基础研究

葛根总黄酮上调磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 保护内皮细胞损伤

易军，李泱*，朱庆磊，尹彤，杨洁，刘杰，赵晓静，周浩，陈光辉*
（解放军总医院心血管内科，北京 100853）

【摘 要】 **目的** 探讨葛根总黄酮（PR）对 H_2O_2 诱导的内皮细胞氧化损伤保护作用及其可能机制。**方法** 分离培养大鼠主动脉内皮细胞。MTT 法检测细胞活力，免疫印迹检测 PR 对 PI3K 和 AKT 蛋白表达的影响，流式细胞仪检测细胞凋亡情况并进行细胞自噬荧光分析。组间比较采用单因素方差分析。**结果** 与 PR + H_2O_2 组相比，PR + H_2O_2 + LY294002 组的 $A_{570\ nm}$ 值显著降低[（2.07 ± 0.08）*vs*（1.69 ± 0.04），$P < 0.05$]。与对照组相比，H_2O_2 组（25.47%）和 PR + H_2O_2 组（13.26%）的细胞凋亡率均显著增加（$P < 0.05$）；而与 H_2O_2 组相比，PR + H_2O_2 组的细胞凋亡率亦显著降低（25.47% *vs* 13.26%；$P < 0.05$）。与对照组相比，H_2O_2 组和 PR + H_2O_2 组的自噬荧光强度均显著增高（$P < 0.05$），PR + H_2O_2 组的自噬荧光强度显著低于 H_2O_2 组（$P < 0.05$）。H_2O_2 + PR 组的 PI3K 和 AKT 蛋白表达显著高于对照组（$P < 0.05$），PR + H_2O_2 + LY294002 组的 PI3K 和 AKT 蛋白表达显著低于 H_2O_2 + PR 组（$P < 0.05$）。**结论** PR 可通过抑制细胞过度自噬和凋亡，促进内皮细胞存活，对 H_2O_2 诱导的内皮细胞损伤有保护作用，且其作用机制可能与调控 PI3K/AKT 表达上调相关。

【关键词】 葛根总黄酮；内皮细胞损伤；凋亡；自噬
【中图分类号】 R966 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.12.218

Flavonoids of puerarin protects vascular endothelial cells against hydrogen peroxide induced injury *via* up-regulating PI3K/AKT

YI Jun, LI Yang*, ZHU Qing-Lei, YIN Tong, YANG Jie, LIU Jie, ZHAO Xiao-Jing, ZHOU Hao, CHEN Guang-Hui*
(Department of Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the protective effect of total flavonoids in puerarin (PR) on oxidant injury in endothelial cells (ECs) induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) and the possible mechanism. **Methods** ECs were isolated from the aorta of male Sprague-Dawley rats by adherent method. Cell viability was assessed by MTT colorimetry, and the effect of PI3K inhibitor LY294002 on the proliferation was also measured. The cell apoptosis was detected with flow cytometry. Fluorescence microscopy was used to observe the autophagic marker, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC-3) in the 3 groups of cells. Western blotting was employed to detect the expression of PI3K and AKT in presence or absence of LY294002. One-way ANOVA was used to make comparison between groups. **Results** The cell viability was significantly lower in the H_2O_2 + PR ECs with LY294002 treatment than those without[(2.07 ± 0.08) *vs* (1.69 ± 0.04), $P < 0.05$]. Flow cytometry showed that the apoptosis rate was significantly higher in the H_2O_2 injured cells and the injured cells with PR treatment than the control cells ($P < 0.05$), but PR treatment reduced the apoptosis rate in the H_2O_2 cells (13.26% *vs* 25.47%, $P < 0.05$). Compared with the control cells, the total intracellular LC3-GFP fluorescence intensity was enhanced in the H_2O_2 ECs and the H_2O_2 + PR ECs ($P < 0.05$), with that of the latter group more significant ($P < 0.05$). The protein levels of PI3K and AKT were up-regulated significantly in H_2O_2 + PR ECs than the control cells ($P < 0.05$), while the increases were blocked by LY294002 treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** PR protects ECs from H_2O_2 induced injury and promotes cell survival through inhibiting cell excessive apoptosis and autophagy, which may be associated with up-regulation of PI3K/AKT expression.

