

# 胺碘酮对人脐静脉内皮细胞的损伤作用及机制研究

王娟娟<sup>1</sup> 田继华<sup>2</sup> 亢晶<sup>3</sup> 杨佳<sup>2</sup> 常思佳<sup>2</sup> 冀贺<sup>2</sup> 黄太平<sup>2</sup> 樊卫平<sup>2</sup> 郭锦丽<sup>1</sup>  
王艳红<sup>2</sup>

<sup>1</sup>山西医科大学第二医院护理部,太原 030001; <sup>2</sup>山西医科大学微生物学与免疫学教研室,太原 030001; <sup>3</sup>西安市红会医院血液肿瘤科,西安 710002

通信作者:王艳红,Email: wangyanhongmail@126.com

**【摘要】** 目的 探讨胺碘酮对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的损伤作用及可能的机制。方法 取经过3代培养的HUVEC接种于96孔板,加入0、10、20、30或60  $\mu\text{mol/L}$ 胺碘酮培养24 h,采用细胞计数试剂盒8(CCK-8)法检测细胞活力,以0  $\mu\text{mol/L}$ 组细胞活力为100%,计算各加药组的相对细胞活力。选择可将细胞活力降至70%左右的胺碘酮浓度用于后续各项实验。采用CCK-8法检测该浓度胺碘酮作用不同时间(6、12、24、36、48 h)对HUVEC活力的影响。以加入该浓度胺碘酮培养的HUVEC为实验组,不加入者为对照组,采用钙依赖性磷脂结合蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶双染法流式细胞术检测细胞凋亡率;蛋白质印迹法和实时荧光定量聚合酶链反应法分别检测B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)、白细胞介素10(IL-10)、IL-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )蛋白和mRNA表达水平;2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯荧光探针法检测活性氧(ROS)含量,水溶性四氮唑-1法检测超氧化物歧化酶(SOD)活性,微板法检测还原型谷胱甘肽(GSH)含量。结果 经10、20、30、60  $\mu\text{mol/L}$ 胺碘酮作用24 h的各加药组HUVEC活力与对照组(100%)相比分别为(88.82 $\pm$ 2.64)%、(74.96 $\pm$ 1.75)%、(64.95 $\pm$ 2.10)%和(18.57 $\pm$ 0.65)%,各加药组与对照组比较以及加药组之间两两比较均 $P<0.01$ 。选择30  $\mu\text{mol/L}$ 胺碘酮用于后续实验。经30  $\mu\text{mol/L}$ 胺碘酮作用6、12、24、36、48 h的各实验组HUVEC活力与对照组(100%)相比分别为(90.19 $\pm$ 1.88)%、(82.81 $\pm$ 2.51)%、(75.33 $\pm$ 1.37)%、(65.76 $\pm$ 1.85)%和(47.01 $\pm$ 3.29)%,各实验组与对照组比较以及实验组之间两两比较均 $P<0.01$ 。实验组细胞凋亡率明显高于对照组(48.59%比16.34%, $P<0.01$ ),促凋亡蛋白Bax和caspase-3以及促炎因子IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 的蛋白和mRNA表达水平均高于对照组(均 $P<0.01$ ),而抗凋亡蛋白Bcl-2和抗炎因子IL-10的蛋白和mRNA表达水平均低于对照组( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。结论 胺碘酮可导致HUVEC损伤,这种损伤作用随胺碘酮浓度升高和作用时间延长而增强;胺碘酮可能通过诱导细胞凋亡、炎症反应及氧化应激导致HUVEC损伤。

**【关键词】** 胺碘酮; 内皮细胞; 静脉炎; 细胞凋亡; 炎症; 氧化应激

**基金项目:**国家自然科学基金青年科学基金(81500529,81500518);山西省自然科学基金(201901D111187,201901D111188)

DOI: 10.3760/cma.j.cn114015-20210322-00336

## Study on the injury and its mechanism of amiodarone on human umbilical vein endothelial cells

Wang Juanjuan<sup>1</sup>, Tian Jihua<sup>2</sup>, Kang Jing<sup>3</sup>, Yang Jia<sup>2</sup>, Chang Sijia<sup>2</sup>, Ji He<sup>2</sup>, Huang Taiping<sup>2</sup>, Fan Weiping<sup>2</sup>, Guo Jinli<sup>1</sup>, Wang Yanhong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Nursing Department, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; <sup>2</sup>Teaching Department of Microbiology and Immunology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; <sup>3</sup>Department of Hematology Oncology, Xi'an Honghui Hospital, Xi'an 710016, China

Corresponding author: Wang Yanhong, Email: wangyanhongmail@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the injury effect and its possible mechanism of amiodarone on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** After 3 generations of cultivation, the HUVECs were seeded in 96-well plates and incubated with amiodarone (0, 10, 20, 30, and 60  $\mu\text{mol/L}$ ) for

