

丹参水溶性成分对胶原酶诱导的内皮损伤保护作用

杨艳丽^{1,2} 姚成芳^{1△}

(¹ 山东省医学科学院基础医学研究所, 山东 济南 250062; ² 济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067)

摘要 目的 探讨丹参水溶性单体成分原儿茶醛对胶原酶诱导 APOE^{-/-} 小鼠内皮损伤的保护作用。**方法** 采用尾静脉注射胶原酶 II 合并肝素法建立内皮损伤模型; 采用生理盐水同步处理作为阴性对照组, 实验组造模同时同步腹腔注射原儿茶醛。采用扫描电镜观察动脉内膜完整性和内皮细胞的形态结构; 采用流式细胞胞内外染色法检测小鼠脾脏淋巴细胞对 TNF- α 、IL-17 等细胞因子的表达能力。**结果** 电镜结果显示: 正常小鼠和对照组小鼠内膜和内皮细胞间连接完整, 偶有内皮细胞脱落; 而内皮损伤模型组小鼠主动脉内膜不完整, 内皮细胞明显脱落, 聚集成团, 条索部分紊乱, 细胞间连接丢失, 造成空洞或“蜂窝”状内膜; PCAD 实验组血管内膜基本规整, 内皮细胞偶有脱落, 无明显附着物。流式细胞术结果显示: 随着内皮损伤和细胞的脱落, 脾脏淋巴细胞分泌炎症因子 IL-17、TNF- α 水平较对照组小鼠明显升高, 而 PCAD 实验组与模型对照组相比可下调炎症因子的阳性比例 ($P < 0.05$)。**结论** 丹参水溶性成分 PCAD 可明显保护动脉粥样硬化早期的内皮损伤, 下调炎症因子的释放。

关键词 原儿茶醛; 胶原酶; 动脉粥样硬化; APOE^{-/-} 小鼠; 内皮损伤

中图分类号: 285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2012)06-173-04

Protective effect of the water-soluble ingredients of salvia miltiorrhiza on collagenase-induced endothelial injury

YANG Yan-li, YAO Cheng-fang

(Institute of Basic Medical Sciences, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

Abstract; Objective To investigate the protective effect of Protocatechualdehyde of the water-soluble ingredients of Salvia miltiorrhiza on endothelial injury induced by collagenase in APOE^{-/-} mice. **Methods** Endothelial injury model was established by intravenous injection of collagenase II with heparin; mice of negative control group was synchronized with physiological saline, the experimental group while simultaneously modeling the intraperitoneal injection of Protocatechualdehyde. Using scanning electron microscope artery intimal integrity and endothelial cell morphology were observed. And using flow cytometry intracellular and extracellular staining the cytokine expression of TNF- α and IL-17 was measured in splenic lymphocytes of mouse. **Results** The electron microscopy results showed that the connection between the mouse intima and endothelial cell integrity was normal in normal mice and control group, and occasional endothelial cell shedding occurred. In endothelial injury model mice, aortic intima was incomplete, and endothelial cells was significantly exfoliated and gathered into cluster. The cord was partly disturbed, and the connection among cells was lost resulting in the the empty or "honeycomb"-like intima. In the PCAD experimental group, it were regular intima, occasional endothelial cell shedding, and no significant attachments. Flow cytometry results showed that endothelial cell injury and cell detachment were present, the secretion of inflammatory cytokines such as IL-17 and TNF- α in splenic lymphocytes was significantly increased compared with the control group of mice, while the PCAD experimental group compared with control group compared inflammatory factors were down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** PCAD, the water-soluble ingredients of Salvia miltiorrhiza can attenuates early endothelial injury in atherosclerosis and decrease the release of inflammatory factors.

Key words: Protocatechualdehyde; Collagenase; Atherosclerosis; Endothelial injury; APOE^{-/-}

△ [通信作者] 姚成芳, E-mail: yaocf9941@163.com

动脉粥样硬化^[1-2] (atherosclerosis, AS) 是严重危害人类健康的常见病、多发病,其发病机制尚不明确,目前大多数的学者对 1993 年 Ross^[3] 提出“内皮损伤反应学说”比较认同,认为血管内皮损伤是 AS 进程的第一步。所以,防治 AS 的有效措施是保护血管内皮。目前临床上对 AS 的防治,主要以西药为主,但是其副作用较多、复发率、病死率也都很高;近些年的研究发现,用中药来治疗 AS,为 AS 的防治提供一条新的途径。

