

5种中药醇提物对 ox-LDL 损伤心肌微血管 内皮细胞的保护作用研究

王岚¹, 杨滨¹, 梁日欣^{1*}, 殷小杰¹, 杨伟鹏¹, 王彦礼¹, 杨艳^{1,2}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 北京市万寿路社区卫生服务中心, 北京 100036)

[摘要] 目的: 观察茶叶、红花、黄芩、贯叶金丝桃、木蝴蝶等5种中药醇提取物对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)损伤的心肌微血管内皮细胞的保护作用, 初步探讨其作用机制。方法: 建立体外培养大鼠心肌微血管内皮细胞 ox-LDL 氧化损伤模型, 倒置显微镜下观察加入不同质量浓度的上述醇提物后, ox-LDL 氧化损伤前后细胞形态学变化; 以噻唑蓝(MTT)法检测各组细胞的增殖率; 测定细胞上清液中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和丙二醛(MDA)含量。结果: 5种中药醇提取物均能不同程度地提高内皮细胞存活率, 提高培养液中 SOD, GSH-Px 活性, 降低 MDA 含量。结论: 5种中药醇提取物具有抗心肌微血管内皮细胞 ox-LDL 氧化损伤的作用, 其机制可能与其提高机体抗氧化能力、抑制细胞脂质过氧化有关。

[关键词] 中药醇提物; 内皮细胞; 氧化低密度脂蛋白; 抗氧化酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0276-04

[doi] 10.11653/syjf2013100276

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130308.1041.005.html>

[网络出版时间] 2013-03-08 10:41

Research on Protection Action of Five Ethanol-extractions of Traditional Chinese Medicine on Cardiac Microvascular Endothelial Cells Damaged by Oxidized Low Density Lipoprotein

WANG Lan¹, YANG Bin¹, LIANG Ri-xin^{1*}, YIN Xiao-jie¹, YANG Wei-peng¹, WANG Yan-li¹, YANG Yan^{1,2}

(1. Institute of Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Community Health Service Center, Beijing 100036, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of protection action of 5 kinds of ethanol-extractions of traditional Chinese medicine (*Camellia sinensis*, *Carthamus tinctorius*; *Scutellaria baicalensis*; *Hypericum perforatum*; *Oroxylum indicum*) on cardiac microvascular endothelial cells damaged by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Method:** The protection of 5 kinds of ethanol-extractions from traditional Chinese medicine and VitE were investigated after ox-LDL (100 mg · L⁻¹) induced injury on the third generation of rat cardiac microvascular endothelial cells. Cell morphology before and after damaged by ox-LDL was observed under the inverted microscope after joining the different concentration of the above ethanol-extractions. Cellular viability was determined by MTT method. The supernatant was collected for detecting malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activity. **Result:** Five kinds of ethanol-extractions from traditional Chinese medicine increased the endothelial cells survival rate, reduced MDA contents and improved SOD, GSH-Px activity. **Conclusion:** The above ethanol-extractions of traditional Chinese medicine showed obvious

[收稿日期] 20121121(608)

[基金项目] 科技部国际科技合作项目(2006DF31720)

[第一作者] 王岚, 副主任技师, 从事中药药理研究, Tel:010-64014411-2948, E-mail: wl11111@sina.com

[通讯作者] * 梁日欣, 研究员, 博士, 从事心血管药理学研究, Tel:010-64014411-2948, E-mail: liangrixin2009@sina.com

anti-oxidative effect on cardiac microvascular endothelial cells damaged by ox-LDL. The anti-oxidative effect may be related to enhancing endogenous antioxidant activity and inhibiting cellular lipid peroxidation.

[Key words] ethanol-extraction of traditional Chinese medicine; endothelial cells; oxidized low density lipoprotein; antioxidant

自由基及其诱导的脂质过氧化和许多慢性疾病如心肌缺血再灌注、动脉粥样硬化(AS)和衰老有关^[1]。大量研究表明,氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)作为氧自由基携带者与AS的发生和发展有重要关联。ox-LDL对内皮细胞产生毒性作用,生成脂过氧化自由基,引发脂质过氧化的连锁反应,进而损伤内皮细胞的屏障功能,加速AS的形成。目前对抗氧化中药的研究是自由基研究领域的一个重要课题,已有文献表明,茶叶、黄芩、贯叶金丝桃、木蝴蝶、红花等中药具有抗氧化作用,但通过何种途径发生作用并不明确。笔者前期研究证明黄芩等中药醇提取物外具有不同程度的抗肝微粒体脂质过氧化作用^[2]。本项实验采用ox-LDL致心肌微血管内皮细胞损伤模型,进一步观察黄芩等5种中药醇提取物对损伤血管内皮细胞的保护作用。

