

## 葛根素通过改善线粒体呼吸功能减轻血管内皮细胞氧化损伤

孙姝婵, 龚迪菲, 袁天翊, 王守宝, 方莲花\*, 杜冠华\*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 药物靶点研究与新药筛选北京市重点实验室,  
天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 本研究旨在探究黄酮类化合物葛根素对过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 诱导损伤的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 的影响及其机制。采用体外培养 HUVEC 细胞, 设立空白组、模型组 ( $H_2O_2$  400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、不同浓度葛根素组 (3、10、30、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。采用葛根素预孵育 2 h,  $H_2O_2$  损伤 HUVEC 细胞 24 h。CCK-8 法检测细胞活力, Transwell 小室观察细胞迁移能力, 以 JC-1 为荧光探针检测线粒体膜电位。O2k 线粒体功能检测系统测定线粒体呼吸功能。RT-PCR 实验技术分析细胞中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 和白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18) 的 mRNA 表达水平; Western blot 检测细胞焦亡相关蛋白氮端 gasdermin D (N-GSDMD)、裂解天冬氨酸特异蛋白酶-1 (cleaved-cysteiny aspartate specific proteinase-1, cleaved-caspase-1)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 和嘌呤能离子通道型受体 7 (purinergic ligand-gated ion channel 7 receptor, P2X7R) 的表达水平。结果显示, 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $H_2O_2$  处理 24 h 对 HUVEC 细胞有明显的损伤作用, 与模型组比较, 葛根素能够浓度依赖性地提高细胞活力, 其中 30 和 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  效果最为显著; 葛根素能够显著降低线粒体膜电位, 改善线粒体呼吸功能, 抑制  $H_2O_2$  诱导的细胞迁移, 降低炎症因子的表达, 下调焦亡相关蛋白的表达。上述研究结果表明, 葛根素能够抑制 HUVEC 细胞的迁移, 减轻  $H_2O_2$  诱导的 HUVEC 氧化损伤, 其机制可能与改善线粒体呼吸功能、抑制细胞焦亡有关。

**关键词:** 葛根素; 人脐静脉内皮细胞; 作用机制; 线粒体; 细胞焦亡

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)05-1352-09

## Puerarin reduces oxidative damage to vascular endothelial cells by improving mitochondrial respiratory function

SUN Shu-chan, GONG Di-fei, YUAN Tian-yi, WANG Shou-bao, FANG Lian-hua\*, DU Guan-hua\*

(Beijing Key Laboratory of Drug Targets Identification and Drug Screening, State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** This study investigated the effect of puerarin on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) injured with hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). HUVEC were divided into three groups: a control group, a model group ( $H_2O_2$  400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and a puerarin-treated group (3, 10, 30 and 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). HUVEC were cultured with varied concentration of puerarin for 2 h and treated with  $H_2O_2$  for another 24 h. Cell proliferation was detected by a CCK-8 assay. The mitochondrial membrane potential was measured by a JC-1 fluorescent probe. A transwell chamber assay was adopted to observe cell migration ability. Mitochondrial respiratory function was measured in a two-chamber titration injection respirometer (Oxygraph-2k). The expression of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-18 (IL-18) and

收稿日期: 2021-11-05; 修回日期: 2021-12-17.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773935, 82073853); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-005).

\*通讯作者 Tel: 86-10-63165313, E-mail: fanglh@imm.ac.cn;

Tel: 86-10-63165184, E-mail: dugh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1590

tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) was detected by quantitative real-time PCR. The expression of pyroptosis-mediated proteins, including cleaved-cysteinyl aspartate-specific proteinase-1 (caspase-1), N-gasdermin D (N-GSDMD), NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) and purinergic ligand-gated ion channel 7 receptor (P2X7R) was detected by Western blot. The results show that 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment for 24 h causes obvious damage to HUVEC. Compared with the model group, puerarin protected against cellular injury in a dose-dependent manner, with the greatest effect at a dose of 30 and 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Puerarin significantly decreased the mitochondrial membrane potential and improved mitochondrial function. Puerarin inhibited cell migration induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$ , suppressed the expression of IL-1 $\beta$ , IL-18 and TNF- $\alpha$ , and down-regulated the pyroptosis-mediated protein. These changes are statistically significant ( $P < 0.05$ ). These findings demonstrate that puerarin has a protective effect against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative damage of HUVEC by inhibiting the migration of HUVEC cells. The mechanism may be related to improved mitochondrial respiratory function and inhibition of pyroptosis.

**Key words:** puerarin; human umbilical vein endothelial cell; mechanism; mitochondria; pyroptosis

血管内皮功能障碍是心血管疾病发展的主要危险因素<sup>[1]</sup>, 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 是内皮细胞的主要类型, HUVEC 细胞膜含有  $\beta$  受体和血管紧张素 1 型受体 (angiotensin type 1 receptor, AT1 receptor) 等, 具有多种生理功能, 是研究心血管疾病的重要工具<sup>[2]</sup>。虽然内皮细胞大部分 ATP 是由无氧糖酵解提供的<sup>[3]</sup>, 但是内皮细胞线粒体在能量储备、感测血氧水平等过程中仍起到不可忽视的作用<sup>[4]</sup>。因此探究内皮细胞与线粒体的关系对心血管疾病的预防与治疗具有重要意义。过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 刺激 HUVEC 细胞是体外氧化损伤的经典模型, 被广泛用于研究心血管疾病的分子机制<sup>[5]</sup>。

细胞焦亡 (pyroptosis) 又称细胞炎性坏死, 是一种程序性细胞坏死, 表现为细胞不断胀大直至细胞膜破裂, 导致内容物的释放进而激活强烈的炎症反应<sup>[6,7]</sup>, 在形态学上同时具有坏死和凋亡的部分特点<sup>[8,9]</sup>。细胞焦亡不仅在感染性疾病中起重要作用, 而且与心血管疾病、肿瘤和中枢神经系统疾病等也密切相关<sup>[10]</sup>, 有报道称细胞焦亡作为一种高度促炎性的细胞死亡方式可导致内皮细胞的功能障碍<sup>[11]</sup>, 但具体机制尚未阐明。