丹参是临床常用活血化瘀类中药,化学成分主要包括水溶性成分和脂溶性成分两种^[4],水溶性成分主要为酚酸类化合物,包括原儿茶醛(protocatechualdehyde, PCAD)、丹酚酸、丹参素等;脂溶性成分主要为二萜醌类化合物,包括隐丹参酮、丹参酮 II A 等。现代药理研究表明^[5],丹参有效成分具有抗血栓、抗菌、调节组织修复与再生、抑制血管平滑肌细胞的增殖和迁移、抗炎、降低血粘度、改善血流变等功能,尤其是对心脑血管系统疾病有非常重要的作用。丹参水溶性成分与脂溶性成分作用靶点不同,药效也不同,近些年一些医药学家研究证明丹参水溶性成分是治疗心血管的主要成分,是主要药效的物质基础。目前临床上也主要用丹参的水提成分来治疗心脑血管性疾病,但是,水溶性成分对内皮细胞的药效作用机制尚不清楚。本研究以载脂蛋白 E 基因敲除(APOE^{-/-})小鼠作为 AS 的动物模型,以 APOE^{-/-}小鼠尾静脉注射胶原酶 II 和肝素后,造成内皮损伤模型,探讨丹参水溶性有效成分 PCAD 对 AS 早期内皮损伤的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

APOE^{-/-}小鼠,雄性,6~8 周龄,体重(20±2)g,购自北京大学医学部实验动物科学部[许可证编号:SCXK(京)2006-2008],自由摄食饮水,温度 23℃~25℃,湿度 48%~52%。

1.2 试剂

原儿茶醛:购于中国药品生物制品质量监督所, (Protocatechualdehyde, PCAD, 批号:070424); 荧光抗体: Rat anti mouse APC-CD3、Rat anti mouse FITC-CD4、Rat anti mouse PE-TNF- α 、Rat anti mouse PE-IL-17 均购自 BD 公司; Ficoll 淋巴细胞分离液; 肝素购自 Sigma 公司; 胶原酶 II 购自 Invitrogen 公司等。

1.3 实验方法

1.3.1 原儿茶醛的配制方法 称取丹参水溶性成分 PCAD, 溶于生理盐水(NS), 最终浓度为 0.55mg/ml, 充分溶解后, 无菌过滤备用, 4℃ 避光保存。

1.3.2 内皮损伤模型的建立 APOE^{-/-}小鼠随机分为: 阴性对照组(NSCol-组)、水溶性模型对照组(NS组)、原儿茶醛治疗组(PCAD组)三组。采用生理盐水同步处理作为阴性对照组; PCAD 治疗组腹腔注射丹参水溶性成分: PCAD, 14mg/kg; NS 对照组小鼠腹腔注射等体积 NS; 除阴性对照组以外 PCAD 治疗组、NS 对照组小鼠经末次给药 60min 后, 尾静脉注射胶原酶 II (113U/只) 和肝素 (6U/只), 50min 后, 小鼠足部肿胀、出现内皮损伤后末梢出血现象。

1.3.3 扫描电镜观察动脉内膜损伤状态 分离小鼠主动脉, 经 2.5% 的戊二醛固定 12~24h 后; 0.1mol/L 磷酸缓冲液清洗 2h 以上, 中间更换 2~3 次新液; 用 1% 的锇酸固定 1~1.5h, 用双蒸水清洗 2h, 中间更换 2~3 次新液; 用上升浓度的酒精脱水 (50%、70%、80%、90%、100% 两次), 每级脱水 20min; 醋酸异戊酯置换; 常规临界点干燥; 黏托后用 IB-5 离子溅射仪镀铂; 扫描电镜观察血管内皮细胞的完整性。

1.3.4 流式细胞术检测炎症因子的表达状态 将分离的脾脏单个细胞用 PBS 和无血清 RPMI 1640 液各洗 1 次。去上清, 加入含血清的 1640 培养液, 调整细胞浓度为 5×10^6 /ml, 混匀后加入培养板, 并加入佛波酯 PMA (30 μ l/ml)、离子霉素 (20 μ l/ml)、莫能霉素 (17 μ l/ml), 放入 37℃, 5% CO₂ 培养箱内培养。4h 后, 收集细胞, 以大鼠血清封闭 Fc 受体, 加外标抗体 (CD3-APC、CD4-FITC), 避光 30min, PBS 洗涤细胞。去上清, 加入固定液, 4℃, 避光放置 30min。加入穿膜液, 洗涤细胞, 去上清。细胞重悬于穿膜液中, 分别加入内标抗体: Rat anti mouse IL-17-PE、Rat anti mouse TNF- α -PE, 4℃, 避光 30min。分别加入穿膜液和 PBS 洗涤细胞各 1 次, 转管, 流式细胞仪检测炎症因子表达强度。