1 材料

1.1 动物 出生5~7 d的SD大鼠乳鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2007-004。

1.2 药物 茶叶、红花、黄芩、贯叶金丝桃、木蝴蝶的70%乙醇提取物(由中国中医科学院中药研究所中药质量中心提供),水溶性维生素E(Aldrich,批号238813)。

1.3 试剂 DMEM培养基干粉(Gibco,批号1297499),优级新生牛血清(中美合资兰州民海生物工程有限公司,批号20090519),内皮细胞生长因子(bECGF,Roche,批号93297921),肝素钠(常州市新华活性材料研究所,批号20061126),明胶(Sigma,北京鼎国生物技术发展中心分装),II型胶原酶(Gibco,北京科海军舟有限公司分装),0.25%胰蛋白酶(Hyclone,批号JRG26965),噻唑蓝(MTT,Sigma,批号SP1080),二甲基亚砜(DMSO,北京化学试剂公司,批号20090402),氧化低密度脂蛋白(ox-LDL,批号20090722),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20090810,20091016)。

1.4 仪器 MCO-15AC型CO₂培养箱(日本Sanyo公司),MK型倒置显微镜(日本Olympus公司),

H2S-H型恒温水浴振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司),LDZ4-0.8型离心机(北京医用离心机厂),Multiskan MK3酶标仪(上海热电仪器公司)。

2 方法

2.1 大鼠乳鼠心肌微血管内皮细胞培养 参照Nishida等^[3]的方法略加改动。取2只出生5~7 d Wistar大鼠心脏,用PBS液洗除血液,剪开左心室,将心脏放于75%乙醇中浸泡30 s。PBS液冲洗后,剪碎心肌组织,加2 mL 0.2% II型胶原酶,在37℃振荡水浴孵育消化30 min;加入等体积终浓度为0.02%的胰蛋白酶,37℃水浴消化10 min。加入等量含血清培养基中和分离下的细胞过200目筛网,弃未过筛网的沉淀,取过滤液,离心(2 000 r·min⁻¹, 5 min),重复2次。所得细胞重悬于DMEM普通培养基中,并调整细胞密度到10⁴~10⁵个/mL,接种于1%明胶处理的培养瓶中,37℃培养4 h,以除去未黏附细胞,更换含50 mg·L⁻¹肝素、10 mg·L⁻¹内皮细胞生长因子的DMEM完全培养基培养。每2~3 d换液1次,直至长成细胞单层,选第3代内皮细胞,0.25%胰蛋白酶消化后备用。

2.2 ox-LDL氧化模型的建立及分组^[4-6] 选第3代内皮细胞,以1×10⁵个/mL的密度接种于96孔板,每孔0.1 mL,24 h细胞贴壁后,分为5组。①空白对照组:孔中加入无血清培养基100 μL;②模型对照组:孔中加入剂量为100 mg·L⁻¹的ox-LDL的无血清培养基100 μL作用24 h;③中药醇提取物高、中、低剂量组(含生药0.5,0.25,0.125 g·L⁻¹):分别加入相应的不同质量浓度的中药醇提取物100 μL(DMEM完全培养基配制)预作用24 h,然后换为含ox-LDL的无血清培养基100 μL作用24 h。

2.3 形态学观察 在倒置显微镜下观察孵育前和孵育24 h后内皮细胞形态学情况(主要观察细胞内空泡及细胞膜伪足的变化)。

2.4 细胞上清液SOD,MDA和GSH-Px的检测 孵育完毕后,收集细胞上清液,MDA,SOD,GSH-Px的测定严格按照试剂盒说明进行,其中MDA的测定为TBA法,SOD的测定为羟胺法,GSH-Px的测定为比色法,均在半自动生化分析仪上进行检测。

2.5 细胞存活情况检测 每孔单层细胞加入

DMEM 135 μL + 15 μL 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 溶液,置 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱,一定湿度孵育 4 h 后小心吸尽培养液,每孔加入 DMSO 120 μL ,振荡 10 min,酶标仪 492 nm 处测定吸光度 (A)。 A 与活细胞的量成正比。

$$\text{增殖率} = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{模型组}}) / A_{\text{模型组}} \times 100\%$$

