

通心络胶囊对同型半胱氨酸诱导的 血管内皮细胞损伤的保护作用

吴琳¹, 刘勇¹, 熊肇军¹, 周彬¹, 王敏¹, 刘定辉¹, 吴伟康², 钱孝贤^{1,2}, 陈燕铭^{3,4}, 吴以岭⁵

(中山大学附属第三医院 1. 心内科, 2. 中山大学中西医结合研究所, 3. 内分泌科, 4. 特诊中心, 广东省广州市 510630;
5. 河北省中西医结合医药研究院, 河北省石家庄市 050035)

[关键词] 通心络; 同型半胱氨酸; 内皮细胞; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

[摘要] 目的 探讨通心络对同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用及机制。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC), 分为对照组、同型半胱氨酸组、通心络组和阿托伐他汀组, 处理 48 h 后, 采用 MTT 法观察内皮细胞的增殖情况; 以荧光定量逆转录聚合酶链反应方法比较各组间超氧化物歧化酶(SOD) mRNA 表达水平; 检测细胞培养液的 SOD 活性和丙二醛含量。结果 Hcy 组细胞活力较对照组明显降低($P < 0.05$), 通心络组和阿托伐他汀组细胞活力较 Hcy 组均明显改善($P < 0.05$)。Hcy 组 SOD mRNA 表达水平显著低于对照组($P < 0.05$); 通心络和阿托伐他汀组 SOD mRNA 表达水平均显著高于 Hcy 组($P < 0.05$)。Hcy 组 SOD 活性较对照组显著下降($P < 0.05$), 丙二醛水平较对照组显著增加($P < 0.05$)。通心络组和阿托伐他汀组 SOD 活性均较 Hcy 组明显增加($P < 0.05$), 而丙二醛水平显著减少($P < 0.05$)。结论 通心络对同型半胱氨酸诱导的血管内皮细胞损伤有保护作用, 其机制可能与其抗氧化作用有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective Effects of Tongxinluo Capsule on Vascular Endothelial Cells Injured by Homocysteine

WU Lin¹, LIU Yong¹, XIONG Zhao-Jun, ZHOU Bin¹, WANG Min¹, LIU Ding-Hui, WU Wei-Kang², QIAN Xiao-Xian^{1,2}, CHEN Yan-Ming^{3,4}, and WU Yi-Ling⁵

(1. Department of Cardiology, 2. Institute Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of Sun Yat-sen University, 3. Department of Endocrinology, 4. Department of Advanced Medical Center, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangdong Guangzhou 510080, China; 5. The Integration of Traditional and Western Medical Research Academy of Hebei Province, Shijiazhuang 50035, China)

[KEY WORDS] Tongxinluo; Homocysteine; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Superoxide Dismutase; Malondialdehyde

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effects of Tongxinluo (TXL) on vascular endothelial cells injured by homocysteine and its mechanism. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cultivated in vitro were divided into four groups: control group, homocysteine group, TXL group and atorvastatin treatment group. The cell proliferation ability was determined by MTT assay. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect mRNA expression of superoxidase dismutase (SOD). The content of malondialdehyde (MDA) and SOD activity in HUVEC cellular supernatant were detected. **Results** Homocysteine significantly inhibited endothelial cell viability ($P < 0.05$). Tongxinluo and atorvastatin significantly improved endothelial cell viability reduced by homocysteine ($P < 0.05$). Homocysteine decreased the expression of SOD mRNA in HUVECs ($P < 0.01$). Tongxinluo

[收稿日期] 2011-01-24

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划项目(973 计划项目)(2005CB523305)资助;广东省自然科学基金(8151008901000209);广东省科技计划项目(2007B060401024)资助

[作者简介] 吴琳, 硕士, 医师, 主要研究方向为动脉粥样硬化的防治, E-mail 为 golinfish@163.com。刘勇, 博士研究生, 主治医师, 主要研究方向为动脉粥样硬化的防治, E-mail 为 lyong1968@163.com。通讯作者陈燕铭, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要研究方向为糖尿病及其血管并发症的防治, E-mail 为 yanmingch@qq.com。

and atorvastatin increased the expression of SOD mRNA compared with homocysteine group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the activity of SOD in Hcy group decreased significantly ($P < 0.05$) while the content of MDA increased dramatically. However, the activity of SOD in TXL group and atorvastatin group increased significantly compared with Hcy group ($P < 0.05$), at the same time, the concentration of MDA in TXL group and atorvastatin decreased ($P < 0.05$).

