基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.000778

# 姜黄素对氧化性低密度脂蛋白诱导的内皮细胞迁移能力的影响

曹 黎，张冬颖，刘 剑
重庆医科大学附属第一医院心内科、眼科学重庆市市级重点实验室，重庆 400016）

[摘 要]目的：研究姜黄素（Curcumin）对氧化性低密度脂蛋白（oxidized low-density lipoprotein，ox-LDL）诱导的内皮细胞迁移能力的影响，并探讨其可能的机制。方法：体外培养人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial cells，HUVECs），不同浓度的 ox-LDL 处理 HUVECs 24 h 后，流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验分为正常对照组、ox-LDL 组、Crcumin 预处理+ox-LDL 组。激光共聚焦检测氧自由基（reactive oxygen species，ROS）；酶标仪法测一氧化氮（nitric oxide，NO）；Westren blot 测定一氧化氮合酶（endothelial nitric oxide synthase，eNOS）、磷酸化一氧化氮合酶（ser1177 位点）（phosphorylated eNOS$^{S1177}$，p-eNOS$^{S1177}$）、蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）、磷酸化蛋白激酶 B（Ser473 位点）（phosphorylated Akt$^{S473}$，p-Akt$^{S473}$）表达水平；细胞迁移实验检测 HUVECs 迁移能力。结果：高浓度的 ox-LDL 促进 HUVECs 凋亡（$P$=0.010）。与对照组比较，ox-LDL 促进 ROS 生成（$P$=0.001），降低 NO 含量（$P$=0.000），下调 p-Akt$^{S473}$、p-eNOS$^{S1177}$ 蛋白表达（$P$=0.000，$P$=0.000），抑制了 HUVECs 迁移能力（$P$<0.05）；与 ox-LDL 组比较，Curcumin 预处理能够显著地降低 ROS 水平（$P$<0.05），增加 p-Akt$^{S473}$、p-eNOS$^{S1177}$ 蛋白表达（$P$<0.05，$P$<0.05），提高 NO 水平（$P$<0.05），并且增加细胞迁移能力（$P$<0.05）。结论：姜黄素抑制 ox-LDL 诱导的 ROS 生成，可能通过 Akt/eNOS/NO 通路改善了内皮细胞的迁移能力。

[关键词]氧化性低密度脂蛋白；人脐静脉内皮细胞；细胞迁移；姜黄素
[中图分类号]Q256 [文献标志码]A [收稿日期]2015-04-12

# Effect of Curcumin on migration of human umbilical vein endothelial cell induced by oxidized low-density lipoprotein

*Cao Li, Zhang Dongying, Liu Jian*
*Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology)*

[Abstract] ***Objective*** To investigate the effect of Curcumin on the migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL). ***Methods*** The HUVECs were cultured *in vitro* and treated with ox-LDL in different concentrations for 24 h, the apoptosis rate was determined by flow cytometry. Cells were divided into three groups: normal control group, ox-LDL treatment group, curcumin pretreatment+ox-LDL group. The concentration of reactive oxygen species (ROS) was measured by laser confocal microscopy, the level of nitric oxide (NO) was dectected by method of colorimetry, the protein levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), phosphorylated eNOS$^{S1177}$ (p-eNOS$^{S1177}$), protein kinase B (Akt) and phosphorylated Akt$^{S473}$ (p-Akt$^{S473}$) were detected by Western blot, the migration ability of endothelial cells was measured by transwell method. ***Results*** High concentrations (≥40 mg/L) of ox-LDL increased the apoptosis rate significantly ($P$=0.010). Compared with those of control group, the level of ROS ($P$=0.001) was obviously increased by ox-LDL, phosphorylation of Akt$^{S473}$, eNOS$^{S1177}$, concentration of NO and the migration ability significantly were inhibited ($P$=0.000, $P$=0.000, $P$=0.000). Compared with those of ox-LDL treatment group, the generation of ROS ($P$<0.05) was reduced by curcumin pretreatment, and the phosphorylation of Akt$^{S473}$, eNOS$^{S1177}$, the concentration of NO ($P$<0.05, $P$<0.05, $P$<0.05) and the ability of migration were increased significantly ($P$<0.05). ***Conclusion*** Curcumin inhibits the production of ROS induced by ox-LDL, and may increase the phosphorylation of Akt$^{S473}$ and eNOS$^{S1177}$ to promote the ability of endothelial cell migration.

