

• 药理 •

牡荆素鼠李糖苷对脐静脉内皮细胞 缺氧再给氧损伤的影响

朱晓新¹, 李连达², 刘建勋², 刘志云², 马雪英²

(1 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700; 2 中国中医研究院西苑医院, 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的保护作用。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, 分别以组织化学法、发光法、荧光染色法测定细胞内乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、游离Ca²⁺, 酶动力学测定细胞培养液中LDH等。结果: 不同浓度的牡荆素鼠李糖苷均可减少细胞内Ca²⁺浓度和MDA含量; 使细胞内和培养上清中的LDH活性明显降低。结论: 牡荆素鼠李糖苷可通过稳定内皮细胞膜, 减轻其损伤等机制保护内皮细胞缺氧再给氧性损伤, 对实验细胞显示有保护作用。

关键词: 牡荆素鼠李糖苷; 内皮细胞; 缺氧再给氧损伤

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2005)06-0030-04

牡荆素鼠李糖苷(Vitexin 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^[1]; 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^[2]。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, 从细胞形态、心肌酶和过氧化脂质表达等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% N₂: 北京分析仪器厂产品。LDH检测试剂盒: 北京中生生物工程高技术公司产品, 批号: 010701。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。Fura-2/AM: 中国医学科学院药物研究所产品, 用DMSO稀释成所需浓度, -20℃保存备用。胰蛋白酶(1:250) Sigma

公司。Tyrodé's液(mmol/L): NaCl 125, KCl 2.6, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.0, HEPES 25, pH7.4。

1.2 人脐带 健康足月孕妇剖腹产后, 无菌剪取脐带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 CO₂ 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, 直至无残留血色, 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DMEM培养基洗1~2次, 悬浮细胞, 计数, 以1×10⁵/mL密度接种于培养瓶或培养板中, 37℃5%CO₂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100μL, 4℃作用1h, PBS洗2遍, 沉淀加荧光二抗100μL, 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。

收稿日期: 2005-09-06

基金项目: 科技部 1035 计划课题, (NO: 95-2-10)

通讯作者: 朱晓新, Tel: (010) 64056154, Fax: (010) 64013996, E-mail: zhuxiaoxin@mail.cintcn.ac.cn

2.3 内皮细胞的缺氧再给氧损伤^[4] 培养好的细胞用缺氧(充入 99.99% N₂ 20min 以上)的 Tyrodé's 液洗 3 遍,按 2mL/孔加入缺氧的 Tyrodé's 液,移入缺氧室(快速充入 99.99% N₂,当 O₂ < 0.1% 时,低速充 N₂,维持此 O₂ 浓度)2h 以缺氧;CO₂ 培养箱中 2h,以再给氧。

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 10⁻³M、10⁻⁴M、10⁻⁵M 的牡荆素鼠李糖苷后,再进行缺氧再给氧损伤;分别称为牡荆素鼠李糖苷 10⁻³M、10⁻⁴M、10⁻⁵M 组(简称为牡荆素鼠李糖苷 10⁻³M、10⁻⁴M、10⁻⁵M)。

2.5 细胞 LDH 的测定及细胞面积的计算^[5] 细胞培养上清中的 LDH 活性采用北京中生生物工程高技术公司检测试剂盒进行检测。细胞内 LDH 用氯化硝基四氮唑蓝染色,通过全自动图象分析仪分析其平均光度、积分光度、平均灰度值,代表其 LDH 的相对活性;细胞面积为细胞边缘内所有像素点之和乘以每个像素点所代表的实际面积。

