

# 钩藤总生物碱和芥子碱硫氰酸盐组分配伍对 血管内皮细胞的变化作用和机制

焦华琛<sup>1</sup>, 李运伦<sup>1</sup>, 姜月华<sup>1</sup>, 齐冬梅<sup>2</sup>, 韩涛<sup>2</sup>, 蒋海强<sup>2</sup>

(1. 山东中医药大学附属医院高血压中医临床研究基地, 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] 钩藤总生物碱; 芥子碱硫氰酸盐; 血管内皮细胞; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 内皮素 1; 血管细胞黏附分子 1; 细胞间黏附分子; 一氧化氮

[摘要] **目的** 研究中药组分钩藤总生物碱、芥子碱硫氰酸盐及其配伍对肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )导致的血管内皮细胞的变化作用和机制。**方法** 体外培养大鼠血管内皮细胞,以 TNF- $\alpha$  建立血管内皮细胞炎症模型。采用扫描电镜技术观察细胞形态的变化,采用 ELISA 测定细胞分泌内皮素 1(ET-1)、血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)和细胞间黏附分子 1(ICAM-1),RT-PCR 测定 ICAM-1、VCAM-1 和 ET-1 的 mRNA 表达,硝酸还原酶法测定细胞分泌血管内皮舒张因子一氧化氮(NO)水平。**结果** TNF- $\alpha$ (5  $\mu$ g/L)可在体外诱导血管内皮炎症模型。钩藤总生物碱与芥子碱硫氰酸盐配伍可改善细胞形态结构,降低 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 分泌,与钩藤总生物碱、芥子碱硫氰酸盐差异无显著性( $P > 0.05$ );提高细胞 NO 分泌,优于钩藤总生物碱、芥子碱硫氰酸盐( $P < 0.05$ );下调细胞 ICAM-1 mRNA 表达,优于钩藤总生物碱、芥子碱硫氰酸盐( $P < 0.05$ );下调细胞 VCAM-1 和 ET-1 mRNA 表达,优于芥子碱硫氰酸盐( $P < 0.05$ )。**结论** 钩藤总生物碱、芥子碱硫氰酸盐及其配伍具有保护 TNF- $\alpha$  致血管内皮细胞炎症的作用。

[中图分类号] R28

[文献标识码] A

## The Effect and Mechanism of Component Compatibility of Rhynchophylla Total Alkaloids and Sinapine Cyanide Sulfonate on Change of Vascular Endothelial Cells

JIAO Hua-Chen<sup>1</sup>, LI Yun-Lun<sup>1</sup>, JIANG Yue-Hua<sup>1</sup>, QI Dong-Mei<sup>2</sup>, HAN Tao<sup>2</sup>, and JIANG Hai-Qiang<sup>2</sup>

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

[KEY WORDS] Rhynchophylla Total Alkaloids; Sinapine Cyanide Sulfonate; Vascular Endothelial Cell; Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; Endothelin-1; Vascular Cell Adhesion Molecule-1; Intercellular Adhesion Molecule-1; Nitric Oxide

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect and mechanism of rhynchophylla total alkaloids, sinapine cyanide sulfonate and its component compatibility on change of vascular endothelial cells induced by the tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).

**Methods** Rat vascular endothelial cells were cultured in vitro, and vascular endothelial cell injury model was established by TNF- $\alpha$ . Then changes of cell morphology were observed before and after treatment; intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) and rat endothelin-1(ET-1) were determined by Elisa method, mRNA of ICAM-1, VCAM-1 and ET-1 by RT-PCR method and the level change of endothelium-derived relaxing factor(NO) by nitrate reductase method.

**Results** The vascular endothelial cell injury model could be established in vitro successfully by TNF- $\alpha$ (5  $\mu$ g/L). Compared with TNF- $\alpha$  group, treated groups could improve vascular endothelial cell morphology, lower the secretion of ICAM-1, VCAM-1 and ET-1. Compared with rhynchophylla total alkaloids group and sinapine cyanide sulfonate group, the component compatibility group was better on heightening the secretion of NO, down-regulating the expression of ICAM-1 mRNA( $P < 0.05$ ). On down-regulating the expression of mRNA of VCAM-1

[收稿日期] 2012-10-08

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81072794);山东省中药现代化科技专项资助项目(2008GG2NS02011)

[作者简介] 焦华琛,博士,主治医师,研究方向为心血管分子生物学,E-mail 为 liyixuan0531@163.com。通讯作者李运伦,博士,教授,研究方向为高血压血管重塑的病理机制与中医证候的客观化,E-mail 为 yunlun.lee@hotmail.com 和 li.yunlun@163.com。

and ET-1, the rhynchophylla total alkaloids group and the component compatibility group were better than the sinapine cyanide sulfonate group( $P<0.05$ ). **Conclusion** The component compatibility of rhynchophylla total alkaloids and sinapine cyanide sulfonate has the function of protecting rat vascular endothelial cell injury induced by TNF- $\alpha$ .

