

• 基础实验研究论著 •

## 黄芪总黄酮对尿毒症患者血清诱导的内皮细胞凋亡的影响\*

苏筠霞, 李建华, 刘天喜, 纪元春, 李侃, 吴蓉, 郭晓超  
(兰州大学第一医院肾病科, 甘肃兰州 730000)

**摘要:**目的 探讨黄芪总黄酮(TFA)对尿毒症患者血清诱导的内皮细胞凋亡的影响。方法 收集 22 例健康志愿者和 25 例规律血液透析的尿毒症患者血清。以人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)为研究对象,设立对照组(细胞同步化后加入健康志愿者血清)和尿毒症组(细胞同步化后加入尿毒症患者血清)。细胞同步化前 6 h,在尿毒症组的一部分细胞中加入 0.5、1.0、2.0 mg/mL TFA 预先进行干预,分别得到低剂量组、中剂量组、高剂量组细胞。细胞培养 24 h 后,于显微镜下观察细胞形态;MTT 法检测细胞增殖活力;黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性;硝酸还原酶比色法测定一氧化氮(NO)水平;彗星实验法检测细胞 DNA 损伤;TUNEL 法检测细胞凋亡。结果 与对照组比较,尿毒症组细胞增殖活力、SOD 活性、NO 水平均降低( $P < 0.01$ ),DNA 拖尾率、细胞凋亡指数(AI)均升高( $P < 0.01$ );与尿毒症组细胞比较,不同剂量干预的各组细胞增殖活力均增加( $P < 0.05$ ),NO 水平均升高( $P < 0.01$ );与尿毒症组比较,中剂量、高剂量组 SOD 活性增加( $P < 0.05$ ),DNA 损伤拖尾率降低( $P < 0.05$ )。结论 TFA 可减少尿毒症患者血清诱导的内皮细胞凋亡,其可能机制与抗氧化应激有关。

**关键词:**黄芪总黄酮; 尿毒症; 氧化应激; 超氧化物歧化酶; 一氧化氮; 凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.18.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)18-2427-03

The effects of total flavonoids of astragalus on the apoptosis of vascular endothelial cells induced by serum of uremia patient\*

Su Junxia, Li Jianhua, Liu Tianxi, Ji Yuanchun, Li Kan, Wu Rong, Guo Xiaochao

(Department of Nephropathy, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of total flavonoids of astragalus(TFA) on the apoptosis of endothelial cells induced by serum of uremia patient. **Methods** The serum of 22 healthy volunteers and 25 uremia patients receiving regularly hemodialysis were enrolled in the study. HUVECs were used as research objects, which were divided into control group(adding serum of healthy people when cell synchronized) and uremia group (adding serum of uremia patient when cell synchronized). Low dose, moderate dose and high dose group were prepared by adding 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL TFA respectively 6 h before cell synchronization. After 24 hours' culture since the serum were added, the morphological change of endothelial cells were observed by microscopy, proliferation activities were tested by using MTT, SOD activities were tested by using xanthine oxidase method, NO levels were measured by using nitrate reductase colorimetric method, DNA damage was detected by using comet assay, the morphological change of apoptosis was observed by using TUNEL method. **Results** Compared with the control group, the proliferation activity, SOD activity, NO levels were lower in uremia group ( $P < 0.01$ ), DNA tailing rate, apoptosis index(AI) significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with cells of uremia group, cell proliferation activity of all the TFA intervention groups increased ( $P < 0.05$ ), NO levels also increased ( $P < 0.01$ ). Compared with uremia group, moderate and high dose group's SOD activity increased ( $P < 0.05$ ), DNA damage tailing rate decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Total flavonoids of astragalus reduces apoptosis of HUVECs induced by serum of uremia patient, the possible mechanism is associated with the decrease of oxidative stress.