[Key words] oxidized low-density lipoprotein; human umbilical vein endothelial cells (HUVECs); cell migration; Curcumin

作者介绍：曹 黎，Email:85001075@qq.com，
研究方向：冠心病的机制研究。
通信作者：刘 剑，Email:liujian 819@126.com。
基金项目：重庆市卫生局中医药科技资助项目（编号：2012-2-125）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150929.1943.012.html（2015-09-29）

动脉粥样硬化、动脉栓塞、血栓形成是机体缺血性疾病的重要组成部分，伴随着动脉粥样硬化病变的增多，机体缺血性疾病的发生率也日益增加。脂质代谢的紊乱可直接影响血管内皮功能，减弱微血管的再生能力[1]。氧化性低密度脂蛋白（oxidized low-density lipoprotein，ox-LDL）能提高血管壁内的氧自由基（reactive oxygen species，ROS）水平[2]，引起内皮细胞的功能障碍[3]。一氧化氮（nitric oxide，NO）可以介导内皮依赖的血管舒张功能，调节血管的舒缩状态。并且研究显示 NO 可促进内皮细胞的迁移[4]，在血管形成方面有重要的作用[5]，内皮细胞的激活，依赖于磷脂酰肌醇 3 激酶（phosphatidyl inositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）/一氧化氮合酶（endothelial nitric oxide synthase，eNOS）通路的作用[6]，活化的内皮细胞促进 NO 的释放。从而促进缺血区域侧支循环的建立，促进伤口的愈合，减轻组织器官的缺血性损伤。

姜黄素（Curcumin）是中药姜黄的主要成分，具有抗炎，抗感染功效[7-8]。姜黄素可以减少内源性胆固醇的合成，抑制细胞对 ox-LDL 的摄取，起到降脂作用[9]，而其独特的化学结构使其有广泛的清除氧自由基的作用[10]，通过上调 eNOS 的活性，减轻内皮细胞的功能障碍，有利于改善血管功能，起到组织抗缺血的作用。

因此，本实验在体外 ox-LDL 作用下，模拟高脂、高氧化应激的环境，建立 ox-LDL 诱导的氧化应激损伤模型，观察姜黄素对内皮细胞功能及内皮细胞的迁移能力的影响，检测 Akt/eNOS/NO 通路活化状态，探讨其可能的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人脐静脉细胞株，购于南京凯基生物公司；RPMI1640、胎牛血清购自 Gibco 公司；姜黄素购自 Sigma 公司；ox-LDL 购于北京协生公司；总一氧化氮检测试剂盒、活性氧检测试剂盒、SDS-PAGE 凝胶试剂盒、ECL 化学发光试剂盒、山羊抗兔二抗购自碧云天公司；兔抗人 Akt 抗体、兔抗人 p-Akt 抗体、兔抗人 eNOS 抗体、兔抗人 p-eNOS 抗体购自 Cell Signalling 公司；Transwell 小室购于 BD 公司。

### 1.2 HUVECs 细胞培养及实验分组

HUVECs 培养用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基，置于 37 ℃，5%$CO_2$ 饱和湿度的培养箱中传代培养，细胞贴壁生长 24 h 后，细胞融合度在 80%左右时用于后续实验。

实验分组：对照组：正常细胞培养液培养；ox-LDL 组：ox-LDL（20 mg/L）处理细胞 24 h；Curcumin 预处理组：不同浓度 Curcumin（5 μmol/L，12.5 μmol/L，25 μmol/L）预处理 2 h 后，加入 ox-LDL 共同培养 24 h。

### 1.3 HUVECs 细胞存活率测定

取对数生长期细胞 $1\times10^4$ 个/100 μl 接种于 96 孔板，96 孔板边缘接种无菌 PBS 缓冲液以减缓蒸发；贴壁生长 24 h 后，对照组加入培养基 100 μl，Curcumin 组分别加入浓度为 5、12.5、25、50 和 100 μmol/L 的 Curcumin；细胞培养箱孵育 24 h；去除培养液，更换无血清培养基；每孔加入 CCK-8 溶液 10 μl 孵育 1.5 h；酶标仪检测 450 nm 处各孔的吸光度，计算 HUVECs 存活率。

### 1.4 HUVECs 凋亡率测定

取对数生长期细胞 $5\times10^4$ 个接种于 6 孔板，贴壁生长 24 h 后，加入含不同浓度的 ox-LDL：0、10、20、40、80、160 mg/L 无血清培养基培养 24 h，收集细胞并吹打成细胞悬液，Annexin-V 和 PI 染色后，流式检测细胞凋亡率。根据细胞凋亡结果选择最佳的 ox-LDL 处理浓度。

### 1.5 NO 含量测定

取对数生长期的细胞按 $5\times10^4$ 个/孔接种于 6 孔板，贴壁生长 24 h 后，实验分组和处理同 1.3，处理结束后分别提取 5 个组的细胞裂解上清液；按总一氧化氮检测试剂盒说明书操作；酶标仪检测 540 nm 处各孔的吸光度；计算各组细胞内的 NO 水平，单位为 μmol/L。

### 1.6 ROS 测定

取对数生长期细胞按 $5\times10^4$ 个/孔接种于共聚焦培养皿，细胞贴壁生长 24 h，处理同 NO 测定；加入浓度为 10 μmol/L DCFH-DA 探针，在 37 ℃培养箱中孵育 20 min；无血清培养基洗涤细胞 3 次；激光共聚焦显微镜检测荧光探针；Image-Pro Plus 6.0 软件分析绿色荧光的强度。

