



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.05.016

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.05.016

· 临床研究 ·

丹参提取物抑制高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞凋亡的机制研究

权联姣 秦婧婧 权元鼎

【摘要】 目的 观察丹参提取物对高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞(HRECs)凋亡的影响及其作用机制。**方法** 将 HRECs 分为对照组(5.5 mmol/L 葡萄糖)、高糖组(30.0 mmol/L 葡萄糖)及丹参提取物低浓度组(30.0 mmol/L 葡萄糖 + 5 μ g/ml 丹参提取物)、中浓度组(30.0 mmol/L 葡萄糖 + 10 μ g/ml 丹参提取物)、高浓度组(30.0 mmol/L 葡萄糖 + 20 μ g/ml 丹参提取物)。采用细胞计数试剂盒(CCK-8)检测细胞活性,流式细胞术检测 HRECs 凋亡率,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-8 的含量,蛋白质印迹法(Western blot)检测 HRECs 中相关蛋白表达水平。**结果** 与高糖组比较,丹参提取物低、中、高浓度组的 HRECs OD 值、细胞活性依次升高,HRECs 凋亡率、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 含量依次降低,活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-3、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax)和磷酸化核因子- κ B(p-NF- κ B)蛋白表达依次下降,Bcl-2 蛋白表达水平依次升高($P < 0.05$)。**结论** 丹参提取物可通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活抑制高糖诱导的 HRECs 凋亡。

【关键词】 丹参提取物; 人视网膜血管内皮细胞; 核因子- κ B 信号通路; 糖尿病视网膜病变; 凋亡

Mechanism of salvia miltiorrhiza extract inhibiting high glucose-induced apoptosis of human retinal vascular endothelial cells Quan Lianjiao, Qin Jingjing, Quan Yuanding. Qingyang People's Hospital, Qingyang 745000, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of salvia miltiorrhiza extract on apoptosis of human retinal vascular endothelial cells (HRECs) induced by high glucose and its mechanism. **Methods** HRECs were divided into control group(5.5 mmol/L glucose), high glucose group (30.0 mmol/L glucose) and salvia miltiorrhiza extract low concentration group(30.0 mmol/L glucose + 5 μ g/ml salvia miltiorrhiza extract), medium concentration group(30.0 mmol/L glucose + 10 μ g/ml salvia miltiorrhiza extract) and high concentration group(30.0 mmol/L glucose + 20 μ g/ml salvia miltiorrhiza extract). Cell activity was detected by cell counting kit (CCK-8). Apoptosis rate of HRECs was detected by flow cytometry. The levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-8 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of related proteins in HRECs were detected by Western blotting. **Results** Compared with the high glucose group, the OD value and cell activity of HRECs in low, medium and high concentration groups of salvia miltiorrhiza extract increased in turn, the apoptosis rate, the content of TNF- α , IL-1 β and IL-8 of HRECs decreased in turn, the activated cysteine aspartic acid protease (Caspase)-3, B lymphoma-2 gene (Bcl-2) related protein (Bax) and phosphorylated nuclear factor- κ B (p-NF- κ B) protein expression decreased in turn, Bcl-2 protein increased in turn ($P < 0.05$). **Conclusion** Salvia miltiorrhiza extract inhibits high glucose-induced apoptosis of HRECs by inhibiting the activation of NF- κ B signaling pathway.

【Key words】 Salvia miltiorrhiza extract; Human retinal vascular endothelial cells; Nuclear factor- κ B signaling pathway; Diabetic retinopathy; Apoptosis

糖尿病视网膜病变(DR)是糖尿病常见的微血管并发症之一,其发病机制尚未完全明确,炎症反应、凋亡、氧化应激等与其密切相关^[1-2]。丹参是一种传统的

中药,具有抗炎、抗氧化、抗血栓、免疫调节等作用^[3]。有关研究发现丹参及其制剂在 DR 的治疗过程中发挥重要作用^[4-5],但其机制目前尚不清楚。本研究采用高糖处理人视网膜血管内皮细胞(HRECs)构建 DR 体外的细胞模型,探讨丹参提取物对 HRECs 凋亡的影响及其作用机制。

材料与方法

1. 材料: HRECs 购自美国菌种保藏中心(ATCC)细胞库; 丹参购自哈尔滨市同仁堂大药房; 杜氏贝科改良伊格尔培养基(DMEM)购自美国HyClone公司; 胰蛋白酶、胎牛血清购自美国Gibco公司; 细胞计数试剂盒(CCK-8)、二辛可宁酸(BCA)试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; 膜联蛋白(Annexin)V-FITC/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒购自日本TaKaRa公司; 肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1 β 和IL-8酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3 兔单克隆抗体、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax)兔单克隆抗体、Bcl-2 兔单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 核因子(NF)- κ B 兔单克隆抗体、磷酸化 NF- κ B(p-NF- κ B)兔单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 购自美国 Abcam 公司。

