

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2011)19-06-0474-05

钩藤总生物碱对 D-半乳糖诱导的内皮细胞衰老的干预

姜月华¹, 李运伦¹, 赵婧², 霍青¹

(1 山东中医药大学附属医院, 山东省济南市 250011; 2 山东中医药大学, 山东省济南市 250355)

[关键词] 血管内皮细胞; 细胞衰老; D-半乳糖; β -半乳糖苷酶; 端粒酶

[摘要] 目的 探讨钩藤总生物碱保护血管内皮细胞、抑制血管内皮细胞衰老的作用。方法 采用 D-半乳糖诱导的大鼠主动脉内皮细胞建立衰老模型, 扫描电镜技术观察衰老血管内皮细胞的形态, β -半乳糖苷酶染色法测定衰老血管内皮细胞发生率以间接反映 β -半乳糖苷酶表达, PCR-ELISA 法测定衰老血管内皮细胞端粒酶活性。结果 钩藤总生物碱可以改善血管内皮细胞形态、降低内皮细胞中 β -半乳糖苷酶表达和端粒酶活性相对表达量 ($P < 0.05$)。结论 钩藤总生物碱具有抑制内皮细胞衰老、保护血管内皮的效用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Uncaria Alkaloids' Intervention on the Aged Endothelial Cell Induced by D-Galactose

JIANG Yue-Hua¹, LI Yun-Lun¹, ZHAO Jing², and HUO Qing¹

(1 Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250011; 2 Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250355, China)

[KEY WORDS] Rat Aortic Endothelial Cells Cell Senescence D-Galactose β -Galactosidase Telomerase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Uncaria alkaloids on protecting rat vascular endothelial cells and inhibiting cell senescence. **Methods** Aging model of rat aortic endothelial cells (REAC) was established by D-galactose. Treated with Uncaria alkaloids and Captopril separately, then the aging vascular endothelial cell morphology were observed by scanning electron microscopy, vascular endothelial cell senescence rate was determined by β -galactosidase staining method, and telomerase activity was determined by PCR-ELISA method. **Results** REAC cell morphology treated with Uncaria alkaloids or captopril was significantly improved, β -galactosidase expression and telomerase activity were significantly decreased ($P < 0.05$). The effects of each dose group of Uncaria alkaloids were medium dose > low dose > high dose, suggesting that high dose of Uncaria alkaloids (> 400 mg/L) may have a certain degree of cytotoxicity, and the best dose of Uncaria alkaloids dose was 200 mg/L. **Conclusion** Uncaria alkaloids can inhibit rat aortic endothelial cell senescence, and protect vascular endothelium.

血管内皮细胞功能障碍是高血压病的重要病理变化,也是高血压血管损害的始发因素。寻找既可降压又能保护血管内皮细胞的药物,是预防高血压病损害的重要策略。钩藤总生物碱是从中药材钩藤中分离、提纯的生物碱,前期研究表明具有降血压、血管保护等药理效应^[1],但钩藤总生物碱能否抑制高血压状态时血管内皮细胞衰老及作用机制尚不清楚。本研究在体外以 D-半乳糖^[2,3]为诱导剂建立了大鼠胸主动脉内皮细胞 (RAEC) 衰老模型,观察钩

藤总生物碱对 RAEC 形态以及细胞衰老标志物如 β -半乳糖苷酶以及内皮端粒酶的影响,探讨其可能存在的保护血管内皮细胞的机制,从而为钩藤总生物碱的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

1 周龄以内的雄性 SD 大鼠 20 只,购自山东中

[收稿日期] 2010-12-01

[基金项目] 山东省教育厅资助课题 (J05L05)、山东省泰山学者建设工程专项资助

[作者简介] 姜月华, 硕士, 主管技师, 研究方向为分子生物学, Email 为 jiang_yuehua@hotmail.com。通讯作者李运伦, 博士, 教授, 研究方向为心血管内科学, Email 为 liyunlun@yahoo.com.cn。

医药大学实验动物中心。

1.2 实验药品

钩藤碱、异钩藤碱和钩藤总生物碱由山东中医药大学药学院周洪雷教授惠赠;卡托普利为济南永宁制药有限公司产品(国药准字 H37022533,生产批号 090401),实验前先经 DMSO 溶解后,用 DMEM-F12 培养基稀释、过滤除菌,4℃冰箱保存备用。