Conclusions TXL capsule can protect the HUVECS from injury by homocysteine. And it may take an important role in the antioxidant of TXL.

近年来研究发现同型半胱氨酸血症是动脉粥样硬化的一个独立危险因素,目前研究证明同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)能诱导内皮细胞凋亡,导致内皮细胞功能障碍^[1]。内皮细胞功能障碍是动脉粥样硬化的始动因素,因此保护血管内皮对于防治心脑血管疾病具有重要意义。通心络(TXL)是根据络病理论而研制的复方制剂,通心络胶囊是由人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍和冰片等中药组成的中成药^[2]。目前临床与动物研究表明,通心络具有抗炎、抗氧化、稳定斑块和调节血脂等功效,在心血管临床应用中具有显著作用^[3,4]。但是,通心络对Hcy损伤血管内皮的保护作用机制尚不完全清楚。本研究拟通过体外细胞培养的方法,探讨通心络对Hcy损伤的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的保护作用,了解通心络的抗氧化作用机制,为通心络临床心血管疾病的应用提供理论依据和实验基础。

1 材料和方法

1.1 试剂

通心络超微胶囊由石家庄以岭药业股份有限公司提供。M199培养基、0.05%胰酶、I型胶原酶购自Gibco。胎牛血清购自Hyclone。ECGS、Hcy购自Sigma。MTT粉购自Amersco。超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物医学工程所。PCR引物由上海生工生物工程公司合成。RT-PCR试剂盒、SYBR GREEN I realMaster-Mix购自TOYOBO公司。

1.2 通心络超微粉溶液的制备

通心络超微粉溶液的制备用M199培养液溶解通心络超微粉,配置为50 g/L原液,室温条件下,充分震荡30 min,超声溶解1 min,1 kr/min离心10 min,取上清用于细胞培养。

1.3 人脐静脉内皮细胞原代培养及鉴定

健康新生儿脐带取自中山大学附属第三医院妇产科;参考JAFEE A改良法,无菌收集新生儿脐带,PBS缓冲液反复冲洗静脉腔后灌注0.1%胶原酶消化30 min,含10%血清的M199培养基终止消化,消

化液1 kr/min离心5 min后加入培养液重悬细胞,计数细胞数量,于37℃,5% CO₂培养箱内培养。待细胞贴壁并85%融合后,用0.05%胰酶消化传代,培养条件同上。HUVEC经细胞形态学鉴定,流式细胞术CD34检测证实阳性,选择生长良好的第3~5代用于实验。

1.4 MTT法测定人脐静脉内皮细胞生长状态

HUVEC按每孔 1×10^4 接种于96孔板中,(1)Hcy对HUVEC的损伤作用:终浓度分别为0.1、0.2、0.4、0.6、0.8和1.0 mmol/L Hcy作用48 h后用MTT法测定细胞存活率。(2)通心络对HUVEC的保护作用:0.5 mmol/L Hcy + TXL 1、2、3、4、5、6、7和8 g/L,作用48 h后用MTT法测定细胞存活率。(3)阿托伐他汀(ATV)对HUVEC的保护作用:对照组(0.5 mmol/L Hcy),ATV分为0.1、1、10和100 μ mol/L,各组均加入0.5 mmol/L Hcy,作用48 h后用MTT法测定细胞存活率。每孔加入20 μ L MTT(5 g/L)孵育4 h后,弃上清,加入100 μ L DMSO,于脱色摇床充分振荡15 min,使结晶体充分溶解,采用酶标仪波长490 nm测定各孔光密度值(D)。HUVEC增殖率(%) = (实验组D值 - 对照组D值) / 对照组D值 $\times 100\%$ 。每组设5个复孔及空白对照,重复3次。