24 hours. The cell viability was detected using cell counting kit 8 (CCK-8) assay and the relative viability of cells incubated with different concentrations of amiodarone were calculated by taking the cell viability of the 0  $\mu\text{mol/L}$  group as 100%. The concentration of amiodarone at which cell viability was reduced to 70% was selected for subsequent experiments. The effect of amiodarone of this concentration on the activity of HUVECs after action for different time (6, 12, 24, 36, and 48 hours) was detected using the CCK-8 assay. HUVECs cultured with amiodarone of this concentration were set as the experimental groups and those without amiodarone were set as the control group. Apoptosis rate of HUVECs was detected by Annexin V-FITC/PI flow cytometry; the protein and mRNA expression levels of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), Caspase-3, interleukin 10 (IL-10), IL-1 $\beta$ , IL-6, and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) were detected using western blotting and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, respectively; the reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA fluorescence probe assay; the superoxide dismutase (SOD) activity was detected by water-soluble tetrazolium-1 assay; the reduced glutathione (GSH) content was detected by microplate assay. **Results** The viabilities of HUVECs incubated with amiodarone at concentration of 10, 20, 30, and 60  $\mu\text{mol/L}$  for 24 hours were (88.82 $\pm$ 2.64)%, (74.96 $\pm$ 1.75)%, (64.95 $\pm$ 2.10)%, and (18.57 $\pm$ 0.65)%, respectively; differences were all significant (all  $P < 0.01$ ) between each experiment group and control group, as well as between each experiment group. Amiodarone at a concentration of 30  $\mu\text{mol/L}$  was used for subsequent experiments. After incubating with 30  $\mu\text{mol/L}$  amiodarone for 6, 12, 24, 36, and 48 hours, the viabilities of HUVECs were (90.19 $\pm$ 1.88)%, (82.81 $\pm$ 2.51)%, (75.33 $\pm$ 1.37)%, (65.76 $\pm$ 1.85)%, and (47.01 $\pm$ 3.29)%, respectively; differences were all significant (all  $P < 0.01$ ) between each experiment group and control group, as well as between each experiment group. Compared with the control group, the apoptosis rate of cells in the experimental group was significantly higher (48.59% vs. 16.34%,  $P < 0.01$ ), the protein and mRNA expression levels of pro-apoptotic proteins Bax and caspase-3, and pro-inflammatory factors IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  were higher (all  $P < 0.01$ ), whereas the protein and mRNA expression levels of anti-apoptotic protein Bcl-2 and anti-inflammatory factor IL-10 were lower ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusions** Amiodarone can cause HUVECs injury, which would be enhanced with the increase of concentration and action time of amiodarone. Amiodarone may cause HUVECs injury by inducing apoptosis, inflammatory response, and oxidative stress.

**【Key words】** Amiodarone; Endothelial cells; Phlebitis; Apoptosis; Inflammation; Oxidative stress

**Fund programs:** Youth Science Fund Project of National Nature Science Foundation of China (81500518, 81500529); The National Natural Science Foundation of Shanxi Province (201901D111187, 201901D111188)

DOI: 10.3760/cma.j.cn114015-20210322-00336

胺碘酮是临床上常用的抗心律失常药,用于心房颤动等严重心律失常治疗时多选择静脉用药,药品说明书推荐采用中心静脉给药,因为外周静脉输注胺碘酮易诱发静脉炎。Spiering<sup>[1]</sup>报道外周性胺碘酮相关静脉炎(peripheral amiodarone-related phlebitis)发生率可高达85%。静脉炎是由于物理、化学及感染等因素对血管壁的刺激而导致的血管壁炎症表现,血管内皮细胞损伤参与静脉炎的发生。研究显示氧化应激、炎症反应和凋亡参与了高糖诱导的血管内皮细胞功能障碍<sup>[2-3]</sup>,也可能参与化疗药物如长春瑞滨<sup>[4]</sup>、表柔比星<sup>[5]</sup>等诱导的血管内皮损伤,但是否参与胺碘酮诱导的静脉炎尚少见报道。为此,我们以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)为研究对象,观察了胺碘酮对HUVEC的损伤作用及其与凋亡、炎症反应和氧化应激之间的关系,以进一步了解胺碘酮诱发静脉炎的病理过程,为该不

良反应的防治提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞** 用于实验的HUVEC为购自中国科学院上海细胞库的普通冻存细胞,复苏后用于后续实验。

**1.1.2 主要仪器** MD SpectraMax 190全波长酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司,荧光定量聚合酶链反应检测仪FQD-96A购自杭州博日科技有限公司,Accuri C6流式细胞仪购自碧迪医疗器械有限公司,电泳仪PowerPac HC 1645052和转膜仪Trans-Blot 170-3940购自美国伯乐公司,Tanon 4600全自动化学发光图像分析系统购自上海天能公司。

**1.1.3 主要试剂** 钙依赖性磷脂结合蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司;

基于水溶性四氮唑-1 (water soluble tetrazolium 1, WST-1) 法的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒和还原性谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 和  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司; 白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10)、IL-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 抗体购自美国 Santa 公司; 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 相关试剂购自宝生物 (大连) 有限公司; 10% 胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司; 杜尔贝科改良伊格尔培养基 (Dulbecco modified Eagle medium, DMEM) 购自美国 Hyclone 公司; 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒、细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 和基于 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFHDA) 荧光探针的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 方法

