

## 齐墩果酸对损伤血管内皮细胞的保护作用及其机制探讨

魏海珍<sup>1</sup>, 张秀峰<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院药学部, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>日照市人民医院中药房, 山东 日照 276800)

**[摘要]** 目的:探讨齐墩果酸(oleanic acid, OA)对过氧化氢(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导人血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)损伤的保护作用及其机制。方法:培养 HUVECs, 分为正常组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+OA (0.25 μmol/L) 组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+OA (0.50 μmol/L) 组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+OA (1.00 μmol/L) 组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+维生素 C(1.50 mmol/L) 组。各组培养 24 h 后,通过 MTT 法检测细胞增殖能力,酶生化法测定上清液中的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和一氧化氮(nitric oxide, NO)含量,酶生化法测定细胞裂解液中的丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力,流式细胞仪测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)和细胞凋亡率。结果:OA 能够恢复 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的细胞活力,减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 LDH 释放,减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 MDA 生成,恢复 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 GSH-Px 和 SOD 活力,清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 ROS,减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞凋亡,提高 HUVECs 细胞 NO 的生成。结论:OA 对损伤血管内皮细胞有保护作用,这与 OA 能够启动 HUVECs 细胞内抗氧化防御机制,清除细胞内的 ROS,提高 HUVECs 细胞 NO 的生成,抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVECs 细胞凋亡有关。

**[关键词]** 齐墩果酸; 人脐静脉内皮细胞; 氧化损伤

**[中图分类号]** R329.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)11-1505-06

## Protective effects and mechanisms of oleanolic acid on damaged human umbilical vein endothelial cells

WEI Hai-zhen<sup>1</sup>, ZHANG Xiu-feng<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Pharmacy, People's Hospital of Rizhao City, Rizhao 276800, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the protective effects and mechanisms of oleanic acid on damaged human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). **Methods:** HUVECs were divided into control group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group (200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of 200 μmol/L combined with OA of 0.25 μmol/L treatment group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of 200 μmol/L combined with OA of 0.50 μmol/L treatment group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of 200 μmol/L combined with OA of 1.00 μmol/L treatment group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of 200 μmol/L combined with vitamin C of 1.50 mmol/L treatment group. Cell viability was determined by MTT method. Lactate dehydrogenase (LDH) and nitric oxide (NO) content in the supernatant were determined by biochemical method. The activity of malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) in the cell lysate was determined by biochemical method. Intracellular reactive oxygen species (ROS) and cell apoptosis were determined by flow cytometry. **Results:** OA restored the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured cell viability, reduced the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced LDH release, and reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced MDA formation, recovered H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured GSH-Px and SOD activity, removed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced ROS, reduced the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis, and enhanced the NO production in HUVECs. **Conclusion:** OA has a protective effect on HUVECs, which is related to initiating the antioxidant defense, getting rid of ROS, inhibiting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis, and improving NO production in HUVECs.

**[Key words]** oleanolic acid; human umbilical vein endothelial cells; hydrogen peroxide

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(11): 1505-1510]

血管内皮病变是心血管疾病发生的关键环节,氧化应激是引起血管内皮损伤的两大主要原因。齐墩果酸(oleanolic acid, OA)又名庆四素,为五环三

萜类化合物,以游离或结合成苷的形式广泛存在于白花蛇舌草、山楂、丁香、大枣、女贞子、枇杷叶、木及夏枯草等植物中<sup>[1]</sup>。齐墩果酸具有保肝、降糖、抗

HIV 和抗肿瘤等药理作用<sup>[2]</sup>。现在越来越多的研究开始探索 OA 抗炎抗氧化和保护血管内皮的作用。研究发现,OA 能明显提高更年期大鼠的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)活性,降低丙二醛(malondialdehyde,MDA)浓度<sup>[3]</sup>。研究表明齐墩果酸还具有降血糖<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>、抗高血压<sup>[6]</sup>等作用。但是,还没有直接证据证明齐墩果酸对损伤的内皮细胞具有保护作用。

本实验采用过氧化氢(hydrogen peroxide,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)作为外源性自由基生成系统,模拟人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)的脂质过氧化损伤和过程,建立离体培养的 HUVECs 氧化损伤模型,观察 OA 对氧化损伤的 HUVECs 的保护作用,并探讨其可能机制,为其用于心、脑血管疾病的治疗提供药理学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