### 1.7 Transwell 检测细胞迁移能力

取孔径为 0.8 μmol/L 的 Transwell 小室放入 24 孔板中；常规细胞消化计数后取 200 μl 共计 $2\times10^4$ 个细胞于上室（不含血清），下室各组分别加入完全培养液及含、ox-LDL（20 mg/L）、Curcumin（25 μmol/L）+ox-LDL 的完全培养液各 500 μl，培养 24 h；棉签擦去上室细胞；4%多聚甲醛固定 15 min；0.1%结晶紫染色 10 min；显微镜下随机选取 3 个清晰视野统计迁移细胞个数，计算各组平均值。

### 1.8 Western blot 检测 Akt、p-Akt、eNOS、p-eNOS 蛋白表达水平

每组取 50 μg 蛋白上样，SDS-PAGE 凝胶电泳 2 h，冰浴中恒流 250 mA 电转（Akt 75 min；p-Akt 80 min；eNOS 200 min；p-eNOS 200 min）；5%脱脂奶粉（Akt、eNOS）或 5%BSA（p-$Akt^{S473}$、p-$eNOS^{S1177}$）封闭 2 h；一抗 4 ℃孵育过夜：Akt（1∶1 000）、p-$Akt^{S473}$（1∶1 000）、eNOS（1∶500）、p-$eNOS^{S1177}$（1∶500）；HRP 标记的山羊抗兔二抗（1∶2 000）37 ℃孵育 1 h；ECL 化学

显色；$p\text{-Akt}^{S473}$、$p\text{-eNOS}^{S1177}$ 的相对含量以 Akt、eNOS 总蛋白作为参照。利用 Quantity one 测定条带灰度值，计算各组蛋白的相对表达量，每组重复 3 次。

### 1.9 统计学分析

数据采用 SPSS 19.0 统计软件分析。计量资料采以均数± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，行方差齐性检验，多组均数比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-$t$ 法；采用析因设计方差分析行不同时间点、不同处理的主效应和两者交互效应分析，检验水准 $\alpha=0.05$。

## 2 结 果

### 2.1 不同浓度姜黄素对 HUVECs 细胞增殖率的影响

CCK-8 结果显示：与对照组相比，当 Curcumin 浓度大于等于 50 μmol/L 时，细胞存活率降低（$P=0.009$，$P=0.000$），差异有统计学意义，提示高浓度的 Curcumin 对细胞有明显的毒性，因此选用 25 μmol/L 作为后续细胞处理浓度（见表 1）。

表 1 HUVECs 生存率

Tab.1 Cell viability of HUVECs

| 组别 | 细胞存活率（%） | $P$ 值 |
|---|---|---|
| 对照组 | 1.000± 0.000 | - |
| Curcumin（5 μmol/L）组 | 1.017± 0.030 | 0.858 |
| Curcumin（12.5 μmol/L 组 | 1.019± 0.064 | 0.983 |
| Curcumin（25 μmol/L）组 | 0.996± 0.054 | 1.000 |
| Curcumin（50 μmol/L）组 | 0.835± 0.031[a] | 0.009 |
| Curcumin（100 μmol/L）组 | 0.485± 0.036[a] | 0.000 |
| $F$ 值 | 104.891 | |
| $P$ 值 | 0.000 | |

注：a，与对照组比较，$P<0.01$

### 2.2 不同浓度 ox-LDL 对 HUVECs 细胞凋亡率的影响

流式结果显示：与对照组相比，不同浓度的 ox-LDL（40、80、160 mg/L）处理细胞 24 h，均可增加内皮细胞的凋亡率，随着 ox-LDL 浓度的增加，细胞凋亡率增加（$P=0.010$，$P=0.000$，$P=0.000$）；而 ox-LDL 的浓度在等于或小于 20 mg/L 时，与对照组相比，细胞凋亡率没有明显的差异（$P=0.246$）。ox-LDL 的浓度在 20 mg/L 时，既能保证良好的建模效果，又能使各组凋亡率无明显差异，保证了后续细胞迁移实验时起始迁移细胞数目的一致，因此选用 ox-LDL 20mg/L 作为后续的细胞处理浓度（见图 1，表 2）。

表 2 HUVECs 凋亡率数值

Tab.2 Cell apoptosis of HUVECs

| 组别 | 细胞存活率（%） | $P$ 值 |
|---|---|---|
| 对照组 | 4.053± 0.794 | - |
| ox-LDL（10 mg/L）组 | 6.650± 1.416 | 0.303 |
| ox-LDL（20 mg/L）组 | 6.860± 1.169 | 0.246 |
| ox-LDL（40 mg/L）组 | 9.590± 2.103[a] | 0.010 |
| ox-LDL（80 mg/L）组 | 15.387± 2.940[a] | 0.000 |
| ox-LDL（160 mg/L）组 | 27.200± 1.6434[a] | 0.000 |
| $F$ 值 | 63.981 | |
| $P$ 值 | 0.000 | |

注：a，与对照组比较，$P<0.010$

### 2.3 姜黄素对 ox-LDL 诱导下 HUVECs 细胞内 NO 含量的影响

NO 检测结果显示：与对照组相比，ox-LDL 组细胞 NO 含量下降（$P=0.000$），差异有统计学意义；与 ox-LDL 组相比，Curcumin 可成可增加细胞内 NO 含量（$P=0.735$，$P=0.011$，$P=0.001$），随着 Curcumin 浓度增加，细胞内 NO 含量呈增多的趋势（见表 3）。

