

◦ 药理实验与临床观察 ◦

青心酮对肺动脉内皮细胞及红细胞生物力学特性的影响

黄云峰¹,叶笃筠²,吴 萍²,吴泽志^{3*}

(1. 武警湖北总队医院 麻醉科,湖北 武汉 430061; 2. 华中科技大学同济医学院 病理生理学教研室,湖北 武汉 430073; 3. 重庆大学生物工程研究院,重庆 400000)

摘 要:目的 观察青心酮对红细胞及肺血管内皮细胞生物力学特性的影响。方法 体外培养肺动脉内皮细胞,分对照组及青心酮大、中、小剂量处理内皮细胞,用微管吸吮技术观察细胞的变形过程。结果 与未用药组比较,在加用青心酮 30 min后,中、大剂量组内皮细胞弹性系数 K_1 和 K_2 增大,粘性系数 η 变化不大;红细胞表观变形指数和最大变形值也明显增加。结论 青心酮可以增加肺血管内皮弹性,并使红细胞变形能力明显增强,这可能是青心酮改善血液循环的生物力学机制。
关键词: 青心酮;微管吸吮;内皮细胞;红细胞
中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)07-0623-03

Effect of DHAP on biomechanic properties of pulmonary artery endothelial cells and erythrocytes

HUANG Yun-feng¹, YE Du-jun², WU Ping², WU Ze-zhi³

(1. Department of Anesthesiology, Hospital of Hubei General Team of Armed Police Troop, Wuhan 430061, China; 2. Department of Pathophysiology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430073, China; 3. Institute of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400000, China)

Abstract **Object** To observe the effects of 3,4-dihydroxyacetophenol (DHAP) on biomechanic properties of cultured pulmonary artery endothelial cells and isolated erythrocytes. **Methods** Cultured *in vitro* pulmonary artery endothelial cells were treated with large-, middle- and small-doses of DHAP, and a control group was set up. The deformation process was observed using micropipette aspiration technique. **Results** Compared with the control group, the elastic coefficient K_1 and K_2 of endothelial cells in large- and middle-dose groups increased significantly, while the viscosity coefficient changed insignificantly in 30 min of giving DHAP. The apparent deformation index and maximum deformation value of erythrocytes also increased markedly. **Conclusion** DHAP can increase pulmonary blood vessel endothelial elasticity and erythrocyte deformability obviously, thus improving the blood circulation.
Key words 3,4-dihydroxyacetophenol (DHAP); micropipette aspiration; endothelial cells; erythrocyte

青心酮又名 3,4-二羟基苯乙酮 (DHAP),是从中药秃毛冬青叶中提取的一种有效成分,临床上已将其用于妊高症 (PIH)、胎儿宫内发育迟缓 (IUGR) 及慢性阻塞性肺疾患 (COPD) 等的治疗,用于改善血液循环取得了良好疗效^[1-3]。其作用机制较复杂,如促使 PG_I的合成,抑制血小板聚集,增加内皮细胞延迟整流钾电流等^[4,5]。但青心酮对血管和红细胞生物力学特性的直接影响尚无文献报道。本文探讨青心酮对血管和红细胞生物力学特性的影响,旨在

日益为人们所重视。其中剪切力对血管的作用最受关注,目前认为剪切力是与心血管疾病最相关的血流动力学因素^[6]。而血管内皮细胞 (VEC) 及血液细胞对剪切力的反应十分复杂,其粘弹性、变形性等生物力学特性可以影响其对剪切力的反应。那么,一些改善血液循环的药物如 DHAP 能否通过调节血管内皮细胞或红细胞对剪切力的响应起作用,值得探讨。本实验应用微管吸吮技术,观察了 DHAP 对血管内皮细胞和红细胞的生物力学特性的影响,旨

* 收稿日期: 2001-12-12
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30070929)
作者简介: 黄云峰 (1974-),男,主治医师,硕士学位,2000年毕业于华中理工大学同济医学院,2000年 7月在武汉武警总医院麻醉科工作至今。

在从生物力学角度探索活血化瘀中药的作用机制

1 材料与方法

1.1 材料: 2周龄雄性 Wistar大鼠 (第三军医大学实验动物中心), 体重 80~ 100 g, DHAP (北京制药工业研究所), DMEM (高糖, Hyclone), FB (Hyclone), 胰蛋白酶 (GIBCO), 胶原酶 (GIBCO), PBS Hands 液 (自配) 倒置显微镜 (Axiover 35, Zeiss Co.), 微管控制器 (P97, Sutter Instrument Co.), CO培养箱

1.2 肺动脉内皮细胞培养: 按文献^[4]方法取大鼠肺动脉中段, 用酶消化法获取内皮细胞进行培养, 待细胞长满瓶底后进行传代。

1.3 微管吸吮操作: 将约 0.5 mL 细胞悬液注入一特定的圆形小室内, 置于倒置显微镜载物台上。微管与显微操作器相连并通过它连接于压力控制和记录系统。利用显微操作器控制微管尖端靠近细胞表面, 使细胞的一小部分吸入微管。细胞在微管内变形过程由图像处理仪记录, 并通过回放所记录的图像测量细胞的变形值。