齐墩果酸(中国药品生物制品检定所);ECM 培养基(美国 Sciencell 公司);DCFH-DA 荧光探针、Annexin V-FITC 凋亡试剂盒、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、DMSO、MTT、维生素 C(vitamin C,VC,美国 Sigma 公司);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)、一氧化氮(nitric oxide,NO)、MDA、GSH-Px、SOD 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);721 型可见紫外光栅分光光度计(上海精密科学有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞分组及处理

取生长良好的 HUVECs 细胞制成细胞悬液,接种于 96 孔、24 孔、6 孔细胞培养板或培养皿中,37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养 24 h。分为 6 组:①正常组;②H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组;③H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+OA (0.25 μmol/L)组;④ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+OA (0.50 μmol/L)组;⑤ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+OA (1.00 μmol/L)组;⑥ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+VC(1.50 mmol/L)组。正常组常规培养,不做任何处理;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组以含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(200 μmol/L)的 ECM 培养基孵育 12 h;其余 4 组用含 OA (0.25、0.50、1.00 μmol/L)或 VC(1.50 mmol/L)的 ECM 培养基预先孵育 24 h,去除上清后,再用含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(200 μmol/L)的 ECM 培养基孵育 12 h。

#### 1.2.2 MTT 法检测细胞活力

将生长良好的 HUVECs 细胞制备 5 × 10<sup>4</sup> 个/ml 的细胞悬液,按每孔 100 μl 接种于 96 孔板,置

37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 24 h。细胞分组及处理如上,每孔加入 MTT 溶液(终浓度 0.5 g/L),置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4 h 后,每孔加入 100 μl DMSO,静置 10 min 后振荡 60 s,30 min 内置酶标仪上检测光密度值 *D*(570 nm),并计算细胞活力。

#### 1.2.3 HUVECs 培养上清中 LDH 和 NO 含量测定

取生长良好的 HUVECs 细胞制成 5 × 10<sup>4</sup> 个/ml 的细胞悬液,2 ml/孔接种于 6 孔板,置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 24 h。细胞分组及处理如上,收集培养上清液,参照 LDH 和 NO 试剂盒说明书测定上清液中的 LDH 和 NO 含量。

#### 1.2.4 酶生化法测 MDA 含量和 GSH-Px、SOD 活力

取生长良好的 HUVECs 细胞制成 5 × 10<sup>4</sup> 个/ml 的细胞悬液,2 ml/孔接种于 6 孔板,置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 24 h。细胞分组及处理如上,去除培养上清液,PBS 洗涤细胞 2 次后,收集细胞,置于冰上,每管加入 100 μl 细胞裂解液,每隔 1 min 吹打 1 次,重复 1 次,13 000 r/min,4℃离心 15 min,收集上清液,用考马斯亮蓝法测定细胞内总蛋白量。按 MDA、GSH-Px、SOD 检测试剂盒说明书测定细胞 MDA 含量和 GSH-Px、SOD 活力。

#### 1.2.5 流式细胞仪测细胞内 ROS 含量

取生长良好的 HUVECs 细胞制成 5 × 10<sup>4</sup> 个/ml 的细胞悬液,2 ml/孔接种于 6 孔板,置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 中孵育 24 h。细胞分组及处理如上,按 1:1 000 稀释 DCFH-DA 探针,0.5 ml/孔,孵育 15 min,PBS 洗 3 次。0.25%胰蛋白酶消化细胞,收集细胞于 1.5 ml 离心管中,2 000 r/min 离心 10 min,倾尽上清。200 μl PBS 重悬细胞,上流式细胞仪分析。

#### 1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

取生长良好的 HUVECs 细胞制成 5 × 10<sup>4</sup> 个/ml 的细胞悬液,2 ml/孔接种于 6 孔板,置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 中孵育 24 h。细胞分组及处理如上,收集各组细胞,弃去培养液,用预冷的 PBS 洗涤 2 次。加入 100 μl Binding Buffer 和 Annexin V-FITC(20 μg/ml)10 μl,室温避光 30 min,再加入 PI (50 μg/ml) 5 μl,避光反应 5 min 后,加入 400 μl Binding Buffer,立即进行流式细胞术定量检测,同时以不加 Annexin V-FITC 及 PI 的空白管、单加 Annexin V-FITC 管和单加 PI 管作为阴性对照。

