

天香丹对人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用研究

辛锦钰, 张亚洁, 古丽葛娜·萨吾尔, 何欢, 任珊, 安冬青*

(新疆医科大学中医学院 新疆名医名方与特色方剂学重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘 要:目的:探讨天香丹对 tBHP 诱导损伤的人脐静脉内皮细胞的保护作用。方法:将 HUVECs 分为对照组、模型组、阳性对照药(维生素 C)组和天香丹剂量组(30、60、90 $\mu\text{g/mL}$)。MTT 法筛选 tBHP 最佳造模浓度,并评价天香丹对内皮细胞氧化损伤的保护作用;微板法和 WST 法检测各组细胞乳酸脱氢酶(LDH)、还原型谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)表达情况;显微镜下观察各组细胞形态学变化,Hoechst 33258 荧光染色法检测各组细胞凋亡情况。结果:经 tBHP 诱导 24 h 后,模型组细胞存活率、SOD 活性和 GSH 含量较对照组显著降低($P < 0.01$),LDH 释放量和细胞凋亡率明显增加($P < 0.01$);经维生素 C 和不同浓度天香丹预处理后,与模型组相比较,各组细胞存活率、SOD 活性和 GSH 含量显著增加,LDH 的释放和细胞凋亡率得到减轻($P < 0.01$)。结论:天香丹具有保护 HUVECs 免于氧化损伤的作用,其机制可能与抗氧化通路的激活,抗氧化能力的增强及逆转细胞凋亡有关。

关键词:氧化应激;tBHP;天香丹;人脐静脉内皮细胞

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2392(2022)01-0018-05

DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.220005

冠状动脉微循环功能障碍(coronary microcirculation dysfunction, CMD)是冠心病患者发生心肌缺血的重要原因,研究显示,在没有明显心外膜冠状动脉阻塞情况下,CMD 可导致 50% 的慢性冠状动脉综合征患者心肌缺血情况加剧^[1]。氧化应激是导致 CMD 发生发展的主要因素。氧化应激状态下,氧自由基产生增加,触发线粒体功能障碍、钙超载、DNA 损伤和心肌膜脂质过氧化,最终导致细胞死亡^[2]。天香丹是由名老中医经验方研发而成的院内制剂,应用于冠心病及心肌缺血综合征的临床治疗,疗效确切。课题组前期研究显示,天香丹可有效改善冠心病患者心肌缺血状况,并对 CMD 动物的心肌起到保护作用^[3],故本实验采用叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide, tBHP)制备人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)氧化损伤模型,以研究天香丹对氧化应激状态下细胞中超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量的影响,并通过比较各组细胞形态学变化和各组

细胞凋亡情况,为天香丹在 CMD 的预防和治疗提供体外实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品

天香丹颗粒(新疆华世丹药业有限公司,批号:新药制字 Z20040820);维生素 C(北京索莱宝科技有限公司,批号:A8100);tBHP(上海麦克林生化科技有限公司生产,批号:B802372)。

1.2 细胞株

人脐静脉血管内皮细胞 HUVECs,购于上海赛百慷生物技术股份有限公司。

1.3 试剂

内皮细胞培养基购于美国 ScienCell 公司;胎牛血清、胰酶和双抗均购于美国 Gibco 公司;PBS 购于美国 Hyclone 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购于北京索莱宝科技有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒和微量还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所(批号依次为:A001-3-2、A020-2、A006-2-1);活性氧检测试剂盒及细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒则购于碧云天生物技术有限公司(批号依次为:S0033、C0003)。

收稿日期:2021-03-01 修回日期:2021-04-14

基金项目:国家自然科学基金项目(81760843)

作者简介:辛锦钰(1994-),女,硕士研究生,研究方向:心血管病的中医药研究。

* 通讯作者:安冬青(1962-),女,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药临床与基础研究。

1.4 仪器

多功能酶标仪(美国 Thermo 公司),低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司)

