

齐墩果酸通过 PPAR γ 调控人脐静脉内皮细胞抗氧化损伤作用

朱宝华¹ 谷春景¹ 刘凤莲¹ 刘璐² 任艳红³

【摘要】 目的 探讨齐墩果酸(OA)对 ox-LDL 诱导的内皮细胞氧化损伤的作用及其机制。方法 实验分组: 对照组, ox-LDL 模型组, ox-LDL+OA (10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$) 组, ox-LDL+OA (10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$)+GW9662, GW9662 单独处理组。采用 MTT 法检测 HUVECs 细胞活力; 酶联免疫吸附试验法检测 HUVECs 细胞 SOD 活力、GSH 活力以及 MDA 含量; 活性氧检测试剂盒检测 HUVECs 细胞 ROS 水平; Western blot 检测 HUVECs 细胞 PPAR γ 蛋白表达水平, 所有指标的检测都进行生物学重复。采用方差分析和两样本 t 检验进行统计学分析。结果 MTT 结果显示, ox-LDL 组的细胞存活率为(49.17 \pm 0.62)%, OA (10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$) 预处理后存活率分别为(68.51 \pm 1.16)%、(82.64 \pm 0.73)%、(92.37 \pm 0.13)%, 可减弱 ox-LDL 对 HUVECs 细胞存活率的降低且呈剂量依赖性关系, 差异具有统计学意义($t = 24.35, 26.18, 35.17$; $P = 0.034, 0.027, 0.008$)。本研究还发现, OA 对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞 SOD、GSH 活性的降低和 MDA、ROS 水平的增加具有抑制作用且呈剂量依赖关系。ox-LDL 组的细胞 SOD、GSH、ROS 和 MDA 水平分别为(16.12 \pm 0.06) $\mu\text{mol/g}$ 、(132.16 \pm 2.11) $\mu\text{mol/g}$ 、(2.63 \pm 0.02) kU/g、(158.12 \pm 0.39)%, ox-LDL+OA (10 $\mu\text{mol/L}$) 组的细胞 SOD、GSH、ROS 和 MDA 水平分别为(10.60 \pm 0.14) $\mu\text{mol/g}$ 、(108.36 \pm 2.05) $\mu\text{mol/g}$ 、(2.41 \pm 0.21) kU/g、(136.18 \pm 1.24)%, ox-LDL+OA (20 $\mu\text{mol/L}$) 组的细胞 SOD、GSH、ROS 和 MDA 水平分别为(13.28 \pm 0.09) $\mu\text{mol/g}$ 、(129.58 \pm 0.09) $\mu\text{mol/g}$ 、(2.26 \pm 0.15) kU/g、(126.43 \pm 1.51)%, ox-LDL+OA (40 $\mu\text{mol/L}$) 组的细胞 SOD、GSH、ROS 和 MDA 水平分别为(14.86 \pm 0.16) $\mu\text{mol/g}$ 、(131.47 \pm 0.76) $\mu\text{mol/g}$ 、(2.14 \pm 0.08) kU/g、(112.39 \pm 1.07)% ($F = 26.38, 31.27, 56.82, 41.16$; $P = 0.005, 0.004, 0.002, 0.003$)。Western blot 结果显示, OA 有效促进 HUVECs 细胞 PPAR γ 蛋白水平提高。与 ox-LDL+OA (20 $\mu\text{mol/L}$) 组(65.37 \pm 0.15)% 比较, ox-LDL+OA (20 $\mu\text{mol/L}$)+GW9662 组的细胞活力为(52.89 \pm 0.16)%, 差异有统计学意义($t = 16.47, P = 0.035$)。进一步发现 ox-LDL+OA (10 $\mu\text{mol/L}$) 组 SOD、GSH、MDA、ROS 水平为(10.58 \pm 0.13) $\mu\text{mol/g}$ 、(102.46 \pm 0.06) $\mu\text{mol/g}$ 、(2.42 \pm 0.08) kU/g、(144.38 \pm 2.02)%, ox-LDL+OA (10 $\mu\text{mol/L}$)+GW9662 组的 SOD、GSH、MDA、ROS 水平分别为(8.42 \pm 0.05) $\mu\text{mol/g}$ 、(88.38 \pm 0.48) $\mu\text{mol/g}$ 、(2.83 \pm 0.01) kU/g、(154.41 \pm 1.04)%, 两组比较差异有统计学意义($t = 38.47, 39.25, 43.69, 41.27$; $P = 0.008, 0.008, 0.006, 0.006$); ox-LDL+OA (20 $\mu\text{mol/L}$) 组 SOD、GSH、MDA、ROS 水平(13.25 \pm 0.05) $\mu\text{mol/g}$ 、(122.59 \pm 0.33) $\mu\text{mol/g}$ 、(2.23 \pm 0.16) kU/g、(123.94 \pm 0.15)%, ox-LDL+OA (20 $\mu\text{mol/L}$)+GW9662 组的 SOD、GSH、MDA、RO 水平分别为(10.59 \pm 0.12) $\mu\text{mol/g}$ 、(106.42 \pm 0.15) $\mu\text{mol/g}$ 、(2.61 \pm 0.07) kU/g、(138.12 \pm 1.15)%, 两组比较差异有统计学意义($t = 46.08, 38.11, 49.35, 35.59$; $P = 0.005, 0.008, 0.004, 0.009$); ox-LDL+OA (40 $\mu\text{mol/L}$) 组 SOD、GSH、MDA、ROS 水平分别为(15.88 \pm 0.14) $\mu\text{mol/g}$ 、(140.26 \pm 1.05) $\mu\text{mol/g}$ 、(2.02 \pm 0.13) kU/g、(187.52 \pm 0.68)%, ox-LDL+OA (40 $\mu\text{mol/L}$)+GW9662 组的 SOD、GSH、MDA、RO 水平(13.65 \pm 0.03) $\mu\text{mol/g}$ 、(124.61 \pm 1.27) $\mu\text{mol/g}$ 、(2.49 \pm 0.04) kU/g、(126.51 \pm 0.73)%, 两组比较差异有统计学意义($t = 48.04, 38.62, 45.14, 50.13$; $P = 0.004, 0.008, 0.005, 0.002$)。此外, 本研究还发现, 抑制 PPAR γ 后, OA 抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞的氧化损伤仍存在剂量效应。结论 OA 可以通过 PPAR γ 抑制 ox-LDL 诱导 HUVECs 细胞氧化损伤。

