

丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 不同配比对肿瘤坏死因子 α 损伤大鼠心脏微血管内皮细胞的影响

张 萌¹, 张伯礼¹, 高秀梅¹, 郭利平², 杜 嵘^{1*}

(1. 天津中医学院 中医药研究中心, 天津 300193; 2. 天津中医学院第一附属医院, 天津 300193)

摘 要: 目的 观察不同配比的丹酚酸 B (SalB)、丹参酮 II_A (Tan II_A) 对体外肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 损伤大鼠心脏微血管内皮细胞 (CM EC) 的影响。方法 采用 CM EC 体外培养技术, 建立 TNF- α 损伤模型, 以细胞活力, 细胞培养液中乳酸脱氢酶 (LDH) 释放、一氧化氮 (NO) 合成、内皮素 (ET) 分泌、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及丙二醛 (MDA) 含量的变化为评价指标, 观察 SalB 和 Tan II_A 不同配比 (10 0, 8 2, 5 5, 2 8, 0 10) 对 TNF- α 损伤 CM EC 的保护作用。结果 SalB 和 Tan II_A (5 5) 组明显提高细胞活力, SalB 和 Tan II_A (8 2) 组显著降低 LDH 释放水平, Tan II_A 促进 NO 合成、降低 ET 分泌以及抗氧化的作用最好。结论 SalB 和 Tan II_A 的各配比组均能明显改善细胞的损伤, 最佳配比根据检测指标的不同而不同。

关键词: 丹酚酸 B; 丹参酮 II_A; 肿瘤坏死因子 α 心脏微血管内皮细胞

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0063-03

Effect of different proportions of salvianolic acid B and tanshinone II_A on rat cardiac microvascular endothelial cells injured by tumor necrosis factor α in vitro

ZHANG Meng¹, ZHANG Bo-li¹, GAO Xiu-mei¹, GUO Li-ping², DU Rong¹

(1. Research Center of Traditional Chinese Medicine, Tianjin College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. First Affiliated Hospital of Tianjin College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Key words: salvianolic acid B (SalB); tanshinone II_A (Tan II_A); tumor necrosis factor α (TNF- α); cardiac microvascular endothelial cells (CM EC)

丹参是常用的活血化瘀药, 广泛应用于心脑血管疾病的治疗。丹参的化学成分为水溶性酚酸和脂溶性二萜醌^[1]。丹酚酸 B (SalB) 是丹参的主要水溶性成分, 是非常强的抗氧化剂^[2], 不仅对心血管系统具有一定的保护作用, 还在体外逆转肝炎肝纤维化^[3]。丹参酮 II_A (Tan II_A) 是丹参主要脂溶性成分, 为萘醌类衍生物, 具有抗炎、抗氧化作用, 对心血管系统有较好的保护作用^[4]。

肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是由激活的巨噬细胞分泌的一类具有多种生物学效应的细胞因子。病理状态下 TNF- α 可损伤心功能、诱导心肌细胞凋亡^[5], 而且 TNF- α 血清水平的变化与多种心脏疾病相关^[6]。为寻找 SalB 与 Tan II_A 的最佳配比和各自作用的靶点, 本实验以 TNF- α 为刺激因素作用于体外培养的血管微血管内皮细胞 (CM EC), 观察 SalB-Tan II_A 不同配比对损伤 CM EC 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料: Wistar 乳鼠由天津药物研究院实验动

物室提供。SalB 纯度 80%; Tan II_A 纯度 80%, 均由清华大学分析中心提供。RPMI-1640 (Gibco, 美国); TNF- α (Sigma, 美国); 第 VIII 因子相关抗原抗体及免疫组化 SABC 染色试剂盒购自天津灏洋生物制品科技公司; 噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DM-SO, Sigma, 美国); LDH 检测试剂盒购自北京中生生物高技术公司; NO, SOD, MDA 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; ET 检测试剂盒购自北京北免东雅生物技术研究所。

1.2 CM EC 的培养与鉴定: 参照 Nishida 等方法略加改动^[7]。无菌条件下取出 Wistar 乳鼠心脏, D-Hanks 液冲洗, 去除大血管及结缔组织等。将心脏剪碎, 用 0.2% 胶原酶 (Sigma, 美国) 和 0.1% 胰蛋白酶 (Gibco, 美国) 37℃ 振荡消化 30 min, 分离下的细胞过 200 目网筛, 悬于含 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中 (内含青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μ g/mL)。调整细胞浓度至 $10^4 \sim 10^5$ /mL, 接种于 75 cm² 培养瓶中, 于 37℃, 5% CO₂ 培

