

· 实验研究 ·

丹参酚酸 B 镁对自由基损伤人主动脉内皮细胞的影响

张知新¹ 高福云² 李克明² 潘琳² 董晞² 陈玉武² 孙瑞娟²

摘要 目的 研究丹参水溶性成分——丹参酚酸 B 镁对人主动脉内皮细胞生长增殖的影响和对自由基损伤内皮细胞的影响,以进一步了解丹参酚酸 B 镁的心血管药理作用机理。方法 实验中使用第 3~6 代的人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cell, HAEC),采用形态学和 MTT 法观察不同浓度药物对细胞增殖的影响;采用葡萄糖-葡萄糖氧化酶造成的氧自由基损伤细胞模型观察药物的作用;透射电镜观察细胞超微结构的变化。结果 丹参酚酸 B 镁 1.0mg/ml 和 0.5mg/ml 两个剂量对 HAEC 有明显的细胞毒作用($P<0.01$)。低于 0.2mg/ml 的浓度对细胞增殖无不良影响;丹参酚酸 B 镁对自由基损伤细胞有明显的保护作用。电镜结果显示其可以保护线粒体等细胞超微结构。结论 丹参酚酸 B 镁对 HAEC 细胞毒性较低;对自由基损伤细胞有明显的保护作用。

关键词 丹参酚酸 B 镁;人主动脉内皮细胞;增殖;氧自由基

Effect of Magnesium Lithospermate B on Endothelial Cells in Human Aorta after Free Radical Injury ZHANG Zhi-xin, GAO Fu-yun, LI Ke-ming, et al *Department of Pediatrics, China-Japan Friendship Hospital, Beijing* (100029)

Objective To study the cardiovascular effects of magnesium lithospermate B (MLB), a water soluble extract from red sage root, on human aortic endothelial cells (HAECs) proliferation and in treating free radical injured endothelial cells, so as to further understand the cardiovascular pharmacological mechanism of MLB. **Methods** HAECs of 3-6 passages were used in the experiment. MLB of different concentrations was used to treat the cells, and cell proliferation was observed using morphological and MTT method. The free radical injured model cell was made by glucose-glucose oxidase method for observing the effect of MLB on its microstructure by transmission electron microscopy. **Results** MLB in concentration of 1.0 mg/ml and 0.5 mg/ml had significant cytotoxicity ($P<0.01$), when its concentration was lower than 0.2 mg/ml, the drug showed no adverse reaction on cell proliferation. MLB showed significantly cell protective effect against free radical injury, the effect in protecting ultrastructure of cells, such as mitochondria, could be demonstrated in transmission electron microscopy. **Conclusion** MLB showed a low cytotoxicity on HAECs, it could obviously protect cells from free radical injury.

Key words magnesium lithospermate B; human aorta endothelial cell; proliferation; oxygen free radical

血管内皮细胞介于流动的血液和血管组织之间,构成一个完整的单层细胞屏障。它不仅具有屏障保护作用,抗凝、抗细胞黏附等功能,而且可以分泌多种活性物质参与人体的生理病理调节过程。内皮细胞的损伤和功能异常与多种疾病的发生相关,尤其在心脑血管

管疾病发病过程中起了重要作用,如动脉粥样硬化的形成,急性心脑血管事件、缺血/再灌、缺氧损伤等^[1]。因此筛选具有内皮细胞保护功能的药物,对于评价某些中药的药理作用机制和寻找新药有重要意义。

丹参是临床常用的活血化瘀类药物,从丹参中提取的有效成分主要有脂溶性和水溶性两类^[2]。本实验旨在研究水溶性成分——丹参酚酸 B 镁(magnesium lithospermate B,)对人主动脉内皮细胞(HAEC)生长增殖的影响和对自由基损伤内皮细胞的影响,以便进一步了解丹参酚酸 B 镁的药理作用,探讨丹参活性作用的物质基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30170241);中日友好医院科研基金资助项目

作者单位:1. 中日友好医院儿科(北京 100029) 2. 中日友好医院临床医学研究所

通讯作者:孙瑞娟, Tel: 010-64480868, E-mail: sunrj@mail.nsf.gov.cn 万方数据

材料和方法

1 药物和仪器 丹参酚酸 B 镁:由本院临床研究所药理室药化组提供。是从中药丹参中提取分离得到的单一成分,经 HPLC 分析测定其纯度 $>98.0\%$;实验前用生理盐水配成 10mg/ml 水溶液, 4°C 保存备用。人主动脉内皮细胞:通过北京清源生物公司购自美国 Cascade 公司(c-006-5c)。细胞培养液:M200,购自美国 Cascade 公司(M-200-500)。MTT:华美公司进口分装(13SO890)。葡萄糖氧化酶:为日本 Toyobo 公司产品(GLO-201)。6 孔和 96 孔细胞培养板:美国 Costar 公司产品。倒置相差显微镜:IMT-2,日本 Olympus 公司产品。DG3022 酶联免疫检测仪:第四军医大学与华东电子管厂联合制造。