【**Key words**】 flavonoids of puerarin; endothelial cell injury; apoptosis; autophagy

Corresponding author: *LI Yang*, *E-mail*: *ganfang9876@163.com*; *CHEN Guang-Hui*, *E-mail*: *13910669498@163.com*

收稿日期：2017－06－22；**修回日期**：2017－08－28
通信作者：李泱，E-mail：ganfang9876@163.com；陈光辉，E-mail：13910669498@163.com

血管内皮细胞(endothelial cells,ECs)不仅是生理屏障,而且在维持内环境稳定方面同样发挥重要作用。血管内皮功能障碍是动脉粥样硬化发生的原因之一。缺血缺氧导致的氧化应激是血管内皮功能障碍的主要病理因素[1-3]。因此,减少氧化应激、促进 ECs 损伤修复对维持心血管系统功能正常、防止动脉粥样硬化发生发展有着重要的作用。

葛根总黄酮(flavonoids of puerarin,PR)是葛根素的主要活性成分,对氧化应激、高糖诱导的 ECs 和平滑肌细胞凋亡有抑制作用,并能促进其增殖[4],但机制尚不清楚。磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B,AKT)通路在抑制细胞凋亡、促进细胞增殖分化等方面起重要的作用[5-8],但 PR 抑制 ECs 凋亡是否通过此通路的相关机制迄今未见报道。本实验采用体外培养原代 ECs 的方法,建立 H_2O_2 对 ECs 的氧化损伤导致的自噬-凋亡模型,探究 PR 对 ECs 损伤的保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

PR 购自安徽九方制药,总黄酮纯度≥72%;杜氏改良的伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium,DMEM)和胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购自 Gibco;PI3K/AKT、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3,LC-3)一抗购自 Sandoz;兔抗鼠二抗、Alexa Flour 488-驴抗兔 IgG 二抗购自北京中山金桥生物技术有限公司;H_2O_2 购于北京化工厂;胰酶和四氮唑兰(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自 SIGMA 公司;碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)购自北京双鹭药业;膜联蛋白-V(AnnexinV-FITC)/碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒购自碧云天生物公司。

1.2 方法

1.2.1 原代大鼠主动脉 ECs 分离培养 取 10 个月龄的 SD 大鼠,3% 戊巴比妥 0.6 ml 腹腔麻醉、脱颈,浸入 75% 乙醇 3 min,分离主动脉,剪为约 5 mm×5 mm,内膜向下贴至直径 35 mm 培养皿中,加 50 μl 含 10% FBS 的 DMEM,置于 CO_2 培养箱,6 h 后补充 100 μl,隔日换液 200 μl。5~6 d 后,见多数组织边缘爬出 ECs,部分局部较密集时,消化、传代,移至培养瓶中,加入 5 ml 含 20% FBS 的 DMEM+50U bFGF,汇合率 70%~80% 时传代。使用 P_3~P_6 代细胞。

1.2.2 MTT 比色法检测 将 ECs 接种于 96 孔培养板,10^4 个/孔,设正常对照组、H_2O_2 组、PR+H_2O_2 组和 PR+H_2O_2+LY294002(10 μmol/L,PI3K 抑制剂)组,每组设 3 个平行孔。检测前每孔加入 100 μl 培养基和 20 μl MTT(5 g/L)作用 4 h,弃掉上清,每孔加 150 μl DMSO,微孔振荡器上振荡 10 min,酶标仪测定细胞 $A_{570\ nm}$。

1.2.3 流式细胞仪检测 ECs(5×10^5/孔)铺 6 孔板培养 24 h,分为 3 组:对照组、H_2O_2 组、PR+H_2O_2 组,每组设 5 个平行孔。H_2O_2 的干预浓度为 600 μmol/L,PR 的干预浓度为 1 μmol/L。24 h 后收集调整细胞数为 5×10^5/ml,4℃、1000 转/min 离心 10 min,弃上清,加入 1 ml 冰冷的磷酸盐缓冲液(PBS)轻洗 1 遍,4℃、1000 转/min 离心 10 min,弃上清,200 μl PBS 重悬,分别加入 10 μl AnnexinV-FITC 和 10 μl 碘化丙啶(propidium iodide,PI)染料,混匀后室温避光反应 15 min,流式细胞仪检测。