血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)损伤和功能障碍是高血压、糖尿病、动脉粥样硬化和冠状动脉介入治疗后再狭窄等多种血管疾病的早发病理过程<sup>[1,2]</sup>,干预血管内皮损伤和功能障碍已成为当前血管疾病防治研究的重要视角,保护内皮功能也成为治疗高血压的新靶点。前期研究表明,钩藤总生物碱具有降低血压、改善血管重塑、拮抗血管内皮细胞衰老等药理效应<sup>[3-5]</sup>;莱菔子水溶性生物碱亦具有降低血压、保护内皮和抗氧化损伤等药理效应<sup>[6,7]</sup>,其降压效应的主要成分是芥子碱硫氰酸盐;钩藤总生物碱配伍莱菔子水溶性生物碱具有良好降压和血管内皮保护效应,其机制与抑制血管内皮细胞分泌黏附因子、减轻血管壁炎症反应有关<sup>[8]</sup>。但钩藤总生物碱和芥子碱硫氰酸盐组分配伍能否抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )诱导 VEC 炎症及作用机制尚不清楚。本研究建立 TNF- $\alpha$  诱导 VEC 炎症模型,选择反映血管内皮依赖性收缩/舒张功能及内皮细胞黏附功能的指标为效应指标,以具有降血压和血管内皮保护双重效应的缬沙坦为阳性对照<sup>[9,10]</sup>,以中药组分钩藤总生物碱、芥子碱硫氰酸盐及其配伍为干预因素,观察其对 TNF- $\alpha$  诱导 VEC 炎症的细胞形态以及分泌内皮素 1(endothelin-1, ET-1)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)和血管细胞黏附分子 1(vascular cellular adhesion molecule-1, VCAM-1)以及细胞 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达的影响,探讨其可能存在的保护 VEC 机制,从而为钩藤总生物碱和芥子碱硫氰酸盐配伍应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新生 Wistar 大鼠,3~4 天,购自山东中医药大学实验动物中心。钩藤总生物碱和芥子碱硫氰酸盐,纯度分别为 50% 和 98%,并建立了相应的质量标准<sup>[11,12]</sup>,经液质联用分析,鉴定了钩藤总生物碱的主要成分(钩藤碱)和芥子碱硫氰酸盐的化学结构,由山东中医药大学药学院周洪雷教授和蒋海强讲师提供。取钩藤总生物碱以二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)作为溶媒,配制成浓度为 0.1 kg/L 的原

液,使用前根据实验设计用 DMEM/F12 稀释成不同的浓度,过滤除菌,置 4℃ 冰箱保存备用。芥子碱硫氰酸盐为水溶性成分,直接以 DMEM/F12 溶解配制。缬沙坦,北京诺华制药有限公司,国药准字 H20040216,批号 X0006,以 DMSO 作为溶媒,配制成浓度为 1 kg/L 的原液,使用前根据实验设计用 DMEM/F12 稀释成不同的浓度,过滤除菌,置 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 实验试剂

TNF- $\alpha$ ,以色列 Prospec 科技有限公司产品;兔抗第八因子相关抗原抗体(Rabbit anti-factor VII),北京博奥森公司产品;Triton X-100,北京索莱宝科技有限公司产品;DMEM/F-12 培养基,GIBCO 公司产品;胎牛血清(FBS),杭州四季青生物工程材料有限公司产品;DMSO, Sigma 公司产品;大鼠 VCAM-1 酶联免疫检测试剂盒、大鼠 ICAM-1 酶联免疫检测试剂盒、大鼠 ET-1 酶联免疫检测试剂盒,R&D 公司产品;NO 检测试剂盒,南京建成公司产品;反转录试剂盒、Taq 酶,大连 Takara 生物技术有限公司产品;所需引物由上海生工生物工程公司合成,其序列为:ICAM-1(388 bp):上游 5'-AGG TAT CCA TCC ATC CCA CA-3',下游 5'-AGT GTC TCA TTC CCA CGG A-3';VCAM-1(570 bp):上游 5'-CGG TCA TGG TCA AGT GTT TG-3',下游 5'-GAG ATC CAG GGG AGA TGT CA-3';ET-1(500 bp):上游 5'-GCT CCT GCT CCT CCT TGA TG-3',下游 5'-CTC GCT CTA TGT AAG TCA TGG-3';内参  $\beta$ -actin(173 bp):上游 5'-CGT TGA CAT CCG TAA AGA-3',下游 5'-AGC CAC CAA TCC ACA CAG-3'。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 细胞的培养与鉴定

采用组织贴块法培养新生鼠胸主动脉内皮细胞。细胞培养瓶用 0.2% 明胶 37℃ 预包被 12~14 h。无菌分离大鼠胸主动脉前降支,将主动脉剪成 1 mm<sup>3</sup>左右的组织块,均匀放入培养瓶中,干贴壁 2~4 h,然后缓慢加入含 50 mg/L 肝素、20% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养基,72 h 后去除组织块并换液。48~72 h 镜下即可见到细胞从组织块边缘游离出来,生长旺盛,形态规则(图 1A);胰蛋白酶消化法作传代培养;经差速贴壁法纯化后,镜下可观察到细胞呈多角形、铺路石样生长,显现典型的内皮细胞形态(图 1B);血管内皮细胞抗第八因

