

三七皂苷单体不同配伍对单核-内皮细胞黏附作用的影响

何翠瑶 李晓辉 何雪峰

(第三军医大学基础部新药研究室, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号, 400038)

[摘要] **目的** 研究三七皂苷不同单体及单体间两两配伍对人单核-内皮细胞黏附的影响及机制。 **方法** 三七皂苷单体及不同单体配伍处理内皮细胞后, 加入氧化低密度脂蛋白(ox-LDL), 以孟加拉玫瑰红活细胞染色法测定人单核细胞系 THP-1 与人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的黏附, 并用 ELISA 法测定内皮细胞黏附分子(ICAM-1)在 HUVECs 的表达水平。 **结果** ox-LDL 显著增强 THP-1 与 HUVECs 的黏附, 内皮细胞经单体 R_{g1}、R_{b1} 处理后, 明显抑制 ox-LDL 诱导的单核-内皮细胞黏附及 ICAM-1 在 HUVECs 的表达($P < 0.05$), R_{g1}:R_{b1}、R_{g1}:R_i、R_{b1}:R_i 配伍组对单核-内皮细胞黏附的抑制作用更为显著, 并能显著下调 ICAM-1 的表达($P < 0.01$)。 **结论** (1) 三七皂苷单体 R_{g1}、R_{b1} 为抑制黏附的有效单体, 单体 R_{g1}、R_{b1}、R_i 之间存在某种协同作用, 对 ox-LDL 诱导的单核-内皮细胞黏附发挥更显著抑制作用。(2) 单体 R_{g1}、R_{b1} 及有效单体配伍组合可能通过下调 ICAM-1 的表达抑制单核-内皮细胞黏附, 从而发挥血管内皮细胞的保护作用。

[关键词] 三七总皂苷; 血管内皮细胞; 单核细胞; 黏附反应

Effect of Different Combinations of Sanchinoside Monomers on Monocyte-Endotheliocyte Adhesion

HE Cui-yao, LI Xiao-hui, HE Xue-feng

(The Third Military Medical University, Chongqing 400038)

ABSTRACT **Objective** To study the effect and mechanism of different combinations of sanchinoside monomers on monocyte-endotheliocyte adhesion. **Methods** Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) was added to endotheliocytes processed by sanchinoside monomers and their different combinations. Then rose bengal staining was used to detect adhesion of human THP-1 monocytes to human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and enzymelinked immunosorbent assay was used to detect the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). **Results** Ox-LDL could enhance adhesion of THP-1 to HUVECs. After processed by R_{g1} and R_{b1}, monocyte-endotheliocyte adhesion and expression of ICAM-1 decreased significantly ($P < 0.05$), especially in combination groups such as R_{g1}:R_{b1}, R_{g1}:R_i, and R_{b1}:R_i ($P < 0.01$). **Conclusion** R_{g1} and R_{b1} can obviously inhibit monocyte-endotheliocyte adhesion induced by ox-LDL, especially in different combinations of R_{g1}, R_{b1} and R_i. R_{g1}, R_{b1} and their combinations could inhibit monocyte-endotheliocyte adhesion by down-regulating the expression of ICAM-1, which might be related to its protection effect on endotheliocytes.

Key Words Sanchinoside; Endotheliocyte; Monocyte; Adhesion

动脉粥样硬化(AS)是严重威胁人类健康和生命的心血管疾病,越来越多的证据表明,AS是一种炎症性疾病,血管内皮损伤是AS发生的先决条件及重要机制^[1]。氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)可引起主动脉内膜损伤,诱导各种黏附分子的表达,从而促进单核细胞与动脉内膜的黏附,迁移并吞噬脂质成为泡沫细胞,这些病理变化在人类动脉粥样硬化发生和发展中起到非常关键的作用^[2]。三七为活血化瘀代表中药,三七总皂苷(total saponins of panax notoginseng, PNS)为其主要成分,大量实验及临床研究证实对动脉粥样硬化具有较好疗效,其机制至少部分与调控炎症免疫反应有关^[3~5]。三七总皂苷含多种单体,何种单体及单体间协同具有抗AS炎症反应的效应少见报道。本文以体外

