

# 牡荆素鼠李糖苷对血管内皮细胞血管活性物质的影响

朱晓新<sup>1\*</sup>, 李连达<sup>2</sup>, 刘建勋<sup>2</sup>, 刘志云<sup>2</sup>, 马雪英<sup>2</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

**[摘要]** 目的: 观察牡荆素鼠李糖苷对缺氧再给氧损伤内皮细胞产生血管活性物质的影响。方法: 采用脐静脉内皮细胞培养的方法, 以缺氧再给氧造成内皮细胞损伤, 分别以放射免疫、Griess法测定细胞培养上清中 $\alpha$ -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$  ( $\alpha$ -Ketor-PGF $_{1\alpha}$ )、血栓素 $B_2$  (TXB $_2$ )、内皮素-1 (ET-1)、一氧化氮 (NO) 含量。结果: 不同浓度的牡荆素鼠李糖苷均可使血管舒张因子 NO、 $\alpha$ -Ketor-PGF $_{1\alpha}$  产量明显增加; 缩血管因子 ET-1、TXB $_2$  明显减少。结论: 牡荆素鼠李糖苷对缺氧再给氧损伤血管内皮细胞产生的血管活性物质具有一定的调节作用。

**[关键词]** 牡荆素鼠李糖苷; 内皮细胞; 缺氧再给氧损伤; 血管活性物质

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)01-0023-03

牡荆素鼠李糖苷 (Viticin rhamnoside) 是从山楂叶中提取出来的一种新的黄酮类成分, 有保护实验性心肌缺血、改善血流动力学等作用<sup>[1]</sup>; 可通过稳定心肌细胞膜, 减轻其损伤, 调节前列腺素 (prostaglandins, PGs) 的表达, 降低心肌细胞搏动频率等机制保护心肌细胞缺氧再给氧性损伤<sup>[2]</sup>。为了进一步研究其作用机制, 本文以缺氧再给氧损伤的血管内皮细胞为病理模型, 从其产生的血管活性物质角度观察了牡荆素鼠李糖苷对其影响。

## 1 材料

**1.1 药品及试剂** 牡荆素鼠李糖苷: 为淡黄色颗粒, 易溶于水, 纯度为 98.7%, 由中国中医研究院西苑医院基础医学研究室药化室提供。DMEM 培养基: GIBCO 公司产品。99.99% N $_2$ : 北京分析仪器厂产品。内皮细胞单抗及荧光二抗: 中国医学科学院血液研究所产品。 $\alpha$ -Ketor-PGF $_{1\alpha}$ 、TXB $_2$ 、NO、ET-1 检测试剂盒: 北京东亚免疫技术研究所产品。胰蛋白酶 (1: 250) Sigma 公司。Tyrode's 液 (mmol/L): NaCl 125, KCl 2.6, KH $_2$ PO $_4$  1.2, MgSO $_4$  1.2, CaCl $_2$  1.0, HEPES 25, pH 7.4。

**1.2 人脐带** 健康足月孕妇剖腹产后, 无菌剪取 20~30cm, 立即浸于灭菌 PBS 中, 4℃保存。由北京市

海淀区妇幼保健院手术室提供。

**1.3 主要实验仪器** BECKMAN GS-15R 高速离心机, 美国; SANYO MCO175 CO $_2$  培养箱, 日本; SW-CJ-IF 超净工作台, 苏州净化仪器厂; OLYMPUS 倒置显微镜, 日本; HPIAS-1000 高清晰度彩色图文分析系统, 同济医科大学千屏影象工程公司。

## 2 方法

**2.1 人脐静脉内皮细胞培养方法** 根据文献[3]的方法略加改进。取脐带, 以 PBS 反复冲洗内腔至无残留血色; 注入灌流消化液, 37℃孵育 30min, 吸取消化液移于离心管中, 牛血清中止消化, 1500r·min $^{-1}$ , 离心 10min, 用无血清培养基洗 1~2 次, 悬浮细胞, 计数, 以  $1 \times 10^5$ /mL 密度接种于培养瓶或培养板中, 37℃ 5% CO $_2$  中培养。一般 4h 后细胞即可贴壁。24h 后换液, 以后每天或隔天换液一次。72h 基本融合后用于实验。

**2.2 内皮细胞的鉴定** 内皮细胞悬液, 1000r·min $^{-1}$  离心 10min, 沉淀加内皮细胞单抗 100 $\mu$ L, 4℃作用 1h, PBS 洗 2 遍, 沉淀加荧光二抗 100 $\mu$ L, 混匀, 4℃作用 1h, PBS 洗 2 遍, 荧光显微镜下观察荧光细胞数量及比例。