1.3 主要试剂

DMEM-F12 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)购自四季青生物工程公司;二甲基亚砷(DMSO)、明胶(Gelatin)和 D-半乳糖(D-gal)购自北京索莱宝科技有限公司;鼠抗人血管性假血友病因子(von Willebrand factor, vWF)单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 二抗及 DAB 显色试剂盒购自北京中山公司;细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒购自碧云天生物技术研究所;PCR-ELISA 端粒酶活性试剂盒购自 Roche(德国宝灵曼公司,货号 11854666910)。其余试剂均为国产分析纯。

1.4 RAEC 的分离培养与鉴定

采用组织贴块法培养大鼠胸主动脉内皮细胞(RAEC)。无菌状态下逐层剪开胸腔,分离大鼠胸主动脉降支,剔除血管外附着的脂肪和结缔组织,用眼科剪剪成约 1 mm 左右的血管环,将其立置于用 0.2% 明胶预处理的细胞培养瓶瓶底,种植密度约为 1 块/cm²,置于 CO₂ 培养箱中干贴壁 2 h,然后加入含 20% FBS 的 DMEM-F12 培养基 3 mL,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。72 h 后去除组织块并换液。长至细胞汇合成单层时以 0.25% 胰蛋白酶消化法传代,选第 4~8 代内皮细胞用于实验。选取第 2 代细胞做 vWF 免疫组织化学染色进行细胞鉴定。

1.5 细胞衰老模型的复制

将原代分离的 RAEC 传代,细胞贴壁后改换含 10 g/L D-gal 的 DMEM 培养液培养。细胞长成单层后,继续用含 D-gal 的培养液传代 3 次,培养 7 天后终止培养,即为 D-gal 诱导的 RAEC 衰老模型。

1.6 分组与给药

经 24 h 无血清培养基预处理后,随机分为 7 组:正常对照组(不加特殊处理因素)、溶媒对照组(1% DMSO/DMEM-F12)、衰老模型组(10 g/L D-gal/DMEM-F12)、阳性对照组(10 g/L D-gal+400 mg/L 卡托普利)及钩藤总生物碱低剂量组(10 g/L D-gal+100 mg/L 钩藤总生物碱)、中剂量组(10 g/L D-gal+200 mg/L 钩藤总生物碱)和高剂量组(10 g/L D-gal+400 mg/L 钩藤总生物碱)。继续培养

48 h 进行实验检测。

1.7 RAEC 形态学观察

细胞爬片,同上培养和分组干预后,采用扫描电镜技术观察细胞形态。2.5% 戊二醛固定 24 h,经 0.1 mol/L 磷酸缓冲液清洗 2 h 以上,中间换 2~3 次新液;用 1% 锇酸固定 1~1.5 h 用双蒸水清洗 2 h,中间换 2~3 次新液;梯度酒精脱水(50%、70%、80%、90%、100% 两次),每级 20 min;醋酸异戊酯置换;常规临界点干燥;粘托后用 IB-5 离子溅射仪镀铂;扫描电镜观察。

1.8 β -半乳糖苷酶测定

同上培养和分组干预后,按照 β -半乳糖苷酶染色试剂盒说明书进行试剂配制及操作。细胞爬片经 1 mL 固定液室温固定 15 min, PBS 洗 3 min \times 3 次;加入 1 mL 染色工作液;37℃ 湿盒孵育过夜,在光学显微镜下即可观察到有蓝色表达的细胞即为衰老细胞。计数 10~20 个视野,约 1000 个细胞,衰老细胞率(%) = 衰老细胞数/总细胞数 \times 100%。

1.9 端粒酶活性测定

同上培养和分组干预后,按 PCR-ELISA 端粒酶活性检测试剂盒说明书进行操作,酶标仪 450 nm(参考波长 690 nm)处检测吸光度,重复 4 次,取其平均值。

1.10 统计学处理方法

数据统计采用 SPSS 17.0 版统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAEC 的培养与鉴定

原代 RAEC 培养 2~3 天即可由组织块边缘游离出,并逐渐向外延伸,呈扁平梭形或多角形;细胞生长融合形成单层及传代后,呈现内皮细胞典型的鹅卵石或铺路石镶嵌状排列生长;经 vWF 免疫组织化学染色鉴定,所培养细胞的胞质内呈现棕色,95% 以上的细胞均为 RAEC(图 1)。

2.2 钩藤总生物碱对衰老 RAEC 形态学的影响

正常对照组 RAEC 呈圆形或梭形、多角形,表面微绒毛丰富,排列规则,细胞膜完整,细胞间隙较小,细胞连接可见。与正常对照组相比,衰老模型组细胞体积变大,形态不如前者规则,表面微绒毛僵直断裂,分布不规则,减少甚至消失,细胞膜不如前者完整,细胞间隙增大,细胞明显肿胀,细胞连接断裂甚至消失。与衰老模型组比较,各药物干预组的