子(因子Ⅷ)相关抗原抗体免疫荧光鉴定<sup>[13,14]</sup>,所培养细胞的胞浆呈现绿色荧光,鉴定为血管内皮细胞

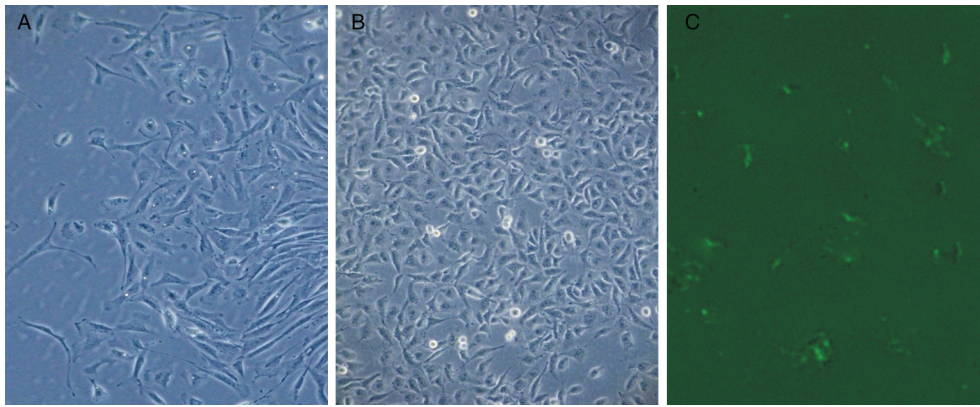


图 1. 大鼠血管内皮细胞的分离培养及纯化和鉴定 A 为原代培养的大鼠胸主动脉内皮细胞,B 为纯化后的血管内皮细胞,C 为因子Ⅷ鉴定。

Figure 1. Isolation, culture, purification and identification of rat vascular endothelial cells

#### 1.4 细胞分组与药物干预

前期研究反复采用 MTT 方法实验,筛选出 TNF- $\alpha$  的最佳浓度为 5  $\mu\text{g/L}$ 、DMSO 的最佳浓度为 0.0008 L/L、缬沙坦的最佳浓度为 80 mg/L、钩藤总生物碱的最佳浓度为 100 mg/L、芥子碱硫氰酸盐的最佳浓度为 60 mg/L、钩藤总生物碱和芥子碱硫氰酸盐组分配伍的合适浓度为 60~100 mg/L。细胞贴壁后,以 TNF- $\alpha$  造成血管内皮细胞炎症模型。经 48 h 预培养和 24 h 去血清同步化后,将细胞随机分为 7 组:①正常组:不加特殊处理因素;②DMSO 溶媒对照组:0.0008 L/L DMSO;③TNF- $\alpha$  组:TNF- $\alpha$  为 5  $\mu\text{g/L}$ ;④缬沙坦组:TNF- $\alpha$  5  $\mu\text{g/L}$  + 缬沙坦 80 mg/L;⑤钩藤总生物碱组:TNF- $\alpha$  5  $\mu\text{g/L}$  + 钩藤总生物碱 100 mg/L;⑥芥子碱硫氰酸盐组:TNF- $\alpha$  5  $\mu\text{g/L}$  + 芥子碱硫氰酸盐 60 mg/L;⑦组分配伍组:TNF- $\alpha$  5  $\mu\text{g/L}$  + 钩藤总生物碱 100 mg/L + 芥子碱硫氰酸盐 60 mg/L。继续培养 48 h,进行各项观察检测。

#### 1.5 细胞形态观察

同上培养和分组干预后,2.5% 戊二醛固定 12~24 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。

#### 1.6 细胞分泌 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 检测

同上培养和分组干预后,采用 ELISA 测定各组细胞培养上清液 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白含

(图 1C)。选用 3~8 代血管内皮细胞用于实验,调整细胞密度为  $1 \times 10^5/\text{L}$ ,接种于培养板/瓶备用。

量。严格按照试剂盒说明书进行操作,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度,根据标准曲线分别计算样品中 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 的含量。

#### 1.7 细胞 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 的 mRNA 检测

同上培养和分组干预后,采用 RT-PCR 测定各组细胞的 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达。采用 Trizol 法抽提总 RNA,进行逆转录反应(20 mL 体系),反应条件为:65 $^{\circ}\text{C}$  5 min,立即冰浴 5 min,37 $^{\circ}\text{C}$  50 min 逆转;70 $^{\circ}\text{C}$  15 min 灭活。以逆转录所得到的 cDNA 为模板,进行 PCR 反应。PCR (50 mL 体系)反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$  终延伸 7 min。以 PCR 产物行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,90 V,电泳 30 min;凝胶成像分析仪中观察、照相;用 Alphaimager 2200. SPSS win 软件分析电泳结果。