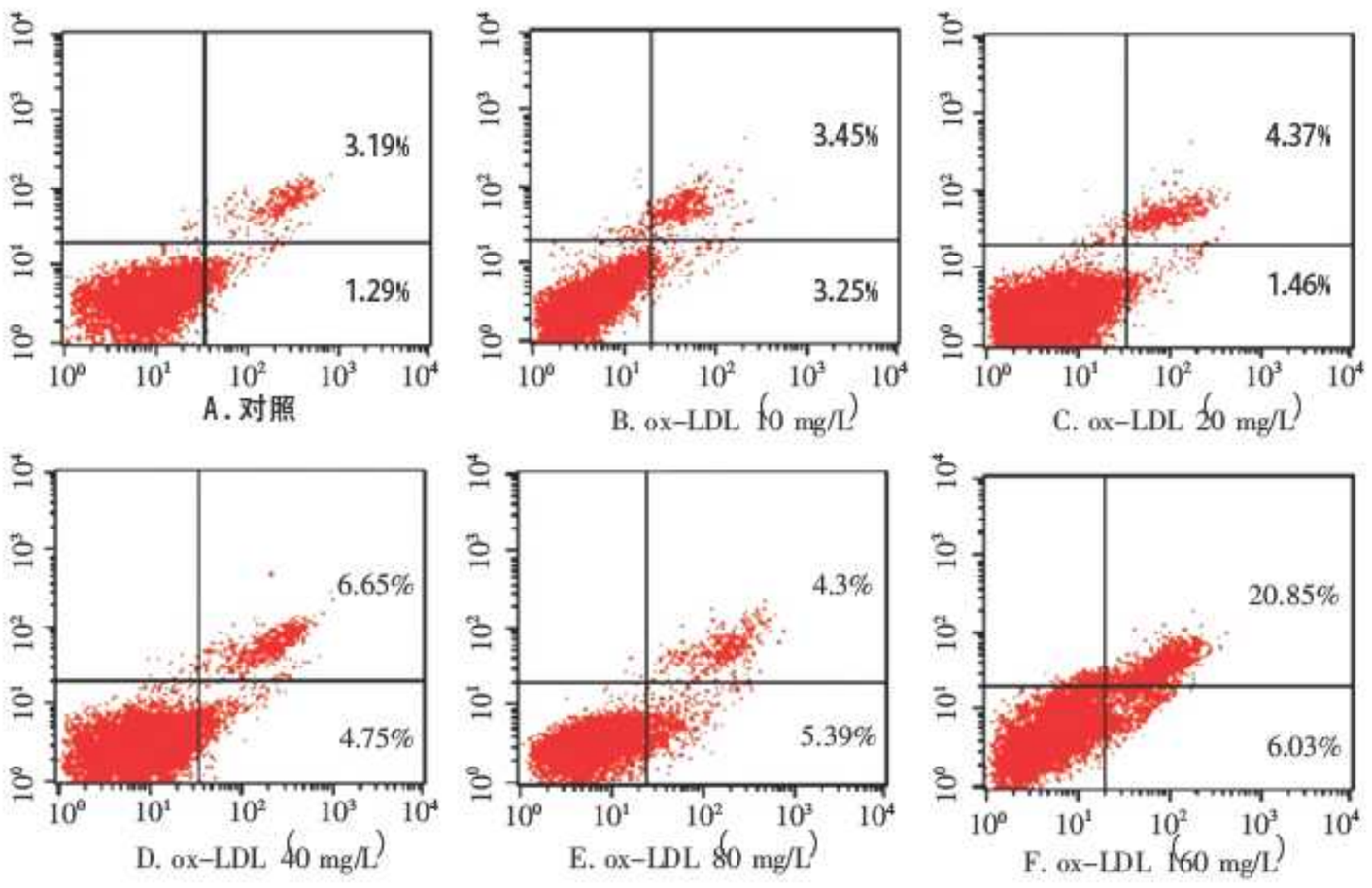



图 1 流式细胞仪检测 HUVECs 细胞凋亡率

Fig.1 Cell apoptosis rate of HUVECs detected by FCM

2.4 姜黄素对 ox-LDL 诱导下 HUVEC 细胞内 ROS 含量的影响

ROS 检测结果显示：对照组细胞处于一个较低的氧化应激状态。与对照组相比，ox-LDL 组 ROS 生成明显增加（$P=0.001$）；与 ox-LDL 组相比，不同浓度 Curcumin 预处理使 ROS 生成明显减少（$P=0.026$，$P=0.002$，$P=0.01$），差异有统计学意义（见图 2，表 3）。

