

绿谷灵芝抑制低密度脂蛋白的氧化及单核细胞对内皮细胞的粘附作用^{*}

张红梅¹ 姚伟娟² 田辉凯¹ 林志彬¹ 李学军¹

内容提要 目的 采用血清药理学方法研究绿谷灵芝对低密度脂蛋白(LDL)氧化作用的影响,以及对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)和晚期糖基化终末产物(AGE)诱导的单核细胞内皮细胞粘附作用的影响。方法 通过检测培养上清中硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)的生成表示含药血清对 LDL 的氧化作用,用白细胞髓过氧化物酶法测定单核细胞对内皮细胞的粘附作用。结果 0.12g/kg 绿谷灵芝一次给药组 0.5h、1h、2h、3h,两次给药 0.5h、1h 取血分离得到的血清对 LDL 氧化作用无明显影响,两次给药 2h、3h 以及 0.12g/kg、0.24g/kg、0.72g/kg 绿谷灵芝连续给药 10 天后,取血分离得到的血清均可降低 LDL 的氧化作用($P < 0.05$)。0.24g/kg、0.72g/kg 绿谷灵芝连续给药 10 天后,取血分离得到的血清均可抑制由 ox-LDL 和 AGE 诱导的单核细胞对内皮细胞的粘附作用($P < 0.05$)。结论 绿谷灵芝含药血清能显著降低 LDL 的氧化作用,减轻由 ox-LDL 和 AGE 诱导的单核细胞对内皮细胞的粘附作用。

关键词 绿谷灵芝 血清药理学 低密度脂蛋白 晚期糖基化终末产物

Effect of Lugu Ganoderma Lucidum on Low-density Lipoprotein Oxidation and Monocyte Adhesion to Endothelium ZHANG Hong-mei, YAO Wei-juan, TIAN Hui-kai, et al *Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing (100083)*

Objective: To study the effect of Lugu Ganoderma Lucidum (LGL) on low-density lipoprotein (LDL) oxidation and monocyte adhesion to endothelium (AdM-E) induced by oxydative LDL and advanced glycosylation endproducts (AGE) by using serum pharmacological technique. **Methods:** LDL oxidation was determined by measuring the thiobarbituric acid reactive substances in the supernatants, and AdM-E was determined by measuring myeloperoxidase activity of adherent monocyte. **Results:** Serum derived from rats 0.5 hrs, 1 hr, 2 hrs, 3 hrs after LGL administering 0.12 g/kg once and 0.5 hrs, 1 hr after LGL administering twice showed no significant effect on LDL oxidation, but the serum from rats 2 hrs, 3 hrs after LGL 0.12 g/kg administering twice or from rats after 10 successive days LGL administering in dose of 0.12 g/kg, 0.24 g/kg and 0.72 g/kg, all could lower the LDL oxidation ($P < 0.05$). Besides, the serum from rats with 10 days LGL administering of all dosages also could inhibit AdM-E induced by AGE ($P < 0.05$), and those of 0.24 g/kg and 0.72 g/kg could inhibit AdM-E induced by oxydative LDL ($P < 0.05$). **Conclusion:** LGL could decrease LDL oxidation and AdM-E induced by AGE or oxydative LDL.

Key words Lugu Ganoderma lucidum, serum pharmacology, low-density lipoprotein, advanced glycosylation endproducts

越来越多的研究表明氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)在糖尿病相关的动脉粥样硬化形成中起着重要作用。低密度脂蛋白(LDL)一经氧化易于粘附于内皮细胞并迁徙于内皮细胞下,被巨噬细胞吞噬后形成泡沫细胞,同时 ox-LDL 还具有细胞毒性,诱导局部血管细胞释放细胞因子,直接作用于单核细胞,刺激单核细

胞粘附于内皮细胞。最近的研究表明晚期糖基化终末产物(AGE)的积聚也参与了糖尿病相关的动脉粥样硬化的形成。AGE 修饰蛋白与细胞膜上特异受体结合以后,可增加细胞氧化及 ox-LDL 的产生,最终增加单核细胞对内皮细胞的粘附^[1]。