* 收稿日期: 2003-06-07

基金项目: 国家重点基础研究发展规划“973”项目资助 (1999054403)

养箱中培养 2 h。去除未贴壁的细胞, 换含 10 mg/L ECGF (Sigma, 美国) RPM I-1640 培养液。每 2~3 d 换液 1 次, 直至细胞长成细胞单层, 铺满瓶底即可传代。取稳定生长的第 3 代细胞供实验用。第Ⅷ因子阳性鉴定培养的细胞为内皮细胞。

1.3 实验分组: 取细胞数均匀的 CMEC, 分种于 96 孔和 24 孔培养板孵育 24 h, 换既无血清又无 ECGF 的 RPM I-1640 培养液继续培养 24 h。随机分组, 分别加不同配比 (10 0, 8 2, 5 5, 2 8, 0 10) 的 Sal B 和 Tan II_A, 终浓度均为 250 μg/L。除对照组外, 每组同时加 TNF-α (终浓度 500 U/mL), 继续培养 24 h 后进行指标检测, 每组设 8 个平行孔。

1.4 样品检测: 取培养上清液以半自动生化分析仪测定 LDH 释放量; 取培养细胞以 MTT 比色法测定细胞活力; 取培养上清液以硝酸还原酶法测定 NO 含量; 取培养上清液用放免法测定 ET 释放水平; 取培养上清液用嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性; 取培养上清液用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量。

1.5 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 10.0 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 对 TNF-α 损伤 CMEC 的细胞活力、LDH 的影响: TNF-α 损伤 CMEC 后细胞活力明显降低, LDH 释放增加, Sal B 与 Tan II_A 能明显改善细胞的 TNF-α 损伤, 表现为细胞活力增强, LDH 释放减少。两者配伍后的作用优于单一药物。见表 1。

表 1 Sal B-Tan II_A 各配比组对 TNF-α 损伤 CMEC 的细胞活力和 LDH 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Table 1 Effect of different proportions of Sal B-Tan II_A on cell activity and LDH of CMEC injured by TNF-α ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	Sal B-Tan II _A	MTT/(A 值)	LDH/(U · L ⁻¹)
对照	0 0	0.120 ± 0.004	54.00 ± 8.47
TNF-α	0 0	0.090 ± 0.004*	68.63 ± 7.95*
Sal B	10 0	0.090 ± 0.002	51.25 ± 2.82
Sal B-Tan II _A	8 2	0.094 ± 0.003	43.75 ± 4.33
	5 5	0.104 ± 0.006	49.00 ± 5.45
	2 8	0.098 ± 0.004	54.38 ± 3.02
Tan II _A	0 10	0.092 ± 0.004	51.50 ± 1.85

与对照组比较: *P < 0.05

与 TNF-α 组比较: P < 0.05 P < 0.01

*P < 0.05 vs control group

P < 0.05 P < 0.01 vs TNF-α group

2.2 对 TNF-α 损伤 CMEC 的 NO, ET 的影响: 随着 Tan II_A 所占比例增加, NO 的产生随之升高, 提示 Tan II_A 有促进 NO 产生的作用; 各配比组均能减少 ET 释放, Tan II_A 的作用最显著。见表 2。

表 2 Sal B-Tan II_A 各配比组对 TNF-α 损伤 CMEC 的 NO 和 ET 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Table 2 Effect of different proportion of Sal B-Tan II_A on NO and ET of CMEC injured by TNF-α ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	Sal B-Tan II _A	NO/(μmol · L ⁻¹)	ET/(pg · mL ⁻¹)
对照	0 0	531.71 ± 41.23	58.60 ± 13.73
TNF-α	0 0	633.84 ± 33.64*	81.46 ± 7.90*
Sal B	10 0	570.12 ± 52.17	60.84 ± 9.64
Sal B-Tan II _A	8 2	689.03 ± 55.90	57.71 ± 12.55
	5 5	711.89 ± 40.83	66.72 ± 10.53
	2 8	708.54 ± 20.57	62.85 ± 8.50
Tan II _A	0 10	716.38 ± 32.20	54.72 ± 9.07

