

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.06.008

黄芪含药血清对血管紧张素 II 致内皮细胞凋亡的保护作用*

邱宇安¹, 陈火国², 李丽红², 靳文剑², 黄绍烈³

(1. 江西省肿瘤医院 ICU, 南昌 330029; 2. 江西省肿瘤医院内四科, 南昌 330029;

3. 南昌大学第一附属医院心内科, 南昌 330006)

摘要:目的 观察血管紧张素 II (Ang II) 对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的致凋亡效应及黄芪含药血清的保护作用。方法 将培养的 ECV-304 分为以下 3 组:(1)空白对照组;(2)Ang II 诱导组,使培养基中 Ang II 终浓度为 $0, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-4}$ mol/L,与细胞共孵育 18 h。MTT 法检测 Ang II 对 HUVECs 生长增殖的影响;流式细胞仪检测 Ang II 作用后内皮细胞凋亡率的变化;电子显微镜观察 Ang II 诱导后内皮细胞的超微结构特点;(3)黄芪含药血清干预组,培养基中加入不同浓度黄芪含药血清培养 24 h 后,加入 Ang II (1×10^{-4} mol/L)孵育 18 h,检测内皮细胞凋亡率的变化。结果 不同浓度的 Ang II 均能抑制内皮细胞生长增殖。不同浓度的 Ang II 均可显著诱导内皮细胞凋亡。透射电镜下可见 Ang II 诱导后内皮细胞的凋亡形态。黄芪含药血清抑制 Ang II 所诱导的内皮细胞凋亡。结论 黄芪含药血清具有内皮保护作用。

关键词:血管紧张素 II; 内皮细胞; 凋亡; 黄芪

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)06-0741-02

Protective effects of serum contained huangqi on endothelial cell apoptosis induced by angiotensin II *

Qiu Yu'an¹, Chen Huoguo², Li Lihong², Jin Wenjian², Huang Shaolie³

(1. Department of ICU, Jiangxi Cancer Hospital, Nanchang, Jiangxi 330029, China; 2. Department of Internal 4 Ward,

Jiangxi Cancer Hospital, Nanchang, Jiangxi 330029, China; 3. Department of Cardiology, the

First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To study Ang II induced apoptosis of HUVECs and to observe the protective effect of serum contained huangqi on endothelial cell. **Methods** ECV-304 cells were randomly divided into control group, Ang II group and huangqi group. In the control group, cells were cultured for 18 h, and the concentration of Ang II were 0 mol/L, 1×10^{-6} mol/L, 1×10^{-5} mol/L and 1×10^{-4} mol/L. The cell proliferation was measured by MTT assay. Electron microscope was used to observe the change of HUVECs. Ultrastructure of HUVECs induced by Ang II was observed by electron microscope. In the huangqi group, serum contained huangqi of different concentration were added into the medium and cultured for 24 h, then Ang II of 1×10^{-4} mol/L was included and cultured for 18 h, and the apoptosis ratio induced by Ang II was measured by flow cytometry. **Results** Ang II of different concentration could all significantly inhibit HUVECs proliferation. Ang II of different concentration could all induce endothelial cell apoptosis. HUVECs apoptosis was observed by electron microscope. HUVECs apoptosis induced by Ang II could be inhibited by serum contained huangqi. **Conclusion** Serum contained huangqi could protect endothelial cells.

Key words: angiotensin II; endothelial cell; apoptosis; huangqi

血管内皮细胞的损伤和功能障碍是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的启动环节。内皮细胞凋亡在 As 发生、发展过程中起重要作用^[1-2]。血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 是已知最强的缩血管活性物质之一,它有多种效应参与 As 进程^[3-5]。中药黄芪具有益气养血之功效,黄芪注射液在临床上可用于冠心病及糖尿病肾病的治疗^[6-7]。本课题旨在观察 Ang II 致内皮细胞凋亡效应及黄芪含药血清的内皮保护作用,探讨了 Ang II 与 As 发生的关系和黄芪含药血清的内皮保护效应。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器 黄芪(江西省中医院中药房);Wistar 大鼠(南昌大学实验动物科学部);人脐静脉内皮细胞株 ECV-304(中国科学院上海细胞生物研究所);AnnexinV-FITC/PI 试剂盒(美国 BD 公司);RPMI-1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);Ang II 原粉、MTT(美国 Sigma 公司);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);酶标仪(芬兰 Thermo bioanalysis 公司);流式细胞仪(美国 BeckmanCoulter 公司);Titachi H-600 电子显微镜(日本日立公司)。