**1.2.1 HUVEC 复苏** 将冻存的 HUVEC 复苏, 放入含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。取经过 3 代培养的 HUVEC 用于实验。

### 1.2.2 胺碘酮对 HUVEC 活力的影响

**1.2.2.1 不同浓度胺碘酮对 HUVEC 活力的影响** 采用 CCK-8 法, 按照 CCK-8 试剂盒说明书进行操作。将 HUVEC 接种到 96 孔板 (1×10<sup>4</sup> 个/孔), 当细胞融合率达到 70%~80% 时, 分别向孔中加入胺碘酮 10、20、30 或 60  $\mu$ mol/L (加药组), 同时设置不加入胺碘酮的对照组和仅含培养基而未加入 HUVEC 的空白组, 每组至少设 5 个复孔, 在无血清培养基中培养 24 h。每孔加入 0.5 mg/ml 的 CCK-8 溶液 10  $\mu$ l, 在 37 °C 培养箱孵育 2 h。使用酶标仪测定各孔波长 450 nm 处的吸光度 (absorbance, A) 值。细胞活力 (%) = (加药组 A 值 - 空白组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值) × 100%。以对照组细胞活力为 100%, 计算各加药组的相对细胞活力。选择可将细胞活力降至 70% 左右的胺碘酮浓度用于以下的各项实验。

**1.2.2.2 选定浓度胺碘酮作用不同时间对 HUVEC 活力的影响** 将 HUVEC 接种到 96 孔板 (1×10<sup>4</sup> 个/孔), 当细胞融合率达到 70%~80% 时, 向孔中加入选定浓度的胺碘酮 (实验组) 或不加胺碘酮 (对照组), 每组均设 5 个亚组, 每个亚组至少设 5 个复孔, 在无血清培养基中分别培养 6、12、24、36 或 48 h。每孔加入 0.5 mg/ml 的 CCK-8 溶液 10  $\mu$ l, 在 37 °C 培养箱孵育 2 h。使用酶标仪测定波长 450 nm 处的 A 值。采用 1.2.2.1 段中所述方法计算细胞活力。

### 1.2.3 胺碘酮对 HUVEC 凋亡的影响

**1.2.3.1 细胞凋亡情况** 细胞凋亡检测采用 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术<sup>[6]</sup>。将 HUVEC 接种到 6 孔板 (3×10<sup>5</sup> 个/孔), 当细胞融合率达到 70%~80% 时, 向孔中加入设定浓度的胺碘酮 (实验组) 或不加胺碘酮 (对照组), 在 37 °C 培养箱进行无血清孵育 24 h。将 2 组 HUVEC 加入 0.25% 胰酶 1.5 ml, 37 °C 培养箱孵育 3 min, 加 1.5 ml 含血清的培养基终止消化, 离心 (1 000 ×g, 5 min) 后, 以磷酸盐缓冲液清洗 2 次, 再加入 1×结合缓冲液重新悬浮细胞, 使细胞浓度为 1×10<sup>6</sup> 个/ml, 吸取 100  $\mu$ l 细胞悬液 (含细胞 1×10<sup>5</sup> 个), 同时加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5  $\mu$ l, 避光孵育 15 min, 应用 Accuri C6 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。每组实验重复 3 次。

**1.2.3.2 凋亡相关蛋白及 mRNA 表达情况** 凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 表达检测采用蛋白质印迹法。取在无血清培养基中培养 24 h 的实验组和对照组 HUVEC, 分别用放射免疫沉淀法裂解液裂解细胞, 4 °C 低温离心 (12 000×g, 5 min), 吸取上清液, 用 BCA 法<sup>[7]</sup>测蛋白浓度。取 25  $\mu$ g 蛋白样品经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 置于转膜仪中进行转膜, 室温封闭 2 h。分别用 Bcl-2、Bax、caspase-3 和  $\beta$ -actin 抗体作为一抗, 在 4 °C 孵育过夜, 用辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 作为二抗, 室温孵育 1 h。TBST (Tris-Buffered Saline-Tween 20) 缓冲液洗 3 次, 增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显色液显色, Tanon 4600 全自动化学发光图像分析系统检测发光强度, Image J 8.0 图像处理软件进行定量分析, 以目的蛋白灰度值与  $\beta$ -actin 灰度值比值表示目的蛋白表达水平。每组实验重复 3 次。

Bcl-2、Bax 和 caspase-3 mRNA 表达检测采用 qRT-PCR 法。取在无血清培养基中培养 24 h 的实验组和对照组 HUVEC, 分别用 Trizol 法提取各组细