培养的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)为研究对象,以ox-LDL作为炎症诱导因素,观察某些三七皂苷单体及不同单体之间配伍对ox-LDL诱导的单核-内皮细胞黏附的抑制作用,探讨其抗动脉粥样硬化可能的分子机制。

1 材料

人来源单核细胞株 THP-1 (由第三军医大学分子生化教研室提供); I 型胶原酶(Roche 公司); M199 培养基(Gibicol 公司); 胎牛血清(Hyclone 公司); ECGS (Sigma 公司); ox-LDL (北京协和医科大学基础研究所提供); 鼠抗人 VIII 因子抗体(北京中山公司); 鼠抗人 ICAN-1 单抗(Santa Cruz 公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG (Santa Cruz 公司); 孟加拉玫瑰红(上海第三试剂厂); 三七总皂苷(云南植物研究所); 三七皂苷单体 R_i 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号:

110745-200516, 纯度 > 98%, 分子式: $C_{47}H_{80}O_{18}$, 相对分子质量: 933.14; 三七皂苷单体 R_{g1} 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110703-200322, 纯度 > 98%, 分子式: $C_{42}H_{72}O_{14} \cdot 2H_2O$, 相对分子质量: 830.03); 三七皂苷单体 R_{b1} 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110704-200322, 纯度 > 98%, 分子式: $C_{54}H_{92}O_{23}$, 相对分子质量: 1109.26); 三七皂苷单体 R_e 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110754-200320, 纯度 > 98%, 分子式: $C_{48}H_{82}O_{18}$, 相对分子质量: 947.12); 其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 HUVEC 的培养及鉴定

取健康正常产妇分娩胎儿的脐带, 75%乙醇擦拭脐带表面及断端, 剪去夹痕, 用 PBS 液冲洗静脉腔内残血, 灌入预热 0.1% I 型胶原酶使之充盈, 消化 15 分钟后, 收集消化液并用 D-hank' 液冲洗静脉, 合并两液, 以 1000 转/分钟离心 10 分钟, 弃上清, 以 M 199 完全培养基(含 20%胎牛血清、青霉素 100U/ml、链霉素 100U/ml、内皮细胞生长添加物 40 μ g/ml、肝素钠 20 μ g/ml) 重悬细胞后, 接种于培养瓶中, 置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱 24 小时。待细胞贴壁后, 换液 1 次, 去除悬浮的死细胞和红细胞, 以后每 2~3 天换液, 细胞长至亚融合后, 消化传代, 实验用第 3 代细胞。培养的细胞形态符合内皮细胞特征, 抗人 VIII 因子抗体免疫组化染色阳性。

2.2 单核细胞 THP-1 的培养

将 THP-1 细胞置于含 10%小牛血清的培养液中, 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养, 每周换液 2~3 次, 使细胞密度保持在 $(2\sim8) \times 10^6$ 个/L。瑞氏染色符合单核细胞形态, 伊红染色显示细胞活性 > 95%。

2.3 药液配置

将 PNS 及三七皂苷单体 R_{g1} 、 R_{b1} 、 R_1 、 R_e 分别溶于无血清培养基中, PNS 和单体的浓度分别配成 100mg/L 和 1 μ mol/L, 针式过滤器过滤后备用。

2.4 实验分组

将汇合至单层的原代 HUVEC 以 4×10^5 个/L 密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 培养 48 小时后, 将 HUVEC 分为: (1) 单体组: 加入 1 μ mol/L 的单体药液 100 μ L, 37℃培养 20 小时后, 加入 100 μ L 终浓度为 80mg/L 的 ox-LDL 继续培养 4 小时。(2) 单体配伍组: 4 个单体之间以 1:1 的比例两两配伍, 两单体在无血清培养基中的终浓度为 0.5 μ mol/L, 每孔加入 100 μ L, 处理同上。(3) PNS 组: 加入 100mg/L 的 PNS 溶液 100 μ L, 处理同上。(4) ox-LDL 组: 不加入单体或 PNS,