2.6 细胞 MDA 测定法^[6] 取制备好的细胞悬液 50μL(4.5 × 10⁵ 个细胞),加入 1/12mol/L 硫酸 4.0mL,10% 磷钨酸 0.5mL,摇匀,室温放置 5min,3500 r·min⁻¹ 离心 15min,沉淀中再加入 1/12mol/L 硫酸 2.0mL,10% 磷钨酸 0.3mL,摇匀,室温放置 5min,3500 r·min⁻¹ 离心 15min,沉淀中加入 4.0mL 双蒸水和 1mL TBA 冰醋酸溶液,充分悬浮,然后在 95℃ 水浴加热 60min,流水冷却后,加入正丁醇 5.0mL,充分摇匀,3500 r·min⁻¹ 离心 15min,取上清在荧光分光光度计上测定荧光读数。结果计算:

$$\text{MDA}(\text{nmol}/4.5 \times 10^5 \text{ 个细胞}) = 0.1 \times (\text{Fu} - \text{Fo}) / (\text{Fs} - \text{Fo}) \times 1/4.5 \times 10^5 \text{ 个细胞}$$

式中 Fu, Fs 和 Fo 分别为测定管,标准管和空白管的荧光读数。

2.7 细胞内游离钙浓度的检测^[7] 将制备好的脐静脉内皮细胞,用无 Ca²⁺ Tyrodé's 液洗 2 遍,加入 Tyrodé's 液 3mL,然后根据分组不同加入药物,进行缺氧再给氧损伤,用 0.125% 胰蛋白酶消化细胞,用无 Ca²⁺ Tyrodé's 液调整细胞浓度为 2.5 × 10⁵/mL,每管 2mL;加入 Fura2/AM 和牛血清白蛋白,使其终浓度分别为 5 μmol/L 和 0.1% (w/v)。置于 5% CO₂ 培养箱孵育 1h,细胞悬液以 1500r·min⁻¹, 10min;沉淀用 Hank's 液洗 2 次,将细胞再用无 Ca²⁺ Tyrodé's 液

悬浮,置 37℃ 孵育 10min。立即用岛津 RF-510 荧光分光光度计检测细胞的荧光强度。细胞自身荧光强度在未负载 Fura2/AM 时进行测定,计算[Ca²⁺]_i前应该减去自身荧光。

$$[\text{Ca}^{2+}]_i \text{ 的计算公式为: } [\text{Ca}^{2+}]_i = \text{Kd} \times (\text{R} - \text{R}_{\text{min}}) / (\text{R}_{\text{max}} - \text{R})。$$

式中 Kd 为 Fura2-Ca²⁺ 的解离常数,37℃ 时其值为 224nmol/L; R 代表荧光强度,为 R₃₄₀/R₃₈₀; R_{max} 和 R_{min} 通过顺次加入 0.1% TritonX-100 和 8mmol/L EGTA 获得。

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。

2.8 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面积及 LDH 的影响

3.1.1 牡荆素鼠李糖苷对内皮细胞面积的影响(表 1) 由表 1 可知,内皮细胞经缺氧再给氧损伤后,其平均面积由正常的 947.20 ± 284.20 缩小至 614.80 ± 351.20,两组比较有非常显著的差异。三个浓度剂量的牡荆素鼠李糖苷均可不同程度地防止或减轻细胞面积的缩小(与模型组比较 P < 0.05~ 0.001)。并且具有良好的剂量依赖性,各剂量组之间比较有显著性差异(P < 0.05~ 0.001)。

表 1 各组内皮细胞面积的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞数	单个内皮细胞面积 ^{注2}
正常对照	50	947.20 ± 284.20 ³⁾
模型对照	50	614.80 ± 351.2
牡荆素鼠李糖苷 10 ⁻³ M	50	1067.00 ± 260.30 ³⁾
牡荆素鼠李糖苷 10 ⁻⁴ M	50	877.60 ± 308.70 ³⁾
牡荆素鼠李糖苷 10 ⁻⁵ M	50	748.00 ± 271.90 ^{1) 6)}

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

注 2: 细胞面积为细胞边缘内所有像素点之和乘以每个像素点所代表的实际面积。

表 2 各组细胞培养上清 LDH 活性比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	LDH (u/L)
正常对照	6.13 ± 3.47 ³⁾
模型对照	19.00 ± 1.94
牡荆素鼠李糖苷 10 ⁻³ M	12.75 ± 5.92 ^{1) 4)}
牡荆素鼠李糖苷 10 ⁻⁴ M	11.91 ± 2.42 ^{3) 5)}
牡荆素鼠李糖苷 10 ⁻⁵ M	8.81 ± 2.53 ³⁾

