

。 方药研究。

通心络超微粉对大鼠损伤的内皮细胞骨架蛋白的影响

高怀林 王玲玲 贾振华 董小伟 王宏涛 刘克剑 朱慧明 吴以岭

(河北医科大学 附属以岭医院心脑血管络病国家中医药管理局重点研究室, 石家庄市新石北路 385号, 050091)

[摘要] 目的 观察通心络超微粉 (TXLU)对血管内皮功能的作用及机制。方法 将健康雄性 Wistar大鼠随机分为正常组和模型组,模型组以蛋氨酸饮食复合“基础饮食+ 负重游泳”法建立络气虚滞型血管内皮功能障碍动物模型。取正常组和模型组大鼠血清体外培养人脐静脉内皮细胞 (HUV EC)细胞株,实验分为 4组:空白组、正常血清组、模型血清组、TXLU组,每组 4个复孔。观察血清作用 HUV EC 6h后细胞骨架蛋白纤维状肌动蛋白 (F-actin)的形态、分布及含量变化。结果 模型组血清作用 6h后细胞骨架蛋白 F-actin发生明显的破坏,其荧光强度减弱, TXLU预处理 HUV EC后可减少 F-actin 损伤的发生及伴随含量的增加 ($P < 0. 01$)。结论 TXLU可以减弱细胞骨架蛋白 F-actin 的损伤,可能是其改善血管内皮功能,防治动脉粥样硬化的机制之一。

[关键词] 通心络超微粉;内皮功能;细胞骨架;络气虚滞

Influence of Tongxinluo Superfine on Damaged Endothelial Cytoskeletal Protein in Rats

GAO Huailin, WANG Lingling, JIA Zhenhua, DONG Xiaowei, WANG Hongtao, LIU Kejian, ZHU Huiming, WU Yiling
(Yiling Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091)

ABSTRACT Objective To observe the influence of Tongxinluo Superfine (Submicron powder of Chinese medicines for preventing the atherosclerosis) on the endothelial cells and its mechanism. **Methods** Healthy male Wistar rats were randomized into normal group and model group. The model group was given a methionine diet plus basic diet and weight-loading swimming to establish the models of endothelial dysfunction in the collateral qi deficiency and stagnation syndrome. The serum of mice of the normal group and model group was used to culture in vitro the cell line of human umbilical vein endothelial cells (HUV EC) in an experiment of four groups, i. e. blank group, normal serum group, model serum group, and Tongxinluo Superfine group. The changes in the morphological structure and distribution and content of fibrous actin (F-actin) of endothelial cytoskeletal protein 6 hours after the serum functioned on HUV EC were observed. **Results** In the model group, a significant destruction of F-actin appeared after the serum functioning for 6 hours, and decreased fluorescence intensity existed. The preprocessing of HUV EC with Tongxinluo Superfine could reduce the incidence of damage of F-actin and increase its content ($P < 0. 01$). **Conclusion** Tongxinluo Superfine can weaken the damage of F-actin of endothelial cytoskeletal protein, being part of the possible mechanism in improving the endothelial functions of vessels to prevent the atherosclerosis.

Key Words Tongxinluo Superfine (Submicron powder of Chinese medicines for preventing the atherosclerosis); Function of endothelial cells; Cytoskeleton; Collateral qi deficiency and stagnation syndrome

内皮细胞形态结构受损和功能改变,导致血管内皮屏障功能的损害,使血液中的脂质等物质更易通过内皮细胞,促进了动脉粥样硬化 (AS)的形成^[1- 2]。研究发现,内皮细胞骨架与血管内皮通透性的调节密切相关,对于维持内皮细胞的屏障功能有重要意义^[3- 4]。F-actin是细胞骨架中的主要收缩蛋白,其含量减少或重聚,可以使内皮细胞单层的通透性增加,导致血管屏障功能的损害。通心络超微粉 (TXLU)能改善血管内皮功能,对冠心病等 AS性疾病有很好的防治作用^[5- 7]。

