

# 淫羊藿苷对 HCY 诱导的血管内皮细胞内质网应激的影响

魏晏<sup>1</sup>, 沈晓君<sup>2\*</sup>

(1. 河南中医学院第三附属医院, 郑州 450008; 2. 河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 研究淫羊藿苷(icariin, ICA)对同型半胱氨酸(homocysteinemia, HCY)诱导的血管内皮细胞内质网应激的影响, 探讨 ICA 抗动脉粥样硬化的机制。方法: 建立 HCY 诱导的兔血管内皮细胞损伤模型, 与不同浓度的 ICA 共同培养 48 h 后, TUNEL 法检测细胞凋亡率; RT-PCR 检测葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78, GRP78) 基因表达; 目的基因克隆、鉴定并测序。结果: 荧光显微镜观察显示 HCY 模型组可见多数凋亡细胞, ICA 组细胞未见明显凋亡形态学改变; ICA 处理组细胞 GRP78 mRNA 表达明显减少, 与 HCY 组比较差异显著( $P < 0.01$ ); 测序结果表明, 来源于血管内皮细胞的全长 648 bp 的基因片段与兔 GRP78 基因高度同源。结论: ICA 拮抗 HCY 诱导的血管内皮细胞凋亡, 减缓血管内皮细胞内质网应激可能是其作用机制之一。

[关键词] 淫羊藿苷; 同型半胱氨酸; 血管内皮细胞; 内质网应激

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0147-04

## Effects of ICA on HCY-induced Vascular Endothelial Cells Endoplasmic Reticulum Stress

WEI Yan<sup>1</sup>, SHEN Xiao-jun<sup>2\*</sup>

(1. No. 3 Affiliated Hospital of Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;  
2. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract] Objective:** To study the effects of ICA on HCY-induced vascular endothelial cells endoplasmic reticulum stress, and to explore ICA anti-atherosclerotic mechanisms. **Method:** HCY-induced rabbit endothelial cell injury models were established, and co-cultured with different concentrations of ICA for 48 hours, then apoptosis rate was assayed by TUNEL; Glucose-regulated protein 78 (GRP78) gene expression was done by RT-PCR detection; The wanted gene was cloned, identified and sequenced. **Result:** The fluorescence microscope observation showed that there were majority of apoptotic cells in HCY model group, and in ICA group there was no significant morphological changes of apoptosis. Compared with HCY group, cell GRP78 mRNA expression in ICA treatment group significantly reduced ( $P < 0.01$ ). Sequencing results showed that full-length 648bp gene fragment derived from vascular endothelial cells was highly homologous with rabbit GRP78 gene. **Conclusion:** ICA can resist HCY-induced endothelial cell apoptosis and slow down vascular endothelial cells endoplasmic reticulum stress, which may be one of the mechanisms of its role.

**[Key words]** icarinn; homocysteine; vascular endothelial cells; endoplasmic reticulum stress

[收稿日期] 20100127(003)

[基金项目] 河南省科技攻关计划项目(0624420026)

[第一作者] 魏晏, 主管药师, 主要从事心血管药理研究, Tel: 13303833958, E-mail: 515986041@qq.com

[通讯作者] \* 沈晓君, 教授, Tel: (0371) 68189816, E-mail: shenxiaojun0628@163.com

血管内皮细胞受损是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)病变形成的始发因素, 对内皮细胞的保护是 AS 防治的关键, 近年来的研究表明, 中药在内皮保护方面具有良好的应用前景。本实验通过观察中药黄酮类化合物淫羊藿苷(icariin, ICA)对同型半胱氨酸(homocysteinemia, HCY)诱导的血管内皮细胞

内质网应激途径标志蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein, GRP78) 基因表达的影响, 探讨其保护血管内皮细胞可能的作用靶点, 为 ICA 治疗 AS 等新的适应证提供实验依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 药物** ICA 对照品购自中国药品生物制品检定所, 纯度 99%, 批号 110737-200312。