与对照组比较: *P < 0.05; 与 TNF-α 组比较: P < 0.05

*P < 0.05 vs control group; P < 0.05 vs TNF-α group

2.3 对 TNF-α 损伤 CMEC 的 SOD, MDA 的影响: TNF-α 损伤 CMEC 后, SOD 活性降低, MDA 含量明显增加, 提示 TNF-α 损伤与过氧化损害相关。Sal B-Tan II_A 的各配比组均有升高 SOD, 减少 MDA 的趋势。Tan II_A 抗氧化的能力最强。见表 3。

表 3 Sal B-Tan II_A 各配比组对 TNF-α 损伤 CMEC 的 SOD 和 MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Table 3 Effect of different proportion of Sal B-Tan II_A on SOD and MDA of CMEC injured by TNF-α ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	Sal B-Tan II _A	SOD/(U · mL ⁻¹)	MDA/(nmol · mL ⁻¹)
对照	0 0	45.49 ± 0.97	1.15 ± 0.102
TNF-α	0 0	44.94 ± 0.37	1.52 ± 0.18*
Sal B	10 0	45.92 ± 0.85	1.13 ± 0.17
Sal B-Tan II _A	8 2	45.51 ± 1.37	1.35 ± 0.17
	5 5	46.31 ± 1.15	1.37 ± 0.11
	2 8	45.75 ± 0.89	1.38 ± 0.08
Tan II _A	0 10	47.42 ± 1.47	0.90 ± 0.09

与对照组比较: *P < 0.05; 与 TNF-α 组比较: P < 0.05

*P < 0.05 vs control group; P < 0.05 vs TNF-α group

3 讨论

TNF-α 是具有多种生物学效应的细胞因子, 对心血管系统的作用主要包括, 增强黏附分子的表达, 释放内皮 NO, 提高血管通透性等^[8]。本研究结果表明, TNF-α 与 CMEC 共同孵育后 LDH 释放, ET 分泌及 MDA 含量均明显升高; 细胞活力显著降低; SOD 活性有降低的趋势。LDH 广泛存在于各种组织细胞的细胞浆中, 病理情况下细胞膜通透性增高, LDH 大量释放到细胞外。ET 是一种血管活性多肽, 是目前所知作用最强的长效血管收缩剂。MDA 为脂质过氧化产物, 可严重破坏细胞膜结构, 导致细胞肿胀、坏死。本实验结果提示 TNF-α 通过内皮分泌 ET 及脂质过氧化等作用导致 CMEC 损伤。

本实验观察 Sal B-Tan II_A 不同配比对 TNF-α

导致 CM EC 损伤的保护作用,从中发现不同配比的药效变化并寻找两者的最佳比例和各自作用的靶点。Sal B 由三分子丹参素和一分子咖啡酸组成,由于含有酚羟基,有很强的抗氧化作用^[9]。Tan II_A 为樱红色针状结晶,体外研究表明, Tan II_A 有较强的抗炎、抗氧化能力,可降低 TNF- α 诱导的升高的人脐静脉内皮细胞 ICAM-1 表达;抑制低密度脂蛋白的氧化^[10,11]。在 TNF- α 损伤条件下, Sal B 与 Tan II_A 各配比组均可提高 CM EC 活力,降低 LDH 释放,但单用的作用不如二者配伍后明显。Tan II_A 增加 NO 合成,减少 ET 释放的作用最显著。各配比组均有增强 SOD 活性,减少 MDA 产生的趋势,但以 Tan II_A 抗氧化的能力最强。提示不同中药组份的不同配比产生不同效应。

本实验重点研究组份的配比,从中分析方剂多组份配比与方剂配伍的相关性,揭示主要药效组份对主要靶点的影响规律及整体综合调节的生物学机制。这为在明确主靶点,强化主效应,降低负效应的基础上,建立以组份配伍研制现代复方中药的新模式,寻求高效可控的现代复方中药提供实验依据。

致谢:天津市南开医院同位素室王民宪主任协助检测 ET。

References

[1] Pan G X, Zhang B L, Qiao Y J. Determination of three war-

ter-soluble components of *Salvia miltiorrhiza* in Fufang Dan-Shen by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(10): 901-903.