灵芝是一种具有广泛药理作用的中药,绿谷灵芝在临床上主要用于调节机体平衡。有研究表明灵芝提取物可清除氧自由基,降低脂质过氧化物的生成^[2]。本实验通过血清药理学的方法研究绿谷灵芝含药血清

^{*} 国家自然科学基金(No. 39770286)

1. 北京大学医学部药理学系(北京 100083) 2. 北京大学医学部血液流变学研究中心

在内皮细胞体系中对 LDL 氧化的影响以及对 ox-LDL 和 AGE 诱导的单核细胞对内皮细胞粘附作用的影响, 以期治疗糖尿病血管并发症提供一种新的、有效的治疗手段。

材料与方法

1 材料

1.1 药物和试剂 绿谷灵芝由绿谷集团提供, 含 20% 灵芝孢子粉和 70% 灵芝精粉; RPMI-1640、胰酶、胎牛血清购自 Gibco 公司; 人糖化白蛋白和 LDL 购自 Sigma 公司; 1, 1, 3, 3-四乙氧基丙烷为 Merk 公司产品; 淋巴细胞分离液、二盐酸邻联茴香胺和硫代巴比妥酸为北京化学试剂公司产品。

1.2 动物 SD 大鼠, 雌雄兼用, 体重 250 ~ 350g, 由北京国家计划生育委员会计划生育研究所动物中心提供。

2 方法

2.1 中药血清制备 取大鼠 36 只, 随机分为 4 组, 对照组(3 只) 0.12g/kg、0.24g/kg、0.72g/kg 绿谷灵芝 3 个剂量组各 3 只, 连续给药 10 天, 末次给药后 2h 取血 3 000r/min 离心 15min, 分离血清, 过滤灭菌, 56℃ 30min 灭活, -80℃ 保存备用。0.12g/kg 绿谷灵芝给药组又分为两个给药方案组, 即给药 1 次, 或间隔 2h 再给药 1 次, 各给药方案组于给药后 0.5h、1h、2h、3h 取血 3 000r/min 离心 15min, 分离血清, 过滤灭菌, 56℃ 30min 灭活, -80℃ 保存备用。在研究含药血清作用时, 用 PBS 洗 2 次, 96 孔板每孔加入 200μl 无血清 RPMI-1640, 然后加入不同时间、不同浓度含药血清, 使其终浓度达 5%。

2.2 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)培养 HUVEC 购自北京大学肿瘤研究所, 复苏后的 HUVEC 接种于细胞培养瓶中, 培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640, 待细胞长满瓶底以后, 弃培养液, 用 PBS 轻轻洗 2 次, 加入 0.25% 的胰蛋白酶消化 4~5min, 吸出胰酶, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液终止消化, 用吸管吹打, 使细胞完全分散, 倒置显微镜下观察计数, 调整细胞数为 5 × 10⁵/ml, 接种于 96 孔板中, 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 细胞生长融合后可用于实验。

2.3 LDL 的氧化修饰和 ox-LDL 的测定 参照文献⁽²⁾方法进行。在含有 3μmol/L CuSO₄ 不含胎牛血清的 RPMI-1640 中加入 100μg/ml LDL, 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 20h, 终浓度为 0.04% 的 EDTA 终止反应。通过检测培养上清中脂质过氧化终产物丙二醛

与硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)的生成量表示含药血清对 ox-LDL 的氧化作用。在 100μl 培养上清中加入 1% 三氯醋酸、0.6% 硫代巴比妥酸 1ml、100μl 双蒸水, 混合物在 100℃ 水浴中放置 30min, 自来水冲洗冷却后, 读取 532nm 处的光密度值。用新鲜配置的 1, 1, 3, 3-四乙氧基丙烷(TEP)制作标准曲线。

2.4 单核细胞分离及单核细胞对内皮细胞的粘附检测 参照文献⁽³⁾方法进行。用新鲜分离的单核细胞进行粘附检测。通过检测单核细胞中髓过氧化物酶活性来反应粘附于内皮细胞上的单核细胞的量。