**1.2 细胞株** 人主动脉内皮细胞购自美国 San Diego 细胞应用公司。

**1.3 试剂** HCY 为 Sigma 公司产品, 批号 C-7352, In situ Apoptosis Detection Kit, pMD-19T 载体, DNA 连接酶, 大肠埃希菌 JM109, 限制性内切酶 BamH<sub>I</sub>, 限制性内切酶 Hinc<sub>II</sub>, Taq 酶均为大连宝生物工程有限公司产品, DMEM 购自 Gibco BRL USA 公司, 高纯总 RNA 快速提取试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司, 逆转录试剂盒, Fermentas 产品。

**1.4 仪器** Hera CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (德国 GMBH 公司), 209b 型超净工作台 (苏净集团安泰公司), BH-NIC-B 型倒置显微镜 (日本 Olympus Optical 公司), Gel Doc 200™ 型凝胶图像分析仪 (美国 BIORAD 公司); TGRADIENT 型 PCR 仪 (德国 Biometra 公司)。

## 1.5 方 法

**1.5.1 模型建立及实验分组** 兔主动脉内皮细胞置于含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中, 加入终浓度为 100 mg · L<sup>-1</sup> 的链霉素与青霉素, 在 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 用含 0.01% EDTA 的 0.25% 胰酶进行消化传代, 处于对数生长期的第 3 ~5 代细胞用于实验。取生长良好的细胞按 1 × 10<sup>8</sup> /L 密度稀释后接种于 96 孔培养板培养 24 h, 分为空白组、HCY 模型组、ICA 处理组, 每组设 6 个复孔, HCY 模型组、ICA 处理组均加入同型半胱氨酸, 剂量为 10<sup>-4</sup> mol · L<sup>-1</sup>, 培养 24 h 后, ICA 处理组分别加入终浓度 0.4, 0.2, 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 的 ICA, 继续培养 48 h 后, 分别收集细胞。

**1.5.2 原位缺口末端标记法 (TUNEL) 检测细胞凋亡** 按试剂盒说明操作: 收集各组细胞后涂片, 用 PBS 清洗固定。Permeabilisation Buffer 100 μL 冰上反应 2 ~5 min, PBS 清洗细胞。把预冷的反应液 50 μL (TdT Enzyme 5 μL + Labeling Safe Buffer 45 μL) 加至载玻片上, 保湿箱中 37 ℃ 反应 60 ~90 min, 荧光显微镜观察细胞染色情况。