2 细胞培养 实验中使用 HAEC 第 3~6 代的细胞,接种于 6 孔或 96 孔细胞培养板中。使用 M200 细胞培养液,置于细胞培养箱中,在 $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C 、饱和湿度的条件下培养。每 2 天更换培养液 1 次。传代时,使用 0.1% 的胰蛋白酶和 0.02% 的 EDTA 消化。

3 细胞增殖实验 取对数生长期细胞,用胰酶-EDTA 消化,制备细胞悬液,离心(500g , 8min)后,调整细胞浓度为 $3 \times 10^5/\text{ml}$,接种于 96 孔细胞培养板中, $200\mu\text{l}/\text{孔}$ 培养 48h。取新鲜配制,并以经 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过的高浓度丹参酚酸 B 镁溶液(10mg/ml 或 1mg/ml),依次加入实验各孔中,使丹参酚酸 B 镁终浓度分别为 1.0 、 0.5 、 0.2 、 0.15 、 0.1 、 0.08 、 0.05 和 0.03mg/ml ,总体积为 $200\mu\text{l}/\text{孔}$ 。对照孔加入等体积生理盐水(NS),以 M200 培养液作空白对照。继续培养 48h 后,取出作增殖实验。加药前后在倒置相差显微镜下观察记录细胞数量及形态的变化。培养完毕,每孔加入 5mg/ml 的 MTT $15\mu\text{l}$,继续培养 4h。再加入二甲亚砜(DMSO) $150\mu\text{l}$,置于 37°C ,作用 1h,充分溶解形成的甲 结晶(formazan)。在酶联免疫检测仪上测定光密度值(OD 值)。

4 自由基损伤实验 在上述增殖实验的基础上,进行葡萄糖-葡萄糖氧化酶造成的氧自由基损伤细胞模型实验,并观察丹参酚酸 B 镁的影响。选择 0.15 、 0.1 、 0.04 和 0.025mg/ml 浓度的丹参酚酸 B 镁,作为药物的观察浓度。(1)损伤前预处理实验组(预处理组)按上述细胞培养方法培养 HAEC 细胞 48h 后,加入不同浓度丹参酚酸 B 镁溶液,继续培养 24h。之后除去各孔内的上清液,每孔加入 $100\mu\text{l}$ 的用无血清 1640 培养液配制的 25mmol/L 的葡萄糖和 12.5mU/ml 的葡萄糖氧化酶,在细胞培养条件下作用 3h。作

用完毕,用 1640 培养液清洗各孔,然后加入 M200 细胞培养液继续培养 6h,用 MTT 法观察细胞存活情况。损伤实验前后使用倒置相差显微镜观察记录细胞数量及形态的变化。(2)损伤干预实验组(干预组)是为了比较药物的保护作用 and 药物本身对损伤作用的干预,采用氧自由基损伤实验同时加入上述不同浓度的丹参酚酸 B 镁的方法,观察细胞经 3h 氧自由基损伤和 6h 的恢复实验后的细胞存活情况。

5 透射电镜观察 用 2.5% 的戊二醛充分固定细胞,再用 1% 锇酸继续固定。细胞样品经梯度酒精逐级脱水后,用 Epon812 环氧树脂包埋, LKB 型超薄切片机切片后,用醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, H-600 透射电镜观察细胞超微结构的差异。

6 统计学方法 应用 SPSS 10.0 软件,采用 t 检验方法。

结 果

1 药物对 HAEC 细胞的毒性作用

1.1 倒置相差光学显微镜观察的结果 丹参酚酸 B 镁较高浓度即 1.0 和 0.5mg/ml 两个剂量对 HAEC 有明显的细胞毒作用,用药前后细胞在数量和形态方面有显著改变,用药 72h 可见在该浓度药物刺激下的细胞发生明显的皱缩、变形和脱落、漂浮现象,抑制作用随药物浓度增高而增强。在 0.2 、 0.15 、 0.1 和 0.08mg/ml 的浓度下细胞生长活跃,增殖数目似乎略高于对照组。 0.05 和 0.03mg/ml 浓度下细胞数目无明显改变。