1.2.4 细胞自噬荧光分析 ECs 按 8×10^3 个/孔接种于 96 孔黑色底透细胞培养板,分为 3 组:对照组、H_2O_2 组、PR+H_2O_2 组,培养 24 h;PR 孵育 30 min,加入 600 μmol/L H_2O_2 孵育 24 h;加入甲醛室温避光固定 20 min,弃液,PBS 洗 1 次;加入 100 μl 透膜液(0.1% Triton X-100PBS 溶液),室温避光孵育 30 min;200 μl PBS 洗 2 min,200 μl 1×封闭液(含 5% BSA 的 PBS 溶液)37℃孵育 30 min,弃液,加入 LC-3 抗工作液(40 μl/孔;兔抗人 LC-3B 单抗,1×封闭液 1∶1000 稀释)室温避光孵育 2 h;弃液,1×封闭液洗 3 次,加入二抗工作液(50 μl/孔;Alexa Flour 488-驴抗兔 IgG 二抗,1×封闭液 1∶500 稀释)室温避光孵育 1 h;PBS 洗 3 次,加入 PBS(200 μl/孔),荧光显微镜观察。

1.2.5 免疫印迹检测 分为 4 组:对照组、PR+H_2O_2 组、H_2O_2+LY294002 组和 PR+H_2O_2+LY294002 组。H_2O_2 的干预浓度为 600 μmol/L,PR 的干预浓度为 1 μmol/L。处理细胞 24 h 阻断信号。细胞冰上裂解,离心,取各组上清,检测浓度,取 80 μg 蛋白与加样缓冲液混匀变性,电泳、转膜、封闭,PI3K 及 AKT 一抗 4℃孵育过夜,二抗孵育 1 h,进行后续发光、压片、显影、定影等,3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)为内参照。采用 BioRad-Jeldoc2000 图像分析系统进行光密度扫描,数值以各干预组与 GAPDH 的比值表示。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠主动脉 ECs 的鉴定

培养 6 d 消化传代，接种 4 d 分裂生长。早期细胞外观呈梭形，折光性、胞质透光性好，边缘清晰，细胞间呈类管腔连接；融合生长细胞则呈铺路石样，胞质透光性降低；细胞假性血友病因子（von Willebrand factor，vWF）荧光染色阳性率 > 90%（图 1）。

2.2 MTT 检测

对照组、H_2O_2 组、PR + H_2O_2 组和 PR + H_2O_2 + LY294002 组的 $A_{570\ nm}$ 分别为 2.38 ± 0.09、1.67 ± 0.10、2.07 ± 0.08、1.69 ± 0.04。与 PR + H_2O_2 组相比，PR + H_2O_2 + LY294002 组的 $A_{570\ nm}$ 显著降低，差异具有统计学意义（$P < 0.05$），表明 PI3K 抑制剂 LY294002 可阻断 PR 对内皮细胞的保护。

2.3 流式细胞仪检测

AnnixinV/PI 双染结果显示，正常对照组、H_2O_2 组和 PR + H_2O_2 组的细胞凋亡率分别为 1.00%、25.47% 和 13.26%，与对照组相比，H_2O_2 组和 PR + H_2O_2 组的细胞凋亡率均显著增加（$P < 0.05$）；而与 H_2O_2 组相比，PR + H_2O_2 组的细胞凋亡率显著降低（$P < 0.05$；图 2）。

2.4 免疫荧光染色检测细胞内自噬小体 LC3

以免疫荧光抗体标记细胞内自噬小体 LC3，观察 PR 对 H_2O_2 诱导的细胞自噬的影响，结果表明，与对照组相比，H_2O_2 组和 PR + H_2O_2 组的自噬荧光强度均显著增高（$P < 0.05$），而 PR + H_2O_2 组的自噬荧光强度显著低于 H_2O_2 组，差异具有统计学意义（$P < 0.05$；图 3）。

2.5 免疫印迹检测 PI3K 和 AKT 蛋白的表达

H_2O_2 + PR 组的 PI3K 和 AKT 蛋白表达显著高于对照组（$P < 0.05$），PR + H_2O_2 + LY294002 组的 PI3K 和 AKT 蛋白表达显著低于 H_2O_2 + PR 组（$P < 0.05$；图 4），提示 PR 抗损伤的作用，可能是通过 PI3K/AKT 表达调控。