**Key words:** total flavonoids of astragalus; uremia; oxidative stress; superoxide dismutase; nitrogen monoxidum; apoptosis

心血管疾病是尿毒症患者常见的并发症之一,也是尿毒症患者死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。在维持性血液透析患者中,40%~60%患者的死亡原因是心血管疾病,为普通人群的 10~20 倍<sup>[2]</sup>。尿毒症患者发生心血管并发症的机制不仅与心脏负荷增加有关,还与血管内皮细胞损伤密切相关。研究发现,尿毒症患者体内高水平的氧化应激对于血管内皮细胞损伤的发生、发展具有重要的促进作用<sup>[3]</sup>。黄芪总黄酮(TFA)是从中药黄芪提取的一类天然黄酮类化合物,具有一定的抗氧化活性。本实验在体外建立了尿毒症患者内环境模型,观察了 TFA 对尿毒症患者血清诱导的内皮细胞凋亡的影响,为尿毒症患者心血管并发症的防治提供了新思路。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2012 年 10 月至 2013 年 10 月在本院血液净化中心规律血液透析的尿毒症患者 25 例,其中男 10 例,女 15 例,年龄(66.83±7.97)岁,包括糖尿病肾病 12 例,高血压肾损害 6 例,慢性肾炎 5 例,多囊肾 1 例,梗阻性肾病 1 例。每周透析 3 次(12 h),透析时间 8~70 个月,平均 26 个月。受试期间,患者病情稳定,无心力衰竭、恶性肿瘤、肝脏疾患、家族性高脂血症,1 个月内未服用抗凝药物、降脂药物及抗氧化剂类药物。选取同期于本院体检中心进行体检并确定为健康的志愿者 22 例,其中男 8 例,女 14 例,年龄(63.58±6.35)岁。符合条件入选人员均签署知情同意书,两组在年龄、性别方面

\* 基金项目:甘肃省自然科学基金计划项目(1208RJZA226)。

作者简介:苏筠霞,女,副主任医师,主要从事基础与临床肾脏病。

无差异。

**1.2 仪器与试剂** 人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)由北京 301 医院吴楠博士友情赠送;DMEM 细胞培养基购于 Gibco 公司;MTT、琼脂糖购于美国 Sigma 公司;一氧化氮(NO)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所;TFA 购于上海圻明生物科技有限公司;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购于北京中杉金桥公司。

**1.3 方法**

**1.3.1 血清的采集和制备** 抽取每位尿毒症患者透析开始前的空腹静脉血 5 mL 以及志愿者的空腹静脉血 5 mL,以 3 000 r/min 离心 10 min 分离血清,56 ℃、30 min 灭活补体后于-80 ℃保存备用。

**1.3.2 细胞培养和实验分组** HUVECs 置于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,贴壁生长至融合状态,用 0.25%胰蛋白酶消化,进行传代培养,选取 3~5 代细胞,细胞贴壁融合达 70%~80%时,更换为无血清的 DMEM 培养液培养过夜同步化,同步化结束前 6 h,在设为尿毒症组的部分细胞中分别加入低、中、高剂量的 TFA(分别为 0.5、1.0、2.0 mg/mL),得到低剂量、中剂量和高剂量组。细胞同步化后,对照组培养基中加入 20%的健康志愿者血清,在尿毒症组培养基中加入 20%的尿毒症患者血清。

**1.3.3 观察 HUVECs 形态** 各组细胞加入相应的人血清后于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h,显微镜下观察内皮细胞形态。

**1.3.4 MTT 法检测内皮细胞增殖活力** HUVECs 以 1×10<sup>5</sup>/mL 接种于 96 孔板,按上述分组和干预条件培养 24 h,每组设 5 个复孔。于实验终止前 4 h 加入 MTT,实验终止时加入二甲基亚砜(DMSO),充分震荡后,在 490 nm 处使用酶标仪测定吸光度(A)值,只加试验所需试剂,不加细胞及干预条件设为空白调零,增殖活力=(A<sub>实验组</sub> - A<sub>空白</sub>)/(A<sub>对照组</sub> - A<sub>空白</sub>)×100%。

**1.3.5 SOD 活性及 NO 水平的检测** 吸取细胞培养上清液 3 000 r/min,离心 10 min。采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,硝酸还原酶法检测 NO 水平,具体操作按试剂盒说明书进行。