1.2 黄芪含药血清的制备 将黄芪水煎煮并浓缩至生药 1g/

mL。20 只 Wistar 大鼠分入空白组、黄芪小剂量组、黄芪中剂量组和黄芪高剂量组。黄芪以成人临床日用量的大鼠等效剂量之 1、2、4 倍分别定义小、中、大剂量。每次灌药液 4 mL,空白组灌等量生理盐水。在 1 周内连续每天给药 2 次,于末次给药 2 h 后心脏取血。于 4 ℃ 静置 2 h,低温离心机 3 500 r/min 离心 15 min,分离血清。56 ℃ 恒温灭活补体 30 min 后,0.22 μm 微孔滤膜过滤,-20 ℃ 低温保存,备用。

1.3 实验分组 在 CO₂ 培养箱内,用 RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清)培养 ECV-304,0.25% 胰酶及 0.02% EDTA 用于消化传代细胞。接种 ECV-304 于细胞培养板,待细胞生长至亚融合状态,进行实验分组:空白对照组和 Ang II 组,各组培养基中 Ang II 终浓度分别为 $1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-4}$ mol/L,培养 18 h 后,检测各组细胞活力及凋亡率。黄芪含药血清实验:将细胞分为阴性对照组(不作任何处理),空白对照组(加生理盐水),黄芪含药血清小、中、大剂量组,培养基中加入不同浓度黄芪含药血清培养 24 h 后,再加入 Ang II (1×10^{-4} mol/L)孵育 18 h,检测该组内皮细胞凋亡率的变化。

1.4 MTT 法检测细胞活力 取出细胞培养板,小心弃去上清

* 基金项目:江西省卫生厅中医药基金项目(2011A061)。 作者简介:邱宇安(1977-),副主任医师,硕士,主要从事中医研究。

液, PBS 洗涤 2~3 次, 每孔加入 20 μL MTT(5 mg/mL), 在培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下培养 4 h。小心吸去孔内培养液。每孔加入 150 μL 二甲基亚砜。低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 在酶联免疫检测仪 490 nm 波长处测量各孔的吸光度值。

1.5 细胞凋亡检测 细胞消化收集后, 制成单个细胞悬液, 调整待测细胞密度为 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6/\text{mL}$, 取 1 mL 细胞用 PBS 离心洗涤, 1 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 共离心 3 次, 弃上清液。将细胞重悬浮于 200 μL 结合缓冲液。加入 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI, 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min。加入 300 μL 结合缓冲液, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.6 电镜观察 收集细胞, 离心沉淀后弃上清, 2.5% 戊二醛固定 3 h, 磷酸缓冲液清洗, 丙酮梯度脱水, 1% 四氧化锇固定 1.5 h, 树脂包埋后进行超薄切片, 经铀和铅双重染色后, 置于透射电镜下观察。

1.7 统计学处理 统计分析采用 SPSS13.0 软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用方差分析及 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Ang II 对内皮细胞增殖的影响 用 MTT 法检测细胞活力: 与空白对照组比较, 不同浓度的 Ang II 对内皮细胞增殖均有抑制作用, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。且随着 Ang II 浓度增加, 抑制作用越明显。见表 1。

表 1 Ang II 对内皮细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Ang II 浓度(mol/L)	吸光度值
0(空白对照组)	0.36 \pm 0.04
1×10^{-6}	0.22 \pm 0.02 ^a
1×10^{-5}	0.18 \pm 0.01 ^{ab}
1×10^{-4}	0.15 \pm 0.01 ^{ac}

