

[文章编号] 1007-3949(2004)12-05-0511-04

•实验研究•

沥水调脂胶囊对轻度修饰低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞单核细胞趋化因子 1 及内皮细胞 P 选择素表达的影响

史国峰, 宋剑南, 陈冰, 牛晓红, 金红

(中国中医研究院基础理论研究所, 北京市 100700)

[关键词] 细胞生物学; 中药对单核细胞趋化因子 1 和 P 选择素的影响; 细胞酶联免疫法; 轻度修饰低密度脂蛋白; 动脉粥样硬化; 血管平滑肌细胞; 内皮细胞

[摘要] 探讨健脾祛痰化痰方药(沥水调脂胶囊)含药血清对轻度修饰低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞表达单核细胞趋化因子 1 及内皮细胞表达 P 选择素的影响。用细胞酶联免疫法测定内皮细胞 P 选择素的表达, 酶联免疫法测定培养血管平滑肌细胞上清液中单核细胞趋化因子 1 的含量。结果发现, 20% 沥水调脂胶囊除蛋白含药血清组对轻度修饰低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞单核细胞趋化因子 1 表达的升高具有一定的抑制作用。10% 含药血清组对轻度修饰低密度脂蛋白诱导的内皮细胞表达 P 选择素已具有抑制作用, 当含药血清浓度达 20% 时其抑制作用更为明显。由此可见, 通过抑制细胞炎性因子单核细胞趋化因子 1 和血小板活化因子 P 选择素, 减轻血管炎性反应和血栓形成, 是健脾祛痰化痰方药沥水调脂胶囊抗氧化损伤、防治动脉粥样硬化发生发展及痰瘀互结的机制之一。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Effects of Li Shui Tiao Zhi Capsule on Monocyte Chemoattractant Protein-1 of Vascular Smooth Muscle Cells and P-Selectin of Vascular Endothelial Cells Induced by Minilly Modified Low Density Lipoprotein

SHI Guo-Feng, SONG Jian-Nan, CHEN Bing, NIU Xiao-Hong, and JIN Hong

(Institute of Basic Theory, China Academy of TCM, Beijing 100700, China)

[KEY WORDS] Minilly Oxidized Low Density Lipoprotein; Atherosclerosis; Vascular Smooth Muscle Cell; Endothelial Cell; Monocyte Chemoattractant Protein-1; P-selectin

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of Li Shui Tiao Zhi Capsule (LSTZ) on monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) of vascular smooth muscle cells (VSMC) and P-selectin of vascular endothelial cells (EC) induced by minilly modified low density lipoprotein (mnr-LDL). **Methods** Cells were treated by different concentrations of serum containing LSTZ (5%, 10% and 20%) and mnr-LDL. MCP-1 of VSMC was determined with ELISA. P-selectin of EC was detected with Cell-ELISA.

Results The expression of MCP-1 induced by mnr-LDL (20 mg/L) can be reduced by 20% serum containing LSTZ ($P < 0.05$). The expression of P-selectin induced by mnr-LDL (40 mg/L) was suppressed by 10% serum containing LSTZ ($P < 0.05$), and it showed a notably inhibition on concentration of 20% ($P < 0.01$).

Conclusions Protecting vascular cell and relieving response of inflammation may be one of the mechanisms of anti-atherosclerosis of LSTZ. Not only MCP-1 but also P-selectin may be involved in the "XUEYUZHENG" in Chinese Medical theory.

血浆中胆固醇水平的升高尤其是氧化型低密度脂蛋白水平的升高是引起动脉粥样硬化的独立危险因素。在动脉粥样硬化初期, 轻度修饰低密度脂蛋白(minilly modified low density lipoprotein, mnr-LDL)即可促进单核细胞向血管内膜粘附, 启动动脉粥样硬化斑块的形成, 且 mnr-LDL 是唯一引起单核细胞与

内皮细胞粘附, 而对其它白细胞粘附没有影响的致动脉粥样硬化的因素。本文旨在研究健脾祛痰化痰方药——沥水调脂胶囊(Li Shui Tiao Zhi Capsule, LSTZ)对抗 mnr-LDL 对细胞炎性因子单核细胞趋化因子 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)和血小板活化因子 P 选择素的影响。