葛根素 (puerarin) 是从葛根中分离出的一种异黄酮类化合物, 被誉为“植物雌激素”<sup>[12]</sup>, 具有扩张血管、抗氧化和抗炎等药理作用<sup>[13,14]</sup>, 对帕金森病、糖尿病和心血管疾病有很好的疗效, 并可通过细胞焦亡信号通路保护人视网膜内皮细胞的氧化损伤<sup>[15]</sup>, 但葛根素能否通过该通路保护 HUVEC 细胞氧化损伤尚不明确。葛根素注射液已广泛应用于中国临床<sup>[16,17]</sup>, 但由于临床试验的可用性有限, 其对人体的有益结果仍不清楚。葛根素对细胞的许多保护作用不能完全转化为疗效, 如何正确评价葛根素对细胞的保护作用仍需深入研究。本研究拟采用  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导损伤的 HUVEC 细胞模型, 以探讨葛根素在保护血管内皮损伤方面的作用及

其机制, 为临床应用提供参考。

## 材料与amp;方法

**主要试剂** 葛根素 (纯度 > 99%) 由中国医学科学院药物研究所晶型中心提供; 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 细胞增殖-毒性检测试剂盒购自 Dojindo 化学研究所; DMEM 细胞培养基和胎牛血清均购自 Gibco 公司; 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 地高辛、谷氨酸、苹果酸、ADP、琥珀酸、寡霉素、三氟甲氧基苯胺羰基氰化物 (carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, FCCP)、鱼藤酮和抗霉素 A 购自 Sigma-Aldrich 公司; 试剂 MiR05 购自北京华威中仪科技有限公司; Trizol RNA 提取试剂、2 $\times$  Taq PCR Master Mix 试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 5 $\times$  RTIII All-in-One Mix 反转录试剂购自莫纳生物; BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 分离胶和浓缩胶、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗兔 IgG、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG、HRP 标记兔抗山羊 IgG 购自北京普利来基因技术有限公司; 0.1% 结晶紫染色液、4% 组织细胞固定液购自北京索莱宝科技有限公司; 白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 引物序列由 PubMed 网站设计 (表 1), 合成并购自北京奥科鼎盛生物科技有限公司; 嘌呤能离子通道型受体 7 (purinergic ligand-gated ion channel 7 receptor, P2X7R) 抗体 (Santa Cruz biotechnology 公司)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 及 cleaved C-terminal gasdermin D (GSDMD) 抗体 (美国 Abcam 公司)、cleaved-caspase-1 及  $\beta$ -actin 抗体 (Cell Signaling Technology 公司); ECL 化学发光检测试剂盒 (北京康为试剂生物科技有限公司)。其他试

**Table 1** Related primer sequence. IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ ; IL-18: Interleukin-18; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; GAPDH: Glycer-aldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Gene		Primer sequence
IL-1 $\beta$	F	AACAGCGAGGGAGAACTGG
	R	GGTCGGAGATTCGTAGCTGG
IL-18	F	GCTTGAATCTAAATTATCAGTC
	R	GAAGATTCAAATTGCATCTTAT
TNF- $\alpha$	F	CTACGTTGCTTTGCTCTGGTGA
	R	CCGGTCTGAATTCCTTTGCTC
GAPDH	F	TCCAAAATCAAGTGGGGCGA
	R	TGATGACCCTTTTGCTCCC

剂均为国产分析纯。

**细胞培养** HUVEC 细胞在含 10% 胎牛血清、100 u·mL<sup>-1</sup>青霉素和 100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>链霉素的 DMEM 培养液中培养, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养, 每隔两天传代, 待细胞处于对数生长期时用于实验。

**细胞模型及分组** 选对数生长期、状态良好的 HUVEC 细胞, 依据实验选择接种于 96 孔板、培养皿或 6 孔板中。建立 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤 HUVEC 内皮细胞模型, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 终浓度为 400  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>。实验分组: 空白组 (不加药、同等体积培养基); 模型组 (400  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 给药组: 以终浓度 3、10、30、100  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 葛根素预孵育 2 h, 之后与 400  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共培养 24 h。

**CCK-8 法检测细胞存活率** 取对数生长期的 HUVEC 内皮细胞 (9~12 代), 0.25% 胰蛋白酶消化后, 计数, 调整细胞密度, 以 5 000 个/孔接种于 96 孔板中。采用 CCK-8 测定法测定葛根素和/或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HUVEC 细胞的毒性。实验终点, 移去上清液, 每个孔中加入 80  $\mu$ L CCK-8 (1:10 稀释) 溶液, 然后在 37 °C 下继续培养 0.5~1 h。使用 Molecular Devices SpectraMax M5 酶标仪在 450 nm 下测定吸光度, 计算各孔细胞活力。

**细胞迁移率测定** 将对数生长期的 HUVEC 细胞消化, 用不含血清的 DMEM 培养基重悬细胞, 调整细胞密度为每毫升 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个, 取 300  $\mu$ L 细胞悬液接种到 Transwell 小室内, 每组设置 3 个复孔, 并在 24 孔板内 (下室) 加入 600  $\mu$ L 含 20% FBS 的 DMEM 培养基作为趋化因子。分别在细胞培养 24 及 48 h 后取出小室, 用棉签擦去上层细胞, 将滤膜下表面的细胞用 4% 多聚甲醛固定, 用 0.1% 结晶紫染色, 用纯水洗去残余染料, 于倒置显微镜 (200 $\times$ ) 下观察并拍照。每组至少随机选取 5 个视野计数。

**JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位** 取对数生长期的 HUVEC 内皮细胞 (9~12 代), 0.25% 胰蛋白酶消化后, 计数, 调整细胞密度, 以 5 000 个/孔接种于 96 孔板中。采用 JC-1 荧光探针测定线粒体膜电位 (mito-

chondrial membrane potential, MMP)。实验终点, 移去上清液, 每孔加入 100  $\mu$ L JC-1 染色工作液 (1 $\times$ ), 充分混匀, 在细胞培养箱中 37 °C 孵育 20 min, 孵育结束后吸除上清, 用 JC-1 染色缓冲液 (1 $\times$ ) 洗涤 2 次, 最后每孔加 100  $\mu$ L 细胞培养液, 荧光显微镜下观察。使用 Molecular Devices Spectra Max M5 酶标仪检测 JC-1 单体 (激发光设置为 490 nm, 发射光设置为 530 nm) 和 JC-1 聚合物 (激发光设置为 525 nm, 发射光设置为 590 nm)。

**Oxygraph-2k (O2k) 线粒体功能测定系统检测线粒体呼吸功能** 对舱内的氧气浓度进行校准。取对数生长期的 HUVEC 内皮细胞 (9~12 代), 0.25% 胰蛋白酶消化后, 计数, 调整细胞密度, 以每毫升 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 个接种于细胞皿中。实验终点时, 通过胰蛋白酶消化, 在室温下 800 r·min<sup>-1</sup> 离心 3 min, 然后用细胞培养基或 MiR05 将细胞重悬。将重悬细胞加入线粒体呼吸功能测定系统 (O2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria)。检测室内细胞最终浓度约为每毫升 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞。稳定 5 min 后, 关闭舱室。数据通过 DatLab 软件 5.2 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) 记录。为了检测 HUVEC 内皮细胞线粒体呼吸功能, 在渗透性细胞中采用底物-解偶联-抑制剂滴定方法, 方案如下: 细胞在舱室呼吸稳定一段时间后, 测量常规呼吸。用洋地黄素 (Dig, 每 10<sup>6</sup> 个细胞 150  $\mu$ g Dig) 进行质膜透化。在没有 ADP 滴定的情况下, 采用谷氨酸 (G, 5 mmol·L<sup>-1</sup>) 和苹果酸 (M, 2 mmol·L<sup>-1</sup>) 用于诱导复合物 I 的呼吸泄漏状态 (CI leak)。然后, 加入 5 mmol·L<sup>-1</sup> ADP 检测复合物 I 的氧化磷酸化 (OXPHOS) 能力 (CI P)。之后, 加入琥珀酸 (100 mmol·L<sup>-1</sup>) 诱导最大氧化磷酸化, 包括复合物 I 和复合物 II (CI + II P)。然后, 使用寡霉素和 FCCP 滴定法测定电子转移系统 (ETS) 的最大解偶呼吸容量 (CI + II ETS)。加入鱼藤酮 (Rot, 0.5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 后检测复合物 II 的非偶联呼吸功能 (CII ETS)。最后, 使用抗霉素 A (2.5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 评价残余耗氧量。

**qRT-PCR 检测 HUVEC 细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$  的表达** 各组细胞分别处理 24 h 后, Trizol 法提取细胞中总 RNA。根据 Takara 逆转录试剂盒进行逆转录反应生成 cDNA, 步骤严格按照试剂盒的说明进行。各基因对应上下游引物各 0.4  $\mu$ L, 2 $\times$  AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10  $\mu$ L, cDNA 模板 1.6  $\mu$ L, 灭菌双蒸水 8  $\mu$ L。PCR 反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 95 °C 15 s, 35 个循环; 60 °C 60 s; 95 °C 15 s; 选取 GAPDH 为内参基因。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 表示各基因的相对表达量。

**蛋白收集与 Western blot 检测焦亡相关蛋白的表达水平** 实验终点, 迅速弃去培养基, 用 4 °C 预冷的

PBS清洗2次,加入适量含蛋白酶抑制剂、蛋白磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液,冰上裂解30 min,用洁净的细胞刮将细胞刮下,吸入1.5 mL EP管中。高速离心机4 °C、12 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,BCA法测定蛋白浓度。RIPA调整蛋白浓度后,加入5×上样缓冲液,金属浴100 °C加热10 min。蛋白分装并存储于-80 °C保存备用。Western blot实验:每孔上样50 μg蛋白样品,进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,漂洗之后与焦亡相关的一抗4 °C下孵育过夜,经TBST洗膜后,加入相应二抗25 °C孵育2 h,洗膜,ECL显色、曝光、分析条带。

**统计学分析** 采用GraphPad Prism 7.0软件进行分析,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

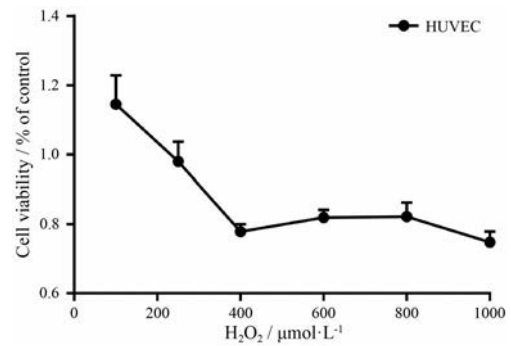
## 结果

### 1 不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对HUVEC内皮细胞活力的影响

将H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>设置浓度梯度分别诱导HUVEC细胞24 h,通过CCK-8法检测H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对HUVEC细胞活力的影响,确认模型条件。结果显示(图1),随着H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的升高,细胞活力越来越低。其中400 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育HUVEC细胞24 h后,细胞活力变化明显,综合考虑,将选用400 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>进行诱导损伤。

### 2 葛根素对正常及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>条件下HUVEC细胞活力的影响

通过CCK-8法检测葛根素潜在细胞毒性,探究正常条件下葛根素对HUVEC细胞活力的影响。结果显示(图2A)葛根素(3~100 μmol·L<sup>-1</sup>)单独孵育HUVEC细胞24 h后,与对照组相比,细胞活力无统计学差异,表明此浓度下葛根素对HUVEC无明显毒性。接下来(图2B),400 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用于HUVEC细胞24 h后,与正常对照组相比,细胞存活率明显降低( $P <$



