

葛根素对缺氧损伤的大鼠脑微血管内皮细胞凋亡和功能的影响

陈冰^{1*}, 李毅², 商悦²

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700;

2. 中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

[摘要] 目的: 研究葛根素对缺氧损伤的大鼠脑微血管内皮细胞 (rCMEC) 凋亡和功能的影响及其机制。方法: 建立缺氧损伤的 rCMEC 模型, 采用四甲基偶氮唑盐法 (MTT), 流式细胞术, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 和免疫印记法 (Western blot), 观察葛根素对 rCMEC 分泌组织型纤溶酶原激活物 (t-PA), 组织纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI), 一氧化氮 (NO), 内皮素 (ET), 表达血管内皮生长因子 (VEGF) 和内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的影响。结果: 葛根素可以减轻缺氧损伤对 rCMEC 的影响, 降低其凋亡率, 可降低 rCMEC 胞内钙离子的浓度, 提高 VEGF 和 eNOS 的表达, 并显著提高 t-PA/PAI 和 NO/ET 的比值。结论: 葛根素对缺氧损伤的脑微血管内皮细胞有保护作用, 其机制可能与促进 VEGF 的表达, 激活 VEGF 受体介导的下游通道有关。

[关键词] 葛根素; 大鼠脑微血管内皮细胞; 缺氧损伤; 凋亡; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)04-0072-04

葛根素 (Puerarin, C₂₁H₂₀O₉) 是从豆科植物野葛或甘葛藤根中提取的一种黄酮类化合物, 其化学结构为 8-β-D-葡萄糖吡喃糖-4', 7-二羟基异黄酮^[1]。实验研究表明葛根素对血管内皮细胞具有保护作用, 能减轻病理状况下内皮细胞功能的损伤^[2-3], 但是有关葛根素对脑微血管内皮细胞方面的研究报道甚少, 本课题探讨了葛根素对模拟缺氧损伤的大鼠脑微血管内皮细胞 (rat cerebral microvascular endothelial cells, rCMEC) 凋亡和功能的影响, 以期葛根素用于心脑血管疾病的治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物 雄性 Wistar 大鼠, 体重 (95 ± 5) g, 由中国医学科学院实验动物研究所提供, 合格证号 SCXK11-00-0006。

1.1.2 药品与试剂 葛根素注射液 (浙江震元制药有限公司, 批号 H20051856, 规格 0.2 g/支, 葛根素分子量 416.38)。DMEM 培养液, 新生牛血清, 肝素钠购自 Hyclone 公司, 内皮细胞生长因子购自罗氏公司, 四甲基偶氮唑盐法 (methylthiazolotetrazolium, MTT)

测定试剂盒购自 Sigma 公司, 凋亡试剂盒购自北京宝赛公司, 组织型纤溶酶原激活物 (Tissue-type plasminogen activator, t-PA) 测定试剂盒、组织纤溶酶原激活物抑制剂 (Tissue plasminogen activator inhibitor, PAI) 测定试剂盒购自上海太阳生物技术有限公司; 一氧化氮 (Nitrogen monoxidum, NO) 测定试剂盒、内皮素 (Endothelin, ET) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。一抗: 内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 兔多抗、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 兔多抗、免疫印记法 (Western Blot) 发光液购自 Santa Cruz 公司, 内参 β-肌动蛋白 (β-actin) 鼠单抗购自 Neomarker 公司。二抗: 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗小鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥有限公司。蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司, 聚偏氟乙烯膜购自 Millipore 公司, 蛋白预染标记购自 New England Biolabs 公司。

1.1.3 仪器 IX-70 倒置显微镜 (Olympus 公司), FACScalibur 流式细胞仪 (BD 公司), 酶标仪 (Bio-Rad 公司 3550), 凝胶成像仪 ChemiImager 5500 (Alpha 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 大鼠脑微血管内皮细胞的培养 参考 HanDong^[4] 等的方法培养 rCMEC。大鼠断头收集大

[收稿日期] 2009-02-02

[通讯作者] * 陈冰, Tel: (010) 64014411-2505; E-mail: bingchen1205@163.com

脑皮质,充分剪碎后过滤网,弃滤液。以冲洗液冲洗并收集滤网上血管段,以 0.1% II 型胰蛋白酶 37℃ 消化 15 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 重复 3 次后弃上清,以培养液重悬沉淀,接种于培养瓶中。待细胞长成融合状态,进行形态学鉴定和免疫组化鉴定 (VIII 因子相关抗原抗体阳性,纯度大于 98%), 确定为 rCMEC。进行传代培养,第 3 代细胞用于实验。