^a: $P < 0.01$, 与空白对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 1×10^{-6} mol/L 比较; ^c: $P < 0.05$, 与 1×10^{-5} mol/L 比较。

2.2 Ang II 致内皮细胞凋亡效应 流式细胞仪检测不同 Ang II 浓度组内皮细胞凋亡率, 结果提示, 在 Ang II 作用下, 内皮细胞的凋亡率明显增加。与空白对照组比较, 差异有统计学意义, 且 Ang II 浓度越高, 内皮细胞凋亡率越高, 见表 2。

表 2 Ang II 诱导内皮细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s$, %)

Ang II 终浓度(mol/L)	内皮细胞凋亡率
0(空白对照组)	8.32 \pm 1.24
1×10^{-6}	26.47 \pm 3.58 ^a
1×10^{-5}	28.83 \pm 3.82 ^a
1×10^{-4}	34.32 \pm 4.27 ^{ab}

^a: $P < 0.01$, 与空白对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 1×10^{-5} mol/L 比较。

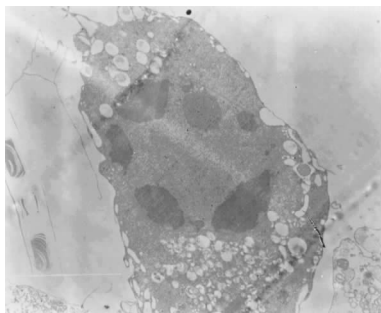


图 1 电镜下凋亡内皮细胞超微结构(透射电镜 $\times 8000$)

2.3 电镜下凋亡内皮细胞超微结构的观察 内皮细胞经 Ang

II 诱导后, 见细胞膜完整, 细胞质浓缩, 细胞核染色质浓缩、边聚, 呈团块状, 表现为凋亡改变, 见图 1。

2.4 黄芪含药血清对 Ang II 诱导内皮细胞凋亡的影响 不同浓度黄芪含药血清培养 24 h 后, 加入 Ang II (1×10^{-4} mol/L) 孵育 18 h, 流式细胞检测。结果表明, 不同浓度的黄芪含药血清均可使 Ang II 所致的内皮细胞凋亡率明显下降。提示黄芪含药血清有内皮细胞保护作用, 见表 3。

表 3 黄芪含药血清对 Ang II 诱导内皮细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	凋亡率
阴性对照组	34.32 \pm 4.27
空白对照组	32.84 \pm 3.32
黄芪含药血清小剂量组	26.56 \pm 3.08 ^a
黄芪含药血清中剂量组	22.02 \pm 2.64 ^{abc}
黄芪含药血清大剂量组	20.83 \pm 2.18 ^{abd}

^a: $P < 0.01$, 与阴性对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与空白对照组比较; ^c: $P < 0.05$, ^d: $P < 0.01$, 与黄芪含药血清小剂量组比较。

3 讨 论

血管内皮细胞位于血液与血管组织之间。它能合成和分泌多种活性物质, 实现复杂的生理功能。主要包括调节血管张力及血压水平、维持凝血和纤溶系统的动态平衡、调节炎症细胞的趋化、黏附和聚集等^[8-9]。血管内皮细胞的损伤将有利于单核细胞的趋化迁移和脂质的沉积, 导致 As 的发生。本研究证实 Ang II 可以通过诱导凋亡来产生抑制内皮细胞生长增殖的效应, 此结果与国外学者 Marampon 等^[10] 研究结果相一致。说明 Ang II 能通过诱导内皮细胞凋亡造成内皮细胞损伤参与 As 的发生、发展。