1.5 方法

1.5.1 HUVECs 细胞培养

用含有 10% 胎牛血清、1% 双抗(青霉素-链霉素)和 1% 内皮细胞生长因子的内皮细胞培养液,在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养人脐静脉内皮细胞,每 2~3 d 传代 1 次,取处于对数生长期的活跃细胞进行实验。

1.5.2 tBHP 诱导的 HUVECs 氧化应激损伤模型的建立

待培养瓶中细胞长至 80%~90% 时,用胰蛋白酶进行消化后离心,用内皮细胞培养液重悬细胞,接种于 96 孔板中,使每孔细胞数为 1.5×10^4 个,置于培养箱中培养,待细胞贴壁后弃去培养液,加入含不同浓度 tBHP 的无血清培养液,药物浓度分别为 60 μmol/L、120 μmol/L、180 μmol/L、240 μmol/L,并设置对照组和空白组,其中对照组含有细胞和培养液,空白组只有培养液。作用 24h 后各孔加入 20 μL MTT 溶液,培养 4 h,弃去上清,再加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO)溶液,使蓝紫色甲臞充分溶解,酶标仪 492 nm 波长处测各孔吸光度 A 值,计算细胞存活率,实验重复 3 次。细胞存活率(%) = $[(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.5.3 天香丹对 tBHP 诱导的 HUVECs 存活率的影响

将细胞分为对照组、模型组、阳性对照药组和天香丹低、中、高剂量组,按每孔 1.5×10^4 个将细胞接种于 96 孔板中,待贴壁后弃去培养液。对照组和模型组均加入无血清培养液,天香丹组加入含不同浓度天香丹的无血清培养液,其浓度分别为 30 μg/mL、60 μg/mL、90 μg/mL,阳性对照药组为 50 μg/mL 维生素 C 组,预处理 12 h。弃去培养液,随后加入 240 μmol/L tBHP 作用 24 h。各孔加入 20 μL MTT 溶液,培养 4 h,弃上清,再加入 150 μL DMSO 溶液使蓝紫色甲臞溶解,于酶标仪 492 nm 波长处测各孔 A 值,计算细胞存活率,实验重复 3 次。

1.5.4 细胞中 LDH、SOD、GSH 含量的测定

按每孔 3.0×10^5 个将细胞均匀接种于 6 孔板中,密切关注细胞生长状态,待细胞生长至 80%~90% 时弃去旧培养液,将细胞分为对照孔、模型孔、阳性对照药孔和天香丹低、中、高剂量孔,其中对照孔及模型孔加入 2 mL 无血清培养液,阳性对照药孔加等体积 50 μg/mL 的维生素 C,天香丹孔则各加入等体积浓度依次为 30 μg/mL、60 μg/mL、90 μg/mL 的天香丹培养液,预处理 12 h 后弃去培养液,加入 240 μmol/L tBHP

作用 24h,诱导细胞氧化应激后收集各组细胞,严格按照试剂盒说明书操作并测定各组细胞中 LDH、SOD 和 GSH 的含量,实验重复 3 次。

1.5.5 天香丹对 tBHP 诱导的 HUVECs 形态学的影响

按每孔 3.0×10^5 个将细胞均匀接种于 6 孔板中。待细胞密度达 80%~90% 时弃去培养液,并按 1.5.4 方法给予细胞不同处理,后弃去旧培养液,加入新鲜培养液,将细胞置于倒置显微镜下观察各组形态学差异,并保存图像。

1.5.6 Hoechst 33258 荧光染色法检测天香丹对细胞凋亡的影响

制备细胞爬片,并按 1.5.4 方法给予细胞不同处理,后弃去培养液,润洗细胞并加入固定液固定 20 min,弃去固定液,PBS 洗涤固定液 3 次,每次 3~5 min。随后按每孔 500 μL 加入 Hoechst 33258 染色液染色 5 min,清洗染色液 3 次,期间将抗荧光淬灭封片液滴加在载玻片上,待染色液清洗完全将贴有细胞的玻片翻盖于载玻片上,确保细胞与封片液紧密接触,将细胞置于荧光显微镜下观察并随机选择 3 个视野进行细胞计数。计数 100 个细胞中凋亡所占细胞个数,计算凋亡率,实验重复 3 次,取 3 次计数结果的平均值。凋亡率(%) = (凋亡细胞数/100) × 100%。