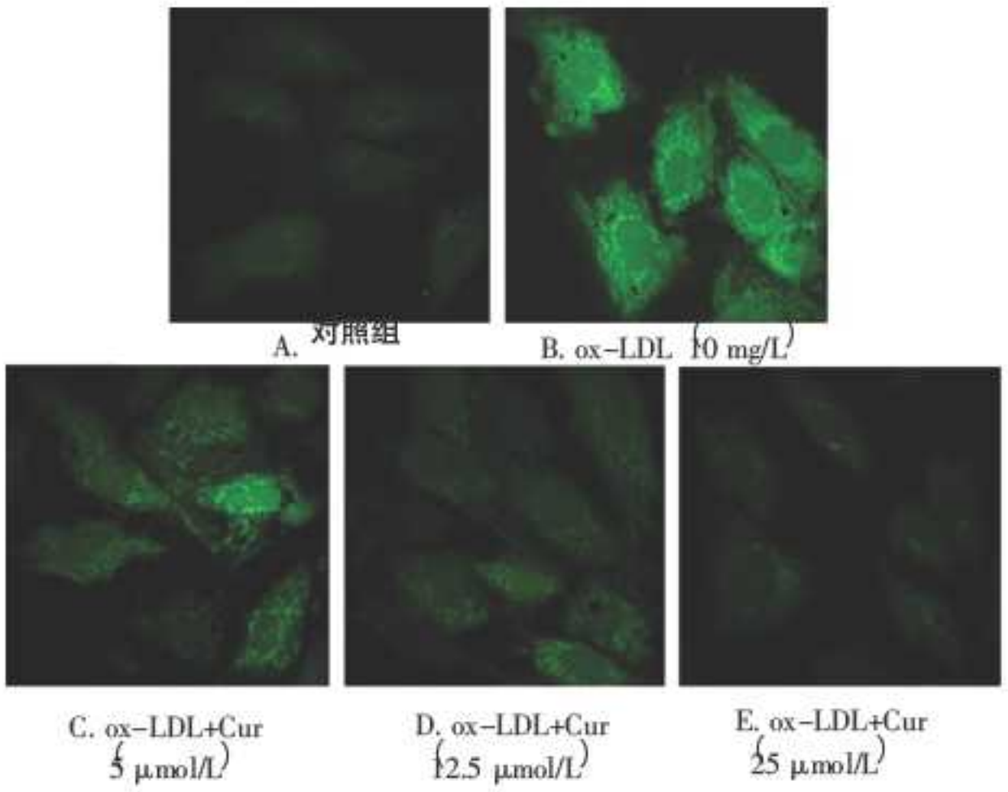



图 2 激光共聚焦显微镜观察 ROS 荧光强度（400×）

Fig.2 DCFH flurescence intensity in HUVECs measured by laser confocal microscopy（400×）

表 3 HUVECs 胞内 NO 和 ROS 含量

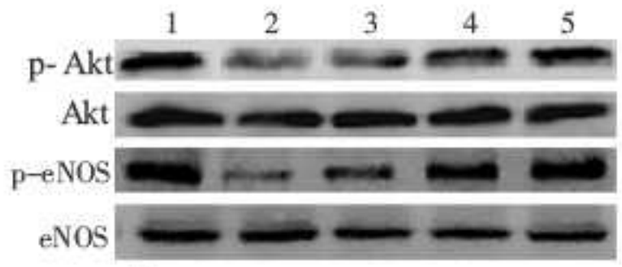
Tab.3 NO and ROS contents in HUVECs

| 组别 | NO含量 | ROS荧光强度 |
|---|---|---|
| 对照组 | 0.530± 0.041 | 21.508± 4.098 |
| ox-LDL 组 | 0.259± 0.025[a] | 97.362± 15.589[a] |
| Curcumin 5 μmol/L+ox-LDL 组 | 0.275± 0.047 | 56.943± 16.706[b] |
| Curcumin 12.5 μmol/L+ox-LDL 组 | 0.402± 0.075[b] | 35.892± 7.529[b] |
| Curcumin 25 μmol/L +ox-LDL 组 | 0.475± 0.075[b] | 19.760± 3.531[b] |
| *F* 值 | 13.641 | 50.305 |
| *P* 值 | 0.000 | 0.000 |

注：NO 含量：a，与对照组比较，$P=0.000$；b，与 ox-LDL 组比较，$P<0.05$；ROS 荧光强度：a，与对照组比较，$P=0.001$；b，与 ox-LDL 组比较，$P<0.05$

2.5 姜黄素对 ox-LDL 诱导下 HUVECs 胞内 Akt、p-Akt$^{S473}$、eNOS、p-eNOS$^{S1177}$ 含量的影响

Western blot 结果显示：与对照组比较，ox-LDL 组细胞内 p-Akt$^{S473}$、p-eNOS$^{S1177}$ 磷酸化水平明显降低（$P=0.000$、$P=0.000$），细胞内总 Akt、eNOS 表达没有明显变化；与 ox-LDL 组相比，不同浓度的 Curcumin 预处理可增加 Akt$^{S473}$（$P=0.018$、$P=0.000$、$P=0.000$）、eNOS$^{S1177}$（$P=0.073$、$P=0.001$、$P=0.000$）位点磷酸化水平，差异有统计学意义（见图 3、表 4）。




