

川芎、当归、红花和人参萃取液对低切应力 环境下血管内皮细胞凋亡的影响

范柳 王素春 张旭静 黄久仪 王桂清

(上海市脑血管病防治研究所, 上海 200433)

摘要 目的:探讨川芎、当归、红花和人参萃取液对动脉粥样硬化的预防作用及其机制。方法:采用³H-胸腺嘧啶掺入率分析和 DNA 片段凝胶电泳测定,研究川芎、当归、红花和人参萃取液抑制体外培养的血管内皮细胞在低切应力环境下的增殖并阻止其凋亡的作用。结果:(1)处理 6 h 后,³H-胸腺嘧啶掺入率随剂量增加而逐渐下降,0.5% 浓度时³H-胸腺嘧啶掺入率下降已非常明显,达 40%,12 h 后趋于稳定。(2)在低切应力条件下,内皮细胞出现明显的 DNA 梯形带,在高切应力环境时,内皮细胞凋亡被抑制;给予 0.5% 的萃取液处理 2 h 后 DNA 梯形带消失。结论:川芎、当归、红花和人参萃取液可阻止低切应力环境下内皮细胞的凋亡。

关键词 血管内皮细胞;凋亡;川芎;当归;红花;人参;切应力

Effects of extract liquid of *Ligusticum chuanxiong*, *Angelica sinensis*, *tinctorius* and *Panax* on vascular endothelial cells under flow environment

FAN Liu, WANG Su-Chun, ZHANG Xu-Jing, HUANG Jiu-Yi, WANG Gui-Qing
(Shanghai Institute of Cerebral Vascular Diseases, Shanghai 200433)

Abstract Objective: To Investigate effect of extract liquid of *Ligusticum chuanxiong*, *Angelica sinensis*, *tinctorius* and *Panax* on prevention of atherosclerosis and the underlying mechanisms. Methods: Antiproliferation effect of extract liquid of *Ligusticum chuanxiong*, *Angelica sinensis*, *tinctorius* and *Panax* on vascular endothelial cells was determined by ³H-thymidine incorporation. Apoptosis of the extract liquid of *Ligusticum chuanxiong*, *Angelica sinensis*, *tinctorius* and *Panax*-treated cells was determined by DNA fragmentation analysis. Results: (1) After treatment with extract liquid for 6 h, ³H-thymidine incorporation decreased in vascular endothelial cells and the effects were time and dose dependent; ³H-thymidine incorporation decreased significantly at the concentration of 0.5%. After 12 h it went to stabilization. (2) Under the lower level shear stress DNA ladder appeared; Under the higher level shear stress it was inhibited. DNA ladder disappeared in DNA fragmentation analysis after 12 h treatment with 0.5% extract liquid under the lower level shear stress. Conclusion: Extract liquid of *Ligusticum chuanxiong*, *Angelica sinensis*, *tinctorius* and *Panax* may inhibit the apoptosis of vascular endothelial cells under the lower level shear stress of flow environment.

Key words vascular endothelial cells; apoptosis; *Ligusticum chuanxiong*; *Angelica sinensis*; *tinctorius*; *Panax*; shear stress

近几年的研究发现,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)斑块中有内皮细胞(endothelial cells, EC)的凋亡与坏死,而凋亡占主导地位,参与 AS 的形成过程^[1]。众所周知,AS 好发于血管分叉等低切应力区域。研究表明,血流产生的切应力抑制 EC 的凋亡,提示低切

应力是 AS 发生的机制之一。川芎、当归在中医临床上一直用于改善循环功能,有预防中风的作用^[2]。本文研究川芎、当归、红花、人参萃取液在低切应力环境下对血管内皮细胞的保护作用及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 内皮细胞培养^[3] 用胰酶和胶原酶混合消化法获取新生牛主动脉内皮细胞^[1],将其置于 M199 培养液(含 20% 小牛血清,青霉素 100 u/ml,链霉素 100 μg/ml),在 37℃,5% CO₂ 培养箱培养。原代或第 1 代内皮细胞接种于直径 24 mm 的经 Poly-L-lysine 处理的圆盖玻片上,3~5 d 待细胞形成单层,Ⅷ 因子染色阳性证实培养的细胞为内皮细胞后,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。

