

过氧化氢诱导大鼠主动脉内皮细胞氧化损伤模型的建立*

黄晶晶, 施晓峰, 陈宇驰, 夏威夷, 金波, 丁志山[△]

(浙江中医药大学生命科学院, 浙江 杭州 310053)

摘要: 目的 采用过氧化氢(H_2O_2)诱导大鼠主动脉内皮细胞(SVAREC)氧化损伤,建立 SVAREC 氧化损伤模型。方法 体外培养 SVAREC 细胞,绘制细胞生长曲线,用不同浓度的 H_2O_2 刺激细胞,并在不同时间点用 MTS 法测定细胞存活率,以确定 SVAREC 氧化损伤模型条件。倒置显微镜下观察细胞形态学变化,微孔酶标法测乳酸脱氢酶(LDH)活力,流式细胞术检测细胞凋亡率,WB 检测细胞中半胱氨酸蛋白酶(Caspase-3)的表达情况。结果 与空白对照组细胞比较,当 H_2O_2 浓度为 100 μM ,作用时间为 2 h 时,造成细胞损伤,其细胞凋亡率和 Caspase-3 蛋白表达量明显高于空白对照组。结论 该实验条件下 H_2O_2 浓度为 100 $\mu mol/L$,作用时间为 2 h 是模型的最佳复制条件。

关键词: 内皮细胞;氧化应激;过氧化氢;细胞损伤;凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2015)03-0005-05

血管内皮细胞直接覆盖于血管内膜表面,是细胞与血液物质交换的第一屏障,具有多种自分泌和旁分泌功能,对维持正常血液循环有重要作用。血管内皮细胞的增殖和分化需要保持动态平衡,一旦失衡,血管内皮细胞受损,将导致多种血管性疾病的发生^[1-2]。

氧化应激是指细胞暴露于高浓度氧分子或氧的化学衍生物而引起的细胞损伤^[3],是导致内皮细胞损伤的主要病理因素。过氧化氢及其代谢产生的活性氧,极易透过细胞膜,与细胞内铁离子形成高活性自由基。氧自由基可诱发细胞膜上钙离子通道大量开放,导致细胞凋亡^[4]。内皮细胞凋亡可增加血管壁对动脉粥样硬化形成的易感性,并进一步增加血栓的形成^[5],但内皮细胞氧化损伤的作用机制尚未完全明了。

过氧化氢来源方便、价格低廉、损伤效果明显,可以模拟氧化应激损伤^[6]。通过过氧化氢诱导内皮细胞损伤,从而建立特异性高、模拟性好、可控性强的氧化应激模型,对于内皮细胞损伤机制的研究,抗氧化功能食品和药物的筛选有重要意义^[7-8]。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

大鼠主动脉内皮细胞(SV40-transformed aortic

rat endothelial cell,SVAREC)由杭州市中医院杨汝春教授惠赠,RPMI.1640 培养液(吉诺生物医药技术有限公司,批号:15010606);胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号:141104);胰蛋白酶(吉诺生物医药技术有限公司,批号:14112101);30%过氧化氢(国药集团化学试剂有限公司,批号:20140310);MTS(promega,批号:0000119322);LDH 试剂盒(南京建成生物研究所,批号:20141212);FITC Annexin V 凋亡试剂盒(BD Pharmingen,批号:4293719), β -actin(Immuno Way,批号:B9901)、Caspase-3(Immuno Way,批号:B5601),羊抗兔 IgG-HRP(联科生物,批号:3104033);CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司),荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司),酶标仪(美国 Dynatech 公司),高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司),流式分析仪(德国 Merck Millipore 公司)。

1.2 SVAREC 的培养

大鼠主动脉内皮细胞(SV40-transformed aortic rat endothelial cell,SVAREC)用含 10%胎牛血清(FBS)的 RPMI.1640 培养液,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,于倒置显微镜下观察,根据细胞生长情况,给予换液,待细胞融合至 70%~80%,用 0.25%胰酶+0.02%EDTA 消化,按 1:3 或 1:4 传代。

* 基金项目: 中国博士后科学基金(2014M550335)

收稿日期: 2015-04-13

作者简介: 黄晶晶(1989-),女,浙江余姚人,在读硕士研究生,从事天然药用资源的研究与评价。

[△]通信作者: 丁志山, E-mail: zjtcmdzs@163.com

1.3 SVAREC 生长曲线的绘制

将生长良好的 SVAREC 细胞消化,制成 5×10^4 mL、 10×10^4 mL 和 15×10^4 mL 的细胞悬液,接种于 96-well,每隔 48h 后倒掉旧培养液,更换新培养液。分时间段加 MTS,测吸光度值,建立 SVAREC 生长曲线。

