

• 药理 •

天麻钩藤饮含药血清对人脐静脉内皮细胞保护作用的研究

孟云辉¹, 涂欣^{2*}, 涂晋文³, 关江峰¹

(1. 湖北中医学院, 湖北 武汉 430061;

2. 华中科技大学人类基因组研究中心/华中科技大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430071;

3. 湖北中医学院附属医院神经内科, 湖北 武汉 430061)

[摘要] 目的: 观察天麻钩藤饮对血管紧张素 II (Ang II) 致人脐静脉内皮细胞(HUVECs) 损伤的保护作用。方法: 制备大鼠天麻钩藤饮含药血清。采用酶消化法体外培养 HUVECs, 利用 Human von Willebrand factor 免疫细胞化学法鉴定, 随机分为 3 组: 对照组, Ang II 组, Ang II + 天麻钩藤饮组。倒置显微镜下观察细胞形态、密度, 酶联免疫法测定细胞上清 TNF- α 含量, RT-PCR 法测定细胞 PPAR- γ mRNA 的表达。结果: 与对照组比较, Ang II (10^{-6} mol/L) 可引起内皮细胞密度降低, 细胞分泌 TNF- α 增加, PPAR- γ mRNA 表达水平降低。天麻钩藤饮含药血清可抑制 Ang II 导致的细胞损伤, 减少 TNF- α 的分泌, 升高 PPAR- γ mRNA 的表达。结论: 天麻钩藤饮可对抗 Ang II 所致的 HUVECs 损伤, 保护血管内皮细胞功能。

[关键词] 天麻钩藤饮; 血管紧张素 II; 人脐静脉内皮细胞; 肿瘤坏死因子; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)01-0026-04

Protective Effects of the Serum containing Tianma Gouteng Yin on Human Umbilical Vein Endothelin Cells

MENG Yun-hui¹, TU Xin^{2*}, TU Jin-wen³, GUAN Jiang-feng¹

(1. Hubei College of TCM, Wuhan 430061, China;

2. Center for Human Genome Research, College of Life Science and Technology/

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430071, China;

3. Department of Neurology, Affiliated Hospital, Hubei College of TCM, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To observe protective effects of Tianma Gouteng Yin on the injury of human umbilical vein endothelin cells(HUVECs) induced by angiotensin II (Ang II). **Methods:** The serum containing metabolic ingredients of Tianma Gouteng Yin was taken from rats. HUVECs were cultured in vitro by collagenase digestive method and identified with human von Willebrand factor immunocytochemical method. HUVECs were randomly divided into three groups: control group, Ang II group, Ang II and Tianma Gouteng Yin group. The morphology and density of HUVECs were observed with invert microscope. The content of TNF- α in supernatant medium was detected with enzyme-linked immunoadsorbent assay. The expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ was measured by means of reverse transcription polymerase

[收稿日期] 2006-04-17

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2003CB517104)

[通讯作者] * 涂欣, Tel: (027) 62001880; E-mail: tuxin0201@hotmail.com

chain reaction. **Results:** Compared with control group, Ang II (10^{-6} mol/L) could make the density of HUVECs to decrease and the secretion of TNF- α to increase. The expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ was lowered. The serum containing metabolic ingredients of Tianma Gouteng Yin could inhibit the decrease of HUVECs and decrease the secretion of TNF- α and increase the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ . **Conclusion:** Tianma Gouteng Yin could inhibit the injury of HUVECs induced by Ang II.

[**Key words**] Tianma Gouteng Yin; angiotensin II; Human umbilical vein endothelin cells; Tumor necrosis factor; Peroxisome proliferator-activated receptor γ

内皮细胞的损伤在高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病的发生发展过程中起着重要作用。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 可导致内皮细胞的损伤, 诱发血管炎症反应, 在心血管事件中占据核心位置。既往研究结果显示: 原发性高血压患者经天麻钩藤饮治疗 12 周后, 血浆中 Ang II、内皮素含量降低, 一氧化氮水平升高^[1]。但天麻钩藤饮对单一刺激因素 Ang II 导致的内皮细胞损伤的影响尚不清楚。本实验通过培养人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs), 观察天麻钩藤饮含药血清对 Ang II 所致 HUVECs 损伤的保护作用及其机制。

1 材料

1.1 药物 天麻钩藤饮由天麻 9 g, 钩藤 12 g, 石决明 18 g, 山栀 9 g, 黄芩 9 g, 川牛膝 12 g, 杜仲 9 g, 益母草 9 g, 桑寄生 9 g, 夜交藤 9 g, 珍珠母 9 g 组成。用蒸馏水常规煎煮 3 次, 浓缩至生药 1 g/mL。

1.2 动物 雄性 SD 大鼠 20 只, 体重 190~200 g, 由湖北省疾病预防控制中心提供 (合格证号: SCXK 鄂 2003-0005)。随机分为 2 组: 空白血清组、天麻钩藤饮含药血清组, 每组各 10 只。