**Figure 1** Effects of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on cell viability in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) for 24 h.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

0.01),说明400 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对HUVEC细胞产生了明显的内皮细胞损伤并导致细胞死亡。葛根素(3~100 μmol·L<sup>-1</sup>)预孵育2 h后,可以保护细胞免受损伤,且具有浓度依赖性,其中以30和100 μmol·L<sup>-1</sup>葛根素药物作用效果最好( $P < 0.05$ )。

### 3 葛根素抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HUVEC内皮细胞迁移

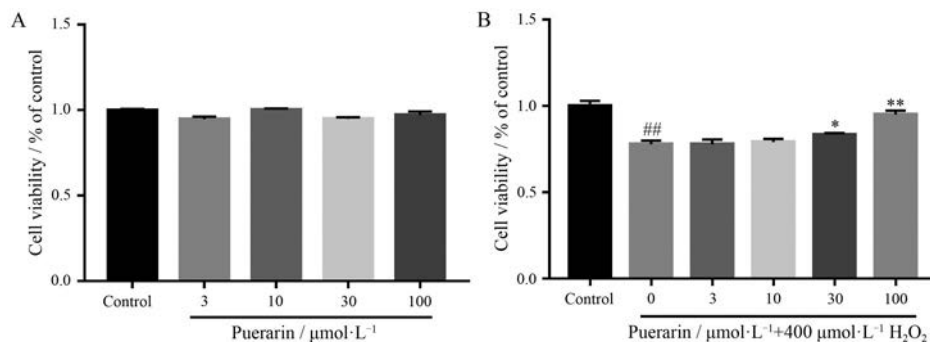
采用Transwell小室对细胞迁移情况进行评价,小室上层为无血清DMEM培养基,下层溶液加入含20% FBS的DMEM培养基,诱导细胞迁移。结果显示(图3),诱导迁移24和48 h后,模型组下表面细胞数量较对照组明显增多,葛根素各给药组浓度依赖性地减少细胞迁移数量,以高浓度葛根素效果最为显著。

### 4 葛根素对HUVEC内皮细胞线粒体膜电位的影响

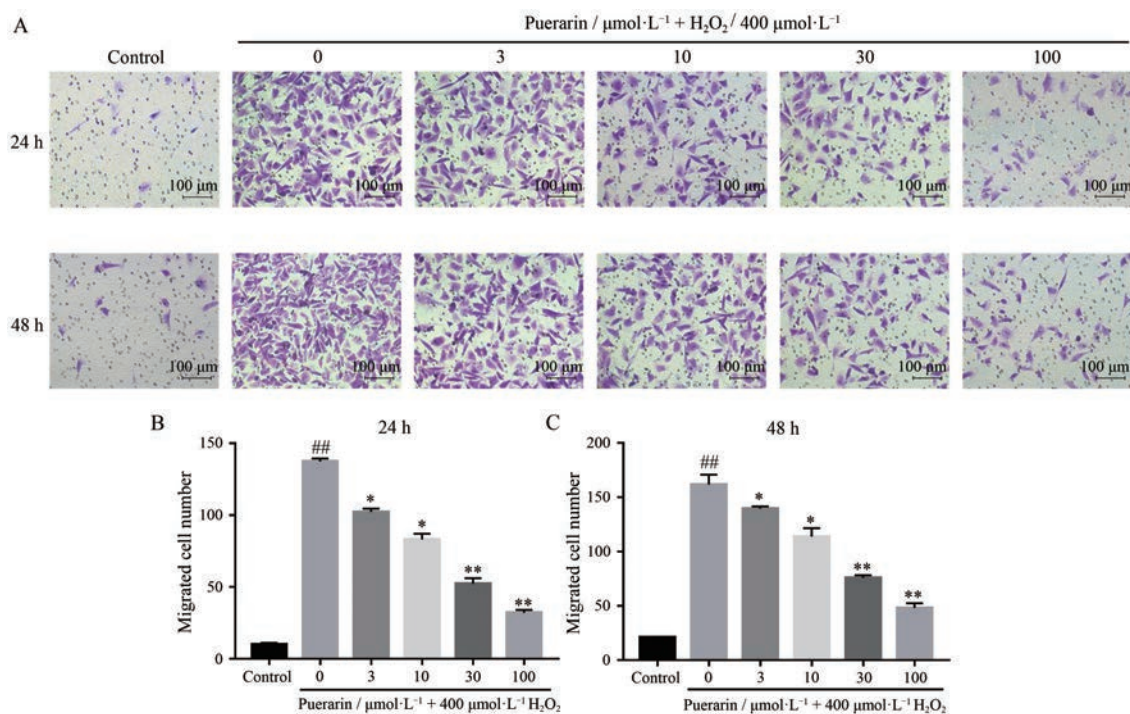
激光共聚焦显微观察及JC-1探针染色法检测各组线粒体膜电位变化。结果显示(图4),与对照组相比,模型组的JC-1探针绿色荧光强度明显增强,红色荧光强度明显减弱( $P < 0.05$ ),表示线粒体膜电位下降;与模型组相比,葛根素可以剂量依赖性地减弱JC-1探针的绿色荧光,红色荧光强度增加,线粒体膜电位升高( $P < 0.05$ ),其中以100 μmol·L<sup>-1</sup>葛根素效果最为显著。