2. 方法

(1) 丹参提取物的制备: 参照文献[6]中制备丹参提取物的方法, 将丹参 40 °C 烘干, 粉碎成干粉, 然后加入 10 倍水于 80 °C 提取 2 次, 每次提取 30 min。过滤, 弃去滤渣, 合并滤液, 过滤, 将溶液定容至 100 mL, 以 2 000 r/min 离心 10 min, 上清即为丹参提取物。

(2) 细胞培养方法和分组情况: 将冻存的 HRECs 常规复苏, 接种到含 10% 胎牛血清、5.5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基中, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞贴壁生长汇合率达 80% 以上时以胰蛋白酶消化进行传代培养。将对数生长期细胞分为 5 组, 5.5 mmol/L 葡萄糖培养的细胞作为对照组, 30.0 mmol/L 葡萄糖培养的细胞作为高糖组^[7], 30.0 mmol/L 葡萄糖和 5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml 丹参提取物培养的细胞作为丹参提取物低、中、高浓度组。

(3) CCK-8 法检测 HRECs 活性: 5 组细胞培养 48 h 后向每孔细胞中加入 10 μ l CCK-8 溶液, 在 37 °C 下继续培养 4 h, 酶标仪检测波长 570 nm 处细胞光密度值(OD 值), 以 OD 值反映细胞活性。重复试验 3 次, 取平均值。

(4) 流式细胞术检测 HRECs 凋亡率: 各组细胞培养 48 h 后用预冷的磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤细胞, 取 100 μ l 1 \times 结合缓冲液重悬细胞, 加入 Annexin V-FITC 溶液 5 μ l, 混匀后避光反应 10 min, 再加入 PI 染液 5 μ l, 混匀后避光孵育 20 min, 最后加入 400 μ l 1 \times Binding Buffer 结合缓冲液, 立即上流式细胞仪测定, 分析细胞凋亡率。重复试验 3 次, 取其平均值。

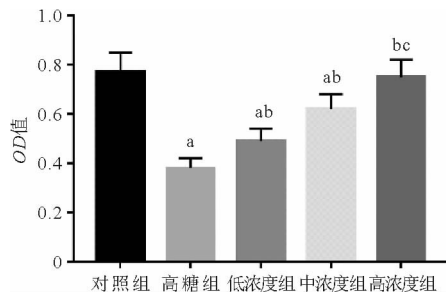
(5) ELISA 检测炎症因子含量: 分别收集处理 48 h 的 HRECs 上清液, 分别参照 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 ELISA 检测试剂盒说明书测定 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 的含量。重复试验 3 次, 取其平均值。

(6) 蛋白质印迹法(Western blot)检测 HRECs 中蛋白表达水平: 5 组 HRECs 处理 48 h 后, 提取细胞总蛋白, 使用 BCA 试剂盒进行定量分析。将蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 在 5% 脱脂奶粉中封阻 2 h, TBS 缓冲液加吐温(TBST)洗膜后加入一抗(Caspase-3 一抗 1:500 稀释, Bax 一抗 1:500 稀释, Bcl-2 一抗 1:500 稀释, NF- κ B 一抗 1:800 稀释, p-NF- κ B 一抗 1:800 稀释), 在 4 °C 下过夜杂交。TBST 洗膜后再加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3 000 稀释), 于室温下杂交 2 h, TBST 洗膜后, 采用电化学发光(ECL)发光液显影, 转移至暗室采集图像, 使用 Image J 软件分析条带灰度值, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内标, 计算各组 HRECs 中目的蛋白相对表达水平。

3. 统计学处理: 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 SNK-q 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.5 组 HRECs 活性比较: CCK-8 检测结果显示, 高糖组 HRECs 的 OD 值较对照组明显降低($P < 0.05$); 与高糖组比较, 丹参提取物低、中、高浓度组 HRECs 的 OD 值均依次升高($P < 0.05$)。见图 1。