1.2 MTT 结果 见表 1。与形态学观察基本一致。丹参酚酸 B 镁在 1.0 和 0.5mg/ml 两个浓度下对 HAEC 有明显的细胞毒作用($P < 0.01$)。在 0.2 、 0.15 、 0.10 、 0.08 、 0.05 和 0.03mg/ml 的浓度下测得的光密度值(OD 值)与 NS 组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1 丹参酚酸 B 镁对 HAEC 细胞的毒性作用 ($\bar{x} \pm s$)

丹参酚酸 B 镁 浓度(mg/ml)	n	光密度值 (OD 值)
0	8	0.25 ± 0.04
1.0	8	$0.16 \pm 0.03^*$
0.5	8	$0.16 \pm 0.04^*$
0.2	8	0.27 ± 0.02
0.15	8	0.25 ± 0.04
0.10	8	0.29 ± 0.03
0.08	8	0.21 ± 0.05
0.05	8	0.23 ± 0.04
0.03	8	0.26 ± 0.05
NS	8	0.26 ± 0.03

注:与 NS 比较, $^* P < 0.01$

2 药物对自由基损伤细胞的保护作用

2.1 形态学观察结果 自由基损伤模型细胞于损伤 3h 末出现明显脱落漂浮现象 损伤程度呈现时间依赖性的变化。0.15mg/ml 和 0.1mg/ml 浓度的丹参酚酸 B 镁对自由基损伤细胞有明显的保护作用。经此两个浓度的丹参酚酸 B 镁预先处理 24h 的 HAEC 可以明显抵抗自由基损伤造成的细胞皱缩、变形和脱落、死亡现象。在损伤后 6h 的恢复过程中,细胞基本恢复到损伤前的状态。用 0.04mg/ml 和 0.025mg/ml 浓度的丹参酚酸 B 镁预处理细胞,对 HAEC 细胞也有轻度保护作用。

2.2 MTT 结果 预处理组较高浓度的丹参酚酸 B 镁(0.15mg/ml 和 0.1mg/ml)预处理的 HAEC 细胞经 6h 恢复后显示的光密度值与对照组比较差异无显著性,见表 2。损伤干预组实验中选用的 0.025mg/ml 的最低浓度也可以明显增强 HAEC 细胞的抗自由基损伤能力,见表 3。

3 透射电镜观察结果 正常对照组 HAEC 细胞核呈圆形或椭圆形,核膜呈双层结构,核周间隙不大,核染色质分布均匀,胞浆内线粒体不肿大,内质网不扩张,细胞表面有较长的微绒毛(见图 1)。氧自由基损伤的 HAEC 细胞呈现核周间隙增大,核染色质凝聚,胞浆内有许多大小不等的空泡,细胞膜破损,失去连续性,表面无微绒毛等异常改变(见图 2)。自由基损伤

表 2 丹参酚酸 B 镁预处理对自由基损伤 HAEC 细胞的保护作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	丹参酚酸 B 镁浓度 (mg/ml)	光密度值 (OD 值)
自由基损伤对照	8	0	0.05 ± 0.03 **
预处理	8	0.15	0.19 ± 0.06
	8	0.1	0.24 ± 0.06
	8	0.04	0.15 ± 0.03 *
	8	0.025	0.12 ± 0.07 **
NS	8	0	0.21 ± 0.04

注:与 NS 对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 3 丹参酚酸 B 镁对自由基损伤 HAEC 细胞的干预作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	丹参酚酸 B 镁浓度 (mg/ml)	光密度值 (OD 值)
自由基损伤对照	0	0.19 ± 0.06 *
干预	0.15	0.29 ± 0.04
	0.1	0.28 ± 0.05
	0.04	0.30 ± 0.07
	0.025	0.29 ± 0.06
NS	0	0.26 ± 0.05

注:与 NS 对照组比较,* $P < 0.01$

实验同时加入丹参酚酸 B 镁 0.1mg/ml 的细胞,只显示出线粒体轻度肿胀,内质网轻度扩张的轻微改变(见图 3)。但是,在自由基损伤实验同时加入丹参酚酸 B 镁 0.04mg/ml 实验组,在损伤实验结束时,未经 6h 的恢复培养期,细胞显示核染色质凝聚,胞浆内有大小不等的空泡,部分线粒体空泡化(见图 4)。丹参酚酸 B