3 统计学方法 组间比较采用方差分析。

结 果

1 绿谷灵芝含药血清对内皮细胞介导的 LDL 氧化修饰作用的影响 见表 1。将 LDL(100μg/ml)加入含有 3μmol/L CuSO₄ 不含血清的 RPMI-1640 中 37℃ 孵育 20h 后发现, 在内皮细胞培养上清中 TBARS 含量[(0.63 ± 0.07)nmol/100μl]显著高于无细胞情况下 TBARS 含量[(0.46 ± 0.04)nmol/100μl, P < 0.01]。0.12g/kg 绿谷灵芝给药组又分为两个给药方案组, 其中 1 次给药后不同时间取血分离得到的含药血清均无降低 LDL 氧化作用, 两次给药(间隔 2h)后不同时间点取血分离得到的含药血清对 LDL 氧化作用的影响与取血时间有关。经过与上述相同的处理方法可发现 0.12g/kg、0.24g/kg、0.72g/kg 绿谷灵芝给药 10 天后分离得到的含药血清均可降低 LDL 的氧化作用(见图 1)。

表 1 0.12g/kg 绿谷灵芝给药所得含药血清对 LDL 氧化作用的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别				给药次数	取血时间	样本数	TBARS 含量 (nmol/100 μ l)			
对 照							4	0.6292 $\pm$ 0.0750		
无药血清							4	0.5731 $\pm$ 0.0390		
含药血清							1 次	0.5h	4	0.6439 $\pm$ 0.0797
								1h	4	0.6401 $\pm$ 0.0559
								2h	4	0.6203 $\pm$ 0.0537
								3h	4	0.6572 $\pm$ 0.0603
							2 次	0.5h	4	0.5701 $\pm$ 0.0558
								1h	4	0.5980 $\pm$ 0.0947
								2h	4	0.4726 $\pm$ 0.0511 *
								3h	4	0.3607 $\pm$ 0.0591 *

注: 与对照组比较, * P < 0.05

2 绿谷灵芝含药血清对 ox-LDL 诱导的单核细胞粘附作用的影响 见图 2。与未加 LDL 组相比, 加入 LDL 后, 粘附的单核细胞增加了 42%。加入无药血清和 0.12g/kg 绿谷灵芝含药血清后, 粘附的单核细胞无降低, 而 0.24g/kg 和 0.72g/kg 绿谷灵芝的含药

血清均可显著降低 LDL 氧化所引起的单核细胞对内皮细胞的粘附作用。

3 绿谷灵芝含药血清对人糖化白蛋白诱导的单核细胞粘附作用的影响 见图 3。与未加糖化白蛋白组(对照组)比较,加入糖化白蛋白后,粘附的单核细胞增加了 1.45 倍,加入 0.12g/kg、0.24g/kg 和 0.72g/kg 绿谷灵芝的含药血清均可显著降低糖化白蛋白诱导的单核细胞粘附作用,无药血清则无此作用。

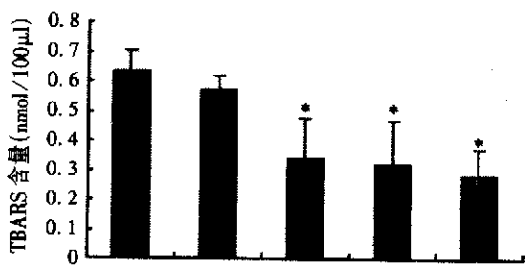


图 1 绿谷灵芝含药血清在内皮细胞体系中对 LDL 氧化作用的影响

注 1 为对照组 2 为无药血清组 3 为 0.12g/kg 含药血清组 4 为 0.24g/kg 含药血清组 5 为 0.72g/kg 含药血清组。与对照组比较, * $P < 0.05$ 下同