RAEC形态结构如细胞形态、大小及微绒毛数量、分布均有明显改善。其中阳性对照组效果最为明显,其余依次为钩藤总生物碱中剂量组和低剂量组。钩

藤总生物碱高剂量组细胞形态与衰老模型组无明显差异。说明 200 mg/L 是钩藤总生物碱发挥抗 RAEC 衰老作用的最适浓度(图 2)。



图 1. RAEC 的培养与鉴定 从左至右依次为原代 RAEC、第三代 RAEC(×100)和 RAEC 的 vWF 免疫组织化学染色(×400)。

Figure 1. Culture and vWF immunohistochemical identification of RAEC

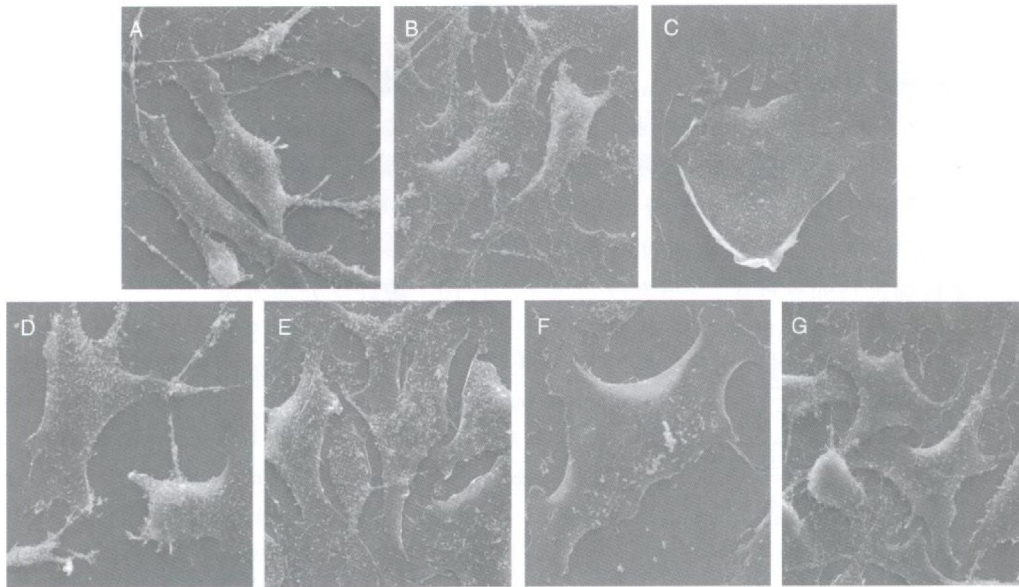


图 2. RAEC 的超微结构(×2000) A 为正常对照组,B 为溶媒对照组,C 为衰老模型组,D 为钩藤总生物碱低剂量组,E 为钩藤总生物碱中剂量组,F 为钩藤总生物碱高剂量组,G 为阳性对照组。

Figure 2. Ultrastructure of RAEC

2.3 钩藤总生物碱对衰老的 RAEC β半乳糖苷酶表达的影响

与正常对照组相比,溶媒对照组细胞衰老率差异无统计学意义($P > 0.05$),说明 DMSO 作为溶媒对实验结果无明显影响;衰老模型组细胞衰老率显著增加($P < 0.05$),说明 D-gal成功诱导了 RAEC 的衰老;各药物干预后,均表现有抑制内皮细胞衰老、降低衰老细胞率的作用,钩藤总生物碱的作用效果为中剂量组 > 低剂量组 > 高剂量组;阳性对照组与钩藤总生物碱低、中剂量组作用相当,差异无统计学

意义($P > 0.05$ 表 1和图 3)。

2.4 钩藤总生物碱对衰老 RAEC 端粒酶活性的影响

溶媒对照组的端粒酶活性与正常对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),表明 DMSO 溶媒对实验结果无影响;衰老模型组细胞端粒酶活性显著增加($P < 0.05$),说明 D-gal诱导 RAEC 衰老成功;各药物组(除钩藤总生物碱高剂量组外)端粒酶活性表达与衰老模型组比均显著降低($P < 0.05$),以阳性对照组为最佳,钩藤总生物碱组以中剂量组为最

