加入胰蛋白酶消化1 min,吹打下细胞悬液离心后弃上清液,再加入适量含有10%灭活胎牛血清、100 u/ml青霉素和100 u/ml链霉素的DMEM高糖培养基,置37℃、5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养,取对数生长期的细胞进行试验。

### 2.2 复制模型细胞 ox-LDL 最适质量浓度的筛选

每孔分别加入终质量浓度含0(即对照组)、25、50、100、200、400 μg/ml ox-LDL的10%胎牛血清DMEM培养基孵育HUVECs 24 h后,每孔加入10 μl CCK-8,继续培养2 h后,用酶标仪在450 nm波长处检测光密度(OD)为细胞活性,按下式计算细胞存活率,重复3次。另设仅有培养液的为空白对照组。细胞存活率(%)=(试验组 OD<sub>450</sub>-空白对照组 OD<sub>450</sub>)/(对照组 OD<sub>450</sub>-空白对照组 OD<sub>450</sub>)×100%。

### 2.3 齐墩果酸最适浓度的筛选

精密称取齐墩果酸0.022 8 g,溶于1 ml DMSO中制备50 mmol/L贮备液,-20℃贮藏,备用,试验时用DMEM高糖培养基将贮备液稀释;取HUVECs(细胞密度为1.5×10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup>),按每孔100 μl细胞加入96孔板,分别加入浓度为0、10、20、40、60、80、100 μmol/L的齐墩果酸,每组6孔,培养24 h后,按“2.2”项下方法以CCK-8法检测并计算细胞存活率。

### 2.4 齐墩果酸对模型细胞的保护作用

试验随机均分为7组,即正常对照(正常培养液)组、模型(正常培养液)组、维生素E(200 μg/ml)组与齐墩果酸①、②、③、④(5、10、20、40 μmol/L)组。按“2.2”项下方法接种96孔板,加入相应药液,预培养16 h后,除正常对照组外其余组加入终质量浓度为100 μg/ml ox-LDL继续培养24 h,用CCK-8法检测并计算各组细胞存活率。收集各组细胞,用PBS洗涤2次,加细胞裂解液,冰上裂解1 h,4℃下,以离心半径为9 cm、12 000 r/min离心10 min,收集上清液,按试剂盒说明测定各组细胞内总蛋白及CAT、GSH-PX、NOS活性与NO含量。

### 2.5 统计学方法

采用SPSS17.0软件处理分析实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态性,再以LSD法进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 复制模型细胞 ox-LDL 最适质量浓度的筛选

与0 μg/ml比较,其余质量浓度下细胞存活率差异有统计

学意义( $P < 0.01$ )。IC<sub>50</sub>=100 μg/ml,因此选取100 μg/ml ox-LDL作为复制HUVECs损伤模型的质量浓度。复制模型细胞ox-LDL最适质量浓度的筛选见表1。

表1 复制模型细胞 ox-LDL 最适质量浓度的筛选( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Tab 1 Screening of optimal concentration of ox-LDL on model cell( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

质量浓度, μg/ml	细胞存活率, %
0	100.02 ± 4.37
25	92.47 ± 3.83*
50	74.29 ± 5.92*
100	52.11 ± 4.11*
200	39.19 ± 3.99*
400	21.28 ± 4.11*

与0 μg/ml比较: \* $P < 0.05$

vs.0 μg/ml: \* $P < 0.05$

### 3.2 齐墩果酸最适浓度的筛选

与0 μmol/L比较,齐墩果酸浓度为60 μmol/L时细胞存活率降低,且随着齐墩果酸浓度的增高,细胞存活率逐渐降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。因此,选择齐墩果酸浓度0~40 μmol/L范围内进行以下试验。齐墩果酸最适浓度的筛选见图1。

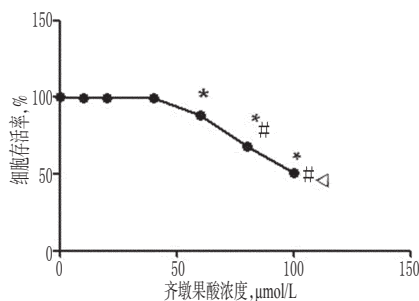


图1 齐墩果酸最适浓度的筛选( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

与0 μmol/L比较: \* $P < 0.05$ ;与60 μmol/L比较: # $P < 0.05$ ;与80 μmol/L比较: Δ $P < 0.05$