**1.3.6 彗星实验法检测细胞 DNA 损伤** 采用双层铺胶法制片、裂解、电泳、染色、镜检、每组随机取 5 个高倍视野(200×)

观察细胞并计算拖尾率。

**1.3.7 TUNEL 法检测细胞凋亡** 将 HUVECs 以 1×10<sup>5</sup>/mL 接种于 96 孔板,按上述分组和干预条件培养 24 h 后,固定,封闭内源性过氧化物酶,加入 TUNEL 反应混合液,显色。光学显微镜下观察,细胞核染色成棕褐色者为阳性。每张切片随机计数 5 个高倍视野(200×)中的凋亡细胞核数,计算细胞凋亡指数(AI),AI=凋亡细胞核数/总细胞核数×100%。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析,检测数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,样本均数的多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,显著性检验水准  $\alpha=0.05$ , $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 TFA 对内皮细胞形态学的影响** 对照组 HUVECs 贴壁生长致密,呈铺路石样,细胞质丰富。尿毒症组 HUVECs 数量明显减少,可见大量细胞漂浮,细胞间连接消失,与周围的细胞脱离、核固缩、边缘化,胞质浓缩。低、中、高剂量 TFA 干预各组,细胞数量较尿毒症组增多,漂浮细胞减少,可见部分细胞核固缩,细胞质浓缩,上述变化呈剂量依赖性好转,见图 1。

**2.2 TFA 对内皮细胞增殖活力的影响** 培养 24 h 后,尿毒症组 HUVECs 增殖活力较对照组明显下降( $P<0.01$ )。各剂量干预组细胞增殖活力均比尿毒症组高( $P<0.05$ )。从增殖活力、DNA 损伤、AI、SOD 活性几项指标来看,中剂量、高剂量组的干预效果优于低剂量组( $P<0.01$ ),见表 1。

**2.3 TFA 对 SOD 活性、NO 水平的影响** 尿毒症组与对照组比较,SOD 活性、NO 水平均降低( $P<0.01$ )。中剂量组、高剂量组分别与尿毒症组比较,SOD 活性均升高( $P<0.05$ )。高剂量组比中剂量组 SOD 活性高( $P<0.05$ )。各剂量干预组与尿毒症组比较,NO 水平均明显升高( $P<0.01$ ),效果以高剂量组最为明显,见表 1。

**2.4 TFA 对内皮细胞 DNA 损伤的影响** 对照组绝大部分细胞呈圆形,DNA 基本无损伤。尿毒症组细胞出现明显的 DNA 损伤,表现为细胞直径增大,圆形头部后有拖尾现象,形似彗星,拖尾率较对照组明显增加( $P<0.01$ );各剂量干预 DNA 损伤拖尾率均比尿毒症组低( $P<0.05$ ),中、高剂量组的干预效果优于低剂量组( $P<0.01$ ),但中、高剂量组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 1、图 2。

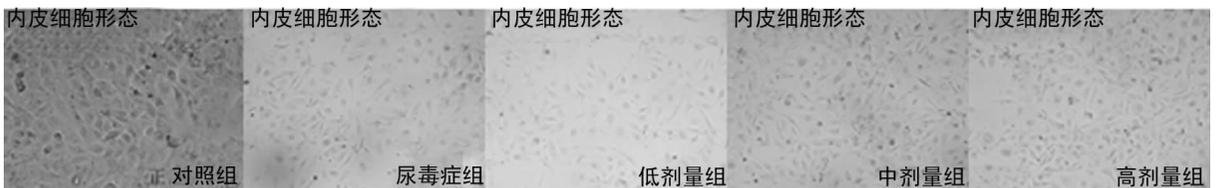


图 1 显微镜观察各组 HUVECs 形态学变化(200×)