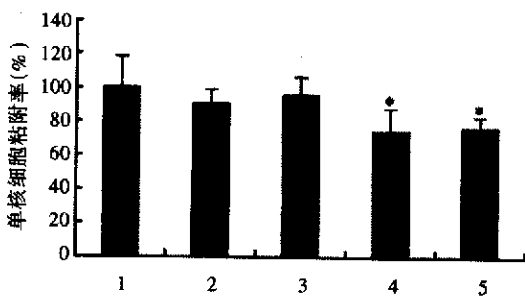


图 2 绿谷灵芝含药血清对 ox-LDL 诱导的单核细胞粘附作用的影响

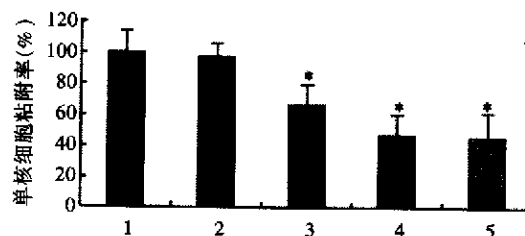


图 3 绿谷灵芝含药血清对糖化白蛋白诱导的单核细胞粘附作用的影响

讨 论

在糖尿病患者体内,单核细胞粘附于内皮细胞作用增强可能与 2 型糖尿病患者加速发展的动脉粥样硬化有关⁽⁴⁾,而可能影响单核粘附作用的主要代谢因素包括 ox-LDL 和 AGE。在高血糖和高血脂等病理因素

作用下,体内超氧化物歧化酶活性降低,氧自由基生成增多,易于发生脂质过氧化作用,产生的脂质过氧化物将 LDL 修饰形成 ox-LDL,ox-LDL 可激活血管内皮细胞核转录因子(NF- κ B)以及诱导或上调细胞粘附分子的表达,导致单核粘附内皮增多。AGE 是长期高血糖情况下蛋白质的非酶糖化产物,在本实验中使用的 AGE 是人糖化白蛋白。糖化白蛋白与内皮细胞上的特异受体结合后,导致细胞氧化增加,通过氧化敏感机制激活 NF- κ B,一些细胞因子,如细胞间粘附分子-1(ICAM-1)和血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)等产生增多⁽⁵⁾,导致单核细胞粘附内皮细胞增多。因此,通过降低脂质过氧化物的生成和抑制,由 ox-LDL 和 AGE 诱导的单核细胞对内皮细胞的粘附作用,可望减轻糖尿病血管并发症。

本实验采用中药血清药理学的方法探讨了中药绿谷灵芝对脂质过氧化物生成和淋巴细胞粘附作用的影响。在收集血清时,采用了不同剂量和不同时间点的含药血清,以期在实验方法学上也有进一步的探索。实验结果表明绿谷灵芝含药血清可降低内皮细胞介导的 LDL 的氧化作用。在本实验中,LDL 的氧化是由 Cu^{2+} 诱导,所以含药血清的抗氧化作用可能与金属螯合作用有关。有人曾研究了在红细胞体系中灵芝组分灵芝多糖的抗脂质过氧化作用⁽²⁾,表明其作用主要是由清除氧自由基引起的。灵芝多糖是绿谷灵芝中的主要组分,所以本实验中的抗氧化作用与清除氧自由基有关。

内皮细胞诱导的 LDL 的氧化是单核细胞粘附作用增高的主要原因之一,本实验中绿谷灵芝含药血清可抑制 LDL 修饰后诱导的单核细胞对内皮细胞的粘附,此结果表明这种抑制作用部分是由其抗氧化作用引起的。根据文献报道,LDL 诱导的单核细胞粘附是内皮细胞表面释放的粘附分子的作用结果,本实验中绿谷灵芝抗单核细胞粘附作用是否与粘附分子有关还有待进一步研究。以往的研究表明糖化白蛋白通过氧化应激机制介导淋巴细胞粘附与内皮细胞,本实验中绿谷灵芝的含药血清可显著降低糖化白蛋白诱导的单核细胞对内皮细胞的粘附,此作用也可能与其抗氧化作用有关。

在本研究中,绿谷灵芝分为 3 个剂量组,其中 0.12g/kg 剂量组又分为两个给药方案,一次给药 0.5h、1h、2h、3h 均无作用,说明血药浓度低,血清中有效成分含量太少,间隔 2h 两次给药后,0.5h、1h 取血分离得到的含药血清无显著抗氧化作用,而 2h、3h 取血分离得到的血清有显著作用。在研究单核细胞粘附

作用时发现 0.24g/kg、0.72g/kg 剂量组给药 10 天所得血清可显著降低 ox-LDL 诱导得单核细胞的粘附作用,对于 AGE 诱导的粘附作用,3 个剂量组均有显著抑制作用,这种作用除了和含药血清中有效成分增多有关,是否还与其他因素如血清中某些活性物质的影响有关,还有待于进一步研究。

参 考 文 献

1. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, et al. Advanced glycation end products interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecular-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. J Clin

Invest 1995 9(9):1395—1403.