1.6 统计分析

实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 形式表示,采用 SPSS 26.0、Graph Pad Prism 8.0 和 Image J 软件进行数据处理和作图,组间差异采用单因素方差分析和 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 tBHP 对 HUVECs 存活率的影响

采用 MTT 法测定不同浓度 tBHP 对人脐静脉内皮细胞存活率的影响。结果如表 1 所示,与对照组相比,细胞存活率与 tBHP 浓度呈负相关,120 μmol/L、180 μmol/L 和 240 μmol/L tBHP 作用 24 h 后,能显著降低细胞存活率,差异具有统计学意义($P < 0.01$),其中 240 μmol/L tBHP 浓度细胞存活率为 $(50.79 \pm 0.53)\%$,接近 50%,为建立氧化应激模型的最佳作用浓度。

表 1 不同浓度 tBHP 对 HUVECs 存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	MTT(A)	存活率(%)
对照组	0.469 ± 0.006	99.99 ± 1.50
60 μmol/tBHP	0.452 ± 0.016	99.34 ± 0.23
120 μmol/tBHP	$0.386 \pm 0.012^{**}$	$83.31 \pm 0.44^{*}$
180 μmol/tBHP	$0.309 \pm 0.045^{**}$	$70.27 \pm 0.16^{**}$
240 μmol/tBHP	$0.195 \pm 0.107^{**}$	$50.79 \pm 0.53^{**}$

注:与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

2.2 天香丹对 tBHP 诱导的 HUVECs 存活率的影响

MTT 法评价天香丹对 tBHP 诱导的 HUVECs 存活率的影响,结果如表 2 所示,模型组细胞存活率为 $(49.34 \pm 2.45)\%$,与对照组相比明显降低($P < 0.05$);相较于模型组,阳性对照组和不同浓度天香丹预处理组的细胞存活率均有明显升高($P < 0.05$),表明天香丹对 tBHP 诱导的 HUVECs 氧化损伤具有抑制作用。

表 2 不同浓度天香丹对 tBHP 诱导的 HUVECs 存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	MTT(A)	存活率(%)
对照组	—	0.553 ± 0.030	100.00 ± 6.13
模型组	—	0.205 ± 0.023	$49.34 \pm 2.45^*$
阳性对照组	50	$0.330 \pm 0.023^{***\#}$	$64.51 \pm 2.39^\#$
天香丹低剂量组	30	$0.356 \pm 0.020^{***\#}$	$66.63 \pm 2.73^\#$
天香丹中剂量组	60	$0.430 \pm 0.019^{***\#}$	$79.52 \pm 1.00^{\#\#}$
天香丹高剂量组	90	$0.489 \pm 0.014^{***\#}$	$84.63 \pm 1.53^{\#\#}$

注:与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组相比, $^\#P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ 。

2.3 天香丹对 tBHP 诱导的 HUVECs 细胞内 LDH 活性、SOD 活力和 GSH 含量的影响

结果显示,与对照组相比,经 tBHP 诱导损伤后,细胞 LDH 的释放量显著上升($P < 0.01$),SOD 的活性和 GSH 的含量显著下降($P < 0.01$);与模型组相较,阳性药组和天香丹预处理组 LDH 释放量明显下降,SOD 的活性和 GSH 含量明显上升,如表 3 所示。

表 3 不同浓度天香丹对 tBHP 诱导的 HUVECs 细胞内 LDH 的活性、SOD 活力和 GSH 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