1.2 测试装置^[4] 内皮细胞切应力受力反应测试装置是由两个储液容器、一个蠕动泵和一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,能产生均匀一致的充分发展的平面流动。切应力 $\tau_w = 6\mu/\delta 2bQ$ (μ = 循环介质粘度, Q = 流量, δ = 矩形腔的高度, b = 矩形腔的宽度)。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。实验时,凡循环介质接触之物品经高压消毒,以防细菌污染。

1.3 ³H-胸腺嘧啶掺入率分析^[5] 将内皮细胞置于 96 孔培养板,每孔加 100 μl 细胞悬液,再加 74 kBq ³H-胸腺嘧啶(特异活性为 8.14 × 10¹² Bq/mol;中科院上海原子核研究所提供),作不同浓度川芎、当归、红花和人参萃取液对³H-胸腺嘧啶掺入率影响的剂量依赖性和时间依赖性分析。

1.4 DNA 片段的测定^[6] 取 10⁶ 个培养细胞,经 PBS 洗涤后加入细胞溶解液,4℃,10 min,高速离心,取上清液加入 2 μl RNase A (2.5 mg/ml)溶液 37℃ 孵育 1 h,再加入 2 μl 蛋白酶(2.5 mg/ml)37℃ 孵育 1 h,加入 5 mol/L NaCl 和异丙醇 - 20℃ 过夜,离心去除异丙醇,

加入 TE 缓冲液溶解 DNA,以 2% 琼脂糖凝胶电泳。依据³H-胸腺嘧啶掺入率分析的结果,本文取 0.5% 川芎、当归、红花和人参萃取液作为实验浓度,作用时间取 12 h,设高切应力组,给药预孵 + 低切应力 + 给药组,低切应力 + 给药组以及低切应力组。

2 结果

2.1 川芎、当归、红花和人参萃取液对内皮细胞³H-胸腺嘧啶掺入率的影响 如图 1 所示,经川芎、当归、红花和人参萃取液处理后的内皮细胞³H-胸腺嘧啶掺入率下降,并呈剂量和时间依赖性,萃取液处理 6 h 后,³H-胸腺嘧啶掺入率随剂量增加而逐渐下降。0.5% 与 0.1% 相比较,³H-胸腺嘧啶掺入率下降显著,达 40% ($P < 0.01$)。在 0.5% 剂量不变的条件下,随处理时间的延长³H-胸腺嘧啶掺入率先下降,12 h 后趋于稳定。当给予 1.0% 浓度的药液时,³H-胸腺嘧啶掺入率虽有进一步下降,但与 0.5% 浓度的药液相比较,无显著差异 ($P > 0.05$)。以上实验均重复 3 次。

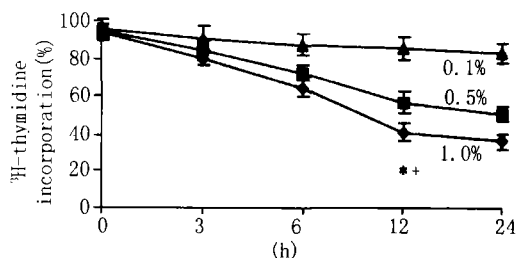


图 1 川芎、当归、红花和人参萃取液对³H-TdR 掺入率的影响

Fig 1 Effect of extract liquid of *Ligusticum chuanxiong*, *Angelica sinensis*, *tinctorius* and *Panax* on ³H-thymidine incorporation
* $P < 0.01$ vs 6 h; + $P > 0.05$ vs 0.5%

2.2 川芎、当归、红花和人参萃取液诱导内皮细胞凋亡的 DNA 片段分析 如图 2 琼脂糖凝胶电泳所示,在低切应力条件下,内皮细胞出现明显的 DNA 梯形带,而给予高切应力环境时,内皮细胞凋亡被抑制;若低切应力条件给予 0.5% 的川芎、当归、红花和人参萃取液,细胞凋