1.4 统计

所有实验数据均经 SPSS15.5 统计软件处理, $P < 0.05$ 时有显著差异。

2 结果

2.1 电镜下丹参水溶性成分 PCAD 对胶原酶诱导的内膜损伤的保护作用

APOE^{-/-}小鼠尾静脉注射胶原酶 II 和肝素后,血管内膜的完整性遭到破坏,扫描电镜观察到:正常 APOE^{-/-}小鼠血管条索排列整齐,内皮细胞间连接完整,黏膜光滑,无明显纤维等斑块附着;而 NS 模型对照组的血管内皮脱落明显,聚集成团,条索部分紊乱,细胞间连接丢失,造成空洞或“蜂窝”状内膜,内膜附着物较多;PCAD 治疗组内皮偶有脱落,血管内膜基本规整,无明显附着物,与 NS 对照组相比对胶原酶诱导的内皮损伤具有明显保护作用。

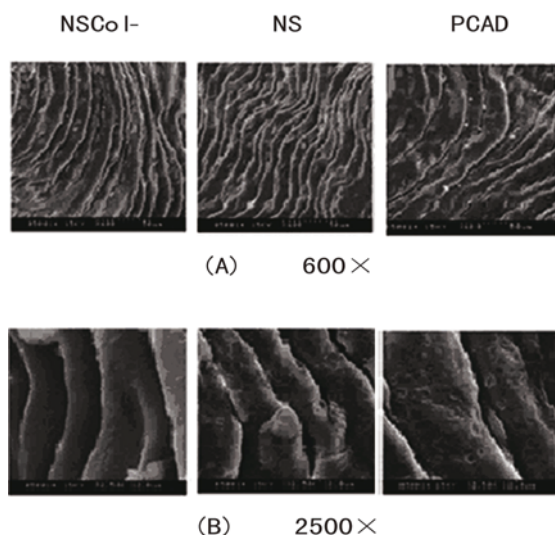
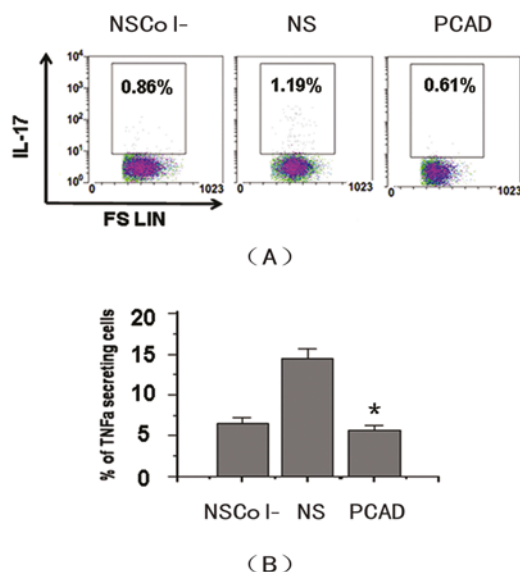


图 1 电镜下 PCAD 对胶原酶诱导内皮损伤的保护作用

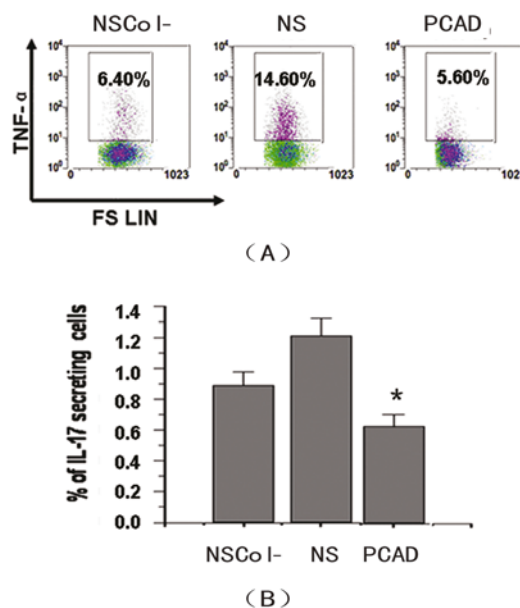
2.2 丹参水溶性成分 PCAD 对炎症因子 IL-17, TNF- α 释放能力的调节作用

胶原酶处理后,随着脱落内皮细胞的增加和内皮完整性的破坏,内皮的屏障功能受到损伤,使循环中淋巴细胞穿越内皮屏障,在由内皮损伤引发的早期炎症反应过程中释放 IL-17, TNF- α 等炎症因子的能力增加,尤以 TNF- α 的变化最为敏感。流式细胞胞内外因子染色法检测发现 PCAD 治疗组与 NS 对照组相比对炎症因子的释放具有调节作用,可下调 IL-17、TNF- α (如图 2、图 3),有统计学意义 ($P < 0.05$)。



