

当归、川芎、红花、人参萃取液对离体培养牛血管内皮细胞一氧化氮合酶的影响

张旭静 王素春 范柳 黄久仪 王桂清

(上海市脑血管病防治研究所, 上海 201318)

摘要 目的:研究以当归、川芎、红花、人参为主要成份的 CO₂ 超临界萃取液对低切应力条件下培养的内皮细胞一氧化氮合酶(eNOS)表达的影响;探讨该萃取液改善血管功能、防止动脉粥样硬化的机理。方法:采用 Western blot 印迹免疫检测,研究该萃取液对低切应力环境下体外培养的牛血管内皮细胞 eNOS 表达的影响。结果:低切应力水平下,内皮细胞 eNOS 表达降低,给予 0.5% 萃取液 1 ml (以萃取原液为 100%),eNOS 的表达明显增加,并接近在高切应力水平下内皮细胞 eNOS 的正常表达水平。结论:当归、川芎、红花、人参萃取液可上调低切应力环境下内皮细胞 eNOS 的表达。

关键词 当归;川芎;红花;人参;血管内皮细胞;一氧化氮合酶

Effect of extract liquid of *Angelica sinensis*, *Ligusticum chuanxiong*, *Carthamus tinctorius* and *Panax ginseng* on cattle vascular endothelial nitric oxide synthase in vitro

ZHANG XuJing, WANG Su-Chun, FAN Liu, HUANG Jiu Yi, WANG Gui-Qing

(Shanghai Institute for Cerebrovascular Diseases, Shanghai 201318, China)

Abstract Objective: To investigate the influence of extract liquid from *Ligusticum*, *Chuanxiong*, *Angelica Sinensis*, *Carthamus tinctorius* and *Panax Ginseng* on vascular endothelial nitric oxide synthase (eNOS) under low shear stress flow environment. Methods: Upregulation of vascular endothelial nitric oxide synthase under low shear stress flow environment by extract liquid of *Ligusticum*, *Chuanxiong*, *Angelica Sinensis*, *Carthamus Tinctorius* and *Panax Ginseng* were determined by Western blot analysis. Results: Under the lower level shear stress (5 dynes/cm²), expression of eNOS was lower but increased after treatment with extract liquid. Conclusion: Extract liquid of *Ligusticum*, *Chuanxiong*, *Angelica Sinensis*, *Carthamus Tinctorius* and *Panax Ginseng* may enhance the expression of eNOS under the low shear stress flow environment.

Key words extract liquid of *Ligusticum*, *Chuanxiong*, *Angelica Sinensis*, *Carthamus Tinctorius*, *Panax Ginseng*; vascular endothelial cells; nitric oxide synthase

血管内皮细胞产生的一氧化氮(NO)等生物活性物质对血压、血管的紧张性具有重要的调节作用,并可抑制内皮细胞的凋亡。在体内血液动力学环境中,这些生物活性物质介导了血流对血管功能的调节。当归、川芎、红花和人参萃取液(以下简称脑安萃取液)在中医临床上一直用于改善脑循环功能,预防中风。我们以前的研究表明脑安萃取液能抑制内皮细胞凋

亡^[1],但作用机理尚不清楚。本文将研究脑安萃取液在流动环境下对血管内皮细胞 NOS 的影响,以阐明脑安萃取液改善循环功能、抑制内皮细胞凋亡等的作用机制。

1 材料和方法

1.1 内皮细胞培养 用胰酶和胶原酶混合消化法获取新生牛主动脉内皮细胞,用 M199 培

养液(含 20%小牛血清,青霉素 100 u/ml,链霉素 100 μ g/ml)在 37.5%CO₂ 培养箱培养。0~3 代内皮细胞接种于直径 24 mm 的圆盖玻片上(预涂纤维连接蛋白),3~5 d 待细胞形成单层后,置于我们研制的内皮细胞切应力受力反应模拟测试装置的平行板流动腔底壁的浅槽中,经受流动切应力的作用。因子染色阳性证实培养的细胞为内皮细胞。