**1.5.3 RT-PCR 检测 GRP78 mRNA 表达** 总 RNA

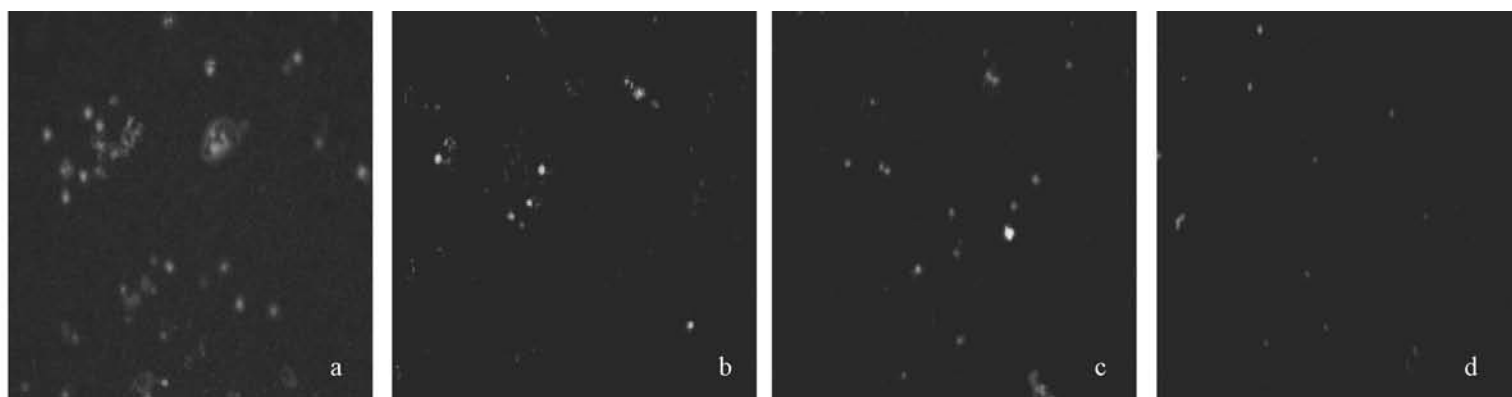
提取: 用高纯总 RNA 快速提取试剂盒提取每组细胞总 RNA, 经紫外分光光度仪测定, 纯度要求 A<sub>260nm</sub> / A<sub>280nm</sub> > 1.8, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性, 28s/18s 约等于 2, 置于 -70 ℃ 冰箱中保存; cDNA 合成: 按逆转录试剂盒说明书进行: 在离心管加入总 RNA 10 μL, Oligo 引物 1 μL, DEPC 处理水 1 μL, 轻轻混合, 瞬时离心, 70 ℃ 5 min, 冰上冷却, 瞬时离心。加入 5 × buffer 4 μL, 逆转录酶抑制剂 1 μL, 10 mmol · L<sup>-1</sup> dNTP<sub>mix</sub> 2 μL, 37 ℃ 5 min, 再加入 M-MLV 逆转录酶 1 μL, 42 ℃ 60 min, 70 ℃ 10 min, 冰上冷却; PCR 反应: 以 cDNA 为模板, 以  $\beta$ -actin 为内参照, 扩增 GRP78 基因片段。  $\beta$ -actin 引物设计, 上游引物: 5'-CTA CAA TGA GCT GGT GTG G-3', 下游引物: 5'-TAG CTC TTC TTC AGG GAG GA-3'; GRP78 序列引物, 上游: 5'-TCT AGG TGA ACG ACC CCT AAC-3', 下游: 5'-GTT CTC TCA ATT TTC TCC CAA C-3', 扩增片段分别为 268, 648 bp, 反应体系为 25 μL。反应条件为: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 50 s, 55 ℃ 退火 50 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个反应循环, 72 ℃ 最后延伸 3 min。取 5 μL RT-PCR 产物及 5 μL DNA Marker 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 采用 Gel Doc 200™ 型凝胶图像分析仪进行吸光度扫描, 观察条带的灰度强弱, 结果以目的基因与  $\beta$ -actin 的积分吸光度比值表示。

**1.5.4 克隆差异表达基因片段、酶切鉴定并测序** PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切下目的片段, 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收。目的片段与质粒 pMD19-T 载体的重组连接、连接产物转化大肠埃希菌 JM109、感受态的制备和转化方法参照分子克隆第 3 版进行。重组质粒的筛选和鉴定根据蓝白筛选原理, 白色菌落即为重组克隆, 随机挑取 5 个阳性菌落转种于 Amp<sup>+</sup> LB 固体培养基, 37 ℃ 培养 18 ~24 h 后准备鉴定。取少许菌落, 溶于 30 μL 去离子水中, 100 ℃ 煮沸 10 min, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min。取 5 μL 上清作为模板, PCR 扩增 30 个循环, 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分析。参照 Vitagene 日常型质粒 DNA 小量纯化试剂盒说明书进行质粒提取。用限制性内切酶 BamH<sub>I</sub> 单酶切, BamH<sub>I</sub> 和 Hinc<sub>II</sub> 双酶切重组质粒 pMD-19T-GRP。并将鉴定过已经转化进目的片段的细菌交于上海捷瑞公司, 采用 Sanger 末端终止法进行测序, 利用生物学软件对测序结果进行分析。

## 2 结果

### 2.1 原位缺口末端标记法 (TUNEL) 检测细胞凋亡

荧光显微镜观察显示 HCY 模型组可见多数凋亡



a. HCY 模型组; b. ICA 0.1 mg/L; c. ICA 0.2 mg · L<sup>-1</sup>; d. ICA 0.4 mg · L<sup>-1</sup>