【关键词】 齐墩果酸; ox-LDL; 氧化损伤; PPAR γ ; 人脐静脉内皮细胞

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2017.06.003

作者单位: 271100 莱芜市人民医院市中分院内科¹; 271100 莱芜市人民医院心内科², 药剂科³

通信作者: 刘璐, Email: ydfygl@126.com

Oleanolic acid inhibits oxidative damage of HUVECs via PPAR γ Zhu Baohua¹, Gu Chunjing¹, Liu Fenglian¹, Liu Lu², Ren Yanhong². ¹Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Laiwu City People's Hospital, Laiwu 271100, China; ²Department of Cardiology, ³Department of Pharmacy, Laiwu City People's Hospital, Laiwu 271100, China

Corresponding author: Liu Lu, Email: ydfygl@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of oleanolic acid (OA) on oxidative damage in human vascular endothelial cells (HUVECs) and its underlying mechanism. **Methods** The groups are as followings: the control group, ox-LDL alone group, ox-LDL+OA (10 μ mol/L, 20 μ mol/L, 40 μ mol/L) group, ox-LDL+OA (10 μ mol/L, 20 μ mol/L, 40 μ mol/L)+GW9662 group, and GW9662 alone group. The cell viability was measured using MTT assay. The levels of SOD, GSH as well as MDA were detected by enzyme linked immunosorbent assay (Elisa). The level of ROS was detected using reactive oxygen species detection kit. The expression level of PPAR γ was measured by Western blot. All indexed are performed biology-repeatedly. The statistical analysis was used with Analysis of Variance and Kruskal-Wallis *H* test. **Results** OA (10 μ mol/L, 20 μ mol/L, 40 μ mol/L) significantly attenuated the cell viability of HUVECs inhibited by ox-LDL (100 μ g/ml) in a dose-dependent manner and each cell viability is (68.51 \pm 1.16)%, (82.64 \pm 0.73)%, (92.37 \pm 0.13)% (t = 24.35, 26.18, 35.17; P = 0.034, 0.027, 0.008). OA reversed oxidative damage was induced by ox-LDL including decreases in the levels of SOD and GSH, and increases in the level of MDA and ROS in HUVECs. The levels of SOD, GSH, ROS and MDA in ox-LDL group are (16.12 \pm 0.06) μ mol/g, (132.16 \pm 2.11) μ mol/g, (2.63 \pm 0.02) kU/g, (158.12 \pm 0.39)%; the levels of SOD, GSH, ROS and MDA in ox-LDL and OA (10 μ mol/L) group are (13.28 \pm 0.09) μ mol/g, (129.58 \pm 0.09) μ mol/g, (2.26 \pm 0.15) kU/g, (126.43 \pm 1.51)% respectively; the levels of SOD, GSH, ROS and MDA in ox-LDL and OA (20 μ mol/L) group is (13.28 \pm 0.09) μ mol/g, (129.58 \pm 0.09) μ mol/g, (2.26 \pm 0.15) kU/g, (126.43 \pm 1.51)% respectively; the levels of SOD, GSH, ROS and MDA in ox-LDL and OA (40 μ mol/L) group are (14.86 \pm 0.16) μ mol/g, (131.47 \pm 0.76) μ mol/g, (2.14 \pm 0.08) kU/g, (112.39 \pm 1.07)% respectively (F = 26.38, 31.27, 56.82, 41.16; P = 0.005, 0.004, 0.002, 0.003). Western blot result showed that OA attenuated downregulation of PPAR γ protein induced by ox-LDL in HUVECs. Our result also showed that PPAR γ inhibitor GW9662 reversed the attenuation of OA on ox-LDL-caused inhibition of cell viability: the cell viability in ox-LDL+OA (20 μ mol/L)+GW9662 group (t = 16.47, P = 0.035). In addition, we found that PPAR γ inhibitor GW9662 reversed the improvement of OA on ox-LDL-caused oxidative damage: the levels of SOD, GSH, MDA and ROS in ox-LDL+OA (10 μ mol/L)+GW9662 group are (8.42 \pm 0.05) μ mol/g, (88.38 \pm 0.48) μ mol/g, (2.83 \pm 0.01) kU/g, (154.41 \pm 1.04)% (t = 38.47, 39.25, 43.69, 41.27; P = 0.008, 0.008, 0.006, 0.006) respectively; the levels of SOD, GSH, MDA and ROS in ox-LDL+OA (20 μ mol/L)+GW9662 group are (10.59 \pm 0.12) μ mol/g, (106.42 \pm 0.1) μ mol/g, (2.61 \pm 0.07) kU/g, (138.12 \pm 1.15)% (t = 46.08, 38.11, 49.35, 35.59, P = 0.005, 0.008, 0.004, 0.009) respectively; the levels of SOD, GSH, MDA and ROS in ox-LDL+OA (40 μ mol/L)+GW9662 group was (13.65 \pm 0.03) μ mol/g, (124.61 \pm 1.27) μ mol/g, (2.49 \pm 0.04) kU/g, (126.51 \pm 0.73)% (t = 48.04, 38.62, 45.14, 50.13; P = 0.004, 0.008, 0.005, 0.002) respectively. Furthermore, we also found that after inhibiting PPAR gamma, OA still dose dependently alleviated ox-LDL-caused oxidative damage of HUVECs cells. **Conclusion** OA inhibits oxidative damage induced by ox-LDL and PPAR γ plays a regulatory role in the protection of OA against ox-LDL-induced oxidative damage of HUVECs.

