

蚤休皂苷对氧化损伤的脐静脉内皮细胞间细胞粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 表达的影响

高琳琳¹, 李福荣¹, 康莉¹, 司艳红¹, 胡维诚²

(1. 泰山医学院病理生理学教研室, 山东省泰安市 271000; 2. 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] 病理学与病理生理学; 蚤休皂苷; 脐静脉内皮细胞; 细胞间粘附分子 1; 血管细胞粘附分子 1; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 研究中药蚤休皂苷对 H_2O_2 诱导的脐静脉内皮细胞 ECV304 损伤的保护作用及其机制。方法 体外培养 ECV304, 建立氧化损伤细胞模型, 然后分为五个实验处理组: 正常对照组、氧化损伤组、高浓度蚤休皂苷组、中浓度蚤休皂苷组和低浓度蚤休皂苷组, 采用四甲基偶氮唑盐比色法检测蚤休皂苷对 H_2O_2 诱导的内皮细胞氧化损伤的影响, 逆转录聚合酶链反应检测细胞间细胞粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达水平, 流式细胞术定量检测细胞间细胞粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 的表达。结果 损伤后细胞吸光度值低于正常对照组 ($P < 0.01$), 药物预处理后吸光度值增加, 高浓度蚤休皂苷组吸光度值与正常组相比差异无显著性; 药物预处理氧化损伤后, 细胞间细胞粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达水平与损伤组相比明显减弱 ($P < 0.01$); 损伤组中与内参照的灰度值之比最大, 与正常组相比差异显著 ($P < 0.01$); 损伤组中表达细胞间细胞粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 的阳性细胞数增多, 与正常组相比差异显著 ($P < 0.01$); 药物预处理氧化损伤后, 阳性细胞数明显减少, 且此效应呈剂量依赖性 ($P < 0.01$)。结论 蚤休皂苷可以保护 H_2O_2 造成的人脐静脉内皮细胞的氧化损伤, 是通过抑制内皮细胞粘附分子的表达从而抑制炎症性损伤, 达到保护内皮细胞、抗动脉粥样硬化的目的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Pariphyllin on the Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Injury Induced by Hydrogen Peroxide in The Human Umbilical Vein Endothelial Cell

GAO Lin-Lin, LI Fu-Rong, KANG Li, SI Yan-Hong, and HU Wei-Cheng

(Department of Pathophysiology, Taishan Medical College, Taian 271000, China)

[KEY WORDS] Pariphyllin; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Intercellular Adhesion Molecule-1; Vascular Cell Adhesion Molecule-1; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the mechanism of anti-injury of pariphyllin on the human umbilical vein endothelial cell (hUVEC) ECV 304 induced by hydrogen peroxide (H_2O_2). **Methods** A model of endothelial cell oxidative damage induced by H_2O_2 was established, then cells were divided into five experimental groups including normal group, oxidative damage group and three different concentration pariphyllin groups. MTT assay was used to detect the protection of pariphyllin, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the mRNA expression level of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), flow cytometry (FCM) was used to quantitate the expression of ICAM-1 and VCAM-1. **Results** Cell optical density in oxidation damaged group was lower than normal control ($P < 0.01$); when pretreated by the medicine, the OD value was increased, and it had no significant difference in the high density pariphyllin than normal control ($P > 0.05$). The mRNA expression of ICAM-1 and VCAM-1 was significantly descended ($P < 0.01$) in medicine treatment groups than in H_2O_2 damage group, FCM result discovered that the numbers of masculine cells which express ICAM-1 or VCAM-1 were obviously more than other groups ($P < 0.01$), but pretreated group could make the number lower and the effect was dose dependent. **Conclusions** Pariphyllin has the protective action on oxidative damage of ECV304, which was related to stabilizing the cell wall to inhibit the inflammatory reaction induced by ICAM-1 and VCAM-1, and then protect endothelial cell, prevent atherosclerosis.