图 1 淫羊藿苷对 HCY 诱导细胞凋亡的影响

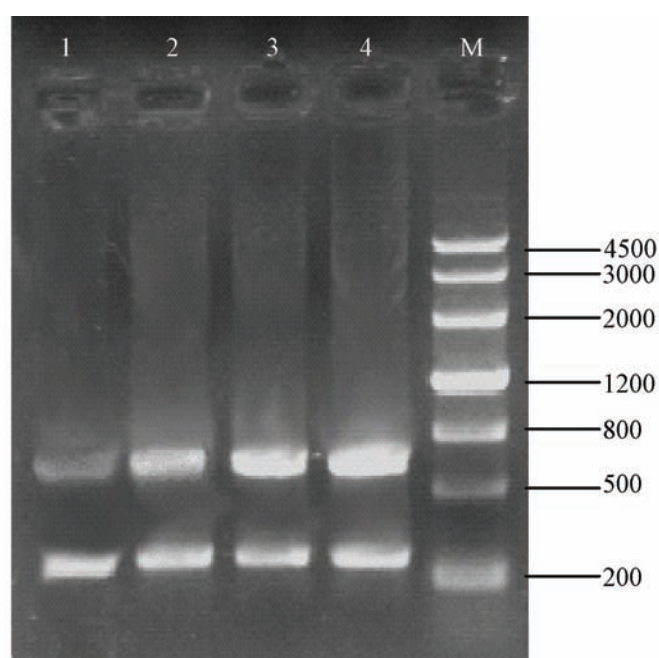
### 2.2 ICA 对血管内皮细胞 GRP78 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示, ICA 处理组细胞 GRP78 mRNA 表达明显减少, 与 HCY 比较差异显著 ( $P < 0.01$ ), 见表 1, 图 2。

表 1 ICA 对血管内皮细胞 GRP78 mRNA 表达的影响 (̄±s, n=6)

组别	剂量	GRP78 mRNA / -actin mRNA
空白对照	—	0.528 ±0.021
HCY	10 <sup>-4</sup> mol · L <sup>-1</sup>	1.323 ±0.044
ICA	0.1 mg · L <sup>-1</sup>	0.787 ±0.039 <sup>1)</sup>
	0.2 mg · L <sup>-1</sup>	0.702 ±0.032 <sup>1)</sup>
	0.4 mg · L <sup>-1</sup>	0.675 ±0.037 <sup>1)</sup>

注: 与 HCY 组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。



1 ~3. ICA 0.4 mg · L<sup>-1</sup>, 0.2 mg · L<sup>-1</sup>, 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 组;  
4. HCY 组; M marker

图 2 淫羊藿苷对血管内皮细胞 GRP78 mRNA 表达的影响

### 2.3 目的基因测序

结果表明, 全长 648 bp 的基因片断与兔葡萄糖调节蛋白 78 基因高度同源。

## 3 讨论

内皮细胞不仅是血管内膜的重要屏障, 而且具

细胞, 表现为核体积缩小, 核染色质浓缩、凝聚, 并可见凋亡小体; ICA 组镜下可见少量细胞碎屑, 凋亡细胞数明显减少, 见图 1。

有分泌功能。各种原因引起血管内皮细胞受损时, 损伤的内皮细胞可分泌生长因子, 吸引单核细胞聚集、黏附并迁入内皮下间隙, 摄取脂质, 形成单核细胞源性泡沫细胞, 因此, 内皮细胞损伤 AS 的首发步骤<sup>[1]</sup>。众多临床与实验研究表明, 血浆 HCY 浓度升高可促进动脉粥样硬化与血栓形成, 高 HCY 血症是血管疾病的一种新的独立危险因素, 且影响其预后<sup>[2]</sup>。研究发现, HCY 可以通过损伤血管内皮细胞启动粥样斑块和血栓形成<sup>[3]</sup>; 体外内皮细胞培养也显示 HCY 能诱导其凋亡, 提示 HCY 可能通过内皮细胞凋亡而促进动脉粥样硬化<sup>[4]</sup>。

