

# 六味地黄方含药血清对氧化低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞的保护作用

张启春, 卞慧敏\*, 喻丽珍, 俞晶华  
(南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 观察六味地黄方大鼠含药血清对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)损伤血管内皮细胞(VEC)的保护作用。方法: 以 MTT 法观察人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的活力和流式细胞仪测定内皮细胞凋亡率, 并通过测定胞内丙二醛(MDA)含量及细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、一氧化氮(NO)含量与超氧化物歧化酶(SOD)活力, 探讨六味地黄方对血管内皮细胞损伤的保护作用及机制。**结果:** 六味地黄方含药血清能促进 ox-LDL 损伤的血管内皮细胞增殖, 抑制 ox-LDL 造成的内皮细胞凋亡, 降低胞内 MDA 含量, 减少细胞 LDH 释放量, 提高 SOD 活力及 NO 含量。**结论:** 六味地黄方对氧化低密度脂蛋白损伤的血管内皮细胞有一定的保护作用。

**[关键词]** 六味地黄方; 人脐静脉内皮细胞; 氧化低密度脂蛋白; 丙二醛; 过氧化物歧化酶; 乳酸脱氢酶; 一氧化氮

**[中图分类号]** R285.5    **[文献标识码]** B    **[文章编号]** 1005-9903(2007)07-0031-04

**[收稿日期]** 2006-06-26

**[基金项目]** 江苏省中医药局课题(H2004); 江苏省教育厅自然科学基金(02KJB360005)

**[通讯作者]** \* 卞慧敏, Tel(025) 86798398

# Protective Effect of Rat Serum Containing Liuweidihuang Formula on Vascular Endothelial Cells from Oxidative Injury by Oxidized Low Density Lipoprotein

ZHANG Qi-chun, BIAN Hui-min\*, YU Li-zhen, YU Jing-hua

(Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effects of Liuweidihuang Formula (LWDHF) on human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) injured by oxidized LDL (ox-LDL). **Methods:** By assaying the proliferation ability of HUVEC using MTT method and the HUVEC apoptosis are with flow cytometry, meanwhile determining the level of malondialdehyde (MDA) in vivo, the levels of lactate dehydrogenase (LDH), nitric oxide (NO) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in vitro, the protective effect and mechanism of serum with LWDHF on injured HUVEC was assessed. **Results:** The serum with LWDHF increases the proliferation of HUVEC injured by ox-LDL and inhibits the apoptosis rate. It was also observed that the serum decreases the level of MDA, LDH and enhances the activity of SOD and the level of NO. **Conclusion:** LWDHF could prevent vascular endothelial cells from oxidative injury induced by ox-LDL.

**[Key words]** LWDHF; HUVEC; ox-LDL; MDA; SOD; LDH; NO

血管内皮细胞(VEC)功能和结构的改变是动脉粥样硬化(AS)发生的病理学基础,氧化低密度脂蛋白(ox LDL)通过引起血管内皮细胞结构损伤和功能障碍,促使动脉粥样硬化的发生<sup>[1-3]</sup>。本实验室前期研究证明六味地黄方能够通过拮抗内皮细胞钙超载来抑制细胞凋亡<sup>[4,5]</sup>。本实验通过观察六味地黄方大鼠含药血清对 ox-LDL 损伤的人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)的保护作用,进一步对六味地黄方对血管内皮细胞的保护作用及机制进行了初步探讨。

## 1 实验材料

**1.1 试剂** 六味地黄方(熟地黄 8: 山萸肉 4: 山药 4: 泽泻 3: 丹皮 3: 茯苓 3)水煎液,终浓度为 2 g 生药/mL,由本实验室自制;小牛血清(杭州四季青生物公司,批号: 050517);噻唑蓝(SIGMA,批号: DZ0793);RPMI1640 培养基(GIBCO,批号: 2535081);胰蛋白酶(GIBCO,批号: 2430B18);ox-LDL(中国医学科学院基础医学研究所);SOD LDH NO 及 MDA 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号: 20050015、20050720、20051019、20051011)。

