

[文章编号] 1007-3949(2011)19-12-1005-03

• 实验研究 •

丹参酮 II A 对糖尿病大鼠主动脉内皮细胞非对称性 二甲基精氨酸和一氧化氮的影响

符杰, 林梅, 李文华, 廖丽娅

(华中科技大学同济医学院附属普爱医院, 湖北省武汉市 430033)

[关键词] 丹参酮 II A; 内皮细胞; 血管内皮生长因子; 一氧化氮

[摘要] 目的 观察丹参酮 II A 对糖尿病大鼠主动脉内皮细胞非对称性二甲基精氨酸和一氧化氮的影响。方法 制备 2 型糖尿病大鼠模型, 组织块法原代培养大鼠主动脉内皮细胞, 丹参酮 II A 0、25、50 mg/L 干预细胞 6 h、12 h 和 24 h, 采用 ELISA 检测细胞培养基非对称性二甲基精氨酸含量, 硝酸还原酶法检测一氧化氮含量。结果 丹参酮 II A 抑制内皮细胞分泌非对称性二甲基精氨酸的作用呈剂量、时间依赖性 ($P < 0.05$)。随浓度增高, 其促进一氧化氮分泌的作用增强, 于 12 h 时促进作用达高峰 ($P < 0.05$)。结论 丹参酮 II A 能降低糖尿病大鼠主动脉内皮细胞分泌非对称性二甲基精氨酸, 同时促进一氧化氮的合成。

[中图分类号] R362

[文献标识码] A

The Effect of Tanshinone II A on Asymmetry Dimethyl Arginine and Nitric Oxide in Aortic Endothelial Cells of Diabetic Rats

FU Jie, LIN Mei, LI Wen-Hua, and LIAO Li-Ya

(Puai Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430033 China)

[KEY WORDS] Tanshinone II A; Endothelial Cells; Vascular Endothelial Growth Factor; Nitric Oxide

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of tanshinone II A on asymmetry dimethyl arginine and NO in aortic endothelial cells of diabetic rats. **Methods** The diabetic model rats was induced and its aortic endothelial cells were primary cultured by tissue patch and intervened with 0, 25, 50 mg/L Tanshinone II A sulfonate for 6 h, 12 h and 24 h. The contents of asymmetry dimethyl arginine and NO in cell culture were determined by ELISA method and nitrate reductase method, respectively. **Results** The inhibiting effect of Tanshinone II A sulfonate on asymmetry dimethyl arginine was in a dose- and time-dependent manner. The difference between each group had statistical significance ($P < 0.05$). The promoting effect of secretion of NO was parallel to the increase of concentration, and it reached the peak in 12 h ($P < 0.05$). **Conclusion** Tanshinone II A can decrease the secretion of asymmetry dimethyl arginine in aortic endothelial cells and promote the synthesis of NO.

血管内皮损伤是糖尿病患者动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的始动环节, 在胰岛素抵抗的早期阶段即已发生^[1]。一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是血管内皮细胞分泌的一种舒血管物质, 其代谢异常在 As 的形成和发展中发挥重要的作用。非对称性二甲基精氨酸 (asymmetric dimethyl arginine, ADMA) 是内源性一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 抑制剂, 竞争性抑制 NO 合成。本研究观察丹参酮

II A (Tanshinone II A, TSN) 对糖尿病大鼠主动脉内皮细胞 ADMA 和 NO 的影响, 为探讨丹参对糖尿病 As 患者的防治作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 2 型糖尿病模型的制备

SD 雄性大鼠 10 只, 清洁级, 8 周龄, 体重 $180 \pm$

[收稿日期] 2011-06-11

[作者简介] 符杰, 住院医师, 主要从事内分泌科疾病的研究, E-mail 为 post.yf@126.com。林梅, 博士, 副主任医师, 主要从事内分泌科疾病的研究。李文华, 主治医师, 主要从事内分泌科疾病的研究。

20 g, 购自华中科技大学同济医学院实验动物中心, 动物许可证号: SYXK(鄂)2008-0005。给予高脂、高糖饲料(含蔗糖 5%、炼猪油 25%、奶粉 5%) 4 周。禁食 12 h, 腹腔一次性注射链脲佐菌素 30 mg/kg, 4 周后测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)为 10.5 ~ 15.3 mmol/L, 平均为 12.3 ± 3.7 mmol/L, 空腹血浆胰岛素(fasting insulin, FINS)为 1.04 ~ 1.48 μg/L, 平均为 1.25 ± 0.23 μg/L, 并做葡萄糖耐量实验, 计算胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI) = 1/(FINS × FBG)。FBG ≥ 7.8 mmol/L 或葡萄糖负荷后 2 h 血糖 ≥ 11.1 mmol/L 伴 ISI 较正常组明显下降者为造模成功。