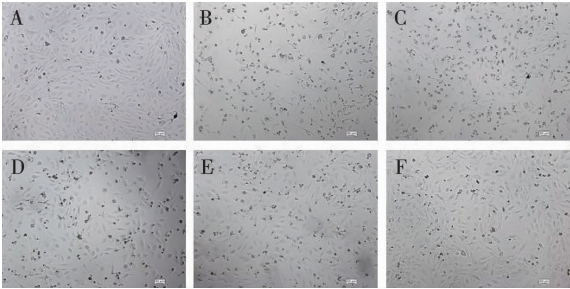
组别	剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	LDH(U/L)	SOD(U/mg)	GSH($\mu\text{mol/g}$)
对照组	—	$156.38 \pm 9.90^{\#\#}$	$16.55 \pm 0.31^{\#\#}$	$17.84 \pm 0.70^{\#\#}$
模型组	—	$49.34 \pm 2.45^*$	$10.00 \pm 0.57^{**}$	$5.66 \pm 0.22^{**}$
阳性对照组	50	$64.51 \pm 2.39^\#$	$13.39 \pm 0.60^{***\#}$	$8.60 \pm 0.32^{***\#}$
天香丹低剂量组	30	$66.63 \pm 2.73^\#$	$14.58 \pm 0.36^{***\#}$	$12.69 \pm 0.17^{***\#}$
天香丹中剂量组	60	$79.52 \pm 1.00^{\#\#}$	$16.34 \pm 0.54^{\Delta\#\#}$	$14.03 \pm 0.83^{***\#}$
天香丹高剂量组	90	$84.63 \pm 1.53^{\#\#}$	$17.78 \pm 0.53^{***\#}$	$15.58 \pm 0.53^{***\#}$

注:与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组相比, $^\#P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ 。

2.4 天香丹对 tBHP 诱导的 HUVECs 形态学的影响

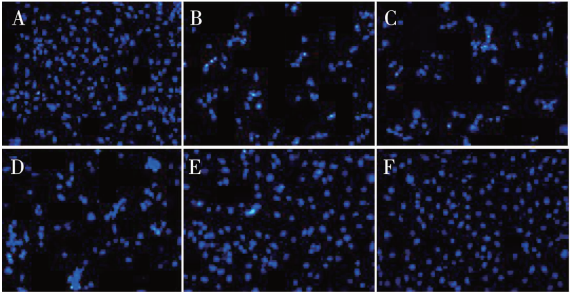
显微镜下观察结果如图 1 所示,模型组细胞在 tBHP 刺激下或皱缩或细胞破碎,同时因氧化应激导致膜蛋白活性改变等因素,细胞贴壁不良,漂浮细胞较多;阳性对照组和天香丹低剂量组与模型组相比稍有好

转,皱缩细胞减少,贴壁细胞数量增加但形态较差;天香丹中剂量组和高剂量组较模型组差异则更为明显,漂浮细胞明显减少,贴壁细胞数量较多,尤以高剂量组为最,形态呈梭形或多边形,彼此嵌合。提示维生素 C 和低、中、高剂量天香丹预处理后,均能有效改善 tBHP 诱导的 HUVECs 细胞形态损伤。

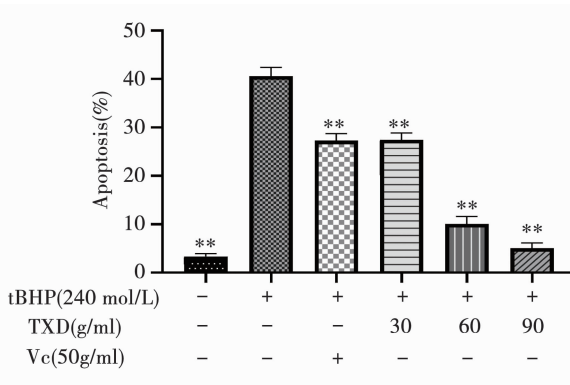


注:A. 对照组;B. 模型组;C. 阳性对照组;D. 天香丹低剂量组;E. 天香丹中剂量组;F. 天香丹高剂量组。

图 1 天香丹对 tBHP 诱导的 HUVECs 形态学影响($\times 100$)