### 5 葛根素对HUVEC细胞线粒体呼吸功能的影响

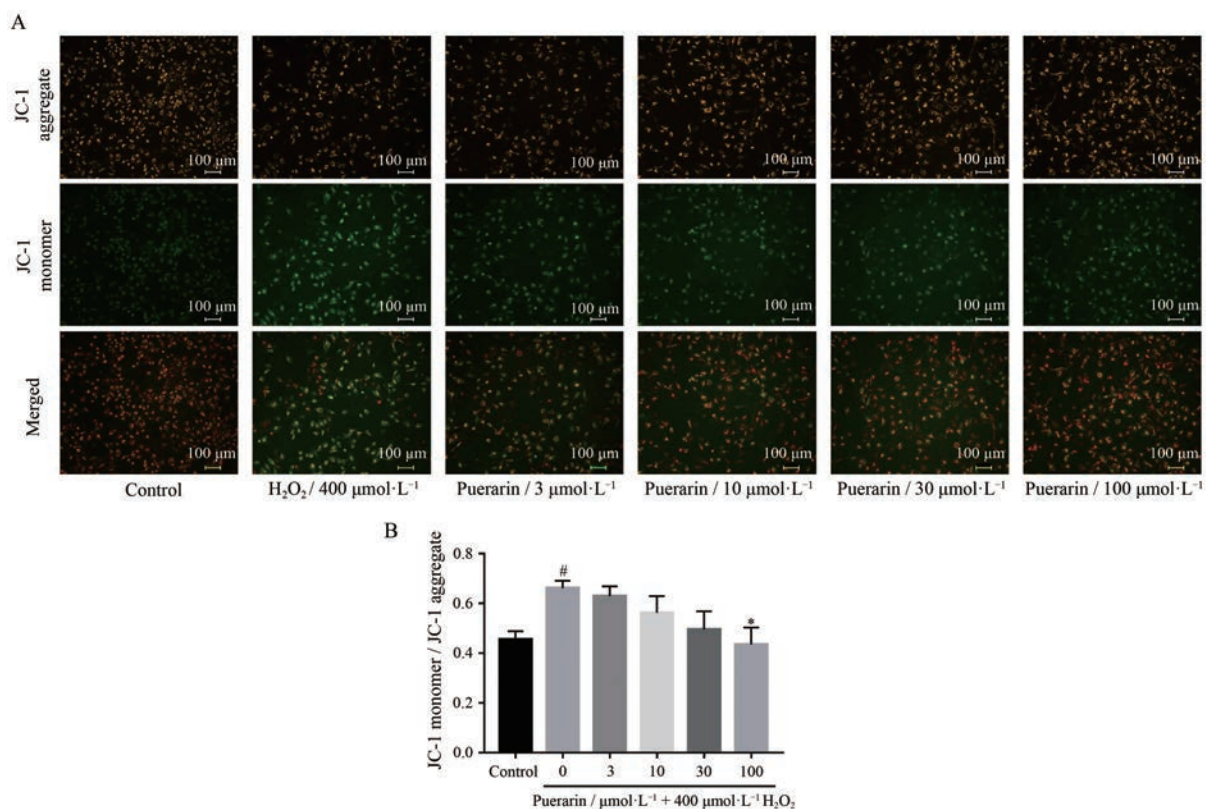
细胞预孵育100 μmol·L<sup>-1</sup>葛根素2 h,再经400 μmol·L<sup>-1</sup>



**Figure 2** Effects of puerarin (3~100 μmol·L<sup>-1</sup>) on the cell viability of HUVEC treated with 400 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A: Effects of puerarin on cell viability under normoxia conditions; B: Effects of puerarin on cell viability in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell injury.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model



**Figure 3** Puerarin reduces cell migration induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of 24 or 48 h. A: Representative images of migrated HUVEC in Transwell chamber assay after treatment with or without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence or absence of puerarin for 24 or 48 h (scale bar: 100 μm); B, C: The figure indicates the number of migrated cells. Cells were counted in 6–8 randomly chosen microscope fields per filter. *n* = 6–8,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup>*P* < 0.01 vs control; <sup>\*</sup>*P* < 0.05, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01 vs model



**Figure 4** Effects of puerarin on mitochondrial membrane potential of HUVEC. Fluorescence image (A) of JC-1 staining in HUVEC cells exposed to 400 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h (scale bar: 100 μm) and quantitative analysis of the ratio of red fluorescence to green fluorescence (B). *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>#</sup>*P* < 0.05 vs control; <sup>\*</sup>*P* < 0.05 vs model

$H_2O_2$ 处理 24 h。通过 O2k 线粒体呼吸功能仪, 采用底物-解偶联-抑制剂滴定方法, 研究 HUVEC 内皮细胞中与复合物 I 和 II 相关的线粒体呼吸, HUVEC 细胞在不同条件下实时的呼吸状态如图 5A 所示; 舱室氧含量的变化情况如图 5B 所示; HUVEC 细胞在不同条件下的呼吸速率如图 5C 所示。结果显示 (图 5D), HUVEC 细胞经  $H_2O_2$  诱导损伤后, 线粒体呼吸速率降低, CI 和 CI + CII 氧化磷酸化 (CI P 和 CI + II P) 能力以及 CI + CII 电子传递 (CI + II ETS) 能力降低最为显著 ( $P < 0.01$ ), 舱室氧量变化不明显。而预孵育葛根素能改善细胞呼吸功能, 其中以 CI + CII 电子转移系统 (CI + II ETS) 最为显著 ( $P < 0.05$ )。

## 6 葛根素对 $H_2O_2$ 诱导损伤 HUVEC 炎症因子转录水平的影响

通过 qRT-PCR 在转录水平探究葛根素对  $H_2O_2$  诱导损伤 HUVEC 细胞炎症因子的影响。如图 6 所示, 与对照组相比,  $H_2O_2$  刺激能够显著增加内皮细胞中 TNF- $\alpha$  的 mRNA 转录水平, 以及细胞焦亡相关的炎症因子 IL-