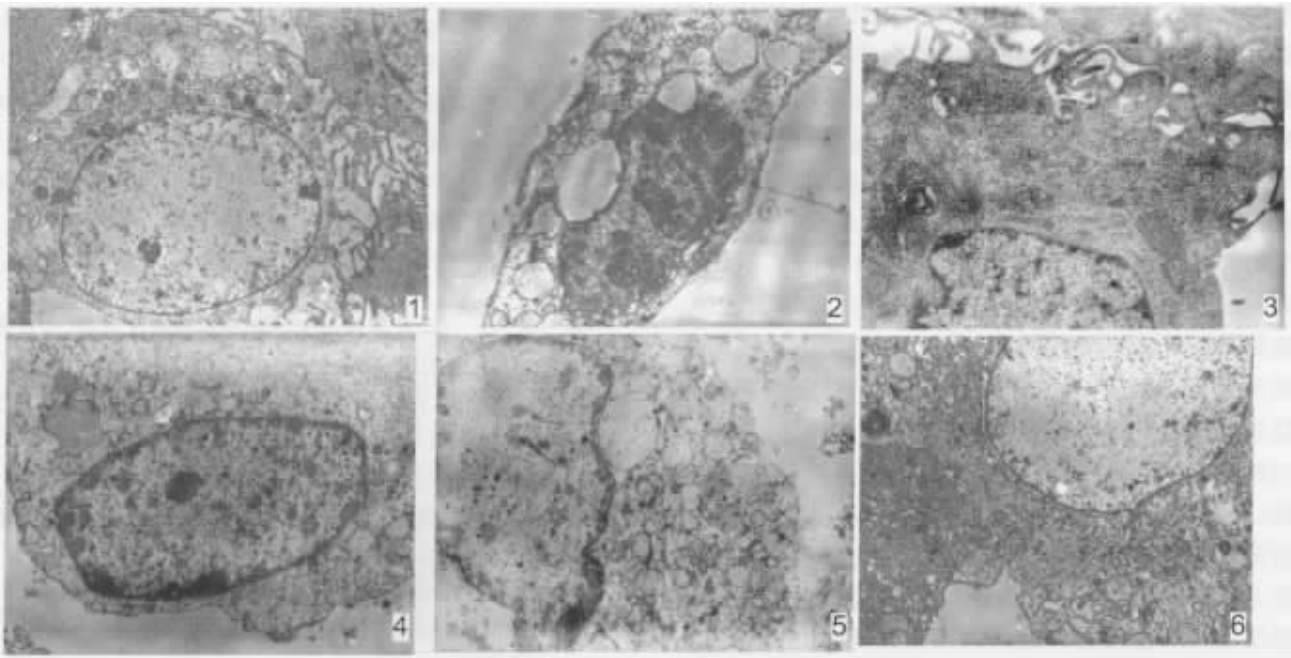


图 1 正常对照细胞($\times 5\,000$);图 2 氧自由基损伤细胞($\times 8\,000$);图 3 干预组细胞丹参酚酸 B 镁 0.1mg/ml($\times 10\,000$);图 4 干预组细胞,丹参酚酸 B 镁 0.04mg/ml($\times 8\,000$);图 5 预处理组细胞,0.1mg/ml 丹参酚酸 B 镁预处理细胞 24h,损伤 3h($\times 6\,000$);图 6 丹参酚酸 B 镁对照组细胞(单纯丹参酚酸 B 镁 0.1mg/ml, $\times 5\,000$)

镁 0.04mg/ml 预处理 24h,再经 3h 损伤的细胞呈现与图 4 类似的结果(见图 5)。单纯加入丹参酚酸 B 镁 0.1mg/ml 培养细胞 72h,细胞超微结构与正常对照组细胞没有明显差异(见图 6)。

讨 论

丹参酚酸 B 镁为丹参的水溶性成分,在丹参中含量较高,系多酚类化合物,在乙醇等有机溶剂中难于溶解。目前药理研究表明丹参的脂溶和水溶性两大类有效成分具有抗血小板聚集和抗血栓形成^[2],改善微循环作用^[3],抗氧化损伤和高脂损伤^[4,5],多途径发挥心肌、肝细胞保护作用^[6,7]和抗炎^[8]等多种作用。丹参酚酸 B 镁为丹参中的主要水溶性成分,它对血管内皮细胞,尤其是对人主动脉内皮细胞有何直接作用尚未见报道。