但其改善内皮功能是否通过抑制内皮细胞骨架的改变或重组而起作用少见相关报道。因此,本研究以络气虚滞型血管内皮功能障碍模型大鼠血清刺激人脐静脉内皮细胞 (HUV EC)为实验模型,通过观察 TXLU对损伤的内皮细胞骨架蛋白的影响,探讨 TXLU改善血管内皮功能及防治 AS的可能机制。

1 材料与方法

1. 1 动物与细胞

健康雄性 Wistar大鼠,体重 220~ 250g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [许可证号: SCXK (京) 2007- 0001]; HUV EC细胞株 (ATCC 编号: CRL-1730); 购于中国典型培养物保藏中心 (武汉大学保藏中心)。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973”计划)资助项目 (2005CB523301);国家“十一五”重大新药创制专项 (2009ZX09313-003)
通讯作者: 吴以岭, ghl650810@ sina. com, (0311) 85901553
(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 药物

通心络超微粉(石家庄以岭药业股份有限公司生产,平均粒度 $5\sim 10\mu\text{m}$),成分:人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍、冰片等。批准文号:国药准字Z19980015 生产批号:20070405

1.3 试剂与仪器

异硫氰酸荧光素-鬼笔环肽(FITC-phalloidin,美国Sigma生产,批号:027k1913);TritonX-100(美国Amresco生产,批号:0154B59);多聚甲醛(天津市大茂化学试剂厂生产,批号:20051217);胰酶(北京鼎国生物技术有限公司生产,批号:DH355-4);LSM510激光共聚焦显微镜(德国蔡司,ZEISS);Epics-XLII型流式细胞仪(美国贝克曼-库尔特有限公司生产)

1.4 模型制备

络气虚滞型血管内皮功能障碍模型的建立^[8]:将雄性Wistar大鼠随机(按动物体重分层随机方法)分为正常组和模型组。模型组连续喂养大鼠3%高蛋氨酸饲料(不限食)4周后,施加力竭游泳因素,每只造模大鼠在给予3%的上述饲料条件下在 $25\sim 27^\circ\text{C}$ 水温的自制游泳缸($60\text{cm}\times 40\text{cm}\times 100\text{cm}$)中每日强迫负重(按每只造模大鼠自身体重的3%计算)游泳,采取两次游泳法,前后相差10min,游泳至力竭为止,以最大限度耗竭动物体力(力竭标准^[9-10]:游泳范围逐渐缩小,动作明显失调,慌张,鼻部在水面上下浮动,头部没入水面下10s不能上浮),连续游泳训练14d络气虚滞型内皮功能障碍模型建立(表现:精神萎靡,眼睑下垂,反应迟钝,全身毛发枯槁、竖立,皮肤松弛,皮下少有脂肪,甚至抓之触骨,鼻尾颜色可见苍白等)

正常大鼠和络气虚滞型内皮功能障碍模型大鼠分别取血后离心,收集血清, 56°C 灭活30min,而后进行过滤除菌, -20°C 保存备用。

1.5 细胞培养实验分组

实验分4组,每组4个复孔:①空白组:无血清培养基(F12K)中加入终浓度为20%的胎牛血清;②正常血清组:无血清培养基(F12K)中加入终浓度为20%的正常大鼠血清;③模型血清组:无血清培养基(F12K)中加入终浓度为20%的模型大鼠血清;④TXLU组:无血清培养基(F12K)中先加入终浓度为 $1\mu\text{g/ml}$ TXLU($3\mu\text{g}$)预处理6h,然后加入终浓度为20%的模型大鼠血清。各项观察与检测均在血清作用后6h进行。

1.6 细胞骨架蛋白纤维状肌动蛋白(F-actin)的形态学观察

将 2ml HUVEC($1.0\times 10^5/\text{ml}$)接种后,常规培养

2d,根据实验设计刺激HUVEC,4%多聚甲醛 4°C 孵育10min,冷PBS漂洗 $2\text{min}\times 3$ 次,再用0.5%TritonX-100 4°C 孵育5min,冷PBS漂洗 $2\text{min}\times 3$ 次,最后用 $3\mu\text{g/ml}$ 的FITC-phalloidin 4°C 避光孵育40min,50%的缓冲甘油封片,用激光共聚焦显微镜观察F-actin的形态及分布变化。