在无血清培养液作用 20 小时后, 加入终浓度为 80mg/L 的 ox-LDL 培养液作用 4 小时。(5) 正常对照组: 只加入无血清培养液。每组设 6 个复孔。

2.5 单核细胞-内皮细胞黏附实验

按上述分组处理生长良好的 HUVEC 24 小时后, 进行黏附实验。吸弃培养液, 每孔加入含有单核细胞 (5×10^6 /ml) 的培养液 100 μ L, 37℃、5%CO₂ 孵育 1 小时后, 用 PBS 洗去未黏附的单核细胞, 每孔加入 100 μ L 0.25% 的孟加拉玫瑰红(PBS 配制), 室温作用 10 分钟, 洗去游离孟加拉玫瑰红, 每孔加入 PBS-乙醇(1:1) 200 μ L, 室温 1 小时后, 酶标仪 570nm 波长测定各孔的吸光度(A 值)。单核细胞所摄取的染料在 PBS-乙醇作用下可释放出来, 每孔的 A 值与所黏附的单核细胞成正比, 最后用实验孔 A 值减去空白孔(未加单核细胞) A 值表示黏附值。

2.6 内皮细胞黏附分子(ICAM-1)表达的测定

将生长良好的内皮细胞接种于 96 孔板, 待细胞生长至良好状态时弃去原培养液, 按上述不同实验组处理, 孵育 24 小时后弃去培养液, PBS 洗涤, 进行 ELISA 实验。用 4%多聚甲于 4℃固定 40 分钟; 2%BSA-PBS 37℃封闭 1 小时; 1:200 鼠抗人 ICAM-1 单抗 50 μ L/孔, 37℃孵育 1 小时; 1:2000 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 100 μ L/孔, 37℃孵育 1 小时; 加入邻苯二胺底物液 100 μ L/孔, 室温避光 15 分钟; 2mol/L 硫酸 50 μ L/孔中止反应, 每步都用 0.05%Tween 20-PBS 洗板 3 次。酶标仪 492nm 波长测定各孔的吸光度(A 值)。

2.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 三七皂苷单体及不同单体配伍对单核-内皮细胞黏附的影响

附表示, 正常对照组的基础黏附率为 (0.016 ± 0.002) , 经终浓度为 80mg/L 的 ox-LDL 作用后, 单核细胞与内皮细胞的黏附显著增强 ($P < 0.01$)。PNS 组、单体组 R_{g1} 、 R_{b1} 明显抑制 ox-LDL 所致的黏附增强 ($P < 0.05$), 单体 R_1 、 R_e 处理内皮细胞后对 ox-LDL 所致的黏附增强无明显影响, 单体配伍组中 $R_{g1}:R_{b1}$ 、 $R_{g1}:R_1$ 、 $R_{b1}:R_1$ 对 ox-LDL 所致的黏附增强有显著抑制作用 ($P < 0.01$), 而其余各配伍组无明显影响, $R_{g1}:R_{b1}$ 组与 PNS 组、单体组 R_{g1} 、 R_{b1} 相比, 对 ox-LDL 所致的黏附增强具有更显著地抑制作用 ($P < 0.05$), $R_{g1}:R_1$ 组与单体 R_{b1} 相比, 能更显著的抑制 ox-LDL 所致的黏附增强 ($P < 0.05$), 提示单体 R_{g1} 、 R_{b1} 、 R_1 之