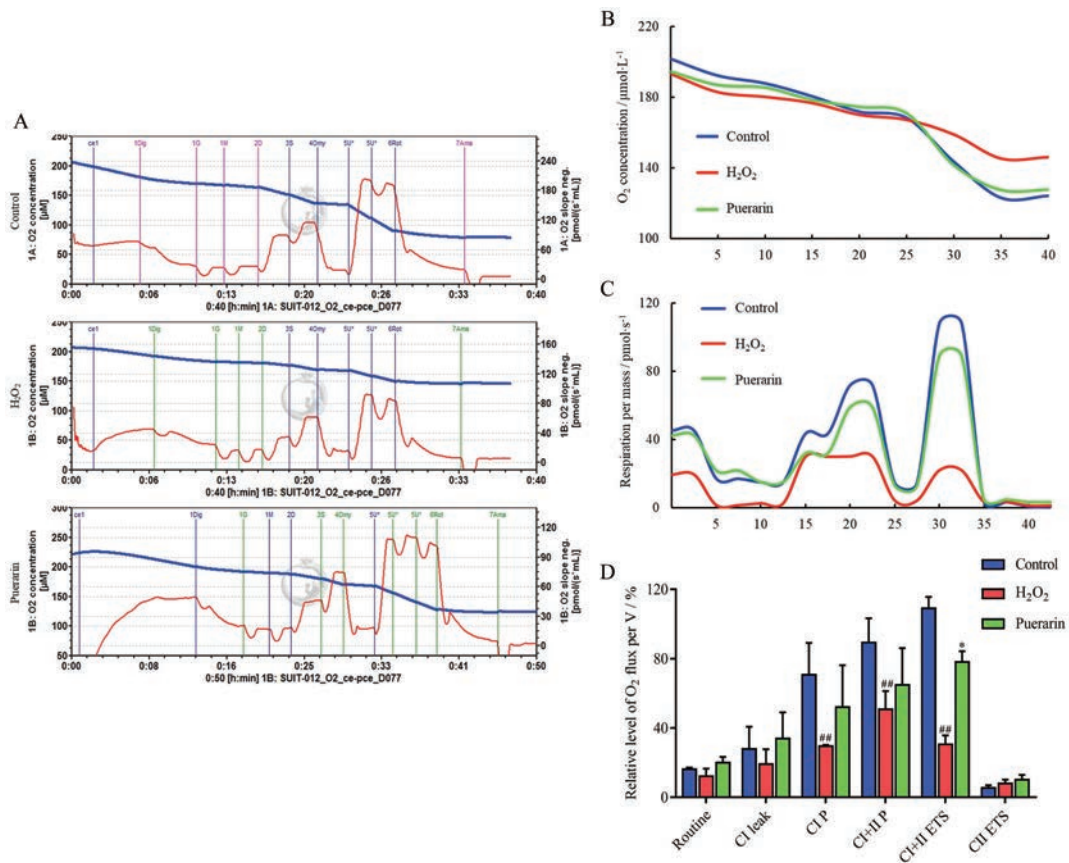
1 $\beta$  和 IL-18 的 mRNA 转录水平也显著增加, 而葛根素可以浓度依赖地降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-18 mRNA 的转录水平。

## 7 葛根素对 $H_2O_2$ 诱导损伤 HUVEC 焦亡通路的影响

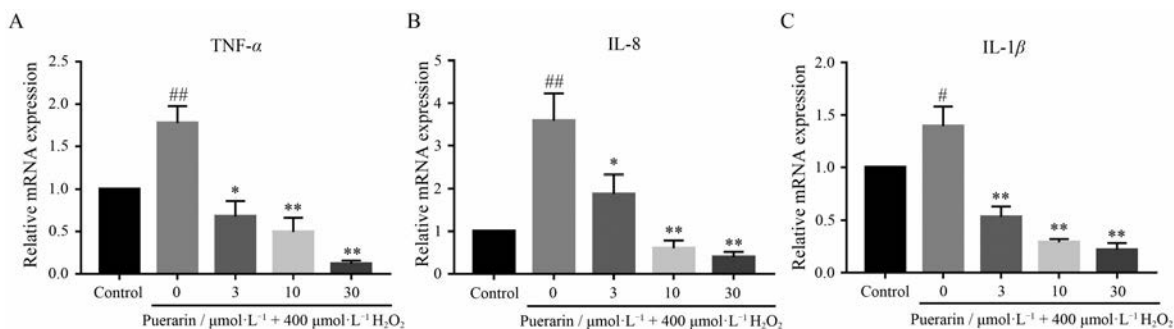
葛根素对  $H_2O_2$  诱导损伤 HUVEC 细胞焦亡通路的影响, 实验结果显示 (图 7), 与对照组相比, 模型组中 N-GSDMD、cleaved-caspase-1、NLRP3、P2X7R 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 葛根素可以剂量依赖性地降低 N-GSDMD、cleaved-caspase-1、NLRP3、P2X7R 蛋白的表达水平, 说明葛根素可能通过调节细胞焦亡改善  $H_2O_2$  引起的内皮细胞损伤。