近年来动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)被认为是一个慢性炎性过程^[1], 诸多研究证明粘附分子

[收稿日期] 2008-05-30

[修回日期] 2008-07-30

[基金项目] 山东省卫生厅青年项目基金(JZ43)资助; 山东省泰安市科技局科技基金(20051011)资助

[作者简介] 高琳琳, 博士, 副教授, 主要从事动脉粥样硬化发病机制的研究, E-mail 为 gao-linlin99@sina.com。李福荣, 硕士, 副教授, 主要从事防治动脉粥样硬化中药药理学研究。通讯作者胡维诚, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化基础研究, E-mail 为 huweicheng@sdu.edu.cn。

的表达与 As 的发生发展有关。细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 存在于白细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC)、上皮细胞等多种细胞的表面,可介导白细胞与内皮细胞粘附,有助于 As 形成过程中的慢性炎症反应^[2]。过氧化产物如氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 可以上调内皮细胞 ICAM-1、血管细胞粘附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 和 P 选择素的表达, ICAM-1 和 VCAM-1 等能促进免疫细胞浸润,促进单核细胞分化为巨噬细胞,使胆固醇沉积失去限制,形成泡沫细胞进而促进 As 的发生。因此,寻找可抑制 ICAM-1 和 VCAM-1 等表达的有效药物对 As 的防治具有重要意义。

本研究观察蚤休皂苷对 H_2O_2 诱导的内皮细胞氧化损伤的影响,检测内皮细胞粘附分子的表达,探讨其与抗氧化损伤间的关系以及可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞系 ECV304 由武汉大学典型培养物保藏中心提供。蚤休干片购于济南建联药店,蚤休皂苷为浅红色粉状结晶,由泰山医学院药物化学教研室提取鉴定,每 1 kg 蚤休干片得到皂苷结晶 189.77 g,用 RPMI1640 培养液稀释至 1 000 ng/L、100 ng/L、10 ng/L,微孔滤膜过滤除菌, - 20℃ 保存备用。即用型兔抗人粘附分子 (ICAM-1 和 VCAM-1) 单克隆抗体购于武汉博士德生物技术有限公司。PCR 引物由大连宝生物公司合成。

1.2 四甲基偶氮唑盐比色法检测蚤休皂苷对 H_2O_2 诱导的内皮细胞氧化损伤的影响

0.25% 胰蛋白酶消化 ECV304,按 $0.4 \times 10^5/L$ 将细胞接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL ,加入 RPMI1640 培养基补充至 200 μL ; 24 h 后,换用无血清无酚红 RPMI1640 培养基饥饿培养 24 h,使细胞同步于 G_0/G_1 期。将孔中液体吸出 100 μL ,分别加入终浓度分别为 1000、100 及 10 ng/L 蚤休皂苷各 50 μL 。并设对照孔。24 h 后,每孔加入 100 $\mu mol/L$ H_2O_2 溶液 50 μL ,设立加入 100 $\mu mol/L$ H_2O_2 溶液 50 μL 的 H_2O_2 氧化损伤组,继续在 37℃ 的 CO_2 培养箱中孵育 24 h,MTT 溶液 (5 g/L 用 PBS 配制, pH7.4) 20 μL ,继续孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加 150 μL DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分融解。选择 490 nm 波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔光