[收稿日期] 2003-12-29 [修回日期] 2004-05-21

[基金项目] 国家自然科学基金(39970883)资助

[作者简介] 史国峰, 硕士, 主要从事中医证候的细胞生物学研究。宋剑南, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中医证候的蛋白质组学研究, E-mail 为 sijn2003@sina.com, 本文通讯作者。陈冰, 硕士, 主要从事中医证候的分子生物学研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养基、M199 固体细胞培养基、胎牛血清(Hyclone 公司); HEPES、L-谷氨酰胺、Ⅰ型胶原酶、

胰蛋白酶(GIBCO 公司);天然低密度脂蛋白(normal low density lipoprotein, nrLDL)(中国医学科学院基础所脂蛋白组提供)。P 选择素一抗为山羊抗人单克隆抗体(Santacruz 生物公司);二抗为辣根过氧化物酶标记兔抗山羊多抗(Vector 公司)。MCP-1 检测试剂盒(TPI 公司),其他试剂为国产分析纯。

1.2 血管平滑肌细胞的培养^[1]

取新鲜人脐带,剥离脐动脉,剪为 1~2 mm 大小的组织块,放入用 DMEM 配置的 2 g/L Ⅲ型胶原酶消化液中消化 40~60 min,然后放置于含 20% 胎牛血清的 DMEM 中孵育 24 h,再放入含终浓度为 2 g/L 胶原酶及 0.1 g/L 胰蛋白酶的复合消化液中,37℃ 消化至完全溶解。离心,细胞计数,用含 20% 胎牛血清的 DMEM 液接种于培养皿中,3~4 代用于实验。

1.3 人脐静脉内皮细胞的培养

用 D-Hank's 液反复冲洗脐静脉,用 1 g/L Ⅲ型胶原酶消化脐静脉,37℃ 孵育 3 min。收集消化液,并用 D-Hank's 液再次冲洗脐静脉,将消化液及冲洗液合并离心,弃上清液,用含 20% 胎牛血清的 M199 培养液吹散细胞,接种于培养瓶中,第 3~4 代用于实验。

1.4 轻度修饰低密度脂蛋白的制备

将 nrLDL 放入透析袋于 pH 7.4 的磷酸缓冲液中 4℃ 充氮透析 24 h,以除去乙二胺四乙酸二钠,然后置于含有 5 μmol/L 硫酸铜的磷酸缓冲液中,37℃ 水浴,每半小时取出少量测定硫代巴比妥酸反应物质的含量,至达到 2~4 μmol/g 且琼脂糖凝胶电泳电泳迁移率无改变为止,置于含 0.1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠的磷酸缓冲液中 4℃ 透析,12 h 后取出,充氮 4℃ 保存。

1.5 沥水调脂胶囊含药血清及正常血清的制备

Wester 大鼠,雌雄各半,体重 227~338 g,购自军事医学科学院实验动物中心(京动许字 99001,清洁级)。分为 2 组,一组按成人体表面积换算等效剂量 8 倍,每天 2 次给药,连续 3 天;另一组以等量水代替,第 3 天将 1 日量 1 次给药,1.5 h 后心脏取血,分离血清,用 3 倍体积的甲醇沉降蛋白,冻干充氮低温保存备用,临用前用三蒸水等量稀释,0.2 μm 过滤除菌。

将血清以相应培养基配制成以下 4 种培养基:

20% 含药血清为 100 mL 含 20 mL 含药血清;④ 10% 含药血清为 100 mL 含 10 mL 含药血清和 10 mL 正常鼠血清;⑤ 5% 含药血清为 100 mL 含 5 mL 含药血清和 15 mL 正常鼠血清; 20% 正常血清为 100

mL 含 20 mL 正常鼠血清。

1.6 实验分组

检测不同浓度 nrLDL 和 mnrLDL(5、10、20、40 及 80 mg/L)对平滑肌细胞 MCP-1 和内皮细胞 P 选择素的影响,选择合适浓度,然后检测不同浓度含药血清(5%、10% 及 20%)对这两种指标的影响。共分 6 组: nrLDL 组为 nrLDL+20% 正常鼠血清;④ mnrLDL 组为 mnrLDL+20% 正常鼠血清;⑤ 5% LSTZ 组为 mnrLDL+5% 含药血清; 10% LSTZ 组为 mnrLDL+10% 含药血清; 20% LSTZ 组为 mnrLDL+20% 含药血清; 维生素 E 组为 mnrLDL+20% 正常鼠血清+10 μmol/L 维生素 E。