1.7 细胞骨架蛋白 F-actin 的含量检测

将 3ml HUVEC($1.0\times 10^5/\text{ml}$)接种于6孔板,常规培养2d,根据实验设计和分组刺激HUVEC,0.25%的胰酶 37°C 消化2~5min后;小心吹打每孔的细胞,悬浮后转移至 1.5ml EP管中, 300r/min ,3min离心;70%酒精悬浮细胞 4°C 过夜;每个样本中分别加入 $100\mu\text{l}$ $5\mu\text{g/ml}$ 的FITC-phalloidin对F-actin进行荧光染色, 4°C 孵育40min;最后用缓冲液悬浮细胞,避光上流式细胞仪检测细胞荧光强度(激发波长488nm,发射波长为520nm),每个样本重复4次,用测得的荧光强度代表F-actin的相对含量。

1.8 统计学方法

采用SPSS 13.0统计分析软件处理,计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组内皮细胞骨架蛋白 F-actin 形态学比较

图1示,空白组、正常血清组可见内皮细胞骨架蛋白F-actin排列整齐,边缘清晰,分布均匀,主要分布在细胞周边,呈连续状态,胞质内应力纤维少;正常血清组与空白组比较,F-actin的边缘略显模糊;模型血清组内皮细胞骨架蛋白F-actin排列紊乱,边缘模糊,胞质内应力纤维明显增多增粗;TXLU组细胞骨架蛋白F-actin与模型血清组比较形态有明显改善,胞质内应力纤维明显减少,且边缘整齐,F-actin主要在细胞周

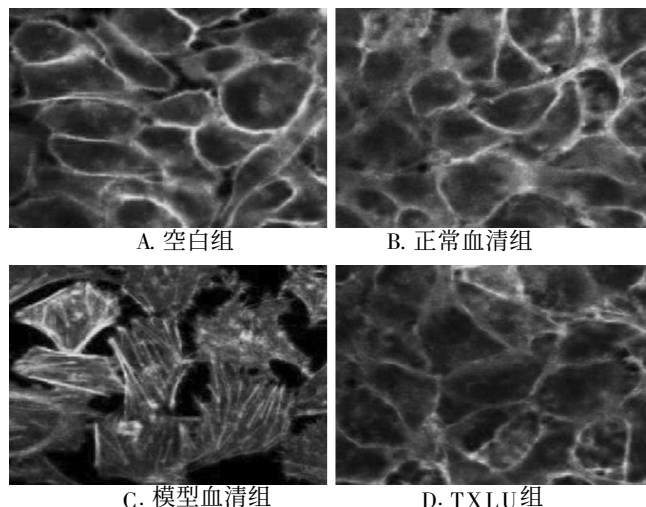


图1 各组内皮细胞骨架蛋白 F-actin 形态及分布变化($\times 630$)

边聚集。

2.2 各组细胞骨架蛋白 F-actin含量变化

正常血清组细胞骨架蛋白 F-actin含量 (0.97±0.08)与空白组 (1.00±0.13)比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);模型血清组 (0.80±0.06)与正常血清组、空白组比较均有统计学差异 ($P<0.01$);TXLU组 (0.97±0.05)与模型血清组比较有统计学差异 ($P<0.01$)。

3 讨论

中医证候的离体水平研究一直是证候研究的难点,目前尚缺乏在离体细胞水平施加病证复合因素的细胞模型,阻碍了证候的病理生理学机制研究。本实验以 HUVEC为实验材料,以络气虚滞型血管内皮功能障碍病证复合模型大鼠血清作为损伤因素,建立了反映人体血管内皮功能障碍“病”和络气虚滞“证”特点的较为理想的细胞模型,为证候研究的深入开展提供了基础。

引起血管内皮通透性增高的原因很多,绝大多数是通过引起内皮细胞骨架蛋白 F-actin改变,使内皮细胞发生收缩,最终导致细胞变圆、细胞间隙增大,致使屏障功能受损^[11-12]。循环血液中的细胞因子和炎症介质等刺激因素作用于内皮细胞,诱导内皮细胞骨架,特别是 F-actin的重组和再分布是导致内皮细胞收缩、血管通透性升高的重要病理基础^[13-14]。前期研究发现,络气虚滞型血管内皮功能障碍模型大鼠的循环血液中许多炎症介质、细胞因子(如 AngII、ET-1、TNF α 等)增高,故我们设想含有这些损伤因素的模型大鼠血液刺激 HUVEC后会引起 F-actin的变化。所以本研究以该模型作为研究载体。