表 1 各组内皮细胞增殖活力、DNA 损伤、AI、SOD 活性、NO 水平的变化

分组	增殖活力(%)	SOD(U/mL)	NO(μmol/L)	拖尾率(%)	AI(%)
对照组	100.00±0.00	8.53±0.99	173.86±10.13	6.00±3.45	7.92±2.13
尿毒症组	53.23±6.84 <sup>a</sup>	4.65±0.55 <sup>a</sup>	80.13±12.67 <sup>a</sup>	37.00±12.29 <sup>a</sup>	44.89±6.60 <sup>a</sup>
低剂量组	62.79±7.37 <sup>c</sup>	5.31±0.63	100.60±8.24 <sup>b</sup>	22.80±5.45 <sup>c</sup>	32.16±7.87 <sup>b</sup>
中剂量组	76.06±6.21 <sup>cd</sup>	6.26±0.60 <sup>ce</sup>	110.21±10.61 <sup>b</sup>	13.40±3.85 <sup>cd</sup>	20.18±5.04 <sup>be</sup>
高剂量组	82.55±7.50 <sup>cd</sup>	7.83±0.29 <sup>cef</sup>	140.51±11.43 <sup>bdf</sup>	9.60±3.13 <sup>cd</sup>	11.49±3.71 <sup>bef</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>: $P<0.01$ ;<sup>c</sup>: $P<0.05$ ,与尿毒症组比较;<sup>d</sup>: $P<0.01$ ;<sup>e</sup>: $P<0.05$ ,与低剂量组比较;<sup>f</sup>: $P<0.05$ ,与中剂量组比较。



图 2 各组内皮细胞 DNA 损伤情况 (200×)

**2.5 TFA 对内皮细胞凋亡的影响** 凋亡细胞细胞质浓缩,细胞体积缩小,细胞核固缩呈均一的致密物。对照组未见明显凋亡细胞。尿毒症组凋亡细胞呈弥散性分布,TFA 干预的各组的凋亡细胞呈散在分布。计数发现,尿毒症组 AI 高于对照组 ( $P < 0.01$ ),TFA 干预后的各组 AI 明显低于尿毒症组 ( $P < 0.01$ ),并随 TFA 浓度的增高逐渐降低 ( $P < 0.05$ ),呈剂量依赖性,见表 1。

### 3 讨论

心血管并发症是尿毒症患者死亡的主要原因,内皮细胞损伤是心血管疾病的重要发病机制。内皮细胞位于血液与血管组织之间,它不仅能完成血液和组织液的代谢交换,并且能合成和分泌多种生物活性物质,以保证血管正常的收缩和舒张。尿毒症患者体内代谢废物排泄障碍,尿毒症毒素大量蓄积,血管内皮细胞长期暴露于尿毒症内环境。尿毒症毒素可能是诱发内皮细胞损伤的重要因素。目前,国内外的大量研究均已证实,同型半胱氨酸、晚期糖基化终末产物、瘦素等单一的某种尿毒症毒素具有一定的细胞毒性作用<sup>[4-6]</sup>。然而,尿毒症患者内环境相当复杂,仅对具体某一尿毒症毒素进行研究并不能完全说明尿毒症患者内环境对内皮细胞的影响。因此,本实验采用了在体外培养的 HUVECs 培养基中添加尿毒症患者血清的研究方法。

TFA 是中药黄芪的有效提取成分,有显著的抗氧化应激作用。体外研究证实 TFA 可通过改善能量代谢,对心肌缺血再灌注损伤起保护作用,提高细胞 SOD 活性,具有抗氧化和清除自由基的作用<sup>[7]</sup>。尿毒症患者尿毒症毒素蓄积可刺激机体产生大量活性氧(ROS),ROS 诱导细胞功能障碍,导致 DNA 断裂损伤<sup>[8]</sup>。内皮细胞损伤与体内氧自由基的产生密切相关。内皮细胞在不同的毒素因子作用下均可产生大量 ROS,进一步触发氧化应激,正反馈加剧内皮细胞损伤<sup>[9]</sup>。SOD 可清除人体内过多的有害氧自由基,降低脂质过氧化物的水平,测定 SOD 的动态变化可间接反映自由基清除和产生的情况,是反映氧化应激水平的常用指标。祝卿等<sup>[10]</sup>研究证实,氧化应激反应参与移植肾的缺血再灌注损伤过程,SOD 可间接反映移植术后的氧化应激水平。本研究发现,TFA 可提高内皮细胞增殖活力,减少细胞凋亡,提高 SOD 活性,使得内皮细胞免受氧化应激的损伤,达到保护内皮细胞的作用。NO 是重要的血管舒张因子,在舒张血管及调节血压等方面起着十分重要的作用。赵雷等<sup>[11]</sup>研究证实 NO 合酶抑制剂,即非对称性二甲基精氨酸,可使 NO 水平明显降低,促进内皮细胞的凋亡。本实验发现,TFA 不仅能通过减轻氧化应激水平从而减少细胞凋亡,同时可以使 NO 水平升高,改善内皮细胞的舒张功能,起到保护血管内皮细胞的作用。