2.6 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 形态学观察 在倒置显微镜下观察到,空白对照组细胞为单层,互不重叠呈铺石状镶嵌排列,呈多角形,边界清楚;经与 ox-LDL 共同孵育后,细胞间隙增宽,细胞收缩,胞膜皱缩,细胞边界不清,部分细胞脱落。MTT 染色后,模型组大部分细胞不着色,仅有少数细胞出现紫色结晶物,而给药各组细胞形态变化均不及模型组明显。

3.2 对 ox-LDL 损伤的内皮细胞存活情况的影响

与空白对照组相比,100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ox-LDL 溶液能明显降低内皮细胞存活率 ($P < 0.01$)。5 种中药醇提物的各剂量组对内皮细胞有不同程度的保护作用,使血管内皮细胞存活率增加,与模型组比较有显著性差异。见表 1。

3.3 对 ox-LDL 损伤的内皮细胞 MDA, SOD, GSH-Px 水平的影响

与空白对照组比较,模型组内皮细胞培养基中的 MDA 含量明显增多 ($P < 0.01$), GSH-Px, SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$);除贯叶金丝桃低剂量组和木蝴蝶低剂量组之外,其余各剂量组对 ox-LDL 氧化损伤的内皮细胞培养基中 MDA 含量具有不同程度的降低作用,与模型组比较有显著差别 ($P < 0.01, P < 0.05$);除茶叶高剂量组、红花中剂量组、黄芩高剂量组外,其余各剂量组均能不同程度地提高内皮细胞培养基 GSH-Px 活性,与模型组比较有显著差别 ($P < 0.01, P < 0.05$);除茶叶中剂量组外,其余各剂量组均能不同程度地提高内皮细胞培养基中 SOD 的活性,与模型组比较有显著差别 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 2。

4 讨论

血管内皮处于血液细胞与血管壁的分界面,是具有选择功能的屏障。研究表明血管内皮的功能失衡在 AS、高血压、缺血再灌注损伤等心脑血管病的发生中扮演着关键的角色^[7-8]。ox-LDL 具有高度细胞毒性,是造成血管内皮损伤、AS 发生与发展的重要危险因素之一^[9-10]。细胞内的抗氧化酶主要有

表 1 5 种中药醇提物对 ox-LDL 损伤的
微血管内皮细胞存活情况 (A) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	A	增殖率/%
对照	-	0.144 \pm 0.007 ²⁾	71.43
模型	-	0.084 \pm 0.006	-
VitE	0.25	0.097 \pm 0.007 ¹⁾	15.48
	0.125	0.117 \pm 0.006 ¹⁾	39.29
	0.062 5	0.130 \pm 0.018 ²⁾	54.76
黄芩	0.5	0.105 \pm 0.006 ¹⁾	25.00
	0.25	0.115 \pm 0.012 ¹⁾	36.90
	0.125	0.111 \pm 0.008 ¹⁾	32.14
茶叶	0.5	0.146 \pm 0.009 ²⁾	73.81
	0.25	0.127 \pm 0.007 ²⁾	51.19
	0.125	0.123 \pm 0.015 ¹⁾	46.43
贯叶金丝桃	0.5	0.132 \pm 0.019 ²⁾	57.14
	0.25	0.115 \pm 0.005 ¹⁾	36.90
	0.125	0.105 \pm 0.013	25.00
红花	0.5	0.141 \pm 0.009 ²⁾	67.86
	0.25	0.139 \pm 0.005 ²⁾	65.48
	0.125	0.126 \pm 0.020 ¹⁾	50.00
木蝴蝶	0.5	0.149 \pm 0.014 ²⁾	77.38
	0.25	0.136 \pm 0.017 ²⁾	61.90
	0.125	0.121 \pm 0.023 ¹⁾	44.05

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

SOD、过氧化氢酶 (CAT) 和 GSH-Px 等。SOD 可催化歧化反应,清除引发自由基连锁反应的起始基-超氧阴离子;GSH-Px 可及时清除脂质过氧化物 (LPO) 和 H_2O_2 ,减少 $\cdot\text{OH}$ 的生成,SOD 及 GSH-Px 活性高低可间接反映自由基的含量和脂质过氧化程度;MDA 是脂质过氧化的代谢产物,其水平的高低可反映脂质过氧化损伤的程度。已有的研究亦表明,ox-LDL 不仅使细胞膜上本身自由基的浓度增加,还可以使细胞抗氧化酶类等防御系统受到抑制和损伤^[11]。

本实验结果表明,与对照组相比,模型组 GSH-Px, SOD 活性显著降低,MDA 含量显著升高,细胞存活率显著下降;5 种中药醇提物能不同程度的提高 GSH-Px, SOD 活性,降低 MDA 含量,增加内皮细胞存活率,提示 5 种中药醇提物对 ox-LDL 损伤的心脏微血管内皮细胞具有不同程度的修复和保护作用,其机制可能与直接减少自由基生成,增强其清除,抑制脂质过氧化的发生以及增强内源性抗氧化酶的活