东汉《金匱要略》上即记载有方剂“黄芪桂枝五物汤”, 以黄芪为君药, 主治血痹之证。祖国医学认为, 黄芪具有益气固表、敛汗固脱、托疮生肌、利水消肿等功效^[11]。杨庆有等^[12] 证实黄芪可以减轻心肌钙超载损伤, 改善心肌的收缩和舒张功能。动物实验证实, 黄芪具有抗动脉粥样硬化的作用^[13]。黄芪注射液可能通过加强对氧自由基的清除, 维持血管内皮正常的功能^[14]。本研究从细胞凋亡的角度探讨了黄芪含药血清的内皮保护作用, 此前未见报道。过程中, 采用中药血清药理学研究方法, 将中药给大鼠灌服后, 用含有药物成分的血清进行体外实验, 更接近药物在体内作用的真实过程^[15]。相比直接使用中药粗制剂, 可信度更高。

本研究观察到 Ang II 所诱导的血管内皮细胞凋亡能被黄芪含药血清所抑制, 说明黄芪含药血清具有明确内皮保护作用。但黄芪成分复杂, 作用广泛。具体是哪种有效成分, 通过何种具体机制, 产生抗内皮细胞凋亡的效应, 有待于进一步深入研究与探讨。

参考文献:

- [1] Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, et al. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis[J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33 (9): 1673-1690.
- [2] Cui GM, Zhao YX, Zhang NN, et al. Amiloride attenuates lipopolysaccharide-accelerated atherosclerosis via inhibition of NHE1-dependent endothelial cell(下转第 745 页)

例肾部分切除伤术后 2 周因完全粘连性肠梗阻死亡。解剖发现其创面胶壳与周围肠道形成了复杂的粘连,致使部分肠段梗阻坏死。速效止血粉组 1 例贯通伤术后 1 周因尿血、尿潴留及全身感染死亡,解剖发现死亡原因是在建立贯通伤模型时伤及肾盂,速效止血粉未能有效止血,血液进入集合系统,继发上尿路梗阻及严重感染引起家兔死亡。速效止血粉组 2 例部分切除模型肾周出现较小的血肿,分析原因可能是形成的部分血凝块脱落,导致继发性出血。

生物胶喷涂在体内脏器表面,在 2~4 周降解吸收并排出体外。病理显示其在家兔肾脏创伤模型中的生物降解性较差,术后 1 个月生物胶被纤维结缔组织包绕,成盔甲样包裹伤口,易与肠道粘连,严重的粘连可造成肠道梗阻,甚至死亡,但同时保证了创面完整性、密封性,利于创口修复。因此,生物胶对于肾创伤的止血效果快速、稳定,在临床应用时应避免生物胶粘连到周围脏器,术后若出现肠梗阻症状应及时处理。

生物胶对肾创伤的止血效果显著,明显优于速效止血粉,术后出血及肠梗阻等并发症少见,伤口愈合好,值得进一步研究推广。

参考文献:

- [1] 李东升,王俭. 急诊骨折漏诊相关因素分析[J]. 中华现代外科学杂志,2008,5(2):121-123.
- [2] 王建,葛宝丰,刘兴炎,等. 战伤止血方法及材料研究进展[J]. 人民军医,2008,51(1):5-6.
- [3] Kheirabadi B. Evaluation of topical hemostatic agents for combat wound treatment[J]. US Army Med Dep J,2011,2(1):25-37.
- [4] 田霞,卢永顺. 福爱乐医用胶及其应用[J]. 国际外科学杂志,2006,33(2):74-80.
- [5] 刘洋,汪燕,李彦宏. 应用医用胶减少腹股沟疝无张力修补术后疼痛的分析[J/CD]. 中华疝和腹壁外科杂志:电子版,2013,7(4):376.