附表 PNS、三七皂苷单体及不同单体配伍对 ox-LDL 诱导的 ICAM-1 表达及细胞黏附的影响(A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	剂量	黏附值	ICAM-1 表达水平
正常对照组	6	—	0.016 ± 0.002 **	0.193 ± 0.047 **
ox-LDL 组	6	—	0.075 ± 0.003	0.518 ± 0.059
PNS 组	6	100 mg/L	0.041 ± 0.009 *	0.447 ± 0.028 **
单体组	6	1 μmol/L		
Rg ₁	6	1 μmol/L	0.040 ± 0.004 *	0.465 ± 0.033 *
Rb ₁	6	1 μmol/L	0.042 ± 0.008 *	0.467 ± 0.029 *
R ₁	6	1 μmol/L	0.071 ± 0.002	0.486 ± 0.032
Re	6	1 μmol/L	0.069 ± 0.004	0.485 ± 0.039
单体配伍组	6	0.5 μmol/L		
Rg ₁ :Rb ₁	6	0.5 μmol/L	0.022 ± 0.005 **△▲○	0.358 ± 0.025 **△▲○
Rg ₁ :R ₁	6	0.5 μmol/L	0.034 ± 0.004 **○	0.368 ± 0.042 **△▲○
Rg ₁ :Re	6	0.5 μmol/L	0.051 ± 0.003	0.481 ± 0.014
Rb ₁ :R ₁	6	0.5 μmol/L	0.037 ± 0.007 **	0.363 ± 0.047 **△▲○
Rb ₁ :Re	6	0.5 μmol/L	0.047 ± 0.004	0.483 ± 0.024
R ₁ :Re	6	0.5 μmol/L	0.067 ± 0.008	0.487 ± 0.029

与 ox-LDL 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 PNS 组比较, △ $P < 0.05$; 与单体组 Rg₁ 比较, ▲ $P < 0.05$; 与单体组 Rb₁ 比较, ○ $P < 0.05$

间有协同促进作用。

3.2 PNS、三七皂苷单体及不同单体配伍对 ox-LDL 诱导 ICAM-1 表达的影响

附表示, 正常对照组的内皮细胞有低水平的 ICAM-1 表达, 经过 ox-LDL 刺激后, 其表达显著增强 ($P < 0.01$)。PNS 组、单体组 Rg₁、Rb₁ 明显抑制 ICAM-1 的表达 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 单体 R₁、Re 对 ox-LDL 所致的 ICAM-1 表达增强无影响 ($P < 0.01$), 单体配伍组中 Rg₁:Rb₁、Rg₁:R₁、Rb₁:R₁ 显著抑制 ICAM-1 的表达, 其余各配伍组无明显影响, Rg₁:Rb₁、Rg₁:R₁、Rb₁:R₁ 配伍组与 PNS 组、单体组 Rg₁、Rb₁ 比较差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。

4 讨论

近年来, 越来越多的学者提出, AS 的形成是由于众多危险因子损伤内皮而发生的一系列炎症反应, 血管壁最早出现的反应就是单核细胞黏附于血管内皮细胞。黏附分子表达的增加在动脉粥样硬化病变发生发展中起重要作用, 细胞黏附分子中免疫球蛋白超家族的 ICAM-1 与动脉粥样硬化、冠心病的关系尤为密切^[6]。ICAM-1 分布广泛, 内皮细胞、白细胞、成纤维细胞、上皮细胞均可表达。ICAM-1 在正常情况下仅少量表达, 但在炎症介质刺激下表达可明显增强。许多研究显示, ox-LDL 有致动脉粥样硬化特征^[7], ox-LDL 可显著诱导内皮产生血管细胞黏附分子 (VCAM) 及 ICAM-1, 这些黏附分子使血流中的单核细胞与血管内皮细胞发生黏附, 并进入内皮下间隙, 同时能促进内皮细胞合成单核细胞化学趋化蛋白-1 (MCP-1), 可加速单核细胞的迁移过程, 使与内皮黏附的单核细胞容易通过内皮间隙, 迁移至内皮下, 本研究结果与报道一