### 1.3 统计学方法

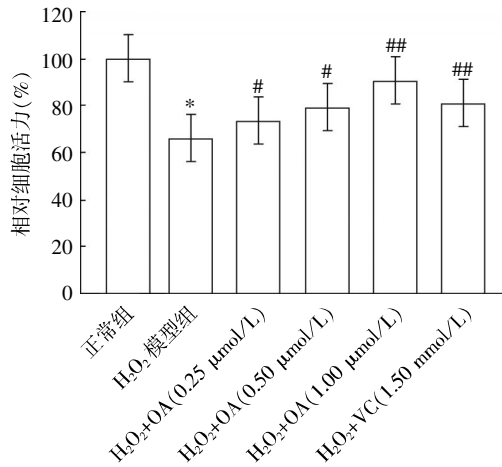
采用 SPSS13.0 统计软件包进行分析,所测值以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析,*q* 检验行组间两两比较,以 *P* < 0.05 表示差异有统计

学意义。

## 2 结果

### 2.1 齐墩果酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 细胞生存率的影响

如图 1 所示, HUVECs 细胞经 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 12 h 后, 细胞活力与正常组相比明显下降, 具有统计学意义 ( $n = 6, P < 0.01$ )。而 OA 对细胞具有保护作用, 能显著抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对细胞的氧化损伤。0.25、0.50、1.00 μmol/L OA 预先处理 24 h, 细胞活力恢复分别为正常对照组的 (72.00 ± 4.49)%、(76.71 ± 6.60)%、(89.20 ± 4.77)%, 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组相比均有统计学意义。



与正常组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  ( $n = 6$ )。

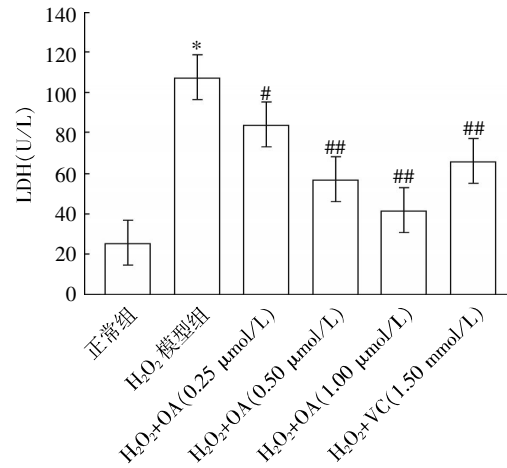
图 1 齐墩果酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 细胞生存率的影响  
Figure 1 Effect of OA on cell viability in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured HUVECs

### 2.2 齐墩果酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 细胞 LDH 释放率的影响

LDH 能催化乳酸生成丙酮酸, 丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯腙, 在碱性溶液中呈棕红色, 通过比色测定反应产物, 间接求出 LDH 活力。如图 2 所示, 与正常组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组 HUVECs 细胞 LDH 释放率显著增高 ( $n = 6, P < 0.01$ )。与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组相比, OA 各组细胞 LDH 释放率均减少: 0.25、0.50、1.00 μmol/L OA 预处理 24 h, LDH 释放率较 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组减少 20.95% ( $P < 0.05$ )、46.37% ( $P < 0.01$ ) 和 60.61% ( $P < 0.01$ )。

### 2.3 齐墩果酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 HUVECs 细胞 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活力的影响

如图 3A 所示, 与正常组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组细胞



与正常组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  ( $n = 6$ )。

图 2 齐墩果酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 HUVECs 细胞 LDH 释放率的影响  
Figure 2 Effect of OA on LDH release in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured HUVECs

