

川芎嗪对花生四烯酸诱导血管内皮细胞凋亡的保护作用

王^{1,2}, 周 新^{1*}, 汪炳华², 张 冀², 陈丽达², 李小明^{2*}

(1. 武汉大学中南医院 基因诊断中心, 湖北 武汉 430071;

2. 武汉大学医学院生物化学与分子生物学系, 湖北 武汉 430071)

摘要:目的 研究川芎嗪 (TMP) 对花生四烯酸 (AA, 160 $\mu\text{mol/L}$) 诱导的血管内皮细胞株 ECV304 损伤和凋亡的保护作用及其机制。方法 MTT 法检测细胞存活率, 比色法测乳酸脱氢酶 (LDH) 释放率和细胞丙二醛 (MDA) 含量, Hoechst 33258 荧光染色法观察细胞核形态变化并测定细胞凋亡率, 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 降解。结果 TMP (0.25~1.0 mmol/L) 能浓度依赖性地抑制 AA 引起的细胞存活率下降 ($P < 0.05$), 并降低细胞 LDH 释放率和 MDA 含量 ($P < 0.05$)。AA 处理 24 h 后的细胞呈典型的凋亡核固缩表现, 凝胶电泳显示 DNA 凋亡梯带, TMP (0.25~1.0 mmol/L) 能降低其凋亡率 ($P < 0.05$)。结论 TMP 对 AA 引起的 ECV304 细胞损伤和凋亡具有保护作用, 其机制可能与其抗脂质过氧化作用有关。

关键词: 川芎嗪; 花生四烯酸; 内皮细胞; 细胞凋亡; 脂质过氧化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)02-0177-04

Protective effect of tetramethylpyrazine against apoptosis of vascular endothelial cells induced by arachidonic acid

WANG Yun^{1,2}, ZHOU Xin¹, WANG Bing-hua², ZHANG Ji², CHEN Li-da², LI Xiao-ming²

(1. Gene Diagnosis Center of Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: **Object** To study the protective effect of tetramethylpyrazine (TMP) against apoptosis of vascular endothelial cell line ECV304 induced by 160 $\mu\text{mol/L}$ arachidonic acid (AA). **Methods** The viability and damaged degree of ECV304 cells were monitored by MTT assay. The release of lactate dehydrogenase (LDH) and malondialdehyde (MDA) content in ECV304 cells were measured by colorimetric assay. Hoechst 33258 dyeing was used to observe AA-induced morphological changes and count apoptotic ratio. Agarose gel electrophoresis was used to detect DNA fragmentation. **Results** TMP (0.25~1.0 mmol/L) prevented the inhibitory effect of viability induced by AA ($P < 0.05$). TMP (0.25~1.0 mmol/L) partly prevented the increase in the release of LDH and MDA contents induced by AA ($P < 0.05$). Cells treated by 160 $\mu\text{mol/L}$ AA showed typical morphological changes of apoptosis. A "DNA ladder" was also observed. TMP (0.25~1.0 mmol/L) partly decreased the ratio of apoptotic cells ($P < 0.05$). **Conclusion** TMP has protective effect on injury and apoptosis of ECV304 cells induced by AA and the mechanism of its action would be related to antilipid peroxidation.

Key words: tetramethylpyrazine; arachidonic acid; endothelial cells; cell apoptosis; lipid peroxidation

近年研究表明, 血管内皮细胞凋亡在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 病变的发生、发展过程中具有重要作用^[1], 因此, 抗血管内皮细胞凋亡药物的研究将为临床防治 AS 提供新途径。实验发现, AS 斑块处积聚的大量游离花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 能诱导动脉壁中多种细胞凋亡, 其机制可能与其促细胞脂质过氧化作用有关^[2~4]。川芎嗪又称四甲基吡嗪 (tetramethylpyrazine, TMP),

是从川芎总生物碱中提取的有效成分。研究表明 TMP 对缺血再灌注损伤所致肾脏细胞凋亡具有保护作用^[5]。本实验应用 AA 诱导血管内皮细胞株 ECV304 凋亡, 观察 TMP 对 ECV304 细胞凋亡的保护作用并探讨其可能机制。

1 材料

DMEM 培养基、新生小牛血清 (calf serum, CS), Gibco 公司产品; 花生四烯酸 (AA), Sigma 公

* 收稿日期: 2003-06-09

基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目 (NO2003ABA188)