1.7 单核细胞趋化因子 1 含量的测定

实验使用第 3 代平滑肌细胞,检测不同浓度 nrLDL 和 mnrLDL 作用 24 h 对细胞 MCP-1 的影响,加入不同浓度含药血清及 mnrLDL(20 mg/L)作用细胞 24 h,用 ELISA 法测定 MCP-1 的表达,具体按试剂盒说明操作。

1.8 P 选择素的测定

实验使用第 3 代内皮细胞,检测不同浓度 nrLDL 和 mnrLDL 作用 24 h 对细胞 P 选择素的影响,观察 mnrLDL(40 mg/L)在不同作用时间点(0.5、6、12、18、24 及 32 h)P 选择素的变化,检测不同浓度含药血清及 mnrLDL(40 mg/L)作用细胞 18 h 后 P 选择素的变化。细胞传入 96 孔板中,先用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养至对数期,按照分组加入相应培养基,用磷酸缓冲液冲洗内皮细胞 3 次,用含 0.025% 戊二醛的磷酸缓冲液固定 10 min,弃固定液,用含有 0.05% 吐温 20 液的磷酸缓冲液冲洗。加入含有 1% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液 4℃ 过夜。冲洗后加入含山羊抗人 P 选择素一抗(1 mg/L)的 1% 牛血清白蛋白溶液,室温温育 60 min。冲洗后,加入含标有辣根过氧化物酶的抗山羊二抗的 1% 牛血清白蛋白溶液,室温下温育 60 min。冲洗,加入显色剂室温下避光温育 30 min,以 2 mol/L 硫酸 50 μL/孔终止反应,30 min 内在 450 nm 下读取吸光度值。

2 结果

2.1 不同浓度的轻度修饰低密度脂蛋白对单核细胞趋化因子 1 的影响

与 nrLDL 相比,mnrLDL 浓度低于 10 mg/L 时对 SMC 表达 MCP-1 未见明显影响,但随着浓度的升高 SMC 表达 MCP-1 的量也相应地明显增加($P < 0.05$; 表 1, Table 1)。

表 1. 不同浓度的轻度修饰低密度脂蛋白对单核细胞趋化因子 1 的影响 (24 h)

Table 1. Effect of different concentrations of mmr-LDL on expression of MCP-1

浓度 (mg/L)	nr-LDL	mmr-LDL
5	0.674 ± 0.049	0.664 ± 0.048
10	0.677 ± 0.032	0.689 ± 0.014
20	0.685 ± 0.039	0.782 ± 0.019 ^a
40	0.699 ± 0.032	0.832 ± 0.041 ^a
80	0.701 ± 0.049	0.841 ± 0.035 ^a

a: $P < 0.05$, 与 nr-LDL 组比较。

2.2 不同浓度含药血清对轻度修饰低密度脂蛋白诱导平滑肌细胞表达单核细胞趋化因子 1 的影响

与 nr-LDL 相比, mmr-LDL 能显著增加 SMC 表达 MCP-1 ($P < 0.01$)。当含药血清浓度达 20% 时即能显著抑制 mmr-LDL 诱导 SMC 表达 MCP-1 ($P < 0.05$; 表 2, Table 2)。

表 2. 沥水调脂胶囊对轻度修饰低密度脂蛋白 (20 mg/L) 诱导平滑肌细胞表达单核细胞趋化因子 1 的影响

Table 2. The effect of LSTZ on the expression of MCP-1 induced by mmr-LDL (20 mg/L) of vascular smooth muscle cells

分 组	吸光度值
nr-LDL	0.708 ± 0.016 ^a
mmr-LDL	0.805 ± 0.017
5% LSTZ	0.798 ± 0.022
10% LSTZ	0.784 ± 0.019
20% LSTZ	0.767 ± 0.021 ^a
维生素 E	0.762 ± 0.019 ^a

a: $P < 0.01$, 与 mmr-LDL 组比较。

2.3 不同浓度的轻度修饰低密度脂蛋白对内皮细胞表达 P 选择素的影响

当 mmr-LDL 浓度低于 20 mg/L 时对内皮细胞表达 P 选择素无明显影响, 其后随着浓度的增加, mmr-LDL 诱导内皮细胞中 P 选择素的表达量也随之明显增多 ($P < 0.05$; 表 3, Table 3)。

2.4 轻度修饰低密度脂蛋白在不同时间对内皮细胞表达 P 选择素的影响

当 mmr-LDL 作用内皮细胞 18 h 后 P 选择素表达开始升高 ($P < 0.05$), 至 24 h 达最大值 ($P < 0.01$), 此后便出现下降趋势 (表 4, Table 4)。