Fig 1 Screening of optimal concentration of oleanolic acid ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

vs.0 μmol/L: \* $P < 0.05$ ;vs.60 μmol/L: # $P < 0.05$ ;vs. 80 μmol/L: Δ $P < 0.05$

### 3.3 齐墩果酸对模型细胞存活率的影响

与正常对照组比较,模型组细胞存活率降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,齐墩果酸①、②、③、④组细胞存活率升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中齐墩果酸④组比齐墩果酸①组细胞存活率高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),证明40 μmol/ml齐墩果酸有较强的抗氧化能力。齐墩果酸对模型细胞存活率的影响见表2。

### 3.4 齐墩果酸对模型细胞 NO、NOS、CAT、GSH-PX 水平的影响

与正常对照组比较,模型组细胞CAT、GSH-PX、NOS活性减弱,NO含量减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,齐墩果酸①、②、③、④组CAT、GSH-PX、NOS活性增强,NO含量增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。齐墩果酸对模型细胞CAT、GSH-PX、NO、NOS水平的影响见表3。

## 4 讨论

ox-LDL在AS的发展中起重要作用<sup>[7]</sup>。经氧化修饰而成的

表2 齐墩果酸对模型细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 2 Effects of OA on survival rate of damaged cell ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	细胞存活率, %
正常对照组	100.01 ± 4.37
模型组	52.41 ± 5.83 <sup>*</sup>
维生素E组	65.73 ± 5.92 <sup>#</sup>
齐墩果酸①组	54.08 ± 4.41 <sup>#</sup>
齐墩果酸②组	56.67 ± 4.99 <sup>#</sup>
齐墩果酸③组	58.28 ± 3.97 <sup>#</sup>
齐墩果酸④组	66.74 ± 4.11 <sup>#A</sup>

与正常对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与齐墩果酸①组比较: <sup>A</sup> $P < 0.05$

vs. normal control group: \* $P < 0.05$ ; vs. model group: # $P < 0.05$ ; vs. oleanolic acid ① group: <sup>A</sup> $P < 0.05$

表3 齐墩果酸对模型细胞 CAT、GSH-PX、NO、NOS 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 3 Effects of OA on the levels of CAT, GSH-PX, NO and NOS in damaged cell ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	CAT, U/ml	GSH-PX, U/ml	NO, mol/L	NOS, $\times 10^3$ U/L
正常对照组	2.54 ± 0.11	139.52 ± 7.83	16.27 ± 0.56	12.06 ± 0.31
模型组	1.69 ± 0.11 <sup>*</sup>	71.54 ± 8.19 <sup>#</sup>	8.26 ± 0.37 <sup>*</sup>	5.51 ± 0.37 <sup>*</sup>
维生素E组	2.23 ± 0.10 <sup>#</sup>	130.91 ± 7.20 <sup>#</sup>	13.39 ± 0.51 <sup>#</sup>	11.33 ± 0.22 <sup>#</sup>
齐墩果酸①组	1.71 ± 0.12 <sup>#</sup>	77.21 ± 7.24 <sup>#</sup>	9.27 ± 0.42 <sup>#</sup>	7.08 ± 0.29 <sup>#</sup>
齐墩果酸②组	1.88 ± 0.10 <sup>#</sup>	93.10 ± 8.86 <sup>#</sup>	10.63 ± 0.40 <sup>#</sup>	8.17 ± 0.34 <sup>#</sup>
齐墩果酸③组	1.98 ± 0.11 <sup>#</sup>	105.71 ± 7.72 <sup>#</sup>	11.88 ± 0.68 <sup>#</sup>	9.09 ± 0.28 <sup>#</sup>
齐墩果酸④组	2.11 ± 0.11 <sup>#</sup>	123.44 ± 7.64 <sup>#</sup>	13.31 ± 0.47 <sup>#</sup>	10.32 ± 0.33 <sup>#</sup>