1.2 细胞培养及鉴定

将造模成功 SD 大鼠处死, 取胸主动脉降支, 放入含无菌 D-Hanks 液的培养皿, 去除外周结缔组织及脂肪, 翻出主动脉内膜; 在酒精灯上烧热镊子, 动脉两端经烫烙后置于覆盖鼠尾胶的 50 mL 培养瓶中, 加入含有 20% 小牛血清的 DMEM/F12 培养液。置入 37°C、5% CO₂ 恒温培养箱。6 h 后弃主动脉并换液。培养 12 ~ 14 天, 待细胞达 80% 融合时用胰酶差速消化法传代。第 1 代细胞以羊抗大鼠 VIII 因子抗体, 以及 FITC 偶联的兔抗羊 IgG 抗体用免疫荧光检测方法进行内皮细胞鉴定。鉴定为内皮细胞后, 继续细胞培养, 制备细胞悬液, 以 2 × 10⁷ 个/L 的密度接种于 6 孔细胞培养板, 细胞随机分为: 丹参酮 II A 0、25 及 50 mg/L 组, 每组进一步分为干预 6 h、12 h 和 24 h 组, 共计 9 组。

1.3 指标检测

分别收集细胞上清液测定 ADMA 和 NO。采用高效液相色谱法检测 ADMA: 细胞上清液 0.5 mL 加 5-磺基水杨酸沉淀蛋白。取 10 μL 细胞上清液加入 100 μL 衍生试剂混匀, 室温下 3 min 后进样, 用线性

梯度洗脱方式将样品从色谱柱中洗脱。预柱处理后, 用荧光检测器对其及内标 ADMA 进行检测, 激发波长 338 nm, 吸收波长 425 nm。采用硝酸还原酶法测定细胞上清液中 NO 含量。

1.4 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析和 NKS-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠主动脉内皮细胞的鉴定

可见多数细胞有一个核, 细胞呈三角形、多角形, 相互连接, 呈典型铺路石样分布。内皮细胞呈单层生长, 细胞呈多角形, 边界清楚(图 1)。

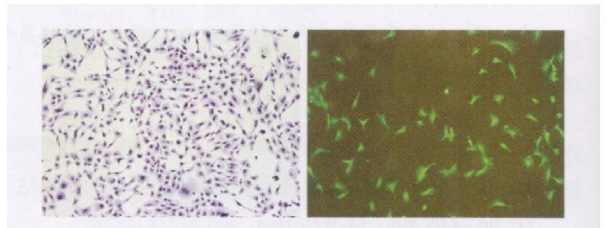


图 1. 大鼠主动脉内皮细胞的鉴定 左图为吉姆萨染色(×100), 右图为免疫荧光染色(×200)

Figure 1. The rat aortic endothelial cells identification

2.2 丹参酮 II A 对糖尿病大鼠主动脉内皮细胞非对称性二甲基精氨酸和一氧化氮的影响

25 mg/L 和 50 mg/L 组内皮细胞分泌 ADMA 均明显低于对照组(0 mg/L 组); 50 mg/L 组 ADMA 低于 25 mg/L 组; 随干预时间延长, 丹参酮 II A 对 ADMA 的抑制作用愈加明显。丹参酮 II A 增加内皮细胞分泌 NO, 呈浓度依赖性; 干预 12 h, NO 分泌达高峰(表 1)。

表 1. 丹参酮 II A 对糖尿病大鼠主动脉内皮细胞非对称性二甲基精氨酸和一氧化氮的影响

Table 1. The effect of tanshinone II A on ADMA and NO of aortic endothelial cells in diabetic rats

丹参酮 II A (mg/L)	ADMA (μmol/L)			NO (μmol/L)		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
0	1.64 ± 0.03	1.66 ± 0.04	1.65 ± 0.04	41.03 ± 2.35	41.17 ± 2.06	41.24 ± 3.13
25	1.44 ± 0.02 ^a	1.33 ± 0.02 ^{ac}	1.14 ± 0.02 ^{ac}	49.72 ± 2.47 ^a	65.25 ± 3.44 ^a	65.38 ± 3.35 ^a
50	1.27 ± 0.01 ^{abcd}	1.01 ± 0.02 ^{abc}	0.86 ± 0.01 ^{abcd}	58.35 ± 3.01 ^{ab}	87.56 ± 3.13 ^{abc}	87.54 ± 3.72 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$, 与 0 mg/L 组比较, b 为 $P < 0.05$, 与 25 mg/L 组比较, c 为 $P < 0.05$, 与同浓度 6 h 组比较, d 为 $P < 0.05$, 与同浓度 12 h 组比较。