表 2 5 种中药醇提取物对内皮细胞 ox-LDL 损伤时 MDA, SOD, GSH-Px 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	GSH-Px/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白对照	-	83.23 \pm 5.61 ²⁾	16.78 \pm 0.32 ²⁾	1.22 \pm 0.10 ²⁾
模型对照	-	30.46 \pm 9.77	8.77 \pm 0.27	1.64 \pm 0.25
红花	0.5	48.92 \pm 14.62 ¹⁾	9.41 \pm 0.10 ²⁾	1.20 \pm 0.09 ²⁾
	0.25	51.32 \pm 4.91	9.27 \pm 0.72 ²⁾	1.22 \pm 0.18 ²⁾
	0.125	65.36 \pm 5.52 ²⁾	9.62 \pm 0.27 ²⁾	1.01 \pm 0.06 ²⁾
黄芩	0.5	65.35 \pm 7.76	9.17 \pm 0.31 ²⁾	0.92 \pm 0.01 ²⁾
	0.25	51.51 \pm 6.37 ²⁾	10.39 \pm 0.81 ²⁾	1.22 \pm 0.19 ²⁾
	0.125	67.02 \pm 2.96 ²⁾	10.61 \pm 0.55 ²⁾	1.20 \pm 0.14 ²⁾
贯叶金丝桃	0.5	56.49 \pm 12.41 ²⁾	9.92 \pm 0.54 ²⁾	1.15 \pm 0.13 ²⁾
	0.25	50.58 \pm 11.42 ²⁾	9.54 \pm 0.50 ²⁾	1.15 \pm 0.07 ²⁾
	0.125	43.75 \pm 5.44 ²⁾	10.18 \pm 0.82 ¹⁾	1.54 \pm 0.06
木蝴蝶	0.5	45.60 \pm 8.82 ¹⁾	9.40 \pm 0.38 ¹⁾	1.35 \pm 0.08 ²⁾
	0.25	54.28 \pm 7.10 ¹⁾	9.40 \pm 0.51 ²⁾	1.28 \pm 0.14 ²⁾
	0.125	50.77 \pm 13.25 ²⁾	9.54 \pm 0.27 ²⁾	1.49 \pm 0.05
茶叶	0.5	53.72 \pm 5.89	8.59 \pm 0.65 ¹⁾	1.59 \pm 0.17 ²⁾
	0.25	46.15 \pm 11.95 ²⁾	7.47 \pm 0.44	1.67 \pm 0.25 ²⁾
	0.125	52.80 \pm 3.16 ¹⁾	9.92 \pm 0.49 ²⁾	1.78 \pm 0.13 ²⁾

性有关,但其具体机制尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京:科学出版社, 1999.
- [2] 杨滨,梁日欣,周晓宁,等. 黄芩脂质过氧化抑制率与有效成分含量的相关性研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16):2019.
- [3] Nishida M, Carley W W, Gerritsen M E, et al. Isolation and characterization of human and rat cardiac microvascular endothelial cells [J]. Am J Physiol, 1993, 264:H639.
- [4] Deshpande N N, Sorescu D, Seshiah P, et al. Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle [J]. Antioxid Redox Signal, 2002, 4(5):845.
- [5] Forman H J, Torres M, Fukuto J. Redox signaling [J]. Mol Cell Biochem, 2002, 234(1/2):49.
- [6] Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison D G, et al. Interactions of peroxynitrite tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase [J]. J Biol Chem, 2003, 278(25):22546.
- [7] Seifried H E, McDonald S S, Anderson D E, et al. The antioxidant conundrum in cancer [J]. Cancer Res, 2003, 63(15):4295.
- [8] Diplock A T, Charleux J L, Crozier-Willi G, et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species [J]. Br J Nutr, 1998, 80 (Suppl 1):S77.
- [9] Chang M Y, Lees A M, Lees R S. Low-density lipoprotein modification and arterial wall accumulation in a rabbit model of atherosclerosis [J]. Biochemistry, 1993, 32:8518.
- [10] Hein T W, Kuo L. LDLs impair vasomotor function of the coronary microcirculation: role of superoxide anions [J]. Circ Res, 1998, 83:404.
- [11] 黄从刚,魏劲波. 自由基清除剂对动脉粥样硬化的影响[J]. 医学综述, 1998(4):166.

[责任编辑 何伟]