- [6] 曾健,乔岗,李建全,等. 角膜溃疡结膜遮盖手术中应用 α -氰基丙烯酸脂医用胶的研究[J]. 中华眼外伤职业眼病杂志,2013,35(7):526-528.
- [7] 兰永怀,隋小强,赵新昂,等. 急诊外伤伤口医用胶粘合 112 例临床观察[J]. 中国临床研究,2012,25(1):42.
- [8] Dubick MA. Current concepts in fluid resuscitation for prehospital care of combat casualties[J]. US Army Med Dep J,2011,2(1):18-24.
- [9] 夏穗生,田霞,卢永顺. 新一代喷涂型福爱乐医用胶[J]. 临床外科杂志,2003,11(2):120-121.
- [10] Nathan F, Pursifull, Allen FM. Tissue glues and nonsuturing techniques[J]. Urology,2007,17(6):396-401.
- [11] Evans LA, Morey AF. Current applications of fibrin sealant in urologic surgery[J]. Int Braz J Urol,2006,32(2):131-141.
- [12] Griffith BC, Morey AF, Rozanski TA, et al. Central renal stab wounds: treatment with augmented fibrin sealant in a porcine model[J]. J Urol,2004,171(1):445-447.
- [13] 李东红,高华,李鹏熙,等. 几种止血材料对兔实质脏器创伤止血性能的比较[J]. 创伤外科杂志,2012,14(5):435-438.
- [14] 余雪松,黄赤兵,张银甫,等. 多孔止血淀粉在肾脏中止血效果的初步实验研究[J]. 重庆医学,2008,37(14):1520-1521.
- [15] Arakaki Y. Editorial comment to management trends, angioembolization performance and multiorgan injury indicators of renal trauma from Japanese administrative claims database[J]. Int J Urol,2012,19(6):564.

(收稿日期:2014-08-07 修回日期:2014-11-10)

(上接第 742 页)

- apoptosis[J]. Acta Pharmacol Sin,2013,34(2):231-238.
- [3] Schmidt-Ott KM, Kagiya S, Phillips MI. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis [J]. Regul Pept,2000,93(1/3):65-77.
- [4] Takayanagi T, Eguchi A, Takaguri A, et al. A repressor protein, Mnt, is a novel negative regulator of vascular smooth muscle cell hypertrophy by angiotensin II and neointimal hyperplasia by arterial injury[J]. Atherosclerosis,2013,228(1):90-93.
- [5] Wang Y, Tikellis C, Thomas MC, et al. Angiotensin converting enzyme 2 and atherosclerosis[J]. Atherosclerosis,2013,226(1):3-8.
- [6] 王光浩,张敬芳,张学福,等. 黄芪注射液对冠心病患者胰岛素、血糖和血脂水平的影响[J]. 中国动脉硬化杂志,2011,19(3):263.
- [7] 郑坤. 氯沙坦钾联合黄芪注射液治疗早期糖尿病肾病的临床分析[J]. 重庆医学,2013,42(11):1231-1232.
- [8] Kluge MA, Fetterman JL, Vita JA. Mitochondria and endothelial function[J]. Circ Res,2013,112(8):1171-1188.
- [9] Ntaios G, Gatselis NK, Makaritsis K, et al. Adipokines as mediators of endothelial function and atherosclerosis[J].

Atherosclerosis,2013,227(2):216-221.

- [10] Marampon F, Gravina GL, Scarsella L, et al. Angiotensin-converting-enzyme inhibition counteracts angiotensin II-mediated endothelial cell dysfunction by modulating the p38/SirT1 axis [J]. J Hypertens,2013,31(10):1972-1983.
- [11] 闫凌云. 黄芪多糖对糖尿病肾病防治机制的研究进展[J]. 医学综述,2012,18(11):1727-1729.
- [12] 杨庆有,陆曙,孙慧茹. 黄芪对慢性心力衰竭患者心功能与血清肿瘤坏死因子水平的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2010,30(7):699-701.
- [13] 张俊峰,高振华,张桂英,等. 黄芪三七有效成分配伍抗动脉粥样硬化作用的实验研究[J]. 山西中医,2008,24(10):44-45.
- [14] 李绚,阎蓉华,罗照田,等. 黄芪注射液对人脐静脉血管内皮细胞的增殖作用[J]. 华西药学杂志,2005,20(1):48-49.
- [15] 王洪武,倪青,林兰. 中药含药血清的研究进展及其在中医学中的应用[J]. 北京中医药,2008,27(9):698-701.

(收稿日期:2014-10-15 修回日期:2014-12-10)