【Key words】 Oleanolic acid; Ox-LDL; Oxidative damage; PPAR γ ; Human umbilical vein endothelial cells

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种常见的心血管致死性疾病,成为所有心血管疾病中的主要危险因素。目前,AS被认为是一种与血管壁脂质沉积相关的,且由免疫介导的慢性炎症性疾病,它的发病机制极其复杂。低密度脂蛋白(low

density lipoprotein, LDL)是AS发生发展过程中的一个主要危险分子,其在AS中的主要表现形式是氧化LDL(oxidative-LDL, ox-LDL)。ox-LDL不仅可导致内皮细胞损伤,还可促进内皮细胞凋亡的发生,增强内皮通透性,也能够促使单核细胞向内皮细

胞发生迁移,加强其附着力,从而促使 AS 的发生发展^[1-2]。因此,阻止血管内皮细胞的病变对治疗 AS 具有重要的临床价值。

齐墩果酸(oleanolic acid, OA)是属于五环三萜类化合物,以游离或者成苷的形式存在,其在食物、药用植物等多种植物中广泛存在。研究表明,OA 具有抗氧化^[3]、抗炎^[4]以及抗 AS^[5]等多种生物学功能。本课题组已有的发现表明,OA 对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)氧化损伤具有保护作用^[6-7]。但是,OA 的这种抗内皮细胞氧化损伤作用机制尚未明确,需要进一步探讨和研究。

过氧化物酶体增殖激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR γ) 是一种配体依赖的核转录因子,属于核受体超家族成员。PPAR γ 在血管壁内皮细胞、血管平滑肌细胞、巨噬细胞和泡沫细胞都有较高水平的表达^[8]。在心血管系统中,PPAR γ 可通过抗炎作用,抑制血管平滑肌增殖迁移,保护血管内皮细胞,增加胆固醇的逆向转运等作用发挥抗 AS 效应^[9]。基于 PPAR γ 抗 AS 功能以及本小组的前期研究结果,认为 PPAR γ 在 OA 的抗内皮细胞氧化损伤中扮演重要角色,并初步探讨 PPAR γ 参与 OA 抗内皮细胞氧化损伤作用的分子机制。

材料与方法

一、试剂:齐墩果酸(OA, $\geq 99\%$) 购买于美国 Sigma 公司; DMEM 培养基以及胎牛血清购买于美国 Gibco 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购买于上海碧云天公司; MTT 购买于美国 Sigma 公司。SOD、GSH-Px、MDA 检测试剂盒购自武汉优尔生公司; ROS 试剂盒由上海碧云天公司提供; PPAR γ 抑制剂 GW9662 由美国 Cayman 公司提供; 抗 PPAR γ 单克隆抗体购自美国 CST 公司; 羊抗鼠抗体购自美国 Cell Signaling 公司。

