

黄芪多糖对高血压病血瘀证患者血清损伤的人脐静脉内皮细胞形态学、活性的影响

张竞之^{1*}, 陈利国², 贾会欣³, 胡小勤⁴

(1. 广州医学院第二附属医院中医科, 广州 510260; 2. 暨南大学医学院, 广州 510632;
3. 大庆油田总医院中医科, 黑龙江 大庆 163001;
4. 广西中医学院药学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 观察黄芪多糖 (astragalus polysaccharide, APS) 对高血压病血瘀证患者血清损伤的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC-C) 形态学、活性的影响。方法: 将培养的高血压病血瘀证患者血清损伤的 HUVEC-C 分别用不同浓度的 APS 含药血清干预后, 倒置显微镜下观察其形态学变化, MTT 法检测其活性。结果: APS 呈剂量依赖性升高损伤的细胞 OD 值, 且随着药物组浓度的增加, 细胞的形态趋向正常细胞。结论: APS 能够抵抗高血压病血瘀证患者血清中有害因子对 HUVEC-C 的损伤作用, 能增强细胞的活性和维持细胞的形态结构, 并呈剂量依赖性。

[关键词] 高血压; 血瘀证; 人脐静脉内皮细胞; 黄芪多糖

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0170-04

Effects of Astragalus Polysaccharide on Activity and Morphological Changes in HUVEC Induced by Serum from Patients with Blood Stasis Syndrome and Hypertension

ZHANG Jing-zhi^{1*}, CHENG Li-guo², JIA Hui-xin³, HU Xiao-qin⁴

(1. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China;
2. College of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
3. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;
4. Daqing Oil Field Hospital, Daqing 163001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Astragalus Polysaccharide (APS) on activity and morphological changes in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by serum from patients with blood stasis syndrome (BSS) and hypertension. **Method:** The HUVEC was affected by the serum of the patient with BSS associated with hypertension and different dosage of APS was applied for intervention. The activity of the HUVEC was determined by MTT assay and the morphological changes were observed by the inverse phase contrast microscope. **Result:** APS had the protective effect for lightening the HUVEC shape change affected by the serum from patient of BSS associated with hypertension and the activity was increased in a dose-dependent manner. **Conclusion:** APS can lighten the injury of the HUVEC affected by the serum from the patient of BSS associated with hypertension, increase cells activity and maintenance for the normal shape of the cells.

[Key words] hypertension; blood stasis syndrome; HUVEC; astragalus polysaccharide

[收稿日期] 20100710(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30572289); 广东省自然科学基金项目(5006019)

[通讯作者] * 张竞之, 讲师, 医学博士, 从事血瘀证及活血化瘀药物研究, Tel: 13570480695, E-mail: doctorzjz@126.com

高血压病是一个处于不断进展状态的心血管综合征,可导致血管功能与结构的改变。血管内皮细胞衬于整个心血管系统的内表面,其损伤程度与高血压的严重程度呈正相关。血瘀证是高血压病中医辨证中的常见证型,人们在研究血瘀证时,开始关注血管内皮细胞与血瘀证的关系,发现血管内皮细胞的形态变化、功能变化与血瘀证有密切的关系^[1-2],因此通过观察血瘀证患者血清对人脐静脉内皮细胞(HUVEC-C)的影响及药物的干预作用,可深入探讨血瘀证形成的病理机制和药物的作用机制。本实验观察了黄芪多糖(APS)对高血压病血瘀证患者血清致伤 HUVEC-C 形态学及活性的影响。

1 材料

1.1 细胞来源 人脐静脉内皮细胞株(HUVEC-C)购自武汉大学“中国典型培养物保藏中心”。

1.2 血清的收集

1.2.1 研究对象 高血压病血瘀证组:40例,为2007年3月至2008年6月暨南大学附属第一医院心血管科、中医科门诊及住院确诊者。诊断符合世界卫生组织/国际高血压学会统一的“高血压病”诊断标准,血瘀证诊断参照1986年修订的诊断标准。其中,按血压级别分为:2级高血压患者31例,3级高血压患者9例;男性患者23例,女性患者17例;平均收缩压(168.63 ± 14.45) mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa),平均舒张压(105.93 ± 8.27) mmHg;平均年龄(65.23 ± 8.46)岁。本课题选用的血瘀证主要证型为:气虚血瘀证、阴虚血瘀证、痰湿血瘀证,少量为气滞血瘀证和热结血瘀证,所选病例能较好的代表血瘀证的各种兼证的临床分布情况。高血压病非血瘀证组:40例,为2007年3月至2008年6月暨南大学附属第一医院心血管科、中医科门诊及住院确诊者。诊断符合世界卫生组织/国际高血压学会统一的“高血压病”诊断标准。其中,按血压级别分为:2级高血压患者32例,3级高血压患者8例;男性患者25例,女性患者15例;平均收缩压(166.19 ± 7.56) mmHg,平均舒张压(103.53 ± 8.47) mmHg;平均年龄(64.60 ± 9.46)岁。