1.4 氧化损伤模型的建立

取对数生长期 SVAREC 细胞,制备成 15×10^4 mL 的细胞悬液,按每孔 100 μ L 接种于 96 孔板,于上述条件下培养 24 h 后更换成无血清的培养液。实验分正常对照组和模型复制组,正常对照组给予 0 μ mol/L 的 H_2O_2 刺激,模型组分别用 50, 100, 150, 200, 400 μ mol/L 的 H_2O_2 刺激细胞 4 h,用 100 μ mol/L H_2O_2 刺激细胞 2, 4, 6, 8 h。每孔加入 MTS 20 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。全自动酶标仪于 490 nm 波长处测定吸光度值(OD 值),每个实验组 6 个复孔。计算细胞存活率,建立最佳损伤模型条件。细胞存活率(%)=(模型组 OD₄₉₀-空白组 OD₄₉₀)/(对照组 OD₄₉₀-空白组 OD₄₉₀) $\times$ 100%

1.5 细胞形态观察及 LDH 释放量测定

取对数生长期的细胞,制成 15×10^4 mL 的细胞悬液,2.5 mL/孔接种于 6 孔板,置 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 孵育 24 h。细胞分对照组和模型组,于倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。收集各组上清液,按照试剂盒说明,测定上清液中 LDH 含量。

1.6 细胞凋亡率的测定

细胞分组及处理同上,按 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书上的方法检测细胞凋亡。胰酶消化各组细胞,用预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次,1 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 5 min 去除细胞碎片。用 1 $\times$ 结合缓冲液重悬细胞,调节细胞密度为 1.0×10^6 mL。取细胞悬液 100 μ L 于 5 mL 流式管中,每管加入 5 μ L FITC Annexin V 和 5 μ L PI,混匀后于室温避光孵育 15 min,1 h 内用流式细胞仪测定各组细胞凋亡率。

1.7 Western blot 检测 Caspase-3 蛋白表达量

细胞分组及处理同上,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 μ L 细胞裂解液,吹打混匀,冰上裂解 30 min 后,12000 r $\cdot$ min⁻¹, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,收集上清液,测细胞内总蛋白含量。用 5%浓缩胶和 10%分离胶进行 SDS-PAGE 电泳,每孔的蛋白上样量为 30 μ g,60 V 恒压电泳 30 min 后转为 80V 恒压电泳 90 min。用

80 V 恒压湿转 2 h 至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,用含 5%脱脂奶粉的 TBS-T 室温封闭 2 h。封闭结束后分别与抗 Caspase-3、 β -actin 的一抗在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜,加二抗,室温孵育 2 h。洗膜,ECL 显色。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。统计学方法采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著性意义

2 结果

2.1 细胞生长曲线的绘制

通过 MTS 法测定 168 h 内细胞吸光度值,绘制 SVAREC 生长曲线,结果如图 1 所示。由 SVAREC 吸光度可知,72 h 内各密度下的 SVAREC 均持续性呈对数生长。考虑细胞数量对损伤的影响,结合实验时间,根据 SVAREC 生长曲线,采用细胞密度为 15×10^4 mL,培养 24 h 换液后的 SVAREC 进行后续试验。

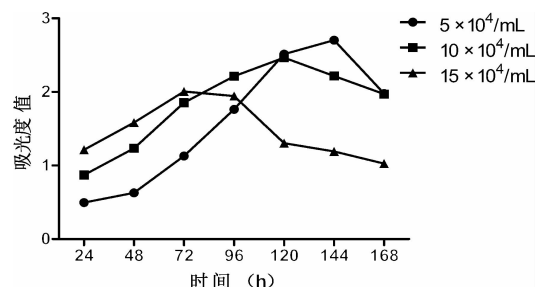


图 1 SVAREC 生长曲线

2.2 MTS 法建立氧化损伤模型

MTS 分析表明,SVAREC 细胞存活率与 H_2O_2 浓度、损伤时间密切相关。与正常对照组相比,随着 H_2O_2 浓度的升高,损伤时间的增加,细胞存活率逐渐降低(见表 1-2)。即模型复制组细胞存活率与 H_2O_2 浓度、损伤时间呈负相关。在 H_2O_2 浓度为 100 μ mol/L,损伤时间为 2 h 时,细胞存活率达 $(51.96 \pm 2.73)\%$ ($P < 0.01$),是 SVAREC 细胞损伤的最佳条件。