1. 对照组；2. ox-LDL 组；3. Curcumin 5 μmol/L+ox-LDL 组；4. Curcumin 12.5 μmol/L+ox-LDL 组；5. Curcumin 25 μmol/L+ox-LDL 组

图 3 Western blot 检测细胞细内 Akt，p-Akt$^{S473}$，eNOS，p-eNOS$^{S1177}$ 表达水平

Fig.3 Expression of Akt，p-Akt$^{S473}$，eNOS，p-eNOS$^{S1177}$ in HUVECs measured by Western blot

表 4 HUVECs 胞内 Akt、p-Akt$^{S473}$、eNOS、p-eNOS$^{S1177}$ 表达

Tab.4 Levels of Akt，p-Akt$^{S473}$，eNOS，p-eNOS$^{S1177}$ in HUVECs

| 组别 | p-Akt$^{S473}$/Akt 比值 | p-eNOS$^{S1177}$/eNOS 比值 |
|---|---|---|
| 对照组 | 0.692± 0.014 | 0.794± 0.018 |
| ox-LDL 组 | 0.140± 0.029[a] | 0.217± 0.118[a] |
| Curcumin 5 μmol/L+ox-LDL 组 | 0.247± 0.030[b] | 0.369± 0.111 |
| Curcumin 12.5 μmol/L+ox-LDL 组 | 0.532± 0.053[b] | 0.588± 0.104[b] |
| Curcumin 25 μmol/L +ox-LDL 组 | 0.625± 0.077[b] | 0.640± 0.076[b] |
| *F* 值 | 81.328 | 18.125 |
| *P* 值 | 0.000 | 0.000 |

注：p-Akt$^{S473}$/Akt 比值：a，与对照组比较，$P=0.000$；b，与 ox-LDL 组比较，$P<0.05$；p-eNOS$^{S1177}$/eNOS 比值：a，与对照组比较，$P=0.000$；b，与 ox-LDL 组比较，$P<0.01$

2.6 姜黄素对 ox-LDL 诱导下 HUVECs 迁移能力的影响

迁移实验结果表明：时间点主效应（$F=129.356$，$P=0.000$）、组别因数主效应（$F=42.438$，$P=0.000$）组别时间点交互作用（$F=5.601$，$P=0.001$），表明时间点可影响细胞的迁移数，组别和时间点存在着交互作用。随着 HUVECs 迁移时间增加，各组的迁移细胞数增加（$P<0.05$）。时间点固定，各处理组的迁移细胞数比较：24 h 时间点 ox-LDL 组 HUVECs 的迁移数目较对照组明显减少（$P=0.000$）；与 ox-LDL 组相比，Curcumin 预处理能够增加 HUVECs 迁移数目（$P=0.024$），差异有统计学意义（见图 4，表 5）。

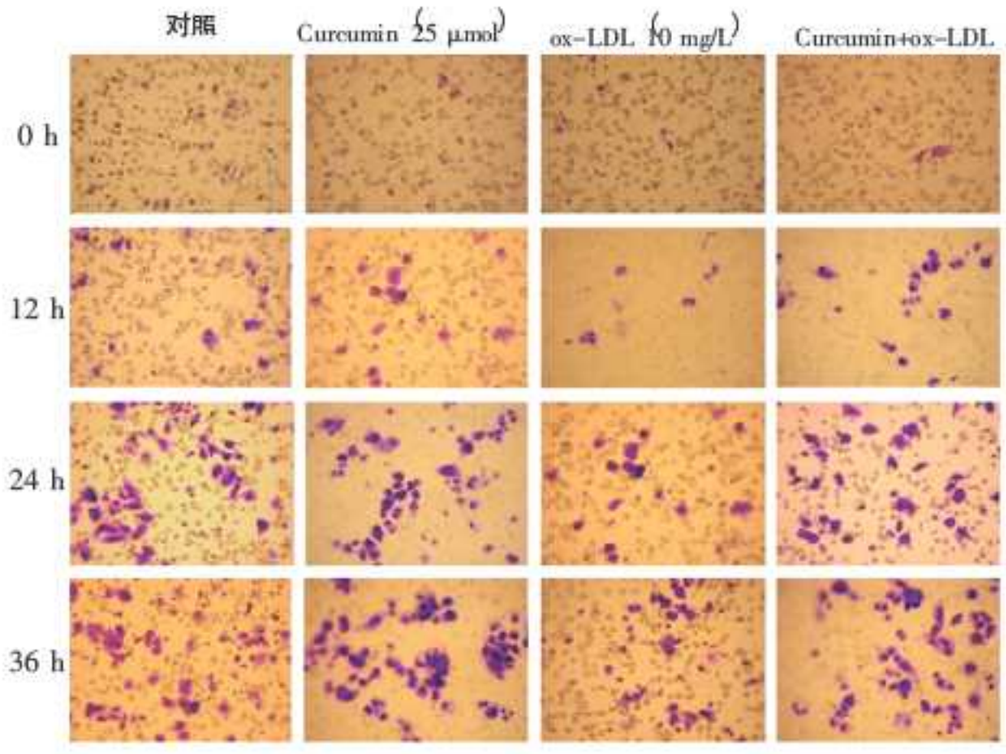



图 4 Transwell 检测姜黄素和 ox-LDL 对 HUVECs 细胞迁移能力的影响（200×）

Fig.4 Effect of Curcumin and ox-LDL on the migration of HUVECs detected by Transwell method（200×）