- [2] Zhang J T. New drugs derived from medicinal plants [J]. *Therapie*, 2002, 57(2): 137-150.
- [3] Liu P, Liu C H, Wang H N, et al. Effect of salvianolic acid B on collagen production and mitogen-activated protein kinase activity in rat hepatic stellate cells [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2002, 23(8): 733-738.
- [4] Ng T B, Liu F, Wang Z T. Antioxidative activity of natural products from plants [J]. *Life Sci*, 2000, 66: 709-723.
- [5] Aikawa R, Nitta-Komatsubara Y, Kudoh S, et al. Reactive oxygen species induce cardiomyocyte apoptosis partly through TNF- α [J]. *Cytokine*, 2002, 18(4): 179-183.
- [6] Muller-Werdan U, Engelmann H, Werdan K. Cardiodepression by tumor necrosis factor- α [J]. *Eur Cytokine Netw*, 1998, 9(4): 689-691.
- [7] Nishida M, Carley W M, Gerritsen M E, et al. Isolation and characterization of human and rat cardiac microvascular endothelial cells [J]. *Am J Physiol*, 1993, 264: H639-H641.
- [8] Azzawi M, Hasleton P. Tumour necrosis factor alpha and the cardiovascular system: its role in cardiac allograft rejection and heart disease [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, 43: 850-859.
- [9] Liu G T, Zhang T M, Wang B E, et al. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes [J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, 43(2): 147-152.
- [10] Jiang K Y, Ruan C G, Gu Z L, et al. Effects of tanshinone II-A sulfonate on adhesion molecule expression of endothelial cells and platelets *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1998, 19(1): 47-50.
- [11] Niu X L, Ichimori K, Yang X, et al. Tanshinone II-A inhibits low density lipoprotein oxidation *in vitro* [J]. *Free Radic Res*, 2000, 33(3): 305-312.

甘遂醇提取物中 4 种二萜类化合物的体内抗病毒活性研究

郑维发*

(江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘要: 目的 阐明甘遂醇提取物中 4 种化合物: 甘遂大戟萜酯 A (I), 13-十一酰基-3-(2, 4-二甲基丁酰基) 巨大戟萜酯 (II), 3-(癸-2, 4-二烯酰基) 巨大戟萜酯 (III) 及甘遂萜酯 A (IV) 的体内抗病毒活性。方法 采用鼻吸入法以流感病毒亚甲型小鼠肺炎适应株 FM₁ 对小鼠造模, 对病毒感染小鼠分别 ig 4 种二萜类化合物, 以小鼠病毒感染肺指数的抑制率为体内抗病毒活性指标。以 ³H-TdR 渗入法测定 4 种二萜类化合物对小鼠淋巴细胞增殖反应的影响。结果 4 种化合物都表现出一定的体内抗病毒活性, I~IV 分别在 20, 40, 50, 30 mg/(kg·d) 以下, 抗病毒活性随剂量增加而增强; 3 种具有四环结构的 Ingenol 衍生物其体内抗病毒活性呈现出明显的构效关系, 在适当剂量下, C-13, C-20 有长链酰基的 I 和 II 表现出较强的体内抗病毒活性, 而这两个位点没有长链酰基的 III 仅表现出弱的抗病毒活性。在低浓度 (0.025~7.85×10⁻⁴ μg/mL) 下, 4 种二萜类化合物对 Con A 诱导的淋巴细胞增殖有显著的增强作用。结论 甘遂二萜类化合物中, C-13, C-20 有长链酰基的 Ingenol 衍生物有显著的体内抗病毒活性, 其抗病毒的机制可能主要是通过提高机体的细胞免疫来实现的。

关键词: 甘遂; 二萜类化合物; 抗病毒活性; 淋巴细胞增殖

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0065-04

* 收稿日期: 2003-04-27

基金项目: 江苏省政府青年科学基金资助项目 (BQ98040); 江苏省教育厅自然科学基金重点项目 (98KJBZ300001)。

作者简介: 郑维发(1962—), 男, 博士后, 硕士生导师, 教授, 主要从事天然产物成分化学和药理学研究。

Tel: (0516) 3403179 E-mail: yzw@xznz.edu.cn