1.3 主要试剂 DMEM/F₁₂ 培养基 (Hyclone 公司), 胎牛血清 (三利公司), Ang II、I 型胶原酶 (Sigma 公司), Human von Willebrand factor (VWF) 抗体、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色剂 (武汉博士德公司), 人 TNF- α 定量 ELA 试剂盒 (RD 公司), Trizol (MRC 公司)、逆转录试剂盒、PCR 试剂盒 (Fermentas 公司)。

1.4 仪器 CO₂ 恒温培养箱、酶标仪、PCR 仪 (Thermo 公司), 超净工作台 (苏州净化公司), 光学显微镜、倒置相差显微镜 (Zeiss 公司), 电泳仪 (北京市八一仪器厂), 凝胶成像分析系统 (Vilber Lourmat 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 天麻钩藤饮含药血清组大鼠按生药 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌服天麻钩藤饮药液, 药量按大鼠与成人体表面积比换算^[2]。空白血清组灌服同体积的生理盐水。每日 2 次, 连续 7 d。第 7 d 将 1 d 量 1 次给药, 1~2 h 后, 无菌条件下颈总动脉采血, 室温静置 2~4 h 待血凝固后, 4 °C 冰箱过夜, 3 000 r/min 离心 10 min, 提取血清, 同组血清混匀, 0.22 μm 滤膜滤过除菌, 56 °C 灭活 30 min, -70 °C 保存备用。同样方法制备空白血清。

2.2 HUVECs 的培养、鉴定及分组 采用酶消化法进行 HUVECs 培养^[3]。取健康新生婴儿脐带 15~20 cm, 置于无菌冷 D-hanks 缓冲液中, 4 °C 存放不超过 3 h。在无菌超净台中, 将无菌 PBS 注入脐静脉中冲洗, 直至冲洗液清亮为止。排空脐静脉, 将 0.1% I 型胶原酶 10 mL 注入脐带内, 37 °C 水浴 15~20 min, 收集消化液, 1 000 r/min 室温离心 8 min。弃上清, 用完全培养液重新悬浮细胞, 移入 24 孔板, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。倒置相差显微镜观察细胞呈梭形或多角形, 融合后呈鹅卵石样排列。台盼蓝染色存活细胞在 95% 以上。VWF 免疫组化鉴定可见 HUVECs 胞质呈黄褐色。选择原代 HUVECs 用于实验。

当细胞融合时进行实验。实验共分 3 组: 对照组, Ang II 组, Ang II+ 天麻钩藤饮组。每组 6 孔。对照组用含 10% 空白血清的基础培养液, Ang II 组用含 10% 空白血清的 Ang II 10^{-6} mol/L 培养液, 而 Ang II+ 天麻钩藤饮组用含 10% 含药血清的 Ang II 10^{-6} mol/L 培养液。培养 24 h 后, 收集上清, -20 °C 保存。收集细胞, 用“Trizol 一步法”抽提各组细胞总 RNA, -70 °C 保存。

2.3 酶联免疫法测定 HUVECs 上清液中 TNF- α 含量
参照试剂盒说明, 利用酶标仪测定各组细胞上清 OD 值, 利用标准曲线求出 TNF- α 含量^[4]。

2.4 RT-PCR 法测定 HUVECs 中 PPAR γ mRNA 表达

引物由上海生工工程技术服务有限公司合成,以 β -actin 为内参照。PPAR γ 引物序列:上游引物 5'-CAAGACAACCTGCTACAAGG-3' 下游引物 5'-TCCTTGATAGATCTCCTGCAG-3',目的片段(200 bp)^[5]。将总 RNA 逆转录成 cDNA,存放于 -20℃。再进行 PCR 扩增,总体积为 50 μ L。反应条件:94℃预变性 5 min,继之 94℃变性 30 s,58℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,共 35 个循环,最后 1 个循环后 72℃再延伸 5 min。扩增产物 1.5% 琼脂糖电泳,凝胶摄像系统采集电泳图像,用 PPAR γ 条带灰度与 β -actin 标准条带的比值进行半定量分析。

2.5 统计学处理 所得数据均用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS10.0 软件进行分析,组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 含药血清对细胞密度、形态的影响 在倒置显微镜下可观察到,对照组细胞排列紧密,呈铺路石状。Ang II 作用 24 h 后,细胞变圆,脱落,细胞间隙增宽,密度明显降低,细胞呈梭形,胞核折光性增强。而天麻钩藤饮含药血清可使细胞形态、密度与对照组相当。

3.2 含药血清对 HUVECs 上清液中 TNF- α 含量的影响 对照组 HUVECs 分泌 TNF- α 量最低(4.934 \pm 0.347) pg/mL。Ang II 组 HUVECs 经 Ang II 刺激 24 h 后,上清液中 TNF- α 含量明显增强(22.461 \pm 4.189) pg/mL,与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$)。与 Ang II 组比较,天麻钩藤饮含药血清作用 24 h 可拮抗 Ang II 作用,明显抑制 TNF- α 分泌(13.574 \pm 2.237) pg/mL(表 1)。