DNA 损伤的程度是评价细胞凋亡的重要指标。TFA 中主要含有 6 种单体化合物,其中 4 种为异黄酮类化合物。既往研究证实,TFA 可穿透细胞膜,作用于 DNA 碱基的链接关键点,通过聚合酶反应,形成防护膜,以此形成 DNA 链的防护作

用,有效地阻止高糖诱导的牛视网膜血管周细胞的 DNA 碱基断裂<sup>[12]</sup>。本研究证实,TFA 通过抑制氧化应激水平,减轻 DNA 损伤,发挥保护内皮细胞的作用。

综上所述,在尿毒症患者血清诱导 HUVECs 凋亡的过程中,氧化应激起着非常重要的作用。TFA 能够减少内皮细胞凋亡,可能与抑制氧化应激,升高 NO 水平,改善内皮细胞舒张功能有关。这可能是其发挥内皮细胞保护作用,降低尿毒症患者心血管并发症发生率的重要机制之一,其具体的信号通路需要进一步研究。

### 参考文献

- [1] Briet M, Burns KD. Chronic kidney disease and vascular remodeling: molecular mechanisms and clinical implications[J]. Clin Sci (Lond), 2012, 123(7):399-416.
- [2] 彭道有. 慢性肾脏病的心血管并发症危险因素及其防治进展[J]. 医学综述, 2010, 16(13):2035-2038.
- [3] Jourde-Chiche N, Dou L, Cerini C, et al. Vascular incompetence in dialysis patients: protein-bound uremic toxins and endothelial dysfunction[J]. Semin Dial, 2011, 24(3):327-337.
- [4] Nishizawa Y, Koyama H, Inaba M. AGEs and cardiovascular diseases in patients with end-stage renal diseases[J]. J Ren Nutr, 2012, 22(1):128-133.
- [5] Cohen G, Raupachova J, Ilic D, et al. Effect of leptin on polymorphonuclear leucocyte functions in healthy subjects and haemodialysis patients[J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(7):2271-2281.
- [6] Perna AF, Luciano MG, Pulzella P, et al. Is homocysteine toxic in uremia? [J]. J Ren Nutr, 2008, 18(1):12-17.
- [7] 全欣. 黄芪主要活性成分的药理作用[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5):1246-1249.
- [8] Satoh M, Takemura Y, Hamada H, et al. EGCG induces human mesothelioma cell death by inducing reactive oxygen species and autophagy[J]. Cancer Cell Int, 2013, 13(1):19.
- [9] Han YH, Kim SZ, Kim SH, et al. Reactive oxygen species and glutathione level changes by a proteasome inhibitor, MG132, partially affect calf pulmonary arterial endothelial cell death [J]. Drug Chem Toxicol, 2010, 33(4):403-409.
- [10] 祝卿, 胡正杨, 金建国, 等. 肾移植术后尿 α1-微球蛋白、超氧化物歧化酶和丙二醛的检测及意义[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(10):1674-1676.
- [11] 赵雷, 张吉凤, 赵佳怡, 等. ADMA 对人脐静脉内皮细胞黏附功能影响的体外研究[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(2):185-187.
- [12] 江红, 匡洪宇. 黄芪总黄酮对高糖诱导的牛视网膜血管周细胞氧化应激与 DNA 损伤的影响[J]. 中国中医急症, 2010, 19(8):1353-1354.