二、实验方法

1. 实验分组: 对照组, ox-LDL 模型组, ox-LDL+OA (10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$) 组, ox-LDL+OA (10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$)+GW9662, GW9662 单独处理组。

2. 细胞培养: 将 HUVECs (购买于中国科学院上海细胞库) 按(密度)接种于培养瓶或者培养板中, 加入适量含有 10% 胎牛血清 DMEM 培养基培养细胞, 置于一定条件(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) 的培养箱中进

行培养。待细胞生长至 70%~80% 融合度, 用胰酶消化细胞, 并按 1:3~5 进行传代培养。

3. MTT 实验: 将处于对数生长期的 HUVECs (5×10^3 个/孔) 均匀接种到 96 孔板中, 放置于细胞培养箱中孵育。药物处理细胞结束后, 向每孔中加入 5 mg/ml 的 MTT (20 μl) 试剂, 置于培养箱中孵育 4 h, 去掉上清液, 加入 150 μl DMSO, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 30 min, 充分溶解结晶物, 在波长为 570 nm 的条件下, 用酶标仪检测每孔的吸光度 (A) 值。

4. 脂质过氧化物检测: HUVECs 的 SOD、GSH 以及 MDA 水平都是应用酶联免疫吸附试验法, 其主要区别是微孔板包被的单克隆抗体不同。具体操作步骤参考试剂盒说明书。所有标准品、样本加入微孔板后, 经孵育、洗涤、二抗孵育、洗涤、加入底物显色并终止, 在波长为 450 nm 的条件下, 用酶标仪测定样品 A 值, 并建立标准曲线, 计算出样品浓度。

细胞内 ROS 水平运用活性氧检测试剂盒, 主要利用 DCFH-DA 荧光探针的强度来反应细胞内 ROS 的浓度。详细的操作步骤参考试剂盒说明书, 最后, 用流式细胞仪检测。

5. Western blot 检测 PPAR γ 蛋白的表达水平: 药物处理细胞后, 提取细胞蛋白进行, 使用蛋白定量试剂盒测定各组蛋白浓度, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离细胞蛋白, 应用湿转法将蛋白转印至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶对 PVDF 膜进行封闭, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下过夜孵育一抗 (PPAR γ 、 β -actin), 抗体稀释比例均为 1:1 000。用 TBST 于摇床上洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min。室温孵育二抗 60 min。用 TBST 于摇床上洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min。加入显色剂, 用成像仪显影。

三、统计学分析方法

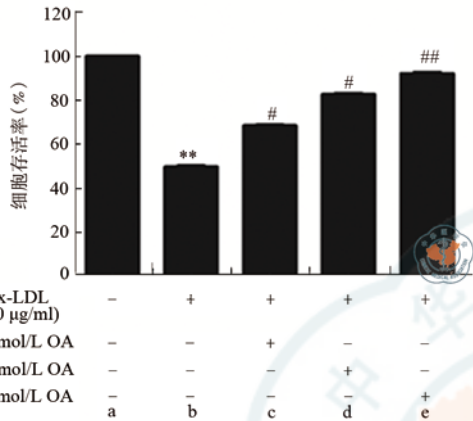
使用 SPSS 20 统计软件对数据进行统计分析, 细胞存活率、SOD、GSH、MDA、ROS 相对荧光强度以及 PPAR γ 蛋白水平实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较使用单因素方差分析, 组与组之间的比较采用两样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、OA 提高 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞存活率结果

MTT 检测结果显示, ox-LDL 组的细胞存活率为 (49.17 \pm 0.62)%, OA (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 预处

理可显著减弱 ox-LDL 对 HUVECs 细胞存活率的降低,其存活率分别为(68.51±1.16) %、(82.64±0.73) %、(92.37±0.13) %,差异具有统计学意义($t = 24.35, 26.18, 35.17, P = 0.034, 0.027, 0.008$);且呈剂量依赖性关系,以上结果提示 OA 可拮抗 ox-LDL 诱导 HUVECs 细胞的细胞损伤(图 1)。



注: a 为对照组; b 为 ox-LDL 组; c 为 ox-LDL+ OA (10 μmol/L) 组; d 为 ox-LDL + OA (20 μmol/L); e 为 ox-LDL + OA (40 μmol/L); 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 ox-LDL 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 1 OA 对 ox-LDL 抑制 HUVECs 细胞活力的影响