表 1 不同浓度 H_2O_2 对 SVAREC 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

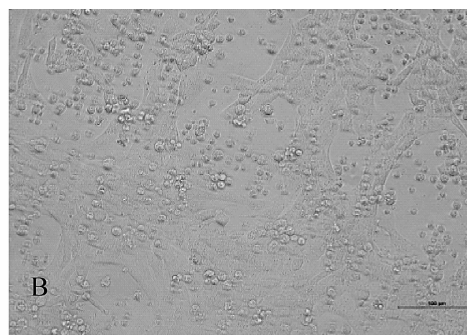
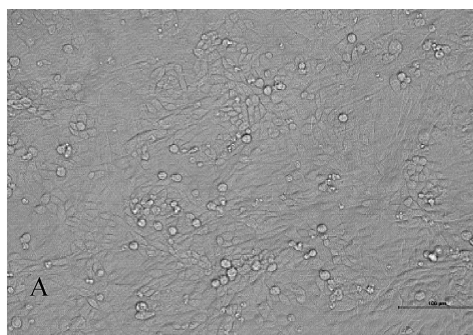
H_2O_2 /(μ mol/L)	细胞存活率 /%	H_2O_2 /(μ mol/L)	细胞存活率 /%
0	100	150	$21.59 \pm 1.35^{**}$
50	$75.02 \pm 3.63^{**}$	200	$21.74 \pm 1.65^{**}$
100	$40.77 \pm 4.91^{**}$	400	$15.15 \pm 0.92^{**}$

注:与正常对照组相比, $^{**}P < 0.01$

表2 不同作用时间对SVAREC细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

时间/h	细胞存活率/%	Time/h	细胞存活率/%
0	100	6	39.03 $\pm$ 5.31**
2	51.96 $\pm$ 2.73**	8	44.63 $\pm$ 3.14**
4	49.2 $\pm$ 1.58**		

注:与正常对照组相比,** $P<0.01$



A:正常SVAREC细胞($\times 200$),B:100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理2h后的SVAREC细胞($\times 200$)

图2 大鼠主动脉细胞光镜形态观察

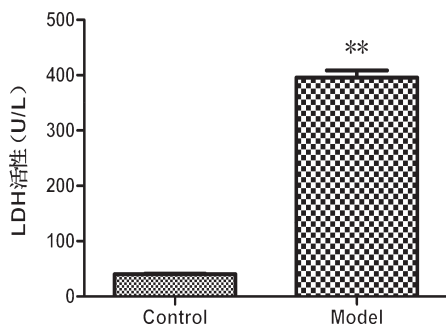
2.4 LDH含量测定

100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理SVAREC细胞2h使培养上清液中LDH含量明显增多(见表3,图3),与正常对照组比较,差异显著($P<0.01$)。

表3 培养上清液中LDH活性($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	LDH活性(U/L)
对照组	40.15 $\pm$ 1.67
模型组	395.60 $\pm$ 22.13**

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$



注:与正常对照组比较,** $P<0.01$

图3 培养上清液中LDH活性($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 细胞凋亡率及Caspase-3蛋白表达

从表4可见,与正常对照组比较,加入100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用2h后,SVAREC细胞凋亡率可达

2.3 细胞形态学变化

在细胞培养过程中,未加 H_2O_2 处理的正常对照组细胞呈单层扁平状生长,梭形,细胞明亮,胞核圆或卵圆形,内有核仁,呈典型“铺路石”样排列。经过100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理2h的模型组可见单层内皮细胞明显肿胀,排列稀疏杂乱,彼此连接减少,聚集成团,可见部分细胞脱落,漂浮,细胞密度明显减少,见图2。

(28.05 $\pm$ 2.58)%,与正常对照组(12.89 $\pm$ 0.99)%相比,差异显著($P<0.01$),其Caspase-3蛋白表达量为(1.382 $\pm$ 0.011),明显高于正常对照组($P<0.01$)。

表4 过氧化氢对SVAREC细胞凋亡率及Caspase-3蛋白相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