1.2 测试装置 内皮细胞切应力受力反应测试装置是由 2 个储液容器、1 个蠕动泵和 1 个平行板流动腔通过硅胶管连接组成的循环系统。循环介质(细胞培养液 M199,完全与静态培养的对照组相同)由上游容器流过平行板流动腔至下游储液容器,再由蠕动泵压至上游容器。平行板流动腔是由上、下两块平行板构成的矩形腔,能产生均一的、且流量和切应力可调控的平面流动。切应力 $\tau = 6\mu/2bQ$ (μ = 循环介质粘度, Q = 流量, h = 矩形腔的高度, b = 矩形腔的宽度)^[2]。实验时,调节“弹性腔”内气/液比至最大,形成准定常流,调节流量,使切应力分别为 20 dynes/cm² 和 5 dynes/cm²,流动作用时间 12 h。

1.3 蛋白印迹杂交分析(Western blot) 10⁶ 细胞经冷 PBS 缓冲液洗涤 2 次,溶于 1.0 ml 细胞溶解液中[2% SDS, 0.15 mol/L NaCl, 10 μ mol/L Tris(pH7.5), 1 mmol/L EDTA],然后置于冰上 30 min。蛋白浓度测定用总蛋白诊断盒(Sigma)和分光光度仪测定(波长为 578 nm)。每孔上样品蛋白含量为 40 μ g,煮沸变性 5 min,分别经 10% SDS-PAGE 电泳,然后电转移至 PVDF 膜上。该膜用含 5% 脱脂牛奶 TBS-T 缓冲液室温封闭 1 h,与 eNOS(1 1000)和 β -actin(1 5000)单抗室温孵育 3 h,TBS-T 缓冲液洗涤 30 min,再与结合有辣根过氧化酶的抗鼠 IgG 抗体(1 5000)室温孵育 1 h,洗涤 30 min。应用化学发光剂(enhanced chemoluminescence, ECL)法检测,与 ECL A 和 ECL B 混合液反应 1 min,显影在 X 光片上。而后进行密度扫描定性和定量分析。实验数据均用 SPSS10.0 软件包进行组间比较(t 检验)。

2 结果

2.1 低切应力条件下不同剂量的脑安萃取液对 eNOS 表达的影响 如图 1 所示,给予浓度为 0.1% 的脑安萃取液 1 ml 时,内皮细胞 eNOS 表达灰度均值为 30%,与对照组 18% 相比较,增加非常显著($P < 0.01$);分别给予浓度为 0.5% 和 1% 的脑安萃取液各 1 ml 时,其灰度均值分别为 70% 和 80%,与对照组比较差异更为显著($P < 0.001$)。

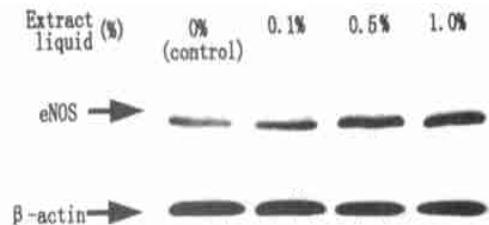


图 1 低切应力条件下,不同浓度的脑安萃取液对 eNOS 表达的影响(给药量均为 1 ml)

Fig 1 Effect of extract liquid of Na'an at different dosage on expression of eNOS under low shear stress flow environment

2.2 脑安萃取液对不同切应力下 eNOS 表达的影响 如图 2 所示,切应力为 5 dynes/cm² 时,eNOS 表达的灰度值为 10%,若给予脑安萃取液(浓度为 0.5%,1 ml),eNOS 的灰度值增至 40%;切应力为 20 dynes/cm² 时,eNOS 的灰度值为 38%,给药后,eNOS 的灰度值增至 65%;经统计学处理,在低切应力与高切应力条件下给药后 eNOS 的灰度均值与给药前相比均有非常显著的差异($P < 0.01$)。