注:A. 对照组;B. 模型组;C. 阳性对照组;D. 天香丹低剂量组;E. 天香丹中剂量组;F. 天香丹高剂量组。



注:与模型组比较,** $P < 0.01$ 。

图 2 天香丹对 tBHP 诱导的 HUVECs 细胞凋亡的影响($\times 200, n = 3$)

2.5 Hoechst 33258 荧光染色法检测天香丹对 tBHP 诱导的 HUVECs 细胞凋亡的影响

荧光显微镜下,染色结果如图 2 所示;对照组细胞核形态多为光滑圆形或椭圆形,核着色程度均一且荧光强度较低,对应细胞凋亡率维持在低水平 $(3.35 \pm 0.57)\%$;经 tBHP 诱导损伤后,细胞贴壁不良,视野范

围内细胞数量明显减少,细胞核形态由椭圆形转变为不规则形,甚至出现核泄漏,胞核也因染色质固缩而出现致密染色,荧光由蓝色转变为蓝白色甚或亮白色,经计算,凋亡率达到 $(40.62 \pm 1.78)\%$,较对照组明显上升;阳性对照药及天香丹预处理后,细胞核形态由不规则形逐渐转为椭圆形,细胞凋亡受到不同程度的抑制,凋亡率分别降至 $(27.26 \pm 1.48)\%$ 、 $(27.43 \pm 1.44)\%$ 、 $(10.08 \pm 1.52)\%$ 、 $(5.08 \pm 1.06)\%$,与模型组相比差异明显($P < 0.01$)。

3 讨论

冠状动脉微循环是指由直径300 μm 以内的微血管组成的供心脏血液流通的循环网,通过调节内皮剪切应力、血管舒缩和物质运输来保证局部血流与组织代谢供需相匹配^[4]。研究显示,当微循环发生结构或功能性障碍时,供需失衡会干扰心肌血流量的调控,对冠心病患者心肌灌注造成不利影响^[5]。CMD的形成原因多样,内皮功能障碍是其中的主要因素之一,其特征是氧化应激增加,NO生物利用度逐渐降低,进一步导致炎症反应。

氧化应激是机体在遭受刺激时,体内自由基成分包括活性氧(ROS)和活性氮(RNS)产生过多,氧化与抗氧化系统之间平衡失调的适应性反应。生理状态下,一定浓度的氧自由基参与细胞的氧化还原调节和正常代谢功能,如促有丝分裂反应和细胞因子的产生等,过量则可通过酶促和非酶促抗氧化系统清除^[2]。在冠心病心肌缺血缺氧等病理因素作用下,细胞ROS生成增加,高浓度ROS可对蛋白质和DNA进行不利修饰,引起生物活性改变,功能丧失,同时也可通过脂质过氧化作用破坏细胞膜完整性,导致膜结构重排^[6]。乳酸脱氢酶(LDH)是细胞损伤的判断指标,其水平反应了细胞膜受损程度;超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)是机体重要的内源性抗氧化因子,前者通过歧化方式将超氧化物转化为 H_2O_2 ,再经由后者转化为氧和水,从而发挥清除氧自由基,减轻氧化应激损伤的作用^[7]。tBHP是常见的体外氧化应激模型诱导剂,可引起脂质过氧化反应并损伤DNA,从而导致细胞损伤甚或凋亡,相较 H_2O_2 具有稳定、不易分解的优点^[8-9],因此本研究采用tBHP作为诱导剂建立细胞氧化应激损伤模型。研究结果显示,HUVECs经240 $\mu\text{mol/L}$ tBHP作用24 h后,LDH释放量显著升高,而SOD的活性及GSH含量明显降低,表明tBHP可有效诱导HUVECs产生氧化应激损伤。

