

半边莲不同组分对内皮细胞内皮素及内皮源一氧化氮合酶代谢的影响

李瑞峰, 温海涛, 李莉, 陈融, 任冬梅, 郭成浩, 闫晓梅, 胡维诚

(山东大学医学院病理生理学教研室, 山东省济南市 250012)

[关键词] 半边莲; 内皮素; 一氧化氮合酶; 动脉粥样硬化

[摘要] 为了探讨半边莲对动脉内皮保护作用的有效成分, 提取半边莲两种不同组分用于高脂血症大鼠, 观察对动脉内皮细胞内皮素和内皮源一氧化氮合酶代谢以及对动脉内皮功能和形态的影响。结果发现, 高脂血症大鼠应用半边莲 B001 组分 60 天后, 血浆内皮素浓度和动脉内皮细胞内皮素阳性细胞率明显低于高脂未用药组 ($P < 0.05$), 血浆内皮源一氧化氮合酶浓度显著高于高脂未用药组 ($P < 0.05$), 且动脉内皮损伤减轻, 但血脂无明显变化。应用半边莲 A001 组分的高脂血症大鼠血脂浓度、内皮素和内皮源一氧化氮合酶无明显变化。结果提示, 半边莲 B001 使高脂血症时内皮细胞、内皮素合成及释放减少, 并可促进内皮源一氧化氮合酶的合成, 缓解高脂血症对血管内皮的持续损伤。

[中图分类号] R972.6

[文献标识码] A

Effects of Different Element from Scute Llarla Barbata on Metabolism of Endothelin and Endothelial Nitric Oxide Synthase in Arterial Endothelium

LI Rui-Feng, WEN Hai-Tao, LI Li, CHEN Rong, REN Dong-Mei, GUO Cheng-Hao, YAN Xiao-Mei, and HU Wei-Cheng

(Department of Pathophysiology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

[MeSH] Scute Llarla Barbata; Endothelin; Nitric Oxide Synthase; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protection of effective elements from Scute Llarla Barbata on arterial endothelium.

Methods The Wistar rats were fed with high cholesterol diet and treated with the A001 element and the B001 element of Scute Llarla Barbata for 60 days. The levels of the blood total cholesterol (TG), triglycerides (TG), endothelin 1 (ET-1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and the positive rate of ET in "en face" preparation of arterial endothelium were detected.

Results The concentrations of TC and TG did not reduce in hyperlipidemic rats treated with both B001 and A001. The blood ET-1, positive rate of ET in arterial endothelium and the morphological injury of the arterial endothelium decreased significantly ($P < 0.05$) and the blood eNOS increased significantly ($P < 0.05$) in the hyperlipidemic rats treated with B001. The hyperlipidemic rats treated with A001 did not show the same changes.

Conclusion The B001 is the effective element of Scute Llarla Barbata, which can protect the arterial endothelium and impede the development of atherosclerosis.

内皮细胞损伤是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 病灶形成的始动环节。高脂血症是 As 的最主要危险因素之一, 血中脂质既能使内皮细胞发生轻度损伤, 又能使脂质在内皮下沉积, 并促使单核细胞在内皮粘附、向内皮下游走而启动 As 过程。内皮素 (endothelin, ET) 与一氧化氮 (nitric oxide, NO) 平衡失调是动脉内皮受损的显著特征, 与 As 的形成有确定的关系^[1]。内皮素与蛇毒有共同的祖基因、同源染色体结构和相似的生物学效应^[2,3]。我们前期工作

显示, 抗蛇毒中药半边莲和蚤休可抑制动脉内皮细胞合成内皮素, 并对血管内皮具有保护作用^[4]。本研究利用高脂血症实验模型进一步探讨半边莲提取物不同组分对内皮素和内皮源一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 的影响, 以及对动脉内皮功能和形态的影响, 以寻找清热解毒类中药对动脉内皮保护作用的有效成分。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

雄性 Wistar 大鼠 40 只, 平均体重 180 ± 20 g, 由山东大学医学院实验动物中心提供, 随机分为四组:

对照组 ($n = 10$) 喂以基础饲料, 任意进食; ④高脂组 ($n = 10$) 在基础饲料中加入 10% 猪油、2% 胆固醇及 0.5% 猪胆盐^[5], 任意进食; ④B001 组 ($n = 10$) 高

[收稿日期] 2001-09-04 [修回日期] 2001-12-24

[基金项目] 山东省卫生厅青年科学研究基金 (CA2CAA2) 资助。

[作者简介] 李瑞峰, 男, 1955 年出生, 山东无棣人, 副教授, 硕士研究生导师。温海涛, 男, 1975 年出生, 山东临沂人, 病理生理学硕士。郭成浩, 男, 1965 年出生, 吉林人, 教授, 硕士研究生导师。胡维诚, 男, 1945 年出生, 教授, 博士研究生导师。

脂喂养 30 天后,每天插管灌胃 5% 半边莲 B001 水溶液 4 mL/g 体重,持续 60 天; A001 组($n=10$)高脂喂养 30 天后,每天插管灌胃 5% 半边莲 A001 水溶液 4 mL/g 体重,持续 60 天。实验第 90 天将大鼠全部处死。

半边莲提取物 A001 和 B001 由山东大学药学院天然药物化学教研室提供。

1.2 血脂测定

分别在实验前、实验第 30 天和实验第 90 天测定血脂。禁食 12 h,断尾取血,用酶法测定血清总胆固醇(total cholesterol,TC)及甘油三酯(triglyceride, TG),试剂由北京中生物生物工程高技术公司提供。

1.3 血浆内皮素 1 及内皮源一氧化氮合酶测定

将大鼠用乙醚麻醉后,固定于实验动物持续吸入麻醉手术台,断尾取血,用 EDTA 和 Aprotinin 抗凝酶处理,37℃水浴静置 15 min,3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆,-20℃保存待测。分别在实验前、实验第 30 天和第 90 天测血浆内皮素 1 和 eNOS。用放射免疫法测定血浆内皮素 1 含量,用化学比色法测定血浆 eNOS 活性。内皮素放射免疫药盒由中国人民解放军总医院科技开发中心放射免疫所提供,内皮源一氧化氮合酶检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.4 动脉内皮细胞内皮素测定

腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠(35 μg/g 体重),于左颈总动脉插管,恒压(13.3 kPa)灌注由 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制的 4% 多聚甲醛(pH 7.2),持续 10 min,剥离出胸主动脉和腹主动脉,置于上述固定液内 1 h。沿纵轴剖开血管,制备动脉内皮铺片,显微镜下计数每例主动脉内皮全部视野内皮细胞总数和内皮素阳性细胞数,计算出内皮素阳性细胞率。小鼠抗内皮素 1 血清由 SIGMA 公司提供;SABC 免疫组织化学染色试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.5 统计学处理

所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行两组均数间的 t 检验和多组均数间的方差分析。

2 结果

2.1 血清总胆固醇和甘油三酯含量

高脂喂养 30 天后,高脂组、B001 组和 A001 组大鼠血清 TC 和 TG 含量明显高于对照组($P<0.05$);灌服中药 60 天后,B001 组和 A001 组 TC 及 TG 仍增高,但与高脂组相比无显著性差异(表 1 和 2, Table 1 and

2)。

表 1. 半边莲不同组分对血清总胆固醇含量的影响.

Table 1. Effect of different element of Scute Llarla Barbata on total cholesterol ($\bar{x} \pm s$, mmol/L).

Groups	0 d	30 d	90 d
Control	1.762 ± 0.194	1.784 ± 0.163	1.796 ± 0.158
HL	1.785 ± 0.168	5.973 ± 0.162 ^a	6.124 ± 0.180 ^a
HL+ B001	1.790 ± 0.153	6.023 ± 0.173 ^a	6.358 ± 0.173 ^a
HL+ A001	1.853 ± 0.178	5.932 ± 0.181 ^a	6.342 ± 0.143 ^a

HL= high lipid diet; the same below. a: $P<0.05$, compared with control group.