3.3 含药血清对 HUVECs 中 PPAR γ mRNA 表达的影响 与对照组 PPAR γ mRNA 表达(1.78 \pm 0.27)比较,Ang II 组 HUVECs 经 Ang II 刺激 24 h 后,PPAR γ mRNA 表达明显减弱(1.10 \pm 0.12) ($P < 0.05$)。与 Ang II 组比较,天麻钩藤饮含药血清作用 24 h 可拮抗 Ang II 作用,促进 PPAR γ mRNA 的表达(1.43 \pm 0.19) ($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 各组中 TNF- α 含量及 PPAR γ mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	TNF- α (pg/ml)	PPAR γ mRNA
对照组	4.934 \pm 0.347 ¹⁾	1.78 \pm 0.27 ¹⁾
Ang II 组	22.461 \pm 4.189	1.10 \pm 0.12
Ang II + 天麻钩藤饮组	13.574 \pm 2.237 ¹⁾	1.43 \pm 0.19 ¹⁾

注:与 Ang II 组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

高血压、冠心病、动脉粥样硬化等疾病与血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VEC)损伤密切相关,因此 VEC 成为治疗靶点。离体及在体实验均证实 Ang II 可引起 VEC 损伤。Dimmeler 等将 HUVECs 暴露于 Ang II 18 h 后,Ang II 呈剂量依赖性诱导 HUVECs 凋亡^[6]。本实验结果显示:10⁻⁶ mol/L Ang II 作用于 HUVECs 24 h 后,可使细胞密度明显降低,而天麻钩藤饮含药血清可拮抗 Ang II 作用,使 HUVECs 密度及形态维持正常,但是否通过拮抗凋亡还有待于进一步研究。

Ang II 可引起氧化应激,导致 VEC 功能紊乱,加剧炎症反应,最终导致动脉粥样硬化。TNF- α 是一种具有多种生物学活性的细胞因子,已被证实在动脉粥样斑块的单核-巨噬细胞、平滑肌细胞及内皮细胞中增高,而在正常血管中很少。VEC 表面存在 TNF- α 受体,是 TNF- α 作用的主要靶细胞之一。TNF- α 对 VEC 可产生直接细胞毒作用,使 VEC 损伤,而 VEC 损伤可促使 TNF- α 等细胞因子产生和释放,形成一种恶性循环。本研究结果提示 10⁻⁶ mol/L Ang II 可刺激 HUVECs 分泌 TNF- α 增加,促进炎症反应。而天麻钩藤饮含药血清可抑制炎性因子 TNF- α 分泌,具有抗炎作用,可能对动脉粥样硬化具有防治作用。

Diep 等的研究表明 PPAR γ 激动剂能逆转 Ang II 所致的内皮功能不全,并降低血管炎症反应的标志物^[7],提示 PPAR γ 与炎症反应有一定相关性。PPAR γ 基因主要存在于脂肪组织,是参与调节糖、脂质代谢的重要因子,近年发现 PPAR γ 还存在于血管平滑肌细胞、VEC、心脏组织,参与调节增殖,迁移,凋亡,炎症等病理过程。PPAR γ 可通过 NF- κ B、活化蛋白-1、信号转导和转录活化因子信号通路抑制 IL-6 环氧合酶、内皮素-1、TNF- α 、基质金属蛋白酶-9、明胶酶、粘附分子表达,抑制炎症反应^[8,9]。

本研究发现 Ang II 刺激 HUVECs 24 h,可在转录水平减弱 PPAR γ 表达。天麻钩藤饮含药血清可拮抗 Ang II 作用,促进 PPAR γ mRNA 的表达。因此,天麻钩藤饮可能通过激活 PPAR γ 表达从而降低 TNF- α 分泌,减轻炎症反应,减少 VEC 损伤,对高血压、动脉粥样硬化具有防治作用,但通过何种信号通路还有待深入研究。

(下转第 43 页)

(上接第 28 页)

[参考文献]

- [1] 胡世云, 冼绍祥, 赵立诚, 等. 天麻钩藤饮干预高血压患者心肌纤维化的临床研究[J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 4(17): 1958-1960.
- [2] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 实验药理方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 203.
- [3] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 425-426.
- [4] 尤昭玲, 付灵梅, 谭朝阳, 等. 三七有效成分对人子宫内膜细胞培养液 TNF- α 和 IL-6 β 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(2): 39-42.
- [5] 万静, 熊世熙, 马业新, 等. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ c161 \rightarrow T 基因多态性与冠心病的关系[J]. 中华心血

管病杂志, 2004, 32(2): 131-134.

- [6] Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, *et al.* Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells: protective effect of nitricoxide[J]. *Cir Res*, 1997, 81: 970-976.
- [7] Diep QN, EL Mabrouk M, Cohn JS, *et al.* Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotension II infused rat: role of peroxisome proliferator activated receptor gamma[J]. *Circulation*. 2002, 105: 2296-2302.
- [8] Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs[J]. *Annu Rev Med*, 2002, 339: 953-959.
- [9] Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines[J]. *Nature*, 1998, 391: 82-86.