1.5 实时定量PCR

细胞同步化后,分为对照组(培养液不加干扰因素)、Hcy组(5 mol/L)、通心络组(Hcy 0.5 mol/L + TXL 5 g/L)和阿托伐他汀组(Hcy 0.5 mol/L + ATV 10 mmol/L),上述各组药物孵育48 h进行实时定量PCR。①总RNA的提取:用RNA提取试剂盒提取细胞总RNA。②互补DNA(cDNA)合成:5 μ g总RNA,2 μ L Oligo-dt,2 μ L dNTP混合物,补足RNase-free水至14 μ L,温和混匀,70℃预变性5 min后迅速冰上冷却2 min。加入5 μ L 5 $\times$ First strand Buffer,1 μ L TianScript M-MLV(200 U),总体积为25 μ L。25℃温浴10 min。42℃温浴50 min。95℃加热5 min终止反应。③SYBR Green RT-PCR(SYBR Green RT-PCR日本TOYOBO公司)1 μ L cDNA,上下游引物(10 μ mol/L)各0.4 μ L,蒸馏水8.2 μ L,

SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 μ L。反应体系 50 μ L。循环条件:95 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s $\times$ 40 循环, 在 ABI prism 7000 荧光定量 PCR 分析仪进行扩增及定量分析。本实验设定 β -actin 为管家基因。 β -actin 引物上游序列为 5'-AGCGGGAAATCGTGCCTGAC-3', 下游序列为 5'-TC-CATGCCCAGGAAGGAAGG-3'。SOD 引物上游序列为 5'-AGCCCGTGTGCGTGCTGAAG-3', 下游序列为 5'-CACCTTTGCCCAAGTCATCTGC-3'。④分析与统计, 反应结束后由计算机自动计算定量结果, 用 $\Delta\Delta C_t$ 方法进行计算和统计。

1.6 超氧化物歧化酶活性和丙二醛水平检测

细胞同步化后, 分为对照组(培养液不加干扰因素)、Hcy 组(5 mol/L)、通心络组(Hcy 0.5 mol/L + TXL 5 g/L)和阿托伐他汀组(Hcy 0.5 mol/L + ATV 10 mmol/L), 上述各组药物孵育 48 h 后, 提取实验组细胞培养液利用 SOD 和丙二醛试剂盒进行检测。SOD 测定用黄嘌呤氧化酶法按操作步骤进行, 于 550 nm 处分光光度计测定吸光度。丙二醛的测定用硫代巴比妥酸法按操作步骤进行, 于 532 nm 处分光光度计测定吸光度。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度通心络对人脐静脉内皮细胞增殖的影响

0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L 的 Hcy 处理 48 h 后, 可抑制细胞增殖, 呈剂量-效应关系($P < 0.05$, $n = 5$; 图 1), 选取病理生理浓度 Hcy 0.5 mmol/L 做为内皮细胞损伤模型浓度。HUVEC 的细胞活力比 Hcy 组明显增加($P < 0.05$, $n = 5$; 图 2), 并且在 5 g/L 时细胞活力达到最大($P < 0.01$, $n = 5$), 但随着浓度增加, HUVEC 增长能力并不随着增加。故本实验采用 5 g/L 通心络浓度作用 HUVEC。用不同浓度的阿托伐他汀及 0.5 mmol/L 的 Hcy 与 HUVEC 共孵育 48 h 后细胞活力与 Hcy 组相比, 随着阿托伐他汀浓度逐渐增大, 细胞活力逐渐增强, 其中 1 μ mol/L 和 10 μ mol/L 阿托伐他汀组的细胞活力比对照组明显增强($P < 0.05$, $n = 5$; 图 3)。

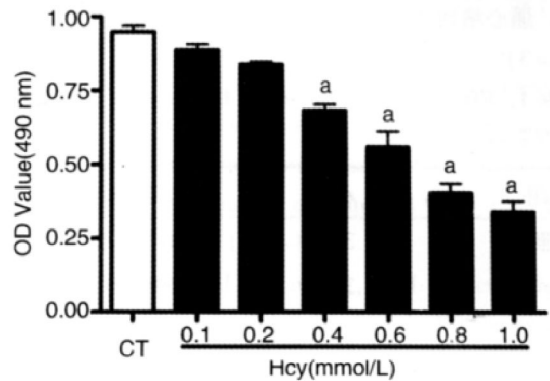


图 1. 同型半胱氨酸对内皮细胞活力的影响 a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 1. Effect of homocysteine on HUVEC viability