## 讨论

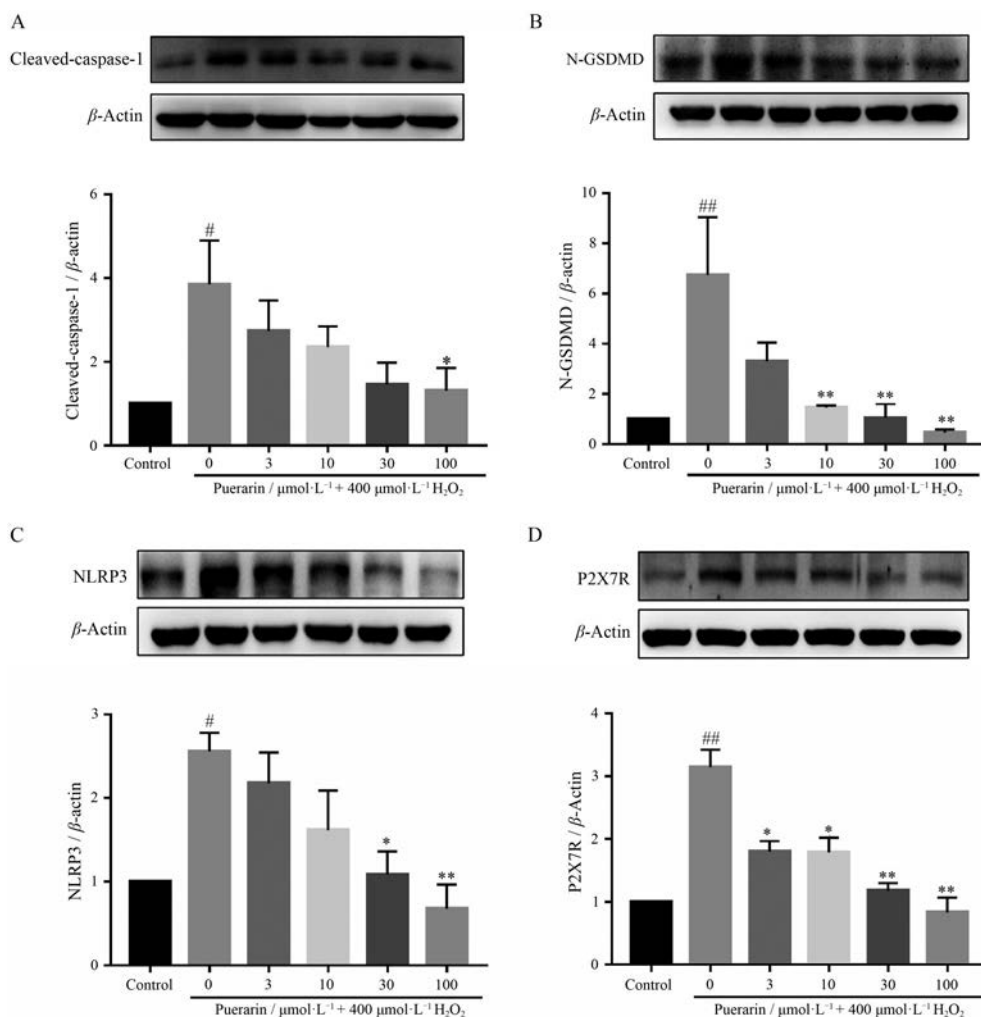
内皮细胞是血管生成所必需的, 是调控炎症、维持血管张力和调节血压的重要通道<sup>[18,19]</sup>, 血管内皮细胞损伤是导致多种心血管疾病发生的关键因素。 $H_2O_2$  作为一种机体产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 低浓度时可作为信号分子传导信号, 高浓度则



**Figure 5** Mitochondrial respiratory function of HUVEC treated with  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} H_2O_2$ . A: Effects of puerarin on mitochondrial complex of HUVEC induced by  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} H_2O_2$  for 24 h; B, C: The representative profile of  $O_2$  concentration change and relative level of  $O_2$  flux per volume of HUVEC in  $H_2O_2$  model; D: The summarized data of mitochondrial respiration in  $H_2O_2$  and puerarin group, including routine, complex I (CI) and CI plus complex II (CII) oxidative phosphorylation, CI and CII leak, as well as CI plus CII electron transfer system. P: Oxidative phosphorylation capacity; ETS: Electron transfer system.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{##}P < 0.01$  vs control;  $^*P < 0.05$  vs model



**Figure 6** Effects of puerarin on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-18 mRNA expression of HUVEC induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs control; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs model



**Figure 7** Effects of puerarin (3–100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on the pyroptosis-related protein expression in HUVEC exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A: Cleaved-caspase-1 expression; B: N-GSDMD expression; C: NLRP3 expression; D: P2X7R expression. Relative density analysis of the protein bands was shown by the Western blot with  $\beta$ -actin as control. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs control; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs model.  $n = 3-6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . N-GSDMD: Cleaved C-terminal gasdermin D; NLRP3: NOD-like receptor protein 3; P2X7R: Purinergic ligand-gated ion channel 7 receptor

引起氧化应激<sup>[20]</sup>, 氧化应激会导致血管内皮细胞的功能紊乱, 从而导致心脑血管疾病的发生。

内皮细胞的增殖能力对于修复血管内皮、维持血管壁的完整性至关重要<sup>[21,22]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激导致内皮细胞

损伤和死亡, 而葛根素可以温和保护内皮细胞, 提高细胞活力。血管内皮细胞迁移是血管生成的关键步骤, 也是新生血管形成的基础。但内皮细胞在氧化应激条件下, 会失去正常的细胞-基质相互作用, 获得了氧化

应激下的迁移能力,伴随着细胞迁移和侵袭能力的改变而导致细胞屏障功能障碍<sup>[23]</sup>。本研究中 Transwell 实验显示,葛根素明显降低 HUVEC 细胞的迁移活性,抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞迁移,改善 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的细胞损伤,以维持血管内平衡。

线粒体维持较高的膜电位对细胞存活起至关重要的作用,当内皮细胞受氧化应激损伤后,ROS 可以引起线粒体渗透性转换孔的开放引起线粒体膜电位降低<sup>[24]</sup>,说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可以诱导 HUVEC 细胞发生凋亡,破坏线粒体结构;而葛根素可以升高在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 条件下 HUVEC 细胞的线粒体膜电位,保护内皮细胞免受损伤。有研究发现,平滑肌细胞受到氧化损伤后,线粒体复合物 I 活性下降<sup>[25]</sup>,而内皮细胞发生氧化损伤后,细胞内线粒体基础呼吸及复合物 I、II 的改变研究较少。本研究通过 O2k 线粒体呼吸功能仪,采用底物-解偶联-抑制剂滴定方法,发现 HUVEC 细胞经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤后,线粒体呼吸速率降低,舱室氧量变化不明显。而预孵育葛根素能改善细胞呼吸功能,提高线粒体复合物 I 和 II 的活性,升高细胞耗氧速率,其中改善线粒体呼吸链复合物 I、II 电子转移系统效果最为显著。以上结果提示,葛根素可以抑制细胞凋亡并对氧化损伤后的内皮细胞线粒体功能有一定的保护作用。