胞的总 RNA,反转录成互补 DNA,根据 qRT-PCR 试剂盒说明书加入 Bcl-2、Bax、caspase-3、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物进行扩增,上、下游引物序列(5'→3') Bcl-2 分别为 GACTTCGCCGAGATGTCCAG、GAACTCAAAGAAGGCCACAATC, Bax 分别为 CGA ACTGGACAGTAACATGGAG、CAGTTTGCTGGCAA AGTAGAAA, caspase-3 分别为 GTGGAGGCCGAC TTCTTGTATGC、TGGCACAAAGCGACTGGATGAA C, GAPDH 分别为 TGAACGGGAAGCTCACTGG、TCCACCACCCTGTTGCTGTA。应用实时荧光定量仪进行 PCR 扩增,PCR 条件:95 ℃、30 s, 95 ℃、5 s, 60 ℃、35 s, 循环 40 次。以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算目的 mRNA 的相对表达量。每组实验重复 3 次。

**1.2.4 胺碘酮对 HUVEC 炎症反应的影响** 实验组和对照组 HUVEC 炎症因子 IL-10、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白和 mRNA 表达的检测分别采用蛋白质印迹法和 qRT-PCR 法,操作步骤与 1.2.3 段中所述相同,上、下游引物序列(5'→3') IL-10 分别为 GTT GTTAAAGGAGTCCTTGCTG、TTCACAGGGAAGAA ATCGATGA, IL-1 $\beta$  分别为 GCCAGTGAAATGAT GGCTTATT、AGGAGCACTTCATCTGTTTAGG, IL-6 分别为 CACTGGTCTTTTGGAGTTTGAG、GGACTT TTGTACTCATCTGCAC, TNF- $\alpha$  分别为 TGGCGTG GAGCTGAGAGATAACC、CGATGCGGCTGATGCT GTGG。每组实验重复 3 次。

**1.2.5 胺碘酮对 HUVEC 氧化应激的影响** 取在无血清培养基中培养 24 h 的实验组和对照组 HUVEC,分别进行 ROS 含量、SOD 活性和 GSH 含量测定。ROS 含量测定采用 DCFH-DA 荧光探针法,按照 ROS 检测试剂盒说明书进行操作。将 DCFH-DA 用无血清培养基按照 1:1 000 的比例稀释后,分别加入实验组和对照组 HUVEC 中,37 ℃、避光孵育 20 min,用无血清培养基洗细胞 3 次,用不含乙二胺四乙酸二钠的胰酶消化细胞,用 Accuri C6 流式细胞仪检测 2 组 HUVEC 的 ROS 荧光强度。SOD 活性测定采用 WST-1 法,按照 SOD 活性检测试剂盒说明书进行操作。GSH 含量测定采用微板法,按照 GSH 含量检测试剂盒说明书进行操作。ROS 含量、SOD 活性和 GSH 含量的检测值均以相对于对照组的百分比值表示。

### 1.3 统计学处理

使用 GraphPad Prism 8.1 统计作图软件分析处

理数据。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析。不同浓度胺碘酮和胺碘酮作用不同时间对 HUVEC 活力影响的差异显著性检验采用方差分析,两两比较采用 Tukey 检验;胺碘酮对 HUVEC 凋亡相关蛋白表达、炎症反应和氧化应激影响的差异显著性检验采用 Sidak 检验。计数资料组间比较用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胺碘酮对 HUVEC 活力的影响

**2.1.1 不同浓度胺碘酮对 HUVEC 活力的影响** CCK-8 法检测结果显示,经 10、20、30、60  $\mu\text{mol/L}$  胺碘酮作用 24 h 的各加药组 HUVEC 活力与对照组(100%)相比分别为(88.82 $\pm$ 2.64)%、(74.96 $\pm$ 1.75)%、(64.95 $\pm$ 2.10)%和(18.57 $\pm$ 0.65)%,细胞活力随着胺碘酮浓度的增加而下降,各加药组与对照组比较以及加药组之间两两比较,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。30  $\mu\text{mol/L}$  胺碘酮给药组细胞活力下降至 70% 左右,故选择该浓度胺碘酮用于后续的各项实验。

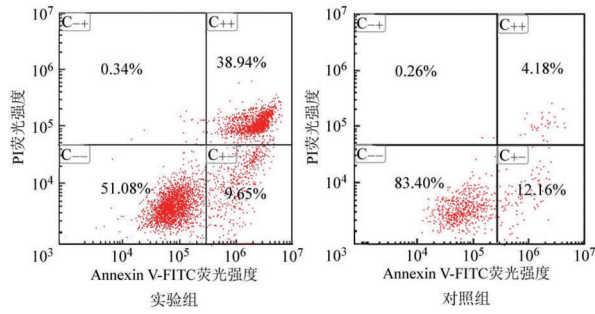
**2.1.2 胺碘酮作用不同时间对 HUVEC 活力的影响** 经 30  $\mu\text{mol/L}$  胺碘酮作用 6、12、24、36、48 h 的各实验组 HUVEC 活力与对照组(100%)相比分别为(90.19 $\pm$ 1.88)%、(82.81 $\pm$ 2.51)%、(75.33 $\pm$ 1.37)%、(65.76 $\pm$ 1.85)%和(47.01 $\pm$ 3.29)%,细胞活力随着胺碘酮作用时间延长而下降,各实验组与对照组比较以及实验组之间两两比较,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。