吸收值,记录结果。

1.3 逆转录聚合酶链反应法检测粘附分子 mRNA 的表达

弃干净培养瓶中的培养液,每瓶细胞加入 1 mL RNA 提取液,然后依次用氯仿、异丙醇萃取,得到的 RNA 沉淀物用分光光度计测 260 nm 和 280 nm 吸光值,计算 RNA 浓度。按如下体系进行逆转录: RNA 2 μg ,寡核苷酸引物 1 μL , Rnasin 1 μL , $5 \times$ 缓冲液 6 μL , dNTP 2 μL , AMV 逆转录酶 (Promega 公司) 40 u,用去 RNA 酶三蒸水补足至 25 μL , 42℃ 1 h, 70℃ 15 min。得到的 cDNA 于 - 20℃ 保存。采用软件 Primer 5 和 Primer 3 分别设计其上下游引物,内参照为 β -actin。ICAM-1 引物序列为正义链 5'-AGC TTC TCC TGC TCT GCA AC-3',反义链 5'-CAT TAT GAC TGC GGC TGC TA-3'; VCAM-1 引物序列为正义链 5'-GGC TGG AGA TAG ACT TAC TGA-3',反义链 5'-TCCA GGG GAG ATC TCA ACA G-3'。聚合酶链反应体系为 cDNA 模板 2 μL , dNTP 1 μL , $10 \times$ 缓冲液 5 μL , 25 mmol/L $MgCl_2$ 3 μL ,寡核苷酸引物 20 pmol/L, Taq 酶 1 μL ,灭菌三蒸水补足至 50 μL ,混匀。94℃ 预变性 5 min,然后 94℃ 变性 30 s \rightarrow 58℃ ~ 65℃ 退火 60 s \rightarrow 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环,最后延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳分析结果。

1.4 流式细胞仪定量检测粘附分子在不同分组细胞中的表达

细胞分组以及处理同前,37℃ 温箱取出各处理组细胞培养瓶,胰蛋白酶消化,分别收集细胞放入试管中。将试管以 1000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 4℃ PBS,涡旋方式混匀,再离心, PBS 洗涤细胞。其余步骤同免疫荧光染色, FITC-SABC 染液 100 μL , 300 目尼龙网过滤。上流式细胞仪测定 (激发波长 488 nm, 氢离子激光),用 MulticycleDNA 分析软件包进行蛋白质的定量分析。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 One-Way ANOVA 分析及 LSD 两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蚤休皂苷对血管内皮细胞氧化损伤的影响

损伤细胞吸光度 OD 值低于正常对照组 ($P < 0.01$); 而经蚤休皂苷的三个浓度预处理后,血管内皮细胞的损伤明显减轻,细胞增殖活性较损伤组明显增加 ($P < 0.01$),其中高浓度蚤休皂苷组与正常对照组相比差异无显著性 (表 1)。

表 1. 蚤休皂苷对各组细胞 OD 值的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

分 组	OD 值
正常对照组	1.605 \pm 0.157
H ₂ O ₂ 损伤组	0.329 \pm 0.012 ^a
H ₂ O ₂ + 1000 ng/L 蚤休皂苷组	1.765 \pm 0.011 ^b
H ₂ O ₂ + 100 ng/L 蚤休皂苷组	1.796 \pm 0.013 ^b
H ₂ O ₂ + 10 ng/L 蚤休皂苷组	1.325 \pm 0.015 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 H₂O₂ 损伤组比较。

2.2 粘附分子 mRNA 的表达

H₂O₂ 氧化损伤后上调 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 的表达, 而蚤休皂苷可干预 H₂O₂ 氧化损伤后的血管内皮细胞中粘附分子的表达, 表现为损伤组条带密度比各预处理组显著增高 ($P < 0.01$)。不同浓度蚤休皂苷组降低 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 的表达(图 1 和表 2)。

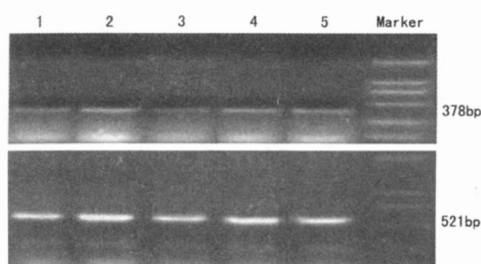


图 1. 粘附分子 mRNA 的表达 上图为 ICAM-1 mRNA 的表达, 下图为 VCAM-1 mRNA 的表达; M 为 Marker, 1 为正常对照组, 2 为损伤组, 3 为高浓度蚤休皂苷组, 4 为中浓度蚤休皂苷组, 5 为低浓度蚤休皂苷组。