表 2. 半边莲不同组分对血清甘油三酯含量的影响.

Table 2. Effect of different element of Scute Llarla Barbata on blood triglyceride ($\bar{x} \pm s$, mmol/L).

Groups	0 d	30 d	90 d
Control	1.074 ± 0.121	1.028 ± 0.123	1.039 ± 0.134
HL	0.986 ± 0.109	3.124 ± 0.414 ^a	3.582 ± 0.324 ^a
B001	1.013 ± 0.132	3.200 ± 0.468 ^a	3.712 ± 0.316 ^a
A001	0.963 ± 0.122	3.135 ± 0.382 ^a	3.678 ± 0.322 ^a

a: $P<0.05$, compared with control group.

2.2 血浆内皮素 1 含量

高脂饮食 30 天后,高脂组、B001 组和 A001 组血浆内皮素 1 含量显著高于对照组($P<0.05$)。用药 60 天,B001 组内皮素 1 继续增高,但低于高脂组($P<0.05$);A001 组与高脂组内皮素 1 比较无显著性差异(表 3, Table 3)。

表 3. 半边莲不同组分对血浆内皮素 1 含量的影响.

Table 3. Effect of different element of Scute Llarla Barbata on blood endothelin 1 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L).

Groups	0 d	30 d	90 d
Control	231.38 ± 23.09	248.03 ± 30.42	242.62 ± 35.07
HL	224.68 ± 31.56	313.23 ± 36.52 ^a	398.65 ± 31.08
B001	231.52 ± 26.36	323.26 ± 30.09 ^a	327.65 ± 28.04 ^b
A001	228.32 ± 30.45	316.54 ± 29.56 ^a	376.28 ± 32.78

a: $P<0.05$, compared with control group; b: $P<0.05$, compared with HC group.

2.3 血浆内皮源一氧化氮合酶活性

高脂饮食 30 天后,高脂组、B001 组和 A001 组血浆 eNOS 活性显著低于对照组($P<0.05$)。用药 60 天,B001 组血浆 eNOS 活性明显高于高脂组($P<0.$

05), 但 A001 组与高脂组比较无显著性差异 (表 4, Table 4)。

表 4. 半边莲不同组分对血浆内皮源一氧化氮合酶活性的影响.

Table 4. Effect of different element of *Scutellaria Barbata* on plasma eNOS active ($\bar{x} \pm s$, ku/L).

Groups	0 d	30 d	90 d
Control	31.53 $\pm$ 2.76	30.62 $\pm$ 2.58	31.69 $\pm$ 2.63
HL	29.66 $\pm$ 2.35	23.19 $\pm$ 2.48 ^a	18.38 $\pm$ 1.63
B001	30.62 $\pm$ 2.52	23.32 $\pm$ 2.56 ^a	24.67 $\pm$ 2.62 ^b
A001	28.78 $\pm$ 2.23	22.46 $\pm$ 1.85 ^a	18.07 $\pm$ 1.79

a: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with HC group.

2.4 内皮细胞铺片检查

对照组内皮细胞排列规则, 胞核呈蓝色椭圆型,

大小一致, 染色深浅基本一致; 高脂组内皮细胞数量增多, 排列紊乱, 胞核形状和大小不一, 可见多数小而深的胞核(固缩核)。对照组内皮素阳性细胞数量较少, 高脂组内皮素阳性细胞数明显增多, B001 组内皮素阳性细胞数较高脂组减少, A001 组与高脂组内皮素阳性细胞数无明显差异 (表 5 和图 1, Table 5 and Figure 1)。

表 5. 动脉内皮细胞内皮素阳性细胞率.

Table 5. Positive rate of endothelin in the arterial endothelium ($\bar{x} \pm s$, %).

Groups	Positive rate
Control	2.78 $\pm$ 0.23
HL	7.23 $\pm$ 0.28 ^a
B001	3.82 $\pm$ 0.16 ^b
A001	6.11 $\pm$ 0.29

a: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with HC group.