在细胞焦亡过程中,线粒体作为细胞的供能器官起到了至关重要的作用,线粒体功能的失衡可导致细胞焦亡的发生<sup>[26]</sup>。细胞焦亡是由 caspase-1 或 caspase-11/4/5 介导的伴随炎症反应的程序性死亡模式<sup>[27]</sup>。氧化应激不仅损伤血管内皮细胞,而且还能增加炎症细胞因子的产生。本研究发现,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 HUVEC 细胞发生氧化应激后,能使细胞内炎症细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TNF- $\alpha$  的表达显著增加,并且 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 干预,导致细胞焦亡的关键性蛋白 N-GSDMD 和 cleaved-caspase-1 表达显著升高,与此同时 NLRP3 和 P2X7R 表达也明显同步升高,提示 NLRP3/caspase-1 介导的细胞焦亡的激活与 P2X7R 的激活同步。而预孵育葛根素显著减少炎症因子的表达,降低 N-GSDMD、cleaved-caspase-1、NLRP3、P2X7R 蛋白的表达水平,因此葛根素在改善线粒体呼吸功能的同时,通过调节细胞焦亡改善 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的内皮细胞损伤,并且此保护作用可能与 P2X7R 密切相关。

本研究采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 细胞损伤模型,探索了葛根素对 HUVEC 细胞的保护作用及其机制。结果表明,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激内皮细胞后,线粒体呼吸功能受损,线粒体膜电位改变,导致 caspase 信号通路的激活,而葛根素可以通过改善线粒体呼吸,维持线粒体功能稳定,调节 NLRP3-caspase-1-GSDMD 介导的细胞焦亡通路,本文为进一步开展葛根素治疗心血管疾病的研

究奠定实验基础。

**作者贡献:** 孙姝婵负责实验研究和文章撰写;龚迪菲参与部分实验研究;袁天翊参与论文修改;王守宝和方莲花负责实验设计、论文修改和基金获得;杜冠华负责实验监督及论文审阅。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Wei DH, Deng JL, Shi RZ, et al. Epimedin C protects H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced peroxidation injury by enhancing the function of endothelial progenitor HUVEC populations [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42: 1491-1499.
- [2] Yan JH, Wu QY, Luo SX, et al. A detailed protocol to cultivate and identify human umbilical endothelial cells [J]. *J Xinjiang Med Univ (新疆医科大学学报)*, 2016, 39: 555-559.
- [3] Davidson SM, Duchon MR. Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease [J]. *Circ Res*, 2007, 100: 1128-1141.
- [4] Chandel NS. Mitochondria as signaling organelles [J]. *BMC Biol*, 2014, 12: 1-7.
- [5] Zhu Z, Shi Z, Xie C, et al. A novel mechanism of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) protecting human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2019, 217: 68-75.
- [6] Jia C, Chen H, Zhang J, et al. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 311-318.
- [7] Bian Y, Li X, Pang P, et al. Kanglexin, a novel anthraquinone compound, protects against myocardial ischemic injury in mice by suppressing NLRP3 and pyroptosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41: 319-326.
- [8] Ma YJ, Xu M. The role of pyroptosis in the macrovascular complications of diabetes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 884-891.
- [9] Lei Q, Yi T, Chen C. NF- $\kappa$ B-gasdermin D (GSDMD) axis couples oxidative stress and NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome-mediated cardiomyocyte pyroptosis following myocardial infarction [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 6044-6052.
- [10] Gong W, Shi Y, Ren J. Research progresses of molecular mechanism of pyroptosis and its related diseases [J]. *Immunobiology*, 2020, 225: 151884.
- [11] Haybar H, Shahabi S, Rezaeeyan H, et al. Endothelial cells: from dysfunction mechanism to pharmacological effect in cardiovascular disease [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2019, 19: 13-22.
- [12] Shibata S, Murakami T, Nishikawa Y, et al. The constituents of pueraria root [J]. *Chem Pharm Bull*, 1959, 7: 134-136.
- [13] Li XG, Yuan TY, Chen D, et al. Cardioprotective effects of puerarin-V on isoproterenol-induced myocardial infarction mice is associated

- with regulation of PPAR- $\gamma$ /NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Molecules*, 2018, 23: 3322.
- [14] Tang F, Yan HL, Wang LX, et al. Review of natural resources with vasodilation: traditional medicinal plants, natural products, and their mechanism and clinical efficacy [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 627458.
- [15] Zhang J, Chen YQ, Gao WP. Puerarin protects against human retinal endothelial cells injury induced by high glucose *via* regulating miR-16-5p/CASP1 axis [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2021, 40: 235-243.
- [16] Qin W, Wu T, Xiao YC, et al. Puerarin injection for unstable angina pectoris [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006, 3: CD004196.
- [17] Yan T, Ming L, Bo W. Puerarin for acute ischaemic stroke [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2008, 23: CD004955.
- [18] Rossman MJ, Kaplon RE, Hill SD, et al. Endothelial cell senescence with aging in healthy humans: prevention by habitual exercise and relation to vascular endothelial function [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 313: H890-H895.
- [19] Lane-Cordova AD, Phillips SA, Baynard T, et al. Effects of ageing and physical activity on blood pressure and endothelial function during acute inflammation [J]. *Exp Physiol*, 2016, 101: 962-971.
- [20] Stone JR, Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses [J]. *Endothelium*, 2002, 9: 231-238.
- [21] Ricard N, Bailly S, Guignabert C, et al. The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18: 565-580.
- [22] Tawa M, Shimosato T, Sakonjo H, et al. Responsiveness of coronary arteries to nitroglycerin under hypoxia: the importance of the endothelium [J]. *Pharmacology*, 2017, 99: 275-280.
- [23] Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition [J]. *Sci Signal*, 2014, 7: re8.
- [24] Kalpage HA, Bazylianska V, Recanati MA, et al. Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis [J]. *FASEB J*, 2019, 33: 1540-1553.
- [25] Wiegman CH, Michaeloudes C, Haji G, et al. Oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136: 769-780.
- [26] Li Q, Shi N, Cai C, et al. The role of mitochondria in pyroptosis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 8: 630771.
- [27] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018 [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25: 486-541.