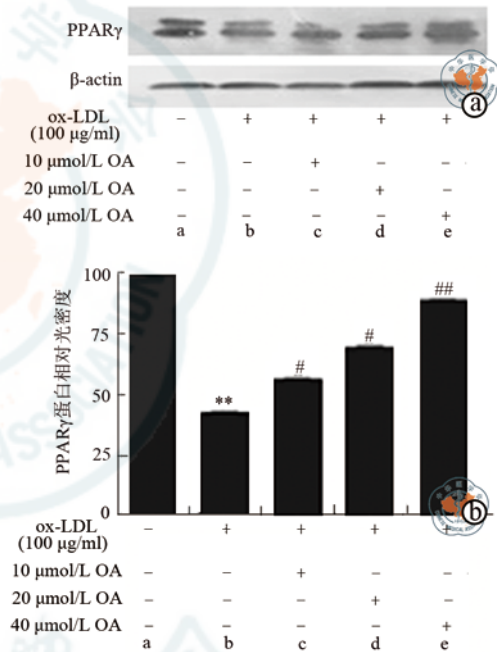
二、OA 逆转 ox-LDL 诱导 HUVECs 的氧化损伤结果

本研究进一步探讨了 OA 对 ox-LDL 作用下 HUVECs 细胞的抗氧化物质 SOD、GSH 活性和氧化损伤相关指标 ROS、MDA 水平的影响。结果发现, ox-LDL 组的细胞 SOD、GSH、ROS 和 MDA 水平, 与 ox-LDL+OA (10 μmol/L) 组、ox-LDL+OA (20 μmol/L) 组、ox-LDL+OA (40 μmol/L) 组的细胞 SOD、GSH、ROS 和 MDA 水平比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。同时, 本研究还发现, OA 对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞 SOD、GSH 活性的降低和 MDA、ROS 水平的增加抑制作用呈剂量依赖关系。以上结果表明 OA 可抑制 ox-LDL 诱导

HUVECs 细胞 SOD, GSH 含量的降低以及 ROS 和 MDA 水平的增加(表 1)。

三、OA 减弱 ox-LDL 对 HUVECs PPAR γ 蛋白的下调作用结果

基于 PPAR γ 抗动脉粥样硬化作用, 于是猜想 OA 抗 ox-LDL 氧化损伤作用是否与调控内皮细胞 PPAR γ 的表达水平有关。因此, 进一步检测预处理 OA 的情况下, ox-LDL 作用下的 HUVECs 细胞中 PPAR γ 蛋白水平是否有变化。Western blot 结果显示, OA 预处理能明显逆转 ox-LDL 诱导的 PPAR γ 蛋白水平的降低, 且随着浓度的增加, OA 的这种逆转作用也不断提高。以上结果提示, OA 可拮抗 ox-LDL 导致的 HUVECs 细胞 PPAR γ 蛋白水平的降低(图 2)。



注: a 图为 Western Blot 图, β -actin 为内参; b 图为 PPAR γ 蛋白相对光密度统计图; 图下方 a 为对照组; b 为 ox-LDL 组; c 为 ox-LDL+OA(10 μmol/L)组; d 为 ox-LDL + OA (20 μmol/L); e 为 ox-LDL + OA (40 μmol/L)。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 ox-LDL 组比较, # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$

图 2 OA 对 ox-LDL 抑制 HUVECs 细胞 PPAR γ 蛋白表达水平的影响

表 1 OA 对 ox-LDL 抑制 HUVECs 细胞氧化损伤的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	样本数	SOD ($\mu\text{mol/g}$)	GSH ($\mu\text{mol/g}$)	MDA (kU/g)	ROS 相对荧光强度(%)
对照组	3	16.12±0.06	132.16±2.11	2.03±0.04	100.04±0.45
ox-LDL	3	5.43±0.08 ^a	49.72±1.28 ^a	2.63±0.02 ^a	158.12±0.39 ^a
ox-LDL+OA (10 μmol/L)	3	10.60±0.14 ^b	108.36±2.05 ^b	2.41±0.21 ^b	136.18±1.24 ^b
ox-LDL+OA (20 μmol/L)	3	13.28±0.09 ^b	129.58±0.09 ^b	2.26±0.15 ^b	126.43±1.51 ^b
ox-LDL+OA (40 μmol/L)	3	14.86±0.16 ^b	131.47±0.76 ^b	2.14±0.08 ^b	112.39±1.07 ^b
F 值		26.38	31.27	56.82	41.16
P 值		0.005	0.004	0.002	0.003