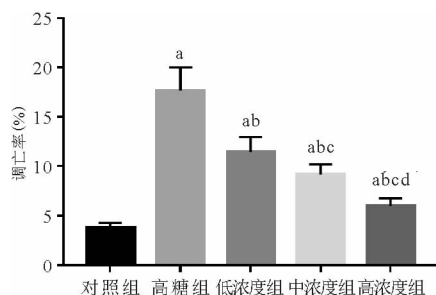


注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与高糖组比较, ^b $P < 0.05$; 与低浓度组比较, ^c $P < 0.05$

图 1 5 组 HRECs 的活性比较结果

2.5 组 HRECs 凋亡率比较: 流式细胞术检测结果显示, 与对照组比较, 高糖组 HRECs 凋亡率明显升高($P < 0.05$); 与高糖组比较, 丹参提取物低、中、高浓度组 HRECs 凋亡率均明显依次降低, 各组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

3.5 组 HRECs 中凋亡相关蛋白表达比较: Western



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与高糖组比较,^b $P < 0.05$;与低浓度组比较,^c $P < 0.05$;与中浓度组比较,^d $P < 0.05$

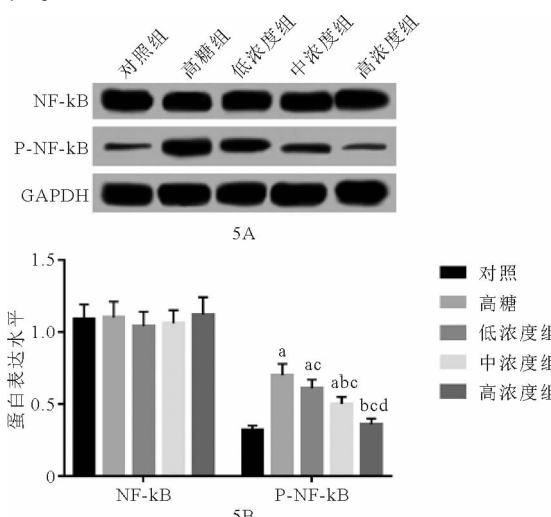
图2 5组 HRECs 凋亡率比较

blot 检测结果显示,与对照组比较,高糖组 HRECs 中 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达明显升高, Bcl-2 蛋白表达明显下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与高糖组比较,丹参提取物低、中、高浓度组 HRECs 中 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达明显依次下降, Bcl-2 蛋白表达明显依次升高,各组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

4.5 组 HRECs 炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 含量比较:ELISA 检测结果显示,与对照组比较,高糖组 HRECs 上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 含量明显升高($P < 0.05$);与高糖组比较,丹参提取物低、中、高浓度组 HRECs 上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 含量明显依次降低,各组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

5.5 组 HRECs p-NF- κ B 蛋白表达比较:Western blot 检测结果显示,与对照组比较,高糖组 HRECs 中 p-NF- κ B 蛋白表达升高($P < 0.05$);与高糖组比较,丹参提取物低、中、高浓度组 HRECs 中 p-NF- κ B 蛋白表达

依次下降,各组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。

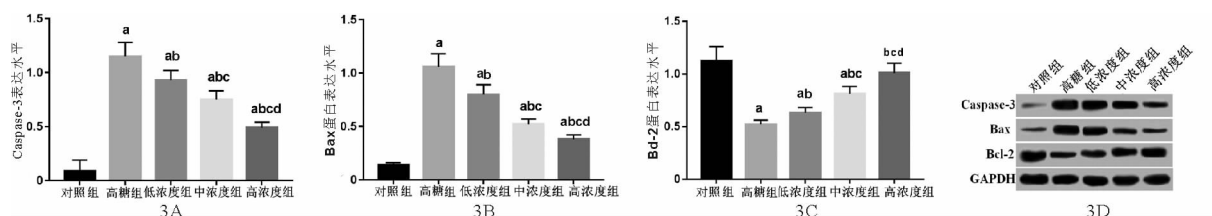


注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与高糖组比较,^b $P < 0.05$;与低浓度组比较,^c $P < 0.05$;与中浓度组比较,^d $P < 0.05$

图5 5组 HRECs p-NF- κ B 蛋白表达比较 A:5组 HRECs NF- κ B 和 p-NF- κ B 蛋白表达水平比较;B:5组 HRECs NF- κ B 和 p-NF- κ B 蛋白表达水平比较