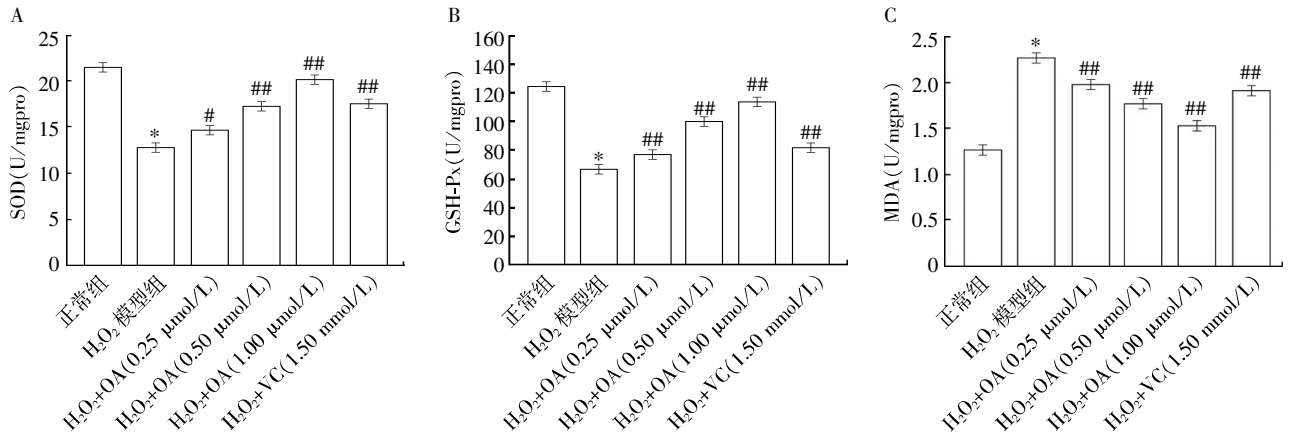
内 SOD 活性显著降低 ( $P < 0.01$ )。与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组相比, 0.25、0.50、1.00 μmol/L OA 预处理均可抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致 HUVECs 细胞的脂质过氧化损伤, 表现为细胞内 SOD 活性明显提高, 分别为 (13.54 ± 0.62) U/mgpro ( $P < 0.05$ )、(16.21 ± 0.79) U/mgpro ( $P < 0.01$ )、(19.13 ± 1.27) U/mgpro ( $P < 0.01$ )。OA 也升高了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 细胞内的 GSH-Px 含量 (图 3B), 降低了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 细胞内的 MDA 含量 (图 3C)。

### 2.4 齐墩果酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 细胞内 ROS 荧光强度的影响

细胞内 ROS 增加是细胞氧化应激状态的主要标志, 经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤后细胞内的 ROS 持续升高。如图 4 所示, HUVECs 细胞经 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 12 h 后细胞内 ROS 荧光强度比正常组增加 (134.82 ± 6.24)% ( $P < 0.01$ ), 说明细胞处于氧化应激状态。与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组相比, 0.25、0.50、1.00 μmol/L OA 预处理组细胞内 ROS 分别降低 23.80%、47.25% 和 53.42% ( $P$  均  $< 0.01$ )。由此可见, OA 具有强大的清除细胞内 ROS 的能力。

### 2.5 齐墩果酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 细胞凋亡率的影响

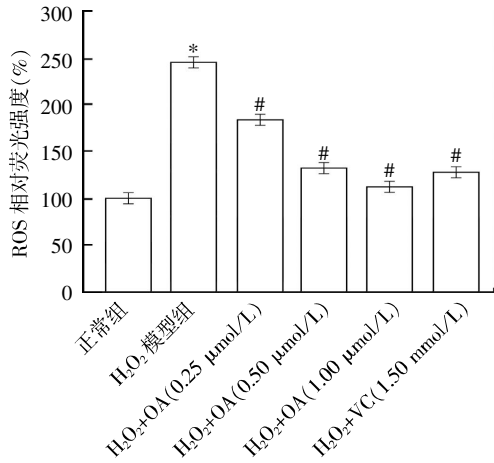
OA 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 细胞凋亡率的影响如图 5 所示。WinMDI 软件分析各组细胞, 计算凋亡率。实验结果表明: 正常组细胞的凋亡率 (9.05 ± 1.91)%; 与正常组比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组细胞的凋亡率明显升高, 凋亡率为 (36.04 ± 1.94)%。表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对



A: SOD 含量测定; B: GSH-Px 含量测定; C: MDA 含量测定。与正常组比较, \* $P < 0.01$ , 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  ( $n = 6$ )。

图 3 齐墩果酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 细胞中 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活力的影响