#### 1.8 细胞分泌一氧化氮检测

同上培养和分组干预后,采用硝酸还原酶法测定细胞培养上清液 NO 含量。严格按照试剂盒说明书进行操作,蒸馏水调零,550 nm,0.5 cm 光径,测各管吸光度值,根据说明书中的公式计算样品 NO 的含量。

#### 1.9 统计学方法

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,组间比较采用单因素方差分析进行处理,方差不齐时采用秩和检验。

## 2 结果

#### 2.1 对细胞形态的影响

正常组细胞成圆形或梭形、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。与正常组相比,TNF- $\alpha$  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,相同视野内细胞数目明显增多。与 TNF- $\alpha$

组比较,各用药组的内皮细胞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,视野中细胞数目减少,其中缬沙坦组效果最为明显(图 2)。

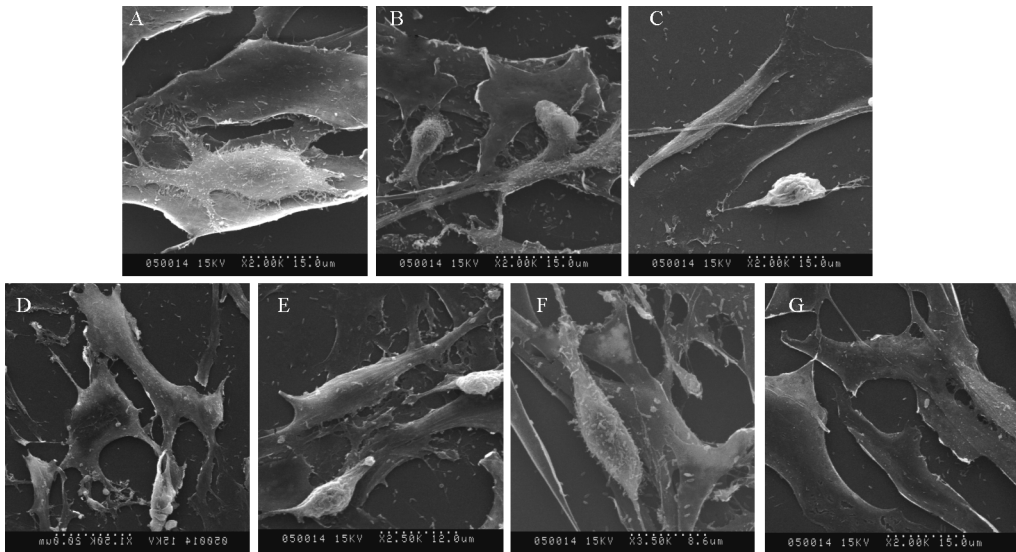


图 2. 扫描电镜下观察内皮细胞(×2000) A 为正常组,B 为 TNF- $\alpha$  组,C 为缬沙坦组,D 为钩藤总生物碱组,E 为芥子碱硫氰酸盐组, F 为组分配伍组,G 为 DMSO 组。

Figure 2. Ultrastructure of endothelial cells were observed under scanning electron microscope(×2000)

### 2.2 对细胞分泌 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 含量的影响

DMSO 组与正常组比较差异无显著性( $P > 0.05$ ),说明实验中 DMSO 作为溶媒对血管内皮细胞功能不造成干扰;与正常组相比,TNF- $\alpha$  组 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 含量均明显升高( $P < 0.05$ ),说明造成血管内皮细胞炎症模型成功。与 TNF- $\alpha$  组比较,缬沙坦组、钩藤总生物碱组、芥子碱硫氰酸盐组和组分配伍组 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 含量均显著性降低( $P < 0.05$ )。与缬沙坦组相比较,钩藤总生物碱组、芥子碱硫氰酸盐组和组分配伍组 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白含量差异均无显著性( $P > 0.05$ ;表 1 和图 3)。

### 2.3 对各组细胞 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 的 mRNA 表达的影响

DMSO 组与正常组比较差异无显著性( $P > 0.05$ ),说明实验中 DMSO 作为溶媒对内皮细胞功能不造成干扰;与正常组相比,TNF- $\alpha$  组 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达均上调,差异具有显著性( $P < 0.05$ ),说明造成内皮细胞炎症模型成功。与 TNF- $\alpha$  组比较,缬沙坦组、钩藤总生物碱组、芥子碱硫氰酸盐组和组分配伍组 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达均下调;缬沙坦组、钩藤总生物碱组和组