根据冠脉微循环障碍的临床特点,中医将其归为“胸痹”“脉痹”的范畴,治宜益气活血、化瘀通络^[10]。

天香丹由新塔花、丹参、降香和红景天4味中药配伍而成,既有益气补虚之功,又奏和血通络之效,可显著改善冠心病患者心肌缺血缺氧症状。既往研究显示,天香丹主药新塔花总黄酮具有舒张血管、抗氧化应激、保护血管内皮细胞的作用^[11-12];降香可通过抑制氧化应激反应改善后负荷增加型心衰大鼠的心脏功能,提高心肌细胞存活率,其中的新黄酮成分还对缺氧复氧导致的细胞损伤具有明显保护作用^[13-14]。而本实验对受损细胞存活率和细胞中LDH、SOD、GSH的检测结果显示,经过不同浓度天香丹及天然抗氧化剂维生素C预处理后,细胞存活率逐渐上升,SOD的活性和GSH含量较模型组提升明显,LDH释放量也有所减轻。提示我们,天香丹能通过增强细胞自由基清除力,有效遏制外源性氧化剂对HUVECs的损伤。

细胞凋亡是维持细胞内环境稳态的一种程序性死亡方式,也是导致内皮功能障碍,影响内皮功能的病理环节之一,氧化应激是其重要诱导因素:一方面细胞内ROS堆积可诱导线粒体通透性转化孔开放,通过破坏细胞膜电位介导细胞凋亡,另一方面ROS也可通过上调p53及p66shc的表达,引起DNA损伤进而导致细胞凋亡^[15-16]。细胞凋亡的发生并非朝夕至,通过有效干预手段仍有部分逆转细胞凋亡,保护细胞免于过度损伤的可能。Hoechst 33258是一种脱氧核糖核酸粘合剂,可与DNA相互结合,是目前常用细胞凋亡检测方法^[17]。本研究对细胞核染色结果显示,240 $\mu\text{mol/L}$ tBHP作用24 h能明显诱导细胞凋亡,引起染色质固缩及核泄漏,而经过维生素C及天香丹预处理后细胞凋亡率逐渐下降,天香丹高剂量组凋亡率与对照组相比更无明显差异($P > 0.05$),提示天香丹能部分逆转细胞凋亡,且这种抑制凋亡的作用在一定范围内与浓度呈正相关。

综上所述,天香丹能保护内皮细胞免于氧化损伤,而这种保护作用可能与抗氧化通路的激活,自由基清除力的增强及细胞凋亡的部分逆转有关。该实验为天香丹在CMD的预防和治疗提供了一定的科学依据,但天香丹对HUVECs保护作用的分子机制仍待进一步阐明。

参考文献:

- [1] PADRO T, MANFRINI O, BUGIARDINI R, et al. ESC Working Group on Coronary Pathophysiology and Microcirculation position paper on 'coronary microvascular dysfunction in cardiovascular disease' [J]. Cardiovascular Research, 2020, 116(4): 741-755.
- [2] SABBATINO F, CONTI V, LIGUORI L, et al. Molecules and Mechanisms to Overcome Oxidative Stress Inducing Cardiovascular Disease in Cancer Patients [J]. Life, 2021, 11(2): 105.