1.4 内皮细胞粘弹性模型和红细胞变形性分析: 参照 Sung^[6]等的方法, 采用标准线性固体模型即 Kelvin 模型分析内皮细胞粘弹特性。该模型用本构方程表示为 $\sigma_{ij} + \mu / K \dot{\sigma}_{ij} = \epsilon_{ij} + \epsilon_{ij} \mu (1 + K_1 + K_2)$, K_1 和 K_2 代表瞬间产生与负荷成正比的变形, 主要反映细胞的初始变形程度, μ 代表任一瞬间产生与负荷成正比的变形速度, 反映了细胞变形对时间的依赖性。本实验以 $K_1 / (K_1 + K_2)$ 作为衡量细胞弹性指标, 以 $\mu / (K_1 + K_2) / K$ 作为细胞蠕变时间, 以此分析内皮细胞粘弹性变化。将红细胞吸吮实验数据按文献^[6]进行归一化处理后, 定义了一个表观变形指数 (apparent deformability index, ADI), 即单位负压下被吸入管内的红细胞长度与微管内径之比, 以 ADI 表示红细胞通过微管的能力。用最大变形 (D_{max}) 反映其变形性。

1.5 给药方法: 将传代 3~ 4 次的 PAEC 用胰蛋白酶消化后, 用 DMEM 培养液清洗吹打分离后随机分成对照组、DHAP 小剂量 (1.32×10^{-5} mol/L) 中剂量 (1.32×10^{-4} mol/L) 和大剂量 (6.60×10^{-4} mol/L) 4 组。抽取大鼠血液, 抗凝离心分离出红细胞后, 再用等渗液稀释至 1 500 /mL, 按上述方法分组和给药, 给药后温育 30 min 后行微管吸吮。

2 结果

2.1 DHAP 对培养 PAEC 粘弹特性的影响: 肺血管内皮细胞于 2.940 N/m^2 的阶跃负压作用下, 在微管内变形经历了一个初始快速响应和其后稳定增加的时间过程, 测得对照组和 DHAP 不同剂量组 PAEC 弹性系数 K_1 、 K_2 和粘性系数 μ 值 (见表 1),

DHAP 小剂量组与对照组无显著差异。

表 1 DHAP 对肺血管内皮细胞粘弹特性的影响 ($n=120, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mol/L)	K_1 (dyn/cm ²)	K_2 (dyn/cm ²)	μ (dyn·s/cm ²)
对照	—	492.03±116.51	363.76±98.51	196.35±126.48
DHAP	1.32×10^{-5}	524.3±113.70	360.35±127.73	203.29±78.99
	1.32×10^{-4}	543.94±69.11*	427.13±113.31*	150.08±39.15*
	6.60×10^{-4}	509.92±229.19*	560.14±144.43**	185.59±74.71

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

2.2 DHAP 对红细胞变形性的影响: 在微管内, 大鼠红细胞于 98~ 196 Pa 的负压作用下, 首先经历 200~ 300 ms 的快速变形, 然后, 呈缓慢稳定增加历程, 测得正常对照和 DHAP 不同剂量组红细胞 ADI 和 D_{max} , 见表 2。

表 2 DHAP 对大鼠红细胞变形性的影响 ($n=120, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mol/L)	ADI	D_{max} (μm)
对照	—	0.88±0.15	0.77±0.14
DHAP	1.32×10^{-5}	1.08±0.21	1.17±0.15
	1.32×10^{-4}	1.68±0.21*	1.9±0.32
	6.60×10^{-4}	4.56±0.86	5.36±1.01*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

3 讨论

血液的流动对 VEC 施加各种物理力, 如剪切力、周期性牵拉力及血液静水压力等。细胞生物力学研究表明, 剪切力对 VEC 的生物学效应产生影响尤为明显, 有人认为剪切力是与心血管疾病最相关的血流动力学因素^[6]。另一方面, 血管内的红细胞的变形能力对维持血管中的正常流态, 保证微循环灌注, 以及器官、组织氧和营养物质的供应是十分必要的^[7]。因而, 研究活血化瘀中药对 VEC 和 RBC 的生物力学的影响, 以阐明其药理作用机制具有重要的理论和实用价值。

微管吸吮技术被认为是一种评价单个细胞变形的重要手段^[5]。本研究发现, 在一定负压的作用下, DHAP 使 PAEC 粘弹系数 K_1 、 K_2 呈剂量依赖性增加, 而粘性系数 μ 变化不大。根据 Kelvin 模型推导, K_1 与细胞的最大变形成反比, K_1 越大, 其最大变形越小, 细胞的刚性和弹性阻力越大; 而 $K_1 + K_2$ 与细胞的初始变形成反比, $K_1 + K_2$ 越大, 其初始变形越小, 刚性也越大。这提示 DHAP 使肺动脉 EC 之弹性响应降低。DHAP 增加 VEC 刚性, 降低细胞的最大变形能力, 这有利于减少血流对 VEC 的损伤作用。而 DHAP 降低 VEC 弹性响应能力, 这使 VEC 在心血管周期收缩运动中, 对相同血流流动、压力产生的剪切应变变小和缓和。这种剪切应变的变化可以缓冲血液流动剪切力对血管壁的损害, 维护血液的正常灌注。