3 讨 论

血管内皮的功能障碍是 As 的病理基础,以内皮细胞所分泌的 NO 减少及氧自由基生成增加而致血管舒张反应下降为主要特征。近来研究表明,糖尿病患者的机体抗氧化防御能力降低,活性氧生成增多^[2]。氧化应激促进 eNOS 降解,NO 释放减少限制血管舒张,活性氧增多损伤内皮细胞而加重 As。ADMA 是内源性 NOS 抑制剂,能够抑制 NO 的产生而引起血管收缩。已有研究表明,ADMA 与高血压、糖尿病等危险因素引起的 As 密切相关^[3]。

丹参酮 II A 是中药丹参根的超临界(二氧化碳)提取物,是丹参的脂溶性成分,具有广泛而复杂的药理作用,除能改善缺血再灌注损伤、参与免疫调节及抗感染外^[4,5],还具有扩张血管、改善微循环、抗氧化损伤、防止内皮细胞凋亡等作用^[6,7]。已有研究报道,丹参酮 II A 有较强的抗氧化作用,它能够清除 O^{2-} 、提高 SOD 的活性、上调 eNOS 表达^[8]。本研究观察了丹参酮 II A 对糖尿病大鼠主动脉内皮细胞 ADMA 和 NO 的影响,结果显示丹参酮 II A 抑制内皮细胞分泌 ADMA 的作用呈剂量、时间依赖性,与以上结果一致。本研究进一步发现,丹参酮 II A 促进 NO 分泌,于 12 h 时促进作用达高峰,至 24 h 时 NO 不再升高,提示丹参酮 II A 作用的早期以抗氧化损伤作用为主,可能通过抑制细胞膜上的 NADH/NADPH 氧化酶,清除 O^{2-} 、提高 SOD 活性而发挥作用。糖尿病时血糖、血脂等代谢紊乱,导致体内活性氧增加,机体处于氧化应激状态。ADMA 水平升高与氧化应激所致脂质过氧化有关。丹参酮 II A 因其良好的自由基清除能力和抗脂质过氧化作用^[9],降低了糖尿病大鼠主动脉内皮细胞分泌 ADMA,削弱其对内源性 NOS 的抑制作用,增加 NO 的释放而对血管内皮起到保护作用。

总之,丹参酮 II A 能减少糖尿病大鼠主动脉内皮细胞分泌 ADMA,促进分泌 NO,对糖尿病 As 的预

防起积极作用,但其具体机制尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 吴仕平,陈明. 替米沙坦联合阿托伐他汀对糖尿病大鼠内皮细胞形态、功能的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(7): 542-546.
- [2] 黄雌友,姚伟峰. 2 型糖尿病患者血清可溶性细胞间粘附分子 1 水平变化及与血管内皮功能的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(2): 153-155.
- [3] 游咏,莫靓,桂庆军,等. 不同程度冠状动脉狭窄患者血清 ADMA 水平分析 [J]. 山东医药, 2010, 50(24): 94-96.
- [4] 谢明,成志. 丹参酮对阿尔茨海默病样大鼠海马内诱导型一氧化氮合酶 mRNA 和乙酰胆碱酯酶表达的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(8): 1 005-008.
- [5] Fan G, Zhu Y, Guo H, et al. Direct vasorelaxation by a novel phytoestrogen tanshinone II A is mediated by non-genomic action of estrogen receptor through endothelial nitric oxide synthase activation and calcium mobilization [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2011, 57(3): 340-347.
- [6] 王冬,田亚平,姜英雁,等. 丹参酮 II A 与 5-FU 抑制 HeLa 细胞生长及诱导细胞凋亡的研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(22): 3 237-240.
- [7] Pan C, Lou L, Huo Y, et al. Salvianolic acid B and Tanshinone II A attenuate myocardial ischemia injury in mice by NO production through multiple pathways [J]. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2011, 5(2): 99-111.
- [8] Li YS, Liang QS, Wang J. Effect of tanshinone II A on angiotensin II induced nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase gene expression in cultured porcine aortic endothelial cells [J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2007, 27(7): 637-639.
- [9] Yang LJ, Jeng CJ, Kung HN, et al. Tanshinone II A isolated from *Salvia miltiorrhiza* elicits the cell death of human endothelial cells [J]. J Biomed Sci, 2005, 12(2): 347-361.

(此文编辑 李小玲)