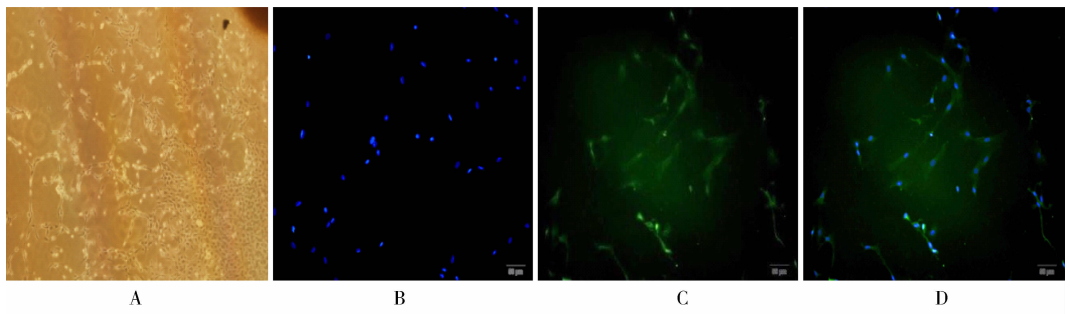


图 1 大鼠主动脉内皮细胞鉴定

Figure 1 Identification of rat aortic endothelial cells

A: light microscope (×40); B: nucleus (Hoechst 33258 staining ×100); C: von Willebrand factor (×100); D: merge (×100)

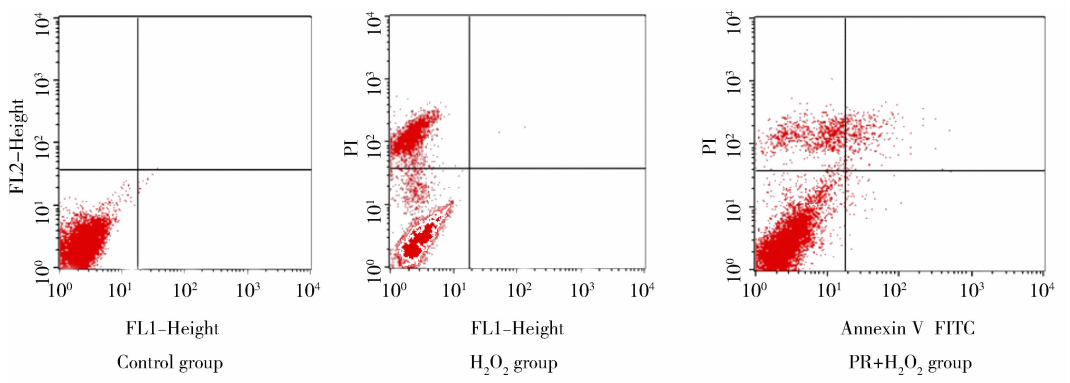


图 2 流式细胞仪 AnnexinV-FITC/PI 染色检测 ECs 凋亡

Figure 2 Flow cytometry detection of apoptosis rate of ECs by AnnexinV-FITC/PI staining

PR: flavonoids of puerarin; PI: propidium iodide; ECs: endothelial cells

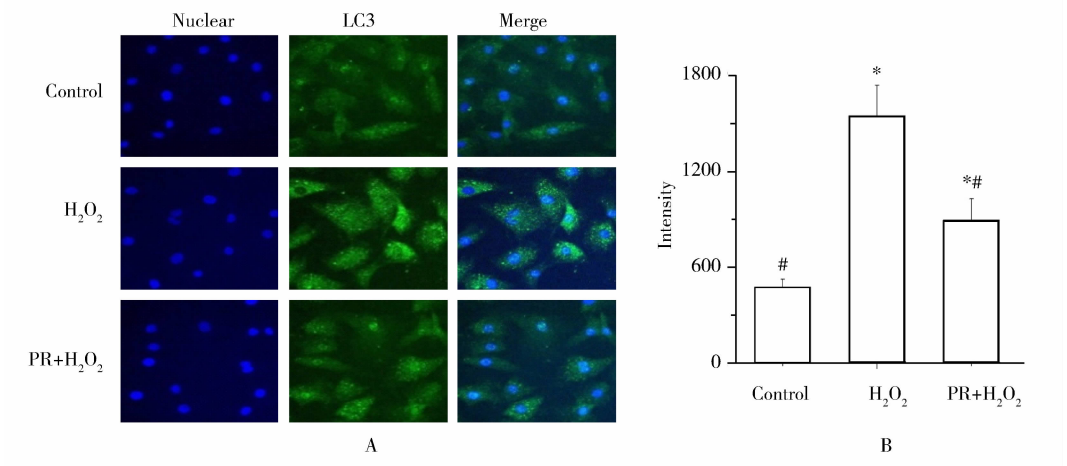


图 3 PR 对 ECs 自噬的影响

Figure 3 Effects of PR on autophagy of ECs

PR: flavonoids of puerarin; ECs: endothelial cells; A: immunofluorescence staining; B: comparison of fluorescence intensity. Compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with H_2O_2 group, $^{\#}P<0.05$