与 DHAP 对 VEC 上述生物力学特性影响不

同, DHAP明显增加红细胞的 ADI和 D_{max} ,表明 DHAP能增加红细胞变形性,这有利于红细胞通过毛细血管,减少细胞间的叠连,降低血液粘度,疏通微循环,从而活血化瘀。这一现象与以往临床观察发现 DHAP能改善 IUGR患者血液流变学的结果相吻合^[1]。总之,本结果表明, DHAP改善微循环的作用,不仅与其增强 VEC刚性和降低其弹性,加强其屏障作用有关,同时也与 DHAP增加红细胞变形性有关。本实验将生物力学概念引入血液流变学相关研究,从细胞变形性、粘弹性变化的角度分析了活血化瘀中药的可能作用机制,具有重要的理论和实用价值,也是血液流变学活性药物筛选的一种实用方法。

参考文献:

[1] 黄引平,马庭元. 青心酮治疗胎儿宫内生长迟缓的临床疗效及

作用机理的研究[J]. 中华妇产科杂志, 1993, 28(3): 333-336.
 [2] 黄引平,叶笃筠,马庭元,等. 青心酮对妊娠高征患胎盘血管壁一氧化氮合成和血浆内皮素的影响[J]. 中华妇产科杂志, 1996, 31: 667-670.
 [3] 洪志刚,叶笃筠,刘声远. 青心酮对豚鼠气道反应性影响[J]. 实用肺科杂志, 1998, 5(4): 12-14.
 [4] 潘德顺,于江洲,郝天玲,等. 红细胞生成素 α 3'-增强子片段对内皮细胞低氧时环加氧酶-2基因表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1998, 14(6): 608-611.
 [5] 冯元桢. 生物力学: 活组织的力学特性[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1986.
 [6] Eskin S G, McIntire L V. Hemodynamic effects in atherosclerosis and thrombosis[J]. Semin Thromb Hemost, 1988, 14: 170-174.
 [7] Kuchan M J, Frangos J A. Role of calcium and calmodulin in force-induced nitric oxide production in endothelial cells [J]. Am J Physiol, 1994, 266: 628-636.

槲皮素对重组人蛋白激酶 CK2全酶的抑制作用及其动力学分析

刘新光,梁念慈*

(广东医学院生物化学与分子生物学研究所,广东 湛江 524023)

摘要: 目的 观察槲皮素对重组人蛋白激酶 CK2全酶的直接作用及其酶动力学机制。方法 利用基因工程克隆、表达和纯化获得重组人蛋白激酶 CK2 α 和 β 亚基,在体外等摩尔数混合构成有最大生物活性的重组 CK2全酶,在不同条件下测定 CK2的活性。CK2活性通过测定转移到 CK2底物上的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的 ^{32}P 放射活度来检测。结果 重组人蛋白激酶 CK2是一种 Ca^{2+} 、cAMP和 cGMP等第二信使非依赖性蛋白激酶,与天然 CK2的性质一致。槲皮素对重组人 CK2全酶具有很强的抑制作用, IC_{50} 为 522 nmol/L,抑制作用大于 CK2已知抑制剂 DRB和 A3。槲皮素对重组人蛋白激酶 CK2的动力学研究表明:它与 ATP和酪蛋白分别呈竞争性和非竞争性抑制作用。结论 槲皮素是 CK2有效抑制剂,该抑制作用可能是槲皮素抗肿瘤作用又一分子机制,为今后筛选更有效的 CK2抑制剂提供了一种较为简便的筛选方法。

关键词: 蛋白激酶 CK2;重组蛋白;全酶;槲皮素; IC_{50} ;酶动力学

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)07-0626-04

Inhibitory effect of quercetin on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme and its kinetics analysis

LIU Xin-guang, LIANG Nian-ci

(Institute of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract **Object** To study the direct effect of quercetin on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme and its kinetics. **Methods** Recombinant human protein kinase CK2 α and β subunits were cloned and expressed by gene engineering, and were purified. The two subunits were mixed at the same molar ratio, thus reconstituting CK2 holoenzyme, which displayed the maximum bioactivity. The CK2 activity was assayed by detecting incorporation of ^{32}P of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ into the substrate in the various condi-

* 收稿日期: 2001-10-08
 基金项目: 广东省自然科学基金 (011766); 广东医学院标志性成果扶持项目
 作者简介: 刘新光 (1964-),男,江西九江人,博士,副教授,硕士生导师,现任广东医学院医学检验系副主任,生化教研室主任。1999年毕业于中山医科大学生物化学与分子生物学专业,获医学博士学位。主要研究方向是肿瘤生化、蛋白激酶的分子生物学与生药理学。目前负责省、厅、市和学院级科研项目 7项,以第一作者发表科研论文 26篇,获湛江市科技进步一等奖 1项 (第一完成人)。Tel (0759) 2388582,个人主页 <http://home.gdmc.edu.cn/jyx/fjian/person/lxg.htm> E-mail: xig.liu@gdmc.edu.cn