分配伍组 ET-1 mRNA 表达均下调,差异具有显著性( $P < 0.05$ )。与缬沙坦组比较,组分配伍组 ICAM-1 mRNA 表达下调更为明显( $P < 0.05$ ),而且也优于钩藤总生物碱组和芥子碱硫氰酸盐组( $P < 0.05$ );与缬沙坦组比较,组分配伍组和钩藤总生物碱组 VCAM-1 mRNA 表达下调更为明显( $P < 0.05$ ),而且组分配伍组优于芥子碱硫氰酸盐组( $P < 0.05$ );与缬沙坦组比较,组分配伍组和钩藤总生物碱组 ET-1 mRNA 表达无明显变化( $P > 0.05$ ),组分配伍组优于芥子碱硫氰酸盐组( $P < 0.05$ ;图 4、图 5 和表 2)。

表 1. 各组细胞分泌 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 含量的比较 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$ )

Table 1. ET-1, ICAM-1 and VCAM-1 in culture supernatant ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$ )

分 组	n	ICAM-1	VCAM-1	ET-1
正常组	6	5.46 $\pm$ 1.83	2.92 $\pm$ 0.29	104.046 $\pm$ 29.11
DMSO 组	6	6.12 $\pm$ 0.69	3.15 $\pm$ 0.31	89.19 $\pm$ 26.36
TNF- $\alpha$ 组	6	7.49 $\pm$ 1.45	3.42 $\pm$ 0.32	156.95 $\pm$ 45.09
缬沙坦组	6	5.12 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	2.48 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	113.80 $\pm$ 22.49 <sup>a</sup>
钩藤总生物碱组	6	5.96 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>	2.56 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	122.18 $\pm$ 26.93 <sup>a</sup>
芥子碱硫氰酸盐组	6	5.25 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	2.67 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	113.20 $\pm$ 24.44 <sup>a</sup>
组分配伍组	6	5.98 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	2.57 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	119.00 $\pm$ 22.90 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与 TNF- $\alpha$  组比较。

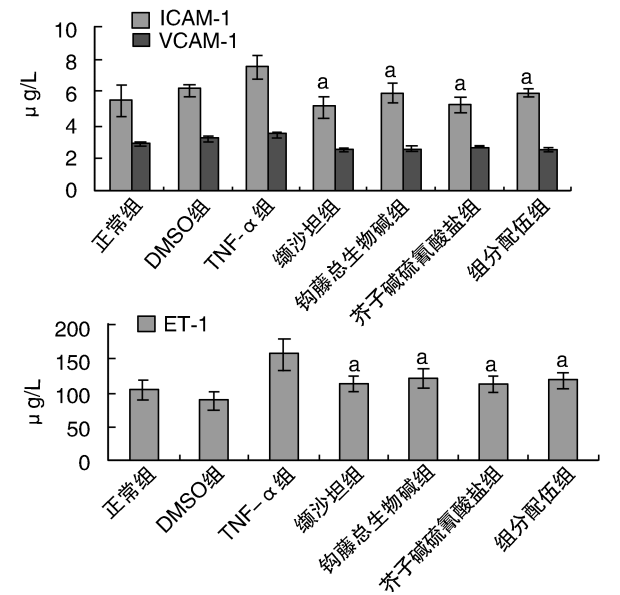


图 3. 各组细胞分泌 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1 含量的比较 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与 TNF- $\alpha$  组比较。

Figure 3. ET-1, ICAM-1 and VCAM-1 in culture supernatant ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$ )

2.4 对细胞分泌 NO 的影响

DMSO 组与正常组比较 NO 略升高, 二者意义无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。TNF- $\alpha$  组与正常组相

比, NO 略降低, 二者无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。与 TNF- $\alpha$  组比较, 缬沙坦组、钩藤总生物碱组、芥子碱硫氰酸盐组和组分配伍组 NO 浓度均显著性升高 ( $P < 0.05$ ); 与缬沙坦组相比较, 组分配伍组 NO 浓度显著性升高 ( $P < 0.05$ ), 而且也明显优于钩藤总生物碱组和芥子碱硫氰酸盐组 ( $P < 0.05$ ; 表 3)。

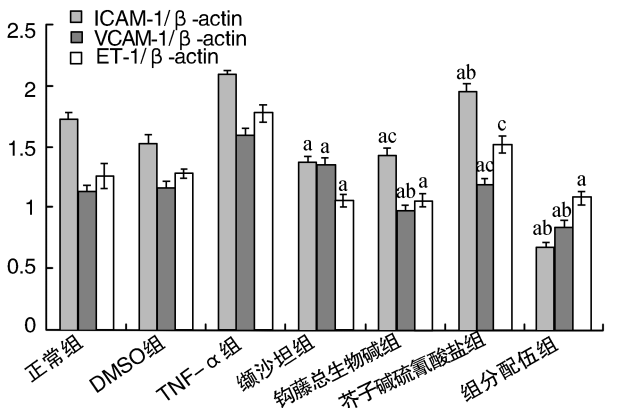


图 4. 血管内皮细胞 ICAM-1、VCAM-1、ET-1 的 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与 TNF- $\alpha$  组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与缬沙坦组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与组分配伍组比较。

Figure 4. mRNA expression of ICAM-1, VCAM-1 and ET-1 of rat vascular endothelial cells ( $\bar{x} \pm s$ )