1.2.2 大鼠脑血管内皮细胞缺氧损伤模型的建立及分组 取第 3 代 rCMEC 传代于相应的培养器皿中,培养 24 h 后长成致密单层,把培养液换成磷酸盐缓冲液(PBS),放置于缺氧罐(温度 37℃, 100% 氮气)中作用 4 h,再换成普通培养液复氧培养 12 h 造成细胞缺氧损伤模型。

1.2.3 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 存活率的影响 以 5 000/孔的细胞密度将 rCMEC 接种于 96 孔板中,按照方法 1.2.2 造模,造模前 4 h 给予终浓度为 0.1 ~ 0.8 mmol·L⁻¹ 的葛根素处理,MTT 法检测葛根素对缺氧损伤 rCMEC 存活率影响。

1.2.4 实验分组 根据 1.2.3 结果,以下实验均分 5 组,正常对照组 (Control), 模型组 (Model), 大中小剂量的葛根素组 (Pue-L, Pue-M, Pue-S 组, 终浓度分别为 0.4, 0.2, 0.1 mmol·L⁻¹), 葛根素均于造模前 4 h 加入。

1.2.5 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 凋亡的影响 以 2×10⁴/孔的细胞密度将 rCMEC 接种于 6 孔板中,按照 1.2.2 方法造模并给予相应剂量的葛根素处理后,收集细胞采用磷脂酰结合蛋白-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI) 双染结合流式细胞仪检测细胞早期和晚期的凋亡率。

1.2.5 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 胞内钙离子浓度的影响 Fluor-3 是细胞膜通透性的 Ca²⁺ 荧光特异性染料,与细胞内游离 Ca²⁺ 结合后发出荧光,荧光强度变化可以直接表示细胞内游离 Ca²⁺ 浓度变化。以 2×10⁴/孔的细胞密度将 rCMEC 接种于 6 孔板中,按照 1.2.2 方法造模并给予相应剂量的葛根素处理后,收集细胞后,加入 Fluor-3 (终浓度 5 μmol·L⁻¹), 37℃ 孵育 45 min, PBS 洗 3 次,流式细胞仪测定平均荧光强度。

1.2.6 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 分泌功能的影响 收集方法 1.2.4 实验中的细胞上清,ELISA 法检测葛根素对 t-PA, PAI, NO, ET 的影响。

1.2.7 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 表达 eNOS 和

VEGF 的影响 以 6×10⁵/瓶的细胞密度将 rCMEC 接种于 25 cm² 培养瓶中,按照方法 1.2.2 造模并给予相应剂量的葛根素处理,收集细胞,裂解,提取蛋白并定量,然后采用 Western blot 法检测葛根素对缺氧损伤表达 eNOS 和 VEGF 的影响。

1.2.8 统计方法 实验数据结果以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用统计软件 SPSS 11.5 进行统计,数据经过正态性检验和方差齐性检验后,进行单因素方差分析和两两比较的统计学分析。

2 结果

2.1 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 存活的影响 MTT 结果显示,缺氧损伤后的 rCMEC 存活率为 16.77%, 经葛根素作用, rCMEC 存活率有明显提高,统计学差异显著,其中以 0.2, 0.3, 0.4 mmol·L⁻¹ 的剂量组效果最佳,分别为 64.63%, 62.45%, 61.43%, 因此采用 0.1, 0.2, 0.4 mmol·L⁻¹ 剂量进行后续实验研究。详见表 1。

表 1 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 存活的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

终浓度(mmol·L ⁻¹)	存活率(%)
Control	16.77 ± 2.32
0.1	36.43 ± 4.16 ¹⁾
0.2	64.63 ± 6.62 ³⁾
0.3	62.45 ± 5.46 ³⁾
0.4	61.43 ± 5.39 ³⁾
0.5	52.74 ± 4.77 ²⁾
0.6	41.83 ± 4.89 ²⁾
0.7	36.43 ± 4.36 ¹⁾
0.8	27.59 ± 3.97 ¹⁾

注:与 Control 组比较 ¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01, ³⁾ P < 0.001