3.1.2 牡荆素鼠李糖苷对内皮细胞 LDH 活性的影响(表 2, 3) 由表 2 可见, 血管内皮细胞经缺氧再给氧损伤后, 其培养上清中 LDH 的活性较正常明显增加 ($P < 0.001$); 牡荆素鼠李糖苷可明显减少 LDH 的

漏出量, 10^{-5} M 浓度组基本维持在正常水平; 而 10^{-3} M 和 10^{-4} M 浓度组虽然 LDH 量较正常组明显增加, 但与模型组比较其增加幅度仍有较大程度的降低 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。

表 3 各组内皮细胞内 LDH 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞数	平均光度	积分光度	平均灰度
正常对照	50	0.07 ± 0.030 ³⁾	72.83 ± 26.09 ³⁾	191.7 ± 11.93 ³⁾
模型对照	50	0.32 ± 0.11	321.70 ± 71.30	119.70 ± 16.22
牡荆素鼠李糖苷 10^{-3} M	50	0.15 ± 0.06 ^{3) 6)}	176.00 ± 57.93 ^{3) 6)}	163.80 ± 17.93 ^{3) 6)}
牡荆素鼠李糖苷 10^{-4} M	50	0.14 ± 0.04 ^{3) 6)}	158.30 ± 35.03 ^{3) 6)}	167.50 ± 13.25 ^{3) 6)}
牡荆素鼠李糖苷 10^{-5} M	50	0.13 ± 0.04 ^{3) 6)}	196.40 ± 59.15 ^{3) 6)}	168.40 ± 14.08 ^{3) 6)}

注: 细胞的密度参数是利用摄像机输入细胞图象信息的光电转换原理, 将细胞在同一光源下吸收光的数值作为光密度(也称吸光度)。平均灰度是指图象中黑白深浅的程度。

通过全自动图象分析仪分析染色颗粒的平均光度、积分光度、平均灰度值, 代表其 LDH 的相对活性。由表 3 可见缺氧再给氧损伤的内皮细胞内 LDH 活性较正常培养组显著升高, 牡荆素鼠李糖苷的三个浓度组均可降低其升高程度, 其结果与培养上清中 LDH 的活性水平基本一致。

3.2 牡荆素鼠李糖苷对内皮细胞内过氧化脂质的影响 发光法检测 MDA 的结果见表 4, 缺氧再给氧损伤后的血管内皮细胞 MDA 产生水平显著升高, 不同浓度的牡荆素鼠李糖苷可显著减少损伤内皮细胞过氧化脂质的产生, 但仍显著高于正常组水平。各药物浓度之间的作用无明显差异。

表 4 各组内皮细胞 MDA 产量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA(nmol/4.5 × 10 ⁵ 细胞)
正常对照	9	0.10 ± 0.04 ³⁾
模型对照	10	0.39 ± 0.11
牡荆素鼠李糖苷 10^{-3} M	11	0.19 ± 0.08 ^{2) 4)}
牡荆素鼠李糖苷 10^{-4} M	8	0.21 ± 0.09 ^{2) 4)}
牡荆素鼠李糖苷 10^{-5} M	8	0.18 ± 0.08 ^{2) 4)}

3.3 牡荆素鼠李糖苷对内皮细胞内 Ca²⁺ 浓度的影响 缺氧再给氧损伤后内皮细胞内 Ca²⁺ 浓度升高 3.48 倍。实验所用各浓度牡荆素鼠李糖苷均可使其明显降低, 与正常培养的内皮细胞 Ca²⁺ 水平无明显差异。各药物浓度的作用虽有剂量依赖性趋势, 但在统计学上无显著性。