作者简介: 王 (1975—), 女, 上海人, 2001 级在读博士研究生, 主要从事动脉粥样硬化分子机制的研究。

* 通讯作者 Tel: (027) 87317802 E-mail: zhousxyk@public.wh.hb.cn

司产品 (HPLC, 纯度 $\geq 95\%$), 用无水乙醇溶解, 临用前用无血清 DMEM 培养基稀释, 其中乙醇终浓度低于 0.25% (此浓度对细胞无毒性); 盐酸川芎嗪 (TMP), 北京第四制药厂生产, 批号 010723, 临用前用无血清 DMEM 培养基稀释; Hoechst 33258、胰蛋白酶 (1:250)、噻唑蓝 (MTT)、蛋白酶 K 等, Sigma 公司产品; TritonX-100, Bio-Rad 公司产品; 丙二醛 (MDA) 检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所产品; 其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 细胞培养: 血管内皮细胞株 ECV304 购自武汉大学典型生物保藏中心。将 ECV304 细胞接种于含 10%CS, 100 U/mL 青霉素, 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基 (pH 7.2) 中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养, 取对数生长期细胞用于实验。

2.2 MTT 法检测细胞存活率: 将生长良好的 ECV304 细胞制备成 $5\times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液, 按每孔 0.1 mL 接种于 96 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 温育 24 h 后换无血清培养基继续培养 24 h, 使细胞同步化至 G₁ 期, 然后随机分为 8 组: 正常对照组加无血清 DMEM 培养基; AA 损伤组加入终浓度为 160 $\mu\text{mol/L}$ AA; TMP 组分别加入终浓度为 0.25, 0.50, 1.00 mmol/L TMP; TMP 保护组先分别加入 0.25, 0.50, 1.00 mmol/L TMP 预保护 3 h 后, 再加入 AA 160 $\mu\text{mol/L}$ 。各组细胞作用 24 h 后, 每孔加入 MTT (5.0 g/L) 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 弃上清液, 每孔加入二甲基亚砷 100 μL , 静置 30 min 后于波长 570 nm 处测定吸光度 ($A_{570\text{nm}}$) 值, 以 $A_{570\text{nm}}$ 值表示细胞存活率。

2.3 乳酸脱氢酶 (LDH) 释放率测定: ECV304 细胞以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 接种于 24 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 温育 24 h, 无血清同步化处理后随机分组同 2.2 项。作用 24 h 后, 收集培养上清液, 每孔加入 0.5 mL 细胞裂解液 (150 mmol/l NaCl, 150 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1% TritonX-100), 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 15 min 后振荡数分钟, 收集细胞裂解液, 用比色法分别测定培养上清液和细胞裂解液中的 LDH 活性, 计算 LDH 释放率。

LDH 释放率= 上清液中 LDH 活性/(上清液中 LDH 活性+ 细胞裂解液中 LDH 活性) $\times 100\%$

2.4 MDA 含量测定: ECV304 细胞以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 接种于 24 孔板, 细胞处理及分组同 2.3 项。作用 24 h 后, 弃去培养基, 用 PBS 洗 3 次后每孔加入 0.5 mL 细胞裂解液, 待细胞充分裂解后, 参照 MDA 检

测试剂盒说明书测定细胞 MDA 含量。细胞蛋白质定量采用 Lowry 法。

2.5 细胞凋亡的检测

2.5.1 Hoechst 33258 荧光染色法观察细胞核形态变化: ECV304 细胞以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 接种于直径为 35 mm 培养皿中, 细胞处理及分组同 2.2 项。作用 24 h 后, 细胞用预冷 PBS 洗 3 次, 4% 预冷多聚甲醛室温固定 30 min 并轻微搅拌, 预冷 PBS 洗 3 次后用终浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 DNA 染料 Hoechst 33258 室温避光染色 5 min, PBS 洗 3 次后于荧光显微镜下 (激发光波长 340 nm) 观察并拍照。每个培养皿任选 10 个视野计数固缩核和细胞核总数来计算细胞凋亡率。

细胞凋亡率= 固缩核数/细胞核总数 $\times 100\%$

2.5.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 降解: ECV304 细胞以 $1\times 10^6/\text{mL}$ 接种于 50 mL 培养瓶中, 细胞处理及分组同 2.2 项。收集作用 24 h 后的各组细胞, 参照文献^[6]方法提取 DNA, 加 TE 缓冲液充分溶解后在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭染色后于紫外灯下观察并拍照。