Figure 3 Effect of OA on the production of MDA, SOD and GSH-Px in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured HUVECs



与正常组比较, \* $P < 0.01$ , 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组比较, # $P < 0.01$  ( $n = 6$ )。

图 4 齐墩果酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 HUVECs 细胞内 ROS 荧光强度的影响

Figure 4 Effect of OA on the production of intracellular ROS in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured HUVECs

HUVECs 细胞有明显的凋亡诱导作用。与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组比较 0.25、0.50、1.00 μmol/L OA 可明显抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞凋亡, 细胞凋亡率分别降低至 (26.15 ± 1.22)%, (21.20 ± 2.02)% 和 (15.30 ± 0.93)% ( $P$  均  $< 0.01$ )。

### 2.6 齐墩果酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 细胞产生 NO 的影响

如图 6 所示, 与正常组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组 HUVECs 细胞培养上清液中 NO 含量无明显变化。与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组相比, 0.25、0.50、1.00 μmol/L OA 预处理组细胞 NO 生成量均明显增高, 分别为 (14.39 ± 0.67)、(16.58 ± 0.59) 和 (18.25 ± 0.71) U/L ( $P$  均  $< 0.01$ )。

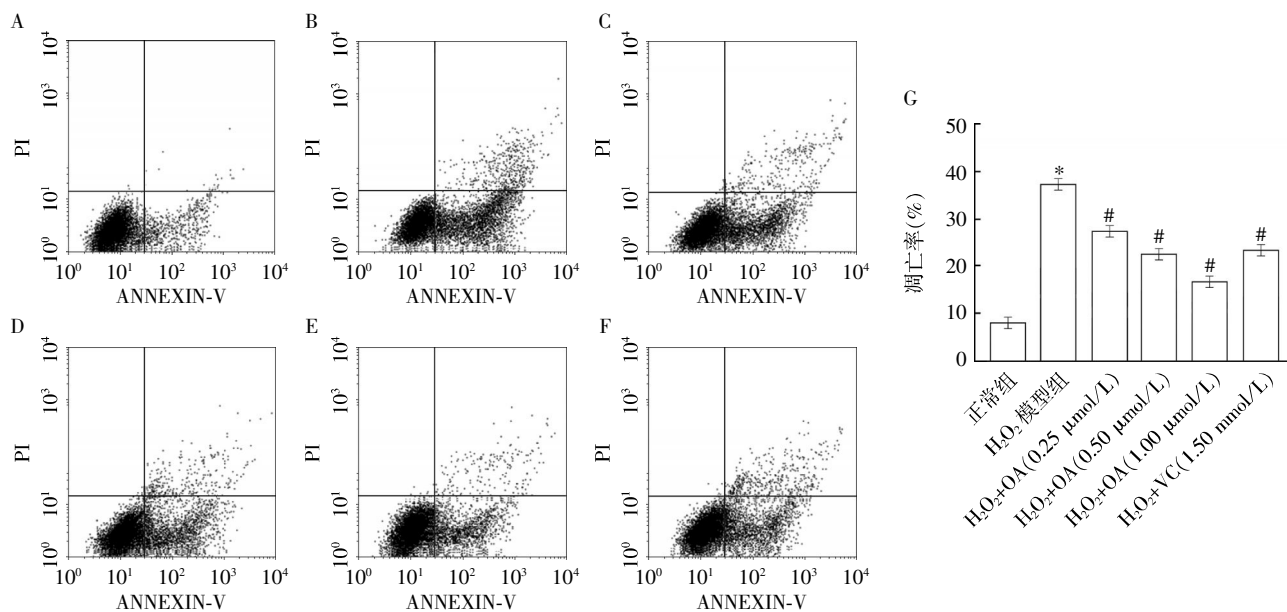
### 3 讨论

血管内皮病变是心血管疾病发生的关键环节。内皮功能障碍可能是某些原发疾病如动脉粥样硬化、高血压的结果, 但同时又可能是促使这些疾病病理状况增强或恶化的原因<sup>[7]</sup>。