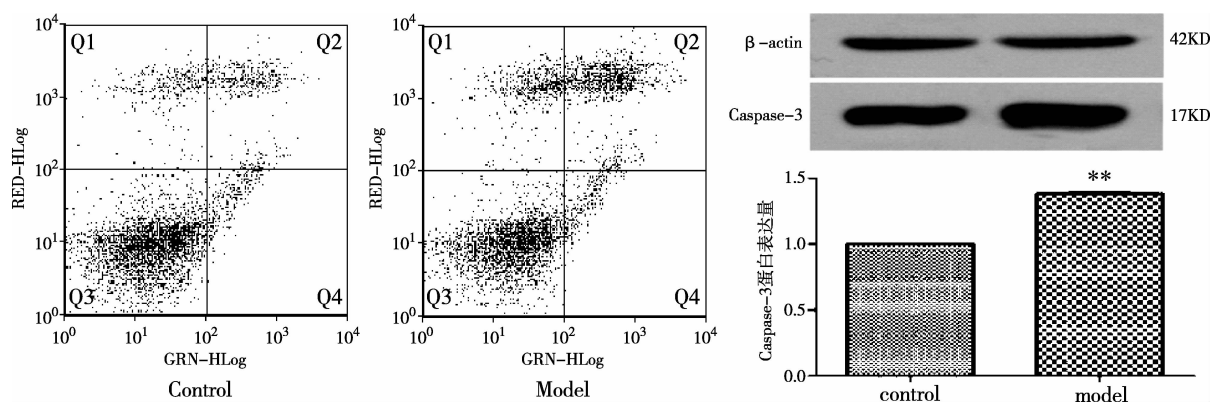
分组	凋亡率/%	Caspase-3 相对表达量
对照组	12.89 $\pm$ 0.99	1
模型组	28.05 $\pm$ 2.58**	1.38 $\pm$ 0.01**

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$

3 讨论

近年来,内皮细胞损伤学说和炎症学说逐渐被大家公认^[9]。在正常情况下,内皮细胞的增殖率和凋亡率都很低,其凋亡与增殖之间的动态平衡是维持内皮细胞数量稳定和血管功能正常的保障^[10]。平衡一旦打破,动脉粥样硬化和血栓等多种血管性疾病发生率增加。 H_2O_2 是活性氧的一种, H_2O_2 及其生成的自由基可以透过细胞膜,与蛋白质、核酸、不饱和脂肪酸等多种生物大分子发生脂质过氧化反应。细胞发生氧化损伤后,将进一步导致细胞衰老和凋亡^[11]。因此,我们用 H_2O_2 来模拟氧化应激损伤,诱发大鼠主动脉内皮细胞损伤并凋亡。

在正常生理条件下,乳酸脱氢酶(LDH)存在于



注:与空白正常对照组比较,** $P < 0.01$

图 4 过氧化氢对 SVAREC 细胞凋亡率及 Caspase-3 蛋白相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

机体细胞内,是参与糖酵解的一种催化酶。如果离体培养的细胞受到 H_2O_2 的刺激,发生氧化损伤,LDH 会从细胞内释放到培养液中。因此,通过测定细胞培养液中 LDH 的含量,可以较客观地评价细胞的受损程度^[12]。本实验结果表明,受损内皮细胞的 LDH 漏出率明显高于空白对照组,证明损伤造模成功。 H_2O_2 可以诱导内皮细胞发生凋亡,其凋亡与激活半胱氨酸蛋白酶 Caspase-3 有关^[1]。本实验结果再次证明, H_2O_2 可导致 Caspase-3 活性明显高于空白对照组,提示 H_2O_2 可通过线粒体细胞色素 C 介导的凋亡通路,启动 Caspase 级联反应,导致细胞凋亡。

本实验的目的是构建大鼠主动脉内皮细胞氧化应激模型,实验证明细胞损伤程度与过氧化氢浓度和损伤时间呈正相关。在过氧化氢浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$,作用时间为 2 h 时,能够成功构建大鼠主动脉内皮细胞发生氧化损伤,部分发生凋亡的模型。该模型复制成功后,可为抗氧化甚至是抗动脉粥样硬化食品和药物的筛选、开发奠定基础。

参考文献:

- [1] Moriue T, Igarashi J, Yoneda K, et al. Sphingosine 1-phosphate attenuates H_2O_2 -induced apoptosis in endothelial cells[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2008, 368(4): 852-857.
- [2] Guan-hua D U. Mechanism of endothelial cell injury and the drugs protection of endothelial cell against injury [J].

Basic Medical Sciences and Clinics, 2004(3):4.