2.3 粘附分子阳性细胞数的变化

损伤组 ICAM-1 和 VCAM-1 的阳性细胞数显著多于正常对照组 ($P < 0.01$); 经蚤休皂苷预处理后, 阳性细胞数明显减少 ($P < 0.01$), 且两种药物的作用均呈剂量依赖性(表 3)。

表 2. 粘附分子 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

分 组	ICAM-1 mRNA	VCAM-1 mRNA
正常对照组	0.59	0.84
H ₂ O ₂ 损伤组	0.84 ^a	1.02 ^a
H ₂ O ₂ + 1000 ng/L 蚤休皂苷组	0.55 ^b	0.78 ^b
H ₂ O ₂ + 100 ng/L 蚤休皂苷组	0.58 ^b	0.88 ^b
H ₂ O ₂ + 10 ng/L 蚤休皂苷组	0.61 ^b	0.80 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 H₂O₂ 损伤组比较。

表 3. 粘附分子阳性细胞数的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

分 组	ICAM-1	VCAM-1
正常对照组	92.11 \pm 10.03	16.92 \pm 1.57
H ₂ O ₂ 损伤组	428.25 \pm 30.8 ^a	82.29 \pm 7.01 ^a
H ₂ O ₂ + 1000 ng/L 蚤休皂苷组	152.54 \pm 15.77 ^{bc}	57.76 \pm 5.41 ^{bc}
H ₂ O ₂ + 100 ng/L 蚤休皂苷组	272.54 \pm 24.39 ^b	68.79 \pm 6.13 ^b
H ₂ O ₂ + 10 ng/L 蚤休皂苷组	321.77 \pm 30.62 ^b	73.32 \pm 6.65 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 H₂O₂ 损伤组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 10 ng/L 蚤休皂苷组比较。

3 讨论

《本经》、《本草纲目》对蚤休(又称重楼)具有的清热解毒、消肿止痛、促进毒素分解排出药性有详细的记载。蚤休的药理活性多样^[3], 近年来国内外学者着眼于其生理活性和独特的药用价值, 运用现代药理方法, 为中药蚤休的一些临床应用提供了理论依据, 同时也发现了它的一些新作用^[4]。中草药中含有丰富的自由基清除成分, 研究表明蚤休提取物还具有一定的抗氧化性。自由基参与许多病理生理现象如衰老、As、缺血再灌注损伤的氧化损伤, 因此我们着重观察了蚤休皂苷的抗内皮细胞氧化损伤进而对抗 As 形成的作用。

近年来研究表明, As 是一种慢性炎症性疾病, 而且, 在炎症过程中, 相继发现了多种血管内皮细胞表达的粘附分子, 并对其结构和功能进行了大量研究, 证明血管内皮细胞表达的粘附分子在炎症性疾病的发病过程中对白细胞与血管壁内皮细胞粘附、经内皮迁移及向组织浸润起了关键作用。因此, 单核细胞与血管内皮细胞粘附是 As 形成过程中最早的现象之一, 也是 As 发生的重要环节^[5]。研究证实 As 斑块中存在着血管平滑肌与血管内皮细胞的凋亡现象, 然而由于血管内皮细胞位于血管最内层, 直接与循环血液接触, 因此较血管平滑肌细胞更易受到血液中活性物质及血液剪切力的影响, 在心脑血管疾病的发生过程中处于关键环节。舒张和收缩因子、促凝和抗凝因子以及生长抑制和生长促进因子的平衡失调导致血管内皮功能障碍, 引起生理系统多方面的变化, 如血小板和白细胞的粘附^[6,7]。