2.5 不同浓度含药血清对轻度修饰低密度脂蛋白诱导内皮细胞表达 P 选择素的影响

与 nr-LDL 相比, mmr-LDL 能明显诱导 P 选择素的表达升高。不同浓度沥水调脂胶囊含药血清对 mmr-LDL 诱导内皮细胞表达 P 选择素的影响不同。当含药血清浓度达 10% 时即能显著抑制 mmr-LDL 诱导内皮细胞表达 P 选择素 ($P < 0.05$), 且随着含药血清浓度的增加, 此种抑制作用更加明显 ($P < 0.01$; 表 5, Table 5)。

表 3. 不同浓度的轻度修饰低密度脂蛋白对内皮细胞表达 P 选择素的影响 (24 h)

Table 3. The effect of different concentrations of mmr-LDL on expression of P-selectin of endothelial cells

浓度 (mg/L)	nr-LDL	mmr-LDL
5	0.722 ± 0.008	0.715 ± 0.012
10	0.724 ± 0.004	0.728 ± 0.004
20	0.738 ± 0.008	0.746 ± 0.007
40	0.750 ± 0.013	0.794 ± 0.014 ^a
80	0.765 ± 0.014	0.823 ± 0.028 ^a

a: $P < 0.05$, 与 nr-LDL 组比较。

表 4. 轻度修饰低密度脂蛋白 (40 mg/L) 在不同时间对内皮细胞表达 P 选择素的影响

Table 4. The effect of mmr-LDL (40 mg/L) on expression of P-selectin of endothelial cells on different time

Time (h)	nr-LDL	mmr-LDL
0.5	0.717 ± 0.023	0.728 ± 0.035
6	0.734 ± 0.031	0.756 ± 0.026
12	0.756 ± 0.036	0.812 ± 0.026
18	0.773 ± 0.071	1.110 ± 0.111 ^a
24	0.789 ± 0.022	1.230 ± 0.137 ^b
30	0.734 ± 0.032	1.070 ± 0.127 ^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 nr-LDL 组比较。

表 5. 不同浓度含药血清对轻度修饰低密度脂蛋白 (40 mg/L) 诱导内皮细胞表达 P 选择素的影响 (18 h)

Table 5. The effect of LSTZ on expression of P-selectin of endothelial cells induced by mmr-LDL (40 mg/L)

分 组	吸光度值
nr-LDL	0.737 ± 0.028 ^b
mmr-LDL	0.872 ± 0.061
5% LSTZ	0.869 ± 0.058
10% LSTZ	0.861 ± 0.064 ^a
20% LSTZ	0.849 ± 0.062 ^b
维生素 E	0.856 ± 0.054 ^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 mmr-LDL 组比较。

3 讨论

动脉粥样硬化的机制研究已经进行了一百多年,日渐被公认属于一种慢性炎症疾病。Ross^[2]于1999年以新的论据在损伤反应学说的基础上,明确提出“动脉粥样硬化是一种炎症性疾病”。引起血管壁炎症反应的因素很多,其中 ox-LDL 是动脉粥样硬化最重要的致病因素,但 LDL 并非只有完全氧化生成 ox-LDL 才具有致病作用,它初步氧化生成的 mmr-LDL 也是一种重要的致炎因子,mmr-LDL 的生成早于 ox-LDL 而且又是 ox-LDL 大量生成的最重要因素,它可使血管壁细胞发生炎症反应,促进血管壁表达粘附分子和趋化因子。

单核细胞趋化因子 1(MCP-1)影响着单核细胞从粘附迁移到泡沫化的全过程。血浆中 MCP-1 水平的高低被认为是评价动脉粥样硬化治疗效果的一个重要指标^[3]。而 P 选择素是启动炎症反应并维持炎症状态的重要成分,它是反映内皮细胞炎症的最佳标志分子,也与血液凝固关系密切。已经有多项研究表明,在动脉粥样硬化炎症过程中,在将形成动脉粥样硬化斑块的血管内膜上 P 选择素表达增加。P 选择素是动脉粥样硬化发生中的单核细胞粘附与迁移的必须条件和最重要的因素之一。因此,我们以 mmr-LDL 为刺激因素,观察内皮细胞、平滑肌细胞表达这 2 种指标的变化。本研究发现,沥水调脂胶囊除蛋白含药血清对 mmr-LDL 诱导的平滑肌细胞 MCP-1 表达的升高具有一定的抑制作用,并可抑制 mmr-LDL 诱导的内皮细胞 P 选择素的表达。我们以往的研究表明,沥水调脂胶囊在体外抑制铜离子对