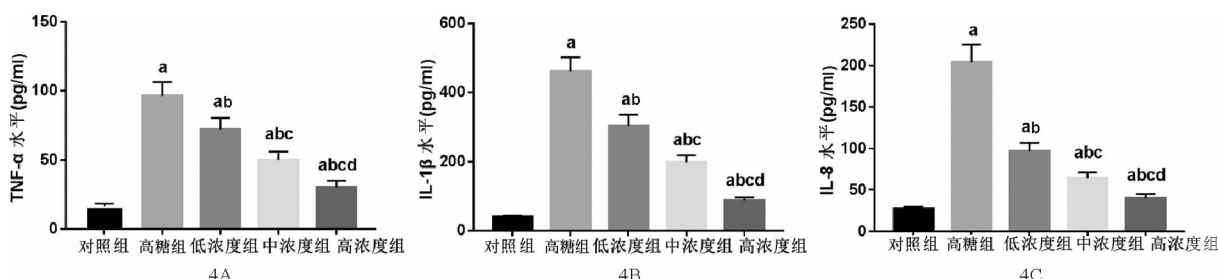
讨 论

研究发现,丹参提取物具有抗炎、抗氧化等作用,在治疗 DR 中取得了较好的疗效^[8]。本研究结果发现,高糖诱导的 HRECs 活力明显降低,且凋亡率明显升高,提示高糖能够诱导细胞凋亡,参与 DR 过程。这与近期关于 DR 患者存在微血管内皮细胞凋亡的研究结果相符^[9-11]。不同浓度的丹参提取物均可提高高糖诱导的 HRECs 活性,抑制高糖诱导的细胞凋亡,



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与高糖组比较,^b $P < 0.05$;与低浓度组比较,^c $P < 0.05$;与中浓度组比较,^d $P < 0.05$

图3 5组 HRECs 中凋亡相关蛋白表达比较 A: Caspase-3 蛋白;B: Bax 蛋白;C: Bcl-2 蛋白;D: Western blot 检测结果



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与高糖组比较,^b $P < 0.05$;与低浓度组比较,^c $P < 0.05$;与中浓度组比较,^d $P < 0.05$

图4 5组 HRECs 中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 含量比较 A: TNF- α ;B: IL-1 β ;C: IL-8

且具有浓度依赖的关系,提示丹参提取物对高糖诱导的 HRECs 具有保护作用。Bax 和 Bcl-2 均属于 Bcl-2 基因家族成员,Bax 是促凋亡基因之一,其过度表达可引起 Bcl-2 对细胞保护效应的失衡。当细胞受到损伤后,Bcl-2 构象发生改变,引起线粒体释放细胞色素 C,进而激活下游的 Caspase-3 级联反应,引发细胞凋亡^[12-13]。本研究结果显示,高糖能够诱导 Caspase-3 和 Bax 蛋白高度表达,Bcl-2 蛋白表达下调,而丹参提取物能够降低 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平,提高 Bcl-2 蛋白表达水平,提示丹参提取物可通过阻碍 Bcl-2 构象改变,抑制 Caspase-3 级联反应,从而抑制细胞凋亡。

NF- κ B 是转录因子蛋白家族成员之一,在免疫、炎症反应及细胞生长发育过程中起重要作用^[14]。有关研究结果显示,NF- κ B 信号通路能够调控下游基因 Bax 和 Bcl-2 的表达,参与细胞凋亡过程^[15]。丹参可通过抑制 NF- κ B 信号通路参与肝癌细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的过程^[16]。本研究结果显示,高糖能够促进 Bax 蛋白的表达,而丹参提取物能够抑制高糖诱导的 Bax 蛋白的表达,提示丹参提取物可能通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活抑制高糖诱导的 HRECs 凋亡。有研究结果表明,NF- κ B 通过调控细胞因子、趋化因子等参与调节机体炎症反应,NF- κ B 的过度激活是炎症反应发生的关键环节^[17-18]。丹参可通过调控 NF- κ B 信号通路进而调控炎症因子和黏附因子等的表达,影响细胞功能^[19-20]。本研究结果显示,高糖诱导的细胞炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 的含量明显增多,丹参提取物处理后 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 的含量明显减少,提示丹参提取物可能通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活降低炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 分泌,从而抑制细胞凋亡。本研究仅对丹参提取物影响 NF- κ B 信号通路的作用机制进行了初步探究,涉及该通路上游或下游基因表达情况的检测尚显不足,后续研究将对此进行补充。

综上所述,丹参提取物可抑制高糖诱导的 HREOS 凋亡,其作用机制可能是抑制 NF- κ B 信号通路的激活,通过上调 Bcl-2 蛋白表达,下调 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达,降低炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 分泌来实现的。提示丹参提取物可通过抑制 NF- κ B 信号通路,对抗炎症反应,降低细胞凋亡从而起保护 HREOS 的作用。