血管内皮细胞损伤受多种因素影响, 如炎症因子、活性氧、脂肪酶等, 氧化应激损伤是其中重要的因素之一^[8,9], 而 VCAM-1 和 ICAM-1 在这个损伤过程中通过脂膜、胞质的信号分子传递, 激活转录因子核因子 κ B, 与靶基因细胞粘附分子基因位点结合, 上调内皮细胞的粘附分子基因及粘附分子的表

达^[10]。这些粘附分子在介导单核细胞粘附、迁移穿过内膜,始动As早期细胞行为中起重要作用。

在As病变过程中不同致病因子的作用下,动脉壁细胞通过自分泌和旁分泌可产生大量的ICAM-1、VCAM-1,它能使血液中的单核细胞迁入内膜下,并活化巨噬细胞,吞噬过氧化脂质形成泡沫细胞,是As最早期最重要的病理变化^[11]。

本研究利用逆转录聚合酶链反应观察内皮细胞ICAM-1和VCAM-1 mRNA的表达,流式细胞仪检测两种粘附分子在不同分组细胞中的定量表达。结果发现,H₂O₂损伤后,单核细胞与内皮细胞的粘附力显著升高,ICAM-1和VCAM-1 mRNA的表达显著升高;ICAM-1和VCAM-1含量明显增加,蚤休皂苷可使单核细胞与内皮细胞的粘附力降低,ICAM-1和VCAM-1 mRNA的表达均降低,ICAM-1和VCAM-1含量也明显下降。说明蚤休皂苷可以降低单核细胞与内皮细胞粘附力,降低ICAM-1和VCAM-1的mRNA表达。提示蚤休皂苷是从转录水平抑制粘附分子的生成,在抑制炎症发生的过程中发挥作用,也体现了As的炎症-损伤学说。所以,蚤休是从保护内皮细胞对抗及其氧化损伤所导致的炎症反应,达到阻断As的发生和发展的目的,减少As的始动环节和早期事件的发生。可以初步认为蚤休皂苷通过保护内皮细胞而具有防治As的作用,其机制及之间的关系值得进一步研究和开发。其具体的分子信号转导机

制仍需在蛋白水平上进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis— an inflammation disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-123.
- [2] Campuzano R, Moya J, Garcia-Liedo A, et al. Endothelial dysfunction, intima-media thickness and coronary artery disease in relation to risk factors and Framingham score in patients without clinical atherosclerosis [J]. *J Hypertens*, 2006, **24** (8): 1581-588.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 183.
- [4] 武珊珊, 高文远, 段宏泉, 等. 重楼化学成分和药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2004, **35** (3): 345.
- [5] 班振英, 周颖, 程恒辉, 等. 脱氢表雄酮通过抑制血管细胞粘附分子1的表达发挥抗动脉粥样硬化的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (10): 835-840.
- [6] Rahman A, Anwar KN, Minhajuddin M, et al. cAMP targeting of p38 MAP kinase inhibits thrombin-induced NF- κ B activation and ICAM-1 expression in endothelial cells [J]. *Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, **287** (5): L1017-024.
- [7] Cline D, Pollak E, Buck C, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders [J]. *Blood*, 1998, **91**: 3527-531.
- [8] Wang Q, Pfeiffer GR 2nd, Gaarde WA. Activation of SRC tyrosine kinases in response to ICAM-1 ligation in pulmonary microvascular endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (48): 47731-743.
- [9] Woodside DG, Kram RM, Mitchell JS, et al. Contrasting roles for domain 4 of VCAM-1 in the regulation of cell adhesion and soluble VCAM-1 binding to integrin α 4 β 1 [J]. *J Immunol*, 2006, **176** (8): 5041-049.
- [10] Min JK, Kim YM, Kim SW, et al. TNF-Related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-Dependent NF- κ B activation in endothelial cells [J]. *J Immunol*, 2005, **175** (1): 531-540.
- [11] Muller MA, Randolph GJ. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: Molecules involved in the transmigration and fate of monocyte [J]. *J Leukoc Biol*, 1999, **66**: 698-704.

(此文编辑 文玉珊)