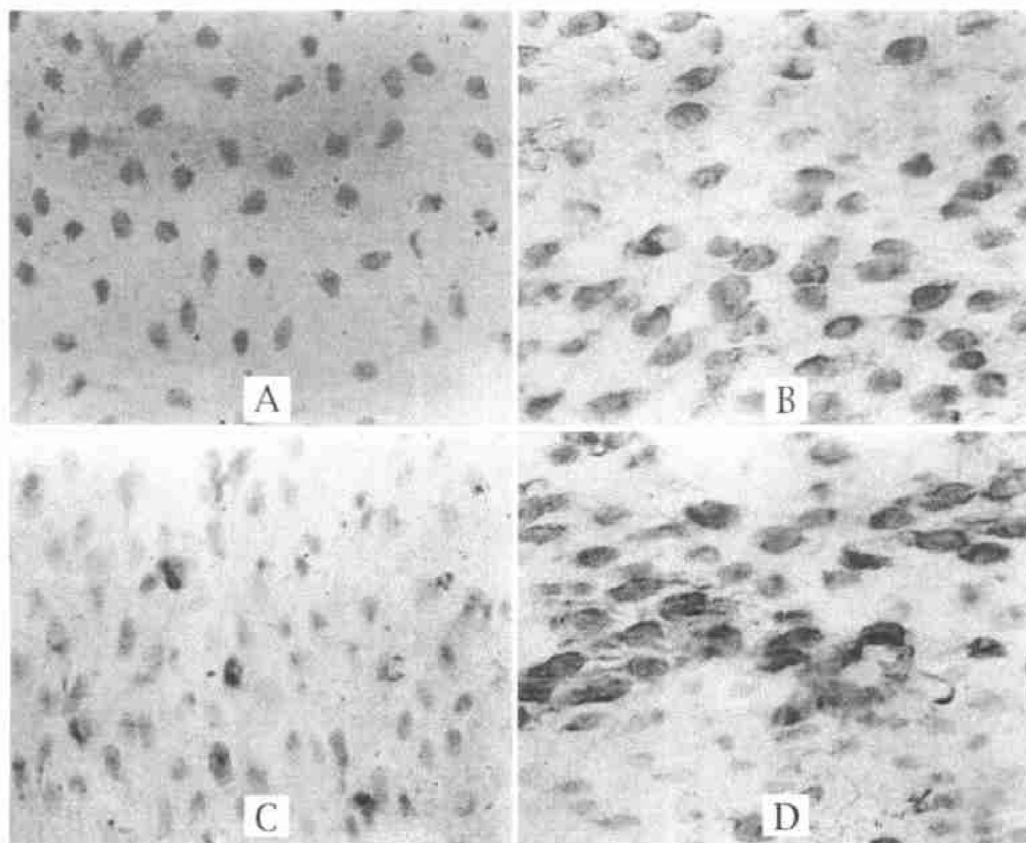


图 1. 大鼠主动脉内皮细胞铺片内皮素检测 (40 $\times$ 10)

Figure 1. Detection of Endothelin in "En-face" preparation of aortic endothelium in rat (40 $\times$ 10). A: Control group; B: HL group; C: B001 group; D: A001 group.

3 讨论

近来研究提示, 高脂血症或 As 动物血管内皮细

胞的功能损伤要早于其结构的损伤, 在动脉形态学损害或斑块出现之前, 就发生了内皮依赖的血管张

力调节、屏障和抗血栓形成等方面的内皮功能障碍^[6]。本实验发现,高脂饮食可明显增高动脉内皮细胞内皮素的合成与释放,并明显降低血浆 eNOS 浓度。

内皮素除了引起强烈的血管收缩外,还能促进血小板聚集和血管平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖,在 As 发病中扮演重要角色。NO 在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)作用下,由左旋精氨酸氧化途径产生。NO 通过激活鸟苷酸环化酶而产生生物学效应^[7],NO 除了调节血管平滑肌张力外,还具有抗氧化、抑制白细胞和血小板粘附与激活、抑制 SMC 增殖与诱导 SMC 凋亡等多种生理和病理作用^[8]。