表 5 Transwell 检测 HUVECs 细胞迁移数目

Tab.5 Number of the migration of HUVECs

| 组别 | 0 h | 12 h | 24 h | 36 h |
|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 0 | 15.343± 2.008 | 40.687± 6.455 | 53.133± 4.473 |
| Curcumin组 | 0 | 16.640± 0.763 | 42.590± 4.025 | 53.783± 53.783 |
| ox-LDL组 | 0 | 8.637± 8.637[a] | 16.747± 2.575[a] | 25.550± 5.300[a] |
| Curcumin+ox-LDL组 | 0 | 18.820± 4.783[b] | 27.723± 5.362[b] | 40.960± 5.316[b] |

注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与 ox-LDL 组比较，$P<0.05$

## 3 讨 论

缺血性疾病如动脉栓塞、动脉粥样硬化可导致机体组织器官的缺血，发生组织的坏死及功能障碍。脂质代谢紊乱尤其是高胆固醇血症可影响血管内皮功能。ox-LDL 是促进动脉粥样硬化斑块形成和进展的重要危险因素，促进血管的炎症反应[11]，增加血管的僵硬度，抑制血管形成能力[12]。

ox-LDL 可引起内皮细胞功能障碍，高浓度的 ox-LDL 甚至导致内皮细胞凋亡[13]；另一方面，Heinloth[14]发现低浓度的 ox-LDL 可促进内皮细胞的增殖，表明高、低浓度的 ox-LDL 对细胞的功能影响有明显的差异。本实验 ox-LDL 细胞处理浓度为 20 mg/L，未见 ox-LDL 对 HUVECs 明显的增殖及凋亡的效应；而当 ox-LDL 浓度大于 40 mg/L 时，高浓度的 ox-LDL 对细胞有明显的促凋亡效应。Transwell 方法检测内皮细胞的迁移的结果显示：在高脂高氧化应激外环境中，内皮细胞的迁移能力降低。

NO 是机体缺血后血管形成的重要调节因子[15]。Paul[16]发现在 eNOS 基因敲除的小鼠，其缺血区血管生长速度，伤口愈合速度明显延迟；Luciano[17]研究显示细胞内氧化应激的增加可减少 NO 含量，抑制内皮细胞的功能。为了明确 ox-LDL 抑制内皮细胞迁移能力的机制，分别检测了 NO、ROS 含量，结果显示：ox-LDL 可增加细胞内的 ROS 含量，降低 NO 水平，表明内皮细胞在高脂高氧化应激外环境中内皮功能损伤。

相关研究提示 PI3K/Akt/eNOS 通路的活化影响 NO 介导的内皮细胞迁移及微血管形成[2]。Emmanouil[18]发现，ox-LDL 通过抑制 Akt/eNOS 磷酸化，减少内皮细胞内 NO 的含量，从而降低血管内皮生长因子诱导下内皮细胞的迁移能力，表明了 Akt/eNOS/NO 通路的活化对于细胞迁移有重要作用。本实验进一步 Western 结果显示：ox-LDL 下调了 $Akt^{S473}$/$eNOS^{S1177}$ 位点磷酸化水平，表明 ox-LDL 降低 HUVECs 迁移能力可能与抑制 Akt/eNOS/NO 通路活化相关，而 ROS 在其中起到了关键作用。

作为中药姜黄中的关键有效成分，姜黄素具有较强的抗氧化、消除氧自由基的能力。Curcumin 通过增加抗氧化酶类如：过氧化氢酶、超氧化物歧化酶[7]和增加抗氧化产物如：谷胱甘肽（glutathione，GSH）[19]来减轻细胞内的氧化应激水平，恢复细胞内的氧化应激的平衡。实验观察到，与 ox-LDL 组相比较，Curcumin 明显地降低了细胞内的 ROS 含量，减轻了 ox-LDL 对 HUVECs 的氧化应激损伤，随着 Curcumin 浓度的增大，其对 HUVECs 保护作用增强；NO 检测显示，Curcumin 可成剂量依赖性地增加细胞内 NO 含量，显著的增强了 HUVECs 的迁移能力；蛋白定量提示 $Akt^{S473}$/$eNOS^{S1177}$ 位点磷酸化水平增加，表明 Curcumin 可抑制 ox-LDL 促进内皮细胞产生 ROS 效应，可能通过 Akt/eNOS/NO 通路增加 HUVECs 迁移能力。

Curcumin 对血管内皮的保护是多方面的，相关研究提示 Curcumin 可以促进在体组织 eNOS 蛋白表达，增强内皮依赖的血管舒张作用[20]；抑制低密度脂蛋白的氧化，减少 ox-LDL 的产生[21]；下调氧化型低密度脂蛋白受体-1（lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1，LOX-1）的表达，从而减少内皮细胞炎症反应相关的的黏附分子（ICAM-1、VCAM-1、P-选择素）的生成[22]。