2.2 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 凋亡的影响 缺氧损伤后,细胞早期、晚期凋亡率及总凋亡率显著上升。与模型组相比,葛根素 3 个剂量组均可明显降低细胞早期、晚期凋亡率及总凋亡率。详见表 2。

表 2 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	终浓度 (mmol·L ⁻¹)	早期凋亡率 (%)	晚期凋亡率 (%)	总凋亡率 (%)
Control	-	2.15 ± 0.57 ³⁾	1.82 ± 0.45 ³⁾	3.97 ± 0.92 ³⁾
Model	-	22.45 ± 6.34	11.35 ± 3.87	33.81 ± 6.72
Pue-S	0.1	11.25 ± 5.83 ²⁾	5.68 ± 2.94 ²⁾	16.93 ± 5.26 ²⁾
Pue-M	0.2	6.39 ± 2.53 ³⁾	3.81 ± 2.44 ³⁾	10.30 ± 3.52 ³⁾
Pue-L	0.4	6.71 ± 3.16 ³⁾	4.08 ± 2.52 ³⁾	11.79 ± 3.75 ³⁾

注:与 Model 组比较 ¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01, ³⁾ P < 0.001(下同)

2.3 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 胞内钙离子浓度的影响 缺氧损伤后细胞内钙离子浓度显著增高。与模型组相比, 葛根素组钙离子浓度显著降低, 其中大、中剂量组与模型组比 $P < 0.001$ 。详见表 3。

表 3 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 胞内钙离子浓度的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	终浓度($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	平均荧光强度
Control	-	322.72 ± 32.15 ³⁾
Model	-	434.34 ± 46.84
Pue-S	0.1	353.23 ± 46.52 ¹⁾
Pue-M	0.2	260.18 ± 31.44 ³⁾
Pue-L	0.4	253.92 ± 35.79 ³⁾

2.4 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 分泌功能的影响 缺氧损伤后 rCMEC 分泌 t-PA 和 NO 显著降低, ET 也有一定程度的降低, t-PA/PAI 和 NO/ET 比值明显降低, 与正常组比 $P < 0.05$, PAI 无显著变化。与模型组相比, 葛根素 3 个剂量组的 t-PA 和 NO 分泌量有显著的提高, 其中大、中剂量组与模型组比 $P < 0.001$, 接近正常对照组; t-PA/PAI 和 NO/ET 比值也有了显著的提高, $P < 0.001$ 。详见表 4~ 5。

表 4 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 分泌 t-PA 和 PAI 影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	终浓度($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	t-PA($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	PAI($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	t-PA/PAI
Control	-	28.12 ± 5.35 ³⁾	2.14 ± 0.33	13.14 ± 3.56 ³⁾
Model	-	8.57 ± 3.87	2.24 ± 0.42	3.83 ± 1.22
Pue-S	0.1	12.65 ± 4.45 ¹⁾	2.17 ± 0.43	5.83 ± 2.09 ¹⁾
Pue-M	0.2	27.14 ± 5.36 ³⁾	2.41 ± 0.65	11.26 ± 3.25 ³⁾
Pue-L	0.4	27.91 ± 5.57 ³⁾	2.52 ± 0.57	11.08 ± 3.34 ³⁾

表 5 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 分泌 NO 和 ET 影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	终浓度($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NO($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	ET($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	NO/ET
Control	-	92.23 ± 21.76 ³⁾	56.24 ± 19.79 ¹⁾	1.64 ± 0.42 ³⁾
Model	-	28.78 ± 8.53	44.28 ± 11.58	0.65 ± 0.42
Pue-S	0.1	49.28 ± 13.06 ²⁾	40.06 ± 12.81	1.23 ± 0.48 ²⁾
Pue-M	0.2	88.17 ± 21.34 ³⁾	41.97 ± 14.24	2.11 ± 0.75 ³⁾
Pue-L	0.4	84.11 ± 22.19 ³⁾	41.07 ± 13.18	2.04 ± 0.68 ³⁾

2.5 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 表达 eNOS 和 VEGF 的影响 Western blot 结果显示: 缺氧损伤后, rCMEC eNOS 和 VEGF 表达量都显著降低; 给予葛根素处理后, eNOS 和 VEGF 表达量增高, 小剂量葛根素组增高幅度较小, 大中剂量的 eNOS 和 VEGF 表达量增加显著。详见图 1。