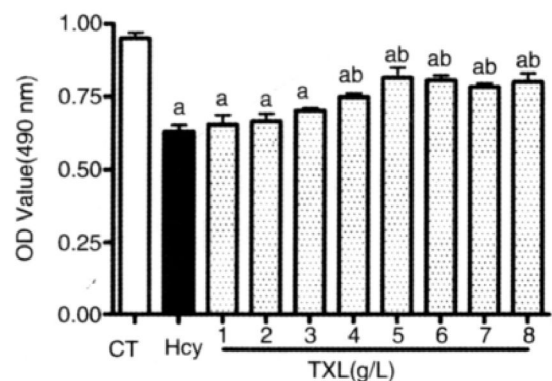


图 2. 通心络对内皮细胞活力的影响 a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 Hcy 组比较。

Figure 2. Effect of Tongxinluo on HUVEC viability

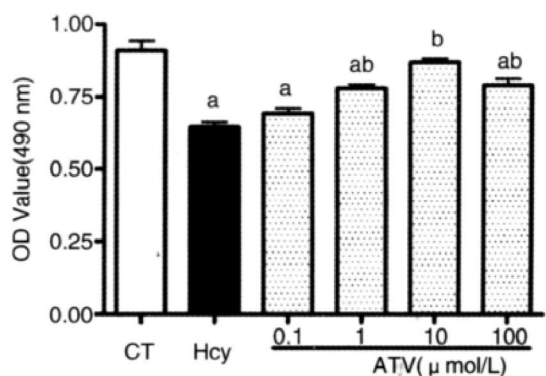


图 3. 阿托伐他汀对内皮细胞活力的影响 a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 Hcy 组比较。

Figure 3. Effect of atorvastatin on HUVEC viability

2.2 通心络对人脐静脉内皮细胞丙二醛水平的影响

与对照组比较, Hcy 组的丙二醛水平显著增加($P < 0.01$), 通心络组和阿托伐他汀组的丙二醛水平较 Hcy 组显著减少($P < 0.01$), 且对照组、通心络和阿托伐他汀组之间丙二醛水平差异无统计学意义($P > 0.05$; 表 1)。

表 1. 通心络对人脐静脉内皮细胞的丙二醛水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1. Effect of Tongxinluo on the level of MDA in HUVEC ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分 组	<i>n</i>	丙二醛 ($\mu\text{mol/L}$)
对照组	3	0.640 $\pm$ 0.027
Hcy 组	3	1.073 $\pm$ 0.005 ^a
通心络组	3	0.539 $\pm$ 0.008 ^b
阿托伐他汀组	3	0.427 $\pm$ 0.003 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 Hcy 组比较。

2.3 通心络对人脐静脉内皮细胞 SOD 活性及 SOD mRNA 表达水平的影响

Hcy 组细胞培养液的 SOD 活性及细胞内的 SOD mRNA 表达水平均显著低于对照组 ($P < 0.01$); 通心络组 SOD 活性及 SOD mRNA 表达水平较 Hcy 组明显提高 ($P < 0.01$), 且对照组、阿托伐他汀组之间的表达水平之间的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$; 表 2)。

表 2. 通心络对人脐静脉内皮细胞 SOD 活性及 SOD mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2. Effect of Tongxinluo on the SOD mRNA expression and SOD activity in HUVEC ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分 组	SOD (Ct)	β -actin (Ct)	SOD 2 ⁻ ($\Delta\Delta\text{Ct}$)	SOD (kU/L)
对照组	17.41 $\pm$ 0.04	14.87 $\pm$ 0.03	1.00	0.517 $\pm$ 0.028
Hcy 组	19.85 $\pm$ 0.24	15.30 $\pm$ 0.06	0.25 $\pm$ 0.03 ^a	0.382 $\pm$ 0.067 ^a
通心络组	18.37 $\pm$ 0.39	15.49 $\pm$ 0.16	0.84 $\pm$ 0.32 ^b	0.480 $\pm$ 0.021 ^b
阿托伐他汀组	18.47 $\pm$ 0.10	15.88 $\pm$ 0.32	0.99 $\pm$ 0.21 ^b	0.473 $\pm$ 0.032 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 Hcy 组比较。