### 2.2 胺碘酮对 HUVEC 凋亡的影响

**2.2.1 细胞凋亡情况** Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术检测结果显示,对照组细胞凋亡率为 16.34%,而实验组细胞凋亡率为 48.59%(图 1),组间差异有统计学意义( $\chi^2 = 3\ 600.00$ ,  $P < 0.01$ )。

**2.2.2 凋亡相关蛋白及 mRNA 表达情况** 蛋白质印迹法检测结果显示,实验组和对照组 HUVEC 中凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达水平分别为(0.41 $\pm$ 0.02)和(0.64 $\pm$ 0.06), Bax 分别为(2.30 $\pm$ 0.08)和(1.85 $\pm$ 0.13), caspase-3 分别为(1.96 $\pm$ 0.11)和(1.55 $\pm$ 0.11),实验组 HUVEC 中促凋亡蛋白 Bax 和 caspase-3 表达水平均高于对照组(均  $P < 0.01$ ),而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平低于对照组( $P < 0.05$ )。见图 2。

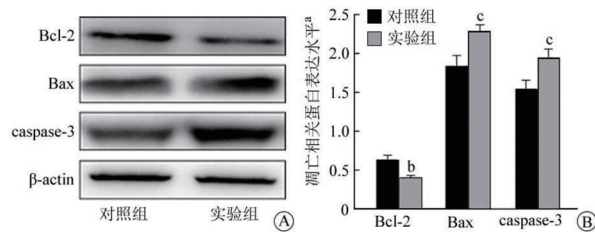
qRT-PCR 法检测结果显示,对照组 HUVEC 中 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的 mRNA 表达水平均为(1.00 $\pm$ 0.01),实验组分别为(0.55 $\pm$ 0.19)、(1.56 $\pm$ 0.17)和(2.31 $\pm$ 0.15),实验组 HUVEC 中 Bcl-2 mRNA 表达水



注 实验组人脐静脉内皮细胞中加入 30 μmol/L 胺碘酮,对照组不加胺碘酮;Annexin V-FITC:钙依赖性磷脂结合蛋白 V-异硫氰酸荧光素;PI:碘化丙啶;C-+:Annexin V-FITC(-)/PI(+),为坏死细胞;C++:Annexin V-FITC(+)/PI(+),为晚期凋亡细胞;C-+:Annexin V-FITC(+)/PI(-),为早期凋亡细胞;C-:Annexin V-FITC(-)/PI(-),为正常活细胞

图 1 2 组人脐静脉内皮细胞凋亡的 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测结果

Fig 1 Apoptosis of human umbilical vein endothelial cells detected by flowcytometry after Annexin V-FITC/PI double staining in the 2 groups



注 实验组人脐静脉内皮细胞中加入 30 μmol/L 胺碘酮,对照组不加胺碘酮;β-actin:β-肌动蛋白;Bcl-2:B 细胞淋巴瘤-2;Bax:Bcl-2 相关 X 蛋白;caspase-3:半胱氨酸蛋白酶 3;\*:以目的蛋白灰度值与 β-actin 灰度值比值表示;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ;<sup>c</sup>: $P < 0.01$

图 2 2 组人脐静脉内皮细胞中凋亡相关蛋白表达的蛋白质印迹法检测结果 A:凋亡相关蛋白电泳图;B:凋亡相关蛋白表达水平比较

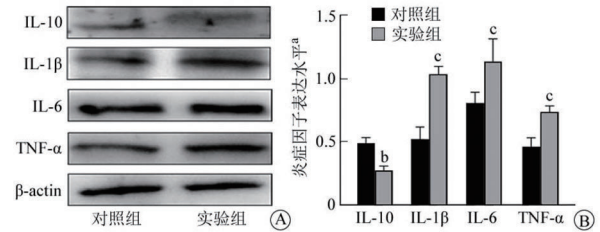
Fig 2 Apoptosis-related protein expression of human umbilical vein endothelial cells detected by Western blotting in the 2 groups A: Apoptosis-related protein electrophoretic map; B: Comparison of expression levels of apoptosis related proteins

平均明显低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 而 Bax mRNA 和 caspase-3 mRNA 表达水平均明显高于对照组 (均  $P < 0.01$ )。

### 2.3 胺碘酮对 HUVEC 炎症反应的影响

蛋白质印迹法检测结果显示,实验组和对照组 HUVEC 中炎症因子 IL-10 表达水平分别为 (0.28±0.04) 和 (0.49±0.04), IL-1β 分别为 (1.03±0.06) 和 (0.52±0.10), IL-6 分别为 (1.14±0.18) 和 (0.81±0.09), TNF-α 分别为 (0.74±0.05) 和 (0.46±0.07), 实

验组 HUVEC 中促炎因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的表达水平均明显高于对照组 (均  $P < 0.01$ ), 而抗炎因子 IL-10 的表达水平明显低于对照组 ( $P < 0.05$ )。见图 3。