2.6 统计学分析: 实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用方差分析和 t 检验判定差异显著性。

3 结果

3.1 TMP 对正常及 AA 损伤 ECV304 细胞存活率的影响: 与正常对照组比较, 各浓度 TMP 对 ECV304 细胞的 $A_{570\text{nm}}$ 值无显著影响 ($P> 0.05$): 160 $\mu\text{mol/L}$ AA 处理的细胞 $A_{570\text{nm}}$ 值明显低于正常对照组 ($P< 0.01$); 而 TMP (0.25~1.00 mmol/L) 可浓度依赖性地减轻 AA 引起的 $A_{570\text{nm}}$ 值的下降 ($P< 0.05$)。结果见表 1。

表 1 TMP 对 ECV304 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n= 6$)

Table 1 Effect of TMP on viability of ECV304 cells ($\bar{x}\pm s$, $n= 6$)

组 别	AA	TMP	$A_{570\text{nm}}$
	$I/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$I/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	
正常对照	0	0	0.85 ± 0.06
AA 损伤	160	0	$0.42\pm 0.11^{**}$
TMP	0	0.25	0.83 ± 0.09
	0	0.50	0.79 ± 0.16
	0	1.00	0.80 ± 0.14
TMP 保护	160	0.25	$0.56\pm 0.08^{**}\triangle$
	160	0.50	$0.61\pm 0.11^{*}\triangle$
	160	1.00	$0.69\pm 0.18^{*}\triangle$

与正常组比较: * $P< 0.05$ ** $P< 0.01$

与 AA 损伤组比较: $\triangle P< 0.05$

* $P< 0.05$ ** $P< 0.01$ vs normal group

$\triangle P< 0.05$ vs AA injured group

3.2 TMP 对 AA 损伤的 ECV 304 细胞释放 LDH 和细胞 MDA 含量的影响: 160 $\mu\text{mol/L}$ AA 处理的细胞的 LDH 释放率和细胞 MDA 含量显著高于正常对照组 ($P < 0.01$); TMP (0.25~1.0 mmol/L) 可部分抑制 AA 引起的 LDH 释放率和细胞 MDA 含量增加 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 TMP 对 ECV304 细胞释放 LDH 和细胞 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effect of TMP on release of LDH and MDA content of ECV304 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)			
组 别	TMP /(mmol · L ⁻¹)	LDH 释放率 /%	细胞 MDA 含量 /($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)
正常对照	0	18.4 ± 2.6	1.95 ± 0.08
AA 损伤	0	66.4 ± 5.8* *	3.48 ± 0.12* *
TMP	0.25	18.2 ± 2.3	1.97 ± 0.13
	0.50	17.9 ± 2.8	1.93 ± 0.07
	1.00	18.5 ± 3.1	1.89 ± 0.09
TMP 保护	0.25	52.3 ± 4.5* * △	3.12 ± 0.06* * △
	0.50	46.8 ± 8.6* △	2.91 ± 0.15* △
	1.00	40.2 ± 5.1* △△	2.59 ± 0.17* △△

与正常对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
与 AA 损伤组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs normal group
△ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ vs AA injured group

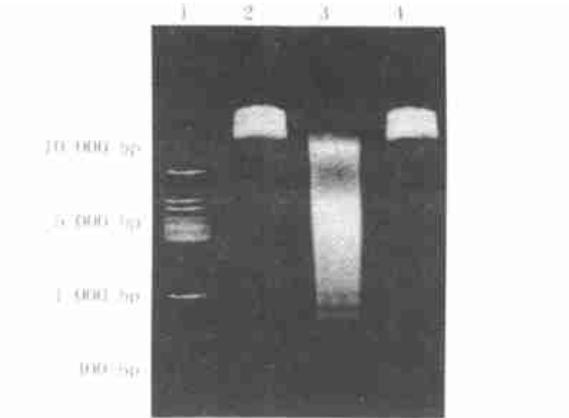
3.3 TMP 对 AA 诱导 ECV304 细胞凋亡的影响

3.3.1 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡率: 细胞经 Hoechst 33258 染色后, 正常对照组细胞核较大且染色均匀; 160 $\mu\text{mol/L}$ AA 处理 24 h 后的 ECV304 细胞核内可见浓染致密的颗粒状荧光, 呈现出凋亡细胞典型的核固缩、核碎裂表现, 其细胞凋亡率为 56.3%; TMP 保护组细胞核形态趋于正常, 0.25, 0.50, 1.00 mmol/L TMP 能使细胞凋亡率分别降至 49.6%, 44.8%, 39.4%。