表 2. 血管内皮细胞 ICAM-1、VCAM-1、ET-1 的 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	<i>n</i>	ICAM-1/β-actin	VCAM-1/β-actin	ET-1/β-actin
正常组	6	1.712 ± 0.126	1.132 ± 0.087	1.257 ± 0.210
DMSO 组	6	1.518 ± 0.143	1.162 ± 0.097	1.273 ± 0.079
TNF-α 组	6	2.078 ± 0.098	1.592 ± 0.108	1.771 ± 0.144
缬沙坦组	6	1.370 ± 0.102 <sup>a</sup>	1.349 ± 0.115 <sup>a</sup>	1.054 ± 0.101 <sup>a</sup>
钩藤总生物碱组	6	1.421 ± 0.131 <sup>ac</sup>	0.969 ± 0.098 <sup>ab</sup>	1.054 ± 0.109 <sup>a</sup>
芥子碱硫氰酸盐组	6	1.947 ± 0.144 <sup>ac</sup>	1.190 ± 0.103 <sup>ac</sup>	1.515 ± 0.141 <sup>c</sup>
组分配伍组	6	0.671 ± 0.087 <sup>ab</sup>	0.836 ± 0.112 <sup>ab</sup>	1.075 ± 0.115 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与 TNF- $\alpha$  组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与缬沙坦组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与组分配伍组比较。

表 3. 各组细胞分泌 NO 含量的比较 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$ )

分 组	<i>n</i>	NO
正常组	6	525 ± 46.8
DMSO 组	6	550 ± 66.8
TNF-α 组	6	487.5 ± 52.6
缬沙坦组	6	600 ± 69.4 <sup>a</sup>
钩藤总生物碱组	6	650 ± 78.4 <sup>ac</sup>
芥子碱硫氰酸盐组	6	650 ± 70.5 <sup>ac</sup>
组分配伍组	6	825 ± 96.7 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与 TNF- $\alpha$  组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与缬沙坦组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与组分配伍组比较。

3 讨 论

血管内皮细胞是人体最大的内分泌器官, 能合成和分泌多种血管活性物质, 在维持血管舒张和收缩、维持凝血和纤溶的平衡、防止中性粒细胞和其它炎症因子黏附于血管壁、调节平滑肌细胞的增殖和迁移等方面发挥重要作用。在高血压状态时由于血流动力学的异常和血流剪切力变化, 可损伤血管内皮细胞, 成为血管内皮损伤的始动因素之一, 而高血压血管内皮功能障碍常发生分泌功能的异常, 常表现为内皮依赖性舒张功能减弱和 (或) 内皮

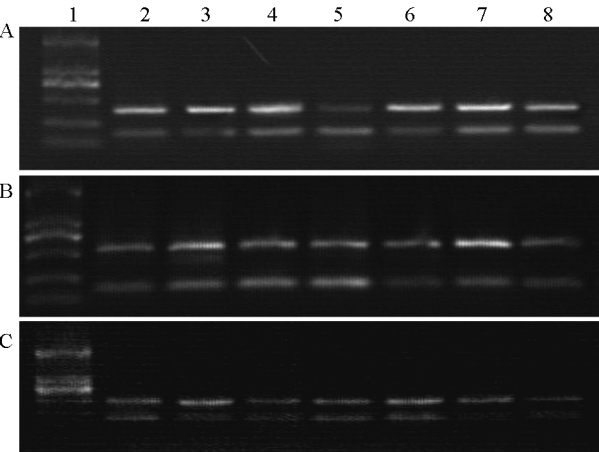


图 5. 血管内皮细胞 ICAM-1 (A)、VCAM-1 (B)、ET-1 (C) 的 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ ) 1 为 DL2000, 2 为正常组, 3 为 TNF- $\alpha$  组, 4 为缬沙坦组, 5 为钩藤总生物碱组, 6 为芥子碱硫氰酸盐组, 7 为组分配伍组, 8 为 DMSO 组。

Figure 5. mRNA expression of ICAM-1 (A), VCAM-1 (B) and ET-1 (C) of rat vascular endothelial cells ( $\bar{x} \pm s$ )

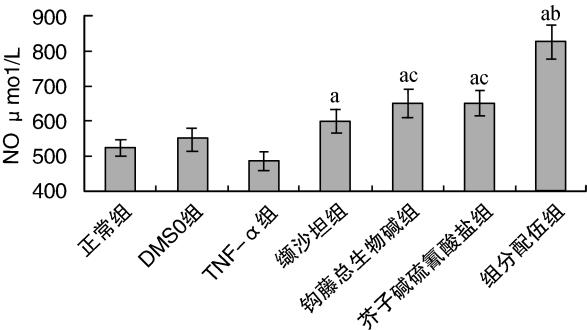


图 6. 各组细胞分泌 NO 含量的比较 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$ )

Figure 6. NO in culture supernatant ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$ )