注 实验组人脐静脉内皮细胞中加入 30 μmol/L 胺碘酮,对照组不加胺碘酮;β-actin:β 肌动蛋白;IL:白细胞介素;TNF:肿瘤坏死因子;\*:以目的蛋白灰度值与 β-actin 灰度值比值表示;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ;<sup>c</sup>: $P < 0.01$

图 3 2 组人脐静脉内皮细胞中炎症因子表达的蛋白质印迹法检测结果 A:炎症因子蛋白电泳图;B:炎症因子表达水平比较

Fig 3 Inflammatory cytokines expression of human umbilical vein endothelial cells detected by Western blotting in the 2 groups A: Inflammatory cytokines protein electrophoretic map; B: Comparison of expression levels of inflammatory factors

qRT-PCR 法检测结果显示,对照组 HUVEC 中 IL-10、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的 mRNA 表达水平均为 (1.00±0.01), 实验组分别为 (0.547±0.07)、(1.55±0.11)、(2.77±0.23) 和 (1.88±0.15), 实验组 HUVEC 中抗炎因子 IL-10 mRNA 表达水平明显低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 而促炎因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α mRNA 表达水平均明显高于对照组 (均  $P < 0.01$ )。

### 2.4 胺碘酮对 HUVEC 氧化应激的影响

以对照组 HUVEC 检测值为 100%, 实验组 HUVEC 中 ROS 含量、SOD 活性和 GSH 含量分别为 (166.64±10.33)%、(71.42±7.84)% 和 (57.85±6.87)%。实验组 HUVEC 中 ROS 含量明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 而 SOD 活性和 GSH 含量均明显低于对照组 (均  $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

胺碘酮相关静脉炎一直是临床护理中非常关注的问题,严重静脉炎不仅会延长患者住院时间、增加患者的住院费用,甚至可导致局部皮肤、软组织坏死和上肢血栓性静脉炎,或被迫停止胺碘酮的治疗<sup>[7-9]</sup>。目前关于其发病机制的研究尚少,缺乏有效的防治手段。

本研究结果显示,经 10、20、30、60 μmol/L 胺碘酮作用 24 h 的各加药组 HUVEC 活力与对照组 (100%) 相比分别为 (88.82±2.64)%、(74.96±1.75)%、

(64.95±2.10)%和(18.57±0.65)% ,经 30 μmol/L 胺碘酮作用 6、12、24、36、48 h 的各实验组 HUVEC 活力与对照组(100%)相比分别为(90.19±1.88)%、(82.81±2.51)%、(75.33±1.37)%、(65.76±1.85)%和(47.01±3.29)% ,各加药组或实验组分别与对照组比较以及加药组之间或实验组之间两两比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。表明胺碘酮可显著抑制 HUVEC 的活力,其抑制程度呈浓度和时间依赖性。这与临床观察到胺碘酮输注浓度越高、时间越长静脉炎发生风险越高的结果<sup>[8-9]</sup>相似。

以往的研究显示,胺碘酮可以通过活化内质网应激、下调甲状腺球蛋白引起甲状腺炎<sup>[10]</sup>。而内质网应激与氧化应激及细胞凋亡之间有着密切的联系<sup>[11]</sup>;胺碘酮可作用于人肺上皮细胞线粒体,诱导 ROS 产生<sup>[12]</sup>,促进肺泡上皮细胞凋亡<sup>[13]</sup>,胺碘酮相关肺毒性反应可能与此有关;胺碘酮可作用于肝细胞线粒体,激活 TNF- $\alpha$  依赖的氧化应激通路,导致肝细胞的氧化应激损伤<sup>[14]</sup>。这些研究结果提示胺碘酮对靶器官的损伤与其诱导的靶细胞凋亡、炎症反应和氧化应激有关。

内皮细胞的凋亡在各种疾病进展中发挥着重要作用<sup>[15]</sup>,血管内皮细胞凋亡可以导致血管屏障破坏、血浆外渗、血栓形成,诱导静脉炎的发生<sup>[4-5, 16]</sup>。Bcl-2 是一种抗凋亡基因,在抑制细胞凋亡中发挥着重要的作用;而 Bax 是一种促凋亡基因,不仅可以抑制 Bcl-2 的活性,而且可以激活 caspase 酶系反应促进细胞凋亡;caspase-3 是凋亡程序的关键执行者,在细胞凋亡中起着不可替代的作用<sup>[17-19]</sup>。本研究结果显示实验组 HUVEC 凋亡率明显高于对照组(48.59% 比 16.34%,  $P < 0.01$ );促凋亡相关蛋白 Bax、caspase-3 的表达水平均高于对照组[(2.30±0.08)比(1.85±0.13), (1.96±0.11)比(1.55±0.11)], Bax 和 caspase-3 mRNA 的表达水平也明显高于对照组[(1.56±0.17)比(1.00±0.01), (2.31±0.15)比(1.00±0.01)],差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ),而抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-2 mRNA 表达水平均低于对照组[(0.41±0.02)比(0.64±0.06),  $P < 0.05$ ; (0.55±0.19)比(1.00±0.01),  $P < 0.01$ ],证实胺碘酮可诱导内皮细胞的凋亡,这可能与外周性胺碘酮相关静脉炎的发生机制有关。