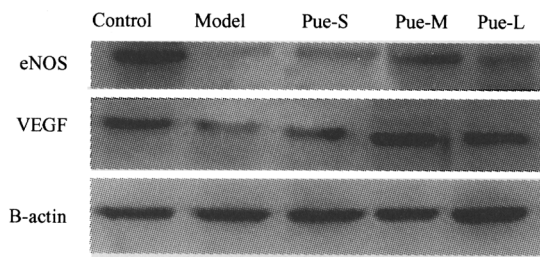


图 1 葛根素对缺氧损伤 rCMEC 表达 eNOS 和 VEGF 的影响

3 讨论

脑卒中主要是因脑动脉系统病损引起的血管痉挛、闭塞或破裂, 造成急剧发展的脑局部循环和功能障碍, 可分为缺血性和出血性两大类^[5]。在我国城乡均居各类死因的第 2 位。年发病率约 1%~ 2%, 年死亡率约 0.6%~ 1.2%。全国患病人数高达 500 万以上^[6], 已成为我国最主要的病死原因之一。正常情况下, 血管内皮细胞所释放的活性因子对调节血管张力、凝血、纤溶功能以及维持正常的血压与血液动力学均有相当的调节作用。一旦血管内皮受损, 暴露的内皮下层使血小板粘附、聚集, 导致血栓形成, 受刺激的内皮细胞可释放组织因子, 促进凝血, 加速血栓的形成^[7]。脑微血管内皮细胞的损伤是脑卒中的始动和关键环节, 在其发生中起主导作用^[8]。

本研究发现, 葛根素可以减轻缺氧损伤对 rCMEC 的影响, 降低其凋亡率, 降低 rCMEC 胞内钙离子的浓度, 促进内皮细胞分泌扩血管、抗凝血功能的血管活性物质, 提高 VEGF 和 eNOS 的表达, 并显著提高 t-PA/PAI 和 NO/ET 的比值。其可能机制是: VEGF 与 VEGF 受体 VEGFR 结合后, 激活了介导的下游信号传导通路: 蛋白激酶 C、一氧化氮合酶、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、鸟苷酸结合蛋白等, 从而起到促进细胞增殖、迁移, 抗凋亡等作用^[9]。研究中发现, 缺氧损伤的内皮细胞 VEGF 表达降低, 而葛根素可以提高 VEGF 的表达量, 由于 VEGF 的表达增多, 下游的 eNOS, NO 的表达也相应增加, 因而可以增强内皮细胞的扩张血管能力。葛根素还可以抑制细胞内钙离子浓度的增高, 发挥钙离子拮抗剂的作用, 因此可能通过抑制因钙离子浓度增高而诱导的细胞凋亡。VEGF 还可以诱导内皮细胞分泌 t-PA 等, 以此降解细胞外基质, 介导内皮细胞迁移和浸润, 诱导新生血管形成^[10]。在脑血管疾病的改善微循环和促进血栓溶解方面, 起着重要作用。

(下转第 79 页)

(上接第 74 页)

综上,葛根素可能通过上述机制对缺氧损伤的脑微血管内皮细胞起到保护和改善作用,因而在心脑血管疾病临床治疗中可以发挥理想的疗效。

[参考文献]

- [1] 岳红文,胡小琴.葛根及葛根素对心血管系统的药用价值[J].中国中西医结合杂志,1996,16(6):382-384.
- [2] 高爱社,沈晓君.葛根素对 oxLDL 诱导的血管内皮细胞凋亡的防护作用[J].山东中医杂志,2008,27(5):334-335.
- [3] 石瑞丽,张建军.葛根素对缺氧性血管内皮细胞凋亡的保护作用[J].药学学报,2003,38(2):103-107.
- [4] Han D, Ma WY, Liao FL, *et al.* Influences of mechanical

and peroxidation-induced factors on cultured rat cerebral microvessels endothelial cells investigated by atomic force microscopy[J]. *Biorheology*, 2002, 39(6) : 641-642.

- [5] 韩济生. 神经科学纲要[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1993:834.
- [6] 上海医科大学《实用内科学》编辑委员会. 实用内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:2060.
- [7] 陈云波,何燕飞. 血管内皮细胞的生物学功能[J]. 生物学通报,1994,29(11):11-13.
- [8] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. *Nature*, 1993, 362(6423) : 801-809.
- [9] McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis [J]. *Oncologist*, 2000, 5(1) : 3-10.
- [10] Carmeliet P, Collen D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1997, 237: H2091-H2104.