清热解毒类中药半边莲是治疗毒蛇咬伤的常用药物。本室在前期工作中曾对高脂血症大鼠灌服半边莲的水煎剂,发现动物的血脂并不降低,但动脉内皮细胞的内皮素合成减少,并使内皮损伤减轻^[4]。张继峰等^[9]发现半边莲和蚤休具有使大鼠离体胸主动脉环松弛、显著抑制内皮素引起的大鼠血压升高,并能部分拮抗内皮素引起的小白鼠猝死,使动物的存活时间延长等作用。田青等^[10]也作过半边莲和蚤休可拮抗内皮素生物学效应的报道。提示半边莲通过拮抗内皮素从而具有抗动脉硬化作用。

本实验结果显示,半边莲 A001 组分对内皮素 1 的合成、释放及保护血管内皮方面无明显作用; B001

组分能明显降低血浆内皮素 1 浓度和动脉内皮细胞内皮素阳性细胞率,表明 B001 组分能通过拮抗内皮素 1 合成与释放,以缓解高脂血症对血管内皮的继续损伤。另外,半边莲 B001 组分尚能促进 eNOS 表达,进而拮抗动脉血管的收缩以及血管 SMC 增殖。本实验初步弄清了半边莲保护动脉内皮的有效成分,为今后在临床上进行 As 等心血管疾病的防治研究提供了一条新的思路。

[参考文献]

- [1] 宋良文, 张秉钧, 赵新荣, 等. 动脉粥样硬化斑块组织中几种基因的表达(免疫组织化学和原位杂交). 北京医科大学学报, 1994, 26 (增刊): 36-39
- [2] Landan G, Bdelah A, Wollberg Z, et al. Evolution of the sarafotoxin/ endothelin superfamily of proteins. *Toxicon*, 1991, 29: 237-244
- [3] Doi Y, Rujimoto S. Vasocontractions of the in-vitro toad aortas induced by endothelin 1 sarafotoxins s6b. *Anat Res*, 1993, 235 (2): 253-260
- [4] 杜艳芝, 阎晓梅, 胡维诚, 等. 清热解毒液对高脂血症大鼠内皮素影响的研究. 中国病理生理杂志, 1999, 15 (12): 1 134-137
- [5] 施新猷(主编). 医学动物实验方法. 人民卫生出版社, 1980, 233
- [6] Guido Arcaro, Beatrice Marina Zenere, Daniela travia, et al. Non-invasive detection of early endothelial dysfunction in hypercholesterolaemic subjects. *Atherosclerosis*, 1995, 114: 247
- [7] 魏 好. 一氧化氮与血管平滑肌细胞增殖的关系. 北京医科大学学报, 1999, 31: 62-64
- [8] 田雪梅, 刘建康, 李 进. 一氧化氮对血管平滑肌细胞中 Bcl-2, Bax, P53 和 Fas 蛋白表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6: 38-41
- [9] 张继峰, 田 青, 汤 健, 等. 从抗蛇毒药探寻内皮素拮抗剂的初步报告. 南京医学院学报, 1993, 13: 228
- [10] 田 青, 赵 东, 张继峰, 等. 对内皮素生物学效应拮抗作用和研究. 中国科学(B 辑), 1995, 25 (2): 172-178

(此文编辑 文玉珊)

•读者•作者•编者•

《中国动脉硬化杂志》第一届编委会

(1993 年 9 月)

名誉主编: 蔡海江*

主编: 杨永宗*

副主编: 徐也鲁* 孙仁俊*

编委(以下按姓氏笔画排列)

丁翠芬*	王宗立	邓仲端*	孙仁俊*	阮琬玉*	刘秉文
刘德文	汪 钟	陈 瑗*	陈保生	陈铁镇	吴满平*
杨小毅*	杨永宗*	杨和平	张英珊	张筠庭	范乐明*
周宏研*	胡必利	胡维诚	徐也鲁*	涂玉林*	黄士通
谢金魁	楼定安	蔡海江*			

注: 姓名右上角打“*”者为常务编委。