氧化应激损伤是机体氧化强于抗氧化作用的一种失衡状态,可引起炎性细胞浸润和蛋白酶分解,从而产生一系列病理改变。Yamada 等<sup>[16]</sup>对长春瑞滨诱导血管内皮细胞损伤的研究结果显示,损

伤的血管内皮细胞中 GSH 水平显著降低,从而引起 ROS 含量增加、细胞活力下降和线粒体膜电位去极化。在本研究中,实验组 HUVEC 中 ROS 含量明显高于对照组[(166.64±10.33)% 比 100%,  $P < 0.01$ ],SOD 活性和 GSH 含量则明显低于对照组[(71.42±7.84)% 比 100%, (57.85±6.87)% 比 100%, 均  $P < 0.01$ ],提示氧化应激损伤可能参与了静脉炎的发生。

一些研究发现,高糖诱导的血管内皮炎症因子释放在内皮细胞障碍中发挥着重要的作用<sup>[2, 20]</sup>,在糖尿病动物模型研究中也发现抑制炎症因子的分泌,可显著抑制内皮细胞活化和血管损伤<sup>[21-22]</sup>,说明炎症因子在血管内皮损伤中发挥重要作用。在本研究中,实验组 HUVEC 中促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的蛋白表达水平明显高于对照组[(1.03±0.06)比(0.52±0.10), (1.14±0.18)比(0.81±0.09), (0.74±0.05)比(0.46±0.07), 均  $P < 0.01$ ], IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达水平也明显高于对照组[(1.55±0.11)比(1.00±0.01), (2.77±0.23)比(1.00±0.01), (1.88±0.15)比(1.00±0.01), 均  $P < 0.01$ ],而抗炎因子 IL-10 及其 mRNA 的表达水平均明显低于对照组[(0.28±0.04)比(0.49±0.04),  $P < 0.05$ ; (0.55±0.07)比(1.00±0.01),  $P < 0.01$ ]。杨婧等<sup>[23]</sup>的动物实验结果显示,通过兔耳缘持续静脉输注胺碘酮 5 h 即可观察到静脉周围存在明显的炎性细胞浸润。Zhang 等<sup>[4]</sup>的研究结果显示,长春瑞滨相关静脉炎在使用抗炎药物干预后明显好转。上述研究结果均提示炎症反应可能参与了胺碘酮诱导的静脉炎的发生。

综上所述,胺碘酮可导致 HUVEC 损伤,这种损伤作用随胺碘酮的浓度和作用时间而增强;胺碘酮可能通过诱导细胞凋亡、炎症反应和氧化应激导致 HUVEC 损伤,但其具体作用机制仍有待于进一步研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Spiering M. Peripheral amiodarone-related phlebitis: an institutional nursing guideline to reduce patient harm[J]. J Infus Nurs, 2014, 37(6): 453-460. DOI: 10.1097/NAN.0000000000000072.
- [2] Yi J, Gao ZF. MicroRNA-9-5p promotes angiogenesis but inhibits apoptosis and inflammation of high glucose-induced injury in human umbilical vascular endothelial cells by targeting CXCR4[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 130: 1-9. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.003.
- [3] Yu L, Liang Q, Zhang W, et al. HSP22 suppresses diabetes-induced endothelial injury by inhibiting mitochondrial reac-