3 讨 论

高同型半胱氨酸血症是动脉粥样硬化的独立危险因素之一^[5]。血管内皮细胞是 Hcy 的重要靶器官^[6,7]。血管内皮细胞除了屏障作用, 而且在维持血管稳态中起着重要作用, 包括调节血管张力, 调节凝血纤溶平衡, 参与炎症和免疫反应等。因此, 血管内皮功能障碍是动脉粥样硬化的始动因素。

本实验证实, Hcy 能抑制 HUVEC 的细胞活力, 并随着 Hcy 剂量加大, 抑制程度逐渐增强。加入通心络共孵育 HUVEC 后, 随着通心络的浓度增加, 细胞活力均逐渐增加, 说明通心络均可以抑制 Hcy 诱导的 HUVEC 的损伤作用, 从而改善细胞活力。

氧化应激是内皮功能障碍的主要病因, 也与 As 发生发展中多个环节如脂质过氧化、炎症反应等密切相关。过多的活性氧通过介导低密度脂蛋白氧化、促进细胞内转录因子活化并激活炎症相关基因的表达, 促使单核细胞趋化并释放炎性分子和细胞因子, 促进血管平滑肌增殖、移行, 从而改变内皮细胞的功能, 最终导致 As 形成。SOD 是超氧离子歧化的必要催化酶, 为体内重要的自由基清除剂, 能清除超氧阴离子自由基, 减轻氧化应激, 具有保护作用^[8]。SOD 的高低可以反应机体内抗自由基水平的高低。丙二醛的形成是自由基介导细胞膜损伤的主要环节, 丙二醛是脂质过氧化物产物, 其含量是衡量氧化应激对机体损伤程度的可靠指标。丙二醛能够明显引起心血管组织硬化并最终导致 As^[9]。

通心络胶囊运用了中医络病理论研制的复方中药制剂, 临床上治疗冠心病具有显著疗效^[2,4,12]。在动物实验中, 通心络明显降低高脂饮食兔的血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇和丙二醛水平, 提高 NO、SOD 水平, 从而达到保护血管内皮的作用^[13]。另外, 在体外细胞实验中发现, 通心络可以通过上调 NOS-NO 通路提高血管紧张素 II 诱导的内皮细胞活力及抗血栓能力, 达到改善内皮细胞功能的功效^[14]。目前多项研究证实: 阿托伐他汀具有一系列独立于降脂作用外的心血管保护作用, 通过保护血管内皮、抗炎、抗凝等^[15]途径逆转或延缓粥样硬化病变。阿托伐他汀改善动脉内皮功能的机制, 目前研究主要包括增加 NO 的生物活性、增加 Akt 磷酸化、降低表皮生长因子 (EGF) 表达、抑制内皮素生成、抗氧化等^[16,17]。故本实验选取阿托伐他汀为阳性对照药物。

本实验发现, Hcy 明显抑制细胞 SOD mRNA 表达, 抑制细胞培养液 SOD 活性, 使丙二醛生成增加, 提示 Hcy 能诱导细胞氧化应激, 导致内皮细胞脂质过氧化增加, 进一步损伤内皮细胞, 与 Tanriverdi 等^[18]结果相似。当通心络与 Hcy 共孵育 HUVEC 后, Hcy 诱导的 HUVEC 氧化应激程度明显减弱, SOD mRNA 表达增加, 细胞培养液 SOD 活性升高, 丙二醛生成减少, 与阳性对照药阿托伐他汀的效果相似, 两组差别无统计学意义。该结果说明通心络通过提高 SOD 的表达、提高 SOD 活性、降低丙二醛水平, 提高细胞抗氧化应激损伤的能力, 减轻细胞膜脂质过氧化损伤, 从而保护内皮细胞。