3 讨论

血管内皮细胞在进化过程中形成了对血流切应力产生适应性变化的能力。内皮细胞对血流变化的反应异常会导致血管的病理性变化,如高血压、动脉粥样硬化^[3,4]。血液流动产生的切应力可刺激内皮细胞产生 NO,从而调节心血管的功能^[5]。在内皮细胞,NO 由 L-精氨酸在 eNOS 的作用下产生。很显然,血流产生的切应力通过影响 eNOS 的活性来调控 NO 的

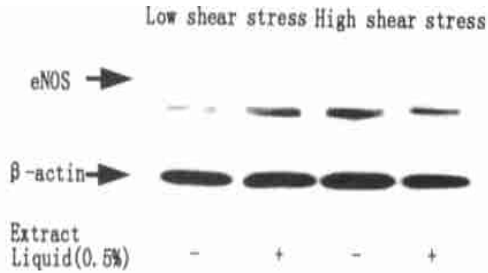


图2 脑安萃取液对不同切应力下 eNOS 表达的影响(给药量均为 1 ml)

Fig 2 Effect of extract liquid of Na'o'an at dose of 1 ml (0.5%) on expression of eNOS under different stress flow environment

产生,从而调节血管功能。曾有报道,切应力的大小直接影响 eNOS 表达水平的高低^[6];而高切应力抑制凋亡是由于上调 eNOS 的表达所致,抑制 eNOS 则导致凋亡增加^[7]。本研究发现在低切应力环境下,eNOS 表达水平降低,而在高切应力环境下,eNOS 表达水平增加。我们以往的工作表明,在低切应力环境下内皮细胞凋亡程度高于高切应力环境^[1],这些结果与前人的报道相同。我们的实验进一步发现,脑安萃取液对低切应力环境下 eNOS 表达有促进作用,当剂量为 1 ml (0.5%) 时,eNOS 的表达明显增加,接近高切应力水平时内皮细胞 eNOS 的正常表达水平。我们以前的实验中发现脑安萃取液可以抑制低切应力环境下内皮细胞的凋亡^[1]。上述结果提示,脑安萃取液可能

通过上调内皮细胞 eNOS 表达,从而抑制低切应力环境下内皮细胞的凋亡,防止动脉粥样硬化的发生。有关脑安萃取液对 eNOS 表达的调节是在转录水平还是在转录后水平有待进一步探讨^[8]。

参考文献

- 1 范柳,王素春,张旭静,等. 脑安萃取液对低切环境下血管内皮细胞的影响. 解剖学杂志,2003,26(3):239-241.
- 2 孙继虎,于彦铮,郦鸣阳,等. 流动切应力对培养的血管内皮细胞形态的影响. 解剖学杂志,1996,19(4):295-298.
- 3 Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*, 1995, 75(3):519-560.
- 4 Resnick N, Gimbrone MA. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J*, 1995, 9(10):874-882.
- 5 Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, 327(6122):524-526.
- 6 Resta TC, Gonzales RJ, Dail WG, et al. Selective upregulation of arterial endothelial nitric oxide synthase in pulmonary hypertension. *Am J Physiol*, 1997, 272(2Pt2):H806-H813.
- 7 Sata M, Kakoki M, Nagata D, et al. Adrenomedullin and nitric inhibit human endothelial cell apoptosis via a cyclic GMP-independent mechanism. *Hypertension*, 2000, 36(1):83-88.
- 8 Drummond GR, Cai H, Davis ME, et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circulat Res*, 2000, 86(3):347-354.

编撰交流:稿件提前发表问题

近年来,常有作者因各种原因,要求将已投稿件提前发表。鉴于本刊稿件发表周期较长,约需一年左右。目前本刊拟采用多种措施,缩短稿件发表周期,如再将部分稿件提前,会使正常稿件的周期更为延后。因此,

今后不拟作稿件提前处理。为照顾作者们的各种困难,我们可以为已定稿件写录用证明,或在发表前 4 个月之内写具体刊登期号的证明。希望作者们给予谅解和支持。