- tive oxygen species formation[J]. *Redox Biol*, 2019, 21: 1010-95. DOI: 10.1016/j.redox.2018.101095.
- [4] Zhang J, Tong N, Chen Y, et al. Resveratrol protects against vinorelbine-induced vascular endothelial cell injury[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2013, 23(9): 665-671. DOI: 10.3109/15376516.2013.837130.
- [5] Yamada T, Egashira N, Bando A, et al. Activation of p38 MAPK by oxidative stress underlying epirubicin-induced vascular endothelial cell injury[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(8): 1285-1293. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.003.
- [6] Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes[J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(8): 1093-1107. DOI: 10.1038/cdd.2009.44.
- [7] Simpson RJ. Quantifying protein by bicinchoninic acid[J]. *CSH Protoc*, 2008, 2008: pdb.prot4722. DOI: 10.1101/pdb.prot4722.
- [8] 李小红. 静脉输注胺碘酮致局部静脉炎原因分析及护理对策[J]. *全科护理*, 2011, 9(21): 1896-1897. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4748.2011.21.011.  
Li XH. Cause analysis and nursing countermeasures of local phlebitis caused by intravenous infusion of amiodarone[J]. *Chin Gen Pract Nurs*, 2011,9(21): 1896-1897. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4748.2011.21.011.
- [9] 李玮, 张俊, 乔燕舞, 等. 高浓度胺碘酮静脉泵入与静脉炎关系的临床研究[J]. *心血管康复医学杂志*, 2004, 13(6): 594-595. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0074.2004.06.040.  
Li W, Zhang J, Qiao YW, et al. Clinical study on the relationship between intravenous pumping of high concentration amiodarone and phlebitis[J]. *Chin J Cardiovasc Rehabil Med*, 2004, 13(6): 594-595. DOI: 10.3969/j.issn. 1008-0074.2004.06.040.
- [10] Lombardi A, Inabnet WB 3rd, Owen R, et al. Endoplasmic reticulum stress as a novel mechanism in amiodarone-induced destructive thyroiditis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(1): e1-e10. DOI: 10.1210/jc.2014-2745.
- [11] Liu H, Hou C, Zeng Q, et al. Role of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rat thyroid toxicity caused by excess fluoride and/or iodide[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 46: 277-285. DOI: 10.1016/j.etap.2016.08.007.
- [12] Nicolescu AC, Ji Y, Comeau JL, et al. Direct mitochondrial dysfunction precedes reactive oxygen species production in amiodarone-induced toxicity in human peripheral lung epithelial HPL1A cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 227(3): 370-379. DOI: 10.1016/j.taap.2007.12.009.
- [13] Uhal BD, Zhang H, Abdul-Hafez A, et al. Amiodarone induces angiotensinogen gene expression in lung alveolar epithelial cells through activation protein-1[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2007, 100(1): 59-66. DOI: 10.1111/j. 1742-7843.2007.00006.x.
- [14] Lu J, Jones AD, Harkema JR, et al. Amiodarone exposure during modest inflammation induces idiosyncrasy-like liver injury in rats: role of tumor necrosis factor-alpha[J]. *Toxicol Sci*, 2012, 125(1): 126-133. DOI: 10.1093/toxsci/kfr266.
- [15] Winn RK, Harlan JM. The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases[J]. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(8): 1815-1824. DOI: 10.1111/j. 1538-7836.2005.01378.x.
- [16] Yamada T, Egashira N, Imuta M, et al. Role of oxidative stress in vinorelbine-induced vascular endothelial cell injury[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(1): 120-127. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.10.032.
- [17] Robertson JD, Orrenius S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2000, 30(5): 609-627. DOI: 10.1080/10408440008951122.
- [18] 张晓田, 宋天保. Caspase-3 与细胞凋亡的研究[J]. *医学综述*, 2002, 8(11): 621-623. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2002.11.001.  
Zhang XT, Song TB. Study on caspase-3 and apoptosis[J]. *Medical Recapitulate*, 2002, 8(11): 621-623. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2002.11.001.
- [19] 吴云飞, 郑维银, 李焰. Caspase-3 在血管内皮细胞凋亡中的作用研究进展[J]. *西南军医*, 2013, 15(4): 408-411. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7193.2013.04.017.  
Wu YF, Zheng WY, Li Y. Research progress on the role of caspase-3 in vascular endothelial cell apoptosis[J]. *J Milit Surg Southwest China*, 2013, 15(4): 408-411. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7193.2013.04.017.
- [20] Huang K, Yu X, Yu Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes high glucose-induced inflammation and apoptosis of vascular endothelial cells by regulating miR-361-3p/SOCS3 axis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(5): 1243-1252.
- [21] 申铿, 陈瑞珍, 杨英珍, 等. Apocynin 降低 1 型糖尿病小鼠心肌组织炎症因子的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(11): 2109-2112. DOI: 10.3321/j.issn:1000-4718.2009.11.006.  
Shen E, Chen RZ YYZ, Chen JZ. Apocynin decreases cardiac cytokines in STZ-induced diabetic cardiomyopathy[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2009, 25(11): 2109-2112. DOI: 10.3321/j.issn:1000-4718.2009.11.006.
- [22] 王战建, 徐焕宇, 苏杰英, 等. 炎症细胞因子与实验性 2 型糖尿病大鼠及肾脏改变[J]. *河北医药*, 2007, 29(2): 99-101. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2007.02.001.  
Wang ZJ, Xu HY, Su JY, et al. The changes of inflammatory factors and kidney injury in rat model of type 2 diabetes mellitus[J]. *Hebei Med J*, 2007, 29(2): 99-101. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2007.02.001.
- [23] 杨婧, 郭锦丽, 祁丽霞. 静脉留置针持续输注盐酸胺碘酮注射液致静脉炎时间的探讨[J]. *实用临床护理学电子杂志*, 2017, 2(17): 178-179. DOI: 10.3969/j.issn.2096-2479.2017.17.132.  
Yang J, Guo JL, Qi LX. Discussion on the time of phlebitis caused by continuous infusion of amiodarone hydrochloride injection with intravenous indwelling needle[J]. *Electronic Journal of Practical clinical Nursing Science*, 2017, 2(17): 178-179. DOI: 10.3969/j.issn.2096-2479.2017.17.132.

(收稿日期:2021-03-22)

(本文编辑:蔡皓东)