- [3] 马学宽,古丽葛娜·萨吾尔,辛锦钰,等. 天香丹对冠脉微循环障碍大鼠血清中 MDA、SOD、GSH - Px 表达的影响[J]. 新疆医科大学学报,2020,43(5):634-636,641.
- [4] PRIES A R, REGLIN B. Coronary microcirculatory pathophysiology: can we afford it to remain a black box? [J]. European heart journal, 2017,38(7):478-488.
- [5] CAMICI P G, D'AMATI G, RIMOLDI O. Coronary microvascular dysfunction: mechanisms and functional assessment [J]. Nature Reviews Cardiology, 2015,12(1):48-62.
- [6] BIRBEN E, SAHINER U M, SACKESSEN C, et al. Oxidative stress and antioxidant defense [J]. World Allergy Organization Journal, 2012, 5(1):9-19.
- [7] 刘小菊,雷新,张润峰. 氧化应激反应在冠心病发病中的作用研究进展[J]. 岭南心血管病杂志,2020,26(5):615-618.
- [8] 金芳多,张天,张钊,等. 芦丁对肝细胞氧化应激损伤的保护作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版),2020,46(6):1117-1123,1345.
- [9] 鄢黎,何乡,马泽康,等. 樱柏酸对叔丁基过氧化氢诱导 SH - SY₅Y 神经细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中山大学学报(自然科学版),2020,59(3):51-58.
- [10] 张娟,薛一涛. 冠状动脉微循环障碍中医治疗研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2021,23(4):153-156.
- [11] ZHANG X M, AN D Q, GUO L L, et al. Identification and screening of active components from Ziziphora clinopodioides Lam. in regulating autophagy [J]. Nat Prod Res. 2019,33(17):2549-2553.
- [12] 张选明,安冬青,张华,等. 芳香新塔花总黄酮对过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2018,34(5):60-64.
- [13] 张妮,陈兰英,骆瑶,等. 降香新黄酮 latifolin 通过 Nr2/HO - 1 通路抗 H₂O₂ 细胞缺氧复氧损伤作用研究 [J]. 中药材, 2019, 42(7):1629-1634.
- [14] 赵美娜,肖凡,李国华,等. 降香通过抗氧化应激改善后负荷增加型心衰小鼠的心脏功能[J]. 现代生物医学进展,2018,18(10):1842-1848.
- [15] LANG J Y, MA K, GUO J X, et al. Oxidative stress induces B lymphocyte DNA damage and apoptosis by upregulating p66shc [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018,22(4):1051-1060.
- [16] XU X G, XU Y, ZHANG Q, et al. Porcine epidemic diarrhea virus infections induce apoptosis in Vero cells via a reactive oxygen species (ROS)/p53, but not p38 MAPK and SAPK/JNK signalling pathways [J]. Vet Microbiol, 2019,232:1-12.
- [17] AMIRBEKYAN K Y, SHAHINYAN G A, GHAZOYAN H H, et al. Fluorescence anisotropy studies on the Hoechst 33258 - DNA interaction: the solvent effect [J]. J Biomol Struct Dyn, 2021,39(13):4902-4906.

Protective Effect of Tianxiang Dan on Oxidative Stress of HUVECs

XIN Jinyu¹, ZHANG Yajie¹, Guligena Sawuer¹, HE Huan¹, REN Shan¹, AN Dongqing¹

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Xinjiang Key Laboratory of Famous Prescription and Science of Formulas, Urumqi 830011, China)

Abstract: Objective: To investigate the protective effect of Tianxiang Dan on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) injured by tert - butyl hydroperoxide (tBHP). Methods: HUVECs were divided into the control group, the model group, the vitamin C group and the Tianxiang Dan groups of low - dose (30 $\mu\text{g/ml}$), medium - dose (60 $\mu\text{g/ml}$) and high - dose (90 $\mu\text{g/ml}$). The optimal concentration of tBHP was screened by MTT, and the protective effect of Tianxiang Dan on oxidative damage of HUVECs was evaluated. Microplate method and WST method were used to detect the expressions of lactate dehydrogenase (LDH), reduced glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) in each group. The morphological changes of the cells were observed under a microscope in each group, and the apoptosis was observed by Hoechst 33258 fluorescent staining. Results: After induction by tBHP for 24 hours, the cell survival rate, the activity of SOD and the level of GSH were significantly lower ($P < 0.01$), and the release of LDH and the apoptosis rate were significantly increased in the model group than those in the control group ($P < 0.01$). The cell survival rate, the activity of SOD and the level of GSH were significantly increased, and the release of LDH and the apoptosis rate were reduced after the interventions of vitamin C and after the interventions of different concentrations of Tianxiang Dan compared to those in the model group ($P < 0.01$). Conclusion: Tianxiang Dan has the effect of protecting HUVECs from oxidative stress, and its mechanism may be related to the activation of antioxidant pathways, the enhancement of antioxidant capacity and the reversal of cell apoptosis.

Key words: Oxidative stress; tBHP; Tianxiang Dan; Human umbilical vein endothelial cells