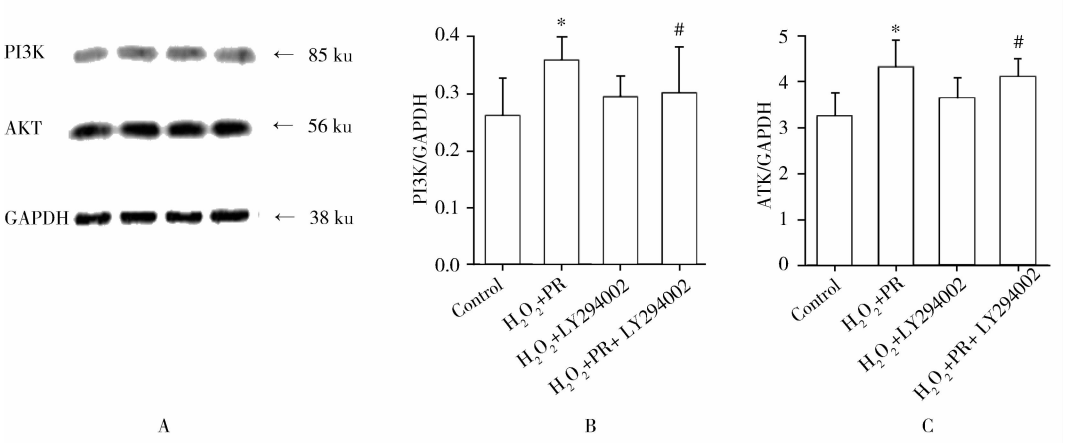


图 4 Western blotting 检测 PI3K 和 AKT 蛋白表达

Figure 4 Expression of PI3K and AKT protein by Western blotting

A: Western blotting; B, C: statistical analysis of protein expression. Compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with H_2O_2 + PR group, $^{\#}P<0.05$

3 讨 论

ECs 结构和功能的损伤是动脉粥样硬化的始动因素,与其病理演进过程密切相关。氧自由基是 ECs 损伤的主要因素之一,细胞代谢过程可产生包括超氧自由基、氢过氧化物自由基、H_2O_2 等氧自由基。当炎症反应、缺血/再灌注等病理因素存在时,H_2O_2 等氧自由基大量产生,介导过氧化反应,引起细胞膜脂质过氧化和蛋白质与核酸变性,从而导致 ECs 不可逆损伤,最终形成动脉粥样硬化。

葛根是豆科植物野葛的干燥根,葛根素是从葛根中提取的活性物质,主要成分是异黄酮类化合物。在临床应用中,PR 对冠心病的治疗起到很好的作用,但其作用机制尚未明晰。外源性 H_2O_2 诱导的氧化损伤,是研究细胞氧化的常见模型。本实验以外源性 H_2O_2 为氧化剂复制大鼠主动脉 ECs 氧化损伤模型,探讨 PR 对 ECs 的保护作用与机制,为中药治疗心血管疾病提供理论依据。

本研究结果表明,PR 能减轻 H_2O_2 导致的细胞损伤,且这种保护作用可被 PI3K 阻断剂 LY294002 明显抑制,提示 PR 抗氧化应激损伤的作用可能与 PI3K 通路相关。自噬是机体维持内环境稳定、应答各种应激刺激的保护性机制[10,11],但过度自噬可引起细胞死亡。本研究的细胞自噬分析发现,PR 可以显著减少 H_2O_2 导致的细胞内自噬小体数量,使细胞荧光强度显著下降。

PI3K/AKT 通路是重要的抗凋亡通路,其中 AKT 作为 PI3K 信号转导途径中重要的下游靶激

酶,通过 AKT 磷酸化介导细胞增殖、抗凋亡等多种生物学效应。多项研究已证实[12-14],PR 能够抑制缺血/再灌注等因素所致的 ECs 凋亡,我们推测 PR 也能通过调控 PI3K/AKT 通路抑制 H_2O_2 诱导的 ECs 凋亡。本研究采用免疫蛋白印迹法检测 PI3K 和 AKT 蛋白的表达,结果表明 PR 可明显上调 H_2O_2 诱导的 PI3K 和 AKT 蛋白,且 LY294002 对 PR 诱导的 PI3K 和 AKT 表达上调有阻断作用。

综上所述,PR 可抑制细胞凋亡和细胞自噬小体过度激活,具有抗 H_2O_2 诱导 ECs 损伤的保护作用,其机制可能与促进 PI3K 和 AKT 蛋白表达有关。

【参考文献】

[1] Gómez-Marcos MA, Blázquez-Medela AM, Gamella-Pozuelo L, *et al*. Serum superoxide dismutase is associated with vascular structure and function in hypertensive and diabetic patients[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 9124676. DOI: 10.1155/2016/9124676.