依赖性收缩功能的增强以及炎症相关物质表达的上调<sup>[15,16]</sup>, 这些又能进一步损伤并激活血管内皮细胞, 形成恶性循环, 促使高血压的发生发展, 成为“内皮-高血压-心血管事件”链起动力和载体。因此, 改善血管内皮的分泌功能、增强内皮依赖性舒张功能、降低内皮依赖性收缩功能、下调炎症相关物质的表达不仅是血管内皮保护的基本策略, 同时也是抗高血压的重要目标。

TNF- $\alpha$  由激活的巨噬细胞分泌的一类具有多种生物学效应的细胞因子, 与内皮细胞膜上的 TNF- $\alpha$  受体相结合而发挥生物学效应, 从而诱导内皮细胞的炎症, 甚至导致细胞衰老、凋亡与坏死<sup>[17-20]</sup>。故本研究以 TNF- $\alpha$  刺激建立 VEC 炎症模型, 以此为研究平台探讨了钩藤总生物碱和芥子碱硫氰酸盐组分配伍对 VEC 的保护作用, 观察了细胞形态及亚细胞结构的变化。结果表明 5  $\mu\text{g/L}$  的 TNF- $\alpha$  在体外

成功造成了 VEC 炎症模型, 表现为细胞体积变大、形态不规则、表面微绒毛僵直断裂、分布不规则、相同视野内细胞数目明显增多。钩藤总生物碱、芥子碱硫氰酸盐及其配伍可以拮抗 TNF- $\alpha$  的促 VEC 炎症效应, 明显改善 VEC 的形态、大小、微绒毛数量及分布, 视野中细胞数目也减少。

血管内皮细胞能分泌多种血管活性物质如 NO、PGI<sub>2</sub>、ET-1 和 ANG II 等, 参与调节血管的紧张度并维持血管正常结构, 其中局部作用最强的是 ET 和 NO<sup>[21,22]</sup>。内皮素 (ET) 是迄今所知最强的缩血管物质, 具有三个异构体, 与不同的受体结合产生不同的效应。ET 受体分两类: 一类是 ETA 受体, 存在于血管平滑肌, 收缩血管, ET-1 对 ETA 受体的效应较强; 另一类是 ETB 受体, 存在于血管内皮细胞, 可以释放 NO 与 PGI<sub>2</sub> 而舒张血管。NO 是以 L-精氨酸为基质, 经过 NO 合成酶 (NOS) 的作用生成, 是独立于交感神经和肾素-血管紧张素之外的血压调节因子<sup>[23]</sup>, 具有舒张血管、抑制血小板聚集及白细胞黏附、清除氧自由基等功效。本研究显示钩藤总生物碱芥子碱硫氰酸盐组分配伍组细胞 NO 分泌量明显优于钩藤总生物碱组和芥子碱硫氰酸盐组, 组分配伍组细胞分泌 ET-1 量与钩藤总生物碱组和芥子碱硫氰酸盐组相当, 下调细胞 ET-1 mRNA 表达优于芥子碱硫氰酸盐组。

血管内皮细胞不但能合成、分泌内皮依赖性舒张因子/收缩因子, 而且能分泌、上调炎症相关物质如 ICAM-1 和 VCAM-1, 二者均属于免疫球蛋白超家族, 是细胞表面黏附分子, 多分布于上皮细胞和内皮细胞表面, 静止状态的内皮细胞 ICAM-1 少量表达, VCAM-1 不表达或极少量表达。但在各种理化因素的作用下内皮细胞活化时 ICAM-1 和 VCAM-1 表达均可明显上调, 以配体-受体结合的形式发挥作用, 主要介导白细胞间的黏附及激活内皮细胞, 导致细胞与细胞间、细胞与基质间或细胞、基质、细胞三者间的黏附, 参与细胞信号转导活化, 炎症血栓形成等一系列重要的病理生理过程<sup>[24,25]</sup>。ICAM-1 主要参与中性粒细胞与内皮的黏附, VCAM-1 主要参与单核细胞与内皮细胞的黏附, 而白细胞的黏附是内皮损伤的最初标志<sup>[26,27]</sup>。本研究显示各用药组细胞分泌 ICAM-1 和 VCAM-1 均有降低, 各用药组细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达均有下调, 其中又以钩藤总生物碱芥子碱硫氰酸盐组分配伍组 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达下调效应最佳。