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 ox-LDL 组比较, ^b $P < 0.01$

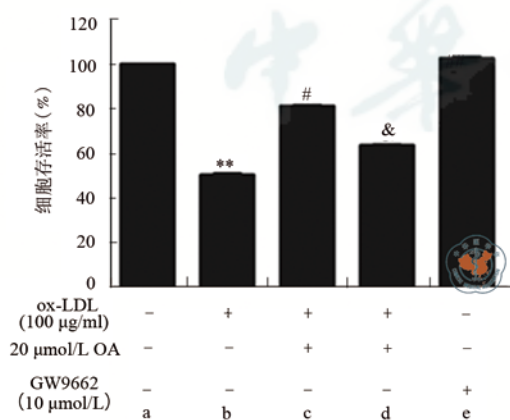
表2 PPAR γ 抑制剂对 OA 抗 ox-LDL 抑制 HUVECs 细胞氧化损伤的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	样本数	SOD ($\mu\text{mol/g}$)	GSH ($\mu\text{mol/g}$)	MDA (kU/g)	ROS 相对荧光强度(%)
对照组	3	17.05 \pm 0.12	135.28 \pm 2.14	2.16 \pm 0.15	100.53 \pm 1.08
ox-LDL	3	6.41 \pm 0.04 ^a	50.38 \pm 0.13 ^a	2.71 \pm 0.12 ^a	160.05 \pm 0.46 ^a
ox-LDL+OA (10 $\mu\text{mol/L}$)	3	10.58 \pm 0.13 ^b	102.46 \pm 0.06 ^b	2.42 \pm 0.08 ^b	144.38 \pm 2.02 ^b
ox-LDL+OA (20 $\mu\text{mol/L}$)	3	13.25 \pm 0.05 ^b	122.59 \pm 0.33 ^b	2.23 \pm 0.16 ^b	123.94 \pm 0.15 ^b
ox-LDL+OA (40 $\mu\text{mol/L}$)	3	15.88 \pm 0.14 ^b	140.26 \pm 1.05 ^b	2.02 \pm 0.13 ^b	187.52 \pm 0.68 ^b
oxLDL+OA(10 $\mu\text{mol/L}$)+GW9662	3	8.42 \pm 0.05 ^c	88.38 \pm 0.48 ^c	2.83 \pm 0.01 ^c	154.41 \pm 1.04 ^c
oxLDL+OA(20 $\mu\text{mol/L}$)+GW9662	3	10.59 \pm 0.12 ^c	106.42 \pm 0.15 ^c	2.61 \pm 0.07 ^c	138.12 \pm 1.15 ^c
oxLDL+OA(40 $\mu\text{mol/L}$)+GW9662	3	13.65 \pm 0.03 ^c	124.61 \pm 1.27 ^c	2.49 \pm 0.04 ^c	126.51 \pm 0.73 ^c
GW9662	3	16.02 \pm 0.13	130.14 \pm 2.04	1.98 \pm 0.29	103.15 \pm 0.29
<i>F</i> 值		35.08	42.31	26.84	33.73
<i>P</i> 值		0.003	0.001	0.004	0.003

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与 ox-LDL 组比较,^b $P < 0.01$;与各自 ox-LDL+OA 组比较,^c $P < 0.01$

四、PPAR γ 抑制剂部分逆转 OA 对 ox-LDL 抑制 HUVECs 细胞活力的拮抗作用结果

为了探讨 PPAR γ 在 OA 抗 ox-LDL 导致的 HUVECs 细胞氧化损伤的作用,首先检测了 PPAR γ 抑制剂 GW9662 (10 $\mu\text{mol/L}$) 预处理对 OA 拮抗 ox-LDL 导致的 HUVECs 细胞活力降低的影响。结果显示,与 ox-LDL+OA (20 $\mu\text{mol/L}$) 组比较,ox-LDL+OA (20 $\mu\text{mol/L}$)+GW9662 组的细胞活力明显降低,为(63.31 \pm 1.15)%。以上结果表明 GW9662 预处理可部分逆转 OA 对 ox-LDL 导致的 HUVECs 细胞存活率降低的拮抗作用,提示 PPAR γ 蛋白可能参与了 OA 的抗 ox-LDL 导致的 HUVECs 细胞氧化损伤作用(图 3)。



注: a 为对照组; b 为 ox-LDL 组; c 为 ox-LDL+ OA (20 $\mu\text{mol/L}$) 组; d 为 ox-LDL + OA (20 $\mu\text{mol/L}$)+GW9662 组, e 为 GW9662 单独处理组。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 ox-LDL 组比较, # $P < 0.05$; 与各自 ox-LDL+OA 组比较, & $P < 0.05$