与正常对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$

vs. normal control group: \* $P < 0.05$ ; vs. model group: # $P < 0.05$

ox-LDL 水平, 已成为临床心脑血管病的一个重要生化标志<sup>[7]</sup>。

Fu R 等<sup>[8]</sup>研究发现, ox-LDL 作用内皮细胞 24 h 后, 细胞中的 F 肌动蛋白(F-actin)被破坏, 导致内皮细胞对脂质成分的通透性增加, 刺激活性氧(ROS)过度生成, 诱导氧化应激, 造成细胞氧化损伤, 此时机体开启抗氧化系统, 促进了 GSH-PX、CAT 等抗氧化酶合成<sup>[9]</sup>。这些抗氧化酶通过清除 ROS, 发挥抑制氧化损伤的作用<sup>[10-11]</sup>。本研究以 ox-LDL 刺激 HUVECs 复制 AS 模型, 模型组 HUVECs 细胞存活率明显降低, GSH-PX 与 CAT 活性明显下降, 表明 ox-LDL 通过抑制 GSH-PX 与 CAT 活性, 诱导氧化损伤。给予齐墩果酸预处理, 能够明显提升 HUVECs 细胞活力, 且 GSH-PX 与 CAT 的活力明显增强。提示齐墩果酸通过提高抗氧化酶 GSH-PX、CAT 活性, 减轻 ox-LDL 对 HUVECs 细胞的氧化损伤, 能有效抑制 AS 进展。齐墩果酸提高抗氧化酶活性的作用, 可能与其富含不饱和基团的三萜类物质结构有关<sup>[12]</sup>。

正常情况下, 内皮细胞中由内皮型一氧化氮合酶(eNOS)催化产生血管内皮舒张因子 NO<sup>[13]</sup>。NO 通过调控四氢生物蝶呤(BH4), 降低体内 ROS 含量<sup>[14]</sup>, 起到保护内皮细胞免于氧化侵袭的作用。本研究对细胞中 NO 含量以及 NOS 活性进行测定, 发现 ox-LDL 损伤的 HUVECs 细胞中, NO 含量减少, NOS 活性降低, 表明 NO 和 NOS 作为抗氧化因子, 在 HUVECs 细胞氧化损伤中受到抑制。经过齐墩果酸预处理, 这两项指标均有不同程度的升高, 证实齐墩果酸通过激活 NOS, 促进 NO 生成, 保护 HUVECs 细胞。最近, Gkaliagkousi E 等<sup>[15]</sup>研究发现,

ox-LDL 可以显著抑制内皮细胞、巨噬细胞 NO 合成酶基因表达, 从而抑制 NO 合成。齐墩果酸提升 NO 和 NOS 的内皮保护作用, 是由于 NO 对 ROS 的直接清除作用, 还是涉及到 NOS 的基因调控, 仍需进一步研究证实。

### 参考文献

- [1] 李丹, 李玉洁, 杨庆, 等. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 272.
- [2] Kautz L, Gabayan V, Wang X, et al. Ross R: Atherosclerosis-an inflammatory disease[J]. *Cell Rep*, 2013, 5(5): 1436.
- [3] 王奇, 芦柏震. 齐墩果酸的研究进展[J]. 中国药房, 2008, 19(9): 711.
- [4] Somova LI, Shode FO, Ramnanan P, et al. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves[J]. *Ethnopharmacol*, 2003, 84(2/3): 299.
- [5] Sultana N, Ata A. Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important Compounds[J]. *Enzyme Inhib Med Chem*, 2008, 23(6): 739.
- [6] Mestas J, Ley K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2008, 18(6): 228.
- [7] Papaharalambus CA, Griendling KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17(2): 48.
- [8] Fu R, Wang Q, Guo Q, et al. XJP-1 protects endothelial cells from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by inhibiting NADPH oxidase subunit expression and modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. *Vascular Pharmacol*, 2013, 58(1/2): 78.
- [9] 赵凯, 杨万松. 氧化应激与高血压血管内皮损伤[J]. 天津医药, 2006, 34(12): 907.
- [10] 杨永宗. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 657.
- [11] Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities [J]. *Diabetes Care*, 2008(Suppl 2): 170.
- [12] 唐初, 陈玉, 柏舜, 等. 齐墩果酸的结构修饰与生物活性研究进展[J]. 有机化学, 2013, 33(1): 46.
- [13] Ulrich F, William CS. Nitric oxide synthases: regulation and function[J]. *Eur Heart*, 2012, 33(7): 829.
- [14] Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms[J]. *Redox Biol*, 2013, 1(1): 244.
- [15] Gkaliagkousi E, Ferro A. Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function[J]. *Front Biosci*, 2011, 16(1): 1873.

(收稿日期: 2014-05-25 修回日期: 2014-06-24)