综上所述, 钩藤总生物碱和芥子碱硫氰酸盐组分配伍对 TNF- $\alpha$  介导的血管内皮细胞炎症具有明



显的保护作用,其部分机制与降低 ET-1、ICAM-1 和 VCAM-1、提高 NO 分泌有关,从而为钩藤总生物碱和芥子碱硫氰酸盐配伍应用提供实验依据。

#### [参考文献]

- [1] 王现珍, 蒋嘉桦, 陆家风, 等. SHR 高血压进程中不同类型血管内皮功能损伤及药物修复研究[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(2): 163-168.
- [2] 郑雯, 李树青. 原发性高血压血管内皮细胞损害机制的研究和治疗进展[J]. 心血管病学进展, 2009, 30(1): 65-69.
- [3] 姜月华, 李运伦, 赵婧, 等. 钩藤总生物碱对 D-半乳糖诱导的内皮细胞衰老的干预[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(6): 474-478.
- [4] 霍青, 赵婧, 姜月华, 等. 钩藤总生物碱干预大鼠血管内皮细胞衰老的实验研究[J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(3): 214-216.
- [5] 张蕴慧, 李运伦, 赵婧, 等. 钩藤总生物碱对自发性高血压大鼠血管内皮及  $\beta$ -半乳糖苷酶和端粒酶活性的影响[J]. 山西中医杂志, 2011, 27(8): 44-45.
- [6] 李铁云, 李天国, 张国侠, 等. 莱菔子水溶性生物碱对自发性高血压大鼠降压作用的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(1): 25-28.
- [7] 张国侠, 盖国忠. 莱菔子水溶性生物碱对 ApoE 基因敲除小鼠内皮细胞的抗氧化保护作用[J]. 中国老年医学杂志, 2010, 30(19): 2 811-812.
- [8] 杨金果, 李运伦, 周洪雷. 钩藤和莱菔子生物碱抗高血压血管内皮细胞损伤效应[J]. 中成药, 2013, 35(5): 15-19.
- [9] 徐莉, 徐瑞金. 缬沙坦改善原发性高血压患者血管内皮功能[J]. 中华高血压杂志, 2006, 14(8): 624-626.
- [10] Xenos ES, Stevens SL, Freeman M B, et al. Nitric oxidem ediates the effect of flu-vastatin on intercellular adhesion molecule and platelet endothelial cell adhesion molecule expression on human endothelial cells[J]. Ann Vasc Surg, 2007, 19(3): 386-392.
- [11] 蒋海强, 窦月, 周洪雷. 钩藤总生物碱有效部位质量控制研究[J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(5): 445-448.
- [12] 窦月, 周洪雷, 齐冬梅, 等. 离子交换树脂对钩藤总生物碱的纯化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 1-3.
- [13] 高润娣, 曹婕, 卢珊, 等. 小鼠肺微血管内皮细胞的培养鉴定及其血管形成功能的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(1): 186-188;192.
- [14] 李振, 刘云会, 薛一雪, 等. 大鼠原代脑微血管内皮细胞体外分离与培养的实验研究[J]. 中国医科大学学报, 2012, 41(10): 873-876.
- [15] 南静. 高血压程度与血清细胞白介素-6 和肿瘤坏死因子的关系[J]. 中国实用医刊, 2008, 35(10): 37-39.
- [16] 喻卓, 陈鹏, 杨桂海, 等. 20(R)-人参皂甙 Rg3 对肿瘤坏死因子- $\alpha$  诱导血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 岭南心血管病杂志, 2011, 17(3): 198-212.
- [17] 苟连平, 秦俭, 吕湛, 等. 高血压患者外周血单核细胞分泌 TNF 水平及洛伐他汀干预实验[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(1): 14-15.
- [18] 邓小鹿, 彭镜, 何芳, 等. TNF- $\alpha$  对小鼠脑微血管内皮细胞 RHoA 活性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(6): 1 210-212.
- [19] 闫承慧, 于海波, 黄明方, 等. 人脐静脉内皮细胞单层通透性的实验研究[J]. 中国组织工程研究及临床康复, 2011, 39(6): 531-537.
- [20] 李俊, 路方红, 刘振东, 等. 血压正常高值者动态血压负荷及血压变异性与肿瘤坏死因子  $\alpha$  的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(6): 541-544.
- [21] 王瑞鑫, 王春波, 罗世滨, 等. SS-GAG 对高糖状态下血管内皮细胞 NO 释放及 ET-1 分泌的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2008, 46(4): 357-361.
- [22] 宗峰, 倪慧娟, 解卫平, 等. 埃他卡林对人肺动脉内皮细胞内皮素系统的作用[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(2): 236-239.
- [23] 陈正贵, 孔祥廉, 缪灿铭, 等. 高血压患者血压昼夜节律消失与一氧化氮和内皮素关系的研究[J]. 中国医师杂志, 2006, 8(10): 1 345-347.
- [24] 黄茂芝, 徐尚华, 宋欢欢, 等. 替米沙坦对同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子-1、核因子  $\kappa$ B 表达及细胞黏附的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(8): 678-683.
- [25] 李军, 王国荣, 王燕, 等. 二苯乙烯苷对同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞 MCP-1、VCAM-1 和 VCAM-1 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(10): 890-894.
- [26] 张敏, 袁方, 陈晖, 等. 辛伐他汀对 CD40L 介导的 ECV-304 细胞 E 选择素表达及黏附功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(12): 1 658-662.
- [27] 陆永光, 苏强, 曾晓聪, 等. 内皮细胞微粒对人脐静脉内皮细胞 VCAM-1 和 ICAM-1 表达的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(9): 1 063-065.

(此文编辑 李小玲)