**2.3 内皮细胞的缺氧再给氧损伤<sup>[4]</sup>** 培养好的细胞用缺氧 (充入 99.99% N $_2$  20min 以上) 的 Tyrode's 液洗 3 遍, 按 2mL/孔加入缺氧的 Tyrode's 液, 移入缺氧室 (快速充入 99.99% N $_2$ , 当 O $_2$  < 0.1% 时, 低速充 N $_2$ , 维持此 O $_2$  浓度) 2h 以缺氧; CO $_2$  培养箱中 2h, 以再给氧。

**[收稿日期]** 2005-09-15

**[基金项目]** 科技部 1035 计划项目 (No: 95-2-10)

**[通讯作者]** 朱晓新, Tel: (010) 64056154; E-mail: zhuxiaoxin@mail.cintcm.ac.cn

**2.4 细胞的分组处理** 正常对照组: 常规培养 4h (简称为正常组); 缺氧再给氧对照组: 缺氧损伤 2h, 再给氧 2h (简称为模型组); 牡荆素鼠李糖苷用药组: 细胞中分别加入终浓度为  $10^{-3}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $10^{-5}M$  的牡荆素鼠李糖苷后, 再进行缺氧再给氧损伤; 分别简称为牡荆素鼠李糖苷  $10^{-3}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $10^{-5}M$  组。取细胞培养上清检测拟定的观察指标。

**2.5  $6\text{-Keto-PGF}_{1\alpha}$ 、 $\text{TXB}_2$ 、 $\text{ET-1}$  的检测, NO 代谢产物亚硝酸盐测定:** 测定操作程序及计算均按试剂盒说明书进行。

以上试验均至少重复 3 次, 每次均至少设 3 个复孔, 结果统计取其均值。

**2.6 统计方法** 所有结果的显著性差异检验均采用成组资料的  $t$  检验进行处理, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

### 3 结果

#### 3.1 牡荆素鼠李糖苷对内皮细胞培养上清中 $6\text{-Keto-PGF}_{1\alpha}$ 和 $\text{TXB}_2$ 的影响

表 1 各组内皮细胞培养上清中  $6\text{-Keto-PGF}_{1\alpha}$  和  $\text{TXB}_2$  比较( $\bar{x} \pm s$ )

分组	$6\text{-Keto-PGF}_{1\alpha}$ (pg/mL)	$\text{TXB}_2$ (pg/mL)	$6\text{-Keto-PGF}_{1\alpha}/\text{TXB}_2$
正常对照	599.67 ± 141.68 <sup>3)</sup>	2.37 ± 0.91 <sup>2)</sup>	225.38 ± 45.20 <sup>3)</sup>
模型对照	279.83 ± 57.88	4.78 ± 1.64	63.74 ± 23.56
牡荆素鼠李糖苷 $10^{-3}M$	735.26 ± 331.87 <sup>2)</sup>	2.01 ± 0.72 <sup>2)</sup>	322.90 ± 171.26 <sup>2)</sup>
牡荆素鼠李糖苷 $10^{-4}M$	908.27 ± 210.98 <sup>3)5)</sup>	2.90 ± 1.00 <sup>1)</sup>	529.51 ± 290.16 <sup>2)4)</sup>
牡荆素鼠李糖苷 $10^{-5}M$	1068.24 ± 247.19 <sup>3)6)</sup>	2.64 ± 0.90 <sup>1)</sup>	464.51 ± 232.96 <sup>2)4)</sup>

注 1: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.001$ ; 与正常组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>5)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>6)</sup>  $P < 0.001$  (下同)。

结果, 缺氧再给氧损伤可导致脐静脉内皮细胞培养上清中  $6\text{-Keto-PGF}_{1\alpha}$  的含量和  $6\text{-Keto-PGF}_{1\alpha}/\text{TXB}_2$  值显著降低, 而  $\text{TXB}_2$  的含量则较正常显著升高。牡荆素鼠李糖苷三个不同浓度均可不同程度地抑制这种损伤导致的变化, 各浓度之间相比无明显差异。

#### 3.2 牡荆素鼠李糖苷对内皮细胞培养上清中 NO、 $\text{ET-1}$ 含量的影响

表 2 各组内皮细胞培养上清中 NO、 $\text{ET-1}$  含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	NO (nmol/L)	$\text{ET-1}$ (pg/mL)
正常对照	8.50 ± 3.31 <sup>3)</sup>	9.97 ± 2.90 <sup>2)</sup>
模型对照	3.79 ± 0.68	16.63 ± 2.84
牡荆素鼠李糖苷 $10^{-3}M$	5.46 ± 0.75 <sup>3)4)</sup>	16.32 ± 4.30 <sup>4)</sup>
牡荆素鼠李糖苷 $10^{-4}M$	5.19 ± 1.19 <sup>2)5)</sup>	11.50 ± 2.55 <sup>2)</sup>
牡荆素鼠李糖苷 $10^{-5}M$	5.54 ± 2.21 <sup>1)4)</sup>	14.34 ± 3.01 <sup>5)</sup>