[2] Nagpure BV, Bian JS. Interaction of hydrogen sulfide with nitric oxide in the cardiovascular system[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 6904327. DOI: 10.1155/2016/6904327.

[3] 何晓乐, 王晓明, 葛伟, 等. 姜黄素在内脂素诱导内皮细胞炎症损伤中的作用机制[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2017, 16(3): 203 - 207. DOI: 10.11916/j.issn.1671-5403.2017.03.046.
He XL, Wang XM, Ge W, *et al*. Role of curcumin in endothelial cell injury induced by visfatin[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2017, 16(3): 203 - 207. DOI: 10.11916/j.issn.1671-5403.2017.03.046.

[4] 黄雄峰, 汪建民. 葛根素的神经保护作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 224 - 228. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.201504022.
Huang XF, Wang JM. Research progress of neuroprotective mechanisms of puerarin[J]. Chin J Experiment Trad Med Form, 2015, 21(4): 224 - 228. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.201504022.

[5] Kim BR, Seo SH, Park MS, *et al*. sMEK1 inhibits endothelial cell proliferation by attenuating VEGFR-2-dependent-Akt/eNOS/HIF-1α signaling pathways[J]. Oncotarget, 2015, 6(31): 31830 - 31843. DOI: 10.18632/oncotarget.5570.

[6] Bekhite MM, Müller V, Tröger SH, *et al*. Involvement of phosphoinositide 3-kinase class IA (PI3K 110α) and NADPH oxidase 1 (NOX1) in regulation of vascular differentiation induced by vascular endothelial growth factor (VEGF) in mouse embryonic stem cells[J]. Cell Tissue Res, 364(1): 159 - 174. DOI: 10.1007/s00441-015-2303-8.

[7] Zeng Y, Liu XH, Tarbell J, *et al*. Sphingosine1-phosphate induced synthesis of glycocalyx on endothelial cells[J]. Exp Cell Res, 2015, 339(1): 90 - 95. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.08.013.

[8] Safaeian L, Javanmard SH, Mollanoori Y, *et al*. Cytoprotective and antioxidant effects of human lactoferrin against H_2O_2-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells[J]. Adv Biomed Res, 2015, 4: 188. DOI: 10.4103/2277-9175.164010.

[9] Panzhinskiy E, Ren J, Nair S. Pharmacological inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B: a promising strategy for the treatment of obesity and type 2 diabetes mellitus[J]. Curr Med Chem, 2013, 20(21): 2609 - 2625. DOI: 10.2174/09298673113-20210001.

[10] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. Cell, 2011, 147(4): 728 - 741. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.026.

[11] Li GH, Lin XL, Zhang H, *et al*. Ox-Lp(a) transiently induces HUVEC autophagy *via* an ROS-dependent PAPR-1-LKB1-AMPK-mTOR pathway[J]. Atherosclerosis, 2015, 243(1): 223 - 235. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.09.020.

[12] 黄华, 丁菁, 粟凤, 等. 葛根素预处理上调内皮型一氧化氮合酶的表达减轻人脐静脉内皮细胞缺氧/复氧损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(5): 857 - 862. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2016.05.015.
Huang H, Ding J, Su F, *et al*. Puerarin pretreatment protects human umbilical vein endothelial cells against hypoxia/reoxygenation injury *via* increasing protein expression of endothelial nitric oxide synthase[J]. Chin J Pathophysiol, 2016, 32(5): 857 - 862. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2016.05.015.

[13] Liu Y, Tang Q, Shao S, *et al*. Lyophilized powder of catalpol and puerarin protected cerebral vessels from ischemia by its anti-apoptosis on endothelial cells[J]. Inte J Biol Sci, 2017, 13(3): 327 - 338. DOI: 10.7150/ijbs.17751.

[14] Fortini F, Vieceli Dalla Sega F, Caliceti C, *et al*. Estrogen receptor β-dependent Notch1 activation protects vascular endothelium against tumor necrosis factor α (TNFα)-induced apoptosis[J]. J Biol Chem, 2017, 11. pii: jbc.M117.790121. DOI: 10.1074/jbc.M117.790121.

(编辑: 吕青远)