本研究发现丹参酚酸 B 镁对细胞的毒性较低,在较高的浓度下才可见细胞毒性反应,一般浓度范围内作用平缓,无细胞毒作用。药物对自由基损伤细胞的保护作用研究显示,0.15mg/ml 和 0.1mg/ml 浓度的丹参酚酸 B 镁对自由基损伤细胞有明显的保护作用。经此两个浓度的丹参酚酸 B 镁预处理 24h 的 HAEC 可以明显抵抗自由基损伤造成的细胞皱缩、变形和脱落、死亡现象。在损伤后 6h 的恢复过程中,细胞基本恢复到损伤前的状态。用 0.04mg/ml 和 0.025mg/ml 浓度的丹参酚酸 B 镁预处理细胞,对 HAEC 细胞也有轻度保护作用。结果还提示,在损伤实验同时加入丹参酚酸 B 镁,即使是 0.025mg/ml 的较低浓度也可以明显增强 HAEC 细胞的抗自由基损伤能力。透射电镜结果显示丹参酚酸 B 镁可以明显稳定细胞质膜,保护线粒体、内质网等细胞器的结构。至于在 0.1mg/ml 浓度的丹参酚酸 B 镁预处理细胞组和自由基损伤实验同时加入丹参酚酸 B 镁 0.04mg/ml 实验组的细胞,电镜结果显示细胞超微结构的改变,但 MTT 结果却与对照组无明显差异,原因在于 MTT 测定是在损伤后经过 6h 的恢复完成的。

因此,我们的实验结果证明了丹参酚酸 B 镁对 HAEC 仅有较低的毒性,只有在较高的浓度下才可见细胞毒性反应;另外在 0.15mg/ml 和 0.1mg/ml 的浓度下,丹参酚酸 B 镁对自由基损伤细胞显示有明显的保护作用。从损伤前预处理以及损伤同时加入药物干预两方面的实验均得到证明,较低浓度的丹参酚酸 B

镁(0.04mg/ml 和 0.025mg/ml)对 HAEC 细胞也显示了不同程度的保护作用。损伤前预处理细胞,可以轻度增强 HAEC 细胞抗自由基损伤的能力,但在有较低浓度的丹参酚酸 B 镁干预下进行自由基损伤实验,则可观察到明显的药物保护作用。丹参酚酸 B 镁的上述作用的机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Sun RJ, Muller S, Wang X, et al. Regulation of von Willebrand factor of human endothelial cells exposed to laminar flow: a study in vitro. Clin Hemorrhol Microcirc 2000;23:1—11.
- 2 胡小戎,曹凤梅.丹参的药理、临床应用与制剂研究.中国新医药 2003;2(6):54—55.
Hu XR, Cao FM. An investigation of dan-shen root pharmacology study, clinical application and preparation. China New Med 2003;2(6):54—55.
- 3 汤书晶,徐素贞.丹参在儿科领域的应用.儿科学杂志 2001;7(4):8—10.
Tang SJ, Xu SZ. Radix salviae miltiorrhizae clinical application on the pediatric field. J Pediat Pharm 2001;7(4):8—10.
- 4 陈向荣,陆京伯,石汉平.丹参的药理作用研究新进展.中国医院药学杂志 2001;21(1):44—45.
Chen XR, Lu JB, Shi HP. Development of study on the pharmacological action of Dan shen. J Chin Hosp Pharm 2001;21(1):44—45.
- 5 Ren DC, Du GH, Zhang JT. Effects of Salvianolic acids on endothelial cells against damage induced by cholestane-3b-5a-6b-triol. Chin Med J 2003;116(4):630—632.
- 6 高秀梅,张伯礼,宫涛,等.丹参及提取物对心血管系统药理作用研究进展.天津中医 2002;19(1):74—76.
Gao XM, Zhang BL, Gong T, et al. Development of study on the pharmacological action of Dan shen and its extract on cardiovascular system. Tianjin Tradit Chin Med 2002;19(1):74—76.
- 7 裴蕾,任英.丹参作用于肝脏的药理研究进展.中医学报 2002;30(1):57—58.
Pei L, Ren Y. Development of pharmacological study of Dan-shen on liver. J Tradit Chin Med Pharm 2002;30(1):57—58.
- 8 何山,马佐英.丹参药理作用研究进展.继续医学教育 2003;17(3):39—41.
He S, Ma ZY. Development of researches on the pharmacological action of radix salviae miltiorrhizae. Continuing Med Education 2003;17(3):39—41.

(收稿 2004-01-29 修回 2004-03-25)