图3 PPAR γ 抑制剂对 OA 抗 ox-LDL 抑制 HUVECs 细胞活力的影响

五、PPAR γ 抑制剂可减弱 OA 对 ox-LDL 诱导 HUVECs 细胞氧化损伤的改善作用结果

接下来本研究探讨 PPAR γ 抑制剂 GW9662 对 OA 抗 ox-LDL 诱导 HUVECs 细胞氧化损伤的逆转作用,以进一步阐明 PPAR γ 蛋白对 OA 拮抗 ox-LDL 诱导 HUVECs 细胞氧化损伤的介导作用。结果显示,与 ox-LDL+OA (10 $\mu\text{mol/L}$) 组比较,ox-LDL+OA (10 $\mu\text{mol/L}$)+GW9662 组的 SOD、GSH 水平明显降低而 MDA、ROS 水平明显升高与 ox-LDL+OA (20 $\mu\text{mol/L}$) 组比较,ox-LDL+ OA (20 $\mu\text{mol/L}$)+GW9662 组的 SOD、GSH 水平明显降低而 MDA、ROS 水平明显升高与 ox-LDL+OA (40 $\mu\text{mol/L}$) 组比较,ox-LDL+OA (40 $\mu\text{mol/L}$)+GW9662 组的 SOD、GSH 水平明显降低,而 MDA、ROS 水平明显升高。此外,本研究还发现,抑制 PPAR γ 后,OA 抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞的氧化损伤仍存在剂量效应。以上结果表明 PPAR γ 抑制剂 GW9662 对 OA 预处理可减弱 OA 对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞 SOD, GSH 含量降低以及 ROS 和 MDA 水平增加的抑制作用,提示 OA 可通过 PPAR γ 拮抗 ox-LDL 导致的 HUVECs 细胞氧化损伤(表 2)。

讨 论

氧化应激在心血管疾病的发生发展中扮演着重要角色,特别是活性氧常常伴随在 AS 的发展过程中^[10-11]。过多活性氧的产生可直接损伤细胞膜、蛋白质和 DNA。且线粒体 DNA 对氧化损伤极其敏感^[11]。最近有研究表明,活性氧水平的增加参与

炎症的发生,可导致血流量和剪切应力的异常以及诱导动脉壁的重塑^[12]。正常生理条件下,机体的抗氧化系统能够消除多余的活性氧,发挥抗氧化应激功能。然而,当机体处于病理状态时,细胞内活性氧生成量增加,抗氧化酶活性受到抑制,进而损伤蛋白质、脂质和核酸等生物大分子,导致细胞功能发生障碍,最终诱导有关疾病的形成^[13-14]。机体调控活性氧的抗氧化剂主要有由抗氧化剂如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)以及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)^[15]。有研究表明,ox-LDL的生产量增加可促进AS进程^[16]。GALLE和他的同事等发现,浓度为10~300 mg/L的ox-LDL可诱导HUVEC细胞中活性氧的产生,并呈浓度依赖性关系,且高浓度的ox-LDL可诱导内皮细胞发生死亡^[17]。

OA是一种天然的五环三萜类化合物,普遍存在于许多的药用植物中,能够产生抗氧化效应。目前的研究资料表明,OA在治疗氧化应激有关的疾病包括炎症、糖尿病以及癌症等方面取得了明显的效果^[18]。研究进一步发现,OA的抗氧化作用与其提高多种抗氧化酶的活性有关^[19]。本研究结果显示,浓度为10 μmol/L, 20 μmol/L和40 μmol/L的OA预处理可显著减弱ox-LDL对HUVECs细胞存活率的抑制作用,且呈浓度依赖性关系。为了探讨OA对ox-LDL诱导的HUVECs细胞氧化应激的影响,本研究检测了OA对ox-LDL作用下的抗氧化剂SOD和GSH活性以及氧化应激相关指标ROS和MDA水平的影响。结果显示,OA预处理可减弱ox-LDL诱导HUVECs细胞SOD, GSH含量的降低。同时,OA预处理可拮抗ox-LDL诱导HUVECs细胞ROS和MDA水平的增加。以上结果表明OA可改善ox-LDL诱导HUVECs细胞的氧化损伤。

PPAR γ 是核受体超家族成员之一,其在心血管疾病中起重要作用。PPAR γ 可通过抗炎,保护血管内皮细胞以及抑制血管平滑肌增殖和迁移作用发挥抗AS功能^[9]。有趣的是, γ -谷氨酰半胱氨酸乙酯对环磷酰胺诱导的肝损伤的保护作用与PPAR γ 的表达上调以及氧化应激的减弱有关^[20]。以上资料提示,PPAR γ 在OA抗ox-LDL诱导HUVECs细胞的氧化损伤中具有重要作用。于是,首先检测了OA对ox-LDL作用下的HUVECs细胞中PPAR γ 蛋白表达的影响。结果显示,OA能剂量依赖性的抑制

ox-LDL诱导的PPAR γ 蛋白水平的下调,这表明OA可减弱ox-LDL导致的HUVECs细胞PPAR γ 蛋白水平的降低。为了进一步确定PPAR γ 蛋白是否参与OA的抗ox-LDL导致的HUVECs细胞氧化损伤作用,接着探讨了PPAR γ 抑制剂GW9662预处理对OA抗ox-LDL诱导HUVECs细胞氧化损伤的影响,以阐明PPAR γ 蛋白对OA拮抗ox-LDL导致的HUVECs细胞氧化损伤的介导作用。结果显示,PPAR γ 抑制剂可逆转OA对ox-LDL抑制HUVECs细胞活力的拮抗作用。此外,抑制PPAR γ 后,OA减弱ox-LDL诱导的HUVECs细胞活性降低仍存在剂量效应。本研究进一步发现PPAR γ 抑制剂GW9662OA可减弱OA对ox-LDL诱导HUVECs细胞,SOD, GSH含量的降低以及ROS和MDA水平的增加的抑制作用。此外,抑制PPAR γ 后,OA抑制ox-LDL诱导的HUVECs细胞的氧化损伤仍存在剂量效应。这表明抑制PPAR γ 蛋白表达可部分逆转OA对ox-LD导致的HUVECs细胞氧化损伤,提示OA可通过PPAR γ 拮抗ox-LDL导致的HUVECs细胞氧化损伤。