- [3] 韩飞,周孟良. 过氧化氢诱导 HepG2 细胞产生氧化应激细胞模型的建立[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 55-57.
- [4] 刁波,唐瑛,王晓昆,等. 不同浓度 H_2O_2 体外诱导大鼠海马细胞氧化损伤观察[J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(2): 121-124.
- [5] 程嘉艺,滕丹,李伟,等. 沙棘总黄酮对血管内皮细胞保护作用及机制研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(3): 355-358.
- [6] 马桂鑫,赵文文,陈修平. 血管内皮细胞损伤模型及中药保护作用研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(2): 276-283.
- [7] 徐清萍,钟桂芳,孟君. 抗氧化剂抗氧化方法研究进展[J]. 食品工程, 2007, 2(6): 23-25.
- [8] 郑延松,李源,张珊红,等. 用低浓度过氧化氢建立心肌细胞氧化损伤模型 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(20): 1849-1851.
- [9] 朱文赫,张巍,李妍,等. 鹿茸多肽对过氧化氢所致血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(5): 697-701.
- [10] 何煜舟,丁美萍. 大豆异黄酮对氧化损伤的血管内皮细胞的保护作用[J]. 浙江中医杂志, 2006, 41(4): 228-229.
- [11] 周智辉,戴亚蕾. 血管内皮细胞衰老的研究进展[J]. 同济大学学报(医学版), 2014(2): 28.
- [12] 白莉,方伟蓉,孔毅,等. 蛇毒三肽 pENW 对 H_2O_2 诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(2): 43-46.

(编辑:杨阳)

Establishment of Oxidative Injury Model of SVAREC in Vitro

HUANG Jingjing, SHI Xiaofeng, CHEN Yuchi, XIA Weibiao, JIN Bo, DING Zhishan[△]
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish the oxidative damage model of SVAREC. **Methods** SVAREC were cultured in vitro and the growth curves were draw. Different concentration of H₂O₂ were stimulated the cells, and the cell viability were measured by the method of MTS at different time. Under the condition of this model, cellular morphology were observed by inverted microscope, the activity of LDH were measured by microplate reader, the apoptosis rate of cells also were detected by flow cytometry, and Caspase-3 expression were tested by Western blotting. **Results** Compared with control, cells were injured at the concentration of H₂O₂ is 100 μmol/L for 2 h, which, the apoptosis rate and protein expression of Caspase-3 were significantly higher. **Conclusion** The best replication model of this experimental condition is exposure the SVAREC at the 100 μmol/L concentration of H₂O₂ for 2 h.

KEY WORDS: endothelial cells; oxidative stress; H₂O₂; cellular damage; apoptosis

(原文见第1页)

To Study the Effect of Yiqi-huoxue Medicine to the Lever of Adponectin Basing on the Emotion-heart Disease Rats Complex Model

WAN Ting, GUO Shuwen[△], WU Jiani, ZHANG Lu, WU Jiangong,
CHEN Xi, LIU Wenchen, SU Zhaoduo
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

ABSTRACT: **Objective** The purpose of this article is to through the animal experiment, study the effect of Yiqi-huoxue medicine on the emotional stress of myocardial ischemia model rats, adponectin content in heart and brain, to provide a theoretical ideas and basis for Yiqi-huoxue medicine in prevention and treatment of cardiovascular diseases. **Methods** Adopt the method of intraperitoneal injection of epinephrine (5 mg/kg·d), and chronic unpredictability emotional stimuli to make complexrats under emotional stress state. Animals are divided into five group: Blank group, ISO model group, Complex model group, Chinese medicine group, Western medicine groups. Using ultrasonic electrocardiogram, monitoring method to record the heart function, using the RT-PCR method for determinate the level of adponectin in heart and brain. According to these indexes of every group in the experimental process, respectively to observe contrast the changes of different groups after 14 and 28 days, treatment. **Results** After 32 days, the ejection fraction (EF) of complex model group, and fractional shortening (FS) were lower than those of blank group, the difference was statistically significant ($P<0.01$); adponectin contents in complex model group and ISO model group were higher than that in blank group, the difference was statistically significant ($P<0.01$ or $P<0.05$); adponectin contents in traditional Chinese medicine group and Western medicine group were lower than the complex model group, the difference was statistically significant ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusion** The reason why Yiqi-huoxue medicine can increase cardiac ejection fraction of rats in complex model group may be according to its effect on adponectin.

KEY WORDS: Adponectin; Chronic stress; cardiovascular disease; Yiqi-huoxue medicine; emotional stimuli