细胞骨架是维持细胞正常形态与功能的重要结构,F-actin是细胞骨架中的主要收缩蛋白,其含量减少或重聚,可导致细胞紧密连接结构不能维持,从而使内皮细胞单层的通透性增加,导致血管屏障功能的损害,使血液中的脂质等生物大分子物质更易通过内皮细胞,进一步形成泡沫细胞,促进 AS形成。

TXLU具有补益心气、活血通络的作用,适用于络气虚乏、血瘀络阻者,能改善血管内皮功能,对络气虚滞型血管内皮功能障碍等 AS性疾病应有较好的防治作用。本实验发现,运用激光共聚焦显微镜观察和流式细胞仪检测 F-actin变化显示,给予 TXLU干预后 F-actin胞质内应力纤维明显减少,且边缘整齐,F-actin主要在细胞周边聚集,其形态恢复接近正常,且含量升高 ($P<0.01$)。提示 TXLU有抑制内皮细胞骨架蛋白 F-actin损伤的作用,其改善内皮功能、防治冠心病等 AS性疾病的作用机制,可能与其改善 F-actin形态、分

布及含量,保持内皮细胞结构与功能的完整性,发挥其屏障功能有关。

参考文献

[1] 张杰,刘赛,苏玉文,等.血管内皮细胞与动脉粥样硬化的关系[J].中国实用内科杂志,2005,25(2):170-172.

[2] 张庆芝,闵锐.血管内皮通透性调节机制新进展[J].中国微循环,2009,13(6):585-588.

[3] Park JH, Okayama N, Gute D, et al. Hypoxia/aglycemia increases endothelial permeability: role of second messengers and cytoskeleton[J]. Am J Physiol, 1999, 277(6 Pt 1): C1066- C1074.

[4] Kuhne W, Besselmann M, Noll T, et al. Disintegration of cytoskeletal structure of actin filaments in energy-depleted endothelial cells[J]. Am J Physiol, 1993, 264(5 Pt 2): H1599- 1608.

[5] 吴以岭,袁国强,游佳华,等.通心络超微粉对高脂饮食兔主动脉内皮保护机制的实验研究[J].中国病理生理杂志,2007,23(4):629-633.

[6] 郝颖,周京敏,王克强,等.通心络对血管紧张素II致大鼠内皮损伤的保护作用[J].中华中医药杂志,2009,24(7):855-858.

[7] 郑雯,李树青.通心络对自发性高血压大鼠血管内皮功能的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2009,7(2):179-180.

[8] 梁俊清,孙士然,吴以岭,等.络气虚滞型血管内皮功能障碍病证结合动物模型的建立及通络方药干预研究[J].山东中医药大学学报,2008,32(1):52-57.

[9] Tanaka M, Nakamura F, Mizokawa S, et al. Establishment and assessment of a rat of fatigue[J]. Neurosci Lett, 2003, 352(3):159-162.

[10] Fitts RH, Booth FW, Winder WW, et al. Skeletal muscle respiratory capacity, endurance, and glycogen utilization[J]. Am J Physiol, 1975, 228(4):1029-1033.

[11] 邱雅慧.血管内皮细胞的功能以及损伤修复与动脉粥样硬化[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(10):1927-1930.

[12] Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, et al. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction[J]. Circulation, 2002, 105(13):1541-1544.

[13] Fujishima S, Hoffman AR, Vu T, et al. Regulation of neutrophil interleukin-8 gene expression, and protein secretion by LPS, TNF-alpha, and IL-1beta[J]. J Cell Physiol, 1993, 154(3):478-485.

[14] Waschke J, Curry FE, Adamson RH, et al. Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(3):H1296-1305.

(收稿日期:2010-04-13;修回日期:2010-05-24)

编辑:行之]