表 2 示, 模型组内皮细胞分泌 NO 水平较正常组明显降低 ( $P < 0.001$ ),  $\text{ET}$  分泌水平则明显增高 ( $P < 0.01$ )。不同浓度的牡荆素鼠李糖苷均可明显增加 NO 含量; 终浓度为  $10^{-4}M$  的牡荆素鼠李糖苷能明显减少细胞培养上清中  $\text{ET}$  的含量, 不同浓度药物

的作用无明显差异。

### 4 讨论

血管内皮细胞能产生多种血管活性物质, 这些物质具有调节血管张力、血液流动性与黏附性功能状态的作用。本文以其中的 NO 与  $\text{ET}$ ,  $\text{PGL}_2$  与  $\text{TXA}_2$  为代表, 观察了牡荆素鼠李糖苷对内皮源血管活性物质的影响。

NO 主要由血管内皮细胞产生, 具有多种心血管效应: 舒张血管平滑肌、抗血小板凝集、抗血小板和血细胞粘附、抗血管平滑肌细胞增生等。业已证实, 缺血-再灌注的早期, 即出现 NO 合成障碍, 并有心肌白细胞浸润和心肌细胞坏死<sup>[5]</sup>, 因而认为 EC 的 NO 合成减少是缺血-再灌注损伤的重要病理改变<sup>[6]</sup>。实验通过检测内皮细胞培养上清中 NO 含量证明, 三个浓度的牡荆素鼠李糖苷均可在一定程度上逆转缺氧再给氧损伤所造成的内皮细胞 NO 产量的减少, 但还不能使之恢复到正常组水平。

$\text{ET}$  为含 21 个氨基酸的多肽, 人的血管内皮细胞主要产生  $\text{ET-1}$ , 是迄今所知作用最强的收缩血管物质, 它比  $\text{Ang II}$  至少强 10 倍。通过对内皮细胞培养上清中  $\text{ET-1}$  含量的检测发现, 缺氧再给氧后, 细胞产生  $\text{ET-1}$  的量较正常明显增加, 终浓度为  $10^{-4}M$  的牡荆素鼠李糖苷能明显抑制  $\text{ET-1}$  产量的增加。

$\text{PGs}$  几乎存在于哺乳动物的所有组织和体液中, 具有调节血管张力作用, 其中  $\text{PGL}_2$  对冠状动脉和外周血管均有扩张作用,  $\text{TXA}_2$  对动脉血管的作用相反, 有很强的收缩作用<sup>[7]</sup>。目前认为, 许多心血管疾病的发生与  $\text{PGL}_2/\text{TXA}_2$  平衡失调有关。本实验结果表明, 内皮细胞的培养上清中  $\text{PGL}_2$  均比未损伤细胞明显减少,  $\text{PGL}_2$  与  $\text{TXA}_2$  的比值明显降低, 而  $\text{TXA}_2$  则明显增加; 实验中选用的三种浓度的牡荆素鼠李糖苷均能有效地提高  $\text{PGL}_2$  的含量及  $\text{PGL}_2/\text{TXA}_2$  比值, 降低  $\text{TXA}_2$  的含量。

总之, 牡荆素鼠李糖苷对血管活性物质具有一定的调节作用, 主要表现为能够逆转缺氧再给氧损伤所致的内皮细胞产生的部分缩血管物质的增多、舒血管物质的减少, 其对 NO 与  $\text{ET}$ ,  $\text{PGL}_2$  与  $\text{TXA}_2$  表现出的影响, 可能是其调节血管张力, 增加冠脉流量, 保护缺血性损伤心肌的物质基础之一, 从而为将牡荆素鼠李糖苷用于防治缺血或缺血再灌注损伤性心血管疾病提供了一定的依据。

## [参考文献]

- [1] 李连达, 靖雨珍. 中医药研究[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2001. 470-476.
- [2] 朱晓新, 李连达, 刘建勋, 等. 牡荆素鼠李糖苷对缺氧再给氧损伤心肌细胞的保护作用研究[J]. 中国天然药物, 2003, 1(1): 44-49.
- [3] 日本组织培养学会组织の培养技术[M]. 日本东京: 朝会书店, 1988. 157-160.
- [4] Xiaobo Zhou, Xiaolin Zhai. Muhammad Ashrafl. Preconditioning of Bovine Endothelial Cells [J]. Circulation Research 1996, 78(1): 73-81.
- [5] Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endothelial modulator of leukocyte adhesion [J]. Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88: 4651-4659.
- [6] Lefler AM, Tsao PS, Lefler DJ, *et al.* Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia [J]. FASEB J 1991, 5: 2029-2037.
- [7] Schror K. Prostaglandins in clinical research (Cardiovascular system) [J]. New York Alan R Liss Inc, 1989, 1.