2. 林志彬. 灵芝的现代研究. 第 2 版. 北京:北京医科大学出版社, 2001:271—272.

3. Genevieve Renier, Anne-Celle Desfaits, Omai Serri. Gliclazide decrease low-density lipoprotein oxidation and monocyte adhesion to the endothelium. Metabolism 2000 49(2):17—22.

4. Desfaits AC, Serri O, Renier G. Normalization of plasma lipid peroxides, monocyte adhesion and tumor necrosis factor- α production in NIDDM patients after gliclazide treatment. Diabetes Care 1998 21(1):487—493.

5. Haller H, Schaper D, Ziegler W, et al. Low-density lipoprotein induces vascular adhesion molecular expression on human endothelial cells. Hypertension 1995 25(1):511—516.

(收稿 2001-09-21 修回 2002-01-30)

· 书刊评介 ·

《医用中药饮片学》评价

李英林

由中国中医研究院中药所中药炮制研究室原思通研究员主编的《医用中药饮片学》,近期已由北京人民卫生出版社正式出版,这是中医药界的一件喜事。

中药包括中药材、中药饮片和中成药三大部分,中药材是中药饮片的原料。中医临证用以防病治病的药物是中药汤剂和中成药,而汤剂和中成药的原料就是由中药材制成的中药饮片,并非中药材。当前临床使用的“中药配方颗粒”,其原料同样是中药饮片。中医治病的最大特点是辨证论治,运用四诊八纲辨证分析,从而确定治疗原则和方法,最后就是遣药组方,这就是中医临床诊治疾病的“理→法→方→药”全部过程。其中组方所用药物就是根据中医辨证施治要求,经过炮制(减毒、改变药性、增效)的中药饮片,从而体现中医临证“饮片入药,生熟异治”的最大用药价值和一大特色。

20 世纪 50 年代以来,我国的中医药教育事业蓬勃发展,学科分化越来越细,医药工作者专业化程度不断提高,因而学科之间应加强沟通和交流,医药紧密结合,重视中药生熟饮片的炮制和运用,使之更大限度地提高临床疗效。

原思通研究员 40 年来一直从事中药炮制教学和科研工作,为中药炮制学科倾注全部心血,积累了丰富的炮制经验和学术体会,根据我国当前中医临证用药及对中药饮片知识的需要,以沟通医药为目的,主编出版了《医用中药饮片学》。全书

分上篇总论和下篇各论两大部分。总论设绪言、中药炮制概要、炮制对中药饮片化学成分的影响、中药饮片的性能、中药饮片的用法和中药饮片的管理等六章,系统阐述了中药饮片的有关理论和知识。各论部分按经典的功效分类方法,设解表药、清热药等 20 章。每味中药均设药材来源、炮制原义、饮片名称、性能叙要、炮制作用、应用要点、用法用量、注意事项和相关研究等 9 项。在相关研究中分别介绍了每味中药的化学成分、药理作用、炮制原理及临证应用等方面的科研成果。全书涵盖 280 种常用中药的 600 余种生熟饮片,不仅将中药饮片学作为一门应用学科首次提出,而且是一本具有科学性强、实用性大和有效性高的中医教学和临床工作者的必备参考书。我作为一名终生从事中医教育及临床研究的科学工作者,对《医用中药饮片学》的出版表示由衷的祝贺。

当然,正如作者在前言中所述《医用中药饮片学》并非尽善尽美之作。例如 1995 年版统编教材《中药学》中收载中药 426 种,而本书仅载 280 种中药,尚有常用或不常用的药物未被收纳。个别中药饮片的辨证遣用方法各家可能会有不同经验。从查阅方面考虑,如能在书末增加“中药饮片名索引”和“治验索引”,将给本书读者提供方便等等,我也希望广大中医工作者在阅读本书的同时,多提宝贵意见,帮助作者修订完善,以丰富中医药宝库,为发展中医药事业做出贡献。

(收稿 2001-12-31)

北京中医药大学附属东直门医院(北京 100700)