参 考 文 献

- [1] Rübsam A, Parikh S, Fort PE. Role of inflammation in diabetic retinopathy[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 942-980.
- [2] Kowluru RA, Shan Y. Role of oxidative stress in epigenetic modification of MMP-9 promoter in the development of diabetic retinopathy[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2017, 255(5): 1055-1056.
- [3] 崔振川,郭静,狄宁宁,等.卡维地洛联合丹参酮 II A 磺酸钠对心力衰竭患者心脏重构的影响[J].中国医药,2019,14(8): 1133-1136.
- [4] An L, Zhou M, Marikar FMMT, et al. Salvia miltiorrhiza lipophilic fraction attenuates oxidative stress in diabetic nephropathy through activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2[J]. Am J Chin Med, 2017, 45(7): 1441-1457.
- [5] 阮余霞,陈明,刘志谦,等.口服复方丹参滴丸联合羟苯磺酸钙治疗糖尿病患者视网膜病变的临床研究[J].中南医学科学杂志,2017, 45(1): 18-20.
- [6] 李杨,张延辉,王云枫,等.丹参提取物促进骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的研究[J].中国骨质疏松杂志,2017, 23(8): 1030-1033.
- [7] 毛拓华,黄汉奇,洪练,等.色素上皮衍生因子对高糖诱导人肾小球系膜细胞转化生长因子- β 1/Smad 信号转导途径的影响[J].临床内科杂志,2018, 35(7): 488-492.
- [8] 李杨,徐秒,陈换飞,等.丹参提取物对糖基化终末产物/缺氧条件下视网膜 Müller 细胞低氧诱导因子-1 α 作用的谱效关系研究[J].中草药,2017, 48(11): 2231-2236.
- [9] Tien T, Zhang J, Muto T, et al. High glucose induces mitochondrial dysfunction in retinal müller cells; implications for diabetic retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(7): 2915-2921.
- [10] Yang X, Huo F, Liu B, et al. Crocin inhibits oxidative stress and pro-inflammatory response of microglial cells associated with diabetic retinopathy through the activation of PI3K/Akt signaling pathway[J]. J Mol Neurosci, 2017, 61(4): 581-589.
- [11] Danish L, Imig D, Allgöwer F, et al. Bcl-2-mediated control of TRAIL-induced apoptotic response in the non-small lung cancer cell line NCI-H460 is effective at late caspase processing steps[J]. PLoS One, 2018, 13(6): e0198203-e0198217.
- [12] 白秋方,胡军,杨少娟,等. c-Jun 氨基末端激酶信号通路对肥胖诱导的大鼠胰岛 β 细胞凋亡的调控作用[J].临床内科杂志,2018, 35(1): 50-53.
- [13] Liu Y, Zuo H, Wang Y, et al. Ethanol promotes apoptosis in rat ovarian granulosa cells via the Bcl-2 family dependent intrinsic apoptotic pathway[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2018, 64(1): 118-125.
- [14] 康林,赵静,杨帆,等.苏木酮 A 对顺铂引起人肾小管上皮细胞损伤的保护作用及其机制[J].临床内科杂志,2019, 36(8): 557-560.
- [15] Zhang Z, Liang Z, Li H, et al. Perfluorocarbon reduces cell damage from blast injury by inhibiting signal paths of NF- κ B, MAPK and Bcl-2/Bax signaling pathway in A549 cells[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173884.
- [16] 厉晶萍,闵晓俊.丹参酮联合大黄素通过 NF- κ B 信号通路抑制肝癌细胞癌细胞中 MMP-9 的表达[J].四川中医,2018, 36(2): 63-68.
- [17] Wang KS, Li J, Wang Z, et al. Artemisinin inhibits inflammatory response via regulating NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2017, 39(1): 28-36.
- [18] Xu H, Wang L, Zheng P, et al. Elevated serum A20 is associated with severity of chronic hepatitis B and A20 inhibits NF- κ B-mediated inflammatory response[J]. Oncotarget, 2017, 8(24): 38914-38926.
- [19] 黄铄,李双,陈哲,等.丹参酮 II A 通过调节 NF- κ B 通路对肥大细胞介导的过敏性鼻炎的影响[J].武汉大学学报(医学版),2018, 39(2): 223-227.
- [20] 潘洁丽,郑国炯,王萌.中药制剂复方丹参滴丸对急性心肌梗死患者体内核因子- κ B p65 介导的炎症反应的影响[J].中国医药生物技术,2017, 12(2): 139-142.

(收稿日期:2019-09-02)

(本文编辑:余晓曼)