2组患者均为原发性高血压患者,排除糖尿病,排除心、脑、肾等靶器官损害及并发症,检查前1周末服用影响血压的药物。2组患者的血压分级、性别分布、平均血压、平均年龄、血脂异常无统计学差异,具有基线可比性。

健康组:选择暨南大学医学院中医系研究生健康志愿者30人作为正常对照组。健康人血压均在正常范围,与高血压病患者血压比较,有统计学差异($P < 0.01$)。

1.2.2 血清收集 患者组及对照组均空腹取血,置入无菌带帽不抗凝干燥试管,自凝后离心(4°C , $2\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min),取上清液置无菌EP管,冻存于 -20°C ,备用。

1.3 药物 APS系南京青泽医药科技发展有限公司生产,批号SLM018;DMEM培养基为Gibco公司产品;南美胎牛血清为Gibco公司产品;胰蛋白酶、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)为Sigma公司产品;青霉素、链霉素为华北制药股份有限公司产品;其他试剂如碳酸氢钠、氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、葡萄糖均为国产分析纯。

1.4 仪器 酶标仪680型为美国Bio-rad公司产品。倒置相差显微镜及摄影装置为德国Leica公司。

2 方法

2.1 APS母液的配制 在预实验中,观察了1,10,100,1 000,10 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 5个梯度的APS溶液对高血压病血瘀证患者血清致伤人脐静脉内皮细胞的作用,发现1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 无效,10,100,1 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 有效,10 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 有细胞毒性。根据以上结果,取12.8 mg的APS,溶于2 mL的DMEM中,制成APS母液,使其浓度为6.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,4 $^\circ\text{C}$ 避光保存。

2.2 分组及条件培养基的配制(以10 mL计算,血清的浓度均为10%) 健康组:9 000 μL DMEM + 1 000 μL 健康人血清;非血瘀组:9 000 μL DMEM + 1 000 μL 非血瘀证患者血清;血瘀组:9 000 μL DMEM + 1 000 μL 血瘀证患者血清;APS1(80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组:8 875 μL DMEM + 1 000 μL 血瘀证患者血清 + 125 μL APS母液;APS2(160 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组:8 750 μL DMEM + 1 000 μL 血瘀证患者血清 + 250 μL APS母液;APS3(320 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组:8 500 μL DMEM + 1 000 μL 血瘀证患者血清 + 500 μL APS母液。

本实验DMSO的终浓度为0.1%(DMSO的终浓度不超过0.1%时,对细胞生物性状无影响),各组培养基经过滤除菌后备用。

2.3 细胞干预 将处于对数生长期的细胞,经胰酶消化后,用含10%的胎牛血清DMEM培养基制成单细胞悬液,调整细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,接种于96孔

培养板中, 200 μL /孔, 每排接种 6 个复孔(每排 8 孔), 最边上的复孔只加 100% DMEM 培养基, 不接种细胞。将铺板的细胞培养至细胞近 70% ~80% 汇合时, 换 100% DMEM 培养基 200 μL /孔同步化 24 h, 后按正常组、非血瘀组、血瘀组、APS1 组、APS2 组、APS3 组并换相应的条件培养基, 200 μL /孔, 干预 24 h。

2.4 细胞的形态观察 HUVEC-C 细胞干预 24 h 后, 于倒置相差显微镜下观察各组细胞的形态。

2.5 MTT 法检测细胞活性 将用不同条件培养基干预 24 h 的 HUVEC-C 细胞分别加入 MTT 溶液条, 每孔 20 μL ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 及饱和湿度条件下的细胞培养箱中孵育 4 h, 去上清, 每孔用 PBS 洗 3 次, 去上清, 每孔加 DMSO 150 μL , 充分振荡 10 min, 使蓝紫色结晶充分溶解, 在全自动酶标仪 570 nm 波长处测定各孔的 OD 值。实验中不加细胞只加培养液的孔为空白对照孔, 其操作与实验组相同。最后比色同, 以空白对照孔调零。