引起内皮细胞损伤的因素很多, 如氧化应激、炎症反应、机械损伤、黏附分子、高同型半胱氨酸血症、感染等, 其中氧化应激是引起血管内皮功能障碍的重要因素<sup>[8]</sup>。氧化应激是氧化-抗氧化能力的失衡, 即是由于氧化剂的过剩和(或)抗氧化剂的缺失导致的。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是主要的 ROS 之一, 是重要的自由基形成源。外源性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 极易透过细胞膜进入细胞, 在体内可以产生自由基。本实验发现 200 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与 HUVECs 孵育 12 h 可显著增加 HUVECs 细胞膜的渗透性, 破坏抗氧化屏障, 引起细胞凋亡。而 OA 可以明显抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的这些作用, 提示 OA 的保护作用可能是通过抗氧化作用, 多环节抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞损伤。

细胞活力的高低可以反映细胞的代谢与增殖能力<sup>[9]</sup>。本研究首先检测 OA 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 细胞活力的保护作用。实验结果显示, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤细胞, 破坏了线粒体膜, 细胞活力下降, 而受 OA 保护的细胞 MTT 值明显增高, 证明 OA 对 HUVECs 有保护作用(图 1)。

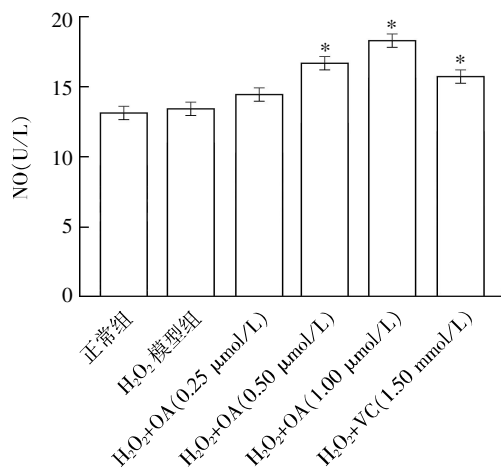
LDH 是一种糖酵解酶, 广泛存在于人体各组织器官中。正常血管内皮细胞很少释放 LDH。当细胞受损时, LDH 即从胞浆中释放出来, 因此 LDH 释放率是细胞受损程度的敏感指标之一<sup>[9]</sup>。实验结果显示, 与正常组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组 LDH 释放率显著增



A: 正常组; B: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组; C: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+OA (0.25 μmol/L) 组; D: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+OA (0.50 μmol/L) 组; E: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+OA (1.00 μmol/L) 组; F: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+VC (1.50 mmol/L) 组; G: OA 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 细胞凋亡率的影响。与正常组比较, \*P < 0.01 (n = 6), 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较, #P < 0.01。

图 5 齐墩果酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 HUVECs 细胞凋亡率的影响

Figure 5 Effects of OA against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced apoptosis in cultured HUVECs



与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组比较, \*P < 0.01 (n = 6)。

图 6 齐墩果酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 HUVECs 细胞产生 NO 的影响

Figure 6 Effect of OA on NO release in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured HUVECs

高, 而 OA 可减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致细胞的氧化损伤, 表现为 LDH 释放率不同程度的下降, 且呈一定的量效关系。细胞活力及 LDH 释放率的实验结果表明 OA 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 具有保护作用。

为探讨 OA 保护 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HUVECs 的作用机制, 本研究首先观察了 OA 的抗氧化作用。在正常机体内, 存在着抗氧化防御系统, 如 SOD、CAT、GSH-Px 等, 可清除自由基, 防止机体氧化损伤。但心脑血管疾病发生时, 自由基大量堆积。自由基对机体最明显的损害是脂质过氧化及其分解产物 MDA 对细胞的损伤<sup>[10]</sup>。本实验结果证实 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化可致 HUVECs

内 MDA 含量增高, 启动细胞膜脂质过氧化反应。而经 OA 处理的细胞 MDA 含量减少, 从而减轻细胞膜的脂质过氧化程度。

SOD 是机体抗氧化防御机制的重要成分, SOD 活力的高低反映了细胞清除氧自由基的能力<sup>[10]</sup>。实验结果显示, 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 即可引起 HUVECs 内 SOD 活性显著降低。而 OA 预处理的细胞内 SOD 活性较 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组均有一定程度的升高, 且呈剂量依赖关系。提示 OA 具有抗氧化性, 可对抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 SOD 活性的抑制作用, 从而提高细胞清除氧自由基的能力。

GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶, 使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物, 同时促进 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的分解, 从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害<sup>[10-11]</sup>。实验结果显示, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可致 HUVECs 内 GSH-Px 含量明显降低, 而 OA 预处理组细胞的 GSH-Px 含量显著提高, 说明提高 GSH-Px 含量是 OA 抗氧化的机制之一。

采用荧光探针 DCFH-DA 检测 ROS 生成情况。细胞内的 ROS 可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内 ROS 的水平。实验结果表明, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的氧化损伤可导致 HUVECs 内的 ROS 上升至正常水平的 244.82%, 而 OA 预处理可明显抑制细胞内 ROS 的合成。

在观察 OA 抗氧化作用的基础上, 我们进一步

研究 OA 是否能够对抗  $H_2O_2$  引起的细胞凋亡。流式细胞仪分析结果显示,  $H_2O_2$  处理体外培养的 HUVECs 12 h 后, 细胞凋亡率明显增高, 而 OA 预处理可减低 HUVECs 的凋亡率, 并呈剂量依赖关系。证明 OA 可抑制  $H_2O_2$  诱导的 HUVECs 细胞凋亡, 具有保护血管内皮细胞作用。

内皮细胞合成的 NO 是一种内源性抗氧化剂<sup>[12]</sup>, 能抑制多种凋亡刺激因素引起的细胞凋亡<sup>[13]</sup>。NO 的主要生理功能包括舒张血管、降低血压、抑制血小板、白细胞等多种血液成分的黏附与聚集、维持血管内皮完整性、抑制血管平滑肌细胞增殖、调节细胞凋亡等<sup>[14]</sup>。与  $H_2O_2$  模型组相比, OA 预处理可明显提高 HUVECs 中 NO 的含量。

综上所述, OA 能够保护  $H_2O_2$  损伤的 HUVECs, 这与 OA 能够启动 HUVECs 内抗氧化防御机制, 清除细胞内的 ROS, 抑制  $H_2O_2$  诱导的细胞凋亡, 提高细胞内 NO 的生成有关。

#### [参考文献]

- [1] 王鹏龙, 程压涛, 汪林, 等. 齐墩果酸和熊去氧胆酸衍生物生物合成及抗血管生成活性研究[J]. 首都医科大学学报, 2012, 33(4): 494-497
- [2] 张明发, 沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸保肝药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学, 2012, 9(1): 13-19
- [3] 娄艳, 陈志良, 王春霞. 齐墩果酸对更年期大鼠作用的实验研究[J]. 中药材, 2005, 25(7): 58-60
- [4] Ali MS, Jahangir M, Hussan SS, et al. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives [J]. Phytochemistry, 2002, 60(3): 295-299
- [5] Chen L, Shang J, Wang ZF, et al. Synthesis and biological evaluation of nitrate-oleanolic acid hydrides as inhibitors of HepG2 cell apoptosis [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 45(12): 1516-1522
- [6] Somova LO, Nadar A, Rammanan P, et al. Cardiovascular, antihyperlipidemic and effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension [J]. Phylomedicine, 2003, 10(2): 115
- [7] 张晋, 王晓良. 内皮源性血管活性因子的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2000, 16(1): 11-15
- [8] 房文通. 前列腺素 E1 对损伤血管内皮细胞的保护作用及其机制探讨 [D]. 济南: 山东大学, 2010
- [9] 高培国, 强辉, 凌鸣. 葛根素对过氧化氢诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 33(2): 245-249
- [10] Fang WT, Li HJ, Zhou LS. Protective effect of prostaglandin E1 on human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxide [J]. 2010, 31(4): 485-492
- [11] Fang WT, Li HJ, Zhou LS, et al. Protective effect of prostaglandin E1 on TNF-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88(5): 576-583
- [12] Cannon RO 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium [J]. Clin Chem, 1998, 44(9): 1809-1819
- [13] Dimmeler S, Zeiher AM. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor [J]. Cell Death Differ, 1999, 6(10): 964-968
- [14] Stagliano NE, Zhao W, Prado R, et al. The effect of nitric oxide synthase inhibition on acute platelet accumulation and hemodynamic depression in a rat model of thromboembolic stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17(11): 1182-1190

[收稿日期] 2012-09-04