致^[8]。

随着对血瘀证研究的深入, 认为 AS 的病因病机为“心血脉瘀滞”, 研究证实, AS 形成过程与血瘀证的病因、病理有许多相似之处, 活血化瘀方药治疗冠心病心绞痛、心肌梗死, 临床疗效较传统的宣痹通阳法有了明显提高, 活血化瘀成为现代中医临床治疗冠心病的主流和首选疗法^[9]。AS 属于血瘀证范畴, 与血管内皮细胞黏附分子存在着很强的相关性^[10]。三七有活血化瘀、通脉活络之功效, PNS 为三七的主要有效活性成分, 对多种心血管疾病具有良好的疗效且安全无毒副作用, 通常认为其机制与降血脂、调血栓、扩张血管、抗氧化等药理作用有关^[11], 本实验室既往研究发现, PNS 具有显著的抗感染作用, 对急、慢性炎症均有显著治疗效果^[3~5]。目前对三七皂苷单体研究比较少, 而对单体间进行配伍研究几乎是空白, 对于三七皂苷单体及单体间配伍研究的意义在于: 一方面, 为阐明中药组方原理提供有利的实验依据, 推进中医的发展; 另一方面, 对于发现活性的单体化合物, 或者先导化合, 具有指导意义, 更好的利用中药资源。迄今为止, 已从 PNS 中分离并鉴别出 20 余种单体成分, 这些单体成分均属于达马烷型四萜三萜类皂苷, 根据其皂单元的不同, 分为三醇型和二醇型, 其中 Rb₁ 为二醇型皂苷, Rg₁、R₁、Re 为三醇型皂苷。本研究表明, 实验浓度为 PNS 百分之一的单体 Rg₁、Rb₁ 均能有效抑制单核-内皮细胞黏附, 而单体 R₁、Re 无明显效果, 说明低浓度的单体 Rg₁、Rb₁ 即可发挥类似于 PNS 的作用。对单体间两两配伍研究发现, 三醇型的 Rg₁、R₁、Re 之间进行两两配伍, 在三组配伍中只有 Rg₁:R₁ 组比单一单体 (下转第 361 页)

血不足者,宜温针灸法,配合巨刺、远道刺,如患侧面部配合梅花针叩刺法,应以潮红为度,取轻能泻实之意。对偏于实证的患者可选用面部拔罐、温针、电针综合法。以患侧口腔内地仓向里挑刺放血或外地仓火针等冲击法,取效后再作辨证配穴治疗更为有效。此时适当配用电针翳风、下关穴刺激面神经法,有利于面神经功能的恢复,刺法宜深,如治疗得法可在质控时段内达到治愈。

2.3 亨特面瘫

亨特面瘫,此型较为少见,但难以治愈,其损伤平面高,是在茎乳孔入口处的膝状神经节处受损及岩大浅神经受累。临床表现除具有贝尔面瘫症状外,还有外耳道或耳廓出现疱疹,疼痛等症状。此型面瘫的面神经多有不同程度的神经变性。临床需要 2~3 个月治疗,但难以完全恢复。此型急性期多有耳廓及耳后部疼痛明显,肝胆湿热、风火上扰少阳经症状出现,发病早期即行耳后三针电针法较为有效。1 周后疼痛消除应尽早应用硝酸一叶秋碱、弥可宝等针剂作患侧面部穴位注射,在第一时间激发面神经功能,减轻面神经变性坏死。面瘫症状改善后可参考贝尔面瘫针灸治疗法,不管患者在哪个时间段内来作针灸治疗,穴位注射均应在第 1 时间内作为首选治疗,这也是亨特面瘫操作流