2.6 统计学处理 计量数据以均数标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件包进行方差齐性检验, 样本均数间的比较采用 t 检验; 与对照组的比较用单因素方差分析和组间 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 形态改变 倒置相差显微镜下观察, 健康组: 细胞呈扁平状、长梭形、多角形、或椭圆形, 镶嵌状紧密排列, 细胞核居中稍微隆起, 部分细胞轮廓亦不清; 非血瘀证组: 多数细胞收缩变形, 部分呈圆形, 细胞间隙变宽, 部分细胞轮廓不清, 大多细胞胞浆中有暗色颗粒, 细胞碎片较多; 血瘀证组: 细胞多呈多角形或椭圆形, 部分甚至呈圆形, 细胞间隙变宽, 部分细胞轮廓不清, 大多细胞胞浆中有暗色颗粒, 细胞碎片较多; APS1 组、APS2 组: 多数细胞收缩变形, 部分呈椭圆形, 细胞碎片较多, 部分细胞轮廓不清, 细胞间隙变宽, 大多细胞胞浆中有暗色颗粒; APS3 组: 细胞呈扁平状、或椭圆形镶嵌状紧密排列, 可见细胞碎片, 部分细胞胞浆中有暗色颗粒, 细胞轮廓不清。

3.2 MTT 法检测细胞活性 由表 1 可见, 血瘀证组与健康组比较, 细胞活性有显著差异 ($P < 0.01$), 加入 APS 干预后, 与血瘀证组相比, 呈剂量依赖性升高细胞的 OD 值, 差异显著 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