内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 是指由于某种原因导致细胞内质网稳态失衡、生理功能发生紊乱的一种亚细胞的病理过程。ERS 分别在脂质代谢异常、炎症反应的激活、诱导特殊细胞凋亡等过程中起着重要的作用。GRP78 是热休克蛋白 70 家族成员之一, 作为一种分子伴侣在蛋白质的折叠和转运过程中发挥重要作用, GRP78 也是内质网的一种应激蛋白, 在应激状态下可大量表达, 因此被称为内质网应激 marker 蛋白。近年来的研究表明, ERS 参与动脉粥样硬化的发生发展<sup>[5]</sup>。HCY 等独立的心血管病危险因素也被证明有可能部分通过诱导 ERS 而诱发动脉粥样硬化<sup>[6]</sup>。研究报道培养的人脐静脉内皮细胞经 HCY 处理可以上调 GRP78 等 ERS 分子的表达; 高 HCY 血症通过 IRE1 途径调节 ERS, 并通过激活 JNK 和 ATF3 介导培养的人脐静脉内皮细胞凋亡<sup>[7]</sup>。细胞受刺激时 GRP78 呈高表达可能是细胞的一种重要的防御机制, 该机制对细胞有保护作用, 从而延长在各种不利因素刺激下细胞的生存期。

ICA 是从淫羊藿茎叶中提取的淫羊藿总黄酮中主要有效成分,传统医学认为 ICA 具有补肾壮阳,祛风湿、强筋骨等功效,近年来的研究表明其对心脑血管疾病有很高的应用价值,具有极大的研究和开发潜力,是近年来国内外学者研究的热点中药单体成分之一<sup>[8,9]</sup>。于永红等<sup>[10]</sup>的研究发现茵陈、赤芍、三棱、淫羊藿具有降脂、抗脂质过氧化、保护内皮细胞的功能,对家兔实验性 AS 病灶有明显的消退作用。本实验结果显示 HCY 模型组多数血管内皮细胞凋亡,ICA 组细胞未见明显凋亡形态学改变,进一步支持 ICA 保护血管内皮细胞的理论;ICA 组 GRP78 基因低表达,提示 ICA 内皮保护作用可能与减缓 HCY 诱导的血管内皮细胞 ERS 损伤有关,但 ICA 调控 GRP78 表达的途径和分子机制还有待于进一步的深入研究。

#### [参考文献]

[ 1 ] 李玉林. 病理学 [ M ] . 北京: 人民卫生出版社, 2008: 113.  
[ 2 ] 李计元. 同型半胱氨酸与血管疾病 [ J ] . 医学综述, 2008, 14( 5 ) : 217, 317.

[ 3 ] 何志勇, 王小同. 同型半胱氨酸诱导内皮细胞凋亡的研究进展 [ J ] . 中国脑血管病杂志, 2005, 2( 3 ) : 141.  
[ 4 ] Chambers J C, Obeid O A, Kooner J S. Physiological increments in plasma homocysteine induce vascular endothelial dysfunction in normal human subjects [ J ] . Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19: 2922.  
[ 5 ] 方希, 薛丹婷, 方立, 等. 内质网应激与动脉粥样硬化 [ J ] . 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13( 8 ) : 947.  
[ 6 ] Glass C K, Witztum J L. Atherosclerosis: the road ahead [ J ] . Cell, 2001, 104( 4 ) : 563.  
[ 7 ] 陈鹏. 内质网应激反应与心血管系统疾病 [ J ] . 心血管病进展, 2009, 30( 2 ) : 301.  
[ 8 ] 黄秀兰, 周亚伟, 王伟. 淫羊藿黄酮类化合物药理研究进展 [ J ] . 中成药, 2005, 27( 6 ) : 719.  
[ 9 ] 王英军, 孙英莲, 唐炜, 等. 淫羊藿总苷对实验动物心血管系统的影响 [ J ] . 中草药, 2007, 38( 1 ) : 97.  
[ 10 ] 于永红, 胡昌兴, 孟卫星, 等. 茵陈、赤芍、三棱、淫羊藿对家兔实验性动脉粥样硬化病灶的消退作用及原癌基因 C-myc、C-fos、V-sis 表达的影响 [ J ] . 湖北民族学院学报: 医学版, 2001, 18( 2 ) : 4.

[ 责任编辑 邹晓翠 ]