程中首选疗法,是针灸治疗此型面瘫的质控保证。此型面瘫发病 1 周为急性期,1 周~2 个月为恢复期,2 个月为后遗症期,质量控制时间应在 3 个月内。

3 面瘫并发症的治疗

周围性面瘫的并发症,临床上以患者上眼睑下垂、下眼睑外翻、患侧口角下垂、面肌痉挛及闭目(口角联动症)出现为特征,或面肌出现倒错现象,若及早地采取应对措施均能获效。中医认为,上眼睑下垂、下眼睑外翻、口角下垂是脾气不足,升阳无力,治宜益气升阳,取百会、列缺、关元、足三里、三阴交以益气升阳,局部取穴针尖应向上取升提之意,并配申脉穴。面肌痉挛及闭目(口角联动症)、面肌倒错症应采用巨刺法,配合远道刺,如足三里、三阴交、四关穴等。

4 面瘫后遗症期的治疗

周围性面瘫急性期、恢复期的误治、失治均可转入后遗症期,后遗症期的治疗应依据中医辨证取穴的原则,综合穴位注射、火针、挑刺放血、拔罐、电针、温针灸等方法。毫针刺法宜透刺、深刺,邪已深入浅刺则针之不及,达不到病所,于病不利。适当地针灸综合配套治疗是针灸治疗此期操作流程中的关键,质控时间应在 3 个月内。

(收稿日期:2006-06-19)

(上接第 356 页)

具有更显著的抑制单核-内皮细胞黏附作用("1+1>2"现象),而二醇型 Rb₁ 与三醇型 Rg₁、R₁、Re 的三组配伍中有两组即 Rg₁:Rb₁、Rb₁:R₁ 配伍较单一单体效果更显著,提示结构差别大的单体组成更有可能产生协同作用。单体 R₁ 单独应用无效果,而与单体 Rb₁、Rg₁ 配伍应用却可以提高单体 Rb₁、Rg₁ 的效果,说明弱效单体存在某种机制可以促进有效单体的作用。至于单体间交互协同机制有待进一步研究。研究还发现,单体 Rg₁、Rb₁ 及有效单体配伍组合 Rg₁:Rb₁、Rg₁:R₁、Rb₁:R₁ 可有效抑制 ox-LDL 所致的 ICAM-1 的表达,提示 PNS 及单体通过下调内皮细胞表面黏附分子 ICAM-1 表达抑制单核-内皮细胞黏附,从而抑制炎症,保护内皮,阻止 AS 的发生。至于这些单体各自相应的作用靶点还需进一步研究。

参考文献

- [1] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115~126.
- [2] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature, 2002, 420(6917): 868~874.
- [3] 刘雅,李晓辉.三七总皂苷对动脉粥样硬化形成中炎症免疫

因子的影响.中草药,2005,36(5):728~730.

- [4] 贾乙,李晓辉.炎症因素在泡沫细胞形成中的作用及三七皂苷对其影响.第三军医大学学报,2005,27(10):972~974.
- [5] 李淑惠,李晓辉,张海港,等.三七叶皂苷抗炎作用机理的实验研究.哈尔滨商业大学学报,2002,18(1):30~33.
- [6] Papagianni A, Kalovoulos M, Kirmizis D, et al. Carotid atherosclerosis is associated with inflammation and endothelial cell adhesion molecules in chronic haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant, 2003, 18(1): 113~119.
- [7] Ehara S, Ueda M, Naruko T, et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. Circulation, 2001, 103(5): 1955~1960.
- [8] Yoshida N, Manabe H, Terasawa Y, et al. Inhibitory effects of vitamin E on endothelial-dependent adhesive interactions with leukocytes induced by oxidized low density lipoprotein. Biofactors, 2000, 13(1-4): 279~288.
- [9] 陈可冀,李连达,翁维良.血瘀证与活血化瘀研究.中西医结合心脑血管杂志,2005,3(1):1~2.
- [10] 赵凯,张磊,奚九一.中药对血管内皮细胞功能影响的研究进展.中国中医药信息杂志,2006,13(5):97~99.
- [11] 杨志刚,陈阿琴,俞颂东.三七药理研究新进展.上海中医药杂志,2005,39(4):59~62.

(收稿日期:2006-11-23;修回日期:2007-01-29)