综上所述,OA对ox-LDL诱导的HUVECs细胞氧化产生保护作用的分子机制与其调控PPAR γ 蛋白有关,这为OA治疗AS的分子机制提供了新的视角。

参 考 文 献

- 1 Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis[J]. *Nature*, 2011, 473(7347):317-325.
- 2 Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis[J]. *Hellenic J Cardiol*, 2009, 50(5):402-409.
- 3 Goyal SN, Mahajan UB, Chandrayan GA, et al. Protective effect of oleanolic acid on oxidative injury and cellular abnormalities in doxorubicin induced cardiac toxicity in rats[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(1):60-69.
- 4 Yang EJ, Lee W, Ku SK, et al. Anti-inflammatory activities of oleanolic acid on HMGB1 activated HUVECs[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(5):1288-1294.
- 5 Buus NH, Hansson NC, Rodriguez-Rodriguez R, et al. Antiatherogenic effects of oleanolic acid in apolipoprotein E knockout mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 670(2-3):519-526.
- 6 王玉, 韩志武. 齐墩果酸对氧化损伤人脐静脉内皮细胞线粒体中一氧化氮合酶的调控作用[J]. *中国药房*, 2015(19):2617-2620.
- 7 王道艳, 王志, 张峥, 等. 齐墩果酸对oxLDL诱导人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. *青岛大学医学院学报*, 2014 (6):487-489.
- 8 Wang C, Gan Q, Han S, et al. The regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on apoptotic related genes p53 and bcl-2 in cultured vascular smooth muscle cells[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2004, 20(4):590-594.

- 9 朱莹, 张文高, 郑广娟, 等. PPAR γ 与动脉粥样硬化及中医药干预研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(3):225-227.
- 10 He F, Li Z. Redox roles of reactive oxygen species in cardiovascular diseases[J]. Int J MolSci, 2015, 16(11):27770-27780.
- 11 Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress[J]. Circ Res, 2000, 87(10):840-844.
- 12 Alexander RW. Pathogenesis of atherosclerosis: redox signaling as a unifying theme[J]. Georgia Tech, 2003, 114:273.
- 13 Yao YS, Wang YB, Zhang YB, et al. Klotho ameliorates oxidized low density lipoprotein(ox-LDL)-induced oxidative stress via regulating LOX-1 and PI3K/Akt/eNOS pathways[J]. Lipids Health Dis, 2017, 16(1):77.
- 14 Ganguly G, Chakrabarti S, Chatterjee U, et al. Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease[J]. Drug Des Devel Ther, 2017, 11:797-810.
- 15 Victor VM, Rocha M, Fuente ML. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(3):327-347.
- 16 Zampetaki A, Dudek K, Mayr M. Oxidative stress in atherosclerosis: The role of microRNAs in arterial remodeling[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2013, 64(SI):69-77.
- 17 Galle J, Heinloth A, Wanner C, et al. Dual effect of oxidized LDL on cell cycle in human endothelial cells through oxidative stress[J]. Kidney IntSuppl, 2001, 78(78):S120-S123.
- 18 Liu J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 100(1-2):92-94.
- 19 Liu JZ, Wang X, Liu R, et al. Oleanolic acid co-administration alleviates ethanol-induced hepatic injury via Nrf-2 and ethanol-metabolizing modulating in rats[J]. Chem Biol Interact, 2014, 221:88-98.
- 20 Alqahtani S, Mahmoud AM. Gamma-glutamylcysteine ethyl ester protects against cyclophosphamide-induced liver injury and hematologic alterations via upregulation of PPAR γ and attenuation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 4016209.
- (收稿日期: 2017-07-11)
(本文编辑: 李少婷)

朱宝华, 谷春景, 刘凤莲, 等. 齐墩果酸通过 PPAR γ 调控人脐静脉内皮细胞抗氧化损伤作用 [J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2017, 7 (6): 327-333.

·读者·作者·编者·

更正说明

2017年第3期第125~130页题目为《高剂量 pSin 慢病毒载体介导的转染对诱导性多能干细胞影响的研究》一文, 经本文作者提出、并与相关作者协商, 同意添加通信作者: 李亮平, Email: liangping_li@jnu.edu.cn; 作者单位: 中山大学中山医学院基础医学系, 暨南大学附属第一医院。增加基金项目: 国家自然科学基金(81472824); 广州市科技计划项目(201504281915133), 特此更正说明。

本刊编辑部

中华医药学会