**1.2 仪器** 流式细胞仪(FACSCalibur,美国 BD 公司);754 紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);酶标仪(SPECTRA MAX 190,AD 公司)。

**1.3 人脐静脉内皮细胞** 南京中医药大学海洋中心药理室提供,以 RPMI1640 培养液(内含 10% 小牛血清,0.0583 mgPL 青霉素,100 mgPL 链霉素,pH7.2)

培养。

**1.4 动物** SD 大鼠,雄性,由南京中医药大学实验动物中心提供,动物生产许可证,SCXK(苏)2002-0012。

## 2 方法

**2.1 含药血清制备** 取体重(250±20)g 的雄性 SD 大鼠 20 只,随机分为两组,第 1 组灌胃给予六味地黄方水煎液(以人临床用量×动物等效剂量比值×血清稀释度为参考给药量)22.5 g 生药/kg,第 2 组给予等容积的生理盐水,连续 5 d(2 次/d),于末次给药后 2 h 颈动脉放血,分离血清,56℃灭活 30 min,0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌,置-20℃保存备用。

**2.2 HUVEC 的培养** 将复苏后的 HUVEC 细胞接种于 75 mL 培养瓶,培养液为含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液,待 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度下长成单层后,加入 0.25% 胰蛋白酶于 37℃ 消化,分别接种于 24 孔、96 孔培养板,细胞密度为 5×10<sup>4</sup> 细胞/mL,置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 下继续培养 24 h。

**2.3 观察六味地黄方含药血清对 HUVEC 细胞 ox-LDL 损伤模型的保护作用。**

取长满单层的 96 孔培养板,弃去上清液,以 PBS 洗涤两次,加入无血清的 RPMI1640 培养基。将细胞分为 5 组:(1)正常组、(2)模型组、(3)10% 含药血清组、(4)15% 含药血清组、(5)20% 含药血清组。(1)、(2)组加入无血清的 RPMI1640 培养基及空白血清(终浓度为 20%,终体积为 200 μL),(3)、(4)、(5)

组加入六味地黄方含药血清,终浓度分别为10%、15%、20%,另以空白血清将血清终浓度补充为20%,终体积为200 μL。于37℃ 5% CO<sub>2</sub>下培养24 h,(2)、(3)、(4)、(5)组加入终浓度为200 μg/mL的ox-LDL,继续培养24 h。每孔加入MTT(终浓度为5 mg/mL),37℃培养3 h,弃去上清,再加入150 μL DMSO,振荡10 min,酶标仪490 nm测OD值。

按下式计算含药血清对HUVEC细胞的保护率 = (含药血清组 OD<sub>490</sub> - 模型组 OD<sub>490</sub>) / (正常组 OD<sub>490</sub> - 模型组 OD<sub>490</sub>) × 100%。

**2.4 细胞凋亡率的测定** 收集24孔培养板的细胞,离心(1 000 r/min × 5 min),弃上清液,加入PBS 2mL混匀,再次离心(1 000 r/min × 5 min),弃上清液,加75%冰乙醇2 mL固定,置4℃保存。于流式细胞仪(FCM)检测前以PBS洗涤3次,加入适量PBS液与含RNA酶的碘化丙啶(PI)染液混匀,4℃保存30 min,经45目尼龙网滤过后,调细胞浓度至1 × 10<sup>6</sup>/mL,测定亚二倍体细胞DNA含量的变化。以流式细胞仪(FCM)检测HUVEC细胞凋亡率。