LDL 的氧化修饰^[4],该药可显著抑制高脂组大鼠主动脉内皮细胞通透性的增加^[5],明显升高高脂状态下主动脉血管壁一氧化氮合酶活性及其 mRNA 表达,降低内皮素 mRNA 表达^[6],起到保护内皮细胞的作用,影响与 SMC 增殖相关基因的表达,明显下调高脂组主动脉 c-myc mRNA 的表达,上调 p53 mRNA 的表达^[7]。本实验研究进一步表明,沥水调脂胶囊能抗 mmr-LDL 对内皮细胞的损伤,减轻炎症反应,抑制内皮细胞表达 P 选择素,保护 SMC,抑制 mmr-LDL 对 SMC 的损伤,减轻炎症反应下调表达 MCP-1。由此可见,通过抑制细胞炎性因子 MCP-1 和血小板活化因子 P 选择素,减轻血管炎性反应和血栓形成,可能是健脾祛痰化痰方药抗氧化损伤、防治动脉粥样硬化发生发展的机制之一。

[参考文献]

- [1] 涂永生,黄红林,朱炳阳,廖端芳. ④型胶原酶/弹性蛋白酶消化法培养大鼠血管平滑肌细胞. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (5): 438-440
- [2] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, 340 (2): 115-126
- [3] De Lencos JA, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, et al. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circ*, 2003, 107: 690-695
- [4] 牛晓红,金红,宋剑南. 健脾祛痰化痰方药——沥水调脂胶囊抗低密度脂蛋白氧化修饰作用的研究. 中国中医基础杂志, 2002, 8 (10): 12-14
- [5] 周瑕菁,宋剑南. 中医不同治法对实验性高脂血症兔主动脉内膜脂斑形成的影响. 中医杂志, 1996, 37 (5): 174
- [6] 李亚俊,宋剑南. 脂泰胶囊对实验性动脉粥样硬化家兔一氧化氮合酶、内皮素活性及基因表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7 (1): 4-6
- [7] 薛士滨,宋剑南,周瑕菁,等. 痰瘀同治方药脂泰胶囊抗动脉粥样硬化的机理. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4 (12): 29-31 (此文编辑 文玉珊)

•读者•作者•编者•

投稿须知: 我刊对所投文稿的要求和注意事项

- 1 所投文稿必须一式两份(因我刊需同时送请两位相关专家审稿),若只投一份文稿,就不能保证在规定的时间内有结果。插图应一式三份,其中两份贴在文稿上供审稿用,一份用信封另装供制版用。若文稿中有照相图,三份图都必须是原件。
- 2 作为中国科协主管的国家级期刊,我刊已签署《全国性学会科技期刊道德公约》。投稿时请附作者单位或文稿工作单位介绍信,并请主要作者签字声明: ①文稿内容素材真实;②署名及作者排名无争议;③在我刊规定的期限内未一稿多投。
- 3 我刊收到文稿后,会立即登记编号,并寄给回执。今后联系,请写明文稿登记号。
- 4 为杜绝草率投稿和一稿多投现象,我刊酌情向投稿者个人收取稿件处理费每篇 50 元,此费不得索取发票向单位报销。我刊在收到稿件处理费后,方可处理该稿件。
- 5 无特殊情况,三个月内发出文稿预录和收取版面费通知书。请作者接到通知后,填写文章发表授权书,汇出所需费用,表明作者同意该文只在我刊发表。编辑部收到授权书后,才挂号邮寄修稿单和稿件。不录用的文稿会书面通知作者,并退稿。作者在投寄文稿三个月后既未收到录用通知,又未收到修稿单,表明该文稿仍在处理中,可来电或 E-mail 查询。
- 6 收到修稿单的作者请按时按要求修改后寄回,编辑部在收到修改稿和磁盘后即安排版面。
- 7 投稿、修回稿及装有修回稿的软盘请寄: 421001, 湖南省衡阳市南华大学内, 中国动脉硬化杂志编辑部收, 勿寄给个人。修回稿除了寄纸打印稿外,也可发 E-mail, 地址是 dmzjbh@163.net; 编辑部的联系电话为 0734-8160765, 传真 8160523。