综上所述：Curcumin 可促进 ox-LDL 诱导下内皮细胞的迁移，其机制可能与 Curcumin 清除 ROS 相关，促进了通路 Akt/eNOS/NO 的活化，提高了内皮细胞的功能。Curcumin 通过抗氧化、消除氧自由基的能力，使内皮细胞功能恢复，有利于如冠心病

的动脉硬化部位、外周血管阻塞区域、断肢再植处的新生微血管的形成，加快动脉闭塞区域的侧枝循环的建立，为机体缺血性疾病的防治、缺血性疾病的恢复和预后提拱了新的药物选择。

## 参 考 文 献


[1] Jang JJ，Ho HK，Kwan HH，et al.Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia：role of asymmetric dimethylarginine[J].Circulation，2000，102（12）：1414-1419.

[2] Fleming I，Mohamed A，Galle J，et al.Oxidized low-density lipoprotein increases superoxide production by endothelial nitric oxide synthase by inhibiting PKCalpha[J].Cardiovasc Res，2005，65（4）：897-906.

[3] Blair A，Shaul PW，Yuhanna IS，et al.Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase（eNOS）from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation[J].J Biol Chem，1999，274（45）：32512-32519.

[4] Murohara T，Witzenbichler B，Spyridopoulos I，et al.Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol，1999，19（5）：1156-1161.

[5] Murohara T，Asahara T.Nitric oxide and angiogenesis in cardiovascular disease[J].Antioxid Redox Signal，2002，4（5）：825-831.

[6] Kawasaki K，Smith RS Jr，Hsieh CM，et al.Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis[J].Mol Cell Biol，2003，23（16）：5726-5737.

[7] Manikandan P，Sumitra M，Aishwarya S，et al.Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischaemia in rats[J].Int J Biochem Cell Biol，2004，36（10）：1967-1980.

[8] Binion DG，Heidemann J，Li MS，et al.Vascular cell adhesion molecule-1 expression in human intestinal microvascular endothelial cells is regulated by PI 3-kinase/Akt/MAPK/NF-kappaB：inhibitory role of curcumin[J].Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol，2009，297（2）：G259-G268.

[9] 康金科，高春江，马克强，等.姜黄素对高脂饮食诱发的代谢紊乱和脂肪组织炎症因子表达的影响[J].重庆医科大学学报，2014，39（9）：964-968.

[10] Barzegar A，Moosavi-Movahedi AA.Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin[J].PLoS One，2011，6（10）：e26012.

[11] 黄 颖，陈运贞，王周碧.不同类型氧化型脂蛋白对血管内皮细胞、单核细胞 NF-κB 和 PPARs 的作用[J].重庆医科大学学报，2003，28（5）：576-579.

[12] Duan J，Murohara T，Ikeda H，et al.Hypercholesterolemia inhibits angiogenesis in response to hindlimb ischemia：nitric oxide-dependent mechanism[J].Circulation，2000，102（19 Suppl 3）：III370-III376.

[13] Chen J，Mehta JL，Haider N，et al.Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells[J].Circ Res，2004，94（3）：370-376.

[14] Heinloth A，Heermeier K，Raff U，et al.Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells[J].J Am Soc Nephrol，2000，11（10）：1819-1825.

[15] Luque CD，Vargas RH，Romo E，et al.The role of nitric oxide in the post-ischemic revascularization process[J].Pharmacol Ther，2006，112（2）：553-563.

[16] Lee PC，Salyapongse AN，Bragdon GA，et al.Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice[J].Am J Physiol，1999，277（4 Pt 2）：H1600-H1608.

[17] Cominacini L，Rigoni A，Pasini AF，et al.The binding of oxidized low density lipoprotein（ox-LDL）to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide[J].J Biol Chem，2001，276（17）：13750-13755.

[18] Chavakis E，Dernbach E，Hermann C，et al.Oxidized LDL inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway[J].Circulation，2001，103（16）：2102-2107.

[19] Biswas SK，McClure D，Jimenez LA，et al.Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells：mechanism of free radical scavenging activity[J].Antioxid Redox Signal，2005，7（1-2）：32-41.

[20] Ramaswami G，Chai H，Yao Q，et al.Curcumin blocks homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries[J].J Vasc Surg，2004，40（6）：1216-1222.

[21] Mahfouz MM，Zhou SQ，Kummerow FA.Curcumin prevents the oxidation and lipid modification of LDL and its inhibition of prostacyclin generation by endothelial cells in culture[J].Prostaglandins Other Lipid Mediat，2009，90（1-2）：13-20.

[22] Lee HS，Lee MJ，Kim H，et al.Curcumin inhibits TNFalpha-induced lectin-like oxidised LDL receptor-1（LOX-1）expression and suppresses the inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells（HUVECs）by an antioxidant mechanism[J].J Enzyme Inhib Med Chem，2010，25（5）：720-729.


责任编辑：冉明会）