**2.5 MDA, NO含量及LDH, SOD活力的测定** 分组造模及给药方法同2.3。于加入含药血清48 h后,按照试剂盒方法,测定细胞裂解液MDA的含量及细胞上清液中NO含量与LDH SOD活力。

**2.6 统计学处理** 数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,实验结果进行t-检验;凋亡率进行 $\chi^2$ 检验。

### 3 结果

#### 3.1 六味地黄方含药血清对ox-LDL损伤的HUVEC

增殖及凋亡率影响 由表1可见,ox-LDL能够抑制HUVEC增殖,增加细胞凋亡率。含药血清则能促进ox-LDL损伤的HUVEC增殖,20%、15%及10%的含药血清对HUVEC的保护率分别为95.90%、88.27%及72.56%。同时,含药血清能明显降低内皮细胞的凋亡率,10%、15%及20%含药血清组的内皮细胞凋亡率分别为15.46%、9.39%及7.40%,均明显低于模型组的20.75%。

表1 六味地黄方对ox-LDL损伤的HUVEC增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	OD <sub>490</sub>	保护率(%)	凋亡率(%)
正常组	0.947 ± 0.050 <sup>2)</sup>	—	1.63 <sup>2)</sup>
模型组	0.557 ± 0.027	—	20.75
20% 药物血清组	0.903 ± 0.021 <sup>2)</sup>	95.90	7.40 <sup>2)</sup>
15% 药物血清组	0.931 ± 0.016 <sup>2)</sup>	88.72	9.39 <sup>2)</sup>
10% 药物血清组	0.840 ± 0.039 <sup>2)</sup>	72.56	15.46 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较,<sup>1)</sup> P < 0.05; <sup>2)</sup> P < 0.01(下同)。

**3.2 六味地黄方对ox-LDL损伤HUVEC的MDA、LDH、NO含量及SOD活力的影响** 结果见表2。由表2可见,ox-LDL损伤的HUVEC胞内过氧化脂质终产物MDA及培养液中LDH的含量增高,同时可降低NO含量及SOD活力。10%、15%及20%六味地黄方含药血清均能显著降低ox-LDL损伤HUVEC的MDA的含量和LDH的漏出量,升高NO含量并增加SOD活力,其对上述诸因素的改善作用与模型组相比均有显著的统计学意义。

表2 六味地黄方对ox-LDL损伤HUVEC的MDA、LDH、NO含量及SOD活力的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	MDA (nmol/mL)	LDH (U/L)	NO (μmol/L)	SOD (U/mL)
正常组	2.540 ± 0.720 <sup>2)</sup>	506.68 ± 50.13 <sup>2)</sup>	478.11 ± 23.60 <sup>2)</sup>	69.51 ± 2.14 <sup>2)</sup>
模型组	7.328 ± 1.241	1014.31 ± 70.96	398.54 ± 28.30	48.74 ± 2.28
20% 药物血清组	4.592 ± 0.693 <sup>2)</sup>	819.66 ± 61.60 <sup>2)</sup>	483.42 ± 21.57 <sup>2)</sup>	67.09 ± 2.52 <sup>2)</sup>
15% 药物血清组	5.778 ± 1.047 <sup>2)</sup>	839.69 ± 48.62 <sup>2)</sup>	468.58 ± 28.28 <sup>2)</sup>	63.80 ± 2.57 <sup>2)</sup>
10% 药物血清组	5.817 ± 0.908 <sup>2)</sup>	842.56 ± 21.18 <sup>2)</sup>	455.37 ± 21.09 <sup>2)</sup>	65.79 ± 2.60 <sup>2)</sup>

### 4 讨论

研究表明,AS的发生和发展与LDL的氧化修饰密切相关,氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)是导致动脉粥样硬化的主要因素之一,ox-LDL通过氧自由基使脂质过氧化对血管内皮细胞产生损伤,促进其凋亡<sup>[6]</sup>。ox-LDL可改变血管内皮细胞形态和结构,破坏内皮细胞完整性;损害内皮依赖性血管舒张功能

及内皮抗凝和纤溶功能;此外还可增加内皮细胞表面粘附分子的表达,募集单核细胞,刺激巨噬细胞生成,以启动AS的形成<sup>[7]</sup>。

内皮细胞是一种多功能细胞,它不仅是血液和组织之间物质交换的选择性通透屏障,而且还能合成和分泌多种活性物质,参与多种生理、病理过程,如调节血管张力,维持凝血和纤溶系统之间的平衡,