3.3.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱: 160 $\mu\text{mol/L}$ AA 处理 24 h 后的 ECV304 细胞可观察到典型的凋亡阶梯状 DNA 区带图谱 (DNA ladder); 正常对照组细胞 DNA 未出现类似改变; 1.0 mmol/L TMP 保护组的 DNA 梯状条带变浅, 介于正常组与 AA 损伤组之间, 见图 1。

4 讨论

AA 是一种多不饱和脂肪酸, 通常以酯化的形式存在于膜磷脂的 sn-2 位上。细胞受到外界刺激时, 通过活化磷脂酶 A₂ 水解膜磷脂而释放游离 AA^[2]。AA 在脂加氧酶 (LPO) 的催化下生成脂质过氧化物 (LOOH), LOOH 可分解为包括 MDA 在内的多种细胞毒性终产物; 此外, LOO· 还可通过环氧化作用进一步攻击蛋白质、核酸和具有双键的



1-DNA ladder 2-正常对照组细胞 3-160 $\mu\text{mol/L}$ AA 损伤组细胞 4-1.0 mmol/L TMP 预保护组细胞
1-DNA ladder 2-normal cells 3-cells treated with 160 $\mu\text{mol/L}$ AA 4-cells pretreated with 1.0 mmol/L TMP

图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig. 1 Agarose gel electro-phoresis of DNA

不饱和化合物, 同时产生更多的自由基^[7]。因而, 脂质过氧化是 AA 发挥其细胞毒和致凋亡作用的重要机制之一^[2~4, 6]。本实验结果显示, 经 160 $\mu\text{mol/L}$ AA 处理的 ECV304 细胞的 MDA 含量较正常组细胞显著增加, 表明 AA 损伤 ECV304 细胞及其致凋亡效应与其促进细胞脂质过氧化作用密切相关。

TMP 是从中药川芎中提取的有效生物碱四甲基吡嗪。研究表明 TMP 能清除氧自由基, 拮抗 H₂O₂ 引起的血管内皮细胞氧化损伤^[8]。本实验为研究 TMP 能否拮抗 AA 对内皮细胞的损伤, 在加 AA 前 3 h, 先加入 TMP 进行预保护。实验结果显示, TMP 能浓度依赖性地抑制 AA 引起的细胞存活率降低、LDH 释放增加及 ECV304 细胞凋亡。文献报道 TMP 能促进正常血管内皮细胞增殖^[8], 因此, 本实验也检测了 TMP 对正常 ECV 304 细胞增殖的影响, 结果表明 TMP 对正常 ECV 304 细胞的 A₅₇₀ 值无明显影响, 提示其未影响 ECV304 细胞的生长和增殖, 从而排除因 TMP 促进 ECV 304 细胞增殖而造成其抗凋亡假象的可能。本实验首次发现 TMP 在一定程度上能拮抗 AA 致血管内皮细胞凋亡, 为该药临床用于 AS 治疗提供有益的实验依据。文献报道 TMP 能通过增加 SOD 活性, 减轻脂质过氧化损伤来抑制细胞凋亡^[5]。本实验也发现, 随着 TMP 浓度的增加, AA 所致的 ECV304 细胞 MDA 生成量也相应减少, 与其相应浓度下抑制 A₅₇₀ 值下降、LDH 释放率增加及凋亡率等变化相一致, 提示 TMP 抗 AA 诱导 ECV304 细胞凋亡可能与其抗脂质过氧化作用有关, 但其详细机制还有待进一步研究。

References:

- [1] Dimmeler S, Hermann C, Zeiher A M. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to pathophysiology of atherosclerosis [J]. *Eur Cytokine Netw*, 1998, 9(4): 697-698.
- [2] Kalyankrishna S, Parmentier J H, Malik K U. Arachidonic acid-derived oxidation products initiate apoptosis in vascular smooth muscle cells [J]. *Prostag Oth Lipid M*, 2002, 70(1): 13-29.
- [3] Herbst U, Toborek M, Kaiser S, *et al*. 4-Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells [J]. *J Cell Physiol*, 1999, 181(2): 295-303.
- [4] Das U N. Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis [J]. *Prostag Leukot Ess Fatty Acids*, 1999, 61(3): 157-163.
- [5] Sun L J, Li Y J, Shi J S. Influence of ligustrazine on cell apoptosis in rat kidneys with ischemia-reperfusion injury [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2002, 23(18): 1683-1685.
- [6] Wang Y, Wang B H, Dai Z M, *et al*. Induction of apoptosis in mouse fibroblast cell line L929 by arachidonic acid [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2003, 19(6): 825-828.
- [7] Spiteller G. Are changes of the cell membrane structure causally involved in the aging process? [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2002, 959: 30-44.
- [8] Lin R, Liu J T, Li X, *et al*. Protective effect of tetramethylpyrazine on vascular endothelial cell injured by hydrogen peroxide [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2000, 14(6): 425-429.

复方决明提取物的降压作用机制研究

陈素红¹, 吕圭源², 施斌³, 李万里², 张丽英^{2*}

(1. 上海中医药大学, 上海 210032; 2. 浙江中医学院, 浙江 杭州 310053; 3. 复旦大学药学院, 上海 210032)

摘要: 目的 探讨复方决明提取物抗高血压的作用机制。方法 放射免疫分析法测定自发性高血压大鼠 (SHR) 血浆中血管紧张素 II (ANG II) 和肾素活性 (RA)、内皮素 (ET)、心钠素 (ANP)、醛固酮 (ALD) 等血压相关物质的含量, 利尿实验测定尿量。结果 不同剂量的复方决明提取物均能降低 SHR 大鼠血浆的 ANG II 含量和 RA, 但对 ALD, ET, ANP 及尿量均无影响。结论 复方决明提取物的降压作用与降低肾素-血管紧张素有关, 而与 ALD, ET, ANP 及尿量无明显关系。

关键词: 复方决明提取物; 高血压; 血管紧张素 II; 肾素活性; 醛固酮; 心钠素; 内皮素

中图分类号: R286.24 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)02-0180-03

Studies on mechanism of antihypertension effect of extracts from Compound Jueming

CHEN Su-hong¹, LÜ Gui-yuan², SHI Bin³, LI Wan-li², ZHANG Li-ying²

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 210032, China; 2. Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China; 3. College of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 210032, China)

Abstract: **Object** To probe into the antihypertension activity mechanism of extracts from Compound Jueming (CJ). **Methods** The method of radioimmunoassay was used to assay the concentration of the related substances on spontaneously hypertensive rats (SHR) such as angiotensin II (ANG II), renin activity (RA), endothelin (ET), atrial natriuretic polypeptide (ANP), aldosterone (ALD), and urine. **Results** All of the three doses (9.5, 7.2, and 4.8 g/kg) of extracts from CJ reduced ANG II and RA, but had no influence on ALD, ET, ANP, and urine in SHR. **Conclusion** The antihypertension effect of extracts from CJ is related to decreasing of renin-angiotensin, but not to ALD, ET, ANP, and urine.

Key words: extracts from Compound Jueming (CJ); hypertension; angiotensin II (ANG II); renin activity (RA); aldosterone (ALD); atrial natriuretic polypeptide (ANP); endothelin (ET)

复方决明提取物是对具有降压作用的中药经动物实验筛选, 按照中医药理论以决明子为主进行组方, 用现代提取工艺制得。本研究在药效实验的基础

上, 通过测定血浆中血管紧张素 II (ANG II) 和肾素活性 (RA)、内皮素 (ET)、心钠素 (ANP)、醛固酮 (ALD) 等血压相关物质的含量及尿量, 探讨复

* 收稿日期: 2003-07-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39470860)

作者简介: 陈素红 (1973—), 女, 浙江金华人, 主管药师, 浙江中医学院中药学硕士毕业, 2001 年考入上海中医药大学攻读中药学博士学位, 现主要参与国家十五重大科技专项 (863 计划, 2003AA2Z3254)、教育部重点项目 (2000176) 及浙江省自然科学基金重大项目等课题的研究, 从事心血管中药药理研究及中药新产品开发。Tel: (0571) 86613601 E-mail: chensuhong@x263.net