佳,高剂量组最差,说明钩藤总生物碱在高剂量用药时,可能存在一定程度上的细胞毒性作用(表 2)。

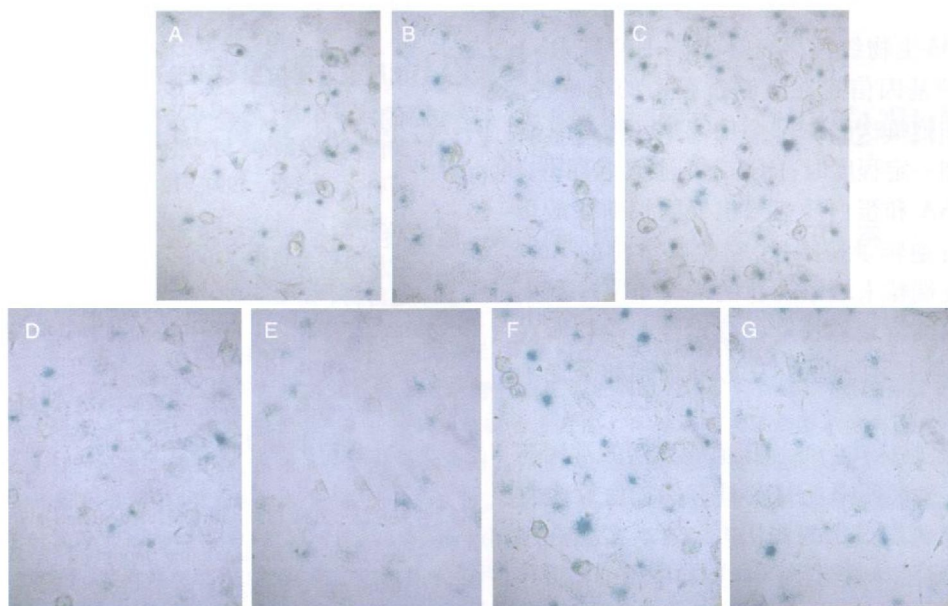


图 3. RAEC 的 β -半乳糖苷酶染色 ($\times 400$) A 为正常对照组, B 为溶媒对照组, C 为衰老模型组, D 为钩藤总生物碱低剂量组, E 为钩藤总生物碱中剂量组, F 为钩藤总生物碱高剂量组, G 为阳性对照组。

Figure 3. β -galactosidase staining of RAEC

表 1. 各组细胞衰老率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The rate of aging cells in every group

分 组	n	衰老细胞率
正常对照组	7	44.23% \pm 5.5060%
溶媒对照组	7	44.03% \pm 1.3250%
衰老模型组	7	58.49% \pm 0.8707% ^a
钩藤总生物碱低剂量组	7	27.54% \pm 0.83% ^b
钩藤总生物碱中剂量组	7	23.61% \pm 2.07% ^{bc}
钩藤总生物碱高剂量组	7	31.66% \pm 2.36% ^b
阳性对照组	7	26.14% \pm 2.13% ^b

a为 $P < 0.05$ 与正常对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与衰老模型组比较; c为 $P < 0.05$ 与钩藤总生物碱高剂量组比较。

表 2. 各组细胞端粒酶活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Telomerase activity in every group

分 组	n	端粒酶活性
正常对照组	4	1.3075 \pm 0.0096
溶媒对照组	4	1.3625 \pm 0.0206
衰老模型组	4	1.5200 \pm 0.0245 ^a
钩藤总生物碱低剂量组	4	1.2480 \pm 0.0173 ^b
钩藤总生物碱中剂量组	4	1.1175 \pm 0.0903 ^{bc}
钩藤总生物碱高剂量组	4	1.4625 \pm 0.0275
阳性对照组	4	0.7025 \pm 0.1272 ^{bc}

a为 $P < 0.05$ 与正常对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与衰老模型组比较; c为 $P < 0.05$ 与钩藤总生物碱高剂量组比较。

3 讨 论

血管内皮细胞结构和功能的完整性对于维持心血管系统的正常功能至关重要^[4]。由于内皮细胞的衰老导致血管内皮的功能逐渐退化^[5],是高血压发生的重要因素,且血压升高对血管壁的剪切力增加,又进一步加剧了血管内皮的损伤,使内皮依赖性血管舒缩功能降低^[6],从而更加剧了血压的升高。D-gal作为一种致老剂,能诱导细胞及整体动物衰老,其具体机制尚未完全明了^[2,7]。本文用 D-gal诱导 RAEC 连续传代 3

次及培养 7 天后,成功建立了 RAEC 的衰老模型。扫描电镜下,衰老 RAEC 细胞形态退化,表现出细胞形态不规则、细胞膜不完整、细胞扁平胀大、表面微绒毛僵直断裂、细胞间隙增大等,呈明显的复制性衰老的特征。