调节炎症细胞的聚集,抑制血小板的聚集和活性等。内皮细胞损伤及功能异常是动脉粥样硬化病变形成的始动环节。

Hiroharu 等认为,氧化低密度脂蛋白诱导的细胞凋亡与 Bcl-2 蛋白的下游调节和 caspase-3 的活性有关。然而,ox-LDL 在不同的细胞中诱导细胞凋亡的机制是有差异的,诱导内皮细胞是通过激活神经酰胺途径和增加对 Fas 通路的敏感性<sup>[2,8]</sup>。本实验结果发现 ox-LDL 损伤的 HUVEC 的增殖能力明显下降,且 ox-LDL 可促进 HUVEC 凋亡,六味地黄方含药血清能明显促进 ox-LDL 损伤 HUVEC 的增殖,降低细胞凋亡率。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,ox-LDL 损伤的 HUVEC MDA 含量增高;SOD 活力下降;而 LDH 是一种细胞内的糖酵解酶,广泛存在于细胞浆内,当细胞破坏或细胞膜通透性增加时,LDH 水平明显增高,可反映细胞或细胞膜损伤的程度,培养液中 LDH 的活力明显增强,意味着 LDH 从 HUVEC 中漏出增多,提示 ox-LDL 对 HUVEC 产生了氧化损伤,HUVEC 膜的完整性受到破坏,六味地黄方含药血清能明显降低 ox-LDL 损伤 HUVEC 的 MDA 的含量和 LDH 的漏出并能升高 SOD 活力;NO 是内皮细胞合成分泌的,由 L-精氨酸在 NO 合成酶的催化下转化而来的,内皮细胞损害,NO 水平降低,导致内皮依赖性血管舒张功能受损;提高 NO 浓度可改善血管内皮功能<sup>[9]</sup>。六味地黄方含药血清可增加 NO 含量。证明其能降低 ox-LDL 对 HUVEC 的损伤程度,改善 ox-LDL 损伤的血管内皮细胞状态。

综上所述,六味地黄方对 ox-LDL 损伤的血管内皮细胞具有保护作用,且可能与其抗氧化功能、抑制

细胞凋亡、维持细胞膜的稳定性有关。这一结果为其防治 AS 的作用机理提供了重要的理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis[J]. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20: 702.
- [2] Harada SM, Kinoshita M, Kamido H, *et al.* Oxidised low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(16): 9681-9687.
- [3] Bombeli T, Karsan A, Tait JF, *et al.* Apoptosis in the vascular endothelial cells become procoagulant[J]. *Blood*, 1997, 89(7): 2429-2442.
- [4] 卞慧敏,朱平,张旭. J-13 六味地黄药物血清对血管内皮细胞凋亡模型的保护作用[J]. *中国微循环*, 2004, 8(5): 339.
- [5] 张旭,卞慧敏,张超英. 六味地黄方药物血清对血管内皮细胞胞内 Ca<sup>2+</sup> 的影响[J]. *中药药理与临床*, 2003, 19(5): 1-2.
- [6] Holvoet P. Endothelial dysfunction, oxidation of LDL and cardiovascular disease[J]. *Thromb Haemostasis*, 1999, 79(4): 287-293.
- [7] Zhao B, Zhang Y, Lin B, *et al.* Endothelial Cells injured by oxidized low density lipoproteins[J]. *Am J Hematol*, 1995, 49(3): 250-252.
- [8] Kataoka H, Kume N, Minami M, *et al.* Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001, Jun, 21(6): 955-960.
- [9] 吴峻,孙明,周宏研. 高脂血症对 VEGF 与 NO 浓度的影响及降脂治疗后的变化[J]. *中国现代医学杂志*, 2003, 1(1): 12-14.