本研究是在细胞水平上, 观察同型半胱氨酸对内皮细胞的细胞活力及氧化应激的作用, 结果发现通心络对同型半胱氨酸损伤的内皮细胞有保护作用。

用,其机制可能与通心络抗氧化应激作用有关。但是,通心络究竟通过哪些信号通路起抗氧化应激的作用有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Jin L, Caldwell RB, Li-Masters T, et al. Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine transport [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2007, 58 (2): 191-206.
- [2] 何穗智, 吴伟康, 邓卓桑, 等. 通心络胶囊治疗冠心病随机对照试验的系统评价 [J]. *中山大学学报医学科学版*, 2007, 28 (5): 573-577
- [3] Zhang L, Liu Y, Lu XT, et al. Traditional Chinese medication Tongxinluo dose-dependently enhances stability of vulnerable plaques: a comparison with a high-dose simvastatin therapy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297 (6): H2 004-014.
- [4] Zhang HT, Jia ZH, Zhang J, et al. No-reflow protection and long-term efficacy for acute myocardial infarction with Tongxinluo: a randomized double-blind placebo-controlled multicenter clinical trial (ENLEAT Trial) [J]. *Chin Med J*, 2010, 123 (20): 2 858-864.
- [5] Das RR, Seshadri S, Beiser AS, et al. Prevalence and correlates of silent cerebral infarcts in the Framingham offspring study [J]. *Stroke*, 2008, 39 (11): 2 919 -920.
- [6] Erol A, Cinar MG, Can C, et al. Effect of homocysteine on nitric oxide production in coronary microvascular endothelial cells [J]. *Endothelium*, 2007, 14 (3): 157 -161.
- [7] Zhou W, Chai H, Courson A, et al. A attenuates homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries [J]. *J Vasc Surg*, 2006, 44 (4): 853-862.
- [8] Chu Y, Piper R, Richardson S, et al. Endocytosis of extracellular superoxide dismutase into endothelial cells: role of the heparin-binding domain [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26 (9): 1 985-990.
- [9] Belardinelli R, Solenghi M, Volpe L, et al. Trimetazidine improves endothelial dysfunction in chronic heart failure: an antioxidant effect [J]. *Eur Heart J*, 2007, 28 (9): 1 102 -108.
- [10] Won D, Zhu SN, Chen M, et al. Relative reduction of endothelial nitric-oxide synthase expression and transcription in atherosclerosis-prone regions of the mouse aorta and in an in vitro model of disturbed flow [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171: 1 691-704.
- [11] Meye C, Schumann J, Wagner A, et al. Effects of homocysteine on the levels of caveolin-1 and eNOS in caveolae of human coronary artery endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 190 (2): 256-263.
- [12] 黄建君, 何 婕. 刺五加和通心络治疗冠心病心绞痛的疗效比较 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13 (3): 372-373.
- [13] 吴以岭, 袁国强, 游佳华, 等. 通心络超微粉对高脂饮食兔主动脉内皮保护机制的实验研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23 (4): 620-633
- [14] 马琦琳, 孙 明, 杨天嵩, 等. 通心络对血管紧张素 II 诱导的血管内皮细胞活力及组织因子的影响 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2007, 32 (3): 485-490
- [15] Davidson MH. Clinical significance of statin pleiotropic effects: hypotheses versus evidence [J]. *Circulation*, 2005, 111 (18): 2 280-281.
- [16] Wenzel P, Daiber A, Oelze M, et al. Mechanisms underlying recoupling of eNOS by HMG-CoA reductase inhibition in a rat model of streptozotocin-induced diabetes mellitus [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 198 (1): 65-76.
- [17] Boodhwani M, Nakai Y, Voisine P, et al. High-dose atorvastatin improves hypercholesterolemic coronary endothelial dysfunction without improving the angiogenic response [J]. *Circulation*, 2006, 114 (1 Suppl): 1 402-408.
- [18] Tanriverdi H, Evrengul H, Enli Y, et al. Effect of homocysteine-induced oxidative stress on endothelial function in coronary slow-flow [J]. *Cardiology*, 2007, 107 (4): 313-320

(此文编辑 李玲玲)