β -半乳糖苷酶是一种常用的报告基因分子,是近年公认的细胞衰老的生物学标志物之一。衰老细胞在酸性条件 (pH 6.0) 下,细胞内源性 β -半乳糖苷酶活性增加。本实验采用的试剂盒以 X-Gal 为底物,通过原位染色,在衰老特异性 β -半乳糖苷酶 (血清饥饿引发的生长抑制并不能提高 β -半乳糖苷酶

的活性^[8])催化下表达深蓝色产物,即为衰老细胞^[9]。

端粒是真核生物线性染色体末端的特殊 DNA 序列,用以维护基因信息在复制过程中的准确性。正常情况下,细胞每次分裂都会使端粒变得越来越短,当端粒短到一定程度时,即进入细胞衰老期^[10]。端粒酶是由 RNA 和蛋白质亚基组成的核糖核酸蛋白复合物,具有逆转录酶活性,它能以自身的 RNA 组分为模板,在端粒末端添加新的端粒重复序列而使端粒延长,以维持端粒长度的稳定性。端粒酶在多数正常体细胞中呈阴性,而在肿瘤细胞和衰老细胞中表达活跃^[11]。

卡托普利是临床防治高血压血管重塑的常用药物,也有体外实验表明卡托普利具有保护血管内皮细胞、抑制血管内皮损伤的作用^[12],故本实验选用卡托普利作为阳性对照药物。本实验中 D-gal 诱导的衰老模型组 RAEC 细胞 β -半乳糖苷酶和端粒酶活性显著增加 ($P < 0.05$),与衰老细胞的特性一致。经钩藤总生物碱或卡托普利干预处理后的 RAEC 细胞形态明显改善, β -半乳糖苷酶表达和端粒酶活性明显降低 ($P < 0.05$),显示了卡托普利对 β -半乳糖苷酶和端粒酶活性具有明显抑制作用,钩藤总生物碱中剂量组药效与阳性对照药卡托普利药效接近,提示钩藤总生物碱既具有强大的抑制内皮细胞衰老、保护血管内皮的效用,又可以发挥其作为中药长效固本的功效。钩藤总生物碱各剂量组的作用效果为:中剂量组 > 低剂量组 > 高剂量组,提示钩藤总生物碱在高剂量用药 (> 400 mg/L)时效果不佳,可能存在一定程度上的细胞毒性作用。经量效观察,发现钩藤总生物碱的最佳作用剂量为 200 mg/L。

[参考文献]

[1] 孙敬昌,周洪雷,齐冬梅,等. 钩藤碱和异钩藤碱对自

发性高血压大鼠动脉形态学及血管紧张素 ① 的影响 [J]. 山东中医药大学学报, 2011; (4).

- [2] 崔旭,李文彬,张炳烈,等. D-gal对神经元和成纤维细胞拟老化作用的实验研究 [J]. 中国应用生理学杂志, 1997, 13(2): 31-38
- [3] 龚国清,徐馥本. 小鼠模型衰老模型的研究 [J]. 中国药科大学学报, 1991, 12(2): 101-110
- [4] 马礼坤,顾统元. 内皮功能异常与冠状动脉疾病 [J]. 心血管病学进展, 2000, 5: 10-13
- [5] 赵海梅,杨彬,成蓓. 血管内皮细胞衰老与细胞生物学特征变化 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2007, 36(2): 191-198
- [6] 陶军,靳亚非,王礼春,等. 年龄对血管弹性和内皮细胞功能的影响 [J]. 中华心血管病杂志, 2003, 4: 250-253
- [7] Sing X, Bao MM, Li YM. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model [J]. Mech Aging Dev, 1999, 108: 239-251.
- [8] Pendergrass WR, Lane MA, Bodkin NL, et al Cellular proliferation potential during aging and caloric restriction in rhesus monkeys [J]. J Cell Physiol, 1999, 180: 123-130
- [9] 单海燕,白小涓,刘强,等. 血管紧张素 ① 诱导血管内皮细胞衰老的形态学研究 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(3): 161-164
- [10] Weinrieb SL, Pruzan R, Ma L, et al Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit RNA [J]. Nat Genet, 1997, 17(4): 498
- [11] Lorel MC, Roger RR. Telomerase maintenance mechanisms and cellular immortalization [J]. Curr Opin Genet Dev, 1999, 9: 97
- [12] 徐慧,郑杨,佟倩. 卡托普利晚期预处理对人内皮细胞缺氧复氧损伤时内皮素 1 和一氧化氮合成酶表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(2): 155-158

(此文编辑 许雪梅)