表 5 各组内皮细胞内 Ca²⁺ 浓度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ca ²⁺ (nmol/L)
正常对照	9	43.51 ± 20.66 ³⁾
模型对照	10	151.24 ± 31.91
牡荆素鼠李糖苷 10^{-3} M	11	45.83 ± 27.96 ³⁾
牡荆素鼠李糖苷 10^{-4} M	8	56.65 ± 12.98 ³⁾
牡荆素鼠李糖苷 10^{-5} M	8	60.69 ± 25.90 ³⁾

4 讨论

近十余年来, 对缺血(氧)再灌注损伤的发生机制研究较多, 其中公认的主要发生机制有两个, 即钙超载和氧自由基的生成。而不论是缺血(氧)还是再灌注, 血管内皮细胞都是组织中受攻击的第一道靶器官^[8,9]。说明内皮细胞在缺血(氧)再灌注过程中的改变对组织生存有着决定性意义。因此, 我们选择缺氧再给氧损伤内皮细胞的方法, 以模拟缺血再灌注损伤的病理状态, 观察了牡荆素鼠李糖苷在这个过程中对内皮细胞的影响。结果发现, 损伤细胞内 Ca²⁺ 显著升高, 与 Arnould 观察到的结果基本一致^[10]。细胞内外 Ca²⁺ 平衡失调造成细胞钙超载是细胞死亡的最后共同通路。牡荆素鼠李糖苷可有效地抑制细胞内 Ca²⁺ 的超载, 同时可减少细胞内 MDA 的含量, 从而保护内皮细胞, 减轻缺氧再给氧对内皮细胞的损伤。

正常情况下, 心肌主要靠有氧代谢提供能量, 急性心肌血(氧)供障碍时, 则有氧代谢转为无氧酵解, ATP 供应不足, 代谢障碍, 代谢产物堆积, 使细胞膜稳定性降低, 溶酶体释放, 导致细胞膜损伤、变性, 使 LDH 大量漏出; 再给氧时氧自由基大量增加, 细胞膜再次受到攻击而损伤加重, 细胞内 LDH 及释放量进一步增加, 故 LDH 是观察缺血(氧)再灌注(给氧)的重要指标。从实验的结果来看, 牡荆素鼠李糖苷可使由于缺氧再给氧造成的细胞内和释放至培养上清中的 LDH 明显减少, 说明牡荆素鼠李糖苷能有效地保护内皮细胞, 维护细胞膜的完整性, 使由于缺氧再给氧所致 LDH 产生和漏出明显减少。

但本实验结果毕竟是在体外培养细胞中得出的, 与体内环境尚有一定的差距, 如果能从在体实验及临床观察中进一步验证牡荆素鼠李糖苷的作用,

其将有可能成为新一代防治缺血性心血管疾病的药物。

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]. 第2版, 日本东京: 朝仓书店, 1988. 157-160.
- [4] Xiaobo Zhou, Xiaolin Zhai, Muhammad Ashraft. Preconditioning of Bovine Endothelial Cells[J]. Circulation Research 1996, 78(1): 73-81.
- [5] 陈啸梅, 周文郁, 彭俊云, 等. 组织化学手册[M]. 第1版, 北京: 人民卫生出版社, 1982: 220-224.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第2版, 北京: 人民卫生出版社, 1994. 937-938.
- [7] Yr-Jun Ou, Yuk-Man Leung, Shou-Jian Huang, et al. Dual effects of extracellular Ca^{2+} on cardiotoxin induced cytotoxicity and cytosolic Ca^{2+} changes in cultured cells of rabbit aortic endothelium[J]. Biochimica et Biophysica Acta 1997, 1330: 29-38.
- [8] Sunnergen KP, Rovetto MJ. Myocyte and endothelial injury with ischemia reperfusion in isolated rat hearts[J]. Am J Physiol 1987, 252: H1211-H1217.
- [9] Lindal S, Sorlie D, Jorgensen L. Endothelial cells of the cardiac microvasculature during ang after cold cardioplegic ischemia[J]. Scand J Thor Cardiovasc Surg 1988, 22: 257-265.
- [10] Arnould T, Michiels C, Alexandre I, et al. Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells[J]. J Cellular Physiol 1992, 152: 215-222.