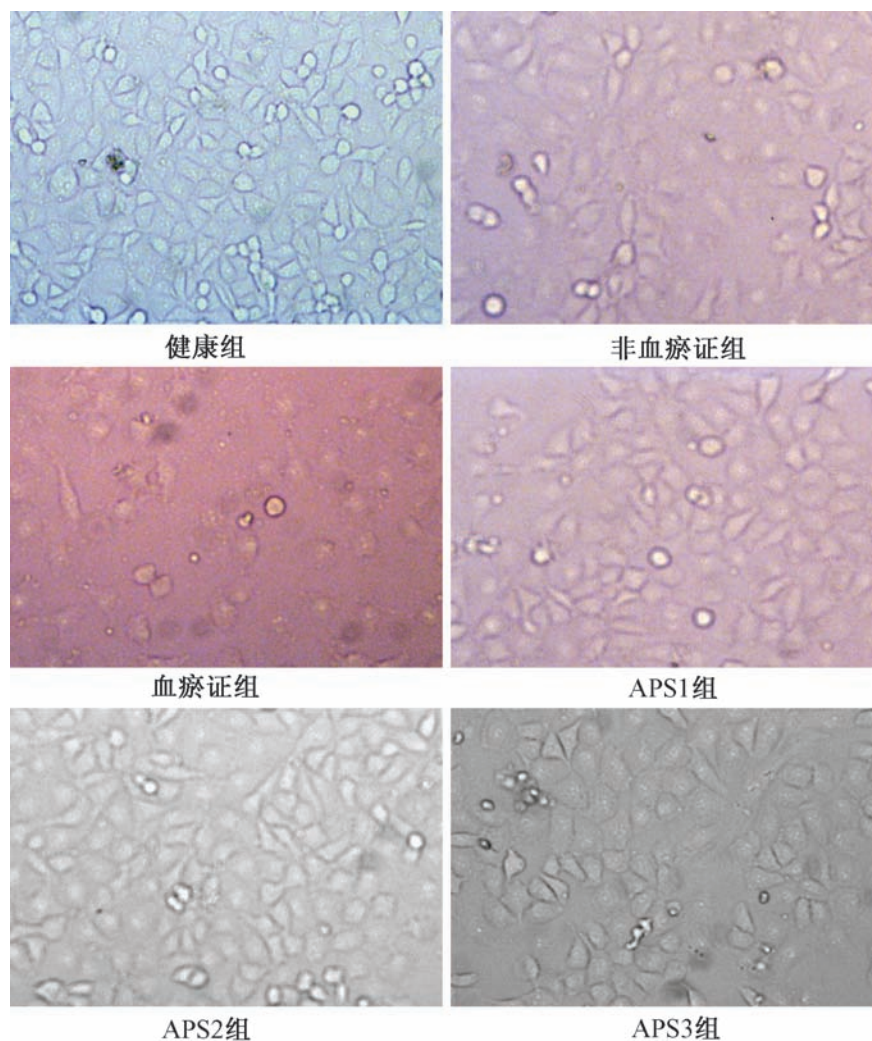


图 1 各组细胞形态改变

表 1 不同干预条件对细胞活性影响的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值	n
健康	0.441 9 \pm 0.021 6 ³⁾	30
非血瘀证	0.319 6 \pm 0.047 9 ^{1,2)}	40
血瘀证	0.224 3 \pm 0.029 8 ¹⁾	40
APS 小剂量	0.234 0 \pm 0.037 6 ^{1,2)}	40
APS 中剂量	0.265 6 \pm 0.023 3 ^{1,2)}	40
APS 大剂量	0.348 7 \pm 0.046 9 ^{1,3)}	40

注: 与健康组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与血瘀证组比较²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ 。

4 讨论

现代研究认为, 高血压病是与免疫密切相关的疾病^[3], 血瘀证是高血压病常见证型, 免疫紊乱是其重要的病理实质。黄芪是传统的益气药, 虽然没有直接活血的功能, 但有活血之药用, 这可在中医的气血理论和现代药理研究中找到证据^[4], APS 是黄芪中最重要的决定其作用的有效成分, 能提高人体免疫功能。以上研究为高血压病的发病机制和治疗研究提供了新的思路, 本实验从免疫角度探讨 APS 对高血压病血瘀证损伤的血管内皮细胞的保护作用。

通过形态学观察的方法可以了解高血压血管内皮损伤的程度, 对于血瘀证损伤血管内皮细胞的形态变化, 王奇等^[5] 曾做了用血瘀证兔模型来培养血管内皮细胞的尝试, 发现有很大的形态学变化, 但是

由于生物学和差异,动物和人类的疾病实际上相差甚远,利用患者的血清干预人体的正常血管内皮细胞来观察其形态学变化,更接近人类疾病的实际情况。MTT法(四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法),是检测细胞增殖活力的一种简便、准确的方法,可用于研究血管内皮细胞的活性。我们的前期研究中,也用 MTT 法发现高血压病血瘀证患者血清可以损伤内皮细胞^[6]。

本实验结果表明,高血压病患者血清可以降低 HUVEC-C 的活性,非血瘀证、血瘀证组与健康组比较,均有显著差异,说明高血压病患者血清中有损伤细胞、影响细胞增殖的因素存在。血瘀证组细胞较非血瘀证组细胞损伤作用更明显,提示高血压病血瘀证患者血清中的致伤因子的作用较非血瘀证血清中的更强,或者有不同于非血瘀证的致伤因子的可能。加入 APS 干预后,与血瘀证组相比,呈剂量依赖性升高细胞的 OD 值,差异显著,说明 APS 能够明显改善血瘀证患者血清对 HUVEC-C 活性的抑制作用,并呈剂量依赖性,但不能将其活性恢复至损伤前。倒置相差显微镜下观察发现,高血压病血瘀证组与健康组的细胞之间形态差异明显,但随着药物组浓度的增加,细胞的形态趋向正常细胞,呈剂量依赖性的抵消患者血清对细胞的损伤。实验说明,

APS 能够抵抗高血压病血瘀证患者血清中有害因子对 HUVEC-C 的损伤作用,能增强细胞的活性和维持细胞的形态结构,并呈剂量依赖性。这一过程可能与 APS 的调解免疫功能有关,调解免疫药有可能成为有价值的高血压病血管内皮细胞保护药,但其具体机制尚须进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 衷敬柏. 内皮素与血瘀证相关性研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(8): 624.
- [2] 张兰凤, 王阶. 血瘀证的细胞学和分子学研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(1): 71.
- [3] 廖玉华, 周子华, 魏宇森, 等. 高血压中免疫介导血管重塑发病机制及其标志物研究[J]. 医学研究杂志, 2007, 36(3): 5.
- [4] 韩娟, 刘宏艳, 肖照岑. 黄芪活血功效刍议[J]. 云南中医中药杂志, 2008, 29(3): 21.
- [5] 王奇, 陈云波, 赖世隆, 等. 血府逐瘀汤对用血瘀证兔血清损伤的血管内皮细胞的形态学影响[J]. 广州中医药大学学报, 2001, 18(2): 104.
- [6] 胡小勤, 陈利国, 贾会欣, 等. 丹参酮_A对高血压病血瘀证患者血清致伤 ECV-304 细胞活性的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(7): 964.

[责任编辑 邹晓翠]