* PCAD 治疗组与 NS 对照组对比具有统计学意义 ($P < 0.05$)

图 2 PCAD 对炎症因子 IL-17 的调节作用



* PCAD 治疗组与 NS 对照组对比具有统计学意义 ($P < 0.05$)

图 3 PCAD 对炎症因子 TNF- α 的调节作用

3 讨论

动脉粥样硬化(AS)是心脑血管疾病的重要病理基础,AS 的发病机制涉及极其复杂和庞大的细胞内信号转导网络,包括血管发育、细胞增殖、血管新生、氧化应激、血管老化、炎症-免疫等^[6]。目前大多数学者认为 AS 是一个血管损伤后的炎症反应过程,殷治华等^[7]也认为内皮功能性损伤是 AS

发生的启动步骤,因此,保护内皮是防治 AS 的有效措施。中药在治疗心脑血管疾病中发挥着重要作用,在这些成分中,丹参的药效更为明显,丹参包括多种成分,本研究根据市场化产品选取了其水溶性成分 PCAD,来研究 PCAD 对 AS 早期内皮损伤的保护作用。

血管内皮损伤除了是 AS 发生发展的主要病理因素外,也是参与炎症早期反应过程的主要细胞。现代医学研究证明,多种细胞参与了内皮损伤过程,如中性粒细胞趋化、黏附于内皮损伤处并迁移到内皮下变成巨噬细胞,巨噬细胞吞噬脂质变成泡沫细胞,形成 AS 早期脂肪斑块;血小板聚集内皮损伤处释放生长因子促使平滑肌细胞迁移到内皮下、增殖形成纤维斑块等,T 淋巴细胞也参与了 AS 的形成过程。最新研究发现,部分 T 细胞亚群特别是 Th17 参与了内皮损伤过程。我们都知道 T 淋巴细胞是适应性免疫应答的主体细胞,主导着后期的免疫反应。以往对炎症早期内皮损伤的相关研究多围绕内皮黏附功能或巨噬细胞、粒细胞等炎性细胞的变化机制,对炎症反应早期 T 细胞亚群的变化特点没有相关研究^[8-9]。本研究采用扫描电镜检测动脉内皮的完整性及 FACS 检测小鼠脾脏 T 细胞亚群分泌炎症因子 IL-17、TNF- α 的状态,来探讨 PCAD 在有效保护血管内皮的同时,对 T 细胞亚群分泌炎症因子 IL-17、TNF- α 的调节。结果发现,电镜下丹参水溶性有效成分 PCAD 治疗组与 NS 模型对照组相比对胶原酶诱导的内膜

损伤具有保护作用;同时可下调 T 细胞亚群分泌的炎症因子 IL-17、TNF- α ($P < 0.05$)。但是 PCAD 下调炎症因子 IL-17、TNF- α 的具体机理有待进一步阐明。

参考文献:

- [1] Paul J, Dasgupta S, Ghosh MK. Carotid artery intima media thickness as a surrogate marker of atherosclerosis in patient with chronic renal failure on hemodialysis[J]. N Am J Med Sci, 2012, 4(2): 77-80.
- [2] Pavlides S, Gutierrez-Paiars JL, Danilo C et al. Atherosclerosis, caveolae and caveolin-1[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 729: 127-44.
- [3] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. Nature, 1993, 362(6423): 801-809.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 52-52.
- [5] 何根云. 丹参的药理作用与临床应用[J]. 浙江中西医结合杂志, 2011, 21(2): 124-25.
- [6] 张运. 动脉粥样硬化研究的当前问题[J]. 中国医药科学, 2012, 2(1): 9-11.
- [7] 殷治华, 杨秀兰. 动脉粥样硬化的发病机制假说—炎症学说[J]. 山西医药杂志, 2006, 35(4): 322-324.
- [8] 刘群峰, 马虹. 血管内皮细胞与心血管疾病的关系及其研究进展[J]. 心脏杂志, 2000, 12(2): 126-127.
- [9] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27(1): 165-197.

(收稿日期 2012-06-05)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对来稿中表、图的要求

来稿中的表、图均须置于正文中,切勿单独放于文后。每幅表、图应有言简意赅的题目。

统计表格一律采用“三线表”格式,不用纵线、斜线。要合理安排纵表的横标目,并将数据的含义表达清楚;若有合计或统计学处理行(如 F 值、P 值等),则在该行上面加一条分界横线;表内数据要求同一指标保留的小数位数相同。

图片应清晰,不宜过大。图的宽×高为 7cm×5cm,最大宽度半栏图不超过 7.5cm,通栏图不超过 17.0cm,高与宽的比例应掌握在 5:7 左右。

本刊编辑部