亡有所减少;而经药液预孵后在低切应力条件下给予0.5%的萃取液处理12 h, DNA 梯形带消失。

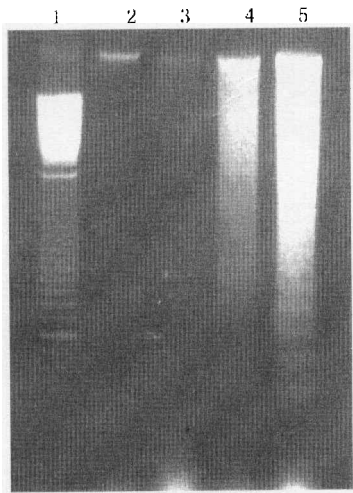


图2 DNA凝胶电泳分析川芎、当归、红花和人参萃取液对低切应力环境下内皮细胞的影响

Fig 2 DNA fragmentation analysis: effect of extract liquid of *Ligusticum chinensis*, *Angelica sinensis*, *tinctorius* and *Panax* on vascular endothelial cells under 5 dynes/cm² shear stress environment

1. DNA marker; 2. 20 dynes/cm²; 3. pro-incubation + 5 dynes/cm² + extracts; 4. 12.5 dynes/cm² + extracts; 5. 5.5 dynes/cm²

3 讨论

3.1 内皮细胞单层的稳定是血管内膜保持正常功能的前提。内皮细胞的分裂增殖速度在体外静态培养时比体内切应力环境中要快得多,在体内的切应力环境中,静脉内皮细胞的分裂速度比动脉快。主动脉内切应力水平低处的内皮细胞增殖率比切应力水平高处的内皮细胞高^[7]。这些现象提示流体流动产生的切应力抑制单层内细胞的分裂增殖,保持内膜的稳定性。内皮细胞分裂增殖的速度决定着内皮细胞衰老的快慢,与内皮细胞损伤修复及AS的发生有着十分密切的关系。

3.2 川芎、当归、红花和人参萃取液有改善微循环的功能。本研究表明此萃取液可有效地降低内皮细胞³H-胸腺嘧啶掺入率,表明细胞增殖受抑制,所以此萃取液可明显抑制内皮细胞增

殖,阻止内皮细胞过度增生,稳定血管内膜,从而防止AS的发生,且其效应呈剂量依赖和时间依赖关系。

3.3 细胞凋亡时最明显的特征是染色体DNA断裂成分子量为不同倍数的180~200 bp左右的片段,凝胶电泳分析时呈典型的梯形排列,本研究显示,在低切应力环境下内皮细胞12 h出现凋亡特征性改变,说明低切应力环境可诱发内皮细胞凋亡,凋亡的内皮细胞极易发生AS。而在低切应力环境下给予0.5%的川芎、当归、红花和人参萃取液,内皮细胞的凋亡有所减少;经药液预孵后在低切应力环境下给予0.5%的川芎、当归、红花和人参萃取液处理,则内皮细胞的凋亡几乎消失,其结果与高切应力环境下内皮细胞的状况相同,即内皮细胞无凋亡。因此,川芎、当归、红花和人参萃取液可阻止低切应力环境下内皮细胞的凋亡,提示该萃取液对AS可能有预防作用。

参考文献

- 1 钱冠清. 血管内皮细胞和动脉粥样硬化. 微循环学杂志, 2000, 10(4): 4-5.
- 2 范柳, 王春安, 钱国正, 等. 川芎、当归萃取液对实验性急性脑梗死大鼠行为学和脑组织损伤的影响. 中国临床药学杂志, 2002, 11(2): 81-83.
- 3 孙继虎, 汪洋, 于彦铮, 等. 血管内皮细胞的体外培养和形态学观察. 解剖学杂志, 1996, 19(3): 261-264.
- 4 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): 295-198.
- 5 Bu SZ, Yin DL, Ren XH, et al. Progesterone induces apoptosis and up-regulation of p53 expression in human ovarian carcinoma cell lines. Cancer, 1997, 79(10): 1944-1950.
- 6 Shi Y, Frankel A, Radvanyi LG, et al. Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. Cancer Res, 1995, 55(9): 1982-1988.
- 7 Levesque MJ, Sprague EA, Nerem RM. Vascular endothelial cell